

Ендофітні бактерії картоплі *in vitro*, активовані екзогенними непатогенними бактеріями

О. В. Подоліч, П. Є. Арданов¹, Т. М. Вознюк¹, М. В. Ковальчук¹,
О. В. Данильченко¹, В. В. Лащевський², С. А. Лященко³, Н. О. Козировська¹

Інститут агроєкології УААН
Вул. Метрологічна, 12, Київ, 03143, Україна

¹ Інститут молекулярної біології та генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

² Інститут мікробіології та вірусології НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 156, Київ, 03143, Україна

³ Інститут картоплярства УААН
смт. Немішаєве Київської обл.

olgapdl@yahoo.com

*Мікробіологічним і незалежним від культивування бактерій методами показано присутність як культивованих, так і некультивованих форм ендофітних бактерій у рослинах — регенерантах картоплі, які вирощують за умов *in vitro*. Введення ризобактерій *Pseudomonas fluorescens* ІМБГ163 у рослини картоплі паралельно з рослинним матеріалом у культуру *in vitro* збільшувало кількість видів ендофітних бактерій коріння першого вегетативного покоління рослин, але при подальшому клональному мікророзмноженні рослин кількість виявлених ендофітів зменшувалася. Ендофітні ізоляти сортів картоплі Загадка та Нігру, активовані ризобактерією, виявляли корисні для рослин властивості.*

*Ключові слова: ендофітні бактерії, картопля *in vitro*, біотичний стресор, *Pseudomonas fluorescens* ІМБГ163.*

Вступ. Рослини, у тому числі й культивовані в асептичних умовах, усередині тканин заселені бактеріями, які називають ендофітами [1]. На відміну від фітопатогенів, що теж колонізують внутрішні тканини рослин, ендофіти не викликають захворювань у своїх рослин-господарів. У порівнянні з вільноіснуючими бактеріями ендофіти утворюють стабільніші асоціації з рослиною і на противагу їм виживають у рослинних тканинах протягом вегетації рослин [2].

Численні види ендофітних бактерій є корисними для рослин: вони можуть брати участь у захисті останніх від захворювань, спричинених патогенними мікроорганізмами, комахами та нематодами, а також допомагати пристосовуватися до несприятливих умов довкілля [3—5], захищати рослину-хазяїна від шкідливої дії катіонів важких металів та радіонуклідів [3, 6], при цьому деякі із згаданих бактерій за допомогою постачання рослинам поживних речовин здатні покращувати їхній ріст і розвиток [7, 8].

З використанням сучасних методів достовірно доведено, що ендофітні бактерії співіснують прак-

© О. В. ПОДОЛІЧ, П. Є. АРДАНОВ,
Т. М. ВОЗНЮК, М. В. КОВАЛЬЧУК,
О. В. ДАНИЛЬЧЕНКО, В. В. ЛАЩЕВСЬКИЙ,
С. А. ЛЯШЕНКО, Н. О. КОЗИРОВСЬКА, 2007

тично з усіма рослинами [9]. При вивченні ендоефітних популяцій рослин картоплі визначено присутність у тканинах бактерій, які належать до широкого спектра підгруп (α -, β -, γ -*Protobacteria*, *Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides*, грам-позитивні бактерії з високим вмістом G+C пар та *Planctomycetales*) [10—12]. Поряд з відомими бактеріями, достатньо охарактеризованими мікробіологічними та біохімічними методами, всередині рослин описано бактерії, які не виділяються традиційними методами через неможливість їхнього культивування. Такі бактерії ідентифікують молекулярними методами завдяки дослідженню їхніх нуклеїнових кислот без культивування бактерій [13]. Бактерії, що не культивуються, здатні переходити до стану культивування під впливом сигналів навколишнього середовища [14].

Завдання нашої роботи полягало у визначенні ендоефітних спільнот бактерій рослин картоплі сортів Загадка та Нігру за умов *in vitro*, а також у дослідженні впливу інокуляції експлантів картоплі бактерією *Pseudomonas fluorescens* ІМБГ163, корисною для рослин [15], на спільноти ендоефітних бактерій.

Матеріали і методи. Інокуляція рослин картоплі ризобактерією. В експериментах використано сорти картоплі Нігру і Загадка вітчизняної селекції. Для їхньої інокуляції використовували штами бактерій у концентрації 10^6 колонієутворювальних одиниць (КУО) в 1 мл, вирощені в рідкому поживному середовищі КВ [16]. Рослинний матеріал інокулювали, як описано раніше [17], після чого його почергово стерилізували у розчинах 70 %-го етилового спирту та комерційного препарату «Білізна» з подальшим триразовим відмиванням у стерильній дистильованій воді. Відмиті експлантати переносили на модифіковане агаризоване безгормональне середовище Мурашіре і Скуга (МС) [18] для регенерації рослин. Культивування проводили при 16—18-год світловому фотоперіоді, температурі 24 °С, відносній вологості 80—85 % та освітленості 4 тис. лк. Отримані рослини-регенеранти розмножували методом клонального мікро-розмноження.

Виділення ендоефітних бактерій. Бактерії виділяли з внутрішніх тканин регенерантів картоплі за асептичних умов [15]. Розтертий матеріал розводили та висівали на повноцінне поживне агарове середовище, розведене у 6 разів. Бактерії виділяли з регенерантів картоплі (окремо з коріння та сте-

бел), як оброблених бактеріями, так і контрольних екземплярів у двох незалежних дослідках.

Культивування бактерій проводили на гліцерин-пептонному агарі [16] (*P. fluorescens* ІМБГ 163), на мінеральному агаровому середовищі з метанолом [19] (рожевопігментована бактерія, РПБ) та МПА (*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* та *Pseudomonas syringae*) протягом 1—5 діб за температури 28 °С.

Визначення ферментативної активності ендоефітних бактерій. Здатність бактерій до продукування ферментів деструкції пектину — полігалакторунази та пектатліази, субстратом для яких є полігалактуронова кислота, визначали за здатністю колоній утворювати заглиблення на поверхні стабілізованого кальцієм поліпектатного гелю внаслідок руйнації полігалактуронової кислоти [20]. Карбоксиметилцелюлозу та полігалактуронат натрію використовували як джерело вуглецю в концентрації 0,2 % у середовищі М9 [21]; розчин барвника Конго червоного (0,1 %) — для визначення наявності целюлазної (ендоглюканазної) активності у дослідних бактерій [22].

Усі реагенти виробництва фірми «Sigma Aldrige» (США). Протеазну активність виявляли за утворенням коагуляту білків із знежиреного молока. Для визначення ауксинів у культуральному середовищі бактерій використано реактив Ерліха [23]. Антагоністичну активність ізолятів та їхній вплив на розвиток пшениці визначали, як описано в [24].

Сумарну ДНК виділяли за прийнятим методом [25] з тканин коренів і стебел (коренева шийка) 3—4-тижневих пробіркових рослин картоплі, поверхню яких було простерилізовано. Виділення бактеріальної ДНК проводили за допомогою набору реагентів UltraClean™ («MoBio Lab.», США).

Аналіз поліморфізму довжини термінально-мічених рестрикційних фрагментів ДНК (ПДТРФ) ендоефітних популяцій картоплі *in vitro* здійснювали за методом [26]. Праймери 507F (5'-TGCCA-GCAGCCGCGGTA, мічений Cy5 з 5'-кінця) та 1384r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT) використовували для ампліфікації фрагмента *rrs*-гена. ПЛР виконували у термоциклері Терцик (РФ). Продукт ПЛР очищували набором реагентів UltraClean™ PCR Clean-up DNA («MoBio Lab.») та обробляли ферментом *HhaI* («Fermentas», Литва). Попередній *in silico* аналіз показав, що ці ферменти з наявних ендонуклеаз рестрикції, що візнають

4 п. н. (*AluI*, *HaeII*, *TaqI*, *HhaI*), утворюють найбільше мічених фрагментів. Аліквоти ТРФ (0,5 мкл) змішували з 1 мкл буфера для нанесення на гель та 0,3 мкл стандартами ДНК («Amersham», Велика Британія). Реакційну суміш денатурували (92 °С, 2 хв) та охолоджували на льоду. Зразки (1,75 мкл) наносили на 6 %-й денатурувальний поліакриламідний гель в автоматичному секвенаторі ALF («Pharmacia», Швеція). Розміри флуоресцентно мічених фрагментів визначали, використовуючи програму ALF Fragment Manager («Amersham»). ТРФ вважалися позитивними, якщо мали не більше 50 одиниць. До аналізу розміри ТРФ брали в межах стандартів (50—600 п. н.).

Визначення нуклеотидної послідовності фрагмента гена *rrs* (16S рРНК) проводили за методом Сенгера. Відповідний ПЛР продукт отримано праймерами F507-Сy5 та R1384 на ДНК-матриці бактерії-ізоляту М1. Нуклеотидну послідовність проаналізовано за допомогою BLASTn (NCBI) та Vector NTI 8.0 («Infomax Inc.», США).

Статистичний аналіз результатів досліджень. Статистичний аналіз отриманих результатів проведено за допомогою програми SigmaPlot 8.0.

Результати і обговорення. *Обробка ризобактеріями рослин картоплі in vitro* сорту Нігру. Після інокуляції чисельність бактерій штаму *P. fluorescens* ІМБГ163 в експлантатах паростків картоплі сорту Нігру складала $1,34 \cdot 10^5$ КУО/г сирової рослинної тканини. Через тиждень після висаджування інокульованих бактерією експлантатів картоплі на поживне середовище МС спостерігали вихід даної бактерії в агар у зоні ризоплани у вигляді специфічного ореолу. Рослини, у яких спостерігали подібний феномен за морфологічними ознаками, не відрізнялися від контрольних.

При визначенні присутності штаму ІМБГ163 в рослинах мікробіологічним методом, тобто висадкою сегментів листя і коріння на селективне середовище КВ 1—5-го вегетативного покоління, показано наявність не лише штаму ІМБГ163, а й бактерії рожевого кольору — ізоляту М1. У контрольних рослинах подібного не відмічено. Можна припустити, що бактерії *P. fluorescens* здатні провокувати вихід іншої бактерії із внутрішніх тканин експлантата, яка співіснує з рослинами картоплі даного сорту.

У результаті мікробіологічного тестування рослин картоплі сорту Нігру виявлено, що кількість рослин, у яких присутня *P. fluorescens* ІМБГ163, з

кожним пасажем зменшувалася, а кількість рослин, з яких виділялися РПБ М1, збільшувалася. Ізолят М1 виділявся з усіх органів рослин: листя, стебел і коріння і колонізував рослину вздовж, починаючи від верхівки до коріння. При цьому рослини-регенеранти росли і розвивалися добре, що свідчить про толерантність даної бактерії до рослин картоплі.

Порівняльний аналіз визначеної послідовності 400 п. н. частини гена, що кодує РНК малої субодиниці рибосоми бактерії М1, з відомими послідовностями з банку генів (GenBank, NCBI) дозволив зробити висновок стосовно приналежності ізоляту М1 до метилотрофних бактерій і показав гомологію до *Methylobacterium radiotolerans*, *M. organophilum*, *M. fujisavense*, *M. rhodium*, *M. jeotgali*, *M. mesophilicum*. Детальніший аналіз цієї послідовності ДНК виявив, що крайні нуклеотиди фрагмента розташовані в межах 791—1234 п. н. Фрагмент містив консервативну частину гена, яка характеризувалася постійним складом нуклеотидів у зазначених видів, і варіабельну ділянку (50 нуклеотидів), ідентичну виду *M. radiotolerans*. Від інших видів метилотрофних бактерій ізолят М1 відрізнявся 3—10 позиціями у межах зазначеної послідовності.

Таким чином, найвірогідніше, що М1 є представником виду *M. radiotolerans*.

Різні штами роду *Methylobacterium* часто виділяють з ґрунту, прісних водоймищ, а також з бруньок, листя, коріння і культури тканин *in vitro* різних рослин [5, 27, 28]. *M. radiotolerans* відомі як супресори патогенних грибів та такі, що мають толерантність до важких металів [29].

Через два місяці після інокулювання з листя двох варіантів рослин (оброблений бактерією *P. fluorescens* ІМБГ163 і контроль без обробки) методом ПДТРФ вивчали сумарну ДНК, виділену з рослин. Результати засвідчили збільшення кількості ендоефітів під впливом псевдомонасу (табл. 1).

Експеримент з рослинами картоплі сорту Загадка. Виходячи з того, що інокуляція рослин картоплі сорту Нігру штамом *P. fluorescens* ІМБГ163 могла спровокувати вихід ізоляту бактерії М1, було перевірено вплив штаму ІМБГ163 на угруповання ендоефітних бактерій рослин картоплі сорту Загадка в умовах *in vitro*. За нашими спостереженнями, після висадки інокульованих експлантатів на поживне середовище МС інтенсивне утворення пагонів відбувалося на п'яту добу і коренів — на

Таблиця 1

Розподіл термінально-мічених рестрикційних фрагментів (*TaqI*) *rrs*-гена ендоефітних бактерій картоплі сорту Нігру (п. н.)

Варіант	32	38	49	52	51	62	64	77	87	219
Контрольна рослина (без обробки)	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-
Оброблена рослина (<i>Pseudomonas fluorescens</i> ІМБГ163)	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+

Таблиця 2

Розподіл термінально-мічених рестрикційних фрагментів (*HhaI*) *rrs*-гена ендоефітних бактерій картоплі сорту Загадка у двох генераціях (п. н.)

Варіант	39	64	68	262	332	364	432	435	482	539	556
Вічка	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
Стебло, R1, контроль	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Стебло, R1, <i>Pseudomonas</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
Стебло, R2, контроль	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Стебло, R2, <i>Pseudomonas</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
Корінь, R1, контроль	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Корінь, R1, <i>Pseudomonas</i>	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
Корінь, R2, контроль	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Корінь, R2, <i>Pseudomonas</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

восьму, так само як і в контрольному варіанті. Але через три тижні у рослин — регенерантів картоплі, інкульованих штамом ІМБГ163, відбувався інтенсивний ріст. У контрольному варіанті рослини розвивалися повільніше.

З інкульованих рослин виділено чотири морфотипи ендоефітних бактерій у кількості $1,0 \cdot 10^4$ КУО/г з кореня і два морфотипи (по 20 КУО/г) із стебел. У другому вегетативному поколінні кількість виділених з кореня морфотипів зменшилася; на поживному середовищі з кореня виділялося два морфотипи бактерій у кількості $2,0 \cdot 10^3$ КУО/г. За даними мікроскопічного аналізу, бактерії є грам-позитивними паличками і диплококами та грам-негативними паличками. Останні домінували серед ізолятів.

Внаслідок аналізу ПДТРФ ДНК бактерій, виділеної з рослин картоплі, виявлено, що структура

ендоефітної асоціації стебла відрізняється від такої асоціації кореня (табл. 2). Порівняння мікробіологічного та ПДТРФ методів свідчить про присутність у структурі ендоефітної спільноти бактерій, які не виявлено на поживному середовищі, тобто таких, що не культивуються за даних умов. Мінімум чотири бактеріальні штами переходять з вічка до кореня і п'ять — до стебла та відповідно два і один види бактерій з вічок не зберігаються у тканинах кореня і стебла рослин картоплі після введення їх у культуру *in vitro*. Шість видів ендоефітів виявлено тільки на рослинах, інфікованих бактеріальним штамом ІМБГ163, який змінює ендоефітну асоціацію коріння першого вегетативного покоління рослин порівняно з контролем. У корінні першого покоління рослин, інфікованих псевдомонадами, виявляли вісім вірогідних видів, тоді як у контрольних — лише три. Структура ендоефітної асоціа-

Таблиця 3

Характеристика ендоефітних бактерій картоплі *in vitro*, ізолюваних після інокуляції бактерією *Pseudomonas fluorescens*

Варіант ізоляту	Виділення ауксинів	Антагонізм до		Ферментативна активність		
		<i>E. carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Пектиназна	Целюлазна	Протеазна
47—57, 59, 60, 64С, 72, 76К	—	—	—	—	—	—
58, 67С, 75К	—	—	—	—	+	—
61С	—	—	—	+	+	—
62, 68С	—	—	+	+	+	—
63С	—	—	+	—	+	—
65С	—	+	+	+	+	+
66К	—	—	+	+	+	—
68К	—	—	+	+	+	—
70К	—	+	—	+	—	—
71К	—	+	—	—	—	+
73К	—	+	—	+	+	—
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ІМБГ163	—	+	+	—	—	—
<i>Klebsiella oxytoca</i> ІМБГ26	+	—	—	+	+	—

Примітка. С — стебло; К — корінь.

ції бактерій стебла несуттєво змінюється при введенні псевдомонасу (на дві позиції збільшується) і є більш-менш стабільною при клонуванні рослин. Така різниця у структурі спільнот ендоефітних бактерій кореня і листя відома [10, 11] і може пояснюватися вищою метаболічною активністю кореня рослин.

У другому поколінні обробленої рослини у складі ендоефітної спільноти бактерій методом ПДТРФ усього визначено сім видів з 10, знайдених у першому, у тому числі три види бактерій, характерних для вічок. При цьому в контрольному варіанті у рослин другого покоління виявляли лише шість видів ендоефітів з семи, які визначено у першому поколінні, і ті ж самі три ендемічні бактерії, що перейшли з вічок до рослин-регенерантів. Отже, структура асоціації бактерій кореня дещо спрощується при клональному мікророзмноженні.

Індукування розмноження ендоефітів різними факторами, наприклад фітопатогеном, до межі, коли бактерії можна зареєструвати чутливими методами, на сьогодні відомо [14], як і відомо, що несприятливі умови для розвитку рослини ускладнюють структуру бактеріальних спільнот [30]. Нами вперше показано збільшення різноманітності ендоефітів у картоплі *in vitro* під впливом непатогенних бактерій.

Дослідження ендоефітних бактерій картоплі. Серед бактерій, активованих введенням *P. fluorescens* ІМБГ163 у культуру *in vitro*, для подальшого вивчення відібрано низку ізолятів грам-негативних паличок, які найчастіше виділялися з кореня стебла пробіркових рослин картоплі різних сортів. Ізоляти 47—65 виділено з тканин стебла рослин — регенерантів картоплі сортів Загадка, Повінь, Астерікс, Білина, Червона рута першого вегетативного покоління після обробки штамом ІМБГ163, ізоляти 66 і 76 — з тканин кореня рослини картоплі у другому і третьому вегетативних поколіннях.

Майже 30 % з відібраних ізолятів виявляли антагоністичну активність до фітопатогенів *E. carotovora* subsp. *atroseptica* та *P. syringae* або до одного з них (табл. 3).

На відміну від штаму ІМБГ163, яким обробляли експлантати картоплі, ізоляти мали такі ферментативні активності, як пектиназна, целюлазна, протеазна, важливі для взаємодії з клітинною стінкою рослини та, можливо асоційовані з біохімічними процесами, що відбуваються при модуляції стійкості рослини до стресорів [31]. Деякі ізоляти ендоефітних бактерій картоплі підвищували суху масу пшениці після обробки ними насіння не гірше за відомий штам ІМБГ163, використаний для порівняння [32].

Таким чином, за результатами аналізу тканин коренів і стебел картоплі *in vitro* встановлено, що кількість бактерій всередині тканин картоплі зменшується у вегетативних поколіннях при клональному мікророзмноженні. Інокулювання вітроплантів бактеріями *P. fluorescens* ІМБГ163 змінює структуру спільноти ендофітів рослини і активує бактерії, які, вірогідно, збільшують популяції і, отже, можуть бути визначені чутливими методами. Не менше 30 % ізолятів ендофітних бактерій картоплі, індукованих псевдомонасом, за умов *in vitro* виявляли антагоністичну активність до бактеріальних патогенів. Оскільки деякі з ізолятів стимулюють ріст бактерій, то існує вірогідність, що вони можуть бути спаринг-партнерами фітопатогенів. Зважаючи на те, що при мікророзмноженні картоплі клонуванням кількість ендофітів картоплі зменшувалася, а *M. radiotolerans* переходив з генерації у генерацію, метилотрофи необхідно контролювати при живцюванні картоплі.

O. V. Podolich, P. E. Ardanov, T. M. Voznyuk, M. V. Kovalchuk, O. V. Danylchenko, V. V. Lashevskiy, S. A. Lyastchenko, N. O. Kozyrovska

Endophytic bacteria from potato in vitro activated by exogenic non-pathogenic bacteria

Summary

The results suggest that potato *in vitro* supports diverse bacterial endophytes. The community composition of the culturable component of the microflora was remarkably different from that revealed by culture-independent method. Introduction of *Pseudomonas fluorescens* ІМБГ163 into potato plant tissue resulted in essential rise of endophytic bacterial species number, however, in the further cloning their number was reduced. Endophytic isolates from potato varieties Zagadka and Nigru, induced by the rhizobacterium, exhibited beneficial for plant characters.

Keywords: endophytic bacteria, potato *in vitro*, biotic stressor, *Pseudomonas fluorescens* ІМБГ163.

O. B. Подоліч, П. Е. Арданов, Т. М. Вознюк, М. В. Ковальчук, О. В. Данильченко, В. В. Лящевский, С. А. Лященко, Н. А. Козыровская

Эндофитные бактерии картофеля *in vitro*, активированные экзотическими непатогенными бактериями

Резюме

Микробиологическим и независимым от культивирования бактерий методами показано присутствие как культивированных, так и некультивированных форм эндофитных бактерий в растениях — регенерантах картофеля, выращиваемых в условиях *in vitro*. Введение ризобактерий *Pseudomonas fluorescens* ІМБГ163 в растения картофеля параллельно с растительным материалом в культуру *in vitro* повышало количество видов эндофитных бактерий корней первого вегетативного поколения растений, но при последующем клональном микроразмно-

жении растений количество выявленных эндофитов уменьшалось. Эндофитные изоляты сортов картофеля Загадка и Нигру, активированные ризобактерией, обладали полезными для растений свойствами.

Ключевые слова: эндофитные бактерии, картофель *in vitro*, биотический стрессор, *Pseudomonas fluorescens* ІМБГ163.

PERELIK LITERATURY

- Rosenblueth M., Martinez-Romero E. Bacterial endophytes and their interaction with hosts // Mol. Plant-Microbe Interact.—2006.—19.—P. 827—837.
- Козыровська Н. О. Молекулярно-генетичні аспекти зовнішньої та внутрішньої колонізації рослин корисними бактеріями // Біополімери і клітина.—2001.—17, № 1.—С. 20—28.
- Siciliano S. D., Fortin N., Mihoc A., Wisse G., Labelle S., Beaumier D., Ouellette D., Roy R., Whyte L. G., Banks M. K., Schwab P., Lee K., Greer C. W. Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination // Appl. Environ. Microbiol.—2001.—67.—P. 2469—2475.
- Araujo W. L., Marcon J., Maccheroni W. Jr., Van Elsas J. D., Van Vuurde J. W., Azevedo J. L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants // Appl. Environ. Microbiol.—2002.—68.—P. 4906—4914.
- Pirttila A. M., Pospiech H., Laukkanen H., Myllyla R., Hohtola A. Seasonal variations in location and population structure of endophytes in buds of Scots pine // Tree Physiol.—2005.—25.—P. 289—297.
- Сорочинський Б. В., Козыровська Н. О. Біотехнологічні аспекти проблеми фітореMediaції об'єктів навколишнього середовища від радіонуклідних забруднень // Агробіотехнологія.—1998.—№ 2.—С. 123—130.
- Verma S. C., Ladha J. K., Tripathi A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice // J. Biotechnol.—2001.—91.—P. 127—141.
- Caballero-Mellado J., Martinez-Aguilar L., Paredes-Valdez G., Santos P. E. *Burkholderia unamae* sp. nov., an N₂-fixing rhizospheric and endophytic species // Int. J. Syst. Evol. Microbiol.—2004.—54.—P. 1165—1172.
- Normander B., Prosser J. I. Bacterial origin and community composition in the barley phytosphere as a function of habitat and presowing conditions // Appl. Environ. Microbiol.—2000.—66.—P. 4372—4377.
- Krechel A., Faupel A., Hallmann J., Ulrich A., Berg G. Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (kofoid & white) chitwood // Can. J. Microbiol.—2002.—48.—P. 772—786.
- Sessitsch A., Reiter B., Berg G. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities // Can. J. Microbiol.—2004.—50.—P. 239—249.
- Garbeva P., Overbeek L. S., Vuurde J. W., Elsas J. D. Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments // Microb. Ecol.—2001.—41.—P. 369—383.
- Amman R. I., Ludwig W., Scheifer K. H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation // Microbiol. Rev.—1995.—59.—P. 143—169.

14. Reiter B., Pfeifer U., Schwad H., Sessitch A. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica* // Appl. Environ. Microbiol.—2002.—68.—P. 2261—2268.
15. Kovalchuk M. V., Lytvynenko T. L., Kononuchenko O. V., Voznyuk T. M., Rymar S. Yu., Negruška V. V., Kozirovska N. O. Colonization, capacity and persistence on wheat roots of a biocontrol agent *Pseudomonas* sp. IMBG163 // Біополімери і клітина.—2004.—20, № 6.—С. 530—534.
16. King E. O., Ward M. K., Raney D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein // J. Lab. Clin. Med.—1954.—44.—P. 301—307.
17. Подоліч О. В., Ковальчук М. В., Литвиненко Т. Л., Кононученко О. В., Козіровська Н. О., Петюх Г. П. Особливості колонізації *in vitro* рослини картоплі бактерією роду *Pseudomonas* sp. IMBG163 // Агроекол. журн.—2005.—№ 2.—С. 61—64.
18. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Proc. Int. Citrus Symp.—1969.—3.—P. 1155—1161.
19. Романовская В. А., Столяр С. М., Малащенко Ю. Р. Распространение бактерий рода *Methylobacterium* в различных экосистемах Украины // Микробиол. журн.—1996.—58, № 3.—С. 3—11.
20. Starr M. P., Chatterjee A. K., Starr P. B., Buchanan G. E. Enzymatic degradation of polygalacturonic acid by *Yersinia* and *Klebsiella* species in relation to clinical laboratory procedures // J. Clin. Microbiol.—1977.—6.—P. 379—386.
21. Миллер Д. Эксперименты в молекулярной генетике.—М.: Мир, 1976.—436 с.
22. Wood P. J. The use of dye-polysaccharide interactions in β -D-glucanase assay // Carbohydr. Res.—1981.—94.—P. 19—23.
23. Tang Y. M., Bonner J. The enzymatic inactivation of indolacetic acid. 1. Some characteristics of the enzyme contained in pea seedlings // Arch. Biochem.—1947.—13.—P. 11—25.
24. Ковальчук М. В., Негруцька В. В., Козіровська Н. О. Характеристики окремих псевдомонад як кандидатів для створення препаратів нового класу по технології «Дуал» // Агроекол. журн.—2004.—№ 2.—С. 41—45.
25. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual.—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1989.—1962 p.
26. Liu W. T., Marsh T. L., Cheng H., Forney L. J. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA // Appl. Environ. Microbiol.—1997.—63.—P. 4516—4522.
27. Wilson M., Hirano S. S., Lindow S. E. Location and survival of leaf-associated bacteria in relation to pathogenicity and potential for growth within the leaf // Appl. Environ. Microbiol.—1999.—65.—P. 1435—1443.
28. Doronina N. V., Ivanova E. G., Suzina N. E., Trotsenko Y. A. Methanotrophs and methylobacteria are found in woody plant tissues within the winter period // Mikrobiologiya (Rus.).—2004.—73, № 6.—P. 702—709.
29. Zarnowski R., Felske A., Ellis R. J., Geuns J. M. C., Pietr S. J. A Methylobacterium-like organism from algal crusts covering silicone rubber electric insulators in Africa // J. Appl. Microbiol.—2002.—93.—P. 1365—1372.
30. Idris R., Trifonova R., Puschenreiter M., Wenzel W. W., Sessitsch A. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense* // Appl. Environ. Microbiol.—2004.—70.—P. 2667—2677.
31. Okubara P. A., Paulitz T. C. Root defense responses to fungal pathogens: a molecular perspective // Plant and Soil.—2005.—74.—P. 215—226.
32. Подоліч О. В., Литвиненко Т. Л., Вознюк Т. М., Ковальчук М. В., Козіровська Н. О. Виявлення угруповань ендоефітних бактерій в асептичних рослинах картоплі після інокуляції *Pseudomonas* sp. IMBG163 // Наук. вісн. Ужгородськ. ун-ту.—2006.—№ 18.—С. 165—170.

УДК 576.5: 582.951:577.2
Надійшла до редакції 18.09.06