

## Взаємодія ендоефітних бактерій з рослиною на клітинному та молекулярному рівнях

Н. О. Козировська

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
252143, Київ, вул. Академіка Заболотного, 150

*В огляді надається інформація про локалізацію ендоефітних бактерій у тканинах рослин, а також обговорюються шляхи та механізми проникнення бактерій всередину рослини. Розглядаються методи детекції ендоефітів всередині рослин (цитохімічні, імунологічні, молекулярно-генетичні).*

Вступ. З середини 40-х рр. фітопатологи та фітоцитологи спостерігали скупчення бактерій у тканинах здорових рослин. Зокрема, в роботі [1] показано, що непатогенні ризосферні бактерії проникають з ґрунту всередину стебел, насіння та бульб картоплі. Такі явища пояснювалися тим, що клітини рослин дегенерують літичним шляхом, утворюючи «ворота», через які бактерії потрапляють всередину рослинного організму [2]. Термін «ендоризосфера» тобто кортекс кореня, заселений бактеріями, які здатні локалізуватися всередині або між клітинами, запропоновано авторами [3] у 1978 р. саме для визначення стадії розкладу тканин кореня рослини з причини проникнення ззовні бактерій через такі «ворота».

Іншого погляду на феномен заселення здорових рослин бактеріями, що потребує фундаментального вивчення, дотримувалися представники бразильської школи асоціативної азотфіксації [4, 5]. Спостерігаючи бактерії всередині тканин рослин, вчені доводили, що ендоефіти потрапляють усередину не через автоліз рослинних клітин, а активно, завдяки якомусь властивому їм механізмові.

У теперішній час через тяжкі наслідки екологічних негараздів, а також завдяки популяризації ідеї ресурсозберігаючого сільського господарства зусилля вчених спрямовано на пошук біологічних альтернатив агрохімічним засобам вирощування врожаїв. У зв'язку з цим набули актуальності проблеми біологічної азотфіксації, яка

до того вивчалася протягом майже ста років, то біологічного контролю шкідників врожаїв. Це простимулювало пошук активних несимбіотичних азотфіксуючих бактерій та бактерій — антагоністів патогенних мікроорганізмів [6, 7].

Історично склалося так, що несимбіотичні бактерії виділяли з ризосфери рослин, тобто з ґрунту, дотичного до кореневої системи рослини, або з поверхні коренів. Незважаючи на високу активність ізолятів бактерій (азотфіксація, виділення фітогормонів тощо), яку вони виявляли в експериментах, у природних умовах високі показники не завжди відтворювалися. Нестабільність результатів польових дослідів з визначення впливу бактерій на підвищення продуктивності рослин з року в рік звичайно залежить від природних факторів (волога, дощі, заморозки), але основною причиною варіації є неконкурентність ризосферних бактерій у нових природних умовах через їхній слабкий контакт з рослиною. У ризосфері рослини відбувається жорстка конкурентна боротьба між мікроорганізмами за джерела вуглецю та енергії — речовини, які вивільняють кореневі системи рослин [8, 9]. Отже, виживають ті з них, котрі пристосовані до споживання певних речовин із спектра кореневих ексудатів. Чим щільніше бактерії локалізуються на поверхні кореня та тісніше асоційовані з рослинами через аглютиніни, фімбрії та інші засоби, тим краще вони живляться. Ендоефітні бактерії витримують меншу конкуренцію, оскільки пристосовані до розвитку всередині тканин рослини.

Після малоуспішних спроб створити ефективні інокуляти для підвищення продуктивності рослин

на основі вільноіснуючих ґрунтових бактерій [10, 11] дослідники знову звернули увагу на ендofіти як на перспективну групу мікроорганізмів через те, що у них більше шансів вижити у природних умовах. Роботи із створення стабільних асоціацій нового типу розгорнулися у двох напрямках: 1) створення штучних асоціацій шляхом індукції ризобіями псевдобульбочок у небобових рослин за рахунок обробки коріння рослин ферментами чи стимуляторами росту [12, 13] або генетичної модифікації фітопатогенних бактерій з метою послаблення їхньої агресивності та перетворення їх на корисні для рослин бактерії [14]; 2) пошук бактерій всередині господарсько цінних рослин, які відрізняються від інших більшою продуктивністю і конкурентоспроможністю. Якщо у першому випадку надії покладаються на створення штучних асоціацій рослина—бактерії різними методами, у тому числі методами генетичної інженерії, то роботи другого напрямку передбачають пошук природних продуктивних асоціацій.

**Екологія і фізіологія ендofітних бактерій.** Дослідження останніх 10 років показують, що на відміну від ризосферних бактерій, не здатних проникати всередину тканин рослини, ендofіти є більш конкурентоспроможними, оскільки займають екологічну нішу всередині рослини і отримують усе необхідне для життєдіяльності. Окрім того, ендofіти знаходять захист у рослинному депо від несприятливих погодних умов. Якщо ризосферні мікроорганізми піддаються впливу різноманітних факторів природи (зливи, коливання температури, опромінення) і їхня популяція нерідко гине, то ендofіти захищені зсередини. Отже, збережені всередині бактерії здатні поновлювати ризосферну популяцію і, таким чином, підтримувати присутність бактерій на рослині протягом її вегетації [15, 16].

Зі свого боку, ендofіти мають вплив на рослину за рахунок більш тісного і стійкішого контакту, тобто у ендofітних бактерій і рослин формуються мутуалістичні взаємини. Бактеріальний партнер захищає рослину від вторинної інфекції ґрунтовими патогенними мікроорганізмами, стимулюючи імунну систему рослини-господаря. Останнє пояснює стійкість рослин, оброблених бактеріями, до нематод. Окрім імунізації рослини, ендofітні бактерії постачають її фізіологічно активними речовинами, які вони здатні продукувати, наприклад, фітогормонами, вітамінами тощо. Ендofіти є засобом цільової доставки певних речовин у рослину, зокрема, біопестицидів [17]. За рахунок таких бактерій (у тому числі генетично модифікованих) можливо буде змінювати властивості рослин без втручання у геном останніх.

У природі ендofітні бактерії, що мають комплекс корисних для рослин властивостей, утворюють тісні асоціативні зв'язки з тими рослинами, які першими заселяють бідні ґрунти або ареали, що постраждали від посух, повіней, пожеж. В асоціації з ендofітами рослина виживає на бідних азотом ґрунтах за рахунок постачання доступної форми азоту від бактеріального партнера. Наприклад, діазотрофну бактерію *Azoarcus* вперше було виділено з коренів пакистанської трави (*Leptochloa fusca* (L) Kunth), яка росте на засолених ґрунтах [18]. Бактерії *Azoarcus spp.* дуже щільно заселяють пакистанські рослини зсередини ( $10^8$  КУО/г сухої маси) і не виділяються з такої ж трави, що росте деінде у світі, зокрема, у Бразилії і Австралії. Сучасними методами простежено, що проникнення бактерій всередину рослин відбувається через корінь у зоні елонгації (тобто в зоні активного росту), і бактерії просуваються далі через міжклітинники до ксилемних судин [19]. Процес азотфіксації відбувається у мікроаерофільних умовах у диференційованих клітинах, які мають більш розвинені мембрани (так звані діазосомні структури) у порівнянні з неазотфіксуючими клітинами [20, 21].

Бактерію *Acetobacter diazotrophicus* вперше виділено з внутрішніх тканин коренів цукрової тростини, яка росте у Бразилії на бідних азотом угіддях [22, 23], а згодом і з інших рослин, що мають високий вміст цукру (солодка картопля, конголезька трава) [24—26]. *A. diazotrophicus* є цікавою фахівцям тим, що фіксує атмосферний азот у присутності нітратів (у нормі нітрати пригнічують азотфіксацію) та при низькому рН (< 3,0) [27]. Окрім того, особливістю цієї бактерії є те, що її клітина виділяє майже половину зв'язаного азоту у формі, доступній рослині [28]. Ця обставина є досить важливою для рослини, оскільки мінеральний азот вона отримує від бактерій лише після загибелі останніх і мінералізації залишків їхніх клітин. Ендofітну природу *A. diazotrophicus* підтверджено багатьма роботами, у яких йдеться про локалізацію бактерій всередині коренів, стебел, листя на різних стадіях росту рослини-господаря у кількості  $10^3$ — $10^6$  КУО/г сухої маси [29], а також у ксилемній рідині, що свідчить про переміщення бактерій по рослині вертикально [25]. Припускається, що ксилемні судини є місцем, де відбувається азотфіксація, через достатню концентрацію чинників енергії, необхідних для цього процесу. Останнім часом *A. diazotrophicus* виділено у Мексиці з тканин цукрової тростини [30], а також з інших видів рослин (наприклад, з кавового дерева) [31], але у таких господарів ця бактерія розвиває невелику популяцію, що пояснюється генетичними

відмінностями нових ізолятів, які спричинилися відносно високим вмістом азоту у ґрунтах Мексики у порівнянні з бразильськими [32].

У Бразилії також вперше виділено ендоефітні азотфіксуючі бактерії *Herbaspirillum seropedicae* та *H. rubrisubalbicans*, які колонізують злакові культури, а також інші однодольні [33—35]. Бактерії проникають у міжклітинники молодих коренів рослин і переміщуються до ксилеми, інколи пошкоджуючи листя через швидке розмноження бактерій всередині ксилемних судин [25].

У Китаї з коренів залізного рису ізольовано азотфіксуючий штам *Alcaligenes* (зараз *Burkholderia*) *faecalis* A15 [36]. Бактерії цього штама колонізують тканини коренів рису, особливо аеренхіму, а також здатні перетинати клітинну стінку та потрапляти всередину клітин. *A. faecalis* A15 засвоюють атмосферний азот в асоціації з рисом навіть при високій концентрації іонів амонію [37], які звичайно заважають процесові азотфіксації.

Зазначені бактерії утворюють стабільні асоціації з рослинами, мають вузьке коло господарів, у них не виявлено спеціальних анатомічних структур, які б свідчили про тісний зв'язок бактерій з рослинами та їхні симбіотичні відносини (як це відомо для бульбочкових бактерій). Раніше вважалося, що загальною рисою для них є те, що вони не здатні виживати в ґрунті і мають екологічну нішу тільки всередині рослинних тканин [25]. Однак нещодавно *A. diazotrophicus* виділено з ґрунту [47], а *Azoarcus* sp. — з тканин рису [86], і визначення «ендоефітні бактерії» знов потребує уточнення.

Інша категорія ендоефітів характеризується тим, що має ширше коло господарів — вони менш специфічні у стосунках з рослинами. Ендоефіти цієї категорії виживають і поза рослинним організмом, тобто вони здатні утворювати ризосферну популяцію. Найрозповсюдженішими серед них є бактерії роду *Azospirillum*, які формують асоціативні зв'язки з різноманітними злаковими культурами. Бактерії цього роду є перспективними кандидатами для створення біологічних препаратів, що підвищують продуктивність рослин за рахунок покращання мінерального живлення рослин та стимуляції їхнього росту [38, 39]. Надії покладаються також на здатність азоспірил засвоювати азот атмосфери. Локалізацію бактерій всередині злакових культур доведено в багатьох роботах [4, 40].

Серед азотфіксуючих бактерій, окрім азоспірил, перспективними видаються бактерії роду *Klebsiella*. У Південно-Східній Азії на них давно звернули уваги через здатність підвищувати врожай рису [41], а вивчення властивостей цих бактерій

стало підґрунтям для розуміння їхньої здатності позитивно впливати на рослину. Бактерії *K. oxytoca* і *K. terrigena* виділяють біостимулятори, а також засвоюють атмосферний азот [42, 43]. Ендоефітну природу цих бактерій підтверджено у наших роботах методом електронної мікроскопії [43—45]. Останнім часом бактерії цього роду виділено з внутрішніх тканин кукурудзи [46, 47].

Перспективною групою бактерій для біологічного контролю шкідників рослин є псевдомонади. Використання псевдомонад для інокуляції рослин призводить до підвищення врожайів за рахунок стимуляції росту, яка досягається завдяки продукції фітогормонів та попередження інфекції рослин патогенними мікроорганізмами внаслідок виділення антимікробних речовин та синтезу сидерофорів [48]. Псевдомонади різних видів виділяють з тканин різноманітних рослин, частіше з коренів [49—54], ксилемної рідини [55—57], але не так давно звернули увагу на ендоефітні асоціації цих бактерій і розпочали їх дослідження [58—65]. Ендоефітну природу *Pseudomonas fluorescens* та *P. aureofaciens* підтверджено методами електронної мікроскопії та ELISA [59, 60, 63, 64]. Бактерії роду *Pseudomonas* колонізують широке коло одно- та дводольних рослин і утворюють стабільні асоціації протягом вегетаційного періоду рослин; це поширюється і на генетично модифіковані псевдомонади [61, 62, 65].

До бактерій роду *Enterobacter* інтерес з'явився у зв'язку з їхню здатністю пригнічувати розвиток патогенних мікроорганізмів [66]. Пошук ендоефітних бактерій цього роду як найбільш перспективних для практичного використання розпочався після успішних польових дослідів, що продемонстрували захист врожайів за допомогою представників цього роду, таких, наприклад, як бактерія *E. cloacae*, що використовується для попередження гниття фруктів та овочів при зберіганні, а також як антагоніст патогенних грибів, зокрема, при вирощуванні кукурудзи і поширюється між клітинами кортексу і стели. *E. cloacae* у відсутності конкуренції (у стерильному ґрунті) колонізує внутрішні тканини кореня пшениці [67]. Іншу перспективну для практичного використання бактерію, *E. asburie*, виділено з тканин кореня бавовнику. Вона здатна колонізувати різноманітні рослини і формувати ендоефітні популяції на рівні  $10^5$  КУО/г сухої маси рослин. Ендоефітну природу її доведено імунологічними методами [70]. Філогенетично близька до неї ентеробактерія *Pantonea agglomerans* здатна колонізувати внутрішні тканини коренів пшениці [71].

Серед численної групи бактерій — представників роду *Bacillus* чимало є таких, що стимулюють розвиток рослин та мають антагоністичні властивості щодо збудників рослинних хвороб. Бацилли часто виділяють із здорових внутрішніх тканин рослини [55, 57]. Доведено, що деякі їхні види здатні утворювати всередині тканин рослин ендоефітні популяції [72—74].

На даний момент ендоефітні бактерії нараховують десятки видів і їх виділено з багатьох видів рослин (див. [57]). Це дозволяє зробити висновок про те, що ендоефіти — нормальна мікрофлора внутрішніх тканин рослини. Вивчення динаміки розвитку популяції ендоефітних бактерій протягом вегетаційного періоду рослин, зрощених у польових умовах, показує, що щільність колонізації ендоефітними бактеріями середини рослини є високою ( $10^3-7$  КУО/г сухої маси), при цьому рівень колонізації кореня вищий, ніж стебла, а останнього — вищий, ніж листка. Пересуваючись судинами рослин, ендоефіти нерідко потрапляють під оболонку насіння. Як правило, вони є присутніми в організмі рослини протягом її вегетації, дещо знижуючи чисельність популяції наприкінці. Джерелом ендоефітів, які колонізують рослини, є насіння, під оболонкою якого бактерії зберігаються довгий час, а також ґрунт, звідки бактерії потрапляють різними шляхами через кореневу систему всередину [75].

На внутрішню колонізацію рослин непатогенними бактеріями впливає багато факторів, таких як наявність та доступність поживних речовин у субстраті, на якому росте рослина, конкурентна боротьба, спектр ексудатів рослини, стадія розвитку рослини, а також немалу роль відіграє генетична адаптація бактерій до рослини-господаря [76].

Методи детекції бактерій всередині рослин. Виділення бактерій з органів рослин, поверхню яких попередньо продезінфіковано, є непрямим методом детекції ендоефітів. Тактика ізоляції бактерій з внутрішніх тканин здорової рослини може бути різною, але вона завжди передбачає стерилізацію поверхні того рослинного органа, з якого планується виділення ендоефітів. Природа стерилізанта та час експозиції рослинного матеріалу у його розчині залежать від різновиду об'єкта. Наприклад, тендітна тканина молодих коренів відрізняється від грубої оболонки насіння, отже, для стерилізації їхньої поверхні необхідні різні підходи. Порівняння багатьох методів стерилізації поверхні рослинного матеріалу показує, що досягти повного знищення бактерій, локалізованих на поверхні рослинного зразка, дуже складно, оскільки ніші між багаточисельними кореневими волосками і

відмираючі епідермальні клітини поверхневого шару тканин кореня захищають ризобактерії від дії стерилізанта. Метод стерилізації поверхні рослинного матеріалу розробляється експериментально для конкретних рослин або їх органів із застосуванням різнобічних перевірок. Індикатором ефективної дії підібраного виду стерилізанта та часу обробки ним рослини є інкубація простерилізованого матеріалу з розчином солі тетразолію (наприклад, хлориду або броміду), яка взаємодіє тільки з живими клітинами бактерій, забарвлюючи їх у малиновий колір. Мікроскопія зрізів тканин дає уявлення про наявність чи відсутність живої мікрофлори у дослідному матеріалі, тобто про якість дезінфекції поверхні рослинного зразка.

Після процедури дезактивації бактерій на поверхні рослинний матеріал подрібнюється в асептичних умовах до гомогенної маси, розводиться, якщо потрібно, та інокулюється на поверхню селективного поживного середовища в залежності від очікуваного виду бактерій-ізолятів. Наприклад, бактерія *A. diazotrophicus*, асоціант цукрової тростини, добре виділяється на середовищі з додаванням неочищеного цукру або екстракту рослини-господаря [77], а *Azospirillum*, *Campylobacter* — на середовищі з малатом [78].

До середини 70-х чи не єдиним прямим методом детекції бактерій всередині тканин рослини була електронна мікроскопія. Трансмісійний мікроскоп дозволяє спостерігати в ультратонких зрізах тканин рослин не тільки локалізацію бактерій, але й ультраструктуру клітин бактерій та рослин, яка дає інформацію про фізіологічний стан партнерів. Незважаючи на цінність інформації, електронна мікроскопія як метод визначення ендоефітної природи бактерій застосовується рідко з причини часота та трудоемності процесу дослідження, а також через високу вартість робіт.

Менш дорогим методом визначення локалізації бактерій у тканинах рослини є метод світлової мікроскопії. Для вирізнення бактерій серед рослинних клітин необхідно їх контрастувати. Методом редукції солей тетразолію можна розрізнити бактеріальні та рослинні клітини. В умовах низького редокс-потенціалу зазначені солі утворюють нерозчинну кольорову форму — формазан [4] і, таким чином, у місцях скупчення фізіологічно активних клітин бактерій, де відбувається редукція барвника, проявляється його колір як свідчення присутності живих ендоефітів. У зрізах тканин рослини при мікроскопуванні у видимому світлі забарвлені бактерії нескладно ідентифікувати. Запропонований свого часу метод забирає небагато часу і не потребує складної техніки для виявлення бактерій,

однак, оскільки тетразолійні солі є цитохімічним індикатором сукцинатдегідрогенази *in vivo*, то одночасне забарвлення клітин рослини інколи може призвести до плутанини рослинних органел з бактеріальними клітинами.

Для суворого доведення локалізації конкретного виду бактерій всередині рослини розроблено також декілька різновидів імунологічного визначення бактерій. Імунологічні методи полягають у застосуванні полі- або моноклональних антитіл, специфічних до окремого виду бактерій. Використання імунологічних методів не залежить від фізіологічного стану бактерій і дозволяє одночасно ідентифікувати специфічні бактерії серед змішаної популяції ендоситів та визначити їхню локалізацію у рослинному депо.

Чутливість імунологічних методів неоднакова і залежить від таких факторів, як специфічність антитіл, вид рослини, штам бактерій. Полі- та моноклональні антитіла забезпечують різні рівні чутливості методу. Поліклональні антитіла менш специфічні до конкретного виду бактерій і нерідко дають перехресну реакцію з близькими видами бактерій. Моноклональні антитіла є більш специфічними, однак вони теж дають перехресні реакції всередині виду, якщо антигени бактерій відрізняються за побудовою бодай однією амінокислотою [80]. На відміну від моноклональних антитіл, поліклональні приєднуються не тільки до мембранних білків, але й до білків флагел, фімбрій і, таким чином, у певному об'ємі визначається більше клітин, ніж є насправді, що спотворює результати.

Певним чином рівень детекції бактерій імунологічними методами залежить від впливу рослинного матеріалу на антитіло або хід реакції антиген—антитіло. Так, рівень визначення бактерій *E. asburiae* з використанням поліклональних антитіл у подрібнених рослинних зразках —  $10^5$  КУО/мл, що значно менше, ніж при визначенні бактерій у чистій культурі [70]. Для запобігання впливу рослинного оточення *in vivo* на чутливість детекції бактерій у тканинах останні переносять з тканин на мембрани або фіксують рослинні зразки. У першому випадку антитіла реагують з бактеріальними клітинами поза рослиною, а в іншому — рослинна тканина фіксується, і процес фіксації призводить до дезактивації тих клітинних компонентів, що руйнують або блокують антитіла, наприклад, гідролітичних ферментів.

Для візуалізації комплексу антитіло—антиген до антитіл приєднують деякі речовини, наприклад, флюорохроми. Останні випромінюють світло у видимому районі спектра при збудженні ультрафіо-

летом і, таким чином, уможливають детекцію бактерій при мікроскопіюванні в ультрафіолетовому світлі (рис. 1). Існує також більш складна техніка визначення специфічних бактерій за допомогою створення кон'югатів антитіл з ферментами, які взаємодіють з відповідними субстратами. Продукти їхньої взаємодії забарвлюють комплекс антиген—антитіло. Для контрастування позначених антитіл і спостереження бактерій в електронному мікроскопі (або за допомогою світлової мікроскопії) використовують частки колоїдного золота.

Полі- та моноклональні антитіла застосовують у декількох різновидах імунометодів при визначенні внутрішньої локалізації бактерій. Для з'ясування відповіді, чи присутні бактерії у тканинах рослини-господаря, їх переносять безпосередньо з рослини на нітроцелюлозну мембрану, попередньо пошкоджуючи поверхню для вивільнення бактерій. Інший спосіб детекції бактерій — вичавлення соку або розтирання рослинного матеріалу, нанесення розведень на мембрану і визначення їх методом дот-блот або ELISA [70]. При детекції бактерій методом дот-блот проводять реакцію антиген—антитіло, і присутність бактерій виявляється за проявленням кольору або флюоресценції на мембрані у залежності від обраного кон'югата.

Для ідентифікації специфічних бактерій серед можливої суміші мікроорганізмів та точного визна-



Рис. 1. Визначення бактерій, позначених антитілами, за допомогою флюоресцентної мікроскопії. Локалізовані на поверхні кореня бактеріальні клітини світяться в ультрафіолетовому промінні

чення концентрації бактерій у рослинному матеріалі при мікроскопіюванні зафіксовані за стандартною методикою ультратонкі зрізи певних частин рослини інкубують із специфічними та неспецифічними антитілами, якими покривають частки золота. Після контрастування зрізів специфічні бактерії чітко вирізняються серед інших завдяки позначенню частками золота.

Одним з пізніших методів детекції бактерій у тканинах рослин є використання полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для ампліфікації фрагментів ДНК або РНК ендоефітів з метою ідентифікації бактерій за допомогою аналізу послідовностей ампліфікованої нуклеїнової кислоти (НК) (див. [81]). Цей метод дозволяє не тільки визначити локалізацію бактерій у межах однієї рослини, але й вести спрямований пошук специфічної бактерії серед кола рослин або аналізувати спектр ендоефітів окремих видів рослин. Слід зазначити, що при використанні цього методу немає необхідності виділяти бактерії з місць їхньої локалізації, а достатньо виділити лише НК з об'єкта дослідження. Для ПЛР-визначення бактерій у тканинах рослин використовують різні праймери в залежності від завдання. Наприклад, якщо ведеться пошук конкретної бактерії серед певного кола рослин-господарів, то використовують праймери, специфічні до цієї бактерії. Це можуть бути, наприклад, послідовності ДНК, комплементарні унікальним генам бактерії. Для вивчення мікробного співтовариства, яке локалізується всередині окремої рослини, використовують праймери, специфічні до еубактеріальної ДНК, що кодує малу субодиницю 16S рибосомної РНК [82, 83]. Метод полягає у виділенні ДНК з частин рослини, де локалізовані ендоефіти, ампліфікації за допомогою специфічних праймерів до генів, які кодуєть 16S рибосомну РНК, у визначенні послідовності ДНК-продуктів реакції і порівнянні їх з відомими послідовностями 16S рДНК, що містяться у базах даних. Так, ПЛР-ампліфікація та аналіз послідовностей ДНК бактерії, виділеної з тканин кукурудзи, дозволили визначити її як *Klebsiella spp.* [46].

Методом молекулярної діагностики бактерій, заснованої на аналізі генів 16S рДНК, було визначено внутрішню локалізацію бактерій *Azoarcus* у пакистанській траві та рисі [19, 83, 85]. Іншу можливість для філогенетичного визначення бактерій, присутніх всередині рослини, дає використання послідовностей структурних генів нітрогенази — ферменту, що каталізує перетворення атмосферного азоту в аміак. Використання праймерів, специфічних до одного з таких генів (*nifH*), дозволяє ідентифікувати різноманітні азотфіксуючі мік-

роорганізми, порівнюючи послідовності останніх з відомими послідовностями гена *nifH*. Такий підхід до визначення бактерій було застосовано при пошуку екологічної ніші бактерії *Azoarcus* у природних умовах, а також за його допомогою визначено нові азотфіксуючі бактерії [19, 86].

Для спрощення процедури детекції бактерій всередині рослин та визначення їхньої локалізації в геном бактерій вводять репортерні гени. Продукти таких генів постійно синтезуються у бактеріальній клітині та дають інформацію про місце їхнього знаходження. Для таких цілей використовується ген  $\beta$ -глюкуронідази — ферменту, який окислює безколірний субстрат 5-бром-4-хлор-3-індоліл- $\beta$ -D-глюкуронід до продукту блакитного кольору (індиго) [87]. Кольорова конверсія дає можливість визначати за кольором бактерії у тканинах будь-якої частини рослини. Отже, введення згаданого гена під конституційним промотором у хромосому бактерії, що вивчається, дозволяє отримати інформацію щодо її екологічної ніші. Злиття такого репортерного гена з геном, який цікавить дослідника, дає інформацію не тільки про локалізацію бактерій, але й стосовно функціонування позначеного гена в умовах розвитку бактерій *in planta* [88]. Використовуються й інші репортерні гени, наприклад, *lacZY* (утилізація лактози за допомогою  $\beta$ -галактозидази) або *hyle* (перетворення катехолу у 2-гідроксимуконівий семиальдегід) [89], але перевагою даного маркера над іншими є те, що він не зустрічається у більшості бактерій та є відсутнім у рослин. Важливою обставиною є також те, що моніторинг позначених GUS-маркером бактерій можна проводити *in vitro*, аналізуючи якусь частину рослини, не знешкоджуючи рослину та не порушуючи процесу взаємодії її з бактеріями [90].

В останні три роки набув поширення інший репортерний ген для вивчення експресії генів, який кодує так званий зелений флуоресцентний білок (GFP). Цей ген виділено з медузи *Aequorea victoria* [91], і експресію як природного варіанта, так і мутантного продемонстровано у різноманітних організмах: бактеріях, комах, дріжджах, рослинах, ссавцях [92]. Клітини, позначені GFP-маркером, візуалізуються за допомогою флуоресцентної мікроскопії, оскільки білок випромінює світло у зеленій частині спектра. Перевагою GFP перед GUS-маркером є, перш за все, те, що його експресія не потребує наявності субстрата, завдяки чому обминаються проблеми, пов'язані з використанням останнього. Окрім того, позначені GFP-маркером клітини можна вивчати за допомогою кількісного імідж-аналізу [92]. За допомогою функціонального злиття генів, які детермінують нітрогеназу (*nif*

НДК), та гена GFP визначено експресію *nif*-генів у бактерії *Azoarcus* sp. BH72 при розвитку останньої у корневих волосках та епідермальних клітинах коренів проростків рису [21].

Шляхи та механізми проникнення непатогенних бактерій до рослин. Механізми проникнення мікроорганізмів у тканини рослин вироблялися у процесі еволюції в залежності від типу їхньої взаємодії: тісніший контакт бактерій з рослиною забезпечується більш складним механізмом. Наприклад, паразити та симбіонти рослин набули таких складних механізмів, що за їхньою допомогою бактерії впізнають тільки рослину-господаря. Шляхи попадання патогенних бактерій у рослинний організм добре вивчено й описано [93]. У значній мірі це стосується і непатогенних бактерій, які можуть потрапити всередину рослини через дихальця, трихоми, через пошкодження тканин епідермісу боковими коренями. На рослині існує чимало «воріт» інфекції, через які мікроорганізми пасивно потрапляють всередину. По-перше, при формуванні латеральних коренів з перичиклу і просуванні їх через кортекс виникають пошкодження тканин кореня, внаслідок яких бактерії проникають в епідерміс останнього. Експериментально доведено, що бактерія *Bacillus polymixa* краще колонізує тканини кореня сосни після формування латеральних коренів [74]. Це справедливо і для інших видів бактерій. По-друге, бактерії потрапляють у рослинний організм через механічні пошкодження або дихальця [59]. Через природні «ворота» інфекції будь-які бактерії пасивно потрапляють всередину, але питання у тому, чи вони там виживають.

Аналіз даних, отриманих при вивченні локалізації ендодіттів у тканинах рослин методом електронної мікроскопії, призвів до висновку, що бактерії рухаються від кортексу до стели через пошкоджені гідролітичними ферментами стінки клітин. Так, наприклад, через два тижні після іпокуляції рису бактеріями *K. oxytoca* останні спостерігалися не тільки у кортексі, а навіть у судинах метаксилеми кореня. При цьому відбувся діз'яс рослинної клітинної стінки на шляху переміщення бактерій у місцях контакту з бактеріями (рис. 2). Однак рослина не вказувала видимих ознак ушкодження, навпаки, бактерії стимулювали її розвиток. Такі спостереження навели на думку про участь гідролітичних ферментів у проникненні ендодіттичних бактерій у товщу тканин.

Вперше про можливу роль целюлолітичних ферментів у процесі внутрішньої колонізації рослини-господаря ендодіттичними бактеріями доповіли німецькі вчені [19, 94]. Активність двох ферментів — екзоглюканази та ендоглюканази було

визначено у бактерії азоркус, і гени, що їх кодують, клоновано та охарактеризовано їхні послідовності. Індукція ендоглюканази, експресію гена якої (*egl*) виявляли цитохімічно, відбувається у корневих волосках рослини, інфікованої бактеріями. Мутації у структурному гені або у регуляторному локусі, які призводять до *Egl*-фенотипу, впливають на проникнення бактерій всередину тканин рослини-господаря, а саме — значно знижують його рівень.

Переконливий доказ продукції целюлази *in planta* бактеріями *E. asburie* та *P. fluorescens* отримано в експериментах з інокуляції бавовнику [70]. Інфіковані проростки бавовнику фіксували для електронно-мікроскопічного аналізу, і ультратонкі зрізи тканин обробляли ендоглюканазою у комплексі з колоїдним золотом для її позначення. На дослідних зразках рослинного матеріалу у місцях скупчення бактерій біля клітинних стінок не спостерігалось позначок золотом, що свідчило про гідроліз целюлози в стінках клітин [64].

Відомо, що пектолітичні ферменти відіграють певну роль у інфекційному процесі патогенних бактерій [95, 96]. Ці ферменти розкладають пектин — компонент серединної пластинки клітинної стінки рослин — до олігосахаридів, які, у свою чергу, засвоюються бактеріями за допомогою інших ферментів. Багато з описаних ендодіттів мають пектолітичну активність, але рівень її низький і тому бактерії не завдають рослині шкоди [97-99]. Іншою причиною непатогенності може бути структура пектолітичних ферментів та відсутність ізоформ, які впливають на вірулентність бактерій, а також нездатність активно виділяти ферменти назовні [99, 100].

В літературі описано випадки, які спрощують роль пектолітичних ферментів непатогенних бактерій у проникненні всередину рослинного організму. Так, з одного боку, псевдомонади, виділені з тканин томатів, не проявляють пектолітичної активності [49], з іншого — відомо, що бактерії з високою пектолітичною активністю не виявляються у тканинах рослин [74]. У цих роботах слід враховувати умови, в яких бактерії взаємодіяли з рослиною. Наші дані свідчать, що пектат ліаза (PL) бактерій *K. oxytoca* може відігравати певну роль у проникненні їх у рослину. Так, штами бактерій з посиленою PL активністю здатні активніше колонізувати рослину зсередини [101].

Незважаючи на недостатність інформації щодо механізмів проникнення та поширення ендодіттичних бактерій всередину рослин, можна зробити висновок, що як проникнення, так і розповсюдження бактерій в органах рослин є активними процесами.

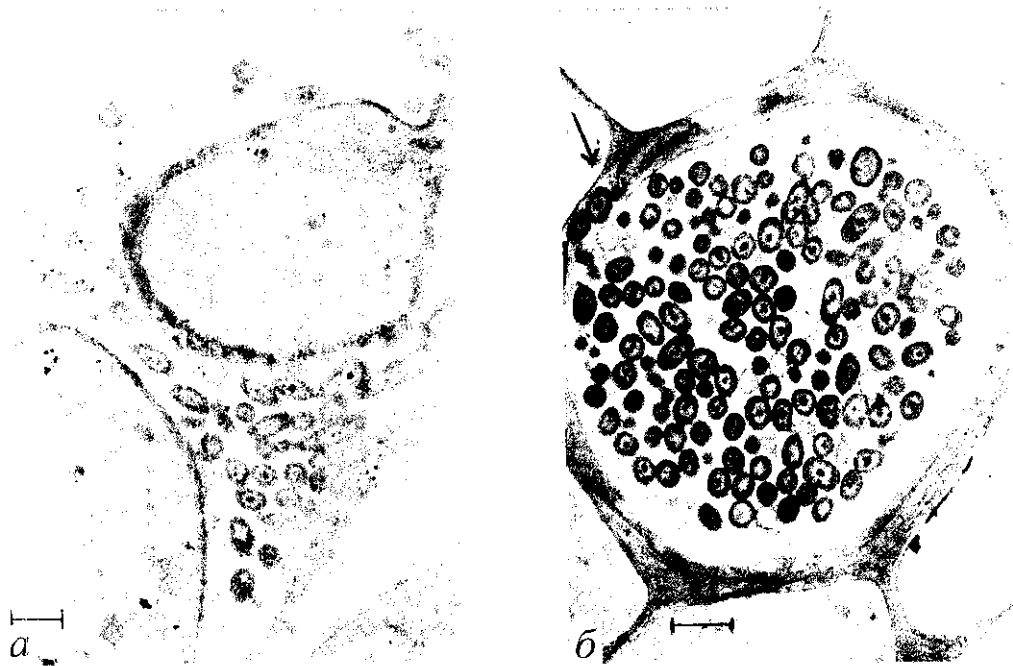


Рис. 2. Ультрамiкроскопiчне визначення бактерiй у тканинах рису: а — епiдермiсi; б — ксилемi. Стрiлкою позначено бактерiї всерединi клiтинної стiнки

**Шляхи поширення ендofiтiв.** Створення iнокyлятив на основi ендofiтних бактерiй (бiодобрив, бiопестицидiв) має великi перспективи для ресурсозберiгаючого сiльського господарства та збереження довкiлля. Несимбiотичнi бактерiї, здатнi до утворення ендofiтних популяцiй у рослинах, використовуються у виглядi рiзноманiтних бiопрепаратiв для обробки ґрунту, насiння, вегетативної частини рослин [102—105]. Обробка насiння або вегетативної частини рослини свiжою культурою бактерiй дає найкращi показники, але рiдка форма препаратy є нестiйкою i використовується лише у мiсцях виробництва. Для тривалого збереження препаратiв застосовують рiзноманiтнi твердi основи для бактерiй, переважно торф, а останнi 20 рокiв використовують бiополiмери [106—109]. Зручнок у використаннi сухою формою бiопрепаратiв є також мiнеральнi гранули, наповненi бактерiями [110, 111].

Облiгатнi ендofiти у природних умовах поширюються серед рослин, якi розмножуються вегетативно, тому традицiйнi методи введення їх у рослину (обробка насiння або частин рослини) є проблемою. Iншою проблемою є розширення кола рослин-господарiв. Створення штучних асоцiацiй таких бактерiй з рослинами, якi розмножуються мiкроклонуванням, не має перешкод, оскiльки ку-

льтивування культури тканин рослини з бактерiями призводить до формування стабiльної асоцiацiї i поширення мiкроклонiв, iнфiкованих корисними бактерiями. Рiзновидом спiльного культивування бактерiй з рослиною-господарем є введення в систему третього партнера — арбускулярного мiкоризного гриба (AM). Останнiй утворює спори, якi контаминуються бактерiальним партнером, за рахунок чого поширюють *A. diazotrophicus* спорами [25]. Для цiєї бактерiї вiдомий лише такий промисловий спiсiб iнфiкування рослин.

**Закiнчення.** Ендofiтнi бактерiї здатнi проникати у тканини рiзноманiтних рослин та поширюватися у рослинному органiзмовi, не спричиняючи йому шкоди та надаючи певної користi. На вiдмiну вiд патогенних та симбiотичних бактерiй, ендofiти не мають хазайської специфiчностi i не призводять до формування анатомiчних структур на рослини на зразок бульбочок або галiв. Однак у порiвняннi з вiльноiснуючими бактерiями ендofiти утворюють бiльш стабiльнi асоцiацiї з рослиною. На вiдмiну вiд них, вони виживають у рослинному депо протягом вегетацiї рослини. Ендofiтнi бактерiї не мають властивих тiльки їм механiзмiв поширення всерединi рослини, i механiзми їхньої взаємодiї з рослинами вiддалено нагадують такi, що мають фiтопатогеннi бактерiї. У процесi еволюцiї ферменти,



які забезпечували бактеріям виживання за рахунок розкладання рослинних полімерів живих рослин, зазнали змін, разом з тим змінився тип живлення бактерій і відповідно тип відносин з рослиною. Механізми взаємодії бактерій з рослинами контролюються з боку обох партнерів і забезпечують їм взаємну користь.

Спектр видів бактерій, здатних активно проникати у тканини рослин та утворювати всередині рослини ендосферні популяції без ураження рослин, дуже широкий; з-поміж них є як активні колонізатори, котрі поширюються у тканинах, сягаючи щільності  $10^8$  КУО/г тканини за будь-яких умов (*Pseudomonas*), так і бактерії, що активно потрапляють до тканин рослин, але поширюються в них лише за сприятливих умов (*Azospirillum*, *Klebsiella*, *Azoarcus*, *Acetobacter*, *Enterobacter*). Такими умовами є низький вміст поживних речовин у субстраті, де розвивається рослина, конкуренція з боку ризобактерій, стадія розвитку рослини тощо. Саме серед ендосферних бактерій через їхній тісний зв'язок з рослиною відшукуються кандидати на створення бакпрепаратів для підвищення продуктивності рослин. На сьогодні створено чимало ефективних препаратів для захисту сільськогосподарських рослин від хвороб та для живлення небобових рослин на основі ендосферних, однак довершених продуктивних суперштамів ще не знайдено, і надії покладаються як на диво природи, так і на генетичну модифікацію бактерій.

Автор висловлює щире подяку професорові Р. І. Гвоздюку за критичні зауваження.

Н. А. Козыровская

Взаимодействие эндосферных бактерий с растением на клеточном и молекулярном уровнях

Резюме

В обзоре представлена информация о локализации бактерий в тканях растений, а также обсуждаются пути и механизмы проникновения бактерий внутрь растения. Рассматриваются методы детекции эндосферных бактерий внутри растений (цитохимические, иммунологические, молекулярно-генетические).

N. O. Kozyrovska

Interaction of endophytic bacteria with the plant: on cellular and molecular level

Summary

This review summarizes of data on the endophytic bacteria location in the plant tissue. Entries and mechanisms of penetration are discussed. Methods of detection of endophytes in the plant interior (cytochemical, immunological, molecular-genetical) are reviewed.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Hollis J. P. Bacteria in healthy potato tissue // *Phytopathology*.—1951.—44.—P. 351—366.

- Martin J. K. Factors influencing the loss of organic carbon from wheat roots // *Soil Biol. Biochem.*—1977.—9.—P. 1—7.
- Balandreau J., Knowles R. The rhizosphere // *Interactions between nonpathogenic soil microorganisms and plants* / Eds Y. R. Dommergues, S. V. Krupa.—Amsterdam: Elsevier, 1978.—P. 243—268.
- Patriquin D. G., Dobereiner J. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil // *Can. J. Microbiol.*—1978.—24.—P. 734—742.
- Patriquin D. G., Dobereiner J., Jain D. K. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses // *Ibid.*—1983.—29.—P. 900—915.
- Burris R. H. 100 years of discoveries in biological N<sub>2</sub>-fixation // *Nitrogen fixation: hundred years after* // Eds H. Bothe, F. J. de Bruijn, W. E. Newton.—Stuttgart; New York: Gustav Fisher, 1988.—P. 21—30.
- Weller D. M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria // *Annu. Rev. Phytopathol.*—1988.—26.—P. 379—407.
- Gunner H. B., Zuckerman B. M., Walker R. W. et al. The distribution and persistence of diazinon applied to plant and soil and its influence on rhizosphere and soil microflora // *Plant Soil*.—1966.—25.—P. 249—264.
- Brown M. E. Plant growth substances produced by microorganisms of soil and rhizosphere // *J. Appl. Bacteriol.*—1972.—35.—P. 443—451.
- Rovira A. D. Microbial inoculation of plants. I. Establishment of free-living nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere and their effects on maize, tomato, and wheat // *Plant Soil*.—1963.—19.—P. 304—314.
- Brown M. E., Burlingham S. K., Jackson R. M. Studies on *Azotobacter* species in soil. III. Effects of artificial inoculation on crop yields // *Ibid.*—1964.—20.—P. 194—214.
- Cooking E., Gough C., Webster G. et al. Intercellular colonization of non-legumes by *Azorhizobium caulinodans* is stimulated by specific flavonoids // *Biological fixation of nitrogen for ecology and sustainable agriculture: Abstr. book.*—Poznan, 1996.—P. 253.
- Christiansen-Weniger C. N<sub>2</sub>-fixation by ammonium excreting *Azospirillum brasilense* auxin-induced root tumors of wheat (*Triticum aestivum* L. // *Biol. Fertil. Soils*.—1992.—13.—P. 165—172.
- Козыровская Н. А., Гвоздь Р. И., Мурас В. А., Кордюм В. А. Перенос маркера плазмиды RP41 в *Xanthomonas beticola* // *Докл. АН УССР.*—1980.—№ 5.—С. 82—85.
- Kozyrovska N., Alexeyev M., Kovtunovych G. et al. Survival of *Klebsiella oxytoca* VN13 engineered to bioluminescence on barley roots during plant vegetation // *Microb. Releases.*—1994.—2.—P. 261—265.
- McInroy J. A., Kloepper J. W. Population dynamics of endophytic bacteria in field-grown sweet corn and cotton // *Can. J. Microbiol.*—1995.—41.—P. 895—901.
- Musson G., McInroy J. S. A., Kloepper J. W. Development of delivery systems for introducing endophytic bacteria into cotton // *Biocontrol Sci. Technol.*—1995.—5.—P. 407—416.
- Reinhold B., Hurek T., Fendrik I. Cross-reaction of predominant nitrogen-fixing bacteria with enveloped, round bodies in the root interior of kallar grass // *Appl. Environ. Microbiol.*—1987.—53.—P. 889—891.
- Reinhold-Hurek M., Hurek T. Capacities of *Azoarcus* sp., a new genus of grass-associated diazotrophs // *New horizons in nitrogen fixation: Proc. 9th Int. Congr. Nitrogen Fixation (6—12 December 1992, Cancun, Mexico)* / Eds R. Palacios, J. Mora, W. E. Newton.—Dordrecht: Kluwer, 1993.—P. 671—675.

20. Hurek T., van Montagu M., Kellenberger E., Reinhold-Hurek B. Induction of complex intracytoplasmic membranes related to nitrogen fixation in *Azoarcus* sp. BH72 // Mol. Microbiol.—1995.—18.—P. 225—236.
21. Egener T., Hurek T., Reinhold-Hurek B. Use of green fluorescent protein to detect expression of *nif* genes of *Azoarcus* sp. BH72, a grass-associated diazotroph, on rice roots // Mol. Plant Microbe Interact.—1998.—11.—P. 71—75.
22. Dobereiner J., Reis V. M., Lazarini A. C. New N<sub>2</sub>-fixing bacteria in association with cereals and sugar cane // Nitrogen fixation: hundred years after / Eds H. Bothe et al.—Stuttgart: Gustav Fisher, 1988.—P. 717—722.
23. Cavalcante V. A., Dobereiner J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugar cane // Plant Soil.—1988.—108.—P. 23—31.
24. Li R., MacRae I. C. Specific association of *Acetobacter diazotrophicus* with sugar cane // Soil Biol. Biochem.—1991.—23.—P. 999—1002.
25. Dobereiner J., Reis V. M., Paula M. A., Olivares F. Endophytic diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants // New horizons in nitrogen fixation: Proc. 9th Int. Congr. Nitrogen Fixation (6—12 December 1992, Cancun, Mexico) / Eds R. Palacios et al.—Dordrecht: Kluwer, 1993.—P. 671—675.
26. Paula M. A., Reis V. M., Dobereiner J. Interaction of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*) sugar cane (*Saccharum spp.*) and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*) // Biol. Fertil. Soils.—1991.—11.—P. 111—115.
27. Stephan M. P., Oliveria M., Teira K. R. S. et al. Physiology of dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus* // FEMS Microbiol. Lett.—1991.—77.—P. 67—72.
28. Cojho E. H., Reis V. M., Schenberg A. C., Dobereiner J. Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amylophilic yeast in nitrogen-free batch culture // FEMS Microbiol.—1988.—106.—P. 341—346.
29. James E. K., Reis V. M., Olivares F. L. et al. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus* // J. Exp. Bot.—1994.—45.—P. 757—766.
30. Fuentes-Ramirez L. E., Jimenez-Salgado T., Abarca-Ocampo I. R., Caballero-Mellado J. Auxin production by *Acetobacter diazotrophicus*, an indol-acetic acid producing bacterium isolated from sugar cane cultivars of Mexico // Plant Soil.—1993.—154.—P. 145—150.
31. Caballero-Mellado J., Fuentes-Ramirez L. E., Reis V. M., Martinez-Romero E. Genetic structure of *Acetobacter diazotrophicus* populations and identification of a new genetically distant group // Appl. Environ. Microbiol.—1995.—61.—P. 3008—3013.
32. Jimenez-Salgado T., Fuentes-Ramirez L. E., Tapia-Hernandez A. et al. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria // Ibid.—1997.—63.—P. 3676—3683.
33. Pimentel J. P., Olivares F. L., Pitard R. M. et al. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae* // Plant Soil.—1991.—137.—P. 61—65.
34. Baldani V. L. D., James E. K., Baldani J. I., Dobereiner J. Colonization of rice by the nitrogen-fixing bacteria *Herbaspirillum spp.* and *Azospirillum brasilense* // New horizons in nitrogen fixation: Proc. 9th Int. Congr. Nitrogen Fixation (6—12 December 1992, Cancun, Mexico) / Eds R. Palacios, J. Mora, W. E. Newton.—Dordrecht: Kluwer, 1993.—P. 705.
35. Baldani J. I., Pot B., Kirchof G. et al. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a milk plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3 // Int. J. Syst. Bacteriol.—1996.—46.—P. 802—810.
36. You C., Zou F. Non-nodular endorhizosphere nitrogen fixation in wetland rice // Can. J. Microbiol.—1989.—35.—P. 403—408.
37. You C. B., Song W., Wang H. X. et al. Association of *Alcaligenes faecalis* with wetland rice // Plant Soil.—1991.—137.—P. 81—85.
38. Michaels K., Vanderleyden J., van Gool A. *Azospirillum* — plant root associations: a review // Biol. Fertil. Soils.—1989.—8.—P. 356—368.
39. Bashan Y., Levanyon H., Whitmoyer R. E. Root surface colonization of non-cereal crop plants by pleomorphic *Azospirillum brasilense* Cd // J. Gen. Microbiol.—1990.—137.—P. 187—196.
40. Baldani V. L., de Alvarez M. A. B., Baldani J. I., Dobereiner J. Establishment of inoculated *Azospirillum spp.* in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum // Plant Soil.—1986.—90.—P. 35—46.
41. Hirota Y., Fujii T., Sano Y., Iyana S. Nitrogen fixation in the rhizosphere of rice // Nature.—1978.—276.—P. 416—417.
42. Козыровская Н. А., Макутрук В. Л., Рукдашев Э. Азотфиксирующие виды *Klebsiella* выделяют индолил-3-уксусную кислоту // Биополимеры и клетка.—1991.—7, № 3.—С. 89—91.
43. Неуен Т. Х., Тон Т. Б., Тарасенко В. А., Козыровская Н. А. Азотфиксирующая энтеробактерия колонизирует ткани корня риса // Молекуляр. и генет. механизмы взаимодействия микроорганизмов и растений.—Пуццано, 1989.—С. 209—214.
44. Белявская Н. А., Козыровская Н. А., Кучеренко Л. А. и др. Взаимоотношения бактерий рода *Klebsiella* с растением. 1. Электронно-микроскопический анализ взаимодействия эндифитных микроорганизмов с корнями проростков риса // Биополимеры и клетка.—1995.—11, № 1.—С. 55—61.
45. Козыровская Н. А., Коштунович Г. Л., Петак А. М. и др. Взаимоотношения бактерий рода *Klebsiella* с растением. 2. Локализация бактерий *Klebsiella oxytoca* и *K. terrigena* в тканях табака и пшеницы // Там же.—№ 6.—С. 75—80.
46. Palus J. A., Borneman J., Ludden P. W., Tilpelt E. W. A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zea mays* L. and *Zea luxurians* Hilt. and Doebley // Plant Soil.—1996.—186.—P. 135—142.
47. Martinez-Romero E., Oswald-Spring U., Miranda M. Towards the application of nitrogen research to forestry and agriculture // Biological fixation of nitrogen for ecology and sustainable agriculture / Eds A. Legocki, H. Bothe, A. Puntler.—Berlin: Heidelberg: Springer, 1997.—P. 187—191.
48. Hussian A., Vancura V. Formation of biologically active substances by rhizosphere bacteria and their effect on plant growth // Folia Microbiol.—1970.—15.—P. 468—478.
49. Van Peer R., Punte H. L. M., de Veger L. A., Schippers B. Characterization of root surface and endorhizosphere pseudomonads in relation to their colonization of roots // Appl. Environ. Microbiol.—1990.—56.—P. 2462—2470.
50. Qui X., Pei Y., Wang Y. N., Zhang F. X. Isolation of *Pseudomonas* from cotton plants and their effect on seedling diseases // Acta phytophyl. Sin.—1990.—17.—P. 303—306.
51. Misaghi I. J., Donndelinger C. R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants // Phytopathology.—1990.—80.—P. 808—811.
52. Sharrock K. R., Parkes S. L., Jack H. K. et al. Involvement of bacterial endophytes in storage roots of buttercup squash (*Cucurbita maxima* D. hybrid «Delica») // N. Z. J. Crop Hortic. Sci.—1991.—19.—P. 157—165.

53. Fisher P. J., Petrini O., Scott H. M. L. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.) // *New Phytol.*—1992.—122.—P. 299—305.
54. Van Baren A. M., Waalwijk C. Biological control of the bacterial ring rot pathogen by endophytic bacteria isolated from potato // *Phytopathology.*—1993.—83.—P. 1406.
55. Gardner J. M., Feldman A. W., Zablutowicz R. M. Identity and behavior of xylem-residing bacteria in rough lemon roots of Florida citrus trees // *Appl. Environ. Microbiol.*—1982.—43.—P. 1335—1342.
56. Gagne S., Richrd C., Rousseau H., Antoin H. Xylem-residing bacteria in alfalfa roots // *Can. J. Microbiol.*—1987.—33.—P. 996—1000.
57. Bell C. R., Dickie G. A., Harvey W. L. G., Chan J. W. Y. F. Endophytic bacteria in grapevine // *Ibid.*—1995.—41.—P. 46—53.
58. Mahaffee W. F., Klopper J. W., van Vuurde J. W. L., van den Brink M. Endophytic colonization of *Phaseolus vulgaris* by *Pseudomonas fluorescens* strain 89B-27 and *Enterobacter asburiae* strain JM22 // Improving plant productivity with rhizosphere bacteria / Eds M. H. Ryder, P. M. Stephens, G. D. Bowen.—Glen Osmond: CSIRO Division of Soils, 1994.—P. 180.
59. Lamb T. G., Tonkyn D. W., Kluepfel D. A. Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue // *Can. J. Microbiol.*—1996.—42.—P. 1112—1120.
60. Benizni E., Schoeny A., Pichard C., Cuckert A. External and internal colonization of maize by two *Pseudomonas* strains: enumeration by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) // *Curr. Microbiol.*—1997.—34.—P. 297—302.
61. Mahaffee W. F., Klopper J. W. Bacterial communities of the rhizosphere and endorhiza associated with field-grown cucumber plants inoculated with a plant growth-promoting rhizobacterium or its genetically modified derivative // *Can. J. Microbiol.*—1997.—43.—P. 344—353.
62. Mahaffee W. F., Bauske E. M., van Vuurde J. W. et al. Comparative analysis of antibiotic resistance, immunofluorescent colony staining, and a transgenic marker (bioluminescence) for monitoring the environmental fate of rhizobacterium // *Appl. Environ. Microbiol.*—1997.—63.—P. 1617—1622.
63. Quandt-Hallmann A., Hallmann J., Klopper J. W. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant-associated bacteria // *Can. J. Microbiol.*—1997.—43.—P. 254—259.
64. Quandt-Hallmann A., Benhamou N., Klopper J. W. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant // *Ibid.*—P. 577—582.
65. Fisher P. J., Broad S. A., Clegg C. D., Lappin Scott H. M. Retention and spread of genetically engineered pseudomonad in seeds and plants of *Zea mays* L.: a preliminary study // *New Phytol.*—1993.—124.—P. 101—106.
66. Hadar Y., Hannon G. E., Taylor A. G., Horton J. M. Effects of pregermination of pea and cucumber seeds and of seed treatment with *Enterobacter cloacae* on rots caused by *Phytophthora* spp. // *Phytopathology.*—1983.—73.—P. 1322—1325.
67. Hinton D. M., Bacon C. W. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn // *Mycopathologia.*—1995.—129.—P. 117—125.
68. Rattray E. A., Prosser J. I., Glover L. A., Killham K. Characterization of rhizosphere colonization by luminescent *Enterobacter cloacae* at population and single-cell levels // *Appl. Environ. Microbiol.*—1995.—61.—P. 2950—2957.
69. Roberts D. P., Marty A. M., Dery P. D., Hartung J. S. Isolation and modulation of growth of a colonization-impaired strain of *Enterobacter cloacae* in cucumber spermosphere // *Can. J. Microbiol.*—1996.—42.—P. 196—201.
70. Quandt-Hallmann A., Klopper J. W. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species // *Ibid.*—P. 1144—1154.
71. Ruppel S., Hecht-Buchholz C., Remus R. et al. Settlement of the diazotrophic, phytoeffective bacterial strain *Pantoea agglomerans* on and within winter wheat: an investigation using ELISA and transmission electron microscopy // *Plant Soil.*—1992.—145.—P. 261—273.
72. Pleban S., In gel F., Chet I. Control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotia rolfsii* in the greenhouse using endophytic *Bacillus* spp. // *Eur. J. Plant Pathol.*—1993.—101.—P. 665—672.
73. Pleban S., Chernin L., Chet I. Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus* // *Leti. Appl. Microbiol.*—1997.—25.—P. 284—288.
74. Shishido M., Loeb B. M., Chanway C. P. External and internal root colonization of loblolly pine seedlings by two growth promoting *Bacillus* strains originated from different root microsites // *Can. J. Microbiol.*—1994.—41.—P. 709—713.
75. Kluepfel D. A. The behavior and tracking bacteria in the rhizosphere // *Annu. Rev. Phytopathol.*—1993.—31.—P. 441—472.
76. Chanway C. P., Holl F. B., Turkinton R. Genotypic coadaptation in plant growth promotion of forage species by *Bacillus polymyxa* // *Plant Soil.*—1988.—106.—P. 281—284.
77. Reis V. M., Olivares F. L., Dohereiner J. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat // *World J. Microbiol. Biotechnol.*—1994.—10.—P. 401—405.
78. McClung C. R., Patriquin D. G. Isolation of a nitrogen-fixing *Campylobacter* species from the roots of *Spartina alterniflora* Lioisel // *Can. J. Microbiol.*—1980.—26.—P. 881—886.
79. Jordan R. L. Strategy and techniques for the production of monoclonal antibodies // *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A laboratory manual* / Ed. R. Hampton.—St. Paul: APS press, 1990.
80. Fazekas de St., Groth S. Monoclonal antibody production: principles and practice // *Handbook of monoclonal antibodies: application in biology and medicine.*—New York: Noyes publ., 1985.—P. 1—10.
81. Козыровская Н. А., Ковтунович Г. Л. Молекулярно-генетические методы детекции и идентификации макроорганизмов в окружающей среде // *Биополимеры и клетка.*—1994.—10, № 3, 4.—С. 5—28.
82. Hurek T. S., Burggraf C., Woese R., Reinhold-Hurek B. 16S rRNA-target polymerase chain reaction and oligonucleotide hybridization to screen for *Azoarcus* spp., grass-associated diazotrophs // *Appl. Environ. Microbiol.*—1993.—59.—P. 3816—3824.
83. Hurek T., Reinhold-Hurek B. Identification of grass-associated and toluene-degrading diazotrophs *Azoarcus* spp. by analyses of partial 16S ribosomal DNA sequences // *Ibid.*—1995.—61.—P. 257—261.
84. Reingold-Hurek B., Hurek T. Interactions between diazotrophs and grasses // *Biological fixation of nitrogen for ecology and sustainable agriculture* / Eds A. Legocki et al.—Berlin, Heidelberg: Springer, 1997.—P. 317—321.
85. Hurek T., Wagner B., Reinhold-Hurek B. Identification of  $N_2$ -fixing plant- and fungus-associated *Azoarcus* species by PCR-based genomic fingerprints // *Appl. Environ. Microbiol.*—1997.—63.—P. 4331—4339.
86. Ueda T., Suga Y., Yabiro N., Matsuguchi T. Remarkable  $N_2$ -fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *MniH* gene sequences // *J. Bacteriol.*—1995.—177.—P. 1414—1417.
87. Jefferson R. A. The GUS reporter gene system // *Nature.*—1989.—342, N 6252.—P. 835—837.

88. Jefferson R. A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system // *Plant Mol. Biol. Rep.*—1987.—5.—P. 387—405.
89. O'Callaghan K., Webster G., Batchelor C. et al. Infection of *Aeshania rostrata* by *Azorhizobium caulinodans* ORS571 with A *lacZ* reporter gene // *Biological fixation of nitrogen for ecology and sustainable agriculture: Abstr. book.*—Poznan, 1996.—P. 89.
90. Wilson K., Jefferson R.  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) as a marker to study plant-microbe interactions // 2nd Int. Workshop on PGPR (October 14—19).—Interlaken, 1990.—P. 69.
91. Chalfie M., Tu Y., Euckirchen G. et al. Green fluorescent protein as a marker of gene expression // *Science.*—1994.—263.—P. 802—805.
92. Van den Wymelenberg A.J., Cullen D., Spear R. N. et al. Expression of green fluorescent protein in *Aureobasidium pullulans* and quantification of fungus on leaf surfaces // *Biotechniques.*—1997.—23.—P. 686—690.
93. Huang J. Ultrastructure of bacterial penetration in plants // *Annu. Rev. Phytopathol.*—1986.—24.—P. 141—157.
94. Reinhold-Hurek B., Hurek T., Claeysens M., van Montagu M. Cloning, expression in *Escherichia coli*, and characterization of cellulolytic enzymes of *Azoarcus* sp., a root-invading diazotroph // *J. Bacteriol.*—1993.—175.—P. 7056—7065.
95. Starr M. P., Chatterjee A. K. The genus *Erwinia*: enterobacteria pathogenic for plants and animals // *Annu. Rev. Microbiol.*—1972.—26.—P. 389—425.
96. Walton J. D. Deconstructing the cell wall // *Plant Physiol.*—1994.—104.—P. 1113—1118.
97. Von Reisen V. L. Pectinolytic, indole-positive strains of *Klebsiella pneumoniae* // *Int. J. Syst. Bacteriol.*—1976.—26.—P. 143—145.
98. Nasser W., Awade A. C., Reverchon S., Robert-Baudouy J. Pectate lyase from *Bacillus subtilis*: molecular characterization of the gene, and properties of the cloned enzyme // *FEBS.*—1993.—335.—P. 319—326.
99. Liao C.-H. Analysis of pectate lyases produced by soft rot bacteria associated with spoilage of vegetables // *Appl. Environ. Microbiol.*—1989.—55.—P. 1677—1683.
100. Fraije B. A., Bosveld M., Van den Bulk R. W., Rombouts F. M. Analysis of conductance responses during depolymerization of pectate by soft rot *Erwinia* spp. and other pectolytic bacteria isolated from potato tubers // *J. Appl. Microbiol.*—1997.—83.—P. 17—24.
101. Kovtunovych G., Kordyum V., Kleiner D., Kozyrovska N. Enhancing the plant colonization rate with endophytic nitrogen-fixing bacteria // *Biopolymery i klityna.*—1999.—15.—(друкується).
102. Mei R., Chen B., Lu S., Chen Y. Field application of yield increasing bacteria (YIB) // *Clin. J. Microcol.*—1990.—2.—P. 45—49.
103. Okon Y. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture // *Trends Biotechnol.*—1977.—33.—P. 223—228.
104. Chen Y., Mei R., Lu S. et al. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in Chinese agriculture // *Management of soilborn diseases / Ed. R. Utkheade.*—New Delhi: M/S Kalyani publ., 1995.—P. 164—184.
105. Kozyrovska N., Kovtunovych G., Gromosova O. et al. Novel inoculants for an environmentally-friendly crop production // *Resources, Conserv. and Recycling.*—1996.—18.—P. 79—85.
106. Fravel D. R., Marois J. J., Lunsden R. D., Connick W. J. Encapsulation of potential control agents in an alginate-clay matrix // *Phytopathology.*—1985.—75.—P. 774—777.
107. Mugnier J., Jung G. Survival of bacteria and fungi in relation to water activity and the solvent properties of water in biopolymer gels // *Appl. Environ. Microbiol.*—1985.—50.—P. 108—114.
108. Bashan Y. Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth // *Ibid.*—1986.—51.—P. 1089—1098.
109. Kozyrovska N., Kovtunovych G., Negrutka V. et al. Microbial inoculants for a sustainable agriculture // *Proc. Int. Seminar «Environment protection: modern studies in ecology and microbiology»* (May 13—16, 1997, Uzhgorod, Ukraine).—Uzhgorod, 1997.—P. 284—288.
110. Fouilleux G., Revellin C., Catroux G. Short-term recovery of *Bradyrhizobium japonicum* during an inoculation process using mineral microgranules // *Can. J. Microbiol.*—1994.—40.—P. 322—325.
111. Ocumpaugh W. R., Smith G. R. Granular inoculum enhances establishment and forage production of arrowleaf clover // *J. Prod. Agric.*—1991.—4.—P. 219—224.

Надійшла до редакції 24.01.98