

БИОРАЗНООБРАЗИЕ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ: ПЕРСПЕКТИВНЫЙ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ РЕСУРС

В.К.ЧЕБОТАРЬ^{1,2}, А.В. ЩЕРБАКОВ^{1,2}, Е.Н. ЩЕРБАКОВА¹, С.Н.МАСЛЕННИКОВА^{1,2}, А.Н.
ЗАПЛАТКИН^{1,2}, Н.В.МАЛЬФАНОВА^{1,2}, Н.В.РАВИН³

¹ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии, 196608 г. Санкт-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского д.3

² Университет ИТМО (Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики), ул. Ломоносова, д. 9, Санкт-Петербург, Россия, 191002

³ Центр "Биоинженерия" РАН, пр-т 60-летия Октября д.7, корп.1, Москва, Россия, 117312

В статье представлены данные о биоразнообразии эндофитных бактерий, механизмах их взаимодействия с растениями и перспективах их практического использования в качестве микробных препаратов для сельского хозяйства.

Ключевые слова: эндофитные бактерии, биоразнообразие, растительно-микробное взаимодействие, ростстимуляция, биоконтроль, вторичные метаболиты, геном бактерий, микробные препараты

Keywords: *endophytic bacteria, biodiversity, plant-microbial interaction, plant growth promotion biocontrol, secondary metabolites, the genome of bacteria, microbial preparations*

Введение

Ассоциации растений с полезными микроорганизмами привлекают внимание ученых с точки зрения не только изучения фундаментальных основ взаимодействия различных организмов, но и возможного использования данных взаимодействий в практике экологически ориентированного адаптивного растениеводства. Большинство научных исследований направлено на изучение ризосферных микроорганизмов [1-3]. Однако имеются микроорганизмы, существующие внутри растения, включая надземную часть и семена, так называемые эндофитные бактерии. Эндофитными могут называться бактерии, которые способны колонизировать внутренние ткани растения, не вызывая при этом заболеваний и не оказывая отрицательного влияния на его развитие [4, 5]. Из существующих на земле 300 000 видов растений, каждый вид является хозяином для одного и более видов эндофитных бактерий [6]. Однако в настоящее время всего несколько видов растений достаточно полно изучены в отношении содержания в них эндофитных бактерий.

Таким образом, открываются большие перспективы по поиску, выделению и изучению новых видов эндофитных бактерий, положительно влияющих на развитие растений, с целью создания новых микробиологических препаратов для адаптивного растениеводства [7]. Бактериальные эндофиты колонизируют те же экологические ниши в растении, что и фитопатогенные микроорганизмы, поэтому являются перспективным агентом биоконтроля фитопатогенов [3].

Действительно, в ряде работ было показано, что эндофитные бактерии способны ингибировать развитие фитопатогенных микроорганизмов [8, 9] и нематод [10, 11]. Эндофитные бактерии способны ингибировать развитие болезней путем синтеза биологически активных соединений, обладающих «антипатогенным» действием, то есть изучение биоразнообразия таких бактерий позволит выделить и идентифицировать новые вещества для создания новых химических препаратов для борьбы с болезнями человека, растений и животных [6].

Кроме того, некоторые штаммы эндофитных бактерий могут быть использованы для фиторемедиации, т.е. очистки техногенно загрязненных территорий с помощью создания специальных растительно-бактериальных систем [7, 13-15, 17].

Биоразнообразие и количество эндофитных бактерий, выделяемых из различных видов растений-хозяев

Нишу эндофитов в растении могут занять лишь те бактерии, которые способны проникать внутрь тканей растения. Эти бактерии обычно колонизируют межклеточные пространства и могут быть выделены из всех частей растения, включая семена. Эндофитные бактерии выделялись как из однодольных, так и двудольных растений, начиная с древесных, таких как дуб (*Quercus* L.) и груша (*Pyrus* L.), до травянистых, таких как сахарная свекла (*Beta vulgaris* L.) и кукуруза (*Zea mays* L.) [25]. Классические исследования биоразнообразия эндофитных бактерий основывались на характеристике изолятов, полученных из внутренних тканей растений после их поверхностной стерилизации [26, 27]. Подробно список бактериальных эндофитов, включающий в себя как грамположительные так и грамотрицательные виды, выделяемые из широкого спектра растений-хозяев, был приведен в нескольких обзорах [28, 29].

Изучение микробных сообществ эндофитов, населяющих стебли, корни и клубни сельскохозяйственных культур с помощью метода анализа последовательностей гена 16S РНК, анализа профиля жирных кислот и утилизации различных источников углерода показало, что они представлены родами *Cellulomonas*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Pseudomonas* и *Microbacterium* [30]. Анализ надземной части *Crocus albiflorus* показал, что ткани растения содержат весьма разнообразные сообщества бактериальных эндофитов, причем как ранее известных, так и не известных науке [31]. Высокая плотность эндофитных бактерий была обнаружена в проростках тополя (*Populus* L.), ели (*Picea* A. Dietr.) и лиственницы (*Larix* Mill.), выращенных из культуры ткани [32]. На основании анализа последовательностей гена 16S РНК большинство этих изолятов эндофитных бактерий было отнесено к роду *Paenibacillus*.

Другие эндофитные бактерии из родов *Methylobacterium*, *Stenotrophomonas* или *Bacillus* были обнаружены только в некоторых культурах тканей тополя, ели и лиственницы. Некоторые виды *Paenibacillus* близкие к *P. humicus* накапливались в тканях в условиях *in vitro* без видимого негативного эффекта на растения. Микрочеренки тополя, инокулированные эндофитным штаммом *Paenibacillus* sp. 22 имели достоверно больше корней на черенок, и такие корни были длиннее, чем корни в контроле через три недели культивирования [32].

В Китае, провинция Хэбэй, с помощью анализа последовательностей гена 16S РНК изучалось бактериальное разнообразие эндофитных бактерий риса (*Oryza sativa* L.) [33]. Такой анализ показал наличие различных фил бактерий из библиотеки 16S РНК, относящихся к альфа, бета, гамма, дельта и эпсилон субклассов *Proteobacteria*, *Cytophaga*, *Flexibacter*, *Deinococcus-Thermus*, *Acidobacteria*, и археи. Доминирующей группой была *Betaproteobacteria* (27,08% от всех изолятов), в которой доминировал род *Stenotrophomonas*. Более 14% всех изолятов относились к некультивируемым видам бактерий [33].

В Индии изучали разнообразие эндофитных бактерий в стеблях кукурузы (*Zea mays* L.), выращиваемой в тропиках [34]. Эндофиты из стеблей кукурузы обнаруживались в течение всего вегетационного сезона. Их численность составляла $1,36-6,12 \times 10^5$ КОЕ/г сырой биомассы. Идентификация бактериальных изолятов, проведенная с помощью хроматографического анализа профиля жирных кислот показала, что в их числе доминируют *Bacillus pumilus*, *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* и *P. fluorescens*.

При исследовании 4-х сельскохозяйственных культур (кукуруза (*Zea mays* L.), сорго (*Sorghum* Moench), соя (*Glycine max* (L.) Merr.) и пшеница (*Triticum* L.)) и широкого спектра дикорастущих растений (злаковые и бобовые травы) было выделено 853 штамма бактериальных эндофитов. Среди которых примерно половина относилась к грамположительным, а другие к грамотрицательным бактериям. Анализ профиля

жирных кислот позволил отнести изоляты эндофитов к 15 родам: *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Cellulomonas*, *Clavibacter*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Rothia*, и *Xanthomonas*, среди которых доминировали *Bacillus*, *Corynebacterium*, и *Microbacterium*. Причем, эндофитные бактерии из родов *Cellulomonas*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, и *Microbacterium* выделенные как из культурных, так и из диких растений показали наивысший уровень колонизации растений (кукурузы и сорго) [35].

Растение как среда обитания эндофитных бактерий

Современные методы визуализации микроорганизмов, основанные на использовании автофлуоресцирующих белков [36], помогают обнаружить и подсчитать микроорганизмы *in situ* на поверхности и внутри растений [36-38]. Одна из таких маркерных систем представлена зеленым флуоресцирующим белком (GFP), который оказался очень удобным методом при мониторинге колонизации псевдомонадами внутренних тканей растений [37, 38]. Бактериальные клетки с геном *gfp* под конститутивным промотором, встроенным в хромосому, могут быть легко идентифицированы при помощи эпифлуоресцентной микроскопии или конфокального лазерного сканирующего микроскопа [15, 39]. Колонизация эндофитными бактериями внутренних тканей растения также может быть визуализируема при помощи β -глюкуронидазной (GUS) репортерной системы. GUS-маркированный штамм *Herbaspirillum seropedicae* Z67 был использован для инокуляции проростков риса. Наиболее интенсивное GUS окрашивание наблюдалась в колеоптилях, латеральных корнях и соединениях латеральных корней с главным корнем [40]. *Herbaspirillum seropedicae* впоследствии колонизирует межклеточные пространства, аэренхиму и кортикальные клетки, а некоторые бактериальные клетки могут проникать в стелу и далее в сосудистую ткань.

Для ассоциаций растений с эндофитными бактериями не характерна видимая анатомическая дифференциация партнеров. Тем не менее, в их развитие может быть вовлечен ряд молекулярных механизмов, описанных для бобово-ризобияльного и арбускулярно-микоризного симбиозов [41].

Имеются сведения, указывающие на существование определенной специфичности взаимодействий в системе: эндофитная бактерия/растение-хозяин. Показано, что облигатный азотфиксирующий эндофит *Azoarcus* sp. штамм BH72 индуцирует защитные механизмы растения-хозяина, что затрудняет колонизацию растений риса другими эндофитными бактериями [42]. В результате инокуляции проростков кукурузы штаммами доминирующих эндофитов стеблей кукурузы: *Bacillus pumilus*, *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* и *P. fluorescens*, наибольшая плотность эндофитных бактерий в проростках наблюдалась в варианте с *B. subtilis* [33].

Позитивное влияние бактериальных эндофитов на рост и развитие растений

Были проведены исследования по изучению рост-стимулирующей активности эндофитных бактерий [43]. Они отличались от биоконтрольных штаммов ризосферных бактерий, поскольку не ингибировали рост фитопатогенных микроорганизмов, а стимулировали развитие растений за счет улучшения минерального питания. Кроме того, эндофитные бактерии способны улучшать фосфорное питание растений [44, 45], продуцировать ИУК [46] и сидерофоры [47]. Было показано, что эндофитные бактерии способны продуцировать витамины, необходимые для растений [48]. Кроме того, было обнаружено, что эндофитные бактерии обладают целым рядом дополнительных свойств, необходимых для улучшения развития растений, таких как: регуляция осмотического давления, регуляция работы устьиц, модификация развития корневой системы растений, регуляция азотного питания растения [49]. В последнее время рост-стимулирующие эндофитные бактерии начали активно применяться для лесовосстановления и фиторемедиации техногенно загрязненных почв [7].

Активность эндофитных бактерий, контролирующая развитие патогенов («биоконтрольная активность»)

Эндофитные бактерии способны уменьшать или предотвращать отрицательное воздействие фитопатогенных микроорганизмов на растения [18, 49, 50]. Инокуляция растений эндофитными бактериями способна значительно уменьшать вред, наносимый растениям патогенными грибами, бактериями, вирусами, насекомыми и нематодами [29, 50-53]. Предполагается, что определенные виды эндофитных бактерий запускают защитные механизмы растений известные как индуцированная системная устойчивость (ISR), которая схожа с приобретенной системной устойчивостью (SAR) [7]. Этим механизмам эндофитных бактерий посвящен обзор Клеппера и Рю [54]. Таким образом, бактериальные эндофиты являются весьма перспективными организмами для разработки микробиологических экологически безопасных приемов борьбы с заболеваниями растений.

Органические соединения, продуцируемые эндофитными бактериями (вторичные метаболиты)

Многие эндофиты являются представителями общеизвестных почвенных бактерий из родов *Pseudomonas*, *Burkholderia* и *Bacillus* [27]. Эти рода хорошо известны как продуценты вторичных бактериальных метаболитов, таких как антибиотики, антираковые вещества, летучие органические соединения, фунгицидные, инсектицидные и иммунодепрессивные вещества. Хотя из эндофитных бактерий выделено достаточно много биологически активных веществ, они до сих пор остаются недостаточно используемым источником таких веществ [7].

Методы определения нуклеотидных последовательностей геномов бактерий

Расшифровка геномов микроорганизмов является одной из основ для проведения исследований в области микробиологии, молекулярной биологии и эволюции живых организмов. В применении к микроорганизмам, используемым в промышленности и сельском хозяйстве, расшифровка геномов позволяет идентифицировать гены, определяющие хозяйственно-значимые признаки соответствующих штаммов. Эта информация может использоваться как при отборе/селекции штаммов, так и для решения задач их молекулярной идентификации и контроля сохранения при промышленном культивировании их ценных признаков на генетическом уровне. Установление роли ДНК как материала наследственности, ее структуры и расшифровка генетического кода стали основой развития молекулярной биологии как науки, изучающей основы функционирования живых организмов на молекулярном уровне. Представления о том, что все свойства организма, в конечном счете «кодируются» его геномом т.е. последовательностью нуклеотидов, сразу же поставили задачу чтения нуклеотидных последовательностей ДНК, - секвенирования. В данном разделе представлено описание основных используемых в настоящее время методов секвенирования геномов микроорганизмов.

Поскольку размер бактериального генома (несколько миллионов нуклеотидов) многократно превышает длину чтения индивидуальной реакции в любом методе секвенирования (50-700 нт), для секвенирования геном микроорганизма разбивают на набор коротких случайным образом выбранных фрагментов (shotgun library), каждый из которых секвенируют по отдельности. Поскольку выборка является случайной, для полного "покрытия" генома необходима избыточность, т.е. совокупная длина фрагментов должна в несколько раз превышать длину генома. Избыточность чтения также повышает качество итоговой последовательности за счет многократного независимого прочтения каждого нуклеотида. Полученные последовательности отдельных фрагментов объединяются в «контиги», в идеальном случае, в один контиг, соответствующий полному геному (Схема 1). С увеличением кратности чтения число контигов будет вначале увеличиваться, а затем уменьшаться в идеале до одного в соответствии с формулой $N_{contigs} = N \times e^{-R}$ (где $N_{contigs}$ – число контигов, N – число просеквенированных фрагментов, R – кратность чтения



Схема 1 – Принцип секвенирования генома бактерии – *shotgun library*.

генома). Расчеты показывают, что 20-кратное перекрытие бактериального генома длиной в несколько миллионов нуклеотидов должно с высокой вероятностью позволить получить всего 1 контиг, соответствующий полному геному.

Однако, объединение отдельных последовательностей в единый контиг невозможно при сколь угодно высокой кратности чтения, если в геноме встречается повторяющаяся последовательность, длина которой превышает длину чтения индивидуальной реакции секвенирования (Схема 2). К таковым относятся, например, мобильные элементы, присутствующие в геномах микроорганизмов. Чем больше длина чтения индивидуальной реакции, тем меньшее число повторов будут разбивать полную геномную последовательность.

Таким образом, методика секвенирования бактериального генома должна обеспечивать возможность секвенирования библиотеки случайных фрагментов (*shotgun library*) до достижения 20-40 кратного перекрытия генома, что соответствует примерно 150-300 млн. нт.

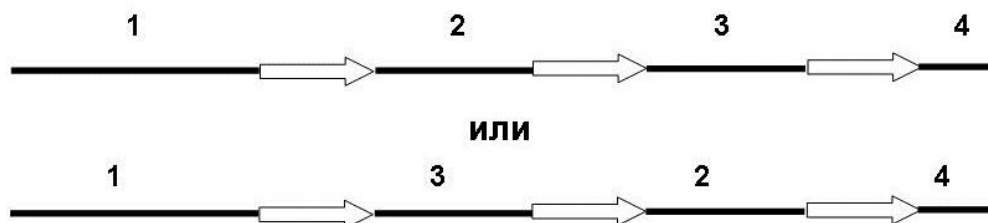


Схема 2 – Пример повторяющегося участка ДНК, длина которого превышает длину чтения индивидуальной реакции. В этом случае однозначная сборка генома невозможна. Повтор указан стрелкой.

Вторым важным требованием является максимально возможная длина чтения индивидуальной реакции секвенирования.

В настоящее время для секвенирования нуклеотидных последовательностей используются пять основных методов: классический метод «Сэнжеровского» секвенирования [55], в формате капиллярного электрофореза, параллельное пиросеквенирование [56], технология Illumina, лигазное секвенирование (SOLiD system) и недавно появившаяся технология Ion Torrent. Не вдаваясь в технические детали каждого метода, которые представлены в ряде обзорных работ [57-60], рассмотрим их основные характеристики.

«Сэнжеровское» секвенирование до настоящего времени остается «золотым стандартом» по качеству прочтения нуклеотидных последовательностей и длине прочтения индивидуальной реакции. Современный секвенатор ABI 3730XL позволяет в течение 3-х часов определить нуклеотидные последовательности 96 образцов со

средней длиной чтения 700-800 нуклеотидов, т.е. производительность прибора составляет около 20 тыс. нт в час. Однако, производительность этого метода и стоимость прочтения одного нуклеотида на порядки меньше, чем для методов секвенирования нового поколения. Даже расшифровка генома бактерии потребует нескольких месяцев работы прибора, поэтому сэнжеровский метод для этих целей в настоящее время не используется.

Метод пиросеквенирования, реализованный на приборе GS FLX (Roche), позволяет одновременно (12 часовой рабочий цикл) секвенировать около 500-800 млн. нуклеотидов, причем средняя длина чтения индивидуальной реакции пиросеквенирования составляет около 700 нуклеотидов. Этот метод наиболее широко используется для расшифровки геномов микроорганизмов, в том числе и исполнителями данной НИР [61-63].

Технологии Illumina и SOLID являются более высокопроизводительными. Так, прибор Illumina HiSeq2500 позволяет прочитать в 11-дневном рабочем цикле около 3 млрд. реакций со средней длиной прочтения 100 нт (300 млрд. нт). Близкими показателями обладает технология SOLID. Прибор SOLiD 5500xl (Applied Biosystems) позволяет генерировать до 50 млрд нт в день, - около 400 млн индивидуальных реакций длиной 50-75 нт. Наконец, IonTorrent PGM (Life Technologies), использующий сходную с пиросеквенированием методику, позволяет получить до 1 млрд нуклеотидов за один рабочий цикл, при этом длина прочтения индивидуальной реакции составляет 100-150 нт.

Важнейшими показателями полноты и качества секвенирования бактерии являются средняя кратность прочтения генома (определяет точность сиквенса – чем большее число раз прочтена конкретная точка генома тем точнее сиквенс в целом) и качество «сборки» генома. В идеальном случае геном должен быть представлен одной кольцевой молекулой ДНК, соответствующей хромосоме (плюс плазмиды при их наличии). Однако, для идентификации микроорганизма и генов, определяющих его хозяйственно-ценные признаки, этого не требуется, важно, чтобы большая часть геномной последовательности была представлена протяженными контигами, длина которых многократно превышала бы среднюю длину бактериального гена (около 1000 нт). В соответствии с требованиями технического задания средняя кратность прочтения геномной последовательности в индивидуальных реакциях секвенирования должна составлять не менее 40 раз, и более 50% геномной последовательности должно быть представлено в виде непрерывных последовательностей ДНК (контигов) длиной не менее 30.000 нуклеотидов, соответствующих участкам генома микроорганизма.

Для достижения этих показателей необходимо просеквенировать примерно 150-300 млн. нт. (средняя длина бактериального генома не более 5 млн. нт). Вторым важным требованием является максимально возможная длина чтения индивидуальной реакции секвенирования. Технологии Illumina и SOLID позволяют прочесть значительно больший объем нуклеотидных последовательностей за один рабочий цикл, но короткая длина чтения индивидуальной реакции секвенирования, которая меньше длины обычно встречающихся в бактериальных геномах повторов, не позволит «собрать» геномную последовательность в контиги средней длиной несколько десятков тысяч нуклеотидов. Эти оценки соответствуют и мировой практике – технологии Illumina и SOLID при расшифровке геномов микроорганизмов если и используются, то почти всегда как «дополнение» к пиросеквенированию [64].

Метод параллельного пиросеквенирования оптимальным образом позволяет решить задачу секвенирования геномов производственных штаммов *Bacillus subtilis* и *Bradyrhizobium japonicum*. Он позволяет получить как достаточный для 40-кратного перекрытия генома общий объем секвенирования (500-800 млн за запуск), так и обеспечивает максимальную длину прочтения индивидуальной реакции (500-700 нт).

Биотехнологические перспективы использования эндофитных бактерий

Уникальные штаммы эндофитных бактерий могут быть использованы непосредственно для инокуляции семян или саженцев, уменьшая, таким образом,

влияние биотических и абиотических факторов на растение, за счет активной колонизации внутренних тканей растений и последующего позитивного биохимического и физиологического воздействия на растение. Находясь в эндосфере, эндофиты имеют существенное преимущество перед организмами, обитающими в ризосфере и филлосфере за счет стабильного pH, влажности, потока питательных веществ и отсутствия конкуренции со стороны большого числа микроорганизмов [65]. Очень важно, что эндофиты, занимающие нишу эндосферы не являются случайными бактериями, а скорее всего, отбираются самим растением, как совместимые и способные обеспечивать растение-хозяина необходимыми веществами для защиты от биотических и абиотических стрессовых факторов. Энергия, затраченная растением на производство биомассы эндофитных бактерий, адекватно компенсируется за счет улучшения развития и физиологического состояния растения-хозяина.

Изучение эндофитов, находящихся во внутренних тканях тополя, показало, что они являются перспективными кандидатами для создания микробных препаратов, используемых для фиторемедиации полей, загрязненных толуеном, летучими углеводородами и тяжелыми металлами [7, 15, 17].

Для инокуляции растений эндофитными бактериями не требуется больших количеств инокулята, учитывая высокую специфичность данного растительно-микробного симбиоза и конкурентоспособность эндофитных бактерий. Этот прием может быть весьма привлекательным для биотехнологических производств, ищущих замену традиционным химическим пестицидам. Будущее использование комбинаций эндофитов с коммерческими пестицидами, применяемыми для обработки семян или проростков может привести к синергическому эффекту против одного или нескольких возбудителей болезней. Химические пестициды способны оказывать кратковременное ингибирующее действие на фитопатогенные микроорганизмы, тогда как биологические агенты оказывают долговременное негативное воздействие на фитопатогены в течение всего вегетационного сезона.

Таким образом, анализируя выше приведенные данные, можно заключить, что в природе растения, по-видимому, развиваются в тесном содружестве с эндофитными бактериями. Эндофитные бактерии способны увеличивать урожай сельскохозяйственных культур, способствовать фиторемедиации почв, ингибировать развитие патогенов, фиксировать азот атмосферы и производить биологически активные вещества. Таким образом, использование взаимодействий эндофит-растение может обеспечить улучшение развития сельскохозяйственных культур, а также сыграть роль в снижении «затратности» сельскохозяйственного производства как пищевой, так и технической продукции. Понимание механизмов, обеспечивающих эндофитным бактериям способность взаимодействовать с растениями и положительно влиять на их развитие, позволит более полно использовать биотехнологический потенциал данных микроорганизмов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №14-16-00146) и государственной финансовой поддержке ведущих университетов Российской Федерации (субсидия 074-U01).

Литература

1. Lindow S.E., Brandl M.T. Microbiology of the phyllosphere. Appl. Environ. Microbiol., 2003, 69:1875–1883.
2. Kuiper I., Lagendijk E.L., Bloemberg G.V., Lugtenberg B.J. Rhizoremediation: a beneficial plant–microbe interaction. Mol. Plant Microbe Interact., 2004, 17: 6–15.
3. Berg G., Eberl L., Hartmann A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. Environ. Microbiol., 2005, 7: 1673–1685.
4. Holliday P. A Dictionary of Plant Pathology. Cambridge University Press, Cambridge. 1989.
5. Schulz B., Boyle C. What are endophytes?. In: Microbial Root Endophytes/Schulz B.J.E., Boyle C.J.C., Sieber T.N. (eds). Springer-Verlag, Berlin. 2006:1–13.

6. Strobel G., Daisy B., Castillo U., Harper J. Natural products from endophytic microorganisms. *J. Nat. Prod.*, 2004, 67:257–268.
7. Ryan R.P., Germaine K., Franks A., Ryan D.J., Dowling D.N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2008, 278:1–9.
8. Lima A.C.F., Pizauro Junior J.M., Macari M., Malheiros E.B. Efeito do uso de probiotico sobre o desempenho e a atividade de enzimas digestivas de frangos de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 2003, 32:200–207.
9. Koumoutsi A., Chen X-H., Henne A. et al. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J. Bacteriol.*, 2004, 186(4):1084–1096.
10. Azevedo J.L., Maccheroni J. Jr., Pereira O., Ara W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electr. J. Biotech.*, 2000, 3:40–65.
11. Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W.F., Kloepper J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.*, 1997, 43:895–914.
12. Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Rodriguez-Kabana R., Kloepper J.W. Interactions between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. *Soil Biol. Biochem.*, 1998, 30:925–937.
13. Siciliano S., Fortin N., Himoc N. et al. Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67: 2469–2475.
14. Barac T., Taghavi S., Borremans B., Provoost A., Oeyen L., Colpaert J.V., Vangronsveld J., van der Lelie D. Engineered endophytic bacteria improve phyto-remediation of watersoluble, volatile, organic pollutants. *Nat. Biotechnol.*, 2004, 22: 583–588.
15. Germaine K., Keogh E., Borremans B. et al. Colonisation of poplar trees by gfp expressing bacterial endophytes. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2004, 48:109–118.
16. Germaine K., Liu X., Cabellos G., Hogan J., Ryan D., Dowling D.N. Bacterial endophyte-enhanced phyto-remediation of the organochlorine herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2006, 57: 302–310.
17. Porteous-Moore F., Barac T., Borremans B., Oeyen L., Vangronsveld J., van der Lelie D., Campbell D., Moore E.R.B. Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: the characterisation of isolates with potential to enhance phytoremediation. *Sys. App. Micro.*, 2006, 29: 539–556.
18. Ryan R.P., Ryan D.J., Sun Y.C., Li F-M., Wang Y., Dowling D.N.) An acquired efflux system is responsible for copper resistance in *Xanthomonas* strain IG-8 isolated from China. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2007, 268:40–46.
19. Хотянович А.В. Методы культивирования азотфиксирующих бактерий, способы получения и применение препаратов на их основе (методические рекомендации). Л., 1991.
20. Лактионов Ю.В. «Бактериальные препараты», Издатель LAP LAMBERT Academic Publishing, 2011.
21. Sutton M.A., O. Oenema, J.W. Erismann, A. Leip, H. van Grinsven, W. Winiwarter. Too much of a good thing - Curbing nitrogen emissions is a central environmental challenge for the twenty-first century. *Nature*. 2011, 472:159-161.
22. Берестецкий О.А., Доросинский Л.М., Кожемяков А.П. Эффективность препаратов клубеньковых бактерий в Географической сети опытов. *Известия АН СССР, серия биол.* 1987, 5: 670–679.
23. Биопрепараты в сельском хозяйстве (методология и практика использования микроорганизмов в растениеводстве и кормопроизводстве)/ Под ред. И.А. Тихоновича, Ю.В. Круглова. М., 2005.
24. Кожемяков А.П., Белоброва С.Н., Орлова А.Г. Создание и анализ базы данных по эффективности микробных биопрепаратов комплексного действия. *Сельскохозяйственная биология*, 2011, 3:112–115.
25. Posada F., Vega F.E. Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (*Ascomycota:Hypocreales*) as an endophyte in cocoa seedlings (*Theobroma cacao*). *Mycologia*, 2005, 97: 1195–1200.
26. Miche L., Balandreau J. Effects of rice seed surface sterilization with hypochlorite on inoculated *Burkholderia vietnamiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67:3046–3052.
27. Lodewyckx C., Vangronsveld J., Porteous F., Moore E.R.B., Taghavi S., Mezgeay M., van der Lelie D. Endophytic bacteria and their potential applications. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 2002, 21: 583–606.
28. Rosenblueth M., Martinez-Romero E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 2006, 19:827–837.

29. Berg G., Hallmann J. Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes. In: Microbial Root Endophytes. Schulz B.J.E., Boyle C.J.C., Sieber T.N.(eds). Springer-Verlag, Berlin. 2006.
30. Franks A., Ryan P.R., Abbas A., Mark G.L., O'Gara F. Molecular tools for Studying Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): Molecular Techniques for Soil and Rhizosphere Microorganisms. CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, UK. 2006.
31. Reiter B., Sessitsch A. Bacterial endophytes of the wildflower *Crocus albiflorus* analyzed by characterization of isolates and by a cultivation-independent approach. *Can. J. Microbiol.*, 2006, 52:140–149.
32. Ulrich K., Stauber T., Ewald D. *Paenibacillus*—a predominant endophytic bacterium colonising tissue cultures of woody plants. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.*, 2008, 93:347–351.
33. Sun L., Qiu F., Zhang X., Dai X., Dong X., Song W. Endophytic Bacterial Diversity in Rice (*Oryza sativa* L.) Roots Estimated by 16S rDNA Sequence Analysis. *Microb. Ecol.*, 2008, 55:415–424.
34. Rai R., Prasanta K. Dash P.K, Prasanna B. M., Singh A. Endophytic bacterial flora in the stem tissue of a tropical maize (*Zea mays* L.) genotype: isolation, identification and enumeration. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, 23:853–858.
35. Zinniel D.K., Lambrecht P., Harris N.B., Feng Z, Kuczmariski D., Higley P., Ishimaru C.A., Arunakumari A., Raul B.G., Vidaver A.K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(5):2198–2208.
36. Larrainzar E., O'Gara F., Morrissey J.P. Applications of autofluorescent proteins for *in situ* studies in microbial ecology. *Ann. Rev. Microbiol.*, 2005, 59:257–277.
37. Gage D.J., Bobo T., Long S.R. Use of green fluorescent protein to visualize early events of symbiosis between *Rhizobium meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa*). *J. Bacteriol.*, 1996, 178:7159–7166.
38. Tombolini R., Unge A., Davey M.E., de Bruijn F.J., Jansson J.K. Flow cytometric and microscopic analysis of GFP-tagged *Pseudomonas fluorescens* bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1997, 22:17–28.
39. Tombolini R., Jansson J.K.) Monitoring of GFP-tagged bacterial cells. In: *Methods in Molecular Biology: bioluminescence Methods and Protocols*. Humana Press Inc., Totowa, NJ. LaRossa R.A., (ed.). 1998.
40. Villacieros M., Power B., Sanchez-Contreras B. et al. Colonization behaviour of *Pseudomonas fluorescens* and *Sinorhizobium meliloti* in the alfalfa (*Medicago sativa*) rhizosphere. *Plant Soil*, 2003, 251, 47–54.
41. James E.K., Gyaneshwar P., Mathan N., Barraquio W.L., Reddy P.M., Iannetta P.P., Olivares F.L., Ladha J.K. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 2002, 15:894–906.
42. Miche L., Battistoni F., Gemmer S., Belghazi M., Reinhold-Hurek B. Up regulation of jasmonate-inducible defense proteins and differential colonization of roots of *Oryza sativa* cultivars with the endophyte *Azoarcus* sp. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, 2006, 1: 502–511.
43. 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, 91:127–141.
44. Wakelin S., Warren R., Harvey P., Ryder M. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. *Bio. Fert. Soils*, 2004, 40: 36–43.
45. Lee S., Flores-Encarnacion M., Contreras-Zentella M., Garcia-Flores L., Escamilla J.E., Kennedy C. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome C biogenesis genes. *J. Bacteriol.*, 2004, 186: 5384–5391.
46. Costa J.M., Loper J.E. Characterization of siderophore production by the biological-control agent *Enterobacter cloacae*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 1994, 7: 440–448.
47. Pirttila A., Joensuu P., Pospiech H., Jalonen J., Hohtola A. Bud endophytes of Scots pine produce adenine derivatives and other compounds that affect morphology and mitigate browning of callus cultures. *Physiol. Plant*, 2004, 121:305–312.
48. Compant S., Duffy B., Nowak J., Clement C., Barka E.A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005a, 71: 4951–4959.
49. Compant S., Reiter B., Sessitsch A., Nowak J., Clement C., Barka E.A. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by a plant growth-promoting bacterium, *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005b, 71:1685–1693.
50. Gray E.J., Smith D.L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signalling processes. *Soil Biol. Biochem.*, 2005, 37:395–412.

51. Kerry B.R. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Ann. Rev. Phytopath.*, 2000, 38:423–441.
52. Sturz A.V., Christie B.R., Nowak J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 2000, 19: 1–30.
53. Ping L., Boland W. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.*, 2004, 9: 263–266.
54. Kloepper J.W., Ryu C-M. Bacterial endophytes as elicitors of induced systemic resistance. In: *Microbial Root Endophytes*. Schulz B.J.E., Boyle C.J.C., Sieber T.N.(eds). Springer-Verlag, Berlin. 2006.
55. Sanger F., Niclein S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977,74:5463-5467.
56. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer MLI, Jarvie TP, Jirage KB, Kim JB, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu P, Begley RF, Rothberg JM. (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437:376–380.
57. Mardis, E.R.. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet.*, 2008, 24:133–141.
58. Metzker, M.L.. Sequencing technologies — the next generation. *Nat. Rev. Genet.*, 2010,11: 31–46.
59. Равин Н.В. Современные методы геномного секвенирования и их применение для расшифровки геномов микроорганизмов. *Биотехнология*, 2009, 5:8-15.
60. Glenn, T.C.. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Mol. Ecol. Resour.*, 2011,11: 759–769.
61. Скрыбин К.Г., Марданов А.В. , Кубланов И.В., Бонч-Осмоловская Е.А., Равин Н.В. Определение полной нуклеотидной последовательности генома гипертермофильного микроорганизма. *Доклады Академии наук*, 2008, 421(3):204-206.
62. Ravin N.V., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Kublanov I.V., Kolganova T.V., Lebedinsky A.V., Chernyh N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Skryabin K.G. Complete genome sequence of the anaerobic, protein-degrading hyperthermophilic crenarchaeon *Desulfurococcus kamchatkensis*. *J. Bacteriol.*, 2009, 191:2371-2379.
63. Mardanov A.V., Svetlitchnyi V.A., Beletsky A.V., Prokofeva M.I., Bonch-Osmolovskaya E.A., Ravin N.V., Skryabin K.G. The genome sequence of the crenarchaeon *Acidilobus saccharovorans* supports a new order, Acidilobales, and suggests an important ecological role in terrestrial acidic hot springs. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010,76:5652–5657.
64. Suen, G., Weimer, P.J., Stevenson, D.M., Aylward, F.O., Boyum, J., Deneke, J., Drinkwater, C., Ivanova, N.N., Mikhailova, N., Chertkov, O., Goodwin, L.A., Currie, C.R., Mead, D., and Brumm, P.J. The complete genome sequence of *Fibrobacter succinogenes* S85 reveals a cellulolytic and metabolic specialist. *PLoS One*, 2011, 6(4):e18814.
65. Backman P.A., Sikora R.A. Endophytes: An emerging tool for biological control. *Biological Control*, 2008, 46:1–3.