

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Tomaž RIJAVEC

**BAKTERIJSKI ENDOFITI V ZRNU KORUZE IN NJIHOV VPLIV NA
IZVORNE RASTLINE**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2005

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo Katedri za botaniko in Katedri za molekularno genetiko in mikrobiologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Marino Dermastia, za somentorico pa doc. dr. Majo Rupnik.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Marjana Regvar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Marina Dermastia
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Maja Rupnik
Zasebna raziskovalka

Članica: izr. prof. dr. Maja Ravnikar
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo

Datum zagovora: 27. 5. 2005

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tomaž Rijavec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 581.137:582.542:582.28:582(043.2)=863
KG	endofit/koruzna/ <i>Zea mays</i> /izolacija/identifikacija/rast in razvoj/biokontrola
AV	RIJAVEC, Tomaž
SA	DERMASTIA, Marina(mentor)/RUPNIK, Maja(somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2005
IN	BAKTERIJSKI ENDOFITI V ZRNJU KORUZE IN NJIHOV VPLIV NA IZVORNE RASTLINE
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 85 str., 16 pregl., 19 sl., 5 pril., 177 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Iz zrn sedmih sort koruze (<i>Zea mays</i> L.) smo izolirali bakterijske endofite iz imbibiranih in neimbibiranih zrn ter kaljenih in nekaljenih zrn. Ugotavljali smo tudi uspešnost izolacije bakterij iz zrn shranjenih daljše časovno obdobje. Bakterijske endofite smo večinoma izolirali iz kaljenih zrn štirih sort. Glede na delno nukleotidno zaporedje gena za 16S rDNA smo izolirane bakterije uvrstili v rodove <i>Microbacterium</i> , <i>Frigoribacterium</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Sphingomonas</i> in <i>Pantoea</i> . Ta uvrstitev se je ujemala z njihovimi mikroskopskimi značilnostmi in ostalimi značilnostmi kultur. V nadaljnje raziskave vpliva semenskih endofitov na razvoj izvorne rastline smo vključili samo sev iz rodu <i>Pantoea</i> . Ugotovili smo, da lahko pozitivno vpliva na rast in razvoj kalic izvorne rastline ter da zavira rast glive <i>Fusarium verticillioides</i> , ki povzroča bolezen pri koruzi. Naši rezultati kažejo, da so v zrnju koruze prisotni bakterijski endofiti, ki spadajo v različne bakterijske rodove, ter da vsaj nekateri med njimi lahko pozitivno vplivajo na rast in razvoj ter ščitijo rastlino pred patogenimi mikroorganizmi.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDK 581.137:582.542:582.28:582(043.2)=863
CX endofit/koruzna/*Zea mays*/izolacija/identifikacija/rast in razvoj/biokontrola
AU RIJAVEC, Tomaž
AA DERMASTIA, Marina(supervisor)/RUPNIK, Maja(co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY 2005
TI BACTERIAL ENDOPHYTES IN MAIZE CARYOPSIS AND THEIR EFFECT ON HOST PLANT DEVELOPMENT
DT Graduation thesis (university studies)
NO XI, 85 p., 16 tab., 19 fig., 5 ann.,177 ref.
LA sl
AL sl/en
AB We examined the presence of bacterial endophytes in seven maize cultivars' (*Zea mays* L.) caryopsis. We tried to isolate bacteria from imbibed and non-imbibed, and germinated and intact seeds. We also examined the bacterial counts in seeds stored over a longer time period. Bacteria were isolated from four out of seven maize cultivars, mostly from germinated seeds and only once from ungerminated seeds. Based on partial 16S rDNA gene sequence the bacterial genera were identified as *Microbacterium*, *Frigoribacterium*, *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Sphingomonas* and *Pantoea*. These results matched with microscopic and culture properties of the isolates. Only one of the isolates, identified as *Pantoea* sp., was used. in our further studies, where we examined the effect of bacterial endophytes on plant growth and development. We concluded that in certain cases the effect on plant growth is beneficial and that *Pantoea* can also inhibit the growth of the phytopathogenic fungus *Fusarium verticillioides*. Our result show that maize caryopsis harbors diverse bacterial endophytes and that some of them are beneficial for host plant growth and can protect their host against pathogenic microorganisms.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 BAKTERIJSKI ENDOFITI	2
2.1.1 Definicija bakterijskih endofitov	2
2.1.2 Izolacija, gojenje in ostale metode dokazovanje prisotnosti bakterijskih endofitov	3
2.1.2.1 Izolacija in gojenje	3
2.1.2.2 Mikroskopija	5
2.1.2.3 Imunološke metode	5
2.1.2.4 Molekularno biološke metode	5
2.1.3 Predstavniki bakterijskih endofitov	7
2.1.4 Lokalizacija in številčnost bakterijskih endofitov	12
2.1.5 Izvor endofitov	13
2.1.5.1 Evolucijski izvor	13
2.1.5.2 Ekološki izvor	14
2.1.6 Endofiti v semenih	15
2.2 ENDOFITI IN GOSTITELJSKA RASTLINA	16
2.2.1 Dejavniki, ki vplivajo na rast endofitov	16
2.2.1.1 Biotski dejavniki	16
2.2.1.1.1 Mikroorganizmi	16
2.2.1.1.2 Parazitski nematodi	17
2.2.1.1.3 Genotip rastline	18
2.2.1.2 Abiotski dejavniki	18
2.2.2 Vpliv endofitov na rast in razvoj gostiteljske rastline	19
2.2.2.1 Neposredni pozitivni učinki	19
2.2.2.2 Posredni pozitivni učinki	19
2.2.2.3. Negativni učinki	20
2.2.3 Uporaba bakterijskih endofitov v kmetijstvu in industriji	20
2.2.4 Koruza (<i>Zea mays</i> L.) in bakterijski endofiti	21
2.2.4.1 Koruza in njen izvor	21
2.2.4.2 Zgradba koruznega zrna	21
2.2.4.3 Bakterijski endofiti v zrnih koruze	23
2.3 NAMEN IN HIPOTEZA	23
3 MATERIALI IN METODE DELA	24
3.1 MATERIALI	24

3.1.1	Testni rastlinski material	24
3.1.2	Gojišča	24
3.1.3	Encimi, reagenti, kemikalije	27
3.1.4	Pribor	29
3.1.5	Mikroorganizmi	30
3.2	METODE DELA	30
3.2.1	Izolacija bakterij iz koruznih zrn	30
3.2.1.1	Čiščenje zrn	30
3.2.1.2	Površinska sterilizacija	31
3.2.1.3	Izolacija bakterij iz nekaljenih zrn	32
3.2.1.3.1	Izolacija bakterij iz celih nekaljenih zrn	32
3.2.1.3.2	Izolacija bakterij iz posameznih delov nekaljenih zrn	33
3.2.1.4	Izolacija bakterij iz kaljenih zrn	33
3.2.1.4.1	Kalitev neimbibiranih zrn	33
3.2.1.4.2	Kalitev imbibiranih zrn	34
3.2.1.4.3	Izolacija čistih bakterijskih kultur in shranjevanje	34
3.2.2	Karakterizacija izoliranih bakterijskih sevov	35
3.2.2.1	Barvanje po Gramu	35
3.2.2.2	Izolacija DNA	36
3.2.2.2.1	Izolacija DNA za določanje nukleotidnega zaporedja	36
3.2.2.2.2	Izolacija DNA za restrikcijske profile gena 16S rDNA	37
3.2.2.3	Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	37
3.2.2.4	Določanje nukleotidnega zaporedja	39
3.2.2.5	Določanje restrikcijskih profilov gena 16S rDNA	39
3.2.3	Vpliv bakterijskega seva TR-5 na rast in razvoj izvorne rastline	39
3.2.3.1	Vpliv bakterijskih endofitov na rast in razvoj mladih rastlin	39
3.2.3.2	Vpliv bakterijskega seva TR-5 na rast izvorne rastline v sterilnih laboratorijskih razmerah	40
3.2.3.3	Vpliv bakterijskega seva TR-5 na rast izvorne rastline v nesterilnih laboratorijskih razmerah	40
3.2.3.4	Ponovna izolacija vnesenega bakterijskega seva TR-5	41
3.2.4	Vpliv bakterijskega seva TR-5 na zmanjšano rast glive <i>Fusarium verticillioides</i>	42
3.2.4.1	Vpliv bakterijskega seva TR-5 na zmanjšano rast glive na hranilnih gojiščih	42
3.2.4.2	Vpliv bakterijskega seva TR-5 na zmanjšano rast glive na površini kalečih zrn koruze	43
4	REZULTATI	44
4.1	IZOLACIJA BAKTERIJSKIH ENDOFITOV	44
4.1.1	Izolacija bakterij iz nekaljenih zrn	44
4.1.1.1	Izolacija bakterij iz celih nekaljenih zrn	44
4.1.1.2	Izolacija bakterij iz posameznih delov nekaljenih zrn	44
4.1.2	Izolacija bakterij iz kaljenih zrn	44
4.1.2.1	Uspešnost izolacije bakterijskih endofitov iz neimbibiranih kaljenih koruznih zrn	46
4.1.2.2.	Uspešnost izolacije bakterijskih endofitov iz imbibiranih kaljenih koruznih zrn	47

4.1.2.3	Uspešnost izolacije bakterijskih endofitov iz zrn iste sorte koruze v daljšem časovnem razdobju	48
4.2	IDENTIFIKACIJA IZOLIRANIH BAKTERIJSKIH SEVOV	48
4.3	VPLIV BAKTERIJSKEGA SEVA TR-5 NA RAST IZVORNE RASTLINE	50
4.3.1	Vpliv bakterijskega seva TR-5 na rast izvorne rastline v sterilnih laboratorijskih razmerah	50
4.3.2	Vpliv bakterijskega seva TR-5 na rast izvorne rastline v nesterilnih laboratorijskih razmerah	53
4.3.3	Vpliv bakterijskega seva TR-5 na zmanjšano rast glive <i>Fusarium verticillioides</i>	58
4.3.3.1	Vpliv bakterijskega seva TR-5 na zmanjšano rast glive na hranilnih gojiščih	58
4.3.3.2	Vpliv bakterijskega seva TR-5 na zmanjšano rast glive na površini kalečih zrn	60
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	64
5.1	RAZPRAVA	64
5.1.1	Izolacija in identifikacija bakterijskih endofitov	64
5.1.2	Vpliv bakterijskih endofitov na rast in razvoj izvorne rastline	67
5.1.3	Zaviranje rasti fitopatogene glive <i>Fusarium verticillioides</i>	69
5.2	SKLEPI	70
6	POVZETEK	71
7	VIRI	72
7.1	CITIRANI VIRI	72
7.1	DRUGI VIRI	84
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.	
Preglednica 2.1	Pregled bakterijskih endofitov in mesta izolacije	7
Preglednica 3.1	Pregled koruznih sort	24
Preglednica 3.2	Optimalne razmere za površinsko sterilizacijo zrn posameznih koruznih sort	31
Preglednica 3.3	Reakcijska mešanica za reakcijo PCR	38
Preglednica 3.4	Reakcijska mešanica za reakcijo PCR	38
Preglednica 3.5	Restriksijska mešanica	39
Preglednica 4.1	Pregled izolacije bakterijskih endofitov iz neimbibiranih kaljenih zrn različnih sort koruze	47
Preglednica 4.2	Izolacija bakterijskih endofitov iz imbibiranih kaljenih zrn sorte W22	47
Preglednica 4.3	Izolacija bakterij iz zrn iste rastline v 1,5 letnem obdobju	48
Preglednica 4.4	Karakterizacija bakterijskih izolatov na osnovi barvanja po Gramu, morfologije in primerjave nukleotidnih zaporedij gena 16S rDNA	49
Preglednica 4.5	Vpliv bakterijskega seva TR-5 na rast koruze v sterilnih razmerah	51
Preglednica 4.6	Vpliv bakterijskega seva TR-5 na rast koruze v nesterilnih razmerah I	54
Preglednica 4.7	Vpliv bakterijskega seva TR-5 na rast koruze v nesterilnih razmerah II	56
Preglednica 4.8	Vpliv bakterijskega seva TR-5 na rast glive <i>Fusarium verticillioides</i> na različnih hranilnih gojiščih	59
Preglednica 4.9	Vpliv bakterijskega seva TR-5 in seva bakterije <i>E. coli</i> na rast patogene glive <i>Fusarium verticillioides</i>	60
Preglednica 4.10	Vpliv bakterijskega seva TR-5 na rast patogene glive <i>Fusarium verticillioides</i> na površini kalečih zrn - makroskopski prikaz	61
Preglednica 4.11	Vpliv bakterijskega seva TR-5 na rast patogene glive <i>Fusarium verticillioides</i> na površini kalečih zrn - glivni micelij pregledan s stereomikroskopom	63

KAZALO SLIK

	str.	
Slika 2.1	Zgradba koruznega zrna	22
Slika 3.1	Shema kontrole sterilizacijskega postopka	32
Slika 3.2	Aparatura za sterilno mletje	32
Slika 3.3	Kalitev zrn v sterilnih steklenih petrijevkah	33
Slika 3.4	Bakterijska gojišča s kaljenimi koruznimi zrni	34
Slika 3.5	Primerjava sevov izoliranih s površine gojišča s kalicami s sevi izoliranimi iz rastlinskega macerata	35
Slika 3.6	Shema poskusa antibioze na hranilnih gojiščih (nanos po sredini gojišča)	42
Slika 3.7	Shema poskusa antibioze na hranilnih gojiščih (konfluentni nanos)	43
Slika 4.1	Bakterijska rast na stiku mlade koreninice z gojiščem	45
Slika 4.2	Rast glivnih kontaminant v kontrolnem tekočem gojišču TSA	46
Slika 4.3	Rast koruze v sterilnih laboratorijskih razmerah	50
Slika 4.4	Vpliv bakterijskega seva TR-5 na rast koruze v sterilnih razmerah	52
Slika 4.5	Vpliv bakterijskega seva TR-5 na rast koruze v nesterilnih razmerah I	54
Slika 4.6	Vpliv bakterijskega seva TR-5 na rast koruze v nesterilnih razmerah I	55
Slika 4.7	Vpliv bakterijskega seva TR-5 na rast koruze v nesterilnih razmerah II	56
Slika 4.8	Vpliv bakterijskega seva TR-5 na rast koruze v nesterilnih razmerah II	57
Slika 4.9	Številčnost bakterij v rastnem substratu v 30 dnevnom časovnem obdobju	58
Slika 4.10	Rast glive <i>Fusarium verticillioides</i> ob prisotnosti bakterijskega seva TR-5	59
Slika 4.11	Zaviranje izločanja glivnega pigmenta	60

KAZALO PRILOG

Priloga A	Do sedaj izolirani bakterijski endofitski rodovi
Priloga B	Identifikacija Izoliranih Bakterijskih Sevov
Priloga C	Identifikacija Izoliranih Bakterijskih Sevov
Priloga D	Predhodne Objave
Priloga E	Predhodne Objave

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

½ HA	bakterijsko gojišče (hranilni agar s polovično vsebnostjo hranil)
BHI	bakterijsko gojišče (Brain Heart Infusion agar)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EDTA	etilen diamin tetra acetat
HA	bakterijsko gojišče (hranilni agar)
HA+Cyc	bakterijsko gojišče (hranilni agar z dodanim cikloheksamidom)
KB	bakterijsko gojišče (King's B)
MEA	bakterijsko gojišče (Malt Extract Agar)
PBS	pufer Phosphate Buffer Saline
PCR	verižna reakcija s polimerazo (Polymer Chain Reaction)
PDA	bakterijsko gojišče (Potato Dextrose Agar)
SDS	natrijev dodecil sulfat (Sodium Dodecyl Sulphate)
STE	pufer Sodium Tris EDTA
TE	pufer Tris EDTA
TSA	bakterijsko gojišče (Tryptone Soytone Agar)
YT	bakterijsko gojišče (Yeast Tryptone)

1 UVOD

Rastline se z mikroorganizmi povezujejo na različne načine. Najbolje so poznane povezave z mikoriznimi glivami, endosimbiontskimi bakterijskimi fiksatorji dušika, rizofernimi mikrobnimi združbami ter z rastlinskimi patogenimi mikrobi. V rastlinah se pojavljajo tudi bakterije (Chanway, 1996) in glive (Wilson, 1993), katerih funkcija pogosto ni znana. Njihov vstop v rastlino je različen in v mnogih primerih še ni znan, njihova glavna značilnost pa je stalna prisotnost v notranjosti rastline. Te mikroorganizme imenujemo rastlinski endofiti. Definirani so kot mikroorganizmi, ki jih lahko izoliramo iz površinsko steriliziranega rastlinskega tkiva ali jih pridobimo iz tkiv z ekstrakcijo, na rastlini pa ne povzročajo vidnih bolezenskih znamenj (Halmann in sod., 1997).

Čeprav vloga bakterijskih endofitov v rastlinah v vseh primerih še ni povsem jasna, pa so za nekatere seve že dokazali pozitiven vpliv na rast gostitelja. Ta je lahko neposreden ali posreden in ima v primerih kulturnih rastlin tudi gospodarski pomen. Med vplivi bakterijskih endofitov na rastline so že raziskovali biološki nadzor patogenih mikroorganizmov, sproženo sistemsko odpornost, fiksacijo dušika, pospeševanje rasti in razvoja rastlin s sintezo fitohormonov ali izboljšanim privzemom vode in mineralnih snovi ter povečano odpornost proti različnim negativnim abiotskim dejavnikom.

Prisotnost bakterijskih endofitov so dokazali v koreninah, stebelu, listih, plodovih, gomoljih, popkih in ponekod tudi v semenih. Na splošno so endofiti bolje poznani v vegetativnih organih odraslih rastlin, v primeru semen pa je znanih povezav še malo. Možen razlog za odsotnost raziskav na tem področju je verjetno prevladujoče prepričanje, da so semena do kalitve sterilna. Prav prisotnost endofitov v semenih pa kaže na visoko stopnjo povezave med gostiteljsko rastlino in mikrobom, saj kolonizacija semen z mikroorganizmi zagotavlja prisotnost endofitskega organizma vsaki naslednji generaciji in to že med razvojem mlade rastlinske kalice.

Vrstna raznolikost bakterijskih endofitov je velika. To dejstvo potrjujejo tako novejša molekularno biološke študije, kot tudi novejša študije z gojitvenimi tehnikami. Predvsem pri slednjih se je pokazalo, da določene skupine bakterij prevladujejo in da so prisotne pri med seboj različnih rastlinskih vrstah. Primer takih so po Gramu negativne bakterije iz skupine psevdomonad (*Pseudomonas* in *Burkholderia*) in po Gramu pozitivne bakterije iz rodu *Bacillus*.

Prisotnost endofitov v koruzi (*Zea mays* L.) je bila potrjena v koreninah, stebelu in zrnih, a njihov pomen še ni bil natančneje določen. Ker je koruza ena najpomembnejših kulturnih rastlin, ima vpliv bakterijski endofitov nanjo tudi velik gospodarski pomen.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIJSKI ENDOFITI

2.1.1 Definicija bakterijskih endofitov

V širšem pomenu so endofiti vsi organizmi, ki so prisotni v notranjosti rastline (gr. endon: notri, notranji; gr. phyton: rastlina), (Chanway, 1996). To so lahko bakterije, fitoplazme, nematodi, virusi in glive (Jurc, 1994). Izraz »endofit« je prvi skoval in uporabil De Barry leta 1866 (Wilson, 1995) in se v literaturi uporablja že več kot 100 let (Jurc, 1994). Z njim je avtor označil glive, katerih hife preraščajo rastlinska tkiva ali celice v notranjosti in jih je zato potrebno ločiti od epifitov na površini gostiteljske rastline. Pojem je na tak način opredelil zelo na široko, saj so vanj vključeni tako patogeni mikroorganizmi kot mikorizni simbionti. Takšna definicija je danes neprimerna (povzeto po Jurc, 1994).

V ožjem pomenu je izraz endofit prvič uporabil Perotti leta 1926. Perotti je z izrazom endofit označil bakterije, ki niso bile uvrščene v rod *Rhizobium*, a so jih izolirali iz notranjosti rastline (cit. po Elvira-Recuenco in van Vuurde, 2000). Ta definicija je endofite označila kot posebne prebivalce rastlinskih tkiv, katerih funkcija še ni bila znana. Pred tem so bakterije izolirane iz notranjosti zdravih rastlin obravnavali kot patogene organizme v latentni oziroma dormantni fazi, ali pa so njihovo prisotnost razložili kot laboratorijsko kontaminacijo (poglavje 2.1.5).

Kasneje so različni avtorji pojem endofit opredelili na različne načine. Kloepper in sod. (1992) so pojem ponovno opredelili zelo na široko. Bakterijski endofiti so po njihovo vse bakterije, ki jih lahko najdemo v tkivih pod povrhnjico. James in Olivares (1997) sta to definicijo priredila s poudarkom, da je kolonizacija notranjosti rastline med drugim lastnost aktivnih in latentnih patogenih mikroorganizmov. Nasprotno je Kado (1992; cit. po Lodewyckx in sod., 2002a) endofite opredelil kot bakterije, ki so prisotne v živih rastlinskih tkivih, tam ne povzročajo nobene večje škode in nimajo nobene dodatne koristi, razen da si zagotavljajo lasten obstoj. S tem je izključil vse prej omenjene negativne povezave in morebitne pozitivne povezave z gostiteljsko rastlino. To je Quispel (1992; cit. po Hallman in sod., 1997a) popravil tako, da je endofite opredelil kot bakterije, ki so v rastlini sposobne vzpostaviti endosimbiontsko povezavo.

Kot vidimo, so pogledi na to, kaj endofiti so, zelo raznoliki. Wennström (1994) meni, da je izraz endofit prestar in da se v večini primerov popolnoma napačno uporablja. Predlaga celo njegovo opustitev. Nasprotno Wilson (1995) različne interpretacije in spremembe znanstvenih pojmov v procesu razvoja vidi kot normalne oziroma ključne za prilagajanje

terminov trenutnim potrebam v znanosti. Poda tudi podroben opis, kaj vse naj bi izraz endofit označeval. Endofiti so po Wilsonu bakterije ali glive, ki celoten življenjski krog ali le del tega naseljujejo tkiva živih rastlin in pri tem ne povzročajo vidnih znakov okužb ali bolezni. Iz pojma je na eni strani izključil patogene mikroorganizme, endosimbionte in mikorizne glive, vseeno pa je na ta način dopustil označevanje latentnih in neaktivnih patogenov. Podobno definicijo sta podala Bacon in Hinton (1996).

Najnovejša in trenutno najbolj priznana je definicija, ki so jo podali Hallman in sod. (1997a). Endofite so definirali kot tiste bakterije, ki rastlini ne škodujejo, izoliramo pa jih iz površinsko steriliziranega rastlinskega tkiva ali jih pridobimo z ekstrakcijo iz rastlinskega materiala. Definicija podobno kot prejšnja opredeli oblike, ki jih z izrazom endofit lahko opišemo in hkrati edina poudari metodologijo izolacije. Ravno zaradi tega pa je hkrati pomanjkljiva, saj ne vključuje vseh tistih bakterij, ki jih laboratorijsko ne moremo gojiti. Zaključke sodobnih molekularno bioloških študij lahko obravnavamo kot nadgradnjo omenjenega pojmovanja endofitov, saj so vplivale na izoblikovanje splošnega prepričanja, ki med endofite prišteva tudi mikroorganizme, ki jih v laboratorijskih razmerah ne moremo gojiti.

2.1.2 Izolacija, gojenje in ostale metode dokazovanje prisotnosti bakterijskih endofitov

Za dokazovanje prisotnosti bakterijskih endofitov v rastlinskem tkivu lahko na eni strani uporabimo metode izolacije in gojenja (Bacon in Hinton, 1996; Stoltzfus in sod., 1997), na drugi strani pa lahko uporabimo mikroskopsko dokazovanje ter imunološke in molekularno biološke metode.

2.1.2.1 Izolacija in gojenje

Pri izolaciji in gojenju endofitov je potrebno upoštevati določene zahteve. Mednje sodijo izbira ustreznega rastlinskega materiala, izbira ustrezne izolacijske tehnike (površinska sterilizacija, trituracija, maceracija, vakuumaska ekstrakcija ali ekstrakcija pod pritiskom, centrifugiranje) in v nadaljevanju še uporaba primerne gojišča in načina gojenja mikroorganizmov.

Pri izbiri rastlinskega materiala je pomembno, da je to zdravo, saj tako preprečimo kontaminacijo s patogenimi mikroorganizmi. Rastlinski material moramo ustrezno površinsko sterilizirati, da preprečimo kontaminacijo z bakterijami, ki že v naravnih razmerah poseljujejo površino rastlin ali pa smo jih na rastlinski material vnesli med poskusom. V primeru semen moramo izbrati zdrava nepoškodovana semena, ki jih

moramo ločiti od ostalih delov rastline ter pravilno shraniti. Pomembna je tudi imbibicija semen, saj znatno poveča uspešnost izolacije mikroorganizmov (Hinton in Bacon, 1996).

Pred postopkom sterilizacije je rastlinski material potrebno dobro sprati, s čimer odstranimo odvečno umazanijo ter zmanjšamo mikrofloro na površini in s tem izboljšamo učinkovitost površinske sterilizacije. Uporabimo lahko sterilno vodo, destilirano vodo ali različne pufrske raztopine. V primeru, da so bila semena škropljena s pesticidi, jih je treba sprati najprej z detergentom, nato pa še z alkoholom. Če v nadaljevanju uporabljamo različna fluorescentna barvila, moramo paziti pri izbiri detergentov, saj so mnogi izmed njih prav tako fluorescirajo.

Pri sterilizaciji materiala moramo izbrati primerno temperaturo in primerno razkužilo. Običajno uporabljamo le eno razkužilo ali pa kombinacijo dveh. Čas inkubacije in koncentracijo razkužila je potrebno optimizirati za vsako posamezno rastlinsko tkivo, v vsakem primeru pa mora sterilizacija semen in lesnatih delov potekati dlje kot sterilizacija ostalih delov rastline. Med delovanjem razkužila medij stresamo ali mešamo. Po opravljenem postopku razkužilo odstranimo, rastlinski material pa speremo (Hinton in Bacon, 1996). Učinkovitost sterilizacije je potrebno preveriti. Rastlinski material lahko pomočimo v tekoče gojišče (Gagne in sod., 1987), njegovo površino odtisnemo na trdno gojišče (Shishido in sod., 1995) ali pa preverimo sterilnost medija, s katerim smo rastlinski material sprali (McInroy in Kloepper, 1994; cit. po Hallman in sod., 1997a). Sterilizacija semen je težavna in je močno odvisna od njihove morfologije (McInroy in Kloepper, 1995b). Če želimo semena po sterilizaciji kaliti, predstavlja dodatno težavo viabilnost semen (Misaghi in Donndelinger, 1990), ki se mora kljub sterilizaciji ohraniti.

Površinsko steriliziran in po potrebi dodatno obdelan rastlinski material (imbibicija semen) uporabimo za izolacijo endofitov. Lahko ga prenesemo neposredno na trdno ali v tekoče gojišče in ju inkubiramo (Bacon in Hinton, 1996) ali pa ga pred tem trituriramo (Hallman in sod., 1997b) ali zmaceriramo (Stoltzfus, 1997; Lodewyckx in sod., 2002b). Notranje rastlinske sokove, ksilemske in floemske tekočine ter medceličnino lahko na drugačen način pridobimo z aseptičnim centrifugiranjem (Dong in sod., 1997).

Površinski sterilizaciji se lahko izognemo z vakuumsko ekstrakcijo ali ekstrakcijo pod tlakom. Tako kot centrifugiranje sta metodi omejeni na pridobitev rastlinskih sokov. Vakuumsko ekstrakcijo so za pridobitev ksilemskega soka uspešno uporabili Bell in sod. (1995) pri vinski trti ter Gardner in sod. (1982) pri vrsti citrusa (*Citrus jambhiri* Lush.). Ekstrakcijo s pomočjo tlaka (angl. Sholander pressure bomb) so uspešno uporabili Hallman in sod. (1997b).

Do sedaj opisani bakterijski endofiti vključujejo anaerobne, aerobne in mikroaerofilne predstavnike, kar moramo upoštevati pri sledečih korakih. Tehnike gojenja morajo zajeti čim širšo skupino bakterij. V ta namen lahko pripravimo več različnih bakterijskih gojišč: hranilni agar, agar iz glukozno-kvasnega ekstrakta, TSA gojišče, gojišče z nizko vsebnostjo dušika LGY, King's B gojišče ali MacConkey agar. Če želimo izolirati določene skupine bakterij, uporabimo selektivna gojišča (Bacon in Hinton, 1996).

2.1.2.2 Mikroskopija

Za dokazovanje prisotnosti bakterijskih endofitov v rastlinskih tkivih lahko uporabimo svetlobno mikroskopijo (Bacon in Hinton, 1995, Duijff in sod., 1997; Gough in sod., 1997; Patriquin in Döbereiner, 1978; Chelius in Triplett, 2000a; Pirttilä in sod., 2000; Gyaneshwar in sod., 2001; Chaintreuil in sod., 2000; M'Piga in sod., 1997; Webster in sod., 1997; Reddy in sod., 1997), fluorescentno mikroskopijo (Quadt-Hallman in sod., 1997a; Coombs in Franco, 2003; Elbeltagy in sod., 2001; Assmus in sod., 1995) in elektronsko mikroskopijo; vrstično elektronsko mikroskopijo (Bacon in Hinton, 1995; Mukhopadhyay in sod., 1996; Hallman in sod., 1998; Sardi in sod., 1992; Bell in sod., 1995; Dong in sod., 1994; Gantar in sod., 1991; Reddy in sod., 1997) in transmisijsko elektronsko mikroskopijo (Bacon in Hinton, 1995, Quadt-Hallman in sod., 1997a, 1997b; Duijff in sod., 1997; Hallman in sod., 1998; Gough in sod., 1997; Bianciotto in sod., 1996; Gyaneshwar in sod., 2001; Elbeltagy in sod., 2001; Dong in sod., 1994; Ruppel in sod., 1992; M'Piga in sod., 1997; Benhamou in sod., 1996a; Hurek in sod., 1994).

2.1.2.3 Imunološke metode

Za lokalizacijo bakterijskih endofitov lahko v povezavi z mikroskopijo uporabimo imunološke metode (Hurek in sod., 1994), kot so lokalizacija z označenimi protitelesi (Hurek in sod., 1994, Quadt-Hallman in sod., 1997a, 1997b; Chelius in Triplett, 2000a; Gyaneshwar in sod., 2001) in histokemijske metode (Benhamou in sod., 1996a, 2000). Kot neodvisno tehniko lahko uporabimo metodo ELISA (Quadt-Hallman in sod., 1997b; Ruppel in sod., 1992).

2.1.2.4 Molekularno biološke metode

Že omenjene metode gojenja bakterijskih endofitov niso vedno najboljše (Fischer in sod., 1992). Ker zajamejo le 5-10% vseh bakterij prisotnih v rastlinskem tkivu (Streichan, 1986), so za dokazovanje celotne združbe bakterijskih endofitov ključne molekularno biološke metode. Primerjave raznolikosti združb določene z molekularnimi metodami in metodami gojenja pokažejo velike razlike (Conn in Franco, 2004a). Raznolikost določena

z molekularnimi metodami je dvestokrat večja kot raznolikost določena z metodo gojenja (Torsvik, 1990). Prednosti molekularnih tehnik so tudi hitrost izvedbe, natančnost in široka ali ozka specifičnost.

Pri identifikaciji in določanju raznolikosti bakterijskih endofitskih združb lahko iz rastlinskega tkiva izoliramo celokupno bakterijsko dednino (Hurek in sod., 1994; Seghers in sod., 2004; Chelius in Triplett, 2001; Araujo in sod., 2001; Lodewyckx in sod., 2002; Sessitsch in sod., 2004; Sessitsch in sod., 2002; Reiter in sod., 2002; Araujo in sod., 2002; Idris in sod., 2004; Jimenez-Salgado in sod., 1997; Conn in Franco, 2004a) in specifično pomnožimo gen 16S rDNA (Cankar in sod., 2005; Bianciotto in sod., 1996; Chelius in Triplett, 2001; Lodewyckx in sod., 2002; Sessitsch in sod., 2002, 2004; van Aken in sod., 2004; Gyaneshwar in sod., 2001; Conn in Franco, 2004a; Zinnel in sod., 2002; Chaintreuil in sod., 2000; Garbeva in sod., 2001; Elbeltagy in sod., 2001). Produkte lahko nato identificiramo z določanjem nukleotidnega zaporedja (Cankar in sod., 2005; Chelius in Triplett, 2001; Lodewyckx in sod., 2002; Pirttilä in sod., 2000; Sessitsch in sod., 2002, 2004; van Aken in sod., 2004; Reiter in sod., 2002; Araujo in sod., 2002; Gyaneshwar in sod., 2001; Idris in sod., 2004; Conn in Franco, 2004a; Zinnel in sod., 2002; Chaintreuil in sod., 2000; Elbeltagy in sod., 2001), metodo terminalnih restrikcijskih fragmentov – T-RFLP (Sessitsch in sod., 2004; Sessitsch in sod., 2002; Reiter in sod., 2002; Idris in sod., 2004; Conn in Franco, 2004a, 2004b), gelsko elektroforezo v denaturacijskem gradientu – DGGE (Seghers in sod., 2004; Sessitsch in sod., 2002; Araujo in sod., 2002, Garbeva in sod., 2001) in določevanjem dolžine naključno pomnoženih fragmentov - RAPD (Araujo in sod., 2001). Za samo določanje raznolikosti lahko naredimo le restrikcijske profile (Cankar in sod., 2005; Chelius in Triplett, 2001; Sessitsch in sod., 2004; Reiter in sod., 2002; Idris in sod., 2004; Jimenez-Salgado in sod., 1997; Chaintreuil in sod., 2000).

Za dokazovanje prisotnosti specifičnega bakterijskega predstavnika in za njihovo lokalizacijo lahko uporabimo specifično pomnoževanje indikatorskih genov s PCR (Hurek in sod., 1994; Sessitsch in sod., 2002), hibridizacijo DNA-DNA (Jimenez-Salgado in sod., 1997) in *in situ* hibridizacijo (Pirttilä in sod., 2000; Assmus in sod., 1995). V predhodno izolirane seve lahko vstavimo reporterske gene, kot so *gfp* (Chelius in Triplett, 2000a; Coombs in Franco, 2003; Elbeltagy in sod., 2001), *lacZ* (Gough in sod., 1997; Chaintreuil in sod., 2000; Webster in sod., 1997; Reddy in sod., 1997) in *gus* (Hurek in sod., 1994; Gough in sod., 1997; Gyaneshwar in sod., 2001; Barraquio in sod., 1997) ter opazujemo mesta, kjer se izražajo.

2.1.3 Predstavniki bakterijskih endofitov

Seznam bakterijskih rodov, ki vključujejo izolirane bakterijske endofite, je precej obširen in vključuje tako po Gramu pozitivne kot po Gramu negativne predstavnike (priloga A). Glavni in najpogostejši predstavniki izoliranih bakterij pripadajo skupini psevdomonad (rodovi *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Phyllobacterium*), družini *Enterobacteriaceae* (rodovi *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Pantoea*) ter rodu *Bacillus* (Hallman in sod., 1997a; Mund in Hinkle, 1976; Gardner in sod., 1982; Bell in sod., 1995, Lalande in sod., 1989). Čeprav se nekateri izolirani rodovi pri posameznih rastlinah pojavljajo pogosteje kot ostali, zaenkrat podatki ne kažejo na specializacijo posameznega rodu za življenje z določeno gostiteljsko rastlino.

Do sedaj so bili endofiti opisani pri velikem številu rastlin, predvsem pri kmetijsko pomembnih, kot so riž (*Oryza breviligulata*), koruza (*Zea mays*), pšenica (*Triticum aestivum*), grah (*Pisum sativum*), kumara (*Cucumis sativus*), bombaž (*Gossypium hirsutum*), vinska trta (*Vitis vinifera*), navadna ogrščica (*Brassica napus*), krompir (*Solanum tuberosum*), korenje (*Daucus carota*), sladkorna pesa (*Beta vulgaris*), kavovec (*Coffea arabica*), sladkorni trs (*Saccharum officinarum*) in različne vrste iz rodu *Citrus*. Ostale zelnate rastline z bakterijskimi endofiti so različne vrste prerijskih rastlin (Zinnel in sod., 2002) in rastline zmernih klimatov (Sardi in sod., 1992), lesnate rastline pa so topol (*Populus deltoides* × *nigra*), (Van Aken in sod., 2004), rdeči bor (*Pinus sylvestris*), (Pirttilä in sod., 2000) in smreka (*Picea abies*), (Cankar, 2001; Cankar in sod., 2005). Natančnejši pregled izoliranih rodov bakterijskih endofitov in mesta izolacije so podana v preglednici 2.1.

Preglednica 2.1: Pregled bakterijskih endofitov in mesta izolacije

Rastlinska vrsta	Organ	Bakterijski rodovi	Vir
arašidi	zrna	<i>Bacillus</i>	Pettit in sod., 1968
bombaž (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	korenina, steblo	<i>Bacillus</i> , <i>Clavibacter</i> , <i>Comamonas</i> , <i>Paracoccus</i> , <i>Acidovorax</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Brevundimonas</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Chryseobacterium</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Phyllobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Variovorax</i> , <i>Xanthobacter</i>	Hallman in sod., 1997b
bombaž (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	radikula, korenina, mlado in staro steblo, neodprt cvet, endokarp in mezokarp plodu	<i>Erwinia</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clavibacter</i> , <i>Xanthomonas</i>	Misaghi in Donndelinger, 1990
bombaž (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	steblo	<i>Bacillus endophyticus</i> sp. nov.	Reva in sod., 2002
bombaž (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	/	<i>Enterobacter</i>	Musson, 1995

...se nadaljuje

nadaljevanje...

Rastlinska vrsta	Organ	Bakterijski rodovi	Vir
Bombaž (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	steblo, korenina	<i>Acinetobacter</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Aureobacterium</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Cellulomonas</i> , <i>Clavibacter</i> , <i>Comamonas</i> , <i>Curtobacterium</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Hydrogenophaga</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Kluyvera</i> , <i>Methylobacterium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Ochrobacterium</i> , <i>Pantoea</i> , <i>Phyllobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Serratia</i>	McInroy in Kloepper, 1995a
bombaž (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	korenina	<i>Sphingomonas</i> , <i>Pantoea</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Phyllobacterium</i>	Quadt-Hallman in sod., 1997a
češnja (<i>Prunus avium</i> L.)	/	<i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Xanthomonas</i>	Tranprasert in Reed, 1997 (cit. po Lodewyckx in sod., 2002)
češnja (<i>Prunus avium</i> L.)	steblo	<i>Pseudomonas</i>	Cameron, 1970
črna detelja (<i>Trifolium pratense</i> L.)	korenine	<i>Serratia</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Acidovorax</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Curtobacterium</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Methylobacterium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Pantoea</i> , <i>Variovorax</i> , <i>Xanthomonas</i>	Sturz in sod., 1998
fižol »pinto«	steblo	<i>Corynebacterium</i> , <i>Xanthomonas</i> , <i>Clostridium</i>	Thomas in Graham, 1952
grah (<i>Pisum sativum</i> L.)	steblo	<i>Pantoea</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i>	Elvira-Recuenco in van Vuurde, 2000
kavovec (<i>Coffea arabica</i> L.)	korenina, steblo	<i>Acetobacter</i>	Jimenez-Salgado in sod., 1997
korenje (<i>Daucus carota</i> L.)	koren	<i>Pseudomonas</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Pantoea</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Kocuria</i> , <i>Variovorax</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Clavibacter</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Micrococcus</i>	Surette in sod., 2003
koruza (<i>Zea mays</i> L.)	korenina, zrno	<i>Rahnella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacter</i>	Seghers in sod., 2004
koruza (<i>Zea mays</i> L.)	steblo, korenina	<i>Agrobacterium</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Aureobacterium</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Clavibacter</i> , <i>Curtobacterium</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Hydrogenophaga</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Kluyvera</i> , <i>Methylobacterium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Ochrobacterium</i> , <i>Pantoea</i> , <i>Phyllobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Serratia</i>	McInroy in Kloepper, 1995a
koruza (<i>Zea mays</i> L.)	steblo	<i>Enterobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Vibrio</i>	Fischer in sod., 1992
koruza (<i>Zea mays</i> L.)	steblo	<i>Runella zaeae</i> sp. nov.	Chelius in sod., 2002

...se nadaljuje

nadaljevanje...

Rastlinska vrsta	Organ	Bakterijski rodovi	Vir
koruza (<i>Zea mays</i> L.)	steblo	<i>Dyadobacter</i> gen. nov.	Chelius in Triplett, 2000b
koruza (<i>Zea mays</i> L.)	mlade kalice	<i>Enterobacter</i>	Hinton in Bacon, 1995
koruza (<i>Zea mays</i> L.)	steblo	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Chelius, Triplett. 2000a
koruza (<i>Zea mays</i> L.)	korenine	<i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Corynebacterium</i>	Lalande in sod., 1989
koruza (<i>Zea mays</i> L.), pšenica (<i>Triticum aestivum</i> L.)	korenine	<i>Burkholderia</i>	Balandreau in sod., 2001
krompir (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	steblo, gomolj	<i>Micrococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Xantomonas</i> , korineformne bakterije, neidentificirane gram negativne bakterije	De Boer in Copeman, 1974
krompir (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	gomolj, steblo	<i>Aerobacter</i> , <i>Bacillus</i>	Hollis, 1951
krompir (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	gomolj	<i>Acidovorax</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Cellulomonas</i> , <i>Clavibacter</i> , <i>Curtobacterium</i> , <i>Kingella</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Pantoea</i> , <i>Promicromonospora</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Sphingobacterium</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Variovorax</i> , <i>Xanthomonas</i>	Sturz in sod., 1999
krompir (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	gomolj	<i>Acinetobacter</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Xanthomonas</i>	Sturz, 1995
krompir (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	gomolj	<i>Bacillus</i> , <i>Curtobacterium</i> , <i>Kingella</i> , <i>Pantoea</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Serratia</i> , <i>Xanthomonas</i>	Sturz in Matheson, 1996b
krompir (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	steblo	<i>Bacillus</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Frateuria</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Clavibacter</i> , <i>Exiguobacterium</i> , <i>Aureobacterium</i>	Reiter in sod., 2002
krompir (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	korenine, stebla	<i>Streptomyces</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Cellvibrio</i> ,	Sessitch in sod., 2002
krompir (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	korenine, stebla	<i>Sphingomonas</i> , <i>Brevundimonas</i> , <i>Methylobacterium</i> , <i>Variovorax</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Pantoea</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Frigoribacterium</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Clavibacter</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Flavobacterium</i>	Sessitch in sod., 2004
krompir, korenje, rdeča pesa, koleraba, paradižnik	založni organi	nedoločene	Tervet in Hollis, 1948
kumara (<i>Cucumis sativis</i> L.)	korenina	<i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Chryseobacterium</i>	Mahaffee in Kloepper, 1997
kumara (<i>Cucumis sativis</i> L.)	plod	rodovi družin <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Achromobacteriaceae</i> , <i>Micrococcaceae</i>	Samish in sod. 1961 (cit. po Hallman in sod., 1997a)
navadna ogrščica (<i>Brassica napus</i> L.)	korenina	<i>Arthrobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Curtobacter</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Rathayibacter</i> , <i>Staphylococcus</i>	Germida in sod., 1998

...se nadaljuje

nadaljevanje...

Rastlinska vrsta	Organ	Bakterijski rodovi	Vir
navadna ogrščica (<i>Brassica napusi</i> L.)	seme	<i>Alcaligenes, Bacillus, Comamonas, Chryseobacterium, Erwinia, Kurtia, Micrococcus, Pantoea, Pseudomonas, Rahnella</i>	Graner in sod., 2003
paradižnik (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	plod	rodovi družine <i>Pseudomonadaceae</i>	Samish in sod. 1963 (cit. po Lodewyckx in sod., 2002)
paradižnik (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	korenine	<i>Pseudomonas</i>	van Peer in sod., 1990
pomaranča (<i>Citrus sinensis</i> Osbeck) mandarina (<i>Citrus reticulata</i>)	steblo	<i>Alcaligenes, Bacillus, Burkholderia, Curtobacterium, Enterobacter, Methylobacterium, Nocardia, Pantoea, Streptomyces, Xanthomonas</i>	Araujo in sod., 2002
pšenica (<i>Triticum aestivum</i> L.)	Korenine	<i>Amycolatopsis, Gordonia, Micromonospora, Mycobacterium, Nocardia, Rhodococcus, Streptomyces</i>	Conn in Franco, 2004a
pšenica (<i>Triticum aestivum</i> L.)	korenine	aktinobakterije	Coombs in Franco, 2003
rdeči bor (<i>Pinus silvestris</i> L.)	popki	<i>Pseudomonas, Methylobacterium</i>	Pirttilä in sod., 2000
riž (<i>Oryza sativa</i> L.)	steblo, korenina	<i>Escherichia, Sinorhizobium, Azorhizobium, Azoarcus, Zoogloea, Pseudomonas, Agrobacterium, Azospirillum, Bacillus</i>	Stolfus in sod., 1997
riž (<i>Oryza sativa</i> L.)	steblo, korenina	<i>Serratia marcescens</i>	Gyaneshwar in sod., 2001
riž (<i>Oryza breviligulata</i>)	korenina	<i>Bradyrhizobium</i>	Chaintreuil in sod., 2000
riž (<i>Oryza sativa</i> L.)	mlade rastline	<i>Enterobacter, Bacillus, Morganelli, Serratia, Yersinia</i>	Mukhopadhyay in sod., 1996
riž (<i>Oryza sativa</i> L.)	seme	<i>Corynebacterium, Bacillus</i>	Bacilio-Jimenez in sod., 2001
4 divje vrste in 3 gojene vrste riža	steblo	<i>Herbaspirillum, Ideonella, Enterobacter, Azospirillum</i>	Elbeltagy in sod., 2001
sladkorna pesa (<i>Beta vulgaris</i>)	korenine	<i>Bacillus, Arthrobacter, Pseudomonas, Aureobacterium, Micrococcus, Xanthomonas, Alcaligenes, Flavobacterium, Agrobacterium, Microbacterium, Aquaspirillum, Erwinia, Hafnia, Ochrobacterium, Staphylococcus, Rhodococcus, Curtobacterium, Corynebacterium</i>	Lilley in sod., 1996
sladkorna pesa (<i>Beta vulgaris</i> L.)	korenina	<i>Bacillus, Erwinia, Pseudomonas, Corynebacterium, Lactobacillus, Xanthomonas</i>	Jacobs in sod., 1985 (cit. po Lodewyckx in sod., 2002)
sladkorni trs (<i>Saccharum officinarum</i> L.)	korenine, steblo	<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	Funetes-Ramirez in sod., 1993; Gillis in sod., 1989, Dong in sod. 1995

...se nadaljuje

nadaljevanje...

Rastlinska vrsta	Organ	Bakterijski rodovi	Vir
sladkorni trs (<i>Saccharum officinarum</i> L.)	steblo	<i>Saccharobacter</i> gen. nov.	Calvacante in Döbereiner, 1988
smreka (<i>Picea abies</i> L. Karst)	seme	<i>Rahnella</i> , <i>Pseudomonas</i>	Cankar 2001; Cankar in sod. 2005
topol <i>Populus deltoides</i> × <i>nigra</i>	tkivo tkivne kulture	<i>Methylobacterium</i>	Van Aken in sod., 2004
večje število rastlin rodu <i>Citrus</i>	listi	<i>Pantoea</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Curtobacterium</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Methylobacterium</i>	Araujo in sod., 2001
vinska trta (<i>Vitis vinifera</i>)	steblo	<i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Rahnella</i> , <i>Pantoea</i> , <i>Xanthomonas</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Comamonas</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Clavibacter</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Curtobacterium</i> , <i>Bacillus</i>	Bell in sod., 1995
vrsta <i>Thlaspi goesingense</i>	korenina, vršički	<i>Methylobacterium</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Curtobacterium</i> , <i>Plantibacter</i> , <i>Rhodococcus</i>	Idris in sod., 2004
vrsta <i>Citrus jambhiri</i> Lush.	steblo	<i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Serratia</i> , <i>Yersinia</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Alcaligenes-Moraxella</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Providencia</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Vibrio</i>	Gardner in sod., 1982
vrsta <i>Leptochloa fusca</i> L.	korenine	<i>Azoarcus</i>	Reinhold-Hurek in sod. 1993
vrsta <i>Thlaspi caerulescens</i> subsp. <i>calamianaria</i>	korenine, vršički	<i>Sphingomonas</i> , <i>Afipia</i> , <i>Methylobacterium</i> , <i>Aureobacterium</i> , <i>Phyllobacterium</i> , <i>Devosia</i> , <i>Rhodococcus</i>	Lodewyckx in sod., 2002b
vrste C4 rastlin (<i>Spartina pectinata</i> , <i>Miscanthus sinensis</i> , <i>Miscanthus sacchariflorus</i> , <i>Pennisetum purpureum</i>)	steblo, listi	<i>Herbaspirillum frisingense</i> sp.nov.	Kirchhof in sod., 2001
različne vrste trav	/	<i>Curtobacterium</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Clavibacter</i> , <i>Rathayibacter</i> gen. nov., <i>Plantibacter</i> gen. nov.	Behrendt in sod., 1999, 2001, 2002
različne vrste žitaric	zrna	rodovi družine <i>Pseudomonadaceae</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Bacillus</i>	Frändenberg in Schnürer, 1998
11 vrst kulturnih rastlin	seme	<i>Acinetobacter</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Pantoea</i> , <i>Pseudomonas</i>	van Dijk in Nelson, 1998
27 vrst (žitarice, zelnote in drevesne vrste)	semenska zasnova, seme	<i>Achromobacter</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Cytophaga</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Serratia</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Xanthomonas</i>	Mundt in Hinkle, 1976

...se nadaljuje

nadaljevanje...

Rastlinska vrsta	Organ	Bakterijski rodovi	Vir
soja (<i>Glycine max</i>), koruza (<i>Zea mays</i> L.), pšenica (<i>Triticum aestivum</i>), sirek (<i>Sorghum bicolor</i>), prerijske rastline rodov <i>Agropyron</i> , <i>Amorpha</i> , <i>Andropogon</i> , <i>Artemisia</i> , <i>Asclpias</i> , <i>Baptisia</i> , <i>Bouteloua</i> , <i>Bromus</i> , <i>Buchloe</i> , <i>Callirhoe</i> , <i>Dichantelium</i> , <i>Euphorbia</i> , <i>Koeleria</i> , <i>Lathyrus</i> , <i>Lespedeza</i> , <i>Panicum</i> , <i>Petalostemon</i> , <i>Phalaris</i> , <i>Psoralea</i> , <i>Sorghastrum</i> , <i>Sporobolus</i> , <i>Viccia</i>	steblo	<i>Agrobacterium</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Cellulomonas</i> , <i>Clavibacter</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rothia</i> , <i>Xanthomonas</i>	Zinnel in sod., 2002
<i>Allium porrum</i> , <i>Amaryllis belladonna</i> , <i>Betula pendula</i> , <i>Brassica oleracea</i> , <i>Calathea</i> sp., <i>Calluna vulgaris</i> , <i>Camellia japonica</i> , <i>Carex</i> sp., <i>Chelidonium majus</i> , <i>Chrysanthemum indicum</i> , <i>Cichorium intybus</i> , <i>Cyclamen persicum</i> , <i>Euphorbia</i> sp., <i>Festuca rubra</i> , <i>Fragaria vesca</i> , <i>Glycine max</i> , <i>Hordeum vulgare</i> , <i>Hyacinthus orientalis</i> , <i>Lactuca scariola</i> , <i>Medicago sativa</i> , <i>Phragmites communis</i> , <i>Quercus</i> sp., <i>Rubus idaeus</i> , <i>Saintpaulia kewensis</i> , <i>Secale cereale</i> , <i>Triticum aestivum</i> , <i>Triticum durum</i> , <i>Vaccinium myrtillus</i>	korenine	<i>Streptomyces</i> in ostale aktinomicetne bakterije	Sardi in sod., 1992

2.1.4 Lokalizacija in številčnost bakterijskih endofitov

Bakterijske endofite so našli v koreninah, stebelu, listih, popkih, plodovih, založnih organih in semenih (preglednica 2.1).

V splošnem endofiti naseljujejo medcelične prostore rastlinskih tkiv (Dong in sod., 1994; Hinton in Bacon, 1995; Patriquin in Döbereiner, 1978; Ruppel, 1992; Duijff in sod., 1997; Pirttilä in sod., 2000; Gyaneshwar in sod., 2001; Coombs in Franco, 2003; Elbeltagy in sod., 2001; Shishido in sod., 1999), v nekaterih primerih pa so jih odkrili tudi znotraj celic (Gantar in sod., 1991; Hurek in sod., 1994; Duijff in sod., 1997; Patriquin in Döbereiner, 1978; Pirttilä in sod., 2000). Čeprav znotraj-celične kolonizacije ne opazijo pogosto, je vsekakor zelo zanimiva z vidika interakcije med endofitom in gostiteljsko rastlino (Hallman in sod., 1997a).

Zanimiva in deloma vprašljiva je kolonizacija prevodnega sistema, čeprav so endofite tam pogosto odkrili (Bell in sod., 1995; Gagne in sod., 1987; Gardner in sod., 1982; Hurek in sod., 1994; Lamb in sod., 1996; Ruppel in sod., 1992; Pirttilä in sod., 2000; Gyaneshwar in sod., 2001; Shishido in sod., 1999). Prevodni sistem po mnenju mnogih ni mesto, ki bi ga bakterije sistemsko kolonizirale, saj naj bi endoderm, ki ga morajo v koreninah prečkati, predstavljal nepremostljivo fizično oviro. Prisotnost velikega števila bakterij v prevodnih elementih lahko vodi v zamašitev le teh (Hallman in sod., 1997a; Gardner in sod., 1982) in v posledični odgovor rastline na vdor patogenov (Moore in sod., 1998).

Verjetno zaradi tega bakterijski endofiti v rastlinskih tkivih večinoma ne nastopajo množično: v koreninah lucerne (*Medicago sativa* L.) povprečno $1,2 \times 10^4$ CFU / g ksilema (Gagne in sod., 1987), v koreninah bora (*Pinus contorta* var. *latifolia* (Dougl.) Engelm.) $5,6 \times 10^5$ CFU/ g rastlinskega materiala, v koreninah in stebelu koruze (*Zea mays* L.) $10^4 - 10^6$ CFU/g mokre teže rastlinskega materiala (McInroy in Kloepper, 1995b), v koreninah in stebelu bombaža $10^4 - 10^7$ CFU/g mokre teže rastlinskega materiala (McInroy in Kloepper, 1995b), v koreninah divjega riža 5×10^6 CFU/g mokre teže rastlinskega materiala (Chaintreuil in sod., 2000), v stebelu koruze $2 \times 10^2 - 3,5 \times 10^6$ celic / g mokre teže rastlinskega materiala (Fischer in sod., 1992), v stebelu citrusov $10^3 - 10^4$ CFU/g mokre teže rastlinskega materiala (Araujo in sod., 2002), v koreninah in stebelu riža $10^5 - 10^6$ CFU/g mokre teže rastlinskega materiala (Gyaneshwar in sod., 2001), v stebelu vinska trte $10^2 - 10^3$ CFU/ml ksilemskega soka, v stebelu sladkornega trsa 10^4 CFU/ml apoplastnega soka, v listih citrusov $3,7 - 12,7 \times 10^3$ CFU/g mokre teže rastlinskega materiala (Araujo in sod., 2001) in v različnih organih bombaža $0,4 - 11,6 \times 10^3$ CFU/g mokre teže rastlinskega materiala (Misaghi in Donndelinger, 1990), (vrednosti za semena so podana v razdelku 2.1.6). Njihova koncentracija se običajno ustali pri določeni vrednosti (Ruppel in sod., 1992) in ne raste dalje, verjetno zaradi že omenjenih rastlinskih obrambnih mehanizmov (Hallman in sod., 1997a).

Znotraj tkiv lahko bakterije pasivno ali aktivno potujejo. Prevodni sistem omogoča transport na daljše razdalje, za krajše premike pa zadostuje apoplast (Elbeltagy in sod., 2001). Ruppel in sod. (1992) poročajo, da transport po prevodnih elementih poteka v obe smeri, od korenine do poganjkov po ksilemu in v obratni smeri po floemu. Apoplast služi le za premike dolžine petnajstih celic (Hurek in sod., 1994; Patriquin in Döbereiner, 1978) oziroma dolžine 1-5 centimetrov (Chen in sod., 1995; Mahaffee in sod., 1997; cit. po Hallman in sod., 1997a).

2.1.5 Izvor endofitov

2.1.5.1 Evolucijski izvor

Prva raziskovanja na rastlinskih tkivih segajo nazaj v sedemdeseta leta devetnajstega stoletja (Hallman in sod., 1997a), ko je Pasteur ugotovil, da je sok plodov grozdja sterilen (cit. po Mundt in Hinkle, 1976). S tem je verjetno vplival na nadaljnje raziskave, pri katerih je Ferenbach (1888; cit. po Mundt in Hinkle, 1976) izolirane bakterije pripisal laboratorijski kontaminaciji. Kasneje se je pokazalo, da različni rastlinski organi kljub temu vsebujejo mikroorganizme (Hollis, 1951; Hallman in sod., 1997a; Mundt in Hinkle, 1976; Samish in sod., 1961, 1963), a so raziskovalci endofite obravnavali kot šibko

virulentne rastlinske patogene mikroorganizme (Thomas in Graham, 1952) ali kot rezultat neustrezne površinske sterilizacije (Hallman in sod., 1997a).

Zgodovinski potek raziskovanja je prav gotovo vplival na mnenja o evolucijskem izvoru endofitov. Ta zaenkrat še ni znan (Cankar, 2001). Wilson (1993) pri glivnih endofitih na podlagi njihovih pozitivnih vplivov predvideva koevolucijski razvoj z gostiteljsko rastlino, a so možne tudi druge interpretacije. Bakterijski endofiti naj bi izvirali iz rastlinskih patogenov oziroma saprofitov. Ker nastopajo kot vmesna stopnja med obema skupinama, lahko le ugibamo ali so izvorno saprofiti, ki se razvijajo v smeri patogenov, ali pa so se iz slednjih še nadalje razvili, tako da so opustili negativne vplive na gostitelja in si tako zagotovili neomejene količine hranil (Hallman in sod., 1997a). Patogenost endofitov se namreč pokaže v izrednih okoliščinah (Thomas in Graham, 1952; Cameron, 1970; Sturz, 1995; Hurek in sod., 1994), kot sta npr. suša (Jurc, 1994) in pomanjkanje kisika (DeBoer in Copeman 1974). Skupne lastnosti s patogeni so sinteza hidrolitičnih encimov (celulaze in pektinaze), razlike pa predstavljajo manjša številčnost endofitov ob invaziji ter odsotnost preobčutljivostnega odgovora pri rastlini ob okužbi (Hurek in sod., 1994).

2.1.5.2 Ekološki izvor

Ekološki izvor endofitov opisujeta dve hipotezi. Po prvi naj bi bile bakterije prisotne že v semenih, iz katerih naj bi se po kalitvi sistemsko razširile po rastlini. Po drugi hipotezi izvirajo endofiti iz okolja, od koder lahko v rastlino vstopajo pasivno ali aktivno s pomočjo hidrolitičnih encimov. Prva hipoteza je bila raziskovalno manjkrat potrjena (preglednica 2.1), v nekaterih primerih pa endofitov iz semen celo niso uspeli izolirati (Gagne in sod., 1987; Mundt in Hinkle, 1976; Araujo in sod. 2001). Nasprotno ostale študije, narejene predvsem na organih odraslih rastlin (koreninah, steblih, listih; preglednica 2.1), v veliki večini potrjujejo drugo hipotezo. Endofite lahko v rastlino vnesejo vektorji, kot so žuželke (Ashbolt in Inkerman, 1990), nematodi (Hallman in sod., 1998) in endofitske glive (Bianciotto in sod., 1996), vstopajo lahko skozi rane (Gagne in sod., 1987), listne reže (Roos in Hattingh, 1983; cit. po Quadt-Hallman in sod., 1997b; Ruppel in sod., 1992) in lenticеле (Fox in sod., 1971; cit. po Quadt-Hallman in sod., 1997b), na mestu kjer novonastale stranske korenine predrejo površino (Shishido in sod., 1995, Duijff in sod., 1997; Webster in sod., 1997; Reddy in sod., 1997), na apikalnem območju korenin (Duijff in sod., 1997) ali s pomočjo hidrolitičnih encimov (Benhamou in sod., 1996b; Shishido in sod., 1995; Quadt-Hallman in sod., 1997b; Elbeltagy in sod., 2001; Sessitsch in sod., 2004). Številčnost bakterij v stebelu upada z višino (Elvira-Recuenco in van Vuurde, 2000; Fischer s sod. 1992; McInroy in Kloepper, 1995b), zato so korenine verjetno najpogostejše mesto vstopa. Združbe endofitskih bakterij v koreninah in rizosferne združbe so si v večini primerov podobne, le da so združbe v notranjosti rastline manj številčne in raznolike

(Araujo in sod., 2001; Lilley in sod., 1996; Conn in Franco, 2004b; Germida in sod., 1998). To dejstvo dodatno potrjuje vstop skozi korenine. Nekateri študije sicer kažejo nasprotno (van Peer in sod., 1990; Idris in sod., 2004; Bell in sod., 1995), vendar so razlog za takšna opažanja kriteriji, ki jih uporabljamo za primerjavo. Tako sta si obe združbi podobni, če primerjamo njune predstavnike in različni, če opazujemo njuno strukturo (Mahaffee in Kloepper, 1997).

Endofitske bakterije imajo v primerjavi z ostalimi bakterijami očitno specifične fiziološke in biokemijske lastnosti, ki jim omogočajo vstop (Shishido in sod., 1995; Lodewyckx in sod., 2002). Van Peer in sod. (1990) kot eno takih lastnosti omenjajo sposobnost pritiranja na površino korenin s specifičnimi aglutinini, Duijff in sod. (1997) pa prisotnost O-stranske verige LPS sloja bakterijske membrane. Pri vstopu so pomembne tudi rastline same, saj aktivirajo premike bakterij iz okolja v notranjost s sintezo flavonoidov (Gough in sod., 1997). Ob tem iz celotne bakterijske populacije selektivno izberejo le primerne organizme (Germida in sod., 1998).

2.1.6 Endofiti v semenih

Dokazov o obstoju bakterijskih endofitov znotraj semen je malo (preglednica 2.1). Tudi deleži semen, v katerih so endofite odkrili, so bili v vseh primerih majhni: 15-30% (Mundt in Hinkle, 1976), 3-5% (Gagne in sod., 1987) in 8% (Elvira-Recuenco in van Vuurde, 2000). Hollis (1951) omenja majhen delež endofitov v semenih krompirja.

Številčnost endofitov v semenih je v večini primerov majhna. Mundt in Hinkle (1976) sta bakterije izolirala iz semenskih zasnov 27 vrst rastlin in iz semen 25 vrst rastlin (iz semen dveh vrst bakterij nista uspela izolirati). Količina bakterij je bila največja v semenskih zasnovah, z zorenjem semen pa se je zmanjševala. V primeru žitaric so bile količine bakterijskih endofitov zelo majhne, 2-10 celic / g rastlinskega materiala. Tudi Adams in Kloepper (1996) sta v semenih v povprečju opazila zelo majhne količine endofitov (manj kot 10 CFU / seme), ki pa so po kalitvi porasli za 3,5 krat. Graner in sod. (2003) so v semenih navadne ogrščice (*Brassica napus*) našli več endofitov ($2,5 - 9,4 \times 10^7$ CFU / g semen oziroma $1,1 - 4,2 \times 10^5$ CFU / seme). McInroy in Kloepper (1995b) sta razlike v številčnosti endofitov pripisala tipu semena. Bakterije so v semenih bombaža, ki imajo močno nagubano in ne po celotni površini sklenjeno semensko lupino, številčnejše ($1 \times 10^3 - 1 \times 10^5$ CFU / g semena) kot v zrnih koruze (manj kot 1×10 CFU / g semena), kjer je perikarp vseskozi sklenjen, njegova površina pa je gladka. Podobno Mundt in Hinkle (1976) endofitov nista mogla izolirati iz semenskih zasnov z nepoškodovanimi integumenti, iz semen dveh vrst, katerih semena so bila trda in prevlečena z voski ter iz semen, katerih semenska lupina med imbibicijo ni počila. Gardner in sod. (1982) so zato

predpostavljali, da so semena sterilna in da lahko bakterije v njih najdemo samo v primerih, ko so fizične ovire in ostali obrambni mehanizmi rastline neučinkoviti.

Mest, kjer bakterije lahko vstopijo v seme, je poleg poškodovanega ovoja več. Bakterije lahko pridejo v seme po prevodnem sistemu ali s pelodovim mešičkom, lahko pa vdrejo v plod skozi hrbtni šiv stroka in migrirajo skozi funikulus (Mundt in Hinkle, 1976).

Dosedanje raziskave nakazujejo povezavo bakterijskih endofitov s semensko lupino (Cankar in sod., 2005; Mundt in Hinkle, 1976; Mukhopadhyay in sod., 1996). Mikroskopsko so jih dokazali na notranji strani semenske lupine riža (Mukhopadhyay in sod., 1996). Če so lupine predhodno odstranili, endofitov niso mogli izolirati. Kljub temu je mogoče, da bakterije nastopajo v zelo majhnih koncentracijah tudi globlje v semenu. Schanthorst in sod. (1954) so endofite lahko izolirali le iz celih semen, izolacija iz posameznih delov semena (semenske lupine, epikotila, hipokotila, radikule) pa je bila neuspešna (cit. po Mundt in Hinkle, 1976). Bakterije lahko v rastlinskem materialu nastopajo tudi v obliki, ko njihovo gojenje v laboratoriju ni mogoče (Wilson in Lindow, 2000) ali pa za njihov rast in razvoj potreben signal kaleče rastline (Nelson, 1990).

2.2 ENDOFITI IN GOSTITELJSKA RASTLINA

2.2.1 Dejavniki, ki vplivajo na rast endofitov

Kot vsi mikroorganizmi, so tudi endofiti podvrženi različnim biotskim in abiotskim dejavnikom, specifičnim za njihovo življenjsko okolje. Ti dejavniki vplivajo na zmožnost kolonizacije posameznih delov gostiteljske rastline ter na sestavo in številčnost bakterijskih združb znotraj rastlin.

2.2.1.1 Biotski dejavniki

2.2.1.1.1 Mikroorganizmi

Endofitske bakterije lahko gostiteljsko rastlino naseljujejo skupaj z drugimi mikroorganizmi, kot so virusi, ostale bakterije in glive. Hranila v rastlini predstavljajo vir energije vsem omenjenim mikroorganizmom, zato med njimi nastopajo različni odnosi (kompeticija, simbioza, antibioza, mutualizem) na način, ki omogoča najbolj optimalno izkoriščanje razpoložljivih virov.

Glivni in bakterijski endofiti ne kolonizirajo istih območij v rastlini. Bakterijski endofiti prevladujejo tam, kjer so koncentracije glivnih endofitov majhne, v majhnih koncentracijah

pa nastopajo v območjih, kjer prevladujejo glivni endofiti (Fischer in sod., 1992). Bakterijski endofiti večinoma kolonizirajo korenine in nižje dele stebela glivni endofiti pa so številčnejši v osrednjem delu stebela, kot je to pri glivi *Guignaria citricapra* in bakterije rodu *Bacillus* (Araujo in sod. 2001). Po drugi strani pa so pri povezavi med glivo *G. citricapra* in endofitsko baterijo *Pantoea agglomerans* ugotovili, da se bakterija in gliva med seboj ne izključujeta, ampak se medsebojno vzpodbuja pri skupni rasti.

Podobni rezultati so se pokazali v medsebojnih odnosih bakterijskih endofitov. Rizosferne bakterije v rastlinskih tkivih ne vplivajo na endofitske bakterije, slednje pa se med seboj izključujejo. Prisotnost dveh bakterijskih endofitov na enem mestu se kaže kot zmanjšana rast obeh predstavnikov, saj med njima poteka boj za življenjski prostor in za omejene vire energije (Quadt-Hallman in sod., 1997).

Številčnost endofitov povečujejo patogeni mikroorganizmi. Tak odnos velja v različnih vrstah citrusov (Gardner in sod., 1982). Okužene rastline so imele večje število endofitov v primerjavi z zdravimi rastlinami. V krompirju patogeni mikroorganizmi povečujejo raznolikost endofitskih združb (Reiter in sod., 2002), slednje pa so tudi pod vplivom rizosfernih združb (Conn in Franco, 2004b).

Malo je znanega o medsebojnih odnosih med endofiti in rastlinskimi virusi. Do sedaj so za krompirjev virus X dokazali, da ne vpliva na endofitsko bakterijsko floro stebela in gomoljev krompirja (De Boer in Copeman, 1974). Razlog za to je verjetno odsotnost neposrednega stika med obema tipoma organizmov. Bakterijski endofiti naseljujejo večinoma medcelične prostore korenin in spodnjih rastlinskih delov, virusi pa so v celicah predvsem nadzemnih delov rastline. Nasprotno Hallman in sod. (1997) trdijo, da sta oba organizma odvisna od rastlinskega metabolizma in da je kompeticija med njima kljub vsemu možna.

2.2.1.1.2 Parazitski nematodi

Na populacijo endofitskih bakterij vplivajo tudi nematodi (*Nematoda*), saj njihov prisotnost v rastlini vpliva na povečanje števila bakterijskih endofitov (Hallman in sod., 1998).

Nematodi prodirajo v rastlino skozi korenine v območji elongacije in diferenciacije (Grundler in Wyss, 1995; cit. po Hallman in sod., 1997a). Pri tem nastajajo rane, ki so primerne za vstop bakterij iz okolja, hkrati pa predstavljajo mesta za izhajanje hranil v okolje. S tem se povečuje okoliška bakterijska flora, posledično pa tudi število potencialnih bakterijskih endofitov. Možno je tudi, da je spremenjeno notranje okolje rastline, kot

posledica okužbe z nematodi, bolj primerno za naselitev z endofiti. To domnevo podpira dejstvo, da se združba bakterijskih endofitov spremeni v sedmih dneh po okužbi z nematodi, torej v času, ko se fiziologija rastline in s tem njeno notranje okolje spremeni kot odgovor na okužbo (Hallman in sod., 1997a)

2.2.1.1.3 Genotip rastline

Pomemben biotski dejavnik, ki vpliva na populacije endofitskih bakterij je tudi genotip rastline. Elvira-Recuenco in van Vuurde (2000) ugotavljata, da je kolonizacija različnih kultivarjev graha različna. Med vsemi pregledanimi kultivarji jih je bilo koloniziranih le pet, med njimi pa je eden močno izstopal. Razlike med kultivarji navadne ogrščice so opazili tudi Graner in sod. (2003) ter Pillay in Nowak (1997). Nekatere raziskave vpliva genotipa rastlin na bakterijske endofite niso pokazale (Bell in sod., 1995; Adams in Kloepper, 1996).

2.2.1.2 Abiotski dejavniki

Gostiteljska rastlina endofitom v primerjavi z zunanostjo nudi varno in stalno notranje okolje (Hallman in sod., 1997a). Kljub temu pa abiotski dejavniki, kot so temperatura, padavine in UV sevanje, ki delujejo na rastlino, posredno in neposredno delujejo tudi na njene endofite. Pillay in Nowak (1997) sta pokazala, da temperatura pomembno vpliva na zmožnost kolonizacije rastlin, Sessitsch in sod. (2002), pa so dokazali, da pomanjkanje svetlobe vpliva na zmanjšanje raznolikost bakterijskih endofitov.

V notranjosti rastline imajo na bakterijske združbe velik vpliv hranila. Različne bakterije lahko različne metabolite izrabljajo na različne načine. Nekateri so jim nedostopni ali celo zavirajo njihovo rast. Splošno gledano je hranil za potrebe bakterij v rastlini dovolj, saj so količine bolj ali manj konstantne, pa tudi številčnost bakterij v tkivih je večinoma majhna.

Kemične in fizikalne lastnosti tal (pH, slanost, tekstura,...) odločilno vplivajo na razvoj saprofitske flore. Slednja predstavlja združbo vrst, ki potencialno lahko prodrejo v rastlino in tam nastopajo kot rastlinski endofiti. Čeprav Bell in sod. (1995) ter Conn in Franco (2004b) opažajo vpliv prsti oziroma tip rastišča na endofitsko združbo, pa Germida in sod. (1998) prsti ne pripisujejo pomena. Vrsta rastline je po njihovem mnenju veliko pomembnejši dejavnik.

Abiotski dejavniki imajo velik vpliv na endofite v semenih. Število baterij, ki jih lahko gojimo, je v svežih semenih večje kot v semenih, ki so prezimila do naslednje sezone (Mundt in Hinkle, 1976). V času dormance semen se zaradi različnih neugodnih razmer

(nizke temperature, UV sevanje in suša), številčnost bakterijskih endofitov v semenih zmanjša.

2.2.2 Vpliv endofitov na rast in razvoj gostiteljske rastline

Učinki bakterijskih endofitov so lahko negativni in rast rastline zavirajo (Surette in sod., 2003), pozitivni (Kloepper in sod., 1999) in pripomorejo k boljši in hitrejši rasti ali pa so nevtralni (Surette in sod., 2003). Pozitivne učinke na rastlino lahko delimo na posredne in neposredne. Mehanizmi, s katerimi bakterije neposredno vplivajo na rastline, so fiksacija dušika, sinteza rastlinskih hormonov, povečevanje dostopnosti železa in fosforja, itd. Med posredne mehanizme prištevamo antibiozo, kompeticijo za hranila, parazitizem, plenilstvo, sprožanje odpornosti rastline, vezava železa itd. (povzeto po Timmusk, 2003).

2.2.2.1 Neposredni pozitivni učinki

Endofitska fiksacija dušika se zaradi aplikativnosti pogosto omenja kot najpomembnejši mehanizem neposrednega vpliva. Endofitske fiksatorje so odkrili v travah (Patriquin in sod., 1983; Boddey in sod., 1991, 1995; Reinhold-Hurek in Hurek, 1998; Triplett, 1996; James in Olivares, 1998), obsegajo pa rodove *Azoarcus* (Hurek in sod., 1994), *Acetobacter* (Dong in sod., 1994, 1995), *Saccharobacter* (Calvacante in Döbereiner, 1988), *Herbaspirillum*, *Ideonella*, *Enterobacter*, *Azospirillum* (Elbeltagy in sod., 2001), *Serratia* (Gyaneshwar in sod., 2001) in *Klebsiella* (Chelius in Triplett, 2000a). Glede vpliva endofitske fiksacije na rast rastline so si eksperimentalni podatki nasprotujoči. Gyaneshwar in sod. (2001) trdijo, da fiksacija ni dovolj velika in ne vpliva na povečano rast, Elbeltagy in sod. (2001) pa za predstavnike iz rodu *Herbaspirillum* dokazujejo ravno nasprotno.

Bakterijski endofiti lahko sintetizirajo rastlinske hormone, kot je avksin IAA (Sessitsch in sod., 2004), ki pospešuje apikalno rast, lahko pa izločajo siderofore za vezavo železa (Elad in Baker, 1985; Sessitsch in sod., 2004), ki jih nato uporabi rastlina.

2.2.2.2 Posredni pozitivni učinki

Zaviranje rasti patogenih mikroorganizmov in ostalih škodljivcev pozitivno vpliva na rast in razvoj rastline. Bakterijski endofiti lahko v ta namen proizvajajo antimikrobne spojine (Mukhopahyay in sod., 1996; Graner in sod., 2003; Pettit in sod., 1968; Coombs in sod., 2004) kot je amoniak (Howell in sod., 1988), hitinolitične encime (Frändenberg in Schnürer, 1998) ali pa spojine, ki odganjajo rastlinojede žuželke (Azevedo in sod., 2000). S patogenimi mikroorganizmi lahko tekmujejo za vire ogljika (Elad in Baker, 1985) in ostala hranila (Elad in Chet, 1987). Proizvajajo lahko siderofore, ki vežejo železo, ki ga

patogeni mikroorganizmi potrebujejo za svoj razvoj (Elad in Baker, 1985; Sessitsch in sod., 2004). Lahko sprožijo obrambne mehanizme rastline (M'Piga in sod., 1997; Benhamou in sod., 1996a, 1996b, 2000), tako da slednja na mestu okužbe začne izgrajevati strukturne prepreke in kopičiti fenole (Benhamou in sod., 1996a), lahko pa celo sprožijo inducirano sistemsko odpornost (Wei in sod., 1996; van Peer in sod., 1991; Raupach in Kloepper, 1998).

2.2.2.3. Negativni učinki

V nekaterih primerih se pokaže patogeni značaj bakterijskih endofitov (poglavje 2.1.5.1) ali pa ti na rast gostiteljske rastline delujejo delno zaviralno. Tak primer se je pokazal pri kalicah smreke in bora, ki so bile inokulirane z enim od endofitskih sevov (Chanway in sod., 2000; Shishido in sod., 1995) ter pri rižu inokuliranemu s kombinacijo bakterijskih endofitov (Bacilio-Jimenez in sod., 2001; Bent in Chanway, 1998). Majhen delež bakterijskih endofitov zavira rast tudi pri korenju (7%), (Surette in sod., 2003) in krompirju (4,5%), (Sturz, 1995).

2.2.3 Uporaba bakterijskih endofitov v kmetijstvu in industriji

Za povečevanje pridelka in zmanjševanje bolezni v kmetijstvu uporabljajo različne kemikalije (gnojila in pesticide). Njihova izdelava in prevoz sta draga, prevelika poraba pa vodi v eutrofikacijo voda. Kot alternativen prehod k bolj naravnim oblikam bogatenja tal in zatiranja škodljivcev v kmetijstvu in gozdarstvu znanstveniki raziskujejo tudi bakterijske endofite (Chanway, 1998).

Endofite so že uporabili za biološko kontrolo pri krompirju (van Buren in sod., 1993; Sturz in sod., 1999; Reiter in sod., 2002; Sturz in Matheson, 1996b) in rižu (Mukhopadhyay in sod., 1996; Bacilio-Jimenez in sod., 2001). Tudi vnosi bakterijskih endofitov na seme graha in soje (Kumar in Dube, 1992) ter obdelava zrn koruze rastlinam izboljša rast oziroma zmanjša gnitje semen (Mao in sod., 1997). Za biološko kontrolo je ključnega pomena izbira pravega bakterijskega seva. Določiti mu je potrebno prekrivanje niš med rastlinskim patogenom in vzpostavitev dominanc nad njim, preveriti je treba ali zavira sintezo toksinov in opraviti širše ekološke študije (Cavaglieri in sod., 2004). Za praktično uporabo so dodatno pomembni še načini vnosa seva. Do sedaj so uporabili inokulacijo semena, namakanje zemlje, razvoj listnega pršila, inokulacijo obrezanih, poškodovanih korenin in kombinacijo večjega števila metod (Bressan in Borges, 2004; Wei in sod., 1996; Musson, 1995). Ob razvoju teh postopkov je potreben celosten vpogled v bakterijske združbe v rastlinah (Sturz in Nowak, 2000). Bakterijski sev, ki ga vnašamo v sistem, vpliva na že izoblikovane mikrobne združbe v tleh (Gilbert in Parke, 1993) in v rastlini. Bakterija,

ki ni prilagojena na obstoječo endofitsko združbo, zmanjša njeno raznolikost (Conn in Franco, 2004b). Zaradi tega je zelo pomembna koncentracija seva, ki ga vnašamo med gojenjem (Pillay in Nowak, 1997) in način gospodarjenja z agrarno površino v preteklosti. Predhodne kulture, ki smo jih gojili (Sturz in Christie, 1996a; Sturz in sod., 1998) ter uporaba organskih in mineralnih gnojil in herbicidov (Surette in sod., 2003; Seghers in sod., 2004) vplivajo na endofitske bakterijske združbe, te pa na učinkovitost delovanja vnesenega seva.

Bakterijske endofite bi v prihodnosti lahko uporabljali za regulacijo rastlinojedih žuželk (Azevedo in sod., 2000), ponovno pogozdovanje v neugodnih razmerah (Chanway, 1997), proizvodnjo bioaktivnih snovi v medicini (Strobel, 2003), biodegradacijo ksenobiotikov (van Aken in sod., 2004) in fitoremedijacijo z divjimi (Lodewyckx in sod., 2002; Newman in Reynolds, 2005; van der Lelie in sod., 2005) in gensko spremenjenimi sevi (Barac in sod., 2004).

2.2.4 Koruza (*Zea mays* L.) in bakterijski endofiti

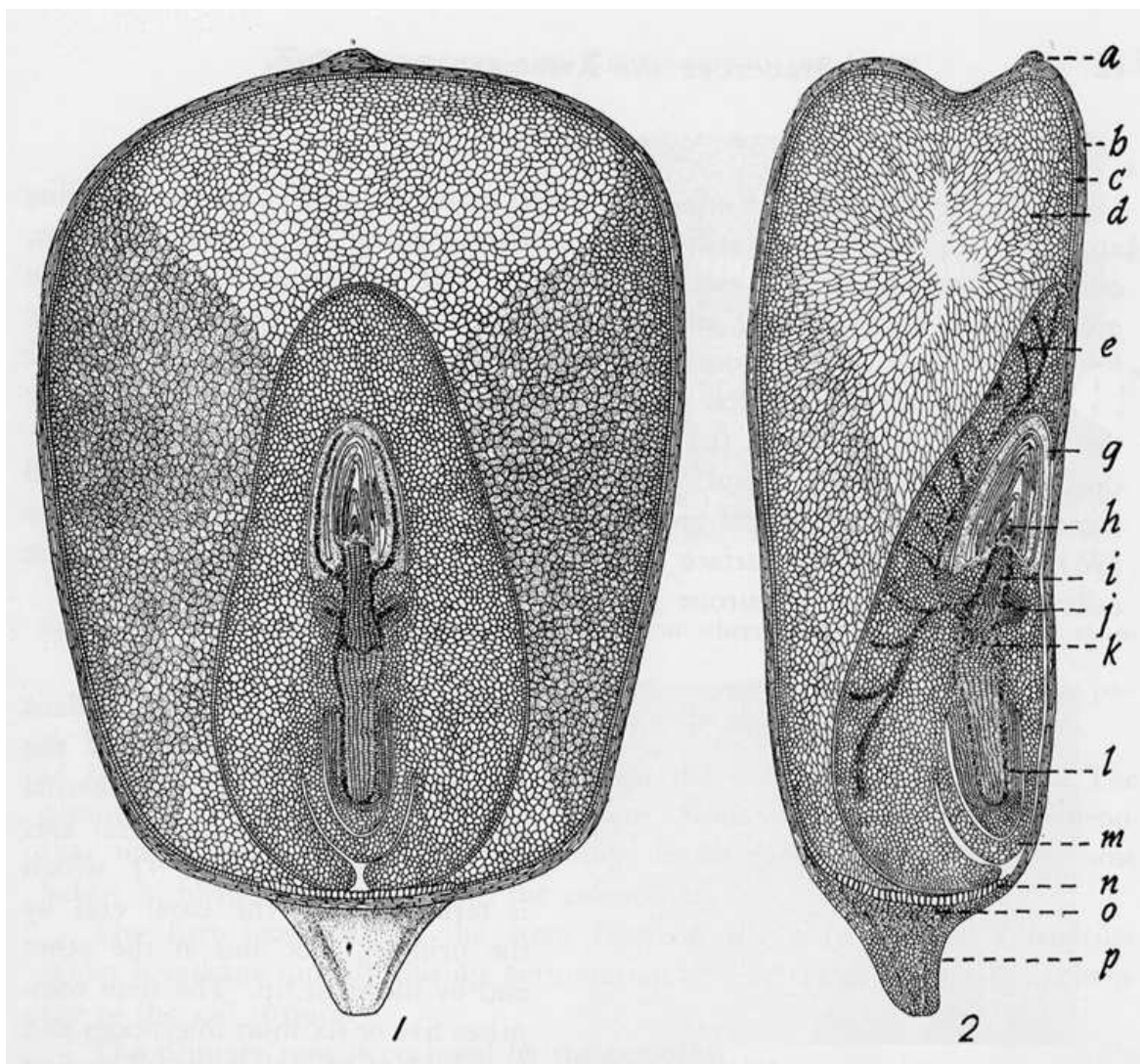
2.2.4.1 Koruza in njen izvor

Koruza izvira iz Srednje in Južne Amerike, od tam pa je bila hitro prenesena po celem svetu. Danes je ena najpomembnejših kmetijskih rastlin v svetovnem merilu, po podatkih iz leta 1988 pa zaseda glede na količino pridelka tretje mesto, takoj za pšenico in rižem.

V Slovenijo je bila koruza prinesena verjetno iz Italije in je tudi pri nas kmalu pridobila pomembno vlogo v prehrani. Prednost pred ostalimi žiti so koruzi dajali večji pridelek in lažja obdelava, slabosti pa je predstavljala setev, okopavanje in osipanje. Vse negativne lastnosti so se močno zmanjšale z vpeljavo mehanizacije ter uporabo novih sort (hibridi) in pesticidov, kar je omogočilo, da je koruza tudi v Sloveniji postala ključna kmetijska rastlina.

2.2.4.2 Zgradba koruznega zrna

Koruza se razmnožuje s semeni, ki so v enosemenskem zaprtem plodu, zrnu ali kariopsi. Koruzno zrno je po lastnostih podobno zrnem drugih žit. Skrajni zunanji del je lupina, sestavljena iz več plasti. Povsem zunanja plast je povrhnjica, ki je zelo tanka, pod njo pa si v zaporedju sledijo epikarp, endokarp, testa in episperm. Povrhnjico, epikarp in endokarp s skupnim imenom imenujemo perikarp (slika 2.1, b), ki pa je s testo zelo tesno zrasel. Vloga teh plasti je varovanje notranjih življenjsko pomembnih organov pred neugodnimi okoliškimi vplivi.



Slika 2.1: Zgradba koruznega zrna. 1 in 2, vertikalna prereza koruznega zrna. b, perikarp; c, alevron; d, endosperm; e, skutelum; g, koleoptila; h, plumula s stebelcem in listi; i, prvi nodij; j, zarodna lateralna korenina; k, skutelarni nodij; l, primarna korenina; m, koleoriza; n, bazalne prenosne celice endosperma; o, črna ali absrazijska plast; p, pedicel (Kiesselbach, 1954)

Pod epispermom sta glavna dela zrna endosperm ali meljak (slika 2.1, d) in embrio (zarodek), (slika 2.1, g-m) s pripadajočimi organi. Zunanji del endosperma je alevron (slika 2.1, c), ki ponavadi sestoji le iz ene plasti celic. Slednje imajo debele stene, pravilno kockasto obliko, v njih pa je veliko proteinov, mineralov in maščob, saj alevron sodeluje pri kalitvi. Ostale celice endosperma vsebujejo velike količine škroba, ki predstavlja energijsko zalogo za procese, ki pospešeno potekajo ob procesu kalitve.

Na spodnjem delu zrna sta na hrbtni strani embrio in ščitek (skutelum). Na embriju so že vsi glavni organi bodoče rastline. Na celotni mejni ploskvi proti endospermu je ščitek, ki je

preoblikovan v klični list. Njegova vloga je prenašanje hranilne snovi iz endosperma do kalčka.

Plod med zoritvijo prehaja skozi več zrelostnih stopenj, pri katerih se spreminja njegova kemijska sestava in količina vode, ki je s časom vse manjša. Polna zrelost ploda je istovetna s fiziološko zrelostjo zrnja in takrat se tok asimilatov v zrno preneha. Dozori tako imenovana črna plast, ki vključuje večplastno abscizijsko plast (slika 2.1, o), ki se razvije znotraj pedicela (tkiva na spodnjem delu zrna, ki je v stiku z materinskimi tkivi), (slika 2.1, p).

2.2.4.3 Bakterijski endofiti v zrnih koruze

V splošnem je prisotnost endofitov v semenih koruze že bila dokazana (Mund in Hinkle, 1976; McInroy in Kloepper, 1995; Zinnel in sod., 2002), vendar sta jih Mund in Hinkle (1976) dokazala le v poškodovanih semenih. Izolirani rodovi so navedeni v preglednici 2.1. Zaenkrat še ni znano, katera območja koruznega zrna bakterijski endofiti kolonizirajo in v kakšnem številu.

Poleg izolacije bakterijskih endofitov iz tkiv odraslih rastlin (preglednica 2.1) so bile na koruzi narejene tudi mnoge gospodarsko pomembne raziskave biološke kontrole patogenih mikroorganizmov. Preverjali so učinkovitost posameznih endofitov, ki imajo sposobnost zatiranja razvoja patogenih mikrobov (Mao in sod., 1997; Bacon in sod., 2001) ali pa so zmožni promocije rasti gostiteljske rastline (Lalande in sod., 1989).

2.3 NAMEN IN HIPOTEZA

Z našimi raziskavami smo proučevali bakterijske endofite v zrnih koruze. S klasičnimi gojitvenimi mikrobiološkimi tehnikami želeli izolirati bakterije iz zrna koruze, pridobljene seve pa identificirati in jih primerjati z že poznanimi. Hkrati smo želeli ugotavljati razlike med zrnih različnih sort koruze, med kaljenimi in nekaljenimi zrnih, različno starimi zrnih ene sorte ter med imbibiranimi in neimbibiranimi zrnih. Želeli smo preveriti tudi vlogo bakterijskih endofitov na rast in razvoj izvornih rastlin ter antagonistični vpliv na rast koruzi patogene glive *Fusarium verticillioides*.

Predvideli smo, da zrna koruze vsebujejo bakterijske endofite, da se vrstna struktura bakterijskih endofitov med različnimi sortami koruze razlikuje, da je uspešnost izolacije bakterijskih endofitov iz kaljenih in nekaljenih zrn različna in da s starostjo zrn upada. Hkrati smo menili, da bakterijski endofiti iz zrn koruze pozitivno vplivajo na rast in razvoj izvorne rastline ter zavirajo rast patogene glive *Fusarium verticillioides*.

3 MATERIALI IN METODE DELA

3.1 MATERIALI

3.1.1 Testni rastlinski material

Pregledali smo zrna sedmih različnih sort koruze (*Zea mays* L.), ki so bile nabrane na različnih območjih. Zrna sorte Pio, W22 in Mo17 so dar Prema Choureya (University of Florida, Florida, ZDA). Podrobnosti so podane v preglednici 3.1.

Preglednica 3.1: Pregled koruznih sort

SORTA	ČAS NABIRANJA	LOKACIJA
Neznana sorta (laboratorijska oznaka »kmet«)	september 2001	Njiva, Ljubljana, Slovenija
PIONEER BRAND PR38F70	18. 9. 2002 september 2002	Njiva, Medno pri Ljubljani, Slovenija ¹
PIONEER BRAND PR39K24	18. 9. 2002 september 2002	Njiva, Medno pri Ljubljani, Slovenija ¹
PIONEER BRAND Elita	18. 9. 2002 september 2002	Njiva, Medno pri Ljubljani, Slovenija ¹
Pio	september 2002	Eksperimentalna njiva, Univerza na Floridi, ZDA
W22	september 2002, september 2003	Eksperimentalna njiva, Univerza na Floridi, ZDA
Mo17	september 2002	Eksperimentalna njiva, Univerza na Floridi, ZDA

¹ zrna koruznih sort nabrana na isti njivi

Nabrane koruzne storže smo posušili, nato pa iz njih obrali posamezna zrna. V primeru, da storži niso bili dobro presušeni, smo zrna še dodatno sušili pri sobni temperaturi. Zrna smo shranjevali v papirnatih vrečkah, pri sobni temperaturi, v zračnem prostoru (zaščita pred navlažitvijo).

3.1.2 Gojišča

Gojišča, ki smo jih uporabili so bila komercialno pripravljena ali pa smo jih povzeli po Rupnik (2002).

Gojišče HA

nutrient broth.....8,0 g
NaCl.....5,0 g
destilirana voda.....1000 ml
za pripravo trdnega gojišča dodamo:
agar15 g

Gojišče ½ HA (tekoče)

nutrient broth.....4,0 g
NaCl.....5,0 g
destilirana voda.....1000 ml
agar15 g

Gojišče HA+Cyc

gojišče HA z dodatkom cikloheksamida
Cyc.....200 mg/l

Gojišče BHI (trdno)

(proizvajalec BIOLIFE Italiana S.r.l., Milano, Italija)

možganski ekstrakt.....12,5 g
ekstrakt govejega srca.....5,0 g
Peptocomplex.....10,0 g
Glukoza.....2,0 g
NaCl.....5,0 g
Na₂PO₄.....2,5 g
Agar.....15 g
destilirana voda.....1000 ml

Gojišče 2 ×YT (tekoče)

tripton.....16,0 g
kvasni ekstrakt.....10,0 g
NaCl.....5,0 g
destilirana voda.....1000 ml

Gojišče TSA (tekoče)

tripton.....15,0 g
soyton.....5,0 g
NaCl.....5,0 g
destilirana voda.....1000 ml
pH = 7,3

Gojišče King's B (KB) (trdno)

(proizvajalec MERCK, Darmstadt, Nemčija)

Bacto Tryptone.....10 g
Bacto Proteose Peptone.....1,5 g
K₂PO₄.....1,5 g
MgSO₄.....1,5 g
agar.....15 g
destilirana voda.....1000 ml

Gojišče MEA (trdno)

(proizvajalec BIOLIFE Italiana S.r.l., Milano, Italija)

maltoza.....12,5 g
dekstrin.....2,5 g
glicerol.....1,0 g
peptokompleks.....2,6 g
agar.....17,0 g
destilirana voda.....1000 ml

Gojišče PDA (trdno)

(proizvajalec OXOID LTD., Hampshire, Anglija)

krompirjev ekstrakt.....4,0 g
glukoza.....20,0 g
agar.....15,0 g
destilirana voda.....1000 ml

3.1.3 Encimi, reagenti, kemikalije

Pripravo reagentov smo povzeli po Rupnik (2002) in Wozniak (1997).

Kristal vijolično

raztopina A

kristal vijolično.....10 g

etanol, 95%.....00 ml

raztopina B

amonijev oksalat.....0,8 g

H₂O.....80 ml

Za pripravo delovne raztopine zmešamo 20 ml raztopine A in 80 ml raztopine B

Lugol

jod.....5 g

kalijev jodid.....10 g

H₂O.....100 ml

Safranin

safranin.....0,5 g

H₂O.....100 ml

Fiziološka raztopina

NaCl.....9 g

destilirana voda.....1000 ml

10 × pufer PBS

NaCl.....80 g

KCl.....2,0 g

Na₂HPO₄.....14,4 g

KH₂PO₄.....2,4 g

destilirana voda.....1000ml

1 × PBS dobimo z 10-kratnim redčenjem, pH umerimo s HCl na 7,2

puffer TE

(100 ml)

1,0M Tris pH8.....1ml
0,5M EDTA pH8.....0,2 ml
destilirana voda.....99 ml

puffer STE

(100 ml)

5,0 M NaCl.....2 ml
1,0 M Tris pH8.....1ml
0,5 M EDTA pH8.....0,2 ml
destilirana voda.....97 ml

10% SDS

(100 ml)

SDS.....10 g
Destilirana voda.....90ml

Segrejemo na 68°C, da se SDS raztopi, uravnamo pH na 7,2 in dopolnimo volumen do 100ml.

Razkužilo za površinsko sterilizacijo

NaOCl.....120g / 1000 ml (H₂O)

70% in 95% etanol

Detergent Tween 80 (BIOLIFE Italiana S.r.l., Milano, Italija)

Kit za izolacijo DNA NucleoSpin[®] 100 (MACHEREY–NAGEL, Düren, Nemčija)

Kit za izolacijo DNA Chelex[®] 100 (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, ZDA)

agaroza (SeaKem[®] LE Agarose) (CAMBREX Corporation, New Jersey, ZDA)

NaCl

glicerol

lizocim (vsi MERCK, Darmstadt, Nemčija)

proteinaza K

encima *Mnl I* in *Hae III* (vsi MBI FERMENTAS, Vilno, Litva)

encim *Hha I* (NEW ENGLAND BIOABS Inc., Beverly, MA, ZDA)

EDTA

Tris

Cikloheksamid (vsi SIGMA CHEMICAL Co., St. Louis, ZDA)

Tripton

Soyton

Bacto agar (vsi DIFCO LABORATORIES, Detroit, Michigan, ZDA)

Oligonukleotidni začetniki RW01 (27fevb)

Oligonukleotidni začetnih DG74 (1495revb) (oba OPERON TECHNOLOGIES, Alameda, ZDA)

Oligonukleotidni začetnik U968-GC (968fevb)

Oligonukleotidni začetnih L1401 (1401revb) (oba PROLIGO FRANCE SAS, Pariz, Francija)

dNTP

25 mM MgCl₂

encim *Taq* polimeraza

10× pufer za PCR reakcijo (vsi PERKIN ELMER, Norwalk, ZDA)

encim *Taq* polimeraza

10× pufer za PCR reakcijo (BIOTOOLS B&M Labs, S. A., Španija)

3.1.4 Pribor

Steklovina: čaše za sterilizacijo in spiranje, erlenmajerice za spiranje in pripravo gojišč, drigalska spatula za razmazanje vzorcev na ploščah, petrijevke za kalitev, pipete, epruvete, 2500 ml kozarci za vlaganje

Železni pribor: pincete, eze, škarje, skalpel, pokrovčki za epruvete

Aparature: PCR cikler GeneAmp PCR system 2400 (proizvajalec PerkinElmer, Fremont, CA, ZDA, električni vrtalnik (2400-2800 obratov/min), tehnica Sartorius analytic (proizvajalec SARTORIUS, Göttingen, Nemčija), laboratorijski sušilnik Wtb (proizvajalec BINDER, Tuttlingen, Nemčija), stereomikroskop ZEISS STEMI SV11 (proizvajalec CARL ZEISS AG, Göttingen, Nemčija)

Razno: magnetno mešalo, vorteks mešalo, avtomatske pipete, petrijevke, mikrocentrifugirke Eppendorf, stojala za mikrocentrifugirke Eppendorf, stojala za epruvete, komercialni sistem za shranjevanje bakterij MICROBANK™ (proizvajalec PRO-LAB DIAGNOSTICS, Ontario, Kanada), cvetlična korita za rože, vermikulit.

3.1.5 Mikroorganizmi

Sev glive *Fusarium verticillioides* (izoliran iz zrn sorte W22 in shranjen v mikrobiološki zbirki Katedre za molekularno genetiko in mikrobiologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani; oznaka v zbirki: EXF-2447)

Sev bakterije *Escherichia coli* (pridobljen iz mikrobiološke zbirke Katedre za molekularno genetiko in mikrobiologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani; oznaka v zbirki: V1)

3.2 METODE DELA

3.2.1 Izolacija bakterij iz koruznih zrn

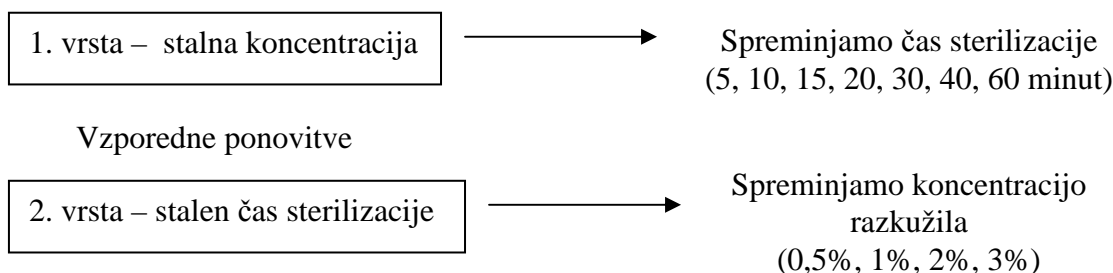
Bakterije smo poskušali izolirati iz nekaljenega in kaljenega zrna. V obeh primerih smo izolacijo izvedli pri imbibiranih in neimbibiranih zrnih. Pred vsako površinsko sterilizacijo in imbibicijo smo zrna najprej očistili. V prvem primeru smo izolacijo iz nekaljenih zrn izvedli takoj po sterilizaciji oziroma imbibiciji, v drugem primeru pa smo zrna pustili kaliti.

3.2.1.1 Čiščenje zrn

Zrna smo pred sterilizacijo dobro očistili. Na spodnji strani zrna smo v območju pedicela odstranili vse odmrle suhe dele, ki so onemogočali delovanje razkužila na površini zrna. Po potrebi smo s preostale površine zrna odstranili vse vidne nečistoče.

3.2.1.2 Površinska sterilizacija

Zrna smo površinsko sterilizirali v natrijevem hipokloritu (NaOCl). Izhodna raztopina sterilizacijskega medija je vsebovala 120 g NaOCl / 1000 ml H₂O in smo jo za sterilizacijo zrn predhodno redčili. Koncentracije so se zaradi različne površinske napetosti na površini zrn med različnimi sortami koruze razlikovale. Za vsako sorto smo zato določili optimalne pogoje sterilizacije kot je prikazano v spodnji shemi.



V primerih, ko sterilizacija ni bila uspešna tudi pri največjih koncentracijah in najdaljših časih, smo v sterilizacijski medij dodali 1-2 kapljici detergenta Tween 80, ki je zmanjšal površinsko napetost in s tem vplival na učinkovitost postopka. Optimalne razmere sterilizacije, ki smo jih določili za zrna posamezne sorte, so podane v preglednici 3.2.

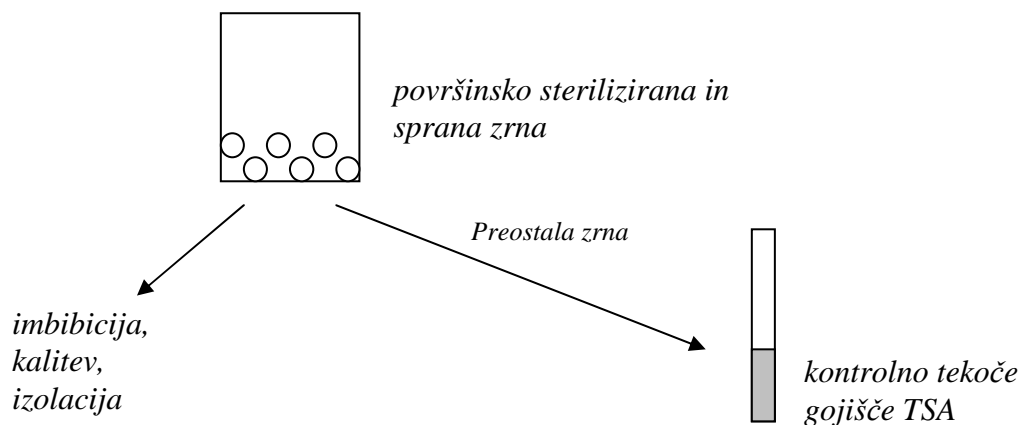
Preglednica 3.2: Optimalne razmere za površinsko sterilizacijo zrn posameznih koruznih sort

Sorta	Koncentracija razkužila (%)	Čas sterilizacije (min)	Dodatki (Tween 80)
»kmet«	0,5	25	/
PR38F70	0,5	25	/
PR39K24	0,5	25	/
Elita	0,5	10	/
Pio	2	30	1-2 kapljici
W22	3	30	1-2 kapljici
Mo17	1	30	1-2 kapljici

Po določitvi optimalnih sterilizacijskih razmer, smo nadaljevali s sterilizacijo zrn za izolacijo bakterijskih endofitov. Površinska sterilizacija je potekala v steklenih čašah prekritih z alu-folijo, ki je preprečevala hlapenje. Vsebino smo med postopkom ves čas mešali na magnetnem mešalu. Po končanem postopku smo zrna sprali (sedemkrat po 10-20 sekund) s sterilno destilirano vodo.

Površinsko sterilizirana in sprana zrna smo prenesli v sterilno okolje za imbibicijo oziroma za kaljenje, hkrati pa smo izvedli tudi kontrolo uspešnosti sterilizacije. Zrna, ki jih nismo uporabili v naslednjih korakih in so torej ostala v čaši, smo naknadno prenesli v tekoče

TSA gojišče. Ta zrna so služila kot kontrola površinske sterilizacije in hkrati kot kontrola aseptičnega dela. Postopek je predstavljen na sliki 3.1.



Slika 3.1: Shema kontrole sterilizacijskega postopka

3.2.1.3 Izolacija bakterij iz nekaljenih zrn

3.2.1.3.1 Izolacija bakterij iz celih nekaljenih zrn

Izolacijo bakterij iz celih neimbibiranih nekaljenih zrn smo izvedli z aseptičnim mletjem površinsko steriliziranih in spranih koruznih zrn. V ta namen smo izdelali aparaturo za sterilno mletje semen (slika 3.2).



Slika 3.2: Aparatura za sterilno mletje

10 gramov površinsko steriliziranih in spranih zrn sorte W22 smo prenesli v aparaturo za sterilno mletje. Dodali smo 90 ml gojišča $\frac{1}{2}$ HA in mleli 5 minut. Zmleta zrna z gojiščem smo aseptično prenesli v sterilno erlenmajerico in mešanico inkubirali pri sobni temperaturi 4 ure na stresalniku. Po tem času smo deset posamičnih vzorcev za vsak

različen volumen (0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 in 1 ml) prenesli v epruveto z 10 ml gojišča HA+Cyc. Epruvete in erlenmajerico s preostalo mešanico zmletih zrn smo inkubirali pri sobni temperaturi 4 dni, nato pa preverili rast gliv v mešanici in rast bakterij v epruvetah. Izbrali smo epruveto z 0,5 ml vcepkom ter jo redčili (od 10^{-1} do 10^{-7}). 0,1 ml vsake razredčine smo razmazali na gojišče BHI. Opazovali smo rast bakterij in izolirali čiste bakterijske kulture.

3.2.1.3.2 Izolacija bakterij iz posameznih delov nekaljenih zrn

Površinsko sterilizirana in sprana zrna neznane sorte (»kmet«) smo aseptično prenesli v čašo s sterilno destilirano vodo in zrna namakali približno 24 ur. Imbibirana zrna smo v nadaljevanju uporabili za sekcijo, kjer smo iz zrna izolirali posamezne dele (embrio, endosperm, testa). Delo je potekalo aseptično, na sterilni površini v laminariju.

Vse tri dele in njihove kombinacije (embrio in endosperm, endosperm in testa) smo prenesli v epruvete s tekočim gojiščem TSA. Izolacijo za vsak del semena smo izvedli v treh ponovitvah. Gojišča z rastlinskim materialom smo inkubirali pri sobni temperaturi (do trideset dni) ter opazovali bakterijsko rast. Za kontrolo postopka smo na začetku in koncu poskusa iz čaše, v kateri je potekala imbibicija, prenesli po eno nekaljeno zrno v tekoče gojišče TSA.

3.2.1.4 Izolacija bakterij iz kaljenih zrn

3.2.1.4.1 Kalitev neimbibiranih zrn

Površinsko sterilizirana zrna so kalila v sterilnih razmerah v steklenih petrijevkah, na omočenem filtrirnem papirju, pri sobni temperature (slika 3.3). Čas inkubacije se je med posameznimi sortami razlikoval zaradi različne hitrosti kalitve. Ko je mlada koreninica zrasla 4-5 cm smo kaljeno zrno aseptično prenesli na bakterijsko gojišče.



Slika 3.3: Kalitev zrn v sterilnih steklenih petrijevkah

3.2.1.4.2 Kalitev imbibiranih zrn

Zrna smo pred površinsko sterilizacijo imbibirali 4 ure v $1 \times$ pufru PBS pri 4°C . Imbibirana zrna smo površinsko sterilizirali (poglavje 3.2.1.3) in nadaljevali izolacijo, kot je opisano v razdelku 3.2.1.4.1.

3.2.1.4.3 Izolacija čistih bakterijskih kultur in shranjevanje

Za izolacijo bakterij smo uporabili dva tipa trdnih bakterijskih gojišč, BHI (Brain Heart Infusion) in KB (King's B). Plošče, na katere smo prenesli kaljena koruzna zrna, smo inkubirali pri sobni temperaturi, v osvetljenem prostoru (slika 3.4). Inkubacija je trajala maksimalno trideset dni oziroma dokler na ploščah ni bilo mogoče opaziti bakterijske rasti na stiku mlade koreninice z gojiščem.



Slika 3.4: Bakterijska gojišča s kaljenimi koruznimi zrnji

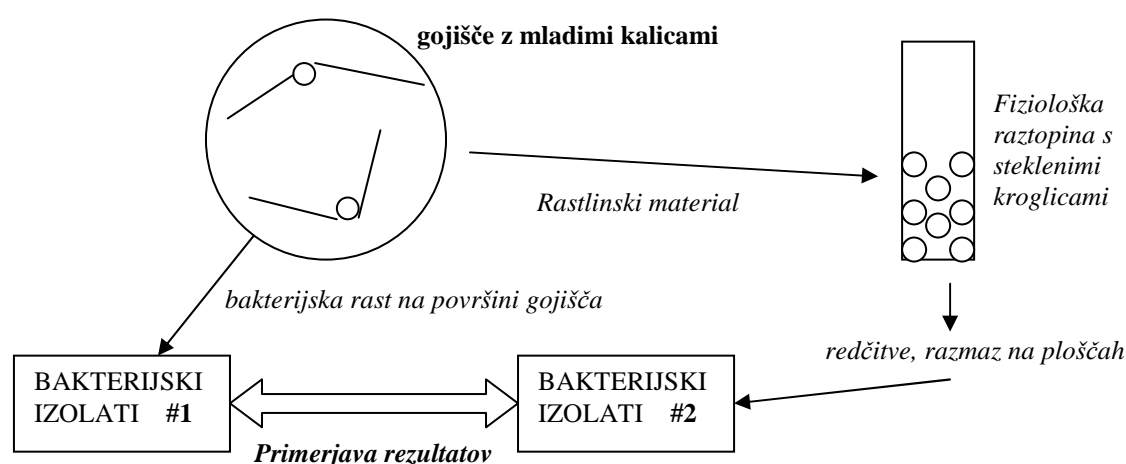
Bakterijske kulture, ki so zrasle na ploščah z rastlinami, smo v nadaljevanju precepili na gojišče BHI, kjer smo ugotavljali njihovo čistost. Kulture smo inkubirali pri sobni temperaturi, v aerobnih razmerah. Čiste bakterijske kulture smo shranili v komercialnem sistemu za shranjevanje pri -80°C .

Mlade kalice koruze smo inkubirali najdlje mesec dni. V primeru, da bakterijske rasti po tem času nismo opazili, smo pri nekaterih zrnih dodatno naredili še macerat mladega rastlinskega tkiva. Tako smo ugotavljali prisotnost bakterij v notranjosti in na površini mladih koreninic.

Macerat mladih koreninic smo naredili tudi v primerih, ko je bila bakterijska rast na ploščah prisotna, vendar ne točno na mestih fizičnega stika koreninice z gojiščem. Na ta

način smo ločevali bakterije prisotne na površini oziroma v notranjosti koreninice, od morebitnih kontaminant, ki bi lahko zašle na gojišča med inkubacijo.

Macerat koreninic smo pripravili tako, da smo del koreninice, kjer ni bilo opazne bakterijske rasti oziroma del, ki ni bil v stiku z gojiščem, aseptično prenesli v sterilno mikrocentrifugirko s fiziološko raztopino (1 ml) in steklenimi kroglicami. Z 1 minutno inkubacijo na vorteks mešalu smo zdrobili rastlinski material. Dobljeno suspenzijo smo redčili (10 \times , 100 \times in 1000 \times), nato pa 0,1 ml vsake razredčine razmazali na gojišče BHI. Opazovali smo rast bakterij ter rezultate primerjali z rastjo na prvotnem bakterijskem gojišču z mlado kalico (slika 3.5).



Slika 3.5: Primerjava sevov izoliranih s površine gojišča s kalicami s sevi izoliranimi iz rastlinskega macerata

3.2.2 Karakterizacija izoliranih bakterijskih sevov

Za osnovno karakterizacijo izoliranih bakterijskih sevov smo določali morfološke značilnosti samih kultur in mikroskopske značilnosti bakterijskih celic (barvanje po Gramu, celična morfologija). Za vrstno identifikacijo pa smo uporabili nukleotidno zaporedje gena za 16S rDNA.

3.2.2.1 Barvanje po Gramu

Izolirane bakterijske seve smo barvali po Gramu ter mikroskopsko ugotavljali celično morfologijo.

Barvanje po Gramu (Rupnik, 2002)

1. Pripravili smo mikroskopski preparat in ga fiksirali nad plamenom.
2. Barvali smo 1 minuto z raztopino kristal vijoličnega.

3. Odvečno barvilo smo sprali z vodo, nato preparat prelili z lugom in počakali 1 minuto.
4. Rahlo smo sprali z vodo.
5. Razbarvali smo v etanolu.
6. Barvali smo s safraninom 1 minuto.

Preparat smo posušili in ga pregledali pod mikroskopom. Določili smo bakterijski tip (po Gramu pozitivno, po Gramu negativno) in morfologijo celic.

3.2.2.2 Izolacija DNA

3.2.2.2.1 Izolacija DNA za določanje nukleotidnega zaporedja

Potek izolacije DNA (Wozniak, 1997):

1. V mikrocentrifugirko Eppendorf smo odpipetirali 1 ml pufra TE in v njem suspendirali bakterijsko kulturo. Centrifugirali smo 10 minut pri 5000 obratov/min. Supernatant smo zavrgli.
2. Pelet smo resuspendirali v 100 μ l pufra STE.
3. Dodali smo 50 μ l lizocima (koncentracija 50 mg/ml) in inkubirali 30 minut pri 37°C.
4. Dodali smo 10 μ l proteinaze K (koncentracija 20 mg/ml) in inkubirali 30 minut pri 37°C.
5. Dodali smo 50 μ l 10% SDS in inkubirali 20 minut pri 60°C. Pri tej inkubaciji se je morala kultura zbistriti. Če se ni, smo čas inkubacije podaljšali.
V nadaljevanju smo uporabljali kit za izolacijo DNA NucleoSpin[®].
6. Namestili smo NucleoSpin[®] kolono v 2 ml mikrocentrifugirko. Vzorec iz koraka 5 smo odpipetirali na kolono in centrifugirali 1 minuto pri 6000 \times g. Če celoten vzorec ni prešel skozi matriks kolone, smo korak ponovili. Filtrat smo zavrgli.
7. Na kolono smo dodali 500 μ l pufra za spiranje in centrifugirali 1 minuto pri 6000 \times g. Filtrat smo zavrgli.
8. Ponovili smo korak 7.
9. Po obeh korakih spiranja smo zavrgli filtrat in ponovno centrifugirali, tokrat 2 minuti pri 6000 \times g, da smo odstranili preostali pufer za spiranje.
10. Kolono NucleoSpin[®] smo namestili v novo 1,5 ml mikrocentrifugirko Eppendorf. DNA smo sprali z 200 μ l pufra za spiranje, ki smo ga predhodno segreli na 70°C. Pred centrifugiranjem (1 minuto pri 6000 \times g) smo kolono skupaj s pufrom za spiranje inkubirali 1 minuto pri 65°C. Filtrat z raztopljeno bakterijsko DNA smo uporabili za namnoževanje 16S rDNA z verižno reakcijo s polimerazo (PCR).

3.2.2.2.2 Izolacija DNA za restrikcijske profile gena 16S rDNA

Potek izolacije DNA (Stubbs in sod., 1999):

1. Pripravili smo 5% Cheleks (0,5g oz. 0,75g če že ima vezano vodo na 10 ml sterilne destilirane vode)
2. Dobro smo premešali in v epruveto Eppendorf, odpipetirali 100 μ l pripravljene mešanice
3. Dodali smo polno 1 μ l zanko kulture
4. Premešali smo na vorteks mešalniku
5. Vzorec smo 10 minut inkubirali v predčasno pripravljene vreli vodni kopeli
6. Centrifugirali smo 10 minut pri maksimalnih obratih (14.000)
7. Supernatant (grobo DNA) smo prenesli v svežo epruveto Eppendorf in jo v nadaljevanju uporabili za pomnoževanje gena 16S rDNA

3.2.2.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) smo pomnoževali gen 16S rDNA. Uporabili smo evbakterijske oligonukleotidne začetnike RW01 (5'-AACTGGAGGAAGGTGGGGAT-3') in DG74 (5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3') ter pogoje pomnoževanja kot so jih opisali Bianciotto in sod. (1996). PCR program in reakcijska mešanica sta navedena spodaj.

PCR program (Bianciotto in sod.,1996)

- denaturacija 94°C, 4 min
- 5 ciklov
 - 94°C, 30s
 - 60°C, 30s
 - 72°C, 4 min
- 5 ciklov
 - 94°C, 30s
 - 55°C, 30s
 - 72°C, 4 min
- 30 ciklov
 - 94°C, 30s
 - 50°C, 30s
 - 72°C, 4 min
- inkubacija ob zaključku programa pri 72°C, 7 min;
- 4°C, ∞

Preglednica 3.3: Reakcijska mešanica za reakcijo PCR.*Uporaba oligonukleotidnih začetnikov RW01 in DG74.*

	100 μ l	Končna koncentracija
H ₂ O	75 μ l	
10 X pufer	10 μ l	1X pufer
25 mM MgCl ₂	6 μ l	1,5 mM
20 mM dNTP	4 μ l	0,2 mM
primer 27 evb 10 pmol / μ l	1 μ l	0,1 pmol / μ l
Primer 1495 revb 10 pmol / μ l	1 μ l	0,1 pmol / μ l
Taq polimeraza	0,25 μ l	
DNA	2 μ l	

Ker pri sevih TR-5, TR-5, W22M1, W22B21 in W22B22 nukleotidnega zaporedja nismo mogli določiti, smo pomnoževanje gena 16S rDNA pri njih ponovili z drugimi oligonukleotidnimi začetniki, U968-GC (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGC-GGGGGCACGGGGGGAACGCGAAGAACCCTTAC-3') in L1401 (5'-CGGTGTGTACA-AGACCC-3' in drugačnimi pogoji PCR reakcije (preglednica 3.4).

PCR program (Lapanje, 2005)

- predhodna denaturacija pri 92 °C, 3 min
- 35 ciklov
 - denaturacija pri 92 °C, 30 sec
 - prileganje pri 54 °C, 30 sec
 - pomnoževanje pri 68°C, 1 min
- inkubacija ob zaključku programa pri 72 °C, 7 min
- 4°C, ∞

Preglednica 3.4: Reakcijska mešanica za reakcijo PCR.*Uporaba oligonukleotidnih začetnikov U968-GC in L1401.*

H2O	16,66 μ l
pufer (10X)	2,5 μ l
dNTP (40 mM)	0,25 μ l
BSA 18 mg/ml	0,5 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 μ l
U968-GC (10 pmol/ μ l)	1 μ l
L1401 (10 pmol/ μ l)	1 μ l
Taq polimeraza (5 U/ μ l)	0,5 μ l

3.2.2.4 Določanje nukleotidnega zaporedja

Produkte PCR reakcije smo za določevanje nukleotidnega zaporedja poslali v SeqLab (Goettingen, Nemčija). Za primerjavo zaporedij smo uporabili program BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) in bazo podatkov projekta RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>).

3.2.2.5 Določanje restrikcijskih profilov gena 16S rDNA

Za ugotavljanje restrikcijskih profilov gena 16S rDNA smo produkte PCR reakcije razrezali s tremi encimi *Hha* I, *Mnl* I in *Hae* III. Reakcijsko mešanico smo pripravili kot kaže tabela 3.5 in jo inkubirali na 37°C v vodni kopeli 24 ur. Restrikcijske profile smo preverili na 2% in 3% agaroznemu gelu.

Preglednica 3.5: Restrikcijska mešanica

	20 µl
encim	2 enoti
puffer	2 µl
BSA (po potrebi)	0,2 µl
DNA	10 µl
H ₂ O	dopolni do 20 µl

Restrikcijske profile smo ugotavljali pri sevih rodov, ki so se pojavljali najpogosteje in za ugotavljanje identitete ponovno izoliranih sevov.

3.2.3 Vpliv bakterijskega seva TR-5 na rast in razvoj izvorne rastline

V nadaljnjih poskusih smo uporabili sev TR-5 in preverjali antibiozo s patogeno glivo izolirano iz zrn koruze in vpliv na rast in razvoj mladih rastlin koruze. Najprej smo preverili rastne značilnosti seva (umeritev rastne krivulje) v tekočem gojišču HA in preživetje v destilirani vodi, nato pa pripravili oba omenjena poskusa.

3.2.3.1 Vpliv bakterijskih endofitov na rast in razvoj mladih rastlin

Vpliv bakterijskega seva na rast in razvoj rastlin smo preverjali v sterilnih in nesterilnih razmerah v obdobju od časa kalitve do maksimalno enega meseca starosti. Rastline smo gojili v vermikulitu, pri dnevni svetlobi pri sobni temperaturi.

3.2.3.2 Vpliv bakterijskega seva TR-5 na rast izvorne rastline v sterilnih laboratorijskih razmerah

Sterilne rastne razmere smo zagotovili v 2500 ml steklenih kozarcih s pokrovi, dodatno zaščitenimi z aluminijasto folijo. Vsak sterilni kozarec je pred vnosom koruznih zrn vseboval 500 ml vermikulita in 100 ml destilirane vode. Zrna koruze smo očistili in površinsko sterilizirali (razdelka 3.2.1.1, 3.2.1.2), jih aseptično prenesli na trdno gojišče KB in jih 3 dni inkubirali na sobni temperaturi. Za poskus smo uporabili le kalice, ki po tem času niso kazale okuženosti z bakterijami ali glivami. Po tri kalice smo aseptično prenesli v sterilne steklene kozarce, jih zakopali pod površino vermikulita in prelili z bakterijsko celično suspenzijo (100 ml na vsak kozarec). Poskus smo izvedli v petih ponovitvah (pet kozarcev, skupaj 15 kalic). Kontrolna skupina je vsebovala enako število kozarcev in kalic, ki pa smo jih namesto z bakterijsko suspenzijo, zalili s sterilno destilirano vodo (100 ml na vsak kozarec). Kozarci so med rastjo rastlin do konca poskusa ostali zaprti.

V 500 ml tekočega HA gojišča smo na stresalniku, pri sobni temperaturi v 21 urah namnožili bakterijsko kulturo. Celice smo sprali s sterilno fiziološko raztopino in jih ponovno resuspendirali v 500 ml sterilne destilirane vode. Tako pripravljeno celično suspenzijo, ki je vsebovala 8×10^9 CFU / ml, smo uporabili za zalivanje kalic.

Kozarce z rastlinami smo inkubirali na dnevni svetlobi, pri sobni temperaturi 14 dni. Iz rizosfere, rizoplana in stebela smo poskušali ponovno izolirati vneseni bakterijski sev. Identiteto izolatov smo potrdili s primerjavo restrikcijских profilov teh izolatov in vnesenega bakterijskega seva. Uporabili smo encim *HhaI*. Pri rastlinah smo preverili svežo in suho težo zelenih poganjkov in korenin ter njihovo maksimalno dolžino. Sušili smo jih v sušilniku 24 ur pri 70°C.

3.2.3.3 Vpliv bakterijskega seva TR-5 na rast izvorne rastline v nesterilnih laboratorijskih razmerah

Mlade rastline smo gojili v cvetličnih koritih v nesterilnih razmerah, pri dnevni svetlobi, na sobni temperaturi 30 dni. Vsaka rastna posoda je vsebovala 2500 ml vermikulita zalitega s 1000 ml destilirane vode. Pod površino vermikulita smo zakopali 15 koruznih zrn in jih zalili s 500 ml pripravljene bakterijske celične suspenzije (poglavje 3.3.2.1). Vpliv seva TR-5 na rast rastlin smo primerjali s kontrolnimi rastlinami, ki smo jih zalili s 500 ml destilirane vode oziroma s 500 ml celične suspenzije bakterije *Escherichia coli*. V nadaljevanju smo vse rastoče rastline v različnih časovnih obdobjih zalivali z destilirano vodo (500 ml na rastno posodo). Pogostost zalivanja je bila odvisna od temperature in

hitrosti sušenja vermikulita. Rastline smo zalili vsakokrat, ko se je izsušila zgornja 0,5-1 centimeterska plast vermikulita.

V sedem dnevnih časovnih razmakih, smo štirikrat preverili številčnost bakterij v rastnem substratu 1-2 cm pod površino, na koncu poskusa pa še v substratu na dnu cvetličnega korita. Vsakokrat smo poskušali ponovno izolirati vneseni bakterijski sev TR-5. Ponovno izolacijo smo na koncu poskušali doseči tudi iz rizosfere in rizoplana rastline. Identiteto izolatov smo potrdili s primerjavo restrikcijskih profilov izolatov in vnesenega seva. Uporabili smo encim *Hha* I. Pri rastlinah smo na koncu preverjali svežo in suho težo zelenih poganjkov in korenin ter njihovo maksimalno dolžino. Sušili smo jih v sušilniku 24 ur pri 70°C.

3.2.3.4 Ponovna izolacija vnešenega bakterijskega seva TR-5

Vnešeni bakterijski sev TR-5 smo ponovno poskušali izolirati iz rizosfere, rizoplana in površine stebela rastlin, ki so rasle v sterilnih razmerah, ter iz rizosfere, rizoplana in rastnega substrata rastlin, ki so rasle v nesterilnih razmerah. V prvem primeru smo ves čas delali aseptično v laminariju.

Rizosferno floro smo pridobili s spiranjem korenin v sterilni fiziološki raztopini, mikrofloro rizoplana pa smo pridobili z nadaljnjim spiranjem bakterij s površine korenin. To smo naredili tako, da smo korenine prenesli v epruveto s sterilno fiziološko raztopino in steklenimi kroglicami, ter jih inkubirali na vorteks mešalu. Raztopino s sprano rizosferno bakterijsko floro in bakterijsko floro rizoplana smo ustrezno redčili in razmazali na trdno gojišče HA. Iz površine stebela smo bakterije izolirali tako, da smo približno 2 cm dolg kos stebela aseptično prenesli na površino trdnega gojišča KB. Plošče z gojiščem smo inkubirali pri sobni temperaturi 2 dni. Po tem času smo izolirali čiste bakterijske kulture. Izbrali smo le rumeno pigmentirane kolonije, katerih rast je bila po 2 dneh dobro opazna. Njihove morfološke značilnosti smo primerjali z značilnostmi kulture vnesenega seva TR-5. Ponovno izolirane seve, ki so imeli enake značilnosti kot sev TR-5, smo dodatno identificirali s pomočjo restrikcijskega profila narejenega z encimom *Hha*I.

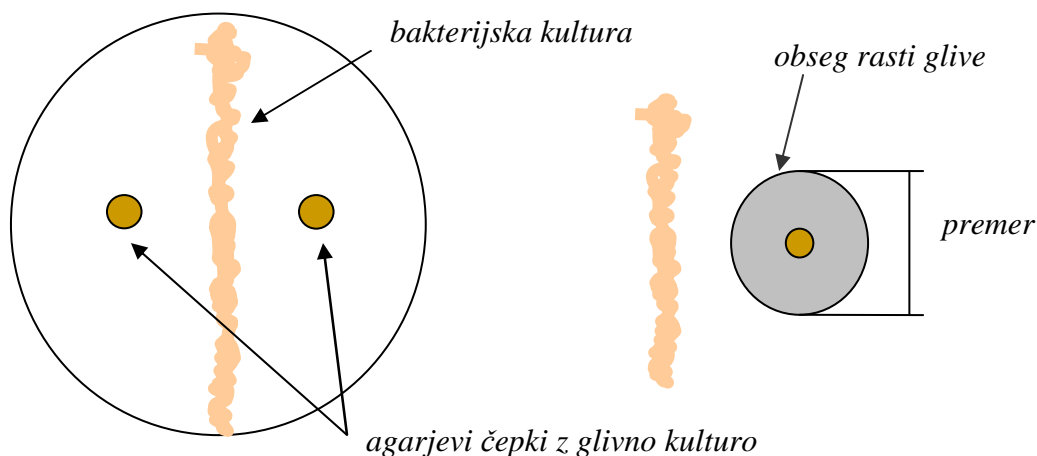
Sev TR-5 smo ponovno izolirali iz rastnega substrata tako, da smo približno 2 g vermikulita suspendirali v 50 ml fiziološke raztopine, suspenzijo ustrezno redčili, razredčine pa razmazali na gojišče HA. Nadaljevali smo kot je že opisano zgoraj.

3.2.4 Vpliv bakterijskega seva TR-5 na rast glive *Fusarium verticillioides*

Iz površinsko steriliziranih zrn koruze sorte W22 smo izolirali sev patogene glive *Fusarium verticillioides*. Identifikacijo seva je opravil Hans-Josef Schroers iz Kmetijskega inštituta v Ljubljani. V poskusih smo preverjali vpliv bakterijskega seva TR-5 na rast glive na različnih hranilnih gojiščih in na kalečih zrnih.

3.2.4.1 Vpliv bakterijskega seva TR-5 na zmanjšano rast glive na hranilnih gojiščih

Potek poskusa smo priredili po Mukhopadhyay in sod. (1996) ter po Kumar in Dube (1992). Bakterijsko kulturo smo preko noči namnožili v $2 \times$ YT gojišču. Iz 3-5 dni stare kulture glive smo izdelali agarjeve čepke premera 5 mm. 100 μ l bakterijske kulture smo nanegli v ravni črti po sredini trdnega hranilnega gojišča (HA, PDA in MEA) ter na vsako stran postavili po en agarjev čepok, tako, da je glivni micelij prišel v stik s površino gojišča. Shema poskusa je predstavljena na sliki 3.4. Deset dni smo nato opazovali glivno rast, ki se je širila okoli agarjevega čepka in vsak dan izmerili premer kroga na premici, vzporedni z bakterijskim nanosom (slika 3.6). Opazovali smo tudi obliko glivne kulture in direktni stik med bakterijo in glivo.

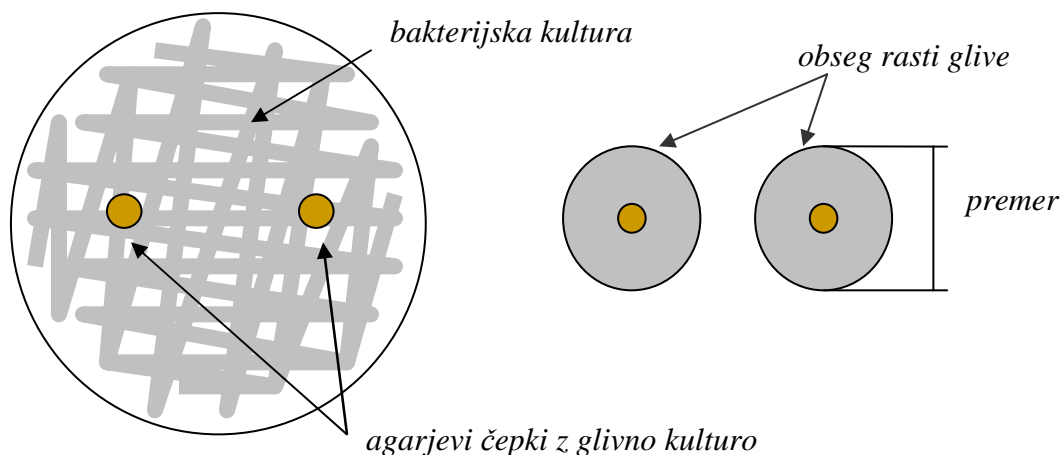


Slika 3.6: Shema poskusa antibiotične aktivnosti na hranilnih gojiščih (nanos po sredini gojišča)

Na kontrolnem gojišču smo na sredino nanegli 100 μ l čistega $2 \times$ YT gojišča in opazovali njegov vpliv na rast glive.

V nadaljevanju smo uporabljali le gojišča PDA. Na njih smo primerjali vpliv seva TR-5 z vplivom seva bakterije *Escherichia coli*, katere antimikrobni vpliv pri rastlinah ni znan. Rast glive pod vplivom posamezne bakterije smo primerjali s kontrolno rastjo brez bakterijske prisotnosti. Bakterijske kulture smo na eni strani nanegli na način, kot je opisan

zgoraj, na drugi strani pa smo jih na gojišče nanegli konfluentno (slika 3.7). Vse parametre smo opazovali na enak način kot je opisano zgoraj.



Slika 3.7: Shema poskusa antibioze na hranilnih gojiščih (konfluentni nanos)

3.2.4.2 Vpliv bakterijskega seva TR-5 na zmanjšano rast glive na površini kalečih zrn koruze

Rast glive smo v obdobju desetih dni opazovali tudi na kalečih zrnih. Poskus smo izvedli paralelno v dveh sterilnih steklenih petrijevkah s filter papirjem. Zrna smo očistili in površinsko sterilizirali (razdelka 3.2.1.1, 3.2.1.2) in jih okužili s patogenim glivnim sevom, tako da smo nanje aseptično prenesli micelij 5 dni stare kulture glive. Okužena zrna smo aseptično prenesli v sterilne steklene petrijevke s filter papirjem. V prvi smo zrna prelili s 4 ml suspenzije bakterijskih celic, v drugi pa s 4 ml sterilne destilirane vode in jo uporabili kot kontrolo. Bakterijsko kulturo smo predhodno namnožili v tekočem $2 \times$ YT gojišču, pri sobni temperaturi na stresalniku v 21 urah. Pred nanosom na zrna smo celice sprali s sterilno fiziološko raztopino in jih ponovno resuspendirali v sterilni destilirani vodi. Površino vsakega zrna smo prelili s celično suspenzijo oziroma čisto destilirano vodo (kontrola), omočili filter papir, na katerem so zrna kalila in opazovali rast glive na površini kalečih zrn.

4 REZULTATI

4.1 IZOLACIJA BAKTERIJSKIH ENDOFITOV

Da bi dokazali prisotnosti endofitskih bakterij v zrnih različnih sort koruze, smo bakterije poskušali izolirati iz površinsko steriliziranih imbibiranih in neimbibiranih oziroma kaljenih in nekaljenih zrn.

4.1.1 Izolacija bakterij iz nekaljenih zrn

4.1.1.1 Izolacija bakterij iz celih nekaljenih zrn

Iz 10 g zmletih neimbibiranih nekaljenih zrn sorte W22 (letnik 2003) smo izolirali en bakterijski sev. Označili smo ga kot sev W22M1 in ga kasneje identificirali (preglednica 4.4).

V kontrolnih tekočih gojiščih TSA nismo opazili bakterijske rasti. V mešanici zmletih zrn smo po 4 dnevni inkubaciji opazili glivno rast. V epruvetah z gojiščem HA+Cyc glivne rasti po enakemu času nismo opazili.

4.1.1.2 Izolacija bakterij iz posameznih delov nekaljenih zrn

Po razrezu zrna neznane sorte («kmet») na embrio, endosperm in testo, iz nobenega dela zrna bakterij nismo uspeli izolirati. V kontrolnih tekočih gojiščih TSA, s katerimi smo preverjali asepticnost našega postopka, nismo opazili bakterijske rasti.

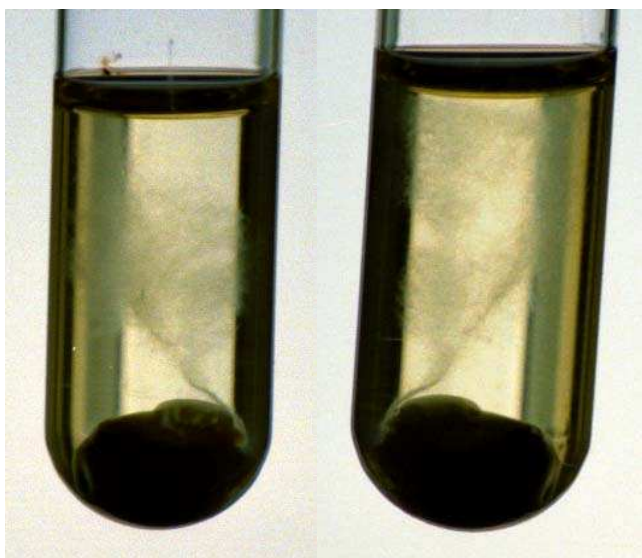
4.1.2 Izolacija bakterij iz kaljenih zrn

Iz 169 kaljenih zrn smo izolirali 16 bakterijskih izolatov. Ko smo zrna prenesli na trdno gojišče (slika 3.4), ki ga običajno uporabimo za izolacijo bakterij, se je v nekaterih primerih na gojišču ob mladih koreninicah pojavila bakterijska rast (slika 4.1). Pri eni sami kalici se je rast bakterij pojavila tudi na delih gojišča, ki niso bili v stiku s koreninicami. Maceracija rastlinskega tkiva je pokazala, da bakterijski sev ni bil prisoten v notranjosti ali na površini korenine. Sev smo označili kot TR-8 (preglednica 4.4) in ga obravnavali kot okužbo pri izvedbi postopka.



Slika 4.1: Bakterijska rast na stiku mlade koreninice z gojiščem

Koruzna zrna so bila pogosto kontaminirana z glivami. Njihovo rast smo lahko opazili že med kalitvijo zrn ali kasneje po prenosu kalic na trdno bakterijsko gojišče. V nekaterih primerih je bila glivna rast opazna v kontrolnih epruvetah s tekočim gojiščem TSA, vendar le na mestu pedicela in vedno po tem, ko je zrno na tem mestu počilo (slika 4.2). Imbibicija, ki smo jo izvedli pred površinsko sterilizacijo, je vplivala na delež kontaminiranih koruznih zrn pri sorti W22. Pri imbibiranih zrnih je bil ta delež 63 %, pri neimbibiranih zrnih pa le 25 %.



Slika 4.2: Rast glivnih kontaminant v kontrolnem tekočem gojišču TSA

4.1.2.1 Uspešnost izolacije bakterijskih endofitov iz neimbibiranih kaljenih koruznih zrn

Pregledali smo 169 neimbibiranih kaljenih zrn sedmih sort koruze. Endofitske bakterije smo izolirali iz zrn štirih sort. Izolirali smo 13 bakterijskih sevov (sevi TRL-2.2, TRL-2.5, TRL-3.1, TRL-3.2, TR-3, TR-4, TR-5, TR-6, TR-7, TR-8, TR-9, W22B31, W22B32). Delež kaljenih zrn, pri katerih je prišlo do bakterijske rasti, se je med posameznimi sortami koruze razlikoval in je bil od 9,7 do 20 %. Bakterijska rast se je pojavila po 1 do 18 dneh po prenosu kalic na bakterijsko gojišče (preglednica 4.4).

Pri sorti W22 smo bakterije izolirali iz zrn, ki so bila nabrana v dveh zaporednih sezonah. Seva TR-5 in TR-7 smo izolirali iz zrn nabranih v letu 2002, seva W22B31 in W22B32 pa iz zrn nabranih v letu 2003.

V poskusih s štirimi sortami koruze smo kalice prenesli na dve vrsti splošnih gojišč za gojitev bakterij, gojišči BHI in King B. Izkazalo se je, da je gojišče King B primernejše za rast koruznih kalic in izolacijo bakterijskih endofitov (preglednica 4.1). Na gojišču BHI so koruzne kalice kmalu po prenosu uvele in pričele propadati. Na tem gojišču nismo izolirali nobenega bakterijskega seva.

Preglednica 4.1: Pregled izolacije bakterijskih endofitov iz neimbibiranih kaljenih zrn različnih sort koruze

Sorta koruze	Štev. testiranih zrn	Čas do kaljenja (dni)	Bakt. gojišče	Število kalic	Število kalic z bakterijsko rastjo	% kalic z bakterijsko rastjo	Število izoliranih sevov
»kmet«	53	1 - 2	BHI	12	0	0	0
			KB	41	5	12,2	5
PIONEER BRAND PR38F70	27	3	BHI	12	0	0	0
			KB	15	3	20,0	3
PIONEER BRAND PR39K24	14	3	BHI	9	0	0	0
			KB	5	0	0	0
PIONEER BRAND Elita	16	2	BHI	14	0	0	0
			KB	2	0	0	0
Pio	9	6	KB	9	1	11,1	1
W22	41	5-11	KB	41	4	9,7	4
Mo17	9	4 - 10	KB	9	0	0	0
Skupaj	169						13

4.1.2.2. Uspešnost izolacije bakterijskih endofitov iz imbibiranih kaljenih koruznih zrn

Pregledali smo 15 kaljenih zrn koruze sorte W22 (letnik 2003), ki smo jih pred površinsko sterilizacijo imbibirali. Izolirali smo 3 bakterijske seve (sevi W22B1, W22B21, W22B22). Delež kaljenih zrn, pri katerih je prišlo do bakterijske rasti je bil 20 %. Bakterijska rast se je pojavila v enem dnevu po prenosu kalic na bakterijsko gojišče.

V eni od kontrolnih epruvt z gojiščem TSA smo po šestih dneh opazili bakterijsko rast. Izolirali smo en sev (W22K1) in ga kasneje identificirali.

Preglednica 4.2: Izolacija bakterijskih endofitov iz imbibiranih kaljenih zrn sorte W22

Sorta koruze	Št. testiranih zrn	Čas do kaljenja (dni)	Bakt. gojišče	Število kalic	Število kalic z bakterijsko rastjo	% kalic z bakterijsko rastjo	Število izoliranih bakterijskih sevov
W22	15	5-11	KB	15	3	20	3

4.1.2.3 Uspešnost izolacije bakterijskih endofitov iz zrn iste sorte koruze v daljšem časovnem razdobju

Uspešnosti izolacije bakterij iz shranjenih zrn smo v daljšem časovnem razdobju preverjali pri neznani sorti (»kmet«). Iz zrn istega storža smo pri tej sorti bakterije v daljšem časovnem razdobju izolirali večkrat. Prvo izolacijo smo izvedli takoj po tem, ko smo koruzni storž nabrali na njivi, potem pa smo še štirikrat testirali prisotnost endofitskih bakterij (preglednica 4.3). Prva in zadnja izolacija sta bili narejeni v razmaku 18 mesecev.

Izolacija bakterijskih endofitov je bila najuspešnejša pri svežih zrnih, potem pa je s časom upadala (preglednica 4.3).

Preglednica 4.3: Izolacija bakterij iz zrn iste rastline v 1,5 letnem razdobju.

Datum	Število pregledanih zrn	Število kalic	Število izolatov	% kalic z bakterijsko rastjo	Gojišče
27. 11. 2001	6	6	2	33,3	KB
08. 01. 2002	8	8	2	25,0	KB
09. 12. 2002	12	12	0	0	BHI
20. 01. 2003	12	12	1	8,3	KB
20. 05. 2003	15	15	0	0	KB

4.2 IDENTIFIKACIJA IZOLIRANIH BAKTERIJSKIH SEVOV

Izolirali smo 18 bakterijskih sevov. 15 sevov smo izolirali iz površine trdnega gojišča, ki je bilo v stiku z mladimi koreninicami, 1 iz zmletega zrna, 1 iz kontrolnega tekočega gojišča TSA in 1 sev iz površine trdnega gojišča, ki ni bilo v stiku s koreninicami.

Izolirani sevi so se razlikovali v morfologiji in pigmentaciji kultur. Večina kultur je bila rumeno pigmentiranih. Z barvanjem po Gramu smo izolirane seve razdelili v tri skupine: po Gramu pozitivne nepravilne paličaste bakterije, po Gramu pozitivne pravilne paličaste bakterije in po Gramu negativne paličaste bakterije. Sev TR-8, ki ni rasel ob korenini, je bil po Gramu pozitiven kok. Obravnavali smo ga kot kontaminacijo.

Ker je klasična biokemijska identifikacija predstavnikov po Gramu pozitivnih nepravilnih paličastih bakterij zahtevna, smo za identifikacijo uporabili molekularno metodo primerjave podobnosti nukleotidnih zaporedij gena 16S rDNA, ki smo ga pomnožili pri 15 bakterijskih sevih. Pomnoževanje gena je bilo v vseh primerih uspešno, vendar pri sevih TR-5, TR-7, W2231, W2232 in W22M1 nukleotidnega zaporedja nismo mogli določiti. Z uporabo oligonukleotidnih začetnikov 968fevb in 1401revb smo pri omenjenih sevih ponovno pomnožili le krajši odsek gena 16S rDNA in seve identificirali na osnovi delnega

nukleotidnega zaporedja. Podrobnosti identifikacije za vse seve so prikazane v prilogah B in C.

Identificirani sevi so bili med seboj večinoma različni in jih lahko glede na podobnosti v nukleotidnem zaporedju uvrstimo v rodove *Microbacterium*, *Frigoribacterium*, *Paenibacillus*, *Sphingomonas*, *Bacillus* in *Pantoea*.

Preglednica 4.4: Karakterizacija bakterijskih izolatov na osnovi barvanja po Gramu, morfologije in primerjave nukleotidnih zaporedij gena 16S rDNA

Izolati	Sorta koruze	Čas do opazne rasti (dnevi)	Mesto izolacije	Barvanje po Gramu	Morfologija	Molekularna identifikacija do rodu
TRL-2.2	»kmet«	16	Bakterijsko gojišče v stiku s korenino	+	Paličasta	<i>Microbacterium</i> sp.
TRL-2.5	»kmet«	16	Bakterijsko gojišče v stiku s korenino	+	Paličasta	ND ^a
TRL-3.1	»kmet«	16	Bakterijsko gojišče v stiku s korenino	+	Paličasta	<i>Frigoribacterium</i> sp.
TRL-3.2	»kmet«	16	Bakterijsko gojišče v stiku s korenino	+	Paličasta	ND ^b
TR-3	»kmet«	18	Bakterijsko gojišče v stiku s korenino	+	Paličasta	<i>Paenibacillus</i> sp.
TR-4	PIONEER BRAND PR38F70	6	Bakterijsko gojišče v stiku s korenino	-	Paličasta	<i>Sphingomonas</i> sp.
TR-5	W22	1	Bakterijsko gojišče v stiku s korenino	-	Paličasta	<i>Pantoea</i> sp.
TR-6	Pio	14	Bakterijsko gojišče v stiku s korenino	+	Paličasta	<i>Bacillus</i> sp.
TR-7	W22	2	Bakterijsko gojišče v stiku s korenino	-	Paličasta	<i>Pantoea</i> sp.
TR-8	PIONEER BRAND PR38F70	1	Bakterijsko gojišče, ki ni v stiku s korenino, odsotnost seva v maceratu	+	Kokoidna	ND ^c
TR-9	PIONEER BRAND PR38F70	6	Bakterijsko gojišče v stiku s korenino	+	Paličasta	<i>Bacillus</i> sp.
W22B1	W22	2	Bakterijsko gojišče v stiku s korenino	+	Paličasta	<i>Microbacterium</i> sp.
W22B21	W22	2	Bakterijsko gojišče v stiku s korenino	+	Paličasta	<i>Microbacterium</i> sp.
W22B22	W22	2	Bakterijsko gojišče v stiku s korenino	+	Paličasta	<i>Microbacterium</i> sp.
W22B31	W22	1	Bakterijsko gojišče v stiku s korenino	-	Paličasta	<i>Pantoea</i> sp.
W22B32	W22	1	Bakterijsko gojišče v stiku s korenino	-	Paličasta	<i>Pantoea</i> sp.
W22M1	W22	/	Zmleto zrno	-	Paličasta	<i>Pantoea</i> sp.
W22K1	W22	6	Kontrolna epruveta	+	Paličasta	<i>Microbacterium</i> sp.

ND – identiteta seva ni bila določena

^a – sev po shranjevanju ni več zrasel

^b – identifikacija do rodu ni bila mogoča

^c – identifikacije nismo opravljali

Seve, ki smo jih uvrstili v isti rod (takšna sta bila rodova *Microbacterium* in *Pantoea*), smo nadalje tipizirali s primerjavo podobnosti restriksijskih profilov. Vse seve iz rodu *Pantoea* (TR-5, TR-7, W2231, W2232, W22M1) smo uvrstili v isti tip, medtem ko smo med sevi iz rodu *Microbacterium* razlikovali dva različna tipa. Enega od njiju predstavljata seva TRL-2.2 in W22K1, drugega pa sevi W22B1, W22B21 in W22B22.

4.3 VPLIV BAKTERIJSKEGA SEVA TR-5 NA RAST IZVORNE RASTLINE

V tem sklopu raziskav smo testirali vpliv bakterijskega seva TR-5, ki smo ga identificirali kot *Pantoea* sp. na rast in razvoj izvorne rastline. Prisotnost bakterij je imela, odvisno od izbire testnih razmer pozitivne ali negativne učinke na izvorno rastlino.

4.3.1 Vpliv bakterijskega seva TR-5 na rast izvorne rastline v sterilnih laboratorijskih razmerah

Rast koruze po 14 dneh v sterilnih razmerah je prikazana na sliki 4.3. Ob dodatku bakterij seva TR-5 je bila rast rastlin slabša, kot če smo dodali le destilirano vodo – kontrolna rast (preglednica 4,5, slika 4.4). Sev TR-5 je zmanjšal biomaso poganjkov in zaviral njihovo rast v dolžino. Na rast korenin ni vplival negativno. Po 14 dneh smo sev TR-5 ponovno uspešno izolirali iz rizosfere, rizoplana in površine stebela.



Slika 4.3: Rast koruze v sterilnih laboratorijskih razmerah.

Rastline zalite s sterilno destilirano vodo (levo), rastline zalite s celično suspenzijo bakterijskega seva TR-5 (desno).

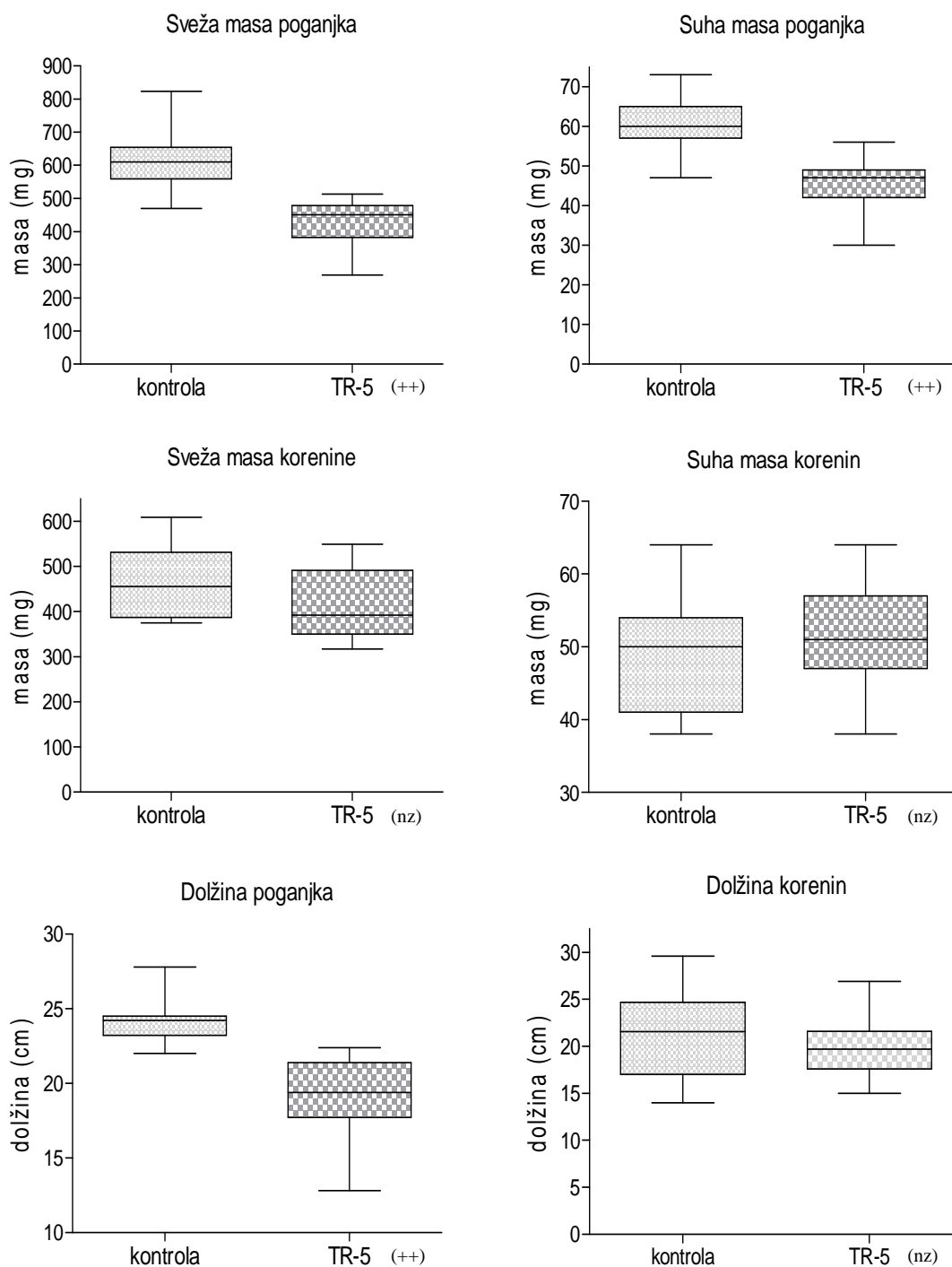
Preglednica 4.5: Vpliv bakterijskega seva TR-5 na rast koruze v sterilnih razmerah.

Rastline zalite s sterilno destilirano vodo (kontrola) in rastline zalite s celično suspenzijo seva TR-5 (TR-5). Vrednosti so prikazane kot srednje vrednosti \pm SD. Statistične razlike so bile preverjene s Studentovim t-testom. Število meritev v vzorcu je prikazano za vsak del posebej (n).

		Kontrola	TR-5
masa poganjka (mg)	sveža masa	616 \pm 86 n = 15	432 \pm 75 ** n = 15
	suha masa	60 \pm 6 n = 15	45 \pm 7 ** n = 15
masa korenin (mg)	sveža masa	468 \pm 75 n = 15	420 \pm 73 ^{NZ} n = 15
	suha masa	48 \pm 7 n = 15	52 \pm 8 ^{NZ} n = 15
dolžina poganjka (cm)		24,1 \pm 1,3 n = 15	18,9 \pm 2,9 ** n = 15
dolžina korenin (cm)		21,4 \pm 4,9 n = 14	19,6 \pm 3,0 ^{NZ} n = 15

Studentov t-test

- statistično značilna razlika; $P \leq 0,05$ (*); $P \leq 0,01$ (**)
- ^{NZ} - razlike niso bile statistično značilne



Mann-Whitney U-test

- statistično značilna razlika; $P \leq 0,05$ (+); $P \leq 0,01$ (++)
- (nz) - razlike niso bile statistično značilne

Slika 4.4: Vpliv bakterijskega seva TR-5 na rast koruze v sterilnih razmerah.

Rastline zalite s sterilno destilirano vodo (kontrola) in rastline zalite s celično suspenzijo seva TR-5 (TR-5). Statistične razlike so bile preverjene z Mann-Whitneyevim U-testom.

4.3.2 Vpliv bakterijskega seva TR-5 na rast izvorne rastline v nesterilnih laboratorijskih razmerah

Rast rastlin zalitih s celično suspenzijo bakterijskega seva TR-5 je bila po 30 dneh boljša kot pri rastlinah zalitih z destilirano vodo oziroma s celično suspenzijo bakterije *Escherichia coli* (slike 4.5, 4.6, 4.7 in 4.8). Rastline obdelane s sevom TR-5 so zrasle višje in imele daljše korenine ter manj odmrlega listnega tkiva kot kontrolne rastline (sliki 4.5, 4.6, preglednica 4.6) ali rastline zalite z bakterijo *Escherichia coli* (sliki 4.7, 4.8, preglednica 4.7). Natančnejše stanja listov (npr. porumenelost, obseg nekroz) nismo ovrednotili. Preživetje rastlin inokuliranih s sevom TR-5 je bilo v primerjavi s kontrolnimi rastlinami zalitimi z destilirano vodo enako (v obeh primerih je odmrla le 1 rastlina). Pri primerjavi rastlin inokuliranih s sevoma TR-5 in *Escherichia coli*, je odmrla 1 rastlina, obdelana s sevom TR-5 in 4 rastline obdelane s sevom *Escherichia coli*. Rastni substrat zalit s celično suspenzijo seva TR-5 se je sušil počasneje kot v ostalih dveh primerih.

Inokulirani sev TR-5 smo po 30 dneh ponovno uspešno izolirali iz rizosfere in rizoplana mladih rastlin. Iz rastnega substrata, v globini 1 cm pod površino, smo sev TR-5 ponovno uspeli izolirati le po 8 in 16 dneh, po 22 in 30 dneh pa smo bili pri izolaciji neuspešni. Po 30 dneh seva TR-5 nismo uspeli izolirati iz rastnega substrata na dnu rastne posode.

Med potekom poskusa smo pri rastlinah zalitih s celično suspenzijo seva TR-5 in seva bakterije *Escherichia coli* spremljali številčnost bakterij v rastnem substratu. V globini 1 cm pod površino je številčnost bakterij od začetka do konca poskusa stalno padala. Na dnu rastne posode je bila številčnost bakterij v rastnem substratu na koncu 30 dnevnega obdobja podobna kot v 22. dnevu 1 cm pod površino (slika 4.9).



Slika 4.5: Vpliv bakterijskega seva TR-5 na rast mladih rastlin koruze v nesterilnih razmerah I.
Rastline zalite z destilirano vodo (levo); rastline zalite s celično suspenzijo seva TR-5 (desno).

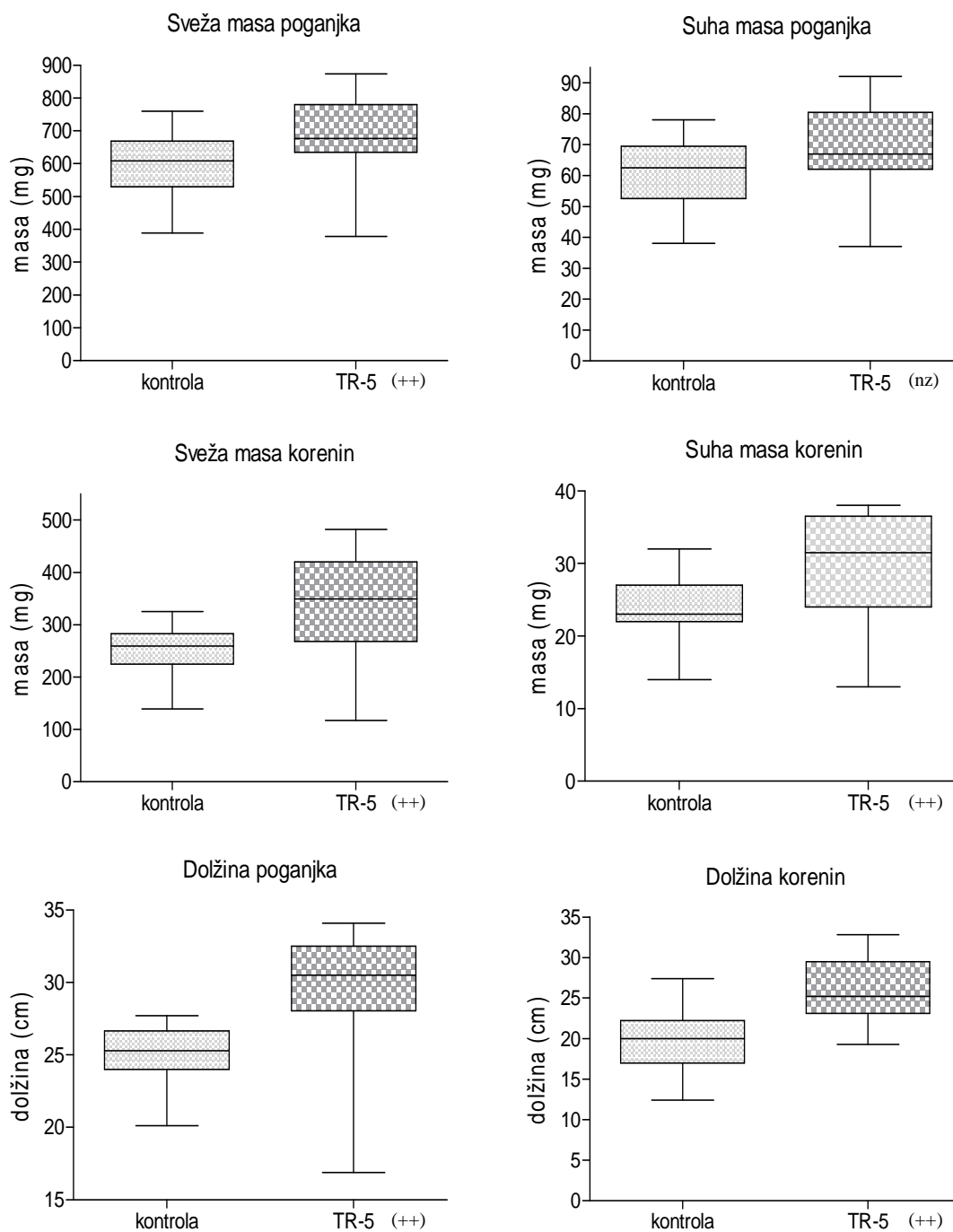
Preglednica 4.6: Vpliv bakterijskega seva TR-5 na rast koruze v nesterilnih razmerah I.

Rastline zalite s sterilno destilirano vodo (kontrola) in rastline zalite s celično suspenzijo seva TR-5 (TR-5). Vrednosti so prikazane kot srednje vrednosti \pm SD. Statistične razlike so bile preverjene s Studentovim t-testom. Število meritev v vzorcu je prikazano za vsak del posebej (n).

		Kontrola	TR-5
masa poganjka (g)	sveža masa	591 \pm 102 n = 14	688 \pm 125 ** n = 14
	suha masa	61 \pm 11 n = 14	69 \pm 13 ^{NZ} n = 14
masa korenine (g)	sveža masa	249 \pm 53 n = 14	335 \pm 99 ** n = 14
	suha masa	24 \pm 5 n = 14	30 \pm 7 ** n = 14
dolžina poganjka (cm)		25,0 \pm 2,0 n = 14	29,6 \pm 4,3 ** n = 14
dolžina korenin (cm)		19,9 \pm 3,9 n = 13	25,9 \pm 3,8 ** n = 14

Studentov t-test

- statistično značilna razlika; $P \leq 0,05$ (*); $P \leq 0,01$ (**)
- ^{NZ} - razlike niso bile statistično značilne



Mann-Whitney U-test

- statistično značilna razlika; $P \leq 0,05$ (+); $P \leq 0,01$ (++)
- (nz) - razlike niso bile statistično značilne

Slika 4.6: Vpliv bakterijskega seva TR-5 na rast koruze v nesterilnih razmerah I.

Rastline zalite s sterilno destilirano vodo (kontrola) in rastline zalite s celično suspenzijo seva TR-5 (TR-5). Statistične razlike so bile preverjene z Mann-Whitneyevim U-testom.



Slika 4.7: Vpliv bakterijskega seva TR-5 na rast koruze v nesterilnih razmerah II.

Rastline zalite s celično suspenzijo seva bakterije Escherichia coli (levo); rastline zalite s celično suspenzijo seva TR-5 (desno).

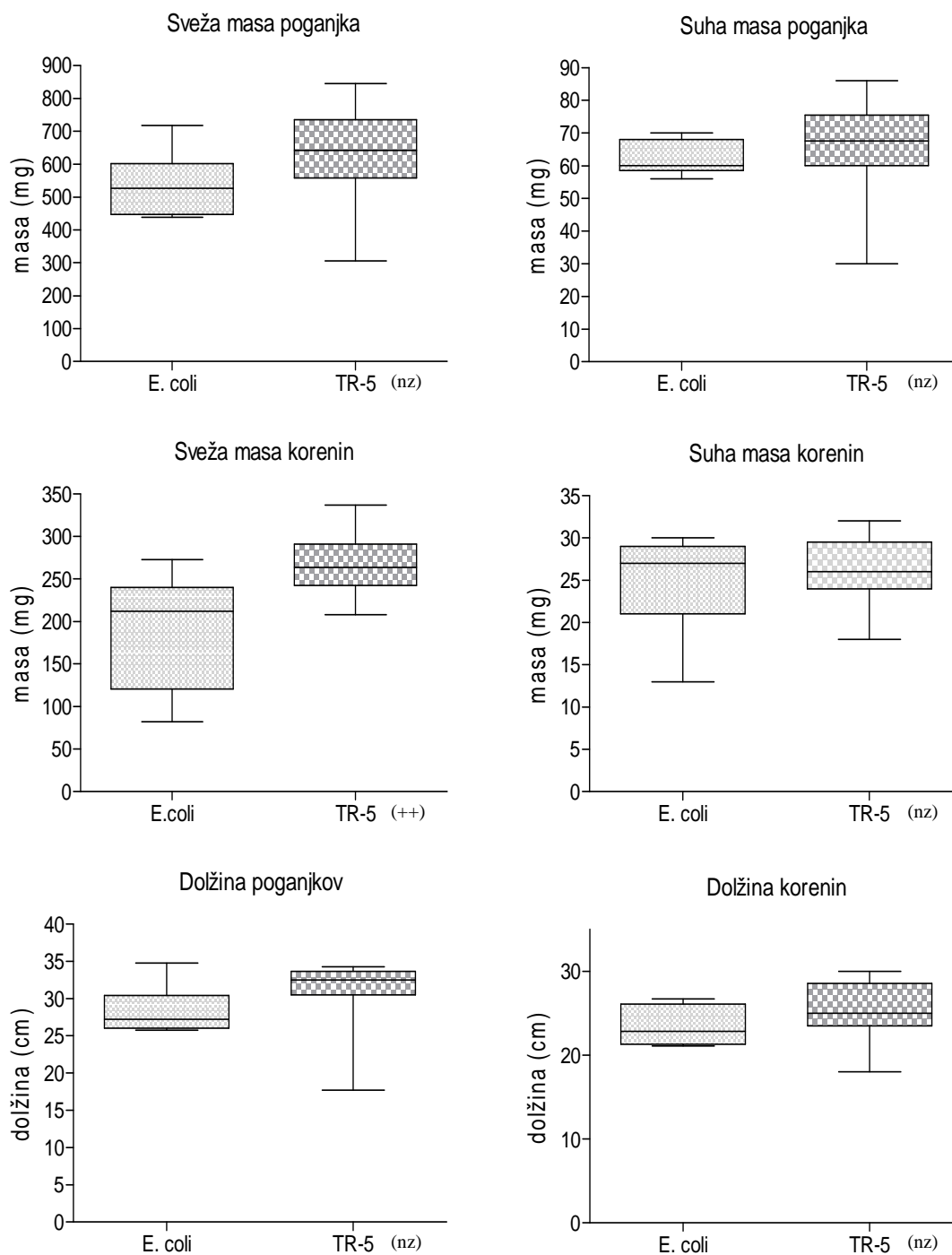
Preglednica 4.7: Vpliv bakterijskega seva TR-5 na rast koruze v nesterilnih razmerah II.

Rastline zalite s celično suspenzijo seva bakterije Escherichia coli (E.coli); rastline zalite s celično suspenzijo seva TR-5 (TR-5). Vrednosti so prikazane kot srednje vrednosti \pm SD oziroma kot (mediana). Statistične razlike so bile preverjene s Studentovim t-testom in Mann-Whitneyevim U-testom. Število meritev v vzorcu je prikazano za vsak del posebej (n).

		TR-5	E.coli
masa poganjka (g)	sveža masa	536 \pm 90 n = 10	629 \pm 157 ^{NZ} n = 12
	suha masa	62 \pm 5 n = 10	65 \pm 16 ^{NZ} n = 12
masa korenine (g)	sveža masa	192 \pm 64 n = 10	270 \pm 40 ^{**} n = 12
	suha masa	25 \pm 6 n = 10	26 \pm 4 ^{NZ} n = 12
dolžina poganjka (cm)		28,2 \pm 3,0 n = 10	30,8 \pm 4,9 ^{NZ} n = 12
dolžina korenin (cm)		23,6 \pm 2,2 n = 10	25,1 \pm 3,7 ^{NZ} n = 12

Studentov t-test

- statistično značilna razlika; $P \leq 0,05$ (*); $P \leq 0,01$ (**)
- ^{NZ} - razlike niso bile statistično značilne

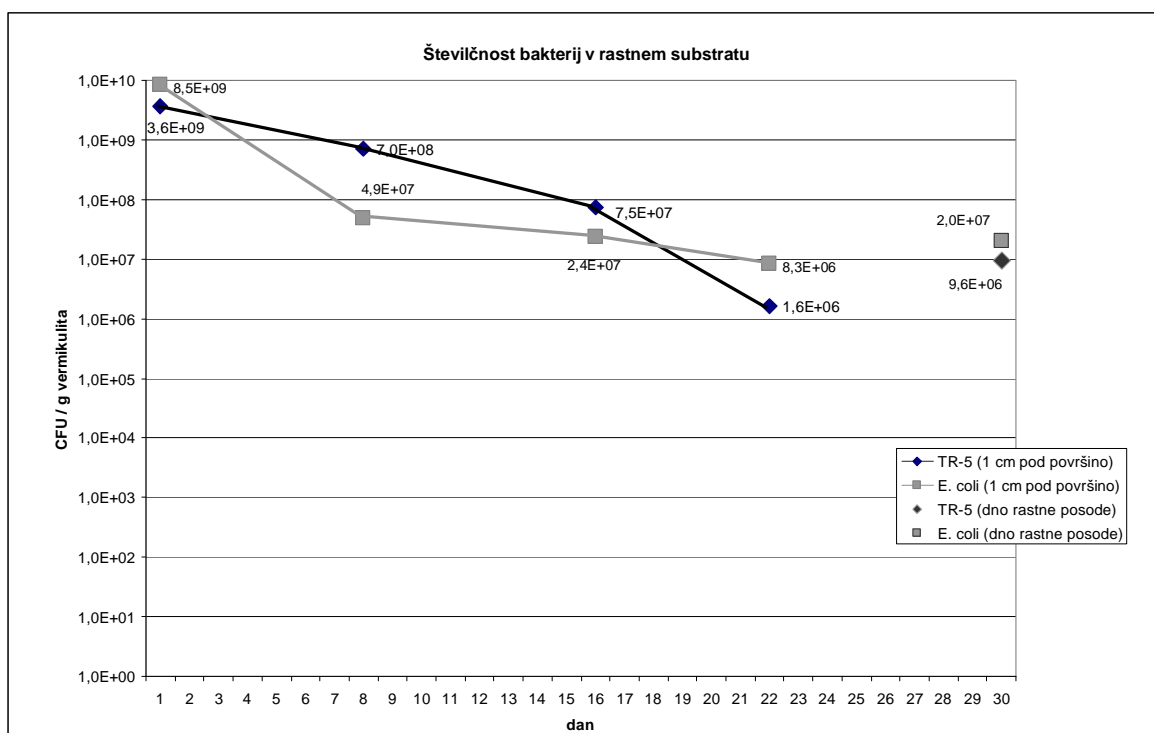


Mann-Whitney U-test

- statistično značilna razlika; $P \leq 0,05$ (+); $P \leq 0,01$ (++)
- (nz) - razlike niso bile statistično značilne

Slika 4.8: Vpliv bakterijskega seva TR-5 na rast koruze v nesterilnih razmerah II.

Rastline zalite rastline zalite s celično suspenzijo seva *Escherichia coli* (*E.coli*) in rastline zalite s celično suspenzijo seva TR-5 (TR-5). Statistične razlike so bile preverjene z Mann-Whitneyevim U-testom.



Slika 4.9: Številčnost bakterij v rastnem substratu v 30 dnevnem časovnem obdobju.

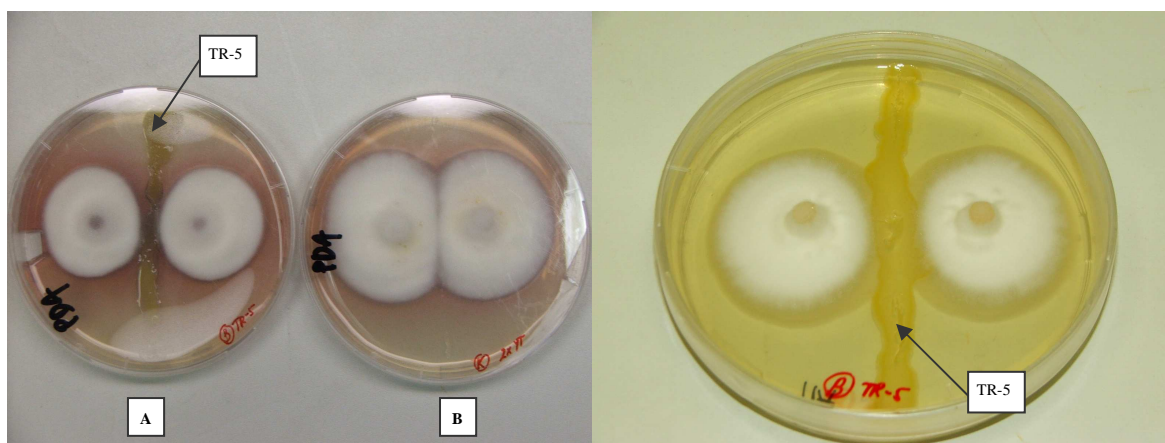
Od prvega do 22 dneva je prikazano spreminjanje številčnosti bakterij v rastnem substratu 1 cm pod površino, 30. dan, ob koncu poskusa, pa je prikazana številčnost bakterij na dnu rastne posode. Rastline zalite s celično suspenzijo seva TR-5 (TR-5), rastline obdelane s sevom *Escherichia coli* (*E. coli*).

4.3.3 Vpliv bakterijskega seva TR-5 na zmanjšano rast glive *Fusarium verticillioides*

V nadaljevanju smo preverjali vpliv bakterijskega seva TR-5 na zmanjšano rast glive *Fusarium verticillioides*. Glivo smo izolirali iz kaljenih zrn koruze sorte W22 in se je v zrnih pogosto pojavljala kot glivna kontaminanta.

4.3.3.1 Vpliv bakterijskega seva TR-5 na zmanjšano rast glive na hranilnih gojiščih

Rast glive je bila ob prisotnosti bakterijskega seva TR-5 na gojiščih HA, MEA in PDA v primerjavi s kontrolno rastjo slabša (preglednica 4.8). Na gojiščih PDA in MEA kontaktne inhibicije nismo opazili, na gojišču HA pa je bila ta po 13 dneh še vedno opazna (slika 4.10, desno).



Slika 4. 10 : Rast glive *Fusarium verticillioides* ob prisotnosti bakterijskega seva TR-5.

Rast glive na gojišču PDA po 10 dneh (levo); rast glive na gojišču HA po 13 dneh (desno); rast glive ob prisotnosti bakterije (levo, A), rast glive brez prisotnosti bakterije – kontrolna rast (levo, B). Nanos bakterij po sredini gojišča (TR-5) je označen s puščico.

Preglednica 4.8: Vpliv bakterijskega seva TR-5 na rast glive *Fusarium verticillioides* na različnih hranilnih gojiščih. Rezultati prikazujejo kolikšen % kontrolne rasti je predstavljala rast glive pod vplivom bakterije. Kontaktno inhibicijo smo preverili ko je glivni micelij prišel v stik z bakterijo.

čas (dnevi) \ gojišče	HA	MEA	PDA
1	100 %	100 %	100 %
2	100 %	100 %	100 %
3	97 %	86 %	78 %
6	55 %	50 %	51 %
8	84 %	78 %	81 %
9	87,55 %	77 %	85 %
10	84 %	73 %	87 %
direktna inhibicija	prisotna	ni prisotna	ni prisotna

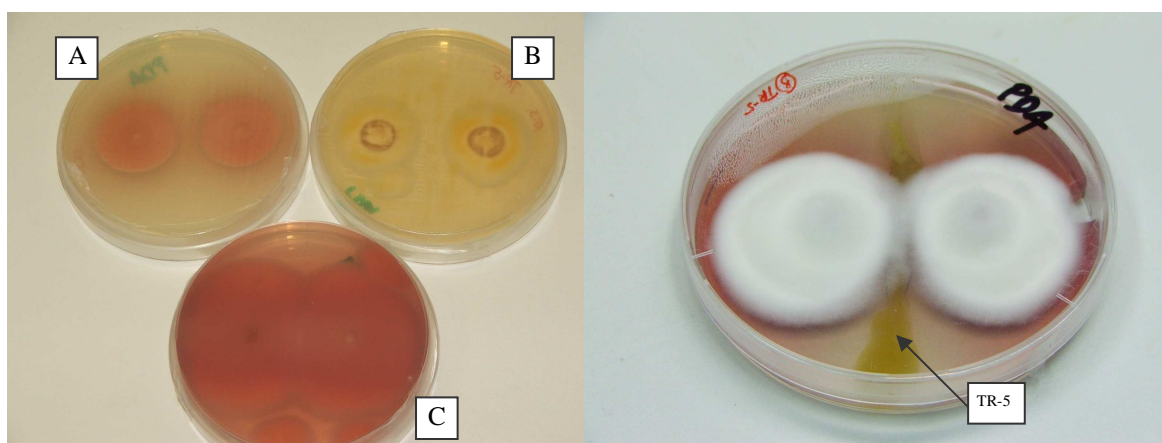
Gliva je najbolje rasla in sintetizirala pigment na gojišču PDA, ki smo ga zato uporabili pri nadaljnjih poskusih. Primerjava vplivov seva TR-5 in bakterije *Escherichia coli* na zmanjšano rast glive ni pokazala velikih razlik. V dveh primerih je bila rast glive zmanjšana ob prisotnosti seva TR-5, v enem primeru pa ob prisotnosti seva bakterije *E. coli* (preglednica 4. 9).

Razlike so bile opazne pri zaviranju tvorbe glivnega pigmenta. Ob konfluentni rasti bakterij na gojišču, pri sevu TR-5 glivnega pigmenta nismo opazili (slika 4.11, levo, B), pri bakteriji *E. coli*, pa je bil pigment vedno prisoten (slika 4.11, levo, A). V primeru, ko smo bakterijski sev TR-5 nanесли po sredini gojišča, je bila koncentracija pigmenta v bližini bakterij najmanjša in se je večala z oddaljenostjo (slika 4.11, desno).

Preglednica 4.9: Vpliv bakterijskega seva TR-5 in seva bakterije *E. coli* na rast patogene glive *Fusarium verticillioides* na gojišču PDA

Čas (dan)	Nanos bakterije po sredini		Konfluentni nanos			
	<i>E.coli</i>	TR-5	<i>E.coli</i>	TR-5	<i>E.coli</i>	TR-5
1	/	/	/	/	86 %	86 %
2	/	/	/	/	70 %	70 %
3	90 %	90 %	50 %	0 %	47 %	50 %
6	85 %	76 %	43 %	33 %	37,5 %	45 %
7	86 %	76 %	45 %	36 %	39 %	49 %
8	83 %	75 %	49 %	39 %	41 %	49 %
9	/	/	/	/	42 %	49 %
10	82 %	76 %	52 %	40 %	44 %	50 %
prisotnost glivnega pigmenta			+	-	+	-

/ - rasti nismo preverili

**Slika 4.11:** Zaviranje izločanja glivnega pigmenta.









Spodnja stran gojišča PDA s konfluentnim nanosom seva bakterije *E. coli* (levo, A) in seva TR-5 (levo, B); spodnja stran kontrolnega gojišča brez bakterije (levo, C); gojišče PDA z nanosom bakterijskega seva TR-5 (označeno s puščico) po sredini gojišča (desno).

4.3.3.2 Vpliv bakterijskega seva TR-5 na zmanjšano rast glive na površini kalečih zrn




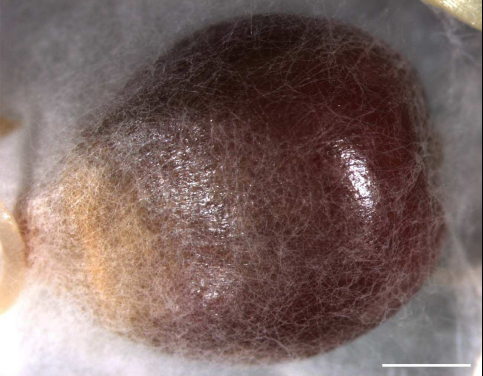
Rast glivnega micelija je bila na površini koruznih zrnih, kaljenih ob prisotnosti bakterijske celične suspenzije seva TR-5, slabša v primerjavi s kontrolnimi zrnji, kaljenimi v destilirani vodi (preglednici 4.10, 4.11). Delež zrn, ki so skalila, je bil v obeh primerih enak.

Preglednica 4.10: Vpliv bakterijskega seva TR-5 na rast patogene glive *Fusarium verticillioides* na površini kalečih zrn - makroskopski prikaz.

Zrna obdelana s sterilno destilirano vodo (kontrola); zrna obdelana s celično suspenzijo seva TR-5. Prikazana so zrna z najmanjšo (min) in največjo (max) rastjo glive 3., 6. in 10. dan po začetku kalitve.

Čas		kontrola	TR-5
3. dan	min		
	max		
6. dan	min		
	max		

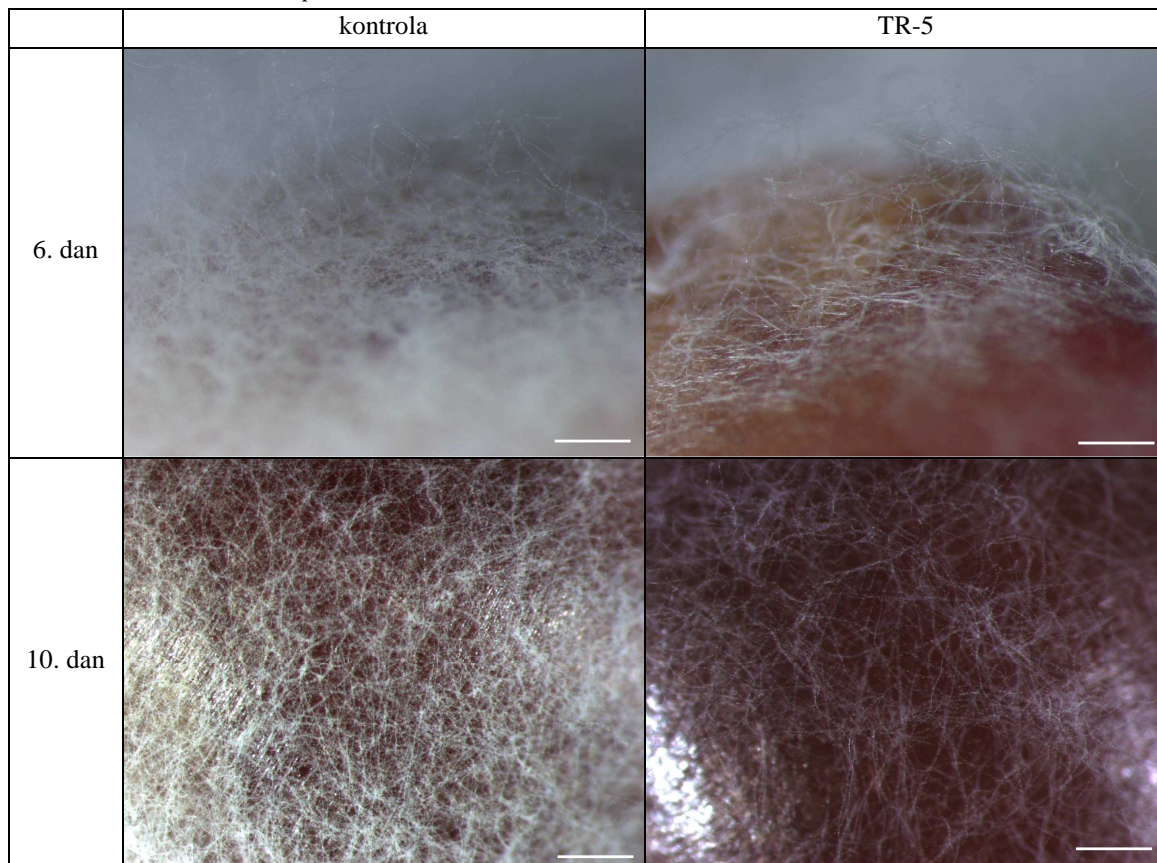
nadaljevanje...

Čas		kontrola	TR-5
10.dan	min		
	max		

Merilo: 2 mm

Preglednica 4.11: Vpliv bakterijskega seva TR-5 na rast patogene glive *Fusarium verticillioides* na površini kalečih zrn - glivni micelij pregledan s stereomikroskopom.

Zrna obdelana s sterilno destilirano vodo (kontrola); zrna obdelana s celično suspenzijo seva TR-5. Prikazana so zrna z najmanjšo (min) in največjo (max) rastjo glive 3., 6. in 10. dan po začetku kalitve.



Merilo: 0,5 mm

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Izolacija in identifikacija bakterijskih endofitov

Prisotnost bakterij v semenih rastlin odpira vprašanje o njihovi vlogi v gostiteljski rastlini. V semenih so lahko bakterije kot komenzali, ali pa s svojo prisotnostjo lahko pozitivno vplivajo na kalitev, rast in zaščito izvorne rastline. Za ugotavljanje vplivov endofitskih bakterij na rastlino je ključnega pomena, da bakterijski izolat lahko laboratorijsko gojimo. S tem lahko določimo lastnosti bakterije in raziskujemo njeno povezavo z rastlino, kar pa ima potencialno tudi uporabno vrednost.

Naše raziskave so potrdile do sedaj redko opisano prisotnost bakterijskih endofitov v zrnih koruze (Mundt in Hinkle, 1976; McInroy in Kloepper, 1995a; Zinnel in sod., 2002). Iz različnih koruznih sort smo izolirali bakterijske seve iz šestih rodov - *Microbacterium*, *Frigoribacterium*, *Paenibacillus*, *Sphingomonas*, *Bacillus* in *Pantoea*. Vsi ti rodovi so že bili opisani v povezavi z rastlinami, večina izmed njih kot endofiti (preglednica 2.1) ali predstavniki rizosferne flore koruze in različnih prerijskih vrst trav (Zinnel in sod., 2002). Iz tega sklepamo, da so izolirani bakterijski sevi, kljub njihovi veliki raznolikosti, najverjetneje bakterije, ki so specifične za koruzo in niso naključne bakterijske okužbe. Našo domnevo dodatno potrjuje sev TR-8, ki smo ga, za razliko od ostalih izolatov, še pred identifikacijo obravnavali kot okužbo pri delu. Mesto, kjer je rasel, se je razlikovalo od mesta rasti ostalih izoliranih bakterijskih sevov, barvanje po Gramu pa je pokazalo, da je edini po Gramu pozitivni kok.

Med vsemi izoliranimi sevi sta po številu izolacij izstopala rodova *Pantoea* in *Microbacterium*. Rod *Pantoea* se je pri sorti W22 pojavljal v zrnih, ki so bila nabrana v dveh zaporednih sezonah, kar kaže na to, da so se iste bakterije v koruznih zrnih naselile dvakrat ločeno. Nasprotno se je rod *Microbacterium* pojavljal ločeno v zrnih dveh različnih sort, neznane sorte (»kmet«) in sorte W22 (seva TRL-2.2 in W22K1). To dejstvo in rezultati nekaterih predhodnih raziskav (Zinnel in sod., 2002; Behrendt in sod., 2002; McInroy in Kloepper, 1995a) kažejo na morebitno specifično povezavo bakterijskega rodu *Microbacterium* s koruzo.

Sev TRL-2.5 shranjevanja pri -80°C ni preživel. Podobne rezultate so Bell in sod. (1995) opazili pri 16 bakterijskih sevih shranjenih pri -70°C . Razlogi za takšna opažanja niso znani. Možno je, da bakterije ne morejo preživeti brez prisotnosti rastline, ali pa preprosto ne preživijo zmrzovanja pri nizkih temperaturah.

Delež semen z bakterijami je bil pri različnih predhodnih raziskavah relativno nizek (pregled v poglavjih 2.1.4, 2.1.6), kar se ujema z našimi rezultati. Uspešnost izolacije bakterij iz zrn je bila pri različnih sortah koruze različna in je nihala med 9 in 20 % (v povprečju približno 15 %). Tudi časovno upadanje deleža bakterijsko okuženih semen, ki smo ga opazili v 1,5 letnem obdobju, se ujema s predhodnimi opažanji (Mundt in Hinkle, 1976). Vzrokov za majhne deleže bakterij, je lahko več. Možno je, da zaradi abiotskih dejavnikov in specifičnih rastnih zahtev, semena s starostjo počasi izgubijo vse bakterijske endofite. Wilson in Lindow (2000) domnevata, da bakterije v semenih ne odmrejo popolnoma, ampak le preidejo v dormantno stanje in jih zato v laboratorijskih razmerah ne moremo več gojiti. Dormantne oblike bakterij so pogoste pri mikroorganizmih v neugodnih razmerah (npr. pogoji stradanja in suše) in so bile velikokrat opisane tudi pri mikroorganizmih, ki so povezani z rastlinami (Wilson in Lindow, 2000).

Kalitev semena verjetno sprosti določene signale, ki dormantne bakterije ponovno spodbudijo k rasti. Takšen mehanizem spodbujanja poznamo pri razvoju rastlinskih patogenov (Nelson, 1990) in je možen tudi pri rastlinskih endofitih. Naša opažanja potrjujejo to domnevo, saj sta uspešna rast in razvoj gostiteljske rastline ključna za izolacijo večjega števila bakterij. V primeru slabe rasti in razvoja kalic na gojišču BHI, ki za rastlino ni primerno, bakterij nikoli nismo izolirali. V primeru dobre rastlinske rasti na gojišču KB, pa smo uspešno izolirali 15 bakterijskih izolatov. Bakterijski sevi so porasli na stiku mlade koreninice z bakterijskim gojiščem, kar je kazalo na prisotnost bakterij v notranjosti oziroma na površini mladih koreninic. Bakterijska rast se je pojavljala predvsem na mestih koreninskih laskov, kar kaže na gibanje bakterij iz notranjosti korenine v smeri proti zunanjemu viru hranil (bakterijsko gojišče).

Na viabilnost bakterij je vplivala tudi imbibicija koruznih zrn pred površinsko sterilizacijo. Znano je namreč, da rehidracija rastlinskega tkiva pomembno vpliva na uspešnost izolacije mikroorganizmov (Bacon in Hinton, 1996). Naša opažanja kažejo na večjo uspešnost izolacije bakterij iz imbibiranih zrn, kot tudi na večjo številčnost glivnih kontaminacij v teh primerih. Bakterije smo izolirali iz 20 % predhodno imbibiranih zrn sorte W22 (preglednica 4.2), delež bakterij v neimbibiranih zrnih pa je bil za polovico manjši (preglednica 4.1). Imbibirana zrna so bila z glivami kontaminirana v 63 %, neimbibirana zrna pa le v 25 %. Na splošno to pomeni boljše prekinitev dormance mikroorganizmov v predhodno imbibiranih koruznih zrnih. Večkrat smo tudi opazili, a ne natančno raziskali, da so glivne kontaminacije izključevale bakterijske, in obratno. Podobne povezave so bile že opisane (pregled v poglavju 2.2.1.1.1).

Nekateri bakterijski sevi pa očitno niso odvisni od rehidracije rastlinskega tkiva, kalitve rastlin in njenega uspešnega nadaljnega razvoja. Tak je sev W22M1 (rod *Pantoea*), ki smo ga izolirali iz zmletih, neimbibiranih nekaljenih zrn sorte W22. Podobno lahko sklepamo tudi za ostale seve rodu *Pantoea* (TR-5, TR-7, W22B31 in W22B32), saj smo njihovo rast opazili takoj po prenosu na bakterijsko trdno gojišče. V zrnih so te bakterije verjetno nastopale v večjem številu blizu semenskega ovoja, kjer so se ob kalitvi skozi razpoke lahko hitro sprostile navzven.

Enak mehanizem sprostitve iz zrn smo predvideli za sev W22K1 (rod *Microbacterium*), ki je porasel v kontrolnem tekočem gojišču TSA. Bakterijske kontaminacije zaradi nezadostne površinske sterilizacije so se vedno pokazale v 1-2 dneh, rast seva W22 pa smo opazili šele po 6 dneh, ko je bilo zrno že močno nabreklo. Čeprav vidnih razpok na površini zrna ni bilo, so manjše nevidne razpoke lahko bile prisotne. V primerih glivnih kontaminacij v kontrolnem tekočem gojišču TSA, se je glivna rast pojavila točno na mestu razpok v območju pedicela (slika 4.2). Rast se je vedno pojavila šele po nastanku razpok, ko je zrno v tekočem gojišču že nabreknilo. Na podlagi teh opažanj in časa, ki ga je bakterija porabila, da je v gojišču porasla, smo sklepali, da se je verjetno sprostila iz notranjosti zrna skozi nevidne razpoke, ki so nastale ob nabrekanju zrna. Endofitski značaj bakterij je v takih primerih pri semenih težko nedvoumno dokazati (Misaghi in Donndelinger, 1990).

Poleg imbibicije in kalitve je pomemben dejavnik, ki vpliva na uspešnost izolacije bakterij, genotip rastline. Uspešnosti izolacije so se med različnimi sortami zelo razlikovale. Iz sort PR39K24, ELITA in Mo17 bakterijskih endofitov nismo izolirali, iz sorte Pio smo izolirali en bakterijski sev, iz sorte PR38F70 dva, iz sort W22 in neznane sorte (»kmet«) pa smo izolirali pet sevov in več. Poleg genotipa je razlog za takšna opažanja deloma lahko tudi različno število pregledanih zrn pri posamezni sorti. Z genotipom in okoljem, v katerem so sorte koruze bile vzgojene, je v zrnih povezana raznolikost endofitskih bakterij. Slednja je bila v zrnih komercialno gojenih sort (W22, PR38F70 in Pio) manjša kot v neznani sorti koruze (»kmet«). Rastline neznane sorte so bile vzgojene na lokalni njivi, kjer so v prejšnjih sezonah rasle tudi druge kmetijske kulture, med cvetenjem je prihajalo do naključnih oprasitev, obremenjenost tal z umetnimi gnojili pa je bila verjetno manjša kot v primeru komercialnih sort. Podatki za sorto W22 so bili ravno nasprotni. Rastline koruze sorte W22 so rasle na eksperimentalni njivi, namenjeni samo za vzgojo te sorte, sorto so v preteklosti gojili na istem mestu, v enakih razmerah, samoopraševanje in naključne oprasitve so bile preprečene. Podobne povezave med bakterijami in razmerami, v katerih so rastline rasle, so že bile dokazane (Seghers in sod. 2004; poglavje 2.2.3).

Z našo raziskavo nismo ugotovili, kje v zrnju koruze bakterijski endofiti so, saj jih iz posameznih delov zrna neznane sorte (»kmet«) (embrio, endosperm, testa) nismo uspeli izolirati. Možnih mest je več in za določitev natančne lokacije bi morali uporabiti dodatne metode, na primer metodo *in situ* hibridizacije ali elektronsko mikroskopijo.

Predstavljeni rezultati naših raziskav podpirajo teorijo, da so semena lahko potencialni izvor bakterijskih endofitov. Zaradi omejitev metode izolacije in gojenja, bi molekularno biološke metode, med njimi izolacija celokupne bakterijske DNA iz površinsko steriliziranih koruznih zrn, lahko služile kot nadgradnja uporabljene metode. Na ta način bi v zrnju lahko določili vse prisotne bakterije, tako tiste, ki jih v laboratoriju lahko gojimo, kot tudi tiste, ki jih ne moremo gojiti. Dobili bi celostno sliko o bakterijskih endofitskih združbah. Ocenili bi lahko, kolikšen del bakterijske združbe smo zaznali z že uporabljeno metodo in kolikšen del je ostal nezazan. Na podlagi identifikacije tega dela, bi lahko pripravili ustrezne gojitvene razmere za specifične bakterijske skupine in tako pridobili večje število bakterijskih izolatov. Čeprav veliko raziskav za molekularne metode in metode gojenja dokazuje razlike v uspešnosti zaznavanja bakterij v rastlinskih tkivih (poglavje 4.1.2.4), pa je primerjava obeh metod, v poskusih na semenih smreke pokazala, da z obema metodama zaznamo iste bakterijske seve (Cankar in sod., 2005). To dejstvo je lahko značilno le v primeru semen smreke, zato bi primerjavo metod morali narediti tudi pri koruznih zrnju.

5.1.2 Vpliv bakterijskih endofitov na rast in razvoj izvorne rastline

Bakterijski sev TR-5, ki smo ga identificirali kot rod *Pantoea*, smo uporabili za preverjanje vpliva bakterijskih endofitov na rast in razvoj izvorne rastline. Za omenjeni sev smo se odločili zato, ker je rod *Pantoea* v preteklosti že bil predstavljen v povezavi z vplivom na rast trav ter zato, ker je bil sev izoliran dve sezoni zaporedoma iz dobro okarakterizirane sorte koruze. Vrsta *Pantoea agglomerans* naj bi rastlinam pomagala pri rasti v času pomanjkanja vode, saj v okolje izloča različne polisaharide, ki vežejo vodo in s tem stabilizirajo njena nihanja v ravnem substratu (Amellal in sod., 1998). Prav tako naj bi nekateri sevi proizvajali hitinolitične encime, s čimer naj bi rastline zaščitili pred rastlinskimi patogenimi glivami (Chernin in sod., 1995).

Za preverjanje vpliva bakterije na rast koruze smo pripravili dva tipa poskusov: vpliv na rast v sterilnih razmerah in vpliv na rast v nesterilnih razmerah. V prvem primeru smo kot edini biotski dejavnik, ki je vplival na rast rastlin, izpostavili bakterijski sev TR-5, v drugem primeru pa smo se z izvedbo poskusa želeli čimbolj približati razmeram, pri katerih rastline rastejo v naravi (izsuševanje ravnega substrata, periodične padavine, prisotnost ostalih mikroorganizmov v ravnem substratu, vlažnost zraka). Sterilne razmere

smo hkrati uporabili zato, da smo lahko ugotovili, kje se sev TR-5 na rastlini lahko pojavlja.

V sterilnih razmerah je bila prisotnost seva TR-5 povezana z zmanjšano biomaso rastlin in rastjo poganjkov, na enake lastnosti korenin pa nismo zaznali negativnega vpliva. Pri teh rezultatih moramo upoštevati, da so bile abiotske razmere poskusa daleč od realnih razmer v naravi in da se v takih primerih lahko pokaže negativen vpliv bakterijskih endofitov (poglavje 2.2.2.3). V steklenih kozarcih, v katerih smo gojili rastline, sta bili, zaradi zaprtosti sistema, zelo visoki zračna vlaga in temperatura. V rastnem substratu je bil od mikroorganizmov prisoten le en bakterijski sev, sev TR-5, in ne raznolika mikrobnna združba, ki jo sicer najdemo v tleh. V takih razmerah se rastlina lahko odzove z zmanjšano rastjo in produkcijo.

V nesterilnih razmerah, bolj podobnih naravnim (nesterilnost okolja in zračna vlaga) so bili rezultati precej drugačni. Rastline zalite s sevom TR-5 so imele daljše zelene poganjke in korenine ter večjo biomaso obeh delov, kot rastline, ki so bile zalite samo z destilirano vodo. Nasprotno se rast rastlin v dolžino in biomasa tkiv zalitih s sevom TR-5 nista statistično razlikovali od rasti in biomase rastlin inokuliranih s sevom bakterije *Escherichia coli*. Edino razliko je predstavljala sveža masa korenin, ki je bila večja pri rastlinah inokuliranih s sevom TR-5. Po eni strani to odstopanje lahko razložimo kot napako pri delu, po drugi strani pa zaradi boljšega stanja, v katerem so bile rastline, zalite s sevom TR-5 (slika 4.7), lahko sklepamo, da so korenine teh rastlin v resnici imele večjo vsebnost vode.

Mehanizma, s katerim bi sev TR-5 vplival na boljšo rast rastlin, ne poznamo. Ker je kvantitativno na rast vplival podobno kot bakterija *Escherichia coli*, ki z rastlinami ni povezana, in ker je njegova številčnost v rastnem substratu s časom upadala (slika 4.9), lahko sklepamo, da so rastline rasle bolje zaradi sproščanja hranil iz odmrlih bakterijskih celic in ne zaradi posebnega mehanizma, s katerim bi sev TR-5 rast spodbujal. Vsekakor pa je bil poseben njegov vpliv na videz rastlin. Rastline so imele manj odmrlega listnega tkiva in večji delež preživetja, kot rastline obdelane s sevom bakterije *Escherichia coli*.

V naših raziskavah smo pokazali tudi kje na rastlini bakterijski sev TR-5 po kalitvi zrn lahko preživi. Njegovo prisotnost smo zaznali v rizosferi in rizoplanu ter na površini stebela, v rastnem substratu na splošno, pa je njegova številčnost s časom upadla pod zaznavno. Ti rezultati dodatno dokazujejo, da je sev TR-5 tesno povezan z rastlinami koruze in da v večjem številu preživi le v rizosferi, rizoplanu ali na površini nadzemnega poganjka. Verjetno je prisoten tudi v rastlini.

5.1.3 Zaviranje rasti fitopatogene glive *Fusarium verticillioides*

Gliva *Fusarium verticillioides* je tako kot veliko vrst rodu *Fusarium* rastlinski patogen in je že bila opisana v povezavi s koruznimi zrnji in njihovim gnitjem ob okužbi (Yates in sod., 2003). Iz zrn koruze sorte W22 smo ga izolirali tudi mi. Gliva je pomembna predvsem iz ekonomskega in zdravstvenega vidika, saj proizvaja fumonizine, zelo strupene mikotoksine, zaradi katerih predvsem v Afriki, pa tudi drugod po svetu, prihaja do zastrupitev s hrano (Fandohan in sod., 2003). Biološka regulacija tega rastlinskega patogena je zato izrednega pomena. V ta namen smo preizkusili, kako bakterijski sev TR-5 iz rodu *Pantoea* vpliva na rast te fitopatogene glive.

V splošnem je sev TR-5 zaviral rast glive *Fusarium verticillioides* na hranilnih gojiščih in na površini kalečih koruznih zrn. Primerjava rasti glive ob prisotnosti seva TR-5 s kontrolno rastjo brez prisotnosti bakterije je pokazala, da je rast glive pod vplivom seva TR-5 počasnejša, glivni micelij pa je pri tem redkejši. Na različnih gojiščih je bila rast glive različno zavirana, predvsem zaradi različne vsebnosti hranil. Na gojiščih MEA in PDA, ki so hranilno bogatejša in splošno uporabljana za gojenje gliv, je gliva po 10 oziroma 13 dneh bakterijsko kulturo na površini gojišča kljub vsemu prerasla. Kontaktne inhibicije v teh primerih nismo opazili. Nasprotno je na hranilno revnejšem bakterijskem gojišču HA do kontaktne inhibicije prišlo (slika 4.10, desno), kar kaže na to, da bakterija rast glive v ustreznih razmerah lahko popolnoma zavre.

Tudi pri tem delu smo lastnosti seva TR-5 primerjali z lastnostmi seva bakterije *Escherichia coli*, za katero zaščita rastlin pred rastlinskimi patogenimi mikroorganizmi ni poznana. Tako kot sev TR-5, je tudi sev bakterije *Escherichia coli* zaviral rast glive *Fusarium verticillioides* in je v enem primeru deloval celo bolje kot sev TR-5 (preglednica 4.9), nikoli pa ni zavrl nastajanja glivnega pigmenta na gojišču PDA. Omenjeni rezultati kažejo na to, da sev TR-5 z glivo *Fusarium verticillioides* verjetno tekmuje za hranila v okolju in tako posredno zavira njeno rast, hkrati pa neposredno vpliva na izločanje nekaterih glivnih metabolitov. V bodoče bo zato potrebno preveriti ali sev TR-5 lahko zavira izločanje večjega števila metabolitov in kateri ti metaboliti so.

Naše raziskave potrjujejo, da bakterijski sev TR-5 zavira rast glive *Fusarium verticillioides*, hkrati pa vpliva na izločanje nekaterih glivnih metabolitov. Ker je gliva za rastline patogena, lahko sev TR-5 na ta način posredno vpliva na rast izvorne rastline. Rastline imajo morda zato večji delež preživetja (poglavje 4.3.2.2) in manj odmrlega listnega tkiva (slika 4.7).

V prihodnje bodo na tem področju potrebne obsežnejše in natančnejše raziskave. Pregledati bo potrebno vpliv na rast večjega števila rastlin koruze, testne razmere pa še bolj približati tistim v naravi. Določiti bo potrebno tudi vpliv na količino pridelka. Podobno kot pri sevu TR-5, bo potrebno preveriti lastnosti ostalih izoliranih bakterijskih sevov, saj so lastnosti večine rodov, ki jim pripadajo, zaenkrat še nepoznane.

5.2 SKLEPI

- Bakterijski endofiti kolonizirajo zrna koruze.
- Bakterije lahko izoliramo iz kaljenih koruznih zrn, iz nepravilno razvitih in odmrlih kalic pa ne. Pri nekaterih sortah bakterij iz nekaljenih zrn ne moremo izolirati, pri drugih pa je to mogoče.
- Na uspešnost izolacije poleg kalitve vplivata imbibicija in genotip rastline. Na vrstno raznolikost bakterij vplivata genotip in okolje, v katerem je rastlina rasla.
- Izolirani bakterijski sevi spadajo v rodove: *Microbacterium*, *Frigoribacterium*, *Paenibacillus*, *Sphingomonas*, *Bacillus* in *Pantoea*. Pestrost bakterijskih rodov kaže na izredno raznolikost bakterijske endofitske združbe v zrnih koruze.
- Delež kaljenih zrn koruze, pri katerih je prišlo do bakterijske rasti je med 10 in 20% in je v povprečju relativno majhen (pribl. 15%).
- Delež zrn z bakterijskimi endofiti, ki jih lahko gojimo, s starostjo rastlinskega materiala upada.
- Bakterijski sev TR-5 iz rodu *Pantoea* je sposoben kolonizirati rizosfero, rizoplan in površino stebela. Na rast rastlin deluje pozitivno ali negativno, odvisno od razmer v okolju.
- Sev TR-5 zavira rast koruzi patogene glive *Fusarium verticillioides* in izločanje metabolitov, kot je glivni pigment na gojišču PDA.

6 POVZETEK

Z našimi poskusi smo želeli dokazati prisotnost bakterijskih endofitov v površinsko steriliziranih zrnih koruze. Preskusili smo metodo izolacije in gojenja bakterij iz nekaljenih in kaljenih zrn različnih sort koruze. Bakterije smo z različno stopnjo uspešnosti izolirali v obeh primerih.

Pregledali smo 184 zrn sedmih sort koruze. Endofitske bakterije smo izolirali pri štirih sortah. Iz kaljenih zrn smo izolirali 13 bakterijskih sevov, iz nekaljenih zrn pa le 1 bakterijski sev. Delež kaljenih zrn, iz katerih smo bakterije lahko izolirali, je bil od 11 do 20% (v povprečju približno 15%) in večji v primerih, ko smo zrna pred površinsko sterilizacijo imbibirali (20% pri imbibiranih zrnih in 9,7% pri neimbibiranih zrnih sorte W22). Hkrati smo pokazali, da uspešnost izolacije bakterij iz shranjenih zrn s starostjo zrn upada. Pri izolaciji smo bili najbolj uspešni pri svežih zrnih in najmanj uspešni pri najdlje shranjenih zrnih.

Poleg kalitve in imbibicije na bakterijske endofite vplivajo tudi drugi dejavniki. Takšna sta genotip rastline in okolje, v katerem so bile rastline vzgojene. Številčnost in raznolikost bakterijskih endofitov se v zrnih koruze med različnimi sortami zelo razlikuje.

Izolirane bakterije smo identificirali z molekularno biološkimi tehnikami, mikroskopsko pa smo določili barvanje po Gramu in celično morfologijo. Izolirani bakterijski rodovi pripadajo 6 rodovom, *Microbacterium*, *Frigoribacterium*, *Paenibacillus*, *Sphingomonas*, *Bacillus* in *Pantoea*, ki so vsi že bili opisani kot bakterijski endofiti ali rizobakterije.

Bakterijski sev TR-5, *Pantoea* sp., vpliva na rast izvorne rastline negativno ali pozitivno, odvisno od razmer v okolju. Hkrati zavira rast koruzi patogene glive *Fusarium verticillioides* in izločanje nekaterih njenih metabolitov. Zaviranje rasti patogene glive je lahko posredni mehanizem, s katerim endofitska bakterija pozitivno vpliva na rast in razvoj izvorne rastline.

7 VIRI

7.1 CITIRANI VIRI

- Adams P. D., Kloepper J. W. 1996. Seed-borne bacterial endophytes in different cotton cultivars. *Phytopathology*, 86, 11, November Supplement S97
- Amellal N., Burtin G., Bartoli F., Heulin T. 1998. Colonization of wheat roots by an exopolysaccharide producing *Pantoea agglomerans* strain and its effect on rhizosphere soil aggregation. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 10: 3740-3747
- Araujo W. L., Maccheroni W., Aguilar-Vildoso C. I., Barroso P. A. V., Saridakis H. O., Azevedo J. L. 2001. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Canadian Journal of Microbiology*, 47: 229-236
- Araujo W. L., Marcon J., Maccheroni W., van Elsas J. D., van Vuurde J. W. L., Azevedo J. L. 2002. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 10: 4906-4914
- Ashbolt N. J., Inkerman P. A. 1990. Acetic acid bacterial biota of the pink sugar cane mealy bug *Saccharococcus*, and its environs. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 3: 707-712
- Assmus B., Hutzler P., Kirchof G., Amann R., Lawrence J. R., Hartmann A. 1995. In situ localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3: 1013-1019
- Azevedo J. L., Maccheroni W., Pereira J. O., Araujo W. L. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 3, 1: 40-65
- Bacilio-Jimenez M., Aguilar-Flores S., del Valle M. V., Perez A., Zepeda A., Zenteno E. 2001. Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense*. *Soil Biology & Biochemistry*, 33: 167-172
- Bacon, C. W., Hinton D. M. 1996. Isolation and culture of endophytic bacteria and fungi. V: Manual of Environmental Microbiology. 1st edition. Hurst C. J., Knudsen G. R., McInerney M. J., Stetzenbach L. D., Walter M. V. (ur). Washington D. C., ASM Press: 413 – 421
- Balandreau J., Viallard V., Cournoyer B., Coenye T., Laevens S., Vandamme P. 2001. *Burkholderia cepacia* genovar III is a common plant-associated bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2: 982-985

- Barac T., Taghavi S., Borremans B., Provoost A., Oeyen L., Colpaert J. V., Vangronsveld J., van der Lelie D. 2004. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nature Biotechnology*, 22, 5: 583-588
- Barraquio W. L., Revilla L, Ladha J. K. 1997. Isolation of endophytic bacteria from wetland rice. *Plant and Soil*, 194: 15-24
- Behrendt U., Ulrich A., Schumann P., Erler W., Burghardt J., Seyfarth W. 1999. A taxonomic study of bacteria isolated from grasses: a proposed new species *Pseudomonas graminis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49: 297-308
- Behrendt U., Ulrich A., Schumann P. 2001. Description of *Microbacterium foliorum* sp. nov. and *Microbacterium phyllosphaerae* sp. nov., isolated from the phyllosphere of grasses and the surface litter after mulching the sward, and reclassification of *Aureobacterium resistens* (Funke *et al.* 1998) as *Microbacterium resistensi* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 1267-1276
- Behrendt U., Ulrich A., Schumann P., Naumann D., Suzuki K. 2002. Diversity of grass-associated *Microbacteriaceae* isolated from the phyllosphere and litter layer after mulching the sward; polyphasic characterisation of *Subtercola pratensis* sp. nov., *Curtobacterium herbarum* sp. nov. and *Plantibacter flavus* gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52: 1441-1454
- Bell C. R., Dickie G. A., Harvey W. L. G., Chan J. W. Y. F. 1995. Endophytic bacteria in grapevine. *Canadian Journal of Microbiology*, 41: 46-53
- Benhamou N., Belanger R. R., Paulitz T. C. 1996a. Pre-inoculation of Ri T-DNA-transformed pea roots with *Pseudomonas fluorescens* inhibits colonization by *Pythium ultimum* Trow: an ultrastructural study. *Planta*, 199: 105-117
- Benhamou N., Kloepper J. W., Quadt-Hallman A., Tuzun S. 1996b. Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. *Plant Physiology*, 112: 919-929
- Benhamou N., Gagne S., Le Quere D., Dehbi L. 2000. Bacterial-mediated induced resistance in cucumber: beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia plymuthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. *Phytopathology*, 90, 1: 45-56
- Bent E., Chanway C. P. 1998. The growth-promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 9: 4650-4652
- Bianciotto V., Bandi C., Minerdi D., Sironi M., Tichy V. H., Bonfante P. 1996. An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 8: 3005-3010

- Boddey R. M., Urquiaga S., Reis V., Döbereiner J. 1991. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. *Plant and Soil*, 137: 111-117
- Bodey R. M., de Oliveira O. C., Urquiaga S., Reis V. M., de Olivares F. L., Baldani V. L. D., Döbereiner J. 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. *Plant and Soil*, 174: 195-209
- Bressan W., Borges M. T. 2004. Delivery methods for introducing endophytic bacteria into maize. *BioControl*, 49: 315-322
- Calvacante V. A., Döbereiner J. 1988. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*, 108: 23-31
- Cameron H. R. 1970. Pseudomonas content of cherry trees. *Phytopathology*, 60: 1343-1346
- Cankar, K. 2001. Ugotavljanje prisotnosti bakterij v semenih smreke (*Picea abies*). Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, 70 str.
- Cankar K., Kreiger H., Ravnikar M., Rupnik M. 2005. Bacterial endophytes from seeds of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst). *FEMS Microbiology Letters*, 244: 341-345
- Cavaglieri L. R., Passone A., Etcheverry M. G. 2004. Correlation between screening procedures to select root endophytes for biological control of *Fusarium verticillioides* in *Zea mays* L. *Biological control*, 31: 259-267
- Chaintreuil C., Giraud E., Prin Y., Lorquin J., Ba A., Gillis M., de Lajudie P., Dreyfus B. 2000. Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the african wild rice *Oryza breviligulata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 12: 5437-5447
- Chanway C. P. 1996. Endophytes: They're not just fungi!. *Canadian Journal of Microbiology*, 74: 321-322
- Chanway C. P. 1997. Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: an emerging technology for reforestation. *Forest Science*, 43, 1: 99-112
- Chanway C. P. 1998. Bacterial endophytes: acological and practical implications. *Sydowia*, 50, 2: 149-170
- Chanway C. P., Shishido M., Nairin J., Jungwirth S., Markham J., Xiao G., Holl F. B. 2000. Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. *Forest Ecology and Management*, 133: 81-88

- Chelius M. K., Triplett E. W. 2000a. Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2: 783-787
- Chelius M. K., Triplett E. W. 2000b. *Dyadobacter fermentans* gen. nov., sp. nov., a novel Gram-negative bacterium isolated from surface-sterilized *Zea mays* stems. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 751-758
- Chelius M. K., Triplett E. W. 2001. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. *Microbial Ecology*, 41: 252-263
- Chen C., Bauske E. M., Musson G., Rodriguezkabana R., Kloepper J. W. 1995. Biological control of Fusarium wilt on cotton by use of endophytic bacteria. *Biological Control*, 5, 1: 83-91
- Chernin L., Ismailov Z., Haran S., Chet I. 1995. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 5: 1720-1726
- Conn V. M., Franco C. M. M. 2004a. Analysis of the endophytic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) by terminal restriction fragment length polymorphism and sequencing of 16S rRNA clones. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3: 1787-1794
- Conn V. M., Franco C. M. M. 2004b. Effect of microbial inoculants on the indigenous actinobacterial endophyte population in the roots of wheat as determined by terminal restriction fragment length polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 11: 6407-6413
- Coombs J. T., Franco C. M. M. 2003. Visualization of an endophytic *Streptomyces* species in wheat seed. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 7: 4260-4262
- Coombs J. T., Michelsen P. P., Franco C. M. M. 2004. Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. *Biological Control*, 29, 3: 359-366
- De Boer S. H., Copeman R. J. 1974. Endophytic bacterial flora in *Solanum tuberosum* and its significance in bacterial ring rot diagnosis. *Canadian Journal of Plant Science*, 54: 115-122
- Dong Z., Canny M. J., McCully M. E., Roboredo M. R., Cabadilla C. F., Ortega E., Rodes R. 1994. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. *Plant Physiology*, 105: 1139-1147

- Dong Z., Heydrich M., Bernard K., McCully M. E. 1995. Further evidence that the N₂-fixing endophytic bacterium from the intercellular spaces of sugarcane stems is *Acetobacter diazotrophicus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 5: 1843-1846
- Duijff B. J., Gianinazzi-Pearson V., Lemanceau P. 1997. Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. *New Phytologist*, 135: 325-334
- Elad Y., Baker R. 1985. The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamydospore germination of *Fusarium* spp. by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 75, 9: 1035-1059
- Elad Y., Chet I. 1987. Possible role for competition for nutrients in biocontrol of Pythium damping-off by bacteria. *Phytopathology*, 77, 2: 190-195
- Elbeltagy A., Nishioka K., Sato T., Suzuki H., Ye B., Hamada T., Isawa T., Mitsui H., Minamisawa K. 2001. Endophytic colonization and in-planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 11: 5285-5293
- Elvira-Recuenco M., van Vuurde J. W. L. 2000. Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 46: 1036-1041
- Fandohan P., Hell K., Marasas W. F. O., Wingfield M. J. 2003. Infection of maize by *Fusarium* species and contamination with fumonisin in Africa. *African Journal of Biotechnology*, 2, 12: 570-579
- Fischer P. J., Petrini O., Lappin Scott H. M. 1992. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). *New Phytologist*, 122: 299-305
- Frändenberg E., Schnürer J. 1998. Antifungal activity of chitinolytic bacteria from airtight stored cereal grain. *Canadian Journal of Microbiology*, 44, 2: 121-127
- Fuentes-Ramirez L. E., Jimenez-Salgado T., Abarca-Ocampo I. R., Caballero-Mellado J. 1993. *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars in Mexico. *Plant and Soil*, 154: 145-150
- Gagne S., Richard C., Rousseau H., Antoun H. 1987. Xylem-residing bacteria in alfalfa root. *Canadian Journal of Microbiology*, 33: 996-1000
- Gantar M., Kerby N. W., Rowell P. 1991. Colonization of wheat (*Triticum vulgare* L.) by N₂-fixing cyanobacteria: II. An ultrastructural study. *New Phytologist*, 118: 485-492

- Garbeva P., Overbeek L. S., van Vuurde J. W., Elsas J. D. 2001. Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments. *Microbial Ecology*, 41, 4: 369-383
- Gardner J. M., Feldman A. W., Zablutowicz R. M. 1982. Identity and behavior of xylem residing bacteria in rough lemon roots of Florida. *Applied and Environmental Microbiology*, 43, 6: 1335-1342
- Germida J. J., Siciliano S. D., de Freitas J. R., Seib A. M. 1998. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiology Ecology*, 26: 43-50
- Gilbert G. S., Parke J. L., Clayton M. K., Handelsman J. 1993. Effects of an introduced bacterium on bacterial communities on roots. *Ecology*, 74, 3: 840-854
- Gillis M., Kersters K., Hoste B., Janssens D., Kroppenstedt R. M., Stephan M. P., Teixeira K. R. S., Döbereiner J., de Ley J. 1989. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39, 3: 361-364
- Gough C., Galera C., Vasse J., Webster G., Cocking E. C. 1997. Specific flavonoids promote intercellular root colonization of *Arabidopsis thaliana* by *Azorhizobium caulinodans* ORS571. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 10, 5: 560-570
- Graner G., Persson P., Meijer J., Alström S. 2003. A study on microbial diversity in different cultivars of *Brassica napus* in relation to its wilt pathogen, *Verticillium longisporum*. *FEMS Microbiology Letters*, 224: 269-276
- Gyaneshwar P., James E. K., Mathan N., Reddy P. M., Reinhold-Hurek B., Ladha J. K. 2001. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *Journal of bacteriology*, 183, 8: 2634-2645
- Hallman J., Quadt-Hallman A., Mahaffee W. F., Kloepper J. W. 1997a. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43: 895-914
- Hallman J., Kloepper J. W., Rodriguez-Kabana R. 1997b. Application of the Scholander pressure bomb to studies on endophytic bacteria of plants. *Canadian Journal of Microbiology*, 43: 411-416
- Hallman J., Quadt-Hallman A., Rodriguez-Kabana R., Kloepper J. W. 1998. Interactions between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. *Soil Biology & Biochemistry*, 30, 7: 925-937
- Hinton D., Bacon C. W. 1995. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. *Mycopathologia*, 129: 117-125
- Hollis J. P. 1995. Bacteria in healthy potato tissue. *Phytopathology*, 41: 350-366

- Howell C. R., Beier R. C., Stipanovic R. D. 1988. Production of ammonia by *Enterobacter cloacae* and its possible role in the biological control of *Pythium* preemergence damping-off by the bacterium. *Phytopathology*, 78, 8: 1075-1078
- Hurek T., Burggraf S., Woese C. R., Reinhold-Hurek B. 1993. 16S rRNA-targeted polymerase chain reaction and oligonucleotide hybridization to screen for *Azoarcus* spp., grass-associated diazotrophs. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 11: 3816-3824
- Hurek T., Reinhold-Hurek B., van Montagu M., Kellenberger E. 1994. Root colonization and systemic spread of *Azoarcus* sp strain BH72 in grasses. *Journal of Bacteriology*, 176, 7: 1913-1923
- Idris R., Trifonova R., Puschenreiter M., Wenzel W. W., Sessitsch A. 2004. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyper accumulator *Thlaspi goesingense*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5: 2667-2677
- James E. K., Olivares F. L. 1998. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 17, 1: 77-119
- Jimenez-Salgado T., Fuentes-Ramirez L. E., Tapia-Hernandez A., Mascarua-Esparza M. A., Martinez-Romero E., Caballero-Mellado J. 1997. *Coffea arabica* -l., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 9: 3676-3683
- Jurc M. 1994. Glivni endofiti v višjih rastlinah. *Zbornik gozdarstva in lesarstva*, 44: 5-43
- Kirchof G., Eckert B., Stoffels M., Baldani J. I., Reis V. M., Hartman A. 2001. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 157-168
- Kloepper J. W., Schippers B., Bakker P. A. H. M. 1992. Proposed elimination of the term endorhizosphere. *Phytopathology*, 82, 7: 726-727
- Kloepper J. W., Rodriguez-Ubana R., Zehnder G. W., Murphy J. F., Sikora E., Fernandez C. 1999. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Australian Plant Pathology*, 28: 21-26
- Kumar B. S., Dube H. C. 1992. Seed bacterization with a fluorescent *Pseudomonas* for enhanced plant growth, yield and disease control. *Soil Biology & Biochemistry*, 24, 6: 539-542

- Lalande R., Bissonnette N., Coutlee D., Antoun H. 1989. Identification of rhizobacteria from maize and determination of their plant-growth promoting potential. *Plant and Soil*, 115: 7-11
- Lapanje A. 2005. Vpliv onesnaženosti z živim srebrom na vrstno raznolikost bakterij v prebavilih enakonožnih rakov. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Lilley A. K., Fry J. C., Bailey M. J., Day M. J. 1996. Comparison of aerobic heterotrophic taxa isolated from four root domains of mature sugar beet (*Beta vulgaris*). *FEMS Microbiology Ecology*, 21: 231-242
- Lodewyckx C., Vangronsveld J., Porteous F., Moore E. R. B., Taghavi S., Mezgeay M., van der Lelie. 2002a. Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21, 6: 583-606
- Lodewyckx C., Mergeay M., Vangronsveld J., Clijsters H., van der Lelie. 2002b. Isolation, characterization, and identification of bacteria associated with the zinc hyper accumulator *Thlaspi caerulescens* subsp. *calaminaria*. *International Journal of Phytoremediation*, 4, 2: 101-115
- Mahaffee W. F., Kloepper J. W. 1997. Temporal changes in the bacterial communities of soil, rhizosphere and endorhiza associated with field-grown cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Microbial Ecology*, 34: 210-223
- Mao W., Lewis J. A., Hebbar P. K., Lumsden R. D. 1997. Seed treatment with a fungal or a bacterial antagonist for reducing corn damping-off caused by species of *Pythium* and *Fusarium*. *Plant Disease*, 81, 5: 450-454
- McInroy J. A., Kloepper J. W. 1995a. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil*, 173: 337-342
- McInroy J. A., Kloepper J. W. 1995b. Population dynamics of endophytic bacteria in field-grown sweet corn and cotton. *Canadian Journal of Microbiology*, 41: 895-901
- Meijer, G. 2001. On the ecology and evolution of seed transmission and choke formation in *Epichloë sylvatica*, a grass endophyte of *Brachypodium sylvaticum*. Doktorska disertacija. Zurich, Swiss Federal Institute of Technology Zurich, 96 str.
- Misaghi I. J., Donndelinger C. R. 1990. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology*, 80, 9: 808-811
- M'Piga P., Balanger R. R., Paulitz T. C., Benhamou N. 1997. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 50: 301-320

- Mukhopadhyay K., Garrison N. K., Hinton D. M., Bacon C. W., Khush G. S., Peck H. D., Datta N. 1996. Identification and characterization of bacterial endophytes from rice. *Mycopathologia*, 134: 151-159
- Mundt J. O., Hinkle N. F. 1976. Bacteria within ovules and seeds. *Applied and Environmental Microbiology*, 32, 5: 694-698
- Musson G. 1995. Development of delivery systems for introducing endophytic bacteria into cotton. *Biocontrol Science and Technology*, 5, 4: 407-416
- Nelson E. B. 1990. Exudates molecules initiating fungal responses to seeds and roots. *Plant and Soil*, 129: 61-73
- Newman L. A., Reynolds C. M. 2005. Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants. *Trends in Biotechnology*, 23, 1: 6-8
- Patriquin D. G., Döbereiner J. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. *Canadian Journal of Microbiology*, 24: 734-742
- Patriquin D. G., Döbereiner J., Jain D. K. 1983. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. *Canadian Journal of Microbiology*, 29: 900-915
- Paulitz T. C. 1991. Effect of *Pseudomonas putida* on the stimulation of *Pythium ultimum* by seed volatiles of pea and soybean. *Phytopathology*, 81, 10: 1282-1287
- Pettit R. E., Taber R. A., Foster B. G. 1968. Occurrence of *Bacillus subtilis* in peanut kernels. *Phytopathology*, 58: 254-255
- Pillay V. K., Nowak J. 1997. Inoculum density, temperature, and genotype effects on in vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. *Canadian Journal of Microbiology*, 43: 354-361
- Pirttilä A. M., Laukkanen H., Pospiech H., Myllylä R., Hohtola A. 2000. Detection of intracellular bacteria in the buds of scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) by in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 7: 3073-3077
- Raupach G. S., Kloepper J. W. 1998. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology*, 88, 11: 1158-1164
- Quadt-Hallman A., Benhamou N., Kloepper J. W. 1997a. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant-associated bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 43: 254-259

- Quadt-Hallman A., Benhamou N., Klopper J. W. 1997b. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. *Canadian Journal Microbiology*, 43: 577-582
- Reddy P. M., Ladha J. K., So R. B., Hernandez R. J., Ramos M. C., Angeles O. R. 1997. Rhizobial communication with rice roots: induction of phenotypic changes, mode of invasion and extent of colonization. *Plant and Soil*, 194: 81-98
- Reinhold-Hurek B., Hurek T., Gillis M., Hoste B., Vancanneyt M., Kersters K., de Ley J. 1993. *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43, 3: 574-584
- Reinhold-Hurek B., Hurek T. 1998. Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends in Microbiology*, 6, 4: 139-143
- Reiter B., Pfeifer U., Schwab H., Sessitsch A. 2002. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5: 2261-2268
- Reva O. N., Smirnov V. V., Pettersson B., Priest F. G. 2002. *Bacillus endophyticus* sp. nov., isolated from the inner tissues of cotton plants (*Gossypium* sp.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52: 101-107
- Ruppel S., Hecht-Buchholz C., Remus R., Ortmann U., Schmelzer R. 1992. Settlement of the diazotrophic, phytoeffective bacterial strain *Pantoea agglomerans* on and within winter wheat: an investigation using ELISA and transmission electron microscopy. *Plant and Soil*, 145: 261-273
- Sardi P., Saracchi M., Quaroni S., Petrolini B., Borgonovi G. E., Merli S. 1992. Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 8: 2691-2693
- Seghers D., Wittebolle L., Top E. M., Verstraete W. 2004. Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3: 1475-1482.
- Sessitsch A., Reiter B., Pfeifer U., Wilhelm E. 2002. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and *Actinomycetes*-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology*, 39: 23-32
- Sessitsch A., Reiter B., Berg G. 2004. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. *Canadian Journal of Microbiology*, 50: 239-249

- Shishido M., Loeb B. M., Chanway C. P. 1995. External and internal root colonization of lodgepole pine seedlings by two growth-promoting *Bacillus* strains originated from different root microsites. *Canadian journal of Microbiology*, 41: 707-713
- Shishido M., Breuil C., Chanway C. P. 1999. Endophytic colonization of spruce by plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 29: 191-196
- Stamford T. L. M., Stamford N. P., Coelho L. C. B. B., Araujo J. M. 2002. Production and characterization of a thermo stable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves. *Bioresource Technology*, 83: 105-108
- Stoltzfus J. R., So R., Malarvithi P. P., Ladha J. K., de Bruijn F. J. 1997. Isolation of endophytic bacteria from rice and assesment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. *Plant and Soil*, 194: 25-36
- Streichan M., Schink B. 1986. Microbial populations in wet wood of European white fir (*Abies alba* Mill.). *FEMS Microbiology Ecology*, 38: 141-150
- Strobel G. A. 2003. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*, 5: 535-544
- Stubs S. L. J., Brazier J. S., O'Neill G. L., Duerden B. I. 1999. PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 2: 461-463
- Sturz A. V. 1995. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. *Plant and Soil*, 175: 257-263
- Sturz A. V., Christie B. R. 1996a. Endophytic bacteria of red clover as agents of allelopathic clover-maize syndromes. *Soil Biology & Biochemistry*, 28, 4/5: 583-588
- Sturz A. V., Matheson B. G. 1996b. Populations of endophytic bacteria which influence host-resistance to *Erwinia*-induced bacterial soft rot in potato tubers. *Plant and Soil*, 184: 265-271
- Sturz A. V., Christie B. R., Matheson B. G. 1998. Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. *Canadian Journal of Microbiology*, 44, 2: 162-167
- Sturz A. V., Christie B. R., Matheson B. G., Arsenault W. J., Buchanan N. A. 1999. Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. *Plant pathology*, 48: 360-369
- Sturz A. V., Nowak J. 2000. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied Soil Ecology*, 15: 183-190

- Surette M. A., Sturz A. V., Lada R. R., Nowak J. 2003. Bacterial endophytes in precessing carrots (*Daucus carota* L. var. sativus): their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. *Plant and Soil*, 253: 381-390
- Tervet I. W., Hollis J. P. 1948. Bacteria in the storage organs of healthy plants. *Phytopathology*, 38: 960-967
- Thomas D., Graham R. W. 1952. Bacteria in apparently healthy pinto beans. *Phytopathology*, 42: 214
- Timmusk S. 2003. Mechanism of action of the plant growth promoting bacterium *Paenibacillus polymyxa*. Doktorska disertacija. Uppsala, Acta Universitatis Upsalensis. 40 str.
- Torsvik V., Goksoyr J., Daae F. L. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 3: 782-787
- Triplett E. W. 1996. Diazotrophic endophytes: progress and prospects for nitrogen fixation in monocots. *Plant and Soil*, 186: 29-38
- Van Aken B., Moon Yoon J., Schnoor J. L. 2004. Biodegradation of nitro-substituted explosives 2,4,6-trinitrotoluene, hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine, and octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5-tetrazocine by a phytosymbiotic *Methylobacterium* sp. associated with popplar tissues (*Populus deltoides* × *nigra* DN34). *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 1: 508-517
- Van Buren A. M., Andre C., Ishimaru C. A. 1993. Biological control of the bacterial ring rot pathogen by endophytic bacteria isolated from potato. *Phytopathology*, 83, 1406
- van der Lelie, Barac T., Taghavi S., Vangronsveld J. 2005. Response to Newman: New uses of endophytic bacteria to improve phytoremediation. *Trends in Biotechnology*, 23, 1: 8-9
- van Dijk K., Nelson E. B. 1998. Inactivation of seed exudates stimulants of *Pythium ultimum* sporangium germination by biocontrol strains of *Enterobacter cloacae* and other seed-associated bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 2: 183-192
- van Peer R., Punte H. L. M., de Weger L. A., Schippers B. 1990. Characterization of root surface and endorhizosphere pseudomonads in relation to their colonization of roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 8: 2462-2470
- van Peer R., Niemann G. J., Schippers B. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology*, 81, 7: 728-734

Webster G., Gough C., Vasse J., Batchelor C. A., O'Callaghan K. J., Kothari S. L., Davey M. R., Denarie J., Cocking E. C. 1997. Interactions of rhizobia with rice and wheat. *Plant and Soil*, 194: 115-122

Wei G., Klopper W., Tuzun S. 1996. Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. *Phytopathology*, 86, 2: 221-224

Wennström A. 1994. Endophyte – the misuse of an old term. *Oikos*, 71, 3: 353-536

Wilson D. 1993. Fungal endophytes: out of sight but should not be out of mind. *Oikos*, 68, 2: 379-383

Wilson D. 1995. Endophyte – the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, 73, 2: 274-276

Wilson M., Lindow S. E. 2000. Viable but nonculturable cells in plant-associated bacterial populations. V: Nonculturable microorganisms in the environment. Colwell R. R., Grimes D. J. Washington, DC, ASM Press, American society for Microbiology: 229-241

Wozniak, G. 1997. Molekularno biološke metode za tipizacijo sevov *Clostridium difficile*. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, 45 str.

Yates I. E., Arnold J. W., Hinton D. M., Basinger W., Walcott R. R. 2003. *Fusarium verticillioides* induction of maize seed rot and its control. *Canadian Journal of Botany*, 81, 5: 422-428

Zinnel D. K., Lambrecht P., Harris N. B., Feng Z., Kuczmarski D., Higley P., Ishimaru C. A., Arunakumari A., Barletta R. G., Vidaver A. K. 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5: 2198-2208

7.2 DRUGI VIRI

Heldt H. W. 1997. *Plant biochemistry and molecular biology*. Oxford: Oxford University Press: 522 str.

Kiesselbach T. A. 1954. *The structure and reproduction of corn*. 50th anniversary edition. New York, Cold Spring Harbor

Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. 2000. *Brock biology of microorganisms*. Ninth Edition. New Jersey, Prentice-Hall, Inc.: 991 str.

Moore R., Clark W. D., Vodopich D. S. 1998. Botany. Second Edition. ZDA, The McGraw-Hill Companies, Inc.: 919 str.

Rupnik M., Zalar P., Janc M. 2001. Splošna mikrobiologija. Navodila za vaje. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Rupnik M. 2002. Taksonomija in identifikacija bakterij. Navodila za vaje. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Tajnšek T. 1991. Koruza. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 180 str.

PRILOGA A

DO SEDAJ IZOLIRANI BAKTERIJSKI ENDOFITSKI RODOVI

(povzeto po Lodewyckx in sod., 2002a in tabeli 2.1)

Achromobacter, *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Aeromonas*, *Afipia*,
Agrobacterium, *Agromonas*, *Alcaligenes*, *Alcanivora*, *Allorhizobium*, *Alteromonas*,
Aminobacter, *Amycolatopsis*, *Aquaspirillum*, *Arthrobacter*, *Aureobacterium*, *Azoarcus*,
Azomonas, *Azorhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Blastobacter*,
Blastomonas, *Brachymonas*, *Bradyrhizobium*, *Brenneria*, *Brevundimonas*, *Brevundimonas*,
Burkholderia, *Cellulomonas*, *Chelatobacter*, *Chromobacterium*, *Chryseobacterium*,
Chryseomonas, *Citrobacter*, *Clavibacter*, *Clostridium*, *Comamonas*, *Corynebacterium*,
Curtobacter, *Curtobacterium*, *Delftia*, *Derxia*, *Devosia*, *Enterobacter*, *Esherichia*,
Exiguobacterium, *Flavimonas*, *Flavobacterium*, *Flexibacter*, *Frankia*, *Frateuria*,
Frigoribacterium, *Gordonia*, *Hafnia*, *Halomonas*, *Herbaspirillum*, *Hydrogenophaga*,
Kingella, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Kocuria*, *Matsuebacter*, *Mesorhizobium*,
Methylobacterium, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Mopraxella*,
Moraxella, *Morganelli*, *Mycobacterium*, *Nevskia*, *Nocardia*, *Ochrobacterium*, *Pantoea*,
Paracoccus, *Pectobacterium*, *Phenylbacterium*, *Photobacterium*, *Phyllobacterium*,
Plantibacter, *Porphyrobacter*, *Promicromonospora*, *Providencia*, *Pseudoalteromonas*,
Pseudomonas, *Psychrobacter*, *Rahnella*, *Ralstonia*, *Rathayibacter*, *Renibacterium*,
Rhizobacter, *Rhizobium*, *Rhizomonas*, *Rhodanobacter*, *Rhodococcus*, *Rothia*, *Salmonella*,
Serratia, *Shewanella*, *Shigella*, *Sinorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Sphingobacterium*,
Sphingomonas, *Spirillum*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Thauera*,
Variovorax, *Vibrio*, *Xanthobacter*, *Xanthomonas*, *Xylella*, *Yersinia*, *Zoogloea*, *Zymobacter*,
Zymomonas

PRILOGA B

IDENTIFIKACIJA IZOLIRANIH BAKTERIJSKIH SEVOV
(Baza podatkov NCBI, BLASTn)

Bakterijski sev	Oznaka v bazi	Sev v bazi	Število baznih parov v primerjavi	% ujemanj z nukleotidnimi zaporedji v bazi
TRL-2.2	AY851689	Uncultured <i>Microbacterium</i> sp. clone p5	499	99
	AJ581908	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	499	99
	AY547556	<i>Microbacterium</i> sp. CME1	499	99
	AY509223	<i>Microbacterium oxydans</i> strain S28n	499	99
	AY509222	<i>Microbacterium oxydans</i>	499	99
TRL-3.1	AY439262	<i>Frigoribacterium</i> sp. GIC6	722	98
	AF157480	<i>Frigoribacterium</i> sp. 312	722	98
	AY336546	<i>Frigoribacterium</i> sp. pFB17	711	98
TRL-3.2	AJ863379	Uncultured bacterium clone 28RHF41	560	98
	AF001645	Uncultured proteobacterium OCS7	560	98
	AF336351	Beta proteobacterium Wuba26	556	98
TR-3	AB045104	<i>Paenibacillus pabuli</i>	739	97
	AB115960	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	739	97
	AY345554	Bacterium H17	739	97
TR-4	AJ429239	<i>Sphingomonas faenia</i>	509	100
	AJ429237	<i>Sphingomonas aurantiaca</i>	509	100
	AJ429236	<i>Sphingomonas aurantiaca</i>	509	100
TR-5		Določanje na podlagi restrikcijskih profilov (glej sev W22M1)		
TR-6	AY462210	<i>Bacillus pumilus</i> strain DF39	734	98
	AY188840	<i>Bacillus</i> sp. ROO40B	734	98
	AY462205	<i>Bacillus pumilus</i> strain DF20	734	98
TR-7		Določena na podlagi restrikcijskih profilov (glej sev W22M1)		
TR-9	AJ439078	<i>Bacillus simplex</i>	726	99
	AF479374	Glacial ice bacterium SB150-2A2	726	99
	AF479334	Glacial ice bacterium G500K-17	726	99
	AY689061	<i>Bacillus</i> sp. 9B_1	726	99
	AJ316308	<i>Bacillus</i> sp. LMG 21002	726	99
	AJ315057	<i>Bacillus</i> sp. 19489	726	99
	AJ628745	<i>Bacillus simplex</i>	726	99
	AJ628744	<i>Bacillus simplex</i>	726	99
	AJ628743	<i>Bacillus simplex</i>	726	99
W22B1	AB167383	<i>Microbacterium trichotecenolyticum</i>	718	98
	AY741722	<i>Microbacterium</i> sp. SKJH-23	718	98
	AF474330	<i>Microbacterium testaceum</i>	718	98
	AY833570	<i>Microbacterium</i> sp. MC3B-10	718	98
	AY569297	Uncultured <i>Microbacterium</i> sp. clone YJQ-29	718	98
W22B21	AJ581908	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	720	98
	AY547556	<i>Microbacterium</i> sp. CME1	720	98
	AY851689	Uncultured <i>Microbacterium</i> sp. clone p5	720	98
	AJ491806	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	720	98

...se nadaljuje

Nadaljevanje...

Bakterijski sev	Številčna oznaka v bazi	Sev v bazi	Število baznih parov v primerjavi	% ujemanj z nukleotidnimi zaporedji v bazi
W22B22	AJ581908	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	721	98
	AY547556	<i>Microbacterium</i> sp. CME1	721	98
	AY851689	Uncultured <i>Microbacterium</i> sp. clone p5	721	98
	AJ491806	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	721	98
W22B31		Določena na podlagi restrikcijskih profilov (glej sev W22M1)		
W22B32		Določena na podlagi restrikcijskih profilov (glej sev W22M1)		
W22M1	AF364847	<i>Pantoea ananatis</i> strain LMG	477	100
	Z96081	<i>Pantoea ananatis</i> LMG 2665	477	99
	AF364844	<i>Pantoea ananatis</i> strain LMG 20106	477	99
	U80209	<i>Erwinia uredovora</i>	477	99
W22K1	AF306835	<i>Microbacterium</i> sp. VA22800_00	720	98
	AY779522	<i>Microbacterium</i> sp. I-F3	720	98
	X77441	<i>M.lacticum</i> (DSM20427)	720	98

PRILOGA C

IDENTIFIKACIJA IZOLIRANIH BAKTERIJSKIH SEVOV
(Baza podatkov projekta RDP – »Ribosomal Database Project«)
<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>

Bakterijski sev	Oznaka v bazi	Tipski sevi v bazi	Število baznih parov v primerjavi	Podobnost z nukleotidnimi zaporedji v bazi
TRL-2.2	S000121408	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	499	0,984
	S000381732	<i>Microbacterium luteolum</i>	499	0,973
	S000007793	<i>Microbacterium oxydans</i>	499	0,961
	S000019591	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	499	0,961
TRL-3.1	S000016911	<i>Frigoribacterium faeni</i>	722	0,949
TRL-3.2	S000437784	<i>Massilia timonae</i>	560	0,898
	S000022017	<i>Duganella zoogloeoides</i>	560	0,859
	S000006620	<i>Janthinobacterium lividum</i>	556	0,836
TR-3	S000414082	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	739	0,942
	S000435846	<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	739	0,874
	S000127874	<i>Paenibacillus pabuli</i>	739	0,845
TR-4	S000383774	<i>Sphingomonas melonis</i>	509	0,859
	S000387421	<i>Sphingomonas aquatilis</i>	509	0,859
	S000016653	<i>Sphingomonas adhaesiva</i>	509	0,853
TR-5		Določanje na podlagi restrikcijskih profilov (glej sev W22M1)		
TR-6	S000012241	<i>Bacillus vallismortis</i>	734	0,860
	S000428475	<i>Bacillus subtilis subsp. Spizizenii</i>	734	0,853
	S000006574	<i>Bacillus licheniformis</i>	734	0,833
TR-7		Določena na podlagi restrikcijskih profilov (glej sev W22M1)		
TR-9	S000130879	<i>Bacillus simplex</i>	726	0,780
	S000130053	<i>Bacillus luciferensis</i>	726	0,772
	S000381271	<i>Bacillus horikoshii</i>	726	0,764
W22B1	S000020165	<i>Microbacterium testaceum</i>	718	0,951
	S000469185	<i>Microbacterium kitamiense</i>	718	0,910
	S000002959	<i>Microbacterium trichotecenolyticum</i>	718	0,894
W22B21	S000007793	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	720	0,973
	S000019591	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	720	0,916
	S000121408	<i>Microbacterium oxydans</i>	720	0,910
W22B22	S000007793	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	721	0,977
	S000121408	<i>Microbacterium oxydans</i>	721	0,919
	S000019591	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	721	0,914
W22B31		Določena na podlagi restrikcijskih profilov (glej sev W22M1)		
W22B32		Določena na podlagi restrikcijskih profilov (glej sev W22M1)		
W22M1	S000127596	<i>Pantoea ananatis</i>	477	0,985
	S000381168	<i>Pantoea ananatis</i>	477	0,985
	S000381180	<i>Pantoea ananatis</i>	477	0,985
W22K1	S000013457	<i>Microbacterium lacticum</i>	720	0,911
	S000002734	<i>Microbacterium arborescens</i>	720	0,904
	S000003131	<i>Microbacterium imperiale</i>	720	0,901

PRILOGA D

PREDHODNE OBJAVE

Prispevek na 3. Slovenskem Simpoziju o rastlinski fiziologiji
(25. – 27. september 2002, Ljubljana, Biološko središče)

ISOLATION OF BACTERIA FROM MAIZE CARYOPSIS

TOMAŽ RIJAVEC, ŠPELA KUBIK, ALEŠ KLADNIK, RUPNIK MAJA, MARINA
DERMASTIA

University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Biology, Večna pot 111, 1000
Ljubljana, Slovenia

Symbiotic and nonsymbiotic root associated bacteria (rhizobacteria) are most studied examples of plant-interacting bacteria. However, many endophytic microorganisms have also been isolated from other plant tissues. In this study we report the isolation of bacteria from maize caryopsis.

We isolated bacteria from mature intact kernels and from germinating seeds with classical culturing techniques. Kernels were surface sterilized and aseptically dissected into pericarp, embryo and endosperm. Each tissue was inoculated into rich liquid medium (TSA). Whole kernels were used as a control for sterilization procedure. In further experiments surface sterilized kernels were allowed to germinate and seedlings were later transferred to King B solid medium. Bacteria started to grow along seedling roots after two weeks of incubation. Four different strains were isolated, and characterized as Gram positive irregular rods. We presume that those are endophytic bacteria within maize caryopsis with potential important role in plant germination and development.

(Vir: Rijavec T., Kubik Š., Kladnik A., Rupnik M., Dermastia M. 2002. Isolation of bacteria from maize caryopsis. Knjiga povzetkov. Ljubljana, Društvo za rastlinsko fiziologijo Slovenije, 2002)

PRILOGA E

PREDHODNE OBJAVE

Raziskovalna naloga

IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA BAKTERIJSKIH ENDOFITOV IZ ZRN KORUZE (*Zea mays*)

Iz kaljenih in nekaljenih zrn koruze smo poskušali izolirati bakterijske endofite. Pregledali smo prisotnost bakterij v zrnih sedmih koruznih sort. Bakterije smo po izolaciji identificirali z molekularnimi biološkimi tehnikami, določili pa smo tudi značilnosti kultur in mikroskopske značilnosti, barvanje po Gramu in celično morfologijo. Prevladovala so po Gramu pozitivne bakterije nepravilnih paličastih oblik z izjemo ene po Gramu negativne bakterije. Izolirane seve uvrščamo v rodove *Microbacterium*, *Frigoribacterium*, *Paenibacillus* in *Pantoea*. Poleg identifikacije smo opazovali tudi pogostost pojavljanja bakterijskih endofitov v zrnih posameznih koruznih sort v enoletnem in dvoletnem časovnem obdobju ter določevali številčni upad bakterij v zrnih koruze v daljšem časovnem obdobju.

(Vir: Rijavec T. Izolacija in identifikacija bakterijskih endofitov iz zrn koruze (*Zea mays*). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, 2003.)

ZAHVALA

Mentorici prof. dr. Marini Dermastia se zahvaljujem, ker mi je odprla pot v svet znanstvenega raziskovanja in me pri tem ves čas vzpodbujala.

Somentorici doc. dr. Maji Rupnik se zahvaljujem za vso pomoč, nasvete in napotke, ki sem jih potreboval pri svojem raziskovalnem delu.

Posebno zahvalo izrekam Alešu Lapanje, univ. dipl. biol., za vse teoretično in praktično znanje, ki mi ga je predal. Njegova pomoč je bila neprecenljiva.

Dr. Poloni Zalar se zahvaljujem za pomoč pri identifikaciji glivnih kontaminant, dr. Alešu Kladniku za pomoč pri izvedbi sekcije koruznega zrna, dr. Dušanu Jurcu za izdelavo slike bakterijske rasti, Špeli Kubik, univ. dipl. mikrobiol., za vse, kar me je naučila pri praktičnem delu v laboratoriju.

Za pomoč pri delu bi se zahvalil tudi vsem iz Katedre za splošno botaniko, Katedre za molekularno genetiko in mikrobiologijo ter Katedre za fiziologijo rastlin.

Hvala »ekipi« iz laboratorija Mikroanaerobi!