

MARTA SIEBYŁA, IWONA SZYP-BOROWSKA

Endofity bakteryjne drzew leśnych – stan wiedzy i sposoby wykorzystania

Endophytic bacteria of the forest trees – state of the art and possible applications

ABSTRACT

Siebyła M., Szyp-Borowska I. 2020. Endofity bakteryjne drzew leśnych – stan wiedzy i sposoby wykorzystania. Sylwan 164 (6): 497-504. DOI: <https://doi.org/10.26202/sylvan.2020018>.

The interaction of endophytic microorganisms with plants are a common occurrence that brings mutual benefits to partners. Plants are the main habitat of bacteria that live inside their tissues and do not cause disease symptoms, but affect the growth and development of plants by producing substances that promote their development. Research on the diversity of endophytic bacteria associated with forest trees is insufficient – little is known about the diversity of endophytic bacteria, and especially their function in tree tissues. Bacteria positively affecting the host tree, among others, increase biomass growth by supporting tree health. The species diversity of endophytic bacteria in plants is influenced by the plant genotype, tissue type, development phase and environmental conditions. So far, bacteria that develop in root, stem, and leaf tissues have been best known. Among the forest trees in which the occurrence and diversity of endophytic bacteria have been studied, there are species such as pine, spruce, birch and oak. The presented paper is a review of the latest literature on the subject.

KEY WORDS

endophytic bacteria, forest trees, host plant, symbiosis

ADDRESSES

Marta Siebyła ⁽¹⁾ – e-mail: m.siebyla@ibles.waw.pl

Iwona Szyp-Borowska ⁽²⁾ – e-mail: i.szyp@ibles.waw.pl

⁽¹⁾ Zakład Ochrony Lasu, Instytut Badawczy Leśnictwa; Sękocin Stary, ul. Braci Leśnej 3, 05-090 Raszyn

⁽²⁾ Zakład Hodowli Lasu i Genetyki Drzew Leśnych, Instytut Badawczy Leśnictwa; Sękocin Stary, ul. Braci Leśnej 3, 05-090 Raszyn

Wstęp

Endofity są mikroorganizmami, które można wyizolować z wysterylizowanych powierzchniowo tkanek roślin. Rozwijają się tam one bezobjawowo, przynajmniej przez część swojego cyklu życiowego. Zaliczane są do nich bakterie oraz grzyby, które bytują wewnątrz komórek rośliny, nie przyczyniają się do choroby gospodarza. Endofity mogą wpływać pozytywnie na zasiedloną roślinę, poprawiając jej funkcje fizjologiczne i zwiększając odporność na czynniki stresowe. Ułatwiają także roślinom adaptację do niekorzystnych warunków, tj. braku wody czy nadmiernego zasolenia. Strzelczyk [2001] podaje, że w świecie zdrowych roślin nie występują gatunki, które byłyby pozbawione mikroorganizmów endofitycznych. Drobnoustroje te wskutek oddziaływania środowiska zewnętrznego wchodzą bezpośrednio lub pośrednio w różne związki z roślinami.

Większość badań dotyczących różnorodności bakterii endofitycznych była prowadzona na roślinach rolniczych i ogrodniczych, dlatego występowanie mikroorganizmów endofitycznych związanych z drzewami leśnymi jest wciąż zagadnieniem mało poznanym. Drzewa leśne charakteryzują się większą biomasa oraz długowiecznością i tym samym mogą zapewnić unikalne, długotrwałe warunki dla rozwoju bakterii endofitycznych. Bakterie natomiast wpływają na ogół pozytywnie (poza bakteriami pasożytniczymi) na drzewo żywicielskie, stymulując rozwój mykoryz (helpery), uczestnicząc w procesach odpornościowych gospodarza, a poprzez wspomaganie stanu zdrowotnego drzew wpływając na wytwarzanie biomasy [Garbaye 1994; Anand i in. 2006; Berg 2009]. Ze względu na pozytywny wpływ użytecznych szczepów bakterii na drzewa żywicielskie ich rozpoznanie i wprowadzenie do praktyki leśnej może mieć wpływ na promowanie wzrostu roślin w niesprzyjających warunkach środowiska.

Z przeprowadzonych dotychczas badań dotyczących interakcji bakterii endofitycznych z drzewami leśnymi wynika, że różne gatunki drzew-gospodarzy i różne ich organy zasiedlane są przez bardzo zróżnicowane zbiorowiska bakterii [Bal i in. 2012; Bal, Chanway 2012a, b; Anand, Chanway 2013; Anand i in. 2013; Yang i in. 2016; Tang i in. 2017]. Występowanie i różnorodność bakterii endofitycznych badano między innymi u sosny [Pirttilä i in. 2000; Pohjanen i in. 2014], świerka [Cankar i in. 2005], brzozy [Mesa i in. 2017] i dębu [Brooks i in. 1994]. Najwięcej jednak badań dotyczy topoli i eukaliptusa, w związku z ich znaczeniem dla bioenergetyki i bioremediacji [Lupo i in. 2001; Doty i in. 2005; Taghavi i in. 2005, 2009; Weyens i in. 2009, 2010, 2012; Fillat i in. 2016].

Występowanie

Do bakterii endofitycznych zasiedlających rośliny drzewiaste zalicza się reprezentantów gromad α -, β - oraz γ -: Proteobacteria, Actinobacteria i Firmicutes. Bakterie należące do rodzajów *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Burkholderia*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Pantoea* i *Flavobacterium* są powszechnie spotykanymi endofitami, zasiedlającymi niemal wszystkie tkanki drzew leśnych. Do bakterii rzadziej występujących u drzew leśnych należą gatunki z rodzajów *Chryseobacterium*, *Citrobacter* i *Duganella* [Moore i in. 2006; Wang i in. 2006; Filteau i in. 2010]. Zazwyczaj w jednej roślinie występuje kilka różnych rodzajów i gatunków bakterii endofitycznych. Ich zróżnicowanie w roślinach zależy od genotypu rośliny, rodzaju tkanki, fazy rozwoju i warunków środowiskowych.

KORZENIE. Dla roślin to gleba jest głównym źródłem pochodzenia bakterii endofitycznych, stąd w tkankach korzeni stwierdzano największą liczbę bakterii, wyrażaną w jednostkach tworzących kolonię (jtk), wynoszącą około $\log 5$ jtk/g świeżej masy roślin. Naturalnie powstające pęknięcia epidermy korzenia głównego, miejsca powstawania korzeni bocznych (ryzosfera), jak i strefa wydłużania i różnicowania się komórek są głównymi drogami wnikania takich bakterii do rośliny. System korzeniowy jest środowiskiem z małymi wahaniami temperatury i zawartości wody, a wydzieliny korzeni stanowią bogate i stałe źródło składników pokarmowych dostępnych dla mikroorganizmów. Kolejnym czynnikiem odpowiedzialnym za dominację ilościową endofitów ryzosfery nad endofitami strefy nadziemnej (fylosfery) jest budowa tkanek. Grube ściany komórkowe epidermy czy obecność kutikuli i wosków na liściach stanowią duże utrudnienie dla przenikania bakterii w porównaniu z cienką, pozbawioną włosków ryzoderma. Dlatego też duża liczba obecnie znanych endofitów to przedstawiciele ryzosfery, ryzoplany bądź wewnętrznych tkanek korzenia. Mikroorganizmy endofityczne najczęściej kolonizują przestrzenie międzykomórkowe i ksylem, mogą też być transportowane przez system wiązek przewodzących bądź ściany komórkowe apoplastu, a także poruszać się aktywnie dzięki rzęskom lub chemotaksji.

PĘDY. Mimo że większość interakcji między roślinami a pożytecznymi mikroorganizmami zachodzi w korzeniach, pędy stanowią wyjątkową niszę ekologiczną. Tkanki roślinne pędów są zwykle narażone na promieniowanie UV, wahania temperatury i wilgotności oraz zmienną zasobność w substancje odżywcze – wszystko, co wpływa na warunki rozwoju bakterii. W nadziemnych częściach rośliny populacja bakterii wynosi około $\log 4$ jtk/g w świeżej masie łodyg i $\log 3$ jtk/g w tkankach liści [Hallmann i in. 1997]. Endofity bakteryjne drzew leśnych izolowano głównie z wierzchołków pędów, pyłków lub nasion, ale także z całych sadzonek. Rzadko natomiast ich występowanie potwierdzono w kwiatach i owocach [Pirttilä 2011].

NASIONA. Niewiele jest doniesień o związkach bakterii endofitycznych z kwiatami, owocami i nasionami [Klama 2004]. Z badań przeprowadzonych przez naukowców ze Słowenii [Cankar i in. 2005] wynika, że do endofitów bakteryjnych najczęściej występujących w nasionach w tym kraju należą bakterie rodzajów: *Bacillus*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* i *Cytophaga*. Spośród badanych bakterii endofitycznych aż 80% wykazywało aktywność przeciwgrzybiczą, wśród nich *Bacillus subtilis* i *Flavobacterium*. Były one silnymi antagonistami wszystkich badanych grzybów patogennych, takich jak: *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Epicoccum purpurascens* i *Fusarium* sp. [Ferreira i in. 2008].

Zróźnicowanie gatunkowe endofitów drzew leśnych i ich znaczenie

SOSNY. Rodzaj *Pinus* jest jednym z najliczniejszych i najważniejszych gospodarczo drzew iglastych w naszej strefie klimatycznej. Pierwsze dowody kolonizacji endofitycznej przez bakterie stymulujące wzrost stwierdzono u sosny wydmowej (*Pinus contorta* Dougl. ex Loud.) [Shishido i in. 1995]. Opisany dla tego gatunku szczep Pw-2 wyizolowano z tkanek korzeni 3-letnich sadzonek. Wstępna charakterystyka wykazała, że należy on do gatunku *Bacillus polymyxa* (obecnie znany jako *Paenibacillus polymyxa*). Korzystne działanie *P. polymyxa* Pw-2 oceniono przez zaszczepienie nieskolonizowanych sadzonek sosny. W porównaniu do kontroli stwierdzono zwiększenie suchej masy pędu do 18%. Wykazano także udział szczepu Pw-2 w produkcji roślinnych hormonów wzrostu wytwarzanych w korzeniach, takich jak kwas indolo-3-octowy (IAA) i rybozyd dihydroazeatyny (DHZR – forma cytokiny) [Bent, Chanway 2001]. Badając paki drzew sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) rosnących na stanowisku naturalnym w północnej Finlandii, Pirttilä i in. [2000] wyizolowali bakterie, które zostały zidentyfikowane jako *Methylobacterium extorquens* (szczep DSM 13060). W kolejnych doświadczeniach stwierdzono, że szczep ten wytwarza pochodne adeniny, które są prekursorami w biosyntezy cytokinin, przez co przyczynia się do znacznego zwiększenia masy pędów i korzeni sadzonek sosny zwyczajnej [Pirttilä i in. 2004].

Drobnoustroje wykazują także zdolność syntezy enzymu nitrogenazy, który katalizuje redukcję N_2 do NH_3 . Dla rozwoju roślin właśnie azot jest jednym z najbardziej istotnych pierwiastków. W zależności od gatunku rośliny jego niedobory objawiają słabym krzewieniem, żółknięciem liści, wątlnością i sztywnością tkanek. Na kuli ziemskiej ilość azotu wiązanego biologicznie przez drobnoustroje wynosi około 100-265 mln ton rocznie, z czego 150 mln ton przypada na mikroorganizmy glebowe [Sawicka 1985; Subba Rao i in. 1985]. Bal i in. [2012] w tkankach pędu sosny *Pinus contorta* (>20 lat) rosnących na ubogich w składniki odżywcze (ograniczony azot) obszarach leśnych wyizolowali endofityczny szczep, który był zdolny do wzrostu na podłożu bez azotu. Szczep ten zidentyfikowano jako należący do gatunku *P. polymyxa*. W dwóch kolejnych doświadczeniach sadzonki sosny zaszczepione tą bakterią były w stanie związać 30 i 66% azotu bezpośrednio z atmosfery, odpowiednio po 27 i 35 tygodniach od zaszczepienia [Anand i in. 2013]. Zaszczepione rośliny były wyższe od kontroli o 33%, a sucha masa pędu i korzenia była wyższa odpowiednio o 78 i 165% w porównaniu do roślin nieskolonizowanych. Stymulowanie wzrostu roślin było

bezpośrednio związane z ilością związanego azotu. Szczep *P. polymyxa* może tworzyć kolonie endofityczne w tkankach korzenia, pędu i w igłach. Także u innego gatunku sosny: sosny giętkiej (*Pinus flexilis* E. James) rosnącej w piętrze subalpejskim Gór Skalistych na stanowiskach z ograniczonym źródłem azotu, zidentyfikowano bakterie wiążące azot *Gluconacetobacter diazotrophicus* [Carrell, Frank 2014]. W badaniach prowadzonych przez Moyes i in. [2016] przedstawiono dowody na obecność w igłach *Pinus flexilis* diazotroficznych endofitów bakteryjnych. Bakterie te mogłyby dostarczyć do drzewostanów sosnowych nawet 6,8-13,6 µg azotu/m² dziennie i około 1-2 mg azotu/m² w ciągu jednego roku [Moyes i in. 2016].

TOPOLE. Pierwsze odkrycie dotyczące obecności diazotroficznego endofitu bakteryjnego u topól dotyczyło klonów mieszańca *Populus trichocarpa* × *P. deltoides*, u których stwierdzono obecność *Rhizobium tropici*. Chociaż ten gatunek bakterii jest dobrze znany ze zdolności do wiązania azotu u roślin strączkowych [Perret i in. 2000], w tym przypadku opisano jego obecność u gospodarza niebędącego rośliną strączkową. Dalsze badania wykazały różnorodność endofitycznych zbiorowisk bakteryjnych dla innych gatunków topoli. W części nadziemnej (liście i gałęzie) mieszańcowych klonów topoli wyizolowano bakterie należące do 53 różnych rodzajów, w tym *Curtobacterium*, *Plantibacter*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Sphingomonas*, *Pedobacter*, *Methylobacterium* i *Paenibacillus*, a najliczniejszymi rodzajami we wszystkich klonach były *Curtobacterium* i *Pseudomonas* [Doty i in. 2005, 2009; Ulrich i in. 2008]. Inne korzystne oddziaływanie układu roślina-drobnoustrój wiąże się z przemianami prowadzącymi do stymulacji wzrostu poprzez udział bakterii w syntezie hormonów. Roślina gospodarza dostarcza tryptofanu, który endofity przekształcają w auksynę – kwas indoliloctowy. Takich obserwacji dokonali Doty i in. [2009] w odniesieniu do przedstawicieli endofitów bakteryjnych z rodzaju *Burkholderia*, *Rahnella* i *Acinetobacter* wyizolowanych z młodych sadzonek topoli kalifornijskiej *P. trichocarpa*. Taghavi i in. [2005, 2009] także wyizolowali kilka gatunków endofitów z tkanek korzeni i pędów hybryd topoli, m.in. trzy szczepy: *Serratia proteamaculans* 568, *Enterobacter* sp. 638 i *Pseudomonas putida* W619. Szczepy te kolonizowały powierzchnię korzenia i tkanki wewnętrzne, co znacznie wpływało na zwiększenie biomasy pędów [Taghavi i in. 2009]. Szczep *Pseudomonas putida* W619, badany później przez Weyens i in. [2012], stymulował wzrost sadzonek topoli poprzez wytwarzanie hormonów: IAA i cytokinin.

Znana jest rola topoli w procesie rekultywacji skażonego środowiska. Z jej hybryd rosnących w miejscu fitoremediacji w pobliżu fabryki silników w Genk w Belgii wyizolowano bakterie endofityczne należące do rodzaju *Pseudomonas* [Germaine i in. 2004]. Szczepy te badano pod kątem ich zdolności do solubilizacji fosforu, wytwarzania IAA i odporności na metale ciężkie. Stwierdzono, że szczepy kolonizują komórki ksylemu i przestrzenie międzykomórkowe korzenia, łodygi i liści.

Ze względu na wartość gospodarczą topole są bardzo intensywnie badane, a od momentu sekwencjonowania genomu zainteresowanie wyjaśnieniem interakcji bakteria × gospodarz na poziomie molekularnym i genetycznym stale wzrasta [Schaefer i in. 2013, 2016].

ŚWIERKI. Pierwszy odnotowany endofit świerkowy, *Pseudomonas* sp. Ss2, został wyizolowany z korzeni mieszańca świerka (*Picea glauca* (Moench) Voss × *Picea engelmannii* Parry) [Shishido, Chanway 2000]. Stymulował on wzrost rośliny poprzez kolonizację ryzosfery oraz znacznie zwiększał masę korzeni, pędów i wysokość sadzonek. Chociaż był izolowany z ryzosfery, był też w stanie skolonizować tkanki wewnątrz korzenia – zarówno sadzonek uprawianych w szklarni, jak i w warunkach polowych [Shishido, Chanway 2000]. Po 4 miesiącach od zaszczepienia był wykrywany we włośnikach korzeniowych, komórkach kory pierwotnej i tkankach przewodzących. Można wywnioskować, że bakterie tego szczepu wnikają do sadzonki świerka przez przetchlinki korzeniowe

i tworzą kolonie w tkankach korzenia i łodygi. Cankar i in. [2005] wykazali obecność endofitów bakteryjnych także w nasionach świerka pospolitego (*Picea abies* L. Karst) rosnącego w różnych lokalizacjach na obszarze w Słowenii (1200-1400 m n.p.m.). Endofity bakteryjne obecne były w okrywie nasiennej, bielmie i tkance embrionalnej. Większość tych bakterii należała do rodzajów *Pseudomonas* i *Rahnella*, które znane są ze swoich właściwości stymulujących wzrost roślin i wiążących azot [Cankar i in. 2005].

INNE GATUNKI. Obecność endofitów bakteryjnych odnotowano także u innych gatunkach drzew iglastych, takich jak daglezja zielona (*Pseudotsuga menziesii*) i żywotnik olbrzymi (*Thuja plicata*), oraz drzew liściastych: u dębu (*Quercus* L.) i wierzby (*Salix* L.). Endofityczne szczepy bakteryjne zidentyfikowane w tkankach łodyg i igieł żywotnika należały do rodzajów *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Paenibacillus* i *Pseudomonas*. Stwierdzono, że szczep *Paenibacillus amylolyticus* C3b wykazywał zdolności do wiązania azotu [Bal i in. 2012]. Doty i in. [2009] wyizolowali 10 szczepów endofitycznych bakterii z tkanek młodych drzew wierzby (*Salix sitchensis*). Zostały one zidentyfikowane jako należące do rodzajów *Acinetobacter*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* oraz *Stenotrophomonas* i podobnie jak w przypadku żywotnika miały zdolność przekształcania azotu atmosferycznego do postaci użytecznych biologicznie. Dwa z izolatów pozyskanych z wierzby – *Herbaspirillum* sp. WW2 i *Pseudomonas* sp. (WW6) – miały geny *nif*, niezbędne do kodowania enzymów azotanowych [Doty i in. 2009]. Izolaty te [Doty i in. 2005, 2009] zostały przetestowane pod kątem ich zdolności do stymulowania wzrostu innego żywiciela – daglezji zielonej [Khan i in. 2015]. Wykazano, że zaszczepione sadzonki daglezji zwiększyły o 48% biomasę i o 13% długość korzeni, były także o 16% wyższe niż sadzonki kontrolne. Wyniki te wskazują, że endofityczne bakterie wierzby nie tylko kolonizują tkanki wewnętrzne innego żywiciela (tu: daglezji), ale także znacznie wspierają ich wzrost w środowisku szklarniowym. Takie badania zwiększają wiedzę na temat endofitów bakteryjnych, które mogą być cenne dla zwiększenia produkcji sadzonek w szkółkach leśnych.

Choroba wędnięcia dębów wywołana przez infekcje grzybowe powoduje wędnięcie i następnie obumieranie drzew. Brooks i in. [1994] badali rolę bakterii endofitycznych w zwalczaniu wywołującego ją patogenu, grzyba *Ceratocystis fagacearum*. Wysunęli oni hipotezę, że ochrona biologiczna poprzez zaszczepienie drzew endofitami może być użytecznym i bezpiecznym dla ekosystemu sposobem kontrolowania przebiegu choroby wędnięcia dębów. Kilka z izolatów należących do rodzajów *Bacillus* i *Pseudomonas*, po ocenie *in vitro* ich zdolności do ograniczania rozwoju *C. fagacearum*, zostało użytych do zaszczepienia roślin. Zdolność szczepów *Pseudomonas* do kontrolowania rozwoju patogenu wędnięcia dębu *in vivo* została potwierdzona zmniejszeniem liczby drzew chorych o 50% i objawów utraty korony o 17%. Opisane badania wskazują, że wykorzystanie endofitów bakteryjnych do ograniczania szkodliwych patogenów różnych gatunków drzew znajduje uzasadnienie i może być użytecznym elementem zintegrowanej ochrony drzew leśnych.

Podsumowanie

Większość badań prowadzonych nad endofitami drzew leśnych koncentrowała się na różnorodności grzybów, niewiele natomiast wiadomo na temat endofitycznych bakterii, a zwłaszcza ich funkcji w tkankach drzew. Wiadomo, że zdrowe rośliny zawierają bakterie endofityczne, które znajdują w nich niezbędną niszę ekologiczną. W świecie roślin zapewne nie występują gatunki, które byłyby pozbawione organizmów endofitycznych [Strzelczyk 2001]. Informacje na temat różnorodności i znaczenia endofitów dla drzew leśnych są nieliczne, ale te istniejące sugerują, że zróżnicowanie liczebności bakterii w tkankach różnych drzew jest znaczące [Izumi 2011].

Wynikają stąd możliwości poznawcze, które powinny dotyczyć słabo poznanych związków pomiędzy roślinami drzewiastymi a bakteriami, jak również możliwości ich wykorzystania w gospodarce leśnej.

Literatura

- Anand R., Chanway C. P. 2013. Detection of GFP-labeled *Paenibacillus polymyxa* in auto fluorescing pine seedling tissues. *Biology and Fertility of Soils* 49: 111-118. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0727-9>.
- Anand R., Grayston S., Chanway C. P. 2013. N₂-fixation and seedling growth promotion of lodgepole pine by endophytic *Paenibacillus polymyxa*. *Microbial Ecology* 66: 369-374. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0196-1>.
- Anand R., Paul L., Chanway C. 2006. Research on endophytic bacteria: recent advances with forest trees. W: Schulz B. J. E., Boyle C. J. C., Sieber T. N. [red.]. *Microbial Root Endophytes*. *Soil Biology* 9: 89-106. DOI: https://doi.org/10.1007/3-540-33526-9_6.
- Bal A., Anand R., Berge O., Chanway C. 2012. Isolation and identification of diazotrophic bacteria from internal tissues of *Pinus contorta* and *Thuja plicata*. *Canadian Journal of Forest Research* 42: 807-813. DOI: <https://doi.org/10.1139/x2012-023>.
- Bal A., Chanway C. P. 2012a. Evidence of nitrogen fixation in lodgepole pine inoculated with diazotrophic *Paenibacillus polymyxa*. *Botany* 90: 891-896. DOI: <https://doi.org/10.1139/b2012-044>.
- Bal A., Chanway C. P. 2012b. 15N foliar dilution of western red cedar in response to seed inoculation with diazotrophic *Paenibacillus polymyxa*. *Biology and Fertility of Soils* 48: 967-971. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0699-9>.
- Bent E., Chanway C. P. 2001. The growth-promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 44: 980-988. DOI: <https://doi.org/10.1139/w98-097>.
- Berg G. 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84 (1): 11-18.
- Brooks D., Gonzalez C. F., Appel D. N. 1994. Evaluation of endophytic bacteria as potential biological control agents for oak wilt. *Biological Control* 4: 373-381.
- Cankar K., Kraigher H., Ravnikar M., Rupnik M. 2005. Bacterial endophytes from seeds of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst). *FEMS Microbiology Letters* 244 (2): 341-345.
- Carrell A. A., Frank A. C. 2014. *Pinus flexilis* and *Picea engelmannii* share a simple and consistent needle endophyte microbiota with a potential role in nitrogen fixation. *Frontiers in Microbiology* 5: 333. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00333>.
- Doty S. L., Doshier M. R., Singleton G. L., Moore A. L., Van Aken B., Stettler R. F., Strand S. E., Gordon M. P. 2005. Identification of an endophytic *Rhizobium* in stems of *Populus*. *Symbiosis* 39: 27-35.
- Doty S. L., Oakley B., Xin G. 2009. Diazotrophic endophytes of native cottonwood and willow. *Symbiosis* 47: 23-33.
- Ferreira A., Quecine M. C., Lacava P. T. 2008. Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. *FEMS Microbiology Letters* 287: 8-14.
- Fillat U., Martín-Sampedro R., Macaya-Sanz D., Martín J. A., Ibarra D., Martínez M. J., Eugenio M. E. 2016. Screening of eucalyptus wood endophytes for laccase activity. *Process Biochemistry* 51: 589-598.
- Filteau M., Lagace L., LaPointe G. 2010. Seasonal and regional diversity of maple sap microbiota revealed using community PCR fingerprinting and 16S rRNA gene clone libraries. *Systematic and Applied Microbiology* 33: 165-173.
- Garbaye J. 1994. Helper bacteria: a new dimension to the micorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 128: 197-210.
- Germaine K., Keogh E., Garcia-Cabellos G. 2004. Colonisation of poplar trees by gfp expressing bacterial endophytes. *FEMS Microbiology Ecology* 48: 109-118. DOI: [10.1016/j.femsec.2003.12.009](https://doi.org/10.1016/j.femsec.2003.12.009).
- Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W. F., Klopper J. W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 895-914. DOI: <https://doi.org/10.1139/m97-131>.
- Izumi H. 2011. Diversity of endophytic bacteria in forest trees controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84: 11-18.
- Khan Z., Kandel S. L., Ramos D. N., Ettl G. J., Kim S. H., Doty S. L. 2015. Increased biomass of nursery-grown Douglas-fir seedlings upon inoculation with diazotrophic endophytic consortia. *Forests* 6 (10): 3582-3593. DOI: <https://doi.org/10.3390/f6103582>.
- Klama J. 2004. Współżycie endofitów bakteryjnych z roślinami. *Acta Scientiarum Polonorum* 3 (1): 19-28.
- Lupo S., Tiscornia S., Bettucci L. 2001. Endophytic fungi from flowers, capsules and seeds of *Eucalyptus globules*. *Revista Iberoamericana de Micología* 18: 38-41.
- Mesa V., Navazas A., González-Gil R., González A., Weyens N., Lauga B., Gallego J. L. R., Sánchez J., Peláez A. I. 2017. Use of Endophytic and Rhizosphere Bacteria to Improve Phytoremediation of Arsenic-Contaminated Industrial Soils by Autochthonous *Betula celtiberica*. *Applied and Environmental Microbiology* 83 (8): e03411-16. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.03411-16>.

- Moore F. P., Barac T., Borremans B. 2006. Endophytic bacterial diversity in poplar trees, growing on a BTEX-contaminated site: the characterisation of isolates with potential to enhance phytoremediation. *Systematic and Applied Microbiology* 29: 539-556.
- Moyes A. B., Kueppers L. M., Pett-Ridge J., Carper D. L., Vandehey N., O'Neil J., Frank A. C. 2016. Evidence for foliar endophytic nitrogen fixation in a widely distributed subalpine conifer. *New Phytologist* 210: 657-668. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.13850>.
- Perret X., Staehelin C., Broughton W. J. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64: 180-201. DOI: 10.1128/MMBR.64.1.180-201.2000.
- Pirttilä A. M. 2011. Endophytic bacteria in tree shoot tissues and their effects on host. W: Pirttilä A. M., Frank A. C. [red.]. *Endophytes of forest trees, biology and applications*. Forestry Sciences Series 80: 139-150. DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-007-1599-8_8.
- Pirttilä A. M., Joensuu P., Pospiech H., Jalonen J., Hohtola A. 2004. Bud endophytes of *Scots pine* produce adenine derivatives and other compounds that affect morphology and mitigate browning of callus cultures. *Physiologia Plantarum* 121: 305-312.
- 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. *Appl Environ Microbiol* 66: 3073-3077. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.66.7.3073-3077.2000>
- Pohjanen J., Koskimäki J. J., Sutela S., Ardanov P., Suorsa M., Niemi K., Sarjala T., Häggman H., Pirttilä A. M. 2014. Interaction with ectomycorrhizal fungi and endophytic *Methylobacterium* affects nutrient uptake and growth of pine seedlings in vitro. *Tree Physiology* 34: 993-1005. DOI: <https://doi.org/10.1093/treephys/tpu062>.
- Sawicka A. 1985. Dinitrogen fixation in the rhizosphere of meadow grasses. W: Welte E., Szablos I. [red.]. *Fight against hunger through improved plant nutrition*. 145-150.
- Schaefer A. L., Lappala C. R., Morlen R. P., Pelletier D. A., Lu T. Y. S., Lankford P. K., Harwood C. S., Greenberg E. P. 2013. LuxR- and LuxI-type quorum-sensing circuits are prevalent in members of the *Populus deltoides* microbiome. *Applied Environmental Microbiology* 79: 5745-5752. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.01417-13>.
- Schaefer A. L., Oda Y., Coutinho B. G., Pelletier D., Weiburg J., Venturi V., Greenberg E. P., Harwood C. S. 2016. A LuxR homolog in a cottonwood tree endophyte that activates gene expression in response to a plant signal or specific peptides. *mBio* 7:e01101-16. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.01101-16>.
- Shishido M., Brevil C., Chanway C. P. 1999. Endophytic colonization of spruce by plant growth promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 29: 191-196. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00603.x>.
- Shishido M., Chanway C. P. 2000. Colonization and growth of outplanted spruce seedlings pre-inoculated with plant growth-promoting rhizobacteria in the greenhouse. *Canadian Journal of Forest Research* 30: 848-854. DOI: <https://doi.org/10.1139/x00-010>.
- 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. DOI: <https://doi.org/10.1139/m95-097>.
- Strzelczyk E. 2001. Endofity. Drobnoustroje środowiska glebowego, aspekty fizjologiczne, biochemiczne, genetyczne. W: Dahm H., Pokojńska-Burdziej A. [red.]. *Wydawnictwo Adam Marszałek, Toruń*. 97-107.
- Subba Rao N. S., Tilak K. V. B. R., Singh C. S. 1985. Effect of combined inoculation of *Azospirillum brasilense* and vesicular-arbuscular mycorrhiza on pearl millet (*Pennisetum americanum*). *Plant Soil* 84: 283-286.
- Taghavi A., Garafola C., Monchy S. 2009. Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Applied Environmental Microbiology* 75: 748-757.
- Taghavi S., Barac T., Greenberg B., Borremans B., Vangronsveld J., van der Lelie D. 2005. Horizontal gene transfer to endogenous endophytic bacteria from Poplar improves phytoremediation of toluene. *Applied Environmental Microbiology* 71: 8500-8505. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.71.12.8500-8505>.
- Tang Q., Puri A., Padda K. P., Chanway C. P. 2017. Biological nitrogen fixation and plant growth promotion of lodgepole pine by an endophytic diazotroph *Paenibacillus polymyxa* and its GFP-tagged derivative. *Botany* 95: 611-619. DOI: <https://doi.org/10.1139/cjb-2016-0300>.
- Ulrich K., Ulrich A., Ewald D. 2008. Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions. *FEMS Microbiology Ecology* 63: 169-180.
- Wang E. T., Tan Z. Y., Guo X. W. 2006. Diverse endophytic bacteria isolated from a leguminous tree *Conzattia multiflora* grown in Mexico. *Archives of Microbiology* 186: 251-259.
- Weyens N., Boulet J., Adriaenssens D. 2012. Contrasting colonization and plant growth promoting capacity between wild type and a gfp-derivate of the endophyte *Pseudomonas putida* W619 in hybrid poplar. *Plant Soil* 356: 217-230. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0831-x>.
- Weyens N., van der Lelie D., Taghavi S., Newman L., Vangronsveld J. 2009. Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation. *Trends in biotechnology* 27: 591-598. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.07.006>.

- Weyens N., Truyens S., Dupae J., Newman L., Taghavi S., van der Lelie D., Carleer R., Vangronsveld J. 2010. Potential of the TCE-degrading endophyte *Pseudomonas putida* W619-TCE to improve plant growth and reduce TCE phytotoxicity and evapotranspiration in poplar cuttings. *Environmental Pollution* 158: 2915-2919. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2010.06.004>.
- Yang H., Puri A., Padda K. P., Chanway C. P. 2016. Effects of *Paenibacillus polymyxa* inoculation and different soil nitrogen treatments on lodgepole pine seedling growth. *Canadian Journal of Forest Research* 46: 816-821. DOI: <https://doi.org/10.1139/cjfr-2015-0456>.