



Wydział Nauk Przyrodniczych
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Zespół Biochemii i Genetyki Mikroorganizmów

DARIA CHLEBEK

Identyfikacja i uwarunkowania genetyczne
antagonistycznych oddziaływań endofitycznych szczepów
***Pseudomonas fluorescens* BRZ63 i *Serratia quinivorans* KP32**
z fitopatogenami grzybowymi

PRACA DOKTORSKA

Promotor:

dr hab. Katarzyna Hupert-Kocurek, prof. UŚ
Uniwersytet Śląski w Katowicach

Promotor pomocniczy:

dr Magdalena Pacwa-Płociniczak
Uniwersytet Śląski w Katowicach

Katowice 2023

Słowa kluczowe: analiza genomu, bakterie endofityczne, biokontrola, fitopatogeny grzybowe, ekspresja genów, mechanizmy antagonistyczne, *Pseudomonas*, *Serratia*

Oświadczenie autora pracy

Ja, niżej podpisana/-y oświadczam, że:

- a) rozprawa doktorska pt.: „Identyfikacja i uwarunkowania genetyczne antagonistycznych oddziaływań endofitycznych szczepów *Pseudomonas fluorescens* BRZ63 i *Serratia quinivorans* KP32 z fitopatogenami grzybowymi”
jest wynikiem mojej działalności twórczej i powstała bez niedozwolonego udziału osób trzecich,
- b) wszystkie wykorzystane przez mnie materiały źródłowe i opracowania zostały w niej wymienione, a napisana przeze mnie praca nie narusza praw autorskich osób trzecich,
- c) artykuły naukowe wchodzące w skład pracy doktorskiej zostały opublikowane na licencji pozwalającej na ich opublikowanie w Biuletynie Informacji Publicznej*
- d) załączona wersja elektroniczna pracy jest tożsama z wydrukiem rozprawy.

*dotyczy rozpraw będących zbiorem opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych

Podpis autora pracy

Podziękowania

Serdeczne podziękowania składam Promotorowi niniejszej pracy, Pani dr hab. Katarzynie Hupert-Kocurek, prof. UŚ za opiekę naukową, nieocenioną pomoc od początku mojej drogi naukowej, zainteresowanie przedmiotem badań, przekazaną wiedzę, wyrozumiałość, cierpliwość, ogromną życzliwość, wsparcie i nieustanną wiarę we mnie.

Promotorowi Pomocniczemu, Pani dr Magdalenie Pacwie-Płociniczak, dziękuję za konsultacje, cenne uwagi i wskazówki.

Chciałabym także podziękować dr Bożenie Nowak za wszelką pomoc i dobre słowo w trudnych chwilach.

Składam również podziękowania współautorom publikacji naukowych oraz Pracownikom Zespołu Biochemii i Genetyki Mikroorganizmów.

Niniejszą pracę pragnę zadedykować mojej Rodzinie.

Część badań prezentowanych w rozprawie doktorskiej zostało wykonanych w ramach projektu *Badania molekularne wpływu grzybowych patogenów roślin na wybrane bakterie endofityczne wykazujące aktywność biologiczną* (OPUS20, UMO-2020/39/B/NZ9/00491) oraz projektu *Zastosowanie szczepów bakterii endofitycznych w ochronie przed grzybowymi patogenami rzepaku w hodowlach wazonowych* realizowanego w ramach programu MEiN "Inkubator Innowacyjności 4.0"(UŚ/5/II 4.0/2021).



SPIS TREŚCI

SPIS SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY	8
1. WSTĘP	10
2. PRZEGLĄD LITERATURY	12
2.1. Grzybowe patogeny roślin	12
2.2. Bakterie endofityczne	13
2.3. Endofity bakteryjne w biokontroli	14
2.4. Mechanizmy biokontroli u bakterii endofitycznych i ich podłoże genetyczne	16
2.4.1. Konkurencja o przestrzeń życiową i składniki pokarmowe	17
2.4.2. Antybioza	18
2.4.3. Produkcja enzymów litycznych	21
2.4.4. Produkcja lotnych związków	23
2.4.5. Indukowanie odporności systemicznej	25
2.4.6. Stymulacja wzrostu roślinnego gospodarza	26
2.5. Kolonizacja gospodarza roślinnego przez bakterie endofityczne	28
2.6. Cechy determinujące kolonizację rośliny	29
3. CELE PRACY	39
4. HIPOTEZY BADAWCZE	39
5. MATERIAŁY I METODY	40
5.1. Szczepy bakteryjne i warunki hodowli	40
5.2. Fitopatogeny grzybowe i warunki hodowli	40
5.3. Badania antagonistycznych oddziaływań bakterii endofitycznych wobec fitopatogenów grzybowych	41
5.3.1. Test podwójnej hodowli	41
5.3.2. Zdolność badanych szczepów do wydzielania do podłoża metabolitów hamujących wzrost fitopatogenów	42
5.3.3. Zdolność badanych szczepów do produkcji lotnych metabolitów	42
5.3.4. Ocena wpływu supernatantu pozyskanego z hodowli bakteryjnej na wzrost patogenów	42
5.4. Sekwencjonowanie i analiza funkcjonalna genomów badanych szczepów bakterii	43
5.5. Analiza filogenetyczna szczepu <i>P. fluorescens</i> BRZ63	44
5.6. Analiza filogenetyczna szczepu <i>S. quinivorans</i> KP32	44
5.7. Badanie właściwości potencjalnie warunkujących aktywność biologiczną badanych szczepów	44
5.7.1. Ocena zdolności produkcji sideroforów	44
5.7.2. Ocena zdolności do produkcji enzymów litycznych	45

5.7.3. Ocena zdolności do produkcji acetoiny i 2,3-butanodiolu.....	45
5.7.4. Ocena zdolności do produkcji cyjanowodoru	46
5.7.5. Ocena zdolności do produkcji kwasu indolilo-3-octowego	46
5.7.6. Ocena zdolności do produkcji kwasu salicylowego.....	46
5.7.7. Ocena zdolności do produkcji deaminazy ACC	47
5.7.8. Ocena zdolności do solubilizacji fosforanów.....	47
5.8. Ocena wpływu patogenów grzybowych na ekspresję wybranych genów u badanych szczepów bakterii.....	47
5.8.1. Przygotowanie filtratów grzybowych	47
5.8.2. Przygotowanie hodowli bakteryjnych z filtratami grzybowymi	48
5.8.3. Izolacja całkowitego RNA i synteza cDNA.....	48
5.8.4. Analiza ekspresji wybranych genów	48
5.9. Ocena wpływu patogenów na aktywność enzymów antyoksydacyjnych	52
5.10. Badanie właściwości warunkujących efektywną kolonizację roślin	52
5.10.1 Ocena zdolności do ruchu	52
5.10.2 Ocena zdolności do autoagregacji.....	53
5.10.3 Ocena zdolności do tworzenia biofilmu.....	53
5.10.4. Ocena zdolności do produkcji egzopolisacharydów	54
5.10.5. Ocena zdolności do produkcji AHL.....	54
5.10.6. Ocena zdolności do wykorzystywania związków organicznych jako źródło węgla i energii	55
5.11. Ocena zdolności badanych szczepów do kolonizacji roślin	56
5.11.1 Znakowanie badanych szczepów białkiem zielonej fluorescencji	56
5.11.2. Inokulacja nasion wyznakowanymi szczepami.....	57
5.11.3. Izolacja bakterii z inokulowanych roślin	57
5.11.4. Obserwacja kolonizacji roślin przez badane szczepy	58
5.12. Badanie wpływu badanych szczepów na wzrost i ochronę rzepaku.....	58
5.12.1. Przygotowanie mutantów rifampicynowych.....	58
5.12.2. Gleba	58
5.12.3. Przygotowanie inokulum wprowadzanego do gleby	59
5.12.4. Układy badawcze	59
5.12.5. Ocena przeżywalności bakterii w tkankach roślin i w glebie	59
5.13. Analiza statystyczna.....	60
6. WYNIKI	60
6.1. Określenie aktywności antagonistycznej wybranych szczepów bakterii endofitycznych wobec fitopatogenów grzybowych.....	60
6.2. Charakterystyka genomów i analiza filogenetyczna szczepu BRZ63 i KP32.....	64

6.3. Identyfikacja genów kluczowych dla biokontroli, promocji wzrostu roślin i kolonizacji roślin w genomach badanych szczepów bakterii	69
6.4. Identyfikacja mechanizmów warunkujących oddziaływania antagonistyczne za pomocą testów biochemicznych <i>in vitro</i>	78
6.5. Wpływ wybranych fitopatogenów grzybowych na ekspresję genów potencjalnie zaangażowanych w proces biokontroli u badanych szczepów bakterii	80
6.6. Biochemiczna charakterystyka badanych szczepów bakterii pod kątem cech niezbędnych w procesie kolonizacji roślin	87
6.7. Zdolność badanych szczepów bakterii do kolonizacji wewnętrznych tkanek roślin	89
6.8. Ocena wpływu badanych szczepów endofitycznych na wzrost i ochronę rzepaku przed chorobami grzybowymi	91
7. DYSKUSJA WYNIKÓW	94
8. WNIOSKI	109
STRESZCZENIE	110
SUMMARY	112
LITERATURA	114
ADDENDA	
A1. Genome mining and evaluation of the biocontrol potential of <i>Pseudomonas fluorescens</i> BRZ63, a new endophyte of oilseed rape (<i>Brassica napus</i> L.) against fungal pathogens	
A2. Genetic determinants of antagonistic interactions and the response of new endophytic strain <i>Serratia quinivorans</i> KP32 to fungal phytopathogens	
A3. Oświadczenia doktoranta i współautorów publikacji	

SPIS SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

2,4-DAPG	2,4-diacetylphloroglucinol	2,4-diacetylfloroglucyna
ACC	1-aminocyclopropane-1-carboxylate	kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksylowy
ACCD	1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase	deaminaza kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksylowego
BCAs	biological control agents	czynniki kontroli biologicznej
BGCs	biosynthetic gene clusters	klastry genów biosyntetycznych
CAS	chrome azurol S	podłoże z dodatkiem chrom azurołu S
CAT	catalase	katalaza
CAZy	carbohydrate-active enzymes	enzymy aktywne w stosunku do węglowodanów
CDS	coding DNA sequences	sekwencje kodujące
CE	carbohydrate esterases	esterazy węglowodanowe
CLPs	cyclic lipopeptides	cykliczne lipopetydy
COGs	cluster of orthologous groups	klastry grup ortologicznych
CRA	congo red	czerwień kongo
CV	crystal violet	fiolet krystaliczny
CWDEs	cell wall-degrading enzymes	enzymy degradujące ścianę komórkową
DHAS	indole-3-acetaldehyde dehydrogenase	dehydrogenaza indolo-3-acetaldehydowa
DHBA	dihydroxybenzoic Acid	kwas dihydroksybenzoesowy
DNS	3,5-dinitro salicylic acid	kwas 3,5-dinitrosalicylowy
eDNA	extracellular DNA	zewnątrzkomórkowe DNA
EGFP	enhanced green fluorescent protein	białko zielonej fluorescencji
EPSs	exopolysaccharides	egzopolisacharydy
ET	ethylene	etylen
GH	glycoside hydrolase	hydrolaza glikozydowa
HDTMA	hexadecyltrimethylammonium bromide	bromek heksadecylotrimetyloamoniowy
IAA	indole-3-acetic acid	kwas indolilo-3-octowy
IAN	indolyl-3-acetonitrile	indolilo-3- acetonitryl
IAM	indolyl-3-acetamide	indolilo-3-acetamidu
IPA	indolyl-3-pyruvate	kwas indolilo-3-pirogronowy
IPDC	indole pyruvate decarboxylase	dekarboksylaza indolopirogronianowa
ISR	induced systemic resistance	indukowana odporność systemiczna
JA	jasmonic acid	kwas jasmonowy
j.t.k	colony-forming unit	jednostki tworzące kolonie
LB	Luria-Bertani broth	bulion Luria-Bertani
LPS	lipopolysaccharide	lipopolisacharyd
		wzorce molekularne związane z mikroorganizmami
MAMP	microbe associated molecular pattern	
MCPs	methyl-accepting chemotaxis proteins	białka chemotaksji MCP
MFS	major facilitator superfamily	transportery z rodziny MFS
MSM	minimal salt medium	pożywka minimalna
<i>N</i> -AHL	<i>N</i> -acyl-homoserine lactones	<i>N</i> -acylowane laktony homoseryny
NRPS	nonribosomal peptide-synthetase	syntetaza nierybosomalnych peptydów
PAL	phenylalanine ammonium lyase	liaza amonowa fenyloalaniny
PAMP	pathogen associated molecular pattern	wzorce molekularne związane z patogenami
PDA	potato dextrose agar	agar ziemiaczno-glukozowy
PGI	percent growth inhibition	procent zahamowania wzrostu

PHZ	phenazine	fenazyzna
PLT	pyoluteorin	pioluteoryna
POX	peroxidase	peroksydaza
PPO	polyphenol oxidase	oksydaza polifenolowa
PQQ	pyrroloquinoline quinon	pirolochinolinochinon
PQQGDH	quinoprotein glucose dehydrogenase	dehydrogenaza chinoproteinowa glukozy
PRN	pyrrolnitrin	pirolnityna
PRPS	pathogenesis related proteins	białka związane z patogenezą
PSI	phosphate solubilizing index	indeks rozpuszczalności fosforanów
QS	<i>quorum sensing</i>	<i>quorum sensing</i>
RNS	reactive nitrogen species	reaktywne formy azotu
ROS	reactive oxygen species	reaktywne formy tlenu
SA	salicylic acid	kwasy salicylowy
SAM	S-adenosyl-methionine	S-adenozylometionina
SOD	superoxide dismutase	dysmutaza nadtlenkowa
SW	Surtherland-Wilkinson	pożywka Surtherland-Wilkinson
T2SS	type II secretion systems	system sekrecji typu II
T3SS	type III secretion system	system sekrecji typu III
T4PS	type IV pilus system	system pilusów typu IV
T6SS	type VI secretion systems	system sekrecji typu VI
TAM	tryptamine	tryptamina
TBDRs	TonB-dependent receptors	TonB-zależne receptory
TRP	tryptophan	tryptofan
VOCs	volatile organic compounds	lotne związki organiczne

**IDENTYFIKACJA I UWARUNKOWANIA GENETYCZNE
ANTAGONISTYCZNYCH ODDZIAŁYWAŃ ENDOFITYCZNYCH SZCZEPÓW
PSEUDOMONAS FLUORESCENS BRZ63 I *SERRATIA QUINIVORANS* KP32
Z FITOPATOGENAMI GRZYBOWYMI**

1. WSTĘP

Choroby roślin wywoływane przez patogeny glebowe, w tym grzyby, stanowią poważny problem w rolnictwie, powodując straty w plonach, jak również istotne zagrożenie dla bezpieczeństwa żywnościowego (Aktar i in., 2009; Yousaf i in., 2014; Han i in., 2022; Xia i in., 2022). Powszechną praktyką zwalczania patogenów jest stosowanie chemicznych środków ochrony roślin, które mają zapewnić odpowiednią jakość i wysokość plonów upraw (Ons i in., 2020; Vandana i in., 2021). Stosowanie tego typu związków budzi jednak coraz więcej kontrowersji, ponieważ prowadzi do poważnych problemów ekologicznych, w tym zanieczyszczenia środowiska, niszczenia ekosystemów oraz zaburzenia równowagi ekologicznej (Vandana i in., 2021; Xia i in., 2022). Ponadto regularne i długotrwałe stosowanie pestycydów, które często działają niespecyficzenie, skutkuje zwiększeniem oporności organizmów docelowych oraz rozprzestrzenianiem się w środowisku genów warunkujących oporność na stosowany pestycyd (Aktar i in., 2009; Bardin i in., 2015; Yang i in., 2020). W związku z powyższym koniecznym stało się poszukiwanie przyjaznych środowisku i alternatywnych dla pestycydów metod zwalczania fitopatogenów (Eljounajdi i in., 2016).

W ostatnich latach szczególną uwagę zwraca się na bakterie endofityczne (ang. *endophytic bacteria*), symbionty żyjące wewnątrz tkanek roślinnych, zdolne do promowania wzrostu gospodarza i zasiedlające tę samą niszę ekologiczną co fitopatogeny (Bakker i in., 2013; Verma i in., 2018). Warto podkreślić, iż ze względu na ścisłe interakcje z roślinami, organizmy te mają ogromny potencjał do wykorzystania ich jako aktywnych czynników ochrony biologicznej (BCAs, ang. *biological control agents*) (Liu i in., 2017; Chlebek i in., 2020).

Biokontrola fitopatogenów przez bakterie endofityczne jest wynikiem aktywności różnych mechanizmów, a rodzaj zaangażowanego mechanizmu jest często specyficzny dla szczepu bakterii i zależy od rodzaju interakcji zachodzących między antagonistą, patogenem i rośliną (Junaid i in., 2013; Saraf i in., 2014). Obok działania skierowanego bezpośrednio

przeciw fitopatogenom, istotne znaczenie ma również obecność u bakterii cech pozwalających im w sposób konkurencyjny skolonizować roślinę (Afzal i in., 2019; Chlebek i in., 2020; Vandana i in., 2021; Chlebek i in., 2022a).

Liczne badania prowadzone w celu określenia aktywności biologicznej bakterii endofitycznych wobec grzybowych patogenów roślin koncentrują się głównie na charakterystyce biochemicznej szczepów bakteryjnych i ocenie ich potencjału biokontroli poprzez testy antagonistyczne *in vitro*, podczas gdy wiedza dotycząca podłoża genetycznego interakcji zachodzących pomiędzy tymi organizmami a fitopatogenami oraz odpowiedzi bakterii endofitycznych na obecność grzybowych patogenów jest nadal ograniczona. Dogłębne poznanie i zrozumienie molekularnego podłoża antagonistycznych oddziaływań endofitów bakteryjnych wobec fitopatogennych grzybów, pozwoli na efektywne ich stosowanie jako czynników biokontroli.

2. PRZEGLĄD LITERATURY

2.1. Grzybowe patogeny roślin

Wśród patogenów roślin uprawnych najliczniejszą grupę stanowią patogeny grzybowe. Obniżenie plonów spowodowane przez choroby wywoływane przez te organizmy zostało udokumentowane dla wszystkich ważnych globalnie upraw, takich roślin jak: pszenica, ryż, kukurydza, ziemniak, soja czy rzepak (Savary i in., 2019; Frąc i in., 2022). Fitopatogeny grzybowe, wykorzystując rośliny jako środowisko życia i źródło substancji odżywczych, stanowią zagrożenie dla ich wzrostu i rozwoju (Olson i in., 2012). Do najważniejszych patogenów przenoszonych przez glebę należą: *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Verticillium dahliae*, *Sclerotinia* spp. i *Sclerotium rolfsii* wywołujące choroby zgorzelowe (Palmieri i in., 2022).

Rodzaj *Fusarium* obejmuje ponad 70 gatunków fitopatogennych grzybów i jest uważany za jeden z najważniejszych w kontekście jakości upraw, żywności i pasz. Wynika to zarówno z rozpowszechnienia tej grupy mikroorganizmów w różnych rejonach świata, jak i z ich szkodliwego wpływu na wiele upraw. Grzyby z rodzaju *Fusarium* powodują choroby zarówno zbóż, w tym pszenicy, pszenżyta, jęczmienia, żyta czy kukurydzy, jak i warzyw i owoców (Kotowicz i in., 2014). Patogeny te porażają rośliny w różnych stadiach rozwojowych, powodując fuzaryjną zgorzel podstawy źdźbła i korzeni, zgorzel siewek, zamieranie ziarna, fuzariozy kłosów i wiech owsa, czy fuzariozę kłosów pszenicy (Suchorzyńska i Misiewicz, 2009). Kluczową rolę podczas infekcji roślin przez te grzyby, odgrywają enzymy lipolityczne i proteolityczne, których aktywność prowadzi do nekrozy tkanek gospodarza (Suchorzyńska i Misiewicz, 2009). Mikroorganizmy te obniżają także bezpieczeństwo zdrowotne upraw, gdyż posiadają zdolność do produkcji wysoce niebezpiecznych i toksycznych metabolitów zwanych mykotoksynami fuzaryjnymi (Suchorzyńska i Misiewicz, 2009; Akhter i in., 2016).

Grzyby z gatunku *Rhizoctonia solani* są wszechobecnymi nekrotrofami glebowymi, które powodują szkody w wielu ważnych gospodarczo uprawach (Ajayi-Oyetunde i Bradley, 2017), wywołując zgorzel siewek lub zgniliznę korzeni, takich roślin jak: ziemniak, burak cukrowy, pomidor, ogórek czy rośliny krzyżowe, w tym kapusta i rzepak (Abdelghany i in., 2022). W patogenezie infekcji wywołanej przez *R. solani*, ważną rolę odgrywa wydzielanie enzymów detoksykujących reaktywne formy tlenu, enzymów lignocelulozowych oraz fitotoksyn (Yamamoto i in., 2019). Ponadto obfity wzrost strzępek tego grzyba warunkuje jego ścisły kontakt z powierzchnią roślinnego gospodarza (Tiwari i in., 2020).

Sclerotinia sclerotiorum należy do najbardziej niespecyficznych patogenów roślin o krótkiej fazie biotroficznej, z następującą po niej fazą nekrotroficzną (Sun i in., 2019). Patogen ten produkuje enzymy degradujące ścianę komórkową roślin oraz toksyny (Yu i in., 2017). W wyniku zakażenia *S. sclerotiorum*, na łodygach roślin pojawiają się plamy z nalotem białej, puszystej grzybni. Porażone przez patogeny liście mają ograniczone procesy asymilacji, a porażenie łodyg i korzeni powoduje ograniczenie przewodzenia substancji pokarmowych i wody, co przy dużym nasileniu choroby skutkuje wędnięciem i zamieraniem roślin.

Wśród grzybowych patogenów stanowiących poważne zagrożenie dla upraw, jak i przemysłu opartego na produktach roślinnych, należy wyróżnić także grzyby z gatunku *Colletotrichum dematium*, wywołujące antraknozy u ponad 3000 gatunków roślin (Yoshida i in., 2000). Fitotoksyny produkowane przez te grzyby przyczyniają się do zahamowania syntezy aminokwasów, co skutkuje pojawieniem się brązowych, nekrotycznych plam, smug lub aureol w tkance zakażonych roślin (Pusztahelyi i in., 2015).

2.2. Bakterie endofityczne

Pojęcie „endofit” pochodzi od dwóch greckich słów: „endon”, czyli „wewnątrz” i „phyton” - „roślina” (Waghunde i in., 2017). Termin ten został po raz pierwszy wprowadzony przez niemieckiego botanika Antona de Bary w 1886 r. dla określenia organizmów, które zasiedlają wewnętrzne tkanki roślin (Wilson, 1995). Obecnie w literaturze można spotkać wiele różnych definicji tej grupy mikroorganizmów. Powszechnie endofity definiuje się jako symbionty kolonizujące tkanki roślin bez powodowania jakichkolwiek objawów choroby, czy negatywnego wpływu na roślinnego gospodarza (Ryan i in., 2008; Tewari i in., 2018). Niektórzy autorzy proponują definicję funkcjonalną, uznając endofity za mikroorganizmy, które można wyizolować z powierzchniowo zdezynfekowanych tkanek roślinnych, niewykazujących objawów chorobowych (Hardoim i in., 2015; Chlebek i Hupert-Kocurek, 2019).

Ze względu na ściśle oddziaływanie endofitów z roślinnym gospodarzem wprowadzono ich podział na trzy główne grupy: endofity obligatoryjne, bytujące tylko i wyłącznie we wnętrzu rośliny, endofity fakultatywne, które mogą bytować we wnętrzu rośliny, jak też w innych środowiskach oraz endofity oportunistyczne, mikroorganizmy które przypadkowo wnikają do tkanek roślinnych, lecz nie posiadają odpowiednich genów umożliwiających im ich skuteczną kolonizację (Hardoim i in., 2008; Pisarska i Pietr, 2014).

Dane literaturowe potwierdzają hipotezę, iż w świecie roślin nie występują gatunki, które pozbawione byłyby specyficznej mikroflory endofitycznej (Hong i in., 2016). Wiele

roślin uprawnych zdolnych jest do nawiązania asocjacji z endofitycznymi bakteriami, jak i grzybami, dzięki którym poprawia się ich wzrost, zwiększa plonowanie, a także odporność na różnego rodzaju czynniki stresowe (Kumar i in., 2019a; Wen i in., 2022). Wykazano, że w jednym gospodarzu roślinnym może bytować od jednego do kilku różnych gatunków bakterii endofitycznych (Kumar i in., 2019a). Bakterie te izolowano z korzeni, łodyg i liści. Co więcej, ich obecność stwierdzono również w kwiatach, owocach czy nasionach (Hong i in., 2016; Tewari i in., 2018). Największą liczebność tych mikroorganizmów (10^5 do 10^7 j.t.k. g^{-1} świeżej masy) obserwowano w korzeniach badanych roślin (Rosenblueth i Martínez-Romero, 2006). Liczebność bakterii w liściach i łodygach wynosiła od 10^3 do 10^4 j.t.k. g^{-1} , a w kwiatach, owocach i nasionach zazwyczaj od 10^2 do 10^3 j.t.k. g^{-1} (Compant i in., 2010).

Większość znanych i opisanych dotąd bakterii endofitycznych zaliczanych jest do typu *Proteobacteria*, w tym klasy α -, β - i γ -*Proteobacteria*, z których γ -*Proteobacteria* jest najbardziej zróżnicowana i dominująca (Afzal i in., 2019), w dużej mierze reprezentowana przez kilka rodzajów bakterii: *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter* i *Serratia* (Bulgari i in., 2019; Schmidt i in., 2021). Mniej powszechne są endofity należące do typów: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* i *Firmicutes* (Reinhold-Hurek i Hurek, 2011), a najrzadziej spotykane należą do typów: *Acidobacteria*, *Planctomycetes* i *Verrucomicrobia* (Santoyo i in., 2016). Warto podkreślić, iż populacja i różnorodność endofitów obecnych w roślinach jest zmienna, uzależniona głównie od rodzaju zasiedlanej tkanki, fazy rozwoju, genotypu i stanu fizjologicznego rośliny oraz struktury fizykochemicznej gleby i warunków środowiskowych (Mercado-Blanco i Lugtenberg, 2014; Eljounadi i in., 2016; Schmidt i in., 2021).

2.3. Endofity bakteryjne w biokontroli

Powszechną praktyką zwalczania patogenów wielu roślin uprawnych jest stosowanie chemicznych środków ochrony. Jednakże, zgodnie z ogólnymi zasadami integrowanej ochrony roślin, nad chemiczne metody zwalczania patogenów grzybowych przedkładać należy m.in. metody biologiczne, w tym te oparte na interakcjach zachodzących pomiędzy mikroorganizmami patogennymi, a mikroorganizmami mogącymi sprawować nad nimi kontrolę. Dlatego też nieustannie trwają poszukiwania i badania nad mikroorganizmami efektywnie zwalczającymi szkodniki i patogeny roślin, które mogłyby być wykorzystane jako aktywne składniki biopestycydów.

Oprócz znanych i szeroko badanych zdolności w zakresie promowania wzrostu i rozwoju roślin (Santoyo i in., 2016), bakterie endofityczne znane są ze swojej aktywności

przeciwdrobnoustrojowej (Eljounadi i in., 2016; Afzal i in., 2019; Chlebek i in., 2022b; Xia i in., 2022) i mogą być wykorzystywane w ochronie roślin przed różnymi patogenami (Eljounadi i in., 2016; Tewari i in., 2018; Wu i in., 2019; Xia i in., 2022). Ochrona, w której pośredniczą mikroorganizmy endofityczne, zapewnia roślinom dodatkowe korzyści w porównaniu z ochroną jaką zapewniają jej mikroorganizmy glebowe, ryzosferowe czy zasiedlające powierzchnię nadziemnych części roślin, co wynika ze ścisłych oddziaływań endofitów z roślinami (Kandel i in., 2017a). Oddziaływania te dają bowiem możliwość stałego kontaktu z komórkami roślinnymi, ułatwiając wywieranie bezpośredniego, korzystnego wpływu (Wang i in., 2014; Chlebek i in., 2020; Morales-Cedeño i in., 2021). Sugeruje się również, że endofity mogą być bardziej wydajne w ochronie roślin, ponieważ kolonizując wewnętrzne tkanki są chronione przed wieloma stresorami abiotycznymi (Hardoim i in., 2015). Mogą one ponadto przyczyniać się do ogólnoustrojowej odporności roślin (Sandhya i in., 2017), jak również, kolonizując nasiona, wspomagać proces ich kiełkowania (Li i in., 2019).

W wielu badaniach wykazano skuteczną aktywność endofitów bakteryjnych wobec fitopatogenów grzybowych, które są trudne do zwalczania ze względu na ich zróżnicowane spektrum żywicieli i penetrację do wewnętrznych tkanek roślin (Toffolatti i in., 2010; Hazarika i in., 2019). Bakterie endofityczne hamują wzrost wielu powszechnych fitopatogenów z rodzajów: *Alternaria*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Ganoderma*, *Gaeumannomyces*, *Fusarium*, *Magnaporthe*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Sclerotium* i *Verticillium* (Amersan i in., 2014; Wang i in., 2014; Martínez-García i in., 2015; Mousa i Raizada., 2015; Ramli i in., 2016; Hazarika i in., 2019; Chlebek i in., 2020; Chaouachi i in., 2021; Morales-Cedeño i in., 2021; Schmidt i in., 2021). Przykłady bakterii endofitycznych hamujących wzrost fitopatogennych grzybów przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Przykłady bakterii endofitycznych hamujących wzrost wybranych grzybowych fitopatogenów

Bakteria endofityczna	Roślinny gospodarz	Grzybowy fitopatogen	Źródło literaturowe
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Bacillus megaterium</i>	<i>Piper nigrum</i> L.	<i>Phytophthora capsici</i>	Aravind i in., 2009
<i>Serratia</i> sp. G3	<i>Triticum aestivum</i> L.	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Cryphonectria parasitica</i> , <i>Rhizoctonia cerealis</i> i <i>Valsa sordida</i>	Liu i in., 2010
<i>Enterobacter</i> HA02	<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>Verticillium dahliae</i>	Li i in., 2012
<i>Serratia proteamaculans</i> 336x	<i>Triticum aestivum</i> L.	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	Wang i in., 2014
<i>Bacillus subtilis</i> BECS7, <i>Bacillus licheniformis</i> BECL5, <i>Achromobacter</i> sp. BECS4	<i>Capsicum annuum</i>	<i>Sclerotium rolfsii</i>	Amasesan i in., 2014
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BacDOB-E19	<i>Curcuma longa</i> L.	<i>Pythium aphanidermatum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i>	Vinayarani i Prakash, 2018
<i>Pseudomonas fluorescens</i> PICF7	<i>Olea europaea</i> L.	<i>Verticillium dahliae</i>	Martínez-García i in., 2015
<i>Bacillus megaterium</i> (BM1), <i>Bacillus subtilis</i> (BS43, BSM0, BSM2)	<i>Triticum aestivum</i> L.	<i>Fusarium graminearum</i>	Pan i in., 2015
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GanoEB1, <i>Burkholderia cepacia</i> GanoEB2	<i>Elaeis guineensis</i>	<i>Ganoderma boninense</i>	Ramli i in., 2016
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> H8	<i>Brassica oleracea</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Selim i in., 2016
<i>Bacillus subtilis</i> H18	<i>Capsicum annuum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Selim i in., 2016
<i>Bacillus subtilis</i> strain 330-2	<i>Brassica napus</i> L.	<i>Alternaria alternata</i>	Ahmad i in., 2017
<i>Rahnella aquatilis</i> B16C, <i>Pseudomonas yamanorum</i> B12, <i>Pseudomonas fluorescens</i> B8P	<i>Faba bean</i>	<i>Fusarium solani</i>	Bahroun i in., 2018
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BDR-2, <i>Bacillus subtilis</i> BRtL-2	<i>Ocimum gratissimum</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Ansary i in., 2018
<i>Bacillus subtilis</i> SCB-1	<i>Saccharum officinarum</i>	<i>Saccharicola</i> , <i>Cochliobolus</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Fusarium</i>	Hazarika i in., 2019
<i>Pseudomonas putida</i> BP25	<i>Piper nigrum</i> L.	<i>Magnaporthe oryzae</i>	Ashajyothi i in., 2020
<i>Serratia plymuthica</i> HRO-48	<i>Brassica napus</i> L.	<i>Verticillium dahliae</i> , <i>Phoma lingam</i>	Schmidt i in., 2021
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Zea mays</i> L.	<i>Botrytis cinerea</i>	Bolivar-Anillo i in., 2021
<i>Bacillus</i> sp., <i>Enterobacter</i> sp.	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	<i>Botrytis cinerea</i>	Chauachi i in., 2021
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B2	<i>Cucumis sativus</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i> P5	Wang i in., 2021
<i>Bacillus</i> sp., <i>Pantoea</i> sp.	<i>Fragaria ananassa</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Moura i in., 2021

2.4. Mechanizmy biokontroli u bakterii endofitycznych i ich podłoże genetyczne

Skuteczna biokontrola fitopatogenów przez bakterie endofityczne jest wynikiem działania kilku kluczowych mechanizmów, które obejmują: (1) konkurowanie z patogenami o niszę i składniki odżywcze, (2) antybiozę, (3) biosyntezę enzymów litycznych, (4) biosyntezę lotnych związków, (5) indukowanie odporności systemicznej oraz (6) stymulowanie wzrostu roślinnego gospodarza (Compant i in., 2010; Santoyo i in., 2016; Liu i in., 2017; Verma i in., 2018; Xia i in., 2022; Chlebek i in., 2022a). Mechanizmy te mogą funkcjonować razem, prowadząc do synergistycznego działania hamującego wzrost i rozwój fitopatogenów.

2.4.1. Konkurencja o przestrzeń życiową i składniki pokarmowe

Rywalizacja bakterii endofitycznych z drobnoustrojami chorobotwórczymi o niszę i składniki odżywcze jest jednym z najistotniejszych mechanizmów zwalczania chorób roślin (Xia i in., 2022). Antagonista, lepiej niż patogen, powinien przystosowywać się do warunków środowiska oraz posiadać zdolność do szybkiego namnażania się przy niskich stężeniach składników odżywczych (Dalvi i in., 2017).

Szczególnym przypadkiem hamowania wzrostu patogenów na drodze konkurencji jest rywalizacja o żelazo (Fe), będące mikroelementem niezbędnym dla wzrostu i rozwoju wszystkich organizmów. Pomimo tego, że występuje ono w glebie w dużej ilości, jest mało dostępne dla roślin, które słabo radzą sobie z pobieraniem jonów Fe^{3+} (Vandana i in., 2021; Chlebek i in., 2022b). Bakterie endofityczne, jak i ryzosferowe, mogą pełnić istotną rolę zarówno w zwiększaniu dostępności Fe dla roślin, jak i ograniczaniu dostępności tego pierwiastka dla fitopatogenów, w wyniku czego hamują ich wzrost i rozwój (Khan i in., 2013; Jacob i in., 2020). Z drugiej strony, mogą one sekwestrować Fe^{3+} wokół korzeni roślin do toksycznego poziomu, co również uniemożliwia patogenom przeżycie w takim środowisku (Sayyed i Patel, 2011; Singh i in., 2019). Zmiana dostępności żelaza w środowisku wynika ze zdolności mikroorganizmów do produkcji sideroforów, związków o niskiej masie cząsteczkowej (500-1500 Daltonów) i silnym powinowactwie do jonów Fe^{3+} . Ze względu na rodzaj grup chelatujących żelazo, cząsteczki te można podzielić na trzy grupy: (1) siderofory katecholowe, do których należy produkowana przez *Enterobacter* sp. J49, *Enterobacter* sp. SA187 i *Serratia marcescens* W225 enterobaktyna (Ludueña i in., 2019; Weakland i in., 2020); (2) siderofory hydroksyamowe, wśród których wyróżniamy alkaligin syntetyzowany przez szczep *Alcaligenes denitrificans* i aerobaktynę produkowaną przez *Serratia grimesii* BXF1 (Nascimento i in., 2018; Jacob i in., 2020) oraz (3) siderofory mieszane, do których należą: mykobaktyna szczepu *Mycobacterium tuberculosis* oraz piowerdyna i rizobaktyna produkowane odpowiednio przez endofityczne szczepy *Pseudomonas fluorescens* PICF7 i *Bacillus licheniformis* GL174 (Maldonado-González i in., 2015; Nigris i in., 2018; Eida i in., 2020). Biosynteza sideroforów jest ściśle regulowana przez wrażliwe na żelazo białka Fur, globalne regulatory GacS i GacA, czynniki sigma RpoS, PvdS i FpvI oraz AHLs (ang. *acetylhomoserine lactones*) (Compant i in., 2005).

O znaczeniu sideroforów w biokontroli patogenów przez bakterie endofityczne świadczą wyniki analiz ich genomów, które wykazały trzykrotnie wyższą częstość występowania genów związanych z biosyntezą sideroforów i sześciokrotnie wyższą częstość występowania genów rozpoznających i transportujących siderofory u tych organizmów, w porównaniu z patogenami (Jacob i in., 2020; Eida i in., 2020). Stwierdzono również,

że szczepy pozbawione klastrów genów zaangażowanych w biosyntezę tych związków mają większą liczbę genów kodujących receptory błonowe do wychwytywania kompleksów Fe-siderofor obecnych w środowisku (Hardoim i in., 2015).

Obecność genów zaangażowanych w syntezę różnego typu sideroforów wykazano w genomach wielu bakterii endofitycznych. Przykładowo, analiza genomu szczepu *Cronobacter* sp. JZ38 ujawniła obecność genów zaangażowanych w biosyntezę enterobaktyny (*entABCDEF*) i aerobaktyny (*iucABCD*). Wykazano również obecność genów odpowiedzialnych za sekrecję i ekstrakcję enterobaktyny (*entS* i *fes*), genów kodujących kompleksy wychwytu Fe-enterobaktyna i regulator sideroforowy (*ahpC*). Stwierdzono także obecność genów kodujących systemy pobierania żelaza (*feoABC* i *efeUOB*) oraz dużą liczbę genów transporterów ABC, MFS (ang. *major facilitator superfamily*) i białek receptorowych. Interesującą cechą endofitycznych szczepów *Burkholderia* WP40 i WP42 jest natomiast obecność klastra genów ornibaktyny (*orb*) (Kandel i in., 2017a). Z kolei, u wielu bakterii endofitycznych z rodzaju *Pseudomonas* wykazano obecność genów związanych z produkcją piowerdyny (Chlebek i in., 2020; Jin i in., 2022). Biosynteza piowerdyny jest złożonym procesem obejmującym 12 różnych białek. Synteza części peptydowej piowerdyny jest katalizowana przez wieloskładnikowe, cytoplazmatyczne kompleksy białkowe NRPSs (ang. *non-ribosomal peptide synthetases*), enzymy złożone z kilku modułów zawierających domeny katalityczne odpowiedzialne za aktywację substratów, katalizę wiązań peptydowych oraz uwalnianie i cyklizację, i ewentualną modyfikację produktu (Miller i Gulick, 2016). W syntezę piowerdyny zaangażowane są NRPSs, takie jak: PvdI, PvdJ i PvdD, które syntetyzują łańcuch peptydowy i PvdL syntetyzujący chromofor (Hartney i in., 2013). Geny *pvd* związane z biosyntezą piowerdyny są zlokalizowane w jednym dużym klastrze w genomie *P. syringae* DC3000, dwóch klastrach u *P. aeruginosa* PAO1 i trzech u *P. fluorescens* Pf0-1 i *P. putida* KT2440 (Jin i in., 2022).

2.4.2. Antybioza

W grupie bakterii wykazujących antagonizm wobec fitopatogenów pochodzenia grzybowego, antybioza jest prawdopodobnie głównym mechanizmem biokontroli (Liu i in., 2017; Aloo i in., 2022; Narayanan i Glick, 2022). Wiele szczepów z rodzaju *Pseudomonas* jest znanych z wytwarzania szerokiej gamy antybiotyków, takich jak: fenazyny (PHZ), pirolnityna (PRN), 2,4-diacetylofloroglucynol (2,4-DAPG), pioluteoryna (PLT), amfizyna, oomycyna A, tensyna, tropolon czy cykliczne lipopeptydy (Compant i in., 2005; Jha i in., 2015). Antybiotyki z grupy fenazyn wykazują antagonizm wobec zróżnicowanej grupy

fitopatogennych grzybów oraz Gram-dodatnich i Gram-ujemnych patogenów bakteryjnych (Vandana i in., 2021). Z kolei, PRN, produkowana przez bakterie z rodzaju *Pseudomonas*, wykazuje antagonizm wobec szerokiej gamy grzybów, w tym niektórych fitopatogenów, takich jak *Botrytis cinerea*, *R. solani*, *S. sclerotiorum* i *V. dahliae* (Vandana i in., 2021). Inny antybiotyk, 2,4-DAPG, wykazuje działanie przeciwbakteryjne, przeciwgrzybowe, przeciw pasożytnicze i przeciwwirusowe, a PLT skutecznie hamuje choroby wywołane przez *Pythium ultimum* i *R. solani* (Morales-Cedeño i in., 2021). Wydzielanie wymienionych antybiotyków przez bakterie jest związane z obecnością w ich komórkach specyficznego systemu wydzielniczego typu VI (T6SS) (Chen i in., 2015), a mechanizm ich działania polega na hamowaniu syntezy ściany komórkowej, inhibicji syntezy DNA, deformacji błon komórkowych lub hamowaniu biosyntezy białek patogena (Kenawy i in., 2019).

Warto zwrócić uwagę na podłoże molekularne związane z biosyntezą powyższych antybiotyków. Przykładowo, u bakterii z gatunku *P. fluorescens*, w biosyntezę pirolnitriny zaangażowany jest operon *pmABCD* (Mousa i Raizada, 2015). W genomie endofitycznego szczepu *P. fluorescens* ALEB7B zidentyfikowano natomiast klaster genów *phIHGFACBDE* kodujący białka zaangażowane w produkcję 2,4-DAPG (Zhou i in., 2014). Białko PhID umożliwia syntezę monoacetylofloroglucynolu, który transformowany jest następnie do 2,4-DAPG przez białka PhIA, PhIB i PhIC. Operon *phIABCD* otoczony jest genami *phIE* i *phIF*, kodującymi odpowiednio eksporter toksycznych intermediatów degradacji 2,4-DAPG i represor transkrypcji operonu *phIABCD* (Mavrodi i in., 2001; Lai i in., 2022). W genomach wielu bakterii z gatunku *P. fluorescens* wykazano także obecność genów kodujących białka zaangażowane w produkcję fenazy (geny operonu *phzABCDEFG*) oraz genów kodujących białka zaangażowane w produkcję jej pochodnych, takie jak: PhzM, PhzS i PhzH (Recinos i in., 2012). Co ciekawe, geny *phzF* i *ubiC* kodujące enzymy zaangażowane w biosyntezę odpowiednio fenazy i 4-hydroksybenzoenu zidentyfikowano także w genomie szczepu *Enterobacter* sp. SA187 (Andrés-Barrao i in., 2017). Szczepy należące do rodzaju *Serratia* zdolne są natomiast do produkcji poliketydów i peptydów nierybosomalnych o silnym działaniu antagonistycznym przeciwko fitopatogenom (Petersen i Tisa, 2013). Liu i in. (2010) wykryli gen *pmC* zaangażowany w produkcję pirolnitriny w genomie *Serratia* sp. G3, szczepu wykazującego szerokie spektrum działania przeciwgrzybowego wobec takim fitopatogenom jak: *B. cinerea*, *Cryphonectria parasitica*, *R. cerealis* i *Valsa sordida*. Ponadto szczepy z rodzaju *Serratia* znane są z produkcji prodigiozyny, której biosyntezę determinuje obecność w genomach tych bakterii operonu *pig* (Sakuraoka i in., 2019). Przykładowo, badania przeprowadzone przez Tan i in. (2015) dowiodły, iż endofityczny szczep *S. marcescens* ITBB B5-1 wykazywał wysoki potencjał

biologicznego zwalczania choroby bananowca powodowanej przez grzyby z rodzaju *Fusarium*, a jego aktywność biologiczna związana była z produkcją prodigiozyny.

Antagonistyczny potencjał wobec szerokiej gamy fitopatogennych grzybów i bakterii, wynikający ze zdolności do produkcji antybiotyków, wykazują również bakterie należące do rodzaju *Bacillus* (Saraf i in., 2014; Gond i in., 2015). Przykładowo badania Gonda i in. (2014) wykazały, że szczep *Bacillus subtilis* SG JW.03 wyizolowany z kukurydzy, zwalczający *Fusarium moniliforme*, jest zdolny do syntezy antybiotyków, takich jak ituryna A i fengicyna. W genomie tego szczepu potwierdzono obecność genu *ituD* zaangażowanego w biosyntezę ituryny A oraz genu *fenD* zaangażowanego w biosyntezę fungicyny. Z kolei badania Jeong i in. (2014) wykazały obecność w genomie szczepu *B. pumilus* INR7, chroniącego *Cucumis* L. przed *Colletotrichum orbiculare*, genów związanych z produkcją surfaktyny i bacilibaktyny.

Regulacja biosyntezy antybiotyków u wielu bakterii Gram-ujemnych zachodzi poprzez dwuskładnikowy system GacS/GacA składający się z sensorycznej kinazy histydynowej GacS i regulatora odpowiedzi GacA, który jest wysoce konserwatywny u γ -proteobakterii. W systemie tym, wrażliwa na sygnał środowiskowy kinaza aktywuje, poprzez fosforylację, regulator transkrypcji GacA, który z kolei wyzwała ekspresję genów docelowych. Poza wspomnianym systemem, wiele genów syntezy antybiotyków regulowanych jest przez system *QS* (ang. *Quorum Sensing*), w którym pośredniczą cząsteczki AHLs, czy przez czynniki RpoS i RpoD (Compnat i in., 2005; Li i in., 2015).

W ostatniej dekadzie coraz intensywniej bada się rolę biosurfaktantów, zwłaszcza cyklicznych lipopetydów (CLPs, ang. *cyclic lipopeptides*), przyczyniających się do biologicznej aktywności bakterii związanych z roślinami, głównie szczepów z rodzaju *Pseudomonas* (Jacob i in., 2020; Oni i in., 2022). CLPs są powierzchniowo czynnymi metabolitami syntetyzowanymi przez syntetazy NRPSs. Strukturalnie, utworzone CLPs zawierają cykliczny pierścień laktonowy połączony z ogonem kwasu tłuszczowego. Cząsteczki te pośredniczą w wielu funkcjach biologicznych, m.in. w tworzeniu biofilmu, ruchliwości, właściwościach przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybowych. Co istotne, CLPs wytwarzane przez określone gatunki, głównie: *P. syringae*, *P. fluorescens*, *P. putida* i *P. asplenii* (Oni i in., 2022) mogą przyczyniać się również do zwalczania grzybowych fitopatogenów. Przykładowo udowodniono, iż istotną rolę w zwalczaniu patogenów mogą pełnić wiskozyny. Dowiedziono, że wiskozynoamid produkowany przez *P. fluorescens* DR54, ograniczał wzrost i rozwój grzybnii *P. ultimum* i *R. solani* (Thrane i in., 2000). Badania przeprowadzone przez Thrane i in. (2001) wykazały, iż wiskozynoamid jest również kluczowy w kontroli zgnilizny buraka cukrowego wywoływanej przez *R. solani*.

W produkcję wiskozyn należących do CLPs zaangażowany jest operon *visc* zawierający trzy geny kodujące NRPSs, z których inicjacyjny gen, *viscA*, jest zlokalizowany daleko od pozostałych dwóch genów *viscB* i *viscC*. Badania przeprowadzone przez Bruijn i in. (2007) wykazały, że każdy z trzech zidentyfikowanych genów operonu *visc* jest niezbędny do wytwarzania CLPs, a białko GacS jest kluczowym elementem w regulacji syntezy CLPs u szczepu *P. fluorescens* SBW25.

Oprócz CLPs, innymi ważnymi w biokontroli biosurfaktantami są również ramnolipidy oddziałujące na lipidy w komórce i zmieniające płynność błony. Goswami i in. (2015) wykazali, że ramnolipid produkowany przez *P. aeruginosa* DS9 ma silne działanie przeciwgrzybowe wobec *Colletotrichum falcatum*, co może stwarzać możliwość jego zastosowania jako alternatywnego fungicydu do zwalczania czerwonej zgnilizny trzciny cukrowej. Abalos i in. (2001) badali przeciwgrzybowe działanie ramnolipidów, wytwarzanych przez szczep *P. aeruginosa* AT10, które wykazywały aktywność hamującą wobec *A. niger*, *B. cinerea*, *C. gloesporioides*, *Fusarium solani*, *Gliocadium virens*, *R. solani* oraz dwóch szczepów z rodzaju *Penicillium*. W innych badaniach ramnolipidy wytwarzane przez szczepy *Pseudomonas* hamowały wzrost *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* i *S. epidermidis* (Das i in., 2014).

2.4.3. Produkcja enzymów litycznych

Wytwarzanie enzymów litycznych, w szczególności chitynaz, β -1,3-glukanaz i proteaz, hydrolizujących odpowiednio wiązania glikozydowe i peptydowe łączące polisacharydy i białka ściany komórkowej fitopatogenów grzybowych, uważa się za jedną z ważniejszych właściwości bakterii antagonistycznych (Kumar i in., 2019a; Aloo i in., 2022; Dimkić i in., 2022).

Chitynazy są białkami enzymatycznymi należącymi do grupy hydrolaz glikozydowych (GH), podzielonej na rodziny, na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasowych GH różnych grup organizmów. Chitynazy bakteryjne należą do rodzin GH18 i GH19. Enzymy te katalizują hydrolizę wiązań β -glikozydowych pomiędzy węglem C1 i C4 dwóch sąsiednich N-acetyloglukozamin w łańcuchu chityny (Daulagala, 2021; Dimkić i in., 2022). Prowadzi to zarówno do inhibicji kiełkowania zarodników, wzrostu i morfogenezy strzępek grzybów, jak też do stymulacji układu odpornościowego rośliny, a produkty rozpadu chityny mogą zostać wykorzystane przez endofity, jako źródło węgla i energii (Wang i in., 2014). Wykazano, że stopień zahamowania wzrostu grzyba jest uzależniony od bakterii syntetyzującej enzym oraz od gatunku patogena (Aloo i in., 2022). Chitynolityczne bakterie należą głównie do rodzajów *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*

oraz *Serratia* (Compant i in., 2005; Shehata i in., 2016). Przykładowo, aktywność antagonistyczna szczepu *Pseudomonas* sp. PGC2 wobec *R. solani* związana jest z produkcją enzymów litycznych, w tym chitynazy (Arora i in., 2008). W innych badaniach wykazano, iż zdolność do produkcji i wydzielania pozakomórkowej chitynazy w miejscu penetracji grzyba, jest kluczowa w procesie hamowania wzrostu *Sclerotium rolfsii* przez *S. marcescens* (Compant i in., 2005) oraz w efektywnej inhibicji wzrostu *A. parasiticus* przez endofityczny szczep *S. marcescens* JPPI (Daulagala, 2021). Szeroko zakrojone badania homologów genu *chiA* kodującego chitynazę, dostarczyły bezpośrednich dowodów na udział tego enzymu w biologicznej aktywności endofitycznego szczepu *S. proteamaculans* 568 (Purushotham i in., 2012). Innym przykładem może być, wyizolowany z korzeni pszenicy, szczep *S. proteamaculans* 336x, będący skutecznym antagonistą *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, w genomie, którego wykazano obecność genu *chiI* (homolog *chiB*) związanego z aktywnością chitynaz (Wang i in., 2012; Wang i in., 2014). Z kolei, chitynolityczna aktywność szczepu *P. aeruginosa* B-18, antagonisty *Sporosorium scitamineum*, wynikała z obecności genu *nagA* (Singh i in., 2021).

Rolę enzymów hydrolitycznych w tłumieniu chorób grzybowych potwierdziły również badania nad inaktywacją genów kodujących określone enzymy. Na przykład, zmutowane szczepy *S. marcescens* ze zinaktywowanym genem kodującym chitynazę (ChiA) były mniej skuteczne w kontrolowaniu *Fusarium* w warunkach szklarniowych, a wprowadzenie tego genu do innych drobnoustrojów powodowało wzrost ich aktywności biologicznej (Jones i in., 1986). Podobnie mutant szczepu *Burkholderia gladioli* 3A12 o obniżonej aktywności chitynolitycznej wykazywał mniejszą efektywność hamowania wzrostu *Sclerotinia homeocarpa* (Shehata i in., 2016).

Podobnie, jak w przypadku syntezy sideroforów i antybiotyków, regulacja biosyntezy enzymów litycznych (w szczególności proteaz i chitynaz) obejmuje układy regulacyjne GacA/GacS lub GrrA/GrrS (Compant i in., 2005).

Innym, ciekawym mechanizmem ochrony roślin przed infekcjami grzybowymi jest produkcja dehydrogenazy mannitolowej (Taghavi i in., 2009). Mannitol jest prawdopodobnie jednym z najliczniej występujących polioli w przyrodzie. Jest produkowany zarówno przez rośliny, jak i mikroorganizmy, w tym grzyby. Wykazano, że wiele grzybów chorobotwórczych wydziela mannitol podczas infekcji roślin, co blokuje odpowiedź ich układu odpornościowego (Wu i in., 2011b). Część roślin zdolnych jest do obrony przed infekcją grzybami produkującymi mannitol, poprzez syntezę dehydrogenazy, ale aktywność tego enzymu jest zwykle niska i niewystarczająca by powstrzymać rozwój infekcji (Patel i Williamson, 2016). Jednakże zdolność do wytwarzania tego enzymu mogą

wykazywać również bakterie endofityczne, które poprzez degradację mannitolu i jego wychwyty ze środowiska, zwiększają podatność grzybów na stres środowiskowy i wspomagają aktywność układu odpornościowego rośliny (Taghavi i in., 2009). Geny, które kodują dehydrogenazę mannitolu (*mltD*), transporter ABC mannitolu (*mltKGFE*), aktywator transkrypcji (*mltR*), fruktokinazę (*mltZ*) i ksylulokinazę (*mltY*) zidentyfikowano w genomie endofitycznego szczepu *P. putida* W619 (Wu i in., 2011b).

2.4.4. Produkcja lotnych związków

Wyniki wielu badań wskazują na istotną rolę lotnych związków (organicznych i nieorganicznych) produkowanych przez bakterie, w zwalczaniu grzybowych patogenów roślin (Rudrappa i in., 2008; Delgado i in., 2021; Vandana i in., 2021).

Lotne związki organiczne (VOCs, ang. *volatile organic compounds*) produkowane przez bakterie należą do różnych klas chemicznych, w tym alkenów, alkoholi, ketonów, benzenoidów, pirazyny, siarczków i terpenów (Schulz-Bohm i in., 2018). Odgrywają znaczącą rolę w antagonistycznych interakcjach między mikroorganizmami zajmującymi tę samą niszę ekologiczną (Popova i in., 2014). Są one związkami o niskiej masie cząsteczkowej (100-500 Daltonów), wysokiej prężności par i niskiej temperaturze wrzenia. Właściwości te ułatwiają parowanie i dyfuzję przez pory wypełnione wodą i gazem w środowisku gleby i ryzosfery (Delgado i in., 2021). Jednakże, aby związki te wywierały jakikolwiek hamujący wpływ na patogeny, wymagana jest ich akumulacja wokół korzenia, umożliwiająca interakcje między bakteriami a patogenami. Wysoka aktywność przeciwgrzybowa tej grupy związków jest często powiązana z szerokim zakresem emitowanych VOCs. Przykładowo, *B. amyloliquefaciens* L3 produkuje czternaście specyficznych VOCs, z których jedenaście wykazywało działanie grzybobójcze wobec *F. oxysporum* (Wu i in., 2019). Z kolei, VOCs produkowane przez trzy wyizolowane z nasion kukurydzy szczepy z rodzaju *Bacillus* przyczyniały się do hamowania wzrostu grzybnicy *S. sclerotiorum* (Massawe i in., 2018).

Spośród lotnych związków organicznych produkowanych przez bakterie endofityczne, na szczególną uwagę zasługują acetoina i 2,3-butanodiol, które nie tylko działają jako czynniki pobudzające wzrost roślin, w tym wzrost i rozwój korzeni, ułatwiając roślinie dostęp do składników odżywczych i wody (Khan i in., 2017), ale zwiększają odporność roślin na patogeny. Badania przeprowadzone przez D'Alessandro i in. (2014), dowiodły, że sadzonki kukurydzy zaszczepione endofityczną bakterią *Enterobacter aerogenes* wydzielającą 2,3-butanodiol wykazywały zwiększoną odporność na zakażenie *Setosphaeria turcica*.

Zdolność do syntezy acetoiny i 2,3-butanodiolu przez bakterie, warunkuje obecność w ich genomach genów *alsDS*. Gen *alsS* koduje syntazę acetylomleczanową (AlsS) katalizującą przekształcenie pirogronianu do acetomleczanu, natomiast gen *alsD* koduje dekarboksylazę acetylomleczanową (AlsD) zaangażowaną w dekarboksylację wytworzonego mleczanu do acetoiny. Acetoina może zostać następnie przekształcona w 2,3-butanodiol przez bakterie lub przez roślinę żywicielską (Taghavi i in., 2009; Khan i in., 2017). Obecność genów *alsDS* wykryto w genomach endofitycznych szczepów: *S. marcescens* RSC-14 (Khan i in., 2017), *S. proteamaculans* 568, *Enterobacter* sp. 638 (Taghavi i in., 2009) i *Klebsiella pneumoniae* 342 (Fouts i in., 2008). Z kolei, w genomie *P. fluorescens* PICF7 zidentyfikowano ortologii genów niezbędnych do biosyntezy acetoiny i 2,3-butanodiolu (Martínez-García i in., 2015).

Wśród lotnych związków hamujących wzrost mikroorganizmów należy wymienić także nieorganiczny cyjanowodór, który wpływa toksycznie na różne patogeny roślin (Popova i in., 2014). Mechanizm działania HCN obejmuje hamowanie aktywności oksydazy cytochromowej, ostatniego enzymu łańcucha oddechowego. Związek ten hamuje transport elektronów, zakłócając dopływ energii do komórek, co prowadzi do śmierci organizmu. HCN jest również skutecznym inhibitorem wielu enzymów zawierających w swoim centrum aktywnym jony metali (Dorjey i in., 2017). Synteza HCN wydaje się być wspólną cechą bakterii endofitycznych należących do rodzajów *Bacillus*, *Burkholderia* i *Pseudomonas* (Dorjey i in., 2017; Kandel i in., 2017a; Verma i in., 2018), a geny zaangażowane w produkcję tego związku, ułożone w operon *hcnABC*, kodują kompleks syntazy HCN, flawoenzymu związanego z zewnętrzną błoną komórkową (Strano i in., 2017). Obecność wielu genów związanych z biokontrolą, w tym klastra *hcnABC*, potwierdziły analizy genomów szczepów *Burkholderia* WP40 i WP42, hamujących wzrost *R. solani* AG-8, *Fusarium culmorum*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* i *P. ultimum* (Kandel i in., 2017a). Sekwencjonowanie i analizy molekularne pozwoliły również na identyfikację genów *hcnBC* w genomie endofitycznego szczepu *Pseudomonas* sp. SY1 o aktywności przeciwgrzybowej względem *F. oxysporum*, *Curvularia* sp. i *Alternaria* sp. (Verma i in., 2018). Z kolei, badania przeprowadzone przez Strano i in. (2017) wykazały, iż mutacja insercyjna w genie *hcnA*, przyczyniała się do utraty zdolności szczepu *P. corrugata* CFBP 5454 do cyjanogenyzy, co z kolei ograniczało jego aktywność biologiczną względem *B. cinerea*.

W genomach wielu bakterii endofitycznych wykazano ponadto obecność szlaków przemian związków siarki, odpowiadających za wytwarzanie związków lotnych, takich jak siarczek dimetylu i siarkowodór (H₂S), które także mogą wzmocnić odporność roślin na atak

patogenów np. poprzez hamowanie kiełkowania zarodników grzybów (Eida i in., 2020; Andrés-Barrao i in., 2021).

2.4.5. Indukowanie odporności systemicznej

Dane literaturowe wskazują, iż oprócz bezpośrednich interakcji, bakterie endofityczne mogą pośrednio hamować rozwój fitopatogenów, modulując układ odpornościowy samej rośliny (Liu i in., 2017). Aktywacja indukowanej odporności systemicznej (ISR, ang. *induced systemic resistance*) sprowadza się do promowania reakcji obronnych, czyli szybszej bądź silniejszej aktywacji mechanizmów obronnych rośliny w odpowiedzi na atak patogena. Taki stan „uwrażliwienia” (ang. *priming*) układu odpornościowego roślin sprzyja ich efektywnej obronie w sytuacji, gdy rzeczywiście taki atak nastąpi.

Aby dostać się do rośliny, endofity muszą przejść przez pierwszą linię obrony jej układu odpornościowego, która obejmuje produkcję aktywnych ROS (ang. *reactive oxygen species*) i RNS (ang. *reactive nitrogen species*), odkładanie kalozy, biosyntezę fitoaleksyn, biosyntezę fitohormonów, zamykanie aparatów szparkowych oraz aktywację szerokiego zestawu genów związanych z reakcjami odpornościowymi (Liu i in., 2017; Hetmann i Kowalczyk, 2018). Jest to możliwe dzięki rozpoznawaniu przez rośliny konserwatywnych cząsteczek, charakterystycznych dla wielu drobnoustrojów. Cząsteczki te są nazywane ogólnie cząsteczkami typu MAMP (ang. *microbe associated molecular pattern*), a gdy pochodzą z organizmów patogennych, cząsteczkami typu PAMP (ang. *pathogen associated molecular pattern*). W percepcji cząsteczek MAMP/PAMP pośredniczą zlokalizowane w błonie plazmatycznej komórek roślinnych białka receptorowe nazywane receptorami typu PRR (ang. *pattern recognition receptor*). Jednym z najlepiej zbadanych MAMP jest flagelina, a dokładniej epitop flg22, rozpoznawany przez PRR FLS2. Inne przykłady MAMP to lipopolisacharydy (LPSs, ang. *lipopolysaccharides*), peptydoglikan, czynnik elongacji TU (EF-TU), bakteryjne białka szoku zimna (motyw RNP1) i dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) (Mengistu i in., 2020; Legein i in., 2020). Ponadto ISR indukowana jest obecnością takich związków jak: VOCs (acetoina, 2,3-butanodiol), siderofory, fitaza, antybiotyki, czy egzopolisacharydy (EPSs ang. *exopolysaccharides*) (Suryadi i in., 2019; Mengistu i in., 2020; Legein i in., 2020).

ISR jest zwykle regulowana przez szlaki sygnałne zależne od kwasu jasmonowego (JA, ang. *jasmonic acid*) i etylenu (ET, ang. *ethylene*) (Mengistu i in., 2020). Hormony te odgrywają ważną rolę we wzmacnianiu roślinnych reakcji obronnych przeciwko szerokiej gamie fitopatogenów (Singh i in., 2021). Bakterie endofityczne inicjujące ISR u roślin,

przyczyniają się do zwiększonej ekspresji genów kodujących szereg białek związanych z patogenezą (PRPs, ang. *pathogenesis related proteins*), takich jak: liaza amonowa fenyloalaniny (PAL), peroksydaza (POX), oksydaza polifenolowa (PPO), β -1,3-glukanaza, czy chitynaza. Ponadto obserwuje się u roślin zwiększoną produkcję flawonoidów, polifenoli i fitoaleksyn (Jacob i in., 2020). Kluczową rolę w biosyntezie ligniny, która ogranicza rozprzestrzenianie się patogenów grzybowych, odgrywa natomiast białko POX (Kumar i in., 2019a).

Inicjowanie ISR, warunkujące ochronę roślinnego gospodarza potwierdzono dla bakterii endofitycznych z rodzajów *Bacillus*, *Pseudomonas* i *Serratia* (Afzal i in., 2019). Przykładowo, endofityczny szczep *P. fluorescens* PICF7 wywoływał szeroki zakres odpowiedzi obronnych w tkankach korzeni oliwki (*Olea eurpea* L.) przeciwko *V. dahliae* (Gómez-Lama Cabanás i in., 2014). Z kolei traktowanie nasion ogórka hodowlą *S. marcescens* indukowało wzmocnienie ścian komórkowych roślin chroniąc je przed patogenami (Kshetri i in., 2019). Dodatkowo, w licznych badaniach wykazano, iż produkcja acetoiny i 2,3-butanodiolu przez *S. proteamaculans* 568 pobudzała wzrost i odporność systemiczną u roślin poprzez indukcję ekspresji genów w szlakach sygnałowych kwasu salicylowego, jasmonowego i etylenu (Taghavi i in., 2009; Singh i in., 2019).

2.4.6. Stymulacja wzrostu roślinnego gospodarza

Powszechnie wiadomo, że endofity i ich metabolity działają jako promotory wzrostu roślin. Organizmy te znacznie poprawiają wchłanianie i wykorzystanie przez rośliny składników pokarmowych, takich jak azot (N), fosfor (P) i potas (K) (Xia i in., 2022). Przyspieszają także wzrost roślinnego gospodarza produkując fitohormony, takie jak: kwas indolilo-3-octowy (IAA), kwas salicylowy, cytokininy, gibereliny, brasinosteroidy, kwas abscysynowy, czy acetoinę i 2,3-butanodiol (Brader i in., 2014). Stymulacja wzrostu roślin inicjowana przez endofity może również pośrednio chronić rośliny żywicielskie przed patogenami (Xia i in., 2022).

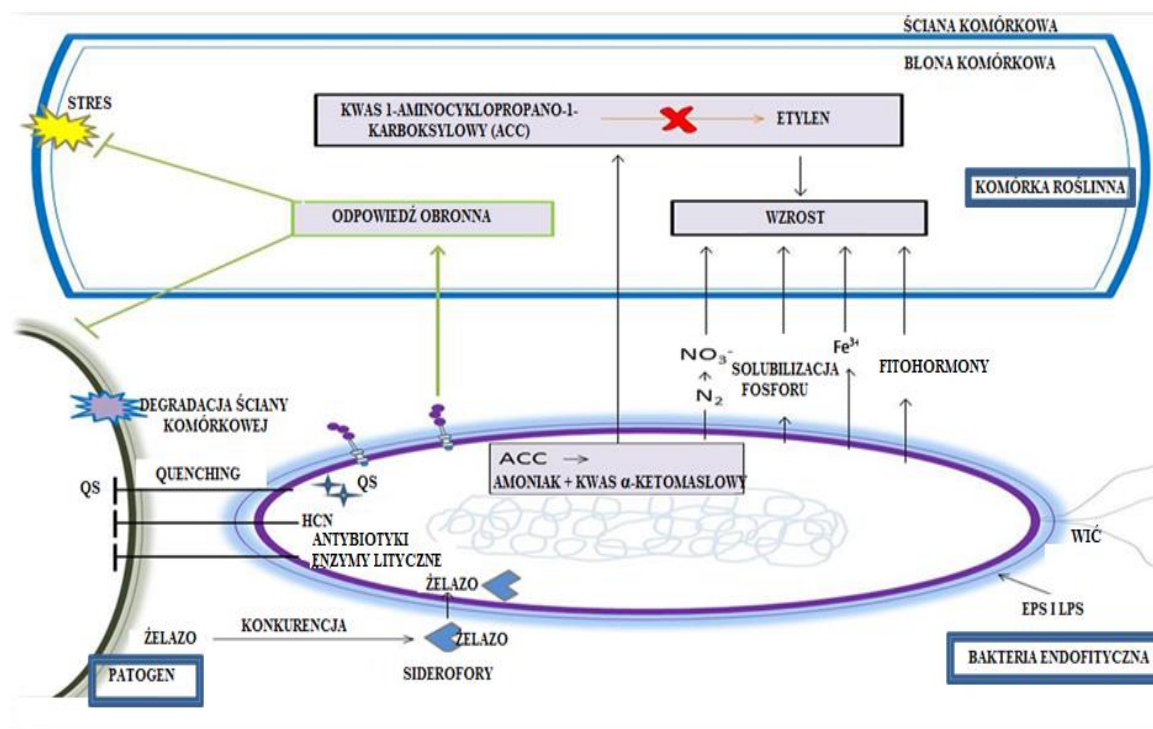
Dane literaturowe wskazują, że zdecydowana większość bakterii endofitycznych wykazuje zdolność do produkcji IAA (Etesami i in., 2015; Pawlik i Piotrowska-Seget, 2015), hormonu biorącego udział w wielu procesach fizjologicznych roślin obejmujących sygnalizację komórka-komórka, regulację rozwoju roślin i indukcję systemów obronnych (Afzal i in., 2019). Głównym prekursorem biosyntezy IAA u bakterii jest L-tryptofan, którego produkcja determinowana jest obecnością w genomach bakterii operonu *trpABCDE* (Chlebek i in., 2022b). Synteza IAA może przebiegać: 1) szlakiem indolilo-3-acetamidu (IAM) w którym monooksygenaza tryptofanu (IaaM) utlenia tryptofan do indolo-3-

acetamidu stanowiącego substrat dla hydrolazy indoloacetamidowej (IaaH) wytwarzającej IAA; 2) szlakiem indolilo-3-pirogronianu (IPA) uwarunkowanego aktywnością dekarboksylazy indolopirogronianowej (IpdC) i dehydrogenazy indolo-3-acetaldehydowej (DhaS) oraz słabo poznanym szlakiem tryptaminy (TAM) i szlakiem indolilo-3-acetonitrylu (IAN) (Duan i in., 2013; Li i in., 2017; Chlebek i in., 2022b). Wytwarzanie IAA przez bakterie endofityczne nie tylko znacząco przyspiesza wzrost roślin (Etesami i in., 2015), ale dodatkowo wspomaga rośliny podczas inwazji patogenów. Przykładowo, Hernández-León i in. (2015) wykazali, że szczep *P. fluorescens* UM16, produkujący IAA (22 µg/ml), promował wzrost pędów u *M. truncatula*, nawet w obecności *B. cinerea*.

Innym mechanizmem promowania wzrostu roślin w warunkach stresu środowiskowego jest synteza deaminazy kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksylowego (ACCD), która bierze udział w obniżaniu stężenia etylenu, fitohormonu kontrolującego wzrost i dojrzewanie roślin. W niskich stężeniach, etylen uczestniczy w regulacji wzrostu roślin i różnych procesów metabolicznych. Jednak w warunkach stresowych, poziom etylenu w roślinie znacznie wzrasta, niekorzystnie wpływając na wzrost korzeni i metabolizm całej rośliny oraz prowadząc do przyspieszonego jej starzenia. W genomach bakterii zdolnych do produkcji ACCD stwierdza się obecność takich genów jak: *acdS* i *dcdD*, kodujących odpowiednio ACCD i jego homolog desulfhydrazę D-cysteinową. Oba enzymy biorą udział w hydrolizie ACC, bezpośredniego prekursora etylenu, do amoniaku i α -ketomasłanu. W konsekwencji poziom ACC w tkankach roślinnych zostaje obniżony, co z kolei skutkuje obniżonym poziomem endogennego etylenu (Chlebek i in., 2022b).

Niektóre bakterie endofityczne odgrywają ważną rolę w zwiększaniu biodostępności fosforu (P), który jest niezbędnym składnikiem odżywczym dla roślin. W procesie tym biorą udział enzymy zaangażowane w solubilizację nieorganicznego fosforu i mineralizację organicznych form fosforu. Mikrobiologiczne mechanizmy solubilizacji obejmują przede wszystkim produkcję i wydzielanie kwasów organicznych, takich jak kwas jabłkowy, kwas cytrynowy, kwas salicylowy i glukonowy (Gebhard i in., 2009). Proces syntezy kwasu glukonowego (GA) u bakterii uwarunkowany jest obecnością w ich genomie klastra genów *pqqABCDE*, determinującego szlak biosyntezy kofaktora - pirolochinolinochinonu (PQQ) oraz genu *gcd* kodującego dehydrogenazę chinoproteinowo-glukozową (PQQGDH), enzym odpowiedzialny za biosyntezę kwasu glukonowego w bezpośrednim szlaku utleniania glukozy. Jak wykazały badania przeprowadzone przez Xu i in. (2014), gen *pqqC* kodujący białko C syntezy pirolochinolinochinonu, jest niezbędny dla przeciwwgrzybowej aktywności *P. kilonensis* JX22 wobec *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Mutant JX22MT1 z inaktywowanym genem *pqqC*, nie wykazywał bowiem zdolności do hamowania wzrostu

patogena. Mechanizmy antagonistycznych oddziaływań bakterii endofitycznych wobec patogenów przedstawiono na rysunku 1.



Rys 1. Mechanizmy antagonistycznych oddziaływań bakterii endofitycznych wobec fitopatogenów (Liu i in., 2017, zmodyfikowano).

2.5. Kolonizacja gospodarza roślinnego przez bakterie endofityczne

Skuteczność kontroli patogenów roślinnych jest bezpośrednio związana ze zdolnością endofitów bakteryjnych do kolonizacji roślin. Efektywna kolonizacja przez te mikroorganizmy przyczynia się bowiem do osiągnięcia ich stabilnej populacji w obrębie rośliny oraz wzmocnienia asocjacji z roślinnym gospodarzem. Warto podkreślić, iż w ocenie kompetencji potencjalnych czynników biokontroli, szczególną uwagę powinno zwracać się na ich zdolności do kolonizowania tkanek roślinnych (Wu i in., 2019; Afzal i in., 2019; Vandana i in., 2021; Singh i in., 2022; Han i in., 2022). Przykładowo wykazano, że kolonizacja roślin przez szczepy *P. koreensis*, *P. aeruginosa* Z5, *P. aeruginosa* B18, *B. atrophaeus* NX-12, *S. plymuthica*, *P. fluorescens* F113 odgrywa znaczącą rolę w zwalczaniu patogenów roślin (Barahona i in., 2011; Singh i in. 2021; Xue i in., 2022).

Bakterie endofityczne zwykle wnikają do roślin z ryzosfery (Afzal i in., 2019). Alternatywnie miejscem kolonizacji może być również fyllosfera (Liu i in., 2017). Endofity mogą kolonizować rośliny poprzez naturalne otwory, takie jak aparaty szparkowe czy przetchlinki (Ali i in., 2014), przez kwiaty, łodygę (Pisarska i Pietr, 2014), nasiona lub uszkodzenia generowane przez wiatr, ataki owadów i patogenów (Klama, 2004; Liu i in.,

2017). Liczne badania związane z kolonizacją roślin wykazały, że naturalne pęknięcia w miejscu wyrastania korzeni bocznych są najczęstszymi miejscami wnikania bakterii endofitycznych. Co więcej, niektóre bakterie wykorzystują wierzchołek korzenia i włókniki jako punkty wejścia, po których następuje kolonizacja w korze korzenia i tkankach naczyniowych (Kandel i in., 2017b). Stwierdzono, iż bakteryjne endofity powszechnie zlokalizowane są w różnych częściach apoplastu, głównie w przestrzeniach międzykomórkowych i ksylemie (Ali i in., 2021). Co ciekawe, bakterie endofityczne zwykle kolonizują specyficzne części rośliny, które nie zawsze odpowiadają miejscu wniknięcia do gospodarza. Bakterie te mogą polegać na ruchu biernym, zgodnym z przepływem wody, jednakże aktywna zdolność do poruszania się, umożliwia im migrowanie wewnątrz rośliny (Taghavi i in., 2009; Afzal i in., 2019). Kluczową rolę w procesie kolonizacji rośliny przez bakterie endofityczne odgrywa komunikacja między gospodarzem a bakterią.

Kolonizacja roślin przez bakterie endofityczne jest złożonym procesem, który można podzielić na pięć odrębnych etapów: (1) rozpoznanie wydzielin korzeniowych i ruchliwość w kierunku rośliny, (2) adhezja do powierzchni korzeni, (3) tworzenie biofilmu, (4) penetracja powierzchni korzenia i (5) kolonizacja wewnętrznych części rośliny (Taghavi i in., 2009; Pisarska i Pietr, 2014; Pinski i in., 2019).

Dzięki analizom porównawczym genomów bakterii endofitycznych udało się wyróżnić zestawy genów odpowiedzialnych za skuteczną kolonizację i oddziaływanie z gospodarzem (Taghavi i in., 2009; Kaneko i in., 2010; Lopes i in., 2017; Chlebek i in., 2020; Singh i in., 2021; Chlebek i in., 2022a). Wykazano, iż kolonizacja roślin przez endofity wywołuje szereg modyfikacji ściany komórkowej, takich jak odkładanie kalozy, pektyny, celulozy i związków fenolowych, co prowadzi do powstania bariery strukturalnej w miejscu potencjalnego ataku fitopatogenów (Pinski i in., 2019; Chlebek i in., 2020). Kolonizacja endofityczna może również skutkować zwiększoną ekspresją ekstensyn, które odgrywają ważną rolę w obronie roślin poprzez wzmocnienie ściany komórkowej. Co ciekawe, roślinny gospodarz może również indukować ekspresję różnych grup genów podczas kolonizacji przez mikroorganizmy. Na przykład, podczas ustanawiania symbiozy, większość szlaków systemu obronnego roślin kierowanych przez miRNA jest wyłączana, co ułatwia ich kolonizację przez endofity (Khare i in., 2018).

2.6. Cechy determinujące kolonizację rośliny

W ciągu milionów lat koewolucji z roślinami, bakterie zostały wyposażone w niezbędne cechy, które umożliwiają im efektywną kolonizację rośliny. Zalicza się do nich: zdolność do ruchu (obecność wici, pilusów i fimbrii), chemotaksji, zdolność adhezji

do powierzchni korzenia, produkcję LPSs i EPSs, tworzenie biofilmu, biosyntezę enzymów degradujących ściany komórkowe (CWDEs, ang. *cell wall degrading enzymes*), produkcję enzymów antyoksydacyjnych, QS oraz sekrecję i translokację białek efektorowych poprzez specyficzne systemy sekrecji (TISS-TVISS, ang. *secretion systems I-VI*) (Liu i in., 2017; Pinski i in., 2019; Kumar i in., 2019a). Znaczenie tych cech w kolonizacji roślin, zostało potwierdzone przez genomikę porównawczą, metagenomikę i analizy transkryptomyczne w połączeniu z mutagenizacją kodujących je genów (Sheibani-Tezerji i in., 2016; Pankiewicz i in., 2016; Pinski i in., 2019).

W kolonizacji roślinnego gospodarza, ważną rolę odgrywa ruchliwość bakterii. Istnieją trzy rodzaje motoryki napędzanej chemotaksją: ruch pływający (ang. *swimming*), ruch rozpełzliwy (ang. *swarming*) oraz ruch drgający (ang. *twitching*). Ruchy typu pływającego i rozpełzliwego zależą od rotacji wici, natomiast ruch drgający uwarunkowany jest obecnością pilusów typu IV (Amaral i in., 2020).

Wić jest strukturą bardzo skomplikowaną pod względem budowy, a jej złożenie wymaga precyzyjnej regulacji na wielu etapach (Buschart i in., 2012). U dobrze zbadanych bakterii *Escherichia coli*, geny kodujące białka zaangażowane w proces składania wici są zorganizowane w operony, znajdujące się pod kontrolą promotorów należących do trzech różnych klas, których aktywacja musi być ściśle kontrolowana. Utworzenie funkcjonalnej maszyny ruchu wymaga transkrypcji ponad 50 różnych genów (Fitzgerald i in., 2014). Analiza genomowa wielu bakterii endofitycznych zaangażowanych w biokontrolę ujawniła obecność klastrów genów związanych z biosyntezą wici (Wu i in., 2011b; Nigris i in., 2018; Chlebek i in., 2020; Chlebek i in., 2022a). Przykładowo Wu i in. (2011b) wykazali w genomie szczepu *P. putida* W619 obecność 52 genów zaangażowanych w biosyntezę wici, w tym klastry *flh*, *fli*, *fle*, *flg*, *motAB*. Ponadto u szczepu *P. putida* KT2440 wykazano, iż mutacje w genach *flgL*, *fliA*, *fleQ*, *fliL*, *fliN* i *flgD30* zmniejszyły ruchliwość bakterii. Badania Straub i in. (2013) wykazały natomiast, że u *Azospirillum brasilense* Sp7 wici niezbędne są nie tylko do chemotaktycznego przemieszczania się bakterii w kierunku korzenia, ale również w początkowym etapie adhezji komórek i ich trwałym zakotwiczeniu.

Zdolność bakterii do ruchu umożliwia nie tylko chemotaksję w kierunku wydzielin korzeniowych rośliny, ale również wzmacnia efekt biokontroli (Kandel i in., 2017b). Badania przeprowadzone przez Hover i in. (2016) wykazały, iż szczep *S. marcescens* z defektem syntezy wici znacznie wolniej migruje wzdłuż strzępek *Rhizopus oryzae*, co skutkuje mniej efektywnym hamowaniem wzrostu grzyba. Co ciekawe, wić uważana jest za jeden z pierwszych czynników bakteryjnych wchodzących w kontakt z rośliną, aktywujący ISR (Fernández-Llamosas i in., 2021).

Istotną rolę w kolonizacji roślinnego gospodarza odgrywa również ruch drgający za pośrednictwem pilusów typu IV (Fernández-Llamosas i in., 2021). Biosynteza tego typu pilusów została najdokładniej zbadana u bakterii Gram-ujemnych, u których ich składanie obejmuje zestaw białek, często kodowanych przez operon *pil* (Imam i in., 2011). Analiza genomów bakterii należących do gatunku *P. putida* pozwoliła na zidentyfikowanie trzech klastrów genów związanych z biosyntezą pilusów typu IV, *pilMNPQ*, *pilACD* i *pilEXW/fimT*, a także czterech kopii genu *pilZ*. Ponadto w badanych genomach stwierdzono obecność złożonego systemu regulacji biosyntezy pilusów, *pilGHIJLchp* (Wu i in., 2011b). Obecność genów związanych z biosyntezą pilusów typu IV wykazano również w genomach takich bakterii, jak: *Azoarcus* sp. BH72, *Enterobacter* sp. 638, *P. fluorescens* F113, *P. stutzeri* A1501, *P. putida* KT2440 (Böhm i in., 2007; Taghavi in., 2009; Wu i in., 2011b). Z kolei, badania mutantów przeprowadzone przez Böhm i in. (2007) udowodniły, iż obecność pilusów typu IV jest konieczna do kolonizacji ryżu przez endofityczny szczep *Azoarcus* sp. BH72. Ruch drgający u tego szczepu bakterii zależy od, katalizowanej przez białko PilT, retrakcji pilusa typu IV. Mutacja w obrębie genu *pilT* powodowała, że uzyskany mutant formował mikrokolonie na powierzchni korzeni ryżu, lecz jego zdolność do inwazji i kolonizacji rośliny były mniej efektywne.

Chemotaksja w kierunku wydzielin korzeniowych, które stanowią złożoną mieszaninę setek różnych związków, w tym: aminokwasów, kwasów organicznych, cukrów, alkoholi, poliamin, kwasów tłuszczowych, puryn, fitohormonów, terpenoidów, witamin, flawonoidów i benzoksazyonoidów, inicjuje kolonizację i nawiązywanie interakcji między bakteriami a roślinami (Compat i in., 2010; Feng i in., 2021). Sugeruje się, że poprzez wydzieliny, rośliny mogą komunikować się z konkretnymi mikroorganizmami w celu odniesienia własnych korzyści ewolucyjnych i ekologicznych (Hardoim i in., 2008). Wydzieliny korzeniowe wywołują szeroki zakres zmian w transkryptomie bakterii, mogą także modulować ekspresję genów związanych z różnymi funkcjami komórkowymi, takimi jak reakcja na stres, metabolizm aminokwasów i węglowodanów, czy homeostaza żelaza (Guzmán-Guzmán i Santoyo, 2022). Badania przeprowadzone przez Coutinho i in. (2015) wykazały, iż u szczepu *Burkholderia kururiensis* M130, pod wpływem ekstraktów pozyskanych z roślin ryżu, ekspresji ulegały geny kodujące białka związane z ruchliwością, chemotaksją i adhezją bakterii. Dużym niezbadanym wciąż obszarem są natomiast wzajemne oddziaływania zachodzące w obrębie układu endofit-roślina-patogen. Co ciekawe, infekcja patogenem jest rozpoznawana przez rośliny, a transdukcja sygnału prowadzi do zmian w składzie wydzielin korzeniowych (Feng i in., 2021). Badania Chen i in. (2017) pozwoliły na zidentyfikowanie związków zaangażowanych w komunikację

między ogórkiem, szczepem *B. amyloliquefaciens* SQR9 i patogenem glebowym *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. Kolonizacja korzeni przez patogen zwiększyła wydzielanie tryptofanu będącego silnym chemoatraktantem dla szczepu SQR9, prowadząc do efektywniejszej kolonizacji korzeni przez badany szczep i skuteczniejszej ochrony rośliny przed patogenem.

Chemosensoryczny szlak składa się z kilku podstawowych genów *che* kodujących białka CheA, CheB, CheR, CheW, CheY, CheZ, odpowiedzialne za przenoszenie zewnętrznych sygnałów środowiskowych, modulowanie aktywności i kierunku rotacji wici bakteryjnej. Ważną rolę pełnią również białka MCPs (ang. *methyl-accepting chemotaxis proteins*) należące do transbłonowych receptorów występujących w wewnętrznej błonie komórkowej bakterii (Zboralski i Fiolon, 2020; Feng i in., 2021). Odpowiedź chemotaktyczna na pojawienie się w środowisku danego związku inicjowana jest przez wykrywanie ligandów przez MCPs (Amaral i in., 2020; Feng i in., 2021). W obrębie tego samego gatunku bakterii liczba genów kodujących MCPs może się znacznie różnić, w zależności od zajmowanej niszy ekologicznej (Feng i in., 2021). Kanoniczny mechanizm chemotaksji, w odpowiedzi na pojawiający się w środowisku związek, polega na interakcji chemicznego liganda z MCPs, co powoduje autofosforylację kinazy CheA, która następnie przenosi grupę fosforanową na białko CheY, regulujące aktywność systemu oddziałującego bezpośrednio z białkiem Film, komponentem znajdującym się w rotorze wici, kontrolującym kierunek jej rotacji (Zboralski i Fiolon, 2020; Feng i in., 2021). Warto zaznaczyć, iż obecność białek CheA i CheY, wykazano u *Archaea*, bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich (Allard-Massicotte i in., 2016). Istotną rolę genów zaangażowanych w chemotaksję potwierdziły badania mutantów. Przykładowo, badania nad kolonizacją pomidora przez endofityczny szczep *P. fluorescens* WCS365 z mutacją w genie *cheA*, wykazały, iż kolonizował on korzenie roślin mniej wydajnie niż szczep typu dzikiego (Weert i in., 2002). W innych badaniach Allard-Massicotte i in. (2016) wykazali, iż szczep *B. subtilis* z mutacją w 10 genach kodujących chemoreceptory: *mcpA*, *mcpB*, *tlpA*, *tlpB*, *mcpC*, *tlpC*, *yvaQ*, *yoaH*, *yfmS*, *heamAT* cechował się obniżoną zdolnością do kolonizowania korzeni *Arabidopsis* w porównaniu do typu dzikiego.

Kolejny etap kolonizacji rośliny przez bakterie polega na adhezji komórek bakteryjnych do powierzchni korzenia i ich intensywnych podziałach, skutkujących utworzeniem mikrokolonii (Fernández-Llamosas i in., 2021). W proces adhezji zaangażowane są takie czynniki, jak: flagelina, pilina, hemaglutynina, pilony, organelle ruchu, EPS i LPS (Chagnot i in., 2013; Berne i in., 2015; Fernández-Llamosas i in., 2021), a u wielu bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* również włókna curli (Piński i Hupert-

Kocurek, 2016), których biosynteza determinowana jest obecnością w genomach bakterii operonów *csgBAC* i *csgDEFG* (Taghavi i in., 2009). Istotną rolę w kolonizacji odgrywa również LPS będący integralną częścią błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych. Wykazano, że zmiany strukturalne LPS zwykle wpływają na siły adhezyjne, prawdopodobnie poprzez zmianę hydrofobowości powierzchni komórek (Bogino i in., 2013). LPS składa się z trzech składników: (i) lipidu A zakotwiczonego w zewnętrznej błonie bakteryjnej, (ii) regionu rdzeniowego oraz (iii) antygeny O. Ramnoza jest monosacharydem, który jest często wykrywany jako część antygeny O, a jego biosynteza wymaga czterech genów – *rfaABCD*. Badania Balsanelli i in. (2010) dowiodły, iż mutant szczepu *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 o obniżonej zdolności do syntezy LPS cechował się zmniejszoną zdolnością do przywierania do powierzchni korzenia kukurydzy w porównaniu ze szczepem dzikim. Mutacja jednego z genów biorących udział w biosyntezie ramnozy (*rfaB* lub *rfaC*) spowodowała 100-krotnie niższy poziom przyczepności do powierzchni korzenia. Co ciekawe, LPSs obecne u endofitycznego szczepu *Pseudomonas phytofirmans* PsJN obniżały poziom ekspresji genów obronnych, takich jak PR1, dysmutaza ponadtlenkowa i kompleks sygnałowy COP9 w liściach ziemniaka (Mengistu i in., 2020).

Pierwotna adhezja bakterii do powierzchni korzeni obejmuje słabe, niespecyficzne i odwracalne oddziaływania międzycząsteczkowe, takie jak: siły grawitacyjne, elektrostatyczne, hydrofobowe, van der Waalsa (Knights i in., 2021). Drugi etap oddziaływań jest nieodwracalny, ze względu na mocne wiązanie bakterii do powierzchni korzenia (Pisarska i Pietr, 2014; Singht i in., 2021). Przywieranie bakterii do powierzchni korzenia jest możliwe dzięki tworzeniu się biofilmu, który składa się głównie z białek, polisacharydów, zewnątrzkomórkowego DNA (eDNA, ang. *extracellular DNA*), RNA i jonów. Ponadto znaczną część macierzy stanowi woda chroniąca biofilm przed wysuszeniem (Zur i in., 2016; Knights i in., 2021; Xue i in., 2022). Komponenty macierzy chronią drobnoustroje przed otaczającym środowiskiem, w tym czynnikami: fizycznymi (np. pH, promieniowaniem UV, stresem osmotycznym), chemicznymi, biologicznymi (czynnikami układu odpornościowego gospodarza), a także tworzą mikrośrodowisko, które współpracuje i współistnieje z roślinami (Costa i in., 2018; Knights i in., 2021; Xue i in., 2022). Biofilmy tworzone na powierzchni korzeni niektórych roślin uprawnych mogą przyczynić się do efektywniejszej biokontroli patogenów, a co za tym idzie poprawy wydajności upraw (Seneviratne i in., 2009; Lahlali i in., 2022). W wielu przypadkach tworzenie biofilmów przez BCAs jest korzystne dla ich gospodarzy i zapobiega wzrostowi patogenów. Zwiększone zdolności do tworzenia biofilmu prowadzą do bardziej stabilnych

interakcji pomiędzy bakteriami endofitycznymi a rośliną, a zdolność tą uważa się za ważne kryterium podczas selekcji BCAs (Singh i in., 2019). Badania przeprowadzone przez Zhu i in. (2020) wykazały, iż dzięki zdolności do tworzenia biofilmu, szczep *B. pumilus* HR10 może skutecznie kolonizować korzenie sadzonek *Pinus massonana*, podczas gdy niezdolne do produkcji biofilmu mutanty wykazywały słabą zdolność kolonizacji oraz ochrony roślin przed *R. solani*. Inne badania przeprowadzone przez Shehata i in. (2016) dowiodły, iż endofityczny szczep *B. gladioli* 3A12 cechuje się zdolnością do zwalczania wielu patogenów roślin uprawnych, w tym *S. homeocarpa*, a zastosowanie przypadkowej mutageny z użyciem transpozonu Tn5 potwierdziło, że strategia zwalczania grzybowego patogena przez szczep 3A12 obejmuje: zdolność do ruchu, tworzenie mikrokolonii i biofilmu na powierzchni strzępek grzyba.

Liczne badania potwierdziły, iż istotnym składnikiem biofilmu są EPSs wpływające na efektywność przyczepiania się komórek bakteryjnych do powierzchni korzenia (Kandel i in., 2017b). Przykładowo, badania Meneses i in. (2011) wykazały, iż u endofitycznej bakterii *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 istotną rolę w tworzeniu biofilmu i kolonizacji korzeni ryżu pełnią wydzielane przez nią EPSs. Co ciekawe, mutacja w genie *gumD* kodującym enzym odpowiedzialny za pierwszy etap biosyntezy tych polisacharydów spowodowała zmniejszenie kolonizacji ryzosferycznej i endofitycznej korzeni ryżu przez szczep PAL5. EPSs mogą również przyczynić się do przetrwania bakterii w roślinie, działając jako bariera chroniąca przed mechanizmami obronnymi roślin (Costa i in., 2018). Ponadto ze względu na higroskopijne właściwości, EPSs mogą zmniejszać utratę wody oraz chronić bakterie przed jonami metali ciężkich, poprzez ich wiązanie i utrudnienie ich wnikania do wnętrza komórek (Singh i in., 2022).

Bakterie endofityczne zdolne są do syntezy wielu różnych polisacharydów, takich jak: alginian (Chlebek i in., 2020), celuloza (Mateolli i in., 2018), lewan, kwas kolaninowy, sukcynglikan, (Liu i in., 2016), kwas poli- γ -glutaminowy (γ -PGA) (Mateolli i in., 2018; Xue i in., 2022). Produkcja tych polisacharydów jest możliwa dzięki obecności w genomach bakteryjnych endofitów wielu specyficznych genów zgrupowanych w operony. Badania przeprowadzone przez Xue i in. (2022) dowiodły, iż γ -PGA produkowany przez szczep *Bacillus atrophaeus* NX-12 przyczynia się do tworzenia biofilmu i kolonizacji ryzosfery, co skutecznie poprawia zdolność biokontroli. Geny biosyntezy γ -PGA są wysoce konserwatywne u różnych bakterii z rodzaju *Bacillus*. Przykładowo, u szczepu *B. subtilis* biosynteza γ -PGA opiera się na konserwatywnym operonie *pgsB-pgsC-pgsA-pgsE*. W oparciu o technologię CRISPR-Cas9n skonstruowano mutantą delecyjnego *pgsBCA* (NX-12 Δ *pgs*), a następnie wykazano, że brak produkcji γ -PGA prowadził do zmniejszenia

zdolności szczepu do tworzenia biofilmu i kolonizacji, co z kolei znacznie zmniejszyło efekt biokontroli grzyba *F. oxysporum* f. sp. *cucumber*. W innych badaniach, Mateolli i in. (2018) wykazali w genomie endofitycznego szczepu *S. marcescens* UENF-22GI obecność operonu *pgaABCD* związanego z produkcją γ -PGA oraz operonów *bcsABZC* i *bcsEFG* związanych z biosyntezą celulozy. Bardzo ważnym składnikiem biofilmu u niektórych gatunków bakterii są włókna celulozy (Knights i in., 2021). Operony syntezy bakteryjnej celulozy (*bcs*) wykazują wysoce zróżnicowaną organizację genetyczną u różnych gatunków bakterii, ale zazwyczaj zawierają gen *bcsA* kodujący transmembranowe białko zakotwiczone w błonie cytoplazmatycznej, które katalizuje polimeryzację UDP-glukozy do celulozy. Białku BcsA zwykle towarzyszy kodowane przez gen *bcsB* kokatalityczne białko BcsB, zakotwiczone C-terminalnym końcem w błonie wewnętrznej. Ponadto u wielu bakterii stwierdzono obecność genu *bcsZ* kodującego liazę peryplazmatyczną (BcsZ), oraz genu *bcsC* kodującego porynę błony zewnętrznej, umożliwiającą translację nowopowstałego polimeru na zewnątrz komórki bakteryjnej oraz dodatkowe podjednostki strukturalne i regulacyjne, z których niektóre są niezbędne do sekrecji (Krasteva i in., 2017). Badania przeprowadzone przez Tuleski i in. (2009) dowiodły, iż inaktywacja genu *bcsZ* u szczepu *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 osłabiła produkcję EPSs, zdolność do tworzenia wczesnego biofilmu i kolonizacji rośliny w porównaniu ze szczepem M1 typu dzikiego. Ponadto w genomach endofitów, głównie z rodzaju *Azotobacter* i *Pseudomonas*, stwierdzono obecność genów związanych z biosyntezą alginianu, składającego się z reszt β -d-mannuronianu (M) i α -l-guluronianu (G) połączonych wiązaniami 1-4 glikozydowymi. U bakterii z rodzaju *Pseudomonas* biosynteza alginianu możliwa jest dzięki obecności 12 genów zebranych w operon *alg* kodujących białka: AlgD, Alg8, Alg44, AlgK, AlgE, AlgG, AlgX, AlgL, AlgI, AlgJ, AlgF i AlgA bezpośrednio zaangażowane w polimeryzację, acetylację, epimeryzację i eksport tego polimeru (Chang i in., 2007; Maleki i in., 2016). Marshall i in. (2019) wykazali, że mutanty *P. fluorescens* Pf0-1 pozbawione genów *alg* wykazywały zmniejszony poziom kolonizacji roślin w porównaniu z typem dzikim, co wskazuje na znaczenie tego polisacharydu w procesie kolonizacji.

Bakterie endofityczne mogą wnikać i rozprzestrzeniać się w tkankach roślinnych poprzez produkcję enzymów degradujących ścianę komórkową roślin (CWDEs), takich jak: celulazy, ksylanazy, pektynazy i endoglukanazy (Kandel i in., 2017b). Geny kodujące te enzymy występują powszechnie w genomach bakterii endofitycznych. Przykładowo, geny kodujące enzymy degradujące polimery roślinne wykryto w dużej liczbie kopii w metagenomie endofitycznych społeczności bakteryjnych kolonizujących korzenie ryżu (Liu i in., 2017). Znaczenia produkcji CWDEs przez bakterie endofityczne dowiodły

badania Reinhold-Hurek i in. (2006), którzy wykazali, że kolonizacja korzeni ryżu została znacznie zmniejszona u mutantu *Azoarcus* sp. BHE6 pozbawionego aktywności endoglukanazy. Co ciekawe, bakterie endofityczne wytwarzają niski poziom enzymów degradujących ściany komórkowe w porównaniu z fitopatogenami, dzięki czemu mogą uniknąć uruchomienia systemów obronnych roślin (Afzal i in., 2019).

W celu skutecznej kolonizacji rośliny, endofity bakteryjne muszą być przystosowane do przetrwania w środowisku bogatym w reaktywne formy tlenu (ROS), takie jak: anionorodnik ponadtlenkowy (O_2^-), rodnik hydroksylowy (OH^\cdot) i nadtlenek wodoru (H_2O_2), a także fitoaleksyny, czy reaktywne formy azotu (RNS), które produkowane są przez rośliny jako mechanizm warunkujący ochronę przed infekcjami wirusowymi, bakteryjnymi, czy grzybowymi (Liu i in., 2017; Kandel i in., 2017b). Zaobserwowano, iż kolonizacja roślin przez endofity również generuje odpowiedź oksydacyjną (Liu i in., 2017). Dlatego też, bakterie endofityczne są wyposażone w mechanizmy umożliwiające przezwycięzenie stresu oksydacyjnego, a tym samym efektywną kolonizację tkanek roślinnych. W genomach wielu endofitycznych szczepów wykazano obecność szerokiej gamy genów kodujących enzymy dezaktywujące ROS, w tym: katalazy (*katE*, *katG*), dysmutazy ponadtlenkowe (*sod1*, *sod2*), S-transferazy glutationowe (*gst*), peroksydazy tiolowe (*tpx*), peroksydazy glutationowe (*gpx*), reduktazy glutationowe (*gor*), hydrolazy glutationowe (*gor*), reduktazy wodoronadtlenku alkilu (*ahpCF*) (Taghavi i in., 2010; Martínez-García i in., 2015; Eida i in., 2020; Chlebek i in., 2020; Chlebek i in., 2022b). Ponadto w genomach tych bakterii zidentyfikowano geny detoksykacji wolnych rodników tlenków azotu, gen *hmp* kodujący dioksygenazę flawohemoproteinową tlenku azotu, czy geny *norRVW* kodujące enzymy zaangażowane w beztlenową redukcję azotanów. Stwierdzono również obecność genów kodujących białka regulatorowe kontroli stresu oksydacyjnego, obejmujące czynnik transkrypcyjny σS (*rpoS*), specyficzny czujnik nadtlenu wodoru (*oxyR*), regulatory odpowiedzi na rodniki ponadtlenkowe (*soxRS*) i regulator wychwyty żelaza (*fur*) (Eida i in., 2020). Istnieje również szereg uniwersalnych białek stresu (*uspABCEFG*), z których niektóre nadają oporność na stres oksydacyjny, podczas gdy inne są ważne dla ruchliwości bakterii (Nachin i in., 2005). Podczas interakcji roślina-endofit, detoksykacja ROS zachodzi wcześniej, po wejściu endofitu do rośliny. Przykładowo, badania Sessitsch i in. (2012) wykazały dużą liczbę i różnorodność genów kodujących dysmutazę ponadtlenkową (SOD) i reduktazę glutationową w metagenomie endofitów kolonizujących korzenie ryżu. Badania Alquéres i in. (2013) wykazały nadekspresję genów kodujących enzymy dezaktywujące ROS w początkowych etapach kolonizacji ryżu. Szczep *Gluconacetobacter diazotrophicus* z mutacjami w genach kodujących reduktazę glutationową i dysmutazę ponadtlenkową

stracił zdolność do efektywnej kolonizacji, a badania przeprowadzone przez Loper i in. (2007) wykazały, iż mutanty *P. protegens* Pf-5 z niedoborem dysmutazy ponadtlenkowej tworzyły mniej liczną populację w ryzosferze, niż ma to miejsce w przypadku szczepu dzikiego. Badania przeprowadzone przez Matilla i in. (2007) wykazały natomiast nadekspresję genów biorących udział w metabolizmie i stresie oksydacyjnym w początkowym etapie kolonizacji kukurydzy przez szczep *P. putida* KT2440.

Quorum sensing jest kolejnym ważnym mechanizmem związanym z regulacją ekspresji genów zaangażowanych w interakcję z gospodarzem roślinnym, z adaptacją do stresu środowiskowego i tworzeniem agregatów komórkowych ułatwiających kolonizację rośliny (Piński i Hupert-Kocurek, 2016). Ponadto u wielu bakterii mechanizm QS indukuje syntezę wtórnych metabolitów przeciwdrobnoustrojowych i zewnątrzkomórkowych enzymów litycznych hamujących działanie patogennych grzybów, bakterii, pierwotniaków i nicieni. Odpowiada również za koniugację, sporulację, bioluminescencję, produkcję toksyn, czy ekspresję genów wirulencji (Dubuis i in., 2007). Rolę cząsteczek sygnałowych u α -, β - i γ -proteobakterii pełnią autoinduktory tzw. laktony N-acetylo-homoseryny (*N*-AHL) syntetyzowane przez dodanie łańcucha acylowego do cząsteczki S-adenozylometioniny (SAM). Autoinduktory wydzielane są przez komórki bakteryjne do środowiska, a w momencie przekroczenia stężenia progowego następuje zmiana ekspresji genów we wszystkich komórkach danej populacji (Rajesh i Rai, 2014). Co ciekawe, w genomach większości przebadanych bakterii endofitycznych stwierdzono obecność genów systemu QS, określanego jako typ LuxI/LuxR (Kandel i in., 2017b). Badania przeprowadzone przez Wei i Zhang (2006) wykazały, iż szczep *P. fluorescens* 2P24 niosący mutacje w genach kodujących białka zaliczane do rodziny LuxI i LuxR wykazywał zmniejszoną aktywność biokontroli grzyba *R. solani*, tworzenia biofilmu oraz kolonizacji pszenicy.

Wydzielanie białek efektorowych odgrywa kluczową rolę w modulowaniu interakcji bakterii z ich środowiskiem. Dzięki systemom sekrecji bakterie wydzielają antybiotyki, wtórne metabolity, enzymy, toksyny i peptydy (Andrés-Barrao i in, 2017; Eida i in., 2020). W komórkach bakterii Gram-ujemnych opisano funkcjonowanie sześciu typów systemów translokacji i sekrecji białek (T1SS – T6SS). Geny kodujące układy wydzielnicze, w tym T1SS, T2SS, T5SS i T6SS, są zwykle wykrywane w dużej liczbie kopii w genomach bakterii endofitycznych. (Liu i in., 2017; Mengistu, 2020). Obecność systemów typu III (T3SS) i typu IV (T4SS) stwierdzono u nielicznych bakterii endofitycznych, co może sugerować, że mechanizm modulacji odpowiedzi rośliny na wniknięcie bakterii poprzez białka efektorowe wydzielane bezpośrednio do komórek gospodarza nie jest powszechny w interakcjach endofit-roślina (Liu i in., 2017). Krause i in. (2006) zsekwencjonowali genom szczepu

Azoarcus sp. BH72 i opisali go jako „rozbrojony”, ze względu na brak zarówno systemu T3SS, jak i T4SS. Co więcej, badania metagenomiczne wykazały rzadką obecność genów kodujących T3SS i T4SS w genomach 11 endofitycznych szczepów bakteryjnych (Reinhold-Hurek i Hurek, 2011). Istotną rolę w interakcjach bakterii endofitycznych z roślinami, może natomiast pełnić system typu VI (T6SS). Funkcjonowanie tego systemu sekrecji jest istotne dla przebiegu wielu procesów, między innymi: tworzenia biofilmu, koniugacji, regulacji QS, czy supresji wirulencji (Piński i Hupert-Kocurek, 2016).

3. CELE PRACY

Nadrzędnym celem pracy doktorskiej była identyfikacja mechanizmów warunkujących wysoką aktywność biologiczną wybranych bakterii endofitycznych. Podjęto próbę poznania i zrozumienia podstaw antagonistycznych oddziaływań między bakteryjnymi endofitami i zróżnicowanymi taksonomicznie fitopatogenami grzybowymi na poziomie molekularnym.

Szczegółowe cele badawcze obejmowały:

1. Określenie aktywności biologicznej wybranych szczepów bakterii endofitycznych wobec zróżnicowanych taksonomicznie fitopatogenów grzybowych.
2. Identyfikację genów kluczowych dla biokontroli, promocji wzrostu roślin i kolonizacji roślin w genomach badanych szczepów bakterii.
3. Identyfikację mechanizmów warunkujących oddziaływania antagonistyczne za pomocą testów biochemicznych *in vitro*.
4. Ocenę wpływu wybranych fitopatogenów grzybowych na ekspresję genów potencjalnie zaangażowanych w proces biokontroli u badanych szczepów bakterii.
5. Biochemiczną charakterystykę badanych szczepów bakterii pod kątem cech niezbędnych w procesie kolonizacji roślin i oddziaływań endofitycznych z gospodarzem.
6. Określenie zdolności badanych szczepów bakterii do kolonizacji wewnętrznych tkanek roślin.
7. Ocenę wpływu badanych szczepów endofitycznych na wzrost i ochronę rzepaku przed chorobami grzybowym

4. HIPOTEZY BADAWCZE

Podczas planowania eksperymentów opisanych w niniejszej pracy postawiono następujące hipotezy badawcze:

- H1. Badane szczepy bakterii endofitycznych hamują wzrost fitopatogennych grzybów.
- H2. Badane szczepy bakterii endofitycznych wykazują różne mechanizmy aktywności biologicznej wobec fitopatogenów grzybowych.
- H3. Fitopatogeny grzybowe wpływają na ekspresję genów warunkujących aktywność biologiczną badanych szczepów bakterii.
- H4. Badane szczepy bakterii efektywnie kolonizują tkanki roślinne.
- H5. Badane szczepy bakterii endofitycznych przyczyniają się do ochrony rzepaku przed fitopatogenami grzybowymi.

5. MATERIAŁY I METODY

5.1. Szczepy bakteryjne i warunki hodowli

Materiał do niniejszych badań stanowiły dwa endofityczne szczepy bakterii pochodzące z Kolekcji Mikroorganizmów Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach: *Pseudomonas fluorescens* BRZ63 wyizolowany z wysterylizowanych powierzchniowo korzeni rzepaku (*Brassica napus* L.) i *Serratia quinivorans* KP32 wyizolowany z wysterylizowanych powierzchniowo korzeni pietruszki (*Petroselinum crispum* L.). Szczepy te zostały wyizolowane w 2017 roku z roślin zasiedlających gleby zanieczyszczone pestycydami i związkami fenolowymi i wykazywały zdolność do degradacji zanieczyszczeń organicznych takich jak: fenol, chlorofenol, benzoesan sodu czy katechol. Badania te koncentrowały się na możliwości zastosowania szczepów bakterii endofitycznych, w tym BRZ63 i KP32, w procesie fitodegradacji (Chlebek, 2018). W badaniach tych, szczepy bakterii zostały wstępnie zaklasyfikowane do gatunku na podstawie sekwencjonowania i analizy genu 16S rRNA oraz scharakteryzowane fenotypowo i biochemicznie przy użyciu standardowych technik.

W badaniach stanowiących podstawę niniejszej pracy doktorskiej jako szczep kontrolny wykorzystano także endofityczny szczep *Enterobacter asburiae* 4FJK wyizolowany z kosmaczka wysokiego (*Hieracium piloselloides*) (Pawlik i Piotrowska-Seget, 2015) pochodzący z Kolekcji Mikroorganizmów Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach.

Wszystkie szczepy bakteryjne stosowane w obecnych badaniach hodowano w bulionie Luria Bertani (LB Broth; BTL, Warszawa, Polska) z wytrząsaniem 130 obr min⁻¹ lub na podłożu Luria Bertani-Agar (LB-Agar, BTL, Warszawa, Polska), w temperaturze 30°C. Do testów aktywności antagonistycznej szczep BRZ63 i KP32 hodowano na agarze ziemniaczano-glukozowym (PDA, A&A Biotechnology, Gdynia, Polska).

5.2. Fitopatogeny grzybowe i warunki hodowli

Fitopatogeny grzybowe zastosowane w badaniach: *Rhizoctonia solani* W70 (RS), *Fusarium avenaceum* (FA), *Colletotrichum dematium* K (CD), *Sclerotinia sclerotiorum* K2291 (SS) pochodziły z Kolekcji Mikroorganizmów Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska, Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Zostały one pierwotnie wyizolowane z tkanek roślinnych wykazujących

wyraźne objawy chorobowe. Szczep *R. solani* W70 wyizolowano z winorośli (*Vitis vinifera* L.), *C. dematium* K i *S. sclerotiorum* K2291 z kminku (*Carum carvi* L.), a *F. avenaceum* z pszenicy (*Triticum* L.). Wszystkie badane patogeny hodowano na pożywce PDA (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska) w temperaturze 30°C lub w podłożu płynnym (pH 5,6) o składzie, g L⁻¹: glukoza 20,0, pepton 10,0, ekstrakt drożdżowy 10,0, Mg₂SO₄ × 7 H₂O 0,5 i K₂HPO₄ 1,0, w temperaturze 30°C.

5.3. Badania antagonistycznych oddziaływań bakterii endofitycznych wobec fitopatogenów grzybowych

5.3.1. Test podwójnej hodowli

Aktywność antagonistyczną endofitycznych szczepów BRZ63 i KP32 badano standardowymi testami hodowli podwójnej *in vitro* na pożywce PDA (Siała i in., 2016; Chlebek i in., 2020). Fitopatogeny grzybowe hodowano oddzielnie na pożywce PDA w temperaturze 30°C przez 5–21 dni (w zależności od szczepu grzyba) w celu uzyskania świeżej grzybni. *C. dematium* hodowano 12 dni, *F. avenaceum* hodowano 5 dni, *R. solani* hodowano 5 dni, natomiast szczep *S. sclerotiorum* hodowano przez 21 dni. Następnie, z każdej aktywnie rosnącej kolonii grzybów pobierano 5 mm krążek agaru z grzybnią i umieszczano w odległości 10 mm od krawędzi szalki Petriego z pożywką PDA, oddzielnie dla każdego patogena. Kolejno wykonywano posiew rysowy 24 godzinnej hodowli zawiesiny bakteryjnej w odległości 30 mm od krążka patogena grzybowego. Jako kontrolę zastosowano płytki z PDA zaszczerpione tylko grzybami. Płytki kontrolne oraz badane inkubowano w temperaturze 30°C do momentu, kiedy promień kolonii grzyba przekroczył 30 mm. Po inkubacji, mierzono odległość pomiędzy punktem inokulacji krążka grzybowego, a aktywnie rosnącymi krawędziami grzybni, zarówno na płytkach kontrolnych, jak i tych zaszczerpionych bakteriami. Zahamowanie wzrostu grzyba świadczyło o aktywności przeciwgrzybowej badanego szczepu bakterii. Procent zahamowania wzrostu (PGI, ang. *percent growth inhibition*) obliczano za pomocą równania:

$$PGI = \frac{KR - R1}{KR} \times 100\%,$$

gdzie: KR oznacza odległość (w mm) od miejsca zaszczerpiania grzyba do krawędzi wzrostu grzybni na szalkach kontrolnych, a R1 oznacza odległość wzrostu grzyba w kierunku antagonisty od miejsca zaszczerpiania grzyba do krawędzi wzrostu grzybni na płytkach zaszczerpionych bakteriami. Doświadczenie prowadzono w trzech powtórzeniach.

5.3.2. Zdolność badanych szczepów do wydzielania do podłoża metabolitów hamujących wzrost fitopatogenów

W celu zbadania zdolności szczepów BRZ63 i KP32 do wydzielania do podłoża metabolitów o aktywności przeciwgrzybowej, 100 μ l 24 godzinnej hodowli każdego ze szczepów rozprowadzano na oddzielnych płytkach z podłożem PDA i inkubowano w temperaturze 30°C przez 24 godziny. Na środku tak przygotowanych płytek, umieszczano 5 mm krążek grzybni danego patogena grzybowego. Kontrolę stanowiły płytki z podłożem PDA, na którym rozprowadzono po 100 μ l sterylnej wody destylowanej i umieszczano 5 mm krążek grzybni danego patogena. Wszystkie układy inkubowano przez 5-21 dni (w zależności od szczepu grzyba) w temperaturze 30°C. Procent zahamowania wzrostu obliczano ze wzoru:

$$PGI = \frac{C-T}{C} \times 100\%,$$

gdzie: C oznacza promień kolonii badanego grzyba (mm), a T promień grzybni rosnącej w obecności antagonistycznego szczepu bakteryjnego (mm). Doświadczenie prowadzono w trzech powtórzeniach.

5.3.3. Zdolność badanych szczepów do produkcji lotnych metabolitów

W celu zbadania zdolności szczepów BRZ63 i KP32 do produkcji lotnych metabolitów o aktywności przeciwgrzybowej, 100 μ l 24 godzinnej hodowli bakteryjnej szczepu BRZ63 bądź KP32 rozprowadzano na połowie szalki Petriego zawierającej stałe podłoże LB, a 5 mm krążek grzybni patogena umieszczano na środku drugiej połowy szalki zawierającej podłoże PDA. Płytki szczelnie zamykano parafilmem i inkubowano w temperaturze 30°C przez 5-21 dni (w zależności od szczepu grzyba). Procent zahamowania wzrostu patogenów grzybowych obliczano według wzoru podanego powyżej (5.3.2). Doświadczenie prowadzono w trzech powtórzeniach.

5.3.4. Ocena wpływu supernatantu pozyskanego z hodowli bakteryjnej na wzrost patogenów

Szczepy BRZ63 i KP32 hodowano oddzielnie w 100 ml pożywki LB w temperaturze 30°C, z wytrząsaniem 130 obr min^{-1} . Po 96 godzinach inkubacji bulion pohodowlany wirowano (5000 x g, 4°C, 10 minut), a supernatant filtrowano przy użyciu filtru strzykawkowego o średnicy porów 0,22 μ m. Wolny od komórek filtrat pohodowlany mieszano z podłożem PDA w stosunku 1:10 (v/v) i wylewano na szalki Petriego. Następnie na środku tak przygotowanych płytek umieszczano grzybnię danego patogena o średnicy 5 mm. Kontrolę stanowiły hodowle badanych grzybów na płytkach z podłożem PDA bez

dotatku filtratu pochodowlanego. Płytki inkubowano w 30°C przez 5 – 21 dni. Procent zahamowania wzrostu grzybni obliczano według wzoru podanego powyżej (5.3.2). Doświadczenie prowadzono w trzech powtórzeniach.

5.4. Sekwencjonowanie i analiza funkcjonalna genomów badanych szczepów bakterii

Genomowe DNA szczepów BRZ63 i KP32 izolowano z użyciem zestawu GeneMatrix Bacterial and Yeast Genomic Purification Kit (EURx, Gdańsk, Polska) zgodnie z zaleceniami producenta. Sekwencjonowanie genomowe wykonano w firmie MicrobesNG (MicrobesNG, Birmingham, Wielka Brytania) przy użyciu platformy Illumina MiSeq z odczytami sparowanych końców 2 x 250 bp. Wyniki sekwencjonowania analizowano korzystając ze standardowych narzędzi MicrobesNG i zdeponowano w bazie danych GenBank pod numerem dostępu SPVI00000000.1 dla szczepu BRZ63 i numerem JAHTKS000000000.1. dla szczepu KP32.

Funkcjonalną adnotację genów prowadzono z użyciem wielu narzędzi bioinformatycznych i baz danych, w tym programu eggNOG 5.0 z ograniczeniem ortologicznym jeden do jednego (<http://eggnogdb.embl.de>) (Huereta-Cepas i in., 2019). W celu opisanie funkcji genów zidentyfikowane geny porównywano z bazą danych KEGG (Functional Kyoto Encyclopedia of Gens and Genomes) (<http://www.genome.jp/kegg/>) (Kanehisa i in., 2016). Analizy funkcjonalne i analizy szlaków metabolicznych prowadzono również przy użyciu narzędzia internetowego BlastKOALA (<https://www.kegg.jp/blastkoala/>) (Kanehisa i in., 2016). Do analizy funkcjonalnej klastrow grup ortologicznych (COG, ang. *clusters of orthologous groups*) wykorzystano WebMGA (<http://weizhong-lab.ucsd.edu/webMGA/server/cog/>) (Wu i in., 2011a). Program antiSMASH 5.0 został zastosowany do identyfikacji klastrow genów odpowiedzialnych za biosyntezę metabolitów wtórnych (<https://antismash.secondarymetabolites.org>) (Blin i in., 2019), a do klasyfikacji i podziału CWDEs na różne rodziny zastosowano bazę danych CAZy (ang. *carbohydrate active enzymes*). Rodziny CAZy identyfikowano za pomocą dbCAN2, zgodnie z bazą danych DIAMOND (<http://www.cazy.org/>) (Yin i in., 2012; Zhang i in., 2018). Sekwencje profagów w genomach badanych szczepów zostały zidentyfikowane za pomocą programu PHAST (Zhou i in., 2011). Dane z sekwencjonowania i montaż przekazano do publicznej bazy danych NCBI, pod numerem dostępu BioProject PRJNA529642 dla szczepu BRZ63 i numerem PRJNA743191 dla szczepu KP32.

5.5. Analiza filogenetyczna szczepu *P. fluorescens* BRZ63

Drzewo filogenetyczne szczepu BRZ63 skonstruowano na podstawie podobieństwa sekwencji białkowych szczepu BRZ63 i sekwencji białkowych dobrze opisanych w literaturze szczepów należących do rodzaju *Pseudomonas* oraz szczepu *E. coli* K-12 substr. MG1655 jako grupą zewnętrzną. Sekwencje białkowe 20 szczepów zostały wyekstrahowane i przyrównane z użyciem programu M1CR0B1AL1Z3R przy ustawieniach domyślnych (Avram i in., 2019). Słabo dopasowane regiony zostały usunięte z zastosowaniem programu Gblocks (wersja 0.91b) (Integrated DNA Technologies, Iowa, IA, USA) (Talavera i in., 2007). Drzewo filogenetyczne skonstruowano przy użyciu programu MEGA X (wersja 10.1.5) (Pennsylvania State University, Mueller Laboratory, University Park, PA, USA). Wartość samopróbkowania podana przy węzłach wyrażona jest w procentach (na 100 powtórzeń) (Kumar i in., 2018).

5.6. Analiza filogenetyczna szczepu *S. quinivorans* KP32

Drzewo filogenetyczne szczepu KP32 skonstruowano na podstawie podobieństwa sekwencji białkowych szczepu KP32 i sekwencji białkowych dobrze opisanych w literaturze szczepów należących do rodzaju *Serratia* oraz szczepu *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883T jako grupą zewnętrzną. Sekwencje białkowe 14 szczepów zostały wyekstrahowane i wyrównane z użyciem programu M1CR0B1AL1Z3R przy ustawieniach domyślnych (Avram i in., 2019). Słabo dopasowane regiony zostały usunięte przez Gblocks (wersja 0.91b) (Integrated DNA Technologies, Iowa, IA, USA) (Talavera i in., 2007). Drzewo filogenetyczne skonstruowano przy użyciu programu MEGA XI (wersja 11.0.10) (Pennsylvania State University, Mueller Laboratory, University Park, PA, USA). Wartość samopróbkowania podana przy węzłach wyrażona jest w procentach (na 100 powtórzeń) (Kumar i in., 2018).

5.7. Badanie właściwości potencjalnie warunkujących aktywność biologiczną badanych szczepów

5.7.1. Ocena zdolności produkcji sideroforów

Zdolność szczepów BRZ63 i KP32 do produkcji sideroforów badano metodą Schwyn i Neilands (1987) bazującą na obserwacji zmiany zabarwienia podłoża zawierającego odczynnik chrom azurol S (CAS) z niebieskiego na pomarańczowy, na skutek chelatacji żelaza przez siderofory. Jako kontrolę pozytywną wykorzystano szczep *E. asburiae* 4FJK. 24-godzinne hodowle każdego z badanych szczepów prowadzono w podłożu Fiss Minimal Medium (FMM), o składzie, g L⁻¹: KH₂PO₄ 5,03, glukoza 5,0, L-

asparagina 5,03, MnSO_4 0,001, MgSO_4 0,04 i ZnCl_2 0,005, z dodatkiem $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ w stężeniu 0,5 mM lub 20 mM. Podłoże FMM niezawierające żelaza zostało zastosowane jako kontrola negatywna. Hodowle wirowano (5000 x g, 4°C, 20 min), po czym 50 μL uzyskanego supernatantu wprowadzano do dołków wyciętych w płytkach z podłożem CAS. Inokulowane płytki inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 30°C (Schwyn i Neilands, 1987, Clark, 2004). Doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach.

5.7.2. Ocena zdolności do produkcji enzymów litycznych

Zdolność do produkcji chitynaz przez badane szczepy BRZ63 i KP32 oceniano zgodnie z metodą opisaną przez Kuddus i Ahmad (2013). Badane szczepy bakterii hodowano na podłożu, o składzie, g L^{-1} : K_2HPO_4 0,7, KH_2PO_4 0,3, $\text{MgSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,5, koloidalna chityna 2,0. Zainokulowane płytki inkubowano przez 5 dni w temperaturze 30°C. Obecność wyraźnych przejaśnień wokół kolonii świadczyła o zdolności szczepów do produkcji chitynaz. Zdolność badanych szczepów do produkcji proteaz oceniano na stałym podłożu LB z dodatkiem mleka odtłuszczonego (0,5% w/v), celulaz na stałym podłożu LB zawierającym karboksymetylocelulozę (0,5% w/v), a amylaz na stałym podłożu LB zawierającym skrobię rozpuszczalną (1% w/v) (Vijayalakshmi i in., 2016). Płytki inkubowano przez 3 dni w temperaturze 30°C. Strefy przejaśnień wokół kolonii świadczyły o produkcji badanych enzymów litycznych. Zdolności badanego szczepu do produkcji lipaz badano na podłożu, o składzie, g L^{-1} : bulion odżywczy 8,0, NaCl 4,0, agar 15,0, CaCl_2 10 ml (1% v/v), oliwa z oliwek 10 ml. O produkcji lipaz świadczyło pojawianie się na powierzchni kolonii białych kryształów oleinianu wapnia (Vijayalakshmi i in., 2016). Doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach.

5.7.3. Ocena zdolności do produkcji acetoiny i 2,3-butanodiolu

Zdolność szczepów BRZ63 i KP32 do produkcji acetoiny i 2,3-butanodiolu badano zgodnie z metodą opisaną przez Gayathri i in. (2010). Badane szczepy hodowano oddzielnie w podłożu (pH 6,0) o składzie, g L^{-1} : pepton 5,0, glukoza 5,0, KH_2PO_4 5,0, przez 48 godzin, w temperaturze 30°C, z wytrząsaniem 130 obr min^{-1} . Następnie, do 10 ml hodowli wprowadzano po 0,6 ml odczynnika Barrita A (5 g α -naftolu w 100 ml absolutnego etanolu) i 0,4 ml odczynnika Barrita B (40% roztwór wodorotlenku potasu). Tak przygotowane próby umieszczano na 30 min w łaźni wodnej, w temperaturze 30°C. Różowe zabarwienie w górnej części podłoża świadczyło o produkcji acetoiny i 2,3 - butanodiolu przez badane szczepy. Doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach.

5.7.4. Ocena zdolności do produkcji cyjanowodoru

Oznaczanie zdolności szczepów BRZ63 i KP32 do produkcji cyjanowodoru prowadzono zmodyfikowaną metodą opisaną przez Lorck (2006). Bakterie hodowano oddzielnie w podłożu LB z dodatkiem glicyny, w końcowym stężeniu 4,4 g L⁻¹, przez 4 dni, w temperaturze 30°C z wytrząsaniem 130 obr min⁻¹. Po tym czasie hodowle przenoszono na zestalone agarowo podłoże LB z dodatkiem glicyny 4,4 g L⁻¹. Na środku każdej płytki umieszczano bibułę filtracyjną nasączoną roztworem 2% węglanu sodu (w/v) w 0,5% roztworze kwasu pikrynowego. Płytki zabezpieczano parafilmem i inkubowano w temperaturze 30°C przez 4 dni. Zmiana zabarwienia bibuły, z żółtego na pomarańczowo świadczyła o zdolności badanych szczepów do produkcji HCN. Doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach.

5.7.5. Ocena zdolności do produkcji kwasu indolilo-3-octowego

Produkcję IAA przez badane szczepy badano metodą kolorymetryczną z użyciem odczynnika Salkowskiego (Szilagyi-Zecchin i in., 2014). Bakterie hodowano w podłożu LB z dodatkiem tryptofanu (500 µg/ml) przez 72 godziny, w temperaturze 30°C, z wytrząsaniem 130 obr min⁻¹. Następnie hodowle wirowano (10000 x g, 4°C, 15 min) i do 1 ml supernatantu dodawano po 100 µl 10 mM kwasu ortofosforowego i 4 ml odczynnika Salkowskiego (96% H₂SO₄ 150 ml, H₂O 250 ml, 0,5M FeCl₃ 7,5 ml). Próby inkubowano przez 20 minut w ciemni, w temperaturze pokojowej. Po inkubacji mierzono absorbancję próby przy długości fali λ=530 nm względem próby ślepej, którą stanowiła pożywka LB z dodatkiem tryptofanu. Różowe zabarwienie świadczyło o obecności IAA. Stężenie IAA oznaczano z wykorzystaniem krzywej wzorcowej, sporządzonej dla roztworów IAA w zakresie stężeń 10-100 µg/ml. Doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach.

5.7.6. Ocena zdolności do produkcji kwasu salicylowego

Zdolność szczepów do produkcji kwasu salicylowego (SA) oceniano metodą opisaną przez Syamala i Sivaji (2017). Bakterie hodowano, w podłożu SMM (pH 7,0), o składzie, g L⁻¹: kwas bursztynowy 4,0, K₂HPO₄ 6,0, (NH₄)₂SO₄ 1,0, MgSO₄·7H₂O 0,2, przez 72 godziny, w temperaturze 30°C, z wytrząsaniem 130 obr min⁻¹. Po inkubacji, hodowle wirowano (5000 x g, 4°C, 20 min), a supernatanty zakwaszono 2M HCl do pH 2. W kolejnym etapie prowadzono ekstrakcję kwasu salicylowego chloroformem w stosunku 1:1 (v/v). Ilość kwasu salicylowego produkowanego przez badane szczepy oznaczano w następujący sposób: do 1 ml ekstraktu dodawano po 1 ml H₂O i 5 µl 2M FeCl₃. W fazie wodnej kwas salicylowy tworzy z żelazem fioletowy kompleks. Ekstynkcję utworzonego kompleksu kwas

salicylowy-żelazo mierzono przy długości fali $\lambda=527$ nm względem próby ślepej, którą stanowiła pożywka SMM. Stężenie SA oznaczano z wykorzystaniem krzywej wzorcowej, sporządzonej dla roztworów SA w zakresie stężeń 10-100 $\mu\text{g/ml}$. Doświadczenie prowadzono w trzech powtórzeniach.

5.7.7. Ocena zdolności do produkcji deaminazy ACC

Zdolność badanych szczepów do wzrostu na podłożu z ACC jako jedynym źródłem azotu badano na stałym podłożu DF (Dworkin Foster) zawierającym ACC w stężeniu 3 mM, zgodnie z procedurą opisaną przez Sandhya i in. (2017). Kontrolę pozytywną stanowiło podłoże DF (pH 7,0), o składzie g L^{-1} : KH_2PO_4 1,36, Na_2HPO_4 2,13, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0,7, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 0,04, $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 0,02, ZnSO_4 0,02, H_3BO_4 0,003, CoCl_2 0,007, Na_2MoO_4 0,004, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2, glukoza 10, agar 20,0. Natomiast kontrolę negatywną stanowiło podłoże DF bez dodatku ACC i siarczanu amonu. Bakterie posiewano punktowo, w trzech powtórzeniach. Płytki inkubowano przez 4 dni, w temperaturze 30°C . Po tym czasie wzrost badanych szczepów na płytkach z ACC jako jedynym źródłem azotu, porównywano z kontrolą pozytywną i negatywną.

5.7.8. Ocena zdolności do solubilizacji fosforanów

Ocenę zdolności szczepów BRZ63 i KP32 do solubilizacji fosforanów badano na podłożu Pikovskaya (pH 6,8-7,0) o składzie g L^{-1} : glukoza 10,0, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5,0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5, NaCl 0,2, $\text{MgSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1, KCl 0,2, ekstrakt drożdżowy 0,5, MnSO_4 0,001, FeSO_4 0,001, agar 20,0 (Pikovskaya, 1948). Podłoże zaszczipiano punktowo hodowlą szczepu BRZ63 lub KP32 i inkubowano przez 7 dni w temperaturze 30°C . Doświadczenie prowadzono w trzech powtórzeniach. Po okresie inkubacji, obserwowano pojawienie się stref przejaśnienia wokół kolonii bakterii na podłożu zawierającym $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, jako jedyne źródło fosforu, mierzono średnicę kolonii i obliczano indeks rozpuszczalności fosforanu (PSI, ang. *phosphate solubility index*) (Pande i in., 2017).

5.8. Ocena wpływu patogenów grzybowych na ekspresję wybranych genów u badanych szczepów bakterii

5.8.1. Przygotowanie filtratów grzybowych

Filtraty każdego z badanych patogenów przygotowywano oddzielnie. W tym celu 250 ml pożywki o składzie opisanym w punkcie 5.2., zaszczipiano 5 mm krążkiem agaru z grzybnią i inkubowano przez 21 dni w temperaturze 30°C . Po tym czasie biomasę grzybową zbierano przez odwirowanie ($10000 \times \text{g}$, 4°C , 20 min), a otrzymany supernatant

filtrowano przy użyciu filtra strzykawkowego o średnicy porów 0,22 μm , w celu usunięcia komórek i zarodników grzybów.

5.8.2. Przygotowanie hodowli bakteryjnych z filtratami grzybowymi

Do 25 ml pożywki LB dodawano po 1 ml 24-godzinnej hodowli szczepu BRZ63 bądź KP32 i po 5 ml filtratu danego grzyba. Kontrole stanowiły hodowle szczepu BRZ63 lub szczepu KP32 prowadzone w pożywce LB bez filtratu. Dodatkowo przygotowano kontrole abiotyczne, które stanowiło podłoże LB z dodatkiem 5 ml filtratu pochodzącego danego patogena grzybowego. Wszystkie układy inkubowano przez 96 godziny w temperaturze 30°C, z wytrząsaniem 130 obr min⁻¹.

5.8.3. Izolacja całkowitego RNA i synteza cDNA

Izolację całkowitego RNA z hodowli bakteryjnych traktowanych filtratami po hodowli grzybów, jak i kontrolnych, izolowano przy użyciu zestawu GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit (EURx, Gdańsk, Polska). Izolację prowadzono po 24, 48, 72 i 96 godzinach hodowli. Wyizolowany całkowity RNA oczyszczano za pomocą DNazy TURBO DNA-free™ (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), w celu usunięcia pozostałości genomowego DNA. Stężenie i czystość otrzymanego RNA oceniano za pomocą spektrofotometru ND-1000 NanoDrop (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) przez pomiar absorbancji pobranych próbek przy długości fali 230, 260 i 280 nm oraz obliczenie odpowiednich wartości stosunków absorbancji $A_{260/280}$ i $A_{260/230}$. Jakość i integralność otrzymanych próbek RNA sprawdzano poprzez elektroforetyczny rozdział uzyskanego RNA w żelu agarozowym (2% w/v).

Syntezę cDNA prowadzono w trzech powtórzeniach, stosując 1 μg całkowitego RNA, losowe startery (ang. Random Hexamer Primers) i zestaw RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), zgodnie z zaleceniami producenta. Próbkę cDNA przechowywano w temperaturze -20°C do dalszych eksperymentów.

5.8.4. Analiza ekspresji wybranych genów

Projektowanie i walidacja starterów

Do badań nad wpływem filtratów po hodowli grzybów na ekspresję genów u szczepu BRZ63, wybrano geny: *gacA*, *gacS*, *rpoS*, *nrpS*, *pvdL*, *sidS*, *pqqC*, *speS*, *phzF*, *manD*, *budC*, *vsmA* i *nagA* potencjalnie zaangażowane w procesy biokontroli oraz *katB* i *sodB* kodujące enzymy antyoksydacyjne. U szczepu KP32, analizowano poziom ekspresji genów: *chiA*, *budA*, *hcnC*, *iucA*, *entB*, *pchB* i *mtlR* oraz *katG* i *sodB*. Jako geny referencyjne, w badaniach

zastosowano geny *gyrA* i *gyrB*. Startery dla testowanych genów zostały zaprojektowane na podstawie sekwencji genomów badanych szczepów przy użyciu programu Geneious Prime (wersja 2020.0.1). Każda para starterów dla wytypowanych genów została zaprojektowana tak, aby miały one optymalną długość 20 nukleotydów z $\geq 50\%$ zawartością par GC zapewniającą wysoką specyficzność przyłączenia startera do matrycy cDNA (Bustin i in., 2020). Specyficzność zaprojektowanych starterów testowano przy użyciu kontrolnej reakcji PCR, z zastosowaniem Color Taq PCR Master Mix (2x) (EURx, Gdańsk, Polska). Mieszanina reakcyjna dla jednej próby zawierała: 10 μ l Color Taq PCR Master Mix (2x), 2 μ l cDNA, 1 μ l mieszaniny starterów R i F oraz 7 μ l wody (PCR nucelase-free water, EURx, Gdańsk, Polska). Reakcja amplifikacji obejmowała 30 cykli reakcji: wstępną denaturację DNA w 95°C (5 min), denaturację DNA w 95°C (30 s), przyłączenie starterów w 60°C (60 s), elongację DNA w 72°C (120 s), i końcową polimeryzację w 96°C (10 min). Po zakończeniu reakcji PCR uzyskane produkty rozdzielano w żelu agarozowym (2% w/v) w obecności markera wielkości - Perfect Plus™ 50-500 bp DNA Ladder (EURx, Gdańsk, Polska). Elektroforezę prowadzono przez 40 min, pod napięciem 70V. Wydajność starterów dla każdego genu sprawdzono według metody Taylora i in. (2010). Produkty wybranych genów oraz sekwencje zaprojektowanych starterów przedstawiono w tabelach 2 i 3.

Tabela 2. Startery zaprojektowane dla genów referencyjnych, wybranych genów potencjalnie zaangażowanych w aktywność przeciwgrzybową oraz genów kodujących enzymy antyoksydacyjne u szczepu BRZ63

Gen	Produkt genu	Starter Forward (5'-3')	Starter Reverse (5'-3')	T _m (°C)	Wydajność starterów (%)	Nachylenie	Wielkość produktu [pz]
Geny referencyjne							
<i>gyrA</i>	podjednostka A gyrazy	ACGGCAAGTACTTCCTGTCG	TACTCGGCCAGCAGTTTCTC	53,8-53,8	101,78	3,28	100
<i>gyrB</i>	podjednostka B gyrazy	AAGGCCTCACCGCATTATC	TCCACTGCGGTCTTCACTTC	53,8-53,8	109,18	3,12	100
Geny potencjalnie zaangażowane w biokontrolę							
<i>gacA</i>	białko regulatorowe	GGAAATCCAGATCGCCTGA	ATAGCGGTAGTGTGACGG	53,8-53,8	108,68	3,13	100
<i>gacS</i>	kinaza histydynowa	CTGGAGGTTATTTGCCGCT	TGCACCGCATGGAAAAATGG	53,8-51,8	91,99	3,53	100
<i>rpoS</i>	czynnik polimerazy RNA sigma-S	CTCCACCGCGTTAAAGCAAC	AGTGAGCAGAGGGGAAAAGC	53,8-53,8	110,17	3,10	100
<i>nrpS</i>	syntetaza nierybosomalnych peptydów	CTGTGGCAACTGGAACCTGA	CCGCCAGGCTGTTATTCAAG	53,8-53,8	105,82	3,19	100
<i>phzF</i>	białko związane z biosyntezą fenazy	CGCCTGGGTAAGACAACACT	GCCTTGCCGAAATGATCAC	53,8-53,8	94,92	3,45	100
<i>sidS</i>	syntaza sideroforu	ACAACCTGCTCAGCCATCTC	TAGTTGGGATGCCACGGATG	53,8-53,8	108,20	3,14	100
<i>pvdL</i>	syntetaza nierybosomalnych peptydów (biosynteza piowerdyny)	GGATGCAGGCCACCTATCAA	ATCAGTGGCCAGAAGCACTC	53,8-53,8	98,03	3,37	100
<i>speS</i>	syntaza spermidyny	ACGTTTCGTTCTGCTGGACA	CGCCCTGGATCTTGATGACA	53,8-53,8	98,44	3,36	100
<i>manD</i>	dehydrogenaza mannitolowa	AGACACCGATGACACCGAAG	CGGGTCAGCAGTTTATCGA	53,8-53,8	102,65	3,24	100
<i>budC</i>	dehydrogenaza mezo-2,3 butanodiolu	GTGTGCAAGGTTTCAGCGTC	TCCAGATGTTGTACAGCCC	53,8-53,8	106,76	3,17	100
<i>vsmA</i>	syntetaza nierybosomalnych peptydów (biosynteza wiskozynu)	GTGGGTATCTGGCAAACGGT	TCACCACTTGGATCGACACG	53,8-53,8	94,92	3,45	100
<i>nagA</i>	deacetylaza N- acetyloglukozamino-6- fosforanowa	TGTATAACGCCATGAGCCCG	GGAGCAAGTCCGGGATCAAT	53,8-53,8	91,99	3,53	100
<i>pqqC</i>	Biosynteza pirolochinolinochinonu	GACATCCTGTGGAGCATGCT	CCTTTATGCCAGACCCGCTG	53,8-55,9	104,89	3,21	100
Geny kodujące enzymy antyoksydacyjne							
<i>katB</i>	katalaza	TGCAGGCATCAAGAACCTT	CCCTTGTGATGTGCGTCAC	51,8-53,8	94,54	3,46	100
<i>sodB</i>	dysmutaza nadadtlenkowa	ATCAACAACCTGAACCGGC	CACGCAGTTTTCCGGCAG	51,8-53,2	109,92	3,10	100

Tabela 3. Startery zaprojektowane dla genów referencyjnych, wybranych genów potencjalnie zaangażowanych w aktywność przeciwgrzybową oraz genów kodujących enzymy antyoksydacyjne u szczepu KP32

Gen	Produkt genu	Starter Forward (5'-3')	Starter Reverse (5'-3')	Tm (°C)	Wydajność straterów (%)	Nachylenie	Wielkość produktu (pz)
Geny referencyjne							
<i>gyrA</i>	podjednostka A gyrazy	TGCGCTATATGCTGGTGGAC	GCAATTTTGGACATGCGCAC	53,8 51,8	97,24	3,39	100
<i>gyrB</i>	podjednostka B gyrazy	CGGCGGCAAATTTGATGACA	AACCAGTTCAGTTCCTCGG	51,8 53,8	99,00	3,35	100
Geny potencjalnie zaangażowane w biokontrolę							
<i>chiA</i>	chitynaza	TGGAATGGCGATACCGGTAC	CCTTAAAGTTTGGCGTGCCC	53,8 53,8	101,35	3,29	100
<i>budA</i>	dekarboksylaza alfa-acetomleczanowa	CGGTGTTTACGAAGGGGAGG	GAAGGCGATCAGTTCACCGT	55,9 53,8	90,94	3,57	100
<i>hcnC</i>	syntaza cyjanowodoru	ACAGCACTATCGACATGCCG	CCAGTCCAGCAGCGGATAAT	53,8 53,8	106,76	3,17	100
<i>iucA</i>	syntaza aerobaktyjny	GTATGCCCCGGAATACCAGG	CTGGGTCAGCGGATATGCTT	55,9 53,8	109,00	3,11	100
<i>entB</i>	syntaza enterobaktyjny	GATCAAGCAGGTGGTGGAGA	ATCGCTCTGCTGATTTGGCT	53,8 51,8	108,20	3,15	100
<i>pchB</i>	liaza pirogronianowa izochoryzmatu	TCATTAAGCTGATCGCCGG	ATGGCCTCAAAGCGCTCTTT	53,8 51,8	105,15	3,20	100
<i>mtlR</i>	dehydrogenaza mannitolu	TCCCTTAAGTGAACGCCTCG	ATCGTGGCCAAACACCGTAT	51,8 53,8	108,20	2,94	100
Geny kodujące enzymy antyoksydacyjne							
<i>katG</i>	katalaza	GTTACATTCCTCAACTGCGC	ATCACCTTATTCCAGGCGGC	53,8 53,8	105,15	3,20	100
<i>sodB</i>	dysmutaza ponadtiolkowa	CGGCGGCATCTCAACAATG	GGCCAGTTTACCTTCAGGCT	53,8 53,8	104,53	3,22	100

qPCR

Ekspresję wybranych genów determinujących aktywność przeciwgrzybową oraz genów enzymów antyoksydacyjnych oceniano w reakcji qPCR z użyciem LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche, Basel, Szwajcaria). Analizę prowadzono w 96-dołkowych płytkach LightCycler 480 Multiwell Plate 96, w trzech powtórzeniach biologicznych i dwóch technicznych. Sygnał fluorescencji z badanych próbek mierzono za pomocą LightCycler® 96 Real-Time PCR System (Roche, Basel, Szwajcaria) w następującej konfiguracji eksperymentu: preinkubacja w 95°C (10 min), 3-etapowa amplifikacja w 45 cyklach 95°C (10 s), 60°C (10 s) i 72°C (10 s), topnienie w 97°C (1 s), 65°C (60 s) i 95°C (10 s) i chłodzenie w 40°C (10 s) (Żur i in., 2020). Do określenia poziomu względnej ekspresji badanych genów wykorzystano metodę zastosowaną przez Livak i Schmittgen (2001). Jako geny referencyjne do obliczeń metodą $2^{-\Delta\Delta CT}$ wykorzystano geny *gyrA* i *gyrB*, które wykazują stabilny profil ekspresji. Statystycznie istotne różnice między kontrolą, a próbkami traktowanymi filtratami po hodowli grzybów obliczano wykorzystując test t-studenta (Statistica 12.5 PL (StatSoft® Inc., Tulsa, OK, USA)).

5.9. Ocena wpływu patogenów na aktywność enzymów antyoksydacyjnych

W celu oznaczenia aktywności katalazy (CAT) i dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), 200 ml bulionu LB zaszczipiano 24 godziną hodowlą szczepu BRZ63 bądź KP32 i dodawano 50 ml filtratu po hodowli danego grzyba. Filtraty przygotowywano tak, jak opisano w punkcie 5.8.1. Bakterie hodowane w pożywce LB bez filtratu służyły jako kontrola. Hodowle szczepu BRZ63 inkubowano w temperaturze 30°C przez 72 godziny. Hodowle szczepu KP32 inkubowano w temperaturze 30°C przez 96 godzin. Po inkubacji, hodowle bakteryjne wirowano (5000 x g, 4°C, 20 min), a zebrane osady zawieszano oddzielnie w 5 ml 50 mM buforu fosforanowego (pH 7,2). Tak przygotowane próby sonikowano przy 20 kHz, 6 razy po 15 s, z odstępami 30 s w temperaturze 4°C przy użyciu homogenizatora ultradźwiękowego Vibra Cell (USA), celem rozbicia komórek bakteryjnych. Po odwirowaniu zawiesin (15000 x g, 4°C, 20 min), otrzymany supernatant zawierający białka enzymatyczne, wykorzystywano do pomiaru aktywności enzymów. Stężenie białka w próbach oznaczano według Bradford (1976), stosując lizozym jako standard. Aktywność CAT oznaczano zgodnie z metodą opisaną przez Banejee i in. (2015) i Muniswamy i in. (2016), opierającą się na indukowanym rozkładzie H₂O₂ w obecności aktywnego enzymu. Aktywność SOD oznaczano spektrofotometrycznie metodą opisaną przez Yuan i in. (2017), w której rodnik ponadtlenkowy powstały w wyniku reakcji katalizowanej przez oksydazę ksantynową redukuje sól tetrazolową do czerwonego formazanu. W obecności aktywnej dysmutazy ponadtlenkowej stężenie rodnika ponadtlenkowego maleje, w wyniku czego nie dochodzi do redukcji soli tetrazolowej. Oznaczenia aktywności dysmutazy prowadzono z użyciem komercyjnego zestawu odczynników (Sigma-Aldrich), a aktywność enzymu obliczano według metody opisanej przez Zhang i in. (2016). Aktywność właściwą CAT i SOD wyrażano jako U·mg⁻¹ białka.

Aktywność oksydaz badano komercyjnie dostępnym zestawem bioMérieux's API® zgodnie z zaleceniami producenta. Na bibułki nasączone odczynnikiem OX nanoszono niewielką ilość materiału bakteryjnego. Obecność niebieskiego zabarwienia świadczyła o aktywności oksydaz. Doświadczenie prowadzono w trzech powtórzeniach.

5.10. Badanie właściwości warunkujących efektywną kolonizację roślin

5.10.1 Ocena zdolności do ruchu

Zdolność szczepów do ruchu oznaczano metodami opisanymi przez Naveed i in. (2014). Zdolność do ruchu rozpełzliwego (ang. *swarming*) badano na płytkach z bulionem zestalonym 0,5% (w/v) agarem, do ruchu pływającego (ang. *swimming*) na płytkach z tryptonem zestalonym 0,3% (w/v) agarem, a zdolność do ruchu drgającego (ang.

twitching) na płytkach z bulionem zestalonych 1% (w/v) agarem. Płytki inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 30°C. Rozprzestrzenianie się bakterii na powierzchni płytek odczytywano jako zdolność szczepu do poruszania się.

5.10.2 Ocena zdolności do autoagregacji

Autoagregację badanych szczepów badano zgodnie z metodą opisaną przez Simoes i in. (2007). Szczepy BRZ63, KP32 i szczep kontrolny 4FJK hodowano oddzielnie w pożywce LB przez 24 godziny w temperaturze 30°C, z wytrząsaniem 130 obr min⁻¹. Po tym czasie, hodowle wirowano (5000 x g, 4°C, 20 min), a komórki przemywano trzykrotnie buforem PBS (pH 7,2) zawierającym g L⁻¹: NaCl 0,8, KCl 0,2, Na₂HPO₄ 1,44, KH₂PO₄ 0,24, w celu usunięcia pozostałej pożywki hodowlanej i zawieszano w takiej objętości, aby gęstość optyczna zawiesiny (OD₅₉₀) wynosiła około 1,0 (co odpowiada 10⁸ CFU ml⁻¹). Następnie zawiesinę bakterii (2 mL) worteksowano przez 10 s i przenoszono do kuwety spektrofotometrycznej. Stopień autoagregacji określano po 2, 18 i 24 godzinach inkubacji w temperaturze 30°C. Doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach.

Procent autoagregacji wyrażano jako:

$$A = \frac{OD_{590i} - OD_{590a}}{OD_{590i}} \times 100 \%,$$

gdzie: OD_{590i} - początkowa absorbancja zawiesiny komórek bakteryjnych, OD_{590a} - absorbancja po określonym czasie inkubacji.

Do oceny stopnia autoagregacji przyjęto następujące kryteria: brak autoagregacji % A < 25%; słaba autoagregacja % A ≥ 25% i ≤ 49%, średnia autoagregacja % A ≥ 50% i ≤ 74%, silna autoagregacja % A ≥ 75% (Wolska i in., 2003).

5.10.3 Ocena zdolności do tworzenia biofilmu

Zdolność szczepu BRZ63, KP32 oraz kontrolnego szczepu 4FJK do tworzenia biofilmu oceniano według metody opisaną przez Naveed i in. (2014) z fioletem krystalicznym (CV). 24-godzinne hodowle każdego ze szczepów, prowadzono w temperaturze 30°C, z wstrząsaniem 130 obr min⁻¹, w podłożu LB. Po tym czasie hodowle wirowano (5000 x g, 4°C, 5 min) a uzyskany osad rozcieńczano 100-krotnie w podłożu LB. W kolejnym etapie, do zagłębienia 96-dółkowej płytki wprowadzano po 180 µl podłoża LB oraz po 20 µl rozcieńczonej, nocnej hodowli każdego ze szczepów. Przygotowane w ten sposób płytki zabezpieczano przed parowaniem parafilmem i inkubowano przez 24, 48 i 72 godziny w temperaturze 30°C. Trzy różne punkty czasowe wybrano, aby uchwycić dynamikę tworzenia biofilmu przez badane szczepu. Po upływie wskazanego czasu każdy

dołek przepłukiwano trzykrotnie 200 µl buforu PBS o pH 7,2. Powstały biofilm utrwalano 200 µl metanolu. Po usunięciu alkoholu biofilm barwiono przez 20 minut 200 µl 0,1% roztworu fioletu krystalicznego i przepłukiwano trzykrotnie 200 µl PBS. W kolejnym etapie, po wysuszeniu, do każdego dołka wprowadzano po 200 µl 96% etanolu, inkubowano 30 minut i mierzono absorbancję przy długości fali 490 nm oraz 590 nm za pomocą systemu Biolog® Microstation™ (BIOLOG Inc., Hayward, CA, USA). Doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach. Na podstawie uzyskanych wyników, badane szczepy klasyfikowano wg Stepanović i in. (2007) (Tabela 4). Klasyfikacja ta opiera się na wartości odcięcia zwanej OD_c, definiowanej jako średnia absorbancja (OD_{590/490}) kontroli negatywnej powiększona o 3-krotność jej odchylenia standardowego.

Tabela 4. Klasyfikacja szczepów bakterii w zależności od stopnia tworzenia biofilmu Stepanović i in. (2007)

brak produkcji biofilmu	0	OD _{590/490} mniejsze lub równe OD _c
słaby producent biofilmu	1	OD _{590/490} większe niż OD _c i mniejsze lub równe 2xOD _c
średni producent biofilmu	2	OD _{590/490} większe niż 2xOD _c i mniejsze lub równe 4xOD _c
silny producent biofilmu	3	OD _{590/490} większe niż 4xOD _c

5.10.4. Ocena zdolności do produkcji egzopolisacharydów

Zdolność do produkcji egzopolisacharydów (EPSs) oceniano podczas hodowli szczepów na agarze z czerwieni Kongo (CRA), o składzie: sacharoza (5%), czerwień Kongo (0,08%), NaCl (1,5%), glukoza (2%) (Freeman i in., 1989). Płytki zaszczepiano hodowlą danego szczepu bakterii i inkubowano przez 48 godzin, w temperaturze 30°C. Szczepy tworzące na podłożu CRA gładkie czarne kolonie, o śluzowatej i błyszczącej powierzchni, uznawano za producentów EPSs. Doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach.

5.10.5. Ocena zdolności do produkcji AHL

Zdolność szczepów BRZ63 i KP32 do produkcji AHL oceniano metodą kolorymetryczną według Taghadosi i in. (2015). W tym celu bakterie hodowano oddzielnie przez 24 godziny, w temperaturze 30°C, z wytrząsaniem 130 obr min⁻¹, w podłożu Sutherlanda-Wilkinsona (SW), o składzie, g L⁻¹: glukoza 30,0, ekstrakt drożdżowy 1,0, kwas Cosamino 1,0, Na₂HPO₄ 10,0, KH₂PO₄ 3,0, NaCl 1,0, K₂SO₄ 1,0, CaCl₂ 0,008, FeSO₄ x

7H₂O 0,001, pH 6,5. Po inkubacji i odwirowaniu komórek (5000 x g, 4°C, 15 min.), osad odrzucano, a powstały supernatant sączono przez filtr strzykawkowy (0,22 µm). Następnie, mieszano równe objętości supernatantu i zakwaszonego octanu etylu (pH 4,0) i wytrząsano przez 10 minut. Po rozdziale mieszaniny, fazę górną zbierano, a fazę dolną ekstrahowano jeszcze dwukrotnie octanem etylu. Po odparowaniu octanu w 45°C, osad zawieszano w acetonitrylu (20%). Następnie, do kolejnych dołków 96-dołkowej płytki wprowadzano po 50 µL badanej zawiesiny, 20 µL mieszaniny hydroksyloaminy (2 M) i NaOH (3,5 M) (1:1, v/v) oraz 30 µL roztworu FeCl₃ (10% w 4 M HCl zmieszane w stosunku 1:1 z 95% etanolem). Na obecność związków laktonowych w badanej próbce wskazywał ciemnobrązowy kolor. Pojawienie się żółtego koloru wskazywało na brak AHL w próbce. Doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach.

5.10.6. Ocena zdolności do wykorzystywania związków organicznych jako źródło węgla i energii

Zdolność badanych szczepów BRZ63 i KP32 do wzrostu w obecności wybranych związków organicznych jako jedyne źródła węgla i energii określano przy użyciu 96-dołkowych mikropłytek. Do kolejnych dołków płytki wprowadzano zawiesinę badanych szczepów BRZ63 lub KP32 o OD₅₉₀ równym 0,250. Zawiesinę przygotowywano w następujący sposób: szczepy hodowano w pożywce LB przez 24 godziny w temperaturze 30°C, z wytrząsaniem 130 obr min⁻¹, po czym hodowlę wirowano (5000 x g, 4°C, 20 min), supernatant odrzucano, a biomasę bakteryjną wirowano trzykrotnie (5000 x g, 4°C, 20 min), po każdym wirowaniu przepłukując osad sterylnym roztworem soli fizjologicznej (0,9% NaCl), w celu oczyszczenia z pozostałości pożywki hodowlanej. Po ostatnim wirowaniu, biomasę bakteryjną zawieszano w pożywce minimalnej (MSM), o składzie, g L⁻¹: Na₂HPO₄·12H₂O 3,78, KH₂PO₄ 0,5, NH₄Cl 5,0, MgSO₄·7H₂O 0,2, ekstrakt drożdżowy 0,01; pH 7,2. Do dołków mikropłytki wprowadzano również odpowiednią objętość pożywki MSM i wodnych roztworów badanych związków. Wzrost wyizolowanego szczepu na mikropłytkach badano w obecności glukozy, arabinozy, ramnozy, mannozy, trehalozy, kwasu bursztynowego, kwasu 4-hydroksyfenylooctowego, kwasu fumarowego, kwasu benzoowego, kwasu jabłczanowego, mannitolu, kwasu cytrynowego, kwasu p-kumarowego w stężeniach 1 mM. Jednocześnie zakładano hodowlę abiotyczną, zawierającą pożywkę MSM i badany związek, bez zawiesiny bakteryjnej. Mikropłytki inkubowano w temperaturze 30°C. Po 24 godzinach inkubacji, mierzono absorbancję w każdym dołku, przy długości fali 590 nm, stosując system Biolog® Microstation™ (BIOLOG Inc., Hayward, CA, USA).

5.11. Ocena zdolności badanych szczepów do kolonizacji roślin

5.11.1 Znakowanie badanych szczepów białkiem zielonej fluorescencji

Przygotowanie komórek elektrokompetentnych

Komórki elektrokompetentne szczepów BRZ63 i KP32 przygotowywano w następujący sposób. Do 100 ml pożywki LB wprowadzano 5 ml nocnej hodowli szczepu BRZ63 bądź KP32. Hodowle inkubowano w temperaturze 30°C z wytrząsaniem 130 obr min⁻¹ do osiągnięcia gęstości optycznej równej 0,5 (OD₅₉₀). W kolejnym etapie, hodowle chłodzono na lodzie przez 30 minut i wirowano (5000 x g, 4°C, 10 min) w uprzednio schłodzonych probówkach. Supernatant usuwano, a osad przemywano kolejno w 100 i 50 ml schłodzonej sterylnej wody destylowanej. Po ostatnim wirowaniu (5000 x g, 4°C, 10 min), przemyty osad bakterii zawieszano w 1800 µl schłodzonego, sterylnego 10% roztworu glicerolu i wirowano (4000 x g, 4°C, 10 min). Dokładnie usuwano supernatant, a komórki zawieszano w 250 µl sterylnego, schłodzonego 10% glicerolu i rozdzielano po 50 µl. Tak przygotowane komórki przechowywano w temperaturze -20°C.

Elektrotransformacja kompetentnych komórek oraz selekcja transformantów

W celu wyznakowania badanych szczepów BRZ63 i KP32 białkiem EGFP (ang. *Enhanced Green Fluorescent Protein*), kompetentne komórki bakterii transformowano wektorem pMP4566 z wklonowanym genem *egfp* o konstytutywnej ekspresji (Bloemberg i in., 2000). Do 50 µl elektrokompetentnych komórek szczepu BRZ63 lub KP32 wprowadzano po 500 ng plazmidu pMP4566. Próbę kontrolną stanowiły komórki kompetentne, do których dodawano po 10 µl sterylnej wody destylowanej. Kolejny etap obejmował inkubację tak przygotowanej mieszaniny w łaźni lodowej przez 2 min. Po inkubacji, całość mieszaniny przenoszono do uprzednio schłodzonej kuwety do elektroporacji i umieszczano w elektroporatorze MicroPulser™ (Bio-Rad). Próby traktowano impulsem elektrycznym o następujących parametrach: napięcie 12.5 kV/cm, pojemność kondensatora 25 µF, opór zewnętrznym 200 Ω, czas 4.5-5 ms. Po elektroporacji komórki natychmiast zawieszano w 950 µl pożywki SOC, o składzie, g L⁻¹: trypton 20,0, ekstrakt drożdżowy 5,0, NaCl 0,5, KCl 0,2, glukoza 3,6, MgCl₂·6H₂O 0,95, MgSO₄·7H₂O 1,2 i pH 7,2 (Inoue i in., 1990). W kolejnym etapie mieszaninę przenoszono do 1,5 ml probówki typu Eppendorf i inkubowano przez 60 min w temperaturze 30°C z wytrząsaniem 120 obr min⁻¹. Selekcję transformantów prowadzono na podłożu LB suplementowanym tetracykliną w stężeniu µg/ml: 25, 50, 70. Płytki inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 30°C. Po tym czasie kolonie wyrosłe na podłożu selekcyjnym umieszczano

w świetle UV. Emisja fluorescencji przez kolonie świadczyła o ekspresji genu *egfp* w komórkach transformantów.

Mikroskopowa obserwacja komórek elektotransformantów

Bakterie niosące plazmid pMP4566 obserwowano w mikroskopie fluorescencyjnym Nikon ECLIPSE-Ni-U, w ciemnym polu, przy fali wzbudzenia wynoszącej 480 nm (światło niebieskie) oraz fali emisji wynoszącej 510 nm (światło zielone).

5.11.2. Inokulacja nasion wyznakowanymi szczepami

Zdolność testowanych szczepów BRZ63 i KP32 wyznakowanych białkiem EGFP do kolonizacji roślin badano przez inokulację nasion modelowej rośliny *Arabidopsis thaliana* Col-0 oraz *Brassica napus* L., metodą opisaną przez Naveed i in. (2014), z niewielkimi modyfikacjami. Nasiona inkubowano przez 2 godziny w wodzie destylowanej, a następnie sterylizowano powierzchniowo przez 2 min w 20% roztworze podchlorynu sodu. W kolejnym etapie nasiona przemywano trzykrotnie wodą destylowaną (3x5 min), a następnie inkubowano przez 2 godziny w zawieszynie komórek bakteryjnych o gęstości optycznej $OD_{590} = 0,5$. Zawieszynę bakteryjną przygotowano w następujący sposób: bakterie hodowano przez 24 godziny, w temperaturze 30°C, w pożywce LB suplementowanej tetracykliną (w stężeniu 50 µg/ml), odwirowywano (5000 x g, 4°C, 10 min) a uzyskany osad zawieszano w sterylnej wodzie destylowanej. Kontrolę negatywną doświadczenia stanowiły sterylne nasiona inkubowane w sterylnej wodzie destylowanej. Zaszczepione nasiona wysiewano na płytki z agarem wodnym (1% w/v) i hodowano przez 7 dni w temperaturze pokojowej w naturalnym świetle słonecznym.

5.11.3. Izolacja bakterii z inokulowanych roślin

W celu potwierdzenia kolonizacji wewnętrznych tkanek roślin *A. thaliana* Col-0 oraz *B. napus* L. przez badane szczepy bakterii, wybierano po 10 7-dniowych siewek. Rośliny poddawano powierzchniowej sterylizacji z użyciem, kolejno: 70% alkoholu etylowego przez 1 minutę, 5% ACE przez 5 minut i trzykrotne płukanie w sterylnej wodzie destylowanej (3x5 min). Sterylne próby homogenizowano przez rozcieranie w sterylnych moździerzach, w 9 ml sterylnej soli fizjologicznej (0,9% NaCl), z zachowaniem sterylnych warunków. Z otrzymanego maceratu przygotowywano szereg rozcieńczeń dziesiętnych. Z rozcieńczeń 10^{-1} i 10^{-2} wysiewano po 100 µl na płytki ze stałym podłożem LB suplementowanym tetracykliną w stężeniu 50 µg/ml. Macerat rozprowadzano głaszczką po powierzchni podłoża, po czym płytki inkubowano w temperaturze 30°C przez 24 godziny. Kontrolę

sterylizacji stanowił posiew 100 μ l wody z ostatniego płukania organu roślinnego na płytki ze stałym podłożem LB. Obecność świecących w promieniach lampy UV kolonii na płytkach z tetracykliną świadczył o zdolności bakterii do kolonizacji rośliny i endofitycznego stylu życia. Wyrosłe na podłożu bakterie obserwowano w mikroskopie fluorescencyjnym Nikon ECLIPSE-Ni-U, w ciemnym polu, przy fali wzbudzenia wynoszącej 480 nm (światło niebieskie) oraz fali emisji wynoszącej 510 nm (światło zielone).

5.11.4. Obserwacja kolonizacji roślin przez badane szczepy

Zdolność wyznakowanych szczepów BRZ63 lub KP32 do kolonizacji roślin obserwowano *in planta* z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego Nikon ECLIPSE-Ni-U. W tym celu, z układów badawczych, które stanowiły inokulowane danym szczepem rośliny *A. thaliana* Col-0 i *B. napus* L. oraz układów kontrolnych bez bakterii, wybierano po 10 7-dniowych siewek. Rośliny obserwowano w ciemnym polu, przy fali wzbudzenia wynoszącej 480 nm (światło niebieskie) oraz fali emisji wynoszącej 510 nm (światło zielone).

5.12. Badanie wpływu badanych szczepów endofitycznych na wzrost i ochronę rzepaku

5.12.1. Przygotowanie mutantów rifampicynowych

Aby umożliwić śledzenie obecności i tym samym przeżywalności bakterii w glebie oraz tkankach roślinnych, przygotowano mutanty rifampicynowe każdego z badanych szczepów bakterii wyznakowanych wcześniej białkiem EGFP. Mutanty rifampicynowe otrzymano wykonując posiewy redukcyjne szczepów na podłożu LB zawierającym rifampicynę w stężeniu 2 μ g/ml. Następnie, wyrosłe kolonie kolejno przenoszono na podłoże LB ze wzrastającym stężeniem rifampicyny od 5-150 μ g/ml. W celu potwierdzenia trwałości uzyskanej oporności, mutanty wzrastające na płytkach z najwyższym stężeniem antybiotyku hodowano na podłożu LB bez rifampicyny, a następnie posiewano ponownie na podłoże LB z rifampicyną w stężeniu 150 μ g/ml.

5.12.2. Gleba

W doświadczeniu wykorzystano glebę uprawną z pola w okolicach Pszczyny (49.988546 N, 18.848113 E), na którym uprawiany był rzepak. Glebę pobierano z powierzchniowej warstwy o głębokości 0-20 cm, a następnie przechowywano w chłodni, w temperaturze 4°C przez 7 dni. Analizę fizykochemiczną próbek pobranej gleby wykonano w i2 Analytical Ltd. Sp. Z o.o., oddział w Polsce.

5.12.3. Przygotowanie inokulum wprowadzanego do gleby

Inokulum, w skład, którego wchodziły pojedyncze szczepy bakterii przygotowywano wykorzystując uzyskane wcześniej mutanty. Bakterie hodowano na podłożu LB z rifampicyną w stężeniu 150 µg/ml, w temperaturze 30°C, z wytrząsaniem 130 obr min⁻¹, aż do uzyskania OD₅₉₀ =1,5-2,0. Uzyskane hodowle odwirowywano (5000 x g, 20°C, 15 min), a otrzymany osad przemywano trzy razy sterylnym roztworem 0,9% NaCl i zawieszano w sterylnym roztworze 0,9% NaCl tak, aby liczba komórek bakterii danego szczepu w mililitrze wynosiła 10⁸ j.t.k.

5.12.4. Układy badawcze

W doświadczeniach doniczkowych wykorzystano rzepak (*B. napus* L.). Układy badawcze stanowiła:

- (1) gleba z wysianymi nasionami rzepaku inokulowana *R. solani*,
- (2) gleba z wysianymi nasionami rzepaku inokulowana *R. solani* i szczepem BRZ63,
- (3) gleba z wysianymi nasionami rzepaku inokulowana *R. solani* i szczepem KP32.

Przed rozpoczęciem doświadczenia glebę przesiewano przez sita (średnica porów 2 mm) w celu usunięcia grudek i kamieni. Następnie, do każdej doniczki odważano po 750 g gleby i wprowadzano po 5 nasion rzepaku. W układach z patogenami, glebę uprzednio skażano grzybnią, wprowadzając 5 mm krążki agaru z grzybnią patogena. Do tak przygotowanych doniczek wprowadzano po 50 ml przygotowanego inokulum. Hodowle prowadzono przez 35 dni, w pokoju hodowlanym, w temperaturze 21°C, w warunkach 16 godzin dnia i 8 godzin nocy, przy intensywności światła 15 000 luksów. W trakcie doświadczenia wilgotność gleby utrzymywana była na stałym poziomie. W 14, 28 oraz 35 dniu hodowli rośliny były delikatnie zbierane, w taki sposób, aby nie uszkodzić tkanek. W celu usunięcia cząsteczek gleby korzenie roślin przepłukiwano z wykorzystaniem strumienia wody z kranu, po czym przepłukiwano poprzez trzykrotne zanurzenie w wodzie dejonizowanej. Następnie, korzenie oraz pędy roślin oddzielano od siebie i osobno ważono ich świeżą masę. Glebę z trzech powtórzeń z danego układu mieszano ze sobą, po czym pobierano próbki gleby oraz roślin do określenia przeżywalności badanych szczepów w glebie oraz ich zdolności do kolonizacji tkanek roślinnych.

5.12.5. Ocena przeżywalności bakterii w tkankach roślin i w glebie

Izolację bakterii prowadzono z 1 g masy roślinnej oraz 10 g gleby. Fragmenty wybranych roślin sterylizowano powierzchniowo zanurzając je kolejno w roztworach: 70%

alkoholu etylowego i 5% ACE (4-5 min), po czym trzykrotnie płukano w sterylnej wodzie destylowanej (3x5 min). Sterylne próby homogenizowano w sterylnych moździerzach. Następnie dodawano 9 ml sterylnej soli fizjologicznej (0,9% NaCl w/v) z zachowaniem sterylnych warunków. Z otrzymanego maceratu przygotowywano szereg rozcieńczeń dziesiętnych i wysiewano po 100 µl na płytki ze stałym podłożem LB z dodatkiem rifampicyny (150 µg/ml). Macerat rozprowadzano głaszczką po powierzchni podłoża, po czym płytki inkubowano w temperaturze 30°C przez 24-48 godzin. Przygotowywano również kontrolę sterylności poprzez wykonanie posiewu 100 µl wody z ostatniego płukania organu roślinnego na płytki ze stałym podłożem LB.

W celu oceny przeżywalności badanych bakterii w glebie, odważano 10 g gleby, którą zawieszano w 90 ml 0,9% NaCl z 1% Tween 80 i wytrząsano (120 obr min⁻¹, 30°C, 30 min). Z otrzymanego roztworu glebowego przygotowywano szereg rozcieńczeń dziesiętnych i wysiewano po 100 µl na stałe podłoże LB z rifampicyną w stężeniu 150 µg/ml. Płytki inkubowano przez 24-48 godziny, w temperaturze 30°C. Po tym czasie zliczano ilość wyrosłych kolonii.

5.13. Analiza statystyczna

Analizy statystyczne uzyskanych wyników prowadzono za pomocą oprogramowania Microsoft Office Excel 2010 i Statistica 12.5 PL (StatSoft® Inc., Tulsa, OK, USA). Dane przedstawiono jako średnią ± odchylenie standardowe (SD) trzech powtórzeń biologicznych. Do analizy wyników testów antagonistycznych i badań ekspresji genów wykorzystano niezależny test t-Studenta dla $p < 0,05$. W celu porównania aktywności enzymów antyoksydacyjnych dane analizowano za pomocą jednoczynnikowej analizy ANOVA i oceniano za pomocą testu post-hoc średnich przy użyciu testu najmniejszych znaczących różnic (LSD) ($p < 0,05$).

6. WYNIKI

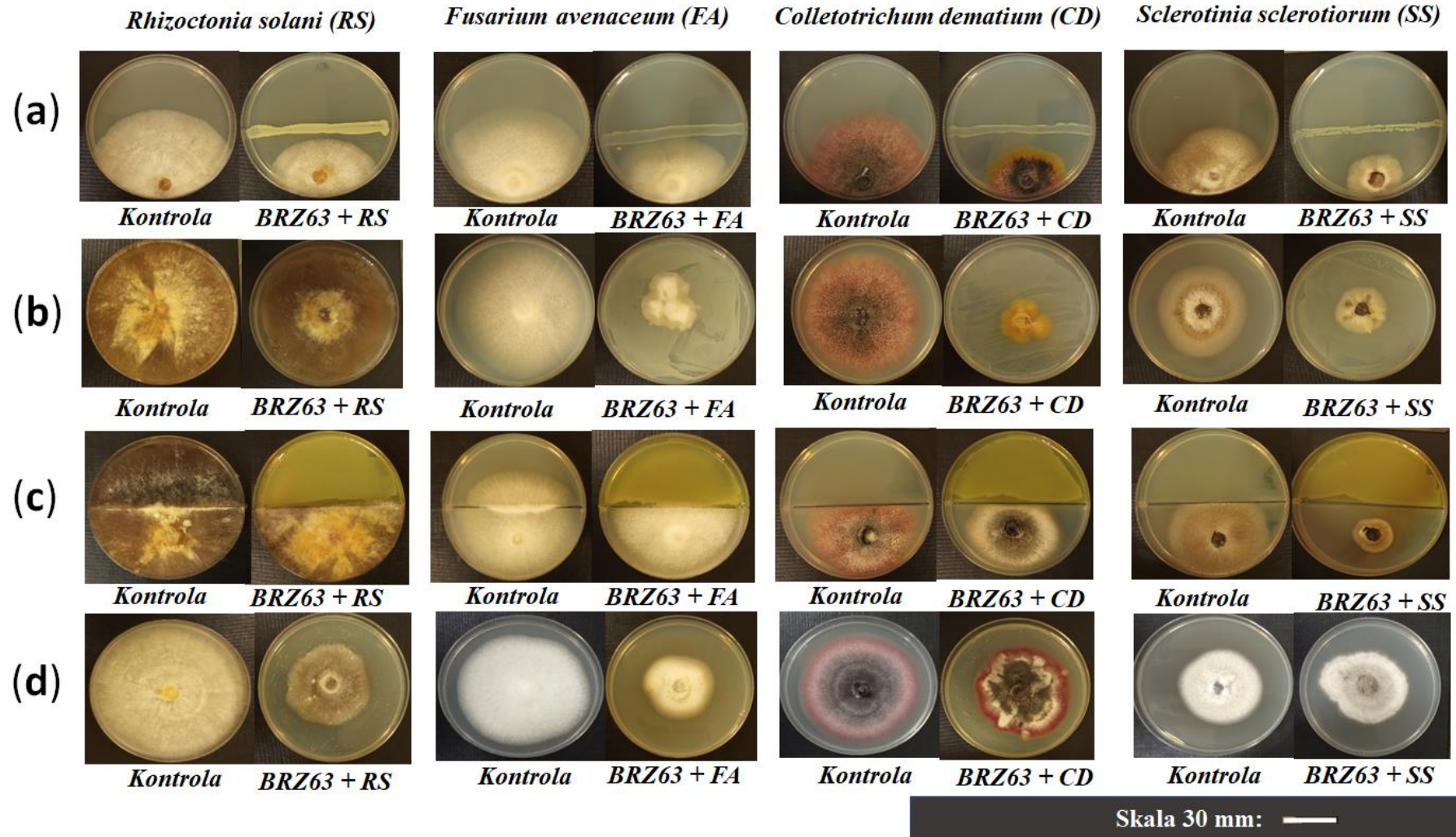
6.1. Określenie aktywności antagonistycznej wybranych szczepów bakterii endofitycznych wobec fitopatogenów grzybowych

W pierwszym etapie badań testowano zdolność badanych szczepów *P. fluorescens* BRZ63 oraz *S. quinivornas* KP32 do biokontroli grzybowych fitopatogenów należących do czterech różnych gatunków: *R. solani* W70, *F. avenaceum*, *C. dematium* K oraz *S. sclerotiorum* K2291. W tym celu zastosowano szereg testów antagonistycznych. Ocena zdolności badanych szczepów do inhibicji wzrostu wybranych patogenów ujawniła ich

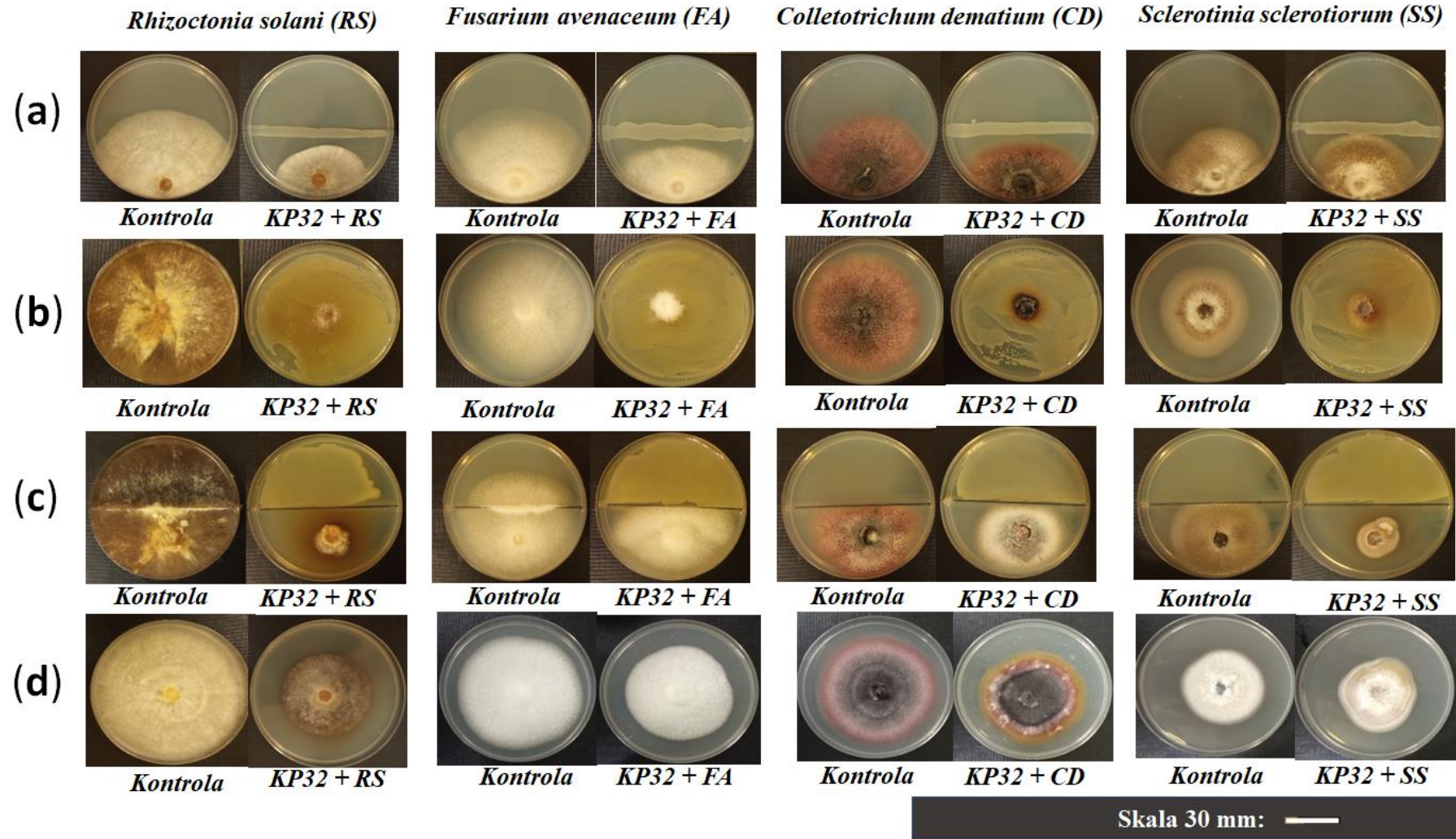
zróżnicowaną aktywność biologiczną względem poszczególnych grzybów, co przedstawiono na rysunku 2 i 3.

Testy podwójnej hodowli wykazały znaczną aktywność antagonistyczną szczepu BRZ63 (Rysunek 2a) oraz produkowanych przez ten szczep związków dyfundujących do podłoża (Rysunek 2b) przeciwko *C. dematium*. W obu przypadkach zahamowanie wzrostu grzyba wynosiło ponad 60% w odniesieniu do kontroli. Procent zahamowania wzrostu pozostałych patogenów: *R. solani*, *F. avenaceum* i *S. sclerotiorum* wynosił odpowiednio około 37%, 39% i 40%, w porównaniu z kontrolą. Znaczne zahamowanie wzrostu grzybni *R. solani* (63%) oraz *F. avenaceum* (54%), w porównaniu z kontrolą, obserwowano w obecności produkowanych przez szczep BRZ63 lotnych związków (Rysunek 2c). Aktywność przeciwgrzybową, szczególnie względem *R. solani* oraz *F. avenaceum*, wykazywał również supernatant pozyskany z hodowli szczepu BRZ63, którego obecność w podłożu hamowała wzrost obu grzybów o około 40% (Rysunek 2d).

Z kolei, szczep KP32 w największym stopniu hamował wzrost *R. solani* (52%), natomiast najniższą aktywność antagonistyczną tego szczepu obserwowano względem *S. sclerotiorum* (26%) (Rysunek 3a). Dyfuzyjne związki produkowane przez szczep KP32 wykazywały znaczącą aktywność przeciwgrzybową względem wszystkich testowanych fitopatogenów, a wzrost grzybni *R. solani* został zahamowany o prawie 80% w stosunku do kontroli (Rysunek 3b). Oprócz aktywnych związków dyfundujących do podłoża, szczep KP32 wytwarzał również lotne związki hamujące wzrost grzybni fitopatogenów (Rysunek 3c). W tym teście, szczep KP32 również wykazał najwyższą aktywność przeciwgrzybową wobec *R. solani*, hamując wzrost patogena o około 80% w porównaniu z kontrolą (Rysunek 3c). W przeprowadzonym teście wykazano także aktywność przeciwgrzybową supernatantu otrzymanego z hodowli szczepu KP32 (Rysunek 3d).



Rysunek 2. Hamujący wpływ *P. fluorescens* BRZ63 na fitopatogeny grzybowe: antagonistyczne działanie szczepu BRZ63 na patogeny grzybowe w teście podwójnej hodowli (a); hamowanie wzrostu grzybów przez dyfuzyjne metabolity wytwarzane przez BRZ63 (b); wpływ lotnych związków wytwarzanych przez BRZ63 na wzrost grzybni fitopatogenów (c); wpływ supernatantu pozyskanego z hodowli BRZ63 na wzrost grzybni patogenów grzybowych (d).



Rysunek 3. Hamujący wpływ *S. quinivornas* KP32 na fitopatogeny grzybowe: antagonistyczne działanie szczepu KP32 na patogeny grzybowe w teście podwójnej hodowli (a); hamowanie wzrostu grzybów przez dyfuzyjne metabolity wytwarzane przez KP32 (b); wpływ lotnych związków wytwarzanych przez KP32 na wzrost grzybní fitopatogenów (c); wpływ supernatantu pozyskanego z hodowli KP32 na wzrost grzybní patogenów grzybowych (d).

We wszystkich układach badawczych dla obu szczepów bakterii, poza hamowaniem wzrostu patogenów, obserwowano zmiany w morfologii grzybni. Zmiany te, w zależności od rodzaju grzyba, obejmowały zwiększenie przejrzystości brzegów grzybni, zmniejszenie jej gęstości lub zmiany zabarwienia (Rysunek 2 i 3).

6.2. Charakterystyka genomów i analiza filogenetyczna szczepu BRZ63 i KP32

Po określeniu aktywności antagonistycznej szczepu *P. fluorescens* BRZ63 oraz *S. quinivorans* KP32 wobec wybranych fitopatogenów grzybowych, przeprowadzono sekwencjonowanie i analizę genomów badanych szczepów. Umożliwiło to wytypowanie genów mogących odgrywać zasadniczą rolę w biokontroli oraz poznanie genetycznych uwarunkowań interakcji badanych bakterii z patogenami oraz roślinnym gospodarzem. Podstawową charakterystykę genomów badanych szczepów BRZ63 oraz KP32 przedstawiono w Tabeli 5.

Szacowana wielkość genomu szczepu BRZ63 wynosi 6 335 040 pz (par zasad) o średniej zawartości G + C równej 64%. W genomie badanego szczepu wykazano obecność 6120 genów, z których 5915 oznaczono jako sekwencje kodujące (CDSs, ang. *coding DNA sequences*). Ponadto wykazano obecność 62 genów kodujących tRNA, 11 genów kodujących rRNA i 128 pseudogenów. Z kolei szacowana wielkość genomu szczepu KP32 wynosi 5 456 872 pz. Genom tego szczepu został złożony z 107 kontigów o średniej zawartości par G + C równej 64%. Analiza genomu wykazała obecność 5098 CDSs. Ponadto genom szczepu KP32 zawiera 79 genów kodujących tRNA, 35 genów kodujących rRNA oraz 44 pseudogeny.

Tabela 5. Ogólna charakterystyka genomów badanych szczepów bakterii

Cecha	<i>P. fluorescens</i> BRZ63	<i>S. quinivorans</i> KP32
Wielkość genomu (pz)	6 335 040	5 456 872
Rusztowanie DNA (liczba sekwencji)	363	107
Zawartość par G+C (%)	64	64
Wszystkie geny (liczba genów)	6120	5194
CDS (liczba genów)	5915	5098
RNA (liczba genów)	77	126
rRNAs (5S, 16S, 23S) (liczba genów)	7, 3, 1	8, 13, 14
tRNA (liczba genów)	62	72
ncRNA (liczba genów)	4	12
Pseudogeny (liczba)	128	44
Geny przypisane do COG (liczba)	5947	5018

Geny przypisane do KEGG PATHWAY (liczba)	2385	3342
Obecność profaga (liczba regionów)	1	2
ID BioProjektu	PRJNA529642	PRJNA743191
ID Biopróbki	SAMN11280435	SAMN20003760
ID Genomu	SPVI00000000.1	JAHTKS000000000.1

CDS - sekwencja kodująca, DNA G + C (%) - procent zawartości zasad G i C w DNA, rusztowanie DNA - połączone kontigi uzyskane w wyniku całogenomowego sekwencjonowania z zastosowaniem strategii typu „shotgun”, pz – pary zasad, COG – klastry grup ortologicznych, KEGG PATHWAY – baza danych związana ze szlakami metabolicznymi, oddziaływaniami molekularnymi i procesami wewnątrzkomórkowymi.

W kolejnym etapie analiz genomów dokonano kategoryzacji funkcjonalnej poszczególnych sekwencji kodujących z wykorzystaniem grupowania w tzw. klastry grup ortologicznych (COGs). W przypadku szczepu BRZ63, spośród wszystkich CDSs, 5947 sklasyfikowano w COGs obejmujących 20 kategorii (Tabela 6). Analiza ujawniła główne funkcjonalne kategorie genów zaangażowane w transport i metabolizm aminokwasów (kategoria E, 9,85%), transkrypcję (kategoria K, 9,79%), transport jonów nieorganicznych (kategoria P, 7,58%), transdukcję sygnału (kategoria T, 5,99%), produkcję i konwersję energii (kategoria C, 5,95%), biogenezę ściany komórkowej/błony/otoczki (kategoria M, 6,00%), transport i metabolizm węglowodanów (kategoria G, 5,45%). W genomie szczepu BRZ63 zidentyfikowano również dużą liczbę genów kodujących białka zaangażowane w biosyntezę, transport i katabolizm metabolitów wtórnych (kategoria Q, 2,99%).

Analiza funkcjonalna przeprowadzona przy użyciu narzędzia KEGG (ang. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) wykazała obecność 2385 genów (39% spośród wszystkich CDSs-ów) związanych ze szlakami metabolicznymi zawartymi w bazie (Tabela 7). Spośród genów, które zostały sklasyfikowane w kategoriach szlaków KEGG, najbardziej znacząca liczba związana jest z metabolizmem węglowodanów (13,00%), aminokwasów (13,5%) oraz kofaktorów/witamin (7,3%). Zidentyfikowano również wiele genów związanych z transdukcją sygnału (6,5%) i transportem przez błony (8,1%) oraz 32 geny zaangażowane w bakteryjne systemy wydzielnicze, w tym w szlaki sekrecji Sec i Tat oraz systemy sekrecji typu II (T2SS) i typu VI (T6SS). Ponadto w genomie szczepu BRZ63 zidentyfikowano jeden region profagowy o wielkości 59,3 kbp i zawartości par zasad G + C wynoszącej 57,49%.

W przypadku szczepu KP32, 5018 sekwencji kodujących przypisano do 20 kategorii grup ortologicznych (COGs) (Tabela 6). Zidentyfikowano duży odsetek genów związanych z metabolizmem i transportem aminokwasów (kategoria E, 9,63%) oraz węglowodanów (kategoria G, 8,37%). Ponadto ujawniono geny zaangażowane m.in. w produkcję i konwersję energii (kategoria C, 5,66%), a także biogenezę ściany komórkowej/błony/otoczki (kategoria M, 5,88%).

Tabela 6. Klasyfikacja funkcjonalnych klastrów grup ortologicznych (COGs) w genomach badanych szczepów

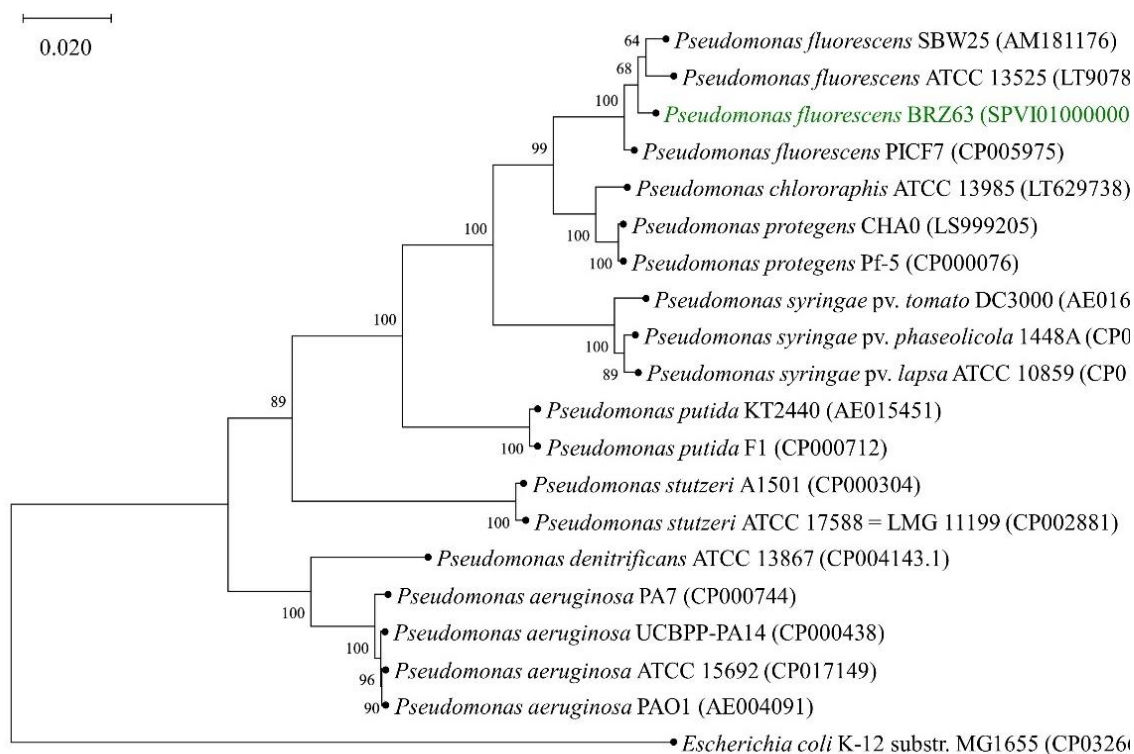
COG	Opis	BRZ63		KP32	
		CDS	CDS (%)	CDS	CDS (%)
D	kontrola cyklu komórkowego, podział komórek, podział chromosomu	54	0,91	59	1,18
M	biogeneza ściany komórkowej/błony/otoczki	357	6,00	295	5,88
N	ruchliwość komórki	174	2,93	126	2,51
T	mechanizmy transdukcji sygnału	356	5,99	154	3,07
U	transport wewnątrzkomórkowy	177	2,98	304	6,06
V	mechanizmy obronne	74	1,24	37	0,74
C	produkcja i konwersja energii	354	5,95	284	5,66
E	transport i metabolizm aminokwasów	586	9,85	483	9,63
F	transport i metabolizm nukleotydów	151	2,54	152	3,03
G	transport i metabolizm węglowodanów	324	5,45	420	8,37
H	transport i metabolizm koenzymów	213	3,58	197	3,93
I	transport i metabolizm lipidów	252	4,24	153	3,05
P	transport i metabolizm jonów nieorganicznych	451	7,58	308	6,14
Q	biosynteza, transport i katabolizm metabolitów wtórnych	178	2,99	128	2,55
A	przetwarzanie i modyfikacja RNA	2	0,03	1	0,02
B	struktura i dynamika chromosomu	2	0,03	1	0,02
J	translacja, struktura rybosomu i biogeneza	226	3,80	234	4,66
K	transkrypcja	582	9,79	518	10,32
L	replikacja	181	3,04	167	3,33
S	funkcja nieznaną	1090	18,33	995	19,83

Tabela 7. Klasyfikacja w kategorii szlaków KEGG genów związanych z oddziaływaniami molekularnymi, szlakami metabolicznymi i różnymi procesami wewnątrzkomórkowymi

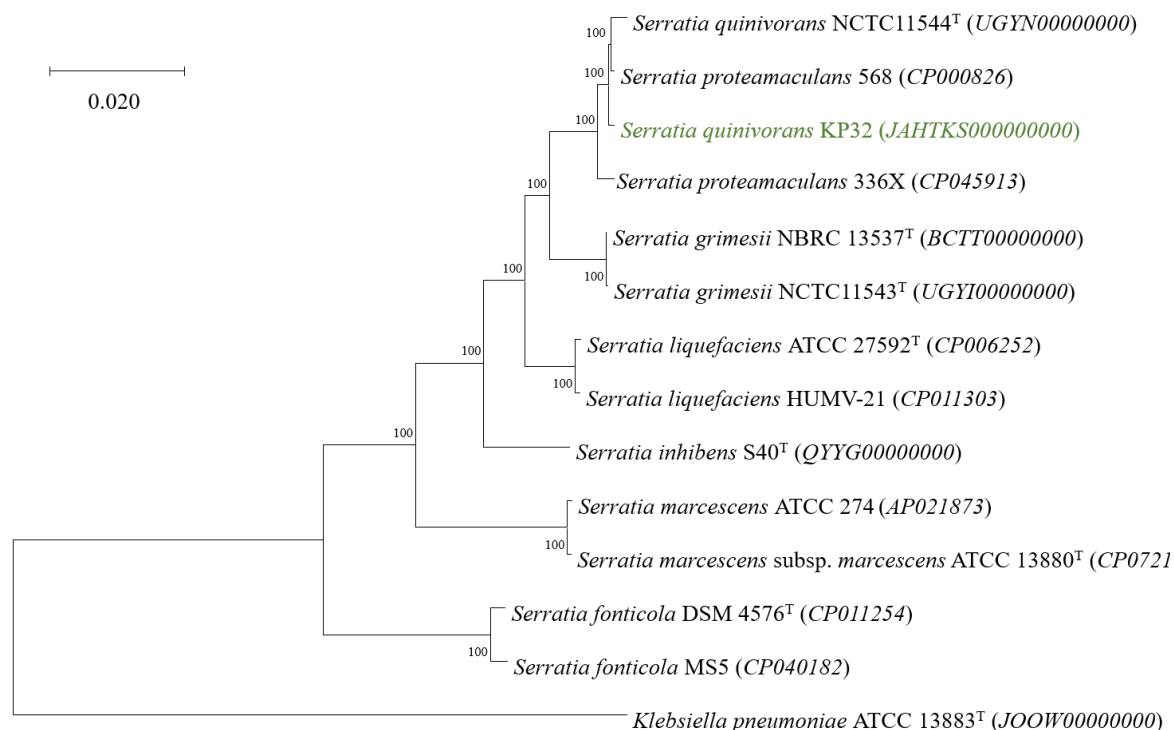
Kategoria pierwszorzędowa	Kategoria drugorzędowa	BRZ63		KP32	
		CDS	CDS (%)	CDS	CDS (%)
Procesy komórkowe	<i>Quorum sensing</i>	41	1,7	54	1,62
	tworzenie biofilmu	45	1,9	81	2,42
	chemotaksja	17	0,7	19	0,57
	składanie wici	37	1,6	44	1,32
Przetwarzanie informacji ze środowiska	transport przez błony	192	8,1	263	7,87
	transdukcja sygnału	156	6,5	157	4,70
Przetwarzanie informacji genetycznej	transkrypcja	5	0,2	4	0,12
	translacja	81	3,4	82	2,45
	sortowanie i degradacja	32	1,3	53	1,59
	replikacja i naprawa DNA	77	3,2	83	2,48
Metabolizm	metabolizm węglowodanów	311	13,0	412	12,33
	pozyskiwanie i konwersja energii	162	6,8	179	5,36
	metabolizm lipidów	72	3,0	76	2,27
	metabolizm nukleotydów	95	4,0	117	3,50
	metabolizm aminokwasów białkowych	321	13,5	294	8,80
	metabolizm aminokwasów niebiałkowych	61	2,6	79	2,36
	biosynteza i metabolizm glikanów	48	2,0	79	2,36
	metabolizm kofaktorów i witamin	175	7,3	184	5,51
	metabolizm terpenoidów i poliketydów	37	1,6	35	1,05
	metabolizm i biodegradacja ksenobiotyków	101	4,2	76	2,27
	biosynteza metabolitów wtórnych	50	2,1	53	1,59

Analiza funkcjonalna przeprowadzona z użyciem narzędzia KEGG wykazała obecność 3342 genów (65,5% wszystkich sekwencji kodujących) związanych ze szlakami metabolicznymi zawartymi w bazie KEGG (Tabela 7). Spośród genów, które zostały sklasyfikowane w kategoriach szlaków KEGG, najbardziej znacząca liczba związana jest z metabolizmem węglowodanów (12,33%), aminokwasów (8,80%) oraz kofaktorów/witamin (5,51%). W genomie szczepu KP32 potwierdzono również obecność genów zaangażowanych w procesy środowiskowe i przetwarzania informacji, takie jak transport przez błony (7,78%) i transdukcja sygnału (4,70%) oraz obecność 35 genów zaangażowanych w bakteryjne systemy wydzielnicze, w tym szlaki sekrecji Sec i Tat oraz większość systemów sekrecji typu II (T2SS) i typu VI (T6SS). Ponadto w genomie szczepu KP32 zidentyfikowano dwa regiony profagowe, jeden o wielkości 34,6 kbp i zawartości par zasad G + C równej 51,56% oraz drugi o wielkości 38,9 kbp i zawartości par zasad G + C wynoszącej 54,45%.

W oparciu o sekwencje genomów przeprowadzono również analizy filogenetyczne badanych szczepów. Drzewo filogenetyczne dla szczepu *P. fluorescens* BRZ63, skonstruowane po dopasowaniu sekwencji białkowych 20 szczepów z wykorzystaniem *E. coli* K-12 substr. MG1655 jako grupy zewnętrznej zilustrowano na rysunku 4. W grupie filogenetycznej rodzaju *Pseudomonas*, szczep BRZ63 został zgrupowany z *P. fluorescens* SBW25 i ATCC13525. Natomiast drzewo filogenetyczne dla szczepu *S. quinivorans* KP32, oparte na dopasowaniu sekwencji białkowych 14 szczepów z zastosowaniem *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883T jako grupy zewnętrznej, zilustrowano na rysunku 5. W grupie filogenetycznej rodzaju *Serratia* szczep KP32 został zgrupowany z *S. quinivorans* NCTC11544, *S. proteamaculans* 568 i *S. proteamaculans* 336X.



Rysunek 4. Drzewo filogenetyczne szczepu *P. fluorescens* BRZ63 oparte na dopasowaniu sekwencji białkowych 20 szczepów z *Escherichia coli* K-12 substr. MG1655 jako grupą zewnętrzną. Numery dostępu genomów podano w nawiasach. Wartość samopróbkowania podana przy węzłach wyrażona jest w procentach (na 100 powtórzeń).



Rysunek 5. Drzewo filogenetyczne szczepu *S. quinivorans* KP32 w oparciu o porównanie sekwencji białkowych 14 szczepów, z *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883T jako grupą zewnętrzną. Numery dostępu genomów podano w nawiasach. Wartość samopróbkowania podana przy węzłach wyrażona jest w procentach (na 100 powtórzeń).

Wyniki opisane w rozdziale 6.1. i 6.2., uzyskane dla szczepu BRZ63 i szczepu KP32 zostały opublikowane odpowiednio w pracach Chlebek i in. (2020) i Chlebek i in. (2022); zamieszczonych w rozdziale A1 i A2 niniejszej pracy.

6.3. Identyfikacja genów kluczowych dla biokontroli, promocji wzrostu roślin i kolonizacji roślin w genomach badanych szczepów bakterii

Analiza genomu szczepu BRZ63 ujawniła obecność wielu genów biorących udział w produkcji sideroforów oraz genów *tonB*, *exbB* i *exbD* kodujących kompleks trzech białek błony wewnętrznej TonB/ExbB/ExbD, który dostarcza energii potrzebnej do translokacji kompleksu siderofor-żelazo przez błonę zewnętrzną bakterii. W genomie badanego szczepu zidentyfikowano także geny kluczowe dla biosyntezy antybiotyku - fenazy, w tym gen *phzF* kodujący izomerazę trans-2,3-dihydro-3-hydroksyantranilanową oraz gen *trdG* kodujący składnik syntazy antranilanowej. Co więcej, potwierdzono obecność genu *ubiC* związanego z produkcją 4-hydroksybenzoenu, a także geny kodujące piocynę-S2 (*pys2*) i oligopeptydazę A (*prlC*). Korzystną dla biokontroli cechą szczepu jest także obecność genów kodujących różne enzymy lityczne, takie jak beta-glukozydaza (*bglX*), deacetylaza N-acetyloglukozamino-6-fosforanowa (*nagA*), czy liczne proteazy (*yegQ*, *ptrB*, *yhbV*) oraz genów warunkujących syntezę acetoiny i 2,3-butanodiolu. Oprócz powyższych, w genomie szczepu BRZ63 zidentyfikowano również geny determinujące cechy niezbędne w promocji wzrostu roślinnego gospodarza, w tym geny biosyntezy tryptofanu (*trpABCDE*), geny kodujące oksydoreduktazę, dehydratazę aldoksymu i nitylazę, istotne w biosyntezie IAA, gen *acdS* kodujący deaminazę kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksylowego oraz zestaw genów wchodzących w skład operonu *pstABCS*, kodujących hipotetyczne białka zaangażowane w metabolizm i transport fosforanów. Wykazano także obecność genów *phoQ*, *phoP* i *phoU*, kodujących białka dwuskładnikowego szlaku regulatorowego, jak również genu odpowiedzialnego za syntezę dehydrogenazy glutaminianowej (*gcd*) oraz klastra genów *pqq* (*pqqABCDE*), niezbędnych do biosyntezy kofaktora PQQ. Genom szczepu BRZ63 niesie także geny dwuskładnikowego systemu transdukcji sygnału GacS/GacA, gen kodujący dehydrogenazę mannitolu (*manD*) oraz gen *pvdQ* kodujący acylazę laktonów acylo-homoseryny, która może być zaangażowana w degradację cząsteczek sygnałowych istotnych w zjawisku QS. Geny determinujące cechy związane z biokontrolą i promowaniem wzrostu roślin obecne w genomie BRZ63 przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Geny determinujące istotne cechy związane z biokontrolą i promowaniem wzrostu roślin obecne w genomie szczepu BRZ63

Aktywność	Gen	Produkt genu	Numer akcesyjny	
Biosynteza i transport sideroforów	<i>entD</i>	podjednostka D sytnazy enterobakteryjnej [EC:6.3.2.14 2.7.8.-]	TFW40873.1	
	<i>iucB</i>	N-acetylotransferaza N6-hydroksylizyny [EC:2.3.1.102]	TFW45226.1	
	<i>bfr</i>	bakterioferrytyna [EC:1.16.3.1]	TFW40338.1	
	<i>bfd</i>	ferredoksyna związana z bakterioferrytyną	TFW42906.1	
	<i>sidS</i>	syntaza sideroforu	TFW45333.1	
	<i>fiu</i>	receptor sideroforu catecholowego	TFW43421.1	
	<i>exbB</i>	biopolimerowe białko transportowe ExbB	TFW41374.1	
	<i>exbD</i>	biopolimerowe białko transportowe ExbD	TFW41375.1	
	<i>tonB</i>	białko peryplazmatyczne TonB	TFW40662.1	
	<i>pvdA</i>	N5-monooksygenaza L-ornityny [EC:1.14.13.195 1.14.13.196]	TFW44939.1	
	<i>pvdE</i>	białko transportowe zawierające kasetę wiążącą ATP	TFW42495.1	
	<i>pvdH</i>	aminotransferaza PvdH	TFW45216.1	
	<i>pvdL</i>	syntetaza peptydów nierybosomalnych	TFW45223.1	
	Produkcja antybiotyków	<i>pvdG</i>	białko biosyntezy piowerdyny PvdG	TFW45224.1
<i>pvdS</i>		alternatywny czynnik sigma PvdS	TFW45225.1	
<i>pvdJ</i>		białko zawierające domenę adenylacji aminokwasów	TFW42491.1	
<i>pvdO</i>		białko biosyntezy piowerdyny PvdO	TFW42496.1	
<i>pvdN</i>		peryplazmatyczna aminotransferaza PvdN	TFW42497.1	
<i>pvdM</i>		dipeptydaza błonowa PvdM	TFW42498.1	
<i>pvdI</i>		syntetaza peptydów nierybosomalnych	TFW40457.1	
<i>pvdQ</i>		acylaza laktonu N-acylo-homoseryny	TFW42063.1	
<i>phzF</i>		izomeraza trans-2,3-dihydro-3-hydroksyantranilanowa	TFW40232.1	
<i>prtB</i>		oligopeptydaza B [EC:3.4.21.83]	TFW41941.1	
<i>ubiC</i>		liaza choryzmianowo-pirogronianowa [EC:4.1.3.40]	TFW44667.1	
<i>ubiA</i>		poliprenylotransferaza 4-hydroksybenzoesanu [EC:2.5.1.39]	TFW44668.1	
<i>gapP</i>		GABA permeza	TFW43975.1	
<i>pys2</i>		piocyna	TFW42890.1	
Produkcja enzymów litycznych	<i>nrpS</i>	syntetaza nierybosomalnych peptydów	TFW40291.1	
	<i>vsmA</i>	syntetaza nierybosomalnych peptydów (biosynteza wiskozyny)	TFW42491.1	
	-	endoglukanaza [EC:3.2.1.4]	TFW40521.1	
	<i>bgIX</i>	beta-glukozydaza [EC:3.2.1.21]	TFW39167.1	
	<i>nagA</i>	deacetylaza N-acetyloglukozamino-6-fosforanowa	TFW43285.1	
	<i>yegQ</i>	proteaza	TFW40215.1	
	<i>ptrB</i>	proteaza	TFW38346.1	
	<i>yhbV</i>	proteaza	TFW39155.1	
	Acetoina i 2,3-butanodiol	-	duża podjednostka syntazy acetylomleczanowej [EC:2.2.1.6]	TFW41813.1
		-	mała podjednostka syntazy acetylomleczanowej [EC:2.2.1.6]	TFW41814.1
	Biosynteza ACCD i IAA	<i>bdh</i>	reduktaza diacetylu [EC:1.1.1.4 1.1.1.- 1.1.1.303]	TFW40243.1
		<i>acdS</i>	deaminaza kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksylowego [EC:3.5.99.7]	TFW41243.1
		-	nitrylaza [EC:3.5.5.1]	TFW41148.1
	Produkcja trptofanu	<i>oxd</i>	dehydrataza aldoksynowa [EC:4.99.1.5]	TFW40578.1
-		oksydoreduktaza	TFW44414.1	
<i>trpE</i>		komponent I syntazy antranilanowej [EC:4.1.3.27]	TFW42468.1	
<i>trpG</i>		komponent II syntazy antranilanowej [EC:4.1.3.27]	TFW42469.1	
<i>trpD</i>		fosforybozylotransferaza antranilanowa [EC:2.4.2.18]	TFW42470.1	
<i>trpC</i>		syntaza fosforanu indolilo-3-glicerolu [EC:4.1.1.48]	TFW42471.1	
<i>trpA</i>		łańcuch alfa syntazy tryptofanu [EC:4.2.1.20]	TFW44799.1	
<i>trpB</i>		łańcuch beta syntazy tryptofanu [EC:4.2.1.20]	TFW44800.1	
Solubilizacja fosforanów		<i>pqqE</i>	cyklaza peptydowa PqqA [EC:1.21.98.4]	TFW42428.1
		<i>pqqD</i>	białko biosyntezy chinonu pirolochinoliny D	TFW42429.1
		<i>pqqC</i>	syntaza pirolochinolino-chinonu [EC:1.3.3.11]	TFW42430.1
		<i>pqqB</i>	białko biosyntezy chinonu pirolochinoliny B	TFW42431.1
		<i>pqqA</i>	białko biosyntezy chinonu pirolochinoliny A	TFW42489.1
		<i>phnA</i>	białko PhnA	TFW40776.1
	<i>ppk2</i>	kinaza polifosforanowa (ADP) [EC:2.7.4.-]	TFW45161.1	
	<i>phoU</i>	białko systemu transportu fosforanów	TFW44677.1	
	<i>pstB</i>	białko wiążące ATP [EC:7.3.2.1]	TFW44678.1	
	<i>pstA</i>	permeaza	TFW44679.1	
	<i>pstC</i>	permeaza	TFW44680.1	
	<i>pstS</i>	białko wiążące substrat	TFW44681.1	
	<i>phoQ</i>	białko regulacyjnego system dwuskłanikowego, kinaza sensorowa [EC:2.7.13.3]	TFW40870.1	
	Biosynteza kwasu salicylowego	<i>phoP</i>	białko regulacyjnego system dwuskłanikowego, regulator odpowiedzi PhoP	TFW40871.1
<i>pit</i>		nieorganiczny transporter fosforanów	TFW42726.1	
<i>pqqL</i>		proteaza cynkowa [EC:3.4.24.-]	TFW37848.1	
<i>gcd</i>		chinoproteinowa dehydrogenaza glukozowa [EC:1.1.5.2]	TFW42967.1	
<i>menF</i>		syntaza izochoryzmatu	TFW35465.1	
<i>pchB</i>		białko biosyntezy salicylanu PchB	TFW41741.1	
Transport żelaza		<i>afuA</i>	białko peryplazmatyczne wiążące żelazo	TFW44456.1
		<i>afuB</i>	permeaza	TFW44457.1
		<i>afuC</i>	białko wiążące ATP [EC:7.2.2.7]	TFW44458.1
Quorum quenching		<i>pvdQ</i>	acylaza laktonu N-acylo-homoseryny [EC:3.5.1.97]	TFW42063.1
Dehydrogenaza mannitolu		<i>manD</i>	dehydrogenaza mannitolu [EC:1.1.1.67]	TFW41120.1

Z kolei analiza z wykorzystaniem programu antiSMASH 5.0 (ang. *Antibiotics and Secondary Metabolite Analysis Shell*) umożliwiła wykrycie klastrów genów odpowiedzialnych za biosyntezę wielu różnych metabolitów wtórnych, w tym czternastu klastrów genów biosyntetycznych (BGC, ang. *biosynthetic gene clusters*) kodujących NRPSs, zaangażowane w produkcję piowerdyny, czy wiskozyny (Tabela 9).

Tabela 9. Klastry genów metabolitów wtórnych zidentyfikowane w genomie szczepu BRZ63 z użyciem antiSMASH 5.0

Region	Typ	OD	DO	Podobny klastor	Podobieństwo
Region 1.1	LAP	85,954	107,934		
Region 1.2	NAGGN	330,566	345,306		
Region 1.3	NRPS	373,569	426,477	piowerdyna	NRP 9%
Region 1.4	Siderofor	512,834	524,762		
Region 2.1	RiPP	326,216	337,061		
Region 4.1	Polieny arylowe	232,497	276,072	APE-Vf	inne 45%
Region 7.1	RiPP	41,058	51,936		
Region 8.1	NRPS	1	24,586	wiskozyna	NRP 37%
Region 9.1	Redoks-kofaktor	159,320	181,467	lankacydyna C	NRP+poliketyd, 13%
Region 14.1	Betalakton	45,049	73,349	fengicyna	NRP 13%
Region 16.1	Terpen	131,565	152,575		
Region 22.1	NRPS	64,606	101,624	taiwachelina	NRP 11%
Region 24.1	NRPS-like	51,064	77,559	kwasy L-2-amino-4-matoksy-trans-3-butenowy	NRP 40%
Region 35.1	NRPS	1	7,725		
Region 38.1	NRPS	1	3,345		

NRP – nierybosomalne peptydy (ang. *nonribosomal peptides*). NRPS – syntetazy nierybosomalnych peptydów (ang. *nonribosomal peptide synthetas*), RiPP - peptydy syntetyzowane rybosomalnie i modyfikowane potranslacyjnie (ang. *ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides*), NAGGN - amid N-acetyloglutaminyloglutaminy (ang. *N-Acetylglutaminyloglutamine amide*), LAP-liniowe peptydy zawierające azol(in)e (ang. *linear azol(in)e-containing peptides*).

Analiza genomu szczepu BRZ63 potwierdziła także obecność szeregu genów warunkujących skuteczną kolonizację roślin, w tym m.in. klastrów genów *flg*, *fil* i *flh* kodujących maszynę biosyntezy i ruchliwości wici oraz genów *cheA*, *cheB*, *cheW* i *mpc*, kodujących białka najbardziej rozpowszechnionego bakteryjnego szlaku sygnałowego chemotaksji. Ponadto w genomie BRZ63 zidentyfikowano geny wchodzące w skład operonu *pil*, wymagane do biosyntezy pilusów typu IV, 12 genów zebranych w operon *alg*, kodujących białka biorące udział w biosyntezie alginianu oraz kluczowe geny biosyntezy LPS, w tym operonu *lpx* - cech istotnych dla adhezji bakterii do powierzchni organów roślinnych w początkowej fazie tworzenia biofilmu. Analiza genomu szczepu BRZ63 wykazała również obecność genów kodujących enzymy antyoksydacyjne, takie jak: katalazę (*katE*), S-transferazę glutationową (*gst*), reduktazę glutationową (*gsr*), dysmutazę

ponadtlenkową [Fe] (*sodB*) i dysmutazę ponadtlenkową [Mn/Fe] (*sodA*). Geny determinujące powyższe cechy obecne w genomie BRZ63 przedstawiono w tabeli 10.

Tabela 10. Geny determinujące cechy związane z kolonizacją roślinnego gospodarza obecne w genomie szczepu BRZ63

Aktywność	Gen	Produkt genu	Numer akcesyjny	
<i>Biosynteza wici</i>	<i>flhG</i>	białko biosyntezy wici FlhG	TFW45253.1	
	<i>flhF</i>	białko biosyntezy wici FlhF	TFW45254.1	
	<i>flhA</i>	białko biosyntezy wici FlhA	TFW45255.1	
	<i>flhB</i>	białko biosyntezy wici FlhB	TFW45258.1	
	<i>fliR</i>	białko biosyntezy wici FliR	TFW45259.1	
	<i>fliQ</i>	białko biosyntezy wici FliQ	TFW45260.1	
	<i>fliP</i>	białko biosyntezy wici FliP	TFW45261.1	
	<i>fliOZ</i>	białko wici FliO/FliZ	TFW45262.1	
	<i>fliNY</i>	białko pierścienia C FliN/FliY	TFW45263.1	
	<i>fliM</i>	białko pierścienia C FliM	TFW45264.1	
	<i>fliL</i>	białko wici FliL	TFW45265.1	
	<i>fliK</i>	białko kontrolujące długość haka FliK	TFW45266.1	
	<i>fliJ</i>	białko wici FliJ	TFW45270.1	
	<i>fil</i>	syntaza ATP specyficzna dla wici [EC: 7.4.2.8]	TFW45271.1	
	<i>fliH</i>	białko biosyntezy wici FliH	TFW45272.1	
	<i>fliG</i>	białko pierścienia MS FliG	TFW45273.1	
	<i>fliF</i>	białko pierścienia M FliF	TFW45274.1	
	<i>fliE</i>	białko kompleksu hak- ciało podstawowe FliE	TFW45275.1	
	<i>fliS</i>	białko wici FliS	TFW45279.1	
	<i>fliD</i>	białko związane z hakiem FliD	TFW45280.1	
	<i>fliC</i>	flagelina	TFW45282.1	
	<i>ftrC</i>	regulator odpowiedzi	TFW45276.1	
	<i>fleQ</i>	regulator transkrypcji zależny od sigma-54, wiciowe białko regulatorowe	TFW45277.1	
	<i>fleL</i>	białko związane z hakiem FleL	TFW45284.1	
	<i>flgK</i>	białko związane z hakiem FlgK	TFW45285.1	
	<i>flgJ</i>	białko wici FlgJ	TFW45286.1	
	<i>flgI</i>	wiciowy prekursor białka pierścienia P FlgI	TFW45287.1	
	<i>flgH</i>	wiciowy prekursor białka pierścienia L FlgH	TFW45288.1	
	<i>flgG</i>	komponent ciała podstawowego FlgG	TFW45289.1	
	<i>flgF</i>	komponent ciała podstawowego FlgF	TFW45290.1	
	<i>Chemotaksja</i>	<i>motB</i>	białko chemotaksji MotB	TFW43788.1
		<i>motA</i>	białko chemotaksji MotA	TFW43789.1
		<i>cheR</i>	metylotransferazy CheR [EC:2.1.1.80]	TFW42220.1
		<i>cheB</i>	metyloesteraza/glutaminaza białkowo-glutaminianowa [EC:3.1.1.61 3.5.1.44]	TFW42221.1
		<i>cheW</i>	białko chemotaktyczne wiążące purynę CheW	TFW45243.1
		<i>cheB</i>	metyloesteraza/glutaminaza białkowo-glutaminianowa [EC:3.1.1.61 3.5.1.44]	TFW45248.1
		<i>cheA</i>	kinaza sensorowa CheA [EC:2.7.13.3]	TFW45249.1
		<i>cheZ</i>	białko chemotaktyczne CheZ	TFW45250.1
		<i>cheY</i>	białko chemotaktyczne CheY	TFW45251.1
		<i>cheV</i>	białko chemotaktyczne CheV	TFW43560.1
		<i>aer</i>	receptor aerotaksji	TFW45380.1
		<i>mcp</i>	chemoreceptor	TFW42247.1
	<i>Biosynteza pilusów</i>	<i>pilO</i>	białko składania pilusa typu IV PilO	TFW43881.1
		<i>pilN</i>	białko składania pilusa typu IV PilN	TFW43882.1
		<i>pilM</i>	białko składania pilusa typu IV PilM	TFW43883.1
		<i>fimA</i>	pilina	TFW43898.1
		<i>pilQ</i>	białko składania pilusa typu IV PilQ	TFW43990.1
		<i>pilV</i>	białko składania pilusa typu IV PilV	TFW43387.1
<i>pilE</i>		białko składania pilusa typu IV PilE	TFW43390.1	
<i>pilD</i>		peptydaza liderowa (peptydaza prepilinowa) / N-metylotransferaza [EC:3.4.23.43 2.1.1.-]	TFW43404.1	
<i>pilC</i>		białko składania pilusa typu IV PilC	TFW43405.1	
<i>pilA</i>		białko składania pilusa typu IV PilA	TFW43652.1	
<i>pilL</i>		kinaza histydynowa i regulator odpowiedzi PilL	TFW44166.1	
<i>pilT</i>		retrakcja pilusa typu IV warunkująca ruch komórki PilT	TFW42281.1	
<i>pilG</i>		białko regulacyjnego system dwuskładnikowego, regulator odpowiedzi PilG	TFW42290.1	
<i>pilH</i>		białko regulacyjnego system dwuskładnikowego, regulator odpowiedzi PilH	TFW42291.1	
<i>pilI</i>		retrakcja pilusa typu IV warunkująca ruch komórki PilI	TFW42292.1	
<i>pilJ</i>		retrakcja pilusa typu IV warunkująca ruch komórki PilJ	TFW42293.1	
<i>pilL</i>		kinaza histydynowa i regulator odpowiedzi PilL	TFW42294.1	
<i>pilF</i>		białko składania pilusa typu IV PilF	TFW39810.1	
<i>Biosynteza egzopolisacharydów</i>		<i>algA</i>	izomeraza mannozo-6-fosforanowa [EC:2.7.7.13 5.3.1.8]	TFW43571.1
		<i>algF</i>	białko biosyntezy alginianu AlgF	TFW43572.1
	<i>algJ</i>	O-acetylaza alginianu AlgJ	TFW43573.1	
	<i>algI</i>	O-acetylaza alginianu AlgI	TFW43574.1	
	<i>algL</i>	liaza alginianowa [EC:4.2.2.3]	TFW43575.1	
	<i>algX</i>	białko biosyntezy alginianu AlgX	TFW43576.1	
	<i>algG</i>	epimeraza-C5 mannuronianu [EC:5.1.3.37]	TFW43577.1	
	<i>algE</i>	białko biosyntezy alginianu AlgE	TFW43578.1	
	<i>alg44</i>	syntaza mannouronianu [EC:2.4.1.33]	TFW43579.1	
	<i>alg8</i>	syntaza mannouronianu [EC:2.4.1.33]	TFW43580.1	
	<i>algD</i>	GDP-6-dehydrogenaza mannozoowa [EC:1.1.1.132]	TFW43581.1	
	<i>algI</i>	O-acetylaza alginianu AlgI	TFW40983.1	
	<i>lpxL</i>	acylotransferaza [EC:2.3.1.241 2.3.1.-]	TFW45209.1	

Biosynteza lipopolisacharydu	<i>lpxO</i>	beta-hydroksylaza [EC:1.14.11.-]	TFW44377.1
	<i>lpxC</i>	deacetylaza UDP-3-O-acylo-N-acetylglukozaminy [EC:3.5.1.108]	TFW43550.1
	<i>lpxB</i>	syntaza lipidowo-A-disacharydowa [EC:2.4.1.182]	TFW42797.1
	<i>lpxA</i>	UDP-N-acetylglukozamina O-acylotransferaza [EC:2.3.1.129]	TFW42798.1
	<i>lpxD</i>	N-acylotransferaza UDP-3-O-acylo-glukozaminy [EC:2.3.1.191]	TFW42800.1
	<i>lpxO</i>	beta-hydroksylaza [EC:1.14.11.-]	TFW41929.1
	<i>lpxH</i>	hydrolaza UDP-2,3-diacetylglukozaminy [EC:3.6.1.54]	TFW41277.1
Enzymy antyoksydacyjne	<i>oxyR</i>	regulator transkrypcji z rodziny LysR. aktywator genów indukowanych natlenkiem wodoru	TFW44636.1
	<i>sodA</i>	manganozależna dysmutaza ponadtlenkowa [EC:1.15.1.1]	TFW43483.1
	<i>sodB</i>	dysmutaza ponadtlenkowa [EC:1.15.1.1]	TFW43053.1
	<i>grxC</i>	glutaredoksyna 3	TFW43955.1
	<i>ggt</i>	gamma-glutamylotranspeptydaza / hydrolaza glutationu [EC:2.3.2.2 3.4.19.13]	TFW43320.1
	<i>gst</i>	S-transferaza glutationowa [EC:2.5.1.18]	TFW45096.1
	<i>katB</i>	katalaza [EC:1.11.1.6]	TFW44834.1
	<i>gpx</i>	peroksydaza glutationowa [EC:1.11.1.9]	TFW45311.1
	<i>gsr</i>	reduktaza glutationowa (NADPH) [EC:1.8.1.7]	TFW42192.1
	<i>gshB</i>	syntaza glutationu [EC:6.3.2.3]	TFW42289.1

W genomie BRZ63 zidentyfikowano ponadto 134 geny kodujące enzymy aktywne w syntezie bądź degradacji węglowodanów, obecne w bazie danych CAZy (Tabela 11). W klasie hydrolaz glikozydowych (GH, ang. *Glycoside Hydrolase*) i esteraz węglowodanowych (CE, ang. *Carbohydrate Esterases*), CAZymes (ang. *Carbohydrate Active Enzymes*) zostały zidentyfikowane geny enzymów o potencjale degradacji wielu polimerów ściany komórkowej, w tym β -1,3-glukanu, celulozy, hemicelulozy, pektyny, peptydoglikanów, polisacharydów i chitooligosacharydów (Tabela 12).

Tabela 11. Geny związane z CAZymes obecne w genomach badanych szczepów

Rodzina enzymów	CBM	GH	GT	PL	AA	CE
Liczba genów w genomie BRZ63	14	51	61	2	6	8
Liczba genów w genomie KP32	21	79	57	0	6	5

CBM – moduł wiążący węglowodany (ang. Carbohydrate-Binding Module); GH – hydrolaza glikozydowa (ang. Glycoside Hydrolase); GT – transferaza glikozydowa (ang. Glycosyl Transferase); PL – liaza polisacharydowa (ang. Polysaccharide Lyases); AA - lityczne monooksygenazy polisacharydowe (ang. Auxiliary Activity); CE – esteraza węglowodanowa (ang. Carbohydrate Esterase).

Tabela 12. CAZymes zaangażowane w degradację ściany komórkowej roślin i grzybów zidentyfikowane w genomie badanych szczepów

Substrat	Rodzina enzymów	Enzymy	Ilość genów w genomie BRZ63	Ilość genów w genomie KP32
Beta-1-3-glukan	GH17	endo-1,3- β -glukozydaza glukanowa (EC 3.2.1.39)	2	0
Celuloza	GH3	β -glukozydaza (EC 3.2.1.21)	4	3
Celuloza	GH6	endoglukanaza (EC 3.2.1.4)	4	2
Hemiceluloza	GH36	α -galaktozydaza (EC 3.2.1.22)	1	36
Pektyny	GH28	poligalakturonaza (EC 3.2.1.15)	2	28
Polisacharydy	GH13	α -amylaza (EC 3.2.1.1)	11	20
Polisacharydy	GH15	glukoamylaza (EC 3.2.1.3)	1	0

Analiza genomu szczepu KP32 ujawniła natomiast obecność genów zaangażowanych w biosyntezę i transport sideroforów należących do sideroforów

katecholowych (enterobaktyna) i hydroksyamowych (aerobaktyna), w tym geny *entC*, *entB* i *entA* kodujące enzymy katalizujące tworzenie kwasu 2,3-dihydroksybenzoesowego (DHBA) z kwasu choryzmowego. Zidentyfikowano również geny kodujące kompleksy wieloenzymatyczne katalizujące syntezę enterobaktyny, złożone z produktów genów *entD*, *entE*, *entF* i *entG* oraz klaster genów *iucABCD* biorących udział w syntezie aerobaktyny i gen kodujący receptor tego sideroforu (*iutA*). Oprócz genów związanych z biosyntezą sideroforów, szczep KP32 zawierał również geny kodujące systemy wychwytu żelaza (*efeUOB*, *feoABC*, *fepABCDG* i *fhuBCD*), szereg transporterów ABC i białek receptorowych należących do rodziny antyporterów MFS. W genomie szczepu KP32 potwierdzono także obecność genów kodujących enzymy lityczne, w tym geny kodujące amylazy (*amyA*), lipazy (*apeE*) i proteazy (*yhbV*, *yegQ*) oraz chitynazę. Dodatkowo szczep KP32 posiadał geny zaangażowane w biosyntezę acetoiny (*ilvM*, *ilvH*, *ilvB*, *budA*) i 2,3-butanodiolu (*butA*) oraz geny związane z produkcją lotnych związków, takich jak 4-hydroksybenzoesan (*ubiC*), metanotiol (*met*) i izopren (*gcpE* i *ispE*). Analizowany genom zawierał również gen *hcnC*, geny dwuskładnikowego systemu regulacji GacS/GacA i gen kodujący dehydrogenazę mannitolu (*mtlR*). Ponadto wykazano obecność genów wchodzących w szlak IPyA biosyntezy kwasu indolo-3-octowego (*ipdC*, *aspC*, *aldA*), genów biosyntezy tryptofanu (*trpABCDE*) oraz genów operonu *pstABSC*, zaangażowanych w transport fosforanów, genów zaangażowanych w degradację fosfonooctanu (*phnA*), kodujących fosfatazy (*ppa*) i układy regulujące pobieranie fosforanów (*phoB*, *phoR*, *phoA*, *phoU*, *phoH*). Na uwagę zasługuje również obecność genów asymilacyjnej redukcji siarczanów (*cysND*, *cysC*, *cysH*) oraz genów kodujących β -syntazę cystationiny (CBS) i γ -liazę cystationiny (CTH), enzymów zaangażowanych w ścieżki produkcji H₂S. Geny determinujące cechy związane z biokontrolą i promowaniem wzrostu roślin zidentyfikowane u szczepu KP32 przedstawiono w tabeli 13.

Tabela 13. Geny determinujące istotne cechy związane z biokontrolą i promowaniem wzrostu roślin obecne w genomie szczepu KP32

Aktywność	Gen	Produkt genu	Numer akcesyjny
Biosynteza i transport sideroforów, systemy wychwytu żelaza,	<i>entA</i>	dehydrogenaza 2,3-dihydro-2,3-dihydroksybenzoesanowa [EC:1.3.1.28]	MBV6692457.1
	<i>entB</i>	dwufunkcyjna liaza izochoryzmatu / białko nośnikowe arylowe [EC: 3.3.2.1 6.3.2.14]	MBV6692458.1
	<i>entE</i>	ligaza 2,3-dihydroksybenzoesan-AMP [EC:6.3.2.14 2.7.7.58]	MBV6692459.1
	<i>entC</i>	syntaza izochoryzmatu [EC:5.4.4.2]	MBV6692461.1
	<i>fepB</i>	białko wiążące substrat systemu transportu enterobaktyny	MBV6692462.1
	<i>entS</i>	eksporter enterobaktyny	MBV6692463.1
	<i>fepD</i>	permeaza	MBV6692464.1
	<i>fepG</i>	permeaza	MBV6692465.1
	<i>fepC</i>	system transportu enterobaktyny, białko wiążące ATP [EC: 7.2.2.17]	MBV6692466.1
	<i>entF</i>	podjednostka F syntazy enterobaktyny [EC:6.3.2.14]	MBV6692467.1
	<i>fes</i>	esteraza [EC:3.1.1.108]	MBV6692469.1
	<i>fepA</i>	receptor kompleksu żelazo-enterobaktyna	MBV6692470.1
	<i>entD</i>	podjednostka D syntazy enterobaktyny [EC:6.3.2.14 2.7.8.-]	MBV6692784.1
	<i>fhuC</i>	system transport sideroforów hydroksamowych, białko wiążące ATP [EC:7.2.2.16]	MBV6694398.1

	<i>fhuD</i>	system transport sideroforów hydroksamowych, białko wiążące substrat	MBV6694399.1
	<i>fhuB</i>	system transport sideroforów hydroksamowych, białko permeazy	MBV6694400.1
	<i>iutA</i>	białko receptorowe	MBV6693781.1
	<i>feoA</i>	białko transportujące żelazo	MBV6695302.1
	<i>feoB</i>	białko transportujące żelazo	MBV6695303.1
	<i>feoC</i>	białko transportujące żelazo	MBV6695304.1
	<i>efeB</i>	peroksydaza EfeB [EC:1.11.1.-]	MBV6691879.1
	<i>efeO</i>	element systemu pobierania żelaza EfeO	MBV6691880.1
	<i>efeU</i>	transporter żelaza	MBV6691881.1
	<i>iucA</i>	syntaza N2-cytrylo-N6-acetylo-N6-hydroksylizyny [EC:6.3.2.38]	MBV6693894.1
	<i>iucB</i>	acetylotransferaza N6-hydroksylizyny [EC:2.3.1.102]	MBV6693895.1
	<i>iucC</i>	syntaza aerobaktyny [EC:6.3.2.39]	MBV6693896.1
	<i>iucD</i>	N6-hydroksylaza lizyny [EC:1.14.13.59]	MBV6693897.1
	<i>dps</i>	białko wiążące DNA	MBV6690874.1
Biosynteza enzymów litycznych	<i>chiA</i>	chitynaza [EC:3.2.1.14]	MBV6693592.1
	<i>gbpA</i>	białko wiążące chitynę	MBV6692519.1
	<i>chiB</i>	chitynaza [EC:3.2.1.14]	MBV6694019.1
	<i>chbG</i>	chitobioza	MBV6694707.1
	<i>amyA</i>	alfa-amylaza [EC:3.2.1.1]	MBV6690782.1
	<i>apeE</i>	lipaza/esteraza błony zewnętrznej	MBV6693525.1
	<i>yhbV</i>	proteaza	MBV6693058.1
	<i>yegQ</i>	proteaza	MBV6693691.1
	<i>mlr</i>	dehydrogenaza mannitolu	MBV6693533.1
Produkcja acetoiny i 2,3-butanodiolu	<i>ilvM</i>	mała podjednostka syntazy acetylomleczanowej II [EC:2.2.1.6]	MBV6694051.1
	<i>ilvH</i>	mała podjednostka syntazy acetylomleczanowej I/III [EC:2.2.1.6]	MBV6694244.1
	<i>ilvB</i>	duża podjednostka syntazy acetylomleczanowej I/II/III [EC:2.2.1.6]	MBV6694245.1
	<i>budA</i>	dekarboksylaza acetylomleczanowa [EC:4.1.1.5]	MBV6692473.1
	<i>butA</i>	reduktaza diacetylowa	MBV6694547.1
	<i>ubiC</i>	liaza choryzmianowa [EC:4.1.3.40]	MBV6692171.1
4-hydroksybenzoesan, metanotiol, izopren, produkcja sodorifenu	<i>metH</i>	5-metylotetrahydrofolian - metylotransferaza homocysteiny [EC:2.1.1.13]	MBV6692197.1
	<i>gcpE</i>	syntaza (E)-4-hydroksy-3-metylobut-2-enylodifosforanu [EC:1.17.7.1 1.17.7.3]	MBV6693643.1
	<i>ispE</i>	kinaza 4-difosfocytydyl-2-C-metylo-D-erytrytolu [EC:2.7.1.148]	MBV6691414.1
	<i>sodA</i>	izopentenyl-difosforan delta izomeraza [EC:5.3.3.2]	MBV6694136.1
	<i>sodB</i>	syntaza 1-deoksy-D-ksylulozo-5-fosforanu [EC:2.2.1.7]	MBV6695426.1
Produkcja HCN	<i>hcnC</i>	syntaza cyjanowodoru	MBV6690484.1
Produkcja siarkowodoru	<i>cysC</i>	kinaza adenylosiarczanowa [EC:2.7.1.25]	MBV6694725.1
	<i>cysN</i>	podjednostka adenylotransferazy siarczanowej 1[EC:2.7.7.4]	MBV6694726.1
	<i>cysD</i>	podjednostka adenylotransferazy siarczanowej 2[EC:2.7.7.4]	MBV6694727.1
	<i>cysG</i>	ferrochelataza sirochlorowodoru [EC:2.1.1.107 1.3.1.76 4.99.1.4]	MBV6694728.1
	<i>cysH</i>	reduktaza fosfosiarczanowa fosfoadenozyny [EC:1.8.4.8 1.8.4.10]	MBV6694730.1
	<i>cysI</i>	reduktaza siarczynowa (NADPH), składnik beta hemoproteiny [EC:1.8.1.2]	MBV6694731.1
	<i>cysJ</i>	reduktaza siarczynowa (NADPH), składnik alfa hemoproteiny [EC:1.8.1.2]	MBV6694732.1
	<i>cth</i>	gamma-liaza cystationinowa [EC:4.4.1.1]	MBV6691019.1
	<i>cbs</i>	beta-syntaza cystationiny [EC:4.2.1.22]	MBV6691020.1
Produkcja kwasu salicylowego	<i>pchB</i>	białko biosyntezy salicylanu PchB	MBV6692322.1
Biosynteza IAA	<i>ipdC</i>	dekarboksylaza indolo-3-pirogronianowa [EC:4.1.1.74]	MBV6693804.1
	<i>aspC</i>	aminotransferaza asparaginianowa [EC:2.6.1.1]	MBV6691124.1
	<i>aldA</i>	dehydrogenaza aldehydu mlekowego / dehydrogenaza aldehydu glikolowego [EC:1.2.1.22 1.2.1.21]	MBV6691460.1
Biosynteza tryptofanu	<i>trpE</i>	komponent I syntazy antranilanowej [EC:4.1.3.27]	MBV6691605.1
	<i>trpG</i>	komponent II syntazy antranilanowej [EC:4.1.3.27]	MBV6691606.1
	<i>trpD</i>	fosforybozylotransferaza antranilanowa [EC:2.4.2.18]	MBV6691607.1
	<i>trpCF</i>	syntaza fosforanu indolo-3-glicerolu / izomeraza fosforybozylantranilanu [EC:4.1.1.48 5.3.1.24]	MBV6691608.1
	<i>trpB</i>	łańcuch alfa syntazy tryptofanu [EC:4.2.1.20]	MBV6691609.1
	<i>trpA</i>	łańcuch beta syntazy tryptofanu [EC:4.2.1.20]	MBV6691610.1
Solubilizacja fosforanów	<i>pstS</i>	białko wiążące substrat	MBV6693473.1
	<i>pstC</i>	permeaza	MBV6693474.1
	<i>pstA</i>	permeaza	MBV6693475.1
	<i>pstB</i>	białko wiążące ATP [EC:7.3.2.1]	MBV6693476.1
	<i>phoU</i>	białko systemu transportu fosforanów	MBV6693477.1
	<i>phnA</i>	białko PhnA	MBV6690599.1
	<i>ppk2</i>	kinaza polifosforanowa [EC:2.7.4.34]	MBV6691499.1
	<i>ppa</i>	nieorganiczna pirofosfataza [EC:3.6.1.1]	MBV6695132.1
	<i>phoA</i>	fosfataza alkaliczna [EC:3.1.3.1]	MBV6690920.1
	<i>phoB</i>	białko regulatorowe PhoB	MBV6695340.1
	<i>phoR</i>	białko regulatorowe PhoR	MBV6695341.1
	<i>phoH</i>	białko PhoH	MBV6690598.1
	<i>gcd</i>	chinoproteinowa dehydrogenaza glukozowa [EC:1.1.5.2]	MBV6692846.1
Sytem transdukcji sygnału	<i>gacS</i>	kinaza histydynowa	MBV6694203.1
	<i>gacA</i>	regulator odpowiedzi	MBV6691275.1
Biosynteza spermidyny	<i>speA</i>	dekarboksylaza argininowa [EC:4.1.1.19]	MBV6694404.1
	<i>speB</i>	agmatynaza [EC:3.5.3.11]	MBV6694405.1
	<i>speD</i>	dekarboksylaza S-adenozylometioniny [EC:4.1.1.50]	MBV6694374.1
	<i>speE</i>	syntaza spermidyny [EC:2.5.1.16]	MBV6694375.1

Analiza z wykorzystaniem programu antiSMASH 5.0 umożliwiła ponadto zidentyfikowanie w genomie szczepu KP32 siedmiu BGCs (Tabela 14). Klastry te wykazywały podobieństwo do znanych klastrów determinujących produkcję metabolitów wtórnych, które odgrywają ważną rolę w inhibicji patogenów, w tym klastry genów

związane z biosyntezą NRPSs zaangażowanych w produkcję amonabaktyny, streptobaktyny, indioginy, betalaktonów, nukleozydów i sideroforów, takich jak np. polien aryłowy.

Tabela 14. Klastry genów metabolitów wtórnych zidentyfikowane w genomie szczepu KP32 przy użyciu antiSMASH 5.0

Region	Typ	OD	DO	Podobny klaster	Podobieństwo
Region 2.1	NRPS	22,349	74,211		
Region 2.2	Siderofor. Polien aryłowy	113,598	155,455	polien aryłowy, aerobaktyna	77%, 77%
Region 5.1	Betalakton	46,504	72,176		
Region 11.1	NRPS-like. Tiopeptyd	630,792	674,628	indioquina	NRP 80%
Region 15.1	Nukleozyd	3,493	25,905		
Region 31.1	NRPS	265,207	318,809	amonabaktyna P 750, enterobaktyna, streptobaktyna	NRP 57%, 20%, 24%
Region 34.1	NRPS-like	56,898	99,879		

NRP – nierybosomalne peptydy (ang. *nonribosomal peptides*). NRPS – syntetazy nierybosomalnych peptydów (ang. *nonribosomal peptide synthetas*).

W genomie szczepu KP32 wykazano także obecność szeregu genów warunkujących skuteczną kolonizację roślin. Potwierdzono obecność wielu genów zaangażowanych w biosyntezę i składanie wici, takich jak geny operonów *flg*, *fli* i *flh*, a także geny *motA* i *motB* kodujące białka motoryczne wici MotA i MotB. Rozpoznano również wiele genów zaangażowanych w chemotaksję (*cheBWARZ*, *tsr*, *aer*, *tar* i *mcp*) oraz adhezję, w tym grupę genów związanych z indukcją adherencji (*yidE-16hspA-yidR-yidQ*). Analiza genomu ujawniła również geny zaangażowane w biosyntezę i składanie systemu pilusów typu IV (T4PS) (*hofBCMOPQ*, *ppdABC*), kilka genów biorących udział w biosyntezie celulozy (operony *bcsABZC* i *bcsEFG*) i kwasu kolaninowego (*wza wzb*, *wzc*), jednego z głównych egzopolisacharydów produkowanych przez bakterie oraz obecność genu *csgG* biorącego udział w biosyntezie włókien curli. Stwierdzono także obecność genu *luxS* zaangażowanego w biosyntezę cząsteczek sygnałowych N-AHL, kodującego liazę S-rybozylohomocysteiny (LuxS, EC 4.4.1.21), uczestniczącą w produkcji cząsteczki sygnałowej - autoinduktora AI-2. Ponadto wykazano obecność szerokiej gamy genów kodujących enzymy i regulatory, które pomagają bakteriom radzić sobie ze stresem oksydacyjnym, takich jak: gen *kata* kodujący katalazę, *katG* kodujący katalazę-peroksydazę, geny dysmutazy ponadtlenkowej (*sodA*, *sodB*, *sodC*), S-transferazy glutationowej (*gstA*), peroksydazy glutationowej (*gpo*), reduktazy glutationowej (*gor*) i geny operonu *gsiABCD*, transportera ABC glutationu. Zidentyfikowano również geny kodujące białko OxyR i RpoS oraz obecność genów *uspABCEFG* kodujących uniwersalne białka stresowe. Geny determinujące cechy związane

z kolonizacją roślinnego gospodarza obecne w genomie szczepu KP32 przedstawiono w tabeli 15.

Tabela 15. Geny determinujące cechy związane z kolonizacją roślinnego gospodarza obecne w genomie szczepu KP32

Aktywność	Gen	Produkt genu	Numer akcesyjny	
Biosynteza wici	<i>flgN</i>	białko biosyntezy wici FlgN	MBV6692976.1	
	<i>flgM</i>	negatywny regulator syntezy flageliny FlgM	MBV6692977.1	
	<i>flgA</i>	białko pierścienia P FlgA	MBV6692978.1	
	<i>flgB</i>	komponent ciałka podstawowego FlgB	MBV6692979.1	
	<i>flgC</i>	komponent ciałka podstawowego FlgC	MBV6692980.1	
	<i>flgD</i>	białko modyfikujące kompleks hak-ciałko podstawne FlgD	MBV6692981.1	
	<i>flgE</i>	białko związane z hakiem FlgE	MBV6692982.1	
	<i>flgF</i>	komponent ciałka podstawowego FlgF	MBV6692983.1	
	<i>flgG</i>	komponent ciałka podstawowego FlgG	MBV6692984.1	
	<i>flgH</i>	białko pierścienia L FlgH	MBV6692985.1	
	<i>flgI</i>	białko pierścienia P FlgI	MBV6692986.1	
	<i>flgJ</i>	hydrolaza peptydoglikanu FlgJ	MBV6692987.1	
	<i>flgK</i>	białko-1 związane z hakiem	MBV6692988.1	
	<i>flgL</i>	białko-3 związane z hakiem	MBV6692989.1	
	<i>fliR</i>	białko biosyntezy wici FliR	MBV6692991.1	
	<i>fliQ</i>	białko biosyntezy wici FliQ	MBV6692992.1	
	<i>fliP</i>	białko biosyntezy wici FliP	MBV6692993.1	
	<i>fliO/fliZ</i>	białko wici FliO/FliZ	MBV6692994.1	
	<i>fliN</i>	białko wici FliN	MBV6692995.1	
	<i>fliM</i>	białko wici FliM	MBV6692996.1	
	<i>fliL</i>	białko wici FliL	MBV6692997.1	
	<i>fliK</i>	białko kontrolujące długość haka FliK	MBV6692998.1	
	<i>fliJ</i>	białko wici FliJ	MBV6692999.1	
	<i>fliI</i>	syntaza ATP specyficzna dla wici [EC: 7.4.2.8]	MBV6693000.1	
	<i>fliH</i>	białko biosyntezy wici FliH	MBV6693001.1	
	<i>fliG</i>	białko pierścienia C FliG	MBV6693002.1	
	<i>fliF</i>	białko pierścienia M FliF	MBV6693003.1	
	<i>fliE</i>	białko kompleksu hak- ciało podstawowe FliE	MBV6693004.1	
	<i>fliT</i>	białko FliT	MBV6693006.1	
	<i>fliS</i>	białko opiekuńcze FliS	MBV6693007.1	
	<i>fliD</i>	białko związane z hakiem 2	MBV6693008.1	
	<i>fliC</i>	flagelina	MBV6693009.1	
	<i>fliA</i>	czynniki sigma polimerazy RNA FliA	MBV6693010.1	
	<i>fliZ</i>	czynniki sigma S FliZ	MBV6693011.1	
	<i>fliY</i>	białko wiążące substrat systemu transportu L-cystyny	MBV6693013.1	
	<i>flhD</i>	aktywator transkrypcji FlhD	MBV6692957.1	
	<i>flhC</i>	aktywator transkrypcji FlhC	MBV6692958.1	
	<i>flhB</i>	białko biosyntezy wici FlhB	MBV6692971.1	
	<i>flhA</i>	białko biosyntezy wici FlhA	MBV6692972.1	
	<i>flhE</i>	białko wici FlhE	MBV6692973.1	
	Chemotaksja	<i>motA</i>	białko chemotaksji MotA	MBV6692959.1
		<i>motB</i>	białko chemotaksji MotB	MBV6692960.1
		<i>cheA</i>	kinaza sensorowa CheA [EC:2.7.13.3]	MBV6692961.1
<i>cheW</i>		białko chemotaktyczne wiążące purynę CheW	MBV6692962.1	
<i>cheR</i>		metylotransferazy CheR [EC:2.1.1.80]	MBV6692965.1	
<i>cheB</i>		metyloesteraza/glutaminaza białkowo-glutaminianowa [EC:3.1.1.61 3.5.1.44]	MBV6692966.1	
<i>cheY</i>		białko chemotaktyczne CheY	MBV6692967.1	
<i>cheZ</i>		białko chemotaktyczne CheZ	MBV6692968.1	
<i>tsr</i>		chemoreceptor	MBV6692963.1	
<i>tap</i>		chemoreceptor	MBV6692964.1	
<i>mcp</i>		chemoreceptor	MBV6690869.1	
Biosynteza pilusów	<i>pilT</i>	retrakcja pilusa typu IV warunkująca ruch komórki PilT	MBV6694347.1	
	<i>hofB</i>	białko transportowe HofB	MBV6694216.1	
	<i>hofC</i>	białko transportowe HofC	MBV6694217.1	
	<i>hofM</i>	białko składania pilusa HofM	MBV6694875.1	
	<i>hofO</i>	białko składania pilusa HofO	MBV6694877.1	
	<i>hofP</i>	białko składania pilusa HofP	MBV6694878.1	
	<i>hofQ</i>	białko transportowe HofQ	MBV6694879.1	
	<i>ppdC</i>	białko zależne od peptydazy prepiliny C	MBV6693326.1	
	<i>ppdB</i>	białko zależne od peptydazy prepiliny B	MBV6693328.1	
	<i>ppdA</i>	białko zależne od peptydazy prepiliny A	MBV6693329.1	
	Biosynteza egzopolisacharydów	<i>bcsA</i>	syntaza celulozy (tworząca UDP) [EC:2.4.1.12]	MBV6693603.1
<i>bcsB</i>		białko operonu syntazy celulozy B	MBV6693604.1	
<i>bcsZ</i>		endoglikanaza [EC:3.2.1.4]	MBV6693605.1	
<i>bcsC</i>		białko operonu syntazy celulozy C	MBV6693606.1	
<i>bcsE</i>		białko biosyntezy celulozy BcsE	MBV6693600.1	
<i>bcsF</i>		białko biosyntezy celulozy BcsF	MBV6693599.1	
<i>bcsG</i>		białko biosyntezy celulozy BcsG	MBV6693598.1	
<i>wza</i> , <i>gfcE</i>		biosynteza polisacharydów / białko eksportowe	MBV6690971.1	
<i>etk-wzc</i>		białkowa kinaza tyrozynowa Etk/Wzc [EC:2.7.10.-]	MBV6693117.1	
<i>wzb</i>		fosfataza białkowa	MBV6690972.1	
<i>csgG</i>		białko związane z biosyntezą włókien curli CsgG	MBV6690785.1	
Quorum sensing	<i>tqsA</i>	białko transportowe TqsA	MBV6691312.1	

Enzymy antyoksydacyjne	luxS	liaza S-rybozylohomocysteiny [EC:4.4.1.21]	MBV6694697.1
	<i>katG</i>	katalazo-peroksydaza [EC:1.11.1.21]	MBV6692224.1
	<i>katE</i>	katalaza [EC:1.11.1.6]	MBV6692316.1
	<i>sodA</i>	dysmutaza ponadtlenkowa [Mn]	MBV6693541.1
	<i>sodB</i>	dysmutaza ponadtlenkowa [Fe]	MBV6694141.1
	<i>sodC</i>	dysmutaza ponadtlenowa [Cu-Zn] [EC:1.15.1.1]	MBV6694127.1
	<i>gstA</i>	S-transferaza glutationowa [EC:2.5.1.18]	MBV6692140.1
	<i>gpo</i>	peroksydaza glutationowa [EC:1.11.1.9]	MBV6694168.1
	<i>gsiA</i>	system transportu glutationu białko wiążące ATP	MBV6690934.1
	<i>gsiB</i>	białko wiążące substrat systemu transportu glutationu	MBV6690935.1
	<i>gsiC</i>	białko permeazy systemu transportu glutationu	MBV6690936.1
	<i>gsiD</i>	białko permeazy systemu transportu glutationu	MBV6690937.1
	<i>gor</i>	reduktaza glutationowa (NADPH) [EC:1.8.1.7]	MBV6693993.1
		regulator transkrypcji z rodziny LysR. aktywator genów indukowanych nadtlkiem wodoru	MBV6695241.1
	<i>oxyR</i>		MBV6695241.1
	<i>rpoS</i>	czynnik sigma polimerazy RNA	MBV6695493.1
	<i>uspA</i>	uniwersalne białko stresu A	MBV6693970.1
	<i>uspB</i>	uniwersalne białko stresu B	MBV6693969.1
	<i>uspC</i>	uniwersalne białko stresu C	MBV6692955.1
	<i>uspE</i>	uniwersalne białko stresu E	MBV6691522.1
	<i>uspG</i>	uniwersalne białko stresu G	MBV6691261.1

Na uwagę zasługują również 162 geny kodujące hipotetyczne białka aktywne w syntezie bądź degradacji węglowodanów oraz CAZymes o potencjale degradacji wielu polimerów ściany komórkowej, w tym hemiceluloz, pektyn i peptydoglikanów (Tabela 11 i 12).

Wyniki identyfikacji genów kluczowych dla biokontroli, promocji wzrostu roślin i kolonizacji roślinnego gospodarza w genomie szczepu BRZ63 zostały opublikowane w pracy Chlebek i in. (2020), identyfikacja genów kluczowych dla biokontroli u szczepu KP32 została przedstawiona w pracy Chlebek i in. (2022); zamieszczonych w rozdziale A1 i A2 niniejszej pracy.

6.4. Identyfikacja mechanizmów warunkujących oddziaływania antagonistyczne za pomocą testów biochemicznych *in vitro*

Po wykazaniu skutecznego działania przeciwgrzybowego i dokonaniu analizy genomów badanych szczepów, która ujawniła obecność genów kluczowych dla biokontroli, przeprowadzono testy biochemiczne na podstawie których oceniono u BRZ63 i KP32 aktywność mechanizmów potencjalnie zaangażowanych w promocję wzrostu roślin, w tym również w biokontrolę. Jako kontrolę do tych testów zastosowano endofityczny szczep *E. asburiae* 4FJK. W badaniach tych oceniano zdolność badanych szczepów do produkcji sideroforów, enzymów litycznych, syntezy acetoiny i 2,3-butanodiolu oraz cyjanowodoru, solubilizacji fosforanów oraz produkcji IAA i deaminazy ACC. Wyniki biochemicznej charakterystyki szczepów przedstawiono w tabeli 16.

Oba badane szczepy bakterii wykazywały zdolność do produkcji sideroforów, o czym świadczyła zmiana zabarwienia podłoża CAS z niebieskiego na żółto–pomarańczowe, co było wynikiem usunięcia żelaza z kompleksu barwnego indykatora przez chelator. Do jednych z najważniejszych mechanizmów biokontroli zalicza się produkcję enzymów litycznych. Zdolność badanych bakterii do produkcji chitynaz oceniano z użyciem

podłoża zawierającego koloidalną chitynę. Stwierdzono, iż oba szczepy bakterii wykazują zdolność do produkcji tej grupy enzymów. Szczepy produkowały także amylazy, proteazy i celulazy. Dodatkowo, u szczepu KP32 potwierdzono zdolność do produkcji lipaz, o czym świadczyło pojawienie się na powierzchni kolonii tego szczepu wzrastających na podłożu z dodatkiem oliwy z oliwek wytrąconych białych kryształów oleinianu wapnia. Kolejną analizowaną cechą była zdolność badanych bakterii do produkcji lotnych związków organicznych - acetoiny i 2,3-butanodiolu oraz HCN. Przeprowadzone testy wykazały zdolność zarówno szczepu BRZ63 jak i KP32 do wytwarzania acetoiny i 2,3-butanodiolu co obserwowano poprzez zmianę zabarwienia podłoża na kolor różowy, oraz zdolność szczepu KP32 do produkcji HCN na podłożu zawierającym glicynę. Badane szczepy wykazywały także zdolność do solubilizacji fosforanów, o czym świadczyły wyraźne strefy przejaśnienia wokół kolonii bakterii na podłożu zawierającym fosforan trójwapniowy $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, jako jedyne źródło fosforu. Indeks solubilizacji fosforanów (PSI) dla szczepu BRZ63 był bardzo wysoki i wyniósł $7,67 \pm 0,33$, natomiast dla szczepu KP32 osiągnął on wartość $2,75 \pm 0,11$. Zaobserwowano jednak, że zdolność solubilizacji fosforanów przez szczepy BRZ63 i KP32 była wyższa niż u szczepu kontrolnego (PSI $1,76 \pm 0,19$) (Tabela 16). Szczep BRZ63 charakteryzował się również wysoką zdolnością do produkcji kwasu indolo-3-octowego (IAA) ($59,62 \pm 1,11 \mu\text{g/ml}$) w obecności tryptofanu (Tabela 16) oraz kwasu salicylowego (SA) ($17,83 \pm 0,95 \mu\text{g/ml}$) (Tabela 16). Innym ważnym mechanizmem sprzyjającym wzrostowi roślin jest zdolność endofitów do wytwarzania deaminazy ACC, obniżającej poziom etylenu w roślinie. Oba badane szczepy rosły na podłożu DF uzupełnionym 3 mM ACC jako źródłem azotu, co potwierdziło ich zdolność do wytwarzania tego enzymu (Tabela 16).

Tabela 16. Biochemiczna charakterystyka badanych szczepów BRZ63 i KP32

Cecha	Szczep BRZ63	Szczep KP32	Szczep 4FJK
Produkcja sideroforów	+	+	-
Produkcja amylaz	+	+	+
Produkcja proteaz	+	+	-
Produkcja chitynaz	+	+	-
Produkcja lipaz	-	+	-
Produkcja celulaz	+	+	-
Produkcja acetoiny i 2,3-butanodiolu	+	+	-
Produkcja HCN	-	+	-
Solubilizacja fosforanów (PSI)	$7,67 \pm 0,33$	$2,75 \pm 0,11$	$1,36 \pm 0,16$
Produkcja IAA ($\mu\text{g/mL}$)	$59,62 \pm 1,11$	$14,32 \pm 0,12$	$17,62 \pm 0,9$
Produkcja deaminazy ACC	+	+	+
Produkcja SA ($\mu\text{g/mL}$)	$17,83 \pm 0,95$	$5,43 \pm 0,89$	$4,25 \pm 0,65$

+ - pozytywna reakcja, - - negatywna reakcja

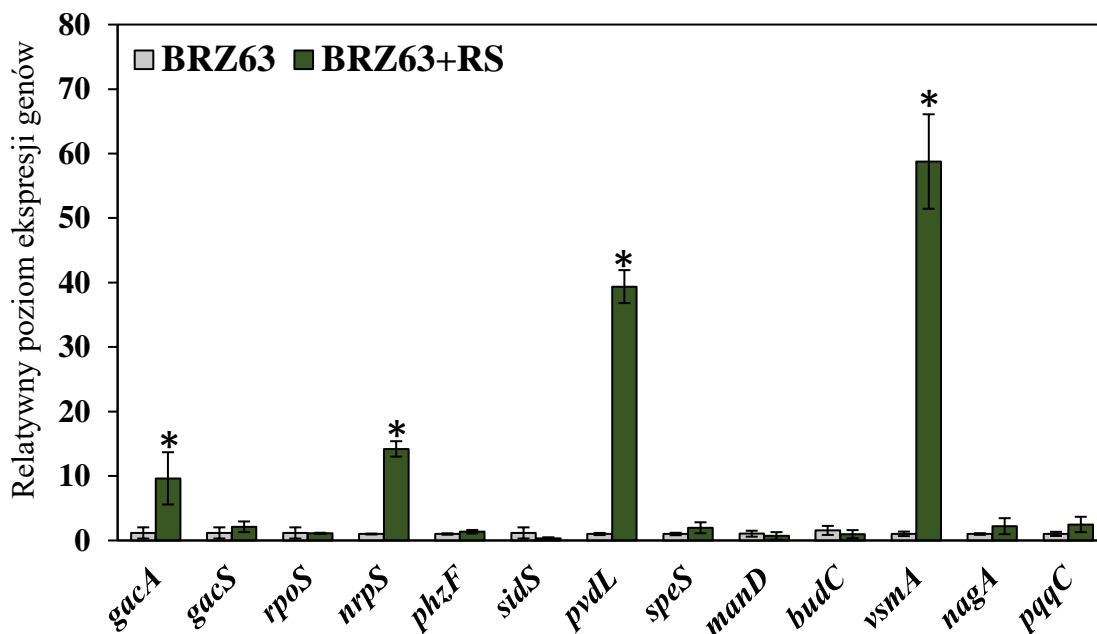
Wyniki charakterystyki biochemicznej szczepu BRZ63 i szczepu KP32 zostały opublikowane odpowiednio w pracy Chlebek i in. (2020) i w pracy Chlebek i in. (2022) zamieszczonych w rozdziale A1 i A2 niniejszej pracy.

6.5. Wpływ wybranych fitopatogenów grzybowych na ekspresję genów potencjalnie zaangażowanych w proces biokontroli u badanych szczepów bakterii

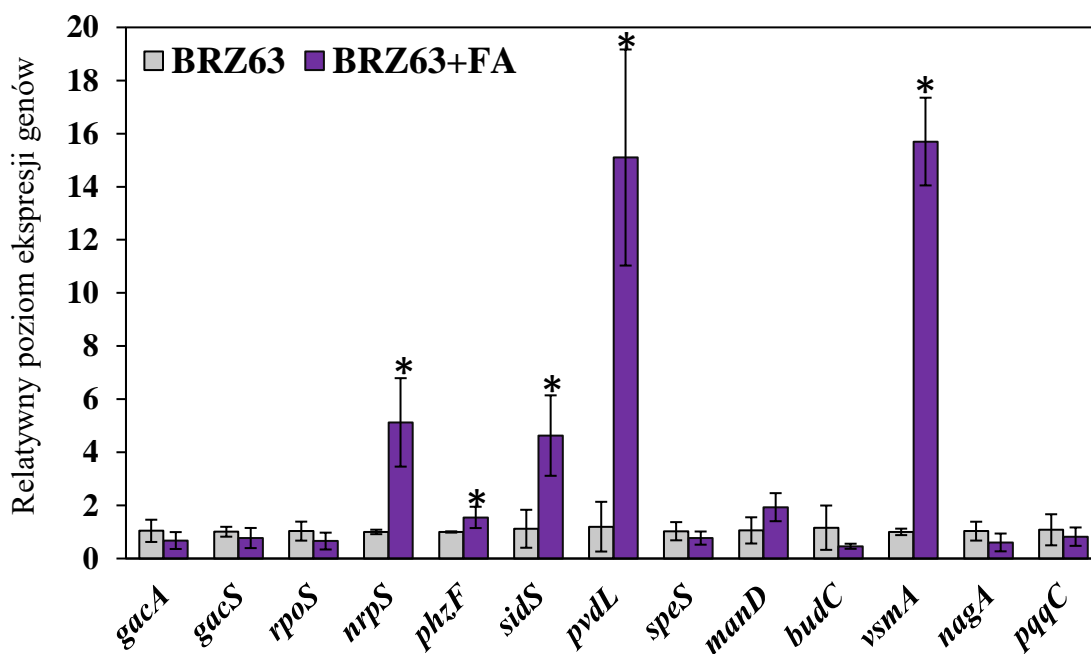
Sekwencjonowanie i analiza genomów szczepów *P. fluorescens* BRZ63 i *S. quinivornas* KP32 ujawniły w nich obecność wielu genów zaangażowanych w mechanizmy kontroli biologicznej. W kolejnym etapie badań, podjęto więc próbę określenia wpływu obecności grzybowych patogenów na ekspresję wybranych genów, potencjalnie zaangażowanych w aktywność antagonistyczną, u badanych szczepów (Materiały i metody, Tabela 2 i 3).

Aby określić wpływ fitopatogenów grzybowych na ekspresję wybranych genów, zmierzono względny poziom ekspresji wytypowanych genów wykorzystując metodę RT-qPCR. Stwierdzono, iż badany szczep BRZ63 wykazywał istotne różnice w poziomie ekspresji genów zaangażowanych w mechanizmy biokontroli, w odpowiedzi na badane fitopatogeny (Rysunki 6-9). Istotne zmiany w ekspresji wybranych genów obserwowano u tego szczepu po 48 godzinach od traktowania jego hodowli filtratami po hodowli grzybów. Profile ekspresji genów ujawniły wyższy poziom ekspresji genów syntetaz nierybosomalnych peptydów (*nrpS*), w tym zaangażowanych w syntezę piowerdyny (*pvdL*) i wiskozyny (*vsmA*), genu syntetazy sideroforów (*sidS*), genu *phzF*, kodującego białko biorące udział w biosyntezie fenazny, białka regulatorowego (*gacA*) oraz kinazy histydynowej (*gacS*) (Rysunki 6-9). Znaczne zwiększenie poziomu ekspresji genów *nrpS*, *pvdL* oraz *vsmA* obserwowano w odpowiedzi na obecność filtratów wszystkich badanych patogenów. Oszacowano, iż poziom ekspresji genu *nrpS* był 14-, 10-,7- i 5-krotnie wyższy, genu *pvdL* 39,3-, 33,9-,16- i 15-krotnie wyższy, a genu *vsmA* 58,8-, 90,1-, 15,0- i 15,7-krotnie wyższy w stosunku do kontroli, po ekspozycji szczepu BRZ63 na filtry odpowiednio *R. solani*, *C. dematium*, *S. sclerotiorum* lub *F. avenaceum* (Rysunki 7-9). Z kolei, w przypadku genu *sidS* obserwowano 4,6- i 7,8-krotny wzrost poziomu ekspresji w obecności filtratów odpowiednio *F. avenaceum* i *S. sclerotiorum*. W obecności filtratów pochodzących z tych dwóch gatunków grzybów zaobserwowano również niewielki wzrost ekspresji genu *phzF* (Rysunek 7, Rysunek 9). Po 48 godzinach ekspozycji szczepu BRZ63 filtratami odpowiednio *R. solani* i *S. sclerotiorum*, obserwowano prawie 10-krotny i ponad 4-krotny wzrost ekspresji genu regulatorowego *gacA* (Rysunek 6, Rysunek 9), natomiast obecność filtratu *S. sclerotiorum* indukowała ponad 4-krotny wzrost ekspresji genu kinazy

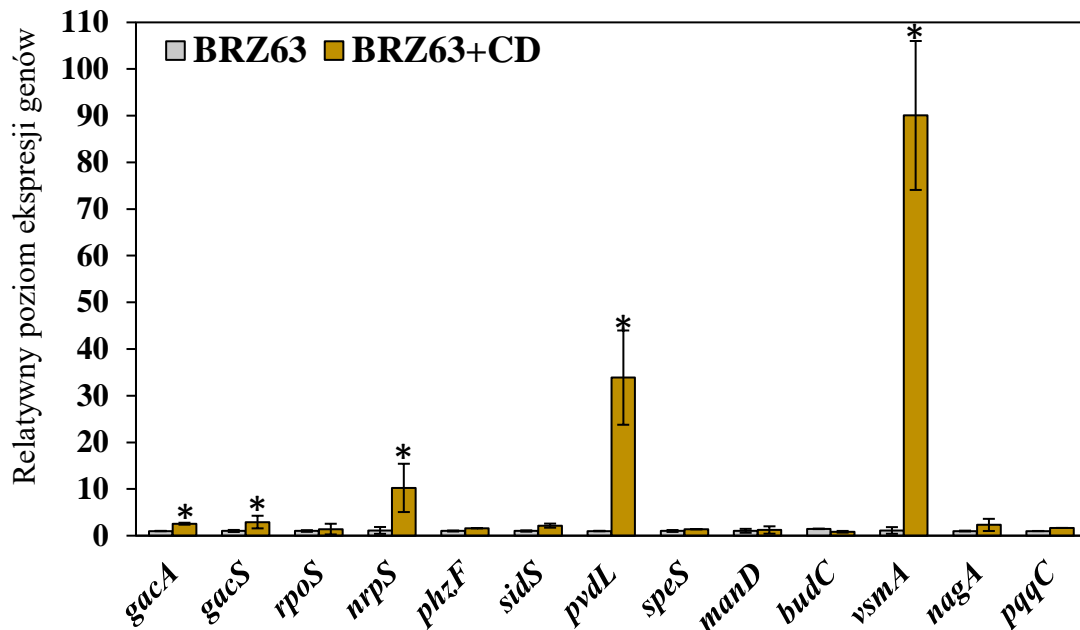
histydynowej (*gacS*) oraz ponad 2-krotny wzrost ekspresji genu *ppqC*, zaangażowanego w biosyntezę pirolochinolinochinonu i genu *nagA* (Rysunek 9).



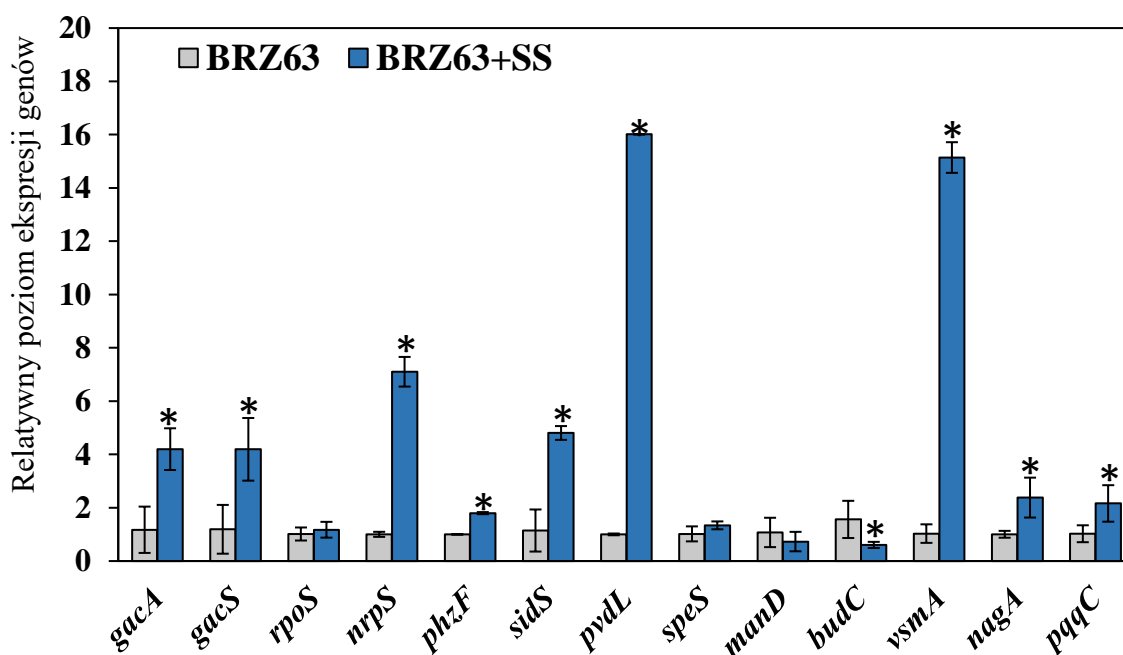
Rysunek 6. Analiza ekspresji genów potencjalnie zaangażowanych w aktywność biologiczną szczepu BRZ63, po 48 godzinach hodowli w obecności filtratów *Rhizoctonia solani*. Krotność zmiany poziomu ekspresji genów oceniano metodą RT-qPCR, zgodnie z metodą $2^{-\Delta\Delta CT}$; *wskazują różnice istotne statystycznie wyznaczone testem t-Studenta z wartością $p < 0,05$.



Rysunek 7. Analiza ekspresji genów potencjalnie zaangażowanych w aktywność biologiczną szczepu BRZ63, po 48 godzinach hodowli w obecności filtratów *Fusarium avenaceum*. Krotność zmiany poziomu ekspresji genów oceniano metodą RT-qPCR, zgodnie z metodą $2^{-\Delta\Delta CT}$; *wskazują różnice istotne statystycznie wyznaczone testem t-Studenta z wartością $p < 0,05$.

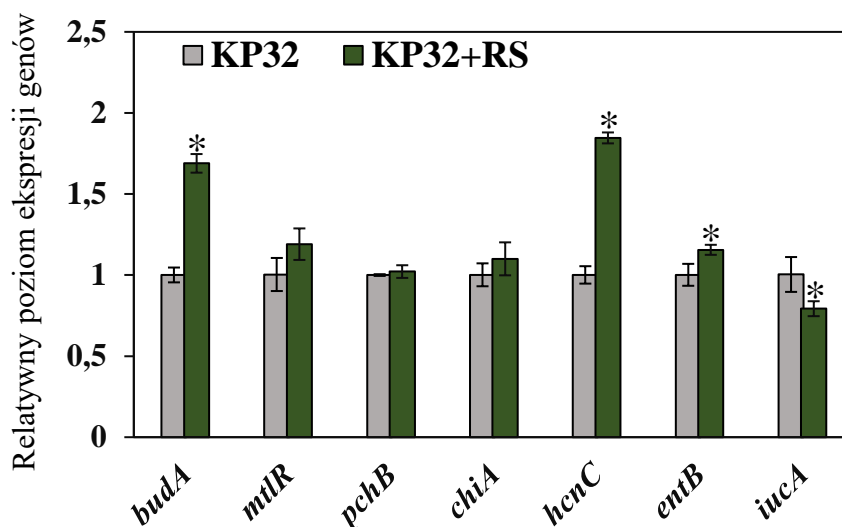


Rysunek 8. Analiza ekspresji genów potencjalnie zaangażowanych w aktywność biologiczną szczepu BRZ63, po 48 godzinach hodowli w obecności filtratów *Colletotrichum dematium*. Krotność zmiany poziomu ekspresji genów oceniano metodą RT-qPCR, zgodnie z metodą $2^{-\Delta\Delta CT}$; *wskazują różnice istotne statystycznie wyznaczone testem t-Studenta z wartością $p < 0,05$.

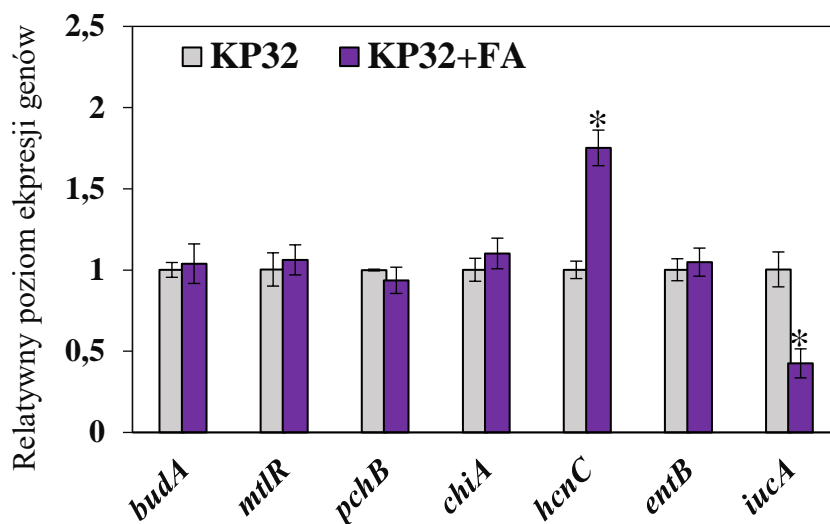


Rysunek 9. Analiza ekspresji genów potencjalnie zaangażowanych w aktywność biologiczną szczepu BRZ63, po 48 godzinach hodowli w obecności filtratów *Sclerotinia sclerotiorum*. Krotność zmiany poziomu ekspresji genów oceniano metodą RT-qPCR, zgodnie z metodą $2^{-\Delta\Delta CT}$; *wskazują różnice istotne statystycznie wyznaczone testem t-Studenta z wartością $p < 0,05$.

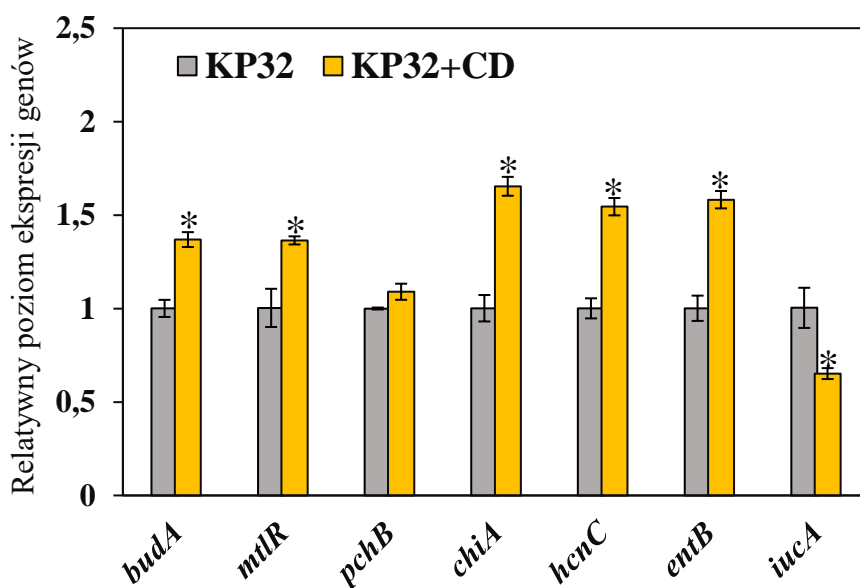
Istotne różnice w poziomie ekspresji genów potencjalnie zaangażowanych w mechanizmy biokontroli u szczepu KP32, w odpowiedzi na badane fitopatogeny, obserwowano po 96 godzinach traktowania hodowli bakteryjnych filtratami po hodowli grzybów. Zaobserwowano, że badane fitopatogeny różnie wpływały na ekspresję genów determinujących aktywność biologiczną KP32 (Rysunki 10-13). Stwierdzono podwyższony poziom ekspresji genów związanych z biosyntezą acetoiny (*budA*), syntazy cyjanowodoru (*hcnC*), chitynazy (*chiA*), dehydrogenazy mannitolu (*mtlR*) i dwufunkcyjnej liazy izochoryzmatu (*entB*). Poziomy ekspresji genów *budA* i *hcnC* były prawie 2-krotnie wyższe w stosunku do kontroli, po ekspozycji szczepu KP32 na filtrat *R. solani* (Rysunek 10). Najwyższą ekspresję genu *budA* i *hcnC* obserwowano dla hodowli KP32 inokulowanej filtratem *S. sclerotiorum* (Rysunek 13). Z kolei, w komórkach KP32 traktowanych filtratami grzybów *C. dematium* lub *S. sclerotiorum*, poziom ekspresji genu *chiA* był odpowiednio 1,5- i 1,65-krotnie wyższy, niż w próbach kontrolnych (Rysunek 12, Rysunek 13). W obecności filtratów *R. solani*, *C. dematium* lub *S. sclerotiorum* obserwowano natomiast zwiększoną ekspresję genu *entB*. Gen *iucA* kodujący syntazę aerobaktyny ulegał niższej ekspresji, gdy do hodowli szczepu KP32 dodawano filtry badanych grzybów (Rysunek 10, Rysunek 12, Rysunek 13).



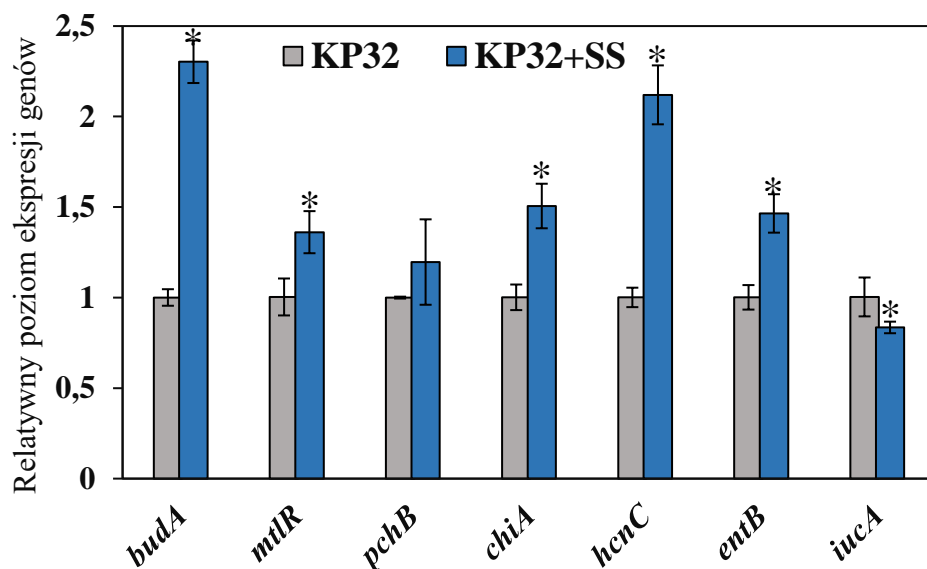
Rysunek 10. Analiza ekspresji genów potencjalnie zaangażowanych w aktywność biologiczną szczepu KP32, po 96 godzinach hodowli w obecności filtratów *Rhizoctonia solani*. Krotność zmiany poziomu ekspresji genów oceniano metodą RT-qPCR, zgodnie z metodą $2^{-\Delta\Delta CT}$; *wskazują różnice istotne statystycznie wyznaczone testem t-Studenta z wartością $p < 0,05$.



Rysunek 11. Analiza ekspresji genów potencjalnie zaangażowanych w aktywność biologiczną szczepu KP32, po 96 godzinach hodowli w obecności filtratów *Fusarium avenaceum*. Krotność zmiany poziomu ekspresji genów oceniano metodą RT-qPCR, zgodnie z metodą $2^{-\Delta\Delta CT}$; *wskazują różnice istotne statystycznie wyznaczone testem t-Studenta z wartością $p < 0,05$.

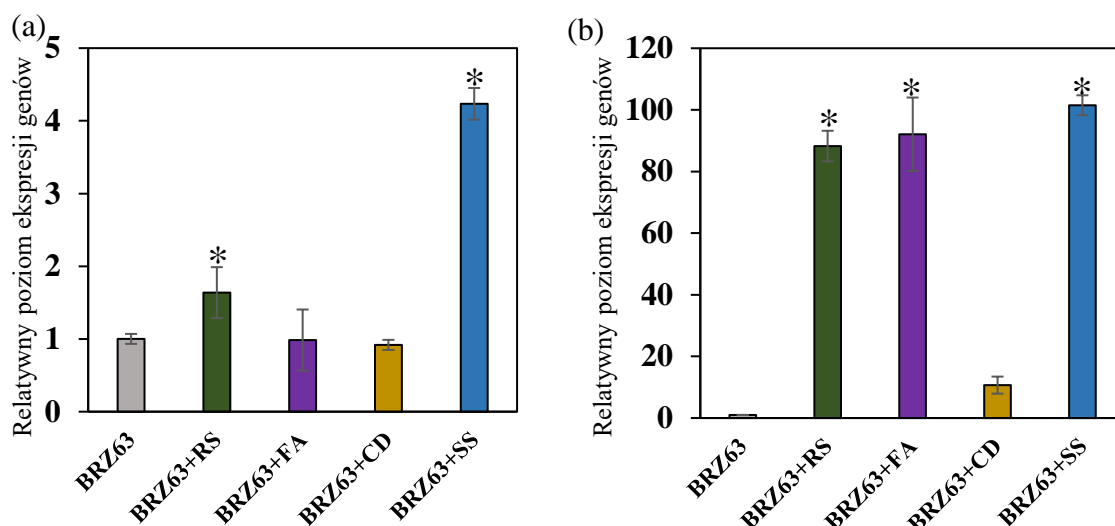


Rysunek 12. Analiza ekspresji genów potencjalnie zaangażowanych w aktywność biologiczną szczepu KP32, po 96 godzinach hodowli w obecności filtratów *Colletotrichum dematium*. Krotność zmiany poziomu ekspresji genów oceniano metodą RT-qPCR, zgodnie z metodą $2^{-\Delta\Delta CT}$; *wskazują różnice istotne statystycznie wyznaczone testem t-Studenta z wartością $p < 0,05$.

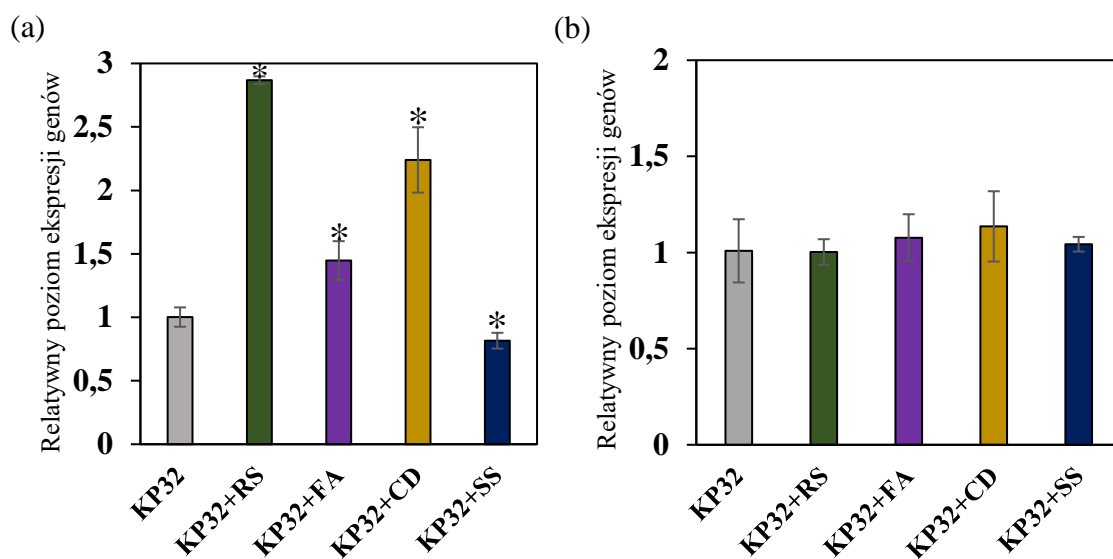


Rysunek 13. Analiza ekspresji genów potencjalnie zaangażowanych w aktywność biologiczną szczepu KP32, po 96 godzinach hodowli w obecności filtratów *Sclerotinia sclerotiorum*. Krotność zmiany poziomu ekspresji genów oceniano metodą RT-qPCR, zgodnie z metodą $2^{-\Delta\Delta CT}$; *wskazują różnice istotne statystycznie wyznaczone testem t-Studenta z wartością $p < 0,05$.

Badania wpływu patogenów grzybowych na ekspresję genów kodujących enzymy antyoksydacyjne u szczepu BRZ63 wykazały znaczący wzrost poziomu ekspresji genu dysmutazy ponadtlenkowej (*sodB*) (ponad 80-krotny wzrost w obecności filtratów *R. solani* i *F. avenaceum* oraz 100-krotny wzrost w obecności filtratów *S. sclerotiorum*) (Rysunek 14b). Ekspozycja badanego szczepu na obecność filtratów *R. solani* i *S. sclerotiorum* wpływała także na podwyższenie poziomu ekspresji genu katalazy (*katB*), odpowiednio 1,6- i 4,2-krotnie w odniesieniu do kontroli (Rysunek 14a). W przypadku szczepu KP32 nie obserwowano wpływu obecności żadnego z patogenów na ekspresję genu *sodB*, z kolei poziom ekspresji genu *katG* wzrastał 2-krotnie po ekspozycji tego szczepu na filtry *R. solani* i *C. dematium* (Rysunek 15a i Rysunek 15b).



Rysunek 14. Analiza ekspresji genów *katB* (a) i *sodB* (b), kodujących enzymy antyoksydacyjne u szczepu BRZ63, po 48 godzinach hodowli w obecności filtratów *Rhizoctonia solani* (RS), *Fusarium avenaceum* (FA), *Colletotrichum dematium* (CD) lub *Sclerotinia sclerotiorum* (SS). Krotność zmiany poziomu ekspresji genów oceniano metodą RT-qPCR, zgodnie z metodą $2^{-\Delta\Delta CT}$; *wskazują różnice istotne statystycznie wyznaczone testem t-Studenta z wartością $p < 0,05$.



Rysunek 15. Analiza ekspresji genów *katG* (a) i *sodB* (b), kodujących enzymy antyoksydacyjne u szczepu KP32, po 96 godzinach hodowli w obecności filtratów *Rhizoctonia solani* (RS), *Fusarium avenaceum* (FA), *Colletotrichum dematium* (CD) lub *Sclerotinia sclerotiorum* (SS). Krotność zmiany poziomu ekspresji genów oceniano metodą RT-qPCR, zgodnie z metodą $2^{-\Delta\Delta CT}$; *wskazują różnice istotne statystycznie wyznaczone testem t-Studenta z wartością $p < 0,05$.

Wyniki przedstawione w rozdziale 6.5., uzyskane dla szczepu KP32, zostały opublikowane w pracy Chlebek i in. (2022); zamieszczonej w rozdziale A2 niniejszej pracy.

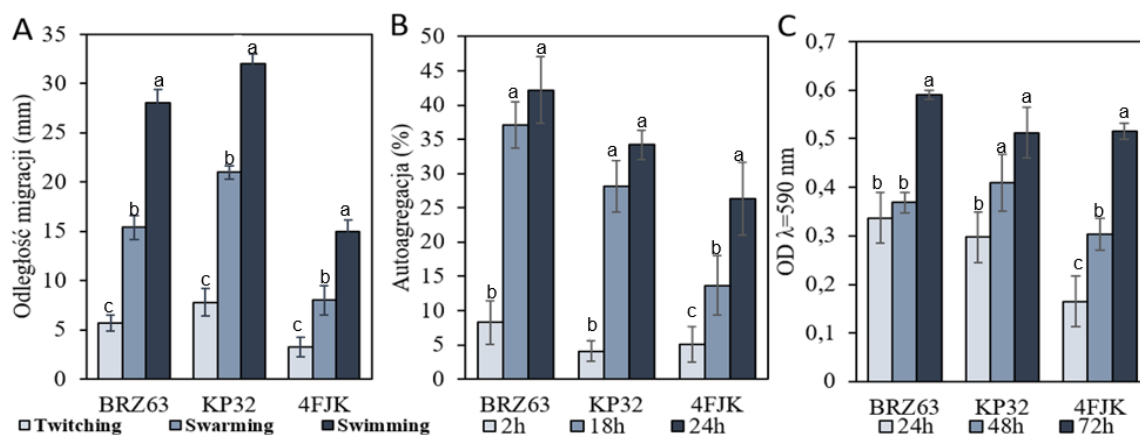
6.6. Biochemiczna charakterystyka badanych szczepów bakterii pod kątem cech niezbędnych w procesie kolonizacji roślin

Kolejny etap pracy obejmował identyfikację cech niezbędnych do kolonizacji roślin u szczepów BRZ63 i KP32. Jako szczep kontrolny zastosowano endofityczny szczep *E. asburiae* 4FJK. Oceniano zdolność badanych szczepów do ruchu, autoagregacji i tworzenia biofilmu, produkcji EPSs, enzymów antyoksydacyjnych i AHL.

Zarówno szczep BRZ63, jak i KP32 wykazywały zdolność do ruchu rozpełzliwego (ang. *swarming*), pływającego (ang. *swimming*) oraz drgającego (ang. *twitching*) i charakteryzowały się większą ruchliwością niż szczep kontrolny (Rysunek 16a).

Ważną cechą szczepów, z punktu widzenia efektywnej kolonizacji roślinnego gospodarza, jest ich zdolność do autoagregacji i tworzenia biofilmu. Przeprowadzone badania wykazały, że agregacja szczepów BRZ63 i KP32 była zależna od czasu inkubacji (Rysunek 16b). Po 2 godzinach wskaźnik autoagregacji wykazany dla szczepu BRZ63 wynosił $8,29 \pm 3,20\%$, natomiast dla szczepu KP32 $4,27 \pm 1,50\%$. Wydłużenie czasu inkubacji do 24 godzin spowodowało znaczny wzrost autoagregacji do $42,21 \pm 3,70\%$ i $34,20 \pm 0,09\%$, odpowiednio u szczepu BRZ63 i KP32. Dla porównania zdolność do autoagregacji określona dla szczepu kontrolnego po 24 godzinach wynosiła $26,00 \pm 4,30\%$ (Rysunek 16b). Zdolność szczepów BRZ63 i KP32 do tworzenia biofilmu oceniano za pomocą metody z CV. Uzyskane wyniki wykazały, że badane szczepy tworzyły biofilm już po 24 godzinach inkubacji. Wydłużenie inkubacji do 72 godzin, w tych samych warunkach, skutkowało powstaniem znacznie silniejszego biofilmu (Rysunek 16c).

Szczepy BRZ63 i KP32 wykazywały także zdolność do produkcji EPSs, o czym świadczyła obecność gładkich, czarnych kolonii o śluzowatej i błyszczącej powierzchni na podłożu CRA, a także wykazywały aktywność CAT i SOD. Szczep BRZ63 wykazywał dodatkowo aktywność oksydazy. Przeprowadzone badania potwierdziły także zdolność szczepu KP32 do produkcji AHL (Tabela 17). Jak wykazały badania, oba szczepy wzrastały w obecności szerokiego spektrum związków organicznych, wykorzystując je jako jedyne źródła węgla i energii (Tabela 17).



Rysunek 16. Zdolność do: ruchu (A), autoagregacji (B), tworzenia biofilmu (C) badanych szczepów *P. fluorescens* BRZ63, *S. quinivorans* KP32 oraz szczepu kontrolnego *E. asburiae* 4FJK. Zdolność autoagregacji badanych szczepów wyrażona została jako procent zagregowanych komórek po 2, 18 i 24 godzinach inkubacji. Tworzenie biofilmu oceniano przez okres 72 godzin, stosując metodę fioletu krystalicznego (CV). Słupki błędów przedstawiają średnią \pm odchylenia standardowe trzech niezależnych powtórzeń dla każdego traktowania. a, b, c- różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$) według testu t-Studenta.

Tabela 17. Cechy warunkujące efektywną kolonizację roślin u *P. fluorescens* BRZ63, *S. quinivorans* KP32 oraz szczepu kontrolnego *E. asburiae* 4FJK

Cecha	Szczep BRZ63	Szczep KP32	Szczep 4FJK
Produkcja egzopolisacharydów	+	+	+
Aktywność katalazy	+	+	+
Aktywność dysmutazy nadtlenkowej	+	+	+
Aktywność oksydazy	+	-	-
Produkcja AHL	-	+	-
Zdolność asymilacji danego substratu			
glukoza	+	+++++	+++++
arabinoza	+	++	-
ramnoza	++++	-	-
mannoza	+++	++++	+++
trehaloza	+++	+++	+++
kwas bursztynowy	+++	+++	++
kwas 4-hydroksyfenylooctowy	+	++	+
kwas fumarowy	+	++	++
kwas benzoesowy	++	+++	+++
mannitol	+	++	+
kwas cytrynowy	++	++	++
kwas p-kumarowy	+	+	++
kwas jabłkowy	+	+	+

+ - pozytywna reakcja, - - negatywna reakcja

Dodatkowo, zbadano również wpływ fitopatogenów na aktywność enzymów antyoksydacyjnych, w tym SOD i CAT u badanych szczepów. Zaobserwowano, że aktywność obu badanych enzymów była podwyższona w większości badanych prób u szczepu BRZ63 traktowanego fitopatogenami, w porównaniu do kontroli, natomiast w przypadku szczepu KP32 odnotowano jedynie podwyższenie aktywności CAT w próbach traktowanych fitopatogenami, w porównaniu do kontroli (Tabela 18).

Tabela 18. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych hodowli bakteryjnych BRZ63 i KP32 eksponowanych na filtry grzybowe.

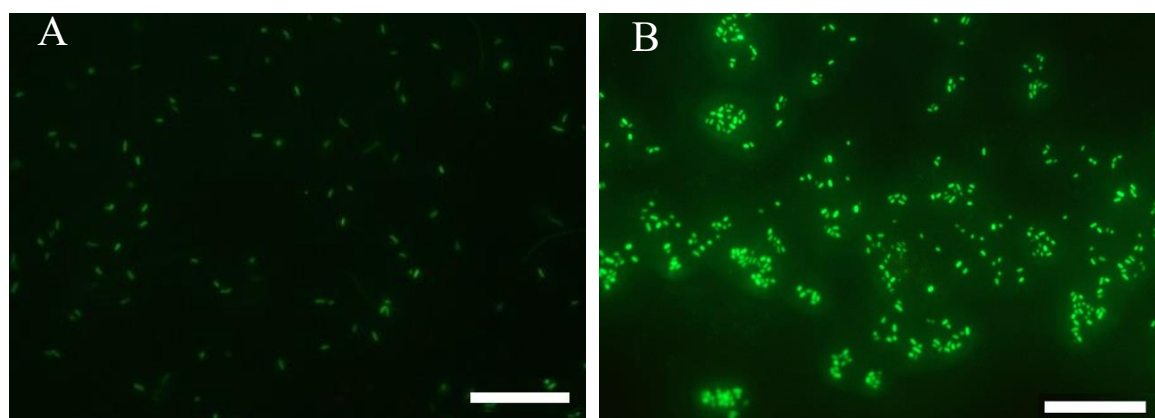
Aktywność enzymatyczna	BRZ63	BRZ63+RS	BRZ63+FA	BRZ63+CD	BRZ63+SS
Katalaza (U·mg ⁻¹ białka)	1,12 ± 0,25c	4,49 ± 0,07a	4,05 ± 0,41a	2,42 ± 0,21b	4,79 ± 0,14a
Dysmutaza ponadtlenkowa (U·mg ⁻¹ białka)	1,29 ± 0,06c	2,53 ± 0,09a	0,87 ± 0,08d	1,6 ± 0,09b	1,52 ± 0,04b
Aktywność enzymatyczna	KP32	KP32+RS	KP32+FA	KP32+CD	KP32+SS
Katalaza (U·mg ⁻¹ białka)	2,84 ± 0,25c	8,49 ± 0,07a	4,05 ± 0,51b	4,89 ± 0,10b	2,47 ± 0,14d
Dysmutaza ponadtlenkowa (U·mg ⁻¹ białka)	0,43 ± 0,06b	0,32 ± 0,09b	0,60 ± 0,08a	0,32 ± 0,11b	0,24 ± 0,02c

a, b, c—istotne statystycznie różnice

Wyniki przedstawione w rozdziale 6.6. uzyskane dla szczepu BRZ63 i KP32 zostały opublikowane odpowiednio w pracy Chlebek i in. (2020) i w pracy Chlebek i in. (2022); zamieszczonych w rozdziale A1 i A2 niniejszej pracy.

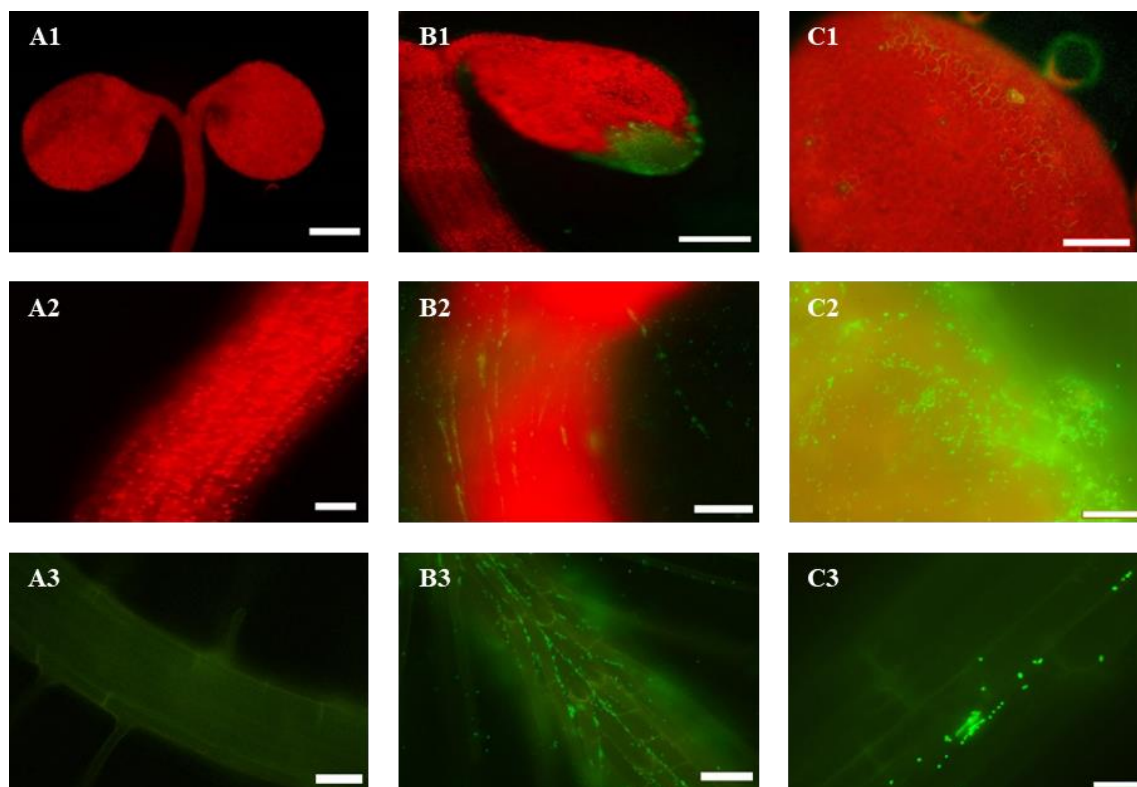
6.7. Zdolność badanych szczepów bakterii do kolonizacji wewnętrznych tkanek roślin

Badania nad kolonizacją roślin przez szczep BRZ63 i KP32 rozpoczęto od ich wyznakowania białkiem EGFP. W tym celu plazmid pMP4566 z wklonowanym genem *egfp* kodującym białko zielonej fluorescencji oraz genem warunkującym oporność transformantów na tetracyklinę wprowadzono do elektrokompetentnych komórek szczepu BRZ63 oraz KP32. Uzyskane transformanty obserwowano w mikroskopie fluorescencyjnym Nikon ECLIPSE-Ni-U w powiększeniu 100x (Rysunek 17). Analiza mikroskopowa preparatów potwierdziła, że komórki szczepu BRZ63^{EGFP} mają wydłużony kształt i przyjmują formę pałeczek, pojedynczych lub układających się w krótkie łańcuszki, natomiast komórki szczepu KP32^{EGFP} przyjmują formę drobnych, pojedynczych pałeczek.

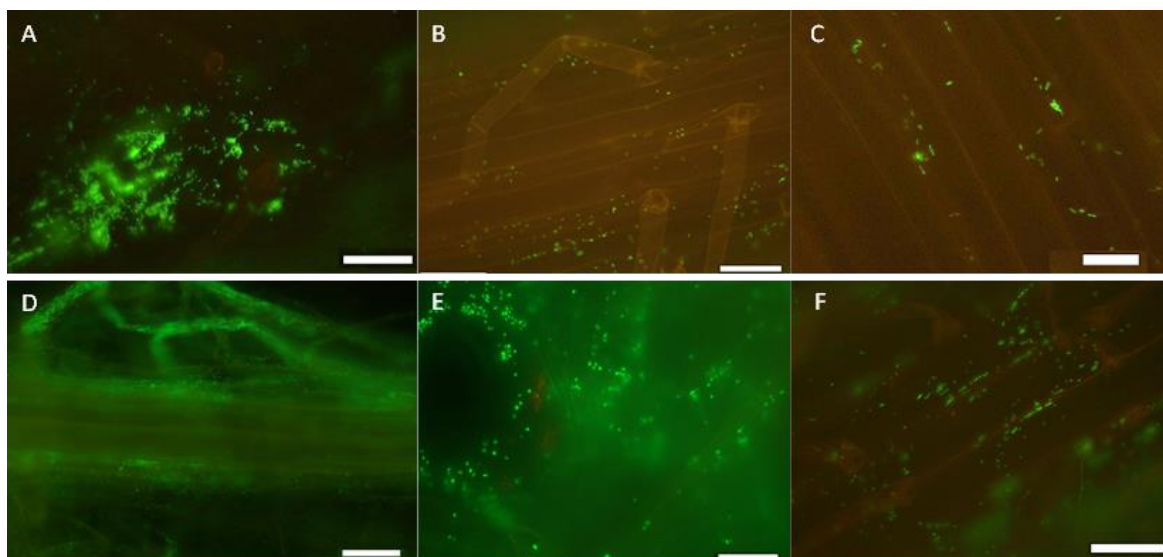


Rysunek 17. Komórki *P. fluorescens* BRZ63 (A) oraz *S. quinivorans* KP32 (B) wyznakowane białkiem EGFP. Obserwacja w mikroskopie fluorescencyjnym Nikon ECLIPSE-Ni-U. Skala 20 µm. Powiększenie 100x. Wszystkie zdjęcia zostały przetworzone przy użyciu ImageJ.

Aby zweryfikować, czy badane szczepy są zdolne do kolonizowania tkanek roślinnych i ich zasiedlania, wysterylizowane powierzchniowo nasiona modelowej rośliny *A. thaliana* Col-0 oraz *B. napus* L. inokulowano szczepami BRZ63^{EGFP} oraz KP32^{EGFP}. Po 7 dniach hodowli, w mikroskopie fluorescencyjnym Nikon ECLIPSE-Ni-U, odnotowano fluorescencję wyznakowanej populacji szczepu BRZ63^{EGFP} oraz KP32^{EGFP} zarówno na powierzchni, jak i wewnątrz inokulowanych roślin (Rysunki 18 i 19). Bakterie obserwowano głównie na i w korzeniach. Dodatkowo, szczep KP32^{EGFP} wykazywał zdolność do wnikania do wnętrza roślin przez aparaty szparkowe (Rysunek 18C1).



Rysunek 18. Kolonizacja *A. thaliana* Col-0 przez wyznakowane genem *egfp* szczepy BRZ63 i KP32. Roślina kontrolna (nieinokulowana bakteriami) (A1-3) (skala: A1 = 200 μm , A2 = 100 μm , A3 = 40 μm). Roślina po inokulacji szczepem BRZ63^{EGFP} (B1-B3) (skala: B1 = 200 μm , B2 = 50 μm , B3 = 20 μm). Roślina po inokulacji szczepem KP32^{EGFP} (C1-C3) (skala: C1 = 20 μm , C2 = 10 μm , C3 = 10 μm). Rośliny obserwowano za pomocą mikroskopu stereoskopowego Nikon ECLIPSE-Ni-U.



Rysunek 19. Kolonizacja *Brassica napus* L. przez wyznakowany EGFP szczep BRZ63. Szczep BRZ63^{EGFP} na powierzchni korzeni (A, B) (skala: A=50 μ m, B=50 μ m), a także wewnątrz korzeni (C) (skala: C=20 μ m). Kolonizacja *Brassica napus* L. przez wyznakowany EGFP szczep KP32. Szczep KP32^{EGFP} na powierzchni korzeni (D, E) (skala: D=100 μ m, E=20 μ m), a także wewnątrz korzeni (F) (skala: F=50 μ m). Obserwacja w ciemnym polu, w mikroskopie fluorescencyjnym Nikon ECLIPSE-Ni-U.

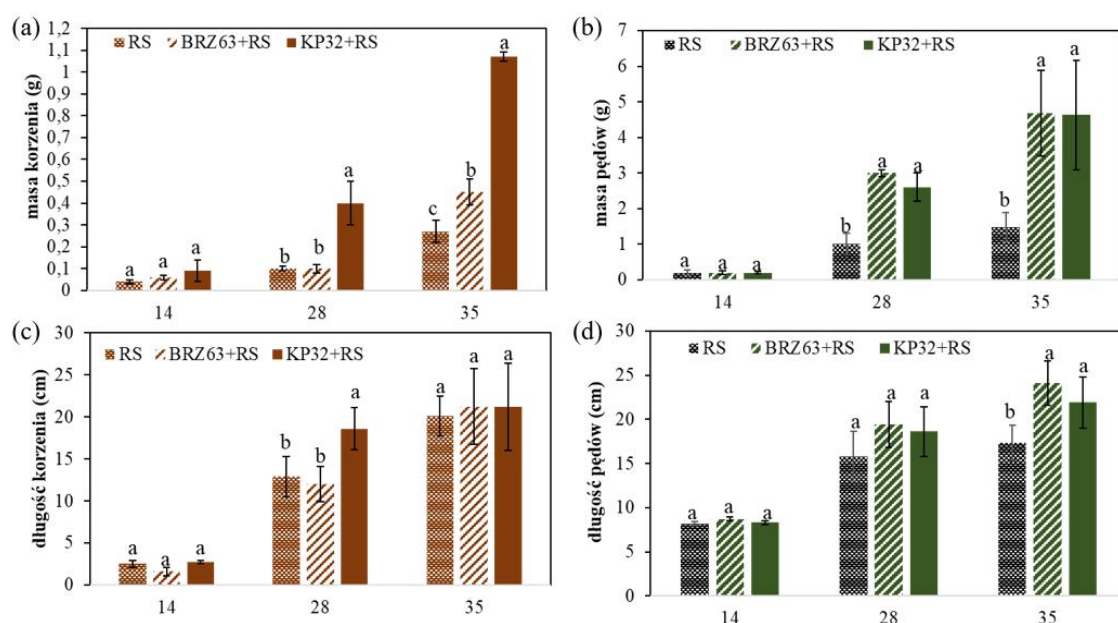
Dodatkowo, w celu potwierdzenia obecności wyznakowanych szczepów BRZ63^{EGFP} i KP32^{EGFP} wewnątrz roślin *A. thaliana* Col-0 oraz *B. napus* L., przeprowadzono ich izolację z tkanek inokulowanych roślin. Obecność kolonii wyrosłych na podłożu selekcyjnym z tetracykliną, emitujących fluorescencję pod wpływem wzbudzenia światłem UV potwierdziła zdolność badanych szczepów do kolonizacji rośliny i endofitycznego stylu życia.

Wyniki badań nad kolonizacją roślin przez szczep BRZ63 zostały opublikowane w pracy Chlebek i in. (2020); zamieszczonej w rozdziale A1 niniejszej pracy.

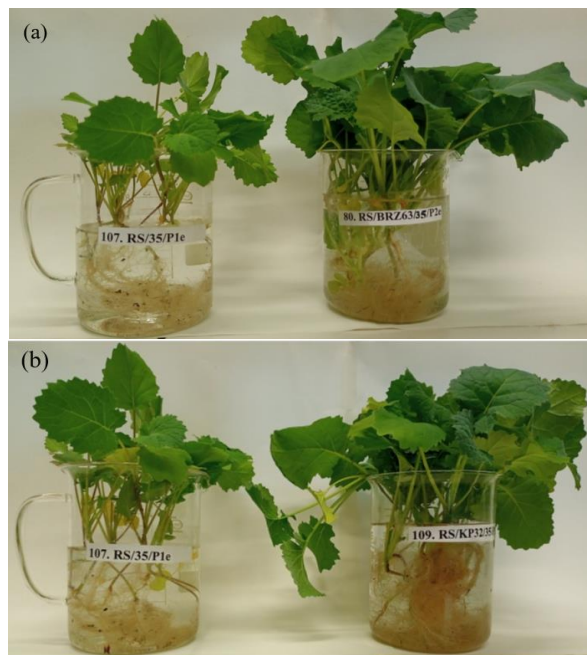
6.8. Ocena wpływu badanych szczepów endofitycznych na wzrost i ochronę rzepaku przed chorobami grzybowymi

Na podstawie przeprowadzonej charakterystyki genetycznej i biochemicznej szczepów BRZ63 i KP32 stwierdzono, iż badane szczepy bakterii endofitycznych są dobrymi kandydatami do zastosowania ich jako aktywnych czynników w biokontroli. Dlatego też, w ostatniej części badań przeprowadzono doświadczenia wazonowe mające na celu zbadanie, w warunkach *in planta*, aktywności biologicznej badanych szczepów w pojedynczych kulturach. Przeprowadzone doświadczenie obejmowało ocenę zdolności badanych szczepów do ochrony rzepaku przed *R. solani*. Wykazano, że oba szczepy BRZ63 i KP32 znosiły negatywny wpływ patogena na wzrost rzepaku. W układach z *R. solani*,

wprowadzenie szczepów BRZ63 oraz KP32, powodowało zwiększenie świeżej masy korzeni o 166,7% i 396,2% odpowiednio u roślin traktowanych szczepem BRZ63 i KP32, w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Odnotowano również znaczny przyrost masy pędu oszacowany na poziomie 316% u roślin inokulowanych szczepem BRZ63 oraz 312,8% u roślin traktowanych szczepem KP32, w porównaniu do roślin kontrolnych. U roślin traktowanych szczepami, po zakończonym eksperymencie stwierdzono również zwiększenie długości pędów roślin, w porównaniu do układów bez bakterii, co przedstawiono na rysunku 20. Ponadto stwierdzono, iż po 35 dniach hodowli, rośliny traktowane badanymi szczepami BRZ63 i KP32 miały lepiej rozwiniętą architekturę korzeni w porównaniu do korzeni roślin nietraktowanych bakteriami (Rysunek 21).

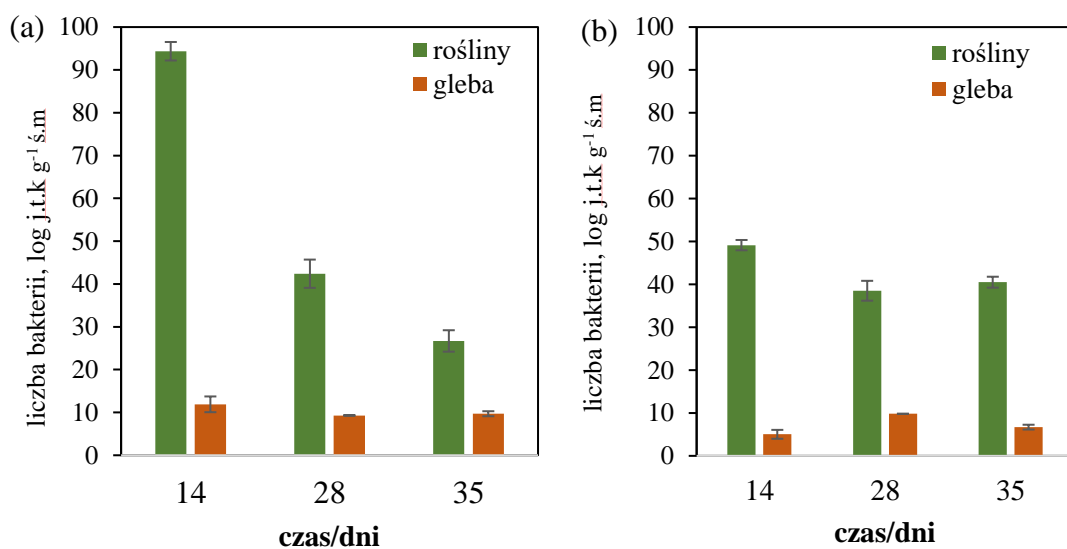


Rysunek 20. Wpływ szczepu BRZ63 i KP32 na wzrost i ochronę rzepaku przed *R. solani* (RS). Wpływ badanych bakterii na masę korzeni i pędów rzepaku po 14, 28 i 35 dniach hodowli (a, b). Wpływ badanych bakterii na długość korzeni i pędów rzepaku po 14, 28 i 35 dniach hodowli (c, d). Różnymi literami oznaczono istotne statystycznie różnice w długości/masie korzeni / pędów roślin (jednoczynnikowa ANOVA, test Tukeya, $p < 0,05$).



Rysunek 21. Wpływ szczepu BRZ63 (a) oraz szczepu KP32 (b) na rozwój i ochronę rzepaku przed *R. solani*, po 35 dniach prowadzenia eksperymentu. RS/35-rośliny hodowane w obecności *R. solani*, RS/BRZ63/35-rośliny inokulowane *R. solani* i szczepem BRZ63, RS/KP32/35-rośliny inokulowane *R. solani* i szczepem KP32.

W trakcie doświadczenia monitorowano również przeżywalność bakterii BRZ63 i KP32 w glebie oraz ich zdolność do kolonizowania i przeżywania w roślinie. Stwierdzono, że oba badane szczepy BRZ63 i KP32 były obecne w glebie i tkankach rzepaku przez cały czas trwania eksperymentu (Rysunek 22).



Rysunek 22. Liczebność komórek szczepu BRZ63 (a) oraz szczepu KP32 (b) w glebie oraz tkankach rzepaku w trakcie trwania doświadczenia.

7. DYSKUSJA WYNIKÓW

Biokontrola jest złożonym procesem polegającym na antagonistycznym oddziaływaniu niektórych bakterii, grzybów bądź produktów ich metabolizmu wobec patogenów, ograniczającym ich występowanie (Köhl i in., 2019). Zastosowanie mikroorganizmów w procesie biokontroli ma na celu zmniejszenie zużycia środków chemicznych, a tym samym ograniczenie ich negatywnego oddziaływania na zdrowie ludzi, zwierząt i środowisko (Yang i in., 2020; Chlebek i in., 2020). Wiele czynników kontroli biologicznej wykazuje specyficzność w stosunku do gatunku żywiciela, rodzaju patogena, czy warunków środowiska (He i in., 2021), dlatego nieustannie poszukuje się nowych BCAs o szerokim zakresie aktywności względem różnych patogenów i szerokim wachlarzu oddziaływań antagonistycznych (Chandra i in., 2020). Dane literaturowe wskazują, iż jako środki kontroli biologicznej zastosowanie znajduje wiele szczepów bakterii z rodzaju *Pseudomonas*, *Serratia* oraz *Bacillus*, izolowanych głównie z gleby lub ryzosfery (Couillerot i in., 2009; Li i in. 2011; Hammoudi i in., 2012; Redondo-Nieto i in., 2013; Neemann i in., 2018; Jiménez i in., 2020). Dobrą alternatywę dla tych mikroorganizmów mogą stanowić mikroorganizmy endofityczne, chroniące gospodarza przed patogenami wewnątrz tkanek roślinnych (Doty i in., 2023). Jednakże wiedza na temat podłoża genetycznego interakcji zachodzących pomiędzy tymi organizmami a fitopatogenami jest nadal ograniczona. Dlatego też, celem niniejszej pracy była charakterystyka dwóch endofitycznych szczepów: *P. fluorescens* BRZ63 oraz *S. quinivorans* KP32, wyizolowanych kolejno z korzeni rzepaku (*Brassica napus* L.) oraz pietruszki (*Petroselinum crispum* L.), pod kątem ich potencjału do zwalczania zróżnicowanych taksonomicznie patogenów grzybowych oraz poznanie molekularnych podstaw tych antagonistycznych oddziaływań. W ramach przeprowadzonych badań, określano zdolność szczepów endofitycznych do hamowania wzrostu wybranych patogenów, kolonizacji tkanek roślinnych oraz promocji wzrostu i ochrony roślin. Przeprowadzone analizy genomów pozwoliły na identyfikację genów warunkujących aktywność biologiczną szczepów, a badania wpływu fitopatogenów na ekspresję tych genów rzuciły światło na możliwe interakcje zachodzące pomiędzy antagonistą a patogenem.

Wiele szczepów z rodzaju *Pseudomonas*, zwłaszcza *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis* i *P. syringe* jest dobrze znanych ze swojej zdolności do stymulowania wzrostu roślin i zwalczania szeregu patogenów (Harting i in., 2021). Na szczególną uwagę zasługują szczepy z gatunku *P. fluorescens*, które stały się obiektem modelowym badań i analiz wtórnego metabolizmu bakterii (Jacob i in., 2020; Guzmán-Guzmán i Santoyo, 2022). Z kolei bakterie z rodzaju *Serratia* to grupa obejmująca gatunki zróżnicowane biologicznie

i ekologicznie, od pożytecznych ważnym gospodarczo roślinom, po gatunki chorobotwórcze, które są szkodliwe dla człowieka (Matilla i in., 2016; Mai i in., 2016). Istotną grupę stanowią entomopatogenne szczepy *Serratia*, znane ze swojej zdolności do infekowania owadów, w tym różnych szkodników (Niu i in., 2022; Vaughan i in., 2022).

Przeprowadzone badania aktywności antagonistycznej endofitycznych szczepów *P. fluorescens* BRZ63 oraz *S. quinivorans* KP32 wykazały ich zróżnicowaną aktywność wobec: *R. solani*, *F. avenaceum*, *C. dematium* i *S. sclerotiorum*, powszechnym roślinnym patogenom przenoszonym przez glebę (Chen i in., 2015; Derbyshire i Denton-Giles, 2016; Drizou i in., 2017). Szczep *P. fluorescens* BRZ63 w różnym stopniu hamował wzrost każdego z patogenów. Aktywność przeciwgrzybową wykazywały zarówno związki wydzielane do podłoża, jak i związki lotne produkowane przez ten szczep, które w największym stopniu hamowały wzrost grzybni *R. solani*. Jak wykazały przeprowadzone analizy filogenetyczne, szczep BRZ63 jest blisko spokrewniony z szeroko opisywanym w literaturze szczepem *P. fluorescens* PICF7 wykazującym aktywność antagonistyczną wobec *V. dahliae* (Martínez-García i in., 2015; Montes-Osuna i in., 2021; Gómez-Lama i in., 2022), a także szczepem *P. protegens* Pf-5 aktywnym wobec *R. solani*, *S. homoeocarpa* i *F. oxysporum* (Loper i in., 2007) oraz szczepami *P. fluorescens* SBW25 i *P. protegens* CHAO chroniącymi groch przed *P. ultimum* (Trippe i in., 2013).

Dane literaturowe wskazują, że niektóre gatunki *Serratia* skutecznie hamują wzrost wielu patogenów (Gkarmiri i in., 2015; Wang i in., 2014), w tym grzybów z rodzaju *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia* i *Verticillium* (Kamensky i in., 2003). Na przykład, szczep *S. plymuthica* IC14 chronił sadzonki ogórka przed *B. cinerea* i *S. sclerotiorum* w warunkach szklarniowych (Vleeschauwer i Höfte, 2007). W badaniu opisanym przez Neupane i in. (2013) endofityczny szczep *S. proteamaculans* S4, wyizolowany z korzeni rzepaku, został użyty jako środek biokontroli przeciwko *V. dahliae* i *R. solani*. W innym badaniu *S. marcescens* wykazywał zdolność do biokontroli *Colletotrichum gloeosporioides*, poprzez hamowanie wzrostu jego grzybni i konidiów (Gutiérrez-Román i in., 2012). W niniejszej pracy, we wszystkich przeprowadzonych testach antagonistycznych wykazano, iż badany szczep *S. quinivorans* KP32, blisko spokrewniony z *S. quinivorans* NCTC11544 i *S. proteamaculans* 336X, które odgrywają kluczową rolę w ochronie pszenicy przed *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Wang i in., 2014), w największym stopniu hamował wzrost *R. solani* indukując jednocześnie makroskopowe zmiany w morfologii grzybni. Zmiany te, obserwowane w testach podwójnej hodowli, mogły wynikać ze zdolności szczepu do wydzielania zewnątrzkomórkowych metabolitów, w tym lotnych związków. Podobne wyniki przedstawili w swojej pracy Dhar-

Purkayastha i in. (2018), którzy w strefie interakcji *S. marcescens* ETR17 z *R. solani* obserwowali, za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej, deformacje, wybrzuszenia i lizę grzybni. Inni badacze, Gkarmiri i in. (2015) udokumentowali natomiast wpływ szczepów *S. proteamaculans* S4 i *S. plymuthica* AS3 na morfologię grzybni *R. solani*, a także dowiedli, iż głównymi mechanizmami zahamowania wzrostu badanego patogena jest produkcja enzymów litycznych, takich jak: chitynazy i proteazy. Opisany w niniejszej pracy szczep *S. quinivorans* KP32 wykazywał także zdolność hamowania wzrostu *C. dematium*, *F. avenaceum* i *S. sclerotiorum*.

Dane literaturowe wskazują, iż zdolność szczepów bakteryjnych do inhibicji zróżnicowanych genetycznie fitopatogenów może być uwarunkowana kombinacją różnych mechanizmów biokontroli (Kumar i in., 2019b). Na przykład badania przeprowadzone przez Dhar-Purkayastha i in. (2018) dowiodły, że aktywność biologiczna *S. marcescens* ETR17 wobec dziewięciu patogenom grzybowym (w tym *Colletotrichum camelliae* i *R. solani*) była związana z produkcją antybiotyków oraz enzymów litycznych.

Jednym z najważniejszych mechanizmów bezpośredniej biokontroli jest produkcja sideroforów, które biorą udział w sekwestracji żelaza, przyczyniając się tym do hamowania wzrostu lub aktywności metabolicznej fitopatogenów (Shanmugaiah i in., 2015). Wiele fitopatogennych grzybów, kolonizując ryzosferę, musi radzić sobie z konkurencją ze strony antagonistycznych bakterii produkujących te związki (Ahmed i in., 2014; Schiessl i in., 2017). Przykładowo, znaczącą rolę w biologicznym zwalczaniu zgorzeli bawełny powodowanej przez *P. ultimum* oraz biokontroli *F. oxysporum* odgrywają siderofory produkowane odpowiednio przez różne szczepy z rodzaju *Pseudomonas* (Vanitha i in., 2014) oraz szczep *Pseudomonas syringae* BAF.1 (Yu i in., 2017). Dodatnią korelację między produkcją sideroforów przez endofityczne szczepy bakterii, a współczynnikiem hamowania wzrostu fitopatogennego grzyba zaobserwowali również Zhao i in. (2018). Wiązanie żelaza przez siderofory produkowane przez mikroorganizmy antagonistyczne przyczynia się również do hamowania wzrostu grzybów z rodzajów *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* oraz *Sclerotinia* (Bigirimana i in., 2002; Sharma i in., 2003; Solanki i in., 2012; Yu i in., 2017; Schmidt i in., 2021). W niniejszych badaniach potwierdzono obecność uwarunkowań genetycznych zaangażowanych w produkcję różnych sideroforów zarówno u szczepu *P. fluorescens* BRZ63, jak i u szczepu *S. quinivorans* KP32. W genomie BRZ63 zidentyfikowano m.in. geny wchodzące w skład klastra *pvd* związanego z produkcją powierdyny oraz gen *tonB*, kodujący białko receptorowe zaangażowane w transport kompleksu siderofor-żelazo do peryplazmy. Z kolei u szczepu KP32 na uwagę zasługuje obecność genów wchodzących w skład klastra *ent* związanego z produkcją enterobaktyny

i klastra *iuc*, związanego z produkcją aerobaktyny oraz obecność receptora sideroforów *iucA*. Zdolność badanych szczepów do produkcji sideroforów potwierdziły również przeprowadzone testy biochemiczne. Sideroforem zaangażowanym w aktywność biologiczną u szczepu *S. quinivorans* KP32 może być prawdopodobnie enterobaktyna, o czym świadczy podwyższony poziom ekspresji genu *entB* w odpowiedzi na traktowanie tego szczepu filtratami grzybowymi pozyskanymi z hodowli *R. solani*, *C. dematium* lub *S. sclerotiorum*. Sideroforem zaangażowanym w aktywność biologiczną szczepu *P. fluorescens* BRZ63 jest najprawdopodobniej piowerdyna. W tym przypadku podwyższony poziom ekspresji genu *pvdL* zaobserwowano w obecności filtratów każdego z badanych grzybów. Jednak udział piowerdyny w biokontroli nadal budzi kontrowersje. Maldonado-Gonzalez i in. (2015) stwierdzili, iż związek ten, produkowany przez *P. fluorescens* PICF7 nie był kluczowym czynnikiem warunkującym skuteczną biokontrolę i kolonizację. Badania Deveau i in. (2016) wykazały natomiast, że za antagonistyczne oddziaływanie szczepu *P. fluorescens* BBC6R8 przeciwko *Laccaria bicolor* S238N i *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 odpowiada właśnie piowerdyna. Również badania przeprowadzone przez Dutta i in. (2020) wykazały znaczącą rolę tego sideroforu w aktywności przeciwgrzybowej szczepu *P. fluorescens* NBC275 wobec *B. cinerea*. W badaniach tych udowodniono, iż mutanty Tn19-60 (*pvdI*) i Tn37-16 (*pvdD*) z defektem w biosyntezie piowerdyny, utraciły zdolność biokontroli. Z kolei, Singh i in. (2019) wykazali, że mutant *P. putida* z nadprodukcją sideroforów był bardziej skuteczny w hamowaniu patogennego *F. oxysporum*. Co ciekawe, badania te wykazały również, iż mutacja w obrębie genu *gacS*, kodującego białko wchodzące w skład systemu regulującego produkcję metabolitów wtórnych u wielu bakterii Gram-ujemnych, powodowała brak zdolności szczepu do hamowania wzrostu grzybów, a jego ruchliwość i produkcja sideroforów była zmniejszona w porównaniu ze szczepem dzikim. Rolę systemu regulacyjnego GacS/GacA w regulacji cech biokontroli umożliwiły badania mutantów, które jednoznacznie potwierdziły, iż mutacje w *gacS* lub *gacA* upośledzają funkcje związane z biokontrolą u większości szczepów z rodzaju *Pseudomonas* (Yan i in., 2018). Na udział układu GacS/GacA w regulacji szlaków metabolicznych związanych z biosyntezą metabolitów wtórnych u badanego szczepu BRZ63 może z kolei wskazywać wzrost poziomu ekspresji genów tego układu regulatorowego podczas traktowania komórek szczepu filtratami *R. solani*, *S. sclerotiorum* i *C. dematium* towarzyszący zwiększonej ekspresji genów *vsmA*, *pvdL* i *nrpS*.

Wysoki odsetek genów w genomach badanych szczepów związany z transportem i metabolizmem aminokwasów oraz jonów nieorganicznych może sugerować zdolność

szczepów BRZ63 oraz KP32 do skutecznego konkurowania z innymi mikroorganizmami w ryzosferze/endosferze. Ponadto na uwagę zasługuje obecność w genomach badanych szczepów szlaków biosyntezy aminokwasów aromatycznych, które w dużej mierze przyczyniają się do produkcji szerokiego spektrum związków organicznych, w tym sideroforów, antybiotyków i innych metabolitów wtórnych (Nelkner i in., 2019). Co więcej, wiele genów obecnych w genomie szczepu BRZ63 i KP32 związana jest z biosyntezą metabolitów wtórnych, w tym z metabolizmem terpenoidów i poliketydów, które reprezentują bioaktywne związki o szerokim zakresie aktywności biologicznej, przyczyniające się m.in. do inhibicji różnych patogenów, w tym grzybów (Soenes i Imperial., 2020). Co ciekawe, w genomie KP32 potwierdzono także obecność 35 genów zaangażowanych w bakteryjne systemy wydzielnicze. Wśród nich znaleziono szlaki sekrecji Sec i Tat oraz większość systemów sekrecyjnych typu II (T2SS) i typu VI (T6SS), podobnie jak w przypadku szczepu BRZ63. Warto podkreślić, że obecność więcej niż jednego typu systemu wydzielniczego w genomie świadczy o tym, że badane szczepy BRZ63 i KP32 posiadają wydajne systemy translokacji wydzielanych związków przez wewnętrzną i zewnętrzną błonę komórkową. T2SS i T6SS są dobrze konserwowane u wielu gatunków bakterii Gram-ujemnych. T2SS transportuje z peryplazmy do środowiska pozakomórkowego. białka, które pełnią szereg funkcji biologicznych m.in. enzymy takie jak: lipazy, proteazy, fosfatazy i kilku białek przetwarzających węglowodany. Co ciekawe, Trunk i in. (2018) opisali dostarczanie przeciwgrzybowych białek efektorowych za pośrednictwem układu wydzielniczego typu T6SS między *S. marcescens* a komórkami grzybów.

Metabolity wtórne, takie jak powierzchniowo czynne cykliczne lipopeptydy, odgrywają ważną rolę w oddziaływaniu antagonistycznych bakterii wobec patogenów roślin (Vreize i in., 2020). CLPs syntetyzowane są przez modułowe wielofunkcyjne enzymy zwane syntetazami nierybosomalnych peptydów. W licznych badaniach potwierdzono, iż NRPSs zaangażowane są w produkcję wielu związków przeciwdrobnoustrojowych, a obecność genów warunkujących ich produkcję wykazano głównie w genomach bakterii z rodzaju *Pseudomonas* i *Bacillus* (Rokni-Zadeh i in., 2011). Dane literaturowe wskazują, iż szczepy z gatunku *P. fluorescens* produkują CLPs należące do grupy wiskozyn, takie jak: wiskozyna czy wiskozynamid, które mogą pełnić istotną rolę w tworzeniu biofilmu, ruchliwości bakterii, antagonizmie wobec bakterii, grzybów i pierwotniaków (Raaijmakers i in., 2006, 2010). Przykładowo, wiskozyna produkowana przez *P. fluorescens* SBW25 odgrywała kluczową rolę w ruchliwości, tworzeniu biofilmu i antagonizmie tego szczepu wobec *P. infestans* oraz *R. solani* (Bruijn i in., 2007). Obecność genów związanych z produkcją

wiskozyzny w genomach endofitycznych bakterii z rodzaju *Pseudomonas* potwierdziły także badania prowadzone przez Doty i in. (2023). Związek ten okazał się skuteczny przeciwko *Aspergillus fumigatus*, *Batrachochytrium dendrobatidis*, *R. solani* i *Pythium myriotylum* (Doty i in., 2023). Roli wiskozyzny w aktywności biologicznej trzech szczepów z gatunku *P. chlororaphis* przeciwko *Phytophthora palmivora* dowiodły także badania przeprowadzone przez Acebo-Guerrero i in. (2015). W niniejszych badaniach, geny kodujące enzymy odpowiedzialne za produkcję wiskozyzny zidentyfikowano w genomie *P. fluorescens* BRZ63. Ponadto analiza ekspresji genu *vsmA* ujawniła istotne zwiększenie poziomu jego ekspresji w obecności filtratów wszystkich badanych patogenów, co może wskazywać na udział tego związku w hamowaniu ich wzrostu. W komórkach szczepu *P. fluorescens* BRZ63, w obecności filtratów pozyskanych z hodowli *C. dematium* i *S. sclerotiorum*, ujawniono również nadekspresję genu *phzF*, kodującego enzym katalizujący początkowy etap konwersji kwasu trans-2,3-dihydro-3-hydroksyantranilowego do kwasu fenazy-1-karboksyłowego. Dane literaturowe wskazują, iż fenazyny, produkowane głównie przez szczepy z gatunku *P. fluorescens*, wykazują szerokie spektrum działania wobec grzybów i patogenów bakteryjnych, i pełnią istotną rolę w biokontroli fitopatogenów (Serafim i in., 2023). Na przykład, rolę fenazyny w hamowaniu wzrostu *S. sclerotiorum* przez szczep *P. chlororaphis* 30-84H udowodniono w badaniach Yu i in. (2018). W innych badaniach zaobserwowano, iż bakterie z rodzaju *Pseudomonas* niosące w swoich genomach geny związane z produkcją fenazyny, zawierają również klastry genów kodujących NRPSs zaangażowane w biosyntezę CLPs. Postawiono hipotezę, że biosurfaktanty, takie jak ramnolipidy lub cykliczne lipopeptydy, wytwarzane przez związane z roślinami *Pseudomonas* spp., mogą zwiększać biodostępność i bioaktywność fenazyny. Tworząc cienką warstwę na strzępkach lub mikrosklerocjach, biosurfaktanty mogą zwiększać rozuszczalność hydrofobowej fenazyny w bezpośrednim sąsiedztwie komórek grzybów. Ponadto zwiększając przepuszczalność ścian komórkowych i błon, biosurfaktanty mogą ułatwiać wnikanie antybiotyków fenazyńowych do wnętrza komórek (D'aes i in., 2011). Może to sugerować, iż działanie badanego szczepu *P. fluorescens* BRZ63 wobec *C. dematium* i *S. sclerotiorum* może opierać się na synergistycznym działaniu fenazyny i CLPs.

Przypuszcza się, że hydroliza ściany komórkowej grzybów chorobotwórczych jest wynikiem skoordynowanego działania kompleksu enzymów litycznych produkowanych przez mikroorganizmy endofityczne (Abo-Elyousr i in., 2021). Przykładowo, produkcja chitynazy, β -1,3-glukanazy i proteazy przez cztery szczepy z rodzaju *Bacillus* była ważnym mechanizmem odpowiedzialnym za hamowanie wzrostu *R. solani* (Solanki i in., 2012). Podobnie szczep *B. subtilis* 330-2 wyizolowany z nasion rzepaku, który wytwarzał β -1,3-

glukanazę, β -1,4-glukanazę i proteazy, silnie hamował wzrost grzybów z gatunku *A. alternata*, *B. cinerea*, *C. heterostrophus*, *F. oxysporum*, *R. solani* AG1-IA i *Nigrospora oryzae* (Ahmad i in., 2017), a szczep *S. plymuthica* IC14 wykazywał działanie przeciwgrzybowe wobec *S. sclerotiorum* i *B. cinerea* poprzez produkcję proteaz (Compant i in., 2010). U endofitycznego szczepu *P. putida* ASU15, wykazującego aktywność antagonistyczną wobec *Uromyces appendiculatus*, stwierdzono natomiast wysoką aktywność chitynaz, proteaz oraz lipaz, a u szczepu *S. marcescens* B2 i *S. proteamaculans* 568 działanie antagonistyczne skorelowane było z wysoką aktywnością chitynaz (Someya i in., 2005; Purushotham i in., 2012). Produkcja proteaz, amylaz i chitynaz wykazana u badanych szczepów *P. fluorescens* BRZ63 oraz *S. quinivornas* KP32, była prawdopodobnie również jednym z czynników zaangażowanych w ich aktywność biologiczną. Może na to wskazywać podwyższenie poziomu ekspresji genu *nagA*, kodującego deacetylazę chityny u szczepu *P. fluorescens* BRZ63 w obecności filtratów *S. sclerotiorum* oraz podwyższony poziom ekspresji genu chitynazy (*chiA*) u szczepu KP32, w obecności filtratów *C. dematium* i *S. sclerotiorum*. Warto zauważyć, iż enzymy lityczne produkowane przez endofity mogą także pomagać w kolonizacji wewnątrzkomórkowej, rozwijać endofityzm (Ben-Slama i in., 2019) oraz przyczyniać się do indukcji ISR (Kumar i in., 2019b).

Zdolność BCAs do produkcji lotnych związków uznaje się za jeden z głównych mechanizmów biokontroli (Delgado i in., 2021; Zhong i in., 2021). Dane literaturowe dowodzą, że bakterie z rodzaju *Serratia* oraz *Pseudomonas* produkują różne VOCs, które odgrywają kluczową rolę w interakcjach między roślinami a mikroorganizmami (Weise i in., 2014; Zhong i in., 2021). Przykładowo badania przeprowadzone przez Zhong i in. (2021) wykazały, iż VOCs wydzielane przez szczep *P. fluorescens* ZX w znaczącym stopniu przyczyniały się do hamowania wzrostu grzybnii *B. cinerea* i ograniczały występowanie patogena na winogronach. W niniejszych badaniach, przeprowadzone testy antagonistyczne wykazały, że produkcja VOCs przez szczep *P. fluorescens* BRZ63 oraz *S. quinivornas* KP32 w znacznej mierze przyczyniała się do hamowania wzrostu grzybnii badanych fitopatogenów, głównie *R. solani*. Zdolność do produkcji przez szczepy BRZ63 i KP32 acetoiny i 2,3-butanodiolu, dwóch dobrze znanych lotnych związków zwiększających odporność roślin na patogeny i stymulujących wzrost roślin (Yi i in., 2016), potwierdziły testy biochemiczne, a analiza genomów obu szczepów pozwoliła zidentyfikować geny szlaków ich biosyntezy. Dodatkowo u szczepu *S. quinivornas* KP32, w odpowiedzi na obecność filtratów *R. solani*, *C. dematium* lub *S. sclerotiorum*, zaobserwowano zwiększoną ekspresję genu *budA* zaangażowanego w biosyntezę acetoiny, co również może potwierdzać znaczenie VOCs w aktywności przeciwgrzybowej tego szczepu. Obecność genu *budA*

stwierdzono w genomach wielu szczepów z rodzaju *Serratia* (Vicente i in., 2016; Nascimento i in., 2018), jednakże niewiele badań odnosi się do analiz ich ekspresji. Większość związków lotnych jest wytwarzana jako produkty takich procesów, jak: fermentacja, degradacja aminokwasów, metabolizm siarki i biosynteza kwasów tłuszczowych (Nascimento i in., 2018). W genomach badanych szczepów wykazano również obecność licznych szlaków metabolicznych związanych z tymi procesami.

Wśród lotnych substancji hamujących wzrost mikroorganizmów działanie toksyczne na różne grzybowe i bakteryjne patogeny wykazuje HCN (Popova i in., 2014). W testach biochemicznych potwierdzono zdolność szczepu *S. quinivornas* KP32 do produkcji cyjanowodoru, a w genomie tego szczepu zidentyfikowano gen *hcnC*, zaangażowany w produkcję tego związku. Co więcej, w obecności wszystkich badanych fitopatogenów obserwowano podwyższony poziom ekspresji *hcnC*, co sugeruje, że u szczepu KP32 produkcja cyjanowodoru może być mechanizmem warunkującym jego aktywność biologiczną wobec taksonomicznie zróżnicowanych patogenów. W genomie szczepu *S. quinivornas* KP32 wykazano również obecność kilku szlaków warunkujących przemianę związków siarki do substancji lotnych, takich jak siarczki dimetylu i H₂S, które mogą hamować kiełkowanie zarodników grzybów czy wzrost grzybni (Fu i in., 2014), a także promować wzrost roślin (Nascimento i in., 2018). Genom szczepu *S. quinivornas* KP32 zawierał ponadto kilka genów zaangażowanych w biosyntezę i modyfikację kwasów tłuszczowych, które odgrywają rolę w produkcji lotnych ketonów i alkoholi.

Liczne badania wykazały, że produkcja acetoiny i 2,3-butanodiolu stymulowała wzrost i odporność systemiczną roślin poprzez indukowanie u nich ekspresji genów istotnych w szlakach sygnałowych SA, kwasu jasmonowego i etylenu (Yi i in., 2016; Nascimento i in., 2018). Można spekulować, iż u *P. fluorescens* BRZ63 i *S. quinivornas* KP32 efekt biokontroli może być również wywierany pośrednio przez indukcję ISR w roślinie żywicielskiej dzięki zdolności biosyntezy 2,3-butanodiolu, acetoiny, czy kwasu salicylowego. Nagarajkumar i in. (2004) zaobserwowali bowiem istotną korelację między potencjałem antagonistycznym *P. fluorescens* wobec *R. solani* a zdolnością do produkcji SA, glukanazy i HCN. Z kolei Nascimento i in. (2021) dowiedli, iż produkcja SA przez szczep *P. thivervalensis* SC5 odgrywała ważną rolę w jego interakcjach z żywicielami roślinnymi, promocji wzrostu roślin, jak i w działaniach biokontroli przeciwko patogenom. Produkcja SA przez szczep *P. fluorescens* BRZ63 i *S. quinivornas* KP32 została potwierdzona badaniami biochemicznymi. Co ciekawe, szczep *P. fluorescens* BRZ63 wykazywał ponad 30-krotnie wyższą produkcję SA niż szczep *P. fluorescens* PICF7, znany i stosowany czynnik biokontroli (Mercado-Blanco i in., 2004).

Charakterystyka mikroorganizmów mogących pełnić istotną rolę w biokontroli, obejmuje także ocenę cech sprzyjających wzrostowi i rozwojowi roślin, które podnoszą ogólną jakość szczepu (Saha i in., 2013). Stymulacja prowadząca do wzrostu roślin i rozwoju architektury korzeni zależy od poziomu hormonów endogennych w roślinie i pobierania składników odżywczych. Może być ona również efektem wpływu drobnoustrojów produkujących hormony roślinne i dostarczających roślinom składniki odżywcze (Tsalgaidou i in., 2023). Badane szczepy *P. fluorescens* BRZ63 i *S. quinivorans* KP32 wykazywały zdolność do solubilizacji fosforanów, produkcji IAA i deaminazy ACC. Właściwości te były także szeroko rozpowszechnione u szczepów endofitycznych pozyskanych z rzepaku wykazujących aktywność antagonistyczną wobec grzybowych fitopatogenów z rodzajów *Sclerotinia* i *Phoma* (Schmidt i in., 2021). Przykładowo, szczepy *Serratia* sp. J260 i *S. fosfoticum* zostały opisane jako bionawozy, ponieważ sprzyjają wzrostowi i produktywności roślin poprzez dostarczanie fosforu w przyswajalnych formach (Sharma i in., 2013; Anzyay i in., 2015). W porównaniu z danymi literaturowymi, aktywność solubilizacji fosforanów przez badany szczep *S. quinivorans* KP32 była umiarkowana (PSI: $2,75 \pm 0,11$) i nie różniła się od wartości opisanych dla wykazującego aktywność biologiczną szczepu *P. aeruginosa* KUPSB12 (PSI: $2,85 \pm 0,2$) (Dipak i in., 2017) czy promującego wzrost topoli szczepu *Burkholderia multivorans* WS-FJ9 (PSI: $2,27 \pm 0,09$) (Zeng i in., 2017). Znacznie wyższą aktywność i wysoki PSI ($7,67 \pm 0,33$) wykazywał natomiast szczep *P. fluorescens* BRZ63.

Szczepy BRZ63 i KP32 produkowały także, wykazujący istotną rolę w promowaniu wzrostu roślin i pośrednio w biokontroli, kwas indolilo-3-octowy. Szczep *P. fluorescens* BRZ63 wytwarzał większą ilość tego fitohormonu ($59,62 \pm 1,11$ $\mu\text{g/ml}$) w porównaniu z *S. quinivorans* KP32 ($14,32 \pm 0,12$ $\mu\text{g/ml}$), jak również opisanym w literaturze *P. fluorescens* UM16 ($22,00 \pm 0,00$ $\mu\text{g/ml}$), promującym wzrost *M. trunkulata* (Hernández-León i in., 2015). Na podstawie analizy genomu *P. fluorescens* BRZ63 można przypuszczać, iż synteza IAA u tego szczepu przebiega szlakiem indolo-3-acetonitrylu (IAN), natomiast u szczepu *S. quinivorans* KP32 szlakiem indolilo-3-pirogronianianu (IPA). Oba badane szczepy wykazywały także zdolność do produkcji deaminazy ACC - enzymu przyczyniającego się do obniżania poziomu etylenu w warunkach stresu i ataku patogenów. Dane literaturowe wskazują, że wyselekcjonowanie bakterii wydajnie wytwarzających deaminazę ACC, ma kluczowe znaczenie dla opracowania skutecznych biopreparatów o zwiększonym potencjale promowania wzrostu roślin i zwiększonej zdolności do ochrony roślin przed stresem biotycznym i abiotycznym (Nascimento i in., 2021; Morales-Cedeño i in., 2021). W niniejszych badaniach wykazano także, iż szczep *S. quinivorans* KP32 jest zdolny do

produkcji AHL wykorzystywanych przez liczne bakterie do regulacji ekspresji genów i zaangażowanych w QS. U wielu bakterii mechanizmy QS indukują syntezę przeciwdrobnoustrojowych metabolitów wtórnych i pozakomórkowych enzymów litycznych hamujących wzrost i rozwój grzybów, bakterii, pierwotniaków i nicieni (Dubuis i in., 2007). Przykładowo badania przeprowadzone przez Hanif i in. (2020) wykazały u szczepu *Serratia plymuthica* zdolność do produkcji cząsteczek AHL regulujących syntezę pirolonitryny i egzoenzymów, produkcję IAA oraz genów zaangażowanych bezpośrednio w aktywność biologiczną przeciwko szarej pleśni. Wyniki oznaczenia fenotypowego potwierdziła analiza genomu szczepu KP32, która wykazała obecność genu *luxS*, zaangażowanego w biosyntezę cząsteczek sygnałowych AHL.

Kolonizacja roślin została uznana za cechę niezbędną w walce bakteryjnych BCA z fitopatogenami (Raaijmakers i in., 2009; Kandel i in., 2017b). W oparciu o ten fakt w pracy przeanalizowano różne mechanizmy warunkujące zdolność do efektywnej kolonizacji roślin przez szczepy *P. fluorescens* BRZ63 oraz *S. quinivorans* KP32. Skuteczność kolonizacji roślin przez mikroorganizmy jest głównie związana z ich zdolnością do ruchu i chemotaksji. Badane szczepy wykazywały zdolność do ruchu rozpełzliwego (ang. *swarming*), ruchu typu pływającego (ang. *swimming*) oraz ruchu drgającego (ang. *twitching*). Wyniki te były zgodne z analizą genetyczną, która ujawniła obecność w ich genomach szerokiego wachlarza genów związanych z biosyntezą wici (*flh*, *fli*, *fle*, *flg*), chemotaksją (*che*, *mcp*) i biosyntezą pilusów (*pil*, *hof*, *ppd*). Ruchliwość bakterii, zależna od obecności wici lub pilusów, jest jednym z kluczowych czynników sprzyjających adhezji do różnych powierzchni i tworzenia biofilmu (Hardoim i in., 2008; Pankiewicz i in., 2016). Wykazano na przykład, iż w przypadku szczepu *P. putida* KT2440 mutacje w genach związanych z biosyntezą wici, takich jak: *flgL*, *fliA*, *fleQ*, *fliL*, *fliN* i *flgD*, powodowały upośledzenie ich ruchliwości oraz wpłynęły na zmniejszenie adhezji mutantów do nasion kukurydzy (Wu i in., 2011b). Badania przeprowadzone przez Dutta i in. (2020) wykazały dodatkowo, iż zdolność szczepu *P. fluorescens* NBC275 do ruchu oraz wysoka efektywność kolonizacji roślin były kluczowe również dla skuteczności biokontroli. Podobnie badania przeprowadzone przez Hover i in. (2016) wykazały, że szczep *S. marcescens* z defektem syntezy wici migrował znacznie wolniej wzdłuż strzępek *Rhizopus oryzae*, co skutkowało mniejszą skutecznością zwalczania tych grzybów. Szybkie rozprzestrzenianie się BCA może zwiększać skuteczność biokontroli poprzez pośrednią eliminację patogena związaną z konkurencją o niszę i/lub bezpośredni antagonizm związany z produkcją metabolitów przeciwgrzybowych. Badania przeprowadzone przez Weert i in. (2002) wskazują natomiast na rolę wydzielin korzeniowych i ruchu chemotaktycznego w ich kierunku w kolonizacji

korzeni pomidora przez *P. fluorescens* WCS365 (Weert i in., 2002). Wydzieliny korzeniowe mają ogromny wpływ na kształtowanie mikrobiomu rośliny (Sharma i in., 2020). Zdolność bakterii do wykorzystywania wydzielin roślinnych jako składników odżywczych oraz wysoka dynamika wzrostu jest warunkiem skutecznego konkurowania z innymi mikroorganizmami (Oso i in., 2019; Chlebek i in., 2020; Chlebek i in., 2022a). W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że oba badane szczepy wykazują metaboliczną aktywność i zróżnicowanie pod względem składników odżywczych, wykorzystując szeroką gamę związków organicznych, takich jak kwasy organiczne, związki fenolowe, cukry, węglowodany i białka, a analizy COG oraz KEGG genomów potwierdziły u nich obecność wielu genów zaangażowanych w przemiany metaboliczne tych związków. Zróżnicowanie to może wspierać zdolności adaptacyjne szczepów BRZ63 i KP32, podczas zasiedlania roślin, wiadomo bowiem, że bakterie wszechstronne metabolicznie są najbardziej skutecznymi kolonizatorami korzeni i konkurentami w środowisku glebowym (Hanif i in., 2020).

Inną ważną cechą badanych szczepów, która podkreśla ich potencjał do kolonizacji, a tym samym ochrony roślin, jest zdolność do autoagregacji i tworzenia biofilmu, potwierdzona zarówno przez testy biochemiczne i mikroskopowe, jak i analizy genetyczne. Na podstawie klasyfikacji Stepanović i in. (2007) oba szczepy zostały uznane jako umiarkowani producenci biofilmu, natomiast w oparciu o klasyfikację opisaną przez Wolska i in. (2003) stwierdzono, że wykazują one słabą zdolność do autoagregacji. Biofilmy tworzone na powierzchni korzeni niektórych roślin uprawnych mogą przyczyniać się bowiem do efektywniejszej biokontroli patogenów, a co za tym idzie poprawy wydajności upraw (Seneviratne i in., 2009; Lahlali i in., 2022). Ponadto bakterie tworzące biofilm w systemie korzeniowym chronią/kontrolują w ten sposób swoją niszę, co daje im przewagę nad konkurentami (Tovi i in., 2019). Dane literaturowe potwierdzają, iż szczepy z gatunku *P. fluorescens* wykazują zdolność do tworzenia biofilmu, który może chronić korzenie przed bakteryjnymi i grzybowymi patogenami glebowymi (Seneviratne i in., 2011). Hernández-Salmerón i in. (2017) potwierdzili, że tworzenie biofilmu przez szczep *P. fluorescens* UM270 odgrywało zasadniczą rolę w kolonizacji *Medicago* spp. W innych badaniach udowodniono, iż szczepy *B. pumilus* HR10 (Zhu i in., 2020) oraz *B. gladioli* 3A12 (Shehata i in., 2016) wykazują aktywność antagonistyczną w odpowiedzi na obecność fitopatogenów rozpoczynając od tworzenia biofilmu. Co więcej, Matteolli i in. (2018) zauważyli, iż tworzenie masywnego biofilmu na strzępkach *Fusarium* przez szczep *S. marcescens* UENF-22GI przyczyniło się do zahamowania wzrostu tego patogena.

Liczne badania potwierdzają, iż istotnym składnikiem biofilmu są EPSs wpływające na efektywność przyczepiania się komórek bakteryjnych do powierzchni korzenia (Kandel i in., 2017b). Związki te mogą również przyczynić się do przetrwania bakterii w roślinie, działając jako bariera dla mechanizmów obronnych roślin (Costa i in., 2018). W niniejszych badaniach, zdolność do produkcji EPSs potwierdzono także u badanych szczepów, *P. fluorescens* BRZ63 i *S. quinivorans* KP32. W genomie BRZ63 zidentyfikowano klaster genów zaangażowanych w biosyntezę alginianu oraz kluczowe geny biosyntezy LPS. Wytwarzanie alginianu stymulującego rozwój biofilmu może ułatwiać utrzymanie nawodnionego środowiska i chronić bakterie przed stresem suszy, zwiększając ich przeżywalność (Maleki i in., 2016). Z kolei zmiany w strukturze LPS zwykle wpływają na siły adhezyjne bakterii, prawdopodobnie poprzez zmianę hydrofobowości powierzchni komórki (Bogino i in., 2013). W genomie szczepu *S. quinivorans* KP32 potwierdzono natomiast obecność genów biorących udział w biosyntezie EPS, takich jak celuloza i kwas kolaninowy, które są niezbędne dla tworzenia biofilmu (Danese i in., 2000; Zhu i in., 2020). Dane literaturowe wskazują, iż inokulacja nasion bakteriami wykazującymi powyższe cechy zapewnia roślinom wiele korzyści, wśród których na uwagę zasługuje poprawa funkcji fizjologicznych i jakości nasion, poprawa wzrostu roślin, tolerancji na stres oraz odporności na choroby. Bakterie te przylegając do nasion i tworząc silny biofilm, zwiększają uwodnienie nasion oraz aktywują i synchronizują procesy metaboliczne związane z kiełkowaniem (Tsalgatidou i in., 2023). Szczep *P. fluorescens* SBW25, blisko spokrewniony ze szczepem BRZ63, był szeroko stosowany jako organizm modelowy do badania biofilmu, kolonizacji roślin, promocji ich wzrostu i biokontroli patogenów z rodzaju *Rhizoctonia* i *Pythium* (Naseby i in., 2001).

Istotną rolę w kolonizacji tkanek roślinnych mogą pełnić CWDEs. Wcześniejsze badania wykazały, że endofity wytwarzające celulazy i pektynazy determinują efektywną kolonizację korzeni (Pal i in., 2021), a Deivanai i in. (2014) zasugerowali, że produkcja enzymów hydrolitycznych przez endofity bakteryjne pomaga w poprawie wzrostu siewek. W niniejszych badaniach produkcję celulaz potwierdzono u szczepu *P. fluorescens* BRZ63. Oba badane szczepy wykazywały natomiast zdolność do wydzielania amylaz, które mogą ułatwiać wykorzystanie skrobi bielma podczas kiełkowania i formowania siewek. Wysoki potencjał kolonizacyjny szczepów *P. fluorescens* BRZ63 oraz *S. quinivorans* KP32 dodatkowo podkreśla obecność genów kodujących enzymy katalizujące degradację polisacharydów budujących ściany komórek roślinnych, w tym β -glukozydazy, endoglukanazy, α -galaktozydazy, poligalakturonazy oraz arsenału genów kodujących kluczowe enzymy antyoksydacyjne. Enzymy te stanowią pierwszą linię obrony

mikroorganizmów, wychwytyjąc toksyczne wolne rodniki powstałe w wyniku stresu abiotycznego i biotycznego, który może być generowany obecnością patogenów (Fouda i in., 2021). Ponadto dane literaturowe donoszą, iż bakterie zdolne do przezwyciężenia stresu oksydacyjnego wykazują większą zdolność do kolonizacji i ochrony roślinnego gospodarza (Vicente i in., 2016), zmniejszając negatywne efekty stresu oksydacyjnego roślinnego gospodarza poprzez ochronę komórek roślinnych przed uszkodzeniami oksydacyjnymi (Hardoim i in., 2015). Bakterie są szczególnie wrażliwe na stres oksydacyjny, ze względu na wysoki stosunek powierzchni do objętości. Szybka odpowiedź na obecność ROS i ich detoksykacja umożliwia im skuteczną kolonizację (Ali i in., 2014). Uzyskane wyniki wskazują, iż zmniejszenie stresu oksydacyjnego, również w odpowiedzi na obecność patogenów u szczepu KP32 może być związane z produkcją katalaz, natomiast u szczepu BRZ63 zarówno z produkcją katalaz i dysmutazy ponadtlenkowej.

Narzędzia molekularne są wykorzystywane do wykrywania i monitorowania BCAs na powierzchni lub wewnątrz rośliny, czy też w środowisku. W celu wizualizacji bakterii, szerokie zastosowanie znalazł gen *gfp* kodujący białko zielonej fluorescencji (Nigris i in., 2018). Bakterie znakowane fluorescencyjnie są także przydatnymi narzędziami do badań interakcji endofit-roślina (Chlebek i in., 2020, Pal i in., 2021). W niniejszych badaniach plazmid pMP4566 zawierający gen *egfp* został z powodzeniem wprowadzony do komórek szczepów *P. fluorescens* BRZ63 oraz *S. quinivorans* KP32, co umożliwiło obserwację kolejnych etapów kolonizacji roślin i potwierdziło zdolność badanych bakterii do kolonizacji i utrzymywania się w tkankach *A. thaliana* Col-0, modelowego obiektu badań interakcji między roślinami a mikroorganizmami (Rangel de Souza i in., 2016) oraz rzepaku. Zarówno szczep BRZ63, jak i KP32 intensywnie kolonizowały powierzchnię korzeni, tworząc agregaty i biofilm (Chlebek i in., 2020), co koreluje z obecnością szerokiego wachlarza cech determinujących skuteczną kolonizację roślin. Szczep KP32 wykazywał dodatkowo zdolność do wnikania do wnętrza roślin przez aparaty szparkowe. Wyznakowane bakterie obserwowano na powierzchni korzeni, jednakże kolonizowały one głównie przestrzenie międzykomórkowe wnętrza korzeni. Obecność endofitów w tych częściach roślin, bogatych w węglowodany, aminokwasy i nieorganiczne składniki odżywcze, obserwowano również w innych badaniach (Compant i in., 2005; Kandel i in., 2017b).

W niniejszej pracy przeprowadzono również badania związane z zastosowaniem szczepów BRZ63 i KP32 jako aktywnych czynników do biokontroli rzepaku (*Brassica napus* L.), będącego jedną z najpowszechniej uprawianych na świecie roślin. Warto zwrócić uwagę na to, iż ze względu na niekorzystne warunki pogodowe oraz duże problemy ze szkodnikami i patogenami, powierzchnia upraw rzepaku w Polsce z roku na rok jest coraz

mniej. Każdego roku straty w plonie rzepaku wynoszą około 15–20%, natomiast straty powodowane przez patogeny grzybowe odpowiedzialne za zgniliznę twardzikową, czern krzyżowych, szarą pleśń czy zgorzel siewek, mogą sięgać nawet 50% potencjalnego plonowania. Powszechnym patogenem rzepaku jest *R. solani* infekujący zarówno kiełkujące nasiona, wschodzące rośliny, jak i rośliny w fazie tworzenia pierwszych liści. Typowym symptomem zgorzeli są ciemne plamy pojawiające się na podziemnej części siewki oraz na powierzchni liści (Drizou i in., 2017). Przeprowadzone testy antagonistyczne ujawniły potencjał szczepów BRZ63 oraz KP32 do ochrony roślin przed różnymi patogenami, jednakże najwyższą aktywność antagonistyczną wykazywały one wobec *R. solani*. Stąd też, aby zweryfikować skuteczność badanych szczepów w ochronie i promowaniu wzrostu roślin przed tym patogenem, przeprowadzono doświadczenie doniczkowe. Wyniki tych badań, jednoznacznie potwierdziły, iż inokulacja gleby szczepami BRZ63 i KP32, które miały zdolność do swobodnego przechodzenia z tkanek roślinnych do gleby i z gleby do rośliny przez cały czas trwania eksperymentu, znosi negatywny wpływ patogena, a nawet prowadzi do przyrostu masy korzeni i pędów rośliny w jego obecności. Podobne wyniki uzyskali m.in. Dinesh i in. (2015), stosując szczepy *B. amyloliquefaciens* GRB35 i *S. marcescens* GRB68 do biologicznego zwalczania *Pythium myriotylum* oraz Khaskheli i in. (2020) stosując, jako czynnik biokontroli, wyizolowany z ryzosfery kukurydzy szczep *P. fluorescens* EM-85. Obserwowany pozytywny wpływ badanych szczepów na kondycję rzepaku, znajduje odzwierciedlenie w szerokim wachlarzu cech związanych z aktywnością antagonistyczną tych szczepów oraz zidentyfikowanych mechanizmach promujących wzrost roślin. Według Hernández-León i in. (2015), szczepy wykazujące wiele determinantów antagonistycznych i mechanizmów promujących wzrost roślin, jak na przykład *P. fluorescens* zdolny do produkcji fenazy, HCN, IAA, deaminazy ACC, sideroforów, VOCs, stanowią doskonałą opcję do stosowania ich jako czynników biokontroli. Obserwowany wzrost masy pędów i korzeni rzepaku w obecności badanych szczepów wynikał prawdopodobnie z ich zdolności do produkcji IAA, jak również solubilizacji fosforanów, cech wpływających na zwiększenie pobierania wody i składników odżywczych. W badaniach przeprowadzonych przez Al-Fadhil i in. (2019) nad ochroną sadzonek ogórka (*Cucumis sativus* L.) przed *F. solani* i *R. solani* wykazano natomiast, iż istotnymi mechanizmami w hamowaniu wzrostu patogenów była produkcja enzymów hydrolitycznych, CLPs oraz sideroforów przez szczepy *B. subtilis* oraz *P. fluorescens*. Co ciekawe, u szczepu BRZ63 w odpowiedzi na filtrat *R. solani* w największym stopniu ekspresji ulegały geny związane z produkcją piowerdyny oraz wiskozyny należącej do CLPs, co może wskazywać na rolę tych właśnie metabolitów w zwalczaniu patogena. W podobnych badaniach przeprowadzonych przez Thrane i in. (2001),

udowodniono istotną rolę szczepu *P. fluorescens* DR54 w ochronie buraka cukrowego przed *R. solani*. Wykazano, iż istotnym mechanizmem w zwalczaniu tego grzyba była produkcja CLPs, głównie wiskozynoamidu. Istotnym mechanizmem w zwalczaniu *R. solani* przez szczep KP32 może być natomiast produkcja lotnych związków, które, jak udowodniły testy antagonistyczne, znacznie hamowały wzrost grzybni patogena. Co więcej, badania ekspresji genów wykazały, iż w odpowiedzi na filtrat *R. solani* w komórkach KP32 nadekspresji ulegały geny związane z produkcją lotnych związków, w tym HCN oraz acetoiny. Lotne związki produkowane przez różne bakterie endofityczne, przyczyniały się m.in. do ograniczenia objawów zgorzeli siewek wywoływanej przez *R. solani* w sadzonkach pomidora (*Solanum linnaeanum*) oraz do stymulacji wzrostu rośliny (Marzouk i in., 2021).

Wyniki uzyskane dla szczepu *P. fluorescens* BRZ63 i *S. quinivorans* KP32 wskazują, iż endofity te są dobrymi kandydatami do zastosowania ich jako aktywnych czynników biokontroli.

8. WNIOSKI

1. *P. fluorescens* BRZ63 oraz *S. quinivorans* KP32 wykazują zróżnicowaną aktywność antagonistyczną wobec patogenów grzybowych należących do różnych grup taksonomicznych.
2. W genomach badanych szczepów zidentyfikowano geny warunkujące szeroki wachlarz mechanizmów determinujących ich aktywność antagonistyczną, zdolność do kolonizacji i promocji wzrostu roślin.
3. Badane szczepy bakterii wykazują różnice w poziomie ekspresji genów zaangażowanych w mechanizmy biokontroli, w odpowiedzi na badane fitopatogeny.
4. U szczepu *P. fluorescens* BRZ63, obecność filtratów grzybowych indukuje ekspresję genów zaangażowanych w produkcję nierybosomalnych peptydów, w tym piowerdyny i wiskozyny oraz genów związanych z odpowiedzią na stres oksydacyjny.
5. Ekspozycja szczepu *S. quinivorans* KP32 na filtraty grzybowe prowadzi do wzrostu ekspresji genów zaangażowanych w biosyntezę chitynazy, cyjanowodoru, enterobaktyny oraz acetoiny.
6. Zdolność obu szczepów do wydzielania szeregu enzymów litycznych, produkcji sideroforów, lotnych związków i solubilizacji fosforanów wskazuje na udział różnych mechanizmów w biokontroli badanych fitopatogenów.
7. *P. fluorescens* BRZ63 i *S. quinivorans* KP32 wykazują cechy niezbędne do skutecznej kolonizacji roślin, takie jak zdolność do aktywnego ruchu, autoagregacji, produkcji egzopolisacharydów i zdolności tworzenia biofilmu.
8. Oba szczepy bakterii są efektywnymi kolonizatorami roślin *A. thaliana* i *B. napus*, i przyczyniają się do promowania wzrostu oraz ochrony rzepaku przed *R. solani*.

STRESZCZENIE

Choroby roślin wywoływane przez patogeny glebowe, w tym grzyby, stanowią poważny problem w rolnictwie. Powszechnie stosowane chemiczne środki ochrony roślin, w tym fungicydy, ze względu na małą wybiórczość oraz toksyczne oddziaływanie na organizmy, nie pozostają obojętne dla środowiska. Stąd też, mikroorganizmy wykazujące oddziaływania antagonistyczne wobec fitopatogenów stanowią pożądaną alternatywę, pozwalającą na ograniczenie stosowania środków chemicznych. Obecnie szczególną uwagę zwraca się na, naturalnie zasiedlające rośliny, bakterie endofityczne, które dzięki aktywności przeciwdrobnoustrojowej, ścisłym oddziaływaniom z roślinami oraz zdolności do wspomagania ich ogólnoustrojowej odporności mogą pełnić istotną rolę w procesach biologicznej ochrony roślin.

Głównym celem niniejszej pracy była identyfikacja mechanizmów warunkujących wysoką aktywność biologiczną endofitycznych szczepów *Pseudomonas fluorescens* BRZ63 wyizolowanego z korzeni rzepaku (*Brassica napus* L.) i *Serratia quinivorans* KP32 wyizolowanego z korzeni pietruszki (*Petroselinum crispum* L.). Podjęto próbę poznania i zrozumienia podstaw antagonistycznych oddziaływań między tymi endofitami i zróżnicowanymi taksonomicznie fitopatogenami grzybowymi na poziomie molekularnym. Ponadto określono zdolność badanych szczepów bakterii do kolonizacji wewnętrznych tkanek roślin oraz ich wpływ na wzrost i ochronę rzepaku przed *Rhizoctonia solani*.

Badane szczepy wykazywały zróżnicowaną aktywność przeciwko *Rhizoctonia solani* W70, *Colletotrichum dematium* K, *Fusarium avenaceum* i *Sclerotinia sclerotiorum* K2291, a ich zdolność do hamowania wzrostu tych fitopatogenów wynikała z szerokiej gamy cech warunkujących oddziaływania antagonistyczne. Analizy genomów badanych szczepów bakterii pozwoliły na identyfikację genów warunkujących różne mechanizmy biokontroli, w tym: konkurencję o przestrzeń życiową i składniki pokarmowe, produkcję antybiotyków, produkcję enzymów degradujących ściany komórkowe patogenów oraz produkcję lotnych związków. Ponadto w genomach obu szczepów zidentyfikowano geny kodujące szeroki wachlarz mechanizmów determinujących zdolność do kolonizacji i promocji wzrostu roślin. Badane szczepy bakterii wykazywały różnice w poziomie ekspresji genów zaangażowanych w mechanizmy biokontroli, w odpowiedzi na badane fitopatogeny. Analiza ekspresji genów u szczepu BRZ63 w odpowiedzi na obecność grzybowych filtratów wykazała istotne zmiany w poziomie transkrypcji genów zaangażowanych w produkcję piowerdyny i wiskozyny. Z kolei u szczepu KP32 wykazano

istotne zmiany w transkrypcji genów kodujących chitynazy, jak również zaangażowanych w biosyntezę cyjanowodoru, enterobaktyny oraz acetoiny, co wskazuje na udział różnych mechanizmów w hamowaniu wzrostu badanych fitopatogenów. Przeprowadzone testy biochemiczne, potwierdziły u badanych szczepów bakterii szereg aktywności warunkujących efektywną kolonizację tkanek roślinnych, w tym zdolność do aktywnego ruchu, produkcję celulaz oraz enzymów antyoksydacyjnych (katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej), produkcję egzopolisacharydów, autoagregację i tworzenie biofilmu. Efektywne właściwości kolonizacyjne szczepów BRZ63 oraz KP32 zostały potwierdzone mikroskopowymi obserwacjami komórek bakterii wyznakowanych białkiem EGFP, zasiedlających powierzchnię oraz wewnętrzne tkanki modelowej rośliny *Arabidopsis thaliana* Col-0 oraz *Brassica napus* L. Ponadto stwierdzono, iż inokulacja gleby szczepami BRZ63 oraz KP32, które wykazywały zdolność do swobodnego przechodzenia z tkanek roślinnych do gleby i z gleby do rośliny, przyczynia się do przyrostu masy korzeni i pędów roślin nawet w obecności *R. solani*.

Aktywność biologiczna badanych szczepów *P. fluorescens* BRZ63 i *S. quinivorans* KP32 oraz ich zdolność do efektywnej kolonizacji i przeżywania w tkankach roślin oraz glebie wskazuje, iż mogą one, zgodnie z ogólnymi zasadami integrowanej ochrony roślin, znaleźć potencjalne zastosowanie jako aktywne czynniki biopestycydów.

SUMMARY

Plant diseases caused by soilborne pathogens, including fungi, pose a severe problem in agriculture. Commonly used chemical plant protection products, including fungicides, are not inert to the environment due to their low selectivity and toxic effects on organisms. Hence, microorganisms showing antagonistic interactions with phytopathogens are a welcome alternative to reduce the use of chemicals. Special attention is now being paid to naturally occurring endophytic bacteria, which can play an essential role in the biological protection of plants due to their antimicrobial activity, close interactions with plants and ability to support their systemic resistance.

The main objective of this study was to identify the mechanisms determining the high biological activity of the endophytic strains *Pseudomonas fluorescens* BRZ63 isolated from the roots of oilseed rape (*Brassica napus* L.) and *Serratia quinivorans* KP32 isolated from the roots of parsley (*Petroselinum crispum* L.). An attempt was made to explore and understand the basis of antagonistic interactions between these endophytes and taxonomically diverse fungal phytopathogens at the molecular level. In addition, the ability of the tested bacterial strains to colonise internal plant tissues and their effects on the growth and protection of oilseed rape against *Rhizoctonia solani* were determined.

The tested strains showed differential activity against *Rhizoctonia solani* W70, *Colletotrichum dematium* K, *Fusarium avenaceum* and *Sclerotinia sclerotiorum* K2291, and their ability to inhibit the growth of these phytopathogens was due to a wide range of traits determining antagonistic interactions. Analyses of the genomes of the bacterial strains studied allowed the identification of genes determining various biocontrol mechanisms, including competition for living space and nutrients, antibiotic production, production of pathogen cell wall-degrading enzymes and production of volatile compounds. In addition, genes encoding a wide range of mechanisms determining the ability to colonise and promote plant growth were identified in the genomes of both strains. Gene expression analysis in the BRZ63 strain in response to fungal filtrates showed significant changes in the transcript levels of genes involved in pyoverdine and viscosin production. In contrast, the KP32 strain showed significant changes in the transcription of genes encoding chitinases, as well as those involved in the biosynthesis of hydrogen cyanide, enterobactin and acetoin, indicating the involvement of different mechanisms in the growth inhibition of the phytopathogens tested. Biochemical tests carried out confirmed a range of activities in the bacterial strains tested for effective colonisation of plant tissues, including the capacity for active motility, production of cellulases and antioxidant enzymes (catalase and superoxide dismutase),

production of exopolysaccharides, autoaggregation and biofilm formation. The effective colonisation properties of strains BRZ63 and KP32 were confirmed by microscopic observations of EGFP protein-labelled bacterial cells colonising the surface and internal tissues of model plants *Arabidopsis thaliana* Col-0 and *Brassica napus* L. Moreover, soil inoculation with strains BRZ63 and KP32, which showed the ability to move freely from plant tissues to soil and soil to plant, was found to contribute to an increase in the weight of plant roots and shoots, even in the presence of *R. solani*.

The biological activity of the tested strains *P. fluorescens* BRZ63 and *S. quinivorans* KP32 and their ability to effectively colonise and survive in plant tissues and soil indicate that they may, according to the general principles of integrated pest management, find potential use as active agents of biopesticides.

LITERATURA

1. Abalos, A.; Pinazo, A.; Infante, M.R.; Casals, M.; Garcia, F.; Manresa, A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir* 2001, 17, 1367–1371.
2. Abdelghany, M.M.A.; Kurikawa, M.; Watanabe, M.; Matsui, H.; Yamamoto, M.; Ichinose, Y.; Toyoda, K.; Kouzai, Y.; Noutoshi, Y. Surveillance of pathogenicity of *Rhizoctonia solani* Japanese isolates with varied anastomosis groups and subgroups on *Arabidopsis thaliana*. *Life* 2022, 12, 76.
3. Abo-Elyousr, K.A.M.; Abdel-Rahim I.R.; Almasoudi N.M.; Alghamdi S.A. Native endophytic *Pseudomonas putida* as a biocontrol agent against common bean rust caused by *Uromyces appendiculatus*. *J. Fungi (Basel)*. 2021, 10, 7(9), 745.
4. Acebo-Guerrero, Y.; Hernández-Rodríguez, A.; Vandeputte, O.; Miguélez-Sierra, Y.; Heydrich-Pérez, M.; Ye, L. i in. Characterization of *Pseudomonas chlororaphis* from *Theobroma cacao* L. rhizosphere with antagonistic activity against *Phytophthora palmivora* (Butler). *J. Appl. Microbiol.* 2015, 119, 1112–1126.
5. Afzal, I.; Shinwari, Z.K.; Sikandar, S.; Shahzad, S. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiol. Res.* 2019, 221, 36–49.
6. Ahmad, Z.; Wu, J.; Chen, L.; Dong, W. Isolated *Bacillus subtilis* strain 330-2 and its antagonistic genes identified by the removing PCR. *Sci. Rep.* 2017, 7, 1777.
7. Ahmed, E.; Holmström, S.J. Siderophores in environmental research: Roles and applications. *Microbial. Biotechnol.* 2014, 7, 196–208.
8. Ajayi-Oyetunde, O.O.; Bradley, C.A. *Rhizoctonia solani*: Taxonomy, population biology and management of rhizoctonia seedling disease of soybean. *Plant. Pathol.* 2018, 67, 3–17.
9. Akhter, A., Hage-Ahmed, K., Soja, G. et al. Potential of *Fusarium* wilt-inducing chlamydospores, *in vitro* behaviour in root exudates and physiology of tomato in biochar and compost amended soil. *Plant Soil* 2016, 406, 425–440.
10. Aktar, M.W.; Sengupta, D.; Chowdhury, A. Impact of pesticides use in agriculture: Their benefits and hazards. *Interdiscip. Toxicol.* 2009, 2, 1–12.
11. Al-Fadhal, F.A.; AL-Abedy, A.N.; Alkhafije, D.A. Isolation and molecular identification of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani* isolated from cucumber (*Cucumis sativus* L.) and their control feasibility by *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *Egypt J. Biol. Pest. Control* 2019, 29, 47.
12. Ali, M.; Ali, Q.; Sohail, M.A.; Ashraf, M.F.; Saleem, M.H.; Hussain, S.; Zhou, L. Diversity and taxonomic distribution of endophytic bacterial community in the rice plant and its prospective. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 10165.
13. Ali, S.; Duan, J.; Charles, T.C.; Glick, B.R. A bioinformatics approach to the determination of genes involved in endophytic behavior in *Burkholderia* spp. *J. Theor. Biol.* 2014, 343, 193–198.
14. Allard-Massicotte, R.; Tessier, L.; Lécuyer, F.; Lakshmanan, V.; Lucier, J.-F.; Garneau, D. i in. *Bacillus subtilis* early colonization of *Arabidopsis thaliana* roots involves multiple chemotaxis receptors. *MBio.* 2016, 7.
15. Aloo, B.N., Mbega, E.R., Makumba, B.A., Tumuhairwe, J.B. Life Inside Plants: Insights into the Lifestyle, Diversity, and Metabolites of Endophytic Bacteria Involved in Plant Defense Against Phytopathogens. In *Microbial Biocontrol: Sustainable Agriculture and Phytopathogen Management*. Kumar, A. Eds. Springer, Cham. 2022, 79-111.
16. Alquéres, S.; Meneses, C.; Rouws, L.; Rothballer, M.; Baldani, I.; Schmid, M.; Hartmann, A. The bacterial superoxide dismutase and glutathione reductase are crucial for endophytic colonization of rice roots by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 2013, 26(8), 937-45.
17. Amaral, F.P.; Tuleski, T.R.; Pankiewicz, V.C.S.; Melnyk, R.A.; Arkin, A.P.; Griffiths, J.; Tadra-Sfeir M.Z.; Maltempi de Souza, E.; Deutschbauer, A.; Monteiro, R.A.; Stacey, G. Diverse bacterial genes modulate plant root association by beneficial bacteria. *mBio.* 2020, 15, 11(6), e03078-20.
18. Amaresan, N.; Jayakumar, V.; Thajuddin, N. Isolation and characterization of endophytic bacteria associated with chilli (*Capsicum annuum*) grown in coastal agricultural ecosystem. *Indian J. Biotechnol.* 2014, 13, 247–255.
19. Andrés-Barrao, C.; Alzubaidy, H.; Jalal, R.; Mariappan, K.G.; de Zélicourt, A.; Bokhari, A.; Artyukh, O.; Alwutayd, K.; Rawat, A.; Shekhawat, K.; Almeida-Trapp, M.; Saad, M.M.; Hirt, H. Coordinated bacterial and plant sulfur metabolism in *Enterobacter* sp. SA187-induced plant salt stress tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2021, 16, 118(46), e2107417118.
20. Andrés-Barrao, C.; Lafí, F.F.; Alam, I.; de Zélicourt, A.; Eida, A.A.; Bokhari, A.; Alzubaidy, H.; Bajic, V.B.; Hirt, H.; Saad, M.M. Complete genome sequence analysis of *Enterobacter* sp. SA187, a plant multi-stress tolerance promoting endophytic bacterium. *Front. Microbiol.* 2017, 8, 2023.
21. Ansary, W.R.; Prince, F.R.K.; Haque, E.; Sultana, F.; West, H.M.; Rahman, M.; Mondol, A.M.; Akanda, A.M.; Rahman, M.; Clarke, M.L.; Islam, T. Endophytic *Bacillus* spp. from medicinal

- plants inhibit mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum* and promote plant growth. *Z. Naturforsch C. J. Biosci.* 2018, 25;73(5-6), 247-256.
22. Aravind, R.; Kumar, A.; Eapen, S.J.; Ramana, K.V. Endophytic bacterial flora in root and stem tissues of black pepper (*Piper nigrum* L.) genotype: isolation, identification and evaluation against *Phytophthora capsici*. *Lett. Appl. Microbiol.* 2009, 48(1), 58-64.
 23. Arora, N. K.; Khare, E.; Oh, J. H.; Kang, S. C.; Maheshwari, D. K. Diverse mechanisms adopted by *Pseudomonas fluorescens* PGC2 during the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora capsici*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2008, 24, 581–585.
 24. Ashajyothi, M.; Kumar, A.; Sheoran, N.; Ganesan, P.; Gogoi, R.; Subbaiyan, G. K. i in. Black pepper (*Piper nigrum* L.). associated endophytic *Pseudomonas putida* BP25 alters root phenotype and induces defense in rice (*Oryza sativa* L.) against blast disease incited by *Magnaporthe oryzae*. *Biol. Control.* 2020. 143, 104181.
 25. Avram, O.; Rapoport, D.; Portugez, S.; Pupko, T. M1CR0B1AL1Z3R—A user-friendly web server for the analysis of large-scale microbial genomics data. *Nucleic Acids Res.* 2019, 47, W88–W92.
 26. Bahroun, A.; Jousset, A.; Mhamdi, R.; Mrabet, M.; Mhadhbi, H. Anti-fungal activity of bacterial endophytes associated with legumes against *Fusarium solani*: Assessment of fungi soil suppressiveness and plant protection induction. *App. Soil Ecol.* 2018, 124, 131-140.
 27. Bajpai, A.; Johri, B.N. Endophytic *Pseudomonads* and their metabolites. In *Endophytes and Secondary Metabolites*; Jha, S., Ed.; Springer: Cham, Switzerland, 2019; pp. 33–59.
 28. Bakker, P.A.; Berendsen, R.L.; Doornbos, R.F.; Wintermans, P.C.; Pieterse, C.M. The rhizosphere revisited: Root microbiomics. *Front. Plant. Sci.* 2013, 4, 165.
 29. Balsanelli, E.; Serrato, R.V.; de Baura, V.A.; Sasaki, G.; Yates, M.G.; Rigo, L.U.; Pedrosa, F.O.; de Souza, E.M.; Monteiro, R.A. *Herbaspirillum seropedicae* *rfbB* and *rfbC* genes are required for maize colonization. *Environ. Microbiol.* 2010, 12, 2233–2244.
 30. Banerjee, G.; Pandey, S.; Ray, A.K.; Kumar, R. Bioremediation of heavy metals by a novel bacterial strain *Enterobacter cloaca* and its antioxidant enzyme activity, flocculant production and protein expression in presence of lead, cadmium and nickel. *Water Air Soil Pollut.* 2015, 226, 91.
 31. Bardin, M.; Ajouz, S.; Comby, M.; Lopez-Ferber, M.; Graillot, B.; Siegwart, M.; Nicot, P.C. Is the efficacy of biological control against plant diseases likely to be more durable than that of chemical pesticides? *Front. Plant. Sci.* 2015, 6, 566.
 32. Bargaz, A.; Lyamlouli, K.; Chtouki, M.; Zeroual, Y.; Dhiba, D. Soil microbial resources for improving fertilizers efficiency in an integrated plant nutrient management system. *Front. Microbiol.* 2018, 9, 1606.
 33. Ben-Slama, H.; Triki, M.A.; Bouket, A.C.; Mefteh, B.F.; Alenezi, F.N.; Luptakova, L.; Cherif-Silini, H.; Vallat, A.; Oszako, T.; Gharsallah, N. i in. Screening of the high rhizosphere competent *Limoniastrum monopetalum* culturable endophyte microbiota allows the recovery of multifaceted and versatile biocontrol agents. *Microorganisms* 2019, 7, 249.
 34. Berne, C.; Ducret, A.; Hardy, G.G.; Brun, Y.V. Adhesins involved in attachment to abiotic surfaces by gram-negative bacteria. *Microbiol. Spectr.* 2015, 3(4), 10.
 35. Bigirimana, J.; Höfte, M. Induction of systemic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in bean by a benzothiadiazole derivative and rhizobacteria. *Phytoparasitica* 2002, 30, 159–168.
 36. Blin, K.; Shaw, S.; Steinke, K.; Villebro, R.; Ziemert, N.; Lee, S.Y.; Medema, M.H.; Weber, T. AntiSMASH 5.0: Updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Res.* 2019, 47, W81–W87.
 37. Bloemberg, G.V.; Wijnjes, A.H.M.; Lamers, G.E.M.; Stuurman, N.; Lugtenberg, B.J.J. Simultaneous imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 populations expressing three different autofluorescent proteins in the rhizosphere: new perspectives for studying microbial communities. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 2000, 13, 1170–1176.
 38. Bogino, P.C.; de las Mercedes, O.M.; Sorroche, F.G.; Giordano, W. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 15838–15859.
 39. Böhm, M.; Hurek, T.; Reinhold-Hurek, B. Twitching motility is essential for endophytic rice colonization by the N₂-fixing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Mol Plant Microbe Interact.* 2007, 20(5), 526-33.
 40. Bolivar-Anillo, H.J.; González-Rodríguez, V.E.; Cantoral, J.M.; García-Sánchez, D.; Collado, I.G.; Garrido, C. Endophytic bacteria *Bacillus subtilis*, isolated from *Zea mays*, as potential biocontrol agent against *Botrytis cinerea*. *Biology* 2021, 10, 492.
 41. Brader, G.; Compant, S.; Mitter, B.; Trognitz, F.; Sessitsch, A. Metabolic potential of endophytic bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2014, 27, 30–37.
 42. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248–254.

43. Bruijn, I.; de Kock, M.J.; Yang, M.; de Waard, P.; van Beek, T.A.; Raaijmakers, J.M. Genome-based discovery, structure prediction and functional analysis of cyclic lipopeptide antibiotics in *Pseudomonas* species. *Mol Microbiol.* 2007, 63(2), 417-28.
44. Bulgari, D.; Montagna, M.; Gobbi, E.; Faoro, F. Green technology: bacteria-based approach could lead to unsuspected microbe–plant–animal interactions. *Microorganisms* 2019, 7, 44.
45. Buschart, A.; Sachs, S.; Chen, X.; Herglotz, J.; Krause, A.; Reinhold-Hurek B. Flagella mediate endophytic competence rather than act as MAMPS in rice-*Azoarcus* sp. strain BH72 interactions. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2012, 25(2), 191-9.
46. Bustin, S.A.; Mueller, R.; Nolan, T. Parameters for successful PCR primer design. *Methods Mol. Biol.* 2020, 2065, 5-22.
47. Chagnot, C.; Zorgani, M.A.; Astruc, T.; Desvaux, M. Proteinaceous determinants of surface colonization in bacteria: bacterial adhesion and biofilm formation from a protein secretion perspective. *Front Microbiol.* 2013, 14; 4, 303.
48. Chandra, H.; Kumari, P.; Bisht, R.; Prasad, R.; Yadav, S. Plant growth promoting *Pseudomonas aeruginosa* from *Valeriana wallichii* displays antagonistic potential against three phytopathogenic fungi. *Mol. Biol. Rep.* 2020, 47, 6015–6026.
49. Chang, W.S.; van de Mortel, M.; Nielsen, L.; de Guzman, G.N.; Li, X.; Halverson, L.J. Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. *J. Bacteriol.* 2007, 189, 8290–8299.
50. Chaouachi, M.; Marzouk, T.; Jallouli, S.; Elkahoui, S.; Gentzbittel, L.; Ben, C.; Djébali, N. Activity assessment of tomato endophytic bacteria bioactive compounds for the postharvest biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Postharvest. Biol. Technol.* 2021, 172, 111389.
51. Chen, L.; Liu, Y.; Wu, G.; Zhang, N.; Shen, Q.; Zhang, R. Beneficial rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 induces plant salt tolerance through spermidine production. *Mol Plant Microbe Interact.* 2017, 30(5), 423-432.
52. Chen, Y.; Zhou, Q.; Strelkov, S.E.; Hwang, S.F. Genetic diversity and aggressiveness of *Fusarium* spp. isolated from canola in alberta, Canada. *Plant. Dis.* 2015, 98, 727–738.
53. Chlebek, D.; Grebtsova, V.; Piński, A.; Žur-Pińska, J.; Hupert-Kocurek, K. Genetic determinants of antagonistic interactions and the response of new endophytic strain *Serratia quinivorans* KP32 to fungal phytopathogens. *Int. J. Mol. Sci.* 2022a, 23, 15561.
54. Chlebek, D.; Płociniczak, T.; Gobetti, S.; Kumor, A.; Hupert-Kocurek, K.; Pacwa-Płociniczak, M. Analysis of the Genome of the Heavy Metal Resistant and Hydrocarbon-Degrading Rhizospheric *Pseudomonas qingdaonensis* ZCR6 Strain and Assessment of Its Plant-Growth-Promoting Traits. *Int. J. Mol. Sci.* 2022b, 23, 214.
55. Chlebek, D.; Pinski, A.; Žur, J.; Michalska, J.; Hupert-Kocurek, K. Genome mining and evaluation of the biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens* BRZ63, a new endophyte of oilseed rape (*Brassica napus* L.) against fungal pathogens. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 8740.
56. Chlebek, D.; Hupert-Kocurek, K. Endophytic bacteria in the phytodegradation of persistent organic pollutions. *Post. Microbiol.* 2019, 1, 70–79.
57. Chlebek D. Ocena potencjału wybranych bakterii endofitycznych do wspomagania procesów fitodegradacji. Praca magisterska. 2018. Katowice, Uniwersytet Śląski.
58. Compant S., Clement Ch., Sessitsch A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol. Biochem.* 2010, 42, 669–678.
59. Compant, S.; Duffy, B.; Nowak, J.; Clément, C.; Barka, E.A. Use of plant growth promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71, 4951–4959.
60. Costa, O.Y.A.; Raaijmakers, J.M.; Kuramae, E.E. Microbial extracellular polymeric substances: ecological function and impact on soil aggregation. *Front. Microbiol.* 2018, 9, 1636.
61. Couillerot, O.; Prigent-Combaret, C.; Caballero-Mellado, J.; Moëgne-Loccoz, Y. *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* 2009, 48(5), 505-12.
62. Coutinho, B. G.; Licastro, D.; Mendonça-Previato, L.; Cámara, M.; Venturi, V. Plant-influenced gene expression in the rice endophyte *Burkholderia kururiensis* M130. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2015, 28, 10–21.
63. D'aes, J., Hua, G. K. H., De Maeyer, K., Pannecoucq, J., Forrez, I., Ongena, M., Dietrich, L. E. P., Thomashow, L. S., Mavrodi, D. V., and Höfte, M. 2011. Biological control of *Rhizoctonia* root rot on bean by phenazine- and cyclic lipopeptide-producing *Pseudomonas* CMR12a. *Phytopathology* 2011, 101:996-1004.
64. D'Alessandro, M.; Erb, M.; Ton, J.; Brandenburg, A.; Karlen, D.; Zopfi, J.; Turlings, T.C.J. Volatiles produced by soil-borne endophytic bacteria increase plant pathogen resistance and affect tritrophic interactions. *Plant Cell Environ.* 2014, 37(4), 813-826.

65. Dalvi, S.M.; Rakh, R.R. Siderophore producing *Pseudomonas* cf. *monteilii* 9 for assured biological control of *Sclerotium rolfsii* causing stem rot of groundnut. *Bioscience Discovery* 2017, 8(3), 546–555.
66. Danese, P.N.; Pratt, L.A.; Kolter, R. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J. Bacteriol.* 2000, 182, 3593–3596.
67. Das, P.; Yang, X.P.; Ma, L.Z. Analysis of biosurfactants from industrially viable *Pseudomonas* strain isolated from crude oil suggests how rhamnolipids congeners affect emulsification property and antimicrobial activity. *Front. Microbiol.* 2014, 5, 696.
68. Daulagala, W.H. Chitinolytic Endophytic Bacteria as Biocontrol Agents for Phytopathogenic Fungi and Nematode Pests: A Review. *Asian J. Res. Bot.* 2021, 5, 14–24.
69. Deivanai, S.; Bindusara, A.S.; Prabhakaran, G.; Bhore, S.J. Culturable bacterial endophytes isolated from mangrove tree (*Rhizophora apiculata* Blume) enhance seedling growth in Rice. *J. Nat. Sci. Biol. Med.* 2014, 5(2), 437–44.
70. Deketelaere, S.; Tyvaert, L.; França, S.D.C.; Höfte, M. Desirable traits of a good biocontrol agent against *Verticillium* Wilt. *Front. Microbiol.* 2017, 8, 1186.
71. Delgado, N.; Olivera, M.; Cádiz, F.; Bravo, G.; Montenegro, I.; Madrid, A.; Fuentealba, C.; Pedreschi, R.; Salgado, E.; Besoain, X. Volatile Organic Compounds (VOCs) produced by *Gluconobacter cerinus* and *Hanseniaspora osmophila* displaying control effect against table grape-rot pathogens. *Antibiotics* 2021, 10, 663.
72. Derbyshire, M.; Denton-Giles, M. The control of sclerotinia stem rot on oilseed rape (*Brassica napus*): current practices and future opportunities. *Plant Pathology* 2016, 65 (6), 859–877.
73. Deveau, A.; Gross, H.; Palin, B.; Mehnaz, S.; Schnepf, M.; Leblond, P.; Dorrestein, P.C. and Aigle, B. Role of secondary metabolites in the interaction between *Pseudomonas fluorescens* and soil microorganisms under iron-limited conditions. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2016, 92, 107.
74. Dhar-Purkayastha, G.; Mangar, P.; Saha, A.; Saha, D. Evaluation of the biocontrol efficacy of a *Serratia marcescens* strain indigenous to tea rhizosphere for the management of root rot disease in tea. *PLoS ONE* 2018, 13, e0191761.
75. Dimkić, I.; Janakiev, T.; Petrović, M.; Degrassi, G.; Fira, D. Plant associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms—A review. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2022, 117, 101754.
76. Dinesh, R.; Anandaraj, M.; Kumar, A.; Bini, Y.K.; Subila, K.P.; Aravind, R. Isolation, characterization, and evaluation of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria for their growth promoting and disease suppressing effects on ginger. *Microbiol. Res.* 2015, 173, 34–43.
77. Dipak, P.; Sankar, S. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KUPSB12 with antibacterial potential from river Ganga, India. *Ann. Agrar. Sci.* 2017, 15, 130–136.
78. Dorjey, S.; Dolkar, D.; Sharma, R. Plant growth promoting rhizobacteria *Pseudomonas*: a review. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 2017, 6(7), 1335–1344.
79. Doty, S.L.; Joubert, P.M.; Firrincieli, A.; Sher, A.W.; Tournay, R.; Kill, C.; Parikh, S.S.; Okubara, P. Potential biocontrol activities of populus endophytes against several plant pathogens using different inhibitory mechanisms. *Pathogens* 2023, 12, 13.
80. Drizou, F.; Graham, N.S.; Bruce, T.J.A. i in. Development of high-throughput methods to screen disease caused by *Rhizoctonia solani* AG 2-1 in oilseed rape. *Plant Methods* 2017, 13, 45.
81. Duan, J.; Jiang, W.; Cheng, Z.; Heikkilä, J.J.; Glick, B.R. The complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. UW4. *PLoS ONE* 2013, 8, e58640.
82. Dubuis, C.; Keel, C.; Haas, D. Dialogues of root-colonizing biocontrol pseudomonads. *Eur. J. Plant Pathol.* 2007, 119, 311–328.
83. Dutta, S.; Yu, S.M.; Lee, Y.H. Assessment of the contribution of antagonistic secondary metabolites to the antifungal and biocontrol activities of *Pseudomonas fluorescens* NBC275. *Plant Pathol. J.* 2020, 36(5), 491–496.
84. Eida, A.A.; Bougouffa, S.; L'Haridon, F.; Alam, I.; Weisskopf, L.; Bajic, V.B.; Saad, M.M.; Hirt, H. Genome insights of the plant-growth promoting bacterium *Cronobacter muytjensii* JZ38 with volatile-mediated antagonistic activity against *Phytophthora infestans*. *Front. Microbiol.* 2020, 11, 369.
85. Eljounaidi, K.; Kyu, S.; Bae, H. Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases—Review and future prospects. *Biol. Control.* 2016, 103, 62–68.
86. Etesami, H.; Alikhani, H.A.; Hosseini, H.M. Indole-3-acetic acid (IAA) production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents. *MethodsX.* 2015, 2, 72–78.
87. Feng, H.; Fu, R.; Hou, X.; Lv, Y.; Zhang, N.; Liu, Y.; Xu, Z.; Miao, Y.; Krell, T.; Shen, Q.; Zhang, R. Chemotaxis of beneficial rhizobacteria to root exudates: the first step towards root–microbe rhizosphere interactions. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 6655.

88. Fernández-Llamosas, H.; Díaz, E.; Carmona, M. Motility, adhesion and c-di-GMP influence the endophytic colonization of rice by *Azoarcus* sp. CIB. Microorganisms. 2021, 8, 9(3), 554.
89. Ferraz, H.G.M.; Resende, R.S.; Moreira, P.C.; Silveira, P.R.; Milagres, E.A.; Oliveira, J.R.; Rodrigues, F.A. Antagonistic rhizobacteria and jasmonic acid induce resistance against tomato bacterial spot. Plant Prot. Sci. 2015, 74, 417–427.
90. Fitzgerald, D.M.; Bonocora, R.P.; Wade, J.T. Comprehensive mapping of the *Escherichia coli* flagellar regulatory network. PLoS Genet. 2014, 2, 10(10), e1004649.
91. Fouts, D.E.; Tyler, H.L.; De Boy, R.T.; Daugherty, S.; Ren, Q.; Badger, J.H.; Durkin, A.S.; Huot, H.; Shrivastava, S.; Kothari, S.; Dodson, R.J.; Mohamoud, Y.; Khouri, H.; Roesch, L.F.; Krogfelt, K.A.; Struve, C.; Triplett, E.W.; Methé, B.A. Complete genome sequence of the N₂-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice. PLoS Genet. 2008, 4(7), e1000141.
92. Fouda A, Eid AM, Elsaied A, El-Belely EF, Barghoth MG, Azab E, Gobouri AA, Hassan SE. Plant growth-promoting endophytic bacterial community inhabiting the leaves of *Pulicaria incisa* (Lam.) DC Inherent to Arid Regions. Plants (Basel). 2021,1;10(1), 76.
93. Fraç, M.; Hannula, E.S.; Belka, M.; Salles, J.F i Jedryczka, M. Soil mycobiome in sustainable agriculture. Front. Microbiol. 2022, 13, 1033824.
94. Freeman, D.J.; Falkiner, F.R.; Keane, C.T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. J. Clin. Pathol. 1989, 42, 872–874.
95. Fu, L.H.; Hu, K.D.; Hu, L.Y.; Li, Y.H.; Hu, L.B.; Yan, H.; Liu, Y.S.; Zhang, H. An antifungal role of hydrogen sulfide on the postharvest pathogens *Aspergillus niger* and *Penicillium italicum*. PLoS ONE. 2014, 9, e104206.
96. Gayathri, S.; Saravanan, D.; Radhakrishnan, M.; Balagurunathan, R.; Kathiresan, K. Bioprospecting potential of fast-growing endophytic bacteria from leaves of mangrove and salt-marsh plant species. Indian Journal of Biotechnology 2010, 9, 397–402.
97. Gebhard, S.; Ekanayaka, N.; Cook, G.M. The low-affinity phosphate transporter PitA is dispensable for *in vitro* growth of *Mycobacterium smegmatis*. BMC Microbiol. 2009, 9, 1–7.
98. Gkarmiri, K.; Finlay, R.D.; Alström, S.; Thomas, E.; Cubeta, M.A.; Högborg, N. Transcriptomic changes in the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani* AG-3 in response to the antagonistic bacteria *Serratia proteamaculans* and *Serratia plymuthica*. BMC Genom. 2015, 16, 630.
99. Gond, S.K.; Bergen, M.S.; Torres, M.S.; White, J.F. Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. Microbiol. Res. 2015. 172:79–87.
100. Goswami, D.; Borah, S.N.; Lahkar, J.; Handique, P.J.; Deka, S. Antifungal properties of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* DS9 against *Colletotrichum falcatum*. J. Basic Microbiol. 2015, 55, 1265–1274.
101. Gómez-Lama Cabanás, C.; Wentzien, N.M.; Zorrilla-Fontanesi, Y.; Valverde-Corredor, A.; Fernández-González, A.J.; Fernández-López, M.; Mercado-Blanco, J. Impacts of the Biocontrol Strain *Pseudomonas simiae* PICF7 on the banana holobiont: alteration of root microbial co-occurrence networks and effect on host defense responses. Front Microbiol. 2022, 15;13, 809126.
102. Gómez-Lama Cabanás, C.; Schilirò, E.; Valverde-Corredor, A.; Mercado-Blanco, J. The biocontrol endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* PICF7 induces systemic defense responses in aerial tissues upon colonization of olive roots. Front Microbiol. 2014, 5, 5, 427.
103. Guitiérrez-Román, M.I.; Holguín-Meléndez, F.; Bello-Mendoza, R.; Guillén-Navarro, K.; Dunn, M.F.; Huerta-Palacios, G. Production of prodigiosin and chitinases by tropical *Serratia marcescens* strains with potential to control plant pathogens. World J. Microbiol. Biotechnol. 2012, 28, 145–153.
104. Guzmán-Guzmán, P.; Santoyo, G. Action mechanisms, biodiversity, and omics approaches in biocontrol and plant growth-promoting *Pseudomonas*: An updated review. Biocontrol Sci. Technol. 2022, 32, 527–550.
105. Hammoudi, O.; Salman, M.; Abuamsha, R.; Ehlers, R. Effectiveness of bacterial and fungal isolates to control *Phoma lingam* on oilseed rape *Brassica napus*. Am. J. Plant. Sci. 2012, 3, 773–779.
106. Han, P.; Liu, T.; Zheng, Y.; Song, R.; Nan, T.; Yang, X.; Huang, L.; Yuan, Y. A mycorrhizal bacteria strain isolated from *Polyporus umbellatus* exhibits broad-spectrum antifungal activity. Front. Plant Sci. 2022, 13, 954160.
107. Hanif, M.K.; Malik, K.A.; Hameed, S.; Saddique, M.J.; Ayesha, Fatima, K.; Naqqash, T.; Majeed. A.; Iqbal, M.J.; Imran, A. Growth stimulatory effect of AHL producing *Serratia* spp. from potato on homologous and non-homologous host plants. Microbiol. Res. 2020, 238, 126506.
108. Hardoim, P.R.; van Overbeek, L.S.; Berg, G.; Pirttilä, A.M.; Compant, S.; Campisano, A.; Döring M.; Sessitsch, A. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2015, 79, 293–320.
109. Hardoim, P.R.; van Overbeek, L.S.; Elsas, J.D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. Trends Microbiol. 2008, 16, 463–471.

110. Harting, R.; Nagel, A.; Nesemann, K.; Höfer, A.M.; Bastakis, E.; Kusch, H.; Stanley, C.E.; Stöckli, M.; Kaever, A.; Hoff, K.J.; Stanke, M.; DeMello, A.J.; Künzler, M.; Haney, C.H.; Braus-Stromeyer, S.A. i Braus, G.H. *Pseudomonas* strains induce transcriptional and morphological changes and reduce root colonization of *Verticillium* spp. *Front. Microbiol.* 2021, 12:652468.
111. Hartney, S.L.; Mazurier, S.; Girard, M.K.; Mehnaz, S.; Davis, E.W.; Gross, H.; Lemanceau, P.; Loper, J.E. Ferric-pyoverdine recognition by Fpv outer membrane proteins of *Pseudomonas protegens* Pf-5. *J. Bacteriol.* 2013, 195(4), 765-76.
112. Hazarika, D.J.; Goswami, G.; Gautom, T.; Parveen, A.; Das, P.; Barooah, M.; Chandra Boro, R. Lipopeptide mediated biocontrol activity of endophytic *Bacillus subtilis* against fungal phytopathogens. *BMC Microbiol.* 2019, 19, 71.
113. He, D.-C.; He, M.-H.; Amalin, D.M.; Liu, W.; Alvindia, D.G.; Zhan, J. Biological control of plant diseases: an evolutionary and eco-economic consideration. *Pathogens* 2021, 10, 1311.
114. Hernández-León, R.; Rojas-Solis, D.; Contreras-Perez, M.; Orozco-Mosqueda, M.D.; Macias-Rodriguez, L.I.; Reyes-de la Cruz, H.; Valencia-Cantero, E.; Santoyo, G. Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biol. Control* 2015, 81, 83–92.
115. Hernández-Salmerón, J.E.; Moreno-Hagelsieb, G.; Santoyo, G. Genome comparison of *Pseudomonas fluorescens* UM270 with related fluorescent strains unveils genes involved in rhizosphere competence and colonization. *J. Genom.* 2017, 5, 91–98.
116. Hetmann, A.; Kowalczyk, S. Membrane receptors recognizing MAMP/PAMP and DAMP molecules that activate first line of defence in plant immune system. *Postepy Biochem.* 2018, 64, 29–45.
117. Hong, C.E; Park, J.M. Endophytic bacteria as biocontrol agents against plant pathogens: Current state-of-the-art. *Plant Biotechnol. Rep.* 2016, 10: 353.
118. Hover, T.; Maya, T.; Ron, S.; Sandovsky, H.; Shadkchan, Y.; Kijner, N.; Mitiagin, Y.; Fichtman, B.; Harel, A.; Shanks, R.M. i in. Mechanisms of bacterial (*Serratia marcescens*) attachment to, migration along, and killing of fungal hyphae. *Appl. Environ. Microbiol.* 2016, 82, 2585–2594.
119. Huerta-Cepas, J.; Szklarczyk, D.; Heller, D.; Hernández-Plaza, A.; Forslund, S.K.; Cook, H.; Mende, D.R.; Letunic, I.; Rattei, T.; Jensen, L.J.; et al. EggNOG 5.0: A hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acid Res.* 2019, 47, 309–314.
120. Imam, S.; Chen, Z.; Roos, D.S.; Pohlschröder, M. Identification of surprisingly diverse type IV pili, across a broad range of gram-positive bacteria. *PLoS One.* 2011, 6(12), e28919.
121. Inoue, H.; Nojima, H.; Okayama, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* 1990, 96(1), 23-8.
122. Jacob, J.; Krishnan, G.V.; Thankappan, D.; Bhaskaran Nair Saraswathy Amma, D.K. *Microbial Endophytes*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2020, 75–105.
123. Jeong, H.; Choi, S.K.; Kloepper J.W.; Ryu, C.M. Genome sequence of the plant endophyte *Bacillus pumilus* INR7, triggering induced systemic resistance in field crops. *Genome Announc.* 2014, 2, e01093.
124. Jha, P.; Panwar, J.; Jha, P.N. Secondary plant metabolites and root exudates: guiding tools for polychlorinated biphenyl biodegradation. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 2015, 12, 789–802.
125. Jiménez, J.A.; Novinscak, A.; Fillion, M. *Pseudomonas fluorescens* LBUM677 differentially increases plant biomass, total oil content and lipid composition in three oilseed crops. *J. Appl. Microbiol.* 2020, 128, 1119–1127.
126. Jin, T.; Ren, J.; Li, Y.; Bai, B.; Liu, R.; Wang, Y. Plant growth-promoting effect and genomic analysis of the *P. putida* LWPZF isolated from *C. japonicum* rhizosphere. *AMB Express.* 2022, 2, 12(1), 101.
127. Jones, J. D. G.; Grady, K. L.; Suslow, T. V.; Bedbrook, J. R. Isolation and characterization of genes encoding two chitinase enzymes from *Serratia marcescens*. *EMBO J* 1986, 467–473.
128. Junaid, J.M.; Dar, N.A.; Bhat, T.A.; Bhat, A.H.; Bhat, M.A. Commercial biocontrol agents and their mechanism of action in the management of plant pathogens. *Int. J. Mod. Plant Anim. Sci.* 2013, 1(2), 39-57.
129. Kamensky, M.; Ovadis, M.; Chet, I.; Chernin, L. Soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases. *Soil Biol. Biochem.* 2003, 35, 323–331.
130. Kandel, S.L.; Firrincieli, A.; Joubert, P.M.; Okubara, P.; Natalie, D.; McGeorge, K.M.; Mugnozza, G.S.; Harfouche, A.; Kim, S.H.; Doty, S.L. An in vitro study of bio-control and plant growth promotion potential of salicaceae endophytes. *Front. Microbiol.* 2017a, 8, 386.
131. Kandel, S.L.; Joubert, P.M.; Doty, S.L. Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. *Microorganisms* 2017b, 5, 77.
132. Kanehisa, M.; Sato, Y.; Kawashima, M.; Furumichi, M.; Tanabe, M. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res.* 2016, 44, D457–D462.

133. Kaneko, T.; Minamisawa, K.; Isawa, T.; Nakatsukasa, H.; Mitsui, H.; Kawaharada, Y.; Nakamura, Y.; Watanabe, A.; Kawashima, K.; Ono, A.; Shimizu, Y.; Takahashi, C.; Minami, C.; Fujishiro, T.; Kohara, M.; Katoh, M.; Nakazaki, N.; Nakayama, S.; Yamada, M.; Tabata, S.; Sato, S. Complete genomic structure of the cultivated rice endophyte *Azospirillum* sp. B510. *DNA Res.* 2010, 17(1), 37–50.
134. Kenawy, A.; Dailin, D. J.; Abo-Zaid, G.; Malek, A.R. i in. Biosynthesis of Antibiotics by PGPR and Their Roles in Biocontrol of Plant Diseases. In: Sayyed R. (eds) *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Sustainable Stress Management*. Microorganisms for Sustainability. Springer, Singapore, 2019, 2 (1), 1–35.
135. Khan, A.R.; Park, G.S.; Asaf, S.; Hong, S.J.; Jung, B.K.; Shin, J.H. Complete genome analysis of *Serratia marcescens* RSC-14: A plant growth-promoting bacterium that alleviates cadmium stress in host plants. *PLoS One.* 2017, 10, 12(2), e0171534.
136. Khan, S.; Afzal, M.; Iqbal, S.; Khan, Q.M. Plant–bacteria partnerships for the remediation of hydrocarbon contaminated soils. *Chemosphere* 2013, 90, 1317–1332.
137. Khare, E.; Mishra, J.; Arora, N. Multifaceted Interactions Between Endophytes and Plant: Developments and Prospects. *Front. Microbiol.* 2018, 9, 2732.
138. Khaskheli, M.A.; Wu, L.; Chen, G.; Chen, L.; Hussain, S.; Song, D.; Liu, S.; Feng, G. Isolation and characterization of root-associated bacterial endophytes and their biocontrol potential against major fungal phytopathogens of rice (*Oryza sativa* L.). *Pathogens* 2020, 9, 172.
139. Kłama J. Współżycie endofitów bakteryjnych z roślinami. *Acta Scientiarum Polonorum seria Agricultura* 2004, 3(1), 19–28.
140. Knights, H.E.; Jorin, B.; Haskett, T.L.; Poole, P.S. Deciphering bacterial mechanisms of root colonization. *Environ Microbiol Rep.* 2021, 13(4), 428–444.
141. Kotowicz, N.K.; Fraç, M.; Lipiec, J. The importance of *Fusarium* fungi in wheat cultivation—pathogenicity and mycotoxins production: A review. *J. Anim. Plant Sci.* 2014, 21, 3326–3343.
142. Köhl, J.; Kolnaar, R.; Ravensberg, W. J. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. *Front. Plant Sci.* 2019, 10, 845.
143. Krasteva, P.V.; Bernal-Bayard, J.; Travier, L. i in. Insights into the structure and assembly of a bacterial cellulose secretion system. *Nat. Commun.* 2017, 8, 2065.
144. Krause, A.; Goesmann, A. i in. Complete genome of the mutualistic, N₂ -fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Nat. Biotechnol.* 2006, 24, 1385–1391.
145. Kshetri, L.; Naseem, F.; Pandey, P. Role of *Serratia* sp. as biocontrol agent and plant growth stimulator, with prospects of biotic stress management in plant. In *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Sustainable Stress Management*. Microorganisms for Sustainability; Sayyed, R., Ed.; Springer: Singapore, 2019; 13, 169–200.
146. Kuddus, S.M.; Ahmad, R.I.Z. Isolation of novel chitinolytic bacteria and production optimization of extracellular chitinase. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 2013, 11, 39–46.
147. Kumar, A.; Radhakrishnan, E.; Droby, S.; Singh, V.; Singh, S.; White, J. Entry, colonization, and distribution of endophytic microorganisms in plants. In *Microbial Endophytes: Functional Biology and Applications*, 1st ed.; Kumar, A., Radhakrishnan, E.K., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridge, UK, 2019a; 1, 1–33.
148. Kumar, A.; Vandana, R.S.; Singh, M.; Pandey, K.D. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). A promising approach to disease management. In *Microbes and Environmental Management*; Studium Press: New Delhi, India, 2019b, 195–209.
149. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018, 35, 1547–1549.
150. Lahlali, R.; Ezrari, S.; Radouane, N.; Kenfaoui, J.; Esmaeel, Q.; El Hamss, H.; Belabess, Z.; Barka, E.A. Biological control of plant pathogens: A global perspective. *Microorganisms* 2022, 10, 596.
151. Lai, X.; Niroula, D.; Burrows, M.; Wu, X.; Yan, Q. Identification and characterization of bacteria-derived antibiotics for the biological control of pea aphanomyces root rot. *Microorganisms* 2022, 10, 1596.
152. Legein, M.; Smets, W.; Vandenheuvel, D.; Eilers, T.; Muyschondt, B.; Prinsen, E.; Samson, R.; Lebeer, S. Modes of action of microbial biocontrol in the phyllosphere. *Front Microbiol.* 2020, 14, 11, 1619.
153. Li, C.H.; Shi, L.; Han, Q.; Hu, H.L.; Zhao, M.W.; Tang, C.M.; Li, S.P. Biocontrol of verticillium wilt and colonization of cotton plants by an endophytic bacterial isolate. *J. Appl. Microbiol.* 2012, 113 (3) 641–51.
154. Li, H.; Parmar, S.; Sharma, V.K.; White, J.F. Seed endophytes and their potential applications. In *Seed Endophytes*; Verma, S.K., White, J.F., Jr., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2019, 35–54.
155. Li, H.B.; Singh, R.K.; Singh, P.; Song, Q.Q.; Xing, Y.X.; Yang, L.T.; Li, Y.R. Genetic diversity of nitrogen-fixing and plant growth promoting *Pseudomonas* species isolated from sugarcane rhizosphere. *Front. Microbiol.* 2017, 8, 1–20.

156. Li, J.; Yang, Y.; Dubern, J.F.; Li, H.; Halliday, N.; Chernin, L.; Gao, K.; Cámara, M.; Liu, X. Regulation of GacA in *Pseudomonas chlororaphis* strains shows a niche specificity. *PLoS ONE* 2015, 10, e0137553.
157. Liu, H.; Carvalhais, L.C.; Crawford, M.; Singh, E.; Dennis, P.G.; Pieterse, C.M.J.; Schenke, P.M. Inner plant values: diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria. *Front. Microbiol.* 2017, 8, 2552.
158. Liu, J. i in. Recent advances in endophytic exopolysaccharides: production, structural characterization, physiological role i biological activity. *Carbohydr. Polym.* 2016, 157, 1113–1124.
159. Liu, X.; Jia, J.; Atkinson, S.; Cámara, M.; Gao, K.; Li, H.; Cao, J. Biocontrol potential of an endophytic *Serratia* sp. G3 and its mode of action. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 26, 1465–1471.
160. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 2001, 25, 402–408.
161. Loper, J.E.; Kobayashi, D.Y.; Paulsen, I.T. The genomic sequence of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5: Insights into biological control. *Phytopathology* 2007, 97, 233–238.
162. Lopes, R.; Cerdeira, L.; Tavares, G.S.; Ruiz, J.C.; Blom, J.; Horácio, E.C.A.; Mantovani, H.C.; Queiroz, M.V. Genome analysis reveals insights of the endophytic *Bacillus toyonensis* BAC3151 as a potentially novel agent for biocontrol of plant pathogens. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2017, 33(10), 185.
163. Lorck H. Production of Hydrocyanic Acid by Bacteria. *Physiologia Plantarum* 2006, 1(2), 142 – 146.
164. Ludueña, L.M.; Anzuay, M.S.; Angelini, J.G.; McIntosh, M.; Becker, A.; Rupp, O.; Goesmann, A.; Blom, J.; Fabra, A.; Taurian, T. Genome sequence of the endophytic strain *Enterobacter* sp. J49, a potential biofertilizer for peanut and maize. *Genomics.* 2019, 111(4), 913-920.
165. Mai, M.; Ghanem A.L. *Serratia* A novel source of secondary metabolites. *Adv. in Biotech. and Microbiol.* 2016, 11 (3).
166. Maleki, S.; Almaas, E.; Zotchev, S.; Valla, S.; Ertesvåg, H. Alginate biosynthesis factories in *Pseudomonas fluorescens*: Localization and correlation with alginate production level. *Appl. Environ. Microbiol.* 2016, 82, 41227–41236.
167. Marques-Pereira, C.; Proença, D.N.; Morais, P.V. Genome sequences of *Serratia* strains revealed common genes in both serratomolides gene clusters. *Biology* 2020, 9, 482.
168. Marshall, D.C.; Arruda, B.E.; Silby, M.W. Alginate genes are required for optimal soil colonization and persistence by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Access Microbiol.* 2019, 3, 1(3), e000021.
169. Martínez-García, P.M.; Ruano-Rosa, D.; Schilirò, E.; Prieto, P.; Ramos, C.; Rodríguez-Palenzuela, P. Complete genome sequence of *Pseudomonas fluorescens* strain PICF7, an indigenous root endophyte from olive (*Olea europaea* L.) and effective biocontrol agent against *Verticillium dahliae*. *Stand. Genomic Sci.* 2015, 10, 10.
170. Marzouk, T.; Chaouachi, M.; Sharma, A.; Jallouli, S.; Mhamdi, R.; Kaushik, N.; Djébal, N. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* using volatile organic compounds of solanaceae seed-borne endophytic bacteria. *Postharvest Biol. Technol.* 2021, 181, 111655.
171. Massawe, V.C.; Hanif, A.; Farzand, A.; Mburu, D.K.; Ochola, S.O.; Wu, L.; Tahir, H.A.S.; Gu, Q.; Wu, H.; Gao, X. Volatile compounds of endophytic *Bacillus* spp. have biocontrol activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology.* 2018, 108 (12), 1373-1385.
172. Matilla, M.A.; Nogellova, V.; Morel, B.; Krell, T.; Salmond, G.P. Biosynthesis of the acetyl-CoA carboxylase-inhibiting antibiotic, andrimid in *Serratia* is regulated by Hfq and the LysR-type transcriptional regulator, AdmX. *Environ. Microbiol.* 2016, 18, 3635–3650.
173. Matilla, M.A., Espinosa-Urgel, M., Rodríguez-Herva, J.J. i in. Genomic analysis reveals the major driving forces of bacterial life in the rhizosphere. *Genome Biol.* 2007, 8, R179.
174. Mavrodi, O. V i in., 2001. Genetic diversity of *phlD* from 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 2001, 91(1), 35–43.
175. Meneses, C.H.S.G.; Rouws, L.F.M.; Simoes-Araujo, J.L.; Vidal, M.S.; Baldani, J.I. Exopolysaccharide production is required for biofilm formation and plant colonization by the nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 2011, 24, 1448–1458.
176. Mengistu A.A. Endophytes: colonization, behaviour, and their role in defense mechanism. *Int. J. Microbiol.* 2020, 30, 6927219.
177. Mercado-Blanco, J., Lugtenberg, B.J.J. Biotechnological applications of bacterial endophytes. *Current Biotech.* 2014, 3, 60-75.
178. Mercado-Blanco, J.; Rodríguez-Jurado, D.; Hervás, A.; Jiménez-Díaz, R.M. Suppression of *Verticillium* wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. *Biol. Control* 2004, 30, 474–486.
179. Miller, B.R.; Gulick, A.M. Structural biology of nonribosomal peptide synthetases. *Methods Mol. Biol.* 2016, 1401, 3-29.

180. Montes-Osuna, N.; Gómez-Lama Cabanás, C.; Valverde-Corredor, A.; Berendsen, R.L.; Prieto, P.; Mercado-Blanco, J. Assessing the involvement of selected phenotypes of *Pseudomonas simiae* PICF7 in olive root colonization and biological control of *Verticillium dahliae*. *Plants* 2021, 10, 412.
181. Morales-Cedeño, L.R.; Orozco-Mosqueda, M.D.C.; Loeza-Lara, P.D.; Parra-Cota, F.I.; de Los Santos-Villalobos, S.; Santoyo, G. Plant growth-promoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre- and post-harvest diseases: Fundamentals, methods of application and future perspectives. *Microbiol Res.* 2021, 242, 126612.
182. Moura, G.G.D.; Barros, A.V.; Machado, F.; Martins, A.D.; Silva, C.M.D.; Durango, L.G.C.; Forim, M.; Alves, E.; Pasqual, M.; Doria, J. Endophytic bacteria from strawberry plants control gray mold in fruits via production of antifungal compounds against *Botrytis cinerea* L. *Microbiol Res.* 2021, 251, 126793.
183. Mousa, W.K.; Raizada, M.N. Biodiversity of genes encoding anti-microbial traits within plant associated microbes. *Front. Plant Sci.* 2015, 6:231.
184. Muniswamy, D.; Krishna, P.M.; Sangeetha, J. Elucidation of impact of heavy metal pollution on soil bacterial growth and extracellular polymeric substances flexibility. *3 Biotech.* 2016, 6, 172.
185. Nachin, L.; Nannmark, U.; Nyström, T. Differential roles of the universal stress proteins of *Escherichia coli* in oxidative stress resistance, adhesion, and motility. *J. Bacteriol.* 2005, 187 6265–6272.
186. Nagarajkumar, M.; Bhaskaran, R.; Velazhahan, R. Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *Microbiol. Res.* 2004, 159, 73–81.
187. Narayanan, Z.; Glick, B.R. Secondary metabolites produced by plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microorganisms* 2022, 10, 2008.
188. Nascimento, F.X.; Urón, P.; Glick, B.R.; Giachini, A.; Rossi, M.J. Genomic analysis of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-producing *Pseudomonas thivervalensis* SC5 reveals its multifaceted roles in soil and in beneficial interactions with plants. *Front. Microbiol.* 2021, 12, 752288.
189. Nascimento, F.; Vicente, C.; Cock, P.; Tavares, M.; Rossi, M.; Hasegawa, K.; Mota, M. From plants to nematodes: *Serratia grimesii* BXF1 genome reveals an adaptation to the modulation of multi-species interactions. *Microb. Genom.* 2018, 4, e000178.
190. Naveed, M.; Mitter, B.; Yousaf, S.; Pastar, M.; Afzal, M.; Sessitsch, A. The endophyte *Enterobacter* sp. FD17: A maize growth enhancer selected based on rigorous testing of plant beneficial traits and colonization characteristics. *Biol. Fertil. Soils* 2014, 50, 249–262.
191. Nelkner, J.; Tejerizo, G.T.; Hassa, J.; Lin, T.W.; Witte, J.; Verwaaijen, B.; Winkler, A.; Bunk, B.; Spröer, C.; Overmann, J.; et al. Genetic potential of the biocontrol agent *Pseudomonas brassicacearum* (formerly *P. trivialis*) 3Re2-7 unraveled by genome sequencing and mining, comparative genomics and transcriptomics. *Genes* 2019, 10, 601.
192. Neseemann, K.; Braus-Stromeier, S.A.; Harting, R.; Höfer, A.; Kusch, H.; Ambrosio, A.B.; Braus, G.H. Fluorescent pseudomonads pursue media-dependent strategies to inhibit growth of pathogenic *Verticillium* fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018, 102, 817–831.
193. Neupane, S.; Goodwin, L.A.; Högberg, N.; Kyripides, N.C.; Alström, S.; Bruce, D.; Quintana, B.; Munk, C.; Daligault, H.; Teshima, H.; i in. Non-contiguous finished genome sequence of plant-growth promoting *Serratia proteamaculans* S4. *Stand. Genom. Sci.* 2013, 8, 441–449.
194. Nigris, S.; Baldan, E.; Tondello, A.; Zanella, F.; Vitulo, N.; Favaro, G.; Marcato, S. Biocontrol traits of *Bacillus licheniformis* GL174, a culturable endophyte of *Vitis vinifera* cv. Glera. *BMC Microbiol.* 2018, 18, 133.
195. Niu, H.; Sun, Y.; Zhang, Z.; Zhao, D.; Wang, N.; Wang, L.; Guo, H. The endophytic bacterial entomopathogen *Serratia marcescens* promotes plant growth and improves resistance against *Nilaparvata lugens* in rice. *Microbiol. Res.* 2022, 256, 126956.
196. Olson A., Aerts A., Asiegbu F. i in. Insight into trade-off between wood decay and parasitism from the genome of a fungal forest pathogen. *New Phytologist.* 2012, 194(4), 1001- 1013.
197. Oni, F.E.; Esmaeel, Q.; Onyeka, J.T.; Adeleke, R.; Jacquard, C.; Clement, C.; Gross, H.; Barka, E.A.; Höfte, M. *Pseudomonas* lipopeptide-mediated biocontrol: chemotaxonomy and biological activity. *Molecules* 2022, 27, 372.
198. Ons, L.; Bylemans, D.; Thevissen, K.; Cammue, B.P.A. Combining biocontrol agents with chemical fungicides for integrated plant fungal disease control. *Microorganisms.* 2020, 4, 8(12), 1930.
199. Oso, S.; Walters, M.; Schlechter, R.O.; Remus-Emsermann, M.N.P. Utilisation of hydrocarbons and production of surfactants by bacteria isolated from plant leaf surfaces. *FEMS Microbiol. Lett.* 2019, 366, fnz061.

200. Pal, G.; Kumar, K.; Verma, A.; Verma, S.K. Seed inhabiting bacterial endophytes of maize promote seedling establishment and provide protection against fungal disease. *Microbiol Res.* 2021 Nov 24, 255, 126926.
201. Palmieri, D.; Ianiri, G.; Del Grosso, C.; Barone, G.; De Curtis, F.; Castoria, R.; Lima, G. Advances and perspectives in the use of biocontrol agents against fungal plant diseases. *Horticultrae* 2022, 8, 577.
202. Pan, D.; Mionetto, A.; Tiscornia, S.; Bettucci, L. Endophytic bacteria from wheat grain as biocontrol agents of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol production in wheat. *Mycotoxin Res.* 2015, 31(3), 137-43.
203. Pande, A.; Pandey, P.; Mehra, S.; Singh, M.; Kaushik, S. Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 2017, 15, 379–391.
204. Pankiewicz, V.C.; Camilios-Neto, D.; Bonato, P.; Balsanelli, E.; Tadra-Sfeir, M.Z.; Faoro, H.; Monteiro, R.A. RNA-seq transcriptional profiling of *Herbaspirillum seropedicae* colonizing wheat (*Triticum aestivum*) roots. *Plant. Mol. Biol.* 2016, 90, 589–603.
205. Patel, T.K.; Williamson, J.D. Mannitol in plants, fungi i plant–fungal interactions. *Trends Plant Sci.* 2016, 21(6), 1–12.
206. Pawlik, M.; Piotrowska-Seget, Z. Endophytic bacteria associated with *Hieracium piloselloides*: Their potential for hydrocarbon-utilizing and plant growth-promotion. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 2015, 78, 860–870.
207. Petersen, L.M.; Tisa, L.S. Friend or foe? A review of the mechanisms that drive *Serratia* towards diverse lifestyles. *Can J Microbiol.* 2013, 59(9), 627-40.
208. Pikovskaya, R.I. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Microbiology* 1948, 17, 362–370.
209. Pinski, A.; Betekhtin, A.; Hupert-Kocurek, K.; Mur, L.A.J.; Hasterok, R. Defining the Genetic Basis of Plant–Endophytic Bacteria Interactions. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 1947.
210. Piński, A.; Hupert-Kocurek K. Genetyczne podłoże oddziaływań bakterii endofitycznych z roślinami. *Post. Mikrobiol.* 2016, 55, 404-412.
211. Pisarska, K.; Pietr, S.J. Bakterie endofityczne – ich pochodzenie i interakcje z roślinami. *Post. Mikrobiol.* 2014, 50, 141-151.
212. Popova, A.A.; Koksharova, O.A.; Lipasova, V.A.; Zaitseva, J.V.; Katkova-Zhukotskaya, O.A.; Eremina, S.I.; Mironov, A.S.; Chernin, L.S.; Khmel, I.A. Inhibitory and toxic effects of volatiles emitted by strains of *Pseudomonas* and *Serratia* on growth and survival of selected microorganisms, *Caenorhabditis elegans*, and *Drosophila melanogaster*. *Biomed. Res. Int.* 2014, 125704.
213. Purushotham, P.; Arun, P.V.; Prakash, J.S.; Podile, A.R. Chitin binding proteins act synergistically with chitinases in *Serratia proteamaculans* 568. *PLoS ONE* 2012, 7, e36714.
214. Pusztahelyi T., Holb I. J., Pócsi I. Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Front. Plant Sci.* 2015, 6, 573.
215. Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., De Nybroe, O., and Ongena, M. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol.* 2010, 34, 1037–1062.
216. Raaijmakers, J.M.; Paulitz, T.C.; Steinberg, C.; Alabouvette, C.; Moëgne-Loccoz, Y. The rhizosphere: A playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* 2009, 321, 341–361.
217. Raaijmakers, J. M.; De Bruijn, I.; De Kock, M. J. D. Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity activity, biosynthesis, and regulation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2006, 19, 699–710.
218. Rajesh, P.S.; Rai, V.R. Molecular identification of *aiiA* homologous gene from endophytic *Enterobacter* species and in silico analysis of putative tertiary structure of AHL-lactonase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014, 3, 443(1), 290-5.
219. Ramli, N. R.; Mohamed, M. S.; Seman, I. A.; Zairun, M. A.; Mohamad, N. The potential of endophytic bacteria as a biological control agent for *Ganoderma* disease in oil palm. *Sains Malaysiana* 2016, 45(3), 401 -409.
220. Rangel de Souza, A.L.S.; De Souza, S.A.; De Oliveira, M.V.V.; Ferraz, T.M.; Figueiredo, F.A.M.M.A.; Da Silva, N.D. Endophytic colonization of *Arabidopsis thaliana* by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and its effect on plant growth promotion, plant physiology, and activation of plant defense. *Plant Soil* 2016, 399(1), 257–270.
221. Recinos, D.A.; Sekedat, M.D.; Hernandez, A.; Cohen, T.S.; Sakhtah, H.; Prince, A.S.; Price-Whelan A, Dietrich LE. Redundant phenazine operons in *Pseudomonas aeruginosa* exhibit environment-dependent expression and differential roles in pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012, 20, 109(47), 19420-5.

- 222.Redondo-Nieto, M.; Barret, M.; Morrissey, J.; Germaine, K.; Martínez-Granero, F.; Barahona, E.; Dowling, D. Genome sequence reveals that *Pseudomonas fluorescens* F113 possesses a large and diverse array of systems for rhizosphere function and host interaction. *BMC Genom.* 2013, 14, 54.
- 223.Reinhold-Hurek, B., Hurek T. Living inside plants: bacterial endophytes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2011, 14, 435–443.
- 224.Reinhold-Hurek, B.; Maes, T.; Gemmer, S.; Van-Montagu, M.; Hurek, T. An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not-cellulose-metabolizing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2006;19 (2), 181-8.
- 225.Rokni-Zadeh, H.; Mangas-Losada, A.; De Mot, R. PCR detection of novel non-ribosomal peptide synthetase genes in lipopeptide-producing *Pseudomonas*. *Microb Ecol.* 2011, 62(4), 941-7.
- 226.Rosenblueth, M., Martínez-Romero, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. Plant-Microbe Interact* 2006, 19, 827–837.
- 227.Rudrappa, T.; Splaine, R.E.; Biedrzycki, M.L.; Bais, H.P. Cyanogenic pseudomonads influence multitrophic interactions in the rhizosphere. *PLoS ONE* 2008, 3, e2073
- 228.Ryan R.P., Germaine K., Franks A., Ryan D.J., Dowling D.N. 2008. Bacterial endophytes: Recent developments and applications. *FEMS Microbiol. Lett.* 278, 1-9.
- 229.Saha, R.; Saha, N.; Donofrio, R.S.; Bestervelt, L.L. Microbial siderophores: A mini review. *J. Basic Microbiol.* 2013, 53, 303–317.
- 230.Sakuraoka R, Suzuki T, Morohoshi T. Distribution and genetic diversity of genes involved in quorum sensing and prodigiosin biosynthesis in the complete genome sequences of *Serratia marcescens*. *Genome Biol. Evol.* 2019, 1;11 (3), 931-936.
- 231.Sandhya, V.; Shrivastava, M.; Ali, S.Z.; Prasad, V.S.S.K. Endophytes from maize with plant growth promotion and biocontrol activity under drought stress. *Russ. Agric. Sci.* 2017, 43, 22–34.
- 232.Santoyo, G.; Moreno-Hagelsieb, G.; Orozco-Mosqueda, M.C.; Glick, B.R. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol. Res.* 2016, 183, 92–99.
- 233.Saraf, M.; Pandya, U.; Thakkar, A. Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens. *Microbiol. Res.* 2014, 169, 18–29.
- 234.Savary, S.; Willocquet, L.; Pethybridge, S. J.; Esker, P.; McRoberts, N.; Nelson, A. Assessing the global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecol. Evol.* 2019, 3, 430–439.
- 235.Sayyed, R.Z.; Patel, P.R. Biocontrol potential of siderophore producing heavy metal resistant *Alcaligenes* sp. and *Acinetobacter* sp. vis-à-vis organophosphorus fungicide. *Indian J. Microbiol.* 2011, 51(3), 266-272.
- 236.Schiessl, K.T.; Janssen, E.M.; Kraemer, S.M.; McNeill, K.; Ackermann, M. Magnitude and mechanism of siderophore-mediated competition at low iron solubility in the *Pseudomonas aeruginosa* pyochelin system. *Front. Microbiol.* 2017, 8, 1964.
- 237.Schmidt, C.S.; Mrnka, L.; Lovecká, P. i in. Bacterial and fungal endophyte communities in healthy and diseased oilseed rape and their potential for biocontrol of *Sclerotinia* and *Phoma* disease. *Sci. Rep.* 2021, 11, 3810.
- 238.Schulz-Bohm, K.; Gerards, S.; Hundscheid, M., Melenhorst, J.; de Boer W.; Garbeva, P. Calling from distance: attraction of soil bacteria by plant root volatiles. *ISME J.* 2018, 12(5), 1252-1262.
- 239.Schwyn, B.; Neilands, J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 1987, 160, 47–56.
- 240.Selim, H.M.; Gomaa, N.M.; Essa, A.M. Antagonistic effect of endophytic bacteria against some phytopathogens. *Egypt J. Bot.* 2016, 1, 74–81.
- 241.Seneviratne, G.; Weerasekara, M.L.M.A.W.; Seneviratne, K.A.C.N.; Zavahir, J.S.; Kecskes, M.L.; Kennedy, I.R. Importance of Biofilm Formation in Plant Growth Promoting Rhizobacterial Action. *Plant Growth and Health Promoting Bacteria. Microbiology Monographs; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2011; Volume 18, pp. 81–95.*
- 242.Seneviratne, G.; Thilakarathne, R.; Jayasekara, A.; Seneviratne, K.; Padmathilake, K.; De Silva, M. Developing beneficial microbial biofilms on roots of non-legumes: a novel biofertilizing technique. In: Khan, M., Zaidi, A., Musarrat, J. (eds) *Microbial Strategies for Crop Improvement.* Springer, Berlin, Heidelberg, 2009.
- 243.Serafim, B.; Bernardino, A.R.; Freitas, F.; Torres, C.A.V. Recent developments in the biological activities, bioproduction, and applications of *Pseudomonas* spp. phenazines. *Molecules* 2023, 28, 1368.
- 244.Sessitsch, A.; Hardoim, P.; Döring, J.; Weilharter, A.; Krause, A.; Woyke, T.; Mitter, B.; Hauberg-Lotte, L.; Friedrich, F.; Rahalkar, M.; Hurek, T.; Sarkar, A.; Bodrossy, L.; van Overbeek, L.; Brar, D.; van Elsas, J.D.; Reinhold-Hurek, B. Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomics analysis. *Mol Plant-Microbe Interact.* 2012, 25, 28–36.
- 245.Shanmugaiah, V.; Nithya, K.; Harikrishnan, H.; Jayaprakashvel, M.; Balasubramanian, N. Biocontrol mechanisms of siderophores against bacterial plant pathogens. In *Sustainable*

- Approaches to Controlling Plant Pathogenic Bacteria, 1st ed.; Kannan, V.R., Bastas, K.K., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2015; 167–190.
246. Sharma, A.; Johri, B.N. Growth promoting influence of siderophore producing *Pseudomonas* strains GRP3A and PRS9 in maize (*Zea mays* L.) under iron limiting conditions. *Microbiol. Res.* 2003, 158, 243–248.
 247. Sharma, M.; Saleh, D.; Charron, J.-B.; Jabaji, S. A crosstalk between *Brachypodium* root exudates, organic acids, and *Bacillus velezensis* B26, a growth promoting bacterium. *Front. Microbiol.* 2020, 11, 575578.
 248. Sharma, S.B.; Sayyed, R.Z.; Trivedi, M.H.; Gobi, T.A. Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springerplus* 2013, 2, 587–600.
 249. Shehata, H.R.; Ettinger, C.L.; Eisen, J.A.; Raizada, M.N. Genes required for the anti-fungal activity of a bacterial endophyte isolated from a corn landrace grown continuously by subsistence farmers since 1000 BC. *Front. Microbiol.* 2016, 7, 1548.
 250. Sheibani-Tezerji, R.; Rattei, T.; Sessitsch, A.; Trognitz, F.; Mitter, B. Transcriptome profiling of the endophyte *Burkholderia phytofirmans* PsJN indicates sensing of the plant environment and drought stress. *mBio* 2016, 6, e00621-15.
 251. Siala, R.; Chobba, I.B.; Vallaey, T.; Triki, M.A.; Jrad, M.; Cheffi, M.; Ayedi, I.; Elleuch, A.; Nems, A.; Cerqueira, F. i in. Analysis of the cultivable endophytic bacterial diversity in the date palm (*Phoenix dactylifera* L.) and evaluation of its antagonistic potential against pathogenic *Fusarium* species that cause date palm bayound disease. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 2016, 4, 93–104.
 252. Simoes L.C., Simoes M., Vieira M.J. Biofilm interactions between distinct bacterial genera isolated from drinking water. *Appl Environ Microbiol.* 2007, 73, 6192-6200.
 253. Singh, D.P.; Gupta, V.K.; Prabha, R. *Microbial Interventions in Agriculture and Environment: Rhizosphere, Microbiome and Agro-Ecology*; Springer: Singapore, 2019.
 254. Singh, P.; Singh, R.K.; Zhou, Y.; Wang, J.; Jiang, Y.; Shen, N.; Wang, Y.; Yang, L.; Jiang, M. Unlocking the strength of plant growth promoting *Pseudomonas* in improving crop productivity in normal and challenging environments: A review. *J. Plant Interact.* 2022, 17, 220–238.
 255. Singh, P.; Singh, R.K.; Guo, D.J.; Sharma, A.; Singh, R.N.; Li, D.P.; Malviya, M.K.; Song, X.P.; Lakshmanan, P.; Yang, L.T.; Li, Y.R. Whole genome analysis of sugarcane root-associated endophyte *Pseudomonas aeruginosa* B18-A plant growth-promoting bacterium with antagonistic potential against *Sporisorium scitamineum*. *Front. Microbiol.* 2021, 5, 12, 628376.
 256. Soenens, A.; Imperial, J. Biocontrol capabilities of the genus *Serratia*. *Phytochem. Rev.* 2020, 19, 577–587.
 257. Solanki, M.K.; Robert, A.S.; Singh, R.K.; Kumar, S.; Pandey, A.K.; Srivastava, A.K.; Arora, D.K. Characterization of mycolytic enzymes of *Bacillus* strains and their bio-protection role against *Rhizoctonia solani* in tomato. *Curr. Microbiol.* 2012, 65, 330–336.
 258. Someya, N.; Nakajima, M.; Watanabe, K.; Hibi, T.; Akutsu, K. Potential of *Serratia marcescens* strain B2 for biological control of rice sheath blight. *Biocontrol Sci. Technol.* 2005, 15, 105–109.
 259. Stepanović, S.; Vukovic, D.; Hola, V.; Di Bonaventura, G.; Djukic, S.; Cirkovic, I.; Ruzicka, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 2007, 115, 891–899.
 260. Strano, C.P.; Bella, P.; Licciardello, G.; Caruso, A.; Catara, V. Role of secondary metabolites in the biocontrol activity of *Pseudomonas corrugata* and *Pseudomonas mediterranea*. *EUROPEAN JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY*, 2017, 149(1), 103-115.
 261. Straub, D.; Rothballer, M.; Hartmann, A.; Ludewig, U. The genome of the endophytic bacterium *H. frisingense* GSF30T identifies diverse strategies in the *Herbaspirillum* genus to interact with plants. *Front. Microbiol.* 2013, 4, 168.
 262. Su, C.; Xiang, Z.; Liu, Y.; Zhao, X.; Sun, Y.; Li, Z.; Li, L.; Chang, F.; Chen, T.; Wen, X. i in. Analysis of the genomic sequences and metabolites of *Serratia surfactantfaciens* sp. nov. YD25T that simultaneously produces prodigiosin and serrawettin W2. *BMC Genom.* 2016, 17, 865.
 263. Suchorzyńska, M.; Misiewicz, A. Mikotoksynotwórcze grzyby fitopatogeniczne z rodzaju *Fusarium* i ich wykrywanie technikami PCR. *Postep. Mikrobiol.* 2009, 48, 221–230.
 264. Sun, H.; Feng, J.; Liang, Y.; Wang, Z.; Wang, T. Application of omics approaches in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Chin. J. Biotechnol.* 2019, 35(4), 589-597.
 265. Suryadi, Y.; Susilowati, D.N.; Fauziah, F. Management of plant diseases by PGPR-mediated induced resistance with special reference to tea and rice crops. *Plant. Growth Promot. Rhizobacteria Sustain. Stress Manag.* 2019, 65–110.
 266. Syamala, M.; Sivaji, M. Functional characterization of various plant growth promoting activity of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* from *Aloe vera* rhizosphere. *J. Pharmacogn. Phytochem.* 2017, 6, 120–122.

267. Szilagyi-Zecchin, V.J.; Ikeda, A.C.; Hungria, M.; Adamoski, D.; Kava-Cordeiro, V.; Glienke, C.; Galli-Terasawa, L.V. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. *AMB Express* 2014, 7, 26.
268. Taghadosi, R.; Shakibaie, M.R.; Masoumi, S. Biochemical detection of N-Acyl homoserine lactone from biofilm-forming uropathogenic *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection samples. *Rep. Biochem. Mol. Biol.* 2015, 3, 56–61.
269. Taghavi, S.; Garafola, C.; Monchy, S.; Newman, L.; Hoffman, A.; Weyens, N.; Barac, T.; Vangronsveld, J.; van der Lelie, D. Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009, 75, 748–757.
270. Talavera, G.; Castresana, J. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Syst. Biol.* 2007, 56, 564–577.
271. Tan, D.; Fu, L.; Han, B.; Sun, X.; Zheng, P.; Zhang, J. Identification of an Endophytic Antifungal Bacterial Strain Isolated from the Rubber Tree and Its Application in the Biological Control of Banana Fusarium Wilt. *PLoS One.* 2015, 2, 10(7), e0131974.
272. Taylor, S.; Wakem, M.; Dijkman, G.; Alsarraj, M.; Nguyen, M. A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* 2010, 50, S1–S5.
273. Tewari, S., Shrivastava, V. L., Hariprasad, P., and Sharma, S. Harnessing endophytes as biocontrol agents. In: *Plant Health Under Biotic Stress*. Singapore: Springer. 2018.
274. Thrane, C.; Nielsen, M.N.; Sørensen, J.; Olsson, S. *Pseudomonas fluorescens* DR54 reduces sclerotia formation, biomass development, and disease incidence of *Rhizoctonia solani* causing damping-off in sugar beet. *Microb Ecol.* 2001, 42(3), 438–445.
275. Thrane, C.; Harder Nielsen, T.; Neendam Nielsen M.; Sørensen, J.; Olsson, S. Viscosinamide-producing *Pseudomonas fluorescens* DR54 exerts a biocontrol effect on *Pythium ultimum* in sugar beet rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol.* 2000, 1, 33(2), 139–146.
276. Tiwari, M.; Srivastava, S.; Singh, P.C.; Mishra, A.K.; Chakrabarty, D. Functional characterization of tau class glutathione-S-transferase in rice to provide tolerance against sheath blight disease. *3 Biotech.* 2020, 10(3), 84.
277. Toffolatti, S.L.; Maffi, D.; Serrati, L.; Vercesi, A. Histological and ultrastructural studies on the curative effects of mandipropamid on *Plasmopara viticola*. *J. Phytopathol.* 2010, 159, 201–207.
278. Tovi, N.; Frenk, S.; Hadar, Y.; Minz, D. Host specificity and spatial distribution preference of three *Pseudomonas* isolates. *Front. Microbiol.* 2019, 9, 3263.
279. Trippe, K.; McPhail, K.; Armstrong, D.; Azevedo, M.; Banowetz, G. *Pseudomonas fluorescens* SBW25 produces furanomycin, a non-proteinogenic amino acid with selective antimicrobial properties. *BMC Microbiol.* 2013, 13, 111.
280. Trunk, K.; Peltier, J.; Liu, Y.C.; Dill, B.D.; Walker, L.; Gow, N.A.R.; Stark, M.J.R.; Quinn, J.; Strahl, H.; Trost, M.; et al. The type VI secretion system deploys antifungal effectors against microbial competitors. *Nat. Microbiol.* 2018, 3, 920–931.
281. Tsalgatidou, P.C.; Thomloui, E.-E.; Nifakos, K.; Delis, C.; Venieraki, A.; Katinakis, P. *Calendula officinalis*—A Great Source of Plant Growth Promoting Endophytic Bacteria (PGPEB) and Biological Control Agents (BCA). *Microorganisms* 2023, 11, 206.
282. Tuleski, T.R., Baura, V.A.d., Donatti, L. i in. Cellulose production increases sorghum colonization and the pathogenic potential of *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1. *Sci. Rep.* 2009, 9, 4041.
283. Vandana, U.K.; Rajkumari, J.; Singha, L.P.; Satish, L.; Alavilli, H.; Sudheer, P.D.V.N.; Chauhan, S.; Ratnala, R.; Satturu, V.; Mazumder, P.B.; Pandey, P. The endophytic microbiome as a hotspot of synergistic interactions, with prospects of plant growth promotion. *Biology* 2021, 10, 101.
284. Vanitha, S.; Ramjagathesh, R. Bio Control Potential of *Pseudomonas fluorescens* against Coleus Root Rot Disease. *J. Plant. Pathol. Microb.* 2014, 5, 216.
285. Vaughan, A.L.; Altermann, E.; Glare, T.R.; Hurst, M.R. Genome sequence of the entomopathogenic *Serratia entomophila* isolate 626 and characterisation of the species specific itaconate degradation pathway. *BMC Genom.* 2022, 23, 728.
286. Verma, S.K.; Kingsley, K.L.; Bergen, M.S.; Kowalski, K.P.; White, J.F. Fungal disease prevention in seedlings of rice (*Oryza sativa*) and other grasses by growth-promoting seed-associated endophytic bacteria from invasive *Phragmites australis*. *Microorganisms* 2018, 6, 21.
287. Vicente, C.S.; Nascimento, F.X.; Ikuyo, Y.; Cock, P.J.; Mota, M.; Hasegawa, K. The genome and genetics of a high oxidative stress tolerant *Serratia* sp. LCN16 isolated from the plant parasitic nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *BMC Genomics.* 2016, 23, 17, 301.
288. Vijayalakshmi, R.; Kairunnisa, K.; Sivvaswamy, S.N.; Dharan, S.; Nataranjan, S. Enzyme production and antimicrobial activity of endophytic bacteria isolated from medicinal plants. *Indian J. Sci. Technol.* 2016, 9, 1–8.
289. Vinayarani, G.; Prakash, H.S. Growth promoting rhizospheric and endophytic bacteria from *Curcuma longa* L. as biocontrol agents against rhizome rot and leaf blight diseases. *Plant. Pathol. J.* 2018, 3, 218–235.

290. Vleeschauwer, D.; Höfte, M. Using *Serratia plymuthica* to control fungal pathogens of plant. CAB Rev. 2007, 2, 46.
291. Waghunde, R.R.; Shelake, R.M.; Shinde, M.S.; Hayashi, H. Endophyte microbes: a weapon for plant health management. In: Panpatte DG, Jhala Y, Vyas R, Shelat H (eds) Microorganisms for Green Revolution. Springer, Singapore, 2017, 303–325.
292. Wang, H.; Cai, X.Y.; Xu, M.; Tian, F. Enhanced biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt by combined application of new antagonistic bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* B2 and phenolic acid-degrading fungus *Pleurotus ostreatus* P5. Front Microbiol. 2021, 24, 12, 700142.
293. Wang, M.; Xing, Y.; Wang, J.; Xu, Y.; Wang, G. The role of the *chi1* gene from the endophytic bacteria *Serratia proteamaculans* 336x in the biological control of wheat take-all. Can. J. Microbiol. 2014, 60, 533–540.
294. Wang, M.; Zhang, L.; Liu, Y.; Wang, J.F.; Zhang, Y.; He, J.; Wang, G. Chemotaxis of endophytic bacteria 336x involved in endophytic colonization in wheat roots. J. Henan Agric. Sci. 2012, 42, 736–741.
295. Weakland, D.R.; Smith, S.N.; Bell, B.; Tripathi, A.; Mobley, H.L.T. The *Serratia marcescens* siderophore serratiochelin is necessary for full virulence during bloodstream infection. Infect Immun. 2020, 21, 88(8), e00117-20.
296. Weert, S.; Vermeiren, H.; Mulders, I.H.; Kuiper, I.; Hendrickx, N.; Bloemberg, G.V.; Vanderleyden, J.; de Mot, R.; Lugtenberg, B.J. Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. Mol. Plant. Microbe. Interact. 2002, 15, 1173–1180.
297. Wei, H.L.; Zhang, L.Q. Quorum-sensing system influences root colonization and biological control ability in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. Antonie Van Leeuwenhoek. 2006, 89(2), 267-80.
298. Weise, T.; Thurmer, A.; Brady, S.; Kai, M.; Daniel, R.; Gottschalk, G.; Piechulla, B. VOC emission of various *Serratia* species and isolates and genome analysis of *Serratia plymuthica* 4Rx13. FEMS Microbiol. Lett. 2014, 352, 45–53.
299. Wen, J.; Okyere, S.K.; Wang, S.; Wang, J.; Xie, L.; Ran, Y.; Hu, Y. Endophytic fungi: an effective alternative source of plant-derived bioactive compounds for pharmacological studies. J Fungi (Basel) 2022, 20, 8(2), 205.
300. Wilson, D. Endophyte: The evolution of a term, and clarification of its use and definition. Oikos, 1995, 73, 274–276.
301. Wolska, K.; Jakubczak, A. Wykrywanie biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* na biomateriałach medycznych. Med. Doświadczalna Mikrobiol. 2003, 55, 371–378.
302. Wu, S.; Zhu, Z.; Fu, L.; Niu, B.; Li, W. WebMGA: A customizable web server for fast metagenomic sequence analysis. BMC Genom. 2011a, 12, 444.
303. Wu, X.; Monchy, S.; Taghavi, S.; Zhu, W.; Ramos, J.; van der Lelie, D. Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida*. FEMS Microbiol Rev. 2011b, 35(2), 299-323.
304. Wu, Y.; Zhou, J.; Li, C.; Ma, Y. Antifungal and plant growth promotion activity of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. Microbiologyopen. 2019, 8(8), e00813.
305. Xia, Y.; Liu, J.; Chen, C.; Mo, X.; Tan, Q.; He, Y.; Wang, Z.; Yin, J.; Zhou, G. The multifunctions and future prospects of endophytes and their metabolites in plant disease management. Microorganisms 2022, 10, 1072.
306. Xu, J.; Deng, P.; Showmaker, K.C.; Wang, H.; Baird, S.M.; Lu, S.E. The *pqqC* gene is essential for antifungal activity of *Pseudomonas kilonensis* JX22 against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. FEMS Microbiol Lett. 2014, 353(2), 98-105.
307. Xue, J.; Tong, T.; Wang, R.; Qiu, Y.; Gu, Y.; Sun, L.; Xu, H.; Lei, P. Secretion of poly- γ -glutamic acid by *Bacillus atrophaeus* NX-12 enhanced its root colonization and biocontrol activity. Front Microbiol. 2022, 29, 13, 972393.
308. Yamamoto, N.; Wang, Y.; Lin, R.; Liang, Y.; Liu, Y.; Zhu, J.; Wang, L.; Wang, S.; Liu, H.; Deng, Q.; Li, S.; Li, P.; Zheng, A. Integrative transcriptome analysis discloses the molecular basis of a heterogeneous fungal phytopathogen complex, *Rhizoctonia solani* AG-1 subgroups. Sci Rep. 2019, 23, 9(1), 19626.
309. Yan, Q.; Lopes, L.D.; Shaffer, B.T.; Kidarsa, T.A.; Vining, O.; Philmus, B.; Song, C.; Stockwell, V.O.; Raaijmakers, J.M.; McPhail, K.L.; Andreote, F.D.; Chang, J.H.; Loper, J.E. Secondary metabolism and interspecific competition affect accumulation of spontaneous mutants in the GacS-GacA regulatory system in *Pseudomonas protegens*. mBio. 2018, 9, e01845-17.
310. Yang, L.; Wang, Y.; Hao, W. i in. Modeling pesticides toxicity to Sheepshead minnow using QSAR. Ecotoxicology and Environmental Safety 2020, 193, 110352.
311. Yi, H.S.; Ahn, Y.R.; Song, G.C.; Ghim, S.Y.; Lee, S.; Lee, G.; Ryu, C.M. Impact of a bacterial volatile 2,3-butanediol on *Bacillus subtilis* rhizosphere robustness. Front. Microbiol. 2016, 7, 993.
312. Yin, Y.; Mao, X.; Yang, J.; Chen, X.; Mao, F.; Xu, Y. dbCAN: A web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. Nucleic Acids Res. 2012, 40, W445–W451.

313. Yoshida, S.; Hiradate, S.; Fujii, Y.; Shirata, A. *Colletotrichum dematium* produces phytotoxins in anthracnose lesions of mulberry leaves. *Phytopathology* 2000, 90(3), 285–291
314. Yousaf, S., Afzal, M., Anees, M., Malik, R.N., Campisano, A. Ecology and functional potential of endophytes in bioremediation: a molecular perspective. In: Verma VC, Gange AC (eds) *Advances in endophytic research*. Springer, India. 2014, 301–320.
315. Yu, J.M.; Wang, D.; Pierson, L.S.; Pierson, E.A. Effect of producing different phenazines on bacterial fitness and biological control in *Pseudomonas chlororaphis* 30-84. *Plant Pathol J.* 2018, 34(1), 44-58.
316. Yu S, Teng C, Liang J, Song T, Dong L, Bai X, Jin Y, Qu J. Characterization of siderophore produced by *Pseudomonas syringae* BAF.1 and its inhibitory effects on spore germination and mycelium morphology of *Fusarium oxysporum*. *J Microbiol.* 2017, 55(11), 877-884.
317. Yuan, Y.-G.; Peng, Q.-L.; Gurunathan, S. Effects of silver nanoparticles on multiple drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from mastitis-infected goats: an alternative approach for antimicrobial therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 569.
318. Zboralski A, Filion M. Genetic factors involved in rhizosphere colonization by phytobeneficial *Pseudomonas* spp. *Comput Struct Biotechnol J.* 2020, 19, 18, 3539-3554.
319. Zeng, Q.; Wu, X.; Wang, J.; Ding, X. Phosphate solubilization and gene expression of phosphate-solubilizing bacterium *Burkholderia multivorans* WS-FJ9 under different levels of soluble phosphate. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2017, 27, 844–855.
320. Zhang, C.; Bruins, M.E.; Yang, Z.Q.; Liu, S.T.; Rao, P.F. A new formula to calculate activity of superoxide dismutase in indirect assays. *Anal. Biochem.* 2016, 503, 65–67.
321. Zhang, H.; Yohe, T.; Huang, L.; Entwistle, S.; Wu, P.; Yang, Z.; Busk, P.K.; Xu, Y.; Yin, Y. dbCAN2: A meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Res.* 2018, 46, W95–W101.
322. Zhao, L.F.; Xua, Y.J.; Lai, X.H. Antagonistic endophytic bacteria associated with nodules of soybean (*Glycine max* L.) and plant growth-promoting properties. *Braz. J. Microbiol.* 2018, 49, 269–278.
323. Zhong, T., Wang, Z., Zhang, M., Wei, X., Kan, J., Zalán, Z. i in. Volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* ZX as potential biological fumigants against gray mold on postharvest grapes. *Biol. Control* 2021, 163, 104754.
324. Zhou, J.Y.; Zhao, X.Y.; Dai, C.C. Antagonistic mechanisms of endophytic *Pseudomonas fluorescens* against *Athelia rolfsii*. *J Appl Microbiol.* 2014, 117(4), 1144-58.
325. Zhu, M.-L.; Wu, X.-Q.; Wang, Y.-H.; Dai, Y. Role of biofilm formation by *Bacillus pumilus* HR10 in biocontrol against pine seedling damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. *Forests* 2020, 11, 652.
326. Zur J., Wojcieszynska D., Guzik U. Metabolic responses of bacterial cells to immobilization. *Molecules* 2016, 21, 958.
327. Żur, J.; Pinski, A.; Wojcieszynska, D.; Smulek, W.; Guzik, U. Diclofenac degradation—Enzymes, genetic background and cellular alterations triggered in diclofenac-metabolizing strain *Pseudomonas moorei* KB4. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 6786.

ADDENDA

A1. Genome mining and evaluation of the biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens* BRZ63, a new endophyte of oilseed rape (*Brassica napus* L.) against fungal pathogens



Article

Genome Mining and Evaluation of the Biocontrol Potential of *Pseudomonas fluorescens* BRZ63, a New Endophyte of Oilseed Rape (*Brassica napus* L.) against Fungal Pathogens

Daria Chlebek *, Artur Pinski , Joanna Żur , Justyna Michalska and Katarzyna Hupert-Kocurek *

Institute of Biology, Biotechnology and Environmental Protection, Faculty of Natural Sciences, University of Silesia in Katowice, Jagiellonska 28, 40-032 Katowice, Poland; apinski@us.edu.pl (A.P.); joanna.zur@us.edu.pl (J.Ż.); jmichalska@us.edu.pl (J.M.)

* Correspondence: dachlebek@us.edu.pl (D.C.); katarzyna.hupert-kocurek@us.edu.pl (K.H.-K.); Tel.: +48-32-2009-462 (K.H.-K.)

Received: 27 October 2020; Accepted: 16 November 2020; Published: 19 November 2020



Abstract: Endophytic bacteria hold tremendous potential for use as biocontrol agents. Our study aimed to investigate the biocontrol activity of *Pseudomonas fluorescens* BRZ63, a new endophyte of oilseed rape (*Brassica napus* L.) against *Rhizoctonia solani* W70, *Colletotrichum dematium* K, *Sclerotinia sclerotiorum* K2291, and *Fusarium avenaceum*. In addition, features crucial for biocontrol, plant growth promotion, and colonization were assessed and linked with the genome sequences. The in vitro tests showed that BRZ63 significantly inhibited the mycelium growth of all tested pathogens and stimulated germination and growth of oilseed rape seedlings treated with fungal pathogens. The BRZ63 strain can benefit plants by producing biosurfactants, siderophores, indole-3-acetic acid (IAA), 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase, and ammonia as well as phosphate solubilization. The abilities of exopolysaccharide production, autoaggregation, and biofilm formation additionally underline its potential to plant colonization and hence biocontrol. The effective colonization properties of the BRZ63 strain were confirmed by microscopy observations of EGFP-expressing cells colonizing the root surface and epidermal cells of *Arabidopsis thaliana* Col-0. Genome mining identified many genes related to the biocontrol process, such as transporters, siderophores, and other secondary metabolites. All analyses revealed that the BRZ63 strain is an excellent endophytic candidate for biocontrol of various plant pathogens and plant growth promotion.

Keywords: biocontrol; endophytic bacteria; genome mining; oilseed rape; phytopathogens; plant growth promotion; *Pseudomonas fluorescens*

1. Introduction

In recent years, the yield and the quality of many crops and medicinal plants, as well as vegetables and fruits have decreased because of plant diseases caused by soil-borne pathogens, including fungi. Fungal pathogens are responsible for a range of serious plant diseases, such as *Fusarium* wilt, highly destructive to tomatoes [1]; phytophthora blight, the most destructive disease caused by the infection of oomycete pathogen *Phytophthora capsici* [2]; *Rhizoctonia* diseases of many crops, cotton, and lettuce [3]; or *Sclerotinia* stem rot (SSR), reducing the yield of rapeseed [4], a major source of vegetable oil for human consumption and biodiesel production [5]. Among different methods used for controlling soil-borne pathogens, chemical control based on synthetic products dominates. However, the excessive use of such compounds results in the reduction of agricultural product quality and, with time, in pathogen

resistance to the applied chemicals. In a long-term perspective, this leads to the destruction of ecosystems and damage to human health [6,7]. Thus, finding eco-friendly methods of plant disease control is of paramount importance [8]. Biocontrol offers a more sustainable alternative to chemical pesticides [9] as plant pathogens are controlled through natural antagonists [10]. Recently, special attention has focused on endophytic bacteria, symbionts residing within the plant tissues for the majority of their life cycle that not only remain asymptomatic but also have beneficial effects on their host [11]. Given the intimate contact with plants, these microorganisms hold tremendous potential for use as biocontrol agents [12].

Efficient biocontrol of phytopathogens is the result of several mechanisms, which include antibiosis, competition for nutrients and niches, production of cell wall-degrading enzymes, synthesis of biosurfactants and volatile organic and inorganic compounds, and/or induced systemic resistance [13]. Additionally, colonization of plants by endophytes induces several cell wall modifications, such as deposition of callose, pectin, cellulose, and phenolic compounds, leading to the formation of a structural barrier at the site of the potential attack by phytopathogens [14]. Endophytic colonization can also result in increased expression of extensins, which plays an important role in plant defense by strengthening the cell wall. It is worth noting that changes in the cell wall structural proteins and enzymes seems to be strain dependent [15]. In biocontrol activity, multiple mechanisms and their synergistic effects might be involved [16].

Although several bacteria species are known for their antimicrobial activity, *Pseudomonas* spp. are one of the most important in agriculture and have long been known to be beneficial to plants because of their potential as biological control agents [17,18] and plant growth-promoting effects [19]. Furthermore, these microorganisms are involved in phytoremediation processes because they play a vital role in degradation of petroleum hydrocarbons as well as other mono- and polycyclic aromatic hydrocarbons, which is enhanced by their ability to produce biosurfactants (e.g., rhamnolipid) [20]. Until now, over 200 species of the *Pseudomonas* genus have been described [21] and a number of them have been classified as *Pseudomonas fluorescens*.

In this work, a new *Pseudomonas fluorescens* BRZ63 strain, isolated from roots of the oilseed rape (*Brassica napus* L.), was investigated to identify both its endophytic ability and biocontrol traits. We combined traditional microbiological methods with in silico genomic analysis, aiming to reveal the genetic background of these properties. The main objectives of the study were: (1) determination of the antifungal activity of the tested strain against fungal phytopathogens, (2) evaluation of the endophytic behavior and biocontrol features of the strain by in vitro bioassays, (3) determination of the ability of the strain to colonize the root surface and internal tissues of plants, (4) in vitro evaluation of the effects of the BRZ63 strain on oilseed rape fitness and protection against fungal disease, and (5) identification of genes crucial for colonization of plants, biocontrol activity, and plant growth promotion in the genome of the BRZ63 strain.

2. Results

2.1. Antagonistic Activity of *P. fluorescens* BRZ63 against Fungal Plant Pathogens

The antagonism test results showed that the BRZ63 strain reduced and inhibited the mycelium growth of all plant pathogens used in this study (Figure 1a, Figure S1). The growth of selected phytopathogens was reduced by the BRZ63 strain by different extents and the inhibition of growth was significant in comparison with the negative controls. The strongest inhibitory effect was observed against *C. dematium* K, where the mycelium expansion was inhibited by over $61.8 \pm 1.64\%$. The BRZ63 strain inhibited the growth of *S. sclerotiorum* K2291 by $39.9 \pm 1.08\%$, followed by *F. avenaceum* ($40.33 \pm 1.04\%$) and *R. solani* W70 ($37.02 \pm 2.85\%$) (Figure 1b).

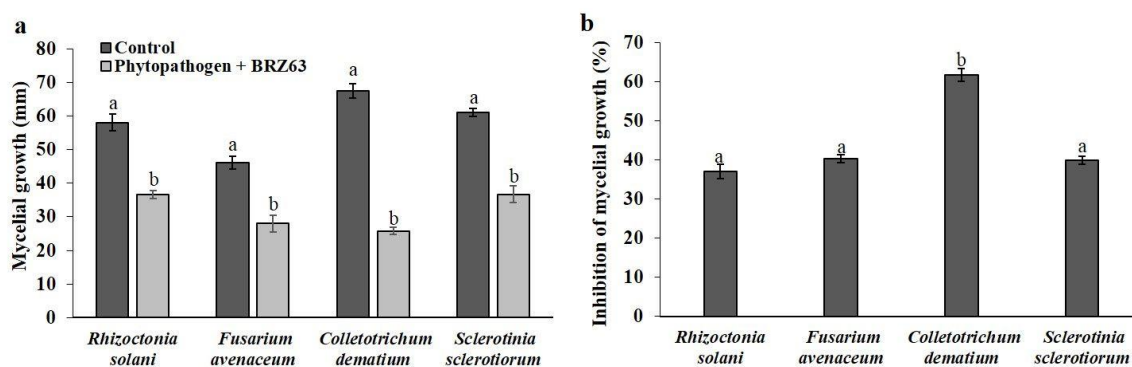


Figure 1. Effect of *P. fluorescens* BRZ63 on mycelial growth (a) and percentage (%) of inhibition of fungal phytopathogens' mycelial growth by the BRZ63 strain (b). Each column represents the mean \pm standard deviation of three independent replications for each treatment. a,b—indicate significant differences ($p < 0.05$) according to the honest significant difference (HSD) test.

2.2. In Vitro Assessment of Colonization Properties of the BRZ63 Strain

Motility assays revealed the ability of the studied strain to spread on 0.3% (swimming), 0.5% (swarming), and 1% (twitching) agar plates. The distance was measured from the center of the original inoculation spot to the leading edge of bacterial growth. The results summarized in Figure 2A show that the BRZ63 strain exhibited a higher motility than the control endophytic strain. When it was cultivated on the agar plates, the distance of migration (28.1 ± 1.3 mm) was bigger than that on the swarm agar plates (15.4 ± 1.2 mm), while onto twitch agar, the BRZ63 strain remained near the point of inoculation (5.7 ± 0.8 mm). The BRZ63 strain formed reddish black colonies with a crystalline consistency on the Congo Red Agar (CRA) medium, which confirmed its ability of exopolysaccharide (EPS) production (Table 1). Another important feature of the strain is its autoaggregation and biofilm formation ability. The results obtained in this study showed that the BRZ63 strain was self-aggregating, with the autoaggregation index increasing with the time of incubation up to $42.21 \pm 3.7\%$ after 24 h. The reference endophytic strain 4FJK showed a lower ability to autoaggregate ($26 \pm 4.30\%$) (Figure 2B). The ability of the BRZ63 strain to develop a biofilm on polystyrene microtiter dishes was assessed using the crystal violet (CV) method. The obtained results showed that the tested strain formed biofilm after 24 h of incubation (Figure 2C), and based on the classification of Stepanović et al. [22], it was classified as a moderate biofilm producer. In addition to the traits described above, the BRZ63 strain exhibited oxidase and catalase activity (Table 1).

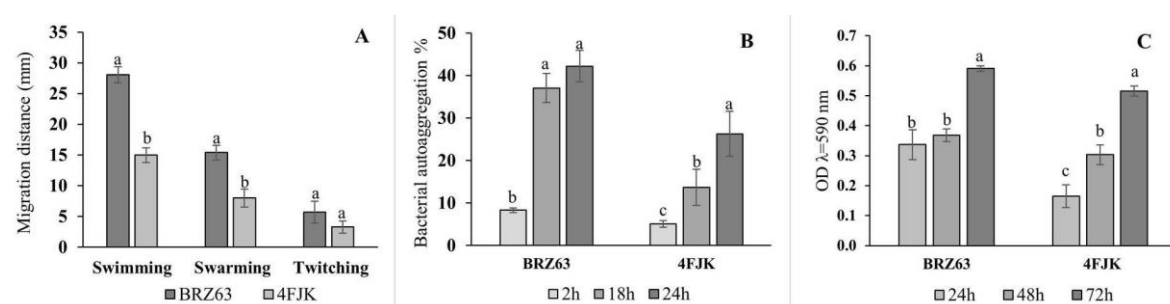


Figure 2. Motility (A), autoaggregation (B), and biofilm formation ability (C) of *P. fluorescens* BRZ63. The *Enterobacter asburiae* 4FJK strain was used as a control strain. The autoaggregation ability of the tested strains is expressed as a percentage of aggregated cells after 2, 18, and 24 h of incubation. The biofilm formation was assessed over a period of 72 h by using the crystal violet (CV) method. Each column represents the mean \pm standard deviations of three independent replications for each treatment. a,b,c—indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) according to the HSD test.

Table 1. Biochemical and physiological characteristics of endophytic *P. fluorescens* BRZ63.

Features	Strain BRZ63	Strain 4FJK
Exopolysaccharides production	+	–
Siderophore production	+	+
Endoglucanase production	+	–
Chitinase production	+	–
Protease production	–	–
Acetoin and 2,3-butanediol production	–	+
IAA production (µg/mL)	59.62 ± 1.11 ^a	34.53 ± 0.97 ^b
SA production (µg/mL)	17.83 ± 0.95 ^a	55.22 ± 1.36 ^b
ACC deaminase production	+	+
Ammonia production	+	+
HCN production	–	+
Catalase production	+	–
Oxidase production	+	–

(+) capability, (–) lack of capability. ^{a,b}—indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) according to the HSD test.

2.3. Inoculation of *Arabidopsis Thaliana* Col-0 with the EGFP-Labeled Strain

Fluorescently labeled bacteria are handy tools to study endophyte–plant interaction. In this study, pMP4566 plasmid with the cloned *egfp* gene [23] was successfully transformed into the BRZ63 strain (Figure 3a). To verify that the strain could colonize plant tissues and thrive within them, surface-sterilized seeds of *Arabidopsis thaliana* Col-0 were inoculated with the EGFP-labeled strain and grown on water agar plates. After 7 days, 6 seedlings were selected and the fluorescence of the labeled BRZ63 strain population in planta was observed (Figure 3(C1–C4)). As it is shown in Figure 3b–d, EGFP-expressing cells adhered and formed biofilm on the root surface, and colonized epidermal cells of the model plant.

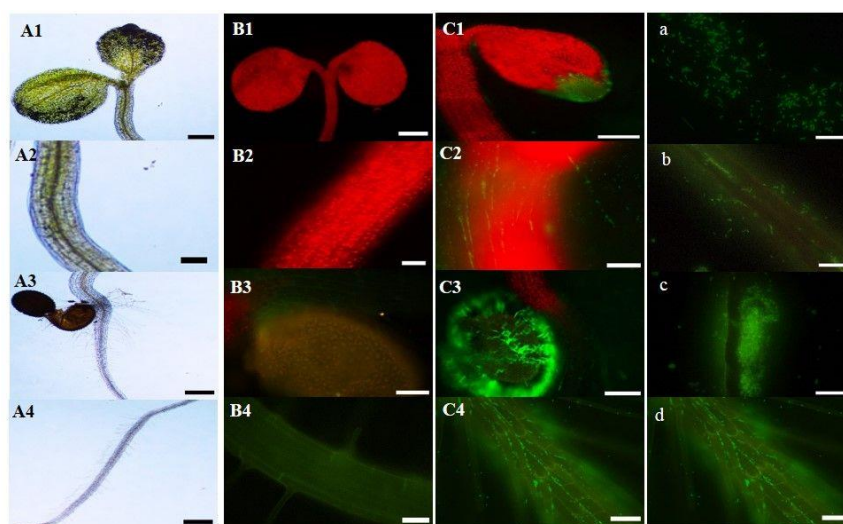


Figure 3. The colonization of *Arabidopsis thaliana* Col-0 and stages of the plant roots colonization with the EGFP-labeled BRZ63 strain. Uninoculated plant observed under a light microscope (A1–A4) (scale bar: A1 = 200 µm, A2 = 100 µm, A3 = 200 µm, A4 = 200 µm). Uninoculated plant (B1–B4) (scale bar: B1 = 100 µm, B2 = 100 µm, B3 = 100 µm, B4 = 40 µm), and plant after inoculation with EGFP-labeled BRZ63 strain (C1–C4) (scale bar: C1 = 200 µm, C2 = 50 µm, C3 = 200 µm, C4 = 20 µm) observed with a Nikon ECLIPSE-Ni-U stereo microscope equipped with epifluorescence detection. EGFP-labeled cells of BRZ63 (scale bar = 10 µm) (a), adhesion of bacteria to the root surface and the root hairs (scale bar = 20 µm) (b), biofilm formation (scale bar = 20 µm) (c), colonization of epidermal cells (scale bar = 20 µm) (d). All pictures were processed using ImageJ software.

2.4. Effects of the BRZ63 Strain on Plant Development and Disease Protection of Oilseed Rape

The BRZ63 strain stimulated the growth of oilseed rape seedlings both not exposed to and treated with fungal pathogens. Significant differences were observed between plants inoculated only with pathogen and those co-inoculated with the fungal strain and the examined BRZ63 strain. Preinoculation of seeds with the BRZ63 strain increased the weight and root length of seedlings exposed to *R. solani* W70, *S. sclerotiorum* K2291, and *F. avenaceum* (Figure 4). Importantly, the BRZ63 strain increased the weight and shoot length of seedlings grown in the presence of the *C. dematium* K (Figure 4). Additionally, except for the *C. dematium* treatment, the oilseed rape seeds co-inoculated with fungi and the BRZ63 strain showed higher germination efficiency than uninoculated seeds exposed to mycelial mass of fungal pathogens. The germination percentage for each treatment is represented in Figure 5. Moreover, the general disease symptoms: yellow chlorosis in leaves, root brown lesions, and necrosis, were significantly reduced in plants co-inoculated with fungal pathogens and the BRZ63 strain (Figure S2). These results clearly demonstrate plant-protective effects of the BRZ63 strains against selected pathogens.

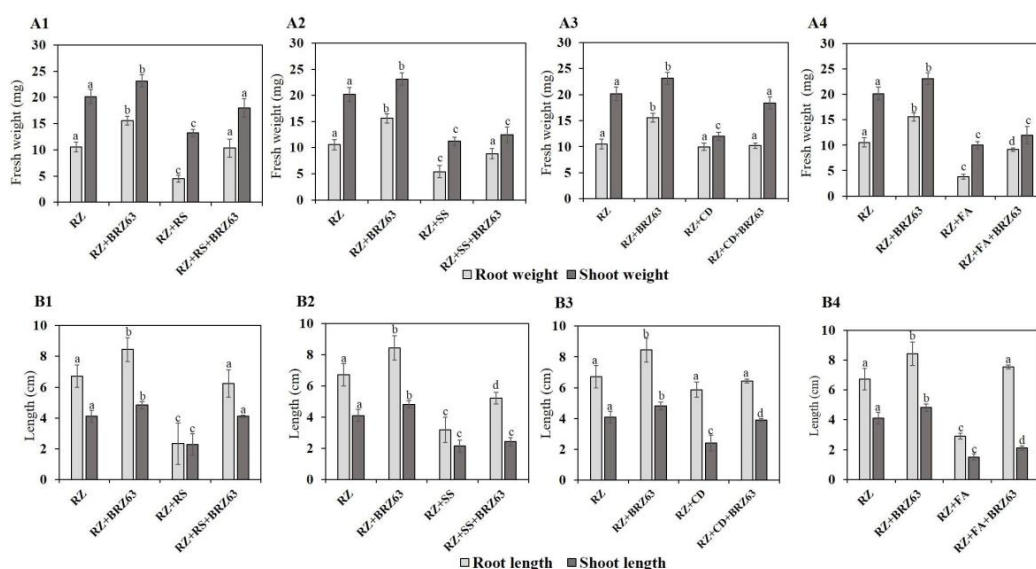


Figure 4. Effects of the BRZ63 strain on plant development and disease protection of oilseed rape. The root and shoot weights of germinating seeds after different treatments (A1–A4). The root and shoot lengths of germinating seeds after different treatments (B1–B4). The different letters (a–d) represent significant difference ($p < 0.05$) in root/shoot lengths and root/shoot weights of germinating seeds. The treatments are described in Section 4.8.

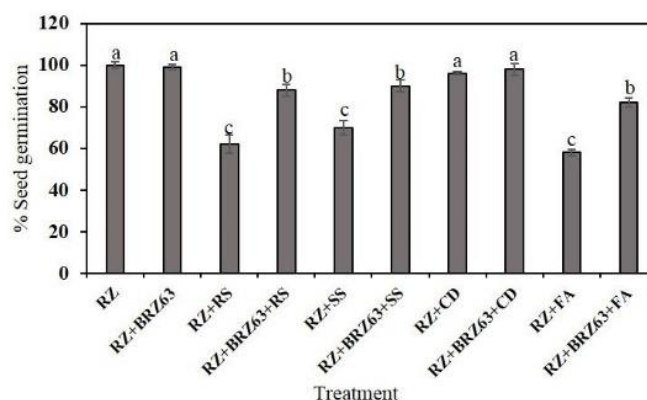


Figure 5. Germination efficiency of oilseed rape seeds after different treatments. The different letters (a–c) above the bar represent significant differences ($p < 0.05$) in the germination percentage. The treatments are described in Section 4.8.

2.5. In Vitro Screening for PGP and Biocontrol Traits of the BRZ63 Strain

The results of the biochemical assays revealed that *P. fluorescens* BRZ63 produced a high level of indole-3-acetic acid (IAA) ($59.62 \pm 1.11 \mu\text{g/mL}$) in the presence of tryptophan (Table 1). It was also able to produce salicylic acid (SA) in the concentration of $17.83 \pm 0.95 \mu\text{g/mL}$ in succinate medium (Table 1). Another important mechanism that promotes plant growth is the ability of endophytes to produce ACC deaminase, reducing the level of ethylene in the plant. The result obtained in this study showed that the BRZ63 strain was able to grow on Dworkin and Foster (DF) minimal salt medium supplemented with 3 mM ACC as a nitrogen source, implying ACC deaminase activity (Table 1). The BRZ63 strain was found to have a phosphate solubilization index (PSI) of 7.67 ± 0.33 . The significantly lower PSI was exhibited by the control strain 4FJK (1.76 ± 0.19) (Table 2). The BRZ63 strain was also positive in the reaction with Nessler's reagent. A dark brown color was observed, indicating ammonia production. The chrome azurol S (CAS) agar plates were used to observe the siderophores production by the strain. The orange halo around strain colonies indicated the ability of the BRZ63 strain to produce siderophores (Table 1). The BRZ63 strain was also positive for endoglucanase and chitinase production (Table 1). Biosurfactant production is another metabolic capability of the BRZ63 strain, which can be harnessed for biocontrol. The positive reaction for methylene blue agar tests suggests the rhamnolipid nature of the biosurfactant produced by the BRZ63 strain (Table 3). The tested strain demonstrated high emulsification activity ($78.79 \pm 2.62\%$ and $32.5 \pm 2.5\%$ with cyclohexane and diesel oil, respectively). Furthermore, the produced biosurfactants showed great potential for lowering the surface tension ($40.30 \pm 3.50 \text{ mm}$). The results of the qualitative (CTAB/methylene blue agar test) and semi-quantitative (emulsification index; lowering the surface tension) parameters obtained by the BRZ63 strain were similar to those obtained for the reference P-1 strain (Table 3).

Table 2. Qualitative estimation of the phosphate solubilization efficiency of *P. fluorescens* BRZ63 and the control *Enterobacter asburiae* 4FJK strain.

Bacterial Strain	Colony Diameter (mm)	Zone of Solubilization (mm)	Phosphate Solubilization Index (PSI)
BRZ63	7.84 ± 0.2	52.3 ± 0.12^a	7.67 ± 0.33^a
4FJK	10.1 ± 0.3	7.7 ± 0.2^b	1.76 ± 0.19^b

^{a,b}—indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) according to the HSD test.

Table 3. Biosurfactant production by *P. fluorescens* BRZ63 and the control *Pseudomonas* sp. P-1.

Test	Strain BRZ63	Strain P-1
Methylene blue agar test	+	+
Oil-spreading (mm)	40.30 ± 3.50^a	44.01 ± 1.52^a
Emulsification index (%)	diesel oil	58.33 ± 4.81^b
	cyclohexane	77.37 ± 2.63^a

(+) the capability of biosurfactant production. ^{a,b}—indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) according to the HSD test.

2.6. General Features of *P. fluorescens* BRZ63 Genome and Phylogenetic Analysis

Following the determination of antagonistic activity and biochemical characterization of *P. fluorescens* BRZ63, whole-genome sequence analysis was performed. The general genome features of the BRZ63 strain are summarized in Table 4. The assembly of the genome sequence resulted in 363 contigs with an estimated genome size of 6,335,040 bp, and an average of G+C content of 64%. In total, 6120 genes, of which 5915 were annotated as protein-encoding sequences (CDSs), 77 RNAs and 128 pseudogenes were predicted, which was similar to the results reported for other endophytic *P. fluorescens* strains [18,24,25]. Of the total CDSs, 5949 genes were classified into clusters of orthologous group (COG) families comprised of 22 categories (Table S1). It revealed three main functional gene

classes: amino acid transport and metabolism (E category), inorganic ion transport (P category), and carbohydrate transport and metabolism (G category). Especially, the number of genes participating in transport and metabolism of amino acids and carbohydrates indicates the inherent capacity of the BRZ63 strain to survive and compete with other microorganisms in the rhizosphere/endosphere. In addition, the number of genes participating in cell motility (C category) identified emphasizes the ability of the BRZ63 strain to effectively colonize plants [26] (Table S1). A large number of predicted genes were assigned as encoding proteins involved in secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism (Q category). The antiSMASH analysis also disclosed secondary metabolite clusters in the genome of the BRZ63 strain (Table S2).

The phylogenetic tree including *P. fluorescens* BRZ63 based on the alignment of the core proteome of 20 strains is illustrated in Figure 6. In the phylogenetic group of genus *Pseudomonas*, BRZ63 grouped closely with *Pseudomonas fluorescens* SBW25 and ATCC 13525.

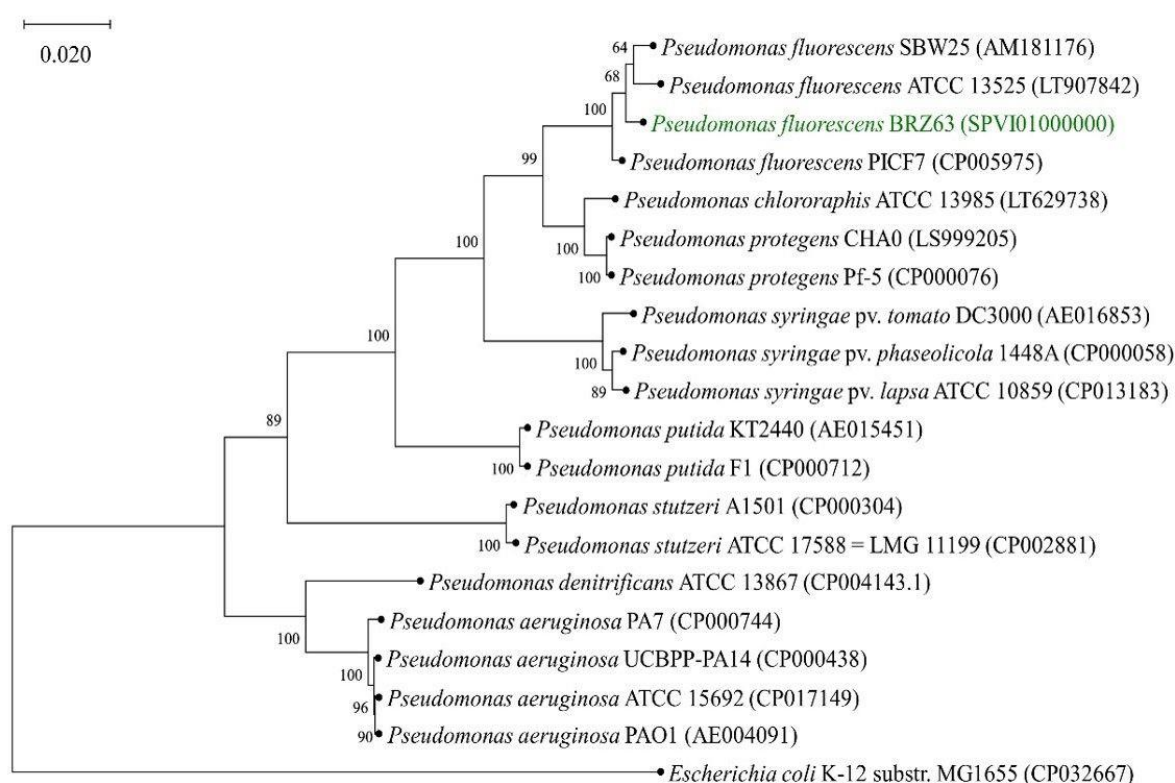


Figure 6. Phylogenetic tree of *Pseudomonas fluorescens* BRZ63 (marked in green) based on alignment of the core proteome of 20 strains with *Escherichia coli* K-12 substr. MG1655 as an outgroup. Branching percentage values were determined with the use of the 1000 bootstraps resampling test. The accession numbers for genomes are shown in brackets. The tree was constructed using the maximum likelihood method. The scale bar represents 1% nucleotide sequence divergence.

Table 4. General genome features of *P. fluorescens* BRZ63.

Attribute	Value
Genome size (bp)	6,335,040 bp
Contigs	363
G+C content (%)	64
Genes (total)	6120
CDSs (total)	6043
Genes (coding)	5915
Protein genes	5915
RNA genes	77
rRNAs	7, 3, 1 (5S, 16S, 23S)
Complete rRNAs	7, 1, 1 (5S, 16S, 23S)
Partial rRNAs	2 (16S)
tRNAs	62
ncRNAs	4
Pseudogenes	128
BioProject ID	PRJNA529642
GenBank accession number	SPVI00000000.1

2.7. The Colonization, Biocontrol, and PGP Features in the BRZ63 Genome

The KEGG annotation and the functional annotation of proteins based on the eggNOG protein database revealed genes related to plant–bacteria interaction, biocontrol, and PGP traits (Table S3). The BRZ63 strain carries clusters containing *flg*, *fil*, and *flh* genes encoding the machinery for flagella biosynthesis and motility. The genome annotations revealed also *cheA*, *cheB*, *cheW*, and *mpc* genes encoding proteins of the most widespread bacterial chemotaxis signaling pathway as well as genes for additional chemotaxis proteins: CheB, CheR, CheZ, and CheV. Furthermore, in the BRZ63 genome, genes required for type IV pili biosynthesis were detected. Among the features essential for bacterial adherence to surfaces during the initial stage of biofilm formation, the presence of 12 *alg* genes encoding proteins involved in alginate biosynthesis and key genes of lipopolysaccharide (LPS) biosynthesis, including operons *lpx*, was admitted. In the genome of BRZ63, we identified 134 putative genes encoding CAZy distributed unevenly among the six CAZy families (Table S4). Within the class of glycoside hydrolases (GH) and carbohydrate esterases (CE), CAZymes with the potential to degrade many cell wall polymers, including beta-1,3-glucan, cellulose, hemicellulose, pectin, peptidoglycans, polysaccharides, and chitooligosaccharides, were found (Table S5). An advantageous feature of the strain is the presence of genes encoding various lytic enzymes, such as beta-glucosidase (*bglX*) and N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase (*nagA*). Moreover, analysis of the BRZ63 genome revealed the presence of several genes encoding catalases, glutathione S-transferase, glutathione reductase, superoxide dismutase [Fe], and superoxide dismutase [Mn/Fe], which protect plant defense mechanisms.

As potential biocontrol strain, we sought genes involved in the production of antimicrobial molecules. In the genome of the BRZ63 strain, genes crucial for phenazine biosynthesis (*phzF* encoding trans-2,3-dihydro-3-hydroxyanthranilate isomerase and *trdG* encoding anthranilate synthase component), *ubiC* gene encoding chorismate pyruvate-lyase involved in the biosynthesis of 4-hydroxybenzoate, as well as genes encoding pyocin-S2 (*pys2*) and oligopeptidase A (*prlC*), were identified. Moreover, the BRZ63 strain carried genes involved in the synthesis of acetoin and butanediol that act as growth-promoting factors and increase plant resistance against pathogens.

Analysis of the BRZ63 genome also revealed the presence of a number of genes involved in siderophore production and transport along with genes encoding bacterioferritin, enterobactin, and pyoverdine. Furthermore, we found genes for TonB-dependent receptors (TBDRs), indicating that the BRZ63 strain may be highly effective in the competitive acquisition of iron. In addition to these features, the strain also contains tryptophan biosynthesis genes (*trpABCDE*) and genes encoding oxidoreductase, aldoxime dehydratase, and nitrilase. In addition, a set of putative proteins involved in

nitrogen fixation (*iscU*) and phosphate metabolism and transport (operon *pstABCS* encoding permease proteins (PstA and PstC), the phosphate import protein (PstB), and the phosphate binding protein (PstS)) was identified. Genome examination also showed several genes coding for the Pho system: *phoQ*, *phoP*, and *phoU* together with the gene responsible for glutamate dehydrogenase (GDH) synthesis (*gcd*) and the *pqq* gene cluster (*pqqABCDE*) necessary for the biosynthesis of PQQ cofactor.

3. Discussion

In this study, we characterized *P. fluorescens* BRZ63, a new endophyte of oilseed rape (*Brassica napus* L.), and demonstrated its phenotypic functionality related to the inhibition of the growth of fungal pathogens, biocontrol, and plant growth promotion. Moreover, the results of phenotypic analysis were linked with the genome sequences analyses for the understanding of genome–phenotype interplays. Many strains of *P. fluorescens* have been shown to be potential biocontrol agents suppressing plant pathogens. However, they were isolated mainly from the rhizosphere or the bulk soil [27–31]. To our knowledge, little is known about the biocontrol activity of *P. fluorescens* strains originally isolated from the internal tissues of rape. It is worth emphasizing that, in contrast with soil and rhizosphere bacteria, endophytic microorganisms could offer systemic tolerance against many plant pathogens as they colonize the entire plant tissues [32]. Furthermore, the plant growth-promoting potential of endophytes is higher than that of soil or rhizosphere microorganisms as they closely interact with their host plants [33]. Endophytes can also colonize seeds and support the germination process [34].

To potentially use *P. fluorescens* BRZ63 as a biocontrol agent, we checked if it could act against some ubiquitous soil-borne plant pathogenic fungi responsible for significant yield losses of crops, including rape [35,36]. In vitro tests demonstrated that the BRZ63 strain, which is closely related to *P. fluorescens* PICF7, the effective biocontrol agent against *Verticillium dahlia* [18], had a positive antagonistic effect on mycelial growth of *R. solani*, *S. sclerotiorum*, *F. avenaceum*, and *Colletotrichum* spp. This emphasizes the potential of the strain to protect plants from various fungal pathogens' invasion and suggests involvement of various mechanisms in this process. To verify these assumptions, we explored the biocontrol efficacy of *P. fluorescens* BRZ63 against fungal pathogens on germinating oilseed rape seeds. The BRZ63 strain was found to confer protection to oilseed rape against all fungi tested in this study despite the different infection strategies used by the pathogens. In case of *R. solani* and *F. avenaceum*, the common root-infecting pathogens causing severe yield reductions in canola [37,38], preinoculation of seeds provided promotion of the length and fresh weights of roots while in plants treated with *C. dematium*, the fungus infecting leaves, flowers, and stems of the host plants [39], the BRZ63 strain caused a limitation of the disease symptoms manifested by lowering the length and fresh weight of the shoots. Among related *Pseudomonas* strains, *P. protegens* Pf-5 suppressed the growth of *R. solani*, *Sclerotinia homoeocarpa*, and *Fusarium oxysporum* [40] while *P. fluorescens* SBW25 and *P. protegens* CHAO were able to protect peas from seedling damping-off caused by the oomycete *Pythium ultimum* [41].

The BRZ63 strain showed a wide spectrum of crucial features for successful colonization of plants. First of all, it exhibited a swimming, swarming, and twitching motility phenotype. The results were consistent with identification of flagellar genes and genes required for chemotaxis, adhesion, and type IV pili biosynthesis. The motility of bacteria, dependent on the presence of flagella or pili, is one of the crucial factors that promotes attachment to different surfaces and biofilm formation [42,43]. The involvement of the flagellar biosynthesis genes in plant colonization was shown for *P. putida* KT2440. The mutations in *flgL*, *fliA*, *fleQ*, *fliL*, *fliN*, and *flgD* resulted in different degrees of impaired swimming and swarming motility, and affected its adhesion to the corn seeds [44]. Chemotaxis toward exudate components played a major role in the colonization of tomato roots by *P. fluorescens* WCS365 [45]. The *cheA* mutant, defective in flagella-driven chemotaxis, colonized the plant roots less efficiently than the wild-type strain. In turn, type IV pili, which are required for twitching motility, were shown to play a significant role in the colonization of a wide range of plants [44].

The other important characteristic of *P. fluorescens* BRZ63 that underlines its potential for colonization and hence biocontrol of plants is the ability to autoaggregate and form biofilm. Strains

of *P. fluorescens* have been reported to coat plant roots by forming a biofilm, which may protect roots against soil bacterial and fungal pathogens [46]. Furthermore, in the root system, bacteria that are found in the biofilm state have several advantages, allowing the organisms that compete in root colonization to create for themselves a better protected niche [47]. Hernández-Salmerón et al. [48] reported that biofilm formation by the *P. fluorescens* UM270 strain played an essential role in root attachment and rhizosphere colonization of *Medicago* spp. plants. To mediate the adhesion and colonization of plant roots, a variety of plant-associated bacteria produce EPS and/or LPS. Meneses et al. [49] reported that the *gumD* gene in endophytic diazotrophic bacterium *G. diazotrophicus* PAL5 was essential for EPS production and biofilm formation. EPS can also contribute to the survival of bacteria within the plant by acting as a barrier against plant defense mechanisms [50]. It is worth noting that the ability to produce the EPS was also observed in the BRZ63 strain. These results were consistent with the identification of a gene cluster involved in alginate biosynthesis in the BRZ63 genome. Additionally, key genes of LPS biosynthesis were detected. According to Chang et al. [51], pseudomonads produce alginate in response to water-limiting conditions, which influences biofilm development and the EPS physiochemical properties. It may facilitate the maintenance of a hydrated microenvironment and protect residents from drought stress, increasing their survival [52]. In turn, structural changes of LPSs have been shown to usually affect adhesive forces among bacteria, possibly through alteration of the cell surface hydrophobicity [53]. The presence of genes coding for enzymes catalyzing degradation of plant cell wall polysaccharides and the arsenal of genes encoding key antioxidant enzymes additionally underlines the high colonization potential of the BRZ63 strain and gives it an advantage for survival in a highly oxidative environment. Successful visualization of the EGFP-labeled BRZ63 strain in the inner tissues of *Arabidopsis thaliana* Col-0 confirms its effective colonization properties. The BRZ63 strain extensively colonized the root surface, forming aggregates and biofilm. It was also able to colonize the interior of epidermal cells of the plant.

Once the effective colonization by *P. fluorescens* BRZ63 was demonstrated, we aimed to assess whether this bacterium is able to produce metabolites involved in biocontrol and plant growth promotion. The ability of the BRZ63 strain to produce siderophores and the presence of a number of genes for biosynthesis of bacterioferritin, enterobactin, and pyoverdine as well as iron transport is an extremely important feature that can contribute to the biocontrol effect of the strain. It is known that *Pseudomonas* spp. producing siderophores not only promote plant growth but also contribute to disease control by competing with phytopathogens for trace metals. For example, siderophores produced by *Pseudomonas* spp. and other rhizobacterial organisms (*Bacillus*, *Enterobacter*) have been used in the biological control of damping-off of cotton caused by *Pythium ultimum* [54]. Moreover, results obtained by Zhao et al. [55] suggested a significant positive correlation between siderophore production by endophytic strains of *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, and *Bacillus* genera and the inhibition ratio against *Phytophthora sojae* 01. Siderophores are also known to induce systemic resistance in plants. For example, the purified pyoverdine from *P. fluorescens* WCS374 induced resistance in radish against *Fusarium* wilt [56].

Production of lytic enzymes, chitinase, and β -1,3-glucanase as well as biosurfactants of high emulsification activity and great potential for lowering the surface tension are other features that may play a crucial role in the biological control of plant pathogens by the BRZ63 strain. It is speculated that cell wall lysis of the pathogenic fungi is a result of coordinated action of a complex of hydrolytic enzymes. Production of chitinase, β -1,3-glucanases, and protease by four *Bacillus* strains was an important mechanism responsible for *Rhizoctonia solani* inhibition in tomato plants [57]. Similarly, the *Bacillus subtilis* strain 330-2 isolated from a rapeseed, which produced β -1,3-glucanase, β -1,4-glucanase, and proteases, strongly suppressed the in vitro growth of *Rhizoctonia solani* AG1-IA, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Cochliobolus heterostrophus*, and *Nigrospora oryzae* [58]. In turn, Goswami et al. [59] showed that rhamnolipid biosurfactant produced by *P. aeruginosa* DS9 has strong antifungal activity against *C. falcatum*, which may offer the possibility of its application as an alternative fungicide to control red rot disease of sugarcane. Moreover, biosurfactants can act on the lipids in

the cell and alter the membrane fluidity. The rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas* strains inhibited the growth of *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, and *S. epidermidis* [60]. The authors suggested that high emulsification potentials might enhance rhamnolipids to penetrate the cell wall of bacteria. In another studies, Abalos et al. [61] tested the antifungal activity of rhamnolipids produced by the *Pseudomonas* AT10 strain. The highest inhibition activity against *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium solani*, *Gliocadium virens*, *Rhizotecnia solani*, and two *Penicillium* strains was observed for surfactants, effectively lowering the surface tension.

The biocontrol effect of the BRZ63 strain could be also exerted by the induction of a systemic resistance response in the host plant since the genome analysis has revealed that the strain has genes required for the biosynthesis of 2,3-butanediol and acetoin together with genes engaged in the biosynthesis of SA through the chorismate/isochorismate pathway. The SA synthesis was linked to the ability of *P. aeruginosa* 7NSK2 to elicit induced systemic resistance (ISR) against *Botrytis cinerea* in bean [62]. It is worth emphasizing that the production of SA by the BRZ63 strain was confirmed by biochemical studies and the strain showed an above 30-fold more effective production of SA than the well-known biocontrol agent PICF7 [63].

P. fluorescens BRZ63 was also able to yield positive results in a test for IAA and ammonia production, ACC deaminase synthesis, and phosphate solubilization. IAA is involved in cell–cell signaling, regulation of plant development, and induction of plant defense systems [64]. Etesami et al. [65] reported that bacteria with the ability to produce IAA not only improve plant growth but also seem to colonize plant roots more efficiently. In another study, Hernández-León et al. [66] showed that the strain *P. fluorescens* UM16 producing IAA at a concentration of 22 µg/mL was able to induce shoot growth in *M. truncatula* plants even in the presence of *Botrytis cinerea*. Interestingly, the BRZ63 strain produced higher levels of IAA (59.62 ± 1.11 µg/mL) than *P. fluorescens* UM16, which emphasizes its potential role in plant growth promotion. Based on the genome analysis, we speculate that in the studied strain, IAA synthesis proceeds through the indole-3-acetonitrile (IAN) pathway. The ability of BRZ63 of phosphate solubilization and high PSI are also remarkable features of the strain. The presence of genes encoding the ABC transport complex (PstABCS), which is responsible for inorganic phosphate uptake under phosphate starvation conditions [67], suggests a strong capability of the strain for phosphate uptake from the environment. Furthermore, the genomic analysis enabled identification of the *gcd* gene encoding glucose dehydrogenase and *pqqABCDE* operon for pyrroloquinoline quinone involved in gluconic acid (GA) biosynthesis and its release into the environment. This finding suggests that similarly to three endophytic *Pseudomonas* strains L111, L228, and L321 isolated from *Miscanthus giganteus* [68], production of GA constitutes a major mechanism of phosphate solubilization by the BRZ63 strain.

4. Materials and Methods

4.1. Bacterial Strains and Growth Conditions

Pseudomonas fluorescens BRZ63 was isolated from surface-sterilized roots of the oilseed rape (*Brassica napus* L.) growing in the area contaminated with pesticides in the vicinity of Bielsko-Biała, Southern Poland [49.847665 N, 18.830396 E]. Herein, a laboratory endophytic strain *Enterobacter asburiae* 4FJK isolated from the high hawk (*Hieracium piloselloides*) [69] and *Pseudomonas* sp. P-1 isolated from soil contaminated with petroleum hydrocarbons [70] were used as controls in assays comprising the characteristic of biochemical and physiological features of the BRZ63 strain. Both control strains were derived from the Microbial Culture Collection of the Institute of Biology, Biotechnology and Environmental Protection (Faculty of Natural Sciences, University of Silesia in Katowice, Poland). Bacterial strains used in this study were cultivated routinely on LB Agar or in Luria-Bertani broth (LB Broth) at 30 °C with shaking (130 rpm). For antagonistic activity tests, the BRZ63 strain was grown on potato dextrose agar (PDA) (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland).

4.2. Isolation and Molecular Identification of the BRZ63 Strain

The BRZ63 strain was isolated from the surface-sterilized roots of the oilseed rape according to the standard protocol [69] with minor modifications. Briefly, the roots of the oilseed rape were washed separately under tap water to remove adhering soil particles, surface sterilized with 70% ethanol (1 min) and 5% sodium hypochlorite (ACE) (5 min), and rinsed three times in sterile distilled water (3 × 5 min). A sterility check was performed by plating 100 µL of sterile water from the final rinse on LB agar medium. For the isolation of bacteria, 2 g of sterilized macerated roots were put into 9 mL of saline solution (0.9% NaCl) and a 100-µL suspension was plated on LB agar medium and incubated at 30 °C for 48 h. After incubation, individual bacterial colonies were isolated and purified. The selected BRZ63 isolate was identified by sequencing of the 16S rRNA gene. The BRZ63 strain was grown in LB medium for 24 h at 30 °C and genomic DNA was extracted using the GeneMatrix Bacterial and Yeast Genomic Purification Kit (EURx, Gdansk, Poland) according to the protocol. Amplification of the 16S rRNA gene was performed with 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') universal primers. The PCR master (50 µL) contained: 50 ng of genomic DNA, 1 U of Taq DNA polymerase, 1× TaqDNA polymerase buffer, 0.2 mM of dNTP, 2 mM MgCl₂, 0.2 µM of the each forward and reverse primers. The PCR cycling conditions were 5 min at 94 °C; 30 cycles of 1 min at 94 °C, 45 s at 54 °C, and 90 s at 72 °C; and 10 min at 72 °C. The PCR-amplified 16S rRNA region was sequenced directly by the commercial company GENOMED (Warsaw, Poland). Obtained sequences were compared with the public databases using NCBI BLASTN online (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The taxonomic affiliation of the BRZ63 strain was also supported by the genomic sequencing described in Sections 4.9 and 4.10.

4.3. Pathogenic Fungi

Rhizoctonia solani W70, *Colletotrichum dematium* K, *Sclerotinia sclerotiorum* K2291, and *Fusarium avenaceum* were derived from the Microbial Culture Collection of the Institute of Biology, Biotechnology and Environmental Protection (Faculty of Natural Sciences, University of Silesia in Katowice, Katowice, Poland). Fungal pathogens were originally isolated from plants tissues exhibiting clear symptoms of diseases. *Rhizoctonia solani* W70 was isolated from the grapevine (*Vitis vinifera* L.), *Colletotrichum dematium* K and *Sclerotinia sclerotiorum* K2291 were isolated from the caraway (*Carum carvi* L.), and *Fusarium avenaceum* was isolated from wheat (*Triticum* L.). All pathogens were incubated on potato dextrose agar (PDA) (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland) at 30 °C.

4.4. Antifungal Activity Assays

The antagonistic activity of the endophytic BRZ63 strain was tested by the standard in vitro dual culture assays on PDA medium [71]. *Rhizoctonia solani* W70, *Colletotrichum dematium* K, *Sclerotinia sclerotiorum* K2291, and *Fusarium avenaceum* were grown separately on PDA medium at 30 °C for 5–21 days (depending of the fungal strain). Then, a 5-mm agar-mycelium disk was taken from each actively growing fungal colony and placed 10 mm from the edge of a Petri dish with the PDA, separately for each pathogen. Next, a sterile loop of the overnight culture of the BRZ63 bacterial suspension was taken and streaked 30 mm away from the disc of the fungal pathogen. Petri dishes inoculated only with fungi were used as controls. Control plates and those with bacteria and fungi were incubated for 5–21 days (depending on the fungal strain) at 30 °C. After incubation, the distance between the point of inoculation of the fungal disk and actively growing edges of the fungus was measured in both, control plates and those coinoculated with bacteria. The percent growth inhibition (PGI) was calculated using the equation:

$$\text{PGI} = \frac{\text{KR} - \text{R1}}{\text{KR}} \times 100\%, \quad (1)$$

where KR represents the distance (in mm) from the point of the fungal inoculation to mycelium growing edges on control dishes, and R1 represents the distance of fungal growth towards the antagonist

from the point of fungal inoculation to the fungal colony margin on plates inoculated with bacteria. The experiment was performed in triplicate.

4.5. In Vitro Assessment of Colonization, Plant Growth Promotion (PGP), and Biocontrol Traits of the BRZ63 Strain

P. fluorescens BRZ63 was evaluated for its colonization and plant growth-promoting capability as well as biocontrol properties in comparison to the control 4FJK strain. Microbial production of cell wall-degrading enzymes, such as proteases and cellulases, was determined according to the protocol of Vijayalakshmi et al. [72]. Chitinase production was tested on the colloidal chitin agar medium using the method described by Kuddus and Ahmad [73]. The biofilm formation, motility, oxidase, and catalase activity of the tested strains were determined following the procedures described by Naveed et al. [74]. Classification of the biofilm formation ability was performed according to Stepanovic et al. [22]. Production of EPS was assessed by cultivating the BRZ63 and 4FJK on CRA using the method modified by Freeman et al. [75]. Production of indole-3-acetic acid by the tested strains was determined by a colorimetric method using Salkowski reagent [76], while the production of ammonia was determined after the incubation of the tested bacteria in peptone water for 72 h at 30 °C [77]. Production of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase was determined according to the method of Sandhya et al. [33]. Solubilization of phosphate was detected based on the formation of the clear halo surrounding the bacterial colony on the Pikovskay'a medium containing insoluble Ca₃(PO₄)₂ after 5 days of incubation at 30 °C [78] and PSI was calculated according to the method described by [79]. The ability of strains to produce siderophores was determined in CAS agar [80]. Production of acetoin and 2,3-butanediol was determined according to the method of Johnston-Monje and Raizada [81]. The ability of strains to produce SA and hydrogen cyanide (HCN) was verified according to the method of Syamala and Sivaji [82] and Ahmad et al. [83], respectively. The ability of the BRZ63 strain to synthesize extracellular glycolipid biosurfactants and emulsification activity was evaluated in comparison to the control P-1 strain using the method described by Pacwa-Płociniczak et al. [70] and Shoeb et al. [84], respectively. All experiments were performed in three biological replicates.

4.6. Autoaggregation Assay

Briefly, the BRZ63 and 4FJK strains were cultivated separately in the LB medium for 24 h at 30 °C and centrifuged (5000 rpm, 20 min, 4 °C). The cells were washed three times to remove the remaining culture medium, resuspended in phosphate-buffered saline (PBS pH 7.2), and the bacterial cell suspension was adjusted to OD at a wavelength of 600 nm (OD₆₀₀) of 1.0. Then, OD₆₀₀ was measured after 2, 18, and 24 h using a spectrophotometer. Aggregation was expressed as a percentage of aggregated cells and calculated as follows:

$$A = \frac{OD_{600i} - OD_{600a}}{OD_{600i}} \times 100\%, \quad (2)$$

where OD_{600i} is the initial absorbance of the bacterial cell suspension and OD_{600a} is the absorbance measured after the incubation.

4.7. Plant Colonization Experiments

4.7.1. Fluorescent Labeling of the BRZ63 Strain

To label the BRZ63 strain with the EGFP protein, electrocompetent cells were prepared according to Nigris et al. [85] and transformed with pMP4566 plasmid vector with the constitutive expression of the *egfp* gene [23]. Electrotransformation was performed following the protocol of Prieto and Mercado-Blanco, [86]. Bacteria harboring plasmid were examined using a Nikon ECLIPSE-Ni-U stereo microscope equipped with epifluorescence detection, with 480/40 nm excitation and 510 nm long pass emission filter.

4.7.2. Inoculation of *Arabidopsis thaliana* Col-0 with the EGFP-Labeled Strain

The ability of the tested BRZ63 strain labeled with the EGFP to colonize plants was studied by inoculating seeds of a model plant *Arabidopsis thaliana* Col-0 using the method described by Naveed et al. [74] with minor modifications. The seeds were incubated for 2 h in distilled water and then surface sterilized for 5 min in a 20% sodium hypochlorite solution. Next, the seeds were washed three times in distilled water and then incubated for 2 h in a bacterial cell suspension ($OD_{600} = 0.5$). Bacteria used for inoculation were grown for 24 h at 30 °C in the LB medium supplemented with tetracycline (at a concentration of 50 µg/mL), subsequently centrifuged (5000 rpm, 10 min), and then suspended in sterile distilled water. Inoculated seeds were plated on water agar plates (1%) and grown for 7 days at room temperature under natural sunlight. In order to confirm the colonization of plants by the tested strain, 6 seedlings were selected. Root explants were first surface sterilized for 2 min with sodium hypochlorite 5%, rinsed with 70% ethanol, and then washed 3 times for 10 min with sterile deionized water. Roots were sliced longitudinally with a blade, mounted on a slide, and covered with a coverslip. The bacterial cells within the plant tissues were observed in a Nikon ECLIPSE-Ni-U stereo microscope equipped with epifluorescence detection, with 480/40 nm excitation and 510 nm long pass emission filter. As a control, the uninoculated plants were analyzed.

4.8. Effects of the BRZ63 Strain Inoculation on Oilseed Rape Development and Disease Protection

B. napus seeds were surface sterilized and inoculated with the EGFP-labeled BRZ63 strain as described above (Section 4.7.2). Next, bacteria-inoculated and uninoculated sterilized seeds were soaked for 5 h in homogenized mycelial mass separately for each fungal pathogen. The phytopathogens used for preparation of fungal inoculum were grown separately on PDA medium at 30 °C for 5–21 days (depending of the fungal strain). After incubation, the mycelial mass was collected, homogenized (2000 rpm, 2 min on ice) using an IKA Ultra-Turrax T25 Digital Homogenizer, and agitated with 15 mL of sterile distilled water. The prepared seeds were divided into 8 sets of treatments, namely RZ+BRZ63+CD (seeds inoculated with the BRZ63 strain and dipped in the inoculum of *C. dematium* K), RZ+BRZ63+RS (seeds inoculated with the BRZ63 strain and dipped in the inoculum of *R. solani* W70), RZ+BRZ63+SS (seeds inoculated with the BRZ63 strain and dipped in the inoculum of *S. sclerotiorum* K2291), RZ+BRZ63+FA (seeds inoculated with strain BRZ63 and dipped in the inoculum of *F. avenaceum*), CD (uninoculated seeds dipped in the inoculum of *C. dematium* K), RS (uninoculated seeds dipped in the inoculum of *R. solani* W), SS (uninoculated seeds dipped in the inoculum of *S. sclerotiorum* K2291), and FA (uninoculated seeds dipped in the inoculum of *F. avenaceum*), plated on water agar plates (1%) and grown at room temperature under natural sunlight. As positive controls, uninoculated seeds (RZ) and seeds inoculated with the BRZ63 strain (RZ+BRZ63) were used. The germinating seeds and seedlings were observed continuously to identify any phenotypic differences between treatments. The characteristics that were measured included the germination efficiency and the length and weights of the roots and shoots. All experiments were performed using 25 seeds for each treatment, repeated twice.

4.9. Genome Sequencing and Sequence Analysis

Genomic DNA of *P. fluorescens* BRZ63 was extracted using GeneMatrix Bacterial and Yeast Genomic Purification Kit (EURx, Gdansk, Poland). The sequencing was performed by MicrobesNG on the Illumina MiSeq platform with 2 × 250-bp paired-end reads. The results of the sequencing were subjected to a standard MicrobesNG analysis pipeline and were deposited in the GenBank database under the accession number SPVI00000000.1. Functional annotation was performed using eggNOG 5.0 with a one-to-one orthology restriction (<http://eggnogdb.embl.de>) [87]. For the annotation of gene function, genes were compared to the KEGG (Functional Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) database [88]. WebMGA was used for functional analysis of Cluster of Orthologous Genes (COG) [89]. antiSMASH 5.0 was used for identification of gene clusters responsible for

biosynthesis of secondary metabolites [90]. The CAZy database (Carbohydrate Active Enzymes database, <http://www.cazy.org/>) was used to classify cell wall-degrading enzymes (CWDEs) and divided them into different families. CAZy families were identified with dbCAN2 according to the DIAMOND database [91,92]. Sequencing data and assembly were submitted to a public NCBI database under the BioProject accession number PRJNA529642.

4.10. Phylogenetic Analysis

The phylogenetic tree was constructed based on the type strains and well-described strains belonging to the *Pseudomonas* genus with *Escherichia coli* K-12 substr. MG1655 as an outgroup. The core proteomes of the 20 strains were extracted and aligned with M1CR0B1AL1Z3R on default settings [93]. Poorly aligned regions were removed by Gblocks (version 0.91b) (Integrated DNA Technologies, Iowa, IA, USA) [94], which resulted in 6824 amino acids for 20 genomes. A maximum-likelihood phylogenetic tree was obtained with MEGA X (version 10.1.5) (Pennsylvania State University, Mueller Laboratory, University Park, PA, USA) on default settings and 1000 bootstraps resampling value [95].

4.11. Statistical Analysis

The statistical analysis was carried out by using Microsoft Office Excel 2010 and Statistica 12.5 PL (StatSoft® Inc., Tulsa, OK, USA). Data were presented as the mean \pm standard deviation (SD) of three biological replicates. Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA). Whenever significant differences were observed, a post hoc Tukey's honest significant difference (HSD) test was used to further elucidate differences among the means ($p < 0.05$). Letters indicate that means differ significantly.

5. Conclusions

The results of this study showed that the *P. fluorescens* BRZ63 strain originally isolated from the roots of oilseed rape holds great potential to be exploited as a biological control agent. The examined strain was found to have antagonistic activity against taxonomically diverse fungal pathogens and inhibited the fungal infection in the germinating oilseed rape seeds and seedlings. It can contribute to biocontrol and promotion of the plant growth through a variety of mechanisms, including production of siderophores, lytic enzymes, biosurfactants, SA, IAA, ACC deaminase, ammonia, and phosphate solubilization. Genome sequencing confirmed the presence of crucial genes encoding a wide range of mechanisms determining biological activity, plant growth promotion, and colonization. The potential for the production of a range of secondary metabolites underlines its ability to protect plants against phytopathogens. Antagonistic activity of the BRZ63 towards various pathogens significantly increases the possibility of its application as a biocontrol factor.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/22/8740/s1>. Table S1. Functional cluster of orthologous genes (COG) classification of predicted genes in the *P. fluorescens* BRZ63 strain. Table S2. Secondary metabolite gene clusters identified in the *P. fluorescens* BRZ63 strain using antiSMASH v. 5.1.2. Table S3. Genes attributed to biocontrol, plant growth promotion and colonization traits identified in the *P. fluorescens* BRZ63 genome. Table S4. Genes related to carbohydrate-active enzymes (CAZymes) in the *P. fluorescens* BRZ63 strain. Table S5. CAZymes involved in plant and fungal cell wall degradation identified in the *P. fluorescens* BRZ63 genome. Figure S1. In vitro inhibition of mycelial growth of *Rhizoctonia solani* W70 (A), *Colletotrichum dematium* K (B), *Sclerotinia sclerotiorum* K2291 (C), and *Fusarium avenaceum* (D) by *P. fluorescens* BRZ63. Upper panel—control - pathogenic fungi grown on PDA medium; bottom panel—dual culture assay on PDA medium - growth of fungi in the presence of BRZ63. Figure S2. Effects of the BRZ63 strain on disease protection of oilseed rape. The leaves and roots of seedlings emerged from the uninoculated seeds (RZ) and seeds inoculated with the BRZ63 strain (RZ+BRZ63). The leaves of seedlings emerged from the uninoculated seeds dipped in the inoculum of *F. avenaceum* (RZ+FA) and seeds preinoculated with strain BRZ63 and dipped in the inoculum of the pathogen (RZ+BRZ63+FA). The leaves of seedlings emerged from the uninoculated seeds dipped in the inoculum of *S. sclerotiorum* K2291 (RZ+SS) and seeds preinoculated with strain BRZ63 and dipped in the inoculum of the pathogen (RZ+BRZ63+SS). The leaves of seedlings emerged from the uninoculated seeds dipped in the inoculum of *C. dematium* K (RZ+CD) and seeds preinoculated with strain BRZ63 and dipped in the inoculum of the pathogen (RZ+BRZ63+CD). The roots of seedlings emerged from the uninoculated seeds dipped

in the inoculum of *R. solani* W70 (RZ+RS) and seeds preinoculated with strain BRZ63 and dipped in the inoculum of the pathogen (RZ+BRZ63+RS).

Author Contributions: Conceptualization, D.C. and K.H.-K.; methodology, D.C., A.P., J.M.; software, D.C., A.P.; formal analysis, D.C., A.P., J.Ž.; data curation, D.C., A.P.; writing—original draft preparation, D.C. and K.H.-K.; writing—review and editing—all of the authors; visualization, D.C. and K.H.-K.; supervision, K.H.-K.; project administration, D.C. and K.H.-K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: We wish to thank Luis A. J. Mur (Aberystwyth University) for his assistance with the whole genome sequencing of *Pseudomonas fluorescens* BRZ63. The genome sequencing was provided by MicrobesNG (<http://www.microbesng.uk>), which is supported by the BBSRC (grant number BB/L024209/1). The authors are very grateful to Bożena Nowak for providing the fungal strains. We wish also to thank Małgorzata Pawlik for providing the bacterial strain *Enterobacter asburiae* 4FJK and Magdalena Pacwa-Płociniczak for providing the strain *Pseudomonas* sp. P-1.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

IAA	Indole-3-acetic acid
ACC	1-aminocyclopropane-1-carboxylate
HSD	Honest significant difference
CRA	Congo Red Agar
EPS	Exopolysaccharide
CV	Crystal Violet
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
SA	Salicylic acid
ISR	Induced Systemic Resistance
DF	Dworkin and Foster
PSI	Phosphate Solubilizing Index
CAS	Chrome azurol S
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide
CDS	Protein-encoding sequences
COG	Cluster of Orthologous Genes
PGP	Plant Growth Promotion
LPS	Lipopolysaccharide
GH	Glycoside Hydrolases
CE	Carbohydrate Esterases
TBDRs	TonB-dependent receptors
GDH	Glutamate dehydrogenase
PQQ	Pyrroloquinoline quinon
LB	Luria-Bertani
PDA	Potato Dextrose Agar
HCN	Hydrogen cyanide
CWDEs	Cell Wall Degrading Enzymes

References

1. Abdallah, A.B.R.; Jabnoun-Khiareddine, H.; Nefzi, A.; Mokni-Tlili, S.; Daami-Remadi, M. Endophytic bacteria from *Datura stramonium* for *Fusarium* wilt suppression and tomato growth promotion. *J. Microb. Biochem. Technol.* **2016**, *8*, 30–41. [[CrossRef](#)]
2. Majid, M.U.; Awan, M.F.; Fatima, K.; Tahir, M.S.; Ali, Q.; Rasid, B.; Rao, A.Q.; Nasit, I.A.; Husnain, T. *Phytophthora capsici* on chili pepper (*Capsicum annuum* L.) and its management through genetic and bio-control: A review. *Zemdirbyste* **2016**, *103*, 419–430. [[CrossRef](#)]
3. Ajayi-Oyetunde, O.O.; Bradley, C.A. *Rhizoctonia solani*: Taxonomy, population biology and management of rhizoctonia seedling disease of soybean. *Plant. Pathol.* **2018**, *67*, 3–17. [[CrossRef](#)]

4. del Rio, L.E.; Bradley, C.A.; Henson, R.A.; Endres, G.J.; Hanson, B.K.; McKay, K.; Halvorson, M.; Porter, P.M.; Le Gare, D.G.; Lamey, H.A. Impact of *Sclerotinia* stem rot on yield of canola. *Plant Dis.* **2007**, *91*, 191–194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lally, R.D.; Galbally, P.; Moreira, A.S.; Spink, J.; Ryan, D.; Germaine, K.J.; Dowling, D.N. Application of endophytic *Pseudomonas fluorescens* and a bacterial consortium to *Brassica napus* can increase plant height and biomass under greenhouse and field conditions. *Front. Plant. Sci.* **2017**, *8*, 2193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Aktar, M.W.; Sengupta, D.; Chowdhury, A. Impact of pesticides use in agriculture: Their benefits and hazards. *Interdiscip. Toxicol.* **2009**, *2*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Bardin, M.; Ajouz, S.; Comby, M.; Lopez-Ferber, M.; Graillot, B.; Siegwart, M.; Nicot, P.C. Is the efficacy of biological control against plant diseases likely to be more durable than that of chemical pesticides? *Front. Plant. Sci.* **2015**, *6*, 566. [[CrossRef](#)]
8. Eljounaidi, K.; Kyu, S.; Bae, H. Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases—Review and future prospects. *Biol. Control* **2016**, *103*, 62–68. [[CrossRef](#)]
9. Kandel, S.L.; Firrincieli, A.; Joubert, P.M.; Okubara, P.; Natalie, D.; McGeorge, K.M.; Mugnozza, G.S.; Harfouche, A.; Kim, S.H.; Doty, S.L. An in vitro study of bio-control and plant growth promotion potential of salicaceae endophytes. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 386. [[CrossRef](#)]
10. Yadav, A.; Yadav, K. Exploring the potential of endophytes in agriculture: A minireview. *Adv. Plants Agric. Res.* **2017**, *6*, 102–106. [[CrossRef](#)]
11. Bakker, P.A.; Berendsen, R.L.; Doornbos, R.F.; Wintermans, P.C.; Pieterse, C.M. The rhizosphere revisited: Root microbiomics. *Front. Plant. Sci.* **2013**, *4*, 165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Liu, H.; Carvalhais, L.C.; Crawford, M.; Singh, E.; Dennis, P.G.; Pieterse, C.M.J.; Schenke, P.M. Inner Plant Values: Diversity, Colonization and Benefits from Endophytic Bacteria. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2552. [[CrossRef](#)]
13. Verma, S.K.; Kingsley, K.L.; Bergen, M.S.; Kowalski, K.P.; White, J.F. Fungal disease prevention in seedlings of rice (*Oryza sativa*) and other grasses by growth-promoting seed-associated endophytic bacteria from invasive *Phragmites australis*. *Microorganisms* **2018**, *6*, 21. [[CrossRef](#)]
14. Benhamou, N.; Gagné, S.; Quéré, D.L.; Dehbi, L. Bacterial mediated induced resistance in cucumber: Beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia plymuthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. *Biochem. Cell Biol.* **2000**, *90*, 45–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Pinski, A.; Betekhtin, A.; Hupert-Kocurek, K.; Mur, L.A.J.; Hasterok, R. Defining the Genetic Basis of Plant–Endophytic Bacteria Interactions. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1947. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Liu, X.; Jia, J.; Atkinson, S.; Cámara, M.; Gao, K.; Li, H.; Cao, J. Biocontrol potential of an endophytic *Serratia* sp. G3 and its mode of action. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *26*, 1465–1471. [[CrossRef](#)]
17. Vinayarani, G.; Prakash, H.S. Growth promoting rhizospheric and endophytic bacteria from *Curcuma longa* L. as biocontrol agents against rhizome rot and leaf blight diseases. *Plant. Pathol. J.* **2018**, *3*, 218–235.
18. Martínez-García, P.M.; Ruano-Rosa, D.; Schilirò, E.; Prieto, P.; Ramos, C.; Rodríguez-Palenzuela, P. Complete genome sequence of *Pseudomonas fluorescens* strain PICF7, an indigenous root endophyte from olive (*Olea europaea* L.) and effective biocontrol agent against *Verticillium dahliae*. *Stand. Genomic Sci.* **2015**, *10*, 10. [[CrossRef](#)]
19. Preston, G.M. Plant perceptions of plant growth-promoting *Pseudomonas*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **2004**, *359*, 907–918. [[CrossRef](#)]
20. Chlebek, D.; Hupert-Kocurek, K. Endophytic bacteria in the phytodegradation of persistent organic pollutants. *Post. Microbiol.* **2019**, *1*, 70–79.
21. Bajpai, A.; Johri, B.N. Endophytic *Pseudomonads* and Their Metabolites. In *Endophytes and Secondary Metabolites*; Jha, S., Ed.; Springer: Cham, Switzerland, 2019; pp. 33–59.
22. Stepanovic, S.; Vukovic, D.; Hola, V.; Di Bonaventura, G.; Djukic, S.; Cirkovic, I.; Ruzicka, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* **2007**, *115*, 891–899. [[CrossRef](#)]
23. Bloembergen, G.V.; Wijfjes, A.H.M.; Lamers, G.E.M.; Stuurman, N.; Lugtenberg, B.J.J. Simultaneous imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 populations expressing three different autofluorescent proteins in the rhizosphere: New perspectives for studying microbial communities. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **2000**, *13*, 1170–1176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

24. Kimbrel, J.A.; Givan, S.A.; Halgren, A.B.; Creason, A.L.; Mills, D.I.; Banowetz, G.M.; Armstrong, D.J.; Chang, J.H. An improved, high-quality draft genome sequence of the Germination-Arrest Factor-producing *Pseudomonas fluorescens* WH6. *BMC Genom.* **2010**, *11*, 522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Nelkner, J.; Tejerizo, G.T.; Hassa, J.; Lin, T.W.; Witte, J.; Verwaaijen, B.; Winkler, A.; Bunk, B.; Spröer, C.; Overmann, J.; et al. Genetic potential of the biocontrol agent *Pseudomonas brassicacearum* (formerly *P. trivialis*) 3Re2-7 unraveled by genome sequencing and mining, comparative genomics and transcriptomics. *Genes* **2019**, *10*, 601. [[CrossRef](#)]
26. Sheibani-Tezerji, R.; Rattei, T.; Sessitsch, A.; Trognitz, F.; Mitter, B. Transcriptome profiling of the endophyte *Burkholderia phytofirmans* PsJN indicates sensing of the plant environment and drought stress. *mBio* **2016**, *6*, e00621-15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Li, H.; Li, H.B.; Bai, Y.; Wang, J.; Nie, M.; Li, B.; Xiao, M. The use of *Pseudomonas fluorescens* P13 to control sclerotinia stem rot (*Sclerotinia sclerotiorum*) of oilseed rape. *J. Microbiol.* **2011**, *49*, 884–889. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Hammoudi, O.; Salman, M.; Abuamsha, R.; Ehlers, R. Effectiveness of bacterial and fungal isolates to control *Phoma lingam* on oilseed rape *Brassica napus*. *Am. J. Plant. Sci.* **2012**, *3*, 773–779. [[CrossRef](#)]
29. Redondo-Nieto, M.; Barret, M.; Morrissey, J.; Germaine, K.; Martínez-Granero, F.; Barahona, E.; Dowling, D. Genome sequence reveals that *Pseudomonas fluorescens* F113 possesses a large and diverse array of systems for rhizosphere function and host interaction. *BMC Genom.* **2013**, *14*, 54. [[CrossRef](#)]
30. Neesemann, K.; Braus-Stromeyer, S.A.; Harting, R.; Höfer, A.; Kusch, H.; Ambrosio, A.B.; Braus, G.H. Fluorescent pseudomonads pursue media-dependent strategies to inhibit growth of pathogenic *Verticillium* fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 817–831. [[CrossRef](#)]
31. Jiménez, J.A.; Novinscak, A.; Filion, M. *Pseudomonas fluorescens* LBUM677 differentially increases plant biomass, total oil content and lipid composition in three oilseed crops. *J. Appl. Microbiol.* **2020**, *128*, 1119–1127. [[CrossRef](#)]
32. Kandel, S.L.; Joubert, P.M.; Doty, S.L. Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. *Microorganisms* **2017**, *5*, 77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Sandhya, V.; Shrivastava, M.; Ali, S.Z.; Prasad, V.S.S.K. Endophytes from maize with plant growth promotion and biocontrol activity under drought stress. *Russ. Agric. Sci.* **2017**, *43*, 22–34. [[CrossRef](#)]
34. Li, H.; Parmar, S.; Sharma, V.K.; White, J.F. Seed endophytes and their potential applications. In *Seed Endophytes*; Verma, S.K., White, J.F., Jr., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2019; pp. 35–54.
35. Sturrock, C.J.; Woodhall, J.; Brown, M.; Walker, C.; Mooney, S.J.; Ray, R.V. Effects of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2-1 on roots of wheat and oil seed rape quantified using X-ray Computed Tomography and real-time PCR. *Front. Plant. Sci.* **2015**, *6*, 461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Kumar, D.; Kalita, P. Reducing Postharvest Losses during Storage of Grain Crops to Strengthen Food Security in Developing Countries. *Foods* **2017**, *6*, 8. [[CrossRef](#)]
37. Drizou, F.; Graham, N.S.; Bruce, T.J.A.; Ray, R.V. Development of high-throughput methods to screen disease caused by *Rhizoctonia solani* AG 2-1 in oilseed rape. *Plant. Methods* **2017**, *13*, 45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Chen, Y.; Zhou, Q.; Strelkov, S.E.; Hwang, S.F. Genetic Diversity and Aggressiveness of *Fusarium* spp. Isolated from Canola in Alberta, Canada. *Plant. Dis.* **2015**, *98*, 727–738. [[CrossRef](#)]
39. Machowicz-Stefaniak, Z. Occurrence and characterization of *Colletotrichum dematium* (Fr.) Grove. *Pol. J. Microbiol.* **2010**, *59*, 191–200. [[CrossRef](#)]
40. Loper, J.E.; Kobayashi, D.Y.; Paulsen, I.T. The genomic sequence of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5: Insights into biological control. *Phytopathology* **2007**, *97*, 233–238. [[CrossRef](#)]
41. Trippe, K.; McPhail, K.; Armstrong, D.; Azevedo, M.; Banowetz, G. *Pseudomonas fluorescens* SBW25 produces furanomycin, a non-proteinogenic amino acid with selective antimicrobial properties. *BMC Microbiol.* **2013**, *13*, 111. [[CrossRef](#)]
42. Hardoim, P.R.; van Overbeek, L.S.; Elsas, J.D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol.* **2008**, *16*, 463–471. [[CrossRef](#)]
43. Pankiewicz, V.C.; Camilios-Neto, D.; Bonato, P.; Balsanelli, E.; Tadra-Sfeir, M.Z.; Faoro, H.; Monteiro, R.A. RNA-seq transcriptional profiling of *Herbaspirillum seropedicae* colonizing wheat (*Triticum aestivum*) roots. *Plant. Mol. Biol.* **2016**, *90*, 589–603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

44. Wu, X.; Monchy, S.; Taghavi, S.; Zhu, W.; Ramos, J.; van der Lelie, D. Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol. Rev.* **2011**, *35*, 299–323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Weert, S.; Vermeiren, H.; Mulders, I.H.; Kuiper, I.; Hendrickx, N.; Bloemberg, G.V.; Vanderleyden, J.; de Mot, R.; Lugtenberg, B.J. Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **2002**, *15*, 1173–1180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Seneviratne, G.; Weerasekara, M.L.M.A.W.; Seneviratne, K.A.C.N.; Zavahir, J.S.; Kecskes, M.L.; Kennedy, I.R. *Importance of Biofilm Formation in Plant Growth Promoting Rhizobacterial Action. Plant Growth and Health Promoting Bacteria. Microbiology Monographs*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2011; Volume 18, pp. 81–95.
47. Tovi, N.; Frenk, S.; Hadar, Y.; Minz, D. Host Specificity and Spatial Distribution Preference of Three *Pseudomonas* Isolates. *Front. Microbiol.* **2019**, *9*, 3263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Hernández-Salmerón, J.E.; Moreno-Hagelsieb, G.; Santoyo, G. Genome comparison of *Pseudomonas fluorescens* UM270 with related fluorescent strains unveils genes involved in rhizosphere competence and colonization. *J. Genom.* **2017**, *5*, 91–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Meneses, C.H.S.G.; Rouws, L.F.M.; Simoes-Araujo, J.L.; Vidal, M.S.; Baldani, J.I. Exopolysaccharide production is required for biofilm formation and plant colonization by the nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **2011**, *24*, 1448–1458. [[CrossRef](#)]
50. Costa, O.Y.A.; Raaijmakers, J.M.; Kuramae, E.E. Microbial Extracellular Polymeric Substances: Ecological Function and Impact on Soil Aggregation. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1636. [[CrossRef](#)]
51. Chang, W.S.; van de Mortel, M.; Nielsen, L.; de Guzman, G.N.; Li, X.; Halverson, L.J. Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 8290–8299. [[CrossRef](#)]
52. Maleki, S.; Almaas, E.; Zotchev, S.; Valla, S.; Ertesvåg, H. Alginate biosynthesis factories in *Pseudomonas fluorescens*: Localization and correlation with alginate production level. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82*, 41227–41236. [[CrossRef](#)]
53. Bogino, P.C.; de las Mercedes, O.M.; Sorroche, F.G.; Giordano, W. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 15838–15859. [[CrossRef](#)]
54. Vanitha, S.; Ramjegathesh, R. Bio Control Potential of *Pseudomonas fluorescens* against Coleus Root Rot Disease. *J. Plant. Pathol. Microb.* **2014**, *5*, 216.
55. Zhao, L.F.; Xua, Y.J.; Lai, X.H. Antagonistic endophytic bacteria associated with nodules of soybean (*Glycine max* L.) and plant growth-promoting properties. *Braz. J. Microbiol.* **2018**, *49*, 269–278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Nagarajkumar, M.; Bhaskaran, R.; Velazhahan, R. Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *Microbiol. Res.* **2004**, *159*, 73–81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Solanki, M.K.; Robert, A.S.; Singh, R.K.; Kumar, S.; Pandey, A.K.; Srivastava, A.K.; Arora, D.K. Characterization of mycolytic enzymes of *Bacillus* strains and their bio-protection role against *Rhizoctonia solani* in tomato. *Curr. Microbiol.* **2012**, *65*, 330–336. [[CrossRef](#)]
58. Ahmad, Z.; Wu, J.; Chen, L.; Dong, W. Isolated *Bacillus subtilis* strain 330-2 and its antagonistic genes identified by the removing PCR. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1777. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Goswami, D.; Borah, S.N.; Lahkar, J.; Handique, P.J.; Deka, S. Antifungal properties of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* DS9 against *Colletotrichum falcatum*. *J. Basic Microbiol.* **2015**, *55*, 1265–1274. [[CrossRef](#)]
60. Das, P.; Yang, X.P.; Ma, L.Z. Analysis of biosurfactants from industrially viable *Pseudomonas* strain isolated from crude oil suggests how rhamnolipids congeners affect emulsification property and antimicrobial activity. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 696. [[CrossRef](#)]
61. Abalos, A.; Pinazo, A.; Infante, M.R.; Casals, M.; Garcia, F.; Manresa, A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir* **2001**, *17*, 1367–1371. [[CrossRef](#)]

62. Djavaheri, M.; Mercado-Blanco, J.; Versluis, C.; Meyer, J.M.; Van Loon, L.C.; Bakker, P.A.H.M. Iron-regulated metabolites produced by *Pseudomonas fluorescens* WCS374r are not required for eliciting induced systemic resistance against *Pseudomonas syringae* pv. tomato in *Arabidopsis*. *Microbiol. Open* **2012**, *1*, 311–325. [[CrossRef](#)]
63. Mercado-Blanco, J.; Rodríguez-Jurado, D.; Hervás, A.; Jiménez-Díaz, R.M. Suppression of *Verticillium* wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. *Biol. Control* **2004**, *30*, 474–486. [[CrossRef](#)]
64. Afzal, I.; Shinwari, Z.K.; Sikandar, S.; Shahzad, S. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiol. Res.* **2019**, *221*, 36–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Etesami, H.; Alikhani, H.A.; Hosseini, H.M. Indole-3-acetic acid (IAA) production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents. *MethodsX* **2015**, *2*, 72–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Hernandez-Leon, R.; Rojas-Solis, D.; Contreras-Perez, M.; Orozco-Mosqueda, M.D.; Macias-Rodriguez, L.I.; Reyes-de la Cruz, H.; Valencia-Cantero, E.; Santoyo, G. Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biol. Control* **2015**, *81*, 83–92. [[CrossRef](#)]
67. Kaur, C.; Selvakumar, G.; Ganeshamurthy, A.N. Draft genome sequence of phosphate-solubilizing bacterium *Paraburkholderia tropica* strain P-31 isolated from pomegranate (*Punica granatum*) rhizosphere. *Genome Announc.* **2016**, *4*, e00844-16. [[CrossRef](#)]
68. Otieno, N.; Lally, R.D.; Kiwanuka, S.; Lloyd, A.; Ryan, D.; Germaine, K.J.; Dowling, D.N. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 745. [[CrossRef](#)]
69. Pawlik, M.; Piotrowska-Seget, Z. Endophytic bacteria associated with *Hieracium piloselloides*: Their potential for hydrocarbon-utilizing and plant growth-promotion. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* **2015**, *78*, 860–870. [[CrossRef](#)]
70. Pacwa-Płociniczak, M.; Płaza, G.A.; Poliwoda, A.; Piotrowska-Seget, Z. Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum contaminated soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2014**, *21*, 9385–9395. [[CrossRef](#)]
71. Siala, R.; Chobba, I.B.; Vallaey, T.; Triki, M.A.; Jrad, M.; Cheffi, M.; Ayedi, I.; Elleuch, A.; Nems, A.; Cerqueira, F.; et al. Analysis of the Cultivable Endophytic Bacterial Diversity in the Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) and Evaluation of Its Antagonistic Potential against Pathogenic *Fusarium* Species that Cause Date Palm Bayound Disease. *J. Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *4*, 93–104.
72. Vijayalakshmi, R.; Kairunnisa, K.; Sivvaswamy, S.N.; Dharan, S.; Natarajan, S. Enzyme production and antimicrobial activity of endophytic bacteria isolated from medicinal plants. *Indian J. Sci. Technol.* **2016**, *9*, 1–8. [[CrossRef](#)]
73. Kuddus, S.M.; Ahmad, R.I.Z. Isolation of novel chitinolytic bacteria and production optimization of extracellular chitinase. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* **2013**, *11*, 39–46.
74. Naveed, M.; Mitter, B.; Yousaf, S.; Pastar, M.; Afzal, M.; Sessitsch, A. The endophyte *Enterobacter* sp. FD17: A maize growth enhancer selected based on rigorous testing of plant beneficial traits and colonization characteristics. *Biol. Fertil. Soils* **2014**, *50*, 249–262. [[CrossRef](#)]
75. Freeman, D.J.; Falkner, F.R.; Keane, C.T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J. Clin. Pathol.* **1989**, *42*, 872–874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Szilagyi-Zecchin, V.J.; Ikeda, A.C.; Hungria, M.; Adamoski, D.; Kava-Cordeiro, V.; Glienke, C.; Galli-Terasawa, L.V. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. *AMB Express* **2014**, *7*, 26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Cappuccino, J.G.; Sherman, N. *Biochemical activities of microorganisms. Microbiology, A Laboratory Manual*; The Benjamin/Cummings Publishing Co.: San Francisco, CA, USA, 1992; pp. 188–247.
78. Pikovskaya, R.I. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Microbiology* **1948**, *17*, 362–370.
79. Pande, A.; Pandey, P.; Mehra, S.; Singh, M.; Kaushik, S. Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* **2017**, *15*, 379–391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Schwyn, B.; Neilands, J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **1987**, *160*, 47–56. [[CrossRef](#)]

81. Johnston-Monje, D.; Raizada, M.N. Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, ethnography and ecology. *PLoS ONE* **2013**, *6*, e20396. [[CrossRef](#)]
82. Syamala, M.; Sivaji, M. Functional characterization of various plant growth promoting activity of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* from *Aloe vera* rhizosphere. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **2017**, *6*, 120–122.
83. Ahmad, F.; Ahmad, I.; Khan, M.S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple growth promoting activities. *Microbiol. Res.* **2008**, *163*, 173–181. [[CrossRef](#)]
84. Shoeb, E.; Ahmed, N.; Akhter, J.; Badar, U.; Siddiqui, K.; Ansari, F.; Baig, R. Screening and characterization of biosurfactant-producing bacteria isolated from the Arabian Sea coast of Karachi. *Turkish J. Biol.* **2015**, *39*, 210–216. [[CrossRef](#)]
85. Nigris, S.; Baldan, E.; Tondello, A.; Zanella, F.; Vitulo, N.; Favaro, G.; Marcato, S. Biocontrol traits of *Bacillus licheniformis* GL174, a culturable endophyte of *Vitis vinifera* cv. Glera. *BMC Microbiol.* **2018**, *18*, 133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Prieto, P.; Mercado-Blanco, J. Endophytic colonisation of olive roots by the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* PICF7. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2008**, *64*, 297–306. [[CrossRef](#)]
87. Huerta-Cepas, J.; Szklarczyk, D.; Heller, D.; Hernández-Plaza, A.; Forslund, S.K.; Cook, H.; Mende, D.R.; Letunic, I.; Rattei, T.; Jensen, L.J.; et al. EggNOG 5.0: A hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acid Res.* **2019**, *47*, 309–314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Kanehisa, M.; Sato, Y.; Kawashima, M.; Furumichi, M.; Tanabe, M. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, D457–D462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Wu, S.; Zhu, Z.; Fu, L.; Niu, B.; Li, W. WebMGA: A customizable web server for fast metagenomic sequence analysis. *BMC Genom.* **2011**, *12*, 444. [[CrossRef](#)]
90. Blin, K.; Shaw, S.; Steinke, K.; Villebro, R.; Ziemert, N.; Lee, S.Y.; Medema, M.H.; Weber, T. AntiSMASH 5.0: Updates to the Secondary Metabolite Genome Mining Pipeline. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, W81–W87. [[CrossRef](#)]
91. Yin, Y.; Mao, X.; Yang, J.; Chen, X.; Mao, F.; Xu, Y. dbCAN: A web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, W445–W451. [[CrossRef](#)]
92. Zhang, H.; Yohe, T.; Huang, L.; Entwistle, S.; Wu, P.; Yang, Z.; Busk, P.K.; Xu, Y.; Yin, Y. dbCAN2: A meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W95–W101. [[CrossRef](#)]
93. Avram, O.; Rapoport, D.; Portugez, S.; Pupko, T. M1CR0B1AL1Z3R-a user-friendly web server for the analysis of large-scale microbial genomics data. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, W88–W92. [[CrossRef](#)]
94. Talavera, G.; Castresana, J. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Syst. Biol.* **2007**, *56*, 564–577. [[CrossRef](#)]
95. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Nnyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 1547–1549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

A2. Genetic determinants of antagonistic interactions and the response of new endophytic strain *Serratia quinivorans* KP32 to fungal phytopathogens



Article

Genetic Determinants of Antagonistic Interactions and the Response of New Endophytic Strain *Serratia quinivorans* KP32 to Fungal Phytopathogens

Daria Chlebek *[†], Valeriia Grebtsova, Artur Piński[†], Joanna Żur-Pińska[†] and Katarzyna Hupert-Kocurek *[†]

Institute of Biology, Biotechnology and Environmental Protection, Faculty of Natural Sciences, University of Silesia in Katowice, Jagiellońska 28, 40-032 Katowice, Poland

* Correspondence: dachlebek@us.edu.pl (D.C.); katarzyna.hupert-kocurek@us.edu.pl (K.H.-K.); Tel.: +48-32-2009-462 (K.H.-K.)

† Present address: Biotechnology Centre, The Silesian University of Technology, B. Krzywoustego 8, 44-100 Gliwice, Poland.

Abstract: Fungal phytopathogens are challenging to control due to their penetration into plant tissues. Therefore, plant-colonizing bacteria could serve as an excellent weapon in fighting fungal infections. In this study, we aim to determine the biocontrol potential of the new endophytic strain *Serratia quinivorans* KP32, isolated from the roots of *Petroselinum crispum* L.; identify the related mechanisms; and understand the basis of its antagonistic interaction with taxonomically diverse fungi at the molecular level. The KP32 strain presented biological activity against *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum dematium*, *Fusarium avenaceum*, and *Sclerotinia sclerotiorum*, and its ability to inhibit the growth of the phytopathogens was found to be mediated by a broad spectrum of biocontrol features, such as the production of a number of lytic enzymes (amylases, chitinases, and proteases), siderophores, volatile organic and inorganic compounds, salicylic acid, and N-acyl-homoserine lactones. The higher expression of chitinase (*chiA*) and genes involved in the biosynthesis of hydrogen cyanide (*hcnC*), enterobactin (*entB*), and acetoin (*budA*) in bacteria exposed to fungal filtrates confirmed that these factors could act in combination, leading to a synergistic inhibitory effect of the strain against phytopathogens. We also confirm the active movement, self-aggregation, exopolysaccharide production, and biofilm formation abilities of the KP32 strain, which are essential for effective plant colonization. Its biological activity and colonization potential indicate that KP32 holds tremendous potential for use as an active biopesticide and plant growth promoter.

Keywords: biocontrol; endophytes; fungal phytopathogens; genome analysis; gene expression; *Serratia quinivorans*



Citation: Chlebek, D.; Grebtsova, V.; Piński, A.; Żur-Pińska, J.; Hupert-Kocurek, K. Genetic Determinants of Antagonistic Interactions and the Response of New Endophytic Strain *Serratia quinivorans* KP32 to Fungal Phytopathogens. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 15561. <https://doi.org/10.3390/ijms232415561>

Academic Editor: Anna Gałazka

Received: 28 October 2022

Accepted: 6 December 2022

Published: 8 December 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Bacteria from the genus *Serratia* are Gram-negative rods from the *Enterobacteriaceae* family isolated from different environments, such as soil, water, plants, insects, and vertebrates [1]. It is a highly diverse group that includes biologically and ecologically various species, from those beneficial to economically important plants to pathogenic species harmful to humans [2,3]. A significant group constitutes the entomopathogenic strains of *Serratia*, known for their ability to infect insects, including various pests [4,5]. The members of *Serratia* can produce a range of biologically active compounds as part of their adaptation to ecological niche(s) [1,6], and can enhance crop yields and environmental balance in agroecosystems by facilitating the uptake of nutrients from the environment [3]. These features make *Serratia* an attractive candidate for biocontrol [6], providing cost-effective and environmentally friendly pest and pathogen control in many crops [7]. Fungal phytopathogens are challenging to control, due to their diverse host spectra and penetration

into the internal tissues of plants [8,9]. Therefore, protection against fungal infection mediated by endophytic biological control agents (BCAs) establishing a stable relationship with the plant, provides additional advantages over rhizospheric or epiphytic microorganisms [10]. An improved understanding of bacterial–fungal interactions in the rhizosphere and endosphere should assist in successfully applying bacteria as BCAs against fungal pathogens of plants, providing alternatives to chemicals in sustainable agriculture.

Data in the literature have indicated that the biocontrol of plant pathogens is a complex process, and antagonism against the target fungus is often multi-faceted [11]. The mechanisms of fungal suppression include antibiosis [6], the production of lytic enzymes (e.g., chitinases, cellulase, β -1,3-glucanases, protease, DNase), siderophores [11], and volatile organic/inorganic compounds [12]. Additionally, bacteria-colonizing plant tissues may lead to induced systemic resistance (ISR), enhancing the plant's defensive capacity against diverse phytopathogens [13]. Among the bacterial factors capable of ISR induction, the most relevant are cell surface elements (e.g., lipopolysaccharides, exopolysaccharides, flagella), acetoin, 2,3-butanediol, lytic enzymes, and antibiotics [12]. It is worth noting that numerous strains of the genus *Serratia* are considered as reservoirs of structurally unique and biologically significant novel secondary metabolites with potent antifungal activities [3], such as prodigiosin, serrawettins [14], pyrrolnitrin, and several N-acyl-homoserine lactones (N-AHLs) [15] and, therefore, have been touted as an essential tool for the effective inhibition of growth of several pathogens [10], including *Rhizoctonia solani*, *Fusarium culmorum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum camelliae*, *Pythium ultimum*, and *Verticillium dahlia* [16]. For example, *S. plymuthica* strain IC14 protected cucumber seedlings against the *B. cinerea* grey mold and *S. sclerotiorum* white mold diseases of leaves under greenhouse conditions [17]. In the study described by Neupane et al. [18], an endophytic strain *S. proteamaculans* S4, isolated from rapeseed roots, was used as a biocontrol agent against *V. dahlia* and *R. solani*. In another study, *S. marcescens*, by inhibiting the growth of mycelium and conidia, showed the ability to biocontrol *Colletotrichum gloeosporioides*, a causative agent of fruit anthracnose in plants [19]. Wang et al. [10] have reported that the antagonistic activity of *S. proteamaculans* 336x against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* resulted from chitinase production. Purkayasth et al. [11] have reported that the in vitro biological activity of *S. marcescens* ETR17 against nine fungal pathogens (including *C. camelliae* and *R. solani*) was associated with the production of antibiotics (pyrrolnitrin and prodigiosin), chitinases, cellulases, proteases, and lipases, as well as siderophores. Based on the literature, the studies conducted to investigate bacterial biocontrol activities have mainly focused on the biochemical characterization of bacterial strains and evaluation of their biocontrol potential through the in vitro antagonism tests. The conventional polymerase chain reaction (PCR) method used to identify functional genes is commonly used to detect and assess the potential of corresponding antimicrobial compound syntheses. However, little is known about changes in the expression of bacterial genes following their interaction with phytopathogens, which can provide valuable clues for elucidating their biological control mechanisms. A thorough understanding of the antimicrobial mechanisms is essential for efficient and long-lasting biocontrol.

Many *Serratia* species—especially *S. proteamaculans*, *S. plymuthica*, *S. marcescens*, *S. ficaria*, *S. liquefaciens*, *S. grimesii*, *S. nematodiphila*, *S. rubidaea*, and *S. fonticola*—have been well-recognized for their ability for biological control and to stimulate plant growth [2,13,17,20,21]. In contrast, endophytic bacteria belonging to the *S. quinivorans* species are still poorly characterized, and their biocontrol potential requires further understanding. In this work, a new endophytic *S. quinivorans* KP32 strain, isolated from roots of *Petroselinum crispum* L., is investigated, in order to identify the mechanisms determining the high biocontrol activity of this strain, as well as to understand the basis of the antagonistic interaction between the KP32 strain and taxonomically diverse fungal pathogens at the molecular level. Genome analysis of this strain provided opportunities to expand our knowledge of genes and their role in determining antagonistic behavior. At the same time, the quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) method was used to determine the expression of functional genes. To the best of our knowledge, this is

the first study of the genome of endophytic strain *S. quinivorans*, which can play a crucial role in the biological control of common fungal phytopathogens. The main objectives of the study were the following: (1) determination of the antifungal activity of the KP32 strain against phytopathogens; (2) identification of genes essential for biocontrol activity in the KP32 strain genome; (3) determination of the effect of fungal phytopathogens on the expression of genes responsible for antifungal activity; and (4) verification of the biocontrol features of the KP32 strain through a biochemical assay. We hypothesized that: (1) the KP32 strain is able to inhibit the growth of diverse phytopathogenic fungi; (2) the strain displays various mechanisms of biological activity towards fungal pathogens; and (3) the pathogens differently influence the expression of genes determining the biological activity of the tested strain.

2. Results

2.1. In Vitro Inhibition of Phytopathogens by the *S. quinivorans* KP32 Strain

S. quinivorans KP32 was isolated from surface-sterilized roots of *Petroselinum crispum* L. Based on the ability of the strain to degrade organic pollutants (unpublished data) and the ease of cultivation under laboratory conditions, we tested its biocontrol ability with respect to common fungal phytopathogens from four different species (Figure 1a). The KP32 strain showed potent activity against *R. solani* W70 ($52.46 \pm 3.62\%$) and moderate activity against *C. dematium* K ($34.62 \pm 2.08\%$) and *F. avenaceum* ($40.43 \pm 3.75\%$). It exhibited the lowest ability to inhibit the growth of *S. sclerotiorum* ($26.41 \pm 7.91\%$); see Figure 2a. The diffusible compounds produced by the KP32 strain exhibited significant antifungal activity against all tested phytopathogens (Figure 1b). Mycelial growth of *R. solani* W70 was inhibited up to $79.36 \pm 2.72\%$, relative to the control (Figure 2b). Besides active diffusible compounds, the KP32 strain also produced volatile organic compounds (VOCs), inhibiting the mycelial growth of fungal phytopathogens (Figure 1c). In this study, the KP32 strain showed maximum antifungal activity with $80.37 \pm 2.26\%$ of mycelial growth inhibition in *R. solani* W70 compared to control, due to the production of active VOCs (Figure 2c). The production of both the diffusible and volatile compounds may be a critical phenomenon presented by the KP32 strain, which plays a crucial role in the in vitro inhibition of tested pathogens. The antifungal activity of supernatant obtained from the KP32 strain culture was also verified. The results of this experiment provide evidence that extracellular metabolites in the supernatant of the KP32 strain inhibit the growth of pathogens. Moreover, in each of the tests, apart from growth inhibition, changes in the mycelial morphology of all fungal pathogens were observed (Figures 1d and 2d).

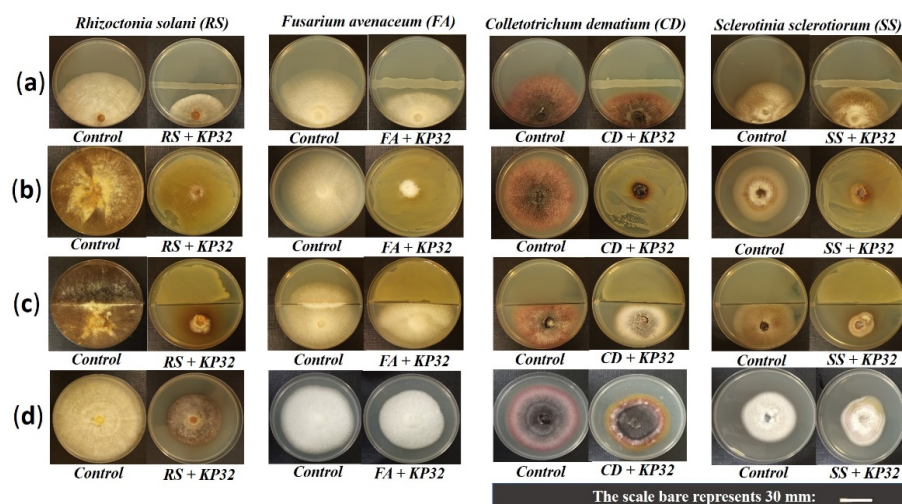


Figure 1. The inhibitory effect of *S. quinivorans* KP32 against fungal phytopathogens: Antagonistic action of the KP32 strain against fungal pathogens in the dual-culture assay (a); inhibition of fungal growth by diffusible metabolites produced by KP32 (b); the effect of VOCs produced by KP32 on the mycelial growth of phytopathogens (c); and the effect of cell-free filtrate of KP32 culture on the mycelial growth of fungal pathogens (d).

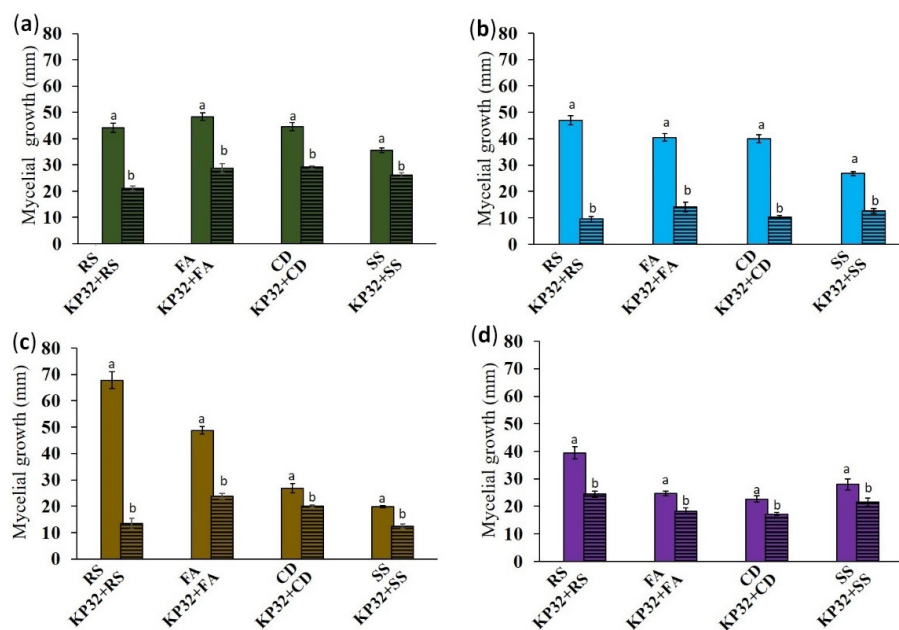


Figure 2. Inhibition of mycelial growth by the *S. quiniivorans* KP32 strain: Mycelial growth inhibition by the KP32 strain in dual-culture assay (a); mycelial growth inhibition by diffusible metabolites produced by KP32 (b); mycelial growth inhibition by the production of VOCs by KP32 (c); and mycelial growth inhibition by cell-free filtrate obtained from the KP32 strain culture (d). All experiments were performed in triplicate. To compare the effect of the tested strain against phytopathogenic fungi, Student's *t*-test was used. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$) between the treatment and control.

2.2. The Properties of Genome and Phylogenetic Analyses

A whole-genome sequence analysis was performed following the determination of the antagonistic activity of the KP32 strain. The newly sequenced 5,456,872 bp genome of *S. quiniivorans* KP32 (Table 1) was assembled into 107 contigs with an average G + C content of 64%. There were about 5098 predicted protein-encoding sequences (CDSs). In addition, the KP32 strain genome included 79 tRNA and 35 rRNA genes. The functional analysis performed using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) identified 3342 genes (65.5% of all CDSs) involved in any of the metabolic pathways included in the knowledge base (Figure S1a). From those genes that were classified among the KEGG pathway categories, the most significant number was involved in the metabolism of carbohydrates (10.32%), amino acids (5.98%), and cofactors and vitamins (4.37%). It is worth emphasizing that the presence in the genome of the biosynthetic pathway for the production of aromatic amino acids majorly contributes to the broad functional spectrum of organisms in nature, as various pigments, siderophores, antibiotics signaling compounds, structural compounds, defense metabolites, and other secondary metabolites are derived from this pathway [22]. Most of the remaining genes were involved in environmental and information-processing processes, such as membrane transport (7.78%) and signal transduction (4.70%). It is worth noting that a number of genes were involved in the biosynthesis of secondary metabolites and metabolism of terpenoids and polyketides, which represent essential bioactive natural products with a broad range of biological activities (Figure S1b). These compounds have general inhibitory activity against various pathogens, including fungi [6]. A total of 5018 protein-encoding genes were assigned to 24 clusters of orthologous genes (COGs); see Figure S2. These results confirmed a preference for the metabolism and transport of carbohydrates (8.37%) and amino acids (9.63%). Other high-percentage clusters represented genes involved in energy production and conversion (5.66%), as well as cell wall/membrane/envelope biogenesis (5.88%).

Table 1. General genome features of the KP32 strain.

Attribute	Value
Genome size (bp)	5,456,872
Contigs	107
G + C content (%)	64
Genes (total)	5194
CDSs (total)	5098
Genes (coding)	5024
Protein genes	5024
RNA genes	126
rRNAs	35
tRNAs	72
ncRNAs	12
Pseudogenes	44
Genes assigned to COGs	5018
Genes assigned to KEGG pathways	3342
BioProject ID	PRJNA743191
BioSample ID	SAMN20003760
GenBank accession number	JAHTKS000000000.1

The production of metabolites was predicted with antiSMASH. In the KP32 strain, seven gene clusters were identified (Table S1). Of these, two were non-ribosomal peptide-synthetase (NRPS)-type gene clusters, predicted for the biosynthesis of amonabactin, enterobactin, and streptobactin; two clusters were designated as the NRPS-like predicted for the biosynthesis indigine; and the other three were predicted to be engaged in the synthesis of betalactones, nucleosides, and siderophores (e.g., arylpolyene and aerobactin). These clusters presented similarity to the known clusters determining the production of secondary metabolites, which play an important role in the suppression of pathogens. The structure of these secondary metabolites was predicted using the PubChem website (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, accessed on 9 November 2021), and is furnished in Supplementary Figure S3.

The phylogenetic tree of *Serratia quinivorans* KP32, based on the alignment of the core proteome of 14 strains with *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883T as an outgroup, is illustrated in Figure 3. In the phylogenetic group of the genus *Serratia*, KP32 was grouped closely with *S. quinivorans* NCTC11544, *S. proteamaculans* 568, and *S. proteamaculans* 336X.

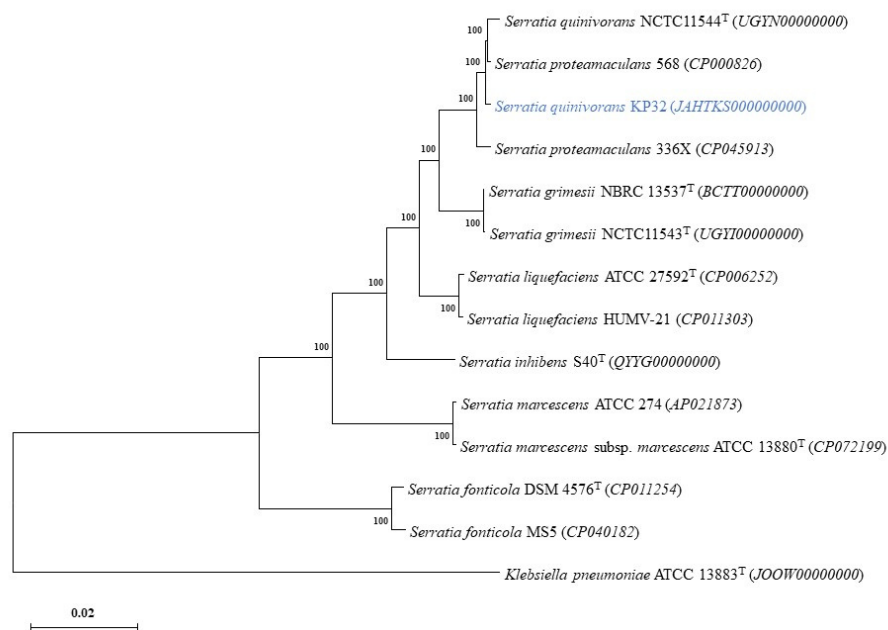


Figure 3. Phylogenetic tree of *S. quinivorans* KP32 (marked in blue) based on the alignment of the core proteome of 14 strains, with *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883^T as an outgroup. The accession numbers of genomes are indicated in brackets. Branching percentage values were calculated with the use of the 1000 bootstraps resampling test. The tree was constructed using the maximum likelihood method, and the scale bar represents 1% nucleotide sequence divergence.

2.3. Genes Essential for Biocontrol Activity in the KP32 Strain Genome

Genome analysis (Table S2) revealed the presence of genes involved in the biosynthesis and transport of siderophores, such as catecholates (enterobactin) and hydroxymates (aerobactin, ferrichrome), including *entC*, *entB*, and *entA* genes encoding enzymes that catalyze the formation of dihydroxybenzoic acid (DHBA) from chorismite. We also found genes encoding multi-enzyme complexes composed of the products of *entD*, *entE*, *entF*, and *entG*, which catalyze the synthesis of enterobactin from three molecules each of DHBA and serine. As for genes involved in aerobactin synthesis, the *iucABCD* gene cluster was identified, and the gene coding for the receptor of this siderophore (*iutA*) was also found upstream. Besides genes related to siderophore biosynthesis, genes encoding the ABC transporter complex associated with aerobactin production were also identified. Additionally, the KP32 strain was found to carry genes encoding ferrous iron uptake systems (*efeUOB*, *feoABC*, *fepABCDG*, and *fluBCD*) and a number of ABC transporters and receptor proteins of major facilitator superfamily (MFS) of transporters. We also found two copies of the *dps* gene related to iron storage inside the cell and proteins that present Fe-S-based prosthetic groups as those coded by *sufEDBCA*. This suggests that the KP32 strain can uptake iron, importing and exporting it to the host plant. The KP32 strain also carried phosphate transporters, such as the *pstABSC* transporter system. Furthermore, we found genes involved in phosphonoacetate degradation (*phnA*), polyP formation (*ppk*), genes encoding phosphatases (*ppa*), and two-component systems (*phoB*, *phoR*, *phoA*, *phoU*, *phoH*) responsible for the phosphate starvation response. Genome analysis revealed the presence of *gcd* for gluconic acid. We also searched for indole-3-acid (IAA) biosynthesis pathways in the KP32 genome. The analysis revealed the presence of biosynthesis genes in the IPyA pathway (*ipdC*, *aspC*, *aldA*) and tryptophan (TRP) biosynthesis genes. It is worth emphasizing that the KP32 strain also carried operons *speAB* and *speDE*, which are involved in spermidine biosynthesis. Genes required for assimilatory sulfate reduction (H₂S production) were present in the KP32 genome (*cysND*, *cysC*, *cysH*). Additionally, genes encoding the enzymes cystathionine β synthase (CBS) and cystathionine-γ-lyase (CTH), which are involved in other possible pathways for H₂S production, were also present. Additionally, the KP32 strain possessed the genes involved in acetoin (*ilvM*, *ilvH*, *ilvB*, *budA*) and 2,3-butanediol (*butA*) production. In addition, the genes for synthesis of VOCs, such as 4-hydroxybenzoate (*ubiC*), methanethiol (*met*), and isoprene (*gcpE* and *ispE*), were identified. The genome of the KP32 also carried the gene *hcnC* and genes for regulatory cascades such as GacS/GacA, as well as auto-regulators, which are involved in the biosynthesis and transportation of antibiotics [23]. In the genome of the KP32, we also found a gene encoding mannitol dehydrogenase (*mtlK*).

In the genome of the KP32 strain, we confirmed the presence of a gene encoding lytic and antioxidant enzymes. We found two genes encoding chitinases and enzymes involved in further chitin degradation. Furthermore, the analysis of the genome revealed genes involved in the production of amylase (*amyA*), lipase (*apeE*), and proteases (*yhbV*, *yegQ*). Additionally, we found a wide range of enzymes and regulators that help bacteria to cope with oxidative stress, such as *katA* (catalase, CAT), *katG* (catalase-peroxidase), *sodA*, *sodB*, *sodC* (superoxide dismutase, SOD), *gstA* (glutathione S-transferases, GTS), *gpo* (glutathione peroxidases), *gsiABCD* (glutathione ABC transporter), and *gor* (glutathione reductase). Additionally, genes coding for the hydrogen peroxidase sensor OxyR and the stress response sigma factor RpoS were identified. Furthermore, we also identified several genes (*uspABCEFG*) encoding universal stress proteins.

Bacterial colonization is dependent on motility and chemotaxis for attractive tags that may be compounds that activate bacterial-specific signaling pathways. In the genome of the KP32 strain, a cluster of genes associated with the induction of hyper-adherence (*yidE-16hspA-yidR-yidQ*), which has been described as fundamental for some microorganisms to colonize plants and seeds, was identified [24]. Moreover, we confirmed the presence of many genes involved in the biosynthesis and assembly of flagella, such as the *flg*, *fli*, and *flh* operons, as well as genes coding for the flagellar motor proteins MotA and MotB.

Additionally, many genes involved in chemotaxis (*cheBWARZ*, *tsr*, *aer*, *tar*, and *mcp*) and adhesive structure, which play significant roles in plant host–bacteria interactions, were recognized. We also found genes involved in the biosynthesis and assembly of the type IV pilus system (T4PS) (*hofBCMOPQ*) and pilin (*ppdABC*). The analysis of the KP32 genome also revealed several genes involved in cellulose (*bcsABZC* and *bcsEFG* operons) and colonic acid biosynthesis (*wza wzb, wzc*). These exopolysaccharides are produced by many *Enterobacteriaceae* and are critical for biofilm formation [25]. The genome of KP32 carried a *csgG* gene involved in curli fiber biosynthesis, which plays an essential role in adhesion to surfaces, cell aggregation, and biofilm formation [26]. Bacterial biofilms can be regulated by a mechanism that uses small signaling molecules (called autoinducers) for cellular communication, called *quorum sensing* (QS). The KP32 strain carried genes (*tqsA*, *luxS*) encoding enzymes that catalyze the synthesis of the signal precursor for autoinducer-2 mediated QS [27]. In the KP32 genome, we also identified 162 putative genes encoding carbohydrate-active enzymes (CAZy) distributed unevenly among the five CAZy families (Table S3). CAZymes with the potential to degrade many cell wall polymers, including hemicellulose, pectin, polysaccharides, and peptidoglycans, were found (Table S4).

Protein secretion plays a central role in modulating the interactions of bacteria with their environments. Different protein secretion systems are activated in some bacteria species during interactions with roots and pathogens [28]. Through these systems, bacteria secrete antibiotics, secondary metabolites, enzymes, toxins, and peptides into the surrounding environment, compete with nearby microorganisms, or are incorporated and used by their host plant [29,30]. In the genome of the KP32, we identified 30 genes involved in bacterial secretion systems. Among them, the Sec and Tat secretion pathways and most of the type II secretion systems (T2SS) and type VI secretion systems (T6SS) were found. It is worth emphasizing that more than one type of secretion system in the genome is evidence that the KP32 strain possesses efficient translocation systems for secreted compounds across the inner and outer membranes of cells. T6SSs and T2SSs are fairly well-conserved in a wide range of Gram-negative bacterial species. T2SSs transport folded proteins from the periplasm into the extracellular environment. This system secreted proteins, which have a range of biological functions: generally enzymes, such as lipases, proteases, phosphatases, and several proteins that process carbohydrates [30]. Interestingly, in 2018, Trunk et al. [31] reported the type VI secretion system-mediated delivery of antifungal effector proteins between *Serratia marcescens* and fungal cells.

The genome of the KP32 strain also carried horizontally transferred genomic islands (GIs). A GI often carries genes essential for genome evolution and adaptation to the environment. The GIs comprised 440 genes, mainly encoding various proteins primarily involved in multi-drug resistance regulatory factors (e.g., RhaR, SutR, RfaH, HxIR, ExaE) and heat-shock tolerance. We also found phage protein genes in the GI, indicating previous infection by phages. Moreover, no pathogenicity factor or compound has been linked to the KP32 genome, and the absence of any virulence, resistance, and pathogen-associated genes was confirmed.

2.4. Determination of the Effect of Fungal Phytopathogens on the Expression of Genes Responsible for Antifungal Activity

While genome sequencing and analyses revealed the presence of genes engaged in biocontrol mechanisms, studies on their expression are essential to understand the relationship between the interacting bacteria and specific fungal pathogens. For this study, several genes encoding features determining antifungal activity [11,12] were selected and analyzed using RT-qPCR. Total RNA was isolated from the KP32 cultures treated individually for 96 h with filtrates of *R. solani*, *F. avenaceum*, *C. dematium*, *S. sclerotiorum* and untreated bacteria (control). The changes in bacterial gene expression in response to the filtrates are summarized in Figure 4. We observed that studied phytopathogens differently influenced the expression of genes determining the biological activity of KP32. The gene expression profiles revealed mainly up-regulation of genes related to the biosynthesis of acetoin (*budA*),

hydrogen cyanide synthase (*hcnC*), chitinase (*chiA*), mannitol dehydrogenase (*mtlR*), bi-functional isochorismate lyase (*entB*), and catalase (*katG*). The expression levels of the *budA*, *hcnC*, and *katG* genes were significantly up-regulated after the exposure of the KP32 strain to the fungal filtrate of *R. solani* W70, where the expression was 1.7-, 1.85-, and 2.87-fold higher than in the control, respectively. The up-regulation of *hcnC* gene was also confirmed for other treatments. It is worth noting that the highest expression for the *hcnC* gene was observed for the KP32 culture inoculated with the fungal filtrate of *S. sclerotiorum*, where the expression was 2.12-fold higher than in the control. The expression level of the *chiA* gene increased in the KP32 cells treated with fungal filtrates of *C. dematium* and *S. sclerotiorum*, being 1.5- and 1.65-fold higher than in the control, respectively. In the presence of the filtrates of these fungi, increased expression of the *entB* gene was also observed. It is worth emphasizing that the highest expression of the *budA* gene was detected for the KP32 culture inoculated with fungal filtrate of *S. sclerotiorum*, with expression 2.3-fold higher than in the control. The *iucA* gene encoding aerobactin synthase was down-regulated when fungal filtrates were added to the culture of the KP32 strain. In addition, the presence of fungi in the cultures did not change the expression of *pchB* and *sodB* genes, while the expression of *katG* was significantly upregulated after culturing the KP32 in the presence of *R. solani*, *F. avenaceum*, and *S. sclerotiorum* filtrates. The obtained results showed that the production of acetoin and hydrogen cyanide contribute to the biological activity of the KP32 strain towards each tested phytopathogen and the reduction of oxidative stress caused by the fungal pathogens could be related to the increased catalase production by the strain.

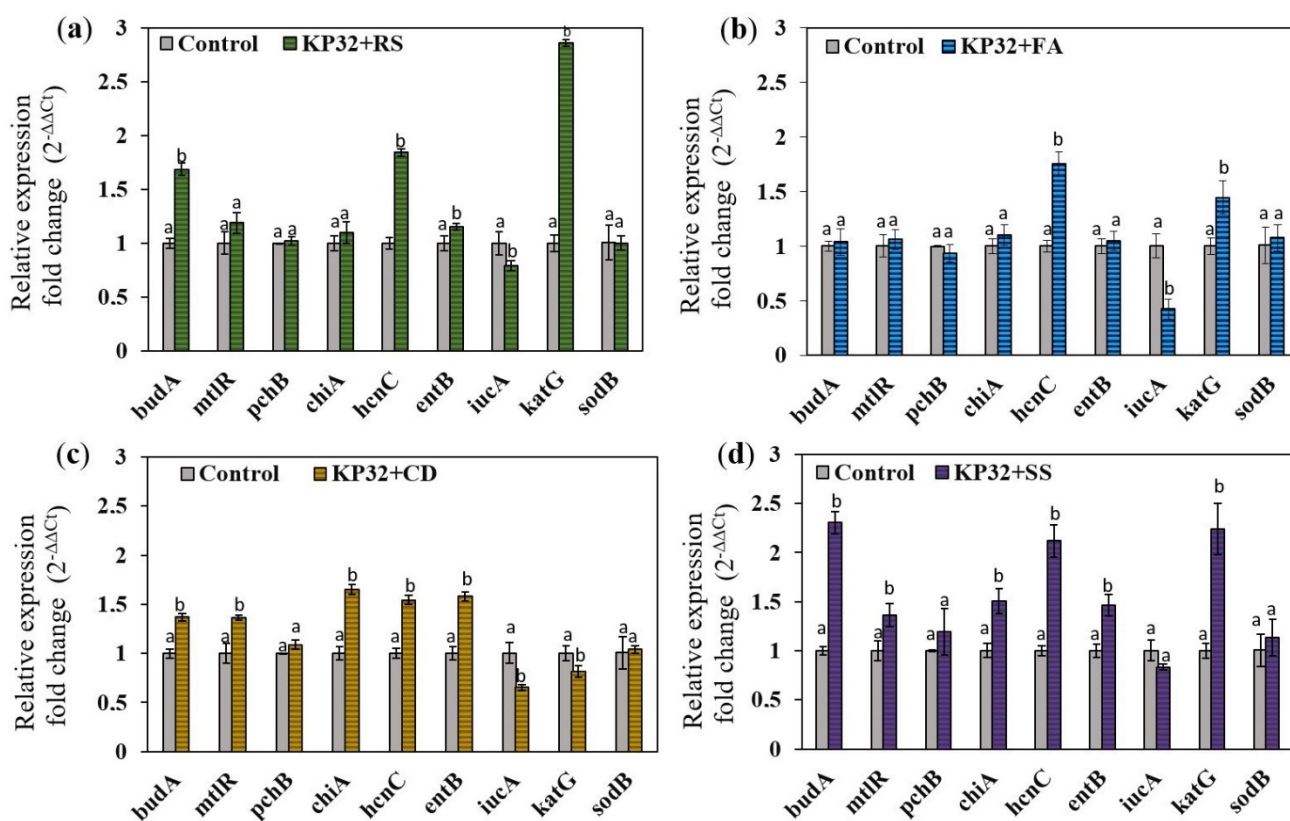


Figure 4. Analysis of the expression of genes potentially engaged in the biocontrol activity of the KP32 strain in the presence of fungal pathogens analyzed with fungal filtrates after 96 h: (a) *Rhizoctonia solani* (RS); (b) *Fusarium avenaceum* (FA); (c) *Sclerotinia sclerotiorum* (SS); and (d) *Colletotrichum dematium* (CD). Fold change in gene expression was evaluated by RT-qPCR, according to the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method; same letters indicate no statistically relevant difference between the treatments ($n = 6$), as determined by Student's *t*-test ($p < 0.05$).

2.5. Evaluation of Biocontrol Features of the KP32 Strain in a Biochemical Assay

Once the effective antifungal activity by the tested strain was demonstrated and the genetic analysis revealed crucial genes for biocontrol activity, the mechanisms potentially involved in biocontrol and plant growth promotion were evaluated using the biochemical test. The KP32 strain formed an orange halo zone on medium chrome azurol S (CAS) agar and a clear zone formation on Pikovskaya's agar media, indicating siderophore production and phosphate solubilization. The KP32 strain produced VOCs such as acetoin and 2,3-butanediol. It was also able to produce IAA at the concentration of $14.32 \pm 0.12 \mu\text{g/mL}$ in 1% tryptophane medium and salicylic acid (SA) at the concentration of $5.43 \pm 0.89 \mu\text{g/mL}$ in succinate medium. After 36 h of incubation at 30 °C, the KP32 strain metabolized 3 mM 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) as the sole source of nitrogen in Dworkin and Foster (DF) medium. It also presented ammonia and hydrogen cyanide (HCN) production. The most important mechanisms to explain the beneficial effects of KP32 included the production of lytic enzymes, which have an excellent biocontrol potential. These enzymes may confer protection against a wide range of phytopathogens. In this study, we observed that the KP32 strain produced proteases, amylases, and chitinases in the absence and presence of fungal cell-free supernatant (Table 2). Exposure of the KP32 strain to the filtrate of *R. solani* W70 resulted in a noticeable increase in protease activity, from 10.32 ± 0.45 to 24.03 ± 0.21 U/mL. Meanwhile, the addition of *S. sclerotiorum* filtrate resulted in decreased protease activity (4.98 ± 0.24 U/mL), compared to the control. The maximum activity of chitinase (2.12 ± 0.1 U/mL) was recorded in the presence of cell-free supernatant of *C. dematium* K. The activity of chitinase in the absence of fungal supernatant was lower (0.84 ± 0.12 U/mL). The KP32 strain did not produce cellulase in the absence as well as the presence of fungal filtrates. The statistical analyses indicated that fungal cell-free supernatants did not influence the increase in amylase activity. To study the impact of phytopathogens on the generation of oxidative stress in the KP32 strain, the activity of enzymatic antioxidants, including superoxide dismutase and catalase, were measured. The KP32 strain exhibited a higher CAT activity after exposure to cell-free supernatant. Interestingly, CAT was the most sensitive to *R. solani* W70 supernatant. The calculated SOD activities led to the conclusion that SOD in the KP32 strain was less active than CAT after exposure to fungal cell-free supernatant.

Table 2. Activities of lytic and antioxidative enzymes measured for control KP32 and bacterial culture exposed to fungal filtrate.

Enzyme's Activity	KP32	KP32 + RS	KP32 + FA	KP32 + CD	KP32 + SS
Protease (U mL ⁻¹)	10.32 ± 0.45 a	24.03 ± 0.21 b	9.05 ± 0.09 c	10.89 ± 0.10 d	4.98 ± 0.24 e
Amylase (U mL ⁻¹)	0.61 ± 0.25 a	0.64 ± 0.03 a	0.64 ± 0.01 a	0.21 ± 0.11 b	0.11 ± 0.14 c
Cellulase (U mL ⁻¹)	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
Chitinase (U mL ⁻¹)	0.84 ± 0.12 a	0.85 ± 0.04 b	0.89 ± 0.21 a	2.12 ± 0.10 c	1.32 ± 0.05 d
Catalase (U mg ⁻¹ of protein)	2.84 ± 0.25 a	8.49 ± 0.07 b	4.05 ± 0.51 c	4.89 ± 0.10 c	2.47 ± 0.14 d
Superoxide dismutase (U mg ⁻¹ of protein)	0.43 ± 0.06 a	0.32 ± 0.09 a	0.60 ± 0.08 b	0.32 ± 0.11 c	0.24 ± 0.02 d

a,b,c,d,e indicate statistically significant differences, according to one-way ANOVA ($p < 0.05$) followed by the least significant differences (LSD) test.

The colonization of plants by endophytic bacteria seems to be essential for disease management and plant growth improvement. The KP32 strain showed various features crucial for plant host colonization (Table 3). Motility assays revealed its ability to spread on 0.3% (swimming), 0.5% (swarming), and 1% (twitching) agar plates. The tested strain produced exopolysaccharide (EPS), as evidenced by smooth black colonies with a slimy and shiny surface on Congo Red Agar (CRA) medium. It was also demonstrated that the KP32 strain can produce N-AHLs, as confirmed by a dark brown color in the sample. The obtained results exhibited a weak ability of the KP32 strain to self-aggregate, based on the classification described in [32]. After 24 h of incubation, the autoaggregation of KP32 reached $34.2 \pm 0.09\%$. Another important feature is the ability of the strain to form a biofilm. The results indicated that KP32 is a moderate biofilm producer [33]. In

this study, we demonstrated that the KP32 strain can grow in the presence of a wide spectrum of organic compounds as the sole source of carbon and energy (Table S5). Organic compounds, including organic acids (e.g., malic, citric, fumaric, and succinic) produced by plants, act as chemotactic agents to recruit beneficial bacteria to the rhizosphere. The chemotactic response of bacteria to organic acids is crucial for the effective colonization of plant tissues [34].

Table 3. Functional characteristics of endophytic strain *S. quinivorans* KP32.

Features	Strain KP32
Plant growth promotion	
Acetoin and 2,3-butanediol production	+
IAA production ($\mu\text{g/mL}$)	14.32 ± 0.12
SA production ($\mu\text{g/mL}$)	5.43 ± 0.89
ACC deaminase production	+
Ammonia production	+
HCN production	+
Siderophore production	+
Phosphate solubilization (PSI)	2.75 ± 11
Colonization properties	
Autoaggregation (%)	
2 h	4.08 ± 0.21
24 h	34.2 ± 0.09
Biofilm formation (OD590 of crystal violet)	
24 h	0.297 ± 0.02
48 h	0.40 ± 0.12
72 h	0.52 ± 0.05
Motility (mm)	
Swimming (0.3%)	3.20 ± 0.3
Swarming (0.5%)	2.10 ± 0.07
Twitching (1%)	0.78 ± 0.15
Exopolysacharydes production	+
N-AHLs production	+

(+) capability, (−) lack of capability.

3. Discussion

Microorganisms can limit the adverse effects of pathogens. This inhibition of pathogenesis is known as biocontrol and has shown promise as a practical alternative for controlling plant pathogens within sustainable agriculture systems [35]. Many biocontrol agents are selective to host species, type of pathogen, environmental conditions, soil types, and seasons [35]. Therefore, systematic analyses are required to discover new biocontrol agents that can respond to a wide range of environments [36]. To benefit their host, bacteria must possess a number of direct and/or indirect mechanisms and activities, allowing them to competitively colonize the plant [37]. To date, some strains of the genus *Serratia* have been shown to control an extensive range of phytopathogens and facilitate growth enhancement in several crops [25].

Despite the existence of knowledge regarding the ecology and pathogenicity mechanisms of *S. marcescens*, *S. plymuthica*, and *S. proteamaculans*, *S. marcescens* N1-14, SR-1, and TRS-1; *S. plymuthica* A21-4 and IC14; and *S. proteamaculans* 1-102 and 3Rc15 are the most-studied as biological plant protection agents [16,38–45]. To the best of our knowledge, little is known about the biocontrol activity of *Serratia* strains originally isolated from the internal tissues of plants. For this study, we characterized an endophytic bacterium—the *S. quinivorans* KP32 strain—which exhibits biocontrol activities against a variety of phytopathogens. It is worth noting that genome analysis and RT-qPCR experiments opened up several prospects to understand the mechanisms used by this endophytic bacterium for the biocontrol of pathogenic fungi.

We found that the KP32 strain, which is closely related to *S. quinivorans* NCTC11544 and *S. proteamaculans* 336X—biological control agents of wheat take-all [10]—can counter the growth of selected fungal pathogens. The studied strain inhibited the growth of *R. solani* W70 to the greatest extent, which is even more important, considering that *R. solani* represents an essential group of soil-borne basidiomycete pathogens, which cause typical symptoms of pre-emergence and post-emergence damping-off, root rot, or stem canker [46,47]. Our results demonstrated that the KP32 strain may be used as an effective BCA against this pathogen. Apart from the inhibitory effect of the KP32 on the growth of the selected fungi, macroscopic changes in the *R. solani* W70 mycelium were noted, which confirmed the biological activity of the KP32 strain. Similar results have been observed by Purkayastha et al. [11]. In the interaction zone of *S. marcescens* ETR17 with *R. solani*, deformation, bulging, and lysis of the mycelium was confirmed through scanning electron microscopy (SEM). Gkarmiri [48] has revealed the effects of the strains *S. proteamaculans* S4 and *S. plymuthica* AS3 on the morphology of *R. solani* mycelium, as well as details of the inhibition of fungal growth potential through the production of chitinases, proteases, and antifungal compounds. The studied KP32 strain also inhibited the growth of *C. dematium* K, *F. avenaceum*, and *S. sclerotiorum* K2291. Mycelial growth and conidial germination caused by *Colletotrichum gloeosporioides* were inhibited by *S. marcescens* CFFSUR-B2, CFFSUR-B3, and CFFSUR-B4 [19]. On the other hand, Li et al. [49] have indicated the ability of *S. marcescens* FS14 to inhibit the growth of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium oxysporum* without direct contact. In addition, according to the authors, the changes in the mycelia of pathogens observed in dual culture tests may have resulted from the ability of the strain to secrete extracellular metabolites [49].

Many publications have highlighted the phenomenon of the effects of volatile bacterial compounds on plants and fungi [50]. It is known that *Serratia* species produce different VOCs that play a role in the plant–microbe interactions [51]. In this study, we also revealed that the production of VOCs by the KP32 strain was the most crucial mechanism in the in vitro inhibition of the tested phytopathogens—mainly *R. solani* W70 (even up to $79.36 \pm 2.72\%$). In other research, Marzouk et al. [47] have provided evidence regarding the VOC-mediated biocontrol ability of seed-borne endophytic bacteria to reduce *R. solani* seedling damping-off and fruit rot of tomato, making them valuable agents for pre- and post-harvest control of this disease. It is worth noting that most volatiles are products of bacterial metabolism, such as fermentation, amino acid degradation, sulfur metabolism, and fatty acid biosynthesis [52], which were also abundant pathways in the KP32 genome. We found that the KP32 strain could produce acetoin and butanediol, two well-known volatile compounds that act as growth-promoting factors and which increase plant resistance against pathogens [53]. It is worth emphasizing that the biosynthesis pathway of these compounds was recognized in the genome of the KP32 strain. Furthermore, in this study, we observed up-regulation of the *budA* gene involved in the biosynthesis of acetoin in the KP32 culture inoculated with fungal filtrates, suggesting that this mechanism is related to the antifungal properties of the bacterium. Numerous studies have shown that the production of acetoin and 2,3-butanediol by *S. proteamaculans* 568 stimulated growth and systemic resistance in plants by inducing expression genes in the signaling pathways of SA, jasmonic acid, and ethylene [54–56]. In turn, high acetoin levels in the mutant strain of *Bacillus velezensis* resulted in a significant increase in the production of H_2O_2 , an increase in the activity of enzymes related to the defence response, and callose deposition in *A. thaliana* [57]. Furthermore, several sulfur modulation pathways were also present in the KP32 genome, which may account for its ability to produce sulfur-based volatiles, like dimethylsulfide and H_2S , that can improve plant growth and root colonization [52], as well as inhibiting fungi spore germination, germ tube elongation, and mycelial growth [58]. The genome of the KP32 strain also carried several genes involved in fatty acid biosynthesis and modification, which play roles in the production of volatile ketones and alcohols. Among the volatile substances inhibiting microorganism growth, the inorganic volatile compound HCN might also have toxic effects on various fungal and bacterial plant pathogens [59]. Moreover, HCN

can indirectly increase phosphorus and iron availability to plants, resulting in increased plant growth promotion activity [60]. This compound inhibits electron transport for energy supply to cells, leading to the organism's death. It also affects the proper functioning of enzymes and natural receptors through reversible inhibition mechanisms [61]. The gene required for the production of HCN was identified in KP32 genome. It is worth noting that the expression level of the *hcnC* gene in the KP32 strain was significantly up-regulated after exposure to fungal filtrates of all tested pathogens, suggesting that the production of hydrogen cyanide is the primary mechanism in their inhibition. In addition, we confirmed the ability of KP32 to produce HCN in biochemical tests.

Another mechanism involved in the antifungal activity of the KP32 strain is the production of lytic enzymes. This function is essential for the antagonism of biocontrol agents against various phytopathogens. The data in the Literature have indicated the suppressive effects of *Serratia* strains on pathogen growth and/or fungal disease to be generally correlated with high chitinase activity [62]. Bacterial chitinases can compromise fungal spore integrity and generate germ tube abnormalities [25]. Furthermore, chitinase promotes the degradation of mycelia of several pathogenic fungi, including *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Botrytis*, and *Sclerotium* [63,64]. Apart from chitinase, extracellular proteases play a crucial role in inhibiting the growth of fungi; for example, *S. plymutica* IC14 exerted an antifungal activity against *S. sclerotiorum* and *B. cinerea* through the production of proteases [63]. It is worth noting that lytic enzymes may aid in intracellular colonization, develop endophytism [65], and serve as determinants in the induction of ISR in plants [66]. In this study, high chitinase activity was observed in the KP32 culture exposed to the cell-free supernatants of *C. dematium* K and *S. sclerotiorum* while, in the presence of the cell-free supernatant of *R. solani* W70, a high activity of protease was observed, suggesting that these enzymes play a crucial roles in the biocontrol of these pathogens. The lower activity of chitinase in the culture of the KP32 strain exposed to cell-free supernatants of *F. avenaceum* and *R. solani* may reflect weaker inhibition of mycelial fungal growth than in the case of *C. dematium* K. The significant role of lytic enzymes, such as chitinase, glucanase, and protease, in controlling *R. solani* by *S. fonticola* has been demonstrated by Faltin et al. [67]. In another study, Guitierrez-Román et al. [19] have shown that *S. marcescens* CFFSUR-B2, CFFSUR-B3, and CFFSUR-B4 inhibited microfungal *Colletotrichum* genus by active production of chitinases and the antibiotic prodigiosin. Similarly, Someya et al. [64] have reported that the effectiveness of inhibition of *F. oxysporum* by *S. marcescens* B2 (Percent Growth Inhibition (PGI) about 70% compared to the control) is related to the production of prodigiosin and high chitinolytic activity.

One of the most crucial direct biocontrol mechanisms is the production of siderophores, which are involved in iron sequestering [68]. Many fungi colonize the rhizosphere and must cope with strong competition from bacteria. It has been well-documented that siderophore-producing antagonistic bacteria exhibit better rhizosphere competence and suppress plant disease by inhibiting plant fungal growth or metabolic activity [69,70]. The ability to inhibit the growth of fungi of the genera *Colletotrichum*, *Fusarium*, and *Rhizoctonia* has been observed in many siderophore-producing microorganisms [71,72], which may indicate that the ability of the strain KP32 to produce siderophores may facilitate the mechanism of *C. dematium* K, *R. solani* W70, and *F. avenaceum* biocontrol. Our study confirmed the presence of genetic determinants involved in the secretion of large numbers of diverse siderophores and the synthesis of siderophore receptors. We also demonstrated the ability of KP32 to produce siderophores in biochemical tests. In a similar study, Press et al. [73] reported that *S. marcescens* 90–166 inhibited anthracnose in cucumber, caused by *C. dematium*, through the production of catecholate siderophore and ISR induction [73]. Interestingly, in this study, we revealed an increased expression of the *entB* gene, encoding enterobactin (catecholate siderophore), when culturing the KP32 in the presence of the filtrates of *C. demetium*. In another study, Singh et al. [74] have shown that a *Pseudomonas putida* mutant with over-production of siderophores was more effective in inhibiting pathogenic *Fusarium oxysporum* in tomato.

The characterization of biocontrol strains most often includes evaluation of plant growth-promoting traits, the presence of which increases the overall quality of a strain [75]. In this study, we showed that the KP32 strain possessed growth-promoting attributes such as IAA, SA, ammonia production, and phosphate-solubilizing ability. The ability of bacteria to solubilize phosphate affects the uptake of nutrients, including calcium, potassium, iron, copper, manganese, and zinc, and can increase plant biomass [76]. For example, the potential use of *Serratia* sp. J260 and *S. phosphoticum* as bio-fertilizers has been reported, as they favor growth and plant productivity by supplying phosphorus in useful forms [77,78]. Compared to the data in the literature, the phosphate solubilization activity of the KP32 strain was moderate (PSI: 2.75 ± 0.11); similarly, the PSI of *Pseudomonas aeruginosa* KUPSB12 was 2.85 ± 0.2 [79], and that of *Burkholderia multivorans* WS-FJ9 was 2.27 ± 0.09 [80]. In turn, in the research of Pande et al. [81], in the endophytic bacteria *Alcaligenes aquatilis* and *Burkholderia cepacia*, the PSI index ranged from 4.88 ± 0.69 to 4.48 ± 0.30 . Another essential feature of the KP32 strain is the SA production ability. Some plant growth-promoting bacteria (PGPB) strains produce SA, which stimulates systemic acquired resistance. The role of SA in ISR elicited by PGPB has been observed against the blue mold of tobacco [82]. In this study, we also demonstrated that the KP32 strain could produce N-AHLs involved in QS, which are employed by numerous bacteria to regulate gene expression in response to cell density. In many rhizobacteria, QS mechanisms induce the synthesis of antimicrobial secondary metabolites and extracellular lytic enzymes inhibitory against other fungi, bacteria, protozoa, and nematodes [83]. Furthermore, we also confirmed the presence of genetic determinants involved in N-AHL biosynthesis in the genome of the tested strain.

Colonization of plants has been recognized as an essential factor for BCA to survive in the rhizosphere battlefield against phytopathogens [84]. Based on this fact, we analyzed different colonization features of the KP32 strain. For successful root colonization, chemotaxis and biofilm formation are the two most crucial activities in bacteria. First, we demonstrated that the KP32 strain utilizes a wide range of organic compounds secreted from root exudates as carbon and energy sources. It is worth noting that root exudates (e.g., organic acids, enzymes, phenolics, sugars, carbohydrates, and proteins) can chemoattract and help bacteria to colonize the surface of plant roots [34]. The KP32 strain carried multiple genes responsible for the metabolism of the primary root exudates and several genes involved in the biosynthesis of EPS, such as cellulose and colonic acid, which are critical for biofilm formation [85,86]. A biofilm is a surface-linked efficient microorganism confined by a polymeric matrix, including self-making exopolysaccharides, extracellular DNA, and proteins related through the biotic surface [53]. Some PGPB have shown antagonistic activity in response to phytopathogens by starting biofilm-like assemblies, as previously reported in *Bacillus pumilus* HR10 [86] and *Burkholderia gladioli* 3A12 [87]. In another study, Mateolli et al. [25] have described the strategy deployed by *S. marcescens* UENF-22GI to hinder fungal growth, which likely involves massive biofilm formation on *Fusarium* hyphae, thus potentially facilitating the colonization and degradation of fungal cell walls. It is worth noting that genome analysis also revealed the presence of genes for flagellar biosynthesis, assembly, and chemotaxis. The ability of the KP32 strain to move enables not only chemotaxis towards plant root exudates, but also enhances the effect of biocontrol [88]. For example, Hover et al. [89] have shown that *S. marcescens* strains with a defect in flagella synthesis migrate significantly slower along the hyphae of *Rhizopus oryzae*, resulting in delayed fungal elimination. During colonization, endophytic bacteria must survive in a highly oxidative environment. In this study, we demonstrated that the KP32 strain can produce catalase, allowing it to overcome oxidative stress.

4. Materials and Methods

4.1. Bacterial Strains and Growth Conditions

Serratia quinivorans KP32 was isolated from surface-sterilized roots of *Petroselinum crispum* L. growing in the area contaminated with phenolic compounds around the Kalina

Pond in Świętochłowice, Southern Poland (50.27894N, 18.92657E), according to the standard protocol described in [90]. The KP32 isolate was identified by sequencing of the 16S rRNA gene. The strain was grown in LB medium (LB Broth, BTL, Warsaw, Poland) for 24 h at 30 °C, and genomic DNA was extracted using a GeneMatrix Bacterial and Yeast Genomic Purification Kit (EURx, Gdańsk, Poland), according to the manufacturer's protocol. Amplification of the 16S rRNA gene was performed with 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') universal primers. The PCR master (50 µL) contained 50 ng of genomic DNA, 1U of Taq DNA polymerase, 1× TaqDNA polymerase buffer, 0.2 mM of dNTP, 2 mM MgCl₂, and 0.2 µM each of the forward and reverse primers. The PCR cycling conditions were 5 min at 94 °C; 30 cycles of 1 min at 94 °C, 45 s at 54 °C, and 90 s at 72 °C; and 10 min at 72 °C. The PCR-amplified 16S rRNA region was sequenced directly by GENOMED (Warsaw, Poland). The obtained sequences were compared with the public databases using NCBI BLASTN online (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, accessed on 2 June 2018). The taxonomic affiliation of the KP32 strain was also supported by the genomic sequencing. The bacterial strain used in this study was cultivated in Luria-Bertani broth (LB Broth, BTL, Warsaw, Poland) with shaking (130 rpm) at 30 °C or on LB Agar (BTL, Warsaw, Poland) at 30 °C. For the in vitro screening of antifungal activities, the KP32 strain was grown on potato dextrose agar (PDA) (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland) at 30 °C.

4.2. Pathogenic Fungi

Rhizoctonia solani W70 (RS), *Fusarium avenaceum* (FA), *Colletotrichum dematium* K (CD), and *Sclerotinia sclerotiorum* K2291 (SS) were derived from the Microbial Culture Collection of the Institute of Biology, Biotechnology and Environmental Protection (Faculty of Natural Sciences, the University of Silesia in Katowice, Katowice, Poland). Fungal phytopathogens were isolated from plant tissues exhibiting apparent symptoms of diseases, such as blights, spots, wilts, anthracnose, and/or rots. *Rhizoctonia solani* W70 was isolated from grapevine (*Vitis vinifera* L.), *Colletotrichum dematium* K and *Sclerotinia sclerotiorum* K2291 were isolated from caraway (*Carum carvi* L.), and *Fusarium avenaceum* was isolated from wheat (*Triticum* L.). All pathogens were incubated on PDA (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland) at 30 °C or in a liquid medium (pH 5.6) composed of 20 g/L of glucose, 10 g/L of peptone, 10 g/L of yeast extract, 0.5 g/L of Mg₂SO₄ × 7 H₂O, and 1 g/L of K₂HPO₄ at 30 °C.

4.3. In Vitro Screening of Antagonistic Behavior of the KP32 Strain against Fungal Phytopathogens

4.3.1. Dual-Culture Assay

The KP32 strain was screened for its antifungal activity through a dual-culture antagonism assay on PDA plates, according to the method described by [90].

4.3.2. Detection of Diffusible Metabolite Production

For the detection of diffusible metabolite production, 100 µL of the KP32 strain culture was uniformly spread on PDA plates. After 24 h of incubation, a 5 mm agar–mycelium disc was placed at the center of the plate, separately for each pathogen. In the control, a 5 mm agar–mycelium disc was placed at the center of a plate inoculated with 100 µL of sterilized distilled water, instead of bacterial culture. Plates were then sealed with parafilm and incubated for 7–21 days (depending on the fungal strain) at 30 °C. The percent growth inhibition was calculated using the formula:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{C - T}{C} \times 100\% \quad (1)$$

where C is the radial growth (in mm) of the control fungal mycelium colony, and T is the radial growth (in mm) of the fungal mycelium growing in the presence of antagonist endophytic bacterial isolate. All treatments were performed in triplicate.

4.3.3. Detection of Volatile Metabolites Production

For the detection of volatile metabolite production, 100 μ L of bacterial culture was spread on the one half of a Petri dish containing LB medium, and a 5 mm agar disc of a pure culture of fungal phytopathogen was placed at the center of the other half of the Petri dish containing PDA medium, separately for each pathogen. Petri dishes inoculated only with fungi were used as controls. Plates were tightly sealed with parafilm and incubated at 30 °C for 7–21 days (depending on the fungal strain). The inhibition of fungal growth was measured using the formula presented above. The experiment was performed in triplicate.

4.3.4. Evaluation of the Effect of KP32 Cell-Free Culture Filtrate

The KP32 strain was grown on Luria Bertani medium (LB Broth, BTL, Warsaw, Poland) in a 100 mL conical flask at 30 °C on a rotary shaker at 130 rpm. After 96 h of incubation, the culture was centrifuged at 10,000 rpm at 4 °C for 10 min, and cell-free culture filtrate was obtained by filtering the supernatant through a 0.22 μ m pore size syringe filter. Next, the filtrate was thoroughly mixed with pre-cooled sterile PDA medium at a ratio of 1:10 (*v/v*), poured onto plates and allowed to solidify. A 5 mm-diameter agar–mycelium disc of the tested fungus was then placed at the center of the prepared PDA plates. Plugs of the tested fungi placed on non-amended (i.e., no cell-free culture filtrate added) PDA plates served as a control. Plates were incubated at 30 °C for 7–21 days (depending on the fungal strain). Mycelial growth inhibition (%) was measured as described above.

4.4. Genome Sequencing and Sequence Analysis

Genomic DNA of *S. quinivorans* KP32 was extracted using a GeneMatrix Bacterial and Yeast Genomic Purification Kit (EURx, Gdańsk, Poland). MicrobesNG performed the sequencing on an Illumina MiSeq platform with 2 \times 250-bp paired-end reads. The results of the sequencing were subjected to a standard MicrobesNG analysis pipeline and were deposited in the GenBank database under the accession number JAHTKS000000000.1. Functional annotation of genes was performed using many tools and databases, including the eggNOG 5.0 orthology prediction pipeline (<http://eggnogdb.embl.de/>, accessed on 26 February 2020) [91]. The genes assigned to multiple COG categories were counted as being present in each category. For gene function annotation, genes were compared to the KEGG database (<http://www.genome.jp/kegg/>, accessed on 26 February 2020) [92]. Functional and pathway analyses were also performed using the BlastKOALA web tool of KEGG (<https://www.kegg.jp/blastkoala/>, accessed on 26 February 2020) [92]. antiSMASH 5.0 was used for the identification of gene clusters responsible for the biosynthesis of secondary metabolites (<https://antismash.secondarymetabolites.org>, accessed on 17 November 2021) [93]. The CAZy database (<http://www.cazy.org/>, accessed on 15 June 2021) was used to classify cell wall-degrading enzymes (CWDEs) and divide them into different families. CAZy families were identified with dbCAN2, according to the DIAMOND database [94,95]. GIs were analyzed using the Island Viewer online tool version 4.0 (<http://www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer/upload/>, accessed on 17 November 2021) [96].

4.5. Phylogenetic Analysis

The phylogenetic tree was constructed based on the type strains and well-described strains belonging to the *Serratia* genus, with *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883T as an outgroup. The core proteomes of the 14 strains were determined and aligned using M1CR0B1AL1Z3R [97]. Poorly aligned regions were identified by Gblocks (version 0.91b) and removed (Integrated DNA Technologies, Iowa, IA, USA) [98], yielding 348,908 amino acids. A maximum-likelihood phylogenetic tree was obtained with MEGA 11 version 11.0.10 (Pennsylvania State University, Mueller Laboratory, University Park, PA, USA), with default settings and a 1000 bootstraps re-sampling [99].

4.6. Evaluation of the Effect of Fungal Pathogens on the Expression Level of Genes Engaged in Antifungal Activity

4.6.1. Preparation of Fungal Filtrates

Fungal filtrates were prepared separately for each pathogen. The liquid medium was as described in Section 4.2, which was inoculated with plugs taken from actively growing fungal cultures and incubated for 21 days at 30 °C on a rotary shaker in darkness. The fungal biomass was collected by centrifugation (5000 rpm, 20 min, 4 °C), and the obtained supernatant was filtered through a 0.22 µm pore size syringe filter (Minisart Syringe Filter, Sartorius, Goettingen, Germany) to remove fungal cells and spores.

4.6.2. Influence of Fungal Filtrates on Bacterial Genes Expression

A total of 25 mL of LB medium was inoculated with 1 mL of overnight LB culture of the KP32 strain, and 5 mL of fungal filtrate was added. The KP32 strain grown in LB medium without filtrate served as a control. Cultures were incubated with rotary shaking (130 rpm) at 30 °C for 96 h. After incubation, total RNA was isolated from the control and the filtrate-treated cultures using a GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit (EURx, Gdańsk, Poland). The extracted RNA was additionally purified with TURBO DNA-free™ DNase (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), and the concentration and purity of obtained RNA were assessed using an ND-1000 NanoDrop spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). The synthesis of single-stranded cDNA was carried out in triplicate, using 1 µg of the total RNA, random hexamer primers and a RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). The generated cDNA was used as a template in qPCR reactions, performed using a LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche, Basel, Switzerland). The qPCR assay was performed in a 10 µL reaction volume with 5 µL LightCycler® 480SYBR Green I Master (Roche, Basel, Switzerland), 2 µL PCR-grade water, 0.5 µM of each gene-specific primer, and 2 µL cDNA as a template. All PCR reactions were performed in LightCycler® 480 Multiwell Plates 96 (Roche, Basel, Switzerland) under the following conditions: 10 min at 95 °C and 45 cycles of 15 s at 94 °C, 30 s at 60 °C, and 30 s at 72 °C. Three biological replicates and two technical replicates were used. The expression levels of the following genes were analyzed: *chiA*, *budA*, *hcnC*, *iucA*, *entB*, *pchB*, *katG*, *sodB*, and *mtlR*. The genes *gyrA* and *gyrB* were used as an internal controls, as commonly used standards in the study of gene expression of bacteria belonging to various genera, including those of *Serratia* [100–102]. The expression of internal genes was stable (CT = 15) across the treatments. In order to increase the stability of the measurements, two genes were used as an internal control. The primers used in this study were designed using Geneious Prime (version 2020.0.1; see Table 4). Three biological and two technical replicates were performed for each treatment. The amplification efficiency of primers for each gene were checked according to Taylor et al. [103] and primers with 90–110% reaction efficiency were used. The relative expression level was calculated according to Livak and Schmittgen [104].

Table 4. Primer sequences (F: forward primer, R: reverse primer) used in RT-qPCR reaction.

Gene	Protein	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Tm (°C)	PCR Efficiency (%)	Slope	Product Size (bp)
<i>gyrA</i>	DNA gyrase subunit A	TGGCTATATGCTGGTGGAC	GCAATTTGGACATGCCGAC	53.8	51.8	97.24	-3.396
<i>gyrB</i>	DNA gyrase subunit B	CGGCGCAAATTTGATGACA	AACCCAGTTCAGCTTCTCGG	51.8	53.8	99.00	-3.351
<i>chiA</i>	Chitinase	TGGAATGGCGATACCGGTAC	CCTTAAAGTTTGCCGTGCC	53.8	53.8	101.35	-3.297
<i>budA</i>	Alpha-acetolactate decarboxylase	CGGTGTTTACGAAGGGGAGG	GAAGGGCATCAGTTCACCGT	55.9	53.8	90.94	-3.567
<i>hcnC</i>	Hydrogen cyanide synthase	ACAGCACTATCGAATGCGG	CCAGTCCAGCAGCGGATAAT	53.8	53.8	106.76	-3.178
<i>iucA</i>	Aerobactin synthase	GTATGCCCCGGAATACAGG	CTGGTTCAGCGGATATGCTT	55.9	53.8	109.00	-3.116
<i>entB</i>	Enterobactin synthase	GATCAAGCAGGTGGTGGAGA	ATCGCTCTGCTGATTTGGCT	53.8	51.8	108.20	-3.147
<i>pchB</i>	Isochorismate pyruvate lyase	TCATTAAGCTGATCCCGCG	ATGGCTCCTCAAAGCGCTCTT	53.8	51.8	105.15	-3.202
<i>katG</i>	Catalase	GTTACATTCCTCAACTGGCG	ATCACCTTATTCAGGGCGG	53.8	53.8	105.35	-3.201
<i>sodB</i>	Superoxide dismutase	CGGCGCATCTCAACAATG	GGCCAGTTTACCTTCAGGCT	53.8	53.8	104.53	-3.219
<i>mtlR</i>	Mannitol dehydrogenase	TCCCTTAAAGTGAACGCTCG	ATCGTGGCCAAACACCGTAT	51.8	53.8	110.28	-3.098

4.7. Evaluation of the Effect of Fungal Pathogens on Lytic and Antioxidant Enzymes Activity

4.7.1. Lytic Enzyme Activity

For the quantitative estimation of amylase, cellulase, protease, and chitinase activity, 200 mL of LB medium was inoculated with 5 mL culture of the KP32 strain, and 50 mL of the tested fungal filtrate was added. Fungal filtrates were prepared as described in Section 4.6.1. Bacteria grown in LB without filtrate served as a control. Cultures were incubated at 30 °C for 96 h and centrifuged (5000 rpm, 20 min, 4 °C). The cell-free supernatant was collected and used as an enzyme source. Amylase and cellulase activities were determined using the 3,5-dinitro salicylic acid (DNS) method, according to Ghose [105]. Protease activity was determined by the degradation of casein, according to Rais et al. [106]. Chitinase activity was measured according to the method described by Zarei et al. [107], with colloidal chitin as the substrate. The lytic enzyme activity was calculated following the formula described by Rais et al. [106].

4.7.2. Antioxidant Enzyme Activity

For quantitative estimation of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities, 200 mL of LB broth was inoculated with 5 mL culture of the KP32 strain, and 50 mL of tested fungal filtrate was added (separately for each pathogen). Fungal filtrates were prepared as described in Section 4.6.1. Bacteria grown in LB medium without filtrate served as a control. The cultures were incubated at 30 °C for 96 h. Next, the bacterial cultures were centrifuged (5000 rpm, 20 min, 4 °C), and the obtained biomasses were suspended in 50 mM phosphate buffer (pH 7.2) and sonicated (20 kHz, 6× for 15 s) at 4 °C using a Vibra Cell (Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT, USA). After centrifugation (15,000 rpm, 20 min, 4 °C), the cell-free extracts were used to measure the activity of SOD and CAT. The SOD activity was assayed spectrophotometrically at $\lambda = 450$ nm with the use of a SOD assay kit (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), by reducing the tetrazolium salt, and calculated according to Zhang et al. [108]. The CAT activity was measured according to Banejee et al. [109]: at $\lambda = 240$ nm for 3 min as the decrease in the absorbance with H₂O₂ used as substrate ($\epsilon = 36,000$ dm³mol⁻¹cm⁻¹). The protein concentration in the crude extract was calculated according to Bradford [110], with lysozyme as the standard. The specific activities of SOD and CAT are expressed as U mg⁻¹ of protein.

4.8. Plant Growth Promotion Features of the KP32 Strain

The KP32 strain was examined for its ability to produce acetoin, 2,3-butanediol, IAA, SA, HCN, ACC deaminase, ammonia, and siderophores, as well as for phosphate solubilization ability, following the standard protocol [111–115] and Pikovskaya [116], respectively. Each analysis was completed in three biological repeats.

4.9. Colonization Features of the KP32 Strain

The KP32 strain was examined for different colonization features, including autoaggregation, biofilm formation, motility, and exopolysaccharide production, following the standard protocol [90,117,118]. The production of N-AHLs was evaluated qualitatively using the colorimetric method of Taghadosi et al. [119]. The presence of lactone compounds was indicated by a dark brown color, while the appearance of a yellow color indicated a lack of N-AHLs in the sample. Each analysis was completed in three biological repeats.

Utilization of Selected Organic Compounds as the Sole Source of Carbon and Energy

The ability of the isolated strain to grow in the presence of selected organic compounds as the sole source of carbon and energy was determined using a 96-well microplate. KP32 suspension with an optical density of about 0.250 at $\lambda = 600$ nm (OD₆₀₀) was introduced into each well. The suspension was prepared as follows: the KP32 strain was cultivated in the LB medium for 24 h at 30 °C; after this, the culture was centrifuged (5000 rpm, 20 min, 4 °C), the supernatant was removed, and the bacterial biomass was centrifuged three times more (5000 rpm, 20 min, 4 °C), rinsing it after each centrifugation with sterile saline (0.9%

NaCl) for purification from the remaining culture medium. After the final centrifugation, the bacterial biomass was suspended in mineral salt medium. Sufficient volumes of mineral salt medium and aqueous solution of aromatic compounds were also introduced into the wells. Growth of the isolated strain on microplates was tested in the presence of glucose, arabinose, rhamnose, mannose, trehalose, succinic acid, 4-hydroxyphenylacetic acid, fumaric acid, benzoic acid, mannitol, citric acid, and *p*-coumaric acid at concentrations of 1 mM [120]. At the same time, an abiotic culture was established, containing mineral salt medium and the tested aromatic compound, without a bacterial suspension. After inoculation, the microplate was incubated at 30 °C. After 24 h of incubation in the dark at 30 °C, the absorbance in each well was measured at a wavelength of 590 nm using a Biolog[®] Microstation[™] (BIOLOG Inc., Hayward, CA, USA).

4.10. Statistical Analysis

The statistical analysis was carried out using the Microsoft Office Excel 2010 and Statistica 12.5 PL software (StatSoft[®] Inc., Tulsa, OK, USA). Data are presented as the mean \pm standard deviation (SD) of three biological replicates. For the analysis of the results of antagonistic tests and gene expression studies the independent Student's *t*-test for the $p < 0.05$ was used. To compare activity of lytic and antioxidative enzymes data were analyzed using one-way ANOVA and evaluated by a post-hoc test of the means using the lowest significant differences (LSD) test ($p < 0.05$). Different letters indicate that the means differed significantly.

5. Conclusions

The newly isolated strain *Serratia quinivorans* KP32 presented biological activity against *Rhizoctonia solani* W70, *Colletotrichum dematium* K, *Fusarium avenaceum*, and *Sclerotinia sclerotiorum* K2291, inhibiting their growth to varying degrees. The ability of the KP32 strain to inhibit several phytopathogens may be conditioned by a combination of various biocontrol factors. Genome sequencing confirmed the presence of crucial genes encoding a wide range of mechanisms determining biological activity, plant growth promotion, and colonization. Studies of bacterial gene expression in response to exposure to fungal filtrates revealed alterations in the transcription of genes involved in the biosynthesis of chitinase, HCN, enterobactin, acetoin, and catalase. The KP32 strain showed the ability to produce a number of lytic enzymes (amylases, chitinases, and proteases) and antioxidant enzymes (CAT and SOD). The production of siderophores, VOCs, HCN, SA, and N-AHLs, as well as phosphate mobilization ability, indicates the possible involvement of various mechanisms in biocontrol of the selected phytopathogens. These mechanisms could be used in combination, leading to a synergistic inhibitory effect against phytopathogens. We also observed the active movement, self-aggregation, exopolysaccharide production, and biofilm formation abilities of the KP32 strain, which are features necessary for effective plant colonization. The biological activities of the KP32 strain and its ability to colonize plants strongly indicates the potential of *Serratia quinivorans* KP32 as an active biopesticide and plant growth-promoting agent.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms232415561/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, D.C. and K.H.-K.; methodology, D.C., A.P. and V.G.; software, D.C. and A.P.; formal analysis, D.C., A.P. and J.Ż.-P.; data curation, D.C. and A.P.; writing—original draft preparation, D.C. and K.H.-K.; writing—review and editing, all of the authors; visualization, D.C. and K.H.-K.; supervision, K.H.-K.; project administration, D.C. and K.H.-K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded in part by the National Science Centre, Poland (grant number UMO-2020/39/B/NZ9/00491). For the purpose of Open Access, the author has applied a CC-BY public copyright licence to any Author Accepted Manuscript (AAM) version arising from this submission.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Sequencing data and assembly are available at NCBI database under the BioProject accession number PRJNA743191. The data are also included in the Supplementary Materials available online, or will be available from the corresponding authors upon request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

Abbreviations

BCA	Biological Control Agents
ISR	Induced Systemic Resistance
N-AHLs	N-acyl-homoserine lactones
PCR	Polymerase Chain Reaction
VOCs	Volatile Organic Compounds
CDS	Protein-encoding sequences
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
COG	Cluster of Orthologous Genes
NRPS	Nonribosomal Peptide-Synthetase
DHBA	Dihydroxybenzoic Acid
MFS	Major Facilitator Superfamily
IAA	Indole-3-acetic acid
TRP	Tryptophane
CBS	Cystathionine β synthase
CTH	Cystathionine- γ -lyase
GTS	Glutathione S-transferases
QS	Quorum sensing
CAZy	Carbohydrate-Active Enzymes
T2SS	Type II Secretion Systems
T6SS	Type VI Secretion Systems
T4PS	Type IV Pilus System
GI	Genomic Islands
RT-qPCR	quantitative reverse transcription PCR
SA	Salicylic Acid
ACC	1-aminocyclopropane-1-carboxylate
DF	Dworkin and Foster
HCN	Hydrogen Cyanide
SOD	Superoxide Dismutase
CAT	Catalase
EPS	Exopolysaccharide
CRA	Congo Red Agar
SEM	Scanning Electron Microscopy
PGI	Percent Growth Inhibition
LB	Luria-Bertani broth
CV	Crystal Violet
PSI	Phosphate Solubilizing Index
CAS	Chrome azurol S
PGPB	Plant Growth Promoting Bacteria
PGP	Plant Growth Promotion
PDA	Potato Dextrose Agar
CWDEs	Cell Wall-Degrading Enzymes
DNS	3,5-dinitro salicylic acid
LSD	Lowest Significant Difference

References

1. Marques-Pereira, C.; Proença, D.N.; Morais, P.V. Genome sequences of *Serratia* strains revealed common genes in both serratomolides gene clusters. *Biology* **2020**, *9*, 482. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Matilla, M.A.; Nogellova, V.; Morel, B.; Krell, T.; Salmond, G.P. Biosynthesis of the acetyl-CoA carboxylase-inhibiting antibiotic, andrimid in *Serratia* is regulated by Hfq and the LysR-type transcriptional regulator, AdmX. *Environ. Microbiol.* **2016**, *18*, 3635–3650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. AL-Ghanem, M.M. *Serratia* a novel source of secondary metabolites. *Adv. Biotechnol. Microbiol.* **2018**, *11*, 555814. [[CrossRef](#)]
4. Niu, H.; Sun, Y.; Zhang, Z.; Zhao, D.; Wang, N.; Wang, L.; Guo, H. The endophytic bacterial entomopathogen *Serratia marcescens* promotes plant growth and improves resistance against *Nilaparvata lugens* in rice. *Microbiol. Res.* **2022**, *256*, 126956. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Vaughan, A.L.; Altermann, E.; Glare, T.R.; Hurst, M.R. Genome sequence of the entomopathogenic *Serratia entomophila* isolate 626 and characterisation of the species specific itaconate degradation pathway. *BMC Genom.* **2022**, *23*, 728. [[CrossRef](#)]
6. Soenens, A.; Imperial, J. Biocontrol capabilities of the genus *Serratia*. *Phytochem. Rev.* **2020**, *19*, 577–587. [[CrossRef](#)]
7. Lahlali, R.; Ezrari, S.; Radouane, N.; Kenfaoui, J.; Esmaeel, Q.; El Hams, H.; Belabess, Z.; Barka, E.A. Biological control of plant pathogens: A global perspective. *Microorganisms* **2022**, *10*, 596. [[CrossRef](#)]
8. Toffolatti, S.L.; Maffi, D.; Serrati, L.; Vercesi, A. Histological and ultrastructural studies on the curative effects of mandipropamid on *Plasmopara viticola*. *J. Phytopathol.* **2010**, *159*, 201–207. [[CrossRef](#)]
9. Hazarika, D.J.; Goswami, G.; Gautom, T.; Parveen, A.; Das, P.; Barooah, M.; Chandra Boro, R. Lipopeptide mediated biocontrol activity of endophytic *Bacillus subtilis* against fungal phytopathogens. *BMC Microbiol.* **2019**, *19*, 71. [[CrossRef](#)]
10. Wang, M.; Xing, Y.; Wang, J.; Xu, Y.; Wang, G. The role of the *chi1* gene from the endophytic bacteria *Serratia proteamaculans* 336x in the biological control of wheat take-all. *Can. J. Microbiol.* **2014**, *60*, 533–540. [[CrossRef](#)]
11. Dhar Purkayastha, G.; Mangar, P.; Saha, A.; Saha, D. Evaluation of the biocontrol efficacy of a *Serratia marcescens* strain indigenous to tea rhizosphere for the management of root rot disease in tea. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0191761. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Suryadi, Y.; Susilowati, D.N.; Fauziah, F. Management of Plant Diseases by PGPR-Mediated Induced Resistance with Special Reference to Tea and Rice Crops. In *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Sustainable Stress Management. Microorganisms for Sustainability*; Sayyed, R., Ed.; Springer: Singapore, 2019; Volume 13, pp. 65–110.
13. Kshetri, L.; Naseem, F.; Pandey, P. Role of *Serratia* sp. as Biocontrol Agent and Plant Growth Stimulator, with Prospects of Biotic Stress Management in Plant. In *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Sustainable Stress Management. Microorganisms for Sustainability*; Sayyed, R., Ed.; Springer: Singapore, 2019; Volume 13, pp. 169–200.
14. Su, C.; Xiang, Z.; Liu, Y.; Zhao, X.; Sun, Y.; Li, Z.; Li, L.; Chang, F.; Chen, T.; Wen, X.; et al. Analysis of the genomic sequences and metabolites of *Serratia surfactantifaciens* sp. nov. YD25T that simultaneously produces prodigiosin and serrawettin W2. *BMC Genom.* **2016**, *17*, 865. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Liu, X.; Jia, J.; Atkinson, S.; Cámara, M.; Gao, K.; Li, H.; Cao, J. Biocontrol potential of an endophytic *Serratia* sp. G3 and its mode of action. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *26*, 1465–1471. [[CrossRef](#)]
16. Kamensky, M.; Ovadis, M.; Chet, I.; Chernin, L. Soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases. *Soil Biol. Biochem.* **2003**, *35*, 323–331. [[CrossRef](#)]
17. De Vleeschauwer, D.; Hö, M. Using *Serratia plymuthica* to control fungal pathogens of plant. *CAB Rev.* **2007**, *2*, 46. [[CrossRef](#)]
18. Neupane, S.; Finlay, R.D.; Alström, S.; Elfstrand, M.; Högberg, N. Transcriptional responses of the bacterial antagonist *Serratia plymuthica* to the fungal phytopathogen *Rhizoctonia solani*. *Environ. Microbiol. Rep.* **2015**, *7*, 123–127. [[CrossRef](#)]
19. Guitierrez-Román, M.I.; Holguín-Meléndez, F.; Bello-Mendoza, R.; Guillén-Navarro, K.; Dunn, M.F.; Huerta-Palacios, G. Production of prodigiosin and chitinases by tropical *Serratia marcescens* strains with potential to control plant pathogens. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *28*, 145–153. [[CrossRef](#)]
20. Ferraz, H.G.M.; Resende, R.S.; Moreira, P.C.; Silveira, P.R.; Milagres, E.A.; Oliveira, J.R.; Rodrigues, F.A. Antagonistic rhizobacteria and jasmonic acid induce resistance against tomato bacterial spot. *Plant Prot. Sci.* **2015**, *74*, 417–427. [[CrossRef](#)]
21. Kumar, A.; Radhakrishnan, E.; Droby, S.; Singh, V.; Singh, S.; White, J. Entry, colonization, and distribution of endophytic microorganisms in plants. In *Microbial Endophytes: Functional Biology and Applications*, 1st ed.; Kumar, A., Radhakrishnan, E.K., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridge, UK, 2019; Volume 1, pp. 1–33.
22. Nelkner, J.; Tejerizo, G.T.; Hassa, J.; Lin, T.W.; Witte, J.; Verwaaijen, B.; Winkler, A.; Bunk, B.; Spröer, C.; Overmann, J.; et al. Genetic potential of the biocontrol agent *Pseudomonas brassicacearum* (formerly *P. trivialis*) 3Re2-7 unraveled by genome sequencing and mining, comparative genomics and transcriptomics. *Genes* **2019**, *10*, 601. [[CrossRef](#)]
23. Li, J.; Yang, Y.; Dubern, J.F.; Li, H.; Halliday, N.; Chernin, L.; Gao, K.; Cámara, M.; Liu, X. Regulation of GacA in *Pseudomonas chlororaphis* Strains Shows a Niche Specificity. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0137553. [[CrossRef](#)]
24. Caneschi, W.L.; Sanchez, A.B.; Felestrino, É.B.; de Carvalho Lemes, C.G.; Cordeiro, I.F.; Fonseca, N.P.; Villa, M.M.; Vieira, I.T.; Moraes, L.Á.G.; de Almeida Barbosa Assis, R.; et al. *Serratia liquefaciens* FG3 isolated from a metallophyte plant sheds light on the evolution and mechanisms of adaptive traits in extreme environments. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 18006. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Matteoli, F.P.; Passarelli-Araujo, H.; Reis, R.J.A.; da Rocha, L.O.; de Souza, E.M.; Aravind, L.; Olivares, F.L.; Venancio, T.M. Genome sequencing and assessment of plant growth-promoting properties of a *Serratia marcescens* strain isolated from vermicompost. *BMC Genom.* **2018**, *16*, 750. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. Barnhart, M.M.; Chapman, M.R. Curli biogenesis and function. *Annu. Rev. Microbiol.* **2006**, *60*, 131–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Rezzonico, F.; Smits, T.H.; Duffy, B. Detection of AI-2 receptors in genomes of *Enterobacteriaceae* suggests a role of type-2 quorum sensing in closed ecosystems. *Sensors* **2012**, *12*, 6645–6665. [[CrossRef](#)]
28. Eida, A.A.; Bougouffa, S.; L'Haridon, F.; Alam, I.; Weisskopf, L.; Bajic, V.B.; Saad, M.M.; Hirt, H. Genome Insights of the Plant-Growth Promoting Bacterium *Cronobacter muytjensii* JZ38 With Volatile-Mediated Antagonistic Activity Against *Phytophthora infestans*. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 369. [[CrossRef](#)]
29. Andrés-Barrao, C.; Lafi, F.F.; Alam, I.; de Zélicourt, A.; Eida, A.A.; Bokhari, A.; Alzubaidy, H.; Bajic, V.B.; Hirt, H.; Saad, M.M. Complete genome sequence analysis of *Enterobacter* sp. SA187, a plant multi-stress tolerance promoting endophytic bacterium. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2023. [[CrossRef](#)]
30. Green, E.R.; Meccas, J. Bacterial Secretion Systems: An Overview. *Microbiol. Spectr.* **2016**, *4*, 1–19. [[CrossRef](#)]
31. Trunk, K.; Peltier, J.; Liu, Y.C.; Dill, B.D.; Walker, L.; Gow, N.A.R.; Stark, M.J.R.; Quinn, J.; Strahl, H.; Trost, M.; et al. The type VI secretion system deploys antifungal effectors against microbial competitors. *Nat. Microbiol.* **2018**, *3*, 920–931. [[CrossRef](#)]
32. Wolska, K.; Jakubczak, A. Wykrywanie biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* na biomateriałach medycznych. *Med. Doświadczalna Mikrobiol.* **2003**, *55*, 371–378.
33. Stepanovic, S.; Vukovic, D.; Hola, V.; Di Bonaventura, G.; Djukic, S.; Cirkovic, I.; Ruzicka, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* **2007**, *115*, 891–899. [[CrossRef](#)]
34. Sharma, M.; Saleh, D.; Charron, J.-B.; Jabaji, S. A crosstalk between *Brachypodium* root exudates, organic acids, and *Bacillus velezensis* B26, a growth promoting bacterium. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 575578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. He, D.-C.; He, M.-H.; Amalin, D.M.; Liu, W.; Alvindia, D.G.; Zhan, J. Biological Control of Plant Diseases: An Evolutionary and Eco-Economic Consideration. *Pathogens* **2021**, *10*, 1311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Chandra, H.; Kumari, P.; Bisht, R.; Prasad, R.; Yadav, S. Plant growth promoting *Pseudomonas aeruginosa* from *Valeriana wallichii* displays antagonistic potential against three phytopathogenic fungi. *Mol. Biol. Rep.* **2020**, *47*, 6015–6026. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Afzal, I.; Shinwari, Z.K.; Sikandar, S.; Shahzad, S. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiol. Res.* **2019**, *221*, 36–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Shen, S.S.; Choi, O.H.; Lee, S.M.; Park, C.S. In vitro and in vivo activities of biocontrol agent, *Serratia plymuthica* A21-4, against *Phytophthora capsici*. *Plant Pathol. J.* **2002**, *18*, 221–224. [[CrossRef](#)]
39. Frankowski, J.; Lorito, M.; Scala, F.; Schmid, R.; Berg, G.; Bahl, H. Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. *Arch. Microbiol.* **2001**, *176*, 421–426. [[CrossRef](#)]
40. Roberts, D.; Lohrke, S.; Meyer, S.; Buyer, J.; Bowers, J.; Baker, C.; Li, W.; de Souza, J.; Lewis, J.; Chung, S. Biocontrol agents applied individually and in combination for suppression of soilborne diseases of cucumber. *Crop Prot.* **2005**, *24*, 141–155. [[CrossRef](#)]
41. Parani, K.; Shetty, G.P.; Saha, B.K. Isolation of *Serratia marcescens* SR1 as a source of chitinase having potentiality of using as a biocontrol agent. *Indian J. Microbiol.* **2011**, *51*, 247–250. [[CrossRef](#)]
42. Chakraborty, U.; Chakraborty, B.N.; Chakraborty, A.P. Influence of *Serratia marcescens* TRS-1 on growth promotion and induction of resistance in *Camellia sinensis* against *Fomes lamaoensis*. *J. Plant Interact.* **2010**, *5*, 261–272. [[CrossRef](#)]
43. Varma, A.; Bakshi, M.; Lou, B.; Hartmann, A.; Oelmueller, R. *Piriformospora indica*: A Novel Plant Growth Promoting Mycorrhizal Fungus. *Agric. Res.* **2012**, *1*, 117–131. [[CrossRef](#)]
44. Dashti, N.; Prithiviraj, B.; Hynes, R.K.; Smith, D.L. Root and Rhizosphere Colonization of Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) by Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria at Low Root Zone Temperatures and under Short-Season Conditions. *J. Agron. Crop Sci.* **2000**, *185*, 15–22. [[CrossRef](#)]
45. Berg, G.; Roskot, N.; Steidle, A.; Eberl, L.; Zock, A.; Smalla, K. Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 3328–3338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Zheng, A.; Lin, R.; Zhang, D.; Qin, P.; Xu, L.; Ai, P.; Ding, L.; Wang, Y.; Chen, Y.; Liu, Y.; et al. The evolution and pathogenic mechanisms of the rice sheath blight pathogen. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Marzouk, T.; Chaouachi, M.; Sharma, A.; Jallouli, S.; Mhamdi, R.; Kaushik, N.; Djébal, N. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* using volatile organic compounds of solanaceae seed-borne endophytic bacteria. *Postharvest Biol. Technol.* **2021**, *181*, 111655. [[CrossRef](#)]
48. Gkarmiri, K.; Finlay, R.D.; Alström, S.; Thomas, E.; Cubeta, M.A.; Högberg, N. Transcriptomic changes in the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani* AG-3 in response to the antagonistic bacteria *Serratia proteamaculans* and *Serratia plymuthica*. *BMC Genom.* **2015**, *16*, 630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Li, P.; Kwok, A.H.Y.; Jiang, J.; Ran, T.; Xu, D.; Wang, W.; Leung, F.C. Comparative Genome Analyses of *Serratia marcescens* FS14 Reveals Its High Antagonistic Potential. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0123061. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Delgado, N.; Olivera, M.; Cádiz, F.; Bravo, G.; Montenegro, I.; Madrid, A.; Fuentealba, C.; Pedreschi, R.; Salgado, E.; Besoain, X. Volatile Organic Compounds (VOCs) Produced by *Gluconobacter cerinus* and *Hanseniaspora osmophila* Displaying Control Effect against Table Grape-Rot Pathogens. *Antibiotics* **2021**, *10*, 663. [[CrossRef](#)]
51. Weise, T.; Thurmer, A.; Brady, S.; Kai, M.; Daniel, R.; Gottschalk, G.; Piechulla, B. VOC emission of various *Serratia* species and isolates and genome analysis of *Serratia plymuthica* 4Rx13. *FEMS Microbiol. Lett.* **2014**, *352*, 45–53. [[CrossRef](#)]
52. Nascimento, F.; Vicente, C.; Cock, P.; Tavares, M.; Rossi, M.; Hasegawa, K.; Mota, M. From plants to nematodes: *Serratia grimesii* BXF1 genome reveals an adaptation to the modulation of multi-species interactions. *Microb. Genom.* **2018**, *4*, e000178. [[CrossRef](#)]

53. Yi, H.S.; Ahn, Y.R.; Song, G.C.; Ghim, S.Y.; Lee, S.; Lee, G.; Ryu, C.M. Impact of a Bacterial Volatile 2,3-Butanediol on *Bacillus subtilis* Rhizosphere Robustness. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 993. [[CrossRef](#)]
54. van der Lelie, D.; Taghavi, S.; Monchy, S.; Schwender, J.; Miller, L.; Ferrieri, R.; Rogers, A.; Wu, X.; Zhu, W.; Weyens, N.; et al. Poplar and its Bacterial Endophytes: Coexistence and Harmony. *Crit. Rev. Plant Sci.* **2009**, *28*, 346–358. [[CrossRef](#)]
55. Taghavi, S.; Garafola, C.; Monchy, S.; Newman, L.; Hoffman, A.; Weyens, N.; Barac, T.; Vangronsveld, J.; van der Lelie, D. Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 748–757. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Umesh, S.; Singh, K.P.P.; Singh, R. Microbial biotechnology and sustainable agriculture. In *Biotechnology for Sustainable Agriculture*; Lakhan Singh, R., Mondal, S., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridge, UK, 2018; pp. 185–205.
57. Peng, G.; Zhao, X.; Li, Y.; Wang, R.; Huang, Y.; Qi, G. Engineering *Bacillus velezensis* with high production of acetoin primes strong induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Microbiol. Res.* **2019**, *227*, 126297. [[CrossRef](#)]
58. Fu, L.H.; Hu, K.D.; Hu, L.Y.; Li, Y.H.; Hu, L.B.; Yan, H.; Liu, Y.S.; Zhang, H. An antifungal role of hydrogen sulfide on the postharvest pathogens *Aspergillus niger* and *Penicillium italicum*. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e104206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Popova, A.A.; Koksharova, O.A.; Lipasova, V.A.; Zaitseva, J.V.; Katkova-Zhukotskaya, O.A.; Eremina, S.I.; Mironov, A.S.; Chernin, L.S.; Khmel, I.A. Inhibitory and toxic effects of volatiles emitted by strains of *Pseudomonas* and *Serratia* on growth and survival of selected microorganisms, *Caenorhabditis elegans*, and *Drosophila melanogaster*. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 125704. [[CrossRef](#)]
60. Etminani, F.; Harighi, B. Isolation and Identification of Endophytic Bacteria with Plant Growth Promoting Activity and Biocontrol Potential from Wild Pistachio Trees. *Plant Pathol. J.* **2018**, *34*, 208–217. [[CrossRef](#)]
61. Dorjey, S.; Dolkar, D.; Sharma, R. Plant growth promoting rhizobacteria *Pseudomonas*: A review. *Int. J. Curr. Microbiol.* **2017**, *6*, 1335–1344. [[CrossRef](#)]
62. Purushotham, P.; Arun, P.V.; Prakash, J.S.; Podile, A.R. Chitin binding proteins act synergistically with chitinases in *Serratia proteamaculans* 568. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e36714. [[CrossRef](#)]
63. Compant, S.; Duffy, B.; Nowak, J.; Clément, C.; Barka, E.A. Use of plant growth promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 4951–4959. [[CrossRef](#)]
64. Someya, N.; Nakajima, M.; Watanabe, K.; Hibi, T.; Akutsu, K. Potential of *Serratia marcescens* strain B2 for biological control of rice sheath blight. *Biocontrol Sci. Technol.* **2005**, *15*, 105–109. [[CrossRef](#)]
65. Ben Slama, H.; Triki, M.A.; Bouket, A.C.; Mefteh, B.F.; Alenezi, F.N.; Luptakova, L.; Cherif-Silini, H.; Vallat, A.; Oszako, T.; Gharsallah, N.; et al. Screening of the High Rhizosphere Competent *Limoniastrum monopetalum* Culturable Endophyte Microbiota Allows the Recovery of Multifaceted and Versatile Biocontrol Agents. *Microorganisms* **2019**, *7*, 249. [[CrossRef](#)]
66. Kumar, A.; Vandana, R.S.; Singh, M.; Pandey, K.D. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). A promising approach to disease management. In *Microbes and Environmental Management*; Studium Press: New Delhi, India, 2019; pp. 195–209.
67. Faltin, F.; Lottmann, J.; Grosch, R.; Berg, G. Strategy to select and assess antagonistic bacteria for biological control of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Can. J. Microbiol.* **2004**, *50*, 811–820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Shanmugaiah, V.; Nithya, K.; Harikrishnan, H.; Jayaprakashvel, M.; Balasubramanian, N. Biocontrol mechanisms of siderophores against bacterial plant pathogens. In *Sustainable Approaches to Controlling Plant Pathogenic Bacteria*, 1st ed.; Kannan, V.R., Bastas, K.K., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2015; pp. 167–190.
69. Ahmed, E.; Holmström, S.J. Siderophores in environmental research: Roles and applications. *Microbial. Biotechnol.* **2014**, *7*, 196–208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Schiessl, K.T.; Janssen, E.M.; Kraemer, S.M.; McNeill, K.; Ackermann, M. Magnitude and Mechanism of Siderophore-Mediated Competition at Low Iron Solubility in the *Pseudomonas aeruginosa* Pyochelin System. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1964. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Bigirimana, J.; Höfte, M. Induction of systemic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in bean by a benzothiadiazole derivative and rhizobacteria. *Phytoparasitica* **2002**, *30*, 159–168. [[CrossRef](#)]
72. Sharma, A.; Johri, B.N. Growth promoting influence of siderophore producing *Pseudomonas* strains GRP3A and PRS9 in maize (*Zea mays* L.) under iron limiting conditions. *Microbiol. Res.* **2003**, *158*, 243–248. [[CrossRef](#)]
73. Press, C.M.; Loper, J.E.; Kloepper, J.W. Role of iron in rhizobacteria mediated induced systemic resistance of cucumber. *Phytopathology* **2001**, *91*, 593–598. [[CrossRef](#)]
74. Singh, D.P.; Gupta, V.K.; Prabha, R. *Microbial Interventions in Agriculture and Environment: Rhizosphere, Microbiome and Agro-Ecology*; Springer: Singapore, 2019.
75. Saha, R.; Saha, N.; Donofrio, R.S.; Bestervelt, L.L. Microbial siderophores: A mini review. *J. Basic Microbiol.* **2013**, *53*, 303–317. [[CrossRef](#)]
76. Bargaz, A.; Lyamlouli, K.; Chtouki, M.; Zeroual, Y.; Dhiba, D. Soil Microbial Resources for Improving Fertilizers Efficiency in an Integrated Plant Nutrient Management System. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1606. [[CrossRef](#)]
77. Sharma, S.B.; Sayyed, R.Z.; Trivedi, M.H.; Gobi, T.A. Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springerplus* **2013**, *2*, 587–600. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Anzuay, M.S.; Ludueña, L.M.; Angelini, J.G.; Fabra, A.; Taurian, T. Beneficial effects of native phosphate solubilizing bacteria on peanut (*Arachis hypogaea* L.) growth and phosphorus acquisition. *Symbiosis* **2015**, *66*, 89–97. [[CrossRef](#)]
79. Dipak, P.; Sankar, S. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KUPSB12 with antibacterial potential from river Ganga, India. *Ann. Agrar. Sci.* **2017**, *15*, 130–136. [[CrossRef](#)]

80. Zeng, Q.; Wu, X.; Wang, J.; Ding, X. Phosphate solubilization and gene expression of phosphate-solubilizing bacterium *Burkholderia multivorans* WS-FJ9 under different levels of soluble phosphate. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *27*, 844–855. [[CrossRef](#)]
81. Pande, A.; Pandey, P.; Mehra, S.; Singh, M.; Kaushik, S. Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* **2017**, *15*, 379–391. [[CrossRef](#)]
82. Zhang, S.; Moyne, A.L.; Reddy, M.S.; Kloepper, J.W. The role of salicylic acid in induced systemic resistance elicited by plant growth-promoting rhizobacteria against blue mold of tobacco. *Biol. Control* **2002**, *25*, 288–296. [[CrossRef](#)]
83. Dubuis, C.; Keel, C.; Haas, D. Dialogues of root-colonizing biocontrol pseudomonads. *Eur. J. Plant Pathol.* **2007**, *119*, 311–328. [[CrossRef](#)]
84. Raaijmakers, J.M.; Paulitz, T.C.; Steinberg, C.; Alabouvette, C.; Moëgne-Loccoz, Y. The rhizosphere: A playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* **2009**, *321*, 341–361. [[CrossRef](#)]
85. Danese, P.N.; Pratt, L.A.; Kolter, R. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 3593–3596. [[CrossRef](#)]
86. Zhu, M.-L.; Wu, X.-Q.; Wang, Y.-H.; Dai, Y. Role of Biofilm Formation by *Bacillus pumilus* HR10 in Biocontrol against Pine Seedling Damping-Off Disease Caused by *Rhizoctonia solani*. *Forests* **2020**, *11*, 652. [[CrossRef](#)]
87. Shehata, H.R.; Ettinger, C.L.; Eisen, J.A.; Raizada, M.N. Genes Required for the Anti-fungal Activity of a Bacterial Endophyte Isolated from a Corn Landrace Grown Continuously by Subsistence Farmers Since 1000 BC. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1548. [[CrossRef](#)]
88. Kandel, S.L.; Joubert, P.M.; Doty, S.L. Bacterial Endophyte Colonization and Distribution within Plants. *Microorganisms* **2017**, *5*, 77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Hover, T.; Maya, T.; Ron, S.; Sandovsky, H.; Shadkhan, Y.; Kijner, N.; Mitiagin, Y.; Fichtman, B.; Harel, A.; Shanks, R.M.; et al. Mechanisms of Bacterial (*Serratia marcescens*) Attachment to, Migration along, and Killing of Fungal Hyphae. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82*, 2585–2594. [[CrossRef](#)]
90. Chlebek, D.; Pinski, A.; Żur, J.; Michalska, J.; Hupert-Kocurek, K. Genome Mining and Evaluation of the Biocontrol Potential of *Pseudomonas fluorescens* BRZ63, a New Endophyte of Oilseed Rape (*Brassica napus* L.) against Fungal Pathogens. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8740. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Huerta-Cepas, J.; Szklarczyk, D.; Heller, D.; Hernández-Plaza, A.; Forslund, S.K.; Cook, H.; Mende, D.R.; Letunic, I.; Rattei, T.; Jensen, L.J.; et al. EggNOG 5.0: A hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D309–D314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Kanehisa, M.; Sato, Y.; Kawashima, M.; Furumichi, M.; Tanabe, M. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, D457–D462. [[CrossRef](#)]
93. Blin, K.; Shaw, S.; Steinke, K.; Villebro, R.; Ziemert, N.; Lee, S.Y.; Medema, M.H.; Weber, T. AntiSMASH 5.0: Updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, W81–W87. [[CrossRef](#)]
94. Yin, Y.; Mao, X.; Yang, J.; Chen, X.; Mao, F.; Xu, Y. dbCAN: A web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, W445–W451. [[CrossRef](#)]
95. Zhang, H.; Yohe, T.; Huang, L.; Entwistle, S.; Wu, P.; Yang, Z.; Busk, P.K.; Xu, Y.; Yin, Y. dbCAN2: A meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W95–W101. [[CrossRef](#)]
96. Bertelli, C.; Laird, M.R.; Williams, K.P.; Simon Fraser University Research Computing Group; Lau, B.Y.; Hoad, G.; Winsor, G.L.; Brinkman, F.S.L. IslandViewer 4: Expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, W30–W35. [[CrossRef](#)]
97. Avram, O.; Rapoport, D.; Portugez, S.; Pupko, T. M1CR0B1A1L1Z3R—A user-friendly web server for the analysis of large-scale microbial genomics data. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, W88–W92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Talavera, G.; Castresana, J. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Syst. Biol.* **2007**, *56*, 564–577. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Nnyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 1547–1549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Vicente, C.S.L.; Nascimento, F.X.; Ikuyo, Y.; Cock, P.J.; Mota, M.; Hasegawa, K. The genome and genetics of a high oxidative stress tolerant *Serratia* sp. LCN16 isolated from the plant parasitic nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *BMC Genom.* **2016**, *17*, 301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Zur, J.; Pinski, A.; Wojcieszynska, D.; Smulek, W.; Guzik, U. Diclofenac degradation—Enzymes, genetic background and cellular alterations triggered in diclofenac-metabolizing strain *Pseudomonas moorei* KB4. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6786. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Dąbrowska, G.B.; Tylman-Mojżesz, W.; Mierek-Adamska, A.; Richert, A.; Hryniewicz, K. Potential of *Serratia plymuthica* IV-11-34 strain for biodegradation of polylactide and poly(ethylene terephthalate). *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *193*, 145–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Taylor, S.; Wakem, M.; Dijkman, G.; Alsarraj, M.; Nguyen, M. A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* **2010**, *50*, S1–S5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)]
105. Ghose, T.K. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* **1987**, *59*, 257–268. [[CrossRef](#)]

106. Rais, A.; Jabeen, Z.; Shair, F.; Hafeez, F.Y.; Hassan, M.N. *Bacillus* spp., a bio-control agent enhances the activity of antioxidant defense enzymes in rice against *Pyricularia oryzae*. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0187412. [[CrossRef](#)]
107. Zarei, M.; Aminzadeh, S.; Zolgharnein, H.; Safahieh, A.; Daliri, M.; Noghabi, K.A.; Ghoroghi, A.; Motallebi, A. Characterization of a chitinase with antifungal activity from a native *Serratia marcescens* B4A. *Braz. J. Microbiol.* **2011**, *42*, 1017–1029. [[CrossRef](#)]
108. Zhang, C.; Bruins, M.E.; Yang, Z.Q.; Liu, S.T.; Rao, P.F. A new formula to calculate activity of superoxide dismutase in indirect assays. *Anal. Biochem.* **2016**, *503*, 65–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Banerjee, G.; Pandey, S.; Ray, A.K.; Kumar, R. Bioremediation of heavy metals by a novel bacterial strain *Enterobacter cloaca* and its antioxidant enzyme activity, flocculant production and protein expression in presence of lead, cadmium and nickel. *Water Air Soil Pollut.* **2015**, *226*, 91. [[CrossRef](#)]
110. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Johnston-Monje, D.; Raizada, M.N. Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, ethnography and ecology. *PLoS ONE* **2013**, *6*, e20396. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Syamala, M.; Sivaji, M. Functional characterization of various plant growth promoting activity of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* from *Aloe vera* rhizosphere. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **2017**, *6*, 120–122.
113. Sandhya, V.; Shrivastava, M.; Ali, S.Z.; Prasad, V.S.S.K. Endophytes from maize with plant growth promotion and biocontrol activity under drought stress. *Russ. Agric. Sci.* **2017**, *43*, 22–34. [[CrossRef](#)]
114. Cappuccino, J.G.; Sherman, N. *Biochemical Activities of Microorganisms. Microbiology, A Laboratory Manual*; The Benjamin/Cummings Publishing Co.: San Francisco, CA, USA, 1992; pp. 188–247.
115. Schwyn, B.; Neilands, J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **1987**, *160*, 47–56. [[CrossRef](#)]
116. Pikovskaya, R.I. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Microbiology* **1948**, *17*, 362–370.
117. Naveed, M.; Mitter, B.; Yousaf, S.; Pastar, M.; Afzal, M.; Sessitsch, A. The endophyte *Enterobacter* sp. FD17: A maize growth enhancer selected based on rigorous testing of plant beneficial traits and colonization characteristics. *Biol. Fertil. Soils* **2014**, *50*, 249–262. [[CrossRef](#)]
118. Freeman, D.J.; Falkiner, F.R.; Keane, C.T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J. Clin. Pathol.* **1989**, *42*, 872–874. [[CrossRef](#)]
119. Taghadosi, R.; Shakibaie, M.R.; Masoumi, S. Biochemical detection of N-Acyl homoserine lactone from biofilm-forming uropathogenic *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection samples. *Rep. Biochem. Mol. Biol.* **2015**, *3*, 56–61. [[PubMed](#)]
120. Michalska, J.; Piński, A.; Żur, J.; Mroziak, A. Selecting Bacteria Candidates for the Bioaugmentation of Activated Sludge to Improve the Aerobic Treatment of Landfill Leachate. *Water* **2020**, *12*, 140. [[CrossRef](#)]

A3. Oświadczenia doktoranta i współautorów publikacji



OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA O WKŁADZIE PRACY

Katowice, 19.05.2023r.

mgr Daria Chlebek
Zespół Biochemii i Genetyki Mikroorganizmów
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Wydział Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Śląski w Katowicach
Jagiellońska 28, 40-032 Katowice
dachlebek@us.edu.pl

Genome Mining and Evaluation of the Biocontrol Potential of *Pseudomonas fluorescens* BRZ63, a New Endophyte of Oilseed Rape (*Brassica napus* L.) against Fungal Pathogens, Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 8740.

Daria Chlebek, Artur Piński, Joanna Żur-Pińska, Justyna Michalska, Katarzyna Hupert-Kocurek

Niniejszym oświadczam, że w ww. pracy mój udział polegał na:

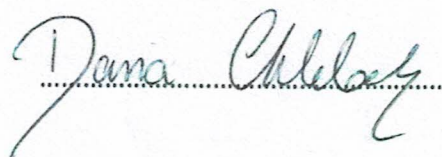
- opracowaniu koncepcji pracy, projektowaniu i prowadzeniu doświadczeń laboratoryjnych, analizie wyników, w tym analizie bioinformatycznej genomu, wykonaniu zdjęć mikroskopowych, opracowaniu manuskryptu. Pełniłam rolę autora korespondencyjnego.

Genetic Determinants of Antagonistic Interactions and the Response of New Endophytic Strain *Serratia quinivorans* KP32 to Fungal Phytopathogens, Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 15561.

Daria Chlebek, Valeriia Grebtsova, Artur Piński, Joanna Żur-Pińska, Katarzyna Hupert-Kocurek

Niniejszym oświadczam, że w ww. pracy mój udział polegał na:

- opracowaniu koncepcji pracy, projektowaniu i prowadzeniu doświadczeń laboratoryjnych, analizie wyników, w tym analizie bioinformatycznej genomu, opracowaniu manuskryptu. Pełniłam rolę autora korespondencyjnego.



**OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA
O WKŁADZIE PRACY**

Katowice, 19.05.2023r.

dr hab. Katarzyna Hupert-Kocurek, prof. UŚ.
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Wydział Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Śląski w Katowicach
katarzyna.hupert-kocurek@us.edu.pl

Genome Mining and Evaluation of the Biocontrol Potential of *Pseudomonas fluorescens* BRZ63, a New Endophyte of Oilseed Rape (*Brassica napus* L.) against Fungal Pathogens, Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 8740.

Daria Chlebek, Artur Piński, Joanna Żur-Pińska, Justyna Michalska, Katarzyna Hupert-Kocurek

Niniejszym oświadczam, że w ww. pracy mój udział polegał na:

opracowaniu koncepcji badań, pozyskaniu finansowania i koordynowaniu prac,
opracowaniu manuskryptu.

Pełniłam rolę autora korespondencyjnego.

Genetic Determinants of Antagonistic Interactions and the Response of New Endophytic Strain *Serratia quinivorans* KP32 to Fungal Phytopathogens, Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 15561.

Daria Chlebek, Valeriia Grebtsova, Artur Piński, Joanna Żur-Pińska, Katarzyna Hupert-Kocurek

Niniejszym oświadczam, że w ww. pracy mój udział polegał na:

opracowaniu koncepcji badań, współdziałale w prowadzeniu badań, pozyskaniu finansowania i koordynowaniu prac, opracowaniu manuskryptu. Pełniłam rolę autora korespondencyjnego.



Katowice, dn. 23 maja 2023 r.

Dr Artur Piński
Zespół Cytogenetyki i Biologii Molekularnej Roślin
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Wydział Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Śląski w Katowicach
Jagiellońska 28, 40-032 Katowice
E-mail: artur.pinski@us.edu.pl

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA O WKŁADZIE PRACY

Genome Mining and Evaluation of the Biocontrol Potential of *Pseudomonas fluorescens* BRZ63, a New Endophyte of Oilseed Rape (*Brassica napus* L.) against Fungal Pathogens, *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 8740.

Daria Chlebek, Artur Piński, Joanna Żur-Pińska, Justyna Michalska, Katarzyna Hupert-Kocurek

Niniejszym oświadczam, że w ww. pracy mój udział polegał na:

- współudziale w wykonaniu analizy wyników oraz przygotowaniu manuskryptu

Genetic Determinants of Antagonistic Interactions and the Response of New Endophytic Strain *Serratia quinivorans* KP32 to Fungal Phytopathogens, *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 15561.

Daria Chlebek, Valeriia Grebtsova, Artur Piński, Joanna Żur-Pińska, Katarzyna Hupert-Kocurek

Niniejszym oświadczam, że w ww. pracy mój udział polegał na:

- współudziale w wykonaniu analizy wyników oraz przygotowaniu manuskryptu



Signed by /
Podpisano przez:

Artur Piński
Uniwersytet Śląski
w Katowicach

Date / Data:
2023-05-24 09:20

Artur Piński, e-mail: artur.pinski@us.edu.pl
Zespół Cytogenetyki i Biologii Molekularnej Roślin
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Śląski w Katowicach
Jagiellońska 28, 40-032 Katowice, Poland
Tel. 791 908 498



Centrum Biotechnologii

Adiunkt
Dr Joanna Żur-Pińska

Katowice, 24.05.2023r.

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA O WKŁADZIE PRACY

dr Joanna Żur-Pińska
Centrum Biotechnologii
Politechnika Śląska w Gliwicach
e-mail: joanna.zur-pinska@polsl.pl

Genome Mining and Evaluation of the Biocontrol Potential of *Pseudomonas fluorescens* BRZ63, a New Endophyte of Oilseed Rape (*Brassica napus* L.) against Fungal Pathogens, *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 8740.

Daria Chlebek, Artur Piński, Joanna Żur-Pińska, Justyna Michalska, Katarzyna Hupert-Kocurek

Niniejszym oświadczam, że w ww. pracy mój udział polegał na:

- współdziałanie w analizie wyników oraz przygotowaniu manuskryptu

Genetic Determinants of Antagonistic Interactions and the Response of New Endophytic Strain *Serratia quinivorans* KP32 to Fungal Phytopathogens, *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 15561.

Daria Chlebek, Valeriia Grebtsova, Artur Piński, Joanna Żur-Pińska, Katarzyna Hupert-Kocurek

Niniejszym oświadczam, że w ww. pracy mój udział polegał na:

- współdziałanie w analizie wyników oraz przygotowaniu manuskryptu

Politechnika Śląska
Centrum Biotechnologii

Akademicka 7, 44-100 Gliwice
+48 32 123 45 67 / +48 123 456 789
joanna.zur-pinska@polsl.pl

NIP PL631 020 07 36



HR EXCELLENCE IN RES



Signed by /
Podpisano przez:

Joanna Paulina
Żur-Pińska

Date / Data:
2023-05-24 09:23

**OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA
O WKŁADZIE PRACY**

Katowice, 19.05.2023r.

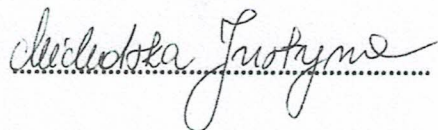
dr Justyna Michalska
Katedra Biotechnologii Środowiskowej
Politechnika Śląska w Gliwicach
e-mail: Justyna.Michalska@polsl.pl

Genome Mining and Evaluation of the Biocontrol Potential of *Pseudomonas fluorescens* BRZ63, a New Endophyte of Oilseed Rape (*Brassica napus* L.) against Fungal Pathogens, Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 8740.

Daria Chlebek, Artur Piński, Joanna Żur-Pińska, Justyna Michalska, Katarzyna Hupert-Kocurek

Niniejszym oświadczam, że w ww. pracy mój udział polegał na:

współdziałale w projektowaniu i wykonaniu doświadczeń oraz przygotowaniu manuskryptu



**OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA
O WKŁADZIE PRACY**

Katowice, 19.05.2023r.


mgr Valeriia Grebtsova
e-mail: valeriia.grebtsova@gmail.com

Genetic Determinants of Antagonistic Interactions and the Response of New Endophytic Strain
Serratia quinivorans KP32 to Fungal Phytopathogens, Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 15561.

Daria Chlebek, Valeriia Grebtsova, Artur Piński, Joanna Żur-Pińska, Katarzyna Hupert-Kocurek

Niniejszym oświadczam, że w ww. pracy mój udział polegał na:

współudziale w prowadzeniu doświadczeń, analizie wyników i opracowaniu manuskryptu



.....