



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΩΝ ΤΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ
ΚΟΙΝΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΡΙΖΟΣΦΑΙΡΑΣ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ ΤΗΣ
ΤΟΜΑΤΑΣ, ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΤΟΝ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟ ΜΕ
ΕΝΑ ΠΑΘΟΓΟΝΟ (*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis
lycopersici*) ΚΑΙ ΕΝΑ ΜΗ ΠΑΘΟΓΟΝΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ ΤΟΥ
ΓΕΝΟΥΣ *FUSARIUM* (*Fusarium solani*)**

ΣΠΥΡΙΔΑΚΗ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2010

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

1. Καρπούζας Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
2. Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
3. Κωνσταντίνος Οιχαλιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Γονιμότητας και Βιολογίας Εδάφους, του Τμήματος Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων και Γεωργικής Μηχανικής, Εργαστήριο Γεωργικής Χημείας και Εδαφολογίας.

Ευχαριστίες

Πρωτίστως, θα ήθελα να εκφράσω τις βαθύτατες μου ευχαριστίες στον κ. Δ. Καρπούζα, Επίκουρο Καθηγητή Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας υπό την επίβλεψη του οποίου πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία, για την πολύτιμη παροχή επιστημονικής γνώσης, την καθοδήγηση και τη διδακτική του στήριξη καθώς και για την ηθική υποστήριξη που μου προσέφερε.

Τις θερμές μου ευχαριστίες στην Επίκουρη Καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Καλλιόπη Παπαδοπούλου για την ανεκτίμητη συμβολή της στην εκπόνηση της πτυχιακής αυτής μελέτης. Ακόμη, εκφράζω τις ευχαριστίες μου

στον κ. Κωνσταντίνο Οιχαλιώτη, Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων και Γεωργικής Μηχανικής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για τη συμμετοχή του στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στη συνάδελφο και μεταπτυχιακή φοιτήτρια Κωνσταντίνα Ρουσίδου για την ανυπολόγιστη βοήθεια και συμβολή της στην εκπόνηση της πτυχιακής μου μελέτης, καθώς βρισκόταν δίπλα μου όποτε τη χρειαζόμουν.

Ένα ακόμα ευχαριστώ στον συνάδελφο και προπτυχιακό φοιτητή Αναστάσιο Καρατασά για την παροχή των αρχικών μου δειγμάτων και τη συμβολή του στην ολοκλήρωση του πειράματος μου. Επίσης, ευχαριστώ τον κ. Κ. Δελή (Διδάσκων ΠΔ 407) για τις χρήσιμες συμβουλές του στο χώρο του εργαστηρίου. Ιδιαίτερα, θέλω να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την καλή συνεργασία σε όλη τη διάρκεια της συνύπαρξής μας.

Τέλος και πιο σημαντικό, οφείλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση και υποστήριξη που μου έδειξαν όλα αυτά τα χρόνια.

Περιεχόμενα

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
<i>Μικροοργανισμοί της ριζόσφαιρας - Οφελος προς τον άνθρωπο</i>	6
<i>Μικροβιακή κοινότητα της ριζόσφαιρας</i>	7
Είδη μικροοργανισμών.....	7
Μη-συμβιωτικά ωφέλιμα βακτήρια και μύκητες της ριζόσφαιρας.....	7
Αμοιβαία Συμβιωτικοί μικροοργανισμοί.....	12
<i>Είδη αλληλεπιδράσεων στην ριζόσφαιρα</i>	13
1. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ PGPR και Rhizobium οδηγώντας σε αποτελεσματικότερη αζωτοδέσμευση.....	14
2. Αλληλεπιδράσεις ανταγωνισμού για τον έλεγχο των παθογόνων.....	15
3. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ ΔΜΜ και πληθυσμών της ριζόσφαιρας.....	17
<i>Επίδραση των ριζικών εκκρίσεων στην μικροβιακή κοινότητα της ριζόσφαιρας</i>	18
<i>Μέθοδοι προσδιορισμού της σύστασης της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους</i>	19
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	25
<i>Fusarium oxysporum f. sp. radicum-lycopersici</i>	25
<i>Fusarium solani</i> στέλεχος Κ.....	26
<i>Pseudomonas</i> , - α-Πρωτεοβακτήρια.....	28
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	29
<i>Μικροοργανισμοί και προετοιμασία εμβολίου</i>	29
<i>Πειραματική διαδικασία</i>	29
<i>Απομόνωση DNA από υλικό εδάφους (Soil DNA extraction)</i>	31
<i>Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)</i>	31
<i>Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών - DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)</i>	35
<i>Κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR και αλληλούχιση</i>	36
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	39
<i>Αποτελέσματα εξαγωγής του DNA από τη ριζόσφαιρα της τομάτας</i>	39
<i>Αποτελέσματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)</i>	39
<i>Αποτελέσματα Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)</i>	42
<i>Κοινότητα Pseudomonas</i>	43
<i>Κοινότητα α-πρωτεοβακτηρίων</i>	48
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	53
ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	57
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	58
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	60

Περίληψη

Το μυκητιακό στέλεχος *Fusarium solani* (FsK) αναπτύσσεται ενδοφυτικά στις ρίζες της τομάτας και καταστέλλει τη μόλυνση από τον *Fusarium oxysporum* f.sp.*radicis lycopersici* (FORL), έναν παθογόνο μύκητα. Αυτά τα δύο στελέχη μυκήτων παρουσιάζουν μία ωφέλιμη και μία βλαβερή αλληλεπίδραση με το φυτο-ξενιστή, έχοντας ένα κοινό χαρακτηριστικό στη διαδικασία αποικισμού στις ρίζες του φυτού, την εισβολή μέσα στους ιστούς της ρίζας. Διετέλεσαμε πείραμα για να ερευνήσουμε την επίδραση που έχει η αποίκιση της ρίζας από τα δύο μυκητιακά στελέχη στη δομή των μικροβιακών κοινοτήτων του εδάφους. Φυτά τομάτας εμβολιάστηκαν με FsK και/ή FORL και 8, 15 και 30 μέρες μετά τον εμβολιασμό, συλλέχθηκε η ριζόσφαιρα και αναλύθηκε μέσω της τεχνικής του DGGE και σε συνδυασμό με κλωνοποίηση. Παρατηρήθηκαν σαφείς επιδράσεις στην κοινότητα των *Pseudomonas* και των α-πρωτεοβακτηρίων στη ριζόσφαιρα, αν και μερικές ζώνες και στις δύο βακτηριακές συντεχνίες επηρεάστηκαν σαφώς και κατά τη διάρκεια και μετά από την είσοδο του FsK στη ρίζα. Κλωνοποιώντας τις επιλεγμένες ζώνες από το DGGE που συνδέθηκαν με τις συγκεκριμένες μεταχειρίσεις, έδειξε ότι ορισμένοι μύκητες και λίγα βακτήρια επηρεάστηκαν από τον FsK ή/και την παρουσία του FORL. Οι κλώνοι που συσχετίστηκαν με τον FsK συνδέθηκαν με τα είδη που περιλαμβάνονται στο βιολογικό έλεγχο των παθογόνων προκαλώντας συστηματική επίκτητη ανθεκτικότητα (induced systemic resistance ISR). Θεωρούμε ότι η ενδοφυτική είσοδος του FsK αλλάζει τη φυσιολογία της ρίζας η οποία προκαλεί με τη σειρά της αλλαγές στη δομή της κοινότητας της ριζόσφαιρας. Αυτές οι αλλαγές απεικονίζουν πιθανότατα τη διαφορετική αλληλεπίδραση που προκαλούν οι δύο μύκητες, ένας παθογόνος και ένας μη παθογόνος(ενδόφυτο).

Εισαγωγή

Μικροοργανισμοί της ριζόσφαιρας - Όφελος προς τον άνθρωπο

Οι μικροοργανισμοί του εδάφους παίζουν σημαντικό ρόλο στην υγεία των φυτών (Ikeda et al., 2006). Έχει βρεθεί ότι οι μικροοργανισμοί που αποικίζουν την ρίζα του φυτού, μπορούν να βοηθήσουν στην ανάπτυξη του φυτού με διάφορους τρόπους, είτε συμμετέχοντας στην πρόσληψη διαφόρων θρεπτικών στοιχείων από το έδαφος, είτε ενισχύοντας την ανάπτυξη του ριζικού συστήματος και κατά συνέπεια την ανάπτυξη όλου του φυτού, όπως επίσης είτε ελέγχοντας την ανάπτυξη άλλων παθογόνων μικροοργανισμών. Εκτός από την επίδραση που μπορούν να έχουν οι μικροοργανισμοί στο φυτό, το ίδιο το φυτό μέσω ουσιών που εκκρίνει, μπορεί να μεταβάλει τη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας στην ριζόσφαιρα. Με αυτόν τον τρόπο, η απόδοση των καλλιεργειών σχετίζεται άμεσα με την ορθή ανάπτυξη και επικοινωνία των μικροοργανισμών της βιόσφαιρας και της ρίζας του φυτού.

Οι αλληλεπιδράσεις που πραγματοποιούνται στη ριζόσφαιρα, δηλαδή στο μικρο-οικοσύστημα του εδάφους που γειτνιάζει και βρίσκεται σε άμεση επαφή με την ρίζα του φυτού, μόλις τώρα αρχίζουν να γίνονται κατανοητές. Γενικά, τα φυτά αναπτύσσονται φυσιολογικά στο έδαφος, χωρίς την παρέμβαση του ανθρώπου. Όμως η συνεχής καλλιέργεια, η ρύπανση του εδάφους ή η επικράτηση φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών, σε ορισμένες περιπτώσεις, έχει οδηγήσει σε σημαντικά μειωμένη παραγωγή ή ολοκληρωτική καταστροφή των καλλιεργειών. Γι' αυτόν τον λόγο η καλύτερη κατανόηση των αλληλεπιδράσεων και των διεργασιών που λαμβάνουν χώρα στην ριζόσφαιρα των φυτών μεταξύ φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών –

ωφέλιμων μικροοργανισμών – φυτού είναι σημαντική για την διασφάλιση αποδοτικότερων και οικονομικότερων συστημάτων καλλιέργειας.

Μικροβιακή κοινότητα της ριζόσφαιρας

Είδη μικροοργανισμών

Μια μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών μπορεί να αποικίσει την ριζόσφαιρα. Είναι γενικά αποδεκτό ότι όλα τα είδη των μικροοργανισμών μπορούν να αναπτύξουν σημαντικές λειτουργίες στο οικοσύστημα. Περισσότερη γνώση υπάρχει γύρω από τις αλληλεπιδράσεις διαφόρων βακτηριακών πληθυσμών αλλά και μυκήτων, στην ριζόσφαιρα, ενώ ελάχιστα είναι γνωστά για τον ρόλο των αρχαίων. Τα βακτήρια και οι μύκητες, παρουσιάζουν διαφορετικές τροφικές συνήθειες, ενώ έχουν περιγραφεί τόσο ωφέλιμες όσο και παθογόνες αλληλεπιδράσεις (Barea et al., 2005). Οι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί που προάγουν την ανάπτυξη του φυτού μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε α) αποδομητές νεκρής οργανικής ύλης (saprotrophos), β) στα ριζοβακτήρια-ριζομύκητες που προάγουν την ανάπτυξη του φυτού (plant growth promoting rhizobacteria-rhizofungi PGPR) και γ) τους μύκητες ή βακτήρια που ανταγωνίζονται τους παθογόνους μικροοργανισμούς της ρίζας, ενώ η σχέση των πληθυσμών αυτών με το φυτό μπορεί είτε να είναι συμβιωτική (αμοιβαία ή όχι) ή μη-συμβιωτική.

Μη-συμβιωτικά ωφέλιμα βακτήρια και μύκητες της ριζόσφαιρας

Ο όρος ριζοβακτήρια/ριζομύκητες χρησιμοποιείται για να περιγράψει την κατηγορία των βακτηρίων/μυκήτων τα οποία είναι ικανά να αποικίσουν το εδαφικό μικρο-οικοσύστημα της ρίζας. Τα PGPR παρουσιάζουν τρία χαρακτηριστικά: α) θα πρέπει να μπορούν να αποικίσουν το

περιβάλλον της ρίζας, β) θα πρέπει να μπορούν να ανταγωνιστούν άλλους μικροοργανισμούς και να αποικίζουν την ρίζα για όσο χρονικό διάστημα απαιτείται ώστε να οδηγήσουν σε ανάπτυξη του φυτού και γ) θα πρέπει να μπορούν να προάγουν την ανάπτυξη του φυτού (Barea et al., 2005). Οι ωφέλιμοι για την ανάπτυξη του φυτού μικροοργανισμοί, παρουσιάζουν ενδιαφέρον για χρήση ως βιολογικά λιπάσματα (Comprant et al., 2009). Παρόλα αυτά, σε αρκετές περιπτώσεις η χρήση των PGPR δεν παρουσιάζει τα επιθυμητά αποτελέσματα, όταν εφαρμόζεται στον αγρό. Αυτό μπορεί να είναι αποτέλεσμα ανεπαρκούς ικανότητας αποίκησης της ριζόσφαιρας, γι' αυτόν τον λόγο είναι απαραίτητο όχι μόνο να βρεθούν οι μηχανισμοί με τους οποίους επιτυγχάνεται η προώθηση της ανάπτυξης των φυτών αλλά επιπλέον να γίνει κατανοητός ο τρόπος με τον οποίο ο εμβολιασμός με PGPR θα οδηγήσει σε εγκατάσταση των επιθυμητών μικροοργανισμών στην ριζόσφαιρα του φυτού.

Τα PGPR μπορούν να χωριστούν περαιτέρω σε δύο κατηγορίες: α) σε αυτά τα οποία συμμετέχουν στην ανακύκλωση των θρεπτικών στοιχείων και στην ενεργοποίηση των φυτών και β) σε αυτά τα οποία ελέγχουν την ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών, παρόλα αυτά μπορεί κάποιος μικροοργανισμός να στηρίζει την ανάπτυξη του φυτού και με τους δύο τρόπους (Barea et al., 2005; Naik et al., 2008). Οι μικροοργανισμοί της πρώτης κατηγορίας βοηθούν την ανάπτυξη του φυτού είτε διαλυτοποιώντας ενώσεις του φωσφόρου και μέταλλα, ώστε να μπορούν να προσληφθούν από την ρίζα, είτε παράγοντας φυτοορμόνες οι οποίες δρουν στο φυτό ευνοώντας την ανάπτυξή του.

A) Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στην ανακύκλωση θρεπτικών στοιχείων και ενεργοποίηση των φυτών

Είναι γνωστό, ότι μικροοργανισμοί παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανακύκλωση των θρεπτικών του εδάφους. Μικροοργανισμοί όπως βακτήρια, μύκητες της ριζόσφαιρας αλλά και ελεύθεροι μύκητες, έχουν την ικανότητα να καθιστούν περισσότερο διαλυτά και προσβάσιμα στο φυτό διάφορα θρεπτικά στοιχεία. Για παράδειγμα διάφορα βακτήρια έχουν την ικανότητα να παράγουν σιδηροφόρες ουσίες οι οποίες βοηθούν στην αύξηση της διαθεσιμότητας του σιδήρου στην ριζόσφαιρα των φυτών (Whitelaw et al., 2000; Richardson et al., 2001). Αντίστοιχα, βακτήρια έχουν απομονωθεί από καλλιεργούμενα και μη εδάφη που έχουν την ικανότητα να διαλυτοποιούν ανόργανες και οργανικές μορφές φωσφόρου καθιστώντας πιο εύκολη την πρόσληψη του από τα φυτά. Παρόλο που βακτήρια από τα γένη των *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Aerobacter* και *Bacillus* έχουν περιγραφεί σαν ικανά να διαλυτοποιούν ενώσεις φωσφόρου, στελέχη του γένους *Pseudomonas* θεωρούνται σαν αποτελεσματικότεροι για τον σκοπό αυτό (Villegas et al., 2001).

Για την ανάπτυξη του φυτού, σημαντικό ρόλο παίζουν φυτοορμόνες όπως είναι το ινδολυλοξικό οξύ (IAA), το αιθυλένιο, οι κυτοκινίνες και οι γιββερελλίνες. Αυτές οι ορμόνες είτε συντίθενται από το ίδιο το φυτό, είτε από τους μικροοργανισμούς της ριζόσφαιρας. Επιπλέον, οι μικροοργανισμοί, μπορούν να αλλάξουν την αναλογία της συγκέντρωσης των ορμονών. Ένα παράδειγμα, για το ότι ορισμένες φορές η αναλογία των ορμονών είναι πιο σημαντική για το τελικό αποτέλεσμα, αποτελεί το αιθυλένιο. Σε χαμηλά επίπεδα, το αιθυλένιο, προάγει την ανάπτυξη αρκετών φυτών, ενώ η ίδια ορμόνη θεωρείται σαν ορμόνη που σχετίζεται με την γήρανση του φυτού (Pieric et al., 2006). Βακτήρια μπορούν να ενεργοποιήσουν την μείωση των

επιπέδων αιθυλενίου οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο σε ανάπτυξη της ρίζας του φυτού και περιορισμό της γήρανσης του φυτού (Glick et al., 2005).

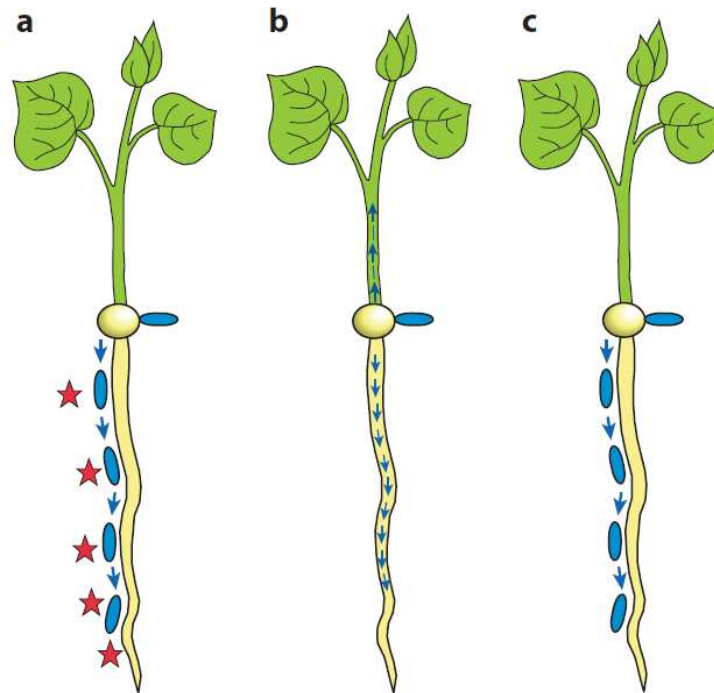
Βακτήρια του γένους *Azospirillum* θεωρούνται επίσης ότι ανήκουν στην κατηγορία των PGPR (Zahir et al., 2004). Μια σημαντική ιδιότητα των βακτηρίων αυτού του γένους είναι ότι παράγει φυτοορμόνες τύπου-αυξίνης οι οποίες επηρεάζουν την μορφολογία της ρίζας και με αυτόν τον τρόπο βελτιώνεται η πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων από το έδαφος. Αυτήν τους η ιδιότητα φαίνεται να είναι πιο σημαντική από την ικανότητά τους να δεσμεύουν, μη συμβιωτικά, ατμοσφαιρικό N₂ (Dobbelaire et al., 1999). Στελέχη αυτού του γένους έχουν βρει εφαρμογή σε συνθήκες αγρού ενώ παρόλο που σε αρκετές μελέτες φαίνεται να υπάρχει όφελος από την εφαρμογή των μικροοργανισμών αυτών, υπάρχουν και μελέτες οι οποίες παρουσιάζουν αντικρουόμενα αποτελέσματα.

B) Μικροοργανισμοί με φυτοπροστατευτικές ιδιότητες

Η χρήση μικροοργανισμών για τον περιορισμό ασθενειών στα φυτά είναι μια φιλική προς το περιβάλλον φυτοπροστατευτική μέθοδος που περιορίζει σε σημαντικό βαθμό την επιβάρυνση του περιβάλλοντος από χημικά συνθετικά γεωργικά φάρμακα. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν μικροοργανισμοί που αποτελούν φυσικούς εχθρούς (παράσιτα ή αρπακτικά) που φυτοπαθογόνου μικροοργανισμού. Ορισμένα μέλη των PGPR έχει αναφερθεί ότι μπορούν να ελέγχουν την ανάπτυξη άλλων παθογόνων μικροοργανισμών, στην ριζόσφαιρα του φυτού (Chin-A-Woeng et al., 2003; De Boer et al., 2003; Persello-Cartieaux et al., 2003). Ο τρόπος με τον οποίο επιτυγχάνεται μπορεί να είναι είτε δρώντας ανταγωνιστικά ως προς τα θρεπτικά στοιχεία και τις θέσεις προσκόλλησης στην ριζόσφαιρα, είτε παράγοντας αντιβιοτικά, συνεχώς ή έπειτα από

επαγωγή, είτε μέσω έμμεσης επαγωγής - ενεργοποίησης των μηχανισμών άμυνας του ίδιου του φυτού (Εικόνα 1) (Lugtenberg and Kamilova, 2009). Σε πολλές περιπτώσεις μικροοργανισμοί μπορεί να χρησιμοποιούν περισσότερους από ένα μηχανισμούς για τον έλεγχο των φυτοπαθογόνων.

Παράδειγμα αποτελεί η εφαρμογή μη-παθογόνων στελεχών του γένους *Streptomyces* για τον έλεγχο ασθένειας σε καρπούς πατάτας (*Solanum tuberosum* L.) η οποία προκαλείται από το βακτηριακό στέλεχος *Streptomyces scabies* (Neeno-Eckwall et al., 1999). Σε αυτήν την περίπτωση, ο έλεγχος της ανάπτυξης του παθογόνου πραγματοποιείται μέσω παραγωγής αντιβιοτικών ή ανταγωνισμού ως προς την πρόσληψη θρεπτικών στην ριζόσφαιρα. Αντίστοιχα, το στέλεχος *Pseudomonas fluorescens* ελέγχει την ανάπτυξη του παθογόνου *Erwinia carotovora* μέσω της παραγωγής του αντιβιοτικού 2,4-διακέτυλοφορογλυκινόλης (2,4-diacetylphoroglucinol DAPG) αλλά και δημιουργώντας συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης σιδήρου (Cronin et al., 1997). Επιπλέον, στελέχη *Pseudomonas* μπορούν να περιορίσουν την ασθένεια που προκαλείται σε πολλά δικοτυλύδωνα φυτά από το βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens* (Khmel et al., 1998). Παρόλα αυτά, η κλασική και πιο αποδοτική μέθοδος για τον έλεγχο της συγκεκριμένης ασθένειας είναι ο εμβολιασμός μη παθογόνου στελέχους του *Agrobacterium tumefaciens* το οποίο ανταγωνίζεται τον αγρίου τύπου πληθυσμό και τελικά εγκαθίσταται στην ριζόσφαιρα (Whipps, 2001). Ένα άλλο παράδειγμα μεικτής δράσης για την αντιμετώπιση του παθογόνου μικροοργανισμού αποτελεί ο μύκητας *Trichoderma*. Τα στελέχη του μύκητα αυτού έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για την καταπολέμηση φυτοπαθογόνων μυκήτων, σε μονοκοτυλήδωνα και δικοτυλήδωνα φυτά, δρώντας ανταγωνιστικά και ενεργοποιώντας παράλληλα την άμυνα του ίδιου του φυτού (Harman et al., 2004;. Shores et al, 2010).



Εικόνα 1. Μηχανισμοί ελέγχου της ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών από μη παθογόνους μικροοργανισμούς (Lugtenberg and Kamilona, 2009). Μικροοργανισμοί μπορούν να ασκήσουν προστατευτική δράση είτε δρώντας ανταγωνιστικά ως προς τα θρεπτικά στοιχεία και τις θέσεις προσκόλλησης στην ριζόσφαιρα παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη παθογόνων(a), είτε παράγοντας αντιβιοτικά (b), είτε μέσω της ενεργοποίησης των μηχανισμών άμυνας του ίδιου του φυτού (c)

Αμοιβαία Συμβιωτικοί μικροοργανισμοί

Η συμβιωτική αζωτοδέσμευση, είναι μια διαδικασία στην οποία συμμετέχουν βακτήρια τα οποία εκφράζουν την νιτρογενάση, το ένζυμο για την μετατροπή του αζώτου σε αμμωνία στα συμβιωτικά φυμάτια της ρίζας διαφόρων φυτών κυρίως ψυχανθών. Η αζωτοδέσμευση αποτελεί βασική διεργασία για τον εμπλουτισμό του εδάφους και των φυτών σε N. Τα βακτήρια τα οποία συμμετέχουν σε αυτήν τη διεργασία και σχηματίζουν συμβιωτικές σχέσεις με φυτά της

οικογένειας των ψυχανθών ανήκουν στα γένη *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* και *Azorhizobium* (Vance CP, 2001).

Μια άλλη ομάδα μικροοργανισμών οι οποίοι δημιουργούν συμβιωτικές σχέσεις με φυτά, είναι οι μυκορριζικοί μύκητες, οι οποίοι σχηματίζουν συμβιωτικές σχέσεις σε περισσότερα από 80% των σήμερα γνωστών φυτών. Οι μυκορριζικοί μύκητες, αποικίζουν επιφανειακά τη ρίζα και αναπτύσσουν ένα εκτενές δίκτυο υφών το οποίο βοηθά την ρίζα των φυτών να αξιοποιήσει μεγαλύτερο όγκο εδάφους βελτιώνοντας έτσι την ικανότητα του να παραλαμβάνει θρεπτικά στοιχεία από το έδαφος (Barea et al., 2005; Smith and Read, 2008). Η ανάπτυξη της μυκόρριζας βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο γονιδίων τόσο του φυτού όσο και του μύκητα, οι οποίοι αλληλεπιδρούν συντονισμένα για να δημιουργηθεί αποτελεσματική συμβίωση μεταξύ τους. Οι μυκορριζικοί μύκητες λαμβάνουν C από το φυτό, ενώ αντίθετα οι μύκητες βοηθούν το φυτό στην πρόσληψη θρεπτικών στοιχείων (P, Zn, Cu) που παρουσιάζουν χαμηλή διαθεσιμότητα στο έδαφος υπό άλλες συνθήκες.

Είδη αλληλεπιδράσεων στην ριζόσφαιρα

Ανάμεσα στους διάφορους μικροβιακούς πληθυσμούς της ριζόσφαιρας, λαμβάνουν χώρα μια σειρά από αλληλεπιδράσεις, οι οποίες σε ένα υγιές φυτό, ευνοούν την ανάπτυξη. Τρεις είναι οι κύριες κατηγορίες αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μικροοργανισμών της ριζόσφαιρας:

1. Μεταξύ PGPR-*Rhizobium*, για αποδοτικότερη αζωτοδέσμευση
2. Αλληλεπιδράσεις ανταγωνισμού για τον έλεγχο των παθογόνων

3. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ μικροοργανισμών της ριζόσφαιρας και δενδρόμορφων μυκορριζικών μυκήτων (ΔΜΜ) για να δημιουργηθεί λειτουργική ριζόσφαιρα

1. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ PGPR και *Rhizobium* οδηγώντας σε αποτελεσματικότερη αζωτοδέσμευση

Καθώς μοιράζονται το ίδιο μικροπεριβάλλον, συμβιωτικά αζωτοδεσμευτικά βακτήρια του γένους *Rhizobium* και PGPR θεωρητικά θα πρέπει να αλληλεπιδρούν. Έχει αποδειχθεί ότι επιλεγμένα PGPR μπορούν να βοηθήσουν στην δημιουργία φυματίων και την αζωτοδέσμευση σε ψυχανθή φυτά ενώ μελέτες που πραγματοποιήθηκαν και σε επίπεδο αγρού ενισχύουν αυτήν την άποψη (Lucas-García et al., 2007). Ο μηχανισμός με τον οποίο τα PGPR ευνοούν την δημιουργία φυματίων, φαίνεται να είναι η παραγωγή φυτοορμονών. Για παράδειγμα, ορισμένα στελέχη του γένους *Pseudomonas*, βρέθηκε ότι αυξάνουν τον αριθμό των φυματίων και την συνολική μάζα του φυτού, έπειτα από εμβολιασμό μαζί με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, όπως παρατηρήθηκε σε *in vitro* πειράματα, ενώ ενδιαφέρον θα παρουσίαζε αν ο σύγχρονος εμβολιασμός με στελέχη των γενών *Pseudomonas* και *Rhizobium* για την βελτίωση της αζωτοδέσμευσης, θα μπορούσε να βρει ευρεία εφαρμογή (Rosas et al., 2006).

Μια άλλη περίπτωση στην οποία παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ PGPR-*Rhizobium*, είναι σε εδάφη ρυπασμένα με Cd, όπου τα PGPR οδήγησαν σε αύξηση του αριθμού των φυματίων σε φυτά τριφυλλίου (Vivas et al., 2005). Η κύρια εξήγηση, γι' αυτό το αποτέλεσμα, φαίνεται να είναι ότι τα PGPR συσσωρεύσαν το Cd, οδηγώντας σε μείωση της συγκέντρωσης του μετάλλου και κατά συνέπεια και της πρόσληψης από το φυτό και τα *Rhizobia*, μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο την τοξικότητα και επιτρέποντας την δημιουργία φυματίων. Επιπλέον,

παρατηρήθηκε και αυξημένη παραγωγή αυξίνης γύρω από τα εμβολιασμένα με PGPR τμήματα της ρίζας η οποία θα μπορούσε επίσης να συμμετέχει στην δημιουργία των φυματίων.

2. Αλληλεπιδράσεις ανταγωνισμού για τον έλεγχο των παθογόνων

Έχουν χρησιμοποιηθεί βακτήρια σε σπόρους και ρίζες για τον έλεγχο βακτηριακών μολύνσεων. Διάφορα προϊόντα μεταβολισμού που παράγονται *in vitro* από ορισμένα βακτηριακά στελέχη, παρουσιάζουν αντιμυκητιακή δράση, ενώ για ορισμένα από αυτά έχει δειχθεί ότι παράγονται και *in vivo* (Whipps JM, 2001). Επιπλέον, ορισμένα βακτήρια παράγουν μεγάλες ποσότητες σιδηροφόρων μορίων στην ριζόσφαιρα και αναστέλλουν την ανάπτυξη παθογόνων μυκήτων. Έπειτα από την σύνδεση με ένα άτομο Fe^{3+} , το σύμπλεγμα σιδηροφόρο- Fe^{3+} συνδέεται στον αντίστοιχο υποδοχέα στην κυτταρική μεμβράνη του βακτηρίου μεταφέροντας το άτομο του σιδήρου στο κυτταρόπλασμα σαν Fe^{2+} , μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο τη συγκέντρωση του διαλυτού σιδήρου στην ριζόσφαιρα (Lugtenberg and Kamilova, 2009). Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.

Παλαιότερα, είχε γίνει η υπόθεση ότι θα πρέπει να υπάρχει ανταγωνισμός για τα θρεπτικά συστατικά της ρίζας καθώς και για τις θέσεις προσκόλλησης στις αντίστοιχες επιφάνειες της ριζόσφαιρας και ότι με αυτόν τον τρόπο θα επιλέγονταν οι μικροοργανισμοί με την μεγαλύτερη ανταγωνιστικότητα, χωρίς όμως να έχει πλήρως αποδειχθεί κάτι τέτοιο. Εκτός από τον ανταγωνισμό μεταξύ των πληθυσμών, έχει παρατηρηθεί ότι κυτταρολυτικά ένζυμα προερχόμενα από βακτηριακούς πληθυσμούς της ριζόσφαιρας μπορεί να αποδομήσουν το κυτταρικό τοίχωμα μυκήτων προστατεύοντας με αυτόν τον τρόπο το φυτό (Whipps JM, 2001). Αυτός ο μηχανισμός

μπορεί να χρησιμοποιηθεί παράλληλα με την έκκριση αντιβιοτικών έναντι των κυττάρων του μύκητα.

Ένα άλλο παράδειγμα καταπολέμησης φυτοπαθογόνου μύκητα από βακτήρια αποτελεί ο μύκητας *Fusarium oxysporum* και η καταπολέμηση του από το βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas fluorescens* WCS365. Το φουζαρικό οξύ (fusaric acid) που ελευθερώνεται από τον μύκητα *Fusarium oxysporum* δρα σαν χημειοτακτικός παράγοντας για το βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas fluorescens* WCS365 (Lugtenberg and Kamilova, 2009). Κατά τον έλεγχο της ασθένειας που προκαλείται από το *Fusarium oxysporum*, το στέλεχος *P. fluorescens* WCS365 προσβάλλει την υφή του μύκητα σχηματίζοντας μικροαποικίες μέσα στην υφή. Αυτός ο αποικισμός φαίνεται να καθιστά τον μύκητα λιγότερο ικανό να προσβάλει το φυτό. Όταν επώασθηκαν σπόρια του μύκητα *Fusarium oxysporum* με εκκρίσεις της ρίζας του φυτού της τομάτας, παρουσία του βακτηριακού στελέχους *Pseudomonas fluorescens* WCS365 αναστέλλει η εκβλάστησή των σπορίων του μύκητα. Μετά την ανάπτυξη της υφής του *Fusarium oxysporum*, σχηματίστηκαν σπόρια τα οποία μπορούν να διασπείρουν τον μύκητα στο περιβάλλον. Η παρουσία του *P. fluorescens* WCS365, οδηγεί σε μείωση της δημιουργίας των σπορίων εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο την διασπορά του *Fusarium oxysporum*. Συμπερασματικά, το βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas fluorescens* WCS365 αναστέλλει την δράση, την επιβίωση και διασπορά του *Fusarium oxysporum* με το να αποικίζει στις υφές του μύκητα και να αναστέλλει τη δημιουργία νέων σπορίων.

Για τον έλεγχο της ανάπτυξης των μικροοργανισμών, μπορούν να ενεργοποιηθούν και οι μηχανισμοί άμυνας του φυτού. Αλληλεπίδραση μεταξύ ορισμένων βακτηρίων και της ρίζας του

φυτού, μπορεί να οδηγήσει σε ανθεκτικότητα του φυτού έναντι παθογόνων βακτηρίων, μυκήτων και ιών (Lugtenberg and Kamilova, 2009). Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται επαγόμενη διασυστημική ανθεκτικότητα (induced systemic resistance ISR).

3. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ ΔΜΜ και πληθυσμών της ριζόσφαιρας

Η ανάπτυξη δενδρόμορφων μυκορριζικών μυκήτων (ΔΜΜ) στην επιφάνεια της ρίζας του φυτού είναι γνωστό ότι προκαλεί σημαντικές μεταβολές στη φυσιολογία του φυτού και στην μικροβιακή σύσταση της ριζόσφαιρας τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά. Έχει δειχθεί ότι η ανάπτυξη δενδρόμορφων μυκορριζικών μυκήτων αυξάνει τον σχηματισμό φυματίων ενώ βελτιώνει την ικανότητα δέσμευσης αζώτου από τα συμβιωτικά αζωτοδεσμευτικά βακτήρια. Ο τρόπος με τον οποίο επιτυγχάνεται αυτή η μεταβολή κατά κανόνα είναι μέσω της γενικότερης ενεργοποίησης της ανάπτυξης του φυτού.

Η κύρια μεταβολή που προκαλεί στο φυτό η συμβίωση με ΔΜΜ είναι η βελτιωμένη ικανότητα πρόσληψης φωσφορικών από το φυτό. Επειδή τα φωσφορικά που ελευθερώνονται από την δράση των φώσφορο-διαλυτικών βακτηρίων (PSB) μπορεί να μην φτάσουν στη ρίζα του φυτού λόγω της περιορισμένης διάχυσης τους, προτάθηκε ότι ο διαλυτοποιημένος P προσλαμβάνεται από τις μυκορριζικές υφές και μεταφέρεται στη ρίζα του φυτού. Με αυτόν τον τρόπο ΔΜΜ και PSB βακτήρια συνεργάζονται για την παροχή P στο φυτό (Barea et al., 2005).

Εκτός των βακτηρίων επιλεγμένοι μύκητες έχει βρεθεί ότι μπορούν να ασκήσουν προστατευτική δράση στο φυτό, εμποδίζοντας την ανάπτυξη φυτοπαθογόνων. Έτσι μύκητες του γένους *Trichoderma* έχει βρεθεί ότι μπορούν να περιορίσουν την προσβολή φυτών από σοβαρά εδαφογενή φυτοπαθογόνα του γένους *Pythium*, *Fusarium* και *Rhizoctonia* (Whipps JM, 2001). Ο

ανταγωνισμός για την πρόσληψη θρεπτικών όπως άνθρακα, αζώτου και σιδήρου είναι ένας μηχανισμός με το οποίο τα μη παθογόνα στελέχη του γένους *Fusarium* και *Trichoderma* προστατεύουν τα φυτά από εδαφογενή φυτοπαθογόνα του γένους *Fusarium*. Επίσης, όπως περιγράφηκε και για τους βακτηριακούς πληθυσμούς, ένας μεγάλος αριθμός μυκήτων, οι οποίοι περιγράφηκαν ότι ασκούν ανασταλτική επίδραση σε παθογόνους μύκητες είτε παράγοντας αντιβιοτικά είτε ανταγωνίζοντας τους παθογόνους για θρεπτικά στοιχεία και θέσεις στην ριζόσφαιρα, μπορούν να ασκήσουν ανασταλτική δράση ενεργοποιώντας τους μηχανισμούς άμυνας του ίδιου του φυτού. Ακόμη υπάρχουν μύκητες οι οποίοι μπορούν να παρασιτήσουν σε σπόρια, υφές ή άλλες δομές μυκήτων και αυτή τους η ιδιότητα οδηγεί σε περιορισμό της ανάπτυξης φυτοπαθογόνων μυκήτων.

Επίδραση των ριζικών εκκρίσεων στην μικροβιακή κοινότητα της ριζόσφαιρας

Οι οργανικές ενώσεις που ελευθερώνονται από τη ρίζα του φυτού περιλαμβάνουν αμινοξέα, λιπαρά οξέα, νουκλεοτίδια, άλλα οργανικά οξέα, φαινόλες, σάκχαρα, βιταμίνες, αυξητικούς παράγοντες (Lugtenberg and Kamilova, 2009). Οι ριζικές εκκρίσεις μεταβάλλονται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, το φως, η συγκέντρωση του CO₂ στην ατμόσφαιρα, από βιολογικές παραμέτρους όπως το είδος του φυτού ή το στάδιο ανάπτυξής του, αλλά και αλληλεπιδράσεις με μικροοργανισμούς της ριζόσφαιρας (Baudoin et al., 2003).

Το είδος των εκκρίσεων του φυτού μπορεί να επηρεάζει την σύσταση της μικροβιακής κοινότητας της ριζόσφαιρας. Τα περισσότερα δεδομένα αναφορικά με την σύσταση των εκκρίσεων της ρίζας έχουν μελετηθεί σε φυτά τομάτας. Σε αυτήν την περίπτωση οι κύριες μορφές άνθρακα που ελευθερώνονται στην ριζόσφαιρα των φυτών είναι οργανικά οξέα και

ακολουθούν σάκχαρα και αμινοξέα (Kamilova et al, 2006a; Kamilova et al, 2006b, Simmons et al., 1997). Οι εκκρίσεις της ρίζας μπορούν να επηρεάσουν την συμπεριφορά παθογόνων ή μη μυκήτων. Οι εκκρίσεις της ρίζας του φυτού της τομάτας, καθώς και δύο από τα βασικά συστατικά τους, κιτρικό και γλυκόζη, προωθούν την βλάστηση των σπορίων του παθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp.*radicis-lycopersici* (FORL) (Kamilova et al., 2008).

Μέθοδοι προσδιορισμού της σύστασης της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους

Οι μέθοδοι αξιολόγησης της ποικιλότητας των μικροοργανισμών στο έδαφος με την καλλιέργεια τους σε θρεπτικά μέσα δεν παρέχουν επαρκή εικόνα της ποικιλότητας. Πλέον είναι γνωστό ότι μόνο 1-5% του συνόλου των μικροοργανισμών που υπάρχουν στο έδαφος μπορούν να καλλιεργηθούν στα ως σήμερα γνωστά θρεπτικά μέσα. Αντίθετα, η χρήση μοριακών (PCR, βιβλιοθήκες κλώνων, αλληλούχιση) ή βιοχημικών τεχνικών που δεν εξαρτώνται από την καλλιέργεια σε θρεπτικά μέσα παρέχει μια πιο ρεαλιστική απεικόνιση της ποικιλότητας των μικροοργανισμών στο έδαφος και γενικότερα σε περιβαλλοντικά υποστρώματα.

Στις μοριακές τεχνικές, συνήθως πραγματοποιείται ενίσχυση PCR συντηρημένων γονιδίων που παρέχουν φυλογενετικές πληροφορίες. Ο πιο κοινός γενετικός τύπος για τα βακτήρια είναι το γονίδιο του 16S rRNA. Μετά από την ενίσχυση της επιθυμητής αλληλουχίας, το προϊόν της PCR μπορεί, είτε να κλωνοποιηθεί και στην συνέχεια να ακολουθήσει πέψη με περιοριστικά ένζυμα ή αλληλούχιση, είτε να χρησιμοποιηθεί απευθείας για την μελέτη της κοινότητας των βακτηρίων με κατάλληλες μεθόδους μοριακής αποτύπωσης.

Στην περίπτωση της κλωνοποίησης δημιουργούνται βιβλιοθήκες κλώνων για τον κάθε βακτηριακό πληθυσμό, καθιστώντας έτσι ικανή την μελέτη του κάθε πληθυσμού χωριστά.

Αλληλούχιση του κλωνοποιημένου τμήματος του γονιδίου που ενισχύθηκε, επιτρέπει την ταυτοποίηση πληθυσμών οι οποίοι είτε είναι άγνωστοι, είτε δεν καλλιεργούνται. Μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι απαιτείται αρκετός χρόνος καθώς πρέπει να απομονωθεί ένας ικανοποιητικός αριθμός κλώνων. Το κόστος είναι αυξημένο αν χρησιμοποιηθεί συσκευή αλληλούχισης ενώ ισχύουν οι περιορισμοί της PCR στην επιλογή των εκκινητών και των συνθηκών της αντίδρασης.

Εκτός από την κλωνοποίηση, το προϊόν της PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας για την μελέτη της βακτηριακής κοινότητας. Ο διαχωρισμός των διαφόρων αλληλουχιών μπορεί να γίνει είτε με βάση το μέγεθος των τμημάτων που προκύπτουν (ARDRA, TRFLP, RISA), είτε με βάση την αλληλουχία των τμημάτων αυτών (DGGE, TGGE, SSCP) (Εικόνα 2). Το αποτέλεσμα είναι ένα μοριακό αποτύπωμα, το οποίο αποτελεί το σύνολο των μικροοργανισμών που συμμετέχουν στην μικροβιακή κοινότητα του δείγματος. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων μπορεί να γίνει πολύπλοκη καθώς μία ζώνη μπορεί να προέρχεται από διαφορετικούς πληθυσμούς ή από το γεγονός ότι ο κάθε πληθυσμός μπορεί να δημιουργεί περισσότερες από μια ζώνες, όπως φάνηκε σε μελέτες όπου βακτήρια του ίδιου είδους παρουσίαζαν διαφορετικές αλληλουχίες rRNA και διαφορετικά βακτήρια παρουσίαζαν παρόμοια μήκη τμημάτων rDNA (Cole et al., 1994; Nubel et al., 1996). Συνεπώς, αυτού του είδους οι προσεγγίσεις είναι κατάλληλες για την σύγκριση βακτηριακών κοινοτήτων και επάνω σε αυτές τις αρχές έχει αναπτυχθεί ένα πλήθος μεθόδων.

Μία από τις μεθόδους στις οποίες ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το μήκος των τμημάτων που προκύπτουν είναι η ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis). Αρχικά πραγματοποιείται ενίσχυση με PCR ενός τμήματος του 16S rDNA, ακολουθεί πέψη με ένζυμο

περιορισμού και ηλεκτροφόρηση των τμημάτων περιορισμού σε πήκτωμα αγαρόζης ή ακρυλαμίδης. Γενικά είναι μια απλή μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται για την μελέτη αλλαγών στην σύσταση της βακτηριακής κοινότητας περιβαλλοντικών δειγμάτων (Ciccilo et al., 2002). Ο κύριος περιορισμός είναι η επιλογή των ενζύμων περιορισμού η οποία είναι σημαντική για τον ικανοποιητικό διαχωρισμό των πληθυσμών, ενώ το πλήθος των πληροφοριών που προκύπτουν δυσχεραίνει την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων προτύπων.

Για να μειωθεί το πλήθος της πληροφορίας που λαμβάνεται από την ARDRA, μπορούν να χρησιμοποιηθούν εκκινητικά μόρια συνδεδεμένα με κάποιο φθοριόχρωμα, με αποτέλεσμα να μελετώνται μόνο τα τελικά τμήματα που προκύπτουν έπειτα από την πέψη με τα ένζυμα περιορισμού, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την ανάλυση πολυπληθών κοινοτήτων καθώς και παρέχοντας πληροφορίες για την ποικιλομορφία καθώς κάθε θραύσμα αντιπροσωπεύει μία ταξινομική μονάδα (Ikeda et al., 2006). Επιπλέον, η μέθοδος μπορεί να αυτοματοποιηθεί χρησιμοποιώντας συσκευή αυτόματης αλληλούχισης, επιτρέποντας την ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου έχει επιβεβαιωθεί, ενώ επίσης έχει χρησιμοποιηθεί για την μελέτη της ριζόσφαιρας σε περιβαλλοντικά δείγματα (Osborn et al., 2000; Tonin et al., 2001). Μια σημαντική διαφορά της μεθόδου σε σχέση με τις μεθόδους DGGE/SSCP είναι ότι από το ίδιο προϊόν της PCR μπορούν να προκύψουν διαφορετικά πρότυπα ανάλογα με τα ένζυμα περιορισμού που θα χρησιμοποιηθούν (Dunbar et al., 2000).

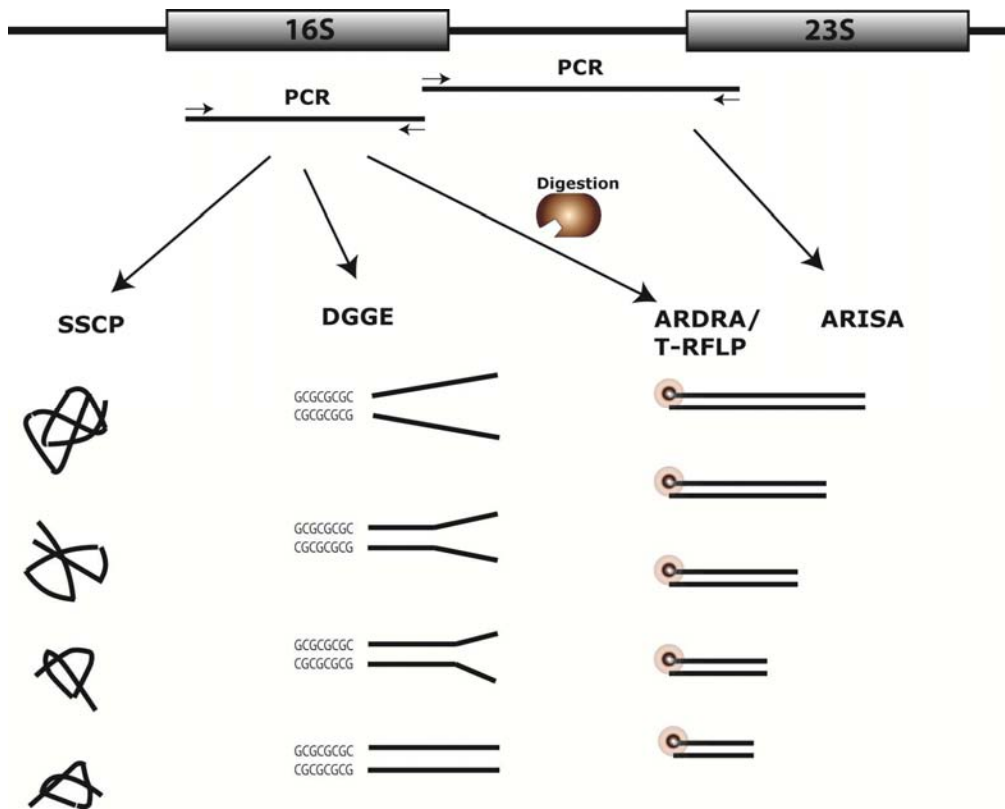
Εκτός από το γονίδιο του 16S rRNA, η περιοχή ανάμεσα από τα γονίδια 16S και 23S έχει χρησιμοποιηθεί για την μελέτη της ποικιλότητας περιβαλλοντικών δειγμάτων. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται ονομάζεται RISA (ribosomal intergenic spacer analysis), στην οποία αρχικά

ενισχύεται με PCR η περιοχή ανάμεσα στο 16S και 23S rDNA (intergenic spacer region, IGS) και στη συνέχεια ηλεκτροφορεύεται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιώντας αποδιατακτικές συνθήκες. Αυτή η περιοχή κωδικοποιεί γονίδια tRNA στους πρωκαριώτες και είναι χρήσιμη για την διαφοροποίηση συγγενικών ειδών λόγω της ετερογένειας του μήκους της αλληλουχίας αυτής (Fisher and Triplett, 1999). Οι πολυμορφισμοί μπορεί να μετρηθούν είτε σε πήκτωμα ακρυλαμίδης με χρώση νιτρικού αργύρου, είτε μπορούν να χρησιμοποιηθούν σημασμένοι εκκινητές και η ανίχνευση να γίνει σε συσκευή αυτόματης αλληλούχισης (ARISA, Automated-RISA). Και οι δύο παραλλαγές της μεθόδου χαρακτηρίζονται από υψηλή επαναληψιμότητα κατά την μελέτη βακτηριακών κοινοτήτων, ενώ η ARISA παρέχει επιπλέον αυξημένη ευαισθησία ενώ μειώνει και τον απαιτούμενο χρόνο. Όπως συμβαίνει και σε άλλες μεθόδους (DGGE, SSCP), οι επιθυμητές ζώνες, μπορούν να απομονωθούν από το πήκτωμα και να αλληλουχηθούν.

Η μέθοδος DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) που αρχικά αναπτύχθηκε για την μελέτη σημειακών μεταλλάξεων σε αλληλουχίες, χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη για μικροβιακής ποικιλότητας (Myzer et al., 1993). Απομονωμένο DNA ενισχύθηκε για μια περιοχή του γονιδίου του 16S rRNA. Το 5' άκρο του πρόσθιου εκκινητή είναι συνδεδεμένο με μια ουρά πλούσια από επαναλήψεις της αλληλουχίας GC, μήκους περίπου 40 νουκλεοτιδίων, έτσι ώστε ένα τμήμα του DNA να παραμένει δίκλωνο κατά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης με διαβάθμιση συγκέντρωσης αποδιατακτικών παραγόντων (φορμαμίδη και ουρία), ενώ θεωρητικά η μέθοδος αυτή μπορεί να διαχωρίσει δύο μόρια DNA τα οποία διαφέρουν σε μία μόνο βάση. Μια παραλλαγή της μεθόδου αποτελεί το TGGE (temperature gradient gel electrophoresis) με τη διαφορά ότι, σε αυτήν την περίπτωση χρησιμοποιείται θερμότητα για την

αποδιάταξη αντί για χημικά αποδιατακτικά. Η μέθοδος DGGE έχει χρησιμοποιηθεί για την μελέτη της ποικιλομορφίας τόσο σε βακτηριακούς όσο και σε πληθυσμούς μυκήτων της ριζόσφαιρας, ενώ περιορισμός της μεθόδου αποτελεί ο χρόνος που απαιτείται για τον χειρισμό των δειγμάτων ενώ παρατηρούνται, δυσκολίες στον σχεδιασμό των εκκινητικών μορίων λόγω του περιορισμού στο μήκος της αλληλουχίας που μπορεί να αναλυθεί. Επίσης, τμήματα DNA με διαφορετική αλληλουχία μπορεί και να έχουν ίδια κινητικότητα, ενώ η δημιουργία ετεροδιμερών έχει αναφερθεί ότι μπορεί να αυξήσει των αριθμό των ζωνών. Γι' αυτόν τον λόγο, η ανάλυση των αποτελεσμάτων μιας ανάλυσης DGGE χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή ενώ μια συγκεκριμένη ζώνη δεν αντιπροσωπεύει απαραίτητα ένα συγκεκριμένο είδος (Ikeda et al., 2006).

Μια ακόμη μεθοδολογία, η οποία βασίζεται στον διαχωρισμό με ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA με διαφορετική αλληλουχία είναι το SSCP (single strand conformation polymorphism). Όπως και με το DGGE, η συγκεκριμένη μεθοδολογία αναπτύχθηκε για να αναγνωρίζει πολυμορφισμούς ή σημειακές μεταλλάξεις σε μία αλληλουχία DNA (Orita et al., 1989). Τα διαφορετικά τμήματα μονόκλωνου DNA ξεχωρίζουν μεταξύ τους με βάση τη διαφορά στην κινητικότητά τους λόγω των δευτεροταγών δομών που σχηματίζουν (Lee et al., 1996). Η μέθοδος του SSCP παρουσιάζει τα ίδια πλεονεκτήματα και περιορισμούς με αυτήν του DGGE, ενώ δεν χρειάζεται GC ουρά στον πρόσθιο εκκινητή ή την δημιουργία πηκτής με βαθμίδωση συγκέντρωσης αποδιατακτικών παραγόντων. Με αυτόν τον τρόπο, οι απαιτήσεις σε εξοπλισμό και η διαδικασία σχεδιασμού των εκκινητικών μορίων είναι λιγότερο προβληματική σε σχέση με τα αντίστοιχα της μεθοδολογίας DGGE.



Εικόνα 2. Κύριες μοριακές τεχνικές για την μελέτη της βιοποικιλότητας του εδάφους

Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη των μεταβολών στις κοινότητες επιλεγμένων βακτηριακών ομάδων (*Pseudomonas* και *α-proteobacteria*) που κυριαρχούν στη ριζόσφαιρα, έπειτα από εμβολιασμό με το φυτοπαθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum f.sp. radicis lycopersici* (FORL) ή/και τον μη παθογόνο και ενδοφυτικό μύκητα *Fusarium solani* (Fs-K). Η ερευνητική υπόθεση στην οποία στηρίζεται η παρούσα εργασία είναι ότι η τριμερής αλληλεπίδραση μεταξύ φυτοπαθογόνου – μη παθογόνου - φυτού είναι πιθανόν να οδηγεί σε σημαντικές μεταβολές στην μικροβιακή κοινότητα της ριζόσφαιρας με τελικό σκοπό την βελτίωση της άμυνας του φυτού κατά του φυτοπαθογόνου.

Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici

Ο μύκητας *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici* (FORL) προκαλεί σήψη της ρίζας στην τομάτα, μια ασθένεια η οποία παρουσιάζει ιδιαίτερο οικονομικό ενδιαφέρον καθώς οδηγεί σε σημαντική μείωση της παραγωγής. Η καταπολέμηση του εδαφογενούς παθογόνου μύκητα FORL είναι ιδιαίτερα δύσκολη. Κατά την δεύτερη ημέρα μετά την μόλυνση αρχίζουν να παρατηρούνται υφές στη ρίζα του φυτού χωρίς όμως παθολογικά συμπτώματα σήψης. Από την τρίτη ημέρα και μετά αρχίζουν να εμφανίζονται συμπτώματα της μόλυνσης. Οι θέσεις στις οποίες εγκαθίσταται ο μύκητας είναι οι θέσεις σύνδεσης μεταξύ επιδερμικών κυττάρων όπου αναπτύσσεται ένα δίκτυο υφών οι οποίες αναπτύσσονται και καλύπτουν όλη την περιοχή του συνδέσμου (Lagorodi et al., 2002). Εκτενής αποικισμός της ρίζας από τον συγκεκριμένο μύκητα προκαλεί σημαντική καταστροφή στην ρίζα, άμεσο μαρασμό των φύλων και θάνατο του φυτού.

Η ανάπτυξη του μύκητα FORL στην ριζόσφαιρα της τομάτας φαίνεται να περιορίζεται από βακτήρια της ριζόσφαιρας όπως είναι τα βακτηριακά στελέχη *Pseudomonas fluorescens* WCS365 και *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 (Bolwerk et al., 2003). Το βακτήριο *P. fluorescens* WCS365 προστατεύει το φυτό από το FORL μέσω διαφόρων μηχανισμών όπως ενεργοποίηση της ISR του φυτού, άμεσου παρασιτισμού της υφής του μύκητα FORL και ανταγωνισμός για θέσεις ανάπτυξης και θρεπτικά,. Αντίθετα, το στέλεχος *P. chlororaphis* PCR 1391 φαίνεται ότι καταπολεμά τον FORL μέσω ανταγωνισμού για θέσεις ανάπτυξης και θρεπτικά, μέσω παραγωγής βιοκτόνων μεταβολιτών (Pyocyanin) και πιθανόν μέσω άμεσου παρασιτισμού της υφής του μύκητα FORL.

Εκτός των βακτηρίων και μη παθογόνα στελέχη μυκήτων έχουν την ικανότητα να περιορίζουν την ανάπτυξη και να καταπολεμούν άμεσα το FORL. Έτσι, το μη παθογόνο στέλεχος *Fusarium oxysporum* Fo47, έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη του FORL σε φυτά τομάτας (Bolwerk et al., 2005). Ο τρόπος με τον οποίο το μη παθογόνο στέλεχος παρεμποδίζει την ανάπτυξη της ασθένειας δεν φαίνεται να είναι μέσω άμεσου ανταγωνισμού με το παθογόνο στέλεχος. Αντίθετα, φαίνεται ότι οι εκκρίσεις τις ρίζας ευνοούν την εκβλάστηση των σπορίων του μη παθογόνου μύκητα. Με αυτόν τον τρόπο, περισσότερες υφές του μύκητα Fo47 αναπτύσσονται και ανταγωνίζονται για την πρόσληψη θρεπτικών από τις εκκρίσεις της ρίζας, τους παθογόνους μύκητες FORL.

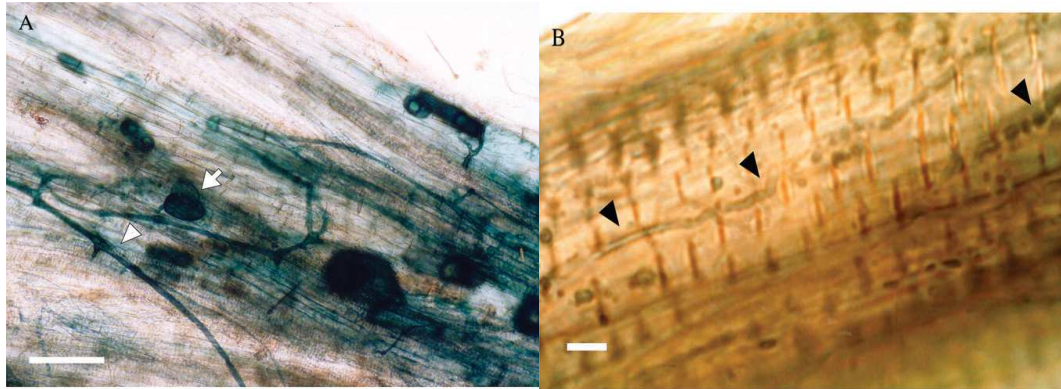
***Fusarium solani* στέλεχος K**

Το στέλεχος *Fusarium solani* K (FsK) απομονώθηκε από κομπόστα στέμφυλων και στερεών αποβλήτων ελαιουργίας που είχε επισχετική δράση κατά του FORL. Το στέλεχος FsK έχει την

ικανότητα να περιορίζει την ανάπτυξη του FORL και κατά συνέπεια την προσβολή φυτών τομάτας από το συγκεκριμένο φυτοπαθογόνο (Kavroulakis et al., 2005). Ο μύκητας FsK που απομονώθηκε παρουσίαζε επισχετική δράση κατά του φυτοπαθογόνου FORL (Kavroulakis et al., 2005).

Ο μύκητας FsK είναι ικανός να διεισδύει στις ρίζες του φυτού και να αναπτύσσεται στο φλοιό της ρίζας 15 ημέρες μετά τον εμβολιασμό του όπως και να εισχωρεί στους ηθμαγγειώδεις δεσμίδες του φυτού διαβιώνοντας ενδοφυτικά (Εικόνα 3). Η ικανότητα του FsK να αποικίζει τις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες του φυτού ωστόσο, είναι κάτι που χαρακτηρίζει τους μύκητες που αποτελούν παθογόνα των ριζών και για το λόγο αυτό, η δυνατότητα ενός ωφέλιμου στελέχους να αναπτύσσεται ενδοφυτικά χωρίς να προκαλεί συμπτώματα ασθένειας στο φυτό δηλώνει μια ασυνήθιστη αλληλεπίδραση μεταξύ μύκητα και φυτού.

Ο μηχανισμός με τον οποίο περιορίζεται η εξάπλωση του παθογόνου FORL, δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Πιθανόν ο μύκητας FsK να αποτελεί ένα στέλεχος το οποίο ανταγωνίζεται τον παθογόνο FORL ως προς τα θρεπτικά και τις θέσεις ανάπτυξης. Εναλλακτικά έχει προταθεί ότι στον μηχανισμό δράσης του FsK έναντι του FORL, φαίνεται να συμμετέχει το αιθυλένιο, καθώς σε γενετικά τροποποιημένα φυτά, τα οποία δεν ανταποκρίνονται στο αιθυλένιο, ο FsK δεν φαίνεται να ασκεί προστατευτική δράση ενάντια του FORL.



Εικόνα 3. Αποικισμός ριζικού ιστού τομάτας από το μύκητα *Fs-K* 15 ημέρες μετά τον εμβολιασμό του. **Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.** Διακρίνεται ο σχηματισμός κυκλικών σωματίων (A) και ο αποικισμός της ηθμαγειώδους δεσμίδας (B).

***Pseudomonas*, - α -Πρωτεοβακτήρια**

Με βάση τη φυλογενετική ανάλυση της αλληλουχίας του ριβοσωμικού RNA, οι διάφοροι βακτηριακοί πληθυσμοί μπορούν να ταξινομηθούν μεταξύ τους. Βακτήρια του γένους *Pseudomonas* καθώς και βακτήρια που ανήκουν στην κλάση των α -πρωτεοβακτηρίων (*Acetovacter*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Rhodobacter*, *Rhizobium* κ.α.) αποτελούν σημαντικά μέλη της βακτηριακής κοινότητας στην ριζόσφαιρα των φυτών και αρκετά στελέχη των παραπάνω γενών ή ομάδων βακτηρίων έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με το φυτό προοθώντας την ανάπτυξη του με διάφορους τρόπους, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (πρόσληψη θρεπτικών συστατικών, έλεγχος ανάπτυξης παθογόνων) (Stackebrandt et al., 1988). Με βάση τις ομοιότητες που παρατηρούνται στην κάθε ταξινομική ομάδα, είναι δυνατόν να σχεδιασθούν εκκινητικά μόρια ειδικά για τις ομάδες αυτές. Στην παρούσα εργασία, διαφορετικά εκκινητικά μόρια, χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση και ανίχνευση πληθυσμών του γένους των *Pseudomonas* και της κλάσης των α -πρωτεοβακτηρίων.

Υλικά και μέθοδοι

Μικροοργανισμοί και προετοιμασία εμβολίου

Για την εκτέλεση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε ένα μη παθογόνο ενδοφυτικό στέλεχος, *Fusarium solani* (FsK), καθώς και ο γνωστός παθογόνος μύκητας της τομάτας *Fusarium oxysporum* fsp. *radicis-lycopersici* (FoRL) Jarvis & Shoemaker (strain CBS 101587, Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands) (Kavroulakis et al., 2005).^{Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.} Τα στελέχη του παθογόνου και του μη παθογόνου μύκητα αναπτύχθηκαν, σε θρεπτικό μέσο Potato Dextrose Broth (PDB), στους 25°C για 5 μέρες στο σκοτάδι. Τα κονίδια ανακτήθηκαν μετά από φυγοκέντρηση στις 4000 rpm. Μετά από την αφαίρεση των μυκηλιακών θραυσμάτων ύστερα από διήθηση, ο αριθμός των κονιδίων μετρήθηκε χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής και επαναδιαλύθηκαν σε κατάλληλο όγκο 0.85% NaCl προκειμένου να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση εμβολίου.

Πειραματική διαδικασία

Σχεδιάστηκε ένα πείραμα ικανό να καθορίσει τις επιδράσεις ενός παθογόνου και ενός μη παθογόνου μύκητα *Fusarium* στη δομή της μικροβιακής κοινότητας στη ριζόσφαιρα της τομάτας. Αρχικά συλλέχθηκε ποσότητα εδάφους από τη Βούλα Αθήνας το Σεπτέμβριο του 2007, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα μας. Το έδαφος κοσκινίστηκε σε κόσκινο διατομής 2mm και ομογενοποιήθηκε. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε 48 πλαστικά φυτοδοχεία των 200 cm³. Σε κάθε φυτοδοχείο φυτεύθηκαν 4 προβλαστημένα σπόρια τομάτας (ποικιλία ACE55). Οι σπόροι τομάτας είχαν προηγουμένως αποστειρωθεί επιφανειακά με πλύσιμο σε διάλυμα 2.5% NaCl. Τα φυτά τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών. Επτά μέρες μετά την εκβλάστηση

των φυτών, τα φυτοδοχεία διαχωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες των 12. Οι δύο πρώτες ομάδες φυτοδοχείων εμβολιάστηκαν με υδατικά διαλύματα που περιείχαν σπόρια των μυκήτων FsK και FORL ενώ η τρίτη ομάδα εμβολιάστηκε ταυτόχρονα και με τους δύο μύκητες (FsK+FORL). Η τελική πυκνότητα εμβολίου των μυκήτων στο έδαφος ήταν 10^6 κονίδια μύκητα g^{-1} εδάφους. Το τέταρτο σετ φυτοδοχείων έλαβε την ίδια ποσότητα νερού χωρίς κονίδια μυκήτων και χρησιμοποιήθηκαν ως μη εμβολιασμένοι μάρτυρες. Όλα τα φυτοδοχεία τοποθετήθηκαν σε θάλαμμο ανάπτυξης φυτών σε σταθερή θερμοκρασία $25^{\circ}C$ και φωτοπερίοδο 16 ώρες φως, 8 ώρες σκοτάδι. Τα φυτά διατηρήθηκαν σε καλή θρεπτική κατάσταση με εβδομαδιαία προσθήκη θρεπτικού διαλύματος Hoagland 10%. Σε τακτά χρονικά διαστήματα τα φυτά ποτίζονταν με νερό έτσι ώστε να διατηρήσουν την υγρασία τους στο 60% της υδατοχωρητικότητας.

Σε διάστημα 8, 15 και 30 ημερών μετά τον εμβολιασμό των φυτών με τους μύκητες, τέσσερις γλάστρες από κάθε μεταχείριση απομακρύνθηκαν από το θάλαμμο ανάπτυξης, εκκριζώθηκαν προσεκτικά τα φυτά και ακολούθησε συλλογή της ριζόσφαιρας. Ως ριζοσφαιρικό έδαφος ορίστηκε το έδαφος που παρέμεινε προσκολλημένο επάνω στις ρίζες των φυτών ύστερα από έντονο τίναγμα της ρίζας. Το έδαφος αυτό συλλέχθηκε σε αποστειρωμένα δοχεία Falcon (50 ml) μετά από πλύσιμο των ριζών με διάλυμα NaCl 0.1%. Σ' όλες τις περιπτώσεις τα δείγματα από τα φυτά μάρτυρες συλλέχθηκαν πρώτα για να αποφευχθεί οποιαδήποτε υπόνοια μόλυνσης με τα εμβολιασμένα δείγματα. Το έδαφος που συλλέχθηκε στην συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στις 13,000 rpm για 10 λεπτά στους $4^{\circ}C$. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε προσεκτικά και το υπόλοιπο δείγμα συντηρήθηκε στους $-20^{\circ}C$, μέχρι να ξεκινήσει η διαδικασία εξαγωγής του DNA.

Απομόνωση DNA από υλικό εδάφους (Soil DNA extraction)

Το DNA εκχυλίστηκε ξεχωριστά από 0,25g εδάφους σε καθένα από τα τρία αποθηκευμένα δείγματα που αντιστοιχούν σε κάθε μεταχείριση χρησιμοποιώντας το Power Soil DNA Isolation kit σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας (Mo Bio Laboratories, USA). Σκοπός ήταν η απόκτηση τριών επαναλήψεων για κάθε μεταχείριση και χρόνο δειγματοληψίας.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για την μελέτη της μικροβιακής κοινότητας, και πιο συγκεκριμένα για τη μελέτη της κοινότητας των *Pseudomonas* και των α-πρωτεοβακτηρίων, ενισχύθηκε μεταβλήτη περιοχή του 16s rRNA γονιδίου με την μέθοδο PCR εσωτερικής ένθεσης. Στην πρώτη PCR, το DNA του εδάφους ενισχύθηκε με εξειδικευμένους εκκινητές για το γένος *Pseudomonas* (PsF311 - PsR1459 μέγεθος 1150 bp) και τα α-πρωτεοβακτήρια (a-F203 - R1492, μέγεθος 1300 bp). Οι αλληλουχίες των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν παραπάνω παρουσιάζονται στους Πίνακες 1 και 2, ενώ τα αντιδραστήρια και οι όγκοι που χρησιμοποιήθηκαν στις παραπάνω αντιδράσεις PCR παρουσιάζονται στους Πίνακες 3 και 4.

Πίνακας 1. Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas*.

Εκκινητής	Αλληλουχία	Tm
PsR1459	5'-AAT CAC TCC GTC GTA ACC GT-3'	58
PsF311	5'-CTG GTC TGA GAC GAT GAT CAG T -3'	62

Πίνακας 2. Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου των α-πρωτεοβακτηρίων

Εκκινητής	Αλληλουχία	Tm
a-F203	5'-CCG CAT ACG CCC TAC GGG GGA AAG ATT TAT -3'	73
R1492	5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T -3'	59

Πίνακας 3. Συστατικά της PCR για την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου των *Pseudomonas*

Αντιδραστήρια	Όγκος
Buffer (10x optimized)	5 μ l
dNTPs (10mM)	1 μ l
Forward primer PsF311 (20μmol/μl)	1 μ l
Reverse primer PsR1459 (20μmol/μl)	1 μ l
BSA (10μg/μl)	2 μ l
Πολυμεράση (1U/μl)	1 μ l
DNA	3 μ l
ddH₂O	36 μ l
Συνολικός όγκος	50 μ l

Πίνακας 4. Συστατικά της PCR για την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου των α -πρωτεοβακτηρίων

Αντιδραστήρια	Όγκος
Buffer (10x optimized)	5 μ l
dNTPs (10mM)	1 μ l
Forward primer α-F203 (20μmol/μl)	1 μ l
Reverse primer R1492 (20μmol/μl)	1 μ l
BSA (10μg/μl)	1 μ l
Πολυμεράση (1U/μl)	1 μ l
DNA	3 μ l
ddH₂O	37 μ l
Συνολικός όγκος	50 μ l

Και οι δύο αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με το θερμοκυκλοποιητικό πρόγραμμα που παρουσιάζεται στον Πίνακα 5).

Πίνακας 5. Θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες για την πρώτη PCR όπου χρησιμοποιήθηκαν κάθε φορά εκκινητές εξειδικευμένοι για *Pseudomonas* και α -πρωτεοβακτήρια

Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης			
Αρχική αποδιάταξη	94 °C	5min	
Αποδιάταξη	94°C	30sec	
Υβριδοποίηση	*	30sec	30 κύκλους
Επιμήκυνση	72 °C	1min	
Τελική επιμήκυνση	72 °C	10min	

*56°C για α -πρωτεοβακτήρια, 58°C για *Pseudomonas*

Σε όλες τις περιπτώσεις στην πρώτη PCR χρησιμοποιήθηκε bovine serum albumin (BSA) σε συγκέντρωση 400 ng μl^{-1} με σκοπό να αποτραπεί η αναστολή της δράσης της πολυμεράσης εξαιτίας της παρουσίας των χουμικών οξέων που βρίσκονται στο περιβαλλοντικό DNA. Το προϊόν PCR (1 μl) που λάβαμε από την πρώτη PCR χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα σε PCR εσωτερικής ένθεσης με την χρήση των κοινών βακτηριακών εκκινητών 357f+GC και 534r (Πίνακας 6) οι οποίοι ενισχύουν ένα κομμάτι μήκους 194bp που περιλαμβάνει τη μεταβλητή V3 περιοχή του 16S rRNA γονιδίου. Μία αλυσίδα 40bp, εμπλουτισμένη σε νουκλεοτίδια γουανίνης και κυτοσίνης (GC clamp), συνδέεται στο 5' άκρο του πρόσθιου εκκινητή ώστε να παρεμποδιστεί η πλήρης αποδιάταξη του PCR προϊόντος κατά την ηλεκτροφόρηση σε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (Muyzer et al., 1993). Τα αντιδραστήρια και οι όγκοι που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR εσωτερικής ένθεσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 6. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR εσωτερικής ένθεσης

Εκκινητής	Αλληλουχία	Tm
Muyzer F (357f-GC)	5' – CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG – 3'	103.2°C
Muyzer R (534r)	5' – ATT ACC GCG GCT GCT GG – 3'	54.4°C

Πίνακας 7. Συστατικά της PCR εσωτερικής ένθεσης για την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου των *Pseudomonas* και των *α-πρωτεοβακτηρίων*

Αντιδραστήρια	Όγκος
Buffer (10x optimized)	5 μ l
dNTPs (0,2mM each)	1 μ l
Forward primer (0.4μM ή 20 pmol)	1 μ l
Reverse primer (0.4μM ή 20 pmol)	1 μ l
1 U DNA πολυμεράση (EXT-DyNAzyme Polymerase)	1 μ l
ddH₂O	40 μ l
1^ο PCR προϊόν	1 μ l

Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες για την PCR εσωτερικής ένθεσης παρουσιάζονται στον

Πίνακας 8 .

Πίνακας 8. Θερμοκυκλικές συνθήκες για τη PCR εσωτερικής ένθεσης

Συνθήκες nested PCR			
Αρχική αποδιάταξη	95 ^ο C	5min	
Αποδιάταξη	95 ^ο C	30sec	
Υβριδοποίηση	55 ^ο C	30sec	30 κύκλοι
Επιμήκυνση	72 ^ο C	45sec	
Τελική επιμήκυνση	72 ^ο C	10min	

Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτική αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον καθαρισμό τμημάτων DNA. Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση στα δείγματα DNA που εκχυλίστηκαν από το έδαφος για τον έλεγχο της απόδοσης της εκχύλισης και στα προϊόντα των PCR για τον έλεγχο της παρουσίας του επιθυμητού προϊόντος.

Χρησιμοποιήθηκε πηκτική αγαρόζης 1% για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πρώτης PCR, φορτώθηκαν 10 μ l από κάθε δείγμα και 3 μ l loading buffer 6x. Η ηλεκτροφόρηση

πραγματοποιήθηκε στα 100V. Για τη δεύτερη PCR αντίθετα πραγματοποιήθηκε πηκτή αгарόζης 1,5% και φορτώθηκαν 5μl προϊόντος PCR.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών - DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

Η DGGE ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το INGENYphorU-2x2 σύστημα (Ingeny International BV, Ολλανδία). Χρησιμοποιήθηκε πηκτή πολυακρυλαμίδης 8% σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x TAE. Σε κάθε 'διαδρομή' φορτώθηκαν 500 ng προϊόντος της δεύτερης PCR. Για την ηλεκτροφόρηση και ανάλυση της κοινότητας των *Pseudomonas* χρησιμοποιήθηκε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών από 45 έως 60% ενώ η αντίστοιχη βαθμίδωση για την κοινότητα των α-πρωτεοβακτηρίων ήταν 45 έως 65% (Αποδιατακτικός παράγοντας 100% περιέχει 7M ουρία και 40% φορμαμίδη).



Εικόνα 4. INGENYphorU-2x2 σύστημα

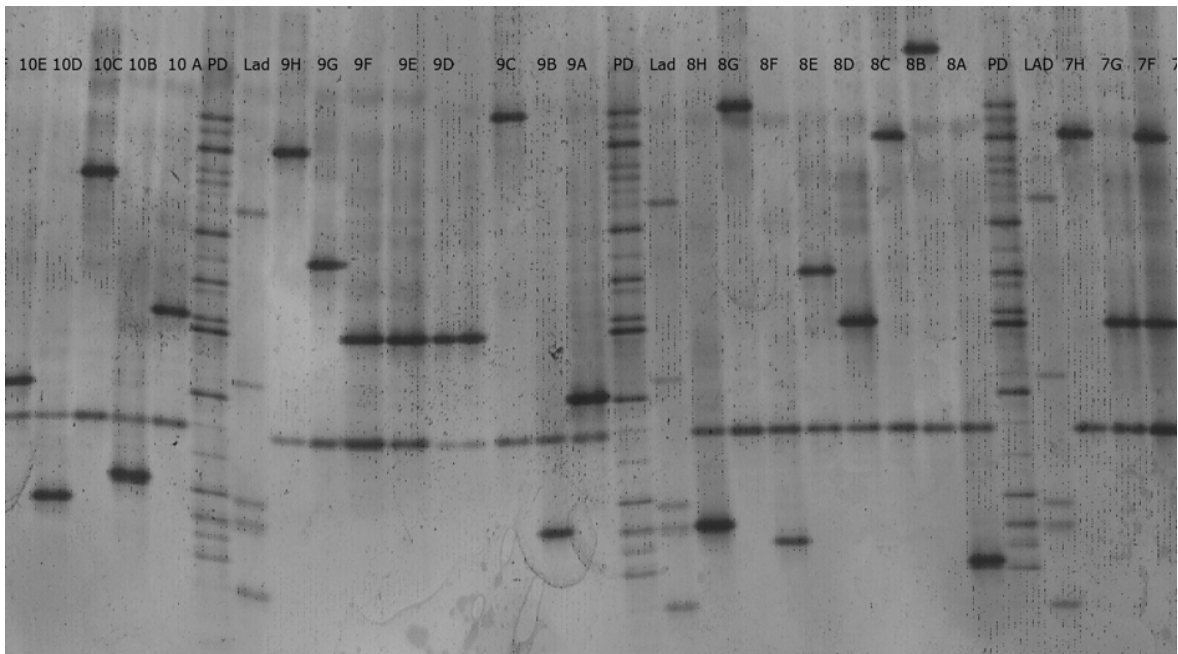
Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 75 V για 16 ώρες στους 60°C. Με την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης ακολούθησε βαφή της πηκτής με νιτρικό άργυρο όπως

περιγράφεται από τον McCaig και τους συνεργάτες (McCaig et al., 2001). Η εικόνα της πηκτής μετά την βαφή φωτογραφήθηκε με ψηφιακή κάμερα και ακολούθησε ανάλυση των εικόνων των πηκτωμάτων DGGE με το λογισμικό CrossChecker. Τα μοριακά αποτυπώματα μετατράπηκαν μέσω καταμέτρησης για την παρουσία και την απουσία ζωνών σε δεδομένα δυαδικής μορφής (binary data) τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την στατιστική ανάλυση με μεθόδους πολυμεταβλητότητας όπως ανάλυση κατά συστάδες (cluster analysis) με την μέθοδο Jaccard distance matrix χρησιμοποιώντας το αλγόριθμο group average. Η ανάλυση των δεδομένων με μεθόδους πολυμεταβλητότητας πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο MultiVariate Statistical Package (MVSP) 3.13v (Kovach Computing Services, <http://www.kovcomp.co.uk/mvsp>).

Κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR και αλληλούχιση

Τα προϊόντα και των τριών επαναλήψεων της πρώτης PCR αναμίχθηκαν ώστε να πάρουμε μια υψηλή ποσότητα DNA για την κλωνοποίηση. Τα προϊόντα της PCR καθαρίστηκαν χρησιμοποιώντας το Nucleospin Extract II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Το καθαρισμένο πλέον προϊόν PCR κλωνοποιήθηκε σε φορέα pGEM-T (Promega, Madison, USA) σύμφωνα με συγκεκριμένο πρωτόκολλο που έχει περιγραφεί από τον Sambrook και συνεργάτες (Sambrook et al., 1989). Η αξιολόγηση των βιβλιοθηκών κλώνων που δημιουργήθηκαν για τις διάφορες μεταχειρίσεις έγινε όπως έχει περιγραφεί από άλλους (Liang et al., 2008). Εν συντομία επιλέχθηκαν 50 κλώνοι από κάθε μεταχείριση και ελέγχθηκαν με colony-PCR χρησιμοποιώντας του εκκινητές εσωτερικής ένθεσης 357f+GC και 534r εάν περιέχουν το σωστό ένθεμα. Ακολούθως, το προϊόν PCR των

κλώνων που περιείχαν το σωστό ένθεμα αξιολογήθηκαν ως προς την κινητικότητα τους σε πηκτή DGGE σε αντιπαραβολή με το μοριακό αποτύπωμα του περιβαλλοντικού δείγματος από το οποίο προήλθαν (Εικόνα 5). Αντιπροσωπευτικοί κλώνοι που εμφάνισαν πανομοιότυπη κινητικότητα σε σχέση με ζώνες των περιβαλλοντικών δειγμάτων αλληλουχήθηκαν. Γενικότερα, για κάθε ζώνη αλληλουχήθηκαν τρεις κλώνοι ώστε να επιβεβαιώσουμε ότι οι κλώνοι που παρουσιάζουν την ίδια κινητικότητα στις πηκτές DGGE παρουσιάζουν και πανομοιότυπες αλληλουχίες,



Εικόνα 5. Εικόνα πηκτής DGGE σε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 45-65%, όπου παρουσιάζεται ενδεικτικά πως έγινε η αξιολόγηση των κλώνων με βάση την κινητικότητά τους σε αντιπαραβολή με τα περιβαλλοντικά δείγματα από τα οποία προήλθαν (PD: περιβαλλοντικό δείγμα, Lad: Ladder)

Για την αλληλούχιση, εκχυλίστηκε και καθαρίστηκε πλασμιδιακό DNA από επιλεγμένους κλώνους χρησιμοποιώντας το NucleoSpin Plasmid kit (Macharey-Nagel GmbH, Germany). σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ακολούθως τα πλασμίδια αποστάλησαν στην εταιρεία MACROGEN για ανάλυση της αλληλουχίας του ενθέματος. Για την ταυτοποίηση των κλώνων που αλληλουχήθηκαν πραγματοποιήθηκε ομοπαράθεση της αλληλουχίας του 16s rRNA γονιδίου με τις καταχωρημένες αλληλουχίες της ηλεκτρονικής βάσης δεδομένων BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), πρόγραμμα (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> BLAST).

Αποτελέσματα

Αποτελέσματα εξαγωγής του DNA από τη ριζόσφαιρα της τομάτας

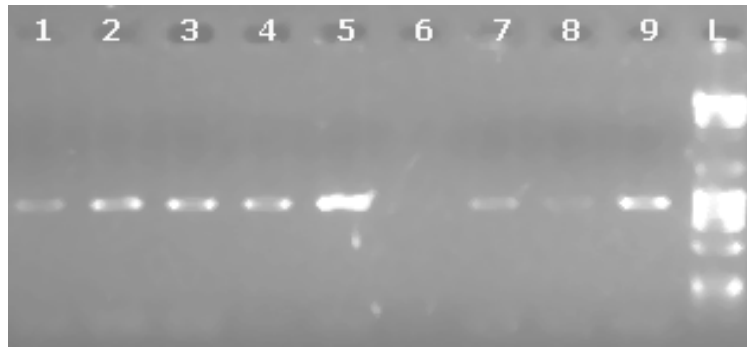
Η εξαγωγή του DNA από τα δείγματα του εδάφους πραγματοποιήθηκε από τον προπτυχιακό φοιτητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Αναστάσιο Καρατασιά. Τα αποτελέσματα αυτής της διαδικασίας περιγράφονται στη διπλωματική του εργασία.

Αποτελέσματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

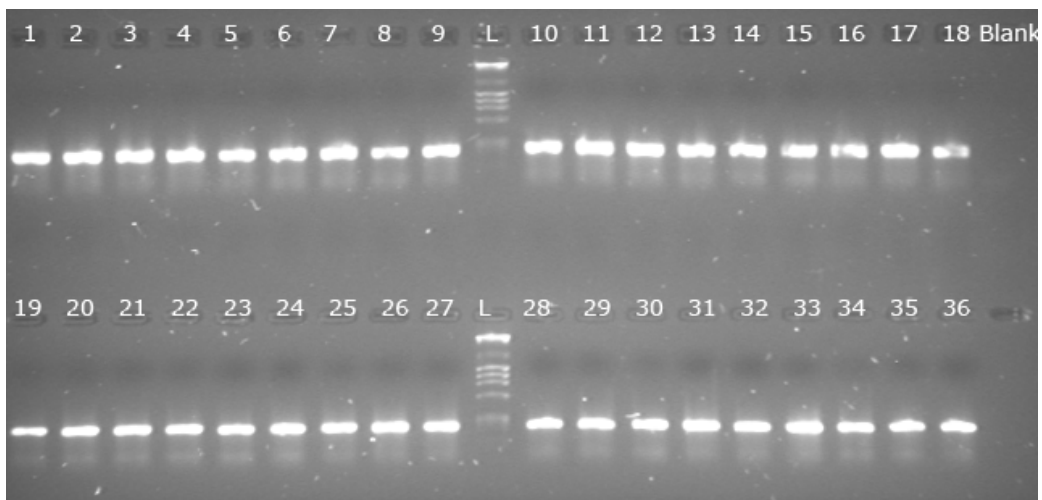
Pseudomonas

Στην πρώτη αντίδραση PCR για τις *Pseudomonas* χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές PsR1459 και PsF311 οι οποίοι ενισχύουν ένα σημαντικό μεγέθους τμήμα του 16s rRNA γονιδίου των *Pseudomonas*.(1200bp) (Εικόνα 5). Αντίστοιχα για τα α-πρωτεοβακτήρια χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές α-F203 και R1492 (Εικόνα).

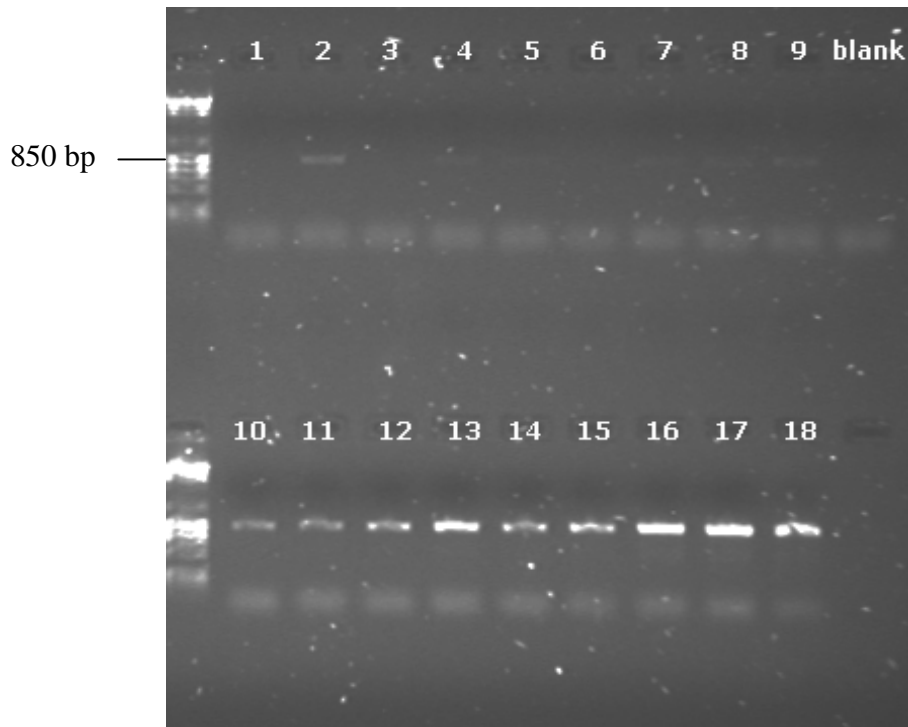
Ακολούθως το προϊόν PCR με τους εξειδικευμένους εκκινητές χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για PCR εσωτερικής ένθεσης με τους εκκινητές Muiyzer F (357f-GC) και Muiyzer R (534r) οι οποίοι (προϊόν περίπου 200bp) και δίνουν προϊόν κατάλληλο για ανάλυση με την μέθοδο DGGE (Εικόνα και 9).



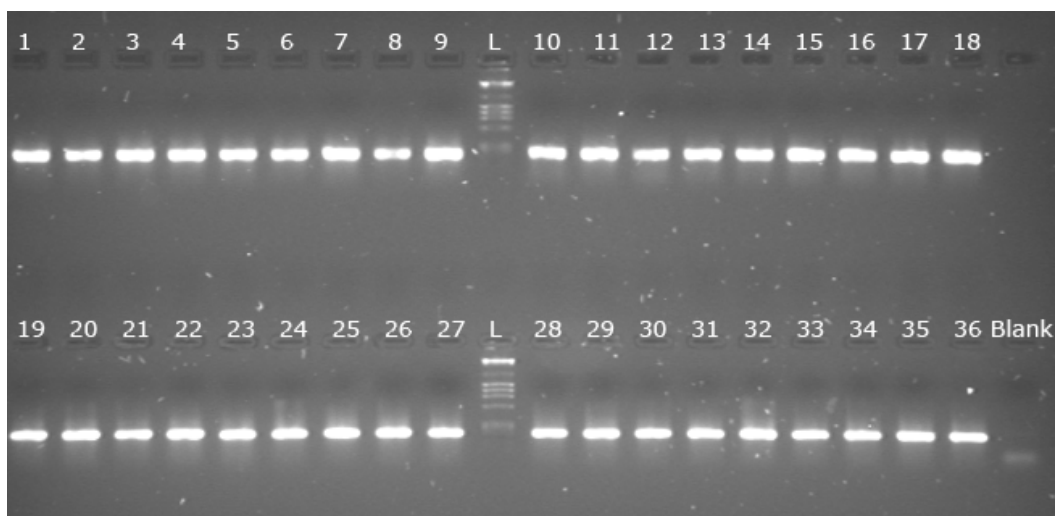
Εικόνα 5. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης 1% PCR προϊόντων που προέκυψαν από ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου των *Pseudomonas* της ριζόσφαιρας με τους εκκινητές *PsR1459* και *PsF311*. L: λ *HindIII*-DNA marker (1μl), Γραμμές 1-9 PCR προϊόν από δείγματα εδάφους. Στις γραμμές φορτώθηκαν 10μl προϊόντος PCR.



Εικόνα 7. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης 1,5% των προϊόντων PCR εσωτερικής ένθεσης από το 16S rRNA γονίδιο της κοινότητας των *Pseudomonas* στην ριζόσφαιρα. L: 1000 bp DNA Ladder(1μl), Στις γραμμές 1- 36 φορτώθηκαν 5μl προϊόντος PCR εσωτερικής ένθεσης .



Εικόνα 8. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης 1% PCR προϊόντων ύστερα από ενίσχυση του 16s rRNA γονιδίου των α-πρωτεοβακτηρίων της ριζόσφαιρας χρησιμοποιώντας τους εκκινητές α-F203 και R1492 . L: λ HindIII-DNA marker (1μl), Γραμμές 1-18 PCR προϊόν από δείγματα εδάφους. Στις γραμμές φορτώθηκαν 10μl PCR προϊόντος



Εικόνα 9. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 1,5% προϊόντων PCR εσωτερικής ένθεσης από το 16S rRNA γονίδιο της κοινότητας των α- πρωτεοβακτηρίων στην ριζόσφαιρα. L: 1000 bp DNA Ladder(1μl), Στις γραμμές 1- 36 φορτώθηκαν 5μl PCR προϊόντος .

Αποτελέσματα Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

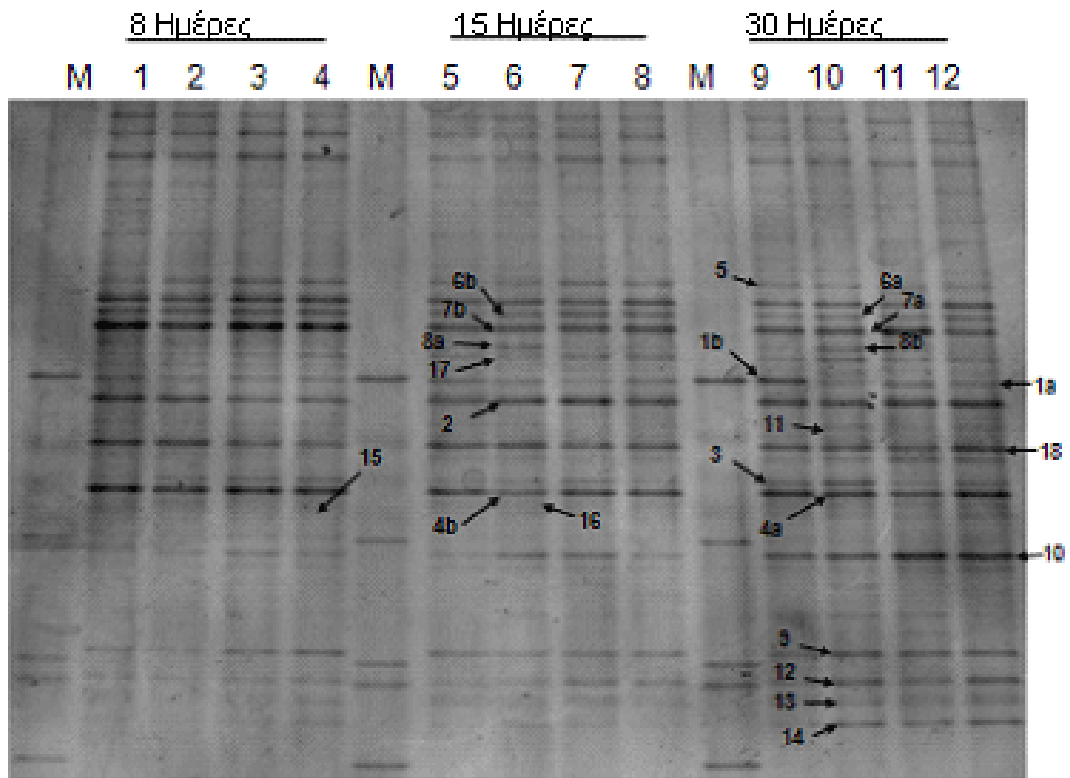
Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε περιορισμένη παραλλακτικότητα στα μοριακά αποτυπώματα των τριών επαναλήψεων από την ίδια μεταχείριση με αποτέλεσμα να παρουσιάζονται στις εικόνες από τις πηκτές DGGE ένα δείγμα για κάθε μεταχείριση ώστε να καταστεί δυνατή η ηλεκτροφόρηση όλων των δειγμάτων για κάθε βακτηριακή κοινότητα στην ίδια πηκτή (Παράρτημα: εικόνα 14, 15). Έτσι αποφεύχθηκε η σύγκριση μεταξύ διαφορετικών πηκτών που μπορεί να αυξάνουν την παραλλακτικότητα και να οδηγούν σε εσφαλμένα συμπεράσματα.

Κοινότητα *Pseudomonas*

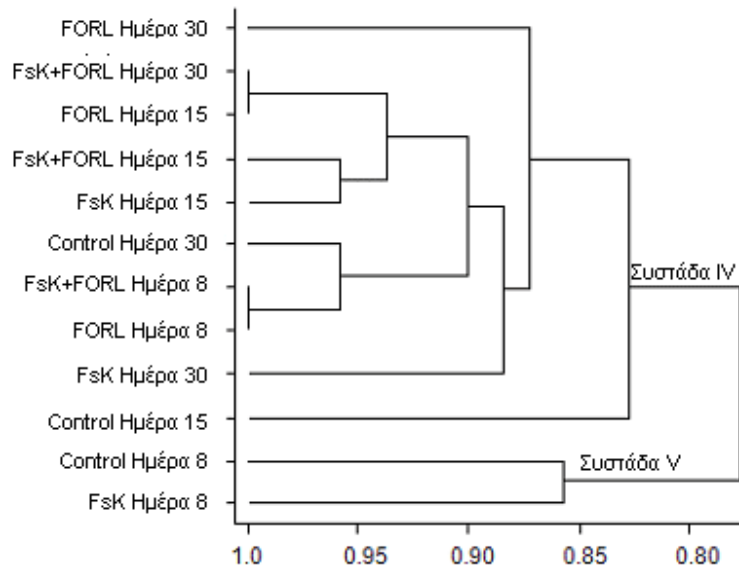
Τα μοριακά αποτυπώματα της κοινότητας των *Pseudomonas* στην ριζόσφαιρα των φυτών τομάτας παρουσιάζονται στην Εικόνα 10. Τα μοριακά αποτύπωματα που συλλέχθηκαν δείχνουν μια σχετικά πολυπληθή κοινότητα βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* καθώς ο αριθμός των ζωνών στις διάφορες μεταχειρίσεις κυμάνθηκε μεταξύ 22 και 26. Ανάλυση κατά συστάδες των δεδομένων δυαδικής μορφής που προέκυψαν έδειξαν ότι οι κοινότητα των *Pseudomonas* στις διάφορες μεταχειρίσεις και χρόνους δειγματοληψίες δεν παρουσίασε σημαντικές μεταβολές (ομοιότητα >80%). Η ανάλυση κατά συστάδες έδειξε την δημιουργία δύο κυρίως συστάδων: μια μεγάλη συστάδα (Συστάδα IV) συμπεριλαμβανομένων όλων των FORL-εμβολιασμένων δειγμάτων (FsK+FORL, FORL) και του μάρτυρα και των δειγμάτων FsK από τις ημέρες 8 15 και 30 (Εικόνα). Τα μόνα δείγματα που διαμόρφωσαν μια χωριστή συστάδα (Συστάδα V, Εικόνα) ήταν τα δείγματα του μάρτυρα και τα FsK-εμβολιασμένα δείγματα που συλλέχθηκαν την ημέρα 8.

Οπτική παρατήρηση των πηκτών DGGE έδειξε την παρουσία/απουσία ορισμένων ζωνών σε συγκεκριμένες μεταχειρίσεις . Κατά συνέπεια δημιουργήθηκαν βιβλιοθήκες κλώνων για τον φυλογεννητικό προσδιορισμό αυτών των ριβότυπων του γένους *Pseudomonas*. Συνολικά, οι σημαντικότερες ζώνες στο μοριακό αποτύπωμα DGGE περιλαμβάνονται στη βιβλιοθήκη κλώνων. Η πλειοψηφία των κλώνων/ζωνών παρουσιάζουν υψηλότερη ομολογία ακολουθίας με στελέχη του γένους *Pseudomonas*, όπως και αναμενόταν με εξαίρεση μερικές ζώνες (9, 10, 14), οι οποίες παρουσίασαν υψηλότερη ομολογία με βακτήρια του γένους *Thermomonas* και *Xanthomonas* (Πίνακας 9). Οι ζώνες 8a και 8b, που παρουσίασαν ίδια κινητικότητα στις πηκτές,

φαίνεται να είναι ιδιαίτερα έντονες και κυριάρχες μόνο στα αποτυπώματα των δειγμάτων που εμβολιάστηκαν με τον FsK και συλλέχθηκαν 15 και 30 μέρες μετά τον εμβολιασμό με το μύκητα αντίστοιχα (Εικόνα). Οι κλώνοι που αντιστοιχούν στις ζώνες 8α και 8β παρουσίασαν υψηλότερη ομολογία με στελέχη του είδους *P. syringae* (99.4%) και *P. stutzeri* (99,9%) αντίστοιχα (Πίνακας 9). Ομοίως, η ζώνη 11 εμφανίστηκε μόνο στα δείγματα που εμβολιάστηκαν με τον FsK και συλλέχθηκαν 30 μέρες μετά τον εμβολιασμό και οι σχετικοί κλώνοι παρουσίασαν υψηλότερη ομολογία με στελέχος του γένους *P. putida* (99.8%). Αντίθετα, η ζώνη 1b, η οποία αντιστοιχεί σε κλώνους που παρουσίασαν υψηλή ομολογία με στέλεχος *Pseudomonas sp.* (99.4%) κυριάρχησε στα δείγματα του μάρτυρα που συλλέχθηκαν 30 ημέρες μετά τον εμβολιασμό.



Εικόνα 10. Εικόνα πηκτής DGGE σε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 45-65% όπου αναλύθηκαν τα προϊόντα της PCR εσωτερικής ένθεσης της κοινότητας των *Pseudomonas*. Διαδρομές 1, 5, 9 δείγματα που δεν εμβολιάστηκαν με μύκητες (Μάρντρας), 2, 6, 10 δείγματα που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *FsK*, 3, 7, 11 δείγματα που εμβολιάστηκαν με τα στελέχη *FsK* και *FORL* και 4, 8, 12 δείγματα που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *FORL*. Όπου *M* marker που αποτελείται από ανάμειξη προϊόντων PCR ($20 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$) από την περιοχή *V3* του *16S rRNA* γονιδίου των βακτηριακών στελεχών: *Flavobacterium* sp. *Pseudomonas entomophila*, *Rhizobium* sp., *Mesorhizobium loti*, *Agrobacterium* sp



Εικόνα 11. Ανάλυση κατά συστάδες (UPGMA, Jaccard similarity matrix) των μοριακών αποτυπωμάτων της κοινότητας των *Pseudomonas* στην ριζόσφαιρα φυτών τομάτας που εμβολιάστηκαν με τους μύκητες FSK και/ή FORL καθώς και σε δείγματα που δεν εμβολιάστηκαν με μύκητες (Control). Η ομοιότητα μεταξύ των διαφόρων δειγμάτων που αναλύθηκαν φαίνεται στην κλίμακα κάτω από το δενδρόγραμμα

Πίνακας 9. Ταυτότητα των επιλεγμένων ζωνών DGGE από την κοινότητα των *Pseudomonas*

Αριθμός Ζώνης	Στελέχη με τη μεγαλύτερη ομολογία σύμφωνα με την GenBank (% ομολογία ακολουθίας από το BLAST) ^a	GenBank Accession no.
1a	<i>Pseudomonas</i> sp. isolate HMPB1 (99.6%)	AM745260
1b	<i>Pseudomonas</i> sp. isolate HMPB1 (99.4%)	AM745260
2	<i>Ps. alcaligenes</i> strain M4-4 (99.4%)	AY880332
3	<i>Ps. putida</i> strain TFD49 (99.9%)	EU827496
4a	<i>Ps. rhizosphaerae</i> isolate (99.9%)	AY152673

4b	<i>Ps. putida</i> partial strain P9 (99.8%)	FM211694
5	Uncultured <i>Cellvibrio</i> clone (97.9%)	EU449580
6a	<i>Ps. jessenii</i> strain PS06 (100%)	EU275363
6b	<i>Pseudomonas</i> sp. isolate LaGso271 (99.9%)	EU934229
7a	<i>Pseudomonas</i> sp. ST-46 strain (99.8%)	EF044368
7b	<i>Ps. fluorescens</i> strain SCAM BA_1 (99.8%)	AM900685
8a	<i>Ps. syringae</i> strain ICMP (99.4%)	AJ308316
8b	<i>Ps. stutzeri</i> strain hyss62 (99.9%)	FJ613315
9	Uncultured γ -proteobacterium (<i>Thermomonas</i> sp) clone (96.7%)	EU276576
10	<i>Xanthomonas</i> sp. strain (96.3%)	AJ244722
11	<i>Ps. putida</i> strain AS01 (99.8%)	EU661866
12	Uncultured bacterium clone (97.1%)	AY212560
13	Uncultured soil bacterium clone (98.5%)	AY493942
14	Uncultured γ -proteobacterium (<i>Thermomonas</i> sp) clone (96.7%)	EU276576
15	<i>Pseudomonas</i> sp. strain PH1N (99.9%)	AY835584
16	Uncultured γ -proteobacterium clone (96.3%)	DQ676408
17	<i>Pseudomonas</i> sp. strain USTB-04 (99.9%)	EU781490
	<i>Ps. pseudoalcaligenes</i> strain KS-1 (99.9%)	EU815635
	<i>Ps. lindanilytica</i> strain IPL-1 (99.9%)	DQ916277
	<i>Ps. mendocina</i> strain PC1 (99.9%)	DQ178219
18	<i>Pseudomonas</i> sp. MAG-api strain (99.3%)	EU445343

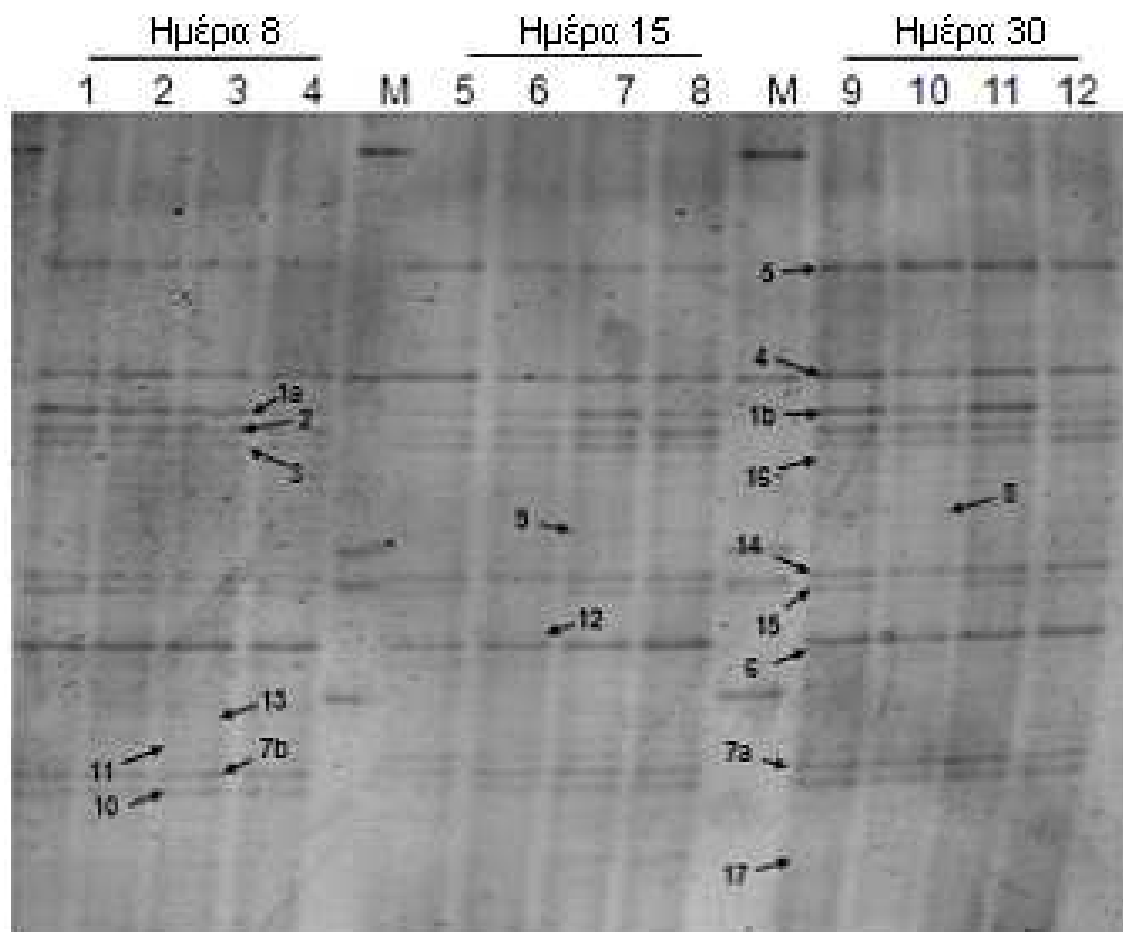
^a Οι ομολογίες βασίζονται σε αλληλουχίες 850 βάσεων του γονιδίου 16 rRNA των *Pseudomonas* του εδάφους εκτός από τις αλληλουχίες των ζωνών 1a, 1b, 8a, 8b και 11 όπου αλληλουχήθηκαν και οι δύο αλυσίδες με αποτέλεσμα το συνολικό μέγεθος της αλληλουχίας που αναλύθηκε να είναι 1150 bp

Κοινότητα α-πρωτεοβακτηρίων

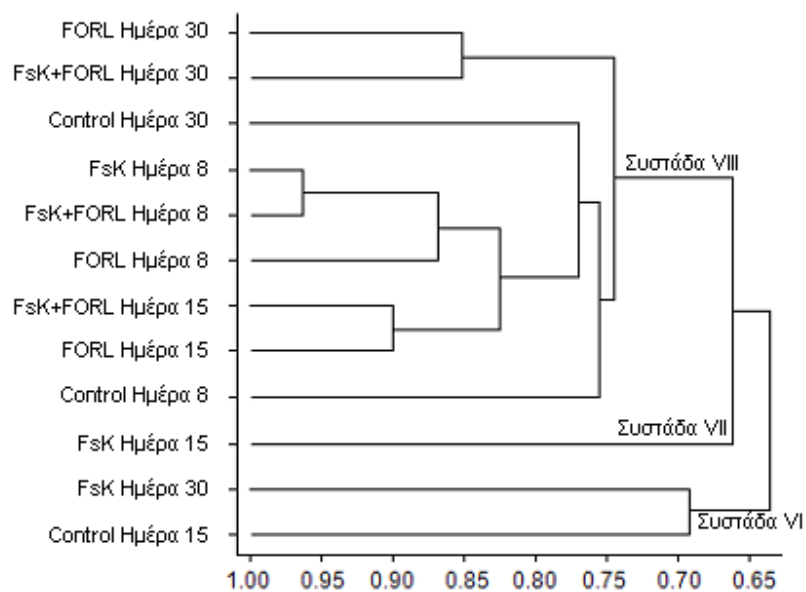
Τα μοριακά αποτυπώματα DGGE της κοινότητας των α-πρωτεοβακτηρίων στη ριζόσφαιρα των τομάτας ήταν πλούσια στις διαφορετικές μεταχειρίσεις με αριθμό ζωνών που κυμάνθηκε από 17 έως 22 (Εικόνα). Ανάλυση κατά συστάδες των δεδομένων δυαδικής μορφής που προέκυψαν έδειξαν ότι η κοινότητα των α-πρωτεοβακτηρίων δεν διαφοροποιείται σε σημαντικό βαθμό από μεταχείριση σε μεταχείριση (Εικόνα 13.63). Έτσι τα δείγματα κατανεμήθηκαν σε δύο κυρίως συστάδες χωρίς όμως να εμφανίζεται κάποια ξεκάθαρη κατανομή με βάση το είδος του μύκητα που εμβολιάστηκε στα φυτά ή τον χρόνο δειγματοληψίας. Η πρώτη συστάδα (Συστάδα VI) περιλάμβανε τα δείγματα που εμβολιάστηκαν με τον μύκητα FsK και συλλέχθηκαν 30 ημέρες μετά τον εμβολιασμό μαζί με τα δείγματα του μάρτυρα που συλλέχθηκαν στις 15 ημέρες. Η δεύτερη κύρια συστάδα αποτελούνταν από δύο υπό-συστάδες : η πρώτη (Συστάδα VII) περιλαμβάνει μόνο τα δείγματα που εμβολιάστηκαν με τον μύκητα FsK και συλλέχθηκαν την ημέρα 15, ενώ η δεύτερη (Συστάδα VIII) περιείχε όλα τα υπόλοιπα δείγματα χωρίς περαιτέρω υποομαδοποίηση με βάση το χρόνο ή την μεταχείριση.

Βιβλιοθήκες κλώνων δημιουργήθηκαν για την κοινότητα των α-πρωτεοβακτηρίων προκειμένου να προσδιοριστούν τα μέλη της κοινότητας που ανταποκρίθηκαν στον εμβολιασμό της ριζόσφαιρας της τομάτας με το ενδοφυτικό ή/και το παθογόνο στέλεχος *Fusarium*. Συνολικά, στην κοινότητα των α-πρωτεοβακτηρίων επικράτησαν βακτήρια που ανήκουν στα

γένη *Agrobacterium/Rhizobium* και *Devosia* (ζώνες 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 και 14). Επιμέρους ζώνες φαίνεται ότι επηρεάστηκαν από τον εμβολιασμό με τον μη παθογόνο μύκητα. Έτσι η ζώνη 15 ήταν παρούσα σε όλες τις μεταχειρίσεις με εξαίρεση τα FsK-εμβολιασμένα δείγματα που συλλέχθηκαν 15 και 30 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, ενώ αντίθετα η ζώνη 12 ήταν μόνο παρούσα στο μοριακό αποτύπωμα των δειγμάτων που εμβολιάστηκαν με τον μύκητα FsK και συλλέχθηκαν 15 ημέρες μετά τον εμβολιασμό (Εικόνα2). Οι αντίστοιχοι κλώνοι παρουσίασαν υψηλότερη ομολογία με στέλεχος του είδους *Devosia riboflavina* (99.4%) και με ένα περιβαλλοντικό κλώνο α -proteobacterium (97%) αντίστοιχα (Πίνακας 10). Από την άλλη μεριά η ζώνη 8 εμφανίζεται σε όλες τις μεταχειρίσεις στα δείγματα που συλλέχθηκαν στις 30 ημέρες και οι αντίστοιχοι κλώνοι παρουσιάζουν υψηλότερη ομολογία με ένα περιβαλλοντικό κλώνο της οικογένειας Rhizobiaceae (98.9%).



Εικόνα 12. Εικόνα πηκτής DGGE σε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 45-65% όπου αναλύθηκαν τα προϊόντα της PCR εσωτερικής ένθεσης της κοινότητας των α -πρωτεοβακτηρίων. Διαδρομές 1, 5, 9 δείγματα που δεν εμβολιάστηκαν με μύκητες (Μάρντρας), 2, 6, 10 δείγματα που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *FsK*, 3, 7, 11 δείγματα που εμβολιάστηκαν με τα στελέχη *FsK* και *FORL* και 4, 8, 12 δείγματα που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *FORL*. Όπου *M* marker που αποτελείται από ανάμειξη προϊόντων PCR από την περιοχή *V3* του *16S rRNA* γονιδίου των βακτηριακών στελεχών *Flavobacterium sp.*, *Pseudomonas entomophila*, *Rhizobium sp.*, *Mesorhizobium loti*, *Agrobacterium sp.*



Εικόνα 13.6 Cluster analysis (UPGMA, Jaccard similarity matrix) του μοριακού αποτυπώματος των διαφόρων μεταχειρίσεων που παρουσιάζονται στην παραπάνω πηκτή DGGE. Η ομοιότητα μεταξύ των διαφόρων δειγμάτων που αναλύθηκαν φαίνεται στην κλίμακα κάτω από το δενδρόγραμμα,

Πίνακας 10. Ταυτότητα των επιλεγμένων ζωνών DGGE από την κοινότητα των α-πρωτεοβακτηρίων

Αριθμός Ζώνης	Στελέχη με τη μεγαλύτερη ομολογία σύμφωνα με την GenBank (% ομολογία ακολουθίας από το BLAST) ^a	GenBank Accession no.
1a	<i>Rhizobium</i> sp. strain 4_C26_39 (99.1%)	EF540509
1b	Uncultured a-proteobacterium clone (99.7%)	AY133098
2	Uncultured Rhizobiales clone (99.5%)	AM936236
3	<i>Devosia neptuniae</i> isolate (99.7%)	AF469072
4	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain AT108N (99.7%)	FJ666055
5	Uncultured <i>Devosia</i> clone (99.3%)	EF665097

6	<i>Devosia</i> sp. strain 4_C16_46 (96.2%)	EF540511
7a	Uncultured bacterium clone HP1B28 (99.5%)	AF502219
7b	Uncultured Hyphomicrobiaceae bacterium clone (98.9%)	EF018645
8	Uncultured Rhizobiaceae clone (98.9%)	FJ516842
9	Uncultured bacterium soil clone bac2nit3 (89.1%)	EU861930
10	Uncultured α -proteobacterium (Rhodospiralles) clone (98.9%)	EU589322
11	Uncultured α -proteobacterium (Paracoccus) clone (97.6%)	AM231059
12	Uncultured α -proteobacterium clone (97.0%)	FJ230899
13	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain ISSDS-755 (99.6%)	EF620460
14	Uncultured Caulobacter clone (98.6%)	AF245033
15	<i>Devosia riboflavina</i> isolate (99.4%)	AJ549086
16	Uncultured bacterium clone (99.0%)	DQ532347
17	Uncultured Caulobacterales clone (99.3%)	EU202838

^a Οι ομολογίες βασίζονται σε αλληλουχίες 850 βάσεων του γονιδίου 16 rRNA των α -πρωτεοβακτηρίων του εδάφους εκτός από τις αλληλουχίες των ζωνών 8, 9, 12, και 15 όπου αλληλουχήθηκαν και οι δύο αλυσίδες συνολικού μήκους 1300 bp

Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε την επίδραση που έχει στη μικροβιακή κοινότητα της ριζόσφαιρας της τομάτας ο εμβολιασμός με δύο στελέχη *Fusarium*, ένα φυτοπαθογόνο (FORL) και ένα μη παθογόνο (FsK) που ενεργεί ανταγωνιστικά και προστατεύει το φυτό από την ανάπτυξη της ασθένειας που προκαλείται από το πρώτο. Ερευνήσαμε αυτήν την επίδραση στη μικροβιακή δυναμική της ριζόσφαιρας κατά τη διάρκεια τριών διαφορετικών αλληλεπιδράσεων στα φυτά, δηλ. με την παρουσία ενός παθογόνου, με έναν συμβιωτικό μύκητα καθώς επίσης και την τριμερή αλληλεπίδραση. Η αρχική υπόθεση που κάναμε ήταν ότι **οι παραπάνω τρεις διαφορετικές καταστάσεις** των φυτών θα οδηγούσαν σε διαφορετικές επιμέρους μεταβολές στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους.

Συνολικά, στη ριζόσφαιρα της τομάτας επικράτησαν στελέχη *Pseudomonas* που παρουσίαζαν υψηλή ομολογία αλληλουχίας με στελέχη που έχει βρεθεί ότι προωθούν την φυτική ανάπτυξη (PGPR) με διάφορους μηχανισμούς (ζώνες *Pseudomonas* 2, 4, 6, 7, 10) (Εικόνα). Για παράδειγμα, η ζώνη/κλώνος 7a παρουσιάζει υψηλότερη ομολογία με ένα στέλεχος του είδους *P.corrugata* (99.8%) το οποίο απομονώθηκε από ριζόσφαιρα και είχε την ικανότητα να ανταγωνίζεται και να καταπολεμά φυτοπαθογόνα εδάφους (Guo et al., 2007). Ο εμβολιασμός της ριζόσφαιρας με τους μύκητες FsK ή/και FORL δεν φαίνεται να προκαλεί μεγάλες και σταθερές αλλαγές στη δομή των *Pseudomonas* στη ριζόσφαιρα όπως φαίνεται και από την ανάλυση κατά συστάδες. Εντούτοις, ορισμένες ζώνες στο μοριακό αποτύπωμα των δειγμάτων που εμβολιάστηκαν με το μη παθογόνο στέλεχος FsK φαίνεται να ευνοούνται από την παρουσία FsK στη ριζόσφαιρα και ειδικότερα μετά την είσοδο του μύκητα στο ενδοφυτικό του στάδιο (15

και 30 ημέρες μετά τον εμβολιασμό). Πράγματι, ένας κλώνος που παρουσίασε υψηλότερη ομολογία με στέλεχος του είδους *P. syringae* κυριάρχησε στα FsK-εμβολιασμένα δείγματα που συλλέχθηκαν 15 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, ενώ κλώνοι που παρουσιάζουν υψηλή ομολογία με στελέχη των ειδών *P. stutzeri* και *P. putida* φαίνεται ότι μετατράπηκαν σε κυρίαρχα μέλη της κοινότητας στα δείγματα που εμβολιάστηκαν με τον μύκητα FsK και συλλέχθηκαν 30 ημέρες μετά τον εμβολιασμό (Εικόνα). Το στέλεχος *P. syringae* είναι ένα παθογόνο βακτηριακό στέλεχος των φυτών που είναι γνωστό για την ικανότητά του να αποικίζει επιφυτικά τα διάφορα φυτά και να σχηματίζει πυρήνες πάγου (ice-nucleation). Από την άλλη μεριά, στελέχη του είδους *P. syringae* απομονώθηκαν επίσης από μη γεωργικά εδάφη, στατικά και ρέοντα επιφανειακά υδροφόρα συστήματα, περιοχές μόνιμων πάγων που αποδεικνύουν την εκτεταμένη διασπορά του στη βιόσφαιρα (Hirano SS, 1985; Morris et al., 2008). Επίσης, μη παθογόνα στελέχη του είδους *P. syringae* έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης ως παράγοντες βιολογικής καταπολέμησης για την καταπολέμηση μυκητολογικών προσβολών των φρούτων μετά τη συγκομιδή. Πρόσφατα, η συμμετοχή τους στην επαγωγή της επαγόμενης διασυστημικής ανθεκτικότητας (IRS) στα φυτά μέσω των μονοπατιών του σαλυκυλικού/γιασμονικού οξέος (Gardener et al., 2007; Cui et al., 2005).

Ομοίως, στελέχη των ειδών *P. stutzeri* και *P. putida* αποτελούν κοινούς αποικιστές της ριζόσφαιρας όπου έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν σε σημαντικές λειτουργίες όπως της αποδόμησης και αποτοξικοποίησης οργανικών ρύπων, στους γεωχημικούς κύκλους αζώτου και φωσφόρου ενώ μερικά στελέχη έχουν και την ικανότητα να δρουν ως βιολογικοί παράγοντες για την καταπολέμηση φυτοπαθογόνων (Karpouzas et al., 2000; Lalucat et al., 2006). Σχετικά πρόσφατα, στελέχη του είδους *P. stutzeri* που απομονώθηκαν από την ριζόσφαιρα φυτών

βρέθηκαν να κατέχουν το γονίδιο απαμινάση του ACC (1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase) το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στην υδρόλυση του ACC που αποτελεί πρόδρομη ουσία για την παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων αιθυλενίου στα φυτά (Govindasamy et al., 2008). Τα παραπάνω αποτελέσματα προσφέρουν αρχικές ενδείξεις ότι η είσοδος του FsK στη ρίζα των φυτών οδηγεί σε μια επιλεγμένη ενεργοποίηση βακτηρίων της ριζόσφαιρας που θα μπορούσαν να δράσουν άμεσα ως παράγοντες βιολογικής καταπολέμησης φυτοπαθογόνων ή έμμεσα διαμέσου ενεργοποίησης επαγόμενης διασυστημικής ανθεκτικότητας στα φυτά. Περαιτέρω μελέτες που πραγματοποιούνται αυτή την στιγμή στο εργαστήριο εστιάζουν στη σύνθεση των εκκρίσεων της ρίζας φυτών τομάτας που έχουν εμβολιαστεί με το μη παθογόνο στέλεχος FsK προσφέροντας περισσότερες πληροφορίες για το θέμα.

Όσον αφορά τα α -πρωτεοβακτήρια, η ανάλυση κατά συστάδες των δεδομένων που προέκυψαν από τα μοριακά αποτυπώματα DGGE έδειξαν, όπως και με τα *Pseudomonas*, ότι ο εμβολιασμός των φυτών τομάτας με τους μύκητες FsK και/ή FORL δεν φαίνεται να προκαλεί σημαντικές μεταβολές συνολικά στην κοινότητα των α -πρωτεοβακτηρίων. Από την άλλη μεριά εμβολιασμός των φυτών με το μη-παθογόνο στέλεχος FsK προκάλεσε επιλεγμένη ενεργοποίηση κάποιων α -πρωτεοβακτηρίων ειδικότερα μετά τις 15 ημέρες που είναι και η έναρξη του ενδοφυτικού σταδίου του μύκητα. Έτσι, ένας κλώνος/ζώνη που παρουσίαζε υψηλότερη ομολογία με ένα στέλεχος του είδους *Devosia riboflavina* φαίνεται να εξαφανίζεται από την κοινότητα των α -πρωτεοβακτηρίων 15 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με το στέλεχος FsK. Αντίθετα, ένας άλλος κλώνος/ζώνη που παρουσιάζει υψηλότερη ομολογία με έναν περιβαλλοντικό κλώνο από α -πρωτεοβακτήριο εμφανίζεται να ευνοείται στα FsK-εμβολιασμένα δείγματα από τις 15 ημέρες και μετά. Στελέχη του είδους *Devosia riboflavina* έχουν σαν κύριο

ενδιαίτημα το έδαφος και η εξαφάνιση του από τη ριζόσφαιρα των φυτών τομάτας που εμβολιάστηκαν με FsK πιθανότατα σημαίνει ότι η είσοδος FsK στις ρίζες των φυτών οδηγεί σε μεταβολές στην σύνθεση των ριζικών εκκρίσεων που αναστέλλουν το *Devosia riboflavina*. Εναλλακτικά, το *D.riboflavina*. μπορεί να εκτοπίστηκε από άλλα ανταγωνιστικότερα βακτήρια που είναι σε θέση να αξιοποιήσουν αποτελεσματικότερα τις αλλαγές της σύνθεσης των ριζικών εκκρίσεων στην ριζόσφαιρα.

Τελικά Συμπεράσματα

Μελετήσαμε τις πιθανές επιδράσεις μιας τριμερούς αλληλεπίδρασης μεταξύ φυτών τομάτας – μη παθογόνου μύκητα – και φυτοπαθογόνου μύκητα στη σύσταση επιλεγμένων βακτηριακών κοινοτήτων στη ριζόσφαιρα της τομάτας. Από την συγκεκριμένη μελέτη προέκυψαν τα παρακάτω βασικά συμπεράσματα:

1. Το μη παθογόνο στέλεχος *Fusarium solani* K (FsK) αλλά και το φυτοπαθογόνο στέλεχος *Fusarium oxysporum* f.sp. *radici lycopersici* (FORL) δεν προκαλεί συνολικά σημαντικές και εκτεταμένες μεταβολές στην σύσταση της κοινότητας των *Pseudomonas* και α-πρωτεοβακτηρίων στην ριζόσφαιρα φυτών τομάτας.
2. Ο εμβολιασμός του μη-παθογόνου στελέχους FsK στην ριζόσφαιρα των φυτών τομάτας και ειδικότερα η είσοδος τους στην ρίζα των φυτών τομάτας 15 ημέρες μετά τον εμβολιασμό οδήγησε σε επιλεκτική ενεργοποίηση στελεχών του γένους *Pseudomonas* (*P. stutzeri*, *P. syringae*, *P. putida*) και α-πρωτεοβακτηρίων που είναι πιθανόν να εμπλέκονται στην καταπολέμηση του φυτοπαθογόνου ή σε ένα συνολικό μηχανισμό αύξησης της άμυνας του φυτού κατά της προσβολής από φυτοπαθογόνα εδάφους.

Το γεγονός ότι ο εμβολιασμός του φυτού με τον Fs-K δεν μεταβάλλει την συνολική ποικιλομορφία των βακτηριακών πληθυσμών της ριζόσφαιρας, αποτελεί πλεονέκτημα για πιθανή εμπορική χρήση του μύκητα αυτού. Τρέχουσες μελέτες στο εργαστήριο θα ερευνήσουν περαιτέρω την επίδραση του FsK στη φυσιολογία της ρίζας και στη συνέχεια στη σύνθεση των ριζικών εκκρίσεων στην ριζόσφαιρα των φυτών τομάτας.

Παράρτημα

Διαλύματα

5x TBE (Tris Borate EDTA) Buffer

Tris Base 54gr

Boric Acid 27.5gr

0.5M EDTA (pH 8) 20ml

Προσαρμογή του όγκου στο 1L με απεσταγμένο νερό

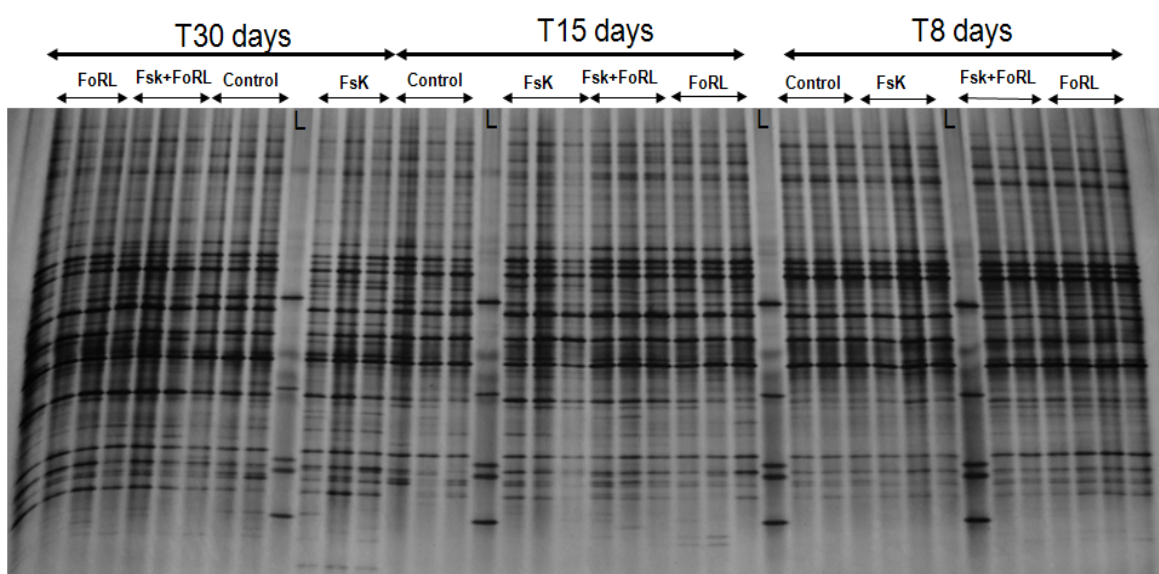
6x loading buffer

Γλυκερόλη 5ml

Bromophenol blue 1ml

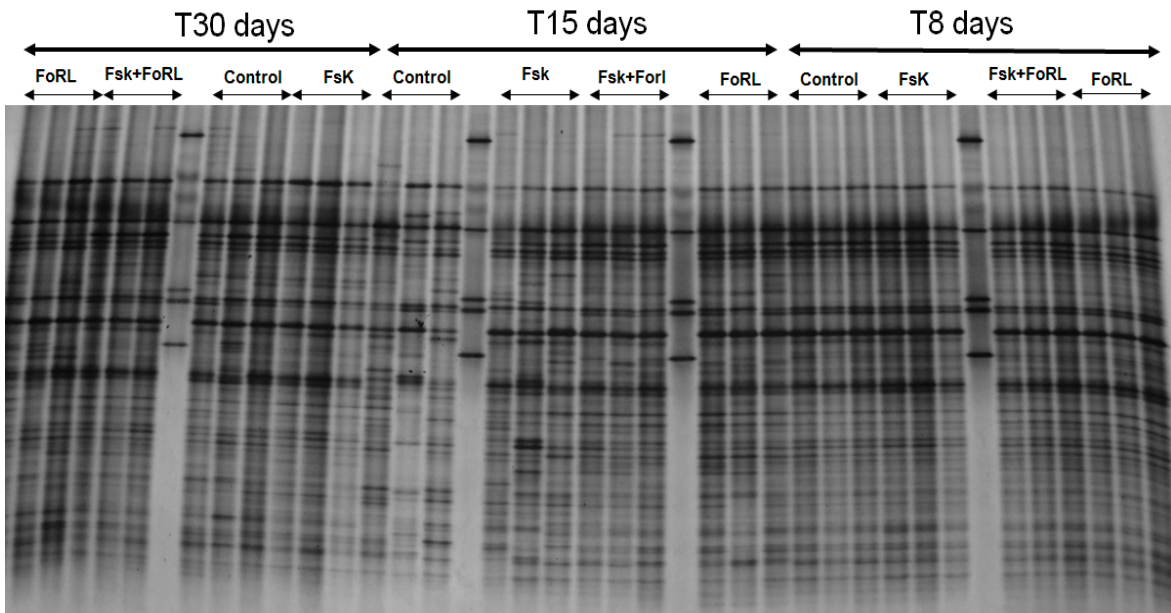
20x TAE 0.5ml

dd H₂O 3.5ml



Εικόνα 14.7 Εικόνα πηκτής πολυακρυλαμιδίου DGGE σε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 45-65% για τις *Pseudomonas*. Στη πηκτή παρουσιάζονται οι τρεις επαναλήψεις για κάθε μεταχείριση και

χρόνο δειγματοληψίας όπου φαίνεται η υψηλή επαναληψιμότητα και χαμηλή παραλλακτικότητα μεταξύ των επαναλήψεων της ίδιας μεταχείρισης



Εικόνα 15. Εικόνα πηκτής πολυακρυλαμιδίου DGGE σε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 45-60% για τα α-πρωτεοβακτήρια. Στη πηκτή παρουσιάζονται οι τρεις επαναλήψεις για κάθε μεταχείριση και χρόνο δειγματοληψίας όπου φαίνεται η υψηλή επαναληψιμότητα και χαμηλή παραλλακτικότητα μεταξύ των επαναλήψεων της ίδιας μεταχείρισης

Βιβλιογραφία

BAREA JM, POZO MJ, AZCON R, AZCON-AGUILAR C. MICROBIAL CO-OPERATION IN THE RHIZOSPHERE. J EXP BOT 2005, 56:1761-78.

BAUDOIN. E, BENIZN E, GUCKERT A. IMPACT OF ARTIFICIAL ROOT EXUDATES ON THE BACTERIAL COMMUNITY STRUCTURE IN BULK SOIL AND MAIZE RHIZOSPHERE. SOIL BIOLOGY & BIOCHEMISTRY 2003, 35:1183-92

BOLWERK A, LAGOPODI AL, WIJFJES AH, LAMERS GE, CHIN-A-WOENG TF, LUGTENBERG BJ, BLOEMBERG GV. INTERACTIONS IN THE TOMATO RHIZOSPHERE OF TWO PSEUDOMONAS BIOCONTROL STRAINS WITH THE PHYTOPATHOGENIC FUNGUS FUSARIUM OXYSPORUM F. SP. RADICIS-LYSPERSICI. MOL PLANT MICROB INTERACT 2003, 16:983-93.

BOLWERK A, LAGOPODI AL, LUGTENBERG BJ, BLOEMBERG GV. VISUALIZATION OF INTERACTIONS BETWEEN A PATHOGENIC AND A BENEFICIAL FUSARIUM STRAIN DURING BIOCONTROL OF TOMATO FOOT AND ROOT ROT. MOL PLANT MICROBE INTERACT 2005 18:710-21.

CHIN-A-WOENG TFC, BLOEMBERG GV, LUGTENBERG BJJ. PHENAZINES AND THEIR ROLE IN BIOCONTROL BY PSEUDOMONAS BACTERIA. NEW PHYTOLOGIST 2003, 157:503-523.

COLE S AND GIRONS IS, BACTERIAL GENOMICS, FEMS MICROBIOL REV 1994 14:139-60

COMPANT S, CLEMENT C, SESSITSCH A. PLANT GROWTH-PROMOTING BACTERIA IN THE RHIZO- AND ENDOSPHERE OF PLANTS: THEIR ROLE, COLONIZATION, MECHANISMS INVOLVED AND PROSPECTS FOR UTILIZATION. SOIL BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY 2009, ARTICLE IN PRESS.

CICCILO F, FIORE A, BEVIVINO A, DALMASTRI C, TABACCHIONI S, CHIARINI L, EFFECTS OF TWO DIFFERENT APPLICATION METHODS OF BURKHOLDERIA AMBIFARIA MCI7 ON PLANT GROWTH AND RHIZOSPHERIC BACTERIAL DIVERSITY, ENVIRON MIRCROBIOL 2002 4:238-45

CRONIN D, MOENNE-LOCCOZ Y, FENTON A, DUNNE C, DOWLING DN, O'GARA F. ECOLOGICAL INTERACTION OF A BIOCONTROL PSEUDOMONAS FLUORESCENS STRAIN PRODUCING 2,4-DIACETYLPHELOGLUCINOL WITH THE SOFT ROT POTATO PATHOGEN ERWINIA CAROTOVORA SUBSP. ATROSEPTICA, FEMS MICROBIOLOGY ECOLOGY 1997, 23:95-106.

CUI J, BAKHRAMI AK, PRINGLE EG, HERNANDEZ-GUZMAN G, BANDER CL, PIERCE NE, AUSUBEL FM. PSEUDOMONAS SYRINGAE MANIPULATES SYSTEMIC PLANT DEFENSES AGAINST PATHOGENS AND HERBIVORES. PNAS 2005, 102: 1791-1796.

DE BOER M, BOM P, KINDT F, KEURENTJER JB, VAN DER SLUIS I, VAN LOON LC, BAKKER PAHM. CONTROL OF FUSARIUM WILT OF RADISH BY COMBINING PSEUDOMONAS PUTIDA STRAINS THAT HAVE DIFFERENT DISEASE-SUPPRESSIVE MECHANISMS. PHYTOPATHOLOGY 2003, 93:626-32.

DOBBELAERE S, CROONENBORGHES A, THYS A, VAN DE BROEK A, VANDERLEYDEN J. PHYTOSTIMULATORY EFFECT OF AZOSPIRILLUM BRASILENSE WILD TYPE AND MUTANT STRAINS ALTERED IN IAA PRODUCTION ON WHEAT. PLANT AND SOIL 1999, 212:155-164.

DUNBAR J, TICKNOR LO, KUSKE CR, ASSESSMENT OF MICROBIAL DIVERSITY IN FOUR SOUTHWESTERN UNITED STATES BY 16S rRNA GENE TERMINAL RESTRICTION FRAGMENT ANALYSIS, 2000 APPL ENVIRON MICROBIOL 2000 66:2943-2950

FISHER MM, TRIPLETT EW, AUTOMATED APPROACH FOR RIBOSOMAL INTERGENIC SPACER ANALYSIS OF MICROBIAL DIVERSITY AND ITS APPLICATION TO FRESHWATER BACTERIAL COMMUNITIES, APPL ENVIRON MICROBIOL 1999 65:4630-6

GARDENER BBMc. DIVERSITY AND ECOLOGY OF BIOCONTROL PSEUDOMONAS SPP IN AGRICULTURAL SYSTEMS. PHYTOPATHOLOGY 2007, 97:221-226

GLICK BR. MODULATION OF PLANT ETHYLENE LEVELS BY THE BACTERIAL ENZYME ACC DEAMINASE. FEMS MICROBIOL LETT 2005, 252:1-7.

GOVINDASAMY V, SENTHILKUMAR M, GAIKWAD K, ANNAPURNA K,. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ACC DEAMINASE GENE FROM TWO PLANT GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA. CURRENT MICROBIOLOGY 57, 2008: 312-317

GUO Y, ZHENG H, YANG Y, WANG H.. CHARACTERIZATION OF PSEUDOMONAS CORRUGATA STRAIN P94 ISOLATED FROM SOIL IN BEIJING AS A POTENTIAL BIOCONTROL AGENT. CURR. MICROBIOL, 2007, 55: 247-253.

HARMAN GE, HOWELL CR, VITERBO A, CHET I, LORITO M. TRICHODERMA SPECIES-OPPORTUNISTIC, AVIRULENT PLANT SYMBIONTS. NATURE REVIEWS MICROBIOLOGY 2004, 2:43-56.

- HIRANO SS,. ECOLOGY AND PHYSIOLOGY OF PSEUDOMONAS SYRINGAE. *BIO/TECHNOLOGY*, 1985, 3: 1073 – 1078
- IKEDA S, YTOW N, EZURA H, MINAMISAWA K, FUJIMURA T. SOIL MICROBIAL COMMUNITY ANALYSIS IF THE ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT OF TRANSGENIC PLANTS. *PLANT BIOTECHNOLOGY* 2006, 23:137-151.
- KAMILOVA F, KRAVCHENKO LV, SHAPOSHNIKOV AI, AZAROVA T, MAKAROVA N, LUGTENBERG BJJ. ORGANIC ACIDS, SUGARS, AND L-TRYPTOPHATE IN EXUDATES OF VEGETABLES GROWING ON STONEWOOL AND THEIR EFFECTS ON ACTIVITIES OF RHIZOSPHERE BACTERIA. *MOL PLANT MICROBE INTERACT* 2006A, 19:250-56.
- KAMILOVA F, KRAVCHENKO LV, SHAPOSHNIKOV AI, MAKAROVA N, LUGTENBERG BJJ. EFFECTS OF THE TOMATO PATHOGEN *FUSARIUM OXYSPORUM* F.SP.RADICIS-LYCOPERSICI AND THE BIOCONTROL BACTERIUM *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* WCS365 ON THE COMPOSITION OF ORGANIC ACIDS AND SUGARS IN TOMATO ROOT EXUDATES. *MOL PLANT MICROBE INTERACT* 2006B, 19:1121-26.
- KAMILOVA F, LAMERS G, LUGTENBERG B. BIOCONTROL STRAIN *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* WCS365 INHIBITS GERMINATION OF *FUSARIUM OXYSPORUM* SPORES IN TOMATO ROOT EXUDATES AS WELL AS SUBSEQUENT FORMATION OF NEW SPORES. *ENVORIN MICROBIOL* 2008, 10:2455-61.
- KARPOUZAS DG, MORGAN JAW, WALKER A. ISOLATION AND CHARACTERISATION OF ETHOPROPHOS-DEGRADING BACTERIA. *FEMS MICROBIOL ECOL*, 2000, 33: 209-218
- KAVROULAKIS N, EHALIOTIS C, NTOUGIAS S, ZERVAKIS GI, PAPADOPOULOU KK. LOCAL AND SYSTEMIC RESISTANCE AGAINST FUNGAL PATHOGENS OF TOMATO PLANS ELICITED BY A COMPOST DERIVED FROM AGRICULTURAL RESIDUES. *PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR PLANT PATHOLOGY* 2005, 66: 163-74.
- KAVROULAKIS N, NTOUGIAS S, ZERVAKIS GI, EHALIOTIS C, HARALAMPIDIS K, PAPADOPOULOU KK. ROLE OF ETHYLENE IN THE PROTECTION OF TOMATO PLANTS AGAINST SOIL-BORNE FUNGAL PATHOGENS CONFERRED BY AN ENDOPHYTIC *FUSARIUM SOLANI* STRAIN. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY* 58 2007, 14:3853-64.
- KHMEL IA, SOROKINA TA, LEMANOVA NB, LIPASOVA VA, METLITSKI OZ, MURDEINAYA TV, CHERNIN LS, BIOLOGICAL CONTROL OF CROWN GALL IN GRAPEVINE AND RASPBERRY BY TWO *PSEUDOMONAS* SPP. WITH A WIDE SPECTRUM OF ANTAGONISTIC ACTIVITY, *BIOCONTROL SCIENCE AND TECHNOLOGY* 1998 8:45-57

LAGOPODI AL, RAM AF, LAMERS GE, PUNT PJ, VAN DEN HONDEL CA, LUGTENBERG BJ, BLOEMBERG GV, NOVEL ASPECTS OF TOMATO ROOT COLONIZATION AND INFECTION BY FUSARIUM OXYSPORUM F. SP. RADICIS-LYCOPERSICI REVEALED BY CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPIC ANALYSIS USING THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN AS A MARKER, MOL PLANT MICROBE INTERACT 2002 15:172-9.

LALUCAT J, BENNASAR A, BOSCH R, GARCIA-VALDES E, PALLERONI NJ, 2006. BIOLOGY OF PSEUDOMONAS STUTZERI. MICROBIOL MOLEC BIOL REV 70: 510-547.

LEE D-H, ZO Y-G, KIM S-J, NONRADIOACTIVE METHOD TO STUDY GENETIC PROFILES OF NATURAL BACTERIAL COMMUNITIES BY PCR-SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM, APPL ENVIRON MICROBIOL 1996 62:3112-20

LIANG, Z., DRIJBER, R.A., LEE, D.J., DWIEKAT, I.M., HARRIS, S.D., WEDIN, D.A. A DGGE-CLONING METHOD TO CHARACTERIZE ARBUSCULAR MYCORRHIZAL COMMUNITY STRUCTURE IN SOIL. SOIL BIOLOGY & BIOCHEMISTRY 2008, 40, 956-966.

LUCAS-GARCIA JA, PROBANZA A, RAMOS B, COLON-FLORES JJ, GUTIERREZ-MANERO FJ. EFFECTS OF PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA (PGPRs) ON THE BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, NODULATION AND GROWTH OF LUPINUS ALBUS I. CV. MULTOLUPA. ENGINEERING LIFE SCIENCES 2004, 4:71-77.

LUGTENBERG B, KAMILOVA F. PLANT-GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA. ANNU REV MICROBIOL 2009, 63:541-56.

MCCAIG, A.E., GLOVER, L.A., PROSSER, J.I.,. NUMERICAL ANALYSIS OF GRASSLAND BACTERIAL COMMUNITY STRUCTURE UNDER DIFFERENT LAND MANAGEMENT REGIMENS BY USING 16S RIBOSOMAL DNA SEQUENCE DATA AND DENATURATING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS BANDING PATTERNS. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY 2001, 67:4554-4559.

MORRIS CE, SANDS DC, VINATZER BA, GLAUX C, GUIBAUD C, BUFFIERE A, YAN S, DOMINGUEZ H, THOMPSON BM. THE LIFE HISTORY OF THE PLANT PATHOGENS IS LINKED TO THE WATER CYCLE. ISME 2008, 2:321-334

MYZER G, DE WAAL EC, UITTERLINDEN AG, PROFILING OF COMPLEX MICROBIAL POPULATION BY DENATURING GRADIENT ELECTROPHORESIS ANALYSIS OF POLYMERASE CHAIN REACTION-AMPLIFIED GENES CODING FOR 16S rRNA, 1993 APPL ENVIRON MICROBIOL 59:695-0

NAIK PR, RAMAN G, NARAYANAN KB, SAKTHIVEL N. ASSESSMENT OF GENETIC AND FUNCTIONAL DIVERSITY OF PHOSPHATE SOLUBILIZING FLUORESCENT PSEUDOMONADS ISOLATED FROM RHIZOSPHERIC SOIL. BMC MICROBIOL 2008, 8:230-44.

NAKAGAWA Y, SAKANE T, YOKOTA A.. TRANSFER OF "PSEUDOMONAS RIBOFLAVINA" (FOSTER 1944), A GRAM-NEGATIVE, MOTILE ROD WITH LONG-CHAIN 3-HYDROXY FATTY ACIDS, TO DEVOSIA RIBOFLAVIN GEN. NOV., SP. NOV., NOM. REV. INT. J. SYSTEM. BACTERIOL, 1996,46:16-22.

NEENO-ECKWALL EC, SCHOTTEL JL. OCCURRENCE OF ANTIBIOTIC RESISTANCE IN THE BIOLOGICAL CONTROL OF POTATO SCAB DISEASE. BIOLOGICAL CONTROL 1999, 16:199-208.

NUBEL U, ENGELEN B, FELSKE A, SNAIDR J, WIESHUBER A, AMANN RI, LUDWIG W, BACKHAUS H, SEQUENCE HETEROGENEITIES OF GENES ENCODING 16S rRNAs IN PAENIBACILLUS POLYMYXA DETECTED BY TEMPERATURE GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS, J BACTERIOL 1996 178:5636-43

ORITA M, SUZUKI Y, SEKIYA Y, HAYASHI K, A RAPID AND SENSITIVE DETECTION OF POINT MUTATIONS AND GENETIC POLYMORPHISMS USING POLYMERASE CHAIN REACTION, GENOMICS 1989 5:874-879

OSBORN AM, MOORE ERB, TIMMIS KN, AN EVALUATION OF TERMINAL-RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISMS (T-RFLP) ANALYSIS FOR THE STUDY OF MICROBIAL COMMUNITY STRUCTURE AND DYNAMICS, ENVIRON MICROBIOL 2000 2:39-50

PERSELLO-CARTIEAUX F, NUSSAUME L, ROBAGLIA C. TALES FROM THE UNDERGROUND: MOLECULAR PLANT-RHIZOSBACTERIA INTERACTIONS. PLANT, CELL AND ENVIRONMENT 2003, 26;189-199.

PIERIC R, THOLEN D, POORTER H, VISSER EJW, VOESENEK LACJ. THE JANUS FACTOR OF ETHYLENE: GROWTH INHIBITION AND STIMULATION. TRENDS PLANT SCI 2006, 11:176-183.

RICHARDSON AE. PROSPECTS FOR USING SOIL MICROORGANISMS TO IMPROVE THE ACQUISITION OF PHOSPHORUS BY PLANTS., AUST J PLANT PHYSIOL 2001, 28:8797-906.

ROSAS SB, ANDRES JA, ROVERA M, CORREA NS. PHOSPHATE-SOLUBILIZING PSEUDOMONAS PUTIDA CAN INFLUENCE THE RHIZOBIA-LEGUME SYMBIOSIS. SOIL BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY 2006, 38:3502-5.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (SECOND ED). COLD SPRING HARBOR, 1989, NY: COLD SPRING HARBOR LABORATORY.

SHORESH M, HARMAN GE, MASTOURI F. INDUCED SYSTEMIN RESISTANCE AND PLANT RESPONSES TO FUNGAL BIOCONTROL AGENTS. ANNU REV PHYT, 2010, 48:1-23

SIMMONS M, PERMENTIER HP, DE WEGER LA, WIJFFELMAN CA, LUGTENBERG BJJ. AMINO ACID SYNTHESIS IS NECESSARY FOR TOMATO ROOT COLONIZATION BY PSEUDOMONAS FLUORESCENS STRAN WCS365. MOL PLANT MICROBE INT 1997, 10:102-6.

SMITH SE AND READ DJ. MYCORRHIZAL SYMBIOSIS. ACADEMIC PRESS 3RD EDITION 2008.

STACKEBRANDT E, MURRAY R.G, TRUPER H.G. PROTEOBACTERIA CLASSIS NOV., A NAME FOR THE PHYLOGENETIC TAXON THAT INCLUDES THE "PURPLE BACTERIA AND THEIR RELATIVES". INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY 1988, 38:321-325

TONIN C, VANDENKOORNHUYSE P, JONER EJ, STRACZEK J, LEYVAL C, ASSESSMENT OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI DIVERSITY IN THE RHIZOSPHERE OF VIOLA CALAMINARIA AND EFFECT OF THESE FUNGI ON HEAVY METAL UPTAKE BY CLOVER, MYCORRHIZA 2001 10:161-168

VANCE CP. SYMBIOTIC NITROGEN FIXATION AND PHOSPHORUS ACQUISITION. PLANT NUTRITION IN A WORLD OF DECLINING RENEWABLE RESOURCES. PLANT PHYSIOLOGY 2001, 127:390-7.

VILLEGAS J, FORTIN JA. PHOSPHORUS SOLUBILIZATION AND PH CHANGES AS A RESULT OF THE INTERACTIONS BETWEEN SOIL BACTERIA AND ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI ON A MEDIUM CONTAINING NO₃⁻ AS NITROGEN SOURCE. CAN J BOT 2001, 80:571-576.

VIVAS A, BAREA JM, AZCON R. INTERACTIVE EFFECT OF BREVIACILLUS BREVIS AND GLOMUS MOSSEAE, BOTH ISOLATED FROM Cd-CONTAMINATED SOIL, ON PLANT GROWTH, PHYSIOLOGICAL MYCORRHIZAL FUNGAL CHARACTERISTICS AND SOIL ENZYMATIC ACTIVITIES IN Cd POLLUTED SOIL. ENVIRONMENTAL POLLUTION 2005, 134:257-66.

WHIPPS JM, MICROBIAL INTERACTIONS AND BIOCONTROL IN THE RHIZOSPHERE, JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY 2001 52:487-511

WHITELAW MA. GROWTH PROMOTION OF PLANTS INOCULATED WITH PHOSPHATE-SOLUBILIZING FUNGI. ADVANCES IN AGRONOMY 2000, 69:99-151.

ZAHIR ZA, ARSHAD M, FRANKENBERGER WT. PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA: APPLICATIONS AND PERSPECTIVES IN AGRICULTURE. ADVANCES IN AGRONOMY 2004, 81:97-168.