



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας
και Βιοτεχνολογίας
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ-ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΦΥΛΛΟΣΦΑΙΡΑ: ΟΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΕΝΟΣ
ΑΝΕΞΕΡΕΥΝΗΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΚΟΣΜΟΥ ΣΕ
ΔΙΑΦΥΛΛΙΚΕΣ ΚΑΙ ΕΔΑΦΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ
ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ**

Χρήστος Γ. Πετσούλας

ΛΑΡΙΣΑ 2013

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας
και Βιοτεχνολογίας
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ-ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Χρήστος Γ. Πετσούλας

ΦΥΛΛΟΣΦΑΙΡΑ: ΟΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΕΝΟΣ ΑΝΕΞΕΡΕΥΝΗΤΟΥ
ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΚΟΣΜΟΥ ΣΕ ΔΙΑΦΥΛΛΙΚΕΣ ΚΑΙ ΕΔΑΦΙΚΕΣ
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Εξεταστική Επιτροπή

| Επιβλέπων | Μέλος | Μέλος |
|--|--|--|
| Δημήτριος Καρπούζας | Καλλιόπη Παπαδοπούλου | Δημήτριος Μόσσιαλος |
| Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας | Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών | Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων |

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα επίκουρο καθηγητή κ. Δημήτριο Καρπούζα για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το θέμα αυτό και που με την καθοδήγηση του , τις συμβουλές του και την αμέριστη συμπαράσταση του με βοήθησε στην πραγματοποίηση της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Ευχαριστίες επίσης θα ήθελα να εκφράσω και στα άλλα μέλη της επιτροπής, την αναπληρώτρια καθηγήτρια κα Καλλιόπη Παπαδοπούλου και τον επίκουρο καθηγητή κ. Δημήτριος Μόσσιαλο για τις χρήσιμες υποδείξεις για την ολοκλήρωση της διατριβής.

Τέλος, ευχαριστώ την υποψήφια διδάκτορα κ. Κωνσταντίνα Ρουσίδου για την σημαντική της βοήθεια και συμβολή στην εκπόνηση της μελέτης μου αλλά και τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Παναγιώτη Καρά που βοήθησε σημαντικά στην εγκατάσταση του πειράματος.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|---|----|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | 5 |
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ | |
| Φυλλόσφαιρα γενικά | 7 |
| Παράγοντες που επηρεάζουν την σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας της φυλλόσφαιρας..... | 8 |
| Επιδράσεις γεωργικών φαρμάκων στην σύσταση της μικροβιακής κοινότητας της φυλλόσφαιρας..... | 11 |
| Επιδράσεις γεωργικών φαρμάκων στην σύσταση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους..... | 13 |
| Imidacloprid..... | 14 |
| Metalaxyl..... | 15 |
| Μέθοδοι προσδιορισμού της σύστασης της μικροβιακής κοινότητας..... | 15 |
| Στόχος της εργασίας..... | 20 |
| ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | |
| Πειραματικό σχεδιασμός..... | 21 |
| Εξαγωγή DNA..... | 22 |
| Ενίσχυση τμήματος του 16S rDNA βακτηρίων με τη τεχνική της PCR εσωτερικής ένθεσης..... | 22 |
| Ενίσχυση της ITS περιοχής των μυκήτων με τη τεχνική της PCR ημι-εσωτερικής ένθεσης..... | 25 |
| Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτη αгарόζης..... | 27 |
| Ηλεκτροφόρηση σε πήκτη με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) για βακτήρια και για μύκητες..... | 28 |
| Στατιστική ανάλυση DGGE..... | 29 |
| ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | |
| Αποτελέσματα εξαγωγής DNA από την φυλλόσφαιρα πιπεριάς..... | 30 |
| Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)- βακτήρια..... | 31 |
| Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)- μύκητες..... | 33 |
| Μοριακή αποτύπωση της βακτηριακής κοινότητας στην φυλλόσφαιρα φυτών πιπεριάς..... | 34 |
| Μοριακή κοινότητα της κοινότητας των μυκήτων στην φυλλόσφαιρα φυτών πιπεριάς..... | 36 |
| ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 39 |
| ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ | 40 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 42 |

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα μικρόβια που κατοικούν στην φυλλόσφαιρα των καλλιεργειών εκτίθενται σε συνθήκες στρες που προκαλούνται από διάφορους παράγοντες όπως η ακτινοβολία και η έλλειψη νερού, αλλά και από γεωργικά φάρμακα τα οποία εφαρμόζονται είτε απευθείας επάνω στο φύλλωμα του φυτού ή έμμεσα μέσω εδαφικών εφαρμογών. Παρά το γεγονός ότι, η μικροβιολογία της φυλλόσφαιρας έχει εξελιχθεί τα τελευταία χρόνια, λίγα είναι ακόμη γνωστά όσον αφορά τις επιπτώσεις των γεωργικών φαρμάκων στην επίφυτη μικροβιακή κοινότητα και ιδιαίτερα για τις ενδεχόμενες επιπτώσεις στους μύκητες. Προσδιορίσαμε την επίδραση δύο διασυστημικών παρασιτοκτόνων, του metalaxyl και του imidacloprid, με εφαρμογή τους είτε στο φύλλωμα είτε μέσω του εδάφους (ριζοπότισμα), στις κοινότητες μυκήτων και βακτηρίων στην φυλλόσφαιρα φυτών πιπεριάς με την χρήση ηλεκτροφόρησης σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (DGGE, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) . Και τα δύο γεωργικά φάρμακα είχαν μάλλον ήπιες επιπτώσεις τόσο στην κοινότητα των μυκήτων όσο και των βακτηρίων με μόνη εξαίρεση την εφαρμογή του imidacloprid στο φύλλωμα των φυτών της πιπεριάς η οποία έδειξε μια πιο εμφανή επίδραση στην κοινότητα των μυκήτων σε σύγκριση με τις άλλες μεταχειρίσεις. Περαιτέρω μελέτες θα έχουν ως στόχο να απομονώσουν και να χαρακτηρίσουν τα στελέχη των μυκήτων που έδειξαν κάποια αντίδραση κατά την εφαρμογή των γεωργικών φαρμάκων, ώστε να μπορεί να διερευνήσει κανείς τις αλληλεπιδράσεις τους.

Abstract

Microbes inhabiting the phyllosphere of crops are exposed to a variety of stress conditions such as radiation, desiccation but also to pesticides which are applied either directly onto plant foliage or indirectly through soil. Although, phyllosphere microbiology has been evolved in recent years, little is still known regarding the impact of pesticides on the epiphytic microbial community and especially on potential impacts on fungi. We determined the impact of two systemic pesticides, metalaxyl and imidacloprid, applied either on foliage or through soil on the epiphytic fungal and bacterial community via DGGE analysis. Both pesticides induced rather mild effects on both the fungal and the bacterial community with the only exception being the foliage application of imidacloprid which showed a more prominent effect on the fungal community compared to the other treatments. Further studies will focus on the isolation of epiphytic yeast and bacterial strains which appear, based on our current results, to be stimulated by pesticides application.

Εισαγωγή

Φυλλόσφαιρα

Ως φυλλόσφαιρα ορίζεται το ενδιαίτημα που αποτελείται από τα υπέργεια μέρη των φυτών ,ενώ επίφυτα καλούνται οι μικροοργανισμοί που τα αποικίζουν. Οι κοινότητες τους αποτελούνται κυρίως από βακτήρια, ζύμες και μύκητες ενώ μικρότεροι είναι οι πληθυσμοί των αρχαίων (Knief et al.,2012).

Τα βακτήρια είναι με διαφορά οι πιο πολυάριθμοι έποικοι της φυλλόσφαιρας , συχνά τους βρίσκουμε σε αριθμούς που φτάνουν κατά μέσο όρο τα 10^6 - 10^7 κύτταρα/cm² φύλλου. Η συνολική επιφάνεια των φύλλων σε όλη την Γή, που μπορεί να εποικιστεί από βακτήρια υπολογίζεται περίπου σε $6,4 \times 10^8$ Km² και ο συνολικός βακτηριακός πληθυσμός της φυλλόσφαιρας μπορεί να φθάνει τα 10^{26} κύτταρα. Ένας πληθυσμός ικανός να επηρεάζει τόσο την συμπεριφορά των φυτών που αποικίζει όσο και να συμβάλει σε διαδικασίες σημαντικές για όλο το φυσικό περιβάλλον (Lindow et al.,2003)

Τα φύλλα είναι η κυρίαρχη δομή στην φυλλόσφαιρας έτσι οι περισσότερες μελέτες αφορούν αυτά ενώ λίγες είναι οι εργασίες που αφορούν τον εποικισμό καρπών και ανθέων. Το ενδιαφέρον για την μικροβιολογία της φυλλόσφαιρας προέκυψε αρχικά λόγω της ανάγκης για μελέτη της συμπεριφοράς των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών ως μέρος της προσπάθειας μας για τον έλεγχο τους, αναγνωρίζεται όμως πλέον ότι και τα μη φυτοπαθογόνα επίφυτα έχουν σημαντικό ρόλο. Ξεχωρίζει ο ρόλος τους στην ρύθμιση του μεγέθους των πληθυσμών των παθογόνων ως παράγοντες βιολογικού ελέγχου (Whipps et al.,2008, Lindow & Leveau,2002), ως αντιπαγετικοί παράγοντες (Braun-Kiewnick et al.,2000), η δυνατότητα τους να ρυθμίζουν το άζωτο στην φυλλόσφαιρα (Miyamoto et al.,2004), να χρησιμοποιούν τη μεθανόλη ως πηγή τροφής (Delmotte et al., 2009) και να αποδομούν οργανικούς ρύπους (Ning et al., 2010). Τα τελευταία χρόνια το ξέσπασμα κάποιων επιδημιών εξαιτίας της κατανάλωσης φρέσκων φρούτων και λαχανικών , έχει εγείρει ανησυχίες για την πιθανή μόλυνση φυτών προσυλλεκτικά από παθογόνους για τον άνθρωπο μικροοργανισμούς (Whipps et al.,2008).

Με την ανάπτυξη των νέων μοριακών και μικροσκοπικών εργαλείων οι ερευνητές έχουν την δυνατότητα να καταλάβουν καλύτερα τόσο την ταυτότητα των επιφύτων όσο και την συμπεριφορά τους όπως επίσης και τις ιδιότητες των φυτικών επιφανειών που αποικίζουν. Επίσης οι μέθοδοι αυτοί σε αντίθεση με τις κλασσικές που εξαρτώνται από την καλλιέργεια των μικροοργανισμών σε θρεπτικά μέσα, έδειξαν το πραγματικό μέγεθος των επιφύτων και την πολυπλοκότητα των κοινοτήτων τους (Yang et al., 2001), εξακολουθεί όμως να είναι μικρότερη σε σχέση με τις μικροβιακές κοινότητες που συναντάμε στο έδαφος (Vorholt, 2012).

Η φυλλόσφαιρα μπορεί να παίξει ένα σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της επιστήμης της οικολογίας αφού αποτελεί ένα μοναδικό περιβάλλον για τον σχεδιασμό επαναλαμβανόμενων πειραμάτων για τον έλεγχο πολλών θεωριών της οικολογίας που μέχρι σήμερα βασίζονται σε θεωρητικές αποδείξεις αλλά και αποδείξεις που βασίζονται στην παρατήρηση (Meyer & Leveau, 2011).

Παράγοντες που επηρεάζουν την σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας της φυλλόσφαιρας

Η μεταβλητότητα των φυσικών (έκθεση σε UV ακτινοβολία, απότομες μεταβολές θερμοκρασίας) και θρεπτικών (διάσπαρτες πηγές ενέργειας, περιορισμένη διαθεσιμότητα νερού) συνθηκών που επικρατούν στην φυλλόσφαιρα είναι ο καθοριστικός παράγοντας για την σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας. Διαφορές παρατηρούνται ακόμα και ανάμεσα σε φυτά του ίδιου είδους, σε διαφορετικό χρόνο της καλλιεργητικής περιόδου, σε διαφορετικά είδη φυλλώματος (πλατύφυλλα, λεπτόφυλλα, με λιπαρή επιφάνεια φύλλων). Η επίδραση του φυσικοχημικού περιβάλλοντος αντανακλά και στο πόσο διαφορετικοί είναι οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών στην φυλλόσφαιρα σε σχέση με αυτούς της ριζόσφαιρας των ίδιων φυτών (Whipps et al., 2008; Lindow et al., 2003).

Παρόλο που οι κοινότητες των επιφύτων έχουν υψηλά επίπεδα φυλογενετικής ποικιλότητας και οι μεταβολές τους γίνονται με πολύ γρήγορους ρυθμούς μέσα στην ίδια χρονιά, παράλληλα ακολουθούν αρκετά προβλέψιμα πρότυπα διαδοχής από έτος σε έτος (Redford A.J. & Fierer N., 2009).

Οι Yadav et al., (2005) μελέτησαν το πως η δομή των φύλλων και η χημική τους σύσταση επιδρούν στον βακτηριακό πληθυσμό της φυλλόσφαιρας σε 8 πολυετή είδη της Μεσογείου, στην περιοχή της Χαλκιδικής. Φαίνεται ότι τα αρωματικά είδη αποικίζονται σε μεγαλύτερο βαθμό από τα μη αρωματικά είδη, όπως και ότι ο πληθυσμός των βακτηρίων είναι μεγαλύτερος στα μη ξυλώδη είδη. Επίσης υπάρχει θετική συσχέτιση του πληθυσμού των βακτηρίων με την πυκνότητα των αδενικών και μη αδενικών τριχών, όπως και με το νερό και τον φώσφορο του φυλλώματος. Αρνητική συσχέτιση υπάρχει με την συνολική περιεκτικότητα φαινολών, το πάχος του φύλλου του μεσόφυλλου και της άνω επιδερμίδας. Δεν βρέθηκε συσχέτιση με την πυκνότητα των στομάτων, του αζώτου και των διαλυτών σακχάρων. Σε φύλλα με περιεκτικότητα σε νερό > 73% ο αποικισμός ήταν υψηλότερος. Για φύλλα με περιεκτικότητα σε νερό < 73%, η περιεκτικότητα σε φώσφορο, με την κρίσιμη τιμή των $1,34 \text{ mg g}^{-1}$ ξ.β., είναι ο δεύτερος σημαντικότερος παράγοντας, ακολουθούμενος από το πάχος της άνω επιδερμίδας. Φύλλα με περιεκτικότητα φωσφόρου $> 1,34 \text{ mg g}^{-1}$ ξ.β. αποικίζονται περισσότερο και φύλλα με την άνω επιδερμίδα παχύτερη από $20,8 \mu\text{m}$ αποικίζονται λιγότερο.

Οι Vokou et al., (2012) μελέτησαν την βακτηριακή κοινότητα στη φυλλόσφαιρα Μεσογειακών ειδών και τη σχέση της με τα βακτήρια της ατμόσφαιρας στο ίδιο περιβάλλον. Επισημαίνουν την αξιοσημείωτη παρουσία στη φυλλόσφαιρα βακτηρίων λακτικού οξέως κάτω από τις σκληρές συνθήκες του Μεσογειακού καλοκαιριού, επίσης προφανής είναι η ανομοιομορφία στην δομή της κοινότητας των βακτηρίων της φυλλόσφαιρας με αυτήν της ατμόσφαιρας. Σημαντικές είναι και οι διαφορές στην φυλλόσφαιρα των διαφορετικών ειδών παρότι γειτονεύουν. Τέλος τονίζουν το ότι η ύπαρξη ή μη αδενικών τριχών στο φύλλωμα καθορίζει τα πρότυπα ανάπτυξης των αποικιών των επιφύτων.

Σε εργασία των Peñuelas et al., (2012) μελετήθηκε η επίδραση της εποχικής μεταβολής και της ξηρασίας στην ποικιλότητα και στο μέγεθος της μικροβιακής κοινότητας της φυλλόσφαιρας της βελανιδιάς (*Quercus ilex*), του πιο διαδεδομένου δένδρου της Μεσογείου. Τόσο το μέγεθος όσο και η ποικιλότητα φαίνεται να αυξάνονται τους καλοκαιρινούς μήνες αλλά και σε

περιόδους ξηρασίας, κάτι που μας δείχνει μια από τις επιπτώσεις της κλιματικής αλλαγής και της υπερθέρμανσης του πλανήτη.

Οι Ruppel et al., (2008) μελέτησαν την συσχέτιση της συγκέντρωσης καροτενοειδών και γλυκοζινολών σε τέσσερα είδη φυτών (σινάπι, ελαιοκράμβη, αντίδι, σπανάκι) με το μέγεθος του βακτηριακού πληθυσμού στην φυλλόσφαιρα τους. Σε τρία συνεχόμενα πειράματα τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα φυτά τόσο στην σύνθεση και στην συγκέντρωση των δευτερογενών μεταβολιτών όσο και στο μέγεθος και στην σύνθεση του πληθυσμού των επιφύτων. Φαίνεται επίσης η θετική συσχέτιση της πυκνότητας του βακτηριακού πληθυσμού με την συγκέντρωση των β-καροτενοειδών και στα τέσσερα φυτά, όπως και η θετική συσχέτιση με διάφορους γλυκοζινολήτες. Αρνητική συσχέτιση του βακτηριακού πληθυσμού βρέθηκε με την 2-φαινυλαιθύλ- γλυκοζινόλη.

Οι Marcell & Beattie et al., (2002) μελέτησαν την ανάπτυξη διαφορετικών ειδών βακτηρίων σε τέσσερις τύπους καλαμποκιού που με μεταλλάξεις απέκτησαν διαφορετική ικανότητα βιοσύνθεσης κρυστάλλων της κηρώδους επιδερμίδας. Στα φυτά με την μικρότερη πυκνότητα κρυστάλλων όπου η μετακίνηση του νερού είναι μεγαλύτερη αναπτύσσονται πιο γρήγορα μεγαλύτεροι πληθυσμοί βακτηρίων.

Οι Jacobs & Sundin et al., (2001) μελέτησαν την επίδραση της υπέρυθρης ακτινοβολίας στην φυλλόσφαιρα φιστικιών. Με την χρήση φίλτρων σε φυτά που αναπτύσσονταν κανονικά στο χωράφι, έδειξαν ότι αυτό που επηρεάζεται από την υπέρυθη ακτινοβολία είναι η σύνθεση του βακτηριακού πληθυσμού και όχι το μέγεθος του και ότι οι ανθεκτικοί φαινότυποι επικρατούν στην κοινότητα αργά στην καλλιεργητική περίοδο.

Οι Grimm et al., (2005) σε πειράματα τους σε φράουλες απομόνωσαν πληθυσμούς επιφύτων με σκοπό να μελετήσουν την αλληλεπίδραση τους με την διαπερατότητα της φυλλικής επιφάνειας. Σε φυτά υπαίθριας καλλιέργειας τα επίφυτα βρίσκονται κυρίως στο κάτω μέρος του φυλλώματος ενώ στο θερμοκήπιο συμβαίνει το αντίθετο. Οι μύκητες αποτελούν σημαντικό μέρος της μικροβιακής βιομάζας στο θερμοκήπιο ενώ στην ύπαιθρο σπάνια είναι σε μεγάλο πληθυσμό. Με την βοήθεια μικροσκοπίου φαίνεται επίσης ότι οι πιο

πυκνοί πληθυσμοί βακτηρίων παρατηρούνται γύρω από τις τρίχες των φύλλων που προφανώς αποτελούν πηγές θρεπτικών συστατικών. Τα επικρατούντα γένη βακτηρίων ήταν τα *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus* και *Arthrobacter*. Φάνηκε επίσης ότι η διαπερατότητα της επιδερμίδας των φυτών από το νερό μπορεί να τροποποιηθεί από τις βακτηριακές κοινότητες ώστε να βελτιώσουν τις συνθήκες διαβίωσης τους στην φυλλόσφαιρα.

Επιδράσεις γεωργικών φαρμάκων στην σύσταση της μικροβιακής κοινότητας της φυλλόσφαιρας.

Παρόλο που σχεδόν όλα τα γεωργικά φάρμακα που εφαρμόζονται στα φυτά έρχονται σε επαφή με το φύλλωμα τους, η σχέση των μικροβιακών πληθυσμών της φυλλόσφαιρας με την αποδόμηση αυτών των ουσιών παραμένει σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστη.

Οι Zang et al., (2009) μελέτησαν την επίδραση της εντομοκτόνου ουσίας cypermethrin στην μικροβιακή κοινότητα της φυλλόσφαιρας φυτών πιπεριάς. Για την ανάλυση της μικροβιακής κοινότητας χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι ανεξάρτητες από την καλλιέργεια, η PLFA και ο συνδυασμός PCR και DGGE. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τόσο η συνολική όσο και η βακτηριακή βιομάζα αυξήθηκαν μετά την εφαρμογή του εντομοκτόνου, επίσης τα gram αρνητικά βακτήρια επικράτησαν και η σύνθεση του πληθυσμού μεταβλήθηκε. Στα φυτά μάρτυρες κυρίαρχα είναι τα φύλα *Firmicutes* ενώ στα ψεκασμένα φυτά κυρίαρχα είναι τα φύλα των *bacteroidetes* και *γ-Proteobacteria*.

Οι Ning et al., (2010) εξέτασαν τη μεταβολή του βακτηριακού πληθυσμού στη φυλλόσφαιρα σταφυλιών μετά από την εφαρμογή του εντομοκτόνου dichlorvos. Βρέθηκε ότι η αποσύνθεση του εντομοκτόνου ήταν μεγαλύτερη στην φυλλόσφαιρα με τον μικροβιακό πληθυσμό παρών σε σχέση με την αποστειρωμένη επιφάνεια. Έξι ήταν τα γένη που επικράτησαν στον πληθυσμό μετά από την εφαρμογή του εντομοκτόνου, τα *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Sphingomonas*, *Acidovorax*, *Agrobacterium* και *Cryseobacterium*, δείχνοντας ότι μπορούν να χρησιμοποιήσουν το dichlorvos σαν πηγή ενέργειας. Για τα τρία τελευταία γένη ήταν η πρώτη αναφορά για την παραπάνω ικανότητα τους.

Οι Zang et al., (2009) μελέτησαν την επίδραση της εφαρμογής του εντομοκτόνου cypermethrin στον μικροβιακό πληθυσμό της φυλλόσφαιρας φυτών αγγουριάς. Με την βοήθεια δοκιμών PLFA φάνηκε ότι το εντομοκτόνο προκαλεί σημαντική αύξηση τόσο της συνολικής όσο και της βακτηριακής βιομάζας αλλά και μείωση της βιομάζας των μυκήτων. Τα gram αρνητικά βακτήρια αυξήθηκαν πράγμα που σημαίνει ότι το εντομοκτόνο μπορεί να ευνοεί την ανάπτυξη τους. Στα ίδια συμπεράσματα κατέληξαν και με την χρήση της μεθόδου T-RFLP.

Με την χρήση μεθόδων ανεξάρτητων από την καλλιέργεια όπως οι PLFA και T-RFLP οι Zang et al., (2008) έδειξαν ότι σε εφαρμογές χαμηλής συγκέντρωσης abamectin σε φυτά μπρόκολου, δεν επηρεάζεται σημαντικά η βιομάζα και η σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας της φυλλόσφαιρας. Πάντως σε εφαρμογές με υψηλή συγκέντρωση η μικροβιακή κοινότητα επηρεάστηκε σημαντικά, μειώθηκε η συνολική και η βακτηριακή βιομάζα όπως και η αναλογία των gram θετικών προς τα gram αρνητικά βακτήρια, αντίθετα δεν μειώθηκε η βιομάζα των μυκήτων. Η μελέτη έδειξε ότι κάποια είδη βακτηρίων παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση της αβαμικτίνης στη φυλλόσφαιρα του μπρόκολου, ενώ κάποια άλλα μπορούν να παίξουν το ρόλο βιοδεικτών για την παρουσία της συγκεκριμένης ουσίας.

Οι Gu et al., (2010) εκτίμησαν στην μελέτη τους την επίδραση του μυκητοκτόνου enostroburin στην βακτηριακή κοινότητα της φυλλόσφαιρας σπαραγιού. Χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι ανεξάρτητες από την καλλιέργεια, η 16S rDNA βιβλιοθήκη κλώνων και ο συνδυασμός PCR και DGGE. Τα κυρίαρχα γένη βακτηρίων στα φυτά που δεν είχαμε εφαρμογή ήταν τα *Pseudomonas* ενώ στα φυτά που ψεκάστηκαν ισχυρή ήταν και η παρουσία γενών του *Pantoea sp* τα οποία πιστεύεται ότι είναι και ανταγωνιστικά άλλων φυτοπαθογόνων μυκήτων.

Οι Walter et al., (2007) μελέτησαν την επίδραση των γεωργικών φαρμάκων που συνήθως χρησιμοποιούνται στην καλλιέργεια των μήλων στην Ν. Ζηλανδία σε μικροοργανισμούς μη στόχους. Ένα μέρος της έρευνας έγινε στο εργαστήριο με εφαρμογές σε είδη-δείκτες, ενώ ένα άλλο έγινε με εφαρμογές στον αγρό. Στην δεύτερη περίπτωση φάνηκε ότι οι επιπτώσεις

στον συνολικό πληθυσμό των μικροοργανισμών δεν ήταν σημαντικές και συνήθως αυτός ανέκαμπτε μετά από 2-6 ημέρες, η ποικιλότητα όμως των ειδών παρουσίασε σημαντική μείωση.

Η εφαρμογή σκευασμάτων βιολογικού ελέγχου εχθρών και φυτοπαθογόνων στα πλαίσια της ολοκληρωμένης φυτοπροστασίας έχει ευρεία αποδοχή τελευταία, λίγο είναι όμως γνωστό πώς επιδρά στην φυλλόσφαιρα. Οι Zang et al., (2009) μελέτησαν την επίδραση σκευασμάτων του *Bacillus thuringiensis* (Bt) στην φυλλόσφαιρα φυτών πιπεριάς. Για την ανάλυση της μικροβιακής κοινότητας χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι ανεξάρτητες από την καλλιέργεια, η PLFA και ο συνδυασμός PCR και DGGE. Η αλλαγή στη σύνθεση της φυλλόσφαιρας ήταν εμφανής και στις δύο μεθόδους, στα φυτά που δεν έγινε εφαρμογή Bt το κυρίαρχο φύλο βακτηρίων ήταν το *Firmicutes* ενώ όπου είχαμε εφαρμογή κυριαρχούν τα *Gamma-proteobacteria*.

Επιδράσεις γεωργικών φαρμάκων στην σύσταση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους.

Οι διάφορες αγροτικές πρακτικές που εφαρμόζονται στα εδάφη για τη μεγιστοποίηση της αγροτικής παραγωγής επηρεάζουν τους μικροοργανισμούς καθώς αλλάζουν τις φυσικές και χημικές ιδιότητες του περιβάλλοντός τους. Αρκετές εργασίες έχουν πραγματοποιηθεί για τη μελέτη της επίδρασης αγροτικών πρακτικών όπως είναι η χρήση γεωργικών φαρμάκων, χημικών και οργανικών λιπασμάτων (κοπριά, υπολείμματα καλλιεργειών) στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους (Imfeld and Vuilleumier, 2012).

Οι Tiedje et al. (1999) σύγκριναν τις επιδράσεις στις μικροβιακές κοινότητες από την εφαρμογή του ζιζανιοκτόνου 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetate) σε τρία εδάφη με διαφορετικό ιστορικό μεταχειρίσεων. Υπέθεσαν ότι διαφορετικές μεταχειρίσεις εδαφών θα έχουν διαφορετικές επιδράσεις στους μικροοργανισμούς μετά την εφαρμογή του ζιζανιοκτόνου 2,4-D. Ωστόσο, ο ίδιος πληθυσμός που αποδομεί το 2,4-D έγινε

κυρίαρχος στα τρία εδάφη, υποδεικνύοντας ότι το 2,4-D είναι ισχυρότερος παράγοντας επιλογής από τις διαφορετικές μεταχειρίσεις των τριών εδαφών.

Οι Seghers et al (2003) μελέτησαν την επίδραση της μακροχρόνιας εφαρμογής (20 έτη) των ζιζανιοκτόνων atrazine και metolachlor στη δομή της βακτηριακής κοινότητας σε καλλιεργούμενο έδαφος. Για το χαρακτηρισμό της σύστασης της μικροβιακής κοινότητας χρησιμοποίησαν την τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (DGGE) και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μακροχρόνια εφαρμογή των ζιζανιοκτόνων atrazine και metolachlor προκάλεσε μεταβολή στη δομή της μικροβιακής κοινότητας και ιδιαίτερα στη κοινότητα των μεθανοτροφών βακτηρίων.

Imidacloprid

Το imidacloprid ανήκει στην ομάδα των χλωρο-νικοτινοειδών εντομοκτόνων και επιδρά στο νευρικό σύστημα των εντόμων με διαφορετικό τρόπο. Συγκεκριμένα δεσμεύεται στους υποδοχείς της ακετυλοχολίνης και παρεμποδίζει την μεταφορά των νευρικών ερεθισμάτων. Η ισορροπία του νευρικού συστήματος των εντόμων διαταράσσεται και τελικά τα έντομα οδηγούνται στον θάνατο. Αυτός είναι και ο κύριος τρόπος δράσης του με εκδήλωση συμπτωμάτων νευροτοξικότητας. Το imidacloprid είναι εντομοκτόνο στομάχου κυρίως και δευτερευόντως επαφής. Είναι διασυστηματικό με κίνηση ακροπέταλη. Το imidacloprid φαίνεται να παρουσιάζει υψηλότερη συγγένεια για τους υποδοχείς των νευρώνων στα έντομα από ότι στα θηλαστικά και σε αυτό το λόγο οφείλεται η χαμηλή τοξικότητα του στα θηλαστικά (Elbert et al., 2008).

Το Imidacloprid είναι σήμερα το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο εντομοκτόνο στον κόσμο και πωλείται με πολλά ονόματα για πολλές χρήσεις. Πρόσφατες έρευνες όμως δείχνουν ότι η εκτεταμένη χρήση του imidacloprid και άλλων νεονικοτινοειδών, μπορούν να έχει συμβάλει στην μείωση των αποικιών μελισσών στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική που παρατηρείται από το 2006 (Whitehorn et al., 2012). Ως εκ τούτου, πολλές χώρες έχουν περιορίσει την χρήση τους. Τον Ιανουάριο του 2013, η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων δήλωσε ότι τα νεονικοτινοειδή ενέχουν απαράδεκτα υψηλό κίνδυνο για τις μέλισσες, και ότι οι μελέτες για την ασφάλεια της χρήσης τους είναι προβληματικές (EFSA, 2013).

Metalaxyl

Το metalaxyl είναι μυκητοκτόνο που χρησιμοποιείται κατά του περονόσπορου σε αμπέλι, πατάτα, καπνό, τομάτα, αγγούρι, πεπόνι κ.α.. Το *metalaxyl-M*, το οπτικώς καθαρό στερεοϊσομερές (ομάδα φαινυλαμιδίων), είναι εκλεκτικό διασυστηματικό μυκητοκτόνο, με δράση κατά των ωομυκήτων, με αποπλαστική κίνηση παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη του παθογόνου και μέσα στους φυτικούς ιστούς (Evenhuis et al., 2006). Τα τελευταία χρόνια έχει παρουσιάσει σοβαρά προβλήματα ανθεκτικότητας (Lee et al., 1999)..

Μέθοδοι προσδιορισμού της σύνθεσης της μικροβιακής κοινότητας

Αυτές μπορούν να χωρισθούν σε δύο κυρίως κατηγορίες, στις μεθόδους που βασίζονται στη καλλιέργεια των μικροοργανισμών και στις μη εξαρτώμενες από την καλλιέργεια μεθόδους.

Στο παρελθόν, οι μέθοδοι ανάλυσης των μικροοργανισμών βασίζονταν στην καλλιέργεια και στην απομόνωση (van Elsas et al., 1998). Μια μεγάλη ποικιλία θρεπτικών μέσων καλλιέργειας έχει αναπτυχθεί για να μεγιστοποιήσει την ανίχνευση ποικίλων μικροβιακών ομάδων (Sait et al., 2002; Janssen et al., 2002; Joseph et al., 2003). Μια άλλη μέθοδος που εξαρτάται από την καλλιέργεια αναπτύχθηκε από τους Garland και Mills (1991) και βασίζεται στο Biolog σύστημα. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της μικροβιακής λειτουργικής ποικιλότητας και έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε ρυπασμένα εδάφη (Koparcka et al., 1988) και σε εδάφη στα οποία έχει γίνει χρήση ζιζανιοκτόνων (EL Fantousi et al., 1999). Το μειονέκτημα των μεθόδων που στηρίζονται στη καλλιέργεια είναι ότι οι περισσότεροι μικροοργανισμοί δεν μπορούν να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο. Έχει προταθεί ότι τουλάχιστον το 95-99% των βακτηρίων που παρατηρούνται στο μικροσκόπιο δεν μπορούν να καλλιεργηθούν με συμβατικές μικροβιολογικές μεθόδους (Borneman et al., 1996). Επίσης, πολλοί μύκητες είναι δύσκολο να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο (van Elsas et al., 2000).

Η ανάπτυξη των μοριακών βιολογικών μεθόδων, οι οποίες δεν βασίζονται στη καλλιέργεια μικροοργανισμών, προσφέρει νέες δυνατότητες στην ανάλυση της μικροβιακής κοινότητας της φυλλόσφαιρας (Saito et al., 2007). Οι μοριακές αυτές τεχνικές μπορεί να βασίζονται στη ανάλυση των λιπαρών οξέων (PLFA) ως δείκτες της μικροβιακής κοινότητας ή στη χρήση

της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) επί DNA που εκχυλίστηκε από την φυλλόσφαιρα (π.χ TRFLP, RISA, ARISA, DGGE).

Οι White και Findlay (1988) ανέπτυξαν την τεχνική της ανάλυσης των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων (**PLFA**, Phospholipid Fatty Acid Analysis) από περιβαλλοντικά δείγματα για το χαρακτηρισμό της δομής της μικροβιακής τους κοινότητας. Τα φωσφολιπίδια είναι συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών όλων των ζωντανών κυττάρων και αποσυντίθενται όταν το κύτταρο πεθάνει. Διαφορετικές ομάδες μικροοργανισμών χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένα PLFA-δείκτες στις κυτταρικές του μεμβράνες και κάθε ομάδα συνεισφέρει στο αποτύπωμα της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους ανάλογα με τη βιομάζα τους. Επομένως, μια μεταβολή στο αποτύπωμα των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων μπορεί να αντιπροσωπεύει μια μεταβολή στην σύσταση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους. Η PLFA ανάλυση έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη μεταβολών της μικροβιακής κοινότητας εξαιτίας ρύπανσης με οργανικά και ανόργανα χημικά (Siciliano and Germida, 1998) και χρήσης αγροτικών πρακτικών (Bossio et al., 1998).

Στις μοριακές τεχνικές συνήθως χρησιμοποιείται η τεχνική της PCR (Polymerase Chain Reaction) που επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* επιλεγμένων αλληλουχιών DNA από ελάχιστες αρχικές ποσότητες δείγματος. Μετά από την ενίσχυση της επιθυμητής αλληλουχίας, το προϊόν της PCR μπορεί, είτε να κλωνοποιηθεί και στην συνέχεια να ακολουθήσει πέψη με περιοριστικά μέτρα ή αλληλούχιση, είτε να χρησιμοποιηθεί απευθείας για την μελέτη της κοινότητας των μικροοργανισμών με κατάλληλες μεθόδους μοριακής αποτύπωσης.

Στην περίπτωση της κλωνοποίησης δημιουργούνται βιβλιοθήκες κλώνων για τον κάθε μικροβιακό πληθυσμό, καθιστώντας έτσι ικανή την μελέτη τους χωριστά. Αλληλούχιση του κλωνοποιημένου τμήματος του γονιδίου που ενισχύθηκε, επιτρέπει την ταυτοποίηση πληθυσμών οι οποίοι είτε είναι άγνωστοι, είτε δεν καλλιεργούνται. Μειονεκτήματα της είναι ότι είναι χρονοβόρα διαδικασία, έχει υψηλό κόστος ενώ υπάρχουν περιορισμοί στην επιλογή εκκινητών και των συνθηκών για την αντίδραση της PCR.

Εκτός από την κλωνοποίηση, το προϊόν της PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας για την μελέτη της μικροβιακής κοινότητας. Ο διαχωρισμός των διαφόρων αλληλουχιών μπορεί να γίνει είτε με βάση το

μέγεθος των τμημάτων που προκύπτουν (TRFLP, ARDRA ,RISA,ARISA),είτε με βάση την αλληλουχία των τμημάτων αυτών (DGGE,TGGE,SSCP).

Η ανάλυση πολυμορφισμών μήκους ακραίων τμημάτων περιορισμού (T-RFLP, Terminal Restriction Fragment Polymorphisms) είναι μία μέθοδος με την οποία μπορεί να αποκτηθεί το γενετικό αποτύπωμα μιας μικροβιακής κοινότητας αναλύοντας τους πολυμορφισμούς ενός συγκεκριμένου γονιδίου. Αφού το DNA εκχυλιστεί από το περιβαλλοντικό δείγμα, το γονίδιο που μας ενδιαφέρει ενισχύεται με την τεχνική της PCR και με έναν εκκινητή σημασμένο με φθορίζουσα χρωστική (π.χ TET, 6-FAM). Στη συνέχεια ακολουθεί πέψη του προϊόντος της PCR με ένα ή περισσότερα ένζυμα περιορισμού. Από τη πέψη παράγονται τμήματα διαφορετικού μεγέθους τα οποία διαχωρίζονται σε συσκευή πολυκάναλου τριχοειδή αναλυτή αλληλουχιών (multichannel capillary sequencer) όπου ανιχνεύονται μόνο τα σημασμένα ακραία τμήματα περιορισμού και το ηλεκτροφοριογράφημα που προκύπτει αποτελεί το αποτύπωμα της μικροβιακής κοινότητας και αναλύεται με ειδικά προγράμματα (GeneMapper). Το πρότυπο των ζωνών (κορυφές στο ηλεκτροφοριογράφημα) παρέχει πληροφορίες για τη ποικιλομορφία καθώς κάθε ζώνη αντιπροσωπεύει μια ταξινομική ομάδα. Η μέθοδος T-RFLP είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την μελέτη σύνθετων μικροβιακών κοινοτήτων και για τη σύγκριση διαφορετικών δειγμάτων (Clement et al., 1998; Liu et al., 1997)

Η ARDRA (Amplified rDNA (Ribosomal DNA) Restriction Analysis) είναι επέκταση της τεχνικής RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) στο γονίδιο που κωδικοποιεί τη μικρή (16S) ριβοσωματική υπομονάδα των βακτηρίων. Η τεχνική περιλαμβάνει μια ενζυματική ενίσχυση, που ακολουθείται από πέψη με ένζυμα περιορισμού tetracutter (Vaneechoutte et al.,1995) .

Η μέθοδος RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) αναπτύχθηκε από τους Borneman και Triplett (1997) και πρώτα χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας σε εδάφη. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει την PCR ενίσχυση της διαγονιδιακής περιοχής (IGS, intergenic spacer) ανάμεσα στη μικρή (16S για τα βακτήρια και 18S για τους μύκητες) και στη μεγάλη υπομονάδα (23S για τα βακτήρια και 28S για τους μύκητες) των rRNA γονιδίων. Αυτή η περιοχή είναι εξαιρετικά μεταβλητή σε μέγεθος και

σε νουκλεοτιδική αλληλουχία. Η μέθοδος RISA εκμεταλλεύεται την ετερογένεια μήκους της περιοχής αυτής. Τα προϊόντα της PCR διαχωρίζονται σε πηκτή πολυακρυλαμίδης με βάση το μέγεθός τους και γίνονται ορατά με βαφή με AgNO_3 . Το αποτέλεσμα είναι ένα πρότυπο ζωνών νουκλεϊκών οξέων στο οποίο κάθε ζώνη αντιπροσωπεύει τουλάχιστον έναν οργανισμό.

Οι Fisher και Triplett (1999) ανέπτυξαν τη μέθοδο ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) για να γίνεται η εκτίμηση της μικροβιακής ποικιλότητας πιο γρήγορα και πιο αποδοτικά. Η PCR ενίσχυση της IGS περιοχής γίνεται με τη χρήση εκκινητή σημασμένου με φθορίζουσα χρωστική, για να μπορεί να ανιχνευθεί το προϊόν στο αυτοματοποιημένο σύστημα ηλεκτροφόρησης. Η μικροβιακή ποικιλότητα σε ένα δείγμα εκτιμάται από το συνολικό αριθμό των ζωνών που εμφανίζονται για κάθε δείγμα στη πηκτή. Η μέθοδος ARISA έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την μελέτη διάφορων μικροβιακών πληθυσμών (Robleto et al., 1998; Borneman, 1999; Fisher and Triplett, 1999; Ranjard et al., 2000).

Μια από τις πρώτες μεθόδους αποτύπωσης DNA που εφαρμόστηκε με επιτυχία στη μικροβιακή οικολογία ήταν η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (DGGE, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Liesac W, et al., 1991). Η μέθοδος DGGE έχει τη ικανότητα να διαχωρίζει μικρά μόρια DNA (περίπου 200-600 bp) που έχουν το ίδιο μέγεθος, αλλά διαφέρουν τουλάχιστον σε ένα νουκλεοτίδιο, κατά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με αυξημένη βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών. Ο διαχωρισμός αυτός βασίζεται στη μειωμένη ηλεκτροφορητική κινητικότητα ενός μερικώς αποδιαταγμένου μορίου DNA σε πηκτή σε σύγκριση με τη κινητικότητα της πλήρως δίκλωνης μορφής του μορίου. Οι δύο αλυσίδες ενός DNA τμήματος αποδιατάσσονται σε συγκεκριμένη θερμοκρασία, η οποία εξαρτάται από (i) τους δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων (αλληλουχίες πλούσιες σε GC αποδιατάσσονται σε υψηλότερες θερμοκρασίες) και (ii) από το στοίβαγμα μεταξύ των γειτονικών βάσεων στην ίδια αλυσίδα (base stacking). Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή ακρυλαμίδης, η κινητικότητα ενός μορίου επιβραδύνεται όταν μια περιοχή του αποδιαταχθεί. Η ολική αποδιάταξη του μορίου αποτρέπεται από τη παρουσία μιας αλληλουχίας πλούσιας σε GC (GC clamp) στο ένα άκρο του. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση ενός PCR εκκινητή

που φέρει στο 5' άκρο ένα GC clamp. Το πρότυπο των ζωνών που προκύπτει από την ηλεκτροφόρηση ενός δείγματος αντανakλά άμεσα τη γενετική του ποικιλότητα και ο αριθμός των ζωνών αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κυρίαρχων ειδών.

Μια παραλλαγή της μεθόδου αποτελεί το TGGE (temperature gradient gel electrophoresis) με την διαφορά ότι, σε αυτήν την περίπτωση χρησιμοποιείται θερμότητα για την αποδιάταξη αντί για χημικά αποδιατακτικά

Αρχικά το DGGE χρησιμοποιήθηκε για το καθορισμό της γενετικής ποικιλότητας βακτηριακών πληθυσμών (Muyzer et al., 1993). Ωστόσο, το DGGE χρησιμοποιείται και για άλλους σκοπούς στη μικροβιακή οικολογία όπως είναι η μελέτη μεταβολών που συμβαίνουν σε μια μικροβιακή κοινότητα εξαιτίας περιβαλλοντικών αλλαγών (Donner et al., 1996), και η σύγκριση διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης DNA (Kozdrój and van Elsas., 2000).

Για τον λόγο ότι , τμήματα DNA με διαφορετική αλληλουχία μπορεί να έχουν την ίδια κινητικότητα, η ανάλυση των αποτελεσμάτων της DGGE χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή , ενώ μια συγκεκριμένη ζώνη δεν αντιπροσωπεύει ένα συγκεκριμένο είδος (Ikeda et al.,2006).

Μια ακόμη μέθοδος η οποία βασίζεται στον διαχωρισμό με ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA με διαφορετική αλληλουχία είναι το SSCP (Single-strand conformation polymorphism). Η μεθοδολογία αυτή αναπτύχθηκε για να αναγνωρίζει πολυμορφισμούς ή σημειακές μεταλλάξεις σε μια αλληλουχία DNA. Τα διαφορετικά τμήματα μονόκλωνου DNA ξεχωρίζουν με βάση τη διαφορά στην κινητικότητα τους λόγω των δευτερογενών δομών που σχηματίζουν. Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει τα ίδια πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα με την DGGE, ενώ δεν χρειάζεται GC ουρά στον πρόσθιο εκκινητή ή την δημιουργία πηκτής με βαθμίδωση συγκέντρωσης αποδιατακτικών ουσιών. Έτσι οι απαιτήσεις σε εξοπλισμό και ο σχεδιασμός εκκινητών προβληματίζουν λιγότερο.

Σκοπός της μελέτης

Στόχοι της εργασίας ήταν α) η μελέτη των επιδράσεων των διασυστηματικών γεωργικών φαρμάκων imidacloprid και metalaxyl στην φυλλόσφαιρα φυτών πιπεριάς και β) αξιολόγηση της επίδρασης της μεθόδου εφαρμογής (διαφυλλική ή ριζοπότισμα) στην φυλλόσφαιρα

Υλικά και μέθοδοι

Πειραματικός σχεδιασμός

Φυτά πιπεριάς (*Capsicum annuum* L. cv Ozho) που παραχωρήθηκαν στο εργαστήριο από την εταιρεία AgriPlant A.E. μεταφυτεύθηκαν σε γλάστρες 3 L οι οποίες περιείχαν την κατάλληλη ποσότητα άμμου και χώματος σε αναλογία 1:1. Έτσι το υπόστρωμα στο οποίο αναπτύχθηκαν τα φυτά ήταν αμμώδες, είχε pH 7.81, ηλεκτρική αγωγιμότητα $0.017 \text{ mmhos cm}^{-1}$, οργανική ουσία 8.8 g kg^{-1} , P-Olsen 2 mg g^{-1} , K 215 mg g^{-1} και Mg 265 mg g^{-1} . Συνολικά προετοιμάσθηκαν 18 γλάστρες και τοποθετήθηκαν τυχαία στον θάλαμο ανάπτυξης στους 22° C με εναλλαγές από 16 ώρες με φώς σε 8 ώρες νύχτας. Τα φυτά ποτίζονταν με την απαραίτητη ποσότητα ενώ 30 mL διαλύματος Hoagland εφαρμόστηκε δύο φορές την εβδομάδα (Hoagland and Arno, 1938). Τα φυτά πιπεριάς αναπτύχθηκαν υπό αυτές τις συνθήκες για μια εβδομάδα και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε ένα εμπορικό θερμοκήπιο που βρίσκεται στην περιοχή Βελεστίνο της Μαγνησίας όπου πραγματοποιήθηκε το πείραμα. Τα φυτά αφέθηκαν στο θερμοκήπιο για μία περίοδο τριών εβδομάδων για να εγκλιματιστούν και να αναπτυχθεί όσο το δυνατόν καλύτερα μια φυσική μικροβιακή κοινότητα στην φυλλόσφαιρα τους. Κατά τη διάρκεια της περιόδου εγκλιματισμού τα φυτά πιπεριάς ποτίζονταν και λιπαίνονταν, ανάλογα με τις ανάγκες τους.

Στο τέλος της περιόδου εγκλιματισμού οι 18 γλάστρες με τα φυτά πιπεριάς χωρίστηκαν σε 6 ομάδες των τριών. Στις πρώτες τρεις γλάστρες εφαρμόσαμε στο φύλλωμα ένα υδατικό εναιώρημα του εντομοκτόνου imidachlorpid (Confidor, 200SL), ενώ στις επόμενες τρεις γλάστρες έγινε η εφαρμογή του ίδιου εντομοκτόνου στο έδαφος τους. Με τον ίδιο τρόπο στις επόμενες δυο ομάδες γλαστρών είχαμε διαφυλλική και εδαφική εφαρμογή του μυκητοκτόνου metalaxyl (Ridomil GOLD, 46.52SL). Οι αναλογίες των δραστικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν τόσο στην διαφυλλική όσο και στην εδαφική εφαρμογή ήταν αυτές που προτείνονται για τον έλεγχο των παρασίτων-στόχων και των ασθενειών. Τέλος, οι υπόλοιπες δύο ομάδες γλαστρών χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες και έλαβαν τον ίδιο όγκο νερού με τα αρχικά διαλύματα η μία στο φύλλωμα και η άλλη στο έδαφος της.

Πέντε ημέρες μετά από την εφαρμογή των παρασιτοκτόνων 10 φύλλα από κάθε φυτό συλλέχθηκαν και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένες πλαστικές σακούλες και μεταφέρθηκαν μέσα σε πάγο στο εργαστήριο, όπου αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι να τα επεξεργαστούμε περαιτέρω.

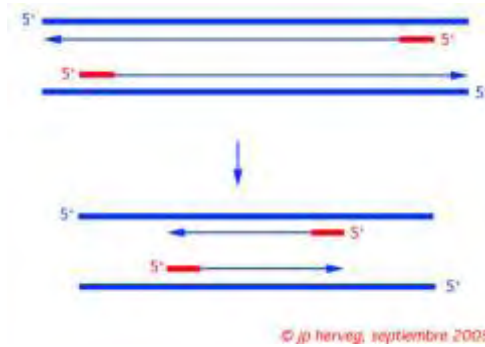
Εξαγωγή DNA

Το DNA των μικροβίων της φυλλόσφαιρας εκχυλίστηκε όπως περιγράφεται από τους Yang et al (2001) με ελαφρές τροποποιήσεις. Εν συντομία, τα δείγματα φύλλων μεταφέρθηκαν ασηπτικά σε σωλήνες πολυπροπυλενίου που περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου 0,1 M (pH 7.0). Στη συνέχεια οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε ένα λουτρό υπερήχων για 10 λεπτά για την αποκόλληση των μικροοργανισμών από την επιφάνεια του φύλλου. Τα υπολείμματα των φύλλων απομακρύνθηκαν με μια ήπια φυγοκέντρηση (3 min 500 στροφές) και το διαυγές εναιώρημα υποβλήθηκε εκ νέου σε φυγοκέντρηση (15 min 7000 στροφές). Το υπερκείμενο υγρό απομακρύνθηκε και το μικροβιακό ίζημα που ελήφθη χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση του DNA χρησιμοποιώντας το kit NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel, Γερμανία) σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών.

Ενίσχυση τμήματος του 16S rDNA βακτηρίων με τη τεχνική της PCR εσωτερικής ένθεσης

Η τεχνική της PCR (Polymerase Chain Reaction) επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* επιλεγμένων αλληλουχιών DNA από ελάχιστες αρχικές ποσότητες δείγματος.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε μια τροποποιημένη μέθοδος της PCR η PCR εσωτερικής ένθεσης ή nested PCR. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί δύο διαδοχικές αντιδράσεις PCR, όπου το προϊόν της πρώτης αντίδρασης χρησιμοποιείται ως μήτρα για τη δεύτερη. Η πρώτη αντίδραση PCR χρησιμοποιεί ένα εξωτερικό ζευγάρι εκκινητών ενώ η δεύτερη ένα νέο ζευγάρι εκκινητών, εσωτερικό των αρχικών (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. PCR εσωτερικής ένθεσης

Στη πρώτη αντίδραση PCR ενισχύεται ένα τμήμα του 16S rDNA των βακτηρίων με τους 63f και 1087r εκκινητές από DNA που έχει εκχυλιστεί από την φυλλόσφαιρα. Στη δεύτερη αντίδραση χρησιμοποιούνται οι εκκινητές *Muzyer F* (357f-GC) και *Muzyer R* (534r) οι οποίοι είναι εσωτερικοί των πρώτων και ενισχύουν την V3 μεταβλητή περιοχή του 16S rDNA των βακτηρίων (*Muzyer et al.*, 1993). Ο εκκινητής *Muzyer F* (357f-GC) φέρει στο 5' άκρο του μια αλληλουχία 40 νουκλεοτιδίων πλούσια σε GC (GC clamp). Με τη δεύτερη αντίδραση παράγονται τμήματα DNA κατάλληλα για ανάλυση με DGGE (~200bp με GC clamp). Το συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών έχει αποδειχτεί ότι αποτελεί τους πλέον ενδεδειγμένους εκκινητές για ανάλυση της βακτηριακής κοινότητας με την μέθοδο DGGE (*Muzyer et al.*, 1993). Η αλληλουχία των εκκινητών, τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζονται στους Πίνακες1, 2, 3& 4.

Πίνακας1. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του 16S rDNA γονιδίου των βακτηρίων

| Εκκινητής | Αλληλουχία | Tm |
|--------------------------------------|--|---------|
| 63f | 5' – AGG CCT AAC ACA TGC AAG TC – 3' | 49.2°C |
| 1087r | 5' – CTC GTT GCG GGA CTT AAC CC – 3' | 56.0°C |
| <i>Muzyer F</i> (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 |
| <i>Muzyer R</i> (534r) | 5' – ATT ACC GCG GCT GCT GG – 3' | 54.4°C |

Πίνακας 2 . Τα συστατικά της πρώτης αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του 16S rDNA γονιδίου με την χρήση των εκκινητών 63f – 1087r

| Αντιδραστήρια | Όγκος | Τελική συγκέντρωση |
|--|----------|-------------------------------|
| Buffer (10x optimized) | 2.5 µl | 1x (1.5mM MgCl ₂) |
| dNTPs (10mM) | 0.5 µl | 200µM από το καθένα |
| Forward primer 63f (20pmol/µl) | 0.25 µl | 0.2µM |
| Reverse primer 1087r (20pmol/µl) | 0.25 µl | 0.2 µM |
| BSA (10µg/µl) | 1 µl | 400ng/µl |
| Πολυμεράση DyNAzyme EXT DNA polymerase (Finnzymes) (1U/µl) | 1 µl | 1U/25µl |
| DNA | 1 µl | 10-50ng |
| MgCl ₂ | 0.75 µl | |
| ddH ₂ O | 17.75 µl | |
| Συνολικός όγκος | 25 µl | |

Πίνακας 3 . Τα συστατικά της PCR εσωτερική ένθεσης για την ενίσχυση του 16S rDNA γονιδίου με την χρήση των εκκινητών 357f+GC – 534r.

| Αντιδραστήρια | Όγκος | Τελική συγκέντρωση |
|--|---------|-------------------------------|
| Buffer (10x optimized) | 5 µl | 1x (1.5mM MgCl ₂) |
| dNTPs (10mM) | 1 µl | 200µM από το καθένα |
| Forward primer 357f-GC (20pmol/µl) | 1 µl | 0.4µM |
| Reverse primer 534r (20pmol/µl) | 1 µl | 0.4µM |
| Πολυμεράση DyNAzyme EXT DNA polymerase (Finnzymes) (1U/µl) | 1 µl | 1U/50µl |
| DNA | 1 µl | |
| MgCl ₂ | 1.5 µl | |
| ddH ₂ O | 38,5 µl | |
| Συνολικός όγκος | 50 µl | |

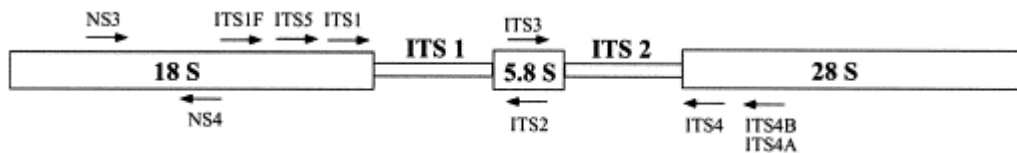
Πίνακας 4. Θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες πραγματοποίησης της πρώτης και δεύτερης PCR αντίδρασης για τα βακτήρια

| | | | |
|-------------------|------|-------|------------|
| Αρχική αποδιάταξη | 95°C | 5min | |
| Αποδιάταξη | 95°C | 30sec | 30 κύκλους |
| Υβριδοποίηση | 55°C | 30sec | |
| Επιμήκυνση | 72°C | 1min | |
| Τελική επιμήκυνση | 72°C | 10min | |

Ενίσχυση της ITS περιοχής των μυκήτων με τη τεχνική της PCR ημι-εσωτερικής ένθεσης

Στην περίπτωση των μυκήτων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της PCR ημιεσωτερικής ένθεσης ή **semi-nested PCR** για την ενίσχυση των ITS περιοχών του rDNA μυκήτων. Στη PCR ημιεσωτερικής ένθεσης, στη δεύτερη αντίδραση ο ένας εκ των δύο εκκινητών είναι ίδιος με έναν από τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκε και στη πρώτη PCR.

Στη πρώτη αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές ITS1F και ITS4 οι οποίοι ενισχύουν την ITS περιοχή όλων των μυκήτων από DNA το οποίο έχει εκχυλιστεί από έδαφος (Gardes and Bruns 1993). Στη δεύτερη αντίδραση PCR, το προϊόν της πρώτης αντίδρασης ενισχύεται με τους ITS1F-GC και ITS2 εκκινητές (Anderson and Cairney 2004). Ο ITS1F-GC εκκινητής είναι ίδιος με τον ITS1F με τη διαφορά ότι έχει μια αλληλουχία 40 νουκλεοτιδίων πλούσια σε GC (GC clamp) στο 5' άκρο του (Εικόνα 2). Με τη δεύτερη αυτή αντίδραση PCR παράγονται μικρότερα ITS τμήματα (300bp) τα οποία φέρουν GC-clamp. Το GC-clamp είναι απαραίτητο για να αποφευχθεί η ολική αποδιάταξη των δίκλωνων τμημάτων DNA κατά την διάρκεια του DGGE. Η αλληλουχία των εκκινητών, τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζονται στους Πίνακες 5, 6, 7 & 8.



Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση του rDNA των μυκήτων και των θέσεων υβριδισμού ορισμένων εκκινητών.

Πίνακας 5. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της ITS περιοχής των μυκήτων

| Εκκινητής | Αλληλουχία | T _m |
|-----------------|---|----------------|
| ITS1F | 5' – CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A – 3' | 45.4°C |
| ITS4 | 5' – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC – 3' | 49.6°C |
| ITS1F-GC | 5' – CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCT TGG TCA TTT AGA GGA AGT AA – 3' | 99.0°C |
| ITS2 | 5' – GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC – 3' | 55.7°C |

Πίνακας 6. Τα συστατικά της πρώτης αντίδρασης PCR για την ενίσχυση της ITS περιοχής των μυκήτων με την χρήση των εκκινητών ITS1F – ITS4

| Αντιδραστήρια | Όγκος | Τελική συγκέντρωση |
|--|----------|-------------------------------|
| Buffer (10x optimized) | 2.5 µl | 1x (1.5mM MgCl ₂) |
| dNTPs (10mM) | 0.5 µl | 200µM από το καθένα |
| Forward primer ITS1F (20pmol/µl) | 0.25 µl | 0.2µM |
| Reverse primer ITS4 (20pmol/µl) | 0.25 µl | 0.2 µM |
| BSA (10µg/µl) | 1 µl | 400ng/µl |
| Πολυμεράση DyNAzyme EXT DNA polymerase (Finnzymes) (1U/µl) | 1 µl | 1U/25µl |
| DNA | 1 µl | 10-50ng |
| MgCl ₂ | 0.75 µl | |
| ddH ₂ O | 17,75 µl | |
| Συνολικός όγκος | 25 µl | |

Πίνακας 7. Τα συστατικά της PCR ημισωτερικής ένθεσης για την ενίσχυση της ITS περιοχής των μυκήτων με την χρήση των εκκινητών ITS1F+GC – ITS2

| Αντιδραστήρια | Όγκος | Τελική συγκέντρωση |
|--|--------------|-------------------------------|
| Buffer (10x optimized) | 5 μ l | 1x (1.5mM MgCl ₂) |
| dNTPs (10mM) | 1 μ l | 200 μ M από το καθένα |
| Forward primer ITS1F-GC (20 μ mol/ μ l) | 1 μ l | 0.4 μ M |
| Reverse primer ITS2 (20 μ mol/ μ l) | 1 μ l | 0.4 μ M |
| Πολυμεράση DyNAzyme EXT DNA polymerase (Finnzymes) (1U/ μ l) | 1 μ l | 1U/50 μ l |
| DNA (προϊόν της πρώτης αντίδρασης) | 1 μ l | |
| MgCl ₂ | 1.5 μ l | |
| ddH ₂ O | 38,5 μ l | |
| Συνολικός όγκος | 50 μ l | |

Πίνακας 8 . Θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες PCR για την ενίσχυση της ITS περιοχής των μυκήτων του εδάφους

| | | | |
|-------------------|------|-------|------------|
| Αρχική αποδιάταξη | 94°C | 5min | |
| Αποδιάταξη | 94°C | 30sec | 30 κύκλους |
| Υβριδοποίηση | 55°C | 30sec | |
| Επιμήκυνση | 72°C | 1min | |
| Τελική επιμήκυνση | 72°C | 10min | |

Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 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 την φυλλόσφαιρα φυτών πιπεριάς για τον έλεγχο της απόδοσης της εκχύλισης και στα προϊόντα των PCR για τον έλεγχο της παρουσίας του επιθυμητού προϊόντος.

Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων DNA από την φυλλόσφαιρα πιπεριάς

Χρησιμοποιήθηκε πηκτή 0.7% (0.7 g αγαρόζη σε 100ml TBE). Στη πηκτή φορτώθηκαν 10μl από κάθε δείγμα DNA αναμειγμένα με 2μl loading buffer . Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 80V. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης η πηκτή τοποθετήθηκε σε απεσταγμένο νερό που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 0.5μg/ml και στη συνέχεια ξεπλύθηκε. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μια χρωστική που φθορίζει στο υπεριώδες φως και παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA. Έτσι είναι δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στην πηκτή αφού τοποθετηθεί σε συσκευή UV.

Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR

Χρησιμοποιήθηκε πηκτή 1% [1 g αγαρόζη σε 100 ml TBE και 6μl βρωμιούχου αιθιδίου (1%)]. Στη πηκτή φορτώθηκαν 10μl από το προϊόν PCR αναμειγμένα με 2μl loading buffer 6x. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 110V. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης είναι δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στη πηκτή αφού τοποθετηθεί σε συσκευή UV.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών(DGGE) για βακτήρια και μύκητες

DGGE ανάλυση διεξήχθη με το σύστημα INGENYphorU-2x2 (Ingeny International BV, Ολλανδία). (Εικόνα 3). για το διαχωρισμό των προϊόντων που προέκυψαν από τις PCR εσωτερικής και ημιεσωτερικής ένθεσης.



Εικόνα 3. INGENYphorU-2x2 σύστημα

Προετοιμάστηκε ρυθμιστικό διάλυμα 1XTAE (40 mM Tris βάση, 20 mM οξικό οξύ, και 1 mM δινάτριο EDTA, pH 8.2) Για τους μύκητες χρησιμοποιήθηκε

πηκτή πολυακρυλαμίδης 8% (w/v) με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών που κυμαίνονταν από 30 μέχρι 55%. Ενώ για τα βακτήρια χρησιμοποιήθηκε πηκτή ακρυλαμίδης 8% με βαθμίδωση από 50 μέχρι 60% (το διάλυμα αποδιατακτικών ουσιών 100% περιέχει 7M ουρία και 40% φορμαμίδη). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 75V για 16 ώρες στους 60 °C. Με την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης ακολούθησε βαφή της πηκτής με νιτρικό άργυρο.

Κάθε πηκτή πολυακρυλαμίδης τοποθετήθηκε σε τράπεζα φωτός και φωτογραφήθηκε με υψηλής ανάλυσης ψηφιακή φωτογραφική μηχανή. Οι φωτογραφίες από κάθε πηκτή DGGE μετατράπηκαν σε κατάλληλης μορφής αρχεία (.bmp) και ψηφιοποιήθηκαν. Στην συνέχεια η φωτογραφία της κάθε πηκτής χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία δεδομένων δυαδικής μορφής (binary dataset) με το πακέτο Cross Checker 2.9v (Wageningen University, The Netherlands) βασιζόμενο στην παρουσία ή απουσία ζωνών DNA στο μοριακό αποτύπωμα του κάθε δείγματος

Στατιστική ανάλυση DGGE

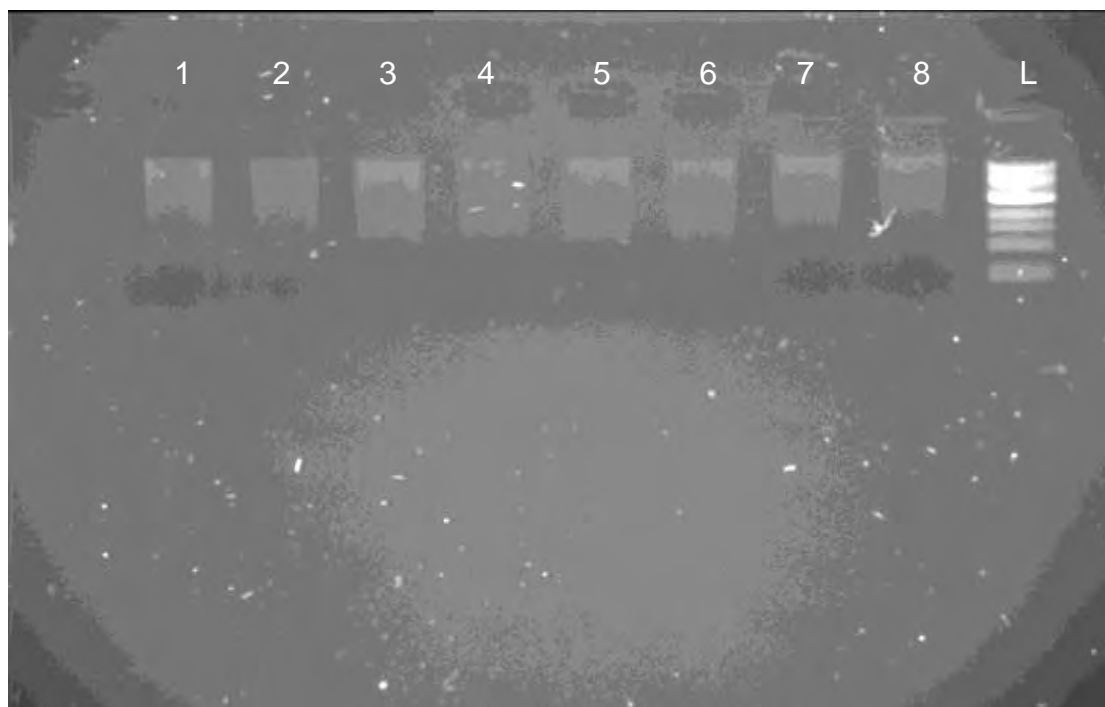
Τα δυαδικής μορφής δεδομένα που προέκυψαν από την ανάλυση των πηκτών DGGE αναλύθηκαν με την μέθοδο των συστάδων (cluster analysis) για να συγκριθεί η επίδραση των γεωργικών φαρμάκων και ο τρόπος εφαρμογής τους στη δομή των μικροβιακών κοινοτήτων της φυλλόσφαιρας. Για κάθε πηκτή κατασκευάστηκαν δένδρογράμματα με την μέθοδο Jaccard χρησιμοποιώντας το αλγόριθμο UPGMA (unweighted paired group means). Η ανάλυση έγινε με το στατιστικό πακέτο MultiVariate Statistical Package (MVSP) 3.13v (<http://www.kovcomp.com/>).

Η ομοιότητα μεταξύ δύο δειγμάτων με βάση των συντελεστή Jaccard δίνεται από τον λόγο του αριθμού των ζωνών DNA στα μοριακά αποτυπώματα των δύο δειγμάτων που είναι ταυτόχρονα παρούσες προς τον αριθμό των ζωνών που είναι παρούσες σε τουλάχιστον ένα από τα δείγματα. Ο αριθμός που προκύπτει αφαιρείται από το 1 ώστε να δώσει το αντίστοιχο μέτρο της ομοιότητας μεταξύ των δύο δειγμάτων

Αποτελέσματα

Αποτελέσματα εξαγωγής DNA από την φυλλόσφαιρα πιπεριάς

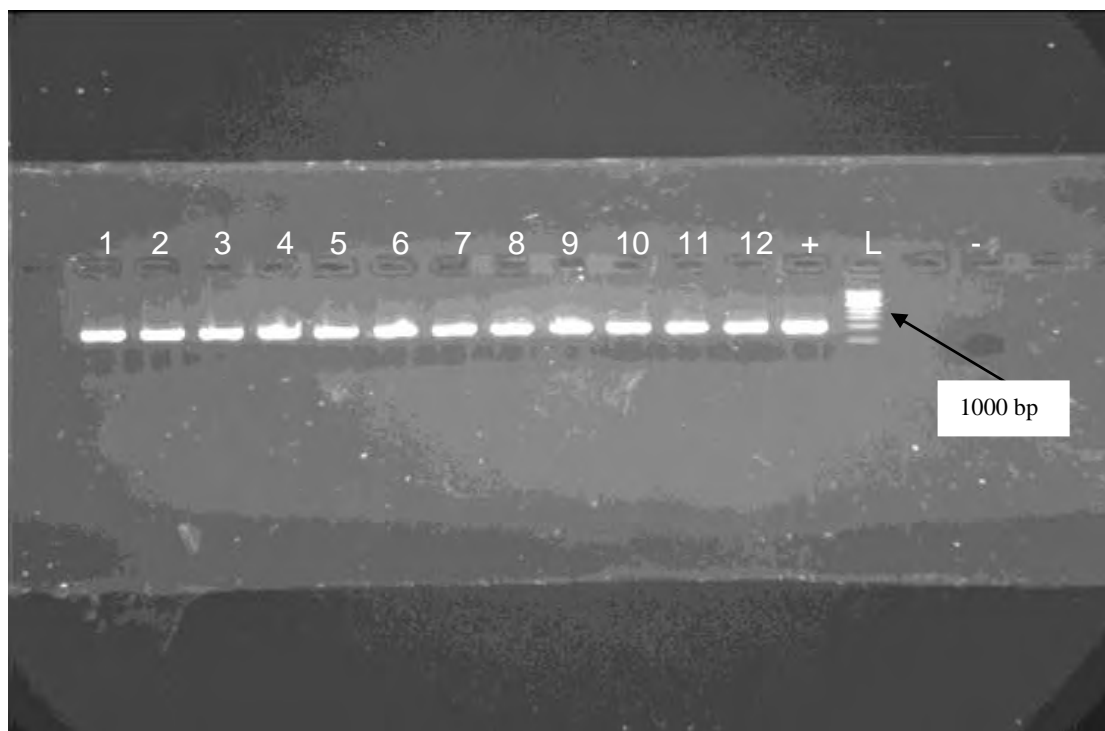
Αρχικά πραγματοποιήθηκε εξαγωγή DNA από τα φύλλα πιπεριάς. Για τον έλεγχο της απόδοσης της εξαγωγής, μια ποσότητα από τα δείγματα DNA ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης 0.7% (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 0.7% δειγμάτων DNA από φύλλα πιπεριάς. 1-3 DNA από δείγματα μάρτυρα με ριζοπτόσιμα, 4-6 DNA από δείγματα μάρτυρα με διαφυλλική εφαρμογή, 7&8 DNA από δείγματα με εφαρμογή με imidacloprid και ριζοπτόσιμα. Σε κάθε γραμμή φορτώθηκαν 10 μl DNA

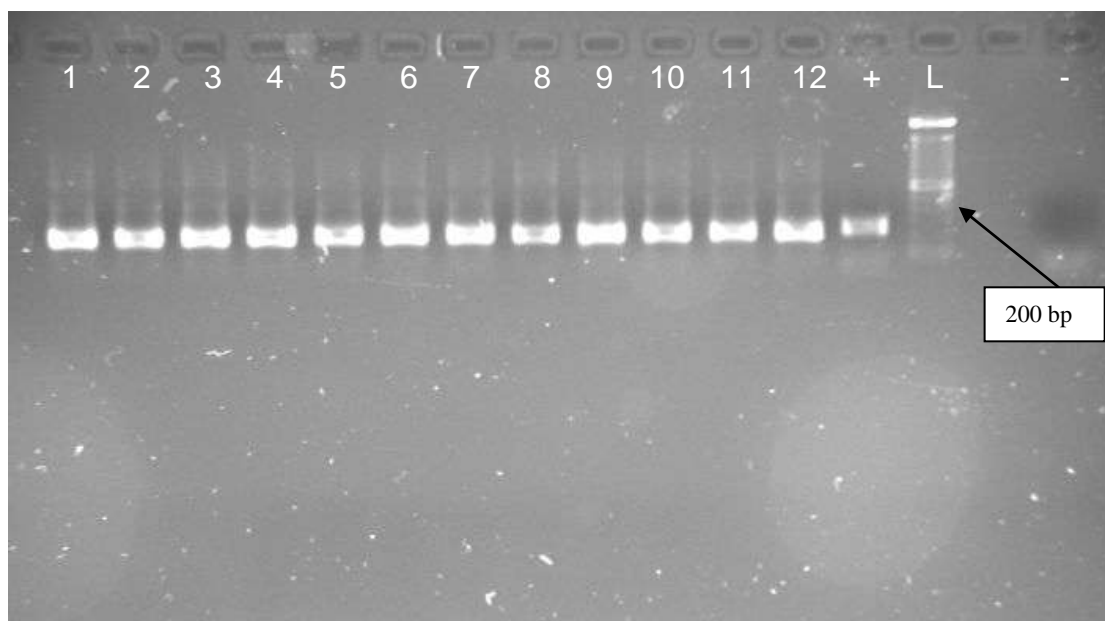
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)- Βακτήρια

Στη πρώτη αντίδραση PCR για την ενίσχυση ενός τμήματος 16S rDNA των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν οι 63f και 1087r εκκινητές. Το προϊόν της αντίδρασης είναι περίπου 1000bp (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 1% PCR προϊόντων από το 16S rRNA γονίδιο της βακτηριακής κοινότητας της φυλλόσφαιρας. 1- 3: PCR προϊόν από δείγματα εφαρμογής imidacloprid με ριζοπότισμα, 4-6: PCR προϊόν από δείγματα εφαρμογής imidacloprid διαφυλλικά, 7-9: PCR προϊόν από δείγματα εφαρμογής metalaxyl με ριζοπότισμα, 10-12 PCR προϊόν από δείγματα εφαρμογής metalaxyl διαφυλλικά. Σε κάθε γραμμή φορτώθηκαν 5 μl από το προϊόν PCR.

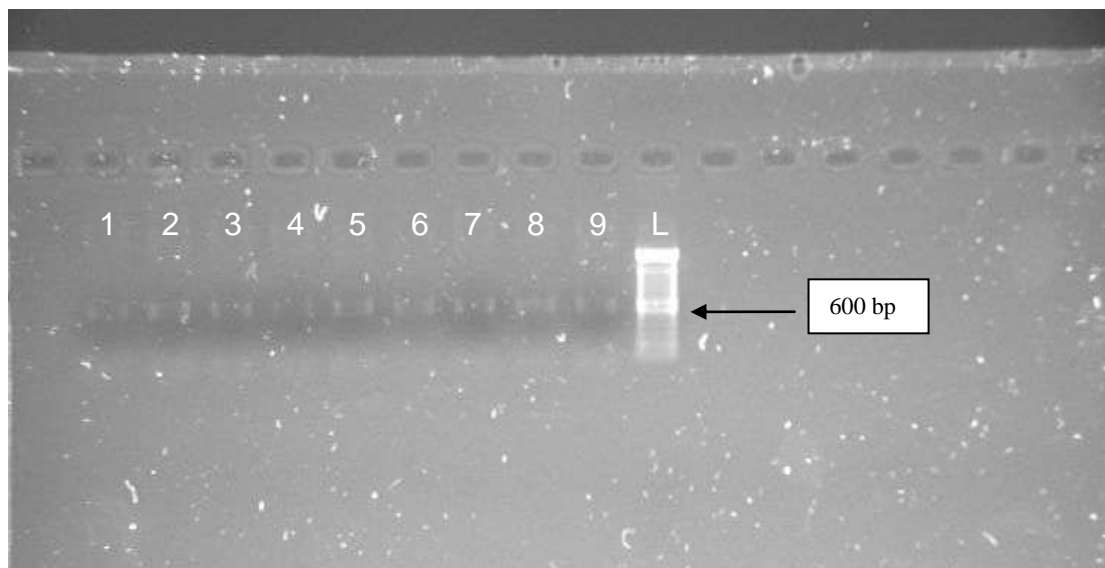
Στη δεύτερη αντίδραση για τα βακτήρια χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές Muzer F (357f-GC) και Muzer R (534r) οι οποίοι είναι εσωτερικοί των πρώτων και ενισχύουν την V3 μεταβλητή περιοχή του 16S rDNA των βακτηρίων (προϊόν περίπου 200bp) (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης 1% PCR προϊόντων από το 16S rRNA γονίδιο της βακτηριακής κοινότητας του εδάφους. 1- 3: PCR προϊόν από δείγματα μάρτυρα με ριζοτόπισμα, 4-6: PCR προϊόν από δείγματα εφαρμογής μάρτυρα διαφυλλικά, 7- 9: PCR προϊόν από δείγματα εφαρμογής imidacloprid με ριζοτόπισμα, 10-12 PCR προϊόν από δείγματα εφαρμογής imidacloprid διαφυλλικά.. Σε κάθε γραμμή φορτώθηκαν 5 μl προϊόν από την 1^η PCR.

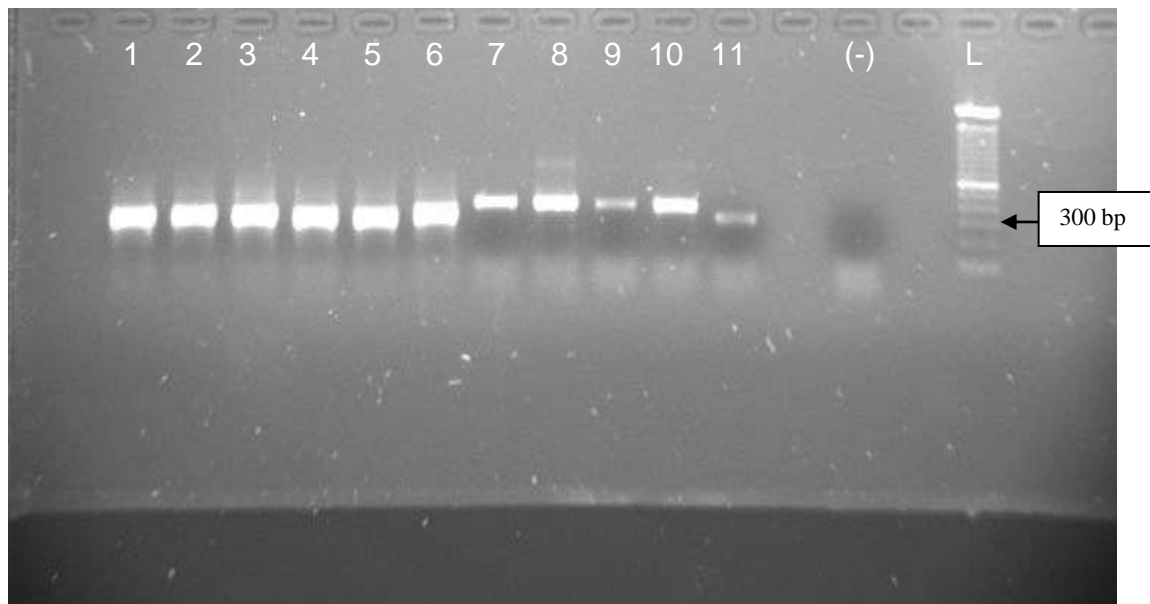
Αλυσιδωτη αντίδραση πολυμεράσης (PCR) Μύκητες

Στην πρώτη αντίδραση PCR για τους μύκητες χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές ITS1F και ITS4 οι οποίοι ενισχύουν την ITS περιοχή όλων των μυκήτων. Το προϊόν της ενίσχυσης αυτής είναι περίπου 600bp (Εικόνα 7)



Εικόνα 7. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 1% PCR προϊόντων της ITS περιοχής από την κοινότητα των μυκήτων της φυλλόσφαιρας. 1- 3: PCR προϊόν από δείγματα μάρτυρα με ριζοπότισμα, 4-6: PCR προϊόν από δείγματα εφαρμογής μάρτυρα διαφυλλικά, 7-9: PCR προϊόν από δείγματα εφαρμογής imidacloprid με ριζοπότισμα. Σε κάθε γραμμή φορτώθηκαν 5 μl από το προϊόν PCR.

Για την δεύτερη αντίδραση PCR ημισωτερικής ένθεσης χρησιμοποιήθηκαν οι ITS1F-GC και ITS2 εκκινητές και το προϊόν της αντίδρασης αυτής είναι περίπου 300bp (Εικόνα 8).

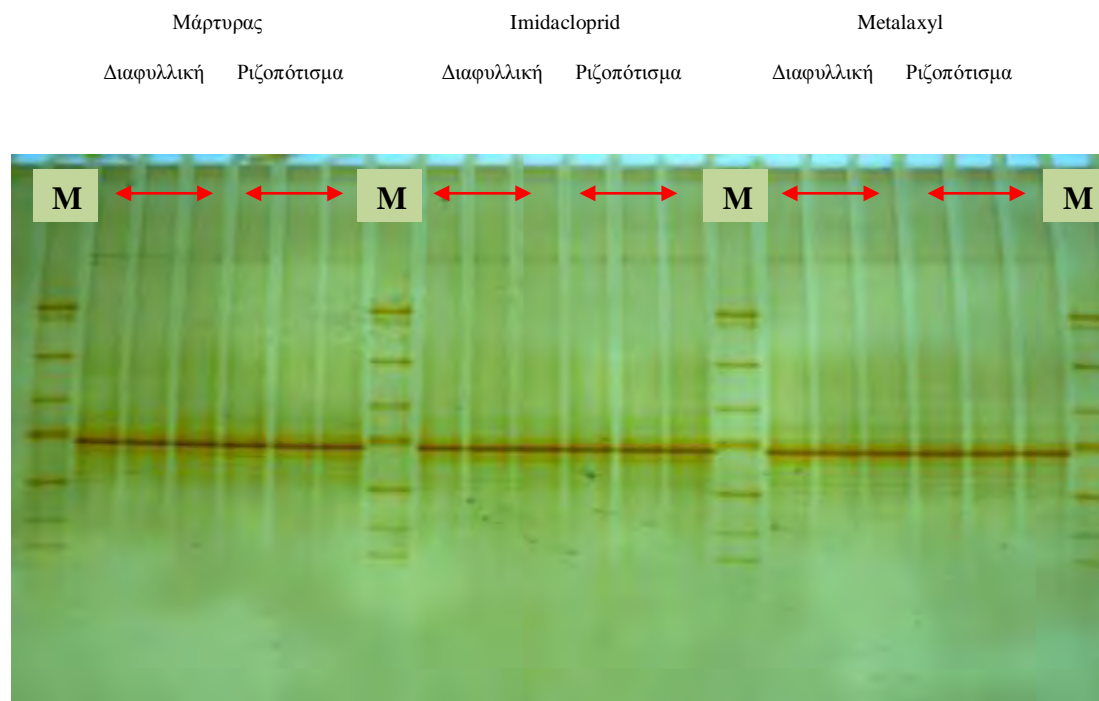


Εικόνα 8. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 1% PCR προϊόντων που προέκυψαν από PCR ημι-εσωτερικής ένθεσης επί του αρχικού προϊόντος ολόκληρης της ITS περιοχής. 1-3: PCR προϊόν από δείγματα εφαρμογής metalaxyl με ριζοπότισμα, 4-6: PCR προϊόν από δείγματα εφαρμογής metalaxyl διαφυλλικά, 7: *Pleurotus djamor*, 8: *P. cystidiosus*, 9: *P. Eryngii*, 10: *P. Ostreatus*, 11: *Fusarium solani strain K*. Σε κάθε γραμμή φορτώθηκαν 10 μl προϊόν PCR που προέκυψε από την 1^η PCR.

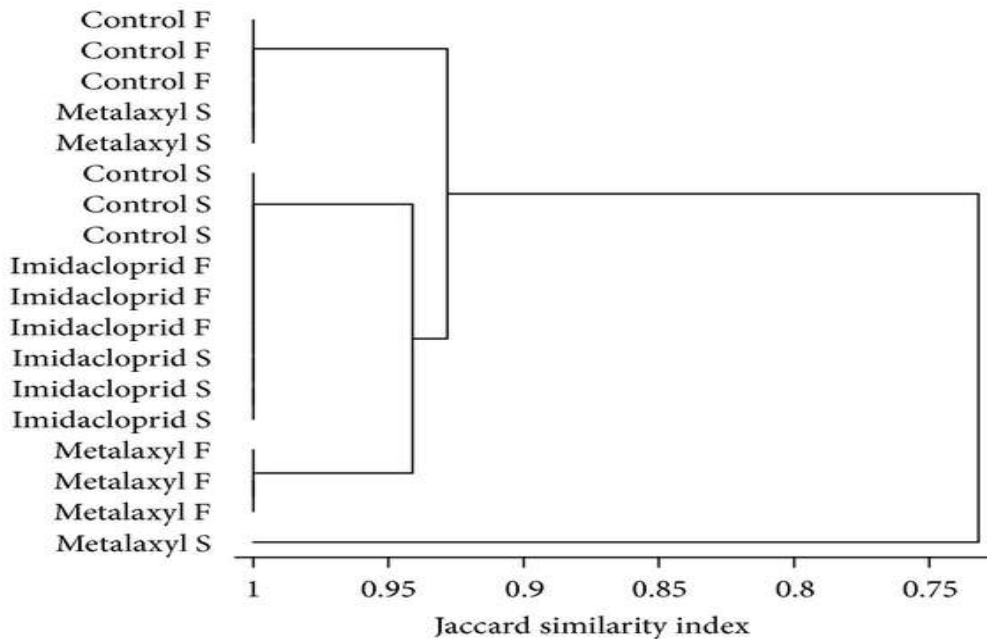
Μοριακή αποτύπωση της βακτηριακής κοινότητας στην φυλλόσφαιρα φυτών πιπεριάς

Η DGGE ανάλυση της βακτηριακής κοινότητας έδειξε ένα σχετικά περιορισμένης πολυπλοκότητας μοτίβο ζωνών, σε σύγκριση με τα μοριακά αποτυπώματα της κοινότητας των μυκήτων, με ζώνες που δεν υπερβαίνουν τις 15 σε καμία από τις μεταχειρίσεις (Εικόνα 9). Ανάλυση κατά συστάδες έδειξε ως αποτέλεσμα την δημιουργία δύο κύριων συστάδων. Η πρώτη συστάδα περιείχε όλα τα δείγματα εκτός από μια επανάληψη της εδαφικής εφαρμογής του metalaxyl με ομοιότητα μεταξύ των δειγμάτων >90%. Η συστάδα αυτή χωρίστηκε περαιτέρω σε δυο υπο-ομάδες, η πρώτη περιείχε τα

δείγματα του μάρτυρα που είχαν δεχτεί εφαρμογή νερού από το έδαφος και τις δυο επαναλήψεις της εδαφικής εφαρμογής metalaxyl, ενώ η δεύτερη υποομάδα περιελάμβανε όλα τα υπόλοιπα δείγματα του μάρτυρα και των εφαρμογών με metalaxyl και imidacloprid (Εικόνα 10).



Εικόνα 9. Εικόνα πηκτής DGGE με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 50-60% όπου αναλύθηκαν τα προϊόντα PCR από την V3 περιοχή 16S rRNA γονιδίου της κοινότητας των βακτηρίων της φυλλόσφαιρας φυτών πιπεριάς, που είχαν υποστεί εφαρμογή imidacloprid, metalaxyl και νερού (μάρτυρας), διαφυλλικά και με ριζοπότισμα. Όπου M marker που περιείχε $20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ 16S rRNA-PCR προϊόντων των κάθε ένα από τα παρακάτω βακτήρια με τη σειρά που αυτά εμφανίζονται στην πηκτή από επάνω προς τα κάτω: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas sp.*, *P. putida*, *Flavobacterium sp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Xanthomonas sp.*, and *Agrobacterium sp.*

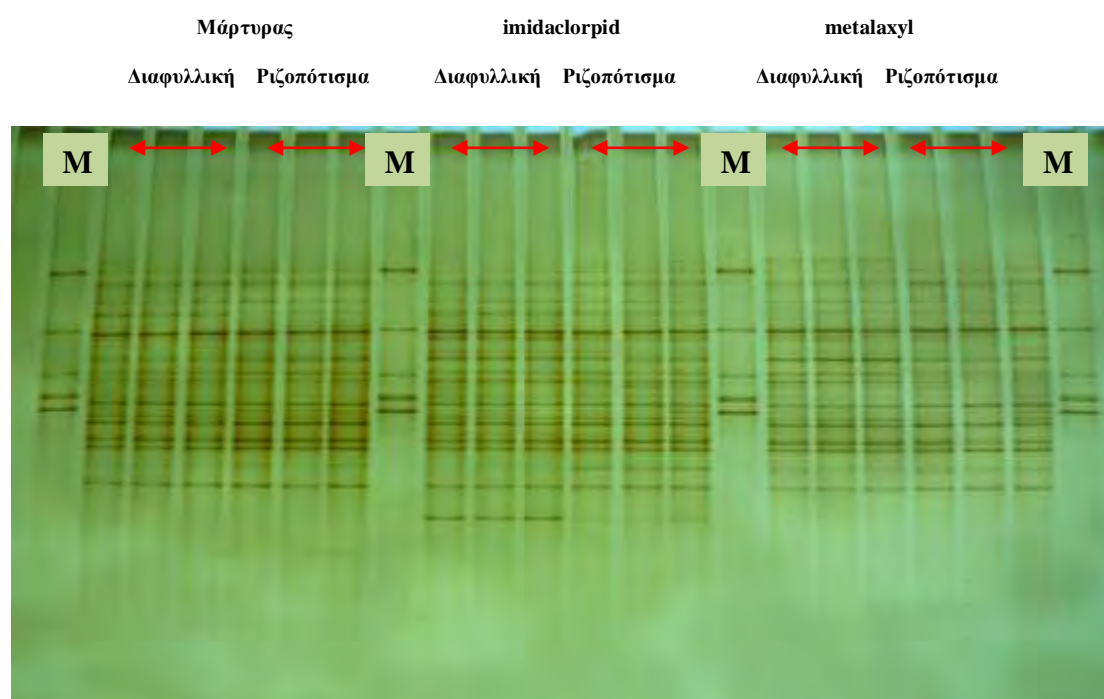


Εικόνα 10. Ανάλυση κατά συστάδες (UPGMA, Jaccard similarity matrix) του μοριακού αποτυπώματος των διαφόρων μεταχειρίσεων που παρουσιάζονται στην παραπάνω πηκτή DGGE. Η ομοιότητα μεταξύ των διαφόρων δειγμάτων που αναλύθηκαν φαίνεται στην κλίμακα κάτω από το δενδόγραμμα

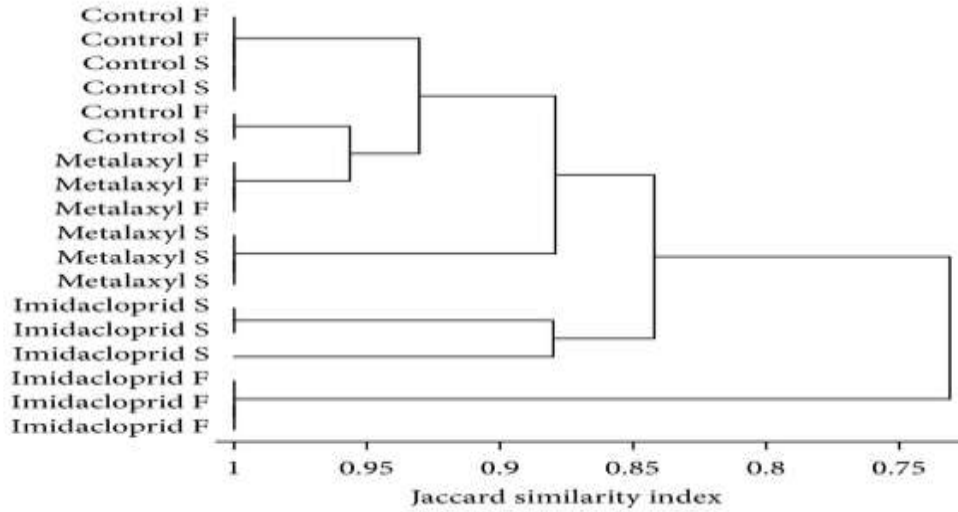
Μοριακή αποτύπωση της κοινότητας των μυκήτων στην φυλλόσφαιρα φυτών πιπεριάς

Τα μοριακά αποτυπώματα που παρήχθησαν από τις τρεις επαναλήψεις της κάθε μεταχείρισης παρουσίασαν σε γενικές γραμμές υψηλή ομοιότητα. Συνολικά, η DGGE ανάλυση της κοινότητας των μυκήτων είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση άνω των 20 ζωνών σε όλες τις μεταχειρίσεις, ενώ το μοτίβο που ακολουθούσαν ήταν μάλλον πολύπλοκο (Εικόνα 11). Ανάλυση κατά συστάδες έδωσε ως αποτέλεσμα την δημιουργία δύο κύριων συστάδων. Η πρώτη συστάδα αποτελείται από τα δείγματα των μαρτύρων (διαφυλλικά & ριζοπότισμα) των μεταχειρίσεων με metalaxyl (διαφυλλικά & ριζοπότισμα) και των δειγμάτων των μεταχειρίσεων imidacloprid με ριζοπότισμα. Τα δείγματα που περιέχονται εντός της πρώτης συστάδας παρουσιάζουν μια ομοιότητα > 84%. Η δεύτερη ομάδα αποτελείται μόνο από τα δείγματα της μεταχείρισης imidacloprid στο φύλλωμα και έδειξε > 70% ομοιότητα με τα δείγματα της πρώτης συστάδας. Στην πρώτη συστάδα, τα δείγματα διαχωρίστηκαν

περαιτέρω έτσι στην πρώτη υπό-ομάδα περιέχονται τα δείγματα των μεταχειρίσεων imidacloprid με ριζοπότισμα, ενώ στη δεύτερη υπό-ομάδα περιέχονται τα δείγματα των μεταχειρίσεων των μαρτύρων (διαφυλλικά & ριζοπότισμα) και των μεταχειρίσεων με metalaxyl (διαφυλλικά & ριζοπότισμα) όπου τα δείγματα της εφαρμογής με metalaxyl διαφυλλικά έδειξαν ομοιότητα >90% με τα δείγματα των μαρτύρων ενώ διαχωρίστηκαν τα δείγματα της εφαρμογής με metalaxyl στο έδαφος (Εικόνα 12).



Εικόνα 11. Εικόνα πηκτής DGGE σε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 30-55% όπου αναλύθηκαν τα προϊόντα PCR από την ITS περιοχή γονιδίου της κοινότητας των μυκήτων της φυλλόσφαιρας φυτών πιπεριάς, που είχαν υποστεί εφαρμογή imidacloprid, metalaxyl και νερού (μάρτυρας), διαφυλλικά ή με ριζοπότισμα. Όπου M marker που περιείχε $20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ITS -PCR προϊόντων των κάθε ένα από τους παρακάτω μύκητες με τη σειρά που αυτοί εμφανίζονται στην πηκτή από επάνω προς τα κάτω: *Pleurotus djamor*, *Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici*, *F. solani*, *P. eryngii*, *P. ostreatus*, and *P. cystidiosus*.



Εικόνα 12. Ανάλυση κατά συστάδες (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 δενδόγραμμα

Συζήτηση

Οι μικροοργανισμοί που κατοικούν στα υπέργεια μέρη των καλλιεργειών συνήθως εκτίθενται σε γεωργικά φάρμακα είτε με την εφαρμογή τους απευθείας στο φύλλωμα ή έμμεσα, μέσω της εφαρμογής τους στο εδάφος. Το τελευταίο ισχύει μόνο για τα διασυστημικά γεωργικά φάρμακα. Πρόσφατες μελέτες μας έχουν αποκαλύψει τον πλούτο του μικροβιακού κόσμου της φυλλόσφαιρας και τον σημαντικό ρόλο του στο συγκεκριμένο οικοσύστημα. Λίγα είναι γνωστά σχετικά με την αλληλεπίδραση των γεωργικών φαρμάκων με τους επίφυτους μικροοργανισμούς. Μελετήσαμε την επίδραση δύο διασυστημικών φυτοφαρμάκων (metalaxyl & imidacloprid) και του τρόπου εφαρμογής τους (ριζοπότισμα και διαφυλλικά) στη δομή της κοινότητας των μυκήτων και των βακτηρίων στη φυλλόσφαιρα φυτών πιπεριάς.

Η DGGE ανάλυση αποκάλυψε μια ιδιαίτερα καλά εγκατεστημένη κοινότητα μυκήτων και μια λιγότερο σύνθετη βακτηριακή κοινότητα. Από τη μία πλευρά, αυτό είναι ενάντια στην γενική αντίληψη ότι τα βακτήρια αποτελούν την κύρια ομάδα μικροοργανισμών στη φυλλόσφαιρα των φυτών (Vorholt 2012). Από την άλλη πλευρά, αυτό το εύρημα δεν προκαλεί έκπληξη λαμβάνοντας υπόψη ότι τα φυτά πιπεριάς αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες θερμοκηπίου οι οποίες ευνοούν την ταχεία ανάπτυξη παθογόνων μυκήτων στα εναέρια μέρη του φυτού. Αυτό επιβεβαιώθηκε και σε ακόλουθη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της μεταπτυχιακής διατριβής του κ. Μουλά όπου επιβεβαιώθηκε ότι στην κοινότητα των μυκήτων που ανιχνεύθηκαν στην φυλλόσφαιρα των φυτών πιπεριάς κυριαρχούσαν επίφυτοι φυτοπαθογόνοι μύκητες που άνηκαν στην οικογένεια Erysiphaceae και στο γένος *Cladosporium* (Moulas et al., 2013)

Σε γενικές γραμμές, τα δύο γεωργικά φάρμακα προκάλεσαν μάλλον ανεπαίσθητες μεταβολές στη δομή της κοινότητας των μυκήτων, με την εφαρμογή του imidacloprid στο φύλλωμα να προκαλεί τις πιο σημαντικές. Λίγα είναι γνωστά σχετικά με την επίδραση των εντομοκτόνων στη μικροβιακή φυλλόσφαιρα. Μια σειρά μελετών από τους Zhang et al., (2008,2009), έδειξε περιορισμένη επίδραση των εντομοκτόνων cypermethrin και abamectin στη βιομάζα των μυκήτων, ενώ ενδεχόμενες επιπτώσεις στη σύσταση της κοινότητας τους δεν μελετήθηκαν. Οι Ning et al., (2010). εξέτασαν τη μεταβολή του βακτηριακού πληθυσμού στη φυλλόσφαιρα σταφυλιών μετά

από την εφαρμογή του εντομοκτόνου dichlorvos. Βρέθηκε ότι η αποδόμηση του εντομοκτόνου ήταν ταχύτερη και αποτελεσματικότερη στην φυλλόσφαιρα με τον μικροβιακό πληθυσμό παρών σε σχέση με την αποστειρωμένη επιφάνεια

Η περιορισμένη επίπτωση του metalaxyl στην κοινότητα θα μπορούσε να αποδοθεί στο ότι είναι εκλεκτικό διασυστηματικό μυκητοκτόνο, με δράση εκλεκτική κατά των ωμοκλήτων. Προηγούμενες *in vitro* αναλύσεις φύλλων έδειξαν ότι ευρέος φάσματος μυκητοκτόνα όπως τα metiram και captan είχαν αρνητικές συνέπειες για την ανάπτυξη των επίφυτων βακτηρίων, μυκήτων και ζυμών με την τελευταία ομάδα μικροοργανισμών να είναι η πιο ευαίσθητη (Walter et al.,2007).

Η εφαρμογή των δυο γεωργικών φαρμάκων προκάλεσε μόνο μικρές αλλαγές στη δομή της βακτηριακής κοινότητας με μια μόνο από τις τρεις επαναλήψεις της εφαρμογής του metalaxyl στο έδαφος, να διαφέρει από όλα τα άλλα δείγματα. Προηγούμενη μελέτη από τους Gu et al., (2010) έδειξε ότι η εφαρμογή του μυκητοκτόνου enostrobutin προκαλεί σημαντικές αλλαγές στην βακτηριακή κοινότητα.

Ακόλουθη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της μεταπτυχιακής διατριβής του κ. Μουλά έδειξε ότι η κυριάρχη ζώνη που εμφανίζεται στο αποτύπωμα της βακτηριακής κοινότητας ανήκει σε αλληλουχία χλωροπλαστών από φυτά πιπεριάς (Moulas et al., 2013). Προηγούμενες μελέτες έχουν καταδείξει το συγκεκριμένο πρόβλημα μόλυνσης του DNA από την φυλλική επιφάνεια με DNA χλωροπλαστών το 16S γονίδιο των οποίων παρουσιάζει υψηλή ομολογία με το γονίδιο 16S rRNA των βακτηρίων (Sun et al., 2008, Rastogi et al., 2010, Hunter et al.,2010) με αποτέλεσμα να καθίσταται ιδιαίτερα δύσκολη η αποφυγή ανάλογων προβλημάτων στην ανάλυση της βακτηριακής ποικιλότητας στην φυλλόσφαιρα με την χρήση PCR-εξαρτώμενων μεθόδων ανάλυσης

Συμπεράσματα

Η μελέτη μας προσφέρει την πρώτη απόδειξη ότι η εφαρμογή των γεωργικών φαρμάκων, είτε απευθείας στο φύλλωμα ή μέσω του εδάφους, προκάλεσε μάλλον ήπιες αλλαγές στη δομή των επίφυτων κοινότητων μυκήτων και βακτηρίων. Περαιτέρω μελέτες θα εστιάσουν στην μελέτη πιθανών

επιδράσεων επιλεγμένων γεωργικών φαρμάκων στην λειτουργία της μικροβιακής κοινότητας της φυλλόσφαιρας με την χρήση τεχνικών πρωτεομικής.

Βιβλιογραφία

Almeida A.M.R., E. Binneck, F.F. Piugal, S.R.R. Marin, P.R.Z. Ribeiro and C.A. Silveira, Characterization of powdery mildews strains from soybean, bean, sunflower, and weeds in Brazil using rDNA-ITS sequences, *Tropical Plant Pathology*, vol. 33, pp.????, 2008

Baldotto L.E.B. and F.L. Olivares, Phylloepiphytic interaction between bacteria and different plant species in a tropical agricultural system. *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 54, pp. 918–931, 2008.

Borneman, J., Skroch, P.W., O'Sullivan, K.M., Palus, J.A., Rumjanek, N.G., Jansen, J.L., Nienhuis, J., Triplett, E.W., Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1935– 1943. 1996

Braun-Kiewnick, A., B. J. Jacobsen, and D. C. Sands. 2000. Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, the causal agent of basal kernel blight of barley, by antagonistic *Pantoea agglomerans*. *Phytopathology* 90:368–375, 2000.

Bunster L., H.J. Fokkema, and B. Schippers, Effect of surface activity of *Pseudomonas* sp. On leaf wettability. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 55, pp. 1340-1345, 1989.

Cadez N., J. Zupan and P. Raspor, The effect of fungicides on yeast communities associated with grape berries. *FEMS Yeast Research*, vol. 10, pp. 619-630, 2010.

Delmotte N., C. Knief, S. Chaffron, G. Innerebner, B. Roschitzki, R. Schlapbach, C. von Mering and J.A. Vorholt, Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106, pp. 16428-16433, 2009

European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy, Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance clothianidin, EFSA Journal vol 11(1), pp 3066,2013

Elbert A., M. Haas, B. Springer, W. Thielert and R. Nauen, Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. Pest Management Science, vol. 64, pp. 1099-1105, 2008.

El Fantroussi, S., Verschuere, L., Verstraete, W., Top, E.M., Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. Applied and Environmental Microbiology 65, 982– 988. 1999

El-Hendawy H. H., M. E. Osman and H. A. Ramadan, Pectic enzymes produced in vitro and in vivo by *Erwinia* spp. isolated from carrot and pepper in Egypt. Journal of Phytopathology, vol. 150, pp. 431-438, 2002.

Evenhuis A., A.G. Spits and H.T.A.M. Schepers, Efficacy of fungicidal protection of newly developing potato leaves against *Phytophthora infestans*. Crop Protection, vol. 25, pp. 562-568, 2006.

Fernández M., E. Prats, A.A. Emeran, and D. Rubiales, Characterization of resistance mechanisms to powdery mildew (*Erysiphe betae*) in beet (*Beta vulgaris*), Genetics and Resistance, vol. 99, pp. 385-389, 2009.

Fokkema N.J., and B. Schippers, «Phyllosphere vs rhizosphere as environments for saprotrophic colonization», in Microbiology of the phyllosphere (N.J. Fokkema and J. Van den Heuvel, eds), Cambridge University Press, London, United Kingdom, pp. 137-151, 1986.

Fonseca A., G. Scorzetti and J.W. Fell, Diversity in the yeasts *Cryptococcus albidus* and related species as revealed by ribosomal DNA sequence analysis. Canadian Journal of Microbiology, vol. 46: pp. 7–27, 2000.

Gardes M. and T.D. Bruns, ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, vol. 2, pp. 113-118, 1993.

Garland, J.L., Mills, A.L., Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level-sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 2351–2359, 1991

Ghanem I., M. Orfi, and M. Shamma, Biodegradation of chlorpyrifos by *Klebsiella* sp. isolated from an activated sludge sample of waste water treatment plant in Damascus. *Folia Microbiologica*, vol. 52, pp. 423-427, 2007.

Gu L., Z. Bai, B. Jin, Q. Hu, H. Wang, G. Zhuang and H. Zhang, Assessing the impact of fungicide enostroburin application on bacterial community in wheat phyllosphere. *Journal of Environmental Sciences*, vol. 22, pp. 134-141, 2010.

He Y-H., S. Isono, M. Shibuya, M. Tsuji, C-R. A. Purushothama, K. Tanaka and T. Sano, Oligo-DNA custom macroarray for monitoring major pathogenic and non-pathogenic fungi and bacteria in the phyllosphere of apple trees. *PLOS One*, vol. 7, e34249, 2012.

Hoagland D.R. and D.I. Arnon, The Water-Culture method for growing plants without soil, California Agricultural Experimental Station, Berkeley, Circular, vol. 347, pp. 1-39, 1938.

Hunter P. J., P. Hand, D. Pink, J. M. Whipps, and G. D. Bending, Both leaf properties and microbe-microbe interactions influence within-species variation in bacterial population diversity and structure in the lettuce (*Lactuca* Species) phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 76, pp. 8117-8125, 2010.

Imfeld G. and S. Vuilleumier, Measuring the effects of pesticides on bacterial communities in soil: a critical review. *European Journal of Soil Biology*, vol. 49, pp. 22–30, 2012.

Jackson C.R. and W.C. Denney, Annual and seasonal variation in the phyllosphere bacterial community associated with leaves of the southern Magnolia (*Magnolia grandiflora*). *Microbial Ecology*, vol. 61, pp. 113-122, 2011.

Jackson C.R., E.E. Roden and E.E. Churchill, Denaturing gradient gel electrophoresis can fail to separate 16S rDNA fragments with multiple base differences. *Molecular Biology Today*, vol. 1, pp. 49-51, 2000.

Jacobs J.L., Sundin G. W., Effect of Solar UV-B Radiation on a Phyllosphere Bacterial Community. *Applied and environmental microbiology*, vol 67,p p. 5488–5496, 2001

Janssen PH, Yates PS, Grinton BE, Taylor PM & Sait M Improved Culturability of Soil Bacteria and Isolation in Pure Culture of Novel Members of the Divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2391-2396,2002.

Jordan M.M., R.T. Burchill, and RB Maude, Epidemiology of *Cladosporium allii* and *Cladosporium allii-cepae*, leaf blotch pathogens of leek and onion. II. Infection of host plants. *Annals of Applied Biology*, vol. 117, pp. 327-336, 1990

Joseph SJ, Hugenholtz P, Sangwan P, Osborne CA & Janssen PH Laboratory Cultivation of Widespread and Previously Uncultured Soil Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 7210-7215,2003.

Jumpponen A. and K.L. Jones, Massively parallel 454 sequencing indicates hyperdiverse fungal communities in temperate *Quercus macrocarpa* phyllosphere. *New Phytologist*, vol. 184, pp. 438-448, 2009.

Kerkenaar A. and A.K. Sijpesteijn, Antifungal activity of metalaxyl and furalaxyl. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol.15, pp. 71-78, 1981.

Kim J.J., and G.W. Sundin, Regulation of the *ruvAB* mutagenic DNA repair operon of *Pseudomonas syringae* by UV-B (290- to 320-nanometers) radiation
Klebsiella sp. isolated from an activated sludge sample of waste water treatment plant in Damascus. *Folia Microbiologica*, vol. 52, pp. 423-427, 2007

Knief C., N. Delmotte, S. Chaffron, M. Stark, G. Innerebner, R. Wassmann, C. von Mering and J.A. Vorholt, Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. *ISME Journal*, vol. 6, pp. 1378–1390, 2012.

Konopka, A., Oliver Jr., L., Turco, R.F.,. The use of carbon source utilization patterns in environmental and ecological microbiology. *Microbial Ecology* 35, 103– 115,1998

Krimm U., Abanda-Nkpawatt D.,Schwab W.,Schreiber L., Epiphytic microorganisms on strawberry plants (*Fragaria ananassa* cv. Elsanta): identification of bacterial isolates and analysis of their interaction with leaf surfaces. *Microbiology Ecology* vol. 53,pp. 483–492, 2005

Lee T.Y., Mizubuti .E, Fry W.E., Genetics of metalaxyl resistance in *Phytophthora infestans*. *Fungal Genetics and Biology* , vol 26(2):118-30, 1999

Lindow S.E., and M.T. Brandl, Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69, pp. 1875–1883, 2003.

Lindow S.E. and Leveau J. H.J., Phyllosphere Microbiology. Current Opinion in Biotechnology, vol. 13, pp 238-243,2002

Mandyam K., T. Loughin and A. Jumpponen, Isolation and morphological and metabolic characterization of common endophytes in annually burned tallgrass prairie. Mycologia, vol. 102, pp. 813-821, 2010.

Marcell L.M., Beattie G. A., Effect of Leaf Surface Waxes on Leaf Colonization by *Pantoea agglomerans* and *Clavibacter michiganensis*. Molecular Plant-Microbe Interactions, Vol. 15, No. 12, pp. 1236–1244, 2002

Mert-Turk F., M.K. Gul and C.O. Egesel, Nitrogen and fungicide applications against *Erysiphe cruciferarum* affect quality components of oilseed rape. Mycopathologia, vol. 165, pp. 27-35, 2008.

Meyer K. M., and Leveau Johan H. J., Microbiology of the phyllosphere: a playground for testing ecological concepts. Oecologia vol. 168.,pp 621–629,2012

Middelhoven W.J., Catabolism of benzene compounds by ascomycetous and basidiomycetous yeasts and yeastlike fungi. A literature review and an experimental approach. Antonie van Leeuwenhoek vol. 63, pp. 125–144, 1993.

Miyamoto T., M. Kawahara and K. Minamisawa, Novel endophytic nitrogen-fixing clostridia from the grass *Miscanthus sinensis* as revealed by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. Applied and Environmental Microbiology, vol. 70, pp. 6580–6586, 2004.

Moulas C., Petsoulas C., Rousidou C., Perruchon C., Karras P., Karpouzias D.G., The effects of systemic pesticides imidachlopid and metalaxyl on the phyllosphere of pepper plants. BIOMED Research International <http://dx.doi.org/10.1155/2013/969750>),2013

Muyzer G., E.C. de Waal and A.G. Uitterlinden, Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 59, pp. 695–700, 1993.

Ning J., Z. Bai, G. Gang, D. Jiang, Q. Hu, J. He, H. Zhang and G. Zhuang, Functional assembly of bacterial communities with activity for the biodegradation of an organophosphorus pesticide in the rape phyllosphere. *FEMS Microbiology Letters* vol. 306, pp. 135-143, 2010.

Penuelas J., Rico L., Ogaya R., Jump AS., Terradas J., Summer season and long-term drought increase the richness of bacteria and fungi in the foliar phyllosphere of *Quercus ilex* in a mixed Mediterranean forest. *Plant Biology*. Vol 14, pp. 565-75, 2012.

Podschun R. and U. Ullmann, *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 11, pp. 589-603, 1998.

Rasche F., T. Lueders, M. Schloter, S. Schaefer, F. Buegger, A. Gattinger, R.C. Hood-Nowotny and A. Sessitsch, DNA-based stable isotope probing enables the identification of active bacterial endophytes in potatoes. *New Phytologist*, vol. 181, pp. 802-807, 2009.

Rastogi G., J.J. Tech, G.L. Coaker, J.H.J. Leveau, A PCR-based toolbox for the culture-independent quantification of total bacterial abundances in plant environments. *Journal of Microbiological Methods*, vol. 83, pp. 127-132, 2010

Redford A. J., & Fierer N., Bacterial Succession on the Leaf Surface: A Novel System for Studying Successional Dynamics. *Microb Ecol*, vol 58, pp 189–198, 2009

Rousidou C., K.K. Papadopoulou, G. Zervakis, B.K. Singh, C. Ehaliotis, D.G. Karpouzias, Fractioned land application of diluted olive mill wastewater

induces changes in the structure of the soil microbial community. *European Journal of Soil Biology*, vol. 46, pp. 34-40, 2010.

Ruppel S., Krumbein A., Schreiner M., Composition of the Phyllospheric Microbial Populations on Vegetable Plants with Different Glucosinolate and Carotenoid Compositions. *Microb Ecol*, vol 56,pp. 364–372,2008

Sait M, Hugenholtz P & Janssen HP Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivationindependent surveys. *Environmental Microbiology* 4, 654-666, 2002.

Saito A.,Ikeda S., Ezura H., and Minamisawa L., Microbial Community Analysis of the Phytosphere Using Culture – Indipendent Methodologies. *Microbes and Enviroments*, vol. 22, No 2, pp. 93-105, 2007

Sakai M., A. Matsuka, T. Komura and S. Kanazawa, Application of a new PCR primer for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the bacterial communities in plant roots. *Journal of Microbiological Methods*, vol. 59, pp. 81–89, 2004.

Seghers D, Verthé K, Reheul D, Bulcke R, Siciliano SD, Verstraete W, Top E.M. Effect of long-term herbicide applications on the bacterial community structure and function in an agricultural soil. *FEMS Microbiology Ecology* 46, 139-146,2003

Singh B. K., A. Walker, J.A.W. Morgan and D.J. Right, Biodegradation of chlorpyrifos by *Enterobacter* strain B-14 and its use in bioremediation of contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 70, pp.

Sun L., F. Qiu, X. Zhang, X. Dai, X. Dong and W. Song, Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microbial Ecology*, vol. 55, pp. 415–424, 2008.

Tiedje JM, Asuming-Brempong S, Nusslein K, Marsch TL, Flynn SJ. Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology* 13, 109–22, 1999

Vallaeyts T., E. Topp, G. Muyzer, V. Macheret, G. Laguerre, A. Rigaud, and G. Soulas, Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 24, pp. 279-285, 1997.

Van Elsas, J.D., Frois-Duarte, G., Keijzer-Wolters, A., Smit, E.. Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* 43, 133–151, 2000.

Vanechoutte, M., L. Dijkshoorn, I. Tjernberg, A. Elaichouni, P. De vos, G. Claeys, and G. Verschraegen.. Identification of *Acinetobacter* Genomic Species by Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis. *J. Clin. Microbiol.* 33:11–15, 1995

Vokou D., Vareli K., Zarali E., Karamanoli K., Constantinidou HI., Monokrousos N., Halley JM., Sainis I., Exploring biodiversity in the bacterial community of the Mediterranean Phyllosphere and its relationship with airborne bacteria. *Microbial Ecology*, vol. 64, pp., 714-24, 2012

Vorholt J.A., Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology*, vol. 10, pp. 828-840, 2012.

Walter M., C. Frampton, K. Wilson, P. Virgin, and N. Waipara, Agrichemical impact on growth and survival of non-target apple phyllosphere microorganisms. *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 53, pp. 45-55, 2007

Whipps J. M., P. Hand, D.A.C. Pink and G.D. Bending, Human pathogens and the phyllosphere. *Advances in Microbial Physiology*, vol. 64, pp. 183-221, 2008b.

Whipps J.M., P. Hand, D. Pink and G.D. Bending, Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 105, pp. 1744-1755, 2008a.

Whitehorn, P. R.; O'Connor, S.; Wackers, F. L.; Goulson, D., "Neonicotinoid Pesticide Reduces Bumble Bee Colony Growth and Queen Production". *Science* vol 336 (6079) pp 351–2, 2012.

Yadav R. K. P., Karamanolis K., Vokou D., Bacterial Colonization of the Phyllosphere of Mediterranean Perennial Species as Influenced by Leaf Structural and Chemical Features. *Microbial Ecology*, Vol 50, pp. 185–196, 2005

Yang C-H., D.E. Crowley, J. Borneman and N.T. Keen, Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 98: pp. 3889-3894, 2001.

Yuan Z-L., C-L. Zhang, F-C. Lin and C.P. Kubicek, Identity, diversity, and molecular phylogeny of the endophytic mycobiota in the roots of rare wild rice (*Oryza granulate*) from a nature reserve in Yunnan, China. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 76, pp. 1642-1652, 2010.

Zhang B., H. Zhang, B. Jin, L. Tang, J. Yang, B. Li, G. Zhuang and Z. Bai, Effect of cypermethrin insecticide on the microbial community in cucumber phyllosphere. *Journal of Environmental Sciences*, vol. 20, pp. 1356-1362, 2008.

Zhang B., Z. Bai, D. Hoefel, L. Tang, X. Wang, B. Li, Z. Li and G. Zhuang, The impact of cypermethrin pesticide application on the non-target microbial community of the pepper plant phyllosphere. *Science of the Total Environment* vol. 407: pp. 1915-1922, 2009a.

Zhang B-G., L. Tang, Z-M., Li, H-L. Wang, W-T. Xu, H-X. Zhang, G-Q. Zhuang and Z-H. Bai, Effect of abamectin insecticide on the microbial

community in broccoli phyllosphere. *Environmental Science*, vol. 30, pp. 1292-1297, 2009b.

Zhang Baoguo, Zihui Bai, Daniel Hoefel, Ling Tang, Zhiguang Yang, Guoqiang Zhuang, Jianzhou Yang & Hongxun Zhang. Assessing the impact of the biological control agent *Bacillus thuringiensis* on the indigenous microbial community within the pepper plant phyllosphere. *FEMS Microbiol Lett* 284 :pp 102–108, 2008