

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος

Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Βιοτεχνολογία - Ποιότητα διατροφής και περιβάλλοντος

Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος

<<Μελέτη της συμβιωτικής μικροβιακής κοινότητας του
άνθους του *Brassica oleracea* >>



Πτυχιακή Διατριβή
Αθανασίας Κατσούλα

Λάρισα, 2013

**<< Μελέτη της συμβιωτικής μικροβιακής κοινότητας του άνθους
του *Brassica oleracea* >>**

**<< Study of symbiotic microbe community of the flower of
Brassica oleracea >>**

ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ & ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Παπαδοπούλου Καλλιόπη**, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
2. **Καρπούζας Δημήτριος**, Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
3. **Παπαδέλη Μαρίνα**, Καθηγήτρια Εφαρμογών Τμήμα Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων, ΤΕΙ Καλαμάτας

Περίληψη

Το αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η καταγραφή της συμβιωτικής μικροβιακής κοινότητας στο άνθος του φυτού *Brassica oleracea*. Πιο συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια να απομονωθούν βακτηριακά στελέχη που συμβιώνουν ενδοφυτικά του άνθους του φυτού, με την κοινή ονομασία μπρόκολο.

Το μπρόκολο αποτελεί μία τροφή πλούσια σε βιταμίνες και ιχνοστοιχεία, αρκετά δημοφιλής ανά τον κόσμο, καθώς τρώγεται τόσο ωμό όσο και μαγειρεμένο.

Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν μπρόκολα από 3 διαφορετικές πηγές: συμβατικής καλλιέργειας, βιολογικής (εισαγωγής από την Ιταλία), και από ερασιτεχνικό αγρό. Ο ενδοφυτικός βακτηριακός πληθυσμός μελετήθηκε με την απομόνωση στελεχών σε θρεπτικά μέσα και τον γενετικό χαρακτηρισμό αυτών με αλληλούχιση του 16S rDNA. Επίσης δημιουργήθηκε μια 16S rDNA βιβλιοθήκη για τον προσδιορισμό των βακτηριακών στελεχών που η καλλιέργεια τους δεν επιτεύχθηκε στο πλαίσιο των απομονώσεων αυτής της εργασίας.

Μέχρι πρότινος το άνθος θεωρούταν το κομμάτι του φυτού, το οποίο ήταν σχετικά αποστειρωμένο-απομονωμένο από μικροοργανισμούς. Με την εργασία αυτή αποδείχθηκε ότι δεν ισχύει κάτι τέτοιο και ότι υπάρχει μία ολόκληρη ενδοφυτική κοινότητα, ο ρόλος των μελών της οποίας στη φυσιολογία του φυτού μένει να μελετηθεί.

Abstract

The present study aims at investigating the symbiotic microbial community of the flower of *Brassica oleracea*. More specifically, in this study we tried to isolate bacterial strains who can live symbiotically within the flower of the plant, commonly named as broccoli.

Broccoli is a food rich in vitamins and microelements, popular all over the world, as it is eaten either raw or cooked. In this study, broccoli from three different sources, were examined: from conventional, biological farming and from a personal garden. The endophytic bacterial population examined, was isolated in nutrient media and genetically characterized with 16S rDNA gene sequencing. A 16s rDNA library was also created, in order to identify the bacterial strains, the isolation of which in culture was not achieved during the present study.

Until recently the flower was considered as the part of the plant that is rather sterilized, isolated from microorganisms. With this study it is proved that there is a whole new endophytic community, remaining to be investigated.

Ευχαριστίες

Μέσω αυτής της παραγράφου θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους εκείνους που με βοήθησαν και με στήριξαν για την περάτωση αυτής της διπλωματικής εργασίας.

Για την συγγραφή αυτής της διπλωματικής εργασίας ευχαριστώ πολύ την αναπληρώτρια καθηγήτρια Καλλιόπη Παπαδοπούλου. Χωρίς την βοήθειά της αυτή η διπλωματική εργασία δε θα γινόταν ποτέ. Την ευχαριστώ θερμά για την σωστή καθοδήγηση και την υπομονή που υπέδειξε, κατά την συγγραφή της.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ και στην υποψήφια διδάκτορα Βασιλική Σκιαδά, η οποία με την εμπειρία της, τις συμβουλές της και την αστείρευτη υπομονή της, βοήθησαν στην περαίωση αυτής της διπλωματικής εργασίας, χωρίς ένδειξη κόπωσης.

Τους γονείς μου Κωνσταντίνο Κατσούλα και Ελευθερία Μαυραντζά, τους ευχαριστώ θερμά για όλα. Για τις ηθικές αξίες που μου έδωσαν μεγαλώνοντας, για την ευκαιρία που μου έδωσαν να σπουδάσω και για την εμπύχωση τους σε όλες τις δύσκολες στιγμές.

Πίνακας Περιεχομένων

1	Εισαγωγή	8
1.1	Οικογένεια <i>Brassicaceae</i> ή <i>Cruciferae</i> , Σταυρανθή	8
1.2	<i>Brassica spp.</i>	9
1.3	<i>Brassica oleracea var. asparagoides (broccoli)</i>	10
1.4	Οικονομική σημασία των Αγγειοσπέρμων. Η περίπτωση του μπρόκολου.	12
2	Υλικά και Μέθοδοι	22
2.1	Απομόνωση ενδοφυτικών μικροοργανισμών	22
2.1.1	Απολύμανση	22
2.1.2	Απομόνωση ενδοφυτικών μικροοργανισμών	23
2.1.3	Εξαγωγή ολικού γενωμικού υλικού από τις απομονωμένες βακτηριακές αποικίες	23
2.1.4	Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου που κωδικοποιεί για το 16S rRNA με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)	24
2.1.5	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	26
2.1.6	Απομόνωση - ανάκτηση DNA από το πήκτωμα αγαρόζης	26
2.1.7	Ανάγνωση αλληλουχιών & Φυλογενετική ανάλυση	26
2.2	Κατασκευή 16S rDNA βιβλιοθήκης	27
2.2.1	Απομόνωση ολικού DNA από το άνθος του μπρόκολου με τη μέθοδο CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide)	27
2.2.2	Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου που κωδικοποιεί για το 16S rRNA με τη μέθοδο PCR	28
2.2.3	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	30
2.2.4	Υποκλωνοποίηση	30
2.2.5	Τεχνητή σύνδεση δύο μορίων DNA (Ligation reaction)	31
2.2.6	Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> DH5a (Transformation)	32
2.2.7	Επιλογή θετικών κλώνων και επιβεβαίωση ένθεσης του επιθυμητού τμήματος με DNA με colony PCR	32
2.2.8	Απομόνωση του πλασμιδιακού DNA (Plasmid prep)	33
3	Αποτελέσματα	34
3.1	Συμβατική καλλιέργεια	34
3.2	Βιολογική καλλιέργεια	38
3.3	Ερασιτεχνικός αγρός	41
3.4	Φυλογενετική ανάλυση απομονωθέντων ενδοφυτικών βακτηρίων	45
3.5	Κατασκευή 16S rDNA βιβλιοθήκης (clone library)	47
4	Συζήτηση	50
5	Βιβλιογραφία	54
5.1	Άρθρα	54
5.2	Ιστοσελίδες	59
5.3	Βιβλία	60
5.4	Εικόνες	60
5.5	Πίνακες	61

1 Εισαγωγή

1.1 Οικογένεια *Brassicaceae* ή *Cruciferae*, Σταυρανθή

Ανθικός τύπος:

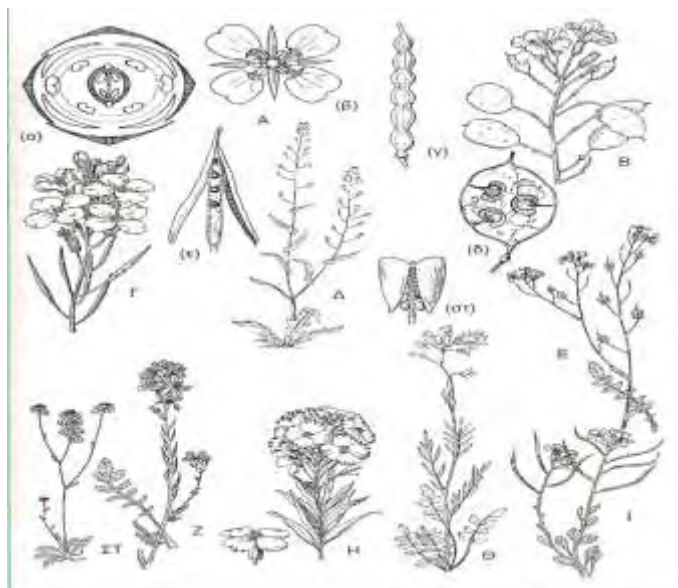
- Κάλυκας 4μελής
- Στεφάνη 4μελής
- Ανδρείο αποτελείται από δύο σπονδυλωτά το ένα 4μελές και το άλλο 2μελές
- Γυναικείο αποτελείται από σύμφυση 2 μελών



Εικόνα 1. Ανθίδιο της ανθικής κεφαλής του μπρόκολου

Περιλαμβάνει ετήσια, διετή ή πολυετή ποώδη φυτά, με ποικιλόμορφα φύλλα, κατ' εναλλαγή άνθη κατά βότρυ που αποκαλύπτουν σχέσεις συγγένειας με τις προγονικές μορφές της οικογένειας *Capparaceae*. Στήμονες τετραδύναμοι (ένα ζεύγος βραχέων και δύο ζεύγη μακρών στημόνων). Καρπός κέρας ή κεράτιο, σπανίως κάρυο, που μετά την ωρίμανση ανοίγει στη συρραφή των καρπόφυλλων, από κάτω προς τα πάνω και εμφανίζεται στη μέση το μεμβρανώδες ψευδοδιάφραγμα, πάνω στο οποίο βρίσκονται τα σπερματάνθη. Σπέρματα ελαιούχα, πολλές φορές καυστικά, με μεγάλο έμβρυο και σχεδόν χωρίς ενδοσπέρμιο.

Διαγνωστικά γνωρίσματα των ειδών της οικογένειας, που ταξινομούνται στα γένη *Alyssum*, *Brassica*, *Cakile*, *Capsella*, *Cardamine*, *Crdaria*, *Eruca*, *Erysimum*, *Lpidium*, *Lunaria*, *Malcolmia*, *Raphanus*, *Sinapis*, *Sisymbrium* κ.α., αποτελούν η μορφή του καρπού, η θέση του εμβρύου στο σπέρμα και η διάταξη των νεκταριοφόρων αδένων (Σαρλής, 1999).



Εικόνα 2. *Brassicaceae*: Α. (α) ανθικό διάγραμμα, (β) άνθος, (γ) καρπός (αρθρωτό κέρασ) του *Raphanus raphanistrum*. Β. *Lunaria annua*: (δ) καρπός (κεράτιο). Γ. *Brassica oleracea*: (ε) καρπός (κέρασ). Δ. *Capsella bursa-pastoris*: στ. καρπός (κεράτιο). Ε. *Bunias erucago*. ΣΤ. *Biscutella laevigata*. Ζ. *Eruca vesicaria subsp. sativa*. Η. *Cheiranthus cheiri*. Θ. *Cardamine pratensis*. Ι. *Malcolmia maritima*.

1.2 *Brassica* spp.

Καλλιεργούμενες ποικιλίες του *Brassica oleracea* που χρησιμοποιούνται στη διατροφή του ανθρώπου αναφέρονται παρακάτω (Σαρλής, 1999).

B. oleracea (*cabbage*) κν. κράμβη

B. oleracea var. *acephala* (*kale*) κν. λαχανίδα

B. « « *asparagoides* (*broccoli*) κν. μπρόκολο, παραπούλι

B. « « *botrytis* (*cauliflower*) κν. κουνουπίδι

B. « « *capitata* (*common cabbage*) κν. λάχανο

B. « « *gemmifera* (*Brussels sprouts*) κν. λάχανο Βρυξελών

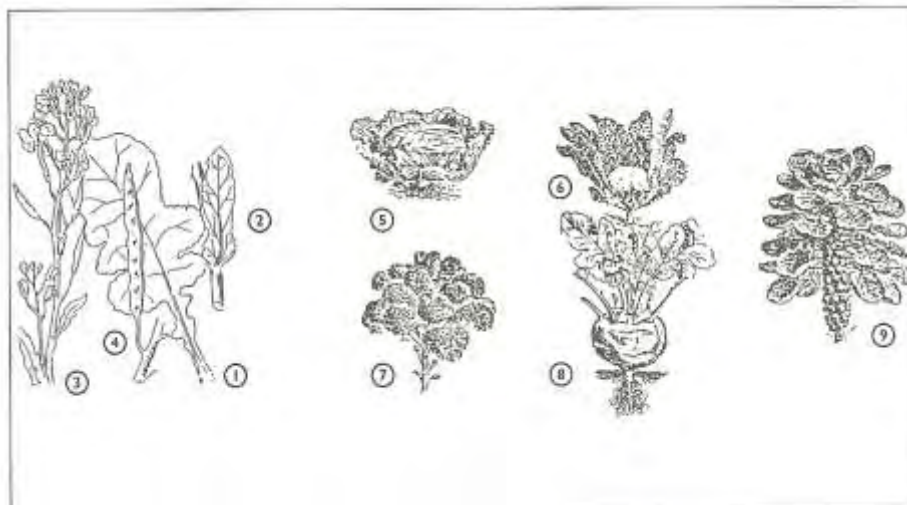
B. « « *gongyloides* (*kohlrabi*) κν. γογγύλι

B. « « *rapa* (*turnip*) κν. ρέβα

B. « « *sabauda* κν. λάχανο του Μιλάνου (Σαρλής, 1999)

1.3 *Brassica oleracea* var. *asparagoides* (broccoli)

Το μπρόκολο ανήκει στην οικογένεια λαχανοειδών, του οποίου το μεγάλο άνθος-κεφαλή χρησιμοποιείται ως λαχανικό. Η λέξη μπρόκολο προέρχεται από την ιταλική *Broccolo*, που αναφέρεται στην ανθική κεφαλή του λάχανου. Το μπρόκολο συνήθως τρώγεται είτε βρασμένο σε νερό είτε στον ατμό, αλλά μπορεί να φαγωθεί και ωμό. Τα φύλλα του μπρόκολου είναι επίσης εδώδιμα.



Εικόνα 3. *Brassica oleracea*.: 1. φύλλο της βάσης, 2. φύλλο του βλαστού, 3. άνθη και καρποί, 4. καρπός, 5. λάχανο «πλακωτό», 6. κουνουπίδι, 7. «ακέφαλο» λάχανο, 8. γογγυλώδες λάχανο, 9. λάχανο των Βρυξελλών.

Το μπρόκολο έχει μεγάλη ανθική κεφαλή, συνήθως σε πράσινο χρώμα, οργανωμένο σε μορφή ομοιάζουσα με δένδρο, με κλάδους που φύονται από έναν κύριο βρώσιμο κορμό-βλαστό. Η ανθική κεφαλή περιστοιχίζεται από φύλλα. Το μπρόκολο ομοιάζει περισσότερο το κουνουπίδι, το οποίο είναι μία διαφορετική ποικιλία από αυτήν του μπρόκολου.



Εικόνα 4. Ανθός φυτού του μπρόκολου, αποτελεί το βρώσιμο κομμάτι του φυτού.

Το μπρόκολο έχει υψηλή περιεκτικότητα σε βιταμίνη C και φυτικές ίνες, επίσης περιέχει πολλά θρεπτικά στοιχεία με αντικαρκινικές ιδιότητες, όπως το δινδολυμεθάνιο και

μικροποσότητα σε σελήνιο. Μία απλή μερίδα προσφέρει περισσότερο από 30 mg της βιταμίνης C. Το 3,3'-διινδολυμεθάνιο που βρίσκεται στο μπρόκολο είναι ένας πιθανός ρυθμιστής του ανοσοποιητικού συστήματος με αντικές, αντιβακτηριδιακές και αντικαρκινικές ιδιότητες.

Πίνακας 1 Θρεπτικά στοιχεία μπρόκολου. Πηγή: USDA

Raw Broccoli nutrition value		
nutrients	Value per 100g	Unit
Water	89.30	g
Energy	34	kcal
Protein	2.82	g
Total lipid (fat)	0.37	g
Carbohydrate, by difference	6.64	g
Fiber, total dietary	2.6	g
Sugars, total	1.70	g
Calcium, Ca	47	mg
Iron, Fe	0.73	mg
Magnesium, Mg	21	mg
Phosphorus, P	66	mg
Potassium, K	316	mg
Sodium, Na	33	mg
Zinc, Zn	0.41	mg
Vitamin C, total ascorbic acid	89.2	mg
Thiamin	0.071	mg
Riboflavin	0.117	mg
Niacin	0.639	mg
Vitamin B-6	0.175	mg
Folate, DFE	63	μg
Vitamin B-12	0.00	μg
Vitamin A, RAE	31	μg
Vitamin A, IU	623	IU
Vitamin E (alpha-tocopherol)	0.78	mg
Vitamin D (D2 + D3)	0.0	μg
Vitamin D	0	IU
Vitamin K (phylloquinone)	101.6	μg
Fatty acids, total saturated	0.039	g
Fatty acids, total monounsaturated	0.011	g
Fatty acids, total polyunsaturated	0.038	g
Cholesterol	0	mg
Caffeine	0	mg

Το μπρόκολο επίσης περιέχει και το γλυκοσινολικό οξύ γλουκοραφάνινη (glucoraphanin), το οποίο με υδρόλυση μετατρέπεται στην αντικαρκινική ένωση σουλφοραφάνη (sulforaphane). Μια άλλη αξιοσημείωτη ιδιότητα του μπρόκολου είναι ότι αποτελεί σπουδαία πηγή σε ινδολ-3-καρβινόλη (indole-3-carbinol), μία χημική ένωση που ενισχύει την επιδιόρθωση του DNA στα κύτταρα και εμφανίζεται να εμποδίζει την αύξηση και ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων.

Το μπρόκολο περιέχει τα υψηλότερα επίπεδα καροτενοειδών συγκριτικά με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας *Brassicaceae*. Είναι αρκετά πλούσιο σε λουτεΐνη και επίσης παρέχει ικανοποιητικά επίπεδα β-καροτίνης. Υψηλά επίπεδα κατανάλωσης μπρόκολου έχει βρεθεί να μειώνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη. Αναφέρεται επίσης ότι δρα ως αποτρεπτικός παράγοντας των καρδιακών νοσημάτων. Ακόμη και τα σπορόφυτα του μπρόκολου προτείνονται για τις θεραπευτικές τους ιδιότητες.

1.4 Οικονομική σημασία των Αγγειοσπέρμων. Η περίπτωση του μπρόκολου.

Τα είδη των Αγγειοσπέρμων αποτελούν για τον άνθρωπο πηγή διατροφής, τεχνικών υλών, ενέργειας και φαρμάκων, γεγονός που καθίσταται περισσότερο κατανοητό, όταν για διδακτικούς σκοπούς τα φυτά δύνανται να διακριθούν σε εδώδιμα, αρωματικά, κλωστικά, δασικά, καλλωπιστικά, μελισσοτροφικά, νομευτικά, τοξικά, φυτά με επιστημονικό και βιολογικό ενδιαφέρον, φυτά μεγάλης καλλιέργειας, βαφικά - χρωστικά, αρωματικά και φαρμακευτικά, χωρίς να αποκλείεται η περίπτωση ένα φυτό να ανήκει ταυτόχρονα σε δύο, τρεις ή και σε περισσότερες κατηγορίες.

Η εξάρτηση του ανθρώπου από τα φυτά για τα απαραίτητα της υπάρξεώς του, δηλαδή τροφή, ένδυση, στέγαση, δημιουργήθηκε από τότε που πρωτοεμφανίστηκε στον πλανήτη. Έτσι, στα φυτά αναζήτησε την τροφή του, αφού στη φυσική πυραμίδα της θρέψεως αυτά αποτελούν τη βάση της παραγωγής οργανικής ουσίας.

Στα εδώδιμα φυτά περιλαμβάνονται τα λαχανικά και οι καρποί, που αποτελούν την κύρια τροφή του ανθρώπου, ενώ στα αρωματικά φυτά, τα αρτύματα ή καρυκείματα που απλώς συνοδεύουν τις άλλες φυτικές ή ζωικές τροφές. Τα λαχανικά αποτελούν σημαντική πηγή ανόργανων αλάτων, βιταμινών και υδατανθράκων. Μερικά επίσης είναι πλούσια σε πρωτεΐνες ή περιέχουν και λίπη.

Το *B. oleracea* έχει εδραιωθεί ως μία σημαντική τροφή για τον άνθρωπο, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης θρεπτικών στοιχείων, που λαμβάνει χώρα στα φύλλα τον χειμώνα. Είναι πλούσιο

σε βασικά θρεπτικά συστατικά, συμπεριλαμβανομένου και της βιταμίνης C.

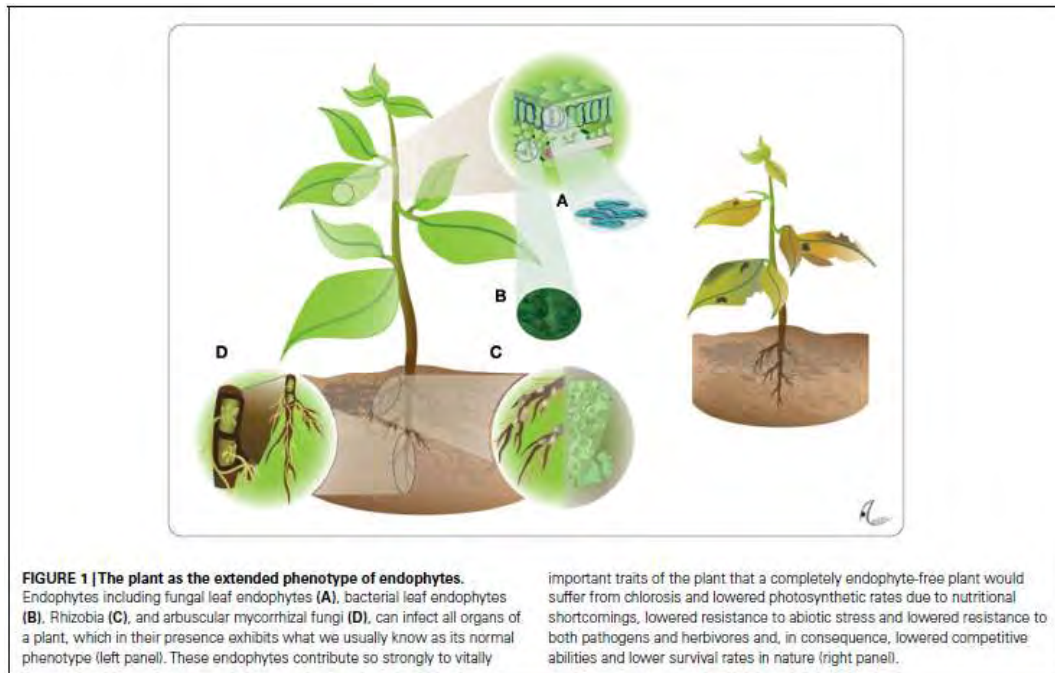
Παρ' όλο που πιστεύεται πως καλλιεργείται για πολλές χιλιάδες χρόνια, η ιστορία του ως εξημερωμένο φυτό δεν είναι καθαρή πριν την Έλληνο-Ρωμαϊκή περίοδο, όπου ήταν πλέον εδραιωμένο ως κηπευτικό λαχανικό. Ο Θεόφραστος αναφέρει τρία είδη ράφανου, ένα με σγουρά φύλλα, ένα με ίσια φύλλα και ο άγριος τύπος. Αναφέρει επίσης και την αντιπάθεια μεταξύ του λάχανου και της αμπέλου, διότι οι αρχαίοι πίστευαν πως τα λάχανα που φυτρώνουν δίπλα σε αμπέλια δίνουν ξεχωριστή γεύση στο κρασί. Έχει υβριδοποιηθεί σε μεγάλη ποικιλία καλλιεργήσιμων ειδών όπως κουνουπίδι, μπρόκολο, λάχανο, κ.α., μερικά των οποίων είναι δύσκολο να αναγνωριστούν ως μέλη του ίδιου γένους, πόσο μάλλον του ίδιου είδους. (Σαρλής, 1999).

1.5 Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί

Στη φύση, τα φυτά αποικίζονται από πληθώρα μικροοργανισμών. Ο βαθμός της μικροβιακής αποίκησης σε ζώντα φυτά-ξενιστές ποικίλει αναλόγως του είδους του φυτού. Οι μικροοργανισμοί μπορεί να είναι επιφυτικοί, ενδοφυτικοί ή δυνητικά παθογόνοι. Όταν οι μικροοργανισμοί αποικίσουν το φυτό-ξενιστή και ο ιστός του φυτού παραμένει υγιής, τότε η σχέση μεταξύ του μικροοργανισμού και του ξενιστή μπορεί να περιγραφεί ως δυνητικά παθογόνος ή ως συμβιωτική. Οι μικροοργανισμοί οι οποίοι εισέρχονται υπό φυσιολογικές συνθήκες εντός του ιστού ζώντων αυτότροφων οργανισμών, χωρίς να προκαλούν κάποια αισθητά συμπτώματα ασθένειας, χαρακτηρίζονται ως ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί. Ωστόσο, οι ίδιοι μικροοργανισμοί μπορεί να είναι σαπροφάγοι ή παθογόνοι σε κάποια άλλη χρονική στιγμή. Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί έχουν απομονωθεί από ιστούς πολλών ζώντων οργανισμών, μεταξύ των οποίων άλγη, λειχήνες, φτέρες, γρασίδι, χορτοδοτικά φυτά και δένδρα που διαβιών σε τροπικές, εύκρατες, βόρειες και αρκτικές συνθήκες. Γενικώς οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί βρίσκονται εντός του ιστού των περισσότερων τμημάτων των φυτών-ξενιστών.

Ο ορισμός για τον όρο «ενδοφυτικός οργανισμός» που γίνεται αποδεκτός από τους περισσότερους ερευνητές σήμερα είναι ο ορισμός κατά Wilson (1995): «Ενδόφυτα είναι μύκητες ή βακτήρια που, για μέρος ή για όλη τη διάρκεια του κύκλου ζωής τους, εισχωρούν στους ιστούς ζώντων φυτών και προκαλούν μη φαινομενικές και ασυμπτωματικές μολύνσεις εξ' ολοκλήρου εντός του φυτικού ιστού, χωρίς όμως να προκαλούν συμπτώματα ασθένειας. Γι' αυτό, ο όρος ενδόφυτο δεν περιγράφει μόνο την τοποθεσία, αλλά και τη στρατηγική προσβολής

που ακολουθεί ένας συγκεκριμένος μύκητας ή βακτήριο, ανεξάρτητα από την ταξινόμηση αυτού ή τον κύκλο προσβολής» (Wilson, 1995).



Εικόνα 5. Το φυτό ως ο εκτεταμένος φαινότυπος των ενδοφυτικών μικροοργανισμών. Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί συμπεριλαμβανομένου και των ενδοφυτικών μυκήτων του φύλλου (A), ενδοφυτικά βακτήρια του φύλλου (B), ριζόβια (C), δενδριώδεις μυκορριζικοί μύκητες (D), Μπορούν να προσβάλλουν όλα τα όργανα του φυτού, και κατά την παρουσία τους το φυτό επιδεικνύει τον συνήθη φαινότυπό του (αριστερή εικόνα). Αυτοί οι ενδοφυτικοί οργανισμοί συμβάλουν τόσο πολύ σε ζωτικής σημασίας χαρακτηριστικά του φυτού, που ένα φυτό ελεύθερο από ενδόφυτα θα εμφάνιζε χλώρωση και χαμηλά επίπεδα φωτοσύνθεσης, λόγω μειωμένης πρόσληψης θρεπτικών συστατικών, χαμηλών επιπέδων αντίστασης σε στρες προκαλούμενο από αβιοτικούς παράγοντες και χαμηλά επίπεδα αντίστασης τόσο σε παθογόνα όσο και σε φυτοφάγους. Αποτέλεσμα όλων αυτών είναι η χαμηλή ανταγωνιστική ικανότητα του φυτού και μειωμένες πιθανότητες επιβίωσης του στη φύση (δεξιά εικόνα) (Partida-Martinez *et al*, 2011).

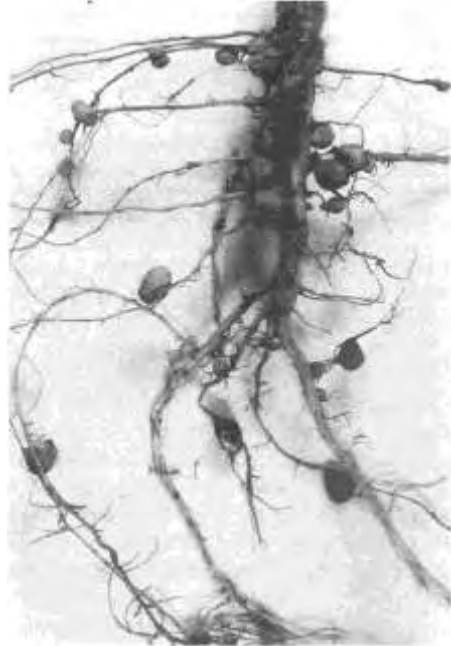
Οι πιθανές ωφέλειες που μπορεί να προσφέρει ο ένας οργανισμός στον άλλο είναι: (α) προμήθεια θρεπτικών ουσιών, (β) προμήθεια ενέργειας, (γ) προστασία από δυσμενείς καιρικές συνθήκες ή από εχθρούς και (δ) μεταφορά, είτε των ίδιων ατόμων είτε των αναπαραγωγικών οργάνων από δυσμενή σε ευνοϊκά περιβάλλοντα. Παρακάτω παρατίθενται παραδείγματα αλληλοεπωφελούμενης συμβίωσης:

➤ **Μυκόρριζες**

Στο σύνολο τους σχεδόν τα φυτά και πολλοί άλλοι αυτότροφοι οργανισμοί "προσβάλλονται" στις ρίζες τους από μύκητες, οι οποίοι σχηματίζουν τις μυκόρριζες. Ο μύκητας προμηθεύεται υδατάνθρακες από τα αυτότροφα φυτά και προσφέρει θρεπτικά στοιχεία ή και νερό, τα οποία προσλαμβάνει με μεγαλύτερη ευκολία από το έδαφος. Ο σχηματισμός μυκορριζών είναι φαινόμενο πολύ διαδεδομένο σε όλες τις φυτοκοινότητες της Γης. Παλαιοντολογικά ευρήματα

δείχνουν ότι μυκόρριζες σχηματίζουν και τα πρώτα φυτικά είδη τα οποία εμφανίσθηκαν στη Γη. Πολλά είδη αυτότροφων οργανισμών, που δεν σχηματίζουν ριζικά τριχίδια ή και ρίζες, μπορούν να διαβιούν σε ορισμένες περιοχές, γιατί σχηματίζουν μυκόρριζες.

➤ Ο πιο συνηθισμένος τύπος συμβίωσης πραγματοποιείται ανάμεσα σε μέλη της οικογένειας φυτών *Leguminosae* και σε εδαφικά βακτήρια των γενών *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* και *Photorhizobium*. Η συμβίωση μεταξύ αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων (γνωστά με το κοινό όνομα ριζόβια) με ψυχανθή φυτά έχει μεγάλη γεωργική και οικολογική σπουδαιότητα και, ως εκ τούτου, είναι αυτή που μελετήθηκε περισσότερο επιστημονικά. Μέσω της συνεργασίας τους αυτής, τα καλλιεργούμενα ψυχανθή φυτικά είδη μπορούν να εξασφαλίζουν τις αναγκαίες ποσότητες αζώτου από την ατμόσφαιρα για ικανοποιητική απόδοση. Η συνεργασία αυτή μεταξύ αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων και ψυχανθών υποκαθιστά, τουλάχιστον εν μέρει, τη χρησιμοποίηση των αζωτούχων λιπασμάτων, τα οποία για την παρασκευή τους απαιτούν μεγάλες ποσότητες ενέργειας. Για τις αναπτυσσόμενες χώρες η καλλιέργεια των ψυχανθών σε μονοκαλλιέργεια ή σε συγκαλλιέργεια αντισταθμίζει κάπως την αδυναμία να χρησιμοποιούν τα αζωτούχα λιπάσματα και αμβλύνει το παρόν επισιτιστικό πρόβλημα των χωρών αυτών. Σε φτωχά σε άζωτο εδάφη, τα πρόδρομα φυτικά είδη (τα είδη των πρώτων σταδίων διαδοχής) είναι ψυχανθή. Με την αζωτοδέσμευση, τα ψυχανθή αυξάνουν το διαθέσιμο άζωτο στο έδαφος και παρέχουν έτσι τη δυνατότητα να ευδοκιμήσουν και μη ψυχανθή είδη (κυρίως αγρωστώδη), τα οποία γίνονται ανταγωνιστικά και τείνουν να εξαφανίσουν τα ψυχανθή (Βερέσογλου, 2004). Τέτοιες συμβιώσεις πραγματοποιούνται στα φυμάτια (nodules) που σχηματίζονται επάνω στις ρίζες του φυτού και περιέχουν τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια.



Εικόνα 6. Ριζικά φυμάτια στη σόγια. Τα φυμάτια είναι ένα αποτέλεσμα μόλυνσεως από το *Rhizobium japonicum*

Η συμβιωτική στερέωση του αζώτου πραγματοποιείται σε ειδικευμένες δομές. Συμβιωτικοί αζωτοδεσμευτικοί προκαρυωτικοί οργανισμοί κατοικούν μέσα στα φυμάτια (nodules), τα ειδικά όργανα του ξενιστού φυτού που είναι διαχωρισμένα από το φυτικό κυτόπλασμα από μεμβράνες προερχόμενες από την πλασματική μεμβράνη του φυτού. Στην περίπτωση του φυτού *Gunnera*, αυτά τα όργανα συνιστούν εμμίσχους αδένες που αναπτύσσονται ανεξαρτήτως του συμβιώντος. (Τσέκος, 2004).

1.6 Ρόλος ενδοφυτικών μικροοργανισμών

Τα ενδοφυτικά βακτήρια μαζί με αυτά της ριζόσφαιρας, συμβάλουν στην αύξηση και ανάπτυξη του φυτού. Εντός του φυτού, η πυκνότητα της μικροβιακής κοινότητας των ενδοφυτικών βακτηρίων, είναι γενικά μικρότερη από αυτή της ριζόσφαιρας ή των παθογόνων βακτηριακών κοινοτήτων. Τα ενδοφυτικά βακτήρια προήλθαν εξελικτικά από τα επιφυτικά και τα βακτήρια της ριζόσφαιρας (Rosenblueth *et al*, 2006).

Η ρύθμιση των επιπέδων αιθυλενίου στα φυτά από βακτηριακά παραγόμενο απαμινάση του 1-αμινο-1καρβοξυλικού κυκλοπροπανίου (1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase) είναι το κλειδί που επιτρέπει την παρέμβαση των βακτηρίων στη φυσιολογία του φυτού. Ενδόφυτα με την ιδιότητα παραγωγής του ενζύμου μπορούν να επωφεληθούν από αυτή τη σχέση με το φυτό-

ξενιστή, καθώς ενισχύεται ο αποικισμός. Με τη σειρά τους, τα φυτά-ξενιστές επωφελούνται με τη μείωση του στρες και την αύξηση του ριζικού συστήματος. Αυτός ο μηχανισμός οδηγεί στην έννοια των «ικανών» ενδόφυτων, που ορίζονται ως εκείνα τα ενδόφυτα τα οποία είναι εξοπλισμένα με γονίδια απαραίτητα για τη διατήρηση της σχέσης μεταξύ φυτού-ενδόφυτου (Hardoim *et al.* 2008).

Μερικοί ενδοφυτικοί μύκητες επηρεάζουν την ανάπτυξη των φυτών και την ανταπόκριση τους σε παθογόνους ή φυτοφάγους μικροοργανισμούς καθώς και στις κλιματολογικές αλλαγές. Άλλοι παράγουν χρήσιμους ή ενδιαφέροντες δευτερογενείς μεταβολίτες (Pogras-Alfaro *et al.* 2011). Γενικώς, οι μικροοργανισμοί επωφελούνται από το ενδοπεριβάλλον του φυτού το οποίο παρέχει θρεπτικά στοιχεία, ενώ τα φυτά επωφελούνται από την ενίσχυση της αύξησης και τη μείωση του στρες (Hardoim *et al.* 2008).

Τα φυτά μπορούν να απαιτήσουν την παρουσία βακτηρίων, απαραίτητων για την ανάπτυξη και εδραίωσή τους σε διαφορετικά οικοσυστήματα. Για παράδειγμα, είναι εξαιρετικά δύσκολη η καλλιέργεια μοσχευμάτων διαφορετικών ειδών υπό την απουσία βακτηρίων, το οποίο υποδεικνύει μία εμπλοκή των τελευταίων στην ανάπτυξη του φυτού. Για παράδειγμα τα *Rhizobia*, αποτελούν ιδανικό παράδειγμα εξελιγμένης σχέσης αμοιβαιότητας μεταξύ φυτών-βακτηρίων. Η συμβιωτική σχέση ριζοβίων – ψυχανθών αναφέρθηκε παραπάνω.

1.7 Δομή των ενδοφυτικών κοινοτήτων του φυτού

Όσα γνωρίζουμε μέχρι στιγμής για τη δομή των ενδοφυτικών βακτηριακών κοινοτήτων σε διαφορετικά φυτικά είδη, βασίζεται σε μελέτες εξαρτημένες ή όχι από καλλιέργεια. Ο συνδυασμός και των δύο παραπάνω τεχνικών σε μία μελέτη είναι ο βέλτιστος, καθώς οι μελέτες που βασίζονται στην καλλιέργεια δίνουν την δυνατότητα απομονώσης των μικροοργανισμών, ενώ οι μελέτες που είναι ανεξάρτητες καλλιέργειας μπορούν να εντοπίσουν τυχόν αποκλίσεις στο σύνολο της ενδοφυτικής κοινότητας. Οι ενδοφυτικές βακτηριακές κοινότητες φαίνεται να είναι δυναμικές χρονικά, με τα ενδόφυτα να δίνουν σημάδια ανάπτυξης παράλληλα με την φυτική αύξηση και ανάπτυξη. Οι ενδοφυτικές βακτηριακές αποικίες που έχουν μελετηθεί είναι απλές σε σύγκριση με αυτές του εδάφους, καθώς οι τελευταίες αποτελούνται από χιλιάδες διαφορετικά είδη. Συμπερασματικά, φαίνεται ότι τα φυτά λειτουργούν ως φίλτρα των μικροοργανισμών που διαβιούν στο έδαφος, επιλέγοντας μόνο εκείνους που μπορούν να

εξελιχθούν σε επιτυχημένα ενδόφυτα.

Συχνά η σύνθεση των ενδοφυτικών βακτηριακών κοινοτήτων φαίνεται να είναι απρόβλεπτη, διότι σημαντικές αποκλίσεις μπορεί να παρατηρηθούν ακόμη και σε μεμονωμένους οργανισμούς του ίδιου φυτικού είδους. Γι' αυτό και είναι δύσκολο να κατανοήσουμε επαρκώς τους παράγοντες που καθορίζουν τις ενδοφυτικές βακτηριακές κοινότητες, τόσο σε όρους αφθονίας και ισότητας των διάφορων ειδών, όσο και σε όρους της ίδιας τους της φύσης, από τα πρόωρα στάδια αποικισμού των ριζών νεαρών φυτών, ως και τις καλά εδραιωμένες κοινότητες που αποικούν τα ώριμα φυτά. Προφανώς υπάρχει κάποιου είδους διαφοροποίηση μεταξύ των τμημάτων του φυτού και των μικροοργανισμών που τα αποικούν, γεγονός που έχει επιπτώσεις στην οικολογική σχέση μεταξύ βακτηρίου και φυτού-ξενιστή (Rosenblueth *et al*, 2006; Bais HP *et al*, 2006).

– Διακυμάνσεις αποικισμού στα διάφορα μέρη του φυτού

Στα φύλλα, στις ρίζες και στους ξυλώδεις βλαστούς συχνά εντοπίζονται σημαντικές διαφορές ως προς τα κυρίαρχα μέλη της ενδοφυτικής τους κοινότητας, ακόμη και ως προς τις λειτουργίες αυτών. Για παράδειγμα, φύλλα, μίσχοι και ρίζες της μηδικής αποικίζονται από διακριτούς μύκητες, οι οποίοι παράγουν ποικίλους δευτερογενείς μεταβολίτες. Αυτές οι διαφορές στις ενδοφυτικές κοινότητες μεταξύ των μερών του φυτού, μπορεί να αντανakλούν τόσο εξωτερικές περιβαλλοντικές διαφορές όσο και βιολογικές διαφορές μεταξύ των οργάνων και των ιστών του φυτού. Στις επιφυτικές ορχιδέες (γένος *Lepanthes*), στις οποίες οι ρίζες και τα φύλλα είναι εξίσου εκτεθειμένα στον αέρα και στο φως, δεν έχουν παρατηρηθεί σημαντικές αλλαγές στις ενδοφυτικές τους κοινότητες.

Ακόμη και εντός του ίδιου φυτού, διαφορετικά φύλλα ή ρίζες, μπορεί να εμφανίζουν σημαντικές διαφορές στην ενδοφυτική τους κοινότητα. Μεμονωμένα φύλλα από το τροπικό δένδρο *Manilkara bidentata*, έδειξαν μία ξεκάθαρη διαβάθμιση της ποικιλομορφίας των απομονωμένων ενδοφυτικών μικροοργανισμών. Από αυτήν την άποψη, τα φυτά αποτελούν ένα γενετικό μωσαϊκό, διότι κάθε όργανο έχει ένα μοναδικό συνδυασμό γονιδίων στο μικροβίωμά του (Porras-Alfaro *et al*. 2011).

1.8 Οικολογία των «ικανών» ενδόφυτων - Τρόπος αποικισμού των φυτών

Ο κύκλος ζωής των εν δυνάμει ενδόφυτων μπορεί να χαρακτηριστεί ως διφασικός, εναλλασσόμενος μεταξύ του φυτού και του εξωτερικού περιβάλλοντος (κυρίως του εδάφους). Η συντριπτική πλειοψηφία των μικροοργανισμών που μπορούν να ευδοκιμήσουν εντός του φυτού πιθανότατα έχει μία κλίση προς αυτόν τον διφασικό τρόπο ζωής. Στην πραγματικότητα, η παρατηρούμενη ποικιλομορφία εντός των φυτών, μπορεί να εξηγηθεί από την ικανότητα των διάφορων ενδοφυτικών μικροοργανισμών να εισέλθουν και να παραμείνουν εντός των φυτών-ξενιστών. Αυτοί οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί που κυρίως προέρχονται από το έδαφος, αρχικά μολύνουν το φυτό-ξενιστή αποικίζοντας π.χ. ανοίγματα στις συνδέσεις των πλάγιων ριζών και αμέσως εξαπλώνονται στην κύρια ρίζα. Παρ' όλο που υπάρχουν και άλλες δίοδοι εισόδου στο φυτό (π.χ. πληγές ή τα στόματα των φύλλων), οι ρωγμές/ανοίγματα στη ρίζα αποτελούν τα κυριότερα σημεία βακτηριακού αποικισμού (Hardoim *et al.* 2008).

Πολλοί ενδοφυτικοί μύκητες αλλά και βακτήρια μεταβιβάζονται μέσω των σπόρων, δηλαδή «κάθετα» στον απόγονό τους. Άλλοι πάλι έχουν την ιδιότητα να αποικίζουν τον φυτικό ιστό από την πρώτη στιγμή της ύπαρξης του, που αναφέρεται ως «οριζόντια μεταβίβαση» (Partida-Martinez *et al.* 2011).

Τα βακτηριακά κληρονομήσιμα χαρακτηριστικά παίρνουν μέρος σε όλη τη διαδικασία της αποίκησης του φυτού και αποκαλούνται κληρονομήσιμα χαρακτηριστικά αποικισμού. Η επικοινωνία μεταξύ φυτού-βακτηρίου και αντιστρόφως, διαδραματίζει τον κύριο ρόλο. Ο βακτηριακός αποικισμός των ριζών αρχίζει με την αναγνώριση συγκεκριμένων συστατικών των εκκρίσεων της ρίζας από τα βακτήρια. Έχει προταθεί η υπόθεση ότι τα φυτά μπορούν να επικοινωνήσουν, ώστε να συγκεκριμενοποιήσουν την προσέλκυση μικροοργανισμών για το δικό τους οικολογικό και εξελικτικό τους όφελος (Hardoim *et al.* 2008).

Οι κυριότεροι παράγοντες που συμβάλλουν στον αποικισμό των φυτικών ιστών από τα «ικανά» ενδόφυτα είναι οι παρακάτω:

- Χημειοταξία

Ένας καθοριστικός παράγοντας ανταγωνιστικότητας στον αποικισμό των ριζών, είναι η κατευθυνόμενη κινητικότητα ως χημειοταξική απάντηση στις ριζικές εκκρίσεις. Οι ρίζες εκκρίνουν οργανικά οξέα τα οποία έλκουν το *Pseudomonas fluorescens* στην τομάτα, ενώ υδατάνθρακες και αμινοξέα, προσελκύουν το *Corynebacterium flavescens* και *Bacillus pumilus*

στο ρύζι. Η φαινομενική εξειδίκευση σε αυτές τις σχέσεις, πιθανότατα συσχετίζεται με τις βακτηριακές απαιτήσεις σε θρεπτικά (Hardoim *et al.* 2008).

- *Προσαρμογή και αποικισμός της ριζικής επιδερμίδας*

Ένα «ικανό» ενδόφυτο το οποίο κινείται προς τις ενεργές ζώνες (περιοχές με αυξημένη εκκριτική δραστηριότητα) της ριζόσφαιρας, θα μετατρέψει τον μεταβολισμό του προς ένα φυσιολογικό στάδιο βέλτιστης πρόσληψης θρεπτικών στοιχείων, ανταγωνιστικότητας και ανάπτυξης. Οι περιβαλλοντικοί αισθητήρες του μικροοργανισμού ανταποκρίνονται σε συνθήματα που ενεργοποιούν ένα πρότυπο γονιδιακής έκφρασης απαραίτητο για τον αποικισμό.

Κοντά στις ρίζες, τα «ικανά» ενδόφυτα πρέπει να προσαρτηθούν στην επιφάνεια των ριζών (rhizoplane) προκειμένου να πλησιάσουν τα πρωταρχικά σημεία εισόδου (π.χ. πληγές, το άκρο της ρίζας, σημεία εισόδου των πλάγιων ριζών). Όταν πλέον οι μικροοργανισμοί προσαρτηθούν στις ρίζες, τείνουν να πολλαπλασιάζονται, ώστε να εδραιώσουν μία μικροαποικία. Σε αυτό το στάδιο, είναι καθοριστική η ενζυμική δράση για την αποικοδόμηση των φακέλων των φυτικών κυττάρων (Hardoim *et al.* 2008).

- *Ενδοφυτικός αποικισμός*

Η παραγωγή ενζύμων όπως η ενδογλουκανάσες και η endopolygalacturonidases, φαίνεται πως είναι απαραίτητες για αυτή την διαδικασία. Σε αυτό το σημείο τα «ικανά» ενδόφυτα μπορούν να πολλαπλασιαστούν γρήγορα εντός του φυτού, συχνά φτάνοντας σε πολύ υψηλούς αριθμούς κυττάρων. Το μέγεθος του ενδοφυτικού πληθυσμού εξαρτάται, και απολύτως συσχετίζεται με το στάδιο ανάπτυξης του φυτού, οπότε εμφανίζεται διαρκώς αυξανόμενο από το στάδιο του φυτάριου και μετά (Hardoim *et al.* 2008).

1.9 Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί ως καινοτόμος πηγή δευτερογενών μεταβολιτών

Οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί αποτελούν ένα γόνιμο έδαφος για εύρεση νέων φαρμάκων (Staniek *et al.* 2008). Ο αριθμός των ευρεσιτεχνιών που χρησιμοποιούν ενδοφυτικούς μικροοργανισμούς για την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών ή με σημαντικές βιολογικές λειτουργίες, έχει παρουσιάσει δραματική αύξηση τα τελευταία 20 χρόνια (Priti *et al.* 2009). Οι κλάσεις των βιοδραστικών μεταβολιτών προερχόμενων από ενδοφυτικούς μικροοργανισμούς συμπεριλαμβάνουν τα αλκαλοειδή, τις κυτοχάλασίνες, τα πολυκετίδια, τα τερπενοειδή, τα φλαβονοειδή και τα στεροειδή (Guo *et al.* 2008). Στόχοι-δραστικότητας αποτελούν τα

βακτήρια, οι μύκητες και τα καρκινικά κύτταρα, ενώ οι κυτταρικοί-στόχοι περιλαμβάνουν την κυτταρική διαίρεση, τη μεταφορά της γλυκόζης, την HIV-1 πρωτεάση, και τον κυτοσκελετό (Gimenez *et al.* 2007; Hawksworth *et al.* 1997; Stierle *et al.* 1993).

Σημαντικοί ενδοφυτικοί δευτερογενείς μεταβολίτες ακόμη ανακαλύπτονται. Πολλές ομάδες των *Convolvulaceae*, συμπεριλαμβανομένου του κοινού είδους *Ipomoea* και των ποικιλιών του, είναι ξακουστά για τα εργοταμινικά αλκαλοειδή που περιέχονται στους σπόρους τους, ουσίες συγγενικές του LSD (Pendall. 2005). Έχει μόλις πρόσφατα ανακαλυφθεί πως οι ουσίες αυτές παράγονται από ενδοφυτικούς μύκητες της οικογένειας *Clavicipitaceae* (Kucht *et al.* 2004). Οι μύκητες αυτοί είναι ακαλλιέργητοι, αλλά η παρουσία τους γίνεται εμφανής με απευθείας αλληλούχιση. Οι ενδοφυτικοί μύκητες μεταβιβάζονται κάθετα μέσω του σπόρου, ενώ φυτά που έχουν υποστεί μυκητοκτονική θεραπεία δεν έχουν ούτε μύκητες ούτε αλκαλοειδή (Ahimsa-Mueller *et al.* 2007).

2 Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Απομόνωση ενδοφυτικών μικροοργανισμών

Προκειμένου να μελετήσουμε τη μικροβιακή κοινότητα του μπρόκολου ακολουθήθηκαν οι παρακάτω μεθοδολογίες. Σε κάθε στάδιο αναφέρονται αναλυτικά οι συνθήκες και τα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν. Τα δείγματα και τυχόν αλλαγές στη μεθοδολογία αναφέρονται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων εκτενέστερα.

2.1.1 Απολύμανση

Προκειμένου να μελετηθεί σωστά η ενδοφυτική μικροβιακή κοινότητα του άνθους *Brassica oleracea*, το άνθος απολυμάνθηκε επιφανειακά, για την αποφυγή τυχόν επιμολύνσεων από μικροοργανισμούς που δεν ανήκουν στην ενδοφυτική μικροβιακή χλωρίδα.

Ακολουθήθηκε το ακόλουθο πρωτόκολλο απολύμανσης:

1. Ξέπλυμα του άνθους με νερό βρύσης
2. Τα άνθη τεμαχίζονται σε μικρά κομμάτια του 1g
3. Τα άνθη εμβαπτίζονται σε διάλυμα Tween-20, 0,01% (v/v) για 1 λεπτό.
4. Ξέπλυμα των άνθων με αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό (3 επαναλήψεις).
5. Τα άνθη τοποθετούνται στον θάλαμο νηματικής ροής και εμβαπτίζονται σε διάλυμα χλωρίνης εμπορίου (NaOCl, 5% v/v), για 10 λεπτά.
6. Τα άνθη ξεπλένονται με αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό εντός θαλάμου νηματικής ροής (3 επαναλήψεις).
7. Τα άνθη εμβαπτίζονται σε διάλυμα αιθανόλης (75% v/v), για 5 λεπτά.
8. Ακολουθεί ξέπλυμα των άνθων με αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό (3 επαναλήψεις).
9. Τα άνθη παραμένουν εντός θαλάμου πνευματικής ροής για μία νύχτα, προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια της επιφανειακής υγρασίας.
10. Από το τελευταίο νερό ξεπλύματος, εμβολιάζουμε 100μl σε τρυβλία petri με θρεπτικό διάλυμα LB και PDA. Ακολουθεί επώαση στους 37° και 28° C για ~5 ημέρες, αντίστοιχα.

Ο τελευταίος εμβολιασμός, χρησιμεύει ως δείκτης της επιτυχούς επιφανειακής απολύμανσης του άνθους του μπρόκολου.

2.1.2 Απομόνωση ενδοφυτικών μικροοργανισμών

Ακολουθείται το παρακάτω πρωτόκολλο, εντός θαλάμου νηματικής ροής:

1. Λειοτριβουμε τον φυτικό ιστό, σε αποστειρωμένο γουδί, με φυσιολογικό ορό (διάλυμα NaCl 0.05% w/v), και το διάλυμα τοποθετείται για επώαση στους 28°C, για 30 λεπτά.
2. Πραγματοποιούνται δεκαδικές αραιώσεις του διαλύματος μέχρι την αραιώση 10^{-3} .
3. Από το αρχικό διάλυμα και τις 3 αραιώσεις εμβολιάζονται 500 μl σε 4 τρυβλία petri με θρεπτικό υπόστρωμα LB, σε 4 τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα LB minimal και σε άλλα 4 τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα M9. Τα τρυβλία επωάζονται στους 25 °C, για περίπου 3 ημέρες.
4. Τμήμα του απολυμασμένου άνθους διατηρείται στους 4°C ως την επόμενη ημέρα, για επιβεβαίωση μη αλλαγής χρώματος του φυτικού ιστού, ένδειξη χρήσης της σωστής ποσότητας απολυμαντικών μέσων.

2.1.3 Εξαγωγή ολικού γενωμικού υλικού από τις απομονωμένες βακτηριακές αποικίες

Οι αποικίες που επιλέχθηκαν για την εξαγωγή του γενετικού τους υλικού, επιλέχθηκαν σύμφωνα με τη διαφορετικότητα της εμφάνισής τους. Πιο συγκεκριμένα η υφή, το χρώμα και το σχήμα των αποικιών ήταν οι παράγοντες που έκριναν τη διαλογή των αποικιών.

Για την απομόνωση ολικού γενωμικού υλικού χρησιμοποιήθηκε το kit NucleoSpin® Tissue, της εταιρίας Macherey-Nagel. Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο, σύμφωνα με το εγχειρίδιο της εταιρίας.

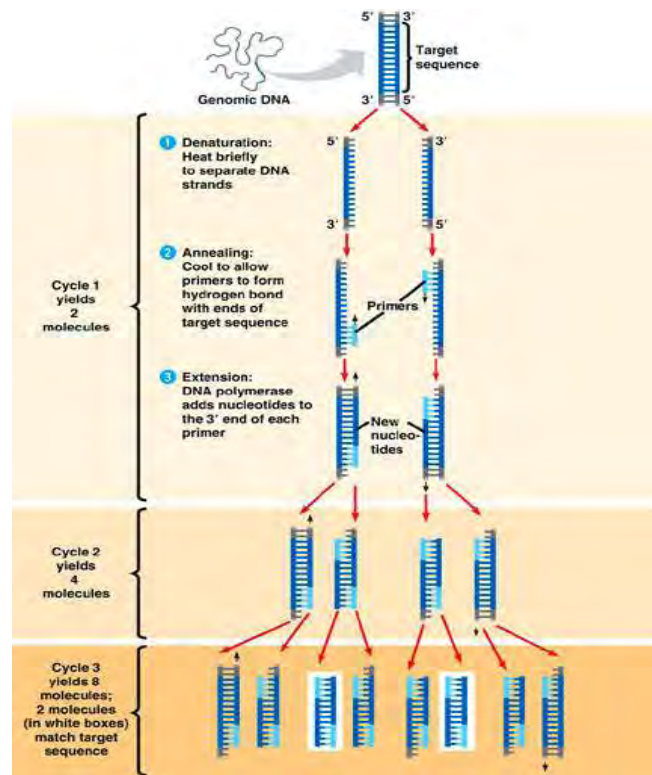
Η Διατήρηση του βακτηριακού DNA έγινε στους 20°C.

2.1.4 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου που κωδικοποιεί για το 16S rRNA με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Με τη χρήση της PCR ενισχύθηκε μία περιοχή του ολικού γενωμικού υλικού των υπό μελέτη στελεχών, με τη χρήση συγκεκριμένων ολιγονουκλεοτιδίων – εκκινητών. Η περιοχή ενίσχυσης αφορά στο γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση του 16S rRNA. Για τη μελέτη του γονιδίου που κωδικοποιεί για το 16S rRNA πραγματοποιήθηκε ενίσχυση τμήματος ~1000 βάσεων. Χρησιμοποιήθηκε αυτόματος κυκλοποιητής της εταιρίας SENSOQUEST. Επίσης χρησιμοποιήθηκε το KAPA Taq PCR Kit της εταιρίας KAPABIOSYSTEMS. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πιν. 2.

Πίνακας 2 Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμήματος του 16S rRNA γονιδίου

63f	5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3'
1087r	5'-CTCGTTGCGGGACTTAACCC-3'



Εικόνα 7. Απεικόνιση σταδίων της PCR

Το Mix Buffer περιέχει:

Πίνακας 2 Συστατικά του PCR Buffer

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Buffer 10x	5 μ l
dNTPs	1 μ l
Forward primer, 63F (20 μ M)	1 μ l
Reverse primer, 1087R (20 μ M)	1 μ l
KapaTaq (5u/ μ l)	0,2 μ l
ddH ₂ Ost	40,8 μ l
DNA	1 μ l
Total	50 μ l

και οι συνθήκες της αντίδρασης είναι οι ακόλουθες:

Πίνακας 3 Συνθήκες PCR

Στάδια	°C	Χρόνος	κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη (initial denaturation)	95°C	5 λεπτά	
Αποδιάταξη (denaturation)	95°C	30 δευτερόλεπτα	Επανάληψη για 20 κύκλους
Υβριδισμός εκκινητών (primer annealing)	55°C	30 δευτερόλεπτα	
Επιμήκυνση (extention)	72°C	1 λεπτό και 30 δευτερόλεπτα	
τελική επιμήκυνση (final etention)	72°C	10 λεπτά	
Διατήρηση (hold)	4°C	∞	

2.1.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί της μεθόδου της *pcr*, για την επιβεβαίωση ενίσχυσης του επιθυμητού τμήματος του γονιδιώματος με την *pcr*. Στόχος είναι η απομόνωση του επιθυμητού τμήματος DNA. Παρασκευάζεται πήκτωμα αγαρόζης (1% w/v), στα βοθρία φόρτωσης του οποίου «φορτώνεται» το *pcr* προϊόν, με παράλληλη προσθήκη μικρής ποσότητας, χρωστικής φόρτωσης (loading dye). Δίπλα στα δείγματα «φορτώνουμε» και μικρή ποσότητα δείκτη μοριακού βάρους ώστε να είναι δυνατή η εύρεση του αριθμού των ζευγών βάσεων που αντιστοιχούν στην υπό μελέτη ζώνη. Ηλεκτροφορούμε στα 90V για περίπου 45 λεπτά.

2.1.6 Απομόνωση - ανάκτηση DNA από το πήκτωμα αγαρόζης

Για την ανάκτηση του επιθυμητού τμήματος DNA από το πήκτωμα αγαρόζης ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του kit NucleoSpin® Gel and PCR clean up, της εταιρίας Macherey-Nagel .

2.1.7 Ανάγνωση αλληλουχιών & Φυλογενετική ανάλυση

Η ανάγνωση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε από εξωτερικό αναλυτικό εργαστήριο, στη Λάρισα. Ο προσδιορισμός των αλληλουχιών έγινε με σύγκριση αυτών με ήδη καταχωρημένες αλληλουχίες της τράπεζας GenBank, με χρήση του αλγόριθμου BLAST, μέσω της βάσης δεδομένων NCBI. Οι ακολουθίες ευθυγραμμίστηκαν με χρήση του αλγόριθμου ClustalW με χρήση του προγράμματος CLC Sequence Viewer 6. Το φυλογενετικό δένδρο πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Neighbor Joining (Saitou & Nei, 1987).

2.2 Κατασκευή 16S rDNA βιβλιοθήκης

Προκειμένου να ταυτοποιηθούν ενδοφυτικά βακτηριακά στελέχη του άνθους του *Brassica oleracea* που δεν ήταν δυνατόν να απομονωθούν σε καλλιέργεια στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, έγινε προσπάθεια κατασκευής μίας 16S rDNA βιβλιοθήκης. .

Για τη διαδικασία αυτήν ακολουθήθηκε το παραπάνω πρωτόκολλο απολύμανσης των άνθων του φυτού *Brassica oleracea*, ενώ για την απομόνωση ολικού DNA ακολουθήθηκε η μέθοδος απομόνωσης CTAB.

2.2.1 Απομόνωση ολικού DNA από το άνθος του μπρόκολου με τη μέθοδο CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide)

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι το παρακάτω:

1. Λειοτριβούμε τον ιστό του φυτού με υγρό άζωτο σε αποστειρωμένο γουδί, μεταφορά της πούδρας σε erpendorf (1,5 ml).
2. Προσθήκη 200μl CTAB (προθερμασμένο στους 65°C) και 1 μl β-μερκαπτοαιθανόλης, επώαση για 10-30 λεπτά στους 65°C, vortex ανά 10 λεπτά.
3. Προσθήκη 200 μl διαλύματος SEVAG [χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη (3-methylbutanol) σε αναλογία 24:1], vortex για 30 δευτερόλεπτα.
4. Φυγοκέντρηση στα 13.000 g για 2 λεπτά. Δημιουργία δύο φάσεων. Μεταφορά της άνω φάσης σε καθαρό erpendorf (1,5 ml).
5. Προσθήκη 0,7 επί του όγκου της άνω φάσης ισοπροπανόλης και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
6. Φυγοκέντρηση στα 13.000 g για 10 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
7. Ξέπλυμα της pellet που δημιουργείται με προσθήκη 0,5 ml από διάλυμα κρύας αιθανόλης (70% v/v). Φυγοκέντρηση στα 13.000 g για 5 λεπτά.
8. Απομάκρυνση του υπερκείμενου. Επαναληψη της φυγοκέντρωσης για 2-3 λεπτά.
9. Επαναδιάλυση της pellet σε 25μl αποστειρωμένο ddH₂Ost, με 1μl RNase.

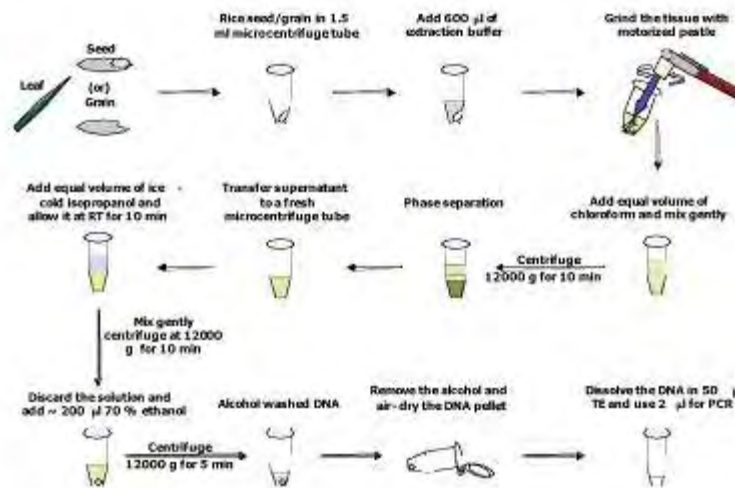


Fig. 1. Steps involved in DNA isolation.

Εικόνα 8. Απεικόνιση βημάτων απομόνωσης γενετικού υλικού από ρύζι με τη μέθοδο CTAB

2.2.2 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου που κωδικοποιεί για το 16S rRNA με τη μέθοδο PCR

Μετά την απομόνωση του DNA ακολουθεί ενίσχυση τμήματος του γονιδίου που κωδικοποιεί για το 16S rDNA (~800 bp) με τη μέθοδο της PCR, χρησιμοποιώντας το ζεύγος εκκινητών 63F-783R (Sakai *et al.* 2004). Οι συγκεκριμένοι εκκινητές επιλέχθηκαν επειδή απομονώνουν βακτηριακό SSU rDNA χωρίς να ενισχύουν αλληλουχίες SSU rDNA των οργανιδίων του φυτού. Χρησιμοποιήθηκε αυτόματος κυκλοποιητής της εταιρίας SENSOQUEST. Επίσης χρησιμοποιήθηκε το KAPA Taq PCR Kit της εταιρίας KAPABIOSYSTEMS.

Πίνακας 4 Παράθεση αλληλουχίας των εκκινητών.

63f	5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3'
783r	783r-a: 5'-CTACCAGGGTATCTAATCCTG-3'
	783r-b: 5'-CTACCGGGGTATCTAATCCCG-3'
	783r-c: 5'CTACCCGGGTATCTAATCCGG-3'

Το Mix Buffer περιέχει:

Πίνακας 5 Συστατικά PCR Buffer

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
Buffer 10x	5 μ l
dNTP's	1 μ l
Forward primer, 63F (20 μ M)	1 μ l
Reverse primer, 783R (20 μ M)	1 μ l
KapaTaq (5u/ μ l)	0,2 μ l
ddH ₂ Ost	40,8 μ l
DNA	1 μ l
Total	50 μ l

με τις ακόλουθες συνθήκες:

Πίνακας 6 Συνθήκες PCR

Στάδια	°C	χρόνος	κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη (initial denaturation)	95°C	3 λεπτά	
Αποδιάταξη (denaturation)	95°C	1 λεπτό	Επανάληψη για 20 κύκλους
Υβριδισμός εκκινητών (annealing)	50°C	1 λεπτό	
Επιμήκυνση (extention)	72°C	1 λεπτό	
τελική επιμήκυνση (final etention)	72°C	10 λεπτά	
Διατήρηση (hold)	4°C	∞	

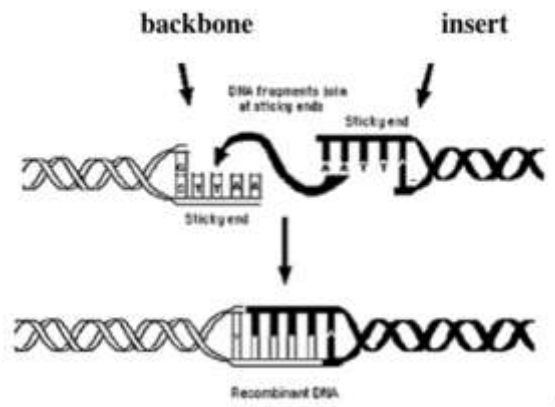
2.2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση του *pcr* προϊόντος και ανάκτηση της επιθυμητής ζώνης από το πήκτωμα αγαρόζης όπως ανωτέρω. Κατά την ηλεκτροφόρηση αναμενόταν ενίσχυση ζώνης περίπου 800 bp, που αντιστοιχεί στο βακτηριακό SSU rDNA (Sakai *et al.* 2004).

2.2.4 Υποκλωνοποίηση

Αρχή της μεθόδου

Το κυκλικό κλειστό πλασμίδιο DNA έχει υποστεί πέψη με ένα ή περισσότερα ένζυμα περιορισμού και συνδέεται τεχνητά *in vitro* με ένα ξένο DNA το οποίο φέρει συμπληρωματικά άκρα. Τα προϊόντα της αντίδρασης τεχνητής σύνδεσης (ligation reaction) χρησιμοποιούνται για να μετασχηματίσουν ένα κατάλληλο στέλεχος *E. coli*. Για την κλωνοποίηση των τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pGEM-T Easy (Promega). Ο συγκεκριμένος φορέας είναι ευθυγραμμισμένος και έχει μονόκλωνα 3' άκρα που φέρουν και τα δύο βάσεις θυμίνης. Αυτό εμποδίζει την επανακυκλοποίηση του πλασμιδίου και βελτιώνει την ενσωμάτωση του ένθετου DNA (insert) στον φορέα.



Εικόνα 9. Απεικόνιση ενσωμάτωσης γονιδιώματος στο βακτηριακό γονιδίωμα.

2.2.5 Τεχνητή σύνδεση δύο μορίων DNA (Ligation reaction)

Με τη μέθοδο αυτή ενώνουμε το ενισχυμένο τμήμα του γονιδιώματος με τον πλασμιδιακό φορέα.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι το εξής:

- Φωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA στο δείγμα.
- Η αντίδραση Ligation περιλαμβάνει τα παρακάτω αντιδραστήρια:

Πίνακας 7 Συστατικά της αντίδρασης ligation.

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
2x Buffer	5μl
pGEM-T easy Vector (50ng)	0,5 μl
T4 ligase	1 μl
Insert DNA	3,5 μl
ddH ₂ Ost (ως τελικό όγκο 10 μl)	-
Total	10 μl

Στην αντίδραση ligation η αναλογία των μορίων του πλασμιδίου και του ένθετου DNA ρυθμίστηκε στο 1:3 ώστε να εξασφαλιστεί η όσο το δυνατόν μεγαλύτερη πιθανότητα ενσωμάτωσης του insert στο πλασμίδιο. Ο υπολογισμός των ng του insert έγινε με τον ακόλουθο τύπο:

$$\frac{\text{ng of vector} \cdot \text{kb size of insert}}{\text{kb size of vector}} \cdot \frac{\text{insert}}{\text{vector}} \text{ molar ratio} = \text{ng of insert}$$

Εικόνα 10. Εξίσωση υπολογισμού των ng του insert

Το διάλυμα παραμένει για επώαση στους 4°C για μία νύχτα.

2.2.6 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* DH5a (Transformation)

Με αυτή τη μέθοδο ο πλασμιδιακός φορέας που φέρει το επιθυμητό ένθετο τμήμα DNA εισέρχεται στο δεκτικό κύτταρο. Οι αποικίες που έχουν δεχτεί το πλασμίδιο που φέρει το insert, εμφανίζονται λευκές μετά την επώαση. Αντιθέτως οι αποικίες με τα μη ανασυνδυασμένα πλασμίδια, εμφανίζονται μπλε. Ακολουθείται το παρακάτω πρωτόκολλο:

1. Ξεπάγωμα των δεκτικών κυττάρων.
2. Σε 80μl δεκτικών κυττάρων προσθήκη 2μl πλασμιδίων, και παραμονή στον πάγο για 30 λεπτά.
3. Επώαση στους 42°C για 1 λεπτό.
4. Παραμονή στον πάγο για 2 λεπτά.
5. Προσθήκη 200μl θρεπτικό διάλυμα LB.
6. Επώαση στους 37°C για 60 λεπτά.
7. Προσθήκη 50μl x-gal (2% w/v) και 10μl IPTG(0,1 M).
8. Στρώσιμο όλης της ποσότητας της αντίδρασης σε τρυβλία petri με θρεπτικό διάλυμα LB με αμπικιλίνη.
9. Επώαση στους 37°C το πολύ για 18 ώρες.

2.2.7 Επιλογή θετικών κλώνων και επιβεβαίωση ένθεσης του επιθυμητού τμήματος DNA με colony PCR

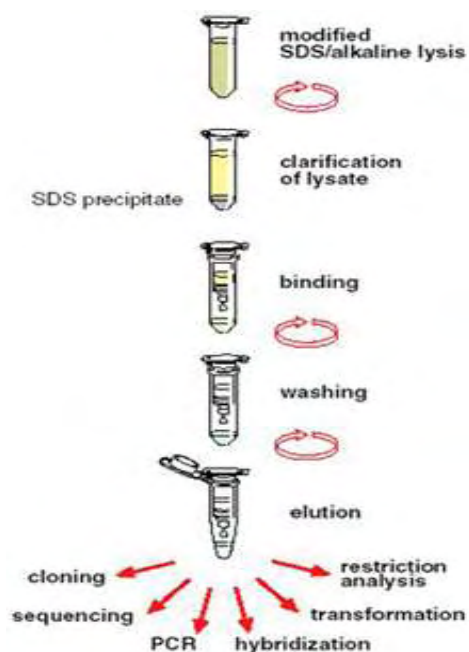
Επιλέχθηκαν ~ 100 κλώνοι (λευκές αποικίες) προκειμένου να κατασκευαστεί η 16S rDNA βιβλιοθήκη. Πραγματοποιήθηκε colony PCR με τους εκκινητές 63F-783R (βλ. συνθήκες στο υποκεφάλαιο 2.2.3) σε όλους τους επιλεχθέντες κλώνους προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ενσωμάτωση του επιθυμητού τμήματος DNA. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός όλων των επιλεχθέντων κλώνων σε υγρή καλλιέργεια LB με αμπικιλίνη για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA. Ακολούθησε επώαση όλων των καλλιεργειών LB υπό ανάδευση στους 37°C το πολύ για 18 ώρες.



Εικόνα 11. Colony PCR Plate

2.2.8 Απομόνωση του πλασμιδιακού DNA (Plasmid prep)

Η απομόνωση του πλασμιδίου έγινε με το kit NucleoSpin® Plasmid ακολουθώντας το πρωτόκολλο της εταιρίας Macherey-Nagel. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε αναγράφεται στις οδηγίες του εγχειριδίου. .



Εικόνα 12. Απεικόνιση διαδικασίας απομόνωσης πλασμιδίου

Τα απομονωμένα πλέον πλασμίδια στάλθηκαν για αλληλούχιση σε εξωτερικό εργαστήριο και η φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε όπως αναφέρθηκε και παραπάνω.

3 Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματά που παρουσιάζονται παρακάτω αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα των κατηγοριών καλλιέργειας που έχουν άμεση πρόσβαση στο καθημερινό τραπέζι του μέσου καταναλωτή.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από το μπρόκολο συμβατικής καλλιέργειας, που παράχθηκε στην Ιταλία, με κωδική ονομασία BrC. Το μπρόκολο βιολογικής καλλιέργειας επίσης έχει καταγωγή από Ιταλία και κωδική ονομασία BrB. Ενώ το μπρόκολο από τον ερασιτεχνικό κήπο φέρει την κωδική ονομασία BrF.

3.1 Συμβατική καλλιέργεια



Εικόνα 13. Κομμάτι άνθους του μπρόκολου μετά από τη διαδικασία της απολύμανσης, με αναμονή 10 λεπτών στο διάλυμα χλωρίνης.



Εικόνα 14. Κομμάτι άνθους του μπρόκολου μετά από τη διαδικασία της απολύμανσης, με αναμονή 5 λεπτών στο διάλυμα χλωρίνης.

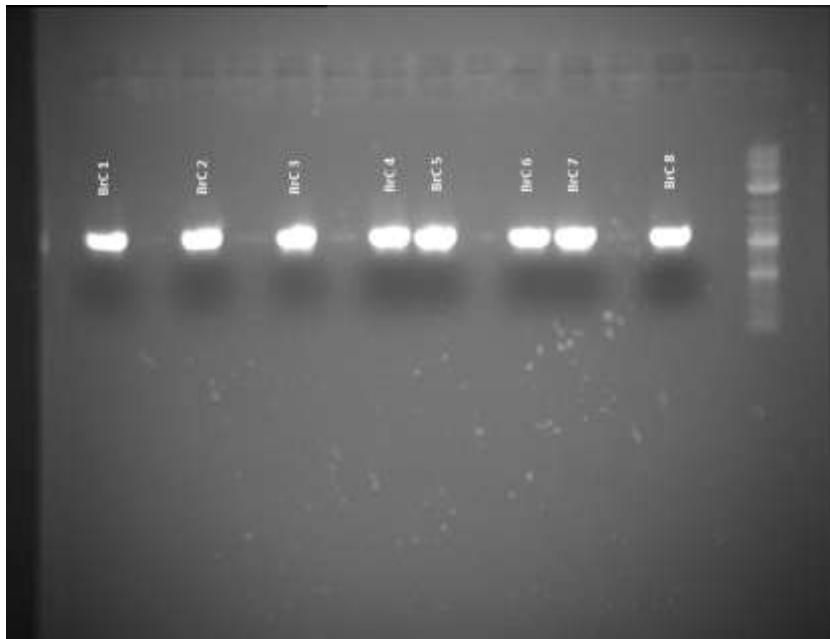
Το δείγμα της συμβατικής καλλιέργειας αποτέλεσε το αρχικό- πιλοτικό δείγμα του πειράματος. Για τον λόγο αυτό έχουν γίνει δύο μεταχειρίσεις, μία με εμβάπτιση σε διάλυμα χλωρίνης (5% v/v) για 5 λεπτά, και μία για 10 λεπτά.



Εικόνα 15. Απομονωμένες αποικίες ενδοφυτικών βακτηρίων από το μπρόκολο συμβατικής καλλιέργειας.

Από τις απομονωθείσες αποικίες των ενδοφυτικών βακτηρίων απομονώθηκε ολικό DNA από κάθε αποικία και ενισχύθηκε με τη μέθοδο της PCR τμήμα του 16S rRNA γονιδίου (βλ. κεφάλαιο Υλικά & Μέθοδοι, παράγραφος 2.1.6 Μετά την ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων πάρθηκε η ακόλουθη φωτογραφία, για τα δείγματα των ενδοφυτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από το μπρόκολο της συμβατικής καλλιέργειας. σελ. 31)

Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου που κωδικοποιεί για το 16S rRNA με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)



Εικόνα 16. Ενίσχυση τμήματος του 16S rRNA γονιδίου των αποικιών ενδοφυτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από το μπρόκολο συμβατικής καλλιέργειας, με το ζεύγος εκκινητών 63f-1087r.

Η παραπάνω φωτογραφία αποδεικνύει την ενίσχυση τμήματος μεγέθους περίπου 1000 bp, του 16S rRNA γονιδίου. Όπως αναμενόταν το ζεύγος των εκκινητών 63F-1087R απομόνωσαν βακτηριακό 16S rDNA. (Hauben, *et al.* 1997)

Τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση σε εξωτερικό εργαστήριο. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ταυτοποίησης των απομονωθέντων ενδοφυτικών βακτηρίων του μπρόκολου συμβατικής καλλιέργειας, μέσω του διαχειριστικού προγράμματος Chromas, με τη χρήση του αλγόριθμου BLAST της βάσης δεδομένων NCBI.

Πίνακας 8 Παράθεση αποτελεσμάτων ταυτοποίησης των δειγμάτων του μπρόκολου συμβατικής καλλιέργειας. Με το ίδιο χρώμα παρουσιάζονται οι απομονώσεις εκείνες που φαίνεται να ταυτοποιούνται ως το ίδιο βακτήριο.

BrC1	<i>Pseudomonas lurida</i> strain TPEB01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Pseudomonas tolaasii</i> strain 47 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Pseudomonas tolaasii</i> strain 93 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
BrC2	<i>Pseudomonas lurida</i> strain TPEB01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. clone ASC155 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Pseudomonas lurida</i> strain : DSM 15835 16S ribosomal RNA, partial sequence
BrC3	Uncultured bacterium clone nbw1210e01c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Proteobacterium</i> symbiont of <i>Nilaparvata lugens</i> clone TM85-92 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	Uncultured <i>Acinetobacter</i> sp. clone HM-78 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
BrC4	Uncultured bacterium clone nbw1210e01c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	Uncultured <i>Acinetobacter</i> sp. clone HM-78 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

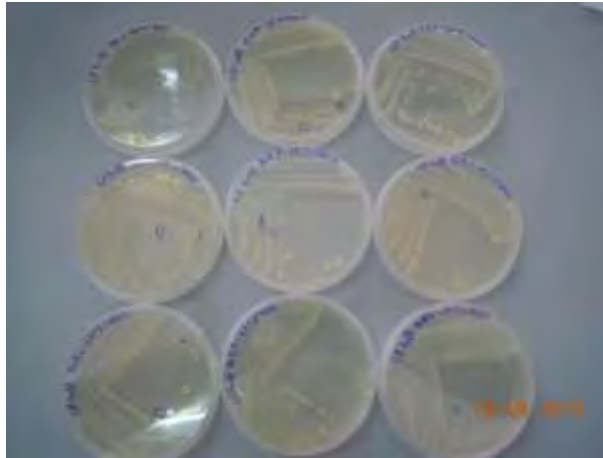
	<i>Acinetobacter sp.</i> Tpl-26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
BrC5	Gamma proteobacterium enrichment culture clone 2-4-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	Gamma proteobacterium enrichment culture clone 2-2-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Pseudomonas sp.</i> 7-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
BrC6	<i>Frigoribacterium faeni</i> strain slg1bF 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Frigoribacterium sp.</i> PDD-24b-20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	Uncultured bacterium clone ncd2606a09c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
BrC7	<i>Pseudomonas sp.</i> ps10-15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Pseudomonas sp.</i> Pier5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Pseudomonas salomonii</i> strain +Y14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
BrC8	<i>Pseudomonas sp.</i> ps10-15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Pseudomonas sp.</i> Pier5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Pseudomonas salomonii</i> strain +Y14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Στον παραπάνω πίνακα παρατίθενται τα 3 πιθανότερα αποτελέσματα ταυτοποίησης, μέσω της τράπεζας γενετικών πληροφοριών NCBI.

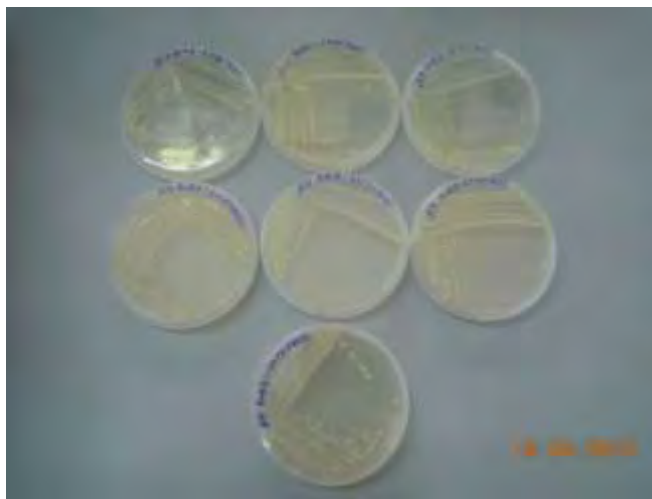
3.2 Βιολογική καλλιέργεια

Το μπρόκολο βιολογικής καλλιέργειας αγοράστηκε από γνωστή αλυσίδα σούπερ μάρκετ και έχει χώρα προέλευσης την Ιταλία. Η κωδική ονομασία του δείγματος αυτού είναι BrB.

Στο συγκεκριμένο δείγμα έγινε μόνο ένας χειρισμός στο στάδιο της απολύμανσης, (εμβάπτιση σε διάλυμα χλωρίνης 5% v/v, για 10 λεπτά).



Εικόνα 17. Απομονωμένες αποικίες ενδοφυτικών βακτηρίων από το μπρόκολο βιολογικής καλλιέργειας, σε θρεπτικό υπόστρωμα LB half.

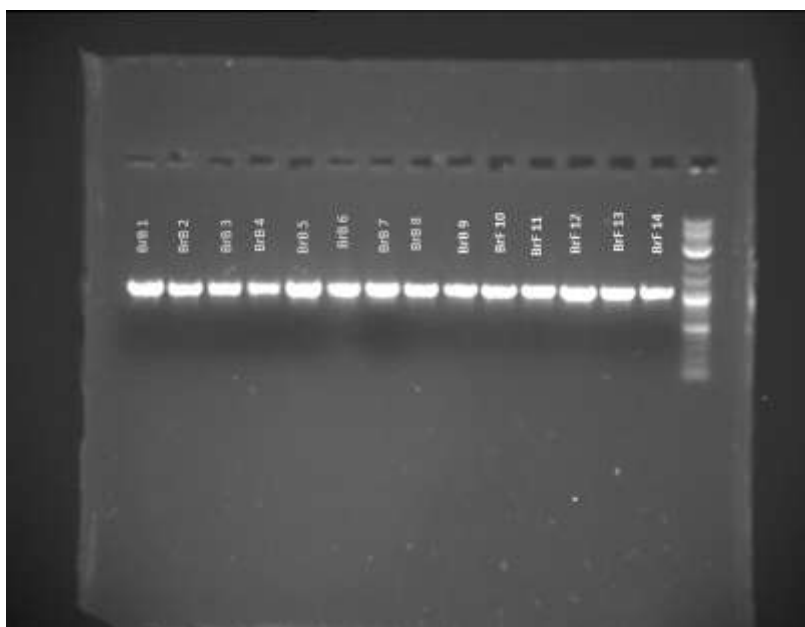


Εικόνα 18. Απομονωμένες αποικίες ενδοφυτικών βακτηρίων από το μπρόκολο βιολογικής καλλιέργειας, σε θρεπτικό υπόστρωμα M9.

Οι παραπάνω εικόνες παρουσιάζουν τις απομονωμένες αποικίες από το μπρόκολο βιολογικής καλλιέργειας και στα δύο θρεπτικά υποστρώματα. Από τις απομονωθείσες αποικίες των ενδοφυτικών βακτηρίων απομονώθηκε ολικό DNA από κάθε αποικία και ενισχύθηκε με τη μέθοδο της PCR τμήμα του 16S rRNA γονιδίου (βλ. κεφάλαιο Υλικά & Μέθοδοι, παράγραφος 2.1.6 Μετά την ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων πάρθηκε η ακόλουθη φωτογραφία, για τα

δείγματα των ενδοφυτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από το μπρόκολο της συμβατικής καλλιέργειας. σελ. 31).

Μετά την ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων πάρθηκε η ακόλουθη φωτογραφία, για τα δείγματα των ενδοφυτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από το μπρόκολο της βιολογικής καλλιέργειας.



Εικόνα 19. Ενίσχυση τμήματος του 16S rRNA γονιδίου των αποικιών ενδοφυτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από το μπρόκολο βιολογικής καλλιέργειας, με το ζεύγος εκκινητών 63f-1087r.

Τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση σε εξωτερικό εργαστήριο. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ταυτοποίησης των απομονωθέντων ενδοφυτικών βακτηρίων του μπρόκολου βιολογικής καλλιέργειας, μέσω του διαχειριστικού προγράμματος Chromas, με τη χρήση του αλγόριθμου BLAST της βάσης δεδομένων NCBI.

Πίνακας 9 Παράθεση αποτελεσμάτων ταυτοποίησης των δειγμάτων του μπρόκολου βιολογικής καλλιέργειας. Με το ίδιο χρώμα παρουσιάζονται οι απομονώσεις εκείνες που φαίνεται να ταυτοποιούνται ως το ίδιο βακτήριο.

BrB1	Uncultured bacterium clone nbw489c11c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Pseudomonas sp.</i> Z56(2013) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain 76P 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

BrB2	Uncultured bacterium clone HDB_SIOY429 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Pseudomonas sp.</i> WS01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Pseudomonas sp.</i> Z56(2013) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
BrB3	<i>Pseudomonas viridiflava</i> strain LK10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Pseudomonas sp.</i> R-41973 partial 16S rRNA gene, strain R-41973
	<i>Pseudomonas sp.</i> R-41777 partial 16S rRNA gene, strain R-41777
BrB4	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain 76P 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Pseudomonas gessardii</i> strain SY7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Pseudomonas gessardii</i> strain SN23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
BrB5	<i>Pseudomonas fluorescens</i> A506, complete genome
	<i>Pseudomonas reactans</i> strain PDD-47b-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Pseudomonas sp.</i> SGb343 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
BrB6	<i>Pseudomonas synxantha</i> strain F112 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Pseudomonas sp.</i> AMF2745 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain 76P 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
BrB7	<i>Pseudomonas viridiflava</i> strain LK10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Pseudomonas sp.</i> R-41973 partial 16S rRNA gene, strain R-41973
	<i>Pseudomonas sp.</i> R-41777 partial 16S rRNA gene, strain R-41777

BrB8	<i>Pseudomonas sp.</i> Z56(2013) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain 76P 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Pseudomonas gessardii</i> strain SY7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
BrB9	Uncultured bacterium clone nbw489c11c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain 76P 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Pseudomonas gessardii</i> strain SY7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

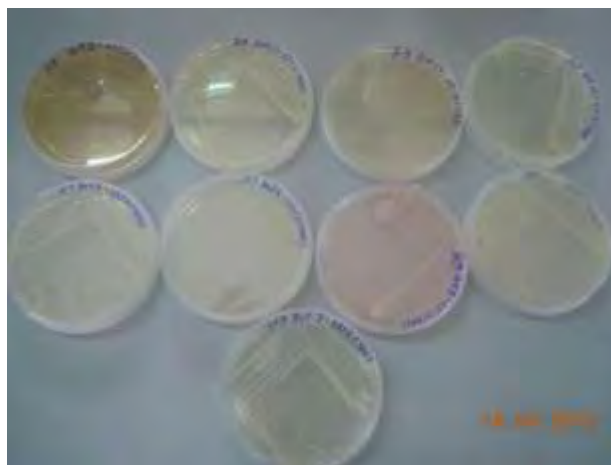
3.3 Ερασιτεχνικός αγρός

Το μπρόκολο αυτό προέρχεται από ερασιτεχνικό αγρό με συγκαλλιέργεια πληθώρας φυτικών ειδών. Στον συγκεκριμένο αγρό/κήπο έχουν εφαρμοστεί φυτοφάρμακα είτε άμεσα (απευθείας ψεκασμός), είτε έμμεσα (εναπόθεση μέσω ανέμου ή υδροφόρου ορίζοντα). Η κωδική ονομασία του δείγματος αυτού είναι BrF και η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε είναι ίδια με το δείγμα της βιολογικής καλλιέργειας.

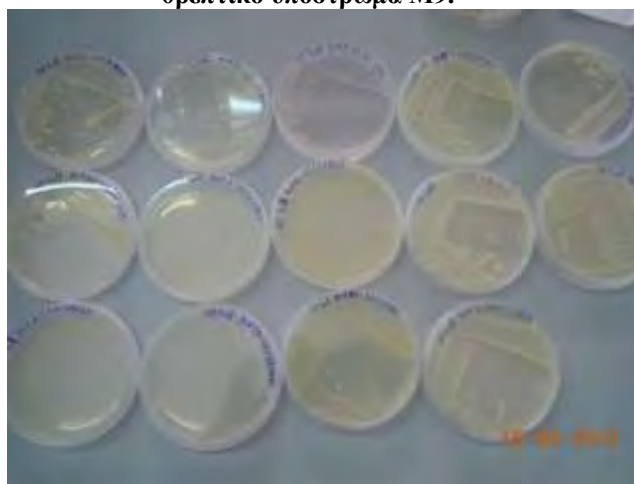


Εικόνα 20. Κομμάτι άνθους του μπρόκολου μετά από τη διαδικασία της απολύμανσης, με αναμονή 10 λεπτών στο διάλυμα χλωρίνης.

Οι απομονωμένες αποικίες των ενδοφυτικών μικροοργανισμών παρουσιάζονται στις παρακάτω φωτογραφίες, σε τρυβλία petri με θρεπτικό διάλυμα M9 και LB half.

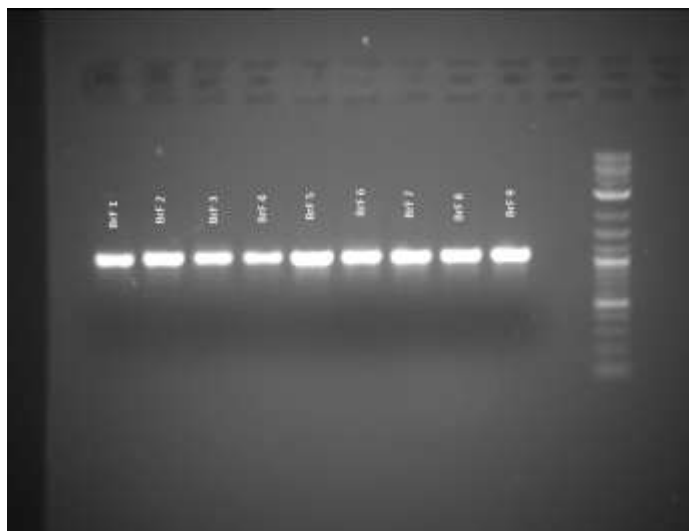


Εικόνα 21. Απομονωμένες αποικίες ενδοφυτικών βακτηρίων από το μπρόκολο από τον ερασιτεχνικό αγρό, σε θρεπτικό υπόστρωμα M9.

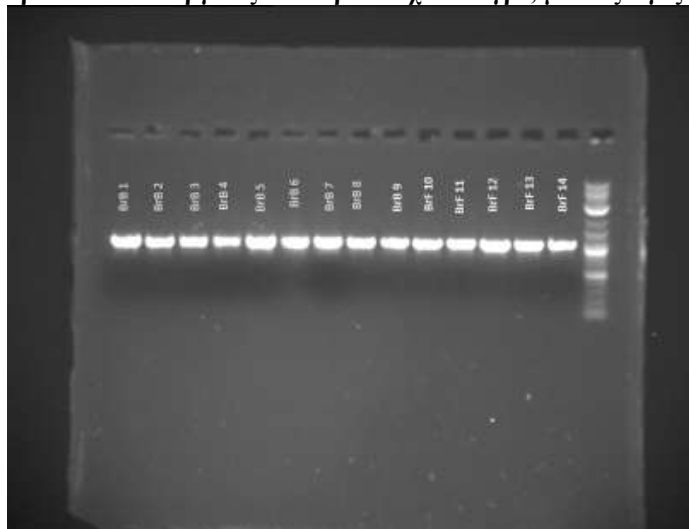


Εικόνα 22. Απομονωμένες αποικίες ενδοφυτικών βακτηρίων από το μπρόκολο από τον ερασιτεχνικό αγρό, σε θρεπτικό υπόστρωμα LB half.

Από τις απομονωθείσες αποικίες των ενδοφυτικών βακτηρίων απομονώθηκε ολικό DNA από κάθε αποικία και ενισχύθηκε με τη μέθοδο της PCR τμήμα του 16S rRNA γονιδίου (βλ. κεφάλαιο Υλικά & Μέθοδοι, παράγραφος 2.1.6 Μετά την ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων πάρθηκε η ακόλουθη φωτογραφία, για τα δείγματα των ενδοφυτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από το μπρόκολο της συμβατικής καλλιέργειας. σελ. 31). Μετά την ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων πάρθηκε η ακόλουθη φωτογραφία, για τα δείγματα των ενδοφυτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από το μπρόκολο που προέρχεται από τον ερασιτεχνικό αγρό.



Εικόνα 23. Ενίσχυση τμήματος του 16S rRNA γονιδίου των αποικιών ενδοφυτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από το μπρόκολο καλλιέργειας στον ερασιτεχνικό αγρό, με το ζεύγος εκκινητών 63f-1087r.



Εικόνα 24. Ενίσχυση τμήματος του 16S rRNA γονιδίου των αποικιών ενδοφυτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από το μπρόκολο καλλιέργειας στον ερασιτεχνικό αγρό, με το ζεύγος εκκινητών 63f-1087r.

Τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση σε εξωτερικό εργαστήριο. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ταυτοποίησης των απομονωθέντων ενδοφυτικών βακτηρίων του μπρόκολου καλλιέργειας σε ερασιτεχνικό αγρο, μέσω του διαχειριστικού προγράμματος Chromas, με τη χρήση του αλγόριθμου BLAST της βάσης δεδομένων NCBI.

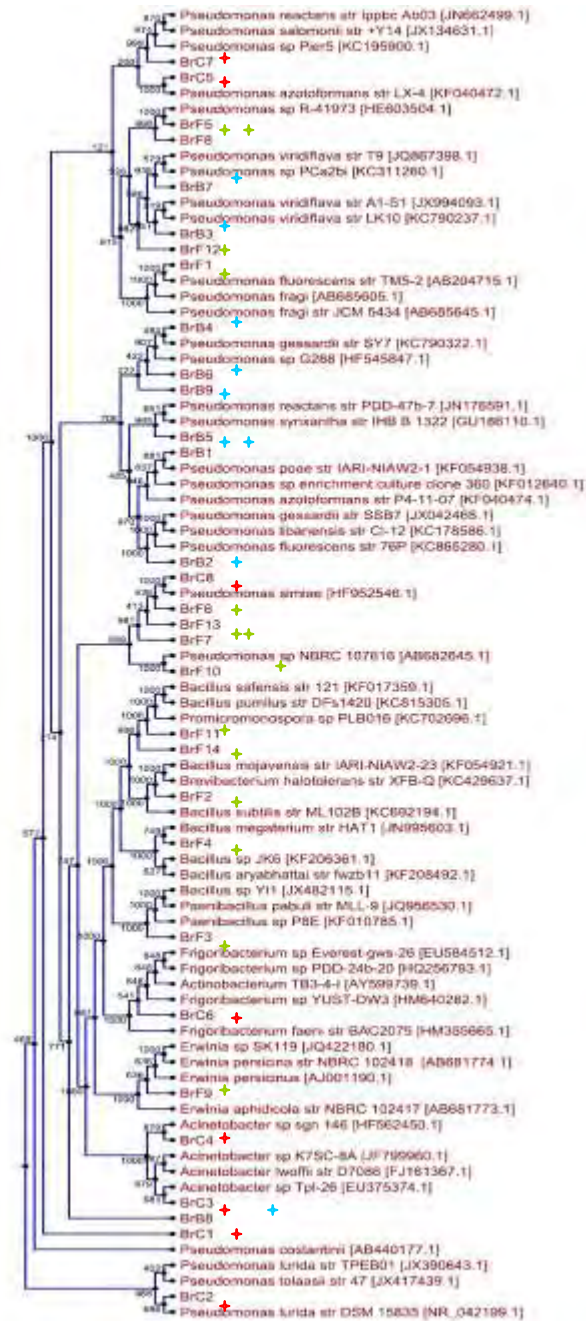
Πίνακας 10 Παρουσίαση αποτελεσμάτων φυλογενετικής ταυτοποίησης των δειγμάτων του μπρόκολου που καλλιεργήθηκε σε ερασιτεχνικό αγρό. Με το ίδιο χρώμα παρουσιάζονται οι απομονώσεις εκείνες που φαίνεται να ταυτοποιούνται ως το ίδιο βακτήριο.

BrF1	<i>Pseudomonas</i> sp. NBRC 107616 gene for 16S rRNA, partial sequence
	<i>Pseudomonas fragi</i> gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: JCM 5392
	<i>Pseudomonas fragi</i> gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: JCM 5452
BrF2	<i>Bacillus subtilis</i> strain Z2010 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	[<i>Brevibacterium</i>] <i>halotolerans</i> strain XFB-Q 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	Uncultured bacterium clone AN1E3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
BrF3	<i>Bacillus</i> sp. Y11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Paenibacillus pabuli</i> strain MLL-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> gene for 16S rRNA, strain:KT5501
BrF4	<i>Bacillus</i> sp. B5(2005b) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Bacillus</i> sp. S85 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Bacillus</i> sp. S84 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
BrF5	<i>Pseudomonas viridiflava</i> strain LK10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Pseudomonas</i> sp. R-41973 partial 16S rRNA gene, strain R-41973
	<i>Pseudomonas</i> sp. R-41777 partial 16S rRNA gene, strain R-41777
BrF6	<i>Pseudomonas</i> sp. Z56(2013) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain 76P 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Pseudomonas gessardii</i> strain SY7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
BrF7	<i>Pseudomonas synxantha</i> strain F127 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Pseudomonas</i> sp. AMF2745 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Pseudomonas</i> sp. Z56(2013) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
BrF8	<i>Pseudomonas viridiflava</i> strain LK10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Pseudomonas</i> sp. R-41973 partial 16S rRNA gene, strain R-41973
	<i>Pseudomonas</i> sp. R-41777 partial 16S rRNA gene, strain R-41777
BrF9	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 8B2-E7
	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 8B1-B4

	<i>Erwinia sp.</i> RA2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
BrF10	<i>Pseudomonas sp.</i> NBRC 107616 gene for 16S rRNA, partial sequence
	<i>Pseudomonas fragi</i> gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: JCM 5392
	<i>Pseudomonas fragi</i> gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: JCM 5452
BrF11	<i>Bacillus sp.</i> L74 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Bacillus sp.</i> L67 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Bacillus sp.</i> L37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
BrF12	<i>Pseudomonas viridiflava</i> strain LK10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Pseudomonas sp.</i> R-41973 partial 16S rRNA gene, strain R-41973
	<i>Pseudomonas sp.</i> R-41777 partial 16S rRNA gene, strain R-41777
Brf13	<i>Pseudomonas sp.</i> AMF2745 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	Uncultured bacterium clone nbw489c11c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Pseudomonas sp.</i> Z56(2013) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
BrF14	<i>Bacillus sp.</i> L74 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Bacillus sp.</i> L67 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<i>Bacillus sp.</i> L37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

3.4 Φυλογενετική ανάλυση απομονωθέντων ενδοφυτικών βακτηρίων

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του τμήματος του 16S rRNA γονιδίου των ενδοφυτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν στην παρούσα μελέτη από άνηθ *Brassica oleracea* διαφορετικής προέλευσης, ευθυγραμμίστηκε, χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο ClustalW, με αντίστοιχα γονίδια συγγενών μικροοργανισμών, των οποίων οι αλληλουχίες είναι διαθέσιμες στο διαδίκτυο (όπως προέκυψαν από τον αλγόριθμο BLAST), μέσω του λογισμικού CLC Sequence Viewer 6. Στη συνέχεια κατασκευάστηκε φυλογενετικό δενδρόγραμμα με τη χρήση της μεθόδου Neighbor Joining.



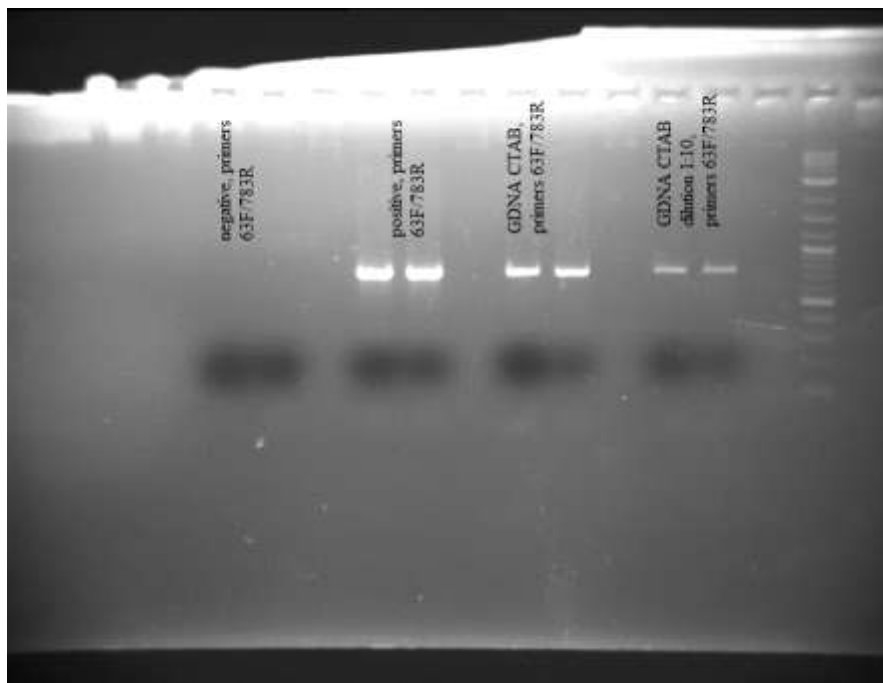
Εικόνα 25. Εξελικτικές σχέσεις 84 ταξινομικές μονάδες. Η απεικόνιση της εξελικτικής ιστορίας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining. Παρουσιάζεται το βέλτιστο δενδρόγραμμα. Δίπλα στους κλάδους παρουσιάζεται το ποσοστό των αντιγράφων των δέντρων στα οποία τα συσχετιζόμενα taxa συγκροτούν μια ομάδα, μέσω της δοκιμής bootstrap (1000 αντίγραφα). Με το πράσινο χρώμα παρουσιάζονται τα δείγματα που απομονώθηκαν από το μπρόκολο καλλιεργημένο στον ερασιτεχνικό αγρό. Με το κόκκινο χρώμα εμφανίζονται τα δείγματα που απομονώθηκαν από το μπρόκολο συμβατικής καλλιέργειας. Ενώ με το μπλε χρώμα παρουσιάζονται τα δείγματα που απομονώθηκαν από το μπρόκολο της βιολογικής καλλιέργειας. Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό CLC Sequence Viewer 6.

3.5 Κατασκευή 16S rDNA βιβλιοθήκης (clone library)

Στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής έγινε και μια προσπάθεια ταυτοποίησης εκείνης της ενδοφυτικής βακτηριακής μικροχλωρίδας, που δεν έγινε δυνατό να απομονωθεί με τις μεθόδους καλλιέργειας. Για αυτό το λόγο απομονώθηκε ολικό DNA από άνθη μπρόκολου που προήλθαν από δύο διαφορετικές πηγές. Το πρώτο αγοράστηκε από γνωστή αλυσίδα σούπερ μάρκετ και είναι εισαγωγής από την Ιταλία, ενώ το δεύτερο αγοράστηκε από λαϊκή αγορά. Και τα δύο δείγματα είναι συμβατικής καλλιέργειας. Μετά το στάδιο της απομόνωσης ολικού DNA από κάθε δείγμα χωριστά, τα δύο δείγματα DNA ενώθηκαν σε ίση αναλογία. Χρησιμοποιήθηκαν αρκετά ζεύγη εκκινητών. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών 8F-1512R, διότι ενισχύουν βακτηριακό 16S rDNA στο *Fragaria ananassa* (de Melo Pereira, *et al.* 2011). Επίσης χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος των εκκινητών 63F-1087R σε μία προσπάθεια ενίσχυσης βακτηριακού 16S rDNA (Hauben, *et al.* 1997). Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν και τα ζεύγη των εκκινητών 799F-1087R και 799F-1512R γιατί ενισχύουν βακτηριακό 16S rDNA στο *Oryza sativa* (Sun, *et al.* 2008). Τελικά δεν έγινε δυνατό να ενισχυθεί τμήμα του βακτηριακού 16S rDNA από το άνθος του φυτού *Brassica oleracea* με κανέναν από τους παραπάνω συνδυασμούς εκκινητών. Πιθανότατα οι συγκεκριμένοι εκκινητές στο *Brassica oleracea* να ενισχύουν το μιτοχονδριακό DNA του φυτού και όχι το βακτηριακό DNA.

Έγινε από την αρχή απομόνωση DNA με τη μέθοδο CTAB που αναφέρεται λεπτομερέστερα στο κεφάλαιο «υλικά και μέθοδοι». Το μπρόκολο που χρησιμοποιήθηκε αγοράστηκε από γνωστή αλυσίδα σούπερ μάρκετ, συμβατικής καλλιέργειας.

Αυτή τη φορά χρησιμοποιήθηκε ένα καινούργιο ζεύγος εκκινητών, οι 63F/783R για την ενίσχυση του SSU rDNA των ενδοφυτικών βακτηρίων, καθώς στο άρθρο αναφέρεται η απομόνωση βακτηριακού DNA από τις ρίζες των φυτών *Triticum aestivum* και *Spinacea oleracea* (Sakai, *et al.* 2004). Οι συνθήκες αναφέρονται στο κεφάλαιο «υλικά και μέθοδοι», καθώς επίσης και οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης.



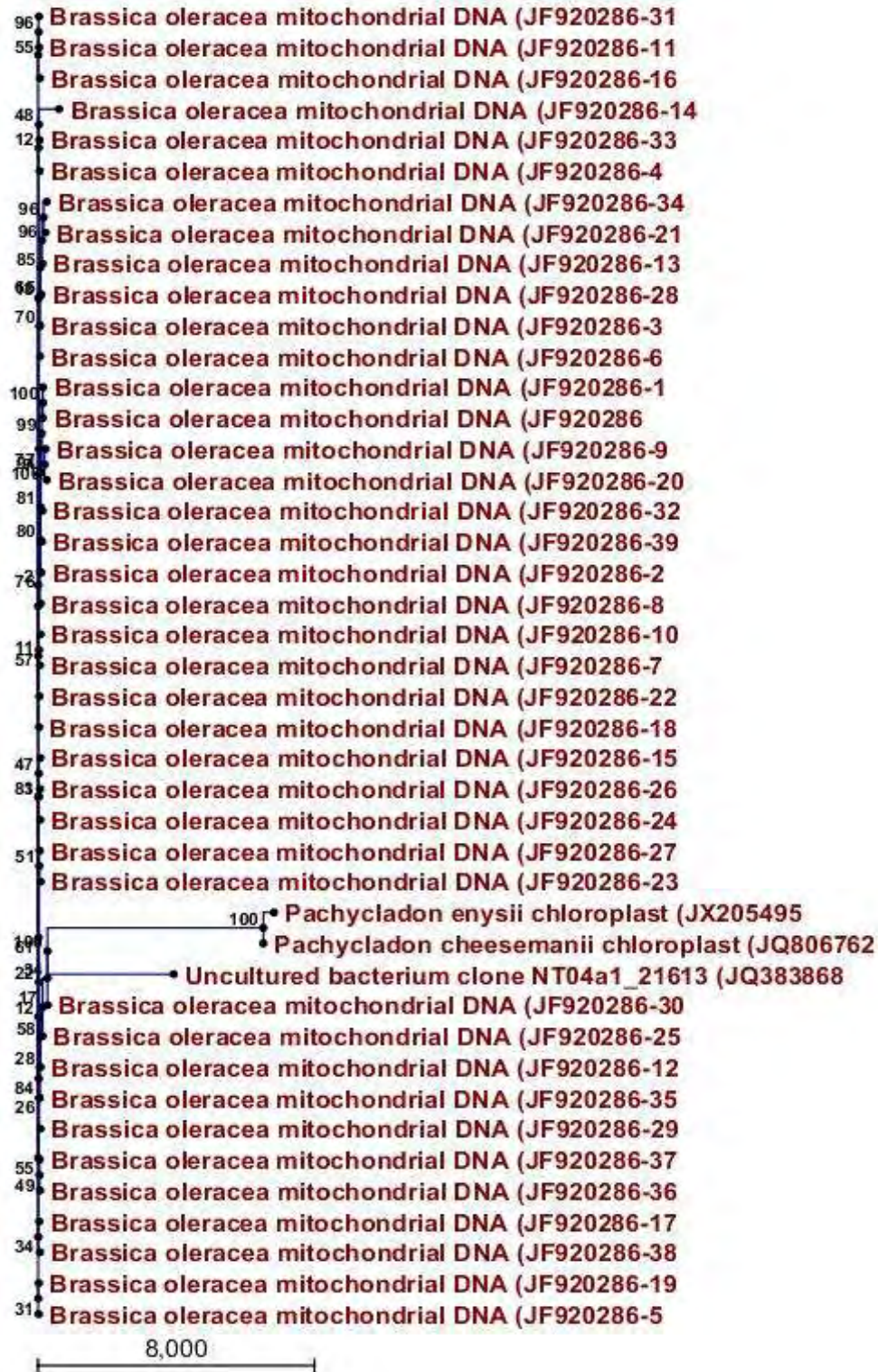
Εικόνα 26. Ενίσχυση του βακτηριακού SSU rDNA (~800 bp), με το ζεύγος εκκινήτων 63f-783r από μπρόκολα συμβατικής καλλιέργειας.

Από τα αποτελέσματα αλληλούχισης της 16S rDNA βιβλιοθήκης, φαίνεται να ενισχύθηκε μόνο το μιτοχondριακό DNA του *Brassica oleracea*. Τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης όλων των κλώνων ήταν ίδια (μιτοχondριακό DNA του *Brassica oleracea*) εκτός του κλώνου Br18 του οποίου η ταυτοποίηση με βάση τον αλγόριθμο BLAST, μέσω της βάσης γενετικών δεδομένων NCBI έδειξε τα παρακάτω:

Πίνακας 11 Αποτελέσματα φυλογενετικής ταυτοποίησης του δείγματος Br18.

Uncultured bacterium clone NT04a1_21613 16S ribosomal RNA gene,partial sequence
Pachycladon cheesemani chloroplast, complete genome
Pachycladon enysii chloroplast, complete genome

Ακολούθως χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα CLC Sequence Viewer 6, για την απεικόνιση του φυλογενετικού δένδρου των αποτελεσμάτων της clone library. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω.



Εικόνα 27. Εξελικτικές σχέσεις 43 ταξινομικές μονάδες. Η απεικόνιση της εξελικτικής ιστορίας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining. Παρουσιάζεται το βέλτιστο δενδρόγραμμα. Δίπλα στους κλάδους παρουσιάζεται το ποσοστό των αντιγράφων των δέντρων στα οποία τα συσχετιζόμενα taxa συγκροτούν μια ομάδα, μέσω της δοκιμής bootstrap (1000 αντίγραφα). Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό CLC Sequence Viewer 6.

4 Συζήτηση

Η παρουσίαση των παραπάνω αποτελεσμάτων μας δείχνει την πληθώρα των μικροοργανισμών που ανήκουν στη συμβιωτική κοινότητα, του άνθους του μπρόκολου. Στους πίνακες που παρατίθενται στο κεφάλαιο 3, φαίνεται ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των μικροοργανισμών ανήκουν στο γένος *Pseudomonas*, κάτι το αναμενόμενο από την υπάρχουσα βιβλιογραφία για ενδοφυτικά βακτήρια.

Ορισμένα είδη των βακτηρίων που απομονώθηκαν στην παρούσα εργασία, έχουν καταγραφεί βιβλιογραφικά ως παθογόνα των φυτών. Από το σύνολο των 84 απομονωμένων taxa, ως παθογόνα χαρακτηρίζονται μόνο τα 6. Παρακάτω παρατίθεται αναλυτικότερα ο παθογόνος χαρακτήρας των βακτηρίων αυτών.

Το βακτήριο *Pseudomonas lurida* είναι φυλογενετικά κοντά με το βακτήριο *Pseudomonas tolaasii* και τα δύο έχουν καταγραφεί ως παθογόνα βακτήρια των φυτών. Βιβλιογραφικά αναφέρεται ο ρόλος της *Pseudomonas lurida*, ως βακτήριο το οποίο αποικεί την φυλλόσφαιρα του γρασιδιού (Behrendt *et al*, 2007). Η *Pseudomonas tolaasii*, έχει χαρακτηριστεί ως βακτηριοφάγο και ως παθογόνο των καλλιεργούμενων μανιταριών, προκαλώντας καφέ κηλίδες, ασθένεια που στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται ως «brown block» (Nguyen *et al*, 2012). Η *Pseudomonas salomonii*, βιβλιογραφικά αναφέρεται ως παθογόνο βακτήριο του σκόρδου, προκαλώντας την ασθένεια «café au late» (Gardan *et al*, 2002).

Η *Pseudomonas viridiflava*, καταγράφεται ως ένα από τα βακτήρια που προκαλούν την ασθένεια σήψης της εντεριώνης στη τομάτα, ενώ προκαλεί βακτηρίωση στα σολανώδη φυτά, υγρές βακτηριακές σήψεις σε μεγάλη γκάμα φυτικών οικογενειών εκτός των σταυρανθών, και βακτηριακή κηλίδωση στην αγγουριά (Παναγόπουλος, 2000). Επίσης προκαλεί νεκρωτικές κηλίδες σε καρπούς τομάτας (Τζάμος, 2007). Επίσης χαρακτηρίζεται ως παθογόνο του φυτού *Arabidopsis thaliana* (Marina *et al*, 2013; Lefort *et al*, 2013).

Το βακτήριο *Pseudomonas fluorescens* αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία ως ένα από τα βακτήρια που προκαλούν τη σήψη της εντεριώνης στη τομάτα και υγρές σήψεις κυρίως στα σταυρανθή, επίσης αναφέρεται και η πηκτινολυτική του δράση (Παναγόπουλος, 2000).

Μέσω της βιβλιογραφίας μας δόθηκαν μερικές απαντήσεις για τον πιθανό ρόλο ορισμένων μικροοργανισμών στο άνθος του μπρόκολο, όπως επίσης επιβεβαιώθηκε και η ενδοφυτική τους ιδιότητα.

Σε μελέτη που έγινε στο άνθος του τριαντάφυλλου βρέθηκαν ενδοφυτικά βακτήρια του γένους *Acinetobacter* και *Bacillus* (Bahig El-Deeb *et al*, 2012), είδη τα οποία απομονώθηκαν και στην παρούσα μελέτη. Επίσης καταγράφηκε η παρουσία ενδοφυτικών βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* και *Bacillus* στα άνθη του σταφυλιού (Comrants *et al*, 2011). Τα ίδια γένη εμφανίστηκαν και σε μελέτη που αφορά τους ενδοφυτικούς οργανισμούς που διαβιούν στο φρούτο της φράουλας (de Melo Pereira *et al*, 2012).

Γένη του βακτηρίου *Pseudomonas* απομονώθηκαν από μίσχο δημητριακών με βακτηρίωση. Πιο συγκεκριμένα απομονώθηκαν τα είδη *P. fluorescens*, *P. tolaasii*, *P. reactans* (Bobrova , 2005), τα οποία απομονώθηκαν και στην παρούσα εργασία. Από τη ρίζα του φυτού *Platycodon grandiflorum* που χρησιμοποιείται στην κινέζικη παραδοσιακή ιατρική, απομονώθηκαν βακτήρια *Bacillus spp.* (Asraful Islam SM, 2010). Από τους καρπούς του φυτού *Coffea arabica* έχουν απομονωθεί τα παρακάτω γένη ενδοφυτικών μικροοργανισμών: *Bacillus*, *Staphylococcus*, και *Paenibacillus* (Oliveira, 2013). Επομένως, συγκρίνοντας τα αποτελέσματά μας με αυτά των παραπάνω εργασιών, διαπιστώσαμε την ενδοφυτική ικανότητα των βακτηριακών στελεχών, η απομόνωση των οποίων πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας μελέτης.

Επισημαίνεται επίσης ο έντονος ανταγωνιστικός χαρακτήρας του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* , γεγονός που επιτρέπει τη χρήση του για τη βιολογική αντιμετώπιση της ασθένειας «βακτηριακό κάψιμο». Επιπρόσθετα, φαίνεται να ανταγωνίζεται το επιφυτικό παθογόνο *Pseudomonas syringae* (Παναγόπουλος, 2007). Επίσης χαρακτηρίζεται και ως επιφυτικό παθογόνο *Pseudomonas syringae* (Παναγόπουλος, 2007). Το ίδιο βακτήριο έχει επίσης καταγραφεί ως ένας παράγοντας που προωθεί τη συμβίωση μανιταριών με ένα είδος πεύκου (Cusano AM *et al*, 2011). Το βακτήριο *Pseudomonas fluorescens* είναι φυλογενετικά κοντά στο βακτήριο *Pseudomonas fragi*. Το βακτήριο *Pseudomonas fragi* αναφέρεται ως διασπαστής λαδιού και μελετάται η χρήση του στην αποτροπή της σήψης τροφών (Klein G *et al*, 2013).

Οι ουσίες φλαγελλίνη και λιποπολυσακχαρίτες των παθογόνων βακτηρίων *Pseudomonas spp.*, έχει βρεθεί πως υπάρχουν και στην επιφάνεια των κυττάρων των ευεργετικών βακτηρίων (για τον ξενιστή) του γένους *Pseudomonas spp.*, και είναι πιθανοί παρακινητές του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή. Η αρχική μορφή της φλαγελλίνης και των λιποπολυσακχαριτών, παραγόμενα από τα μη παθογόνα βακτήρια, κλώνους του *Pseudomonas*

fluorescens WCS417 και WCS374, και *Pseudomonas putida* WCS358, έχουν διαφορετικές επιπτώσεις στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος των φυτών *Arabidopsis*, τομάτα και φασόλι. Οι ουσίες αυτές προτείνουν στον ξενιστή συγκεκριμένα να αναγνωρίσει αυτούς τους ευεργετικούς μικροοργανισμούς.(Van Wees *et al*, 2008)

Το βακτήριο *Pseudomonas reactans* έχει καταγραφεί ως μέλος της κοιλιακής χλωρίδας της κατσαρίδας *Blattella germanica* (Zhang F *et al*, 2013). Επιπρόσθετα, το βακτήριο *Paenibacillus pabuli* καταγράφεται ως ενδοφυτικό βακτήριο του καπνού, το οποίο δρα ανταγωνιστικά με το παθογόνο βακτήριο *Phytophthora* (Wang H *et al*, 2012).

Το βακτήριο *Paenibacillus amylolyticus* αναφέρεται να έχει έντονη αντιβακτηριδιακή ιδιότητα, λόγω της παραγωγής της δραστικής ουσίας πολυμυξίνη E (DeCrescenzo Henriksen E *et al*, 2007).

Το βακτήριο *Bacillus subtilis*, όπως και το βακτήριο *Pseudomonas fluorescens*, βιβλιογραφικά αναφέρονται ως ανταγωνιστικά του μύκητα *Colletotrichum higginsianum*, (Rakotoniriana EF *et al*, 2013). Σε μια άλλη μελέτη αναφέρεται η αντιβακτηριδιακή, αντική και γενικότερα φυτοπροστατευτική του δράση (Nihorimbere *et al*, 2009). Το βακτήριο *Bacillus subtilis* έχει επίσης απομονωθεί και από τον καρπό της φράουλας (de Melo Pereira *et al*, 2012), καθώς επίσης και από τα φύλλα του φυτού *Swietenia macrophylla* στον Αμαζόνιο (Coêlho *et al*, 2011). Το βακτήριο *B. subtilis* είναι φυλογενετικά κοντά στο βακτήριο *B. safensis*. Το βακτήριο *B. subtilis* έχει επίσης απομονωθεί και από τις εναέριες ρίζες του φυτού *Ficus benghalensis*, σε μελέτη που έγινε με σκοπό την ανεύρεση μυκητο-ανταγωνιστικών βακίλων (Pathak, 2013). Προτείνεται επίσης και η χρήση του για τη βιολογική αντιμετώπιση της ασθένειας «βακτηριακό κάψιμο» στα πυρηνόκαρπα (Παναγόπουλος, 2007).

Ως προς τα απομονωθέντα ενδοφυτικά βακτήρια της παρούσας μελέτης, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα βακτήρια *Pseudomonas lurida* και *Acinetobacter sp. Tpl-26*, απομονώθηκαν μόνο από το δείγμα της συμβατικής καλλιέργειας. Τα βακτήρια του γένους *Bacillus* απομονώθηκαν μόνο από το δείγμα του ερασιτεχνικού αγρού.

Τα παραπάνω αποτελέσματα χρήζουν περεταίρω μελέτης, καθώς μένει αναπάντητο το ερώτημα του ρόλου του κάθε βακτηρίου στο συγκεκριμένο τμήμα του φυτικού ιστού του μπρόκολου. Θα πρέπει να γίνουν περισσότερες μελέτες για τη μεταξύ των μικροοργανισμών σχέση, είναι δηλαδή εξαρτώμενες, αλληλοεξαρτώμενες, ή ανταγωνιστικές;

Από τα αποτελέσματα της προσπάθειας δημιουργίας μιας 16S rDNA βιβλιοθήκης στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής, προκύπτει ότι χρειάζεται περαιτέρω έρευνα προκειμένου να βρεθεί το σωστό ζεύγος εκκινητών που να αποκλείει την ενίσχυση του μιτοχονδριακού DNA του *Brassica Oleracea*. Παρόλο που οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κατάλληλοι για άλλα είδη φυτών, για το *Brassica oleracea* αποδείχθηκε πως δεν ήταν οι κατάλληλοι.

5 Βιβλιογραφία

5.1 Άρθρα

- Akoumianaki I, Nomaki H, Pachiadaki M, Kormas KA, Kitazato H, Tokuyama H. (2012). Low bacterial diversity and high labile organic matter concentrations in the sediments of the Medee deep-sea hypersaline anoxic basin, *Microbes Environ.* 27(4):504-8.
- Abrahão MRE, Molina G, Pastore GM. (2013). Endophytes: Recent developments in biotechnology and the potential for flavor production. *Food Research International.* 52:367–372.
- Ahimsa-Mueller MA, Markert A, Hellwig S, Knoop V, Steiner U, et al. 2007. Clavicipitaceous fungi associated with ergoline alkaloid-containing Convolvulaceae. *J. Nat. Prod.* 70:1955–60.
- Asraful Islam SM, Math RK, Kim JM, Yun MG, Cho JJ, Kim EJ, Lee YH, Yun HD. (2010). Effect of plant age on endophytic bacterial diversity of balloon flower (*Platycodon grandiflorum*) root and their antimicrobial activities. *Curr Microbiol.* 61(4):346-56.
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol.* 57:233-66.
- Behrendt U, Ulrich A, Schumann P, Meyer JM, Spröer C. (2007). *Pseudomonas lurida* sp. nov., a fluorescent species associated with the phyllosphere of grasses. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57(5):979-85.
- Bobrova VK, Miliutina IA, Troitskiĭ AV. (2005). Genetic diversity in pseudomonads associated with cereal cultures infected with basal bacteriosis. *Mikrobiologiya.* 74(4):537-44.
- Chelius MK, Triplett EW. (2001). The Diversity of Archaea and Bacteria in Association with the Roots of *Zea mays* L.. *Microb Ecol.* 41:252–263.
- Chelius MK, Triplett EW. (2000). Immunolocalization of Dinitrogenase Reductase Produced by *Klebsiella pneumoniae* in Association with *Zea mays* L.. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(2):783-787.

- Coêlho MM, Ferreira-Nozawa MS, Nozawa SR, Santos ALW. (2011). Isolation of endophytic bacteria from arboreal species of the Amazon and identification by sequencing of the 16S rRNA encoding gene, *Genetics and Molecular Biology*. 34(4):676-680.
- Compant S, Mitter B, Colli-Mull JG, Gangl H, Sessitsch A. (2011). Endophytes of Grapevine Flowers, Berries, and Seeds: Identification of Cultivable Bacteria, Comparison with Other Plant Parts, and Visualization of Niches of Colonization. *Microb Ecol*. 62:188–197.
- Cusano AM, Burlinson P, Deveau A, Vion P, Uroz S, Preston GM, Frey-Klett P. (2011). *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8 type III secretion mutants no longer promote ectomycorrhizal symbiosis. *Environ Microbiol Rep*. 3(2):203-10.
- de Melo Pereira GV, Teixeira Magalhães K, Rainildes Lorenzetti E, Pereira Souza T, Freitas Schwan R. (2012). A Multiphasic Approach for the Identification of Endophytic Bacterial in Strawberry Fruit and their Potential for Plant Growth Promotion. *Microb Ecol*. 63:405–417.
- DeCrescenzo Henriksen E, Phillips DR, Peterson JB. (2007). Polymyxin E production by *P. amylolyticus*. *Lett Appl Microbiol*. 45(5):491-6.
- El-Deeb B, Bazaid S, Gherbawy Y, Elhariry H. (2012). Characterization of endophytic bacteria associated with rose plant (*Rosa damascena trigintipeta*) during flowering stage and their plant growth promoting traits. *Journal of Plant Interactions*. 7(3):248-253.
- Gardan L, Bella P, Meyer JM, Christen R, Rott P, Achouak W, Samson R. (2002) *Pseudomonas salomonii* sp. nov., pathogenic on garlic, and *Pseudomonas palleroniana* sp. nov., isolated from rice. *Int J Syst Evol Microbiol*. 52(6):2065-74.
- Giménez C, Cabrera R, Reina M, González-Coloma A. 2007. Fungal endophytes and their role in plant protection. *Curr. Org. Chem*. 11:707–20.
- Guo B, Wang Y, Sun X, Tang K. 2008. Bioactive natural products from endophytes: a review. *Appl. Biochem. Microbiol*. 44:136–42.
- Hardoim PR, van Overbeek LS, Elsas JD. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol*. 16(10):463-71.
- Hardoim PR, van Overbeek LS, van Elsas JD. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, 16(10):463-71.

- Hauben L, Vauterin L, Swings J, Moore ERB. (1997). Comparison of 16s Ribosomal DNA Sequences of All *Xanthomonas* Species, *Int J Syst Bacteriol.* 47(2):328-335.
- Hawksworth DL, Rossman AY. 1997. Where are all the undescribed fungi? *Phytopathology.* 87:888–91.
- Hirsch AM. (2004). Plant-Microbe Symbioses: A Continuum from Commensalism to Parasitism. *Symbiosis.* 37(1-3):345-363.
- Hornschuh M, Grotha R, Kutschera U. (2002). Epiphytic Bacteria Associated with the Bryophyte *Funaria hygrometrica*: Effects of *Methylobacterium* Strains on Protonema Development. *Plant Biology.* 4(6):682–687.
- Ivy RA, Ranieri ML, Martin NH, den Bakker HC, Xavier BM, Wiedmann M, Boor KJ. (2012). Identification and characterization of psychrotolerant sporeformers associated with fluid milk production and processing. *Appl Environ Microbiol.* 78(6):1853-64.
- James E.K. (2000). Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Research.* 65(2–3):197-209.
- Klein G, Rüben C, Upmann M. (2013). Antimicrobial Activity of Essential Oil Components Against Potential Food Spoilage Microorganisms. *Curr Microbiol.* 67(2):200-8.
- Krause A, Ramakumar A, Bartels D, Battistoni F, Bekel T, Boch J, Böhm M, Friedrich F, Hurek T, Krause L, Linke B, McHardy AC, Sarkar A, Schneiker S, Syed AA, Thauer R, Vorhölter FJ, Weidner S, Pühler A, Reinhold-Hurek B, Kaiser O, Goesmann A. (2006). Complete genome of the mutualistic, N₂-fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Nature Biotechnology,* 24(11):1385-91.
- Kucht S, Groí J, Hussein Y, Grothe T, Keller U, et al. 2004. Elimination of ergoline alkaloids following treatment of *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) with fungicides. *Planta* 219:619–25.
- Lefort F, Calmin G, Crovadore J, Osteras M, Farinelli L. (2013). Whole-Genome Shotgun Sequence of *Pseudomonas viridiflava*, a Bacterium Species Pathogenic to *Arabidopsis thaliana*. *Genome Announc.* 1(1):00116-12.
- Lewandowski I, Scurlock JMO, Lindvall E, Christou M. (2003). The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe. *Biomass and Bioenergy.* 25(4):335–361.

- Marina M, Sirera FV, Rambla JL, Gonzalez ME, Blázquez MA, Carbonell J, Pieckenstain FL, Ruiz OA. (2013). Thermospermine catabolism increases *Arabidopsis thaliana* resistance to *Pseudomonas viridiflava*. *J Exp Bot.* 64(5):1393-402.
- Nguyen HT, Yoon S, Kim MH, Kim YK, Yoon MY, Cho YH, Lim Y, Shin SH, Kim DE. (2012). Characterization of bacteriophage ϕ Pto-bp6g, a novel phage that lyses *Pseudomonas tolaasii* causing brown blotch disease in mushrooms. *J Microbiol Methods.* 91(3):514-9.
- Nihorimbere V, Fickers P, Thonart P, Ongena M. (2009). Ecological fitness of *Bacillus subtilis* BGS3 regarding production of the surfactin lipopeptide in the rhizosphere, *Environ Microbiol Rep.* 1(2):124-30.
- Oliveira MN, Santos TM, Vale HM, Delvaux JC, Cordero AP, Ferreira AB, Miguel PS, Tótola MR, Costa MD, Moraes CA, Borges AC. (2013). Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from southeastern Brazil. *Can J Microbiol.* 59(4):221-30.
- Ownley BH, Gwinn KD, Vega FE. (2010). Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl.* 55(1):113-128.
- Partida-Martínez LP, Heil M. (2011). The microbe-free plant: fact or artifact?. *Front Plant Sci.* 2:100.
- Pathak KV, Keharia H. (2013). Characterization of fungal antagonistic bacilli isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) using intact-cell MALDI-TOF mass spectrometry (ICMS). *J Appl Microbiol.* 114(5):1300-10.
- Pendall D. 2005. *Pharmako/Gnosis: Plant Teachers and the Poison Path*. San Francisco: Mercury House. 383 pp.
- Porrás-Alfaro A, Bayman P. (2011). Hidden Fungi, Emergent Properties: Endophytes and Microbiomes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49:291-315.
- Priti V, Ramesha BT, Singh S, Ravikanth G, Ganeshiah KN, et al. 2009. How promising are endophytic fungi as alternative sources of plant secondary metabolites? *Curr. Sci.* 97:477-78.
- Rakotoniriana EF, Rafamantanana M, Randriamampionona D, Rabemanantsoa C, Urveg-Ratsimamanga S, El Jaziri M, Munaut F, Corbisier AM, Quetin-Leclercq J, Declerck S. (2013). Study in vitro of the impact of endophytic bacteria isolated from *Centella asiatica*

on the disease incidence caused by the hemibiotrophic fungus *Colletotrichum higginsianum*, *Antonie Van Leeuwenhoek*. 103(1):121-33.

- Ramani K, Jain SC, Mandal AB, Sekaran G. (2012). Microbial induced lipoprotein biosurfactant from slaughterhouse lipid waste and its application to the removal of metal ions from aqueous solution. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 97:254-63.
- Rastogi G, Tech JJ, Coaker GL, Leveau JHJ. (2010). A PCR-based toolbox for the culture-independent quantification of total bacterial abundances in plant environments. *Journal of Microbiological Methods*. 83:127–132.
- Redford AJ, Fierer N. (2009). Bacterial Succession on the Leaf Surface: A Novel System for Studying Successional Dynamics. *Microb Ecol*. 58:189–198.
- Reinhold-Hurek B, Hurek T. (2011). Living inside plants: bacterial endophytes. *Curr Opin Plant Biol*. 14(4):435-43.
- Rokni-Zadeh H, Li W, Yilma E, Sanchez-Rodriguez A, De Mot R. (2013). Distinct lipopeptide production systems for WLIP (white line-inducing principle) in *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol Rep*. 5(1):160-9.
- Rosenblueth M, Martínez-Romero E. (2006). Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts. *MPMI*. 19(8):827–837.
- Sajben-Nagy E, Maróti G, Kredics L, Horváth B, Párducz A, Vágvölgyi C, Manczinger L. (2012). Isolation of new *Pseudomonas tolaasii* bacteriophages and genomic investigation of the lytic phage BF7. *FEMS Microbiol Lett*. 332(2):162-9.
- Sakai M, Matsuka A, Komura T, Kanazawa S. (2004). Application of a new PCR primer for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the bacterial communities in plant roots. *Journal of Microbiological Methods*. 59:81– 89.
- Shankar Sagaram U, DeAngelis KM, Trivedi P, Andersen GL, Lu S-E, Wang N. (2009). Bacterial Diversity Gene Analysis of Huanglongbing Pathogen-Infected Citrus, Using PhyloChip Arrays and 16S rRNA Clone Library Sequencing. *Appl. Environ. Microbiol*. 75(6):1566.
- Staniek A, Woerdenbag HJ, Kayser O. (2008). Endophytes: exploiting biodiversity for the improvement of natural product-based drug discovery. *J. Plant Interact*. 3:75–93.
- Stierle A, Strobel GA, Stierle D. 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*. *Science*. 260:214–16.

- Sun L, Qiu F, Zhang X, Dai X, Dong X, Song W. (2008). Endophytic Bacterial Diversity in Rice (*Oryza sativa* L.) Roots Estimated by 16S rDNA Sequence Analysis. *Microb Ecol.* 55:415–424.
- Tadych M, Bergen M, Dugan FM, White JF Jr.. (2007). Evaluation of the potential role of water in spread of conidia of the Neotyphodium endophyte of *Poa annua*. *Mycol Res.* 111(Pt 4):466-72.
- Urquiaga S , Cruz KHS, Boddey RM. (1992). Contribution of Nitrogen Fixation to Sugar Cane: Nitrogen-15 and Nitrogen-Balance Estimates. *Soil Science Society of America Journal.* 56(1):105-114.
- Van Wees SCM, Van der Ent S, Pieterse CMJ. (2008). Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology.* 11:443–448.
- Wang H, Li W, Chen Q, Huang Y, Li K, Xia H, Wang M, Cai L, Shang S, Shi J. (2012). A rapid microbioassay for discovery of antagonistic bacteria for *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Phytopathology.* 102(3):267-71.
- Wilson D. (1995). Endophyte: The Evolution of a Term, and Clarification of Its Use and Definition. *Oikos* 73(2):274-276.
- Zhang F, Huang YH, Liu SZ, Zhang L, Li BT, Zhao XX, Fu Y, Liu JJ, Zhang XX. (2013). *Pseudomonas reactans*, a Bacterial Strain Isolated From the Intestinal Flora of *Blattella germanica* With Anti-*Beauveria bassiana* Activity. *Environ Entomol.* 42(3):453-9.

5.2 Ιστοσελίδες

- http://ocw.mit.edu/courses/biological-engineering/20-109-laboratory-fundamentals-in-biological-engineering-fall-2007/labs/mod1_3/
- http://ocw.mit.edu/courses/biological-engineering/20-109-laboratory-fundamentals-in-biological-engineering-fall-2007/labs/examine_clones/
- http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Plant_endophyte
- http://openwetware.org/wiki/BE.109:DNA_engineering/DNA_ligation_and_bacterial_transformation

5.3 Βιβλία

- Madigan, MT, Martinko JM, Parker J. 2005. *Brock* Βιολογία των μικροοργανισμών, Τόμος 1, εκδόσεις πανεπιστημίου Κρήτης. Ηράκλειο.
- Βαρδαβάκης Μ, Ζούζουλας Δ. 2003. Μορφολογία και ανατομία των φυτών, εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη.
- Βερέσογλου ΔΣ. 2004. Οικολογία, Β' έκδοση, εκδόσεις έλλα. Λάρισα.
- Παναγόπουλος ΧΓ. 2000. Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών, Β' έκδοση, εκδόσεις Αθαν. Σταμούλη, Αθήνα.
- Παναγόπουλος ΧΓ. 2007. Ασθένειες καρποφόρων και αμπέλου, 4^η έκδοση, εκδόσεις Αθ. Σταμούλης, Αθήνα.
- Σαρλής ΓΠ. 1999. Συστηματική βοτανική εφαρμογές κορμόφυτων, εκδόσεις Αθ. Σταμούλης, Αθήνα.
- Τζάμος ΕΚ. 2007. Φυτοπαθολογία, Β' έκδοση, εκδόσεις Αθ. Σταμούλης, Αθήνα.
- Τσέκου ΙΒ. 2004. Φυσιολογία Φυτών, Β' έκδοση, εκδόσεις Αδελφών Κυριακίδη α.ε.. Αθήνα.

5.4 Εικόνες

- <http://en.wikipedia.org/wiki/Broccoli>
- www.shigen.nig.ac.jp
- www.scq.ubc.ca
- www.cambio.co.uk
- www.anachem.co.uk
- <http://schoolworkhelper.net/pcr-uses-steps-purpose/>
- http://openwetware.org/wiki/BE.109:DNA_engineering/DNA_ligation_and_bacterial_transformation
- http://ocw.mit.edu/courses/biological-engineering/20-109-laboratory-fundamentals-in-biological-engineering-fall-2007/labs/mod1_3/

5.5 Πίνακες

- <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2858?fg=&man=&lfacet=&format=&count=&max=25&offset=&sort=&qlookup=broccoli>