

Περίληψη

Η φυλλόσφαιρα και η ριζόσφαιρα είναι μικρο-ενδιαιτήματα του φυτού που είναι γνωστό ότι φέρουν ποικιλόμορφες μικροβιακές κοινότητες, η δομή των οποίων εξαρτάται από το φυτό. Σκοπός μας ήταν η διερεύνηση των μηχανισμών που διαμορφώνουν τη μικροβιακή κοινότητα της φυλλόσφαιρας και του εδάφους που βρίσκεται περιμετρικά της ρίζας, και η ταυτοποίηση της απόκρισης τους σε καλλιεργητικές πρακτικές, όπως η χρήση εδαφοβελτιωτικών και οι εφαρμογές γεωργικών φαρμάκων. Εστιάσαμε σε γηγενή φυτά του Μεσογειακού συστήματος, μερικά εκ των οποίων παράγουν αιθέρια έλαια που είναι γνωστά για τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες, και επίσης σε καλλιεργούμενα φυτά.

Αρχικά διερευνήσαμε τους παράγοντες που διαμορφώνουν τη μικροβιακή κοινότητα της φυλλόσφαιρας γηγενών φυτών του ημιάνυδρου Μεσογειακού οικοσυστήματος, χρησιμοποιώντας προσεγγίσεις με q-PCR και amplicon sequencing. Συλλέξαμε φύλλα στις δύο εποχές με τις μεγαλύτερες αντιθέσεις (καλοκαίρι και χειμώνα) από 8 πολυετή φυτά με διαφορετικά χαρακτηριστικά που ανήκουν σε διάφορες λειτουργικές ομάδες: (i) αιθαλή ξυλώδη σκληρόφυλλα, φρύγανα και πόες, (ii) αρωματικά και μη-αρωματικά. Καθορίσαμε την αφθονία των βακτηρίων, Κρεναρχαίων, μυκήτων *Alternaria* και *Cladosporium* (κύριοι αερομεταφερόμενοι μύκητες) μέσω q-PCR, και τη δομή της επιφυτικής κοινότητας των βακτηρίων, αρχαίων και μυκήτων μέσω amplicon sequencing. Παρατηρήσαμε έντονη επίδραση της εποχής, αλλά όχι ξεκάθαρη επίδραση του φυτού-ξενιστή στη μικροβιακή αφθονία: η βακτηριακή αφθονία ήταν υψηλότερη τον χειμώνα, και η αφθονία όλων των υπόλοιπων μικροοργανισμών ήταν αυξημένη το καλοκαίρι.

Φυτό-ξενιστής και εποχή είχαν ίση επίδραση στη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας των βακτηρίων και μυκήτων, ενώ η κοινότητα των αρχαίων καθορίζεται από το φυτό-ξενιστή. Το φυτικό είδος αποτελεί σημαντικότερο παράγοντα διαμόρφωσης των επιφυτικών μικροβιακών κοινοτήτων, σε σχέση με την αρωματική φύση των φυτών, η οποία επηρεάζει μόνο τη μυκητιακή κοινότητα. Η βακτηριακή κοινότητα κυριαρχείται από *Chloroflexi* και α-Πρωτεοβακτήρια το καλοκαίρι και χειμώνα αντίστοιχα, με τα OTUs των *Sphingomonas*, *Rhizobia* και *Methylobacterium* να ευνοούνται τον χειμώνα. Η κοινότητα των αρχαίων κυριαρχείται από Soil Crenarchaeotic Group (SCG) και *Aenigmarchaeota*. Η μυκητιακή κοινότητα αποτελείται κυρίως από *Ascomycota* με *Capnodiales*, *Pleosporaceae* και *Dothioraceae*, να είναι τα μέλη-κλειδιά των οποίων η αφθονία διαφοροποιείται αναλόγως του φυτού-ξενιστή και της εποχής.

Επεκτείναμε τη μελέτη μας και στα αρωματικά φυτά, εξερευνώντας τη χρήση τους ως εδαφοβελτιωτικά. Πραγματοποιήσαμε ένα πείραμα με γλάστρες, ώστε να μελετήσουμε την επίδραση της μέντας (*Menta piperita*), του δυόσμου (*Menta spicata*) και του δενδρολίβανου (*Rosemarinus officinalis*), σε σύγκριση με ένα οργανικό εδαφοβελτιωτικό, στη δυναμική των κύριων βακτηριακών taxa, Κρεναρχαίων, μυκήτων και άλλων λειτουργικών μικροβιακών ομάδων, όπως τα αμμώνια-οξειδωτικά βακτήρια (AOB) και αρχαία (AOA), τα θείο-οξειδωτικά βακτήρια (SOB) και τα *catA*-, *pcaH*- φέροντα βακτήρια, τα οποία εμπλέκονται στον κύκλο του άνθρακα. Επιπλέον διερευνήσαμε πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ

εδαφοβελτιωτικών και παρουσίας του φυτού τομάτας. Η βελτίωση του εδάφους με μέντα, δυόσμο και οργανικό εδαφοβελτιωτικό, αύξησε την αφθονία των Πρωτεοβακτηρίων και μυκήτων. Αντίθετα το δενδρολίβανο, το οποίο έχει χαρακτηριστικό αιθέριο έλαιο με διαφορετική σύσταση σε σχέση με τις μέντες έδρασε ευεργετικά στις κοπιοτροφικές αυτές μικροβιακές ομάδες, μόνο κατά την παρουσία του φυτού της τομάτας. Επιπροσθέτως εξερευνήσαμε τις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μέσω ανάλυσης amplicon sequencing στις μικροβιακές κοινότητες των βακτηρίων, αρχαίων και μυκήτων. Αυτό επιβεβαίωσε τον ρόλο κλειδί του δενδρολίβανου ως εδαφοβελτιωτικού στη σύσταση της βακτηριακής και μυκητιακής κοινότητας καθώς και αυτής των αρχαίων, αλλά και τον ευεργετικό του ρόλο στην αφθονία των Πρωτεοβακτηρίων. Η εφαρμογή του δενδρολίβανου επηρέασε αρνητικά OTUs που ανήκουν στα Ακτινοβακτήρια, τα οποία σχετίζονται κυρίως με ανέγγιχτα εδαφικά συστήματα (π.χ. *Blastococcus*, *Rubrobacter*, *Solirubrobacter*, *Agromyces*), όπως προέκυψε από την πολυπαραγοντική ανάλυση. Αντίθετα παρατηρήθηκε μία εντυπωσιακή κυριαρχία των διασπαστών κυτταρίνης βασιδιομυκήτων *Minimedusa* σε εδάφη εμπλουτισμένα με δενδρολίβανο. Οι γνωστές αντιμικροβιακές ιδιότητες του μύκητα αυτού ίσως να εξηγούν την αρνητική επιρροή του δενδρολίβανου ως εδαφοβελτιωτικού, που παρατηρήθηκε στα *Nectriaceae*.

Τέλος, εξερευνήσαμε την πιθανή επίδραση των γεωργικών φαρμάκων, ως εξωτερικού παράγοντα διαταραχής της αφθονίας και ποικιλότητας των μικροβιακών κοινοτήτων στα φύλλα του φυτού και στο έδαφος στην περιοχή της ρίζας. Εξετάσαμε την υπόθεση ότι αυτά τα δύο ενδιαίτηματα ενώ φέρουν διαφορετικές μικροβιακές κοινότητες, αντιδρούν το ίδιο (επιταχυνόμενη βιοδιάσπαση ή τοξικότητα) στην επαναλαμβανόμενη έκθεση τους στο βιοδιασπώμενο μυκητοκτόνο iprodione. Σε φυτά πιπεριάς εφαρμόστηκαν τέσσερις επαναλαμβανόμενες φυλλικές ή εδαφικές εφαρμογές του iprodione, διαδικασία που επιτάχυνε τη διάσπαση στο έδαφος ($DT_{50_1st}=1.23$ και $DT_{50_4th} = 0.48$ ημέρες) και στα φύλλα ($DT_{50_1st} >365$ και $DT_{50_4th} = 5.95$ ημέρες). Η σύσταση της επιφυτικής και εδαφικής βακτηριακής και μυκητιακής κοινότητας, η οποία καθορίστηκε με amplicon sequencing, άλλαξε στατιστικώς σημαντικά από το iprodione. Η επιφυτική και εδαφική κοινότητα των αρχαίων αντέδρασε διαφορετικά· με το πρώτο να μην αντιδρά στο iprodione. Τρία συγγενικά στελέχη *Paenarthrobacter* που διασπούν το iprodione, απομονώθηκαν από έδαφος και φύλλα. Υδρολύουν το iprodione σε 3,5-dichloraniline (3,5-DCA) μέσω σχηματισμού 3,5-dichlorophenyl-carboxiamide και 3,5-dichlorophenylurea-acetate, ένα μονοπάτι που μοιράζονται με άλλα arthrobacters που έχουν απομονωθεί από το έδαφος, προτείνοντας μία φυλογενετική ειδικευση στη βιομετασχηματισμό του iprodione.

Συνολικά, αποδείξαμε πως η φυλλόσφαιρα είναι ένα ενδιαίτημα που αποικίζεται από διαφορετικά βακτήρια και μύκητες, ενώ η αφθονία και ποικιλομορφία των αρχαίων είναι μειωμένη. Η επιφυτική μικροβιακή κοινότητα των Μεσογειακών φυτών διαμορφώνεται από το φυτό-ξενιστή και την εποχή. Η εφαρμογή αρωματικών φυτών ως εδαφοβελτιωτικού βρέθηκε να διεγείρει τους κοπιοτροφικούς μικροοργανισμούς και αλληλοπαθητικούς εναντίων εδαφογενών φυτοπαθογόνων. Τέλος, αποδείξαμε ότι το επιφυτικό μικροβίωμα, αντιδρά στις εφαρμογές γεωργικών φαρμάκων, με μερικά μικρόβια να εγκλιματίζονται στο να

διασπών γεωργικά φάρμακα. Αυτή η διδακτορική διατριβή ανέφερε το πρώτο επιφυτικό βακτήριο, ένα στέλεχος *Paenarthrobacter*, το οποίο είναι ικανό να διασπά το iprodione και επίσης προτείνει μία μη-κοινή ειδικευση των *Arthrobacter* στη διάσπαση αυτού του μυκητοκτόνου.