



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ & ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**Διδακτορική Διατριβή**

Απομόνωση και ταυτοποίηση ενδοφυτικών ριζοβακτηρίων από φυμάτια καλλιεργούμενων ψυχανθών και αξιολόγηση της βιολογικής δράσης τους στην ανάπτυξη των φυτών

**Ευδοξία Μ. Ευσταθιάδου**

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Αναστασία Ταμπακάκη, Καθηγήτρια ΕΛΜΕΠΑ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Αναστασία Ταμπακάκη, Καθηγήτρια ΕΛΜΕΠΑ

Δημήτριος Σάββας, Καθηγητής ΓΠΑ

Δημήτριος Γεωργακόπουλος, Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ  
2023



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ & ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**Διδακτορική Διατριβή**

Απομόνωση και ταυτοποίηση ενδοφυτικών ριζοβακτηρίων από φυμάτια καλλιεργούμενων ψυχανθών και αξιολόγηση της βιολογικής δράσης τους στην ανάπτυξη των φυτών

Isolation and identification of endophytic rhizobacteria from nodules of cultivated legumes and evaluation of their biological action on plant growth

**Ευδοξία Μ. Ευσταθιάδου**

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Ταμπακάκη Αναστασία, Καθηγήτρια ΕΛΜΕΠΑ (επιβλέπουσα)

Σάββας Δημήτριος, Καθηγητής ΓΠΑ

Γεωργακόπουλος Δημήτριος, Καθηγητής ΓΠΑ

Γεωργία Ντάτση, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

Χατζηπαυλίδης Ιορδάνης, Καθηγητής ΓΠΑ

Ζερβάκης Γιώργος, Καθηγητής ΓΠΑ

Γκούμας Δημήτρης, Καθηγητής ΕΛΜΕΠΑ

## Απομόνωση και ταυτοποίηση ενδοφυτικών ριζοβακτηρίων από φυμάτια καλλιεργούμενων ψυχανθών και αξιολόγηση της βιολογικής δράσης τους στην ανάπτυξη των φυτών

Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παράγωγης  
Εργαστήριο Γενικής & Γεωργικής Μικροβιολογίας

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ριζόβια έχουν ικανότητα αζωτοδέσμευσης και αφομοίωσης του αζώτου κατά τη συμβιωτική σχέση που αναπτύσσουν με ψυχανθή φυτά, στα οποία σχηματίζουν ριζικά φυμάτια. Εκτός από ριζόβια, στα φυμάτια εντοπίζονται επιπλέον μη φυματιογενή ενδοφυτικά ριζοβακτήρια, τα οποία προωθούν την ανάπτυξη των φυτών καθώς και την αντοχή σε αβιοτικές και βιοτικές καταπονήσεις και ορισμένα απ' αυτά έχουν αξιοποιηθεί εμπορικά. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει έντονη ερευνητική δραστηριότητα τόσο για τα ριζόβια όσο και για τα ενδοφυτικά ριζοβακτήρια γιατί αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της βιώσιμης γεωργίας.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή απομονώθηκαν 166 ριζόβια και 38 ενδοφυτικά ριζοβακτήρια από φυμάτια καλλιεργούμενων [κουκί (*Vicia faba*), φασόλι (*Phaseolus vulgaris*, *Phaseoli coccineus*) και άγριων ψυχανθών [φτερωτό μπιζέλι (*Tetragonolobus purpureus*), έβενος (*Ebenus cretica*)], από διαφορετικές περιοχές της ηπειρωτικής και νησιωτικής Ελλάδας. Η μελέτη της γενετικής ετερογένειας των ριζοβίων επέτρεψε τη διάκριση τους σε συνολικά 33 αντιπροσωπευτικά στελέχη ριζοβίων προερχόμενα από το κουκί, τη φασολιά και το φτερωτό μπιζέλι τα οποία μελετήθηκαν περαιτέρω. Η ταυτοποίηση των απομονώσεων σε επίπεδο γένους ή/ και είδους βασίστηκε στη φυλογενετική ανάλυση ευρέως χρησιμοποιούμενων γονιδίων π.χ. 16S rRNA, *recA*, *glnII*, *gyrB*, κ.α. Η ταξινομική θέση των απομονωμένων ριζοβίων σε επίπεδο συμβιότυπου καθορίστηκε από τη φυλογένεια γονιδίων που σχετίζονται με τη συμβίωση, όπως τα γονίδια *nifH* και *nodC*. Τα ριζόβια από το κουκί ταξινομήθηκαν ως *Rhizobium hidalgonense* με τη συντριπτική πλειοψηφία να ανήκουν στα γονιδιωματικά είδη *gsF-2*, *gsB* και *gsA* του *Rhizobium leguminosarum* species complex καθώς και των *Rhizobium laguerreae* και *Rhizobium ruizarguesonis*. Το *Rhizobium* VFEP82 το οποίο είναι φυλογενετικά πλησιέστερο στο *Rhizobium grahamii*, κατά πάσα πιθανότητα ανήκει σε μια νέα γενεαλογική σειρά. Με εξαίρεση την απομόνωση VFEP82 όπου δεν κατέστη εφικτή η ενίσχυση του γονιδίου *nodC*, οι υπόλοιπες απομονώσεις ταξινομήθηκαν στο συμβιότυπο *viciae* και προσδιορίστηκαν τέσσερις απλότυποι του γονιδίου *nodC* (A – D). Ένα σημαντικό εύρημα ήταν ο εντοπισμός του συμβιότυπου *viciae* σε στελέχη *Rhizobium hidalgonense* (VFEP162), καθώς αυτό αναφέρθηκε για πρώτη φορά.

Στην περίπτωση των ριζοβίων της φασολιάς, οι απομονώσεις ταξινομήθηκαν σε καλά καθορισμένα είδη των *Rhizobium redzeponicii*, *Rhizobium hidalgonense*, *Rhizobium anhuiense*, *Rhizobium croatiense*, *Rhizobium sophoriradicis*, *Rhizobium azibense*, *Rhizobium tropici*. Εξαίρεση αποτέλεσε ένα πλήθος ριζοβίων με αντιπροσωπευτικό στέλεχος το PVKV3, που αν και είναι φυλογενετικά πλησιέστερο στο *Rhizobium etli*, κατά πάσα πιθανότητα συνιστά νέα γενεαλογική σειρά. Τα περισσότερα από τα ριζόβια φασολιάς ταξινομήθηκαν στο συμβιότυπο phaseoli και έφεραν τα αλληλόμορφα α-, γ-α και γ-β του γονιδίου *nodC*. Ο συμβιότυπος των υπολοίπων προσδιορίστηκε ως *sv gallicum* και *tropici*. Επιπλέον σημαντικό εύρημα ήταν η καταγραφή στελέχους *Rhizobium sophoriradicis* με αλληλόμορφο γ-β καθώς κάτι τέτοιο δεν έχει αναφερθεί ξανά σε ευρωπαϊκά εδάφη. Τα ριζόβια του φτερωτού μπιζελιού ομαδοποιήθηκαν μαζί με τα *Mesorhizobium ciceri* και εμφάνισαν τον συμβιότυπο *biserrulae*. Επιπλέον, η ταυτοποίηση των μη φυματιογενών ενδοφυτικών ριζοβακτηρίων των φυματίων κατέταξε τις 38 απομονώσεις ως *Enterobacter* sp., *Bacillus* sp., *Ochrobactrum* sp., *Shinella* spp., *Pseudomonas* spp., *Achromobacter* sp., *Microbacterium* spp., *Georgenia* sp., *Kocuria* spp., *Roseomonas* sp., *Sphingomonas* sp. και *Phyllobacterium* sp.

Ο έλεγχος της ικανότητας των ριζοβίων του κουκιού και της φασολιάς να μολύνουν τον ξενιστή από τον οποίο προήλθαν, επιβεβαίωσε ότι είναι πραγματικοί μικροσυμβιώτες για τα φυτά αυτά. Η αξιολόγηση της ικανότητας προώθησης της ανάπτυξης του κουκιού μετά από εμβολιασμό του σπόρου με στελέχη *Rhizobium* έδειξε ότι το στέλεχος VFLE1 συνέβαλε στην αύξηση του μήκους και της ξηρής βιομάζας του βλαστού των φυτών, ενώ ο μέγιστος αριθμός φυματίων παρατηρήθηκε σε φυτά εμβολιασμένα με το VFEP162.

Χαρακτηριστικά γνωρίσματα που σχετίζονται με την προώθηση της ανάπτυξης των φυτών εξετάστηκαν σε αντιπροσωπευτικά στελέχη ριζοβίων κουκιού, φασολιάς και φτερωτού μπιζελιού καθώς και σε επιλεγμένα ενδοφυτικά ριζοβακτήρια *Enterobacter* VFAT314 και *Bacillus* VFFN21 που απομονώθηκαν στην παρούσα διατριβή. Παρόμοια ανάλυση έγινε σε ριζόβια και ενδοφυτικά ριζοβακτήρια που είχαν απομονωθεί σε προγενέστερο χρόνο, όπως τα *Bradyrhizobium* spp (VUCR24, VUEP21, VULI11), *Ensifer* sp. VUKA2, *Enterobacter* spp (C1.2, C1.5, C3.1) και *Lelliottia* sp. D2.4. Όλα τα στελέχη που εξετάστηκαν είχαν ικανότητα διαλυτοποίησης του φωσφόρου και παραγωγής σιδηροφόρων. Ικανότητα παραγωγής αυξίνης καταγράφηκε μόνο στα *Rhizobium*, στα *Bradyrhizobium*, VUCR24 και VULI11, και στο *Enterobacter* sp. VFAT314. Ικανότητα παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ενώσεων καταγράφηκε μόνο στο *Bradyrhizobium* VUEP21 και στο *Bacillus* VFFN21. Η μελέτη της ικανότητας επιβίωσης των επιλεγμένων ριζοβακτηρίων σε αβιοτικές συνθήκες καταπόνησης (θερμοκρασία, αλατότητα pH, υδατική καταπόνηση), έδειξε διαφορετικό αβιοτικό προφίλ ανοχής μεταξύ των

εξεταζομένων γενών. Τα ριζόβια και ο *Bacillus* VFFN21 ήταν τα πιο ευαίσθητα σε αυτές τις καταπονήσεις με διαφοροποιήσεις αναλόγως της εξεταζόμενης βιοδοκιμασίας, ενώ τα *Enterobacter* και η *Lelliottia* D2.4 ξεχώρισαν για την ανοχή τους στις περισσότερες συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης.

Η μελέτη της ανταγωνιστικότητας των εξεταζομένων ριζοβακτηρίων έναντι τεσσάρων φυτοπαθογόνων μυκήτων *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*, *Verticillium dahliae* και 14 βακτηρίων *Pseudomonas syringae* (3), *Dickeya solani*, *Acidovorax citrulli* (3), *Xanthomonas campestris*, *Erwinia amylovora*, *Pectobacterium brasiliense* (2), και *Clavibacter* (3) ανέδειξε τα *Enterobacter*, *Lelliottia* D2.4 και *Bacillus* VFFN21 ως βιολογικούς παράγοντες ελέγχου (Β.Π.Ε.). Από τα ριζόβια μόνο το *Bradyrhizobium* VULI11 εμφάνισε παρεμποδιστική δάση κατά των *Clavibacter*. Τα *Enterobacter*, *Lelliottia* D2.4 και *Bacillus* VFFN21 χρησιμοποιήθηκαν ως εμβολιαστικό υλικό σε μη ψυχανθή φυτά. Η μελέτη προώθησης της ανάπτυξης φυτών τομάτας μετά από εφαρμογή των παραπάνω ενδοφυτικών ριζοβακτηρίων έδειξε ότι φυτά εμβολιασμένα με το στέλεχος D2.4 είχαν μεγαλύτερη νωπή και ξηρή βιομάζα βλαστού και περισσότερη ξηρή βιομάζα ρίζας. Επιπλέον, η δράση του D2.4 ήταν ωφέλιμη στην ανάπτυξη φυτών τομάτας που ήταν μολυσμένα με *Clavibacter* και στο μετριασμό των συμπτωμάτων της ασθένειας. Φυτά εμβολιασμένα με το στέλεχος *Enterobacter* VFAT314 είχαν μεγαλύτερο μήκος, νωπή και ξηρή βιομάζα και ήταν περισσότερο υγιή σε σχέση με τα φυτά που είτε είχαν εμβολιαστεί με τους υπόλοιπους Β.Π.Ε., είτε όχι. Η αξιολόγηση της βιολογικής προστασίας κονδύλων πατάτας και καρότου από το φυτοπαθογόνο *D. solani* IPO 2222 έδειξε ότι η εφαρμογή των παραπάνω Β.Π.Ε. δεν παρεμπόδισε την πρόκληση μαλακής σήψης, παρότι *in vitro* λειτούργησαν ανταγωνιστικά. Η εφαρμογή των Β.Π.Ε. σε φυτά τομάτας και μελιτζάνας για βιολογική προστασία από το φυτοπαθογόνο μύκητα *Botrytis cinerea*, ανέδειξε τα βακτήρια *Enterobacter* C1.5 και το *Enterobacter* C1.2 που λειτούργησαν φυτοπροστατευτικά. Σε φυτά τομάτας και μελιτζάνας εμβολιασμένα με το C1.5 και το C1.2, αντίστοιχα, η θνησιγόνος και μολυσματική δράση του μύκητα ήταν μικρότερη.

Η παρούσα μελέτη συνέβαλε στη δημιουργία συλλογής βιολογικού υλικού με ριζοβακτήρια (ριζόβια και ενδοφυτικά ριζοβακτήρια) που εν δυνάμει προωθούν την ανάπτυξη των φυτών και έχουν φυτοπροστατευτική δράση. Οι μικροοργανισμοί αυτοί θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη βιοδιεγερτών και να εφαρμοστούν μελλοντικά σε συστήματα βιολογικής γεωργίας.

**Επιστημονική Περιοχή:** Γεωργική Μικροβιολογία

**Λέξεις Κλειδιά:** ψυχανθή, ριζοβακτήρια, ταυτοποίηση, προώθηση ανάπτυξης, φυτοπροστασία

## Isolation and identification of endophytic rhizobacteria from nodules of cultivated legumes and evaluation of their biological action on plant growth

Faculty of Crop Science

Laboratory of General & Agricultural Microbiology

### ABSTRACT

Rhizobia have the ability to fix and assimilate nitrogen after establishing symbiotic relationship with leguminous plants, forming root nodules. Apart from rhizobia, nodules harbor non-nodulating endophytic rhizobacteria, which promote plant growth, enhance resistance to abiotic and biotic stresses and some of them have been used commercially. In recent years, there has been intense research activity for both rhizobial and endophytic rhizobacteria because they are an integral part of sustainable agriculture.

In this thesis, 166 rhizobia and 38 endophytic rhizobacteria were isolated from nodules of cultivated [faba bean (*Vicia faba*), bean (*Phaseolus vulgaris*, *Phaseoli coccineus*) and wild endemics legumes [winged pea (*Tetragonolobus purpureus*), ebony (*Ebenus cretica*)], from different regions of Greece. The study of genetic heterogeneity of rhizobia allowed them to be distinguished into a total of 33 representative rhizobia from broad bean, bean and winged pea which were further analysed. The identification of isolates to genus and/or species level was based on phylogenetic analysis of widely used genes e.g. 16S rRNA, *recA*, *glnII*, *gyrB*, etc. The taxonomic position of the isolated rhizobia at the symbiovar level was determined by the phylogeny of symbiotic-related genes such as *nifH* and *nodC*. Rhizobia from faba bean were classified as *Rhizobium hidalgonense* with the vast majority belonging to genospecies gsF-2, gsB and gsA of the *Rhizobium leguminosarum* complex, *Rhizobium laguerreae* and *Rhizobium ruizarguesonis*. *Rhizobium* sp. VFEP82 which is phylogenetically closer to *Rhizobium grahamii*, belongs presumably to a new rhizobial lineage. With the exception of *Rhizobium* VFEP82 where the *nodC* gene was not amplified, the remaining isolates belonged to symbiovar (sv.) viciae harboring four distinct *nodC* gene haplotypes (A – D). An important finding was the identification of sv. viciae symbiotype in *Rhizobium hidalgonense* (VFEP162), which is reported for the first time.

In case of common bean rhizobia, the strains were closely related to *Rhizobium redzepovicii*, *Rhizobium hidalgonense*, *Rhizobium anhuiense*, *Rhizobium croatiense*, *Rhizobium sophoriradicis*, *Rhizobium azibense* and *Rhizobium tropici*. Interesting was the case of rhizobia with the representative strain PVKV3, which is phylogenetically closer to *Rhizobium etli*, but probably belongs to belong to a new rhizobial lineage. Most strains belonged to symbiovar phaseoli carrying the  $\alpha$ -,  $\gamma$ -a and  $\gamma$ -b alleles of *nodC* gene, while some of them belonged to symbiovar

gallicum and tropici. To the best of our knowledge, it is the first time that strains assigned to *R. sophoriradicis* and harbored the  $\gamma$ -b allele were found in European soils. Winged pea rhizobia were grouped together with *Mesorhizobium ciceri* and belonged to symbiovar (sv.) biserrulae. In addition, the identification of non –nodulating endophytic rhizobacteria classified them as *Enterobacter* sp., *Bacillus* sp., *Ochrobactrum* sp, *Shinella* spp, *Pseudomonas* spp, *Achromobacter* sp., *Microbacterium* spp., *Georgenia* sp., *Kocuria* spp., *Roseomonas* sp., *Sphingomonas* sp. and *Phyllobacterium* sp.

Nodulation test between rhizobia isolated from faba bean and common bean and the host of origin, confirmed that they are true microsymbionts for them. The evaluation of the ability to promote the growth of faba bean after inoculation of the seed with *Rhizobium* strains showed that strain VFLE1 contributed to increase in plant shoot length and dry biomass, while the maximum number of nodules was observed in plants inoculated with VFEP162.

Characteristic traits related to plant growth promotion were examined in representative rhizobia strains of faba bean, common bean, winged pea and in the selected endophytic rhizobacteria *Enterobacter* VFAT314 and *Bacillus* VFFN21 which were isolated in this thesis. Similar analysis was performed to examine rhizobia and endophytic rhizobacteria that had been isolated at an earlier time, such as *Bradyrhizobium* spp (VUCR24, VUEP21, VULI11), *Ensifer* sp. VUKA2, *Enterobacter* spp (C1.2, C1.5, C3.1) and *Lelliottia* sp. D2.4. All strains had the ability to solubilize phosphorus and produce siderophore. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* VUCR24, VULI11 and *Enterobacter* VFAT314 were able to produce auxin, while *Bradyrhizobium* VUEP21 and *Bacillus* VFFN21 produced biosurfactant compounds. Testing survival ability of the selected rhizobacteria under extreme growth conditions (temperature, pH salinity, water stress) showed different abiotic tolerance profile between the genera. *Rhizobia* and *Bacillus* VFFN21 were the most sensitive to extreme growth conditions, while *Enterobacter* and *Lelliottia* D2.4 stood out for their tolerance to most stress conditions.

*Enterobacter*, *Lelliottia* D2.4 and *Bacillus* VFFN21 were tested successfully in most cases against four phytopathogenic fungi (*Alternaria alternate*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* f. sp. radicis-cucumerinum, *Verticillium dahlia*) and 14 bacteria [*Pseudomonas syringae* (3), *Dickeya solani*, *Acidovorax citrulli* (3), *Xanthomonas campestris*, *Erwinia amylovora*, *Pectobacterium brasiliense* (2), *Clavibacter* (3)]. For that reason, they were characterized as biological control agents (BCA). From rhizobia, only *Bradyrhizobium* VULI11 showed inhibitory action against *Clavibacter*. *Enterobacter*, *Lelliottia* D2.4 και *Bacillus* VFFN21 were used as inoculants in non-legumes plants. Tomato plants inoculated with D2.4 exhibited greater shoot fresh and dry biomass and more root dry biomass. Moreover, *Lelliottia* D2.4 exhibited plant

growth promotion ability in tomato plants infected with *Clavibacter* and alleviated disease symptoms. Plants inoculated with *Enterobacter* VFAT314 had greater length, fresh and dry biomass, and were healthier compared to plants which either had been inoculated with the rest of BCA, or not. The evaluation of biological protection of potato and carrot pieces from the phytopathogen *D. solani* IPO 2222 showed that the above BCA did not prevent the induction of soft rot, although *in vitro* they exhibited *in vitro* antagonistic activity. Tests aiming to detect biological control efficiency against *Botrytis cinerea* in tomatoes and eggplants revealed that the most effective BCA were *Enterobacter* C1.5 and *Enterobacter* C1.2, reducing the mortality rate and disease severity of infected tomatoes and eggplants, respectively.

The present study contributed to the creation of a collection of biological material with potential rhizobacteria (rhizobial and endophytic rhizobacteria) that promote plant growth and have phytoprotective action. These microorganisms could be used for the development of biostimulants based on BCA which could be applied in the future in organic farming systems.

**Scientific Area:** Agricultural Microbiology

**Keywords:** leguminous plants, rhizobacteria, identification, plant growth promotion, plant protection



*Στην οικογένεια μου....*

*Σα βγεις στον πηγαιμό για την Ιθάκη, να εύχεται να 'ναι μακρύς ο δρόμος,  
γεμάτος περιπέτειες, γεμάτος γνώσεις.....*

Κωνσταντίνος Καβάφης

Μέρος της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής χρηματοδοτήθηκε την περίοδο 1/1/2018-31/12/2018 και 1/1/2019-31/12/2019 από το Ευρωπαϊκό Ερευνητικό Πρόγραμμα «TRUE- TRansition paths to sUstainable legume based systems in Europe» (Horizon 2020, Αριθμός Συμφωνίας Χρηματοδότησης: 727973) και από το «TOMRES, a novel and integrated approach to increase multiple and combined stress tolerance in plants using tomato as a model» (Horizon 2020, Αριθμός Συμφωνίας Χρηματοδότησης: 727929). Επίσης, την περίοδο 10/2019-8/2022, η υποψήφια διδάκτωρ χρηματοδοτήθηκε από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ.) στο πλαίσιο της Δράσης «Υποτροφίες ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ. Υποψηφίων Διδακτόρων» (Αριθμός Υποτροφίας: 957).



## Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας τη διδακτορική μου διατριβή, θα ήθελα να απευθύνω τις ευχαριστίες μου σε όσους συνέβαλαν στην εκπόνηση της, δεδομένου ότι η παρουσία και η υποστήριξη τους ήταν καίρια για την υλοποίηση αυτής της ερευνητικής εργασίας.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου Ταμπακάκη Αναστασία για την ευκαιρία που μου έδωσε να μαθητεύσω στο πλάι της αρχικά ως συμμετέχουσα στα προγράμματα TRUE και TOMRES και στη συνέχεια ως Υποψήφια Διδάκτωρας στο εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής της Σχολής Επιστημών των Φυτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (2018-2021) και στο εργαστήριο Βιολογικών και Βιοτεχνολογικών Εφαρμογών του Τμήματος Γεωπονίας της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Ελληνικού Μεσογειακού Πανεπιστημίου (2021-2022). Επιπλέον, η εμπιστοσύνη του συγκεκριμένου ερευνητικού θέματος από την επιβλέπουσα καθηγήτρια Ταμπακάκη Αναστασία, η καθοδήγηση και η ενθάρρυνση της προς το πρόσωπο μου ήταν καθοριστικής σημασίας για τη διεκδίκηση χρηματοδότησης για τη συγκεκριμένη εργασία από το ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ.. Οι συζητήσεις μου μαζί της ήταν κομβικής σημασίας στην αντιμετώπιση δυσεπίλυτων ζητημάτων και η συμβολή της καταλυτική για την ολοκλήρωση της συγκεκριμένης εργασίας είτε στο πειραματικό είτε στο συγγραφικό μέρος. Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Σάββα Δημήτριο για τη στήριξη που μου πρόσφερε χρηματοδοτώντας μέρος της παρούσας εργασίας μέσω των προγραμμάτων TRUE και TOMRES καθώς και για την ανάπτυξη συνεργασίας με τα μέλη του εργαστηρίου του. Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Γεωργακόπουλο Δημήτριο για τη συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή, καθώς και για την υποστήριξη του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διατριβής.

Επίσης οφείλω να αναφερθώ στην επίκουρη καθηγήτρια Ντάτση Γεωργία, την οποία ευχαριστώ θερμά, καθώς είχε ενεργό ρόλο στην υλοποίηση του προγράμματος TRUE παρέχοντας παράλληλα υποστήριξη όταν χρειαζόταν. Θα ήθελα να ευχαριστήσω εξίσου τον καθηγητή Χατζηπαυλίδη Ιορδάνη και τον καθηγητή Ζερβάκη Γιώργο για το ευχάριστο περιβάλλον και το άρτια εξοπλισμένο εργαστηριακό χώρο που έχουν διαμορφώσει καθώς και για την ενθάρρυνση που μου έχουν προσφέρει κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διατριβής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον καθηγητή Γκούμα Δημήτριο για την πρόσβαση που μου έδωσε στις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας, για τις συμβουλές που μου έδωσε και για τον εμπνευστικό ρόλο του τον τελευταίο χρόνο εκπόνησης της παρούσας διατριβής.

Θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στα άτομα που γνώρισα στο εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, όπως: στην κα. Κεφαλογιάννη Ηώ (ΕΔΙΠ), στην κα. Παπαμελετίου Πόπη (ΕΤΕΠ), στους Κουτρώτσιο Γεώργιο και Μπεκιάρη Γεώργιο (μεταδιδάκτορες) και στους Δασκαλόπουλο Βασίλη και Κορόζη Ευαγγελίνα (υπ. διδάκτορες), Γιαννακοπούλου Μελίνα (κάτοχος μεταπτυχιακού τίτλου). Ένα εξίσου μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στα άτομα που γνώρισα στο εργαστήριο Βιολογικών και Βιοτεχνολογικών Εφαρμογών, όπως: στον κύριο Βερβερίδη Φίλιππο (καθηγητής), στον κύριο Τραντά Εμμανουήλ (επίκουρος καθηγητής), στους Βαβουράκη Κατερίνα, Μέρμηγκα Ρίτα, Ανδρέα Θεοχάρη (μεταδιδάκτορες), στις Μπαλαντινάκη Ευαγγελία, Παγουλάτου Μαριάνθη (τεχνικούς εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας), στην Δελησάββα Μαλαματένια (υπ. Διδάκτωρ), στις Καλαθάκη Σεβαστή και Χειλαδάκη Ιωάννα (κάτοχοι μεταπτυχιακού τίτλου) και στους Μιχάλη και Χρύσα (προπτυχιακούς φοιτητές).

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον πατέρα μου Μιχαήλ, τη μητέρα μου Μαρία και το σύζυγό μου Γεώργιο για την αμέριστη υποστήριξη που μου προσέφεραν μέχρι σήμερα. Ειδικά ευγνώμων νοιώθω απέναντι στους γονείς μου για όλες τις θυσίες που έχουν κάνει συμπλέοντας σε όλα τα στάδια της προσωπικής και εκπαιδευτικής μου πορείας.

## Περιεχόμενα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	20
1.1) Το φυτικό μικροβίωμα .....	21
1.1.1) Το μικροβίωμα των σπόρων .....	22
1.2) Τα ψυχανθή φυτά στη βιώσιμη γεωργία.....	23
1.2.1) Σχηματισμός Φυματίου.....	24
1.2.2) Το μικροβίωμα των φυματίων.....	28
1.2.3) Αποτελεσματικότητα αζωτοδέσμευσης και ανταγωνισμός .....	29
1.3) Μοριακός χαρακτηρισμός βακτηρίων .....	30
1.3.1) Μέθοδοι μελέτης βακτηριακής ετερογένειας .....	30
1.3.2) 16S και Πολυτοπική Ανάλυση Αλληλουχιών .....	32
1.3.3) Μοριακοί δείκτες για μελέτη συμβιωτικών σχέσεων .....	34
1.3.4) Αλληλούχιση επόμενης γενιάς και αλληλούχιση γονιδιώματος .....	35
1.4) Μηχανισμοί Δράσης Ωφέλιμων Ριζοβακτηρίων.....	36
1.4.1) Βιολογική αζωτοδέσμευση .....	37
1.4.2) Διαλυτοποίηση Φωσφόρου .....	39
1.4.3) Διαθεσιμότητα Καλίου .....	41
1.4.4) Παραγωγή σιδηροφόρων.....	42
1.4.5) Παραγωγή φυτοορμονών .....	42
1.4.5.1) Αυξίνη.....	42
1.4.5.2) Κυτοκινίνες και Γιββερελίνες .....	44
1.4.5.3) Αμπισικό οξύ .....	45
1.4.5.4) Αιθυλένιο .....	45
1.4.6) Αντιμικροβιακοί μεταβολίτες .....	47
1.4.6.1) Πτητικές οργανικές ενώσεις (VOCs).....	49
1.4.7) Υδρολυτικά Ένζυμα .....	51
1.4.8) Διασυστημική Ανθεκτικότητα .....	51
1.4.9) Ανοχή σε αβιοτικές καταπονήσεις.....	53
1.4.9.1) Ωσμοπροστασία και Ομοιόσταση ιόντων.....	54
1.4.10) Αντιοξειδωτικά ένζυμα .....	55
1.4.11) Βιοεξυγίανση.....	56
1.4.12) Εξωπολυσακχαρίτες και σχηματισμός βιοϋμενίου .....	56
1.4.13) Αίσθηση απαρτίας (Quorum sensing, QS) .....	60
1.5) Τα μικροβιακά σκευάσματα στη βιολογική γεωργία .....	61

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΡΙΖΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΑΠΟ ΦΥΜΑΤΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΩΝ ΚΑΙ ΑΥΤΟΦΥΩΝ ΨΥΧΑΝΘΩΝ.....	63
2.1) ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	64
2.1.2) Τα ριζόβια του κουκιού.....	64
2.1.3) Τα ριζόβια της φασολιάς.....	67
2.2) ΣΤΟΧΟΙ ΕΡΕΥΝΑΣ .....	70
2.3) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	71
2.3.1) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΡΙΖΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΑΠΟ ΦΥΜΑΤΙΑ ΨΥΧΑΝΘΩΝ ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ.....	71
2.3.1.1) Συλλογή φυματίων.....	71
2.3.1.2) Απομόνωση ριζοβακτηρίων και αποθήκευση βιολογικού υλικού .....	73
2.3.1.3) Διαχωρισμός ριζοβακτηρίων σε ριζόβια και μη ριζόβια ενδοφυτικά βακτήρια ...	74
2.3.2) ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ - ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΡΙΖΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΦΥΜΑΤΙΑ ΨΥΧΑΝΘΩΝ .....	75
2.3.2.1) Απομόνωση γονιδιωματικού DNA .....	76
2.3.2.2) Προσδιορισμός γονιδιωματικού προφίλ.....	77
2.3.2.3) Ενίσχυση γονιδίων και αλληλούχιση .....	77
2.3.2.4) Φυλογενετική ανάλυση γονιδίων .....	78
2.3.3) ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΣΗΜΑΝΣΗ ΡΙΖΟΒΙΩΝ ΜΕ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ.....	82
2.3.3.1) Μετατροπή κυττάρων <i>Escherichia coli</i> ( <i>E.coli</i> ) σε επιδεκτικά (competent cells) ..	82
2.3.3.2) Μετασηματισμός κυττάρων <i>E.coli</i> .....	82
2.3.3.3) Σύζευξη κυττάρων <i>E.coli</i> – ριζοβίων .....	83
2.3.4) <i>in planta</i> ΜΕΛΕΤΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΕΠΙΣΗΜΑΣΜΕΝΩΝ ΡΙΖΟΒΙΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥΣ ΣΤΗ ΦΑΣΟΛΙΑ .....	85
2.3.5) Μελέτη της αποδοτικότητας των ριζοβιακών απομονώσεων κουκιού ως προς το σχηματισμό αζωτοδεσμευτικών φυματίων και την ενίσχυση της ανάπτυξης του ξενιστή απομόνωσης.....	88
2.4) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	91
2.4.1) ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΗΓΕΝΩΝ ΡΙΖΟΒΙΩΝ ΑΠΟ ΦΥΜΑΤΙΑ ΚΟΥΚΙΑΣ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΑ ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ.....	91
2.4.1.1) Απομόνωση και μορφοφυσιολογικός χαρακτηρισμός ριζοβίων από φυτά κουκιού .....	91
2.4.1.2) Μελέτη γενετικής ετερογένειας ριζοβίων κουκιού .....	92
2.4.1.3) Μοριακός χαρακτηρισμός ριζοβίων κουκιού σε επίπεδο είδους .....	95
2.4.1.4) Προσδιορισμός συμβίωσιμου ριζοβίων κουκιού .....	109

2.4.2) ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΡΙΖΟΒΙΩΝ ΦΑΣΟΛΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ..	114
2.4.2.1) Απομόνωση ριζοβίων φασολιάς και μελέτη πολλές ικανότητας ανάπτυξης σε διάφορα θρεπτικά μέσα σε βέλτιστες συνθήκες.....	114
2.4.2.2) Μελέτη γενετικής ετερογένειας ριζοβίων φασολιάς .....	115
2.4.2.3) Μοριακός χαρακτηρισμός ριζοβίων φασολιάς σε επίπεδο είδους.....	118
2.4.2.4) Προσδιορισμός συμβίωτου ριζοβίων φασολιάς.....	128
2.4.3) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΡΙΖΟΒΙΩΝ ΣΤΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΦΥΜΑΤΙΩΝ ΣΕ ΚΟΥΚΙ ΚΑΙ ΦΑΣΟΛΙΑ.....	133
2.4.3.1) Δοκιμή επιβεβαίωσης ταυτότητας (Authentication Test) .....	133
2.4.3.3) Αξιολόγηση της ικανότητας προώθησης της ανάπτυξης του κουκιού μετά από εμβολιασμό του σπόρου με στελέχη <i>Rhizobium</i> .....	138
2.3.4) ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΗΓΕΝΩΝ ΡΙΖΟΒΙΩΝ ΑΠΟ ΦΥΜΑΤΙΑ ΦΤΕΡΩΤΟΥ ΜΠΙΖΕΛΙΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΑ ΑΠΟ ΤΗ ΚΡΗΤΗ .....	144
2.3.4.1) Απομόνωση και μορφοφυσιολογικός χαρακτηρισμός ριζοβίων από φυτά φτερωτού μπιζελιού.....	144
2.3.4.2) Μελέτη γενετικής ετερογένειας ριζοβίων φτερωτού μπιζελιού .....	145
2.3.4.3) Μοριακός χαρακτηρισμός ριζοβίων φτερωτού μπιζελιού σε επίπεδο είδους και συμβίωτου .....	146
2.3.5) ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΓΗΓΕΝΩΝ ΕΝΔΟΦΥΤΙΚΩΝ ΡΙΖΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΦΥΜΑΤΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΩΝ ΚΑΙ ΑΓΡΙΩΝ ΨΥΧΑΝΘΩΝ.....	153
2.3.5.1) Ενδοφυτικά ριζοβακτήρια κουκιού .....	153
2.3.5.1.1) <i>Enterobacter</i> sp. VFAT314 .....	153
2.3.5.1.2) <i>Bacillus</i> sp. VFFN21.....	157
2.3.5.2) Ενδοφυτικά ριζοβακτήρια φασολιάς.....	160
2.3.5.3) Ενδοφυτικά ριζοβακτήρια αυτοφυών ψυχανθών .....	160
ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.....	162
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΡΙΖΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΑΠΟ ΦΥΜΑΤΙΑ ΨΥΧΑΝΘΩΝ .....	186
3.1) ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	187
3.2) ΣΤΟΧΟΙ ΕΡΕΥΝΑΣ .....	189
3.3) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	189
3.3.1) Έλεγχος αντοχής σε υψηλή θερμοκρασία, αλατότητα και οξύτητα/αλκαλικότητα... ..	189
3.3.2) Έλεγχος αντοχής σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης .....	190
3.3.3) Διαλυτοποίηση Φωσφόρου .....	191
3.3.3.1) Ποιοτική εκτίμηση σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα.....	191



3.3.3.2) Ποσοτική εκτίμηση της αλλαγής του pH και του χρώματος σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα.....	193
3.3.4) Παραγωγή σιδηροφόρων.....	193
3.3.4.1) Ποιοτική εκτίμηση σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα.....	193
3.3.4.2) Ποσοτική εκτίμηση σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα .....	194
3.3.5) Παραγωγή ινδολοξικού οξέως (IAA) .....	195
3.3.6) Εφαρμογή μεθόδου ταυτόχρονης διπλής καλλιέργειας (dual culture) μεταξύ βακτηρίου και μύκητα.....	197
3.3.7) Αξιολόγηση της επίδρασης εκκρινόμενων εξωκυτταρικών μεταβολιτών έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων .....	200
3.3.8) Διερεύνηση της αντιβακτηριακής δράσης εφαρμόζοντας την τεχνική της διασταυρούμενης επίστρωσης (cross-streak) και τη μέθοδο διάχυσης δίσκων αντιβακτηριακών ενώσεων σε στερεό θρεπτικό (Agar-(Disk)-Diffusion Method) .....	201
3.3.8.1) Μέθοδος διασταυρούμενης επίστρωσης (cross-streak method) .....	201
3.3.8.2) Μέθοδος διάχυσης αντιβακτηριακών ενώσεων σε στερεό θρεπτικό παρουσία και απουσία χάρτινων δίσκων (Agar-(Disk)-Diffusion Method) .....	202
3.3.9) Αξιολόγηση της επίδρασης εκλυόμενων οργανικών πτητικών ενώσεων (Volatile Organic Compounds, VOCs) ενάντια σε φυτοπαθογόνους μύκητες και βακτήρια .....	204
3.3.10) Υπολογισμός ποσοστού παρεμπόδισης ανάπτυξης του μύκητα από βακτήρια..	205
3.3.11) Ανίχνευση παραγόμενων επιφανειοδραστικών ενώσεων .....	206
3.3.12) Στατιστική ανάλυση .....	206
3.4) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	207
3.4.1) ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΦΥΜΑΤΙΑ ΨΥΧΑΝΘΩΝ ΦΥΤΩΝ ΣΕ ΑΒΙΟΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ .....	207
3.4.1.1) Έλεγχος αντοχής σε διαφορετικές συνθήκες pH, θερμοκρασίας, αλατότητας...	207
3.4.1.2) Έλεγχος αντοχής σε υδατική καταπόνηση.....	213
3.4.2) <i>in vitro</i> ΜΕΛΕΤΗ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΑΓΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΑΠΟ ΡΙΖΟΒΑΚΤΗΡΙΑ .....	217
3.4.2.1) Μελέτη της ικανότητας διαλυτοποίησης φωσφόρου σε θρεπτικό υλικό NBRI-BTB .....	217
3.4.2.2) Μελέτη της ικανότητας παραγωγής σιδηροφόρων .....	228
3.4.3) <i>in vitro</i> ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΡΙΖΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΤΑ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΚΑΙ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ .....	247
3.4.3.1) Διερεύνηση της αντιμυκητιακής δράσης ριζοβίων και ενδοφυτικών ριζοβακτηρίων με την τεχνική της διπλής καλλιέργειας, μέσω πτητικών οργανικών ενώσεων και CFSs	247
3.4.3.2) <i>In vitro</i> ανταγωνιστική δράση ριζοβακτηρίων κατά φυτοπαθογόνων βακτηρίων .....	263

3.4.3.3) Παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ενώσεων από ριζόβια και μη ριζοβιακά ενδοφυτικά ριζοβακτήρια .....	278
ΠΡΟΣΘΕΤΟ ΥΛΙΚΟ .....	280
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΡΙΖΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΗΝ ΠΡΟΩΘΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΕ ΜΗ ΨΥΧΑΝΘΗ ΦΥΤΑ ΚΑΙ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΑΠΟ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ( <i>in planta</i> assays) .....	281
4.1) ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	282
4.2) ΣΤΟΧΟΙ ΕΡΕΥΝΑΣ .....	283
4.3) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	284
4.3.1) Υλικά .....	284
4.3.2) Συνθήκες ανάπτυξης/εκτέλεσης πειραμάτων .....	284
4.3.2.1) Μελέτη της ικανότητας επιλεγμένων ριζοβακτηρίων να προωθούν την ανάπτυξη της τομάτας .....	284
4.3.2.2) Εφαρμογή ριζοβακτηρίων για τη βιολογική προστασία φυταρίων τομάτας και μελιτζάνας από το φυτοπαθογόνο μύκητα <i>Botrytis cinerea</i> .....	285
4.3.2.3) Εφαρμογή ριζοβακτηρίων για τη βιολογική προστασία κονδύλων πατάτας και καρότου από το φυτοπαθογόνο βακτήριο <i>D. solani</i> IPO 2222 <sup>T</sup> .....	286
4.3.2.4) Εφαρμογή ριζοβακτηρίων για τη βιολογική προστασία φυταρίων τομάτας από το φυτοπαθογόνο βακτήριο <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> CFBP 4999 <sup>T</sup> (Cmm) .....	287
4.3.3) Εκτίμηση πορείας ασθένειας .....	288
4.3.4) Στατιστική Ανάλυση .....	288
4.4) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	290
4.4.1) Έλεγχος προώθησης της ανάπτυξης φυτών τομάτας μετά από εφαρμογή ριζοβακτηρίων .....	290
4.4.2) Εφαρμογή ριζοβακτηρίων σε φυτά τομάτας και μελιτζάνας για βιολογική προστασία από το φυτοπαθογόνο μύκητα <i>Botrytis cinerea</i> .....	294
4.4.3) Αξιολόγηση της βιολογικής προστασίας κονδύλων πατάτας και καρότου από το φυτοπαθογόνο <i>D. solani</i> IPO 2222 με τη χρήση ενδοφυτικών ριζοβακτηρίων .....	304
4.4.4) Αξιολόγηση της βιολογικής δράσης επιλεγμένων ενδοφυτικών βακτηρίων σε φυτάρια τομάτας μολυσμένα με <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Cmm) .....	306
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	316
ΠΡΩΤΟΤΥΠΙΑ ΚΑΙ ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ .....	319
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	321
Ελληνόγλωσση Βιβλιογραφία .....	369
Ιστοσελίδες .....	370

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΚΑΙ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΣΕ ΕΘΝΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ .....	370
ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΟ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΕΡΓΟ (ΑΡΘΡΑ) .....	371

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### 1.1) Το φυτικό μικροβίωμα

Οι φυτικοί ιστοί φιλοξενούν μικροβιακές κοινότητες οι οποίες στο σύνολό τους διαμορφώνουν το φυτικό μικροβίωμα που είναι βασικός και καθοριστικός παράγοντας για την υγεία και την παραγωγικότητα των φυτών (Berendsen et al., 2012). Συνεπώς μικροοργανισμοί μπορούν να εντοπιστούν στη ριζόσφαιρα, στη φυλλόσφαιρα (εναέριες επιφάνειες των φυτών) και στην ενδόσφαιρα (εσωτερικοί ιστοί). Όταν οι μικροοργανισμοί βρίσκονται κοντά ή πάνω στο φυτικό ιστό (π.χ. ριζόσφαιρα, φυλλόσφαιρα) αναφέρονται ως επίφυτα. Στη φυλλόσφαιρα, τα επίφυτα δεν παρουσιάζουν ομοιογένεια και επηρεάζονται από τις δομές των φύλλων όπως αγγεία, τρίχες και στομάτια. Το ανώτατο επίπεδο αποικισμού στις επιφάνειες των φύλλων φτάνει τα  $10^7$  μικρόβια ανά  $\text{cm}^2$  (Lindow & Brandl, 2003), με τη φυλλόσφαιρα να αποτελεί φτωχό περιβάλλον σε θρεπτικά συστατικά που υπόκειται σε ακραίες θερμοκρασίες, ακτινοβολία και υγρασία (Vorholt, 2012). Στη ριζόσφαιρα, οι ρίζες των φυτών παρέχουν στα βακτήρια άνθρακα αλλά και επιφάνειες για να μπορέσουν να προσκολληθούν (Calvert et al., 1984). Πολλά από τα βακτήρια που εντοπίζονται έχουν ικανότητα προώθησης της φυτικής ανάπτυξης και είναι κυρίως αζωτοδεσμευτικά. Στα αζωτοδεσμευτικά συμπεριλαμβάνονται βακτήρια που ζουν ελεύθερα (π.χ. *Azotobacter*) και συμβιωτικά (π.χ. *Rhizobium* spp.).

Όταν οι μικροοργανισμοί εντοπίζονται εσωτερικά στους φυτικούς ιστούς (π.χ. φύλλα, ρίζες, μίσχους, σπόρους) αναφέρονται ως ενδοφυτικοί. Οι μικροοργανισμοί αυτοί θεωρούνται ως μη παθογόνα, συμπεριλαμβάνοντας όμως λανθάνοντα παθογόνα που, ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες ή/και τον γονότυπο του ξενιστή, μπορούν να προκαλέσουν ασθένεια (James & Olivares, 1998; Monteiro et al., 2012). Τα ενδόφυτα αν και πιστεύεται ότι είναι ένας υποπληθυσμός του μικροβιώματος της ριζόσφαιρας (Compant et al., 2010), έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά, υποδηλώνοντας ότι δεν μπορούν όλα τα ριζοσφαιρικά βακτήρια να εισέλθουν στα φυτά ή/και ότι όταν εισέλθουν στο φυτό ξενιστή αλλάζουν το μεταβολισμό τους και προσαρμόζονται στο εσωτερικό περιβάλλον του φυτού (Monteiro et al., 2012; Sessitsch et al., 2012; de Santi Ferrara et al., 2012). Τα ενδόφυτα εισέρχονται εντός του φυτού είτε μέσω των πλευρικών συνδέσεων των ριζών, είτε μέσω φυσικών ρωγμών, είτε μέσω της σύνθεσης ενζύμων αποικοδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος, τα οποία όμως παράγονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις από αυτές των φυτοπαθογόνων (James & Olivares, 1998; James et al., 2002; Reinhold-Hurek & Hurek, 2011; Monteiro et al., 2012).

Ο αριθμός των βακτηρίων που εισέρχεται στις ρίζες φαίνεται ότι είναι ελεγχόμενος ( $10^7$  έως  $10^8$  cfu ανά γραμμάριο φρέσκου βάρους) και συχνά είναι αρκετά χαμηλός ( $10^3$  cfu ανά γραμμάριο νωπού βάρους) ανάλογα με την ηλικία και το γονότυπο του φυτού (James et al., 2002). Το φυτικό μικροβίωμα επηρεάζεται έντονα από το γονιδίωμα του φυτού και μπορεί να

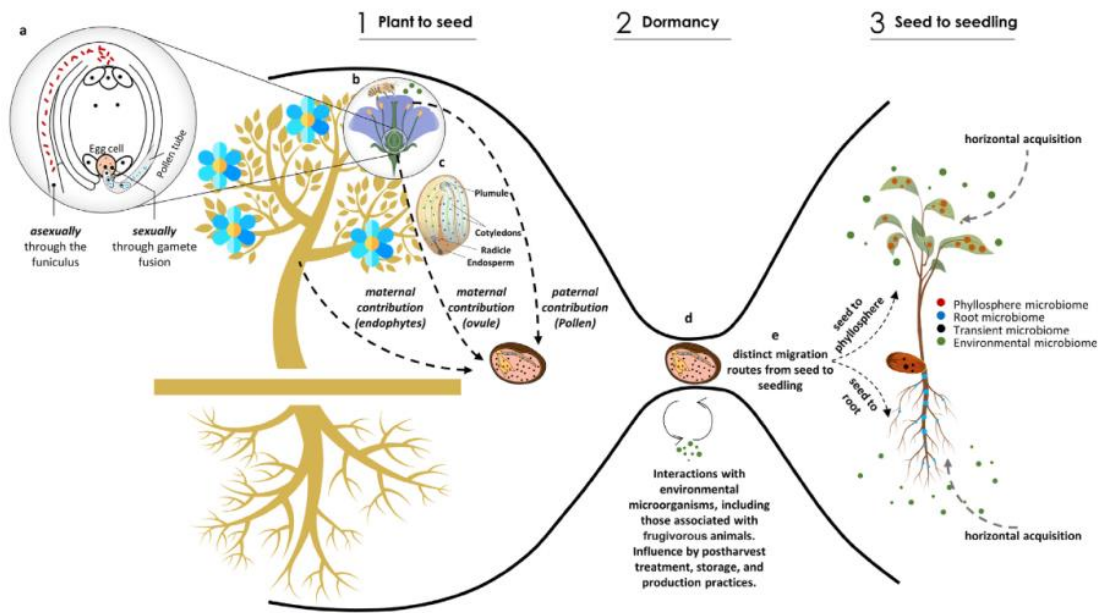
θεωρηθεί ως επέκταση του για το σχηματισμό ενός δεύτερου γονιδιώματος ή του πανγονιδιώματος (Turner et al., 2013). Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτού-μικροβιώματος είναι εξαιρετικά περίπλοκες και δυναμικές. Στον προσδιορισμό της δομής του μικροβιώματος των φυτών θεωρείται ότι παίζει βασικό ρόλο το ανοσοποιητικό σύστημα των φυτών (Turner et al., 2013).

### **1.1.1) Το μικροβίωμα των σπόρων**

Μέρος του φυτικού μικροβιώματος υψίστης σημασίας είναι και το μικροβίωμα του σπόρου, το οποίο είναι ξεχωριστό και παίζει μοναδικό ρόλο συνδέοντας τη μια γενιά σπερματοφύτων με την επόμενη. Η διαδικασία της μικροβιακής κληρονομικότητας των ενδόφυτων έχει προταθεί ότι σχετίζεται με την κάθετη μετάδοση και την επακόλουθη μετακίνηση μικροοργανισμών από το σπόρο στο νέο φυτό. Η συγκρότηση του μικροβιώματος του σπόρου είναι αποτέλεσμα μιας κληρονομικής διαδικασίας τριών σταδίων (φύτευση του σπόρου, σπόρος σε λήθαργο, μετάβαση από το σπόρο στο σπορόφυτο) (Abdelfattah et al., 2022). Η κάθετη μετάδοση είναι ένας άμεσος τρόπος κληρονομικότητας και αποκλείει την οριζόντια μεταφορά μικροοργανισμών, μέσω της οποίας οι μικροοργανισμοί του γύρω περιβάλλοντος και όσοι δεν είναι του φυτού ξενιστή μπορούν να αποικίσουν τους φυτικούς ιστούς (Bright & Bulgheresi, 2010). Ωστόσο, κατά τη διάρκεια του τρίτου σταδίου πέρα από την κάθετη μεταφορά λαμβάνεται υπόψη και η απόκτηση μικροοργανισμών μέσω οριζόντιας μεταφοράς. Κατά την προβλάστηση του σπόρου εκκρίνονται φυτικοί πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες που δρουν ως μόρια σηματοδότησης, τα οποία αναμένεται να προσελκύσουν ορισμένους μικροοργανισμούς του εδάφους που στη συνέχεια αποικίζουν το σπορόφυτο (van Dijk & Nelson, 2000; Nelson, 2004).

Για τη διασφάλιση της συνέχειας του μικροβιώματος του φυτού στις επόμενες γενιές φυτών, ζωτικής σημασίας είναι η διατήρηση ενός υποσυνόλου της μικροβιακής κοινότητας (Abdelfattah et al., 2021), χωρίς να είναι γνωστοί οι παράγοντες που κάνουν διάκριση μεταξύ των προσωρινών και μόνιμων μικροοργανισμών, με το μόνιμο να πιστεύεται ότι είναι βασικός καθοριστικός παράγοντας στη διαμόρφωση της κοινοτικής δομής στο σπορόφυτο με πρωτεύοντες επιπτώσεις προτεραιότητας έναντι των περιβαλλοντικών μικροβίων (Shade et al., 2017). Η απόκτηση μικροοργανισμών μέσω κάθετης διαδικασίας είναι διαφορετική από εκείνη της οριζόντιας μεταφοράς και η διαφοροποίηση αυτή είναι σημαντική. Δεδομένου ότι οι σπόροι είναι το πιο πρόσφατο φυτικό όργανο, πιθανότατα εξακολουθούν να φιλοξενούν μικροοργανισμούς που είτε είναι άγνωστοι είτε προσφέρουν νέες λειτουργίες (Abdelfattah et al., 2022).

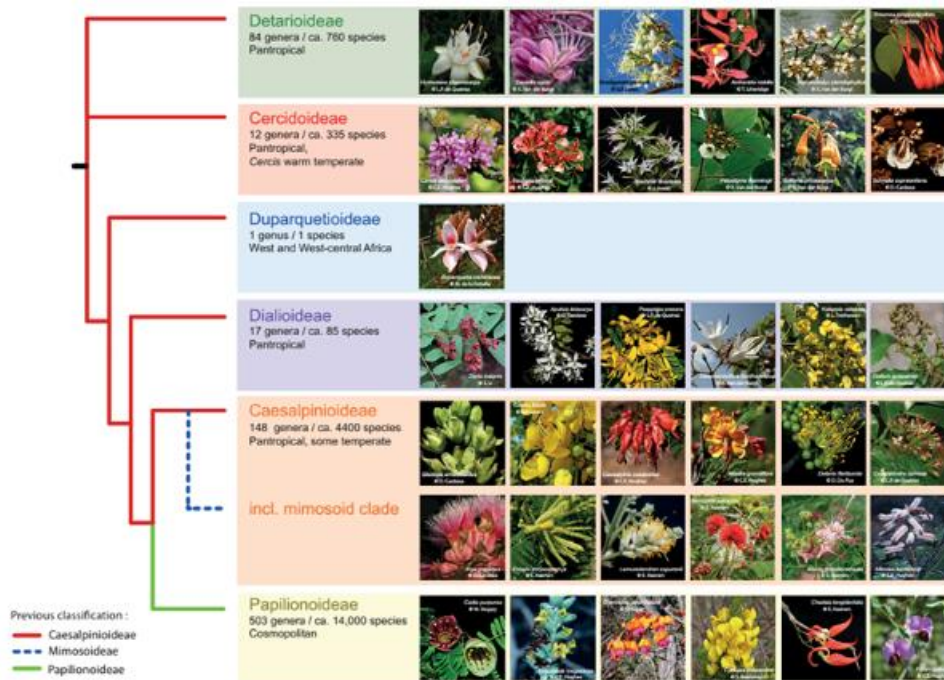
## Microbial inheritance in plants



**Εικόνα 1.1:** Διαδικασία μικροβιακής κληρονομικότητας τριών σταδίων. Το πρώτο στάδιο δέχεται την επίδραση των μικροοργανισμών του περιβάλλοντος και των επικονιαστών στο μικροβίωμα λουλουδιών και σπόρου. Στο στάδιο αυτό γίνεται επίσης η διαμόρφωση και η κατανομή εντός του μικροβιώματος του σπόρου από την εμβρυογένεση μέχρι την ωρίμανση του σπόρου (a- c). Στο δεύτερο στάδιο, το μικροβίωμα του σπόρου αλληλεπιδρά με τους μικροοργανισμούς του περιβάλλοντος κατά τη διάρκεια που βρίσκεται σε λήθαργο (d). Στο τρίτο στάδιο, οι μικροοργανισμοί του σπόρου κατευθύνονται προς τη φυλλόσφαιρα του δενδρυλλίου και τις ρίζες, ενώ μέρος του μικροβιώματος δεν μεταναστεύει έξω από το σπόρο (e). Στη διαμόρφωση του φυτικού μικροβιώματος ρόλο παίζει και η οριζόντια μεταφορά με το δενδρίλιο να αποικίζεται από το περιβαλλοντικό μικροβίωμα, μια διαδικασία που δεν αποτελεί μέρος της μικροβιακής κληρονομικότητας (Abdelfattah et al., 2022).

### 1.2) Τα ψυχανθή φυτά στη βιώσιμη γεωργία

Τα ψυχανθή ανήκουν στην οικογένεια (*Fabaceae-Leguminosae*), αποτελούν μια αξιόλογη ομάδα κηπευτικών τα οποία καλλιεργούνται σε όλο τον κόσμο, καθώς και στην Ελλάδα. Σε αυτά περιλαμβάνονται φυτά τόσο θερμής εποχής (καλλιεργούνται άνοιξη-καλοκαίρι-φθινόπωρο) π.χ. φασολιά, όσο και ψυχρής εποχής (καλλιεργούνται φθινόπωρο-χειμώνα-άνοιξη), π.χ. κουκί (Ολύμπιος, 2019). Πολλά μέλη της οικογένειας *Fabaceae* έχουν οικολογική και οικονομική σημασία, η οποία οφείλεται εν μέρει στην ικανότητά τους να σχηματίζουν συμβιωτικές σχέσεις με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια (Doyle & Luckow, 2003). Η μόλυνση ριζών ψυχανθών με ριζόβια οδηγεί στο σχηματισμό ριζικών φυματίων, στα οποία τα βακτήρια δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό άζωτο ( $N_2$ ). Τα ψυχανθή εμφανίστηκαν πριν από περίπου εξήντα εκατομμύρια χρόνια (Lavin et al., 2005) με τα περισσότερα είδη κάθε υποοικογένειας να στερούνται της ικανότητας σχηματισμού συμβιωτικού ριζικού φυματίου (Griesmann et al., 2018).



**Εικόνα 1.2:** Ταξινόμηση των ψυχανθών (*Leguminosae*) σε έξι υποοικογένειες ([http://english.kib.cas.cn/rh/rp/201703/t20170306\\_174599.html](http://english.kib.cas.cn/rh/rp/201703/t20170306_174599.html))(Lewis & Castellanos, 2019).

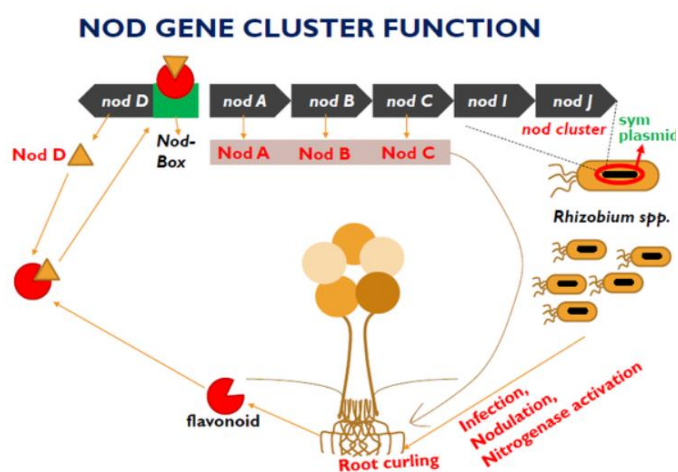
Στα ψυχανθή η παρουσία του φυματίου είναι πολύ κοινή στα *Papilionoideae*, λιγότερο κοινή στα *Mimosoideae* και σπάνια στα *Caesalpinioideae*, με την παραπάνω σειρά να συμφωνεί με την εξέλιξη της φυλογένειας τους (Allen & Allen, 1981). Το άζωτο που δεσμεύεται ετησίως στα ριζικά φυμάτια έχει υπολογιστεί ότι συνιστά το ένα τέταρτο περίπου του συνολικά δεσμευμένου  $N_2$  στη Γη. Η σημασία του είναι τεράστια καθώς αυξάνει την περιεκτικότητα του εδάφους σε δεσμευμένο άζωτο. Ψυχανθή τα οποία φέρουν φυμάτια μπορούν να αναπτυχθούν καλά ακόμη και σε εδάφη χωρίς λίπανση ή φτωχά σε άζωτο, όταν άλλα φυτά δε μπορούν (Madigan et al., 2014). Επομένως, τα ψυχανθή είναι απαραίτητο συστατικό του επίγειου κύκλου του αζώτου και χρησιμοποιούνται για τη διατήρηση της λειτουργίας του οικοσυστήματος (Hirsch, 2002).

### 1.2.1) Σχηματισμός Φυματίου

Στα ψυχανθή φυτά η ζωντανή απόδειξη της αλληλεπίδρασης του φυτού ξενιστή με συμβιωτικούς μικροοργανισμούς είναι το ριζικό φυμάτιο. Η συμβιωτική αλληλεπίδραση ξεκινά με την αμοιβαία ανταλλαγή σημάτων μεταξύ του φυτού και των ριζοβίων, μιας ειδικής κατηγορίας συμβατών βακτηρίων. Για την επίτευξη της διαδικασίας της μόλυνσης, αρωματικές ενώσεις (κυρίως φλαβονοειδή) εκκρίνονται από τα φυτά στη ριζόσφαιρα και ενεργοποιούν την έκφραση των γονιδίων σχηματισμού φυματίων (*nod genes*). Στα ριζόβια, μέσω της ρυθμιστικής βακτηριακής πρωτεΐνης NodD, ενεργοποιείται η μεταγραφή για τη σύνθεση των παραγόντων Nod (Oldroyd, 2013), οι οποίοι είναι λιπολιγυσακχαριτιδικής φύσεως και κωδικοποιούνται



από τα γονίδια *nodABC* (Jones et al., 2007). Μέσω χημειοτακτισμού, τα βακτήρια κινούνται, οδηγούμενα από τις εκκρίσεις των ριζών των φυτών και προσδένονται σε εκφυόμενα ριζίδια της κύριας ρίζας (Gage, 2004). Οι παράγοντες Nod με τη σειρά τους αναγνωρίζονται από τα επιδερμικά φυτικά κύτταρα. Το φάσμα των φλαβονοειδών που εκκρίνεται από ένα ψυχανθές, καθώς και οι ειδικές για το στέλεχος χημικές δομές των παραγόντων Nod, είναι πρωταρχικοί καθοριστικοί παράγοντες της ειδικότητας του ξενιστή (Broughton et al., 2000). Πρόσθετα βακτηριακά συστατικά όπως εξωπολυσακχαρίτες, και συστατικά του εκκριτικού συστήματος τύπου III και IV απαιτούνται επίσης για να είναι αποτελεσματική η μόλυνση (Perret et al., 2000; Saeki, 2011).



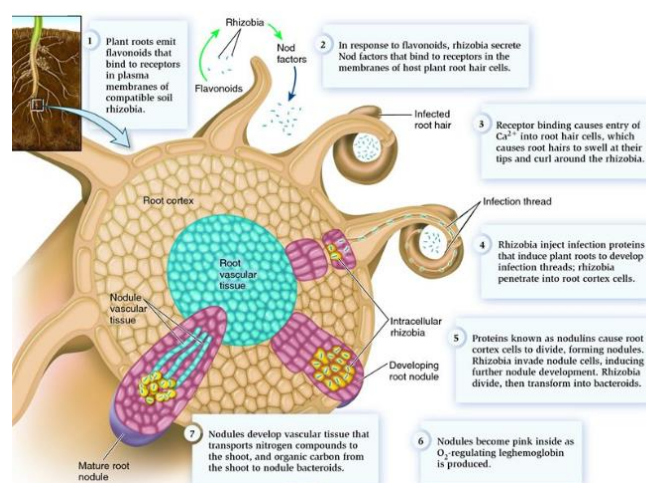
**Εικόνα 1.3:** Ενεργοποίηση της ομάδας των γονιδίων *nod* για έναρξη της συμβιωτικής αλληλεπίδρασης φυτού-ριζοβίων (<https://exama2z.in/nod-factor-root-nodulation-and-nitrogen-fixation/>).

Η μεταγωγή σήματος μέσω των παραγόντων NOD χρησιμοποιεί την οδό σηματοδότησης ασβεστίου, η οποία περιλαμβάνει την ενεργοποίηση πρωτεϊνικής κινάσης (η οποία εξαρτάται από το ασβέστιο και την καλμοδουλίνη) και την επακόλουθη επαγωγή γονιδιακής έκφρασης με αποτέλεσμα την αναδιάταξη του κυτταροσκελετού των ριζικών τριχιδίων και την έναρξη βακτηριακής μόλυνσης στην επιδερμίδα. Με την παραμόρφωση των τριχιδίων της ρίζας (Limpens et al., 2003; Madsen et al., 2003), ριζόβια παγιδεύονται και εισέρχονται στο ριζικό τριχίδιο μέσω σωληνοειδούς δομής που ονομάζεται μολυσματικό νημάτιο, το οποίο περιβάλλεται από μια μεμβράνη κυτταρίνης (Heinz, 1988). Τις περισσότερες φορές, στα ριζικά τριχίδια εισέρχεται μόνο ένα είδος βακτηρίου, αλλά περιστασιακά, μπορεί να εισέλθουν περισσότερα είδη βακτηρίων οδηγώντας σε διπλά κατελιημμένα φυμάτια (Gage, 2002).

Ταυτόχρονα, οι παράγοντες Nod προκαλούν διαίρεση των κυττάρων του φλοιού της ρίζας, που στη συνέχεια διαφοροποιούνται σε αζωτοδεσμευτικά φυμάτια (Crespi & Frugier, 2008; Oldroyd et al., 2011). Τα αναπτυσσόμενα μολυσματικά νημάτια διασχίζουν την επιδερμίδα και το φλοιό της ρίζας, διεισδύουν στα αρχέγονα κύτταρα και στη συνέχεια τα εισβάλλοντα βακτήρια απελευθερώνονται στα κύτταρα-ξενιστές μέσω ενός μηχανισμού που μοιάζει με ενδοκύτωση (Ivanov et al., 2010). Τα εισβάλλοντα βακτήρια περιβάλλονται από μια φυτική

κυτταρική μεμβράνη, την περιβακτηριδιακή μεμβράνη, η οποία σχηματίζει μια δομή που μοιάζει με οργανίδια και ονομάζεται συμβιόσωμα, εντός του οποίου τα βακτήρια διαφοροποιούνται σε αζωτοδεσμευτικά βακτηριοειδή (Heldt, 1999). Εν τέλει τα συμβιοσώματα γεμίζουν πλήρως το κυτταρόπλασμα των μολυσμένων κυττάρων. Παράλληλα τα βακτήρια του συμβιοσώματος διαφοροποιούνται και τα μολυσμένα κύτταρα υφίστανται μεγέθυνση. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη διεξαγωγή επαναλαμβανόμενων κύκλων ενδοδιπλασιασμού (δηλαδή γονιδιωματικού αναδιπλασιασμού του DNA χωρίς μίτωση ή κυτταροκίνηση) οδηγεί στη δημιουργία μεγάλων πολυπλοειδικών κυττάρων που φιλοξενούν χιλιάδες βακτηριοειδή (Kondorosi et al., 2000; Jones et al., 2007).

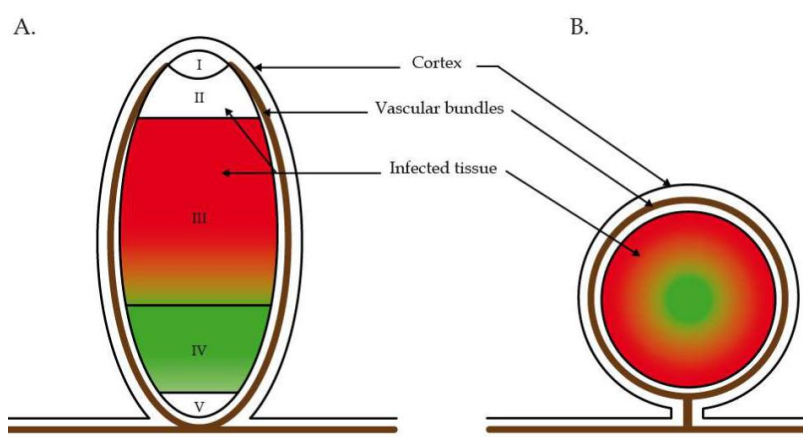
Η φυματιογένεση συνοδεύεται από σημαντικές αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων των φυτών (El Yahyaoui et al., 2004; Benedito et al., 2008). Τα γονίδια που εκφράζονται αποκλειστικά ή ρυθμίζονται έντονα στα φυμάτια ονομάζονται «νοντουλίνες» και στο πρώιμο στάδιο σχετίζονται με τη μεταγωγή σήματος για την ανάπτυξη των φυματίων και κατά το ώριμο στάδιο για τη διαδικασία αζωτοδέσμευσης.



**Εικόνα 1.4:** Μηχανισμός σχηματισμού φυματίου επτά σταδίων: Σύνδεση φλαβονοειδών με υποδοχείς στις πλασματικές μεμβράνες ριζοβίων (στάδιο 1). Ενεργοποίηση των μικροβιακής προέλευσης-παραγόντων Nod και μόλυνση του φυτικού ιστού μέσω των ριζικών τριχιδίων (στάδιο 2). Μεταγωγή σήματος και πρόκληση παραμόρφωσης των ριζικών τριχιδίων (στάδιο 3). Σχηματισμός νημάτιου μόλυνσης και εγκατάσταση των ριζοβίων στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων του φλοιού, περιβαλλόμενα από τη μεμβράνη του ξενιστή (στάδιο 4). Ανάπτυξη ώριμου φυματίου και διαφοροποίηση ριζοβίων σε βακτηριοειδή (στάδιο 5). Παραγωγή αιμογλοβίνης των ψυχανθών και αζωτοδέσμευση (στάδιο 6). Σχηματισμός αγγειακού ιστού για τη μετακίνηση του αζώτου σε όλο το φυτό μέσω του αγγειακού συστήματος της ρίζας και της τροφοδότησης των βακτηριοδών με οργανικά θρεπτικά στοιχεία από το φυτό στο φυμάτιο (<https://biology-forums.com/index.php?action=gallery;sa=view;id=1011>).

Τα φυμάτια ανάλογα με τον τρόπο ανάπτυξής τους ταξινομούνται σε δύο κύριες ομάδες (Yang & Bisseling, 1992; Maunoury et al., 2008) (**Εικόνα 1.5**). Στην πρώτη ομάδα, ψυχανθή όπως το *Medicago truncatula*, το *Pisum sativum* (μπιζέλι) ή το *Trifolium* (τριφύλλι) σχηματίζουν μη καθορισμένα φυμάτια που επιμηκύνονται για να γίνουν κυλινδρικά. Όριμα

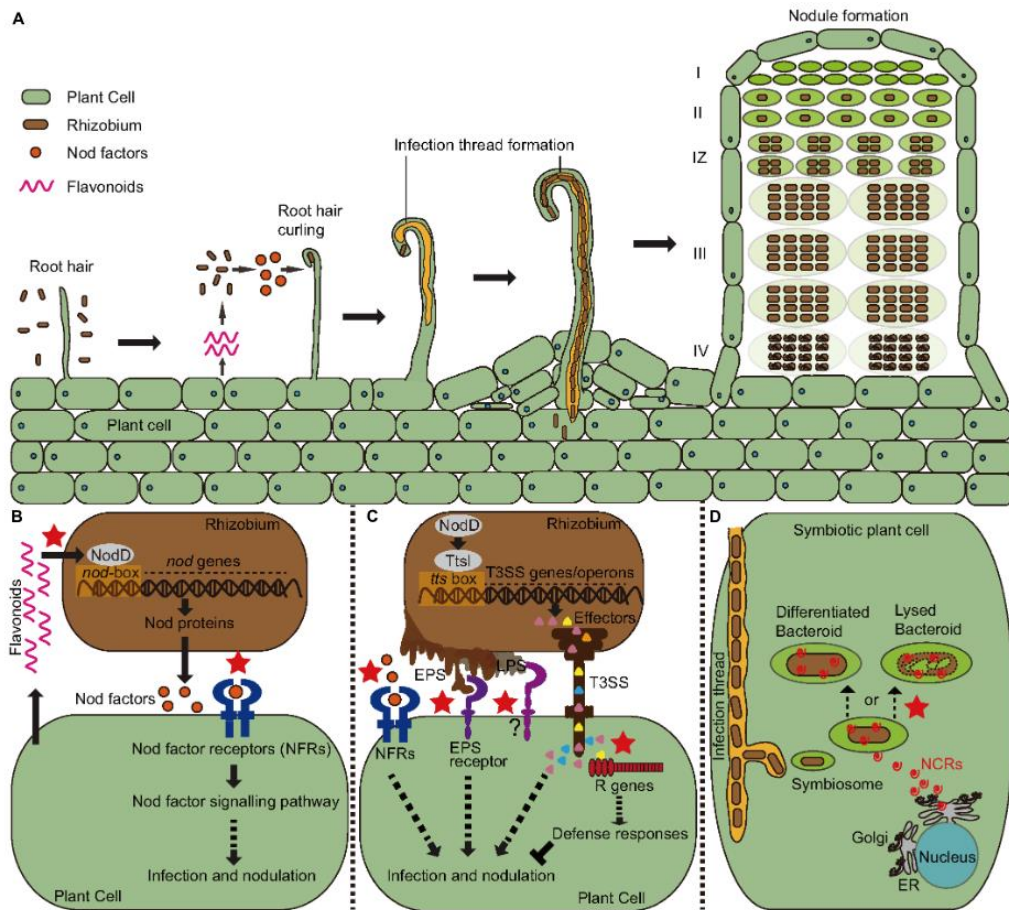
φυμάτια αυτού του τύπου, εμφανίζουν αρκετές διακριτές ιστολογικές ζώνες κατά το πέρασμα των διαδοχικών αναπτυξιακών φάσεων (Vasse et al., 1990). Στη ζώνη I εντοπίζεται το κορυφαίο μερίστωμα που είναι απαλλαγμένο από βακτήρια. Η ζώνη II είναι η ζώνη μόλυνσης στην οποία τα μεταμιτωτικά κύτταρα εισέρχονται στο πρόγραμμα διαφοροποίησης των φυματίων. Στη ζώνη αυτή, το μολυσματικό νημάτιο διεισδύει στα φυτικά κύτταρα και απελευθερώνει ριζόβια. Στη ζώνη III, τα βακτηριοειδή είναι σε θέση να αζωτοδεσμεύουν. Σε γηρασμένα φυμάτια, έχει παρατηρηθεί κοντά στη ρίζα η ζώνη IV, όπου τα βακτηριοειδή μαζί με τα φυτικά κύτταρα, αποικοδομούνται. Με τη γήρανση, η ζώνη αυτή σταδιακά επεκτείνεται και φτάνει στο κορυφαίο τμήμα οδηγώντας το φυμάτιο σε εκφυλισμό. Κοντά στη ζώνη IV βρίσκεται μια επιπλέον περιοχή, η ζώνη V, που περιέχει αδιαφοροποίητα βακτήρια, τα οποία φαίνεται να πολλαπλασιάζονται στον αποσυντιθέμενο φυτικό ιστό (Timmers et al., 2000).



**Εικόνα 1.5:** Σχηματική αναπαράσταση μη καθορισμένων (A) και καθορισμένων ώριμων φυματίων (B). Όπου: I η ζώνη μεριστώματος, II η ζώνη μόλυνσης, III η ζώνη δέσμευσης αζώτου, IV η ζώνη γήρανσης και V η σαπροφυτική ζώνη (Dupont et al., 2012).

Αντίθετα, στη δεύτερη ομάδα ψυχανθή όπως το *Phaseolus vulgaris* (φασόλι), το *Lotus japonicus* ή το *Glycine max* (σόγια) σχηματίζουν καθορισμένα με σφαιρικό σχήμα φυμάτια. Τα ώριμα φυμάτια περιέχουν έναν ομοιογενή κεντρικό ιστό που αποτελείται από μολυσμένα κύτταρα πλήρως κατελημμένα με αζωτοδεσμευτικά βακτηριοειδή και μερικά μη μολυσμένα κύτταρα. Σε αυτά τα φυμάτια, η γήρανση εμφανίζεται ακτινωτά, ξεκινώντας από το κέντρο προς την περιφέρεια. Φυμάτια γηρασμένα σε στάδιο αποσύνθεσης, απελευθερώνουν βακτηριοειδή, τα περισσότερα από τα οποία μπορούν να επιστρέψουν σε έναν ελεύθερο τρόπο ζωής. Σε αντίθεση με τα βακτηριοειδή των στενά καθορισμένων φυματίων, τα απροσδιόριστα φυμάτια έχουν χάσει την ικανότητα αναπαραγωγής. Έτσι, στο τέλος της

συμβίωσης, τα βακτήρια που απελευθερώνονται από το μολυσματικό νημάτιο μπορούν να επιστρέψουν σε έναν ελεύθερο τρόπο ζωής και να αποικίσουν εκ νέου τη ριζόσφαιρα (Mergaert et al., 2006).

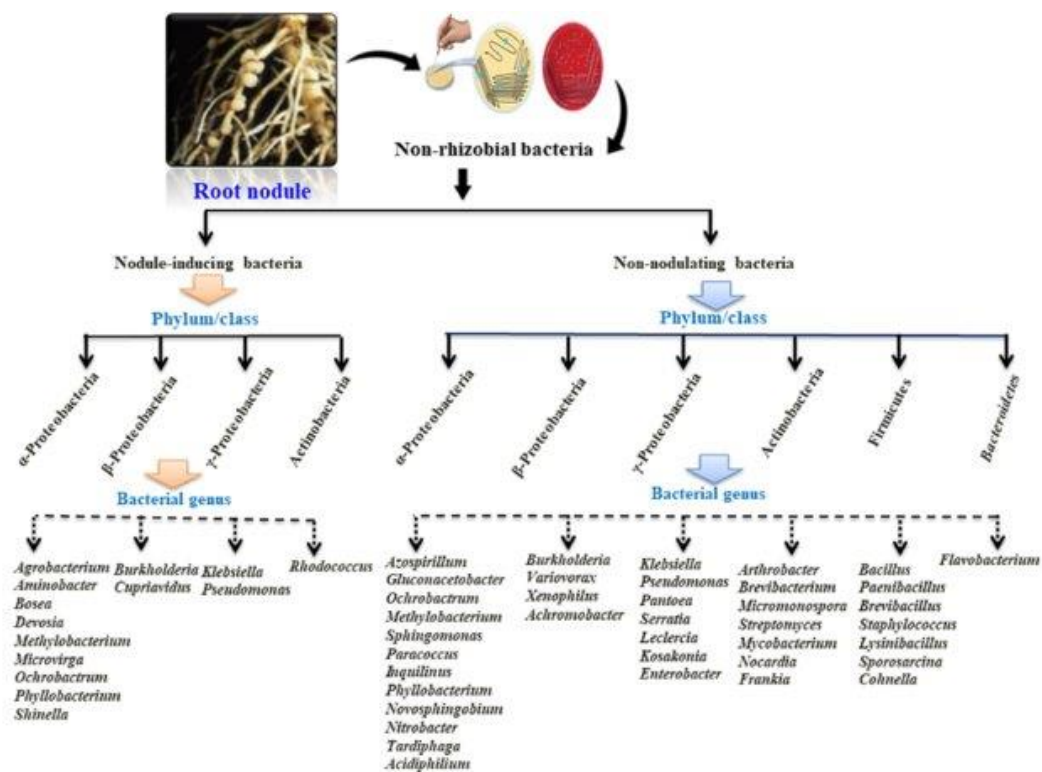


**Εικόνα 1.6:** Συνολική σχηματική παρουσίαση της σηματοδότησης για συμβίωση και ανοσία σε φυτά, διεργασίες που εμπλέκονται στην εξειδικευμένη αναγνώριση της αλληλεπίδρασης ψυχανθών-ριζοβίων (κόκκινα αστέρια): (A) Διαδικασία μόλυνσης, ανάπτυξης φυματίων και παρουσίαση ενός ώριμου απροσδιόριστου τύπου φυματίου που εμφανίζει τις ζώνες I,II,IZ, III, IV. (B) Έκκριση φλαβονοειδών από τον ξενιστή, έκφραση βακτηριακών γονιδίων *nod* μέσω της ενεργοποίησης των πρωτεϊνών NodD, σύνθεση των παραγόντων Nod και αναγνώριση από τους αντίστοιχους υποδοχείς. (C) Παραγωγή βακτηριακών εξωπολυσακχαριτών (EPS) και τελεστών τύπου III για τη διευκόλυνση της μόλυνσης κατά τη συμβιωτική αλληλεπίδραση. (D) Κωδικοποίηση ειδικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων πλούσιων σε κυστεΐνη (NCR) από ψυχανθή όπως το *Medicago* που οδηγούν τους βακτηριακούς εταίρους τους στην τελική διαφοροποίηση που απαιτείται για τη δέσμευση του αζώτου. Ωστόσο, ορισμένα ριζοβιακά στελέχη δε μπορούν να επιβιώσουν από την αντιβακτηριακή δράση ορισμένων ισομορφών πεπτιδίων, οδηγώντας σε σχηματισμό φυματίων που στερούνται αζωτοδεσμευτικής δράσης (Wang et al., 2018).

### 1.2.2) Το μικροβίωμα των φυματίων

Το φυμάτιο αποτελεί οικολογικό ενδιαίτημα για την απομόνωση όχι μόνο ριζοβίων αλλά και μη ριζοβιακών βακτηρίων με βιοτεχνολογικές δυνατότητες στη γεωργία, τα οποία ανήκουν κυρίως στα γένη *Bacillus*, *Enterobacter*, *Agrobacterium*, *Acinetobacter*, *Paenibacillus*, *Pantoea*,

*Mycobacterium*, *Micromonospora*, *Pseudomonas* (Zakhia et al., 2006; Kan et al., 2007; Martínez-Hidalgo & Hirsch, 2017; Deng et al., 2020). Η είσοδος των ενδοφυτικών αυτών βακτηρίων εντός των φυματίων μπορεί να συμβεί σε συνδυασμό με τα ριζόβια κατά τη διάρκεια της μόλυνσης του φυτικού ιστού (Deng et al., 2011). Η αλληλεπίδραση μεταξύ ριζοβακτηρίων και ριζοβίων εντός των φυματίων ενδέχεται να επηρεάσει τη φυσική κατάσταση και τη συμπεριφορά του φυτού-ξενιστή. Ακόμα και βακτήρια που δεν είναι πρωτεοβακτήρια και ως εκ τούτου δεν αζωτοδεσμεύουν ούτε προκαλούν φυματιογένεση, εμφανίζουν πολλά χαρακτηριστικά που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (PGP) (Aserse et al., 2013; Lai et al., 2015; Deng et al., 2020; Mukhtar et al., 2020).



**Εικόνα 1.7:** Απλοποιημένη σχηματική αναπαράσταση της πληθώρας των μικροοργανισμών που συναντώνται στο μικροβίωμα των φυματίων (Etesami, 2022).

### 1.2.3) Αποτελεσματικότητα αζωτοδέσμευσης και ανταγωνισμός

Η ικανότητα ενός ψυχανθούς να επωφελείται από την αφομοίωση του ατμοσφαιρικού αζώτου εξαρτάται από την παρουσία κάποιου ριζοβίου στο έδαφος, το οποίο όχι μόνο προκαλεί σχηματισμό φυματίων αλλά και εδραίωνει αποτελεσματική αζωτοδεσμευτική σχέση με το φυτό-ξενιστή σε συνθήκες πεδίου (Amanger, 2001). Στη γεωργία, οι συμβιωτικά αποτελεσματικές σχέσεις είναι επιθυμητές καθώς οδηγούν στην αφομοίωση περισσότερου αζώτου, με αποτέλεσμα υψηλότερες αποδόσεις στις καλλιέργειες (Hungria et al., 2006).

Ωστόσο, δεν είναι αποτελεσματικές όλες οι συμβιωτικές αλληλεπιδράσεις, γι' αυτό πρέπει να γίνουν κατανοητές οι αιτίες που οδηγούν σε μη σταθερές και αναποτελεσματικές αλληλεπιδράσεις ώστε να αποτελέσουν τη βάση για το σχεδιασμό στρατηγικών που θα μεγιστοποιήσουν τα οφέλη της αζωτοδέσμωσης (Mwenda, 2017).

Ένας από τους λόγους μη επιτυχούς αφομοίωσης του αζώτου μέσω της χρήσης ριζοβίων σε καλλιέργειες με ψυχανθή είναι η παρουσία γηγενών πληθυσμών ριζοβίων στο έδαφος τα οποία έχουν αναπτύξει εξειδικευμένη σχέση με αυτό. Για αυτό, προαπαιτείται το προς χρήση ριζόβιο να είναι ικανό να αποικίζει τη ριζόσφαιρα και στη συνέχεια να επάγει το σχηματισμό φυματίων ανταγωνιζόμενο το γηγενές στέλεχος. Ως ανταγωνιστικότητα ορίζεται η ικανότητα κάποιων ριζοβιακών στελεχών να κυριαρχούν στο σχηματισμό φυματίων έναντι των γηγενών ριζοβίων. Συνεπώς, η χρήση λιγότερο ανταγωνιστικών ριζοβίων σε σχέση με τα γηγενή τα καθιστά και λιγότερο αποτελεσματικά (Triplett & Sadowsky, 1992; Gaur, 1993). Γενικά ο ανταγωνισμός μεταξύ ριζοβίων για την επαγωγή σχηματισμού φυματίων είναι ένα περίπλοκο φαινόμενο. Μερικοί από τους παράγοντες που συμβάλλουν στην ενίσχυση της ανταγωνιστικότητας είναι: ο ρυθμός ανάπτυξης, ο χημειοτακτισμός, η κινητικότητα, οι επιφανειακοί κυτταρικοί πολυσακχαρίτες, το σύστημα πρόσληψης υδρογένης, η ανοχή στα αντιβιοτικά και η παραγωγή βακτηριοσίνης. Η ανταγωνιστικότητα μεταξύ των ριζοβιακών στελεχών έχει σημαντική αγρονομική σημασία, καθώς μπορεί να καθορίσει αν τα φυμάτια καταλαμβάνονται από ένα αποτελεσματικό βακτηριακό στέλεχος (Kumar, 2004).

Με βάση την αλληλεπίδραση ψυχανθούς-ριζοβίου-περιβάλλοντος το αποτέλεσμα των συμβιωτικών σχέσεων μπορεί να ομαδοποιηθεί σε τέσσερις κατηγορίες (Howieson et al., 2005; Mwenda, 2017): 1) Μη μολυσματικές, δηλαδή δεν σχηματίζονται φυμάτια (Nod-). 2) Μολυσματικές αλλά μη αποτελεσματικές, δηλαδή σχηματίζονται φυμάτια αλλά δεν υπάρχει δέσμωση  $N_2$  (Nod+ Fix-). 3) Μερικώς αποτελεσματικές, δηλαδή σχηματίζονται φυμάτια και υπάρχει ασθενής δέσμωση  $N_2$  (Nod+ Fix+). 4) Αποτελεσματικές δηλαδή σχηματίζονται φυμάτια και υπάρχει ισχυρή δέσμωση  $N_2$  (Nod+ Fix++).

### **1.3) Μοριακός χαρακτηρισμός βακτηρίων**

#### **1.3.1) Μέθοδοι μελέτης βακτηριακής ετερογένειας**

Η κλασική ταξινόμηση των προκαρυωτών βασίστηκε αποκλειστικά σε φαινοτυπικές ομοιότητες και χημικά χαρακτηριστικά, που ορισμένα από αυτά επηρεάζονται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία και το pH (Tindall et al., 2010). Η ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας, άλλαξε τη διαδικασία χαρακτηρισμού, σύγκρισης και αναγνώρισης των βακτηρίων. Οι τεχνικές αποτυπώματος DNA είναι ένα μέσο οπτικοποίησης του πολυμορφισμού

του DNA μεταξύ δειγμάτων και χρησιμοποιούνται ως ένα εργαλείο για να προσδιοριστεί η ταυτότητα ενός συγκεκριμένου δείγματος DNA ή για να αξιολογηθεί ο βαθμός συγγένειας μεταξύ δειγμάτων (Stackebrandt et al., 2002). Η επιλογή της τεχνικής αποτυπώματος εξαρτάται από τον υπό μελέτη οργανισμό και από την εφαρμογή της μελέτης που θα γίνει. Τα κριτήρια για την αξιολόγηση της τεχνικής περιλαμβάνουν τη δυνατότητα επιλογής, την επαναληψιμότητα, τη διακριτική ισχύ και την ευκολία ερμηνείας των αποτελεσμάτων (Coenye et al., 2002). Για το διαχωρισμό μεταξύ ειδών και στελεχών του ίδιου είδους χρησιμοποιούνται μέθοδοι που στοχεύουν είτε ολόκληρο το γονιδίωμα (PFGE, RAPD, AFLP, REP) είτε συγκεκριμένα γονίδια (RFLP) (Stackebrandt et al., 2002). Οι μέθοδοι αυτές βασίζονται (Wolska et al., 2012): είτε στο πρότυπο δημιουργίας μοτίβων DNA υπό τη μορφή ζωνών, ως αποτέλεσμα ενζυμικής πέψης γονιδιωματικού ή πλασμιδιακού DNA (π.χ. PFGE), είτε στο πρότυπο δημιουργίας μοτίβων DNA υπό τη μορφή ζωνών που δημιουργούνται από ενίσχυση μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) (π.χ. RAPD, AFLP, REP, RFLP). Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τις μεθοδολογίες γονιδιωματικού αποτυπώματος DNA, η χρήση λογισμικών είναι διαδεδομένη, χωρίς να υπάρχει κάποιο που να ταιριάζει σε όλες τις μεθόδους μελέτης βακτηριακής ετερογένειας (Heras et al., 2016).

Για τη μελέτη της γενετικής ετερογένειας των ριζοβίων χρησιμοποιούνται κυρίως τεχνικές που στοχεύουν τα διασκορπισμένα, επαναλαμβανόμενα και συντηρημένα στοιχεία DNA, REP, ERIC, BOX, τα οποία επιτρέπουν την ταυτόχρονη ενίσχυση πολλαπλών τμημάτων DNA διαφορετικών μεγεθών (Howieson & Dilworth, 2016). Τα στοιχεία REPs (repetitive extragenic palindromic elements) έχουν μέγεθος αλληλουχίας 35-40 bp (Merino et al., 1987) και είναι γνωστά και ως παλινδρομικές μονάδες (palindromic units), οι οποίες περιγράφηκαν για πρώτη φορά ως πιθανές ρυθμιστικές αλληλουχίες μέσα σε αμετάφραστες περιοχές των οπερονίων, λόγω της παλινδρομικής φύσης τους και της ικανότητας τους να σχηματίζουν σταθερές δομές κορμού-θηλιάς (stem-loop), κατά τη μεταγραφή του RNA (Versalovic et al., 1991). Στη συνέχεια, τα στοιχεία ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) είναι μικρές επαναλαμβανόμενες μονάδες μεγέθους 126 bp που περιέχουν μια συντηρημένη, κεντρική και ανεστραμμένη επανάληψη των 40 bp και φαίνεται ότι δεν έχουν ομοιότητα με τα στοιχεία REP (Hulton et al., 1991). Παρόλα αυτά, και οι δύο κατηγορίες στοιχείων περιέχουν εξαιρετικά διατηρημένες κεντρικές ανεστραμμένες επαναλήψεις και βρίσκονται συνήθως σε διαγονιδιακές περιοχές που μεταγράφονται, αλλά δεν μεταφράζονται. Η σχετική θέση αυτών των στοιχείων στο γονιδίωμα ενός δεδομένου βακτηριακού προϊόντος απομόνωσης διατηρείται στα στενά συγγενικά στελέχη και διακρίνεται στα διαφορετικά γένη

(Versalovic et al., 1991). Εκτός από αυτές τις κατηγορίες επαναλαμβανόμενων στοιχείων, χρησιμοποιούνται και τα στοιχεία BOX. Τα στοιχεία BOX βρίσκονται σε διαγονιδιακές περιοχές, μπορούν να σχηματίσουν δομές κορμού-θηλιάς και είναι επαναλαμβανόμενα στοιχεία που αποτελούνται από πολλούς συνδυασμούς τριών αλληλουχιών (boxA, boxB, boxC), μήκους 59, 45, και 50 νουκλεοτίδια αντίστοιχα. Τα στοιχεία BOX δεν έχουν καμία ομοιότητα στην αλληλουχία με τα στοιχεία REP και ERIC (Martin et al., 1992).

### **1.3.2) 16S και Πολυτοπική Ανάλυση Αλληλουχιών**

Οι προκαρυωτικοί οργανισμοί περιέχουν τρεις τύπους rRNA: το 16S rRNA, το 23S rRNA και το 5S rRNA (Madigan et al., 2014). Τα γονίδια rRNA (16S, 23S, 5S) είναι ιδιαίτερα συντηρημένα λόγω του θεμελιώδους ρόλου των ριβοσωμάτων στην πρωτεϊνοσύνθεση και στην μεταφορά σημαντικών εξελικτικών πληροφοριών (Woese, 1987). Από τα τρία rRNA το 16S rRNA (*rrs*) είναι το κύριο γονίδιο για τη φυλογενετική ταυτοποίηση των βακτηρίων (Tindall et al., 2010). Οι λόγοι για τους οποίους είναι το πιο αποδεκτό και ευρέως χρησιμοποιούμενο συντηρημένο γονίδιο για τη βακτηριακή ταξινόμηση και φυλογένεια, αφορούν (Janda & Abbott, 2007):

- α) την παρουσία του σε όλα τα βακτήρια, συχνά ως πολλαπλά αντίγραφα ή ως οπερόνια.
- β) τη λειτουργία του, η οποία δεν έχει αλλάξει με το πέρασμα του χρόνου, υποδηλώνοντας ότι τυχαίες αλλαγές στην αλληλουχία είναι περισσότερο αντιπροσωπευτικές της εξέλιξης.
- γ) το γονίδιο 16S rRNA έχει μέγεθος ~1500 bp, το οποίο είναι κατάλληλο για αλληλούχιση.

Γενικά, στα φυλογενετικά δέντρα που φτιάχνονται με βάση το 16S rRNA γονίδιο, τα στελέχη με λιγότερο από 95% ομοιότητα στην αλληλουχία τους ανήκουν σε διαφορετικό είδος (Konstantinidis & Tiedje, 2005). Ακόμη, στη φυλογενετική ανάλυση μπορούν να χρησιμοποιηθούν και τμήματα της αλληλουχίας του 16S, αλλά πρέπει να είναι το λιγότερο 1300 bp, ώστε να είναι αξιόπιστη η ομαδοποίηση των βακτηρίων (Yarza et al., 2014). Τα ριζόβια, με βάση το 16S rRNA μπορούν να ταξινομηθούν μέχρι το επίπεδο του γένους, αλλά οι διαφοροποιήσεις στην αλληλουχία του γονιδίου το καθιστούν αναξιόπιστο στο να τα ταξινομήσει σε επίπεδο είδους, αφού σε πολλά είδη ριζοβίων, αυτή η περιοχή έχει μικρές διαφοροποιήσεις μεταξύ τους (van Berkum et al., 2003). Δεδομένου ότι οργανισμοί με υψηλή ομοιότητα σε αλληλουχίες rRNA παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές σε επίπεδο συνολικού γονιδιώματος, πρέπει να δίνεται προσοχή στα πρότυπα διακλάδωσης των φυλογενετικών δέντρων κατά την ερμηνεία αυτών, καθώς μπορεί να μην αντιπροσωπεύουν την πραγματική φυλογένεια (Ludwig & Klenk, 2001). Λόγω της μοριακής δομής του 16S rRNA που είναι πολύ συντηρημένη δεν βοηθά στη διάκριση μεταξύ στενά συγγενικών ειδών με ομοιότητα >97% (Stackebrandt & Goebel, 1994; Rosselló-Mora & Amann, 2001; Richter & Rosselló-Móra, 2009).



Ως εκ τούτου, φυλογενετικές σχέσεις σε επίπεδο είδους μέσα σε ένα γένος δεν μπορούν να αναλυθούν επαρκώς (Glaeser & Kämpfer, 2015).

Για πιο αποτελεσματική φυλογενετική ανάλυση εντός γένους επιλέγονται γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, διότι εξελίσσονται με αργό αλλά σταθερό ρυθμό και έχουν καλύτερη ισχύ ανάλυσης, ειδικά σε επίπεδο γένους ή και πιο κάτω (Glaeser & Kämpfer, 2015). Τα γονίδια αυτά λέγονται γονίδια κυτταρικής οικονομίας είναι χρωμοσωμικής συνήθως προέλευσης και εκφράζονται σε όλα τα κύτταρα υπό φυσιολογικές και παθολογικές συνθήκες προκειμένου να διατηρηθούν οι βασικές κυτταρικές λειτουργίες ενός οργανισμού. Γι' αυτό έχει καθιερωθεί και χρησιμοποιείται η φυλογένεια που βασίζεται σε πολλά γονίδια προκειμένου να ξεπεραστεί η ανακρίβεια που προκύπτει από την ανάλυση ενός μόνο γονιδίου. Η μέθοδος αυτή για την ταξινόμηση των προκαρυωτών λαμβάνει υπόψη εσωτερικά τμήματα αρκετών γονιδίων και ονομάζεται πολυτοπική ανάλυση αλληλουχίας (MLSA) (Gevers et al., 2005) και χρησιμοποιείται κατόπιν της ανάλυσης του 16S rRNA γονιδίου. Για να ξεπεραστούν οι περιορισμοί που προκύπτουν από την αλληλούχηση του 16S rRNA, θεωρείται ότι η πολυτοπική ανάλυση αλληλουχιών, γνωστή ως MLSA (multilocus sequence analysis) είναι η περισσότερο προτιμητέα μέθοδος για τη μελέτη στενά συγγενικών ειδών και για τη διάκριση στελεχών του ίδιου είδους καθώς, τα γονίδια κυτταρικής οικονομίας είναι οι πιο κατάλληλοι δείκτες για τη φυλογενετική ανάλυση των βακτηρίων. Γενικά, τα γονίδια κυτταρικής οικονομίας έχουν υψηλότερο ποσοστό απόκλισης των αλληλουχιών συγκριτικά με το γονίδιο 16S rRNA, αλλά διατηρούνται αρκετά στα βακτηριακά είδη ώστε να παρέχουν γενετικές πληροφορίες και επομένως οι αλληλουχίες τους παρουσιάζουν καλύτερη διάκριση από την αλληλουχία του 16S rRNA (Zeigler, 2003).

Για τη διεξαγωγή MLSA, το πιο κρίσιμο σημείο είναι η επιλογή των γονιδίων. Τέτοιου είδους γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες με σημαντικές λειτουργίες, οι οποίες είναι σταθερές σε σχέση με γρήγορες γενετικές τροποποιήσεις. Ωστόσο, για να επιτραπεί η ιεραρχική ταξινόμηση όλων των προκαρυωτών, το σύνολο των γονιδίων που θα χρησιμοποιηθεί πρέπει να είναι καθολικό και ικανό να διακρίνει ταξινομικά στενά συγγενικά βακτήρια. Τα γονίδια κυτταρικής οικονομίας που αναλύονται πιο συχνά είναι εκείνα που κωδικοποιούν (Gevers et al., 2005):

- υπομονάδες ενζύμων που βρίσκονται παντού, όπως η β-υπομονάδα της DNA γυράσης (*gyrB*: β-subunit of DNA gyrase), η β-υπομονάδα της RNA πολυμεράσης (*rpoB*: β-subunit of RNA polymerase), η β-υπομονάδα της ATP συνθάσης FOF1 (*atpD*: β-subunit of ATP synthase FOF1), η β-υπομονάδα της συνθάσης της τρυπτοφάνης (*trpB*: β-subunit of tryptophan synthase)
- ο παράγοντας sigma 70 (sigma D) της RNA πολυμεράσης (*rpoD*)
- η ανασυνδυάση A (*recA*: recombinase A),

- ο παράγοντας έναρξης της μετάφρασης IF-2 (*infB*: translation initiation factor IF-2), κ.α.  
Αν και έχει αποδειχθεί ότι ακόμα και ένα μόνο γονίδιο κυτταρικής οικονομίας είναι αρκετό για να προβλέψει τη συγγένεια ολόκληρου του γονιδιώματος των βακτηρίων και να παρέχει μια ισχυρή οριοθέτηση των ειδών (Zeigler, 2003; Martens et al., 2008; Rivas et al., 2009), έχουν υπάρξει μελέτες που έδειξαν μεταβλητά στοιχεία στην ομαδοποίηση των βακτηρίων, συνιστώντας τη χρήση περισσότερων από ένα γονιδίων για τη φυλογενετική και ταξινομική ταυτοποίηση των βακτηρίων (Rivas et al., 2009). Αρχικά, είχε εκτιμηθεί ότι ο αριθμός των γονιδίων προς διερεύνηση σε μελέτες φυλογενετικής ανάλυσης δεν πρέπει να είναι μικρότερος από 4-5 (Glaeser & Kämpfer, 2015), αν και λιγότερα από τέσσερα γονίδια θεωρούνται επαρκή, με τα γονίδια *recA*, *gyrB*, *atpD* να χρησιμοποιούνται ευρέως για την ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών (Konstantinidis et al., 2006). Συνεπώς, συνήθως είναι η χρήση συνδυασμού γονιδίων από δύο και πάνω σε μελέτες ταξινόμησης των ριζοβίων, συμπεριλαμβανομένης και της φυλογενετικής ανάλυσης (Degefu et al., 2012). Ωστόσο η ταξινόμηση χρησιμοποιώντας μεθόδους 16S rRNA και MLSA θα μπορούσε να είναι επίσης αναξιόπιστη λόγω πιθανών σφαλμάτων στην αλληλούχιση (Han et al., 2016).

### 1.3.3) Μοριακοί δείκτες για μελέτη συμβιωτικών σχέσεων

Στα ριζόβια, τα συμβιωτικά γονίδια είναι αναγκαία για το σχηματισμό των φυματίων (γονίδια *nod*) και για την αζωτοδέσμευση (γονίδια *fix* και *nif*) και βρίσκονται είτε σε πλασμίδια είτε σε συμβιωτικές νησίδες (symbiotic islands) των χρωμοσωμάτων των βακτηρίων (Aserse et al., 2013). Γενικά, η φυλογένεια των συμβιωτικών γονιδίων των ριζοβίων ακολουθεί τη φυλογένεια των φυτών-ξενιστών ή της γεωγραφικής προέλευσης των ξενιστών. Ταξινομικά συγγενικά είδη μπορούν να εμφανίσουν διαφορές στα συμβιωτικά τους γονίδια αν μολύνουν διαφορετικά φυτά-ξενιστές (Aserse et al., 2013).

Στη διαδικασία σχηματισμού φυματίων εμπλέκονται διαφορετικά γονίδια, με τα γονίδια *nodABC* να είναι αυτά που ευθύνονται για τη βασική δομή των παραγόντων Nod (Dresler-Nurmi et al., 2007). Τα φυλογενετικά δέντρα που προκύπτουν από αλληλουχίες γονιδίων *nod*, γενικά, δε συμφωνούν απόλυτα με αυτά που προκύπτουν από τις 16S rRNA αλληλουχίες. Τα *nod* φυλογενετικά δέντρα δείχνουν κάποια συσχέτιση με το φάσμα των ξενιστών και έχει παρατηρηθεί ότι είναι παρόμοια με αυτά που προκύπτουν από αλληλουχίες γονιδίων *nifH*. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με το γεγονός ότι τα γονίδια *nif* και *nod* είναι συχνά στενά συνδεδεμένα στα ριζόβια αφού βρίσκονται σε στοιχεία που υπόκεινται οριζόντια γενετική μεταφορά, όπως πλασμίδια ή σε χρωμοσωμικές νησίδες συμβίωσης ή στοιχεία που μοιάζουν με μεταθετά (Laguerre et al., 2001).

Μεταξύ των γονιδίων που ευθύνονται για την αζωτοδέσμευση, το γονίδιο *nifH* είναι ένα από τα πιο μελετημένα και έχει αποδειχθεί ότι είναι χρήσιμο για τη φυλογενετική ανάλυση (Dobert et al., 1994; Chen et al., 2003). Το *nifH* είναι από τα πιο συντηρημένα γονίδια σε πολλούς μικροοργανισμούς, καθιστώντας το ως ένα ιδανικό μοριακό εργαλείο για τον προσδιορισμό πιθανότητας βιολογικής αζωτοδέσμευσης σε οποιοδήποτε περιβάλλον και επίσης βοηθάει στην καλύτερη εκτίμηση της ταξινόμησης και της ποικιλομορφίας των αζωτοδεσμευτικών μικροοργανισμών, αφού είναι δύσκολο να προσδιοριστούν μόνο από τη μελέτη του γονιδίου 16S rRNA (Mehta et al., 2003).

#### **1.3.4) Αλληλούχιση επόμενης γενιάς και αλληλούχιση γονιδιώματος**

Καθώς η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος δεν ήταν διαθέσιμη μέχρι πρόσφατα για την ταξινόμηση των οργανισμών χρησιμοποιούνταν παλιότερα τεχνικές, όπως η τεχνική υβριδισμού DNA-DNA (DDH). Για τη διάκριση μεταξύ των ειδών, βάσει του DDH, ως συνιστώμενο πρότυπο για την οριοθέτηση ειδών έχει οριστεί η τιμή 70 %, χωρίς να αποτελεί αυστηρό πρότυπο (Wayne et al., 1987; Goris et al., 2007). Πλέον η τεχνική DDH είναι μια παρωχημένη προσέγγιση προς αντικατάσταση (Stackebrandt et al., 2002), στη θέση της οποίας έχει υπεισέλθει η μέθοδος αλληλούχισης. Η μόνη μέθοδος αλληλούχισης που χρησιμοποιούνταν μέχρι πρόσφατα ήταν η μέθοδος Sanger η οποία έχει χαρακτηριστεί ως μέθοδος πρώτης γενιάς αλληλούχισης (Meera Krishna et al., 2019). Ωστόσο η είσοδος της αλληλούχισης επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS), με τη χρήση πλατφορμών (Roche/454 sequencing, Ion torrent: Proton/PGM sequencing, Illumina (Solexa) sequencing, SOLiD sequencing) ανέδειξε τις νέες μεθόδους προσδιορισμού αλληλουχίας DNA ως πιο οικονομικές και γρήγορες σε σχέση με τη μέθοδο Sanger, παρουσιάζοντας μια σειρά πλεονεκτημάτων και επέτρεψε την αλληλούχιση: 1) ολόκληρου γονιδιώματος, 2) εξωνίων όλων των γονιδίων του γονιδιώματος (Exome sequencing), 3) RNA (RNA sequencing), 4) σε συνδυασμό με ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης (Chromatin immunoprecipitation-Chip sequencing) (Shendure & Ji, 2008). Η αλληλούχιση επόμενης γενιάς περιλαμβάνει όχι μόνο σχετικά απλή τεχνολογία αλλά και τα πρωτόκολλα προετοιμασίας της είναι αποτελεσματικά και αυτό έχει βελτιώσει σημαντικά την ικανότητα εκτέλεσης χαμηλού κόστους, αποτελεσματικών αλληλουχιών γονιδιώματος (Kwong et al., 2015). Για παράδειγμα, εκτιμάται ότι η αλληλούχιση ολόκληρου γονιδιώματος βακτηριακής προέλευσης κυμαίνεται από 40 -487€ (Schwarze et al., 2018).

Η ταυτοποίηση στελεχών με βάση την αλληλούχιση ολόκληρου γονιδιώματος παρέχει καλύτερη ανάλυση σε σύγκριση με μεθόδους που βασίζονται σε γενετικούς δείκτες, όπως η πολυτοπική ανάλυση αλληλουχιών (MLSA) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί όταν τεχνικές όπως η

ηλεκτροφόρηση πηκτής παλλόμενου πεδίου (PFGE) δε μπορούν να διακρίνουν με ακρίβεια τη φυλογένεια των δειγμάτων (Balloux et al., 2018). Σε επίπεδο γονιδιώματος μια από τις προτεινόμενες εναλλακτικές προτάσεις είναι η μέση ταυτότητα νουκλεοτιδίων (ANI). Η μέθοδος προσδιορισμού του ANI συντηρημένων γονιδίων που υπάρχουν σε δύο αλληλουχημένα στελέχη, αντιπροσωπεύει ένα ισχυρό μέτρο εύρεσης της γενετικής και εξελικτικής απόστασης μεταξύ δυο στελεχών. Αυτό ισχύει διότι η τιμή ANI δείχνει ισχυρή συσχέτιση με την ομοιότητα της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA και του ρυθμού μετάλλαξης του γονιδιώματος και δεν επηρεάζεται από την οριζόντια μεταφορά ή τους μεταβλητούς ρυθμούς ανασυνδυασμού μεμονωμένων (ή λίγων) γονιδίων, προσφέροντας έτσι δυνατότητα ανάλυσης σε επίπεδο υποειδούς (Konstantinidis & Tiedje, 2005). Οι Goris et al. (2007), έδειξαν ότι οι τιμές DDH συσχετίζονται καλά με τις παραμέτρους ANI που προέρχονται από την αλληλουχία του γονιδιώματος και το ποσοστό διατηρημένου DNA. Έτσι τιμή 70 % με βάση το DDH αντιστοιχεί σε περίπου 95 % ANI και 69 % διατηρημένο DNA.

Παρόλο που για πιο ακριβείς μετρήσεις ίσως χρειάζονται εναλλακτικές μέθοδοι μεταξύ των διαφορετικών προσεγγίσεων, το ANI μεταξύ ενός δεδομένου ζεύγους γονιδιωμάτων φαίνεται μέχρι στιγμής να είναι η καλύτερη εναλλακτική λύση (Goris et al., 2007; Konstantinidis & Tiedje, 2005; Rosselló-Mora, 2005). Για τη σύγκριση γονιδιωμάτων για ταξινομικούς σκοπούς, οι αλγόριθμοι υπολογισμού ANI που έχουν αναπτυχθεί βασίζονται είτε στο BLAST (Altschul et al., 1990; Konstantinidis & Tiedje, 2005; Goris et al., 2007), είτε στο MUMmer (Kurtz et al., 2004). Ανεξάρτητα από τον αλγόριθμο υπολογισμού του ANI, η τιμή ορίου στην ταξινομική για την ειδογένεση φαίνεται να εξακολουθεί να είναι το 95–96% (Richter & Rosselló-Móra, 2009). Μερικά από τα on-line βιοπληροφορικά εργαλεία για τον υπολογισμό του ANI είναι το JSpeciesWS (Richter & Rosselló-Móra, 2009), το ANItools Online (Han et al., 2016) και το OrthoANI (Chun et al., 2015). Επίσης, μια επιπλέον εναλλακτική πρόταση για την εξαγωγή αποστάσεων μεταξύ ζευγών γονιδιωμάτων, αποτελεί ο *in silico* υπολογισμός του DDH (wet-lab DDH) που παρέχεται μέσω του GBDP (Genome Blast Distance Phylogeny). Το εργαλείο αυτό αποτελεί ένα ψηφιακό, εξαιρετικά αξιόπιστο εκτιμητή για τη συγγένεια των γονιδιωμάτων και η εφαρμογή του ως *in silico* αντικαταστάτης του DDH δεν περιορίζεται μόνο για την εξαγωγή συμπερασμάτων φυλογενετικών δέντρων ή δικτύων από ένα σύνολο γονιδιωμάτων, αλλά θα μπορούσε επίσης να εφαρμοστεί ακόμη και σε μεμονωμένα γονίδια (Göker et al., 2010).

#### **1.4) Μηχανισμοί Δράσης Ωφέλιμων Ριζοβακτηρίων**

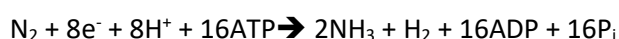
Οι μηχανισμοί δράσης των ωφέλιμων ριζοβακτηρίων που ενισχύουν την ανάπτυξη των φυτών (Plant Growth Promotion Bacteria, PGPB) είναι άμεσοι και έμμεσοι. Με τους άμεσους μηχανισμούς τα PGPB συμβάλλουν στην απορρόφηση θρεπτικών συστατικών (όπως το άζωτο,

ο φώσφορος, το κάλιο, ο σίδηρος) από το έδαφος και στην παραγωγή φυτοορμονών (όπως αυξίνες, κυτοκινίνες, γιβεριλλίνες και αιθυλένιο) (Glick,2012; Kumar, 2016). Τα PGPB μέσω έμμεσων μηχανισμών μπορούν επίσης να προάγουν την ανάπτυξη των φυτών αποτρέποντας την ανάπτυξη των φυτοπαθογόνων, είτε παράγοντας μεταβολίτες με αντιμικροβιακή φύση είτε επάγοντας τη διασυστηματική αντίσταση στο φυτό (Gouda et. Al., 2018).

#### 1.4.1) Βιολογική αζωτοδέσμευση

Το άζωτο (N) αποτελεί περίπου το 78% της ατμόσφαιρας της γης υπό μορφή N<sub>2</sub> η οποία είναι μη διαθέσιμη για τα φυτά, τα ζώα και τους μικροοργανισμούς. Όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί χρησιμοποιούν το άζωτο με τη μορφή αμμωνίας για την παραγωγή διαφόρων μακρομορίων ζωτικής σημασίας για τη ζωή, όπως αμινοξέα, πρωτεΐνες νουκλεϊκά οξέα κ.α. (Mariotti et al., 2008; Lu & Tian, 2017; Adams et al., 2018). Πολύ λίγοι είναι οι μικροοργανισμοί που μπορούν να σπάσουν τους δεσμούς μεταξύ των δύο ατόμων αζώτου μετατρέποντάς το σε αφομοιώσιμη για τους ζωντανούς οργανισμούς μορφή. Τέτοιου τύπου βακτηριακά στελέχη δημιουργούν συμβιωτικές αλληλεπιδράσεις με ψυχανθή (*leguminous*) φυτά όπως τα *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* και με δέντρα (μη ψυχανθή) όπως τα στελέχη *Frankia*. Η συμβιωτική σχέση καθορίζεται από την αλληλεπίδραση μεταξύ φυτού-ξενιστή και βακτηρίου που έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό φυματίων (Choudhary et al., 2016). Η αφομοίωση του αζώτου πραγματοποιείται και από ελεύθερα διαβιούντα, μη συμβιωτικά βακτήρια (π.χ. *Cyanobacteria* (*Anabaena*, *Nostoc*), *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Klebsiella*, *Clostridium* κ.α), παρέχοντας στο φυτό-ξενιστή μικρό μέρος από το συνολικό άζωτο που αφομοιώνεται (Choudhary et al., 2016). Η αντίδραση αφομοίωσης αζώτου είναι εξαιρετικά εξώθερμη και πραγματοποιήσιμη μόνο σε ανοξικές (απουσία οξυγόνου) συνθήκες. Αυτό συμβαίνει γιατί το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση, δηλαδή η νιτρογενάση, όταν εκτεθεί στο οξυγόνο, αντιδρά με αυτό και απενεργοποιείται. Ωστόσο, η παραγωγή αμμωνίας είναι δυνητικά τοξική και μετατρέπεται αμέσως σε αμίδια και αμινοξέα τα οποία χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό μακρομορίων (Bittsánszky et al., 2015).

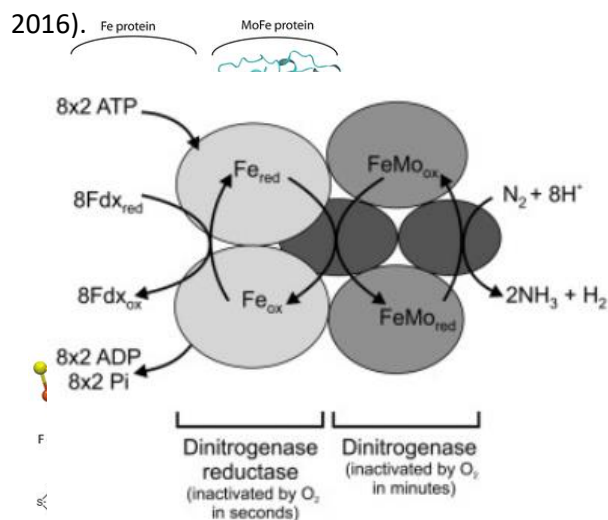
Η αντίδραση αφομοίωσης αζώτου (Poole & Allaway, 2000) είναι η εξής:



Η διαδικασία της καθήλωσης του αζώτου και η μετατροπή του σε άμεσα διαθέσιμη μορφή μέσω της συμβιωτικής αλληλεπίδρασης ονομάζεται βιολογική αζωτοδέσμευση (BNF) (Yang et al., 2017), διαδικασία που επιτελείται μόνο από αζωτοδεσμευτικά βακτήρια όπως ριζόβια και α-πρωτεοβακτήρια (Sørensen & Sessitsch, 2007). Τα φυμάτια των ψυχανθών φυτών διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο για τη διασφάλιση όλων των φυσιολογικών προϋποθέσεων για την καθήλωση του αζώτου στα βακτηριοειδή, καθώς προστατεύει το ένζυμο νιτρογενάση από

το οξυγόνο ενώ ταυτόχρονα παρέχεται ενέργεια μέσω οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, η οποία είναι απαραίτητη για την καθήλωση του αζώτου και για την καλή λειτουργία του ενζύμου.

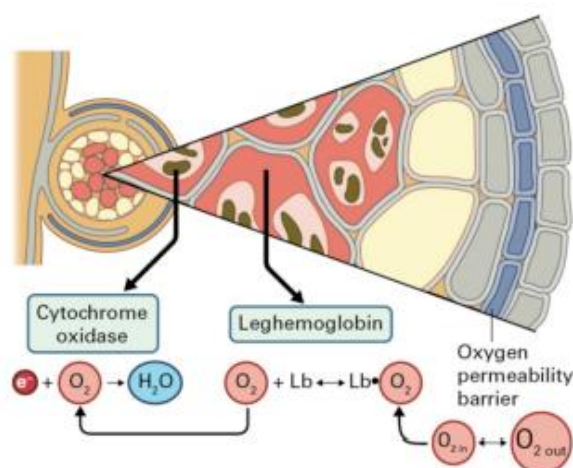
Η νιτρογενάση κωδικοποιείται από τα γονίδια *nif* και αποτελείται από ένα σύμπλεγμα δύο διακριτών ενζύμων (**Εικόνα 1.8**), της αναγωγάσης της δινιτρογενάσης και της δινιτρογενάσης, τα οποία δεν έχουν ενζυμική δράση από μόνα τους (Igarashi & Seefeldt, 2003). Η αναγωγάση της δινιτρογενάσης είναι μια διμερής ( $\alpha_2$ ) Fe-πρωτεΐνη περίπου 70 kDa με ένα σύμπλεγμα 4Fe-4S, που δεσμεύει το ATP και μεταφέρει ηλεκτρόνια στη δινιτρογενάση. Η δινιτρογενάση είναι μια τετραμερής ( $\alpha_2\beta_2$ ) πρωτεΐνη FeMo περίπου 220 kDa. Περιέχει δύο συμπλέγματα Mo-Fe-S και ένα μεταβλητό αριθμό συμπλέγματος Fe-S και δεσμεύει το  $N_2$  (Dixon & Wheeler, 1986). Για την κατασκευή των υπομονάδων της νιτρογενάσης, τα κύρια δομικά γονίδια είναι τρία (*nifD*, *nifK* και *nifH*), ενώ τόσο για τη σύνθεση της νιτρογενάσης όσο και για την εξασφάλιση της λειτουργικότητας της στους διαζότροφους οργανισμούς ευθύνεται ένα σύνολο γονιδίων *nif* (*nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifY*, *nifB*, *nifQ*, *nifE*, *nifN*, *nifX*, *nifU*, *nifS*, *nifV*, *nifW*, *nifZ*) (Choudhary et al., 2016).



**Εικόνα 1.8:** Το ενζυμικό σύμπλεγμα της νιτρογενάσης (αριστερά και δεξιά). Στο δεξί τμήμα της εικόνας αποτυπώνεται η τρισδιάστατη δομή της αναγωγάσης της δινιτρογενάσης και της δινιτρογενάσης (A) και η παρουσία του συμπλέγματος 4Fe-4S (F), του P-συμπλέγματος (P) και του M-συμπλέγματος (M) (Hoffman et al., 2014; Rascio & La Rocca, 2013).

Τα δύο ένζυμα που συνθέτουν τη νιτρογενάση είναι πολύ ευαίσθητα στο οξυγόνο, το οποίο τα αδρανοποιεί γρήγορα (Dixon & Wheeler, 1986). Για το λόγο αυτό τα βακτήρια έχουν αναπτύξει έναν καταρράκτη αντιδράσεων ευαίσθητο στην παρουσία του οξυγόνου για τον έλεγχο της έκφρασης του συμπλέγματος νιτρογενάσης και των μικροαερόβιων αναπνευστικών ενζύμων που απαιτούνται για την παροχή ενέργειας και αναγωγικού δυναμικού στη νιτρογενάση (Fischer, 1994). Στα βακτήρια η ρύθμιση αυτή περιλαμβάνει ένα επαγόμενο από το οξυγόνο ρυθμιστικό σύστημα δύο συστατικών το FixL και το FixJ, καθώς και τα NifA,  $\sigma^{54}$  και FixK (Fischer, 1994). Αυτοί οι ρυθμιστές είναι υπεύθυνοι για πολλές από τις αλλαγές στην

έκφραση γονιδίων και πρωτεϊνών που έχουν ανιχνευθεί κατά τη διαφοροποίηση των βακτηριοειδών (Fisher, 2006). Για την επίτευξη αυτών των προϋποθέσεων δράσης της νιτρογενάσης, μηχανισμοί που επιστρατεύονται για τη διατήρηση του οξυγόνου σε χαμηλή συγκέντρωση είναι δύο. Ο πρώτος αφορά την ενίσχυση του ρυθμού αναπνοής στα βακτηριοειδή και ο δεύτερος την κατασκευή του εσωτερικού φλοιού των φυματίων με τρόπο τέτοιο που να παρεμποδίζει τη διάχυση του  $O_2$  σε πυκνοστοιβαγμένα κύτταρα. Ο φραγμός διάχυσης του οξυγόνου μπορεί να ρυθμίζει γρήγορα τη συγκέντρωση οξυγόνου έξω και μέσα στο φλοιό των φυματίων (Vessey et al., 2005) και αποτελείται από πάχος πέντε στρωμάτων που οι χώροι μεταξύ των κυττάρων μπορεί να γεμίζουν με νερό ή αέρα. Μεταξύ των δύο, το φράγμα νερού είναι πιο επιθυμητό μέσο μείωσης της συγκέντρωσης οξυγόνου στο εσωτερικό των φυματίων (Blevins, 1989). Επίσης, ο όγκος του διακυτταρικού  $H_2O$  και η μεσοκυτταρική γλυκοπρωτεΐνη (James et al., 2000) μπορούν να επηρεάσουν το ρυθμό διάδοσης του οξυγόνου. Σε περίπτωση ανεπαρκούς παροχής οξυγόνου, η αιμοσφαιρίνη των ψυχανθών συμμετέχει για να καταστεί δυνατή η επαρκής παροχή οξυγόνου στα βακτηριοειδή. Η πρωτεΐνη αυτή είναι σημαντική και κατέχει περίπου το 5% των συνολικών πρωτεϊνών του φυματίου.



**Εικόνα 1.9:** Μηχανισμοί ελέγχου της παροχής οξυγόνου εντός του φυματίου

(<http://web.uvic.ca/~cpc/9.NitrogenFixationNotes.pdf>).

#### 1.4.2) Διαλυτοποίηση Φωσφόρου

Μετά το άζωτο, ο φώσφορος (P) είναι το δεύτερο πιο σημαντικό θρεπτικό συστατικό για την ανάπτυξη και την παραγωγικότητα των φυτών. Η διαθεσιμότητα του στα περισσότερα γεωργικά εδάφη είναι συχνά περιορισμένη επειδή συνδέεται ισχυρά με σωματίδια του εδάφους και με δισθενή κατιόντα σχηματίζοντας αδιάλυτα P-συμπλέγματα (Elhaissofi et al., 2022), π.χ. αντίδραση φωσφορικών αλάτων με ασβέστιο, αλουμίνιο και ιόντα σιδήρου, τα οποία υπάρχουν σε μικρομοριακές ή μικρότερες ποσότητες στο έδαφος (Porder & Hilley, 2011). Για την αύξηση της γεωπονικής απόδοσης του φωσφόρου, μια πολλά υποσχόμενη τεχνολογική

εφαρμογή που χρησιμοποιείται είναι η χρήση μικροοργανισμών που διαλυτοποιούν το φώσφορο (PSB). Στην προσέγγιση αυτή, μικροοργανισμοί μεσολαβούν ως αναπόσπαστα συστατικά του εδάφους καθώς συμμετέχουν έντονα σε διαδικασίες που αφορούν τη θρέψη στη ριζόσφαιρα (Jha et al., 2018). Σε αυτές τις μικροβιακά μεσολαβούμενες διεργασίες συμμετέχουν μύκητες, βακτήρια και ζυμομύκητες που μπορούν να διαλυτοποιήσουν διάφορες αδιάλυτες μορφές του P (Jain et al., 2010; de Oliveira Mendes et al., 2014; Klaić et al., 2018). Τα βακτήρια PSB είναι ικανά να διαλυτοποιήσουν μη διαθέσιμη μορφή P σε διαλυτές μορφές, βελτιώνοντας έτσι τη διαθεσιμότητα του P στα φυτά (Srinivasan et al., 2012; Khan et al., 2014; Acevedo et al., 2014; Behera et al., 2014) και χωρίζονται σε δύο ομάδες ανάλογα με το αν το υπόστρωμα του φωσφόρου είναι σε ανόργανη ή οργανική μορφή (Kuhad et al., 2011; Berde et al., 2021), επιστρατεύοντας διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης ανά περίπτωση.

Για τη διαλυτοποίηση ανόργανου P, ως κύριος μηχανισμός δράσης είναι η έκκριση διαφόρων χαμηλού μοριακού βάρους οργανικών οξέων (Goldstein, 1994), όπως:

- το γλυκονικό, που θεωρείται το κυρίαρχο οργανικό οξύ για τη διαλυτοποίηση φωσφορικών (Zeng et al., 2016, Xie et al., 2021),
- το ηλεκτρικό οξύ που έχει συσχετιστεί με τη δραστηριότητα του *Bacillus megaterium* ως PSB (Zheng et al., 2018),
- το οξαλικό και κιτρικό, που είναι τα κυρίαρχα εκκρινόμενα οξέα από το *Pseudomonas* sp. (Saleemi et al., 2017).

Η απελευθέρωση των οξέων αυτών στο περιβάλλον πραγματοποιείται μέσω της γλυκομεταβολικής οδού, συνοδευόμενη με την πτώση της τιμής του pH (Illmer & Schinner, 1995). Οι τύποι οργανικών οξέων που εκκρίνονται από τα PSB διαφέρουν ανάλογα με το είδος του βακτηρίου και τις αδιάλυτες πηγές φωσφόρου. Η φύση των οργανικών οξέων επηρεάζει σημαντικά τη δραστηριότητα των βακτηρίων ως PSB (Patel et al., 2008) και το συνολικό ποσό των οξέων αυτών δε συσχετίζεται με την ικανότητα διαλυτοποίησης φωσφόρου (Zeng et al., 2016).

Ως μηχανισμός δράσης προτείνεται η απελευθέρωση του υδρογόνου από τα οργανικά οξέα, το οποίο θα μπορούσε να αντικαταστήσει τα μεταλλικά ιόντα από το φωσφορικό ασβέστιο, απελευθερώνοντας έτσι το διαλυτό ιόν P (Goldstein, 1994). Επίσης οι εξωπολυσακχαρίτες (EPS) που παράγονται από τα PSB συμβάλλουν σημαντικά στη διαλυτοποίηση φωσφορικών αλάτων κρατώντας το φώσφορο ελεύθερο, λόγω ομοιόστασης (Yi et al., 2007). Η δράση των PSB, επάγεται από χαμηλά επίπεδα ιόντων P και καταστέλλεται από υψηλά επίπεδα. Η ανεπάρκεια σε P-ιον οδηγεί σε μετατόπιση της γλυκόζης προς την οξειδωτική οδό του καταβολισμού της γλυκόζης (Buch et al., 2008). Το P-ιον ρυθμίζει τη μεταγραφή του γονιδίου *gcd*, πυροδοτώντας την έκκριση γλυκονικού οξέος και τη μεσολαβούμενη από το γλυκονικό ικανότητα



διαλυτοποίησης φωσφόρου (Zeng et al., 2016). Για τη διαλυτοποίηση οργανικών φωσφορικών ενώσεων, τα PSB καθιστούν τις ενώσεις αυτές διαθέσιμες για την ανάπτυξη των φυτών με την απέκκριση μικροβιακών φωσφατάσων (Li et al., 2019). Εκτός από τις φωσφατάσες, η PS-δράση, μπορεί να αποδοθεί στη δραστηριότητα της φυτάσης (Kusale et al., 2021; Li et al., 2013). Στην εμφάνιση της ικανότητας διαλυτοποίησης του ανόργανου φωσφόρου κρίσιμο ρόλο παίζουν διάφορα γονίδια όπως: *ppq*, *phoB*, *phoR*, *pstC*, *pstA*, *pstB*, *phoU*, *pstS* (Chhabra et al., 2013).

Παρόλο που η ικανότητα διαλυτοποίησης του φωσφόρου εμφανίζεται και στους μύκητες, τα βακτηριακά είδη είναι καλύτεροι διαλυτοποιητές (Alam et al., 2002), επιδεικνύοντας περίπου 1-50% ικανότητα διαλυτοποίησης φωσφόρου, ενώ η αντίστοιχη των μυκήτων είναι περίπου 0,1–0,5% (Chen et al., 2006). Από τα βακτήρια, οι πιο αποτελεσματικοί διαλυτοποιητές P ανήκουν στα γένη *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, και *Enterobacter*, ενώ από τους μύκητες στα γένη *Penicillium* και *Aspergillus* (Kucey et al., 1989; Rodriguez & Fragal, 1990).

### 1.4.3) Διαθεσιμότητα Καλίου

Για τα φυτά, το κάλιο (K) είναι το τρίτο σε σειρά σημαντικότητας, θρεπτικό συστατικό μετά το φώσφορο (P) και το πιο άφθονο θρεπτικό στοιχείο μετά το άζωτο (N) στους φωτοσυνθετικούς ιστούς των φυτών, ενώ για ορισμένα είδη φυτών (π.χ. βαμβάκι και μπανάνα), οι απαιτήσεις για K είναι υψηλότερες από εκείνη για N και P (Mora et al., 2012). Όπως και στην περίπτωση του P, έτσι και για το K, παρόλο που τα εδάφη περιέχουν μεγάλες ποσότητες, μόνο το 1%-2% του συνολικού K του εδάφους είναι άμεσα διαθέσιμο, ενώ το υπόλοιπο συνδέεται με άλλα ορυκτά, δημιουργώντας ανεπάρκεια για τη φυτική παραγωγή (Meena et al., 2015), η οποία καλύπτεται με την εφαρμογή λιπασμάτων K.

Εναλλακτική και φιλική προς το περιβάλλον προσέγγιση αποτελεί η χρήση μικροβίων διαλυτοποίησης του K (KSM), αντίστοιχα με τα PSB (Boubekri et al., 2021), απελευθερώνοντας το K από τα αποθέματα του εδάφους, μειώνοντας έτσι την ανάγκη χρήσης προσθέτων σε ορισμένα γεωργικά εδάφη (Teotia et al., 2017). Ήδη από το 1890, έχουν αναγνωριστεί διάφοροι μικροοργανισμοί, όπως μύκητες (*Aspergillus* spp.), ακτινομύκητες και βακτήρια (*Pseudomonas* spp., *Bacillus mucilaginosus*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Paenibacillus*) για την ικανότητα απελευθέρωσης K από αδρανή ορυκτά που φέρουν K (Lian et al., 2008). Τα KSB είναι περισσότερο αποτελεσματικά στη διαλυτοποίηση του καλίου σε συγκεκριμένο εύρος pH 6,5–8,0 (Badr et al., 2006). Ωφέλιμα και μη ωφέλιμα για τα φυτά, βακτήρια έχουν χαρακτηριστεί ως KSB τα οποία ανήκουν σε διάφορα γένη, όπως *Achromobacter* sp, *Klebsiella* sp., *Sphingobacterium* sp, *Burkholderia* sp, *Paenibacillus* sp., *Bacillus* sp, *Pseudomonas* sp, *Serratia* sp., *Arthrobacter* sp, *Pantoea* sp, *Enterobacter* sp κ.α., επιδεικνύοντας καταβολική ευελιξία. Η ευελιξία οφείλεται στην ικανότητα παραγωγής οργανικών οξέων ως μηχανισμοί

διαλυτοποίησης του Κ και εξαρτάται από τη φύση των παραγόμενων μεταβολιτών (Soumare, et al., 2022).

#### **1.4.4) Παραγωγή σιδηροφόρων**

Ένα άλλο σημαντικό θρεπτικό συστατικό που απαιτείται από τα φυτά είναι ο σίδηρος (Fe), ο οποίος εντοπίζεται ως  $Fe^{3+}$  και  $Fe^{2+}$ , σε αδιάλυτα υδροξείδια σε αερόβιο περιβάλλον, που δεν είναι αφομοιώσιμα από τα φυτά. Τα σιδηροφόρα είναι χηλικοί παράγοντες χαμηλού μοριακού βάρους που έχουν συγγένεια με τον αδιάλυτο σίδηρο, που παράγουν και εκκρίνουν βακτήρια όπως *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Enterobacter* και *Serratia* (Ansari et al., 2017). PGPB παραγωγοί σιδηροφόρων, μπορούν να διαλυτοποιήσουν το σίδηρο από μέταλλα ή οργανικές ενώσεις υπό συνθήκες περιορισμού του σιδήρου κάνοντας σταθερά σύμπλοκα με βαρέα μέταλλα καθώς και με ραδιενεργά σωματίδια (Hider & Kong, 2017). Με αυτό τον τρόπο τα PGPB βοηθούν έμμεσα το φυτό-ξενιστή να μειώσει την καταπόνηση που προκαλείται από τα βαρέα μέταλλα στο έδαφος (Glick, 2012; Ahemad & Khan, 2012; Rajkumar et. al., 2012). Οι μηχανισμοί για την αφομοίωση του σιδήρου από τα φυτά μέσω των σιδηροφόρων μπορούν να διαφέρουν είτε μέσω χηλοποίησης και απελευθέρωσης σιδήρου, είτε μέσω της άμεσης πρόσληψης συμπλεγμάτων σιδηροφόρων-σιδήρου (Thomine & Lanquar, 2011).

#### **1.4.5) Παραγωγή φυτοορμονών**

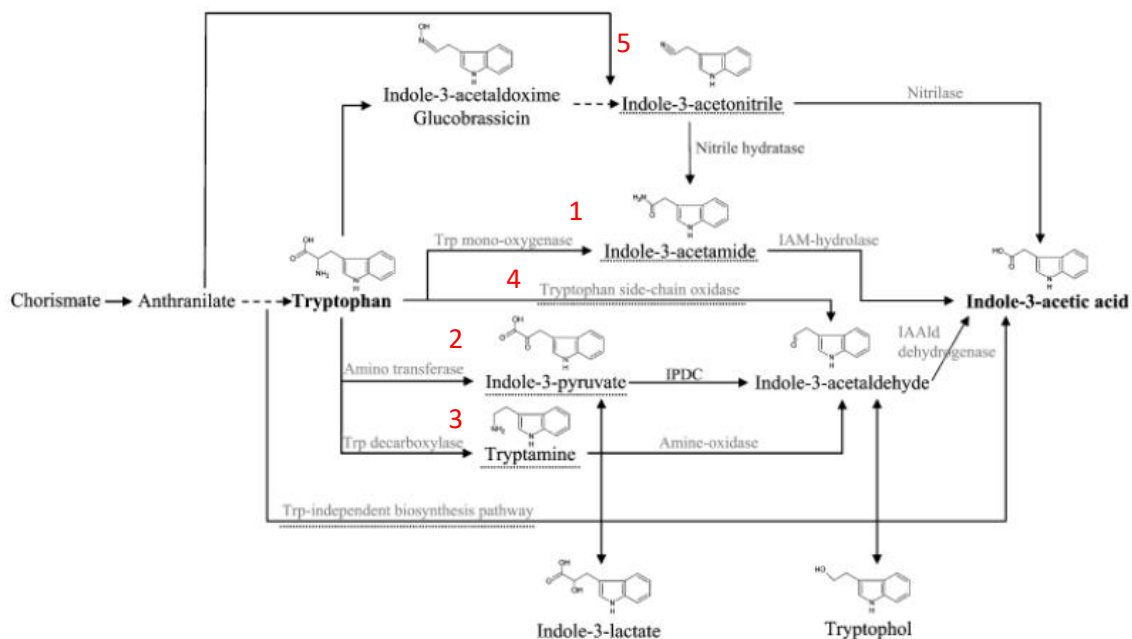
##### **1.4.5.1) Αυξίνη**

Ζωτικής σημασίας για τη φυτική παραγωγή αποτελεί η φυτοορμόνη αυξίνη (IAA). Η φυτοορμόνη αυτή συνδέεται άμεσα ή έμμεσα με την πλειοψηφία των φυσιολογικών φυτικών διεργασιών και σχετίζεται με την εγκατάσταση, τη διατήρηση και τη ρύθμιση συσχετίσεων μεταξύ φυτού-μικροοργανισμών. Η δράση των PGPB μπορεί να επηρεάσει την ποσότητα και τον εντοπισμό της καθώς και την κατεύθυνση της κίνησης της στο φυτό (Ahmed & Hasnain, 2014).

Πληθώρα εργασιών δείχνουν ότι διάφορα PGPB συνθέτουν αυξίνη στο μέσο καλλιέργειας (Sraepren et al., 2007; Ahmed & Hasnain, 2014), με την αντίδραση Salkowski, να αποτελεί μια φθηνή και προσιτή λύση ανίχνευσης και εκτίμησης της ποσότητας των ενώσεων ινδόλης στο υγρό μέσο καλλιέργειας (Contesto et al., 2010; Iqbal & Hasnain, 2013). Καθώς η αντίδραση αυτή δεν είναι ειδική για την αυξίνη, δεν είναι σίγουρο αν το εξεταζόμενο υποψήφιο PGPB μπορεί πράγματι να συνθέσει IAA ή άλλη βιολογικά ενεργή αυξίνη. Για να αποδειχθεί η βακτηριακά παραγόμενη αυξίνη χρησιμοποιούνται προηγμένες τεχνικές, όπως το GC-MS (Ali et al., 2009; Ali, 2015) και HPLC (Júnior et al., 2011). Η κύρια πρόδρομη ένωση για τη βακτηριακή σύνθεση της IAA είναι η τρυπτοφάνη, ενώ η ταυτοποίηση των ενδιάμεσων μεταβολικών προϊόντων, αποκάλυψε την ύπαρξη πέντε τρυπτοφανο-εξαρτόμενων διαφορετικών μονοπατιών (Remans

et al., 2006), διαμεσολαβημένων από πέντε ενδιάμεσα και ενός μη εξαρτώμενου μονοπατιού, που έχει εντοπιστεί στο *Azospirillum brasilense*.

Το 1<sup>ο</sup> μονοπάτι (IAM οδός) που πήρε το όνομα του από το Indole-3-acetamide (IAM) είναι οδός δύο βημάτων, στο οποίο η τρυπτοφάνη μετατρέπεται αρχικά σε IAM το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε IAA, με τη μεσολάβηση του ενζύμου τρυπτοφαν-2-μονοοξυγενάσης (IaaM), που κωδικοποιείται από το γονίδιο *iaaM* και από την υδρολάση του IAM (IaaH), αντίστοιχα σε κάθε βήμα χωριστά. Η οδός αυτή έχει εντοπιστεί σε διάφορα βακτήρια, όπως *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*, *Pantoea agglomerans*, *Rhizobium* και *Bradyrhizobium* (Sekine et al., 1989; Clark et al., 1993; Morris, 1995; Theunis et al., 2004). Το 2<sup>ο</sup> μονοπάτι (IPyA οδός) που πήρε το όνομα του από το Indole-3-pyruvate (IPyA), είναι τριών βημάτων και έχει εντοπιστεί τόσο σε φυτοπαθογόνα βακτήρια, όσο και σε ωφέλιμα π.χ. *Bradyrhizobium*, *Azospillum*, *Rhizobium*, *Enterobacter cloacae*, και κυανοβακτήρια. Αρχικά η τρυπτοφάνη μετατρέπεται σε IPyA το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε indole-3-acetaldehyde (IAAld) που μετατρέπεται εν τέλει σε IAA. Κάθε βήμα είναι ενζυμικά καταλυόμενο από την αμινοτρανσφεράση που καταλύει την τρανσαμίνωση του αρχικού βήματος, από την ινδολο-3-πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση (IPDC) του μεσαίου βήματος και από την αφυδραγονάση του IAAld για την οξείδωση του IAAld σε IAA. Το 3<sup>ο</sup> μονοπάτι (Tryptamine οδός) πήρε το όνομα του από το Tryptamine (TAM), το οποίο μετατρέπεται απευθείας σε IAAld από μια αμινοοξειδάση (Hartmann et al., 1983) και έχει εντοπιστεί στο *Bacillus cereus* (Perley & Stowe, 1966) και στο *Azospirillum* (Hartmann et al., 1983). Στο 4<sup>ο</sup> μονοπάτι η οξειδάση της πλευρικής αλυσίδας τρυπτοφάνης (TSO) μετατρέπει την τρυπτοφάνη απευθείας σε IAAld η οποία μπορεί να οξειδωθεί σε IAA (Oberhansli et al., 1991), παρακάμπτοντας την IPyA και έχει εντοπιστεί στο *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Τέλος το 5<sup>ο</sup> μονοπάτι (IAN οδός) που πήρε το όνομα του από το Indole-3-acetonitrile (IAN), αποτελείται από μια σειρά βημάτων που δεν έχουν διαλευκανθεί όλα στο ίδιο βαθμό. Έχει προταθεί ότι η τρυπτοφάνη μετατρέπεται σε IAN είτε μέσω της οδού των ινδολικών γλυκοζινολικών (οδός γλυκομπρασικίνης) είτε μέσω της ινδολο-3-ακεταλδοξίμης οδού (Bak et al., 2001; Zhao et al., 2001). Στη συνέχεια το παραγόμενο IAN, μετατρέπεται σε IAA καταλυόμενο από νιτριλάση (Bartling et al., 1992). Στην περίπτωση των *Rhizobium* spp., το IAN μετατρέπεται σε IAM και μετά σε IAA, με την αντίδραση μετατροπής να καταλύεται από το ένζυμο υδράση νιτριλίου και αμιδάση (IAM-hydrolase) (Kobayashi et al., 1995). Τα παραπάνω μονοπάτια βιοσύνθεσης του IAA εντοπίζονται και στα φυτά με εξαίρεση τα δύο τελευταία. Η βιοσύνθεση της IAA επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες τροποποιώντας την έκφραση των βιοσυνθετικών γονιδίων για την παραγωγή IAA (Sraepen et al., 2007; Sraepen & Vanderleyden, 2011).



**Εικόνα 1.10:** Επισκόπηση των διαφορετικών οδών σύνθεσης IAA σε βακτήρια. Το ενδιάμεσο που αναφέρεται στο όνομα του μονοπατιού ή στο ίδιο το μονοπάτι υπογραμμίζεται με διακεκομμένη γραμμή. IAAId, ινδόλη-3-ακεταλδεΐδη; IAM, ινδόλη-3-ακεταμίδιο; IPDC, ινδολο-3-πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση; Trp, τρυπτοφάνη (Remans et al., 2006).

#### 1.4.5.2) Κυτοκινίνες και Γιββερελίνες

Οι κυτοκινίνες εμπλέκονται σε διάφορες πτυχές της ζωής του φυτού (Schaller et al., 2014). Για παράδειγμα, οι κυτοκινίνες ρυθμίζουν τη χλωροφύλλη, τη βιοσύνθεση και βιογένεση των χλωροπλαστών (Cortleven & Schmuelling, 2015) και συμμετέχουν στην ανάπτυξη της ανοχής των φυτών σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις (Grosskinsky et al., 2011; O'Brien & Benkova, 2013). Τα PGPB έχει επιβεβαιωθεί ότι μπορεί να επηρεάσουν τη συγκέντρωση της φυτικής κυτοκινίνης, καθώς πολλά από αυτά μπορούν να συνθέσουν κυτοκινίνη (Arshad & Frankenberger, 1991; Glick, 2012). Στα ψυχανθή φυτά η εξωγενής εφαρμογή υψηλής συγκέντρωσης κυτοκινινών οδηγεί σε μείωση του αριθμού φυματίων, αντιθέτως η μειωμένη συγκέντρωση ενισχύει τη φυματογένεση. Αυτό συμβαίνει λόγω της δράσης των κυτοκινινών ως ρυθμιστές της κυτταρικής διαίρεσης και της ενεργοποίησης επιπλέον γονιδίων στην απόκριση αυτής. Ως αποτελεσματικοί παραγωγοί κυτοκινινών αναφέρονται τα στελέχη *Rhizobium* (Caba et al., 2000).

Οι γιββερελίνες (GA) είναι μια ομάδα τετρακυκλικών δι-τερπενοειδών ενώσεων που δρουν ως ορμόνες και εμπλέκονται σε διάφορες λειτουργίες στο φυτό. Τα PGPB μπορεί να επηρεάσουν την ποσότητα της ενδογενούς γιββερελίνης στα φυτά, με τρόπο παρόμοιο με άλλες ορμόνες, π.χ. συνθέτοντας γιββερελίνες (Bottini et al., 2004). Η GA βιοσύνθεση είναι γονιδιακά ρυθμισμένη μέσω οπερονίων για (i) ισοπρενοειδείς διφωσφορικές συνθάσες, (ii) διτερπενικές κυκλάσες, (iii) μονοοξυγενάσες του κυτοχρώματος P450, (iv) φερρεδοξίνες και (v)

αφυδρογονάσες/αναγωγάσες βραχείας αλυσίδας. Το οπερόνιο βιοσύνθεσης GA βρίσκεται πάντα εντός συμβιωτικής νησίδας ή πλασμιδίου και ελέγχεται από προαγωγείς NifA-RpoN (Hershey et al., 2014; Salazar, et al., 2010; Dombrecht, et al., 2002; Hauser, et al., 2007), οι οποίοι εμπλέκονται κυρίως στη δέσμευση αζώτου και παίζουν ρόλο στη συμβιωτική αλληλεπίδραση ριζόβιων –ψυχανθών.

#### **1. 4.5.3) Αμπσισικό οξύ**

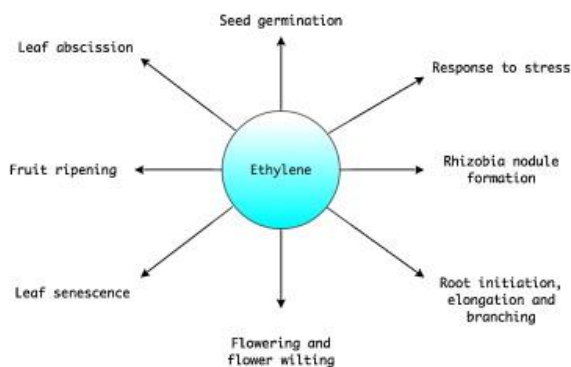
Εκτός από την αυξίνη, τις γιββερέλινες και τις κυτοκινίνες, το αμπσισικό οξύ αποτελεί μια ακόμα ορμόνη με ρυθμιστικό ρόλο για τη φυτική ανάπτυξη. Η βακτηριακά παραγόμενη φυτοορμόνη αμπσισικό οξύ (abscisic acid, ABA), συντίθεται σε συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης του εδάφους (π.χ. ξηρασία, κρύο, αλατότητα, ρύπανση) και παίζει σημαντικό ρόλο στο μετριασμό των επιπτώσεων αυτής (Sah et al., 2016). Η ορμόνη αυτή συμβάλλει στη συσσώρευση οσμολυτών, διαφόρων προστατευτικών πρωτεϊνών, επηρεάζει την αρχιτεκτονική του ριζικού συστήματος (Munemasa et al., 2015; Sah & Singh, 2016; Egamberdieva et al., 2017), ρυθμίζει τη χρησιμοποίηση του νερού από το περιβάλλον, προκαλώντας κατακράτηση στους φυτικούς ιστούς (Fadiji et al., 2022) και μετριάζει την πίεση λόγω έλλειψης νερού ρυθμίζοντας την ακουαπορίνη (Zhou et al., 2012).

Στα ριζόβια, η παραγωγή ABA έχει έμμεση δράση στην ανοχή των φυτών σε συνθήκες πίεσης. Η εξωγενής εφαρμογή ABA επιφέρει ανασταλτική επίδραση στη φυματιογένεση συνοδευόμενη από μειωμένο αριθμό φυματίων (Ferguson & Mathesius, 2003). Η δράση των PGPB αναφορικά με τη ρύθμιση του ABA θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως αμφιλεγόμενη καθώς άλλα PGPB είναι παραγωγοί (*Bacillus licheniformis* Rt4M10, *Pseudomonas fluorescens* Rt6M10, *Azospirillum brasilense* Sp 245), άλλα αποδομητές (*Rhodococcus* sp. P1Y, *Novosphingobium* sp. P6W) και άλλα με δράση που μειώνει τα επίπεδα του ABA στο φυτό-ξενιστή χωρίς να είναι απαραίτητα αποδομητές αυτής (Jiang et al., 2012; Salomon et al., 2014; Cohen et al., 2015). Φυτοορμόνες παραγόμενες από PGPB μπορούν να εμφανίζουν ανταγωνιστική δράση, δρώντας η μια αντίθετα από την άλλη, όπως συμβαίνει με τις γιββεριλλίνες και τις κυτοκινίνες που δρουν ως ανταγωνιστές του ABA (Cohen et al., 2009).

#### **1.4.5.4) Αιθυλένιο**

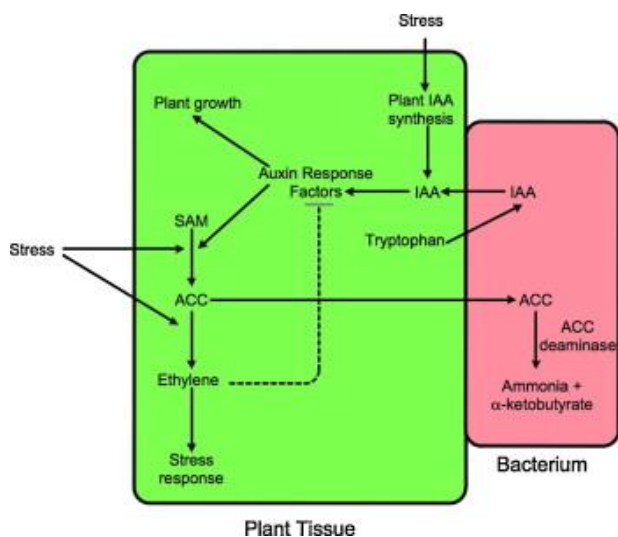
Η ορμόνη αιθυλένιο, βρίσκεται σε όλα τα ανώτερα φυτά και αποτελεί έναν επιπλέον σημαντικό ρυθμιστή της φυσιολογικής ανάπτυξης, καθοριστικής σημασίας στην απόκριση τους απέναντι σε ένα ευρύ φάσμα καταπονήσεων (Abeles et al., 1992). Η ορμόνη αυτή επηρεάζει πολλά αναπτυξιακά στάδια του φυτού καθώς και διάφορες διεργασίες στις οποίες συμμετέχει το φυτό, συμπεριλαμβανομένης της φυματιογένεσης στα ψυχανθή (Goodlass & Smith 1979) και των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσει με ωφέλιμους μυκοριζικούς μύκητες (**Εικόνα 1.11**). Η δράση του αιθυλενίου μπορεί να είναι ανασταλτική της ανάπτυξης των φυτών ή διεγερτική,

ανάλογα με το είδος του φυτού και τη συγκέντρωση ορμονών (Vandenbussche & van der Straeten, 2012).



**Εικόνα 1.11:** Η επίδραση του αιθυλενίου σε μεγάλο αριθμό διαφορετικών διεργασιών σχετικών με τη φυτική ανάπτυξη (Glick, 2014).

Τα PGPB μπορούν να αλλάξουν τα επίπεδα του αιθυλενίου. Η ρύθμιση των επιπέδων της ορμόνης αυτής επηρεάζεται από την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα σύνθεσης αιθυλενίου, ACC-συνθάση και ACC-οξειδάση, επιφέροντας αλλαγές στο φυτό όπως στην ανάπτυξη του ριζικού συστήματος (Ivanchenko et al., 2008). Η ρύθμιση των επιπέδων του αιθυλενίου διαμεσολαβείται από τη βακτηριακή ACC απαμινάση αλλά και από την παραγωγή IAA, που εμπλέκονται στο μονοπάτι βιοσύνθεσης του αιθυλενίου (**Εικόνα 1.12**). Στα φυτά υπό συνθήκες πίεσης, η πρόδρομη ένωση S-αδενοσυλ μεθειονίνη (SAM) μετατρέπεται σε 1-αμινοκυκλοπροπανο-1-καρβοξυλικό (ACC) μέσω του ενζύμου ACC-συνθάση. Στη συνέχεια, το ACC μετατρέπεται περαιτέρω σε αιθυλένιο από το ένζυμο ACC οξειδάση (Yu et al., 1979; Glick, 2014).



**Εικόνα 1.12:** Σχηματικό μοντέλο του τρόπου με τον οποίο τα βακτήρια προάγουν την ανάπτυξη των φυτών, παράγοντας ACC απαμινάση και IAA. Συντομογραφίες: ACC, 1-αμινοκυκλοπροπανο-1-καρβοξυλικό; IAA, ινδολο-3-οξικό οξύ; SAM, S-αδενοσυλ μεθειονίνη (Glick, 2014).

Παράλληλα η έκκριση του ACC από τις ρίζες στο έδαφος επάγει τη βιοσύνθεση του ενζύμου ACC-απαμινάση από βακτήρια που φέρουν το αντίστοιχο γονίδιο (*acdS*), μειώνοντας έτσι τα επίπεδα του ACC, συνεπώς και της ποσότητας του αιθυλενίου που θα μπορούσε δυνητικά να

σχηματιστεί στο φυτό. Ο μηχανισμός αυτός από την πλευρά των βακτηρίων προάγει την ανάπτυξη των φυτών μετά από ένα ευρύ φάσμα αβιοτικών και βιοτικών καταπονήσεων, κάνοντας τα φυτά να έχουν μακρύτερες ρίζες και βλαστούς και να είναι πιο ανθεκτικά σε συνθήκες που ευνοούν την παραγωγή αιθυλενίου (Glick, 2014). Στη βακτηριακά διαμεσολαβούμενη τροποποίηση των παραγόμενων από το φυτό επιπέδων αιθυλενίου, έχει προταθεί η εμπλοκή βακτηρίων που παράγουν IAA, με το IAA να δρα ενεργοποιώντας τη μεταγραφή της ACC-συνθάσης, οδηγώντας σε παραγωγή σχετικά υψηλών συγκεντρώσεων ACC.

Τα βακτήρια που παράγουν IAA μπορεί να δρουν τελικά ανασταλτικά στην ανάπτυξη των φυτών, αν και αυτό στην πραγματικότητα δεν συμβαίνει. Η αύξηση των επιπέδων αιθυλενίου στα φυτά, ασκεί αρνητική επανατροφοδότηση στην παραγωγή και στη μεταγωγή σήματος IAA περιορίζοντας έτσι το βαθμό στον οποίο το IAA μπορεί να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή της ACC-συνθάσης (Burg & Burg, 1966; Morgan & Gausman, 1966; Pierik et al., 2006; Prayitno et al., 2006; Czarny et al., 2007; Glick et al., 2007; Stearns et al., 2012). Παρουσία PGPB που εκκρίνουν IAA και συνθέτουν ACC-απαμινάση, τα επίπεδα αιθυλενίου στα φυτά δεν αυξάνονται στον ίδιο βαθμό όπως όταν τα φυτά αλληλεπιδρούν με PGPB που εκκρίνουν IAA αλλά δεν συνθέτουν ACC-απαμινάση. Το αιθυλένιο είναι πολύ λιγότερο παρουσία ACC-απαμινάσης και τότε ακολουθεί αρνητική ανατροφοδότηση της μεταγωγής σήματος IAA, επιτρέποντας τη βακτηριακή παραγωγή της IAA που θα συνεχίσει να προάγει την ανάπτυξη των φυτών και την αύξηση της μεταγραφής της ACC-συνθάσης. Ωστόσο, σε αυτή την περίπτωση, ένα μεγάλο μέρος του πρόσθετου ACC που συντίθεται διασπάται από τη βακτηριακή ACC-απαμινάση. Το καθαρό αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης μεταξύ IAA και ACC απαμινάσης είναι ότι μειώνοντας τα επίπεδα αιθυλενίου στα φυτά, η ACC-απαμινάση διευκολύνει τη διέγερση της ανάπτυξης των φυτών από την IAA.

#### **1.4.6) Αντιμικροβιακοί μεταβολίτες**

PGPB που ανήκουν στα γένη *Bacillus*, *Pseudomonas* και *Streptomyces* (Meena et al., 2019; Almoneafy et al., 2021; Ngalimat et al., 2021) παράγουν δευτερογενείς μη πτητικούς μεταβολίτες με αντιμικροβιακή δράση δρώντας ως βιολογικοί παραγόντες ελέγχου για τη βιώσιμη γεωργία. Τέτοιου τύπου μεταβολίτες είναι οι φαιναζίνες (phenazine), οι φλωρογλυκινόλες (phloroglucinols), η πυολουτεορίνη (pyoluteorin), η πυρρολνιτρίνη (pyrrolnitrin), και τα λιποπεπτίδια (lipopeptides) για την καταστολή των φυτοπαθογόνων.

Για παράδειγμα οι φαιναζίνες είναι ετεροκυκλικές αζωτούχες ενώσεις που παράγονται από τα βακτηριακά γένη *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Brevibacterium* και *Streptomyces* (Chen et al., 2014; Dasgupta et al., 2015) και εμφανίζουν αποτελεσματική δράση έναντι διαφόρων μυκητιακών και βακτηριακών παθογόνων όπως τα *Gaeumannomyces graminis*, *Pythonium* sp.

και *Erwinia amylovora* (Saraf et al., 2014). Οι φθορογλουκινόλες αποτελούν αντιβιοτικό ευρέως φάσματος που παράγεται από πολλά στελέχη βακτηρίων όπως στελέχη *Pseudomonas fluorescens* που προκαλούν διασυστηματική αντίσταση (Dwivedi et al., 2003). Στελέχη *Pseudomonas* παράγουν επίσης πυρρολιτρίνη που είναι μεταβολίτης με ευρύ αντιμυκητιακό φάσμα και εξαιρετική μυκητοκτόνο δράση έναντι φυτικών παθογόνων μυκήτων όπως *Rhizoctonia solani*, *Fusarium graminearum* και *Phytophthora capsici*. Οι πυολολουτεορίνες παράγονται από φθορίζοντα στελέχη *Pseudomonas* και έχουν μυκητοκτόνα, βακτηριοκτόνα και ζιζανιοκτόνα δράση (Takeda, 1959; Mishra et al., 2018). Στελέχη *Pseudomonas* και *Bacillus* sp. αναφέρεται ότι παράγουν λιποπεπτίδια με αντιμικροβιακό χαρακτήρα και μέσω αυτών επάγεται η ανοχή των φυτών σε παθογόνα, καθώς διεγείρεται και ενισχύεται ο αμυντικός μηχανισμός τους. Παράλληλα οι ενώσεις αυτές μπορούν να διευκολύνουν τη διαδικασία αποικισμού των ριζών (Babalola et al., 2012; Glick et al., 2012).

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από τα βακτήρια εμφανίζουν τεράστια ποικιλία και μπορεί να είναι πολυκετίδια (polyketide, PK), παραγόμενα από πολυκετιδικές συνθάσες (PKSs) ή μη ριβοσωμικά πεπτίδια (NRPs) παραγόμενα από μη ριβοσωμικές πεπτιδικές συνθάσες (NRPSs) ή υβρίδια της δράσης των PKS–NRPSs (Fisch, 2013). Τα PK εμφανίζουν ποικίλες βιολογικές δραστηριότητες, τα ένζυμα που τα συνθέτουν έχουν δράση κετοσυνθάσης (KS) και ανήκουν σε τρεις ομάδες (PKSs τύπου I, τύπου II, τύπου III). PK όπως οι μακρολακτάμες που περιέχουν β-αμινοξέα, η εντεροκίνη και τα φαινολικά λιπίδια συντίθενται από PKS τύπου I, τύπου II και τύπου III, αντίστοιχα (Miyanaga, 2017). Χαρακτηριστικό παράδειγμα PK ένωσης είναι ο μεταβολίτης πυολολουτεορίνη.

Οι NRPSs είναι σημαντικά βιοσυνθετικά ένζυμα για την παραγωγή των NRPs, τα οποία είναι πολύ διαφορετικά και εκτενώς τροποποιημένα πεπτίδια (Süssmuth & Mainz, 2017). Η ποικιλομορφία αυτή οφείλεται στη συνδυαστική ικανότητα ενσωμάτωσης ενός διευρυμένου φάσματος μονομερών μαζί με πεπτίδια που έχουν εκτεταμένες τροποποιήσεις τόσο κατά τη διάρκεια της συναρμολόγησης της αλυσίδας όσο και μετά (Walsh et al., 2013). Για την επίτευξη της σύνθεσης των NRPs, τα ελάχιστα ενζυμικά σύμπλοκα που χρησιμοποιούνται περιέχουν τέσσερις διακριτές περιοχές που ονομάζονται πυρήνες ή βασικές περιοχές (Marahiel et al., 2016). Στην πρώτη περιοχή (A) λαμβάνει χώρα η αδενυλίωση όπου στρατολογούνται μη πρωτεϊνογόνα μονομερή αμινοξέων, συμπεριλαμβανομένων, για παράδειγμα, L-, D- και α-, β- ή δ-αμινοξέων καθώς και 2-αμινοϊσοβουτυρικό οξύ (Aib, που υπάρχει σε πεπταϊβόλες), υδροξυφαινογλυκίνη (Hpg, που υπάρχει σε αντιβιοτικά γλυκοπεπτιδίων) ή διυδροξυβενζοϊκό (Dhb, που βρίσκεται σε πολλά σιδηροφόρα) (Caboche et al., 2010). Στη συνέχεια το ενεργοποιημένο πλέον μονομερές μεταφέρεται και προσδένεται ομοιοπολικά στην περιοχή



θειολίωσης (T) ή αλλιώς PCP για πρωτεΐνη φορέα πεπτιδυλίου (Izore & Cryle, 2018). Η τρίτη περιοχή είναι η περιοχή συμπύκνωσης (C) που καταλύει το σχηματισμό δεσμού πεπτιδίου (αμιδίου) μεταξύ των μονομερών που μεταφέρονται από τις γειτονικές περιοχές T. Διαφορετικοί υπότυποι περιοχών C έχουν εντοπιστεί που σχετίζονται με τη φύση των συμπυκνωμένων μονομερών (Rausch et al., 2007). Η τελευταία και τερματική περιοχή (Te) είναι η περιοχή δράσης της θειοεστεράσης η οποία καταλύει την απελευθέρωση του νεοσχηματισμένου μη ριβοσωμικού πεπτιδίου από το σύμπλεγμα ενζύμων. Το πεπτίδιο μπορεί να απελευθερωθεί με υδρόλυση για την παραγωγή γραμμικών ενώσεων όπως η ACV (αμινοαδипικό οξύ-κυστεΐνη-βαλίνη), που είναι πρόδρομη ένωση του αντιβιοτικού πενικιλίνης (Tahlan et al., 2017) ή μέσω ενδομοριακής αντίδρασης, παράγοντας κυκλικό πεπτίδιο (Sieber & Marahiel, 2005). Τα λιποπεπτίδια κυκλικά ή μη ανήκουν στην κατηγορία των NRPs, με τα κυκλικά να αποτελούν κύρια βιοεπιφανειοδραστικά βακτηριακής προέλευσης, η δράση των οποίων τα κάνει να έχουν πολύ ενδιαφέρουσες εφαρμογές (Raaijmakers et al., 2010; Esmaeel et al., 2018; Geudens & Martins, 2018). Στην παραγωγή των περισσότερων λιποπεπτιδίων εμπλέκονται γονίδια οργανωμένα σε οπερόνια όπως το οπερόνιο για την surfactin (*srfAABCD*), το οπερόνιο για την bacillomycin (*bamDABC*), το οπερόνιο για την iturin (*ituDABC*), το οπερόνιο για την fengycin (*fenABCDE*), το οπερόνιο για την plipastatin (*ppsABCDE*) και το οπερόνιο για το mycosubtilin που απαρτίζεται από τα γονίδια *fenF*, *mycA*, *mycB* και *mycC*.

#### **1.4.6.1) Πτητικές οργανικές ενώσεις (VOCs)**

Τα βακτήρια ως αποτέλεσμα διαφόρων οδών ζύμωσης, παράγουν πολυάριθμους δευτερογενείς μεταβολίτες πτητικής φύσης, όπως παράγωγα λιπαρών οξέων, αρωματικές ενώσεις που περιέχουν άζωτο και θείο (Schulz, & Dickschat, 2007; Kai & Piechulla, 2009; Piechulla et. al., 2017) που διαχέονται στους πόρους του εδάφους, επιτρέποντας την απορρόφηση τους από τις ρίζες. Αυτές οι πτητικές ενώσεις παρουσιάζουν διαφορές στις χημικές τους δομές (**Εικόνα 1.13**) που κυμαίνονται από αλειφατικές (διμεθυλοδισουλφίδιο), αρωματικές (ινδόλη), κετόνες, αλκάνια ή αλκένια (1-ενδεκένιο) και τερπένια (π.χ. γεωσμίνη) (Effmert et. al., 2012; Peñuelas et. al., 2014).

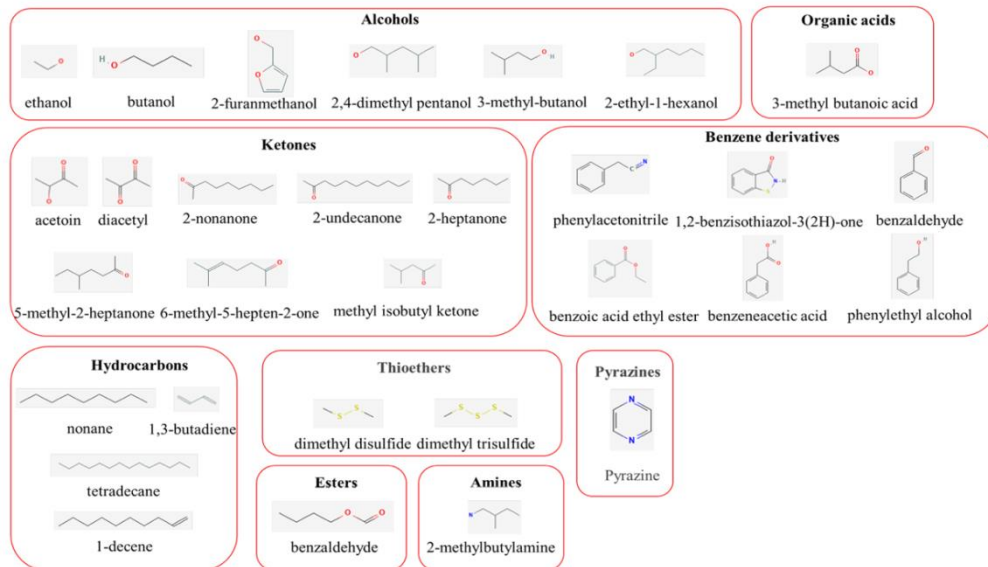
Κάθε βακτηριακό στέλεχος παράγει διαφορετικό συνδυασμό πτητικών ενώσεων διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση των βακτηρίων με άλλους οργανισμούς. Για παράδειγμα αναφέρεται ότι οι βακτηριακές πτητικές ενώσεις πυροδοτούν μονοπάτια σηματοδότησης της αυξίνης, της γιββερελίνης, των κυτοκινινών, του σαλικυλικού οξέος και των βρασινοστεροειδών (Ryu et al., 2003; Zhang et al., 2007; Zhang et al., 2008; Meena et al., 2017). Έτσι, μέσω των ενώσεων αυτών τα PGPB ενισχύουν την ανάπτυξη των φυτών, τη βλάστηση των σπόρων, την παραγωγή βιομάζας, διεγείρουν την ανθοφορία, βελτιώνουν το

σχηματισμό καρπών και σπόρων ενώ δρουν επιπλέον και ως παράγοντες ρύθμισης της λοιμογόνου δράσης των φυτοπαθογόνων συμβάλλοντας στο μετριασμό των επιπτώσεων που προκαλούν οι συνθήκες καταπόνησης (Zhang et al., 2007; Ossowicki et al., 2017; Sharifi et al., 2018).

Τα μικροβιακά VOCs (mVOCs) βελτιώνουν την ανοχή των φυτών στην ξηρασία κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής του φυτού (Narayananamy et al., 2020). Από τα mVOC, η πτητική ένωση 2,3-βουτανοδιόλη φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο στη βελτίωση της ανταπόκρισης των φυτών υπό συνθήκες ξηρασίας, διεγείροντας τη σύνθεση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) στα φυτά. Επίσης, ορισμένα mVOC, όπως π.χ. οξικό οξύ, μπορούν να προωθήσουν την παραγωγή βιοϋμενίου και εξωπολυσακχαριτών (Chen et al., 2015), επηρεάζοντας έμμεσα την ανοχή των φυτών στην ξηρασία.

Πτητικές ενώσεις όπως η διμεθυλεξαδεκυλαμίνη και η ινδόλη ενισχύουν το μήκος των πρωτογενών και πλευρικών ριζών και την πυκνότητα των ριζικών τριχιδίων, γεγονός που αυξάνει έμμεσα τον όγκο και την επιφάνεια της ρίζας (Castulo-Rubio et al., 2015). Η 2,3-βουτανοδιόλη και η πρόδρομή της ακετοΐνη επάγουν την ανάπτυξη των φυτών και τη διασυστημική αντίσταση στα φυτά (Farag et al., 2006). Σε άλλες περιπτώσεις η παραγωγή πτητικών ενώσεων αναστέλλει την ανάπτυξη φυτοπαθογόνων όπως το *Rhizoctonia solani* και το *Fusarium culmorum* (Tyc et al., 2017). Στελέχη του γένους *Bacillus*, *Paenibacillus* και *Pseudomonas* αποτελούν μερικές από τις βασικές πηγές παραγωγής VOCs με αντιμικροβιακή δράση (Zhao et al., 2022), στις οποίες προστίθενται και στελέχη του γένους *Enterobacter* (Toh et al., 2016; Gong et al., 2019).

Το υδροκυάνιο είναι επίσης πτητικός δευτερογενής μεταβολίτης που εκκρίνεται από διάφορα gram-θετικά και gram-αρνητικά βακτήρια που δρουν ως παράγοντες βιοελέγχου κατά των φυτοπαθογόνων που μεταδίδονται στο έδαφος (Askeland & Morrison, 1983; Haas & Defago, 2005). Το HCN δρα ως ισχυρός αναστολέας διαφόρων μεταλλικών ενζύμων (Cho et al., 2013) και συμβάλλει στην πρόληψη πολλών ασθενειών των φυτών όπως η σήψη της ρίζας και η μαύρη σήψη φυτών τομάτας (Voisard et al., 1989) παρουσιάζοντας επιπροσθέτως νηματωδοκτόνο δράση (Anderson & Kim, 2018).



**Εικόνα 1.13:** Κατηγορίες των κύριων δραστικών πτητικών οργανικών ενώσεων (VOCs) βακτηριακής προέλευσης, με πολλά υποσχόμενη αντιμικροβιακή δράση στο βιοέλεγχο των φυτοπαθογόνων (Tilocca et al., 2020).

#### 1.4.7) Υδρολυτικά Ένζυμα

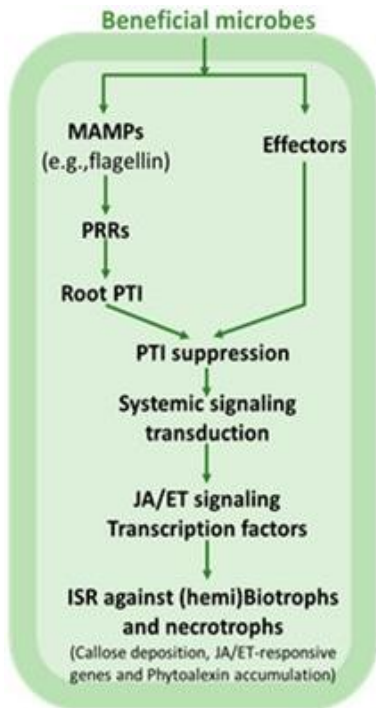
Τα υδρολυτικά ένζυμα που παράγουν τα PGPB όπως η χιτινάση, πρωτεΐνάση, κυτταρινάση και οι γλυκανάσες, καταστέλλουν άμεσα την ανάπτυξη των φυτικών παθογόνων βλάπτοντας τη δομική ακεραιότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων τους (Budi et al., 2000), ενώ σε άλλες περιπτώσεις προκαλούν την αποικοδόμηση των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος σε μύκητες και ωομύκητες (Chet & Inbar, 1994). Επίσης, τα βακτηριακής προέλευσης ένζυμα καταστρέφουν τα ωοσπόρια, επηρεάζουν τη βλάστηση των σπορίων και την επιμήκυνση του βλαστικού σωλήνα των φυτοπαθογόνων μυκήτων (Frankowski et al., 2001). Μικροβιακά στελέχη όπως *Serratia marcescens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* και *Bacillus thuringiensis*, που παράγουν τα ένζυμα αυτά, μπορούν να ελέγξουν πολλά φυτοπαθογόνα όπως *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *Pythium ultimum* κ.λπ. (Someya et al., 2000). Συνεπώς, βακτήρια που παράγουν υδρολυτικά ένζυμα αποτελούν παράγοντες βιοελέγχου για την καταπολέμηση των φυτοπαθογόνων μυκήτων (Someya et al., 2007).

#### 1.4.8) Διασυστημική Ανθεκτικότητα

Η επαγόμενη ή αλλιώς επίκτητη διασυστημική ανθεκτικότητα είναι η ενίσχυση του μηχανισμού φυσικής άμυνας χωρίς την αλλαγή του γονιδιώματος του φυτού. Το ανοσοποιητικό σύστημα των φυτών εξαρτάται από την ικανότητα συγκεκριμένων υποδοχέων (PRRs), να αναγνωρίζουν διατηρημένα μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με ωφέλιμα και παθογόνα μικρόβια που ονομάζονται MAMPs (Microbe Associated Molecular Patterns) και PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns), αντίστοιχα. Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι

η ενεργοποίηση της ανοσίας που προκαλείται από τα M/PAMP η οποία είναι γνωστή ως MAMP-triggered immunity (MTI) και ως PAMP-triggered immunity (PTI) (M/PTI), αντίστοιχα. Όταν τα παθογόνα καταστέλλουν με επιτυχία το PTI εκκρίνουν μολυσματικά μόρια τελεστών, τα φυτά με τη σειρά τους κωδικοποιούν την εκφραση υποδοχέων μέσω των γονιδίων αντίστασης (R) που αναγνωρίζουν συγκεκριμένους παθογόνους παράγοντες, οδηγώντας σε ανοσία που προκαλείται από τελεστές (effector-triggered immunity, ETI). Έπειτα λαμβάνει χώρα και δευτερεύουσα σηματοδότηση μέσω της ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής κινάσης μιτογόνου (Mitogen Activated Protein Kinase, MAPK), των αμυντικών φυτοορμονών και άλλων εμπλεκόμενων παραγόντων μεταγραφής. Οι διαδικασίες αυτές επιφέρουν πολυάριθμες αμυντικές αποκρίσεις, συμπεριλαμβανομένης της εναπόθεσης καλλόζης, λιγνίνης και του κλεισίματος των στοματίων για να περιορίσουν την είσοδο των παθογόνων στον ξενιστή. Επιπλέον, δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) παράγονται με τοξική επίδραση κατά των παθογόνων, οδηγώντας σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (program cell death, PCD) στις εστίες μόλυνσης για την καταστολή της εξάπλωσης του παθογόνου. Άλλες ενώσεις που παράγονται στα πλαίσια του φυτικού αμυντικού μηχανισμού είναι αμυντικές φυτοορμόνες και αντιμικροβιακές ενώσεις, όπως φυτοαλεξίνες, πρωτεΐνες που σχετίζονται με παθογόνα (pathogen-related, PR) και/ή αντιμικροβιακά πεπτίδια (defensins και thionins). Ο μηχανισμός αυτός οδηγεί στο τέλος σε διασυστημική αντίσταση η οποία όταν προκαλείται από παθογόνα ονομάζεται SAR (systemic acquired resistance) και όταν προκαλείται από ωφέλιμα μικρόβια ISR (induced systemic resistance) (Liu et al., 2009; Nishad et al., 2020).

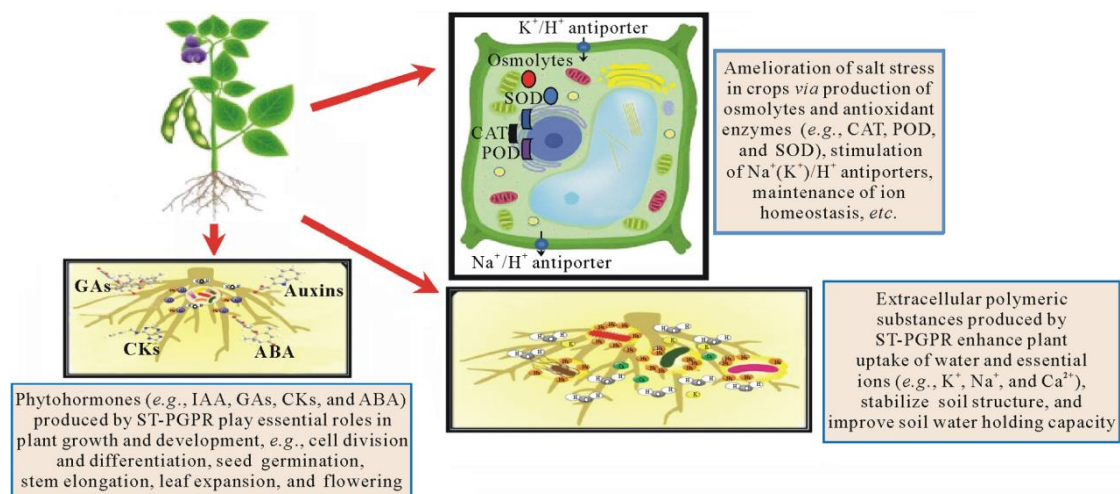
Η ISR μπορεί να προκληθεί μέσω του αποικισμού με στελέχη PGPB κοντά στις ρίζες των φυτών οδηγώντας σε αποτελεσματική αντιμετώπιση ενός ευρέως φάσματος φυτοπαθογόνων και ταυτόχρονα να διεγείρει την ανάπτυξη των φυτών (Beneduzi et al., 2012; Yadav et al., 2021). Στην πυροδότηση του ISR εμπλέκονται διάφοροι μηχανισμοί όπως το μονοπάτι σηματοδότησης του αιθυλενίου και του γιασμαμονικού οξέος (Choudhary et al., 2007; Pieterse et al., 2014). Το σαλικυλικό και γιασμαμονικό οξύ αποτελούν σηματοδοτικά μόρια εμπλεκόμενα στη διασυστημική επίκτητη αντίσταση (SAR) και την επαγόμενη διασυστημική αντίσταση (ISR), αντίστοιχα (van der Ent et al., 2009). Επιπλέον, το γιασμομονικό οξύ εμπλέκεται και στην ανάπτυξη ανοχής υπό αβιοτικές συνθήκες καταπόνησης (Ahmad et al., 2017). Παρόλο που οι δυο παραπάνω φυτοορμόνες εμπλέκονται στην πρόκληση ανθεκτικότητας του φυτού, φαίνεται ότι υπάρχει ανταγωνιστική δράση μεταξύ των αντίστοιχων σηματοδοτικών οδών (Yang et al., 2015).



Εικόνα 1.14: Ανοσολογική απόκριση φυτού επαγόμενη από ωφέλιμα μικρόβια (Nguyen et al., 2022).

#### 1.4.9) Ανοχή σε αβιοτικές καταπονήσεις

Τα PGPB προκαλούν ανοχή στα φυτά έναντι αβιοτικών καταπονήσεων με άμεσους αλλά και έμμεσους μηχανισμούς (Yang et al., 2009), οι οποίοι ρυθμίζουν την οσμωτική ισορροπία, την ομοιόσταση ιόντων, τη σηματοδότηση φυτορμονών και ενισχύουν τη δραστηριότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) και η υπεροξειδάση (POD) (Stefan et al., 2013; Azarmi et al., 2016; Ilangumaran & Smith, 2017). PGPB όπως τα *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Pantoea*, *Burkholderia* και *Rhizobium* ενισχύουν την ανοχή των φυτών έναντι της ξηρασίας, της αλατότητας, της θερμικής καταπόνησης και των τραυματισμών λόγω ψύξης (Noorieh et al., 2013; Jha & Subramanian, 2014; Egamberdieva et al., 2019).



Εικόνα 1.15: Διαμεσολαβούμενοι από PGPB-φυτικοί μηχανισμοί αντιμετώπισης καταστάσεων καπνότητας (Kumawat et al., 2023).

#### 1.4.9.1) Ωσμοπροστασία και Ομοιόσταση ιόντων

Τα RGPB που σχετίζεται με τα φυτά συμβάλλουν στο μετριασμό της οσμωτικής καταπόνησης λόγω υδατικής καταπόνησης, παράγοντας συμβατές διαλυμένες ουσίες (οσμολύτες), όπως η προλίνη, η τρεχαλόζη, οι πολυαμίνες και οι βεταΐνες, οι οποίες βοηθούν στη διατήρηση της οσμωτικής ισορροπίας, προστατεύουν τα φυτά από την κυτταρική οξειδωτική βλάβη (Paul & Nair, 2008; Ilangumaran et al., 2017) και βοηθούν στην ενίσχυση της ανάπτυξης των φυτών (Paul et al., 2008). Τα αμινοξέα και τα οργανικά οξέα που παράγονται από τα RGPB συμμετέχουν στη διατήρηση του υδατινού δυναμικού από το έδαφος στα φυτά, ενώ το οσμωτικό δυναμικό ρυθμίζεται από το διαλυτό σάκχαρο (Joune et al., 2004). Για παράδειγμα, σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης, φυτά αραβοσίτου εμβολιασμένα με *Bacillus* sp. εμφανίζουν ενισχυμένο περιεχόμενο σε προλίνη (Vardharajula et al., 2011). Σε αυτού του είδους την περιβαλλοντική πίεση έχει φανεί ότι η εφαρμογή του *Rhizobium etli* σε φυτά φασολιάς οδηγεί σε υπερέκφραση του γονιδίου της συνθάσης της 6-φωσφορικής τρεχαλόζης, υποδηλώνοντας την ενίσχυση των προϊόντων της έκφρασης γονιδίων που ανταποκρίνονται στην πίεση αυτή, όπως η τρεχαλόζη. Ακόμα, άλλες ωσμοπροστατευτικές ουσίες, όπως η γλυκίνη και η βεταΐνη, βοηθούν τόσο στην ενζυμική σταθερότητα όσο και στην σταθερότητα των πρωτεϊνικών μεμβρανών. Η αύξηση του περιεχομένου σε οσμολύτες (χολίνη, βεταΐνη και γλυκίνη) έχει παρατηρηθεί και από τους Zhang et al. (2010), μετά από εφαρμογή *Bacillus subtilis* σε φυτά *Arabidopsis*. Η προστατευτική αυτή δράση των RGPB (ειδικά εκείνων με ανοχή στην αλατότητα), οφείλεται στην υψηλή έκφραση των γονιδίων π.χ. για τη βιοσύνθεση της προλίνης (Saum & Müller, 2007) και τρεχαλόζης (Qin et al., 2018; Egamberdieva et al., 2019; Orozco-Mosqueda et al., 2019; Shim et al., 2019).

Φυτά καταπονημένα λόγω ξηρασίας, εμφανίζουν ριζικό σύστημα χαρακτηριστικής αρχιτεκτονικής. Στο σύστημα αυτό, περιλαμβάνονται η δομή, η γεωγραφική κατανομή δευτερογενών και πρωτογενών ριζών, η διάμετρος της ρίζας κ.α. Σε καταστάσεις έλλειψης υγρασίας, η ευελιξία της ρίζας για την απόκριση σε αυτού του είδους την πίεση αποτελεί πολύτιμο εργαλείο (Ngumbi & Klopper, 2016). Τόσο η ανάπτυξη όσο και η ευελιξία των ριζών σχετίζεται με την αρχιτεκτονική της ρίζας η οποία υπόκειται σε αλλαγές μεσολαβούμενες από RGPB. Αλλαγές τέτοιου τύπου μπορεί να σχετίζονται με την αύξηση του εμβαδού της επιφάνειας της ρίζας επιφέροντας θετικές αλλαγές ως προς την πρόσληψη θρεπτικών ουσιών και νερού, γεγονός με σημαντικό αντίκτυπο σχετικά με την ανοχή στην ξηρασία (Ngumbi & Klopper, 2016; Abdelaal et al., 2021). Τα RGPB παράγουν σηματοδοτικά μόρια που αλλάζουν την αρχιτεκτονική του ριζικού συστήματος διαφόρων καλλιεργειών (Phillips et al., 2004; Ojuederie et al., 2019). Σύνηθες αποτέλεσμα της δράσης των RGPB είναι η πρόκληση αλλαγών

που αφορούν στην ευκαμψία των κυτταρικών μεμβρανών της ρίζας, ως βασική αντίδραση της περιοχής έκθεσης για την αύξηση της ανοχής στην υδατική καταπόνηση (Vurukonda et al., 2016). Για τη σύγκριση των χαρακτηριστικών της αρχιτεκτονικής της ρίζας των φυτών χρησιμοποιούνται διάφορες υπολογιστικές τεχνικές ανάλυσης και απεικόνισης, δίνοντας επιπρόσθετα τη δυνατότητα παρατήρησης της μορφολογίας του συστήματος αυτού. Τέτοιου είδους προγράμματα είναι και τα WinRHIZO, GiA Roots (Ambreetha et al., 2019).

Τα PGPB βοηθούν στη διατήρηση της ομοιόστασης των ιόντων με διάφορους μηχανισμούς, για την αλλαγή της δομής της ρίζας, για την παγίδευση κατιόντων, τη ρύθμιση της έκφρασης των μεταφορέων ιόντων, την ενίσχυση της ανταλλαγής μακροθρεπτικών και μικροθρεπτικών συστατικών για το μετριασμό των επιβλαβών επιπτώσεων από την υψηλή εισροή ιόντων  $\text{Na}^+$  και  $\text{Cl}^-$ . Τα PGPB ενισχύουν τη δράση των μεταφορέων καλίου υψηλής συγγένειας βοηθώντας στο μετριασμό των επιπτώσεων από τα επίπεδα του  $\text{Na}^+$  (Ilangumaran & Smith, 2017). Ο ωσμοπροσαρμοστικός μηχανισμός που παρέχεται από PGPB ανεκτικά στην αλατότητα (ST-PGPB), φαίνεται ότι είναι ικανός να αναιρέσει αποτελεσματικά την επιζήμια επίδραση της υψηλής συγκέντρωσης αλατιού και μπορεί να αξιοποιηθεί ως πιθανός παράγοντας βιοελέγχου για διαφορετικές καλλιέργειες που αναπτύσσονται σε αλατούχα εδάφη (Paul & Nair, 2008).

#### **1.4.10) Αντιοξειδωτικά ένζυμα**

Η έκθεση των φυτών σε συνθήκες πίεσης οδηγεί στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), όπως ρίζες ανιόντος υπεροξειδίου, υπεροξείδιο του υδρογόνου και ρίζες υδροξυλίου, που αντιδρούν με βιομόρια όπως πρωτεΐνες, λιπίδια, νουκλεϊκά οξέα και οδηγούν σε οξειδωτική βλάβη των κυτταρικών συστατικών, εμποδίζοντας έτσι τις κανονικές τους λειτουργίες (Zushi & Matsuzoe, 2009; Vardharajula et al., 2011; Khan et al., 2019). Για τον περιορισμό της δράσης των ROS και των παραπάνω επιπτώσεων, τα φυτά αναπτύσσουν αντιοξειδωτικά αμυντικά συστήματα δέσμευσης των ROS που μπορεί να είναι ενζυμικά [π.χ. υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), υπεροξειδάση (POD), καταλάση (CAT), ασκορβική υπεροξειδάση (APX) και αναγωγάση γλουταθειόνης (GR)] ή μη ενζυμικά (όπως μέσω τοκοφερόλης, φλαβονοειδών, φαινολών, γλουταθειονών και ασκορβικού οξέως) (Khan et al., 2019; Rajput et al., 2021).

Ο εμβολιασμός με PGPB έχει αναφερθεί ότι μειώνει την οξειδωτική βλάβη στα φυτά η οποία έχει προκληθεί λόγω αβιοτικών καταπονήσεων, όπως η ξηρασία, η αλατότητα, το νερό και τα βαρέα μέταλλα, ενεργοποιώντας τα αντιοξειδωτικά αμυντικά συστήματα στα φυτά (Vardharajula et al., 2011; Jha & Subramanian, 2014; Himabindu et al., 2016) και ενισχύοντας την έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση, η υπεροξειδάση, η

καταλάση και η οξειδάση πολυφαινόλης (Chakraborty et al., 2013; Sukweenadhi et al., 2018; Zahir et al., 2019).

#### **1.4.11) Βιοεξυγίανση**

Η χρήση των PGPB για την αποτελεσματική αποκατάσταση μολυσμένων εδαφών εξαρτάται από την επίδραση διαφόρων παραγόντων όπως οι βιοχημικές ιδιότητες του εδάφους, η παρουσία και η αναλογία θρεπτικών ουσιών (π.χ. N και P), ο ανταγωνισμός, η θήρευση, η οριζόντια μεταφορά γονιδίων, η διαθεσιμότητα, η ποσότητα και ο τύπος των ιόντων καθώς και η υγρασία. Οι οργανικοί ρύποι μπορούν να υποστούν αποσύνθεση μέσω μονοπατιών διαμεσολαβούμενων από οξειδάσες με την παρουσία του οξυγόνου όμως να θανατώνει ωφέλιμους οργανισμούς (Abatenh et al., 2017). Σε περιπτώσεις αποκατάστασης τοπίου από υδρογονάνθρακες, η μικροβιακή αποδόμηση ξεκινά από τους απλούστερους υδρογονάνθρακες (ν-αλκάνια), ακολουθούν διακλαδισμένα, κυκλικά αλκάνια, και τέλος οι πιο σύνθετοι υδρογονάνθρακες (πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες PAH) (Tyagi et al., 2011; Gkorezis et al., 2016). Τα PGPB μπορούν να ενισχύσουν το ρόλο του φυτού μειώνοντας την τοξικότητα των βαρέων μετάλλων, βοηθώντας στον έλεγχο της απορρόφησης, της πιθανής συσσώρευσης ή αποτοξίνωσης (Mishra et al., 2017). Τέτοιου είδους μικροοργανισμοί είναι ανεκτικοί στην υψηλή συγκέντρωση μετάλλων και μπορούν να τροποποιήσουν τη βιοδιαθεσιμότητα των μετάλλων αυτών μέσω της απελευθέρωσης χηλικών ουσιών, όπως οργανικά οξέα, σιδηροφόρα, και αλλάζοντας το pH του εδάφους (Ma et al., 2016). Μεταξύ των PGPB που ενισχύουν τη φυτοεξυγίανση είναι βακτήρια όπως ο *Bacillus pumilus* (Ma et al., 2016), *Rhodococcus erythropolis* (Liu et al., 2015), *Bradyrhizobium* sp. (Guo et al., 2014), *Ralstonia eutropha* και *Chryseobacterium humi* (Moreira et al., 2014). Λόγω των αποικοδομητικών ιδιοτήτων των PGPB, τα βακτήρια αυτά εμπλέκονται με επιτυχία σε διαδικασίες επεξεργασίας βιομηχανικών και αστικών λυμάτων (Borghuso et al., 2017), με μερικά από αυτά να έχουν πιθανή χρήση στη μετατροπή λυμάτων σε νερό κατάλληλο για άρδευση (Riva et al., 2020).

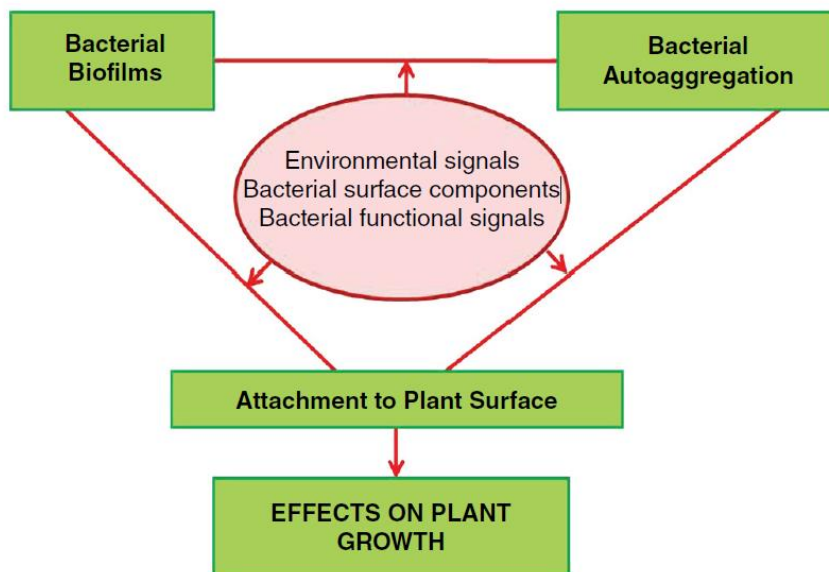
#### **1.4.12) Εξωπολυσακχαρίτες και σχηματισμός βιοϋμενίου**

Οι εξωπολυσακχαρίτες αποτελούν ένα πολύ ενεργό συστατικό της εδαφικής οργανικής ύλης (Gouzou et al., 1993) και παράγονται από τα PGPB κάτω από διαφορετικές εδαφικές συνθήκες όπως αλατότητα (Uradhyay et al., 2011; Mohammed, 2018), ξηρασία αλλά και υπό κανονικές συνθήκες (Alami et al., 2000). Οι βακτηριακοί εξωπολυσακχαρίτες απελευθερώνονται στο έδαφος σε δύο μορφές (ως λάσπη και ως κάψουλα) και μπορούν να απορροφηθούν από πηλινες επιφάνειες μέσω κατιονικών γεφυρών, μέσω δυνάμεων Van der Waals, δεσμών υδρογόνου και διαδικασιών απορρόφησης ανιόντων παρέχοντας ένα προστατευτικό φράγμα



στα αδρανή εδάφη που τα περιβάλλει (Sandhya et al., 2009). Σύμφωνα με τους Selvakumar et al. (2012), οι εξωπολυσακχαρίτες αυξάνουν τη στεγανότητα του εδάφους ενισχύοντας τη συσσωμάτωση του και διατηρούν αυξημένο το υδατικό δυναμικό πάνω από την περιοχή της ρίζας. Με αυτόν τον τρόπο αυξάνεται η απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών και βελτιώνεται η ανάπτυξη του φυτού και η ανοχή του στην υδατική καταπόνηση.

Οι εξωπολυσακχαρίτες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές λειτουργίες π.χ. στο σχηματισμό βιοϋμενίου (Bhaskar & Bhosle, 2005), στην προστασία των βακτηριακών κυττάρων (Mohammed, 2018), στην αποικοδόμηση ρύπων (Fusconi & Godinho, 2002), στη συντήρηση της πρωταρχικής λειτουργίας του κυττάρου και στην εμφάνιση αντιβακτηριδιακής δράσης (Alami et al., 2000; Mohammed, 2018). PGPB που παράγουν εξωπολυσακχαρίτες επηρεάζουν το προσκολλημένο στις ρίζες έδαφος δημιουργώντας ισορροπία μεταξύ των ριζών των φυτών και του μικροβιακού πληθυσμού (Alami et al., 2000; Upadhyay et al., 2011). Για να αντιμετωπιστεί η καταπόνηση λόγω αλατότητας, τα PGPB παράγουν βιοϋμένιο και εξω-πολυσακχαρίτες, με τα τελευταία να προκαλούν μια σειρά γεγονότων όπως η συσσωμάτωση εδαφικών σωματιδίων, η διατήρηση της δομικής ακεραιότητας, η προώθηση της ανταλλαγής κατιόντων- νερού, η κατακράτηση θρεπτικών συστατικών, η προστασία από τις περιβαλλοντικές διακυμάνσεις και η ενίσχυση του επιφυτικού αποικισμού (Balsanelli et al., 2014; Upadhyay & Singh, 2015; Kasim et al., 2016). Αυτές οι εξωκυτταρικές πολυμερείς ενώσεις δεσμεύουν ιόντα  $\text{Na}^+$ , μειώνοντας την πρόσληψή τους από το φυτό συμβάλλοντας έτσι στο μετριασμό της περιβαλλοντικής πίεσης (Upadhyay et al., 2011). Η παραγωγή εξωπολυσακχαριτών, ο σχηματισμός βιοϋμενίου και η συσσώρευση ενδοκυτταρικών οσμολυτών διέπουν την ωσμο-ανοχή των PGPB. Οι Ashraf et al. (2006) διαπίστωσαν ότι ο εμβολιασμός με βακτηριακά στελέχη (που παράγουν εξωπολυσακχαρίτες) στις ρίζες φυτών σιταριού σε εδάφη που επηρεάζονται από το αλάτι παρέχει ένα «κάλυμμα ανθεκτικό στο αλάτι».



**Εικόνα 1.16:** Συνθήκες ανάπτυξης βακτηριακού βιοϋμενίου (Bogino et al., 2013).

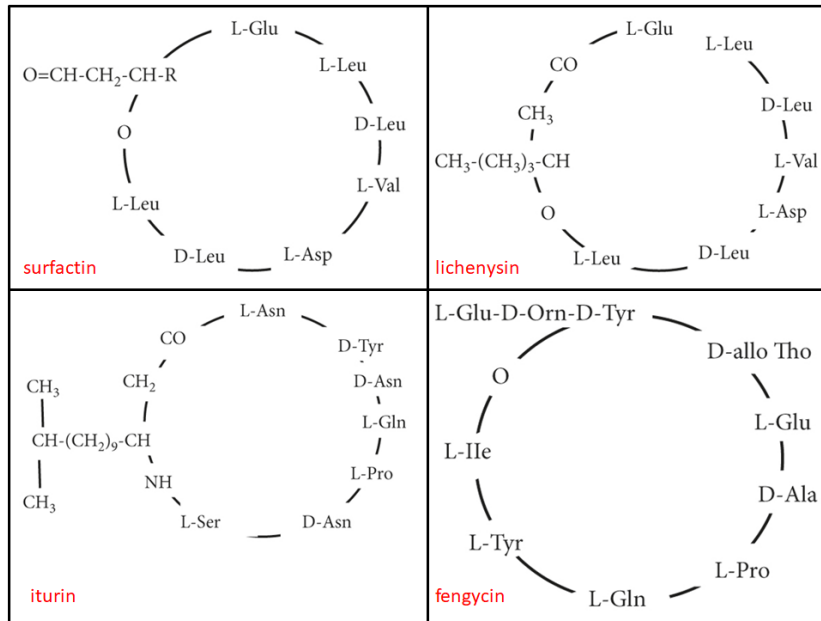
#### **1.4.12.1) Βιοεπιφανειοδραστικά**

Τα βιοεπιφανειοδραστικά είναι αμφίφιλες ενώσεις που μειώνουν την ελεύθερη ενέργεια του συστήματος, αντικαθιστώντας τα μόρια υψηλότερης ενέργειας σε μια διεπαφή. Τα επιφανειοδραστικά ταξινομούνται ως κατιονικά, ανιονικά, δίπολα και μη ιονικά και είναι μικροβιακής ή συνθετικής προέλευσης όπως υδρογονάνθρακες, λιγνοσουλφονικά ή τριγλυκερίδια (Antony et al., 2017). Οι ενώσεις αυτές περιέχουν ένα υδρόφοβο τμήμα με μικρή συγγένεια για το μέσο και μια υδρόφιλη ομάδα που έλκεται από αυτό. Τα βιοεπιφανειοδραστικά είναι μια χημικά ετερόκλητη ομάδα μορίων με γλυκολιπίδια, λιποπεπτίδια, λιποπρωτεΐνες, λιπαρά οξέα, φωσφολιπίδια, ουδέτερα λιπίδια, πολυμερή και σωματιδιακά βιοεπιφανειοδραστικά. Τα βιοεπιφανειοδραστικά έχουν πολλές εφαρμογές, λόγω της δράσης τους έναντι των βιοϋμενίων, η δυνατότητα χρήσης τους σε τομείς σχετικούς με την υγειονομική περίθαλψη, τη γεωργία και τη βιομηχανία έχουν στρέψει την ερευνητική προσοχή προς αυτά (Banat et al., 2014; Sachdev et al., 2013; Kiran et al., 2016). Η επιφανειοτροποποιητική ιδιότητα των βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών επηρεάζει το μικροβιακό αποικισμό και τον επακόλουθο σχηματισμό βιοϋμενίου, μειώνοντας επιλεκτικά την υδροφοβικότητα των βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων. Η τροποποίηση της υδροφοβικότητας επηρεάζει άμεσα την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου από το παθογόνο.

Τα βιοεπιφανειοδραστικά εκτός από τροποποιητική δράση μπορούν να διαταράξουν τα ήδη προσχηματισμένα βιοϋμένια (Irie et al., 2005; Kiran et al., 2010; Dusane et al., 2012; Singh et al., 2013). Οι βιοεπιφανειοδραστικές ενώσεις βακτηριακής προέλευσης που είναι αποτέλεσμα της

δράσης των μη ριβοσωμικών πεπτιδικών συνθετασών (NRPSs) εμπλέκονται και σε άλλες διαδικασίες σχετικές με την ομαδική κίνηση, τη σηματοδότηση και η ανίχνευση τους αποτελεί ένδειξη ότι συμβάλουν στη ρύθμιση των αλληλεπιδράσεις φυτού-μικροβίου (Sachdev & Cameotra, 2013). Σύμφωνα με τον Cáuper (2017), τα στελέχη *Rhizobium*, είναι σε θέση να παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες, με στελέχη *Rln* να παράγουν βιοεπιφανειοδραστικά μόρια όπως βιογαλακτωματοποιητές υπό συγκεκριμένες συνθήκες (Kareem & Ahmed, 2016). Οι Braeken et al. (2008) ανίχνευσαν στο *Rhizobium etli* CNPAF512 μόρια AHL μακράς αλυσίδας, με τις ενώσεις αυτές να δείχνουν ότι μπορούν να εμφανίσουν άμεσο βιοεπιφανειοδραστικό ρόλο (Daniels et al., 2006). Παραγωγοί βιοεπιφανειοδραστικών, μπορεί να είναι στελέχη των γενών *Caryophanon*, *Castellaniella*, *Filibacter*, *Geminicoccus*, *Georgenia*, *Luteimonas*, *Mesorhizobium*, *Mucilaginibacter*, *Nubsella*, *Paracoccus*, *Pedobacter*, *Psychrobacter*, *Rahnella*, *Sphingobium*, *Sphingoryxis* και *Sporosarcina* με την περιοχή απομόνωσης να παίζει καίριο ρόλο στην εμφάνιση βιοσυνθετικής ικανότητας (Saisa-ard et al., 2014).

Σε μη παθογόνα *Enterobacter*, όπως το *Enterobacter* sp. UJS-RC (Chandankere et al., 2020), το *Enterobacter asburiae* (Hošková et al., 2013) και το *Enterobacter* sp. NRRL B-59189 (Rooney et al., 2009), έχει εντοπιστεί η βιοεπιφανειοδραστική ένωση ραμνολιπίδιο. Σε άλλα στελέχη αυτού του γένους έχουν εντοπιστεί γαλακτωματοποιητές της κατηγορίας των τρεχαλολιπιδίων (de Paula et al., 2022), ενώ λόγω της παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ουσιών στελέχη, όπως το *Enterobacter cloacae* (Darvishi et al., 2011), το *Enterobacter cloacae* sp. HN01 (Wang et al., 2022) και το *Enterobacter* sp. MS16 (Jadhav et al., 2011) συμβάλλουν στη βιοεξυγίανση περιβαλλοντικά επιβαρυσμένων συστημάτων. Τέλος, σημαντική είναι η συνεισφορά του γένους *Bacillus* στην παραγωγή επιφανειοδραστικών ουσιών όπως λιποπεπτιδίων. Η ταξινόμηση των λιποπεπτιδίων βασίζεται κυρίως στην αμινοξική αλληλουχία και στα διάφορα στελέχη του *Bacillus* spp. που παράγουν τα λιποπεπτίδια π.χ. *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. globigii*, *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *B. pumilus* και *B. licheniformis* (Nihorimbere et al. 2012; Pueyo et al., 2009; Vater et al., 2002; Yu et al., 2002). Οι ουσίες surfactin, η surfactin A, η pumilacidin, η iturin A, η fengycin, bacillomycin (D) και η lichenysin αποτελούν χαρακτηριστικά λιποπεπτίδια παραγόμενα από διάφορα στελέχη *Bacillus* (Ali et al., 2022).



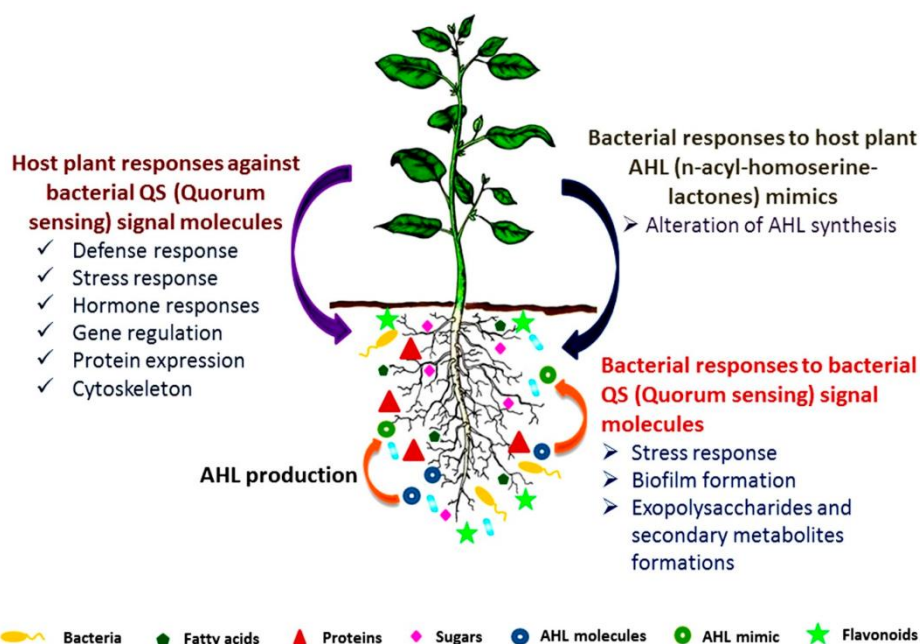
**Εικόνα 1.17:** Χημική δομή των λιποπεπτιδίων surfactin, lichenysin, iturin και fengycin (Ali et al., 2022).

Επιπλέον, ως βιοεπιφανειοδραστικά μόρια μπορούν να λειτουργήσουν οι εξωπολυσακχαρίτες υψηλού μοριακού βάρους, αντιπροσωπεύοντας ένα ετερογενές φάσμα πολυμερών με μονομερή συστατικά πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, λιποπολυσακχαρίτες, λιποπρωτεΐνες ή πολύπλοκα μείγματα αυτών των βιοπολυμερών (Perfumo et al., 2010).

#### 1.4.13) Αίσθηση απαρτίας (Quorum sensing, QS)

Το σύστημα αίσθησης απαρτίας (QS) αποτελεί στρατηγική επικοινωνίας που χρησιμοποιείται από τα βακτήρια, χρησιμοποιώντας ειδικά σηματοδοτικά μόρια τις N-ακυλοομοσερινικές λακτόνες (AHLs). Τα μόρια αυτά ως αυτο-επαγωγείς ανιχνεύουν τις περιβαλλοντικές αλλαγές, την πυκνότητα του βακτηριακού πληθυσμού (Fuqua et al., 1994), τη ρύθμιση της έκφρασης πολλαπλών γονιδίων, πολλά από τα οποία σχετίζονται με παράγοντες λοιμογόνου δράσης ή με το σχηματισμό βιοϋμενίου σε διάφορα φυτικά παθογόνα (Quiñones et al., 2005; Meena et al., 2019; Ortiz-Castro et al., 2019). Η διαταραχή ή παρεμπόδιση αυτού του συστήματος μπορεί να αποτελέσει στρατηγική για την καταπολέμηση των φυτοπαθογόνων στη γεωργία (Grandclément et al., 2016) (**Εικόνα 1.18**). Το Quorum quenching (QQ) είναι μια στρατηγική ενζυμικής αποδόμησης των AHLs για τη διακοπή του QS (Uroz et al., 2009) που χρησιμοποιείται από πολλά Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτήρια όπως *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* και *Klebsiella* (Chen et al., 2013). Στο μηχανισμό αυτό σημαντικό ρόλο κατέχει η AHL-λακτονάση (AiiA) την οποία φέρουν πολλά είδη του γένους *Bacillus* καθώς υδρολύει τον δακτύλιο λακτόνης,

παρεμβαίνοντας στο σύστημα QS και μετριάζοντας τη φυτοπαθογένεση (Dong et al., 2005; Pan et al., 2008).



**Εικόνα 1.18:** Αλληλεπίδραση μεταξύ φυτών-ξενιστών και βακτηρίων μέσω ανίχνευσης απαρτίας (Chandran et al., 2021).

### 1.5) Τα μικροβιακά σκευάσματα στη βιολογική γεωργία

Τα μικροβιακά σκευάσματα ή βιοσκευάσματα είναι ενεργά βιολογικά προϊόντα που περιέχουν ένα ή περισσότερα ευεργετικά μικροβιακά στελέχη σε έναν εύχρηστο και οικονομικό φορέα υλικών. Η μελέτη και ανάπτυξη τέτοιων σκευασμάτων είναι δυνατόν να αντικαταστήσει στο μέλλον τη χρήση των χημικών λιπασμάτων και των παρασιτοκτόνων (Agora et al., 2011). Τα μικροβιακά σκευάσματα μπορούν να έχουν δράση βιοδιεγέρτη. Ένας βιοδιεγέρτης φυτών είναι προϊόν λίπανσης, η εφαρμογή του οποίου αποσκοπεί στο να διεγείρει τις διαδικασίες θρέψης των φυτών ανεξάρτητα από την περιεκτικότητα του προϊόντος σε θρεπτικά στοιχεία. Σκοπός του είναι η βελτίωση ενός ή περισσότερων από τα χαρακτηριστικά του φυτού ή της ριζόσφαιρας του φυτού, όπως είναι η αποδοτικότητα της χρήσης θρεπτικών στοιχείων, η ανοχή σε αβιοτικές καταπονήσεις και η βελτίωση της διαθεσιμότητας των θρεπτικών στοιχείων στο έδαφος ή στη ριζόσφαιρα (Fusco et al., 2022).

Τα βιολιπάσματα έχουν δράση μικροβιακού διεγέρτη και αποτελούνται από ένα μικροοργανισμό ή κοινότητα μικροοργανισμών. Τα σκευάσματα αυτά στοχεύουν στη δημιουργία αμοιβαίως επωφελομένων σχέσεων με τα φυτά, συμβάλλοντας στην ανταπόκρισή τους σε αβιοτική καταπόνηση με αποτέλεσμα τη βελτίωση της γονιμότητας των εδαφών, την περιβαλλοντική και την οικονομική βιωσιμότητα (Khan et al., 2016). Τα

πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της χρήσης των βιολιπασμάτων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1.1** (Yadav & Sarkar, 2019).

<b>Πίνακας 1.1:</b> Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα από τη χρήση βιολιπασμάτων.	
<b>Πλεονεκτήματα</b>	<b>Μειονεκτήματα</b>
Μειωμένη χρήση χημικών λιπασμάτων και της ρύπανσης του περιβάλλοντος.	Πιο αργή διαδικασία σε σχέση με τα χημικά λιπάσματα.
Αύξηση της πρόσληψης των θρεπτικών συστατικών.	Δυσκολία αποθήκευσης λόγω ευαισθησίας σε περιβαλλοντικές αλλαγές (θερμοκρασία και υγρασία).
Απελευθέρωση ουσιών που προωθούν και ενισχύουν την ανάπτυξη.	Περιορισμένο το δίκτυο διάθεσης προϊόντων (ειδικά σε απομακρυσμένες περιοχές).
Έκκριση αντιβιοτικών για τον έλεγχο των ασθενειών των φυτών.	Συμπληρωματική η χρήση των βιολιπασμάτων χωρίς την εξολοκλήρου υποκατάσταση των χημικών.
Οικονομικά προσιτή επιλογή.	Μείωση της διαθεσιμότητας λόγω έλλειψης του μέσου ανάπτυξης ή του στελέχους σύνθεσης του σκευάσματος.
Μεταφορά πολύπλοκων οργανικών υλικών σε απλούστερα.	
Αύξηση του ριζικού συστήματος λόγω απελευθέρωσης ορμονών με προωθητική δράση.	
Φιλικό προς το περιβάλλον.	

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΡΙΖΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΑΠΟ ΦΥΜΑΤΙΑ  
ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΩΝ ΚΑΙ ΑΥΤΟΦΥΩΝ ΨΥΧΑΝΘΩΝ**

## 2.1) ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 2.1.1) Γονιδιωματικά είδη του συμπλέγματος *Rhizobium leguminosarum* (Rl)

Στη μελέτη της βακτηριακής ειδογένεσης χρησιμοποιούνται συχνά οι όροι γονιδιωματικό είδος (genospecies, gsp) και βιότυπος (biovar, bv). Ο πρώτος περιγράφει ένα διακριτό σύμπλεγμα οργανισμών με βάση την αλληλουχία γονιδίων βασικών για την επιβίωση τους (core genes), τα οποία συγκροτούν ομάδα λόγω ανασυνδυασμού (Ravin, 1963), ενώ ο δεύτερος ομαδοποιεί ένα σύνολο στελεχών που μοιράζονται μια γενετική πληροφορία που προσδίδει έναν ξεχωριστό φαινότυπο (Rogel et al., 2011). Στην περίπτωση μελέτης συμβιωτικών σχέσεων, η συμβίωση δεν είναι υποχρεωτική ή κληρονομική, αλλά κάθε φυμάτιο δημιουργείται από ένα ξεχωριστό γεγονός μόλυνσης από απογόνους ενός βακτηριακού κυττάρου. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα ομαδοποίησης βακτηρίου σε γονιδιωματικά είδη είναι το *Rhizobium leguminosarum* (Kumar et al., 2015), στο οποίο έχει αποδοθεί η παρουσία τριών διακριτών συμβιοτύπων (sv): ο (sv.) *viciae* που σχηματίζει φυμάτια μόνο στις ρίζες των ψυχανθών *Viciae*, που περιλαμβάνει κουκί, βίκο, μπιζέλι και φακή (*Vicia*, *Lathyrus*, *Pisum* και *Lens*), ο sv. *trifolii* και ο *phaseoli* που περιορίζονται μόνο στο τριφύλλι (*Trifolium*) και στο φασόλι (*Phaseolus*), αντίστοιχα (Jordan 1984; Rogel et al., 2011).

Πολλά στελέχη που παλιότερα είχαν περιγραφεί ως *R. leguminosarum* πλέον έχουν μεταφερθεί σε νέα είδη με τους συμβιότυπους να μην περιορίζονται μόνο σε αυτό το είδος αφού σχεδόν πανομοιότυπα γονίδια φυματιογένεσης μπορεί να βρεθούν και σε άλλα είδη του γένους *Rhizobium* (Remigi et al., 2016). Η ταξινομική κατάσταση του *R. leguminosarum* έχει επανεξεταστεί χρησιμοποιώντας δεδομένα από την αλληλούχιση γονιδίων (Ramírez-Bahena et al., 2008), καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι βακτήρια που είχαν οριστεί ως *R. trifolii* είναι συνώνυμα του *R. leguminosarum*, με τα *R. phaseoli* sv. *phaseoli* να ορίζουν ένα ξεχωριστό είδος, παρόλο που έχουν εντοπιστεί *R. leguminosarum* με sv. *phaseoli*. Με βάση την αλληλούχιση γονιδίων αλλά και την ανάλυση γονιδιωμάτων, πλέον είναι ξεκάθαρο ότι τα στελέχη *R. leguminosarum* συγκροτούν ένα σύμπλεγμα που σχηματίζει διακριτό κλάδο, που τα διαχωρίζει από τα υπόλοιπα είδη του γένους. Το σύμπλεγμα αυτό αποτελείται από 18 υποομάδες (gsL, gsM, gsC, gsD, gsE, gsH, gsA, gsG, gsS, gsl, gsQ, gsR, gsP, gsO, gsN, gsK, gsJ, gsB) χωρίς να αποκλείεται το ενδεχόμενο αναθεώρησης του αριθμού αυτού λόγω ένταξης στελεχών σε νέα γονιδιωματικά είδη (Young et al., 2021).

### 2.1.2) Τα ριζόβια του κουκιού

Το κουκί (*Vicia faba*) είναι ξενιστής που συνήθως εγκαθιστά αποδοτική αζωτοδεσμευτική συμβίωση με γονιδιωματικά είδη (genospecies) εντός της ομάδας των *Rhizobium leguminosarum* (sensu lato) (Rl ως συντομογραφία) τα οποία απαντούν σε όλο τον κόσμο



(Kumar et al., 2015; Boivin et al., 2020). Από μελέτες που έχουν διεξαχθεί είναι γνωστή η ύπαρξη 18 γονιδιωματικών ειδών μέσα στο σύμπλεγμα του *Rhizobium leguminosarum*, τα οποία δεν έχουν συγκεκριμένο συμβίωτο (Kumar et al., 2015; Boivin et al., 2020). Ομοίως, έχει οριστεί ένας αριθμός γονιδιωματικών ειδών που σχηματίζουν φυμάτια στο κοινό φασόλι (*Phaseolus vulgaris*) και μερικά από αυτά είναι ισοδύναμα με αυτά που βρέθηκαν στα *Vicia* spp. και *Trifolium* spp. (Kumar et al., 2015; Tong et al., 2018). Εκτός από το κουκί, μερικά γονιδιωματικά είδη *Rl* είναι ικανά να σχηματίζουν αποδοτικά φυμάτια τόσο σε καλλιεργούμενα όσο και σε αυτοφυή ψυχανθή της οικογένειας *Viciae*, η οποία περιλαμβάνει τα γένη *Vicia*, *Pisum*, *Lens* και *Lathyrus* (Allen & Allen, 1981; Perret et al., 2000; Laguerre et al., 2003; Jorin et al., 2020). Αν και τα αυτοφυή είδη του γένους *Viciae* έχουν ένα πιο ευρύ φάσμα μικροσυμβιωτών σε σχέση με τα καλλιεργήσιμα, το κυρίαρχο είδος στα φυμάτια τους είναι το *Rl* (Patriarca et al., 1992; Zhang et al., 2001; Laguerre et al., 2003; Kwon et al., 2005; Tian et al., 2007; Kan et al., 2007; Lei et al., 2008).

Ο συμβίωτος *viciae* (*symbionar*, sv.) είναι ο μοναδικός συμβίωτος που μπορεί να δημιουργήσει αποτελεσματική αζωτοδεσμευτική συμβιωτική σχέση με το κουκί (Allen & Allen, 1981), και εντοπίζεται σε διάφορα χρωμοσωμικά υπόβαθρα (van Berkum et al., 1995; van Berkum & Eardly, 1998; Zhang et al., 2001; Laguerre et al., 2003; Mutch & Young, 2004; Moschetti et al., 2005; Kan et al., 2007; Santillana et al., 2008; Tian et al., 2007, 2008; Lei et al., 2008; Álvarez-Martínez et al., 2009; De Meyer et al., 2011), όπως:

- 1) το *R. etli* στην Κίνα, το Περού και την Αίγυπτο (Tian et al., 2007; Santillana et al., 2008; Shamseldin et al., 2009).
- 2) το *R. laguerreae* στην Αλγερία, Περού, Ισπανία και Τυνησία (Santillana et al., 2008; Saïdi et al., 2014; Belhadi et al., 2018; Boivin et al., 2020).
- 3) τα *R. mesosinicum* (Xu et al., 2015), *R. fabae* (Tian et al., 2008; Chen et al., 2018), *R. anhuiense*, *R. sophorae*, *R. vallis* (Zhang et al., 2015; Chen et al., 2018) και μια άγνωστη γενεαλογική σειρά *Rhizobium* sp. I και II (Xu et al., 2015; Chen et al., 2018) στην Κίνα.
- 4) τα *Sinorhizobium* / *Ensifer melilotii* στην Αίγυπτο (Shamseldin et al., 2009).

Όσον αφορά την κατανομή των *Rl* στα ευρωπαϊκά εδάφη, τα *Rl* συναντώνται σε όλα τα αρόσιμα εδάφη και έχουν απομονωθεί από φυμάτια κουκιού στην Ισπανία, Γαλλία, Γερμανία, Ιταλία, Σερβία, Σουηδία και στην Τσέχικη Δημοκρατία (Young & Wexler, 1988; Priefer, 1989; Patriarca et al., 1992; Laguerre et al., 1993; Rigottier-Gois et al., 1998; Mutch & Young, 2004; Moschetti et al., 2005; Ventrino et al., 2007; Tian et al., 2010; Ruiz-Díez et al., 2012a; Ruiz-Díez et al., 2012b; Boivin et al., 2020). Απομονώσεις *Rl* έχουν επίσης βρεθεί τόσο σε καλλιεργήσιμα όσο και σε αυτοφυή ψυχανθή των *Viciae*, όπως αρακάς (*Pisum sativum*), φακή (*Lens culinaris*),

λαθούρι (*Lathyrus sativus*) και *Vicia* spp. στο Ηνωμένο Βασίλειο, στη Γερμανία, στο Βέλγιο, στην Ιταλία, στη Γαλλία, στη Σερβία, στη Τσεχική Δημοκρατία, στη Πολωνία, στην Ισπανία και στη Σουηδία (Amromah & Huss-Danell, 2016). Παρόλο που τα *R1* θεωρούνται ως το πιο σύνηθες συμβιωτικό ριζόβιο των *Vicia* spp. σε όλο τον κόσμο, έχει αποδειχθεί ότι γηγενή πληθυσμοί *R1* είναι φαινοτυπικά και γενετικά πολυμορφικοί, με την ετερογένεια τους να ποικίλλει στα διάφορα ψυχανθή των *Viciae* και από ήπειρο σε ήπειρο (Laguerre et al., 1992, 1996, 2003; Mutch & Young, 2004; Silva et al., 2005; Álvarez-Martínez et al., 2009; Saïdi et al., 2014; Jorriin & Imperial, 2015; Boivin et al., 2020). Μελέτες σχετικά με την ποικιλομορφία των *R1* έδειξαν την ύπαρξη φαινοτυπικών και γενετικών διαφορών μεταξύ των ευρωπαϊκών *R1* απομονώσεων και εκείνων από την Ιορδανία και την Κίνα (Laguerre et al., 2003; Mutch et al., 2003; Mutch & Young, 2004; Tian et al., 2007, 2010; Santillana et al., 2008; Lei et al., 2008; Boivin et al., 2020). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι συγκεκριμένα γονιδιωματικά είδη *R1* δείχνουν προτιμήσεις είτε σε διαφορετικά είδη εντός της οικογένειας *Viciae* (*Vicia*, *Pisum*, *Lens* και *Lathyrus*), είτε σε διαφορετικούς γενότυπους εντός του ίδιου είδους ψυχανθούς φυτού- ξενιστή (Hynes & O'Connell, 1990; Evans et al., 1996; Handley et al., 1998; Laguerre et al., 2003; Mutch & Young, 2004; Álvarez-Martínez et al., 2009; Jorriin & Imperial, 2015; Boivin et al., 2020; Cavassim et al., 2020).

Διαφορές στην εξειδίκευση των *R1* στελεχών ως προς τα διάφορα αυτοφυή και καλλιεργούμενα ψυχανθή (κουκί, αρακάς, φακή, βίκος, λαθούρι) έχουν καταγραφεί ακόμα και όταν αυτά καλλιεργούνται στο ίδιο χώμα (Hynes & O'Connell, 1990; Handley et al., 1998; Laguerre et al., 1992, 1993, 2003; Mutch & Young, 2004). Συγκεκριμένα, στο κουκί ο σχηματισμός φυματίων προκαλείται σχεδόν αποκλειστικά από τα *R1* στελέχη στα οποία εδρεύει ένας συγκεκριμένος συμβιωτικός γονότυπος (*nodD* τύπου g ή *nodDF-2*) ανεξάρτητα από το ριζοβιακό χρωμοσωμικό υπόβαθρο. Παρόλο που ο αρακάς και ο βίκος είναι πιο ελαστικοί σε σχέση με το κουκί στην επιλογή του γενότυπου πρόκλησης φυματίων, επιδεικνύουν προτίμηση σε συγκεκριμένους συνδυασμούς γονιδιωματικού υποβάθρου και τύπου *nod* (Laguerre et al., 2003; Mutch & Young, 2004). Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση δυο απομονώσεων *R1* τα 248 και 3841, τα οποία απομονώθηκαν στο Ηνωμένο Βασίλειο από φυμάτια κουκιού και αρακά, αντίστοιχα (van Berkum & Eardly, 1998; Laguerre et al., 2003; Mutch & Young, 2004). Επιπλέον, στο παρελθόν είχαν απομονωθεί ριζοβιακά στελέχη από φυμάτια κουκιού και αρακά, από την περιοχή των Άνδεων και από παράκτιες περιοχές του Περού, τα οποία ήταν γενετικά διαφορετικά, παρόλο που οι περιβαλλοντικές συνθήκες ή/ και ο ξενιστής θα μπορούσαν να είναι υπεύθυνοι για την επιλογή συγκεκριμένων ριζοβιακών γενότυπων (Santillana et al., 2008).

Επιπρόσθετα, έχουν καταγραφεί διακριτές προτιμήσεις διαφόρων γονότυπων κουκιού σε συγκεκριμένες γενεαλογικές σειρές *Rl* (Laguerre et al., 2003; Tian et al., 2007; Xu et al., 2015). Ομοίως, έχουν αναφερθεί διαφορές στην εξειδίκευση των *Rl* μεταξύ διαφορετικών σειρών αρακά. Παραδείγματος χάριν στελέχη *Rl* εντοπισμένα κυρίως στη Μέση Ανατολή και στην Κεντρική Ασία (Τουρκία, Ισραήλ και Αφγανιστάν) ήταν ικανά να σχηματίσουν φυμάτια σε κάποιες αρχέγονες σειρές αρακά από το Αφγανιστάν και το Ιράν, καθώς και σε σύγχρονες ευρωπαϊκές. Ωστόσο, ευρωπαϊκά στελέχη *Rl* απομονωμένα από καλλιεργούμενο αρακά δεν προκάλεσαν σχηματισμό φυματίων σε κάποιες αρχέγονες σειρές (Lie et al., 1987; Young & Matthews, 1988; Young et al., 2021). Η ικανότητα των στελεχών *Rl* να σχηματίσουν φυμάτια στις αρχέγονες σειρές αρακά αποδόθηκε στην παρουσία του γονιδίου *nodX*, που εδρεύει στο πλασμίδιο sym pRL5J1 (Davis et al., 1988). Επιπρόσθετα, η ικανότητα συγκεκριμένων γονότυπων *Rl* να σχηματίσουν φυμάτια ποικίλλει ανάλογα με την ποικιλία του αρακά και με το στάδιο ανάπτυξης του φυτού (Depret et al., 2004). Ακόμα έχει αναφερθεί ότι τόσο το στέλεχος όσο και η ποικιλία επιδρά στη διαδικασία της αζωτοδέσμευσης και του σχηματισμού φυματίων στα διαφορετικά στελέχη *Rl* επί των ψυχανθών φακή, αρακάς και κουκί (Laguerre et al., 2003; Abi-Ghanem et al., 2011; van Cauwenberghe et al., 2016; Yang et al., 2017).

Πρόσφατες μελέτες επιβεβαιώνουν ότι διαφορές στην επιλογή των συμβιωτικών εταίρων στη σχέση μεταξύ των ψυχανθών κουκιού και αρακά και του στελέχους *Rl* εξαρτώνται τόσο από το ξενιστή-ψυχανθές όσο και από το γονιδιωματικό είδος *Rl* (Bourion et al., 2018; Boivin et al., 2020). Όσον αφορά την ανταγωνιστικότητα των ριζοβίων για το σχηματισμό φυματίων, η διαδικασία αυτή δεν έχει συσχετιστεί με την αποτελεσματικότητα της βιολογικής αζωτοδέσμευσης (BNF). Όσον αφορά τη διαφορική επιλογή των *Rl* από τα φυτά ξενιστές, αυτό οφείλεται σε γενετικά προκαθορισμένους παράγοντες που σχετίζονται με τα γονίδια *nod* και με άλλες γενετικές θέσεις που σχετίζονται με τη συμβίωση. Επομένως, η βελτίωση της BNF επιλέγοντας κατάλληλους συνδυασμούς βακτηριακών στελεχών και ψυχανθών γονοτύπων μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της παραγωγικότητας και σε μείωση της χρήσης αζωτούχων λιπασμάτων.

### **2.1.3) Τα ριζόβια της φασολιάς**

Εκτός από το κουκί, η φασολιά είναι ένα σημαντικό ψυχανθές φυτό που καλλιεργείται παγκοσμίως (σε τροπικές, υποτροπικές και εύκρατες περιοχές). Στη Νότια Ευρώπη, οι κύριοι παραγωγοί φασολιών είναι η Ελλάδα, η Ιταλία και η Ισπανία (FAOSTAT, 2019), γεγονός που τονίζει την κοινωνικοοικονομική σημασία αυτής της καλλιέργειας. Στην Ελλάδα, οι κύριες περιοχές παραγωγής φασολιών εντοπίζονται στο βόρειο και κεντρικό μέρος της χώρας, αντιπροσωπεύοντας το 40,4% της καλλιεργήσιμης γης με ετήσια παραγωγή περίπου 79.340

τόνους (FAOSTAT, 2019). Εκτός από αυτό, οι παραδοσιακοί αγρότες καλλιεργούν ακόμα τις δικιές τους ποικιλίες συμβάλλοντας στην εθνική παραγωγή φασολιών. Ωστόσο, η καλλιέργεια των φασολιών απαιτεί υψηλά ποσά αζώτου, τα οποία καλύπτονται μέσω των αζωτούχων λιπασμάτων ή εναλλακτικά μέσω της BNF.

Η φασολιά αναπτύσσει συμβιωτικές σχέσεις, μέσω του σχηματισμού αζωτοδεσμευτικών ριζικών φυματίων με ποικίλα ριζόβια, σε διάφορες χώρες και ηπείρους (Michiels et al., 1998; Shamseldin & Velázquez, 2020). Η φασολιά σε αντίθεση με το κουκί είναι ξενιστής που επιτρέπει την ανάπτυξη συμβιωτικής σχέσης με μεγάλο εύρος ριζοβίων καθώς υπόκειται φυματιογένεση από γενετικά διαφορετικά είδη, τα οποία μπορεί να είναι α- ή β-πρωτεοβακτήρια και συνήθως ανήκουν στο γένος *Rhizobium*, αν και έχει αναφερθεί η ύπαρξη ριζοβιακών ειδών του γένους *Ensifer*, *Pararhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* και *Burkholderia*. Μέχρι σήμερα, έχουν βρεθεί περισσότερα από τριάντα είδη ριζοβίων ικανά να αναπτύξουν συμβιωτικές σχέσεις με τα φασόλια:

- *R. aethiopicum* (Aserse et al., 2013, 2017)
- *R. acidisoli* (Rouhrazi et al., 2016)
- *R. anhuiense* (Tong et al., 2018)
- *R. azibense* (Mnasri et al., 2014)
- *R. ecuadoreense* (Ribeiro et al., 2015)
- *R. esperanzae* (Cordeiro et al., 2017)
- *R. etli* (Segovia et al., 1993)
- *R. freirei*(Dall’Agnol et al., 2013)
- *R. gallicum*(Amarger et al., 1997)
- *R. giardinii*(Amarger et al., 1997)
- *R. hidalgonens* (Yan et al., 2017)
- *R. leguminosarum* (Segovia et al., 1993)
- *R. leucaenae* (Ribeiro et al., 2012)
- *R. lusitanum*(Valverde et al., 2006)
- *R. mesoamericanum* (López-López et al., 2012)
- *R. mongolense*(van Berkum et al., 1998)
- *R. paranaense* (Dall’Agnol et al., 2014)
- *R. phaseoli* (Ramirez-Bahena et al., 2008)
- *R. sophorae* (Jiao, et al., 2015)
- *R. sophoriradicis*(Jiao, et al., 2015)
- *R. tibeticum* (Hou et al., 2009)
- *R. tropici* (Martinez-Romero et al., 1991)
- *R. vallis* (Wang et al., 2011)
- *E. meliloti* (Mnasri et al., 2006)
- *E. fredii* (Sadowsky et al., 1988)
- *E. medicae* (Mhamdi et al., 2002)
- *E. americanum* (Toledo et al., 2003)
- *Mesorhizobium* sp. (Grange & Hungria, 2004)
- *Bradyrhizobium* sp. (Han et al., 2005)
- *Burkholderia phymatum* (Han et al., 2005)

Αξίζει να αναφερθεί ότι αρκετά ριζόβια είτε έχουν κατατεθεί με λάθος όνομα είτε σχετίζονται με μη καθορισμένα είδη, τα οποία πρόσφατα έχουν ενταχθεί σε είδη που έχουν περιγραφεί ή σε νέες *Rhizobium* γενεαλογικές σειρές με βάση γονιδιωματικά δεδομένα (Tong et al., 2018). Η μη επιλεκτικότητα του φασολιού δε σχετίζεται μόνο με το είδος των ριζοβίων αλλά και με το συμβιότυπο. Μέχρι σήμερα, έχουν βρεθεί οκτώ συμβιότυποι (sv.) (phaseoli, mimosae, gallicum, orientale, giardini, tropici, mediterraneanse και ένα μη ονοματισμένο), οι οποίοι είναι κατανεμημένοι σε διαφορετικά είδη συμβιωτικών ριζοβίων με το φασόλι (Peix et al., 2015; Rogel et al., 2011; Shamseldin & Velázquez, 2020). Με εξαίρεση το συμβιότυπο mediterraneanse, όλοι οι υπόλοιποι συνδέονται με το γένος *Rhizobium*, με τους συμβιότυπους

*giardini*, *gallicum* και *phaseoli* να συνδέονται επίσης και με το γένος *Pararhizobium* (Román-Ponce et al., 2016). Όσον αφορά το sv. *mediterranense* συνδέεται με το γένος *Ensifer*, ενώ το μη ονοματισμένο έχει εντοπιστεί στα *R. grahamii* και *R. mesoamericanum* (López-López et al., 2012). Μεταξύ των διαφόρων συμβιότυπων που βρέθηκαν στα ριζόβια της φασολιάς ο sv. *phaseoli* είναι ο πιο διαδεδομένος παγκοσμίως και διανέμεται σε ποικίλα ριζόβια με διαφορετικό χρωμοσωμικό υπόβαθρο όπως στα *R. phaseoli*, *R. leguminosarum*, *R. etli*, *R. sophoriradicis*, *R. vallis*, *R. giardini*, *R. gallicum*, *R. lusitanum*, *R. ecuadorensis*, *R. sophorae* (Segovia et al., 1993; Amarger et al., 1997; Valverde et al., 2006; Ramírez-Bahena et al., 2008; Wang et al., 2011; Ribeiro et al., 2015; Jiao, et al., 2015). Άξιο είναι το γεγονός ότι ο sv. *phaseoli* έχει στενό εύρος όσον αφορά το φυτό ξενιστή και περιορίζεται στο *P. vulgaris*, εν αντιθέσει με τους υπόλοιπους συμβιότυπους που σχετίζονται με ευρύτερο φάσμα ξενιστών (Martínez et al., 1985; Amarger et al., 1997; Peix et al., 2015). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση του συμβιότυπου sv. *tropicici* που εντοπίζεται στα *R. tropici*, *R. leucaenae*, *R. lusitanum* και *R. freirei*, τα οποία σχηματίζουν φυμάτια εκτός από τη φασολιά και σε αρκετά άλλα ψυχανθή όπως στο *Leucaena leucocephala* και στο *Macroptilium atropurpureum* (van Rhijn et al., 1993; Valverde et al., 2006; Ribeiro et al., 2012; Dall’Agnol et al., 2013). Τέλος, ο συμβιότυπος *mediterranense* των *E. meliloti*, *E. fredii* και *E. americanum* προσδίδει αζωτοδεσμευτικά φυμάτια όχι μόνο στο *P. vulgaris*, αλλά και στα *L. leucocephala* και *Acacia* (Mnasri et al., 2006, 2012), ενώ ο sv. *mimosae* έχει επίσης ένα ευρύ φάσμα ξενιστών πέραν του *P. vulgaris* όπως ο *Mimosa affinis* και *L. leucocephala* (Wang et al., 1999).

Υπό το πρίσμα της ριζοβιο-γεωγραφίας, είναι γνωστό ότι στην Κεντρική Αμερική και στις Άνδεις, τα κυρίαρχα ριζόβια της φασολιάς είναι τα *R. etli* sv. *phaseoli* και *R. phaseoli* sv. *phaseoli* αν και έχουν αναφερθεί και άλλα είδη ριζοβίων, π.χ. *R. tropici*, *R. leguminosarum*, *R. gallicum* με τον ίδιο συμβιότυπο (Martínez-Romero et al., 1991; Eardly et al., 1995; Aguilar et al., 1998; Bernal & Graham, 2001; Martínez-Romero, 2003; Silva et al., 2003; Dall’Agnol et al., 2013). Τα περισσότερα ριζόβια της φασολιάς από την Αμερική έχουν εντοπιστεί και σε άλλες ηπείρους, ένδειξη της αμερικανικής τους προέλευσης και της μεταβίβασής τους, στους αντίστοιχους σπόρους (Herrera-Cervera et al., 1999; Rodríguez-Navarro et al., 2000). Ωστόσο, από φυμάτια φασολιάς έχουν απομονωθεί και άλλα είδη ριζοβίων τόσο στην Ευρώπη όσο και στην Αφρική και στην Ασία, όπου εκ των υστέρων εισήχθη το *P. vulgaris*. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι τα ριζόβια των περιοχών όπου εισήχθη το *P. vulgaris* ενδέχεται να έχουν αποκτήσει συμβιωτικά γονίδια με οριζόντια μεταφορά από τα αμερικανικά στελέχη. Επίσης το γεγονός ότι αρκετά Ευρωπαϊκά και Αφρικανικά στελέχη (με πανομοιότυπο ή διαφορετικό χρωμοσωμικό υπόβαθρο) μοιράζονται παρόμοια συμβιωτικά γονίδια με Αμερικανικά, υποστηρίζει τον

ισχυρισμό περί οριζόντιας μεταφοράς (Valverde et al., 2006; Amarger et al., 1997; García-Fraile et al., 2010; Mulas et al., 2011).

Στα ευρωπαϊκά εδάφη, οι συμβιότυποι *phaseoli*, *gallicum*, *tropici*, *giardinii* και *mediterranense* έχουν βρεθεί σε διαφορετικά είδη ριζοβίων όπως τα *R. leguminosarum*, *R. etli*, *R. tropici*, *R. gallicum*, *R. lusitanum*, *R. giardinii*, *E. fredii* και *E. meliloti*. Συγκεκριμένα, στελέχη με sv. *phaseoli* έχουν βρεθεί στην Ισπανία (Rodríguez-Navarro et al., 2000; García-Fraile et al., 2010; Lozano et al., 2010; Mulas et al., 2011), στη Γαλλία (Geniaux et al., 1993), στην Αγγλία (Young et al., 1991) και στην Αυστρία (Sessitsch et al., 1997), ο sv. *gallicum* στην Αυστρία (Sessitsch et al., 1997) και Γαλλία (Amarger et al., 1997), ο sv. *tropici* του *R. lusitanum* στην Πορτογαλία, ενώ οι sv. *giardinii* και *mediterranense* στη Γαλλία (Valverde et al., 2006) και στην Ισπανία (Amarger et al., 1997), αντίστοιχα.

Παρόλο που το κοινό φασόλι μπορεί να δημιουργήσει συμβιωτικές σχέσεις με μεγάλο αριθμό ειδών ριζοβίων που φέρουν διαφορετικούς συμβιότυπους, εμφανίζει μειωμένη ικανότητα αζωτοδέσμευσης σε σύγκριση με άλλα ψυχανθή για αυτό θεωρείται φτωχός αφομοιωτής αζώτου (Graham, 1981; Buttery & Dirks, 1987; Rodríguez-Navarro et al., 2000; Herridge et al., 2008; Remans et al., 2008; Peoples et al., 2009). Για το λόγο αυτό, η επιλογή τόσο ποικιλιών υψηλής αζωτοδεσμευτικής ικανότητας όσο και αποτελεσματικών, ανταγωνιστικών και καλά προσαρμοσμένων ριζοβίων στις διαφορετικές εδαφοκλιματικές ζώνες θεωρείται η πιο βιώσιμη γεωργική πρακτική για τη βελτιστοποίηση της φυματιογένεσης και της αζωτοδέσμευσης στα κοινά φασόλια, επιτυγχάνοντας τελικά τη μέγιστη βιολίπανση.

Στην Ελλάδα, η μελέτη της ποικιλομορφία των ριζοβίων της φασολιάς είναι πολύ περιορισμένη, ενώ πρόσφατα διεξήχθη μελέτη η οποία ανέλυε τον πληθυσμό των ριζοβίων φασολιάς στην γεωγραφικά απομονωμένη περιοχή, την πεδιάδα των λιμνών της Πρέσπας στη Β. Ελλάδα (Ipsilantis et al., 2019). Αν και οι απομονώσεις τους δεν ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους και συμβιότυπου, η ανάλυση της εσωτερικά μεταγραφόμενης περιοχής του 16S-23S έδειξε ότι σχετίζονται με τα *R. leguminosarum*, *R. etli*, *R. gallicum*, *R. mongolense* και *E. meliloti*.

## 2.2) ΣΤΟΧΟΙ ΕΡΕΥΝΑΣ

- Η δημιουργία «βιβλιοθήκης» βιολογικού υλικού με ριζικά φυμάτια ψυχανθών φυτών και με ριζοβακτηριακές απομονώσεις φυματίων (ριζοβίων και μη ριζοβιακών ενδοφυτικών βακτηρίων) από διαφορές εδαφοκλιματικές περιοχές της Ελλάδας.
- Η μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας ριζοβιακών απομονώσεων κουκιού και φασολιάς από διάφορες γεωγραφικές περιοχές της χώρας. Η φυλογενετική συσχέτιση των

ριζοβίων σε επίπεδο είδους-συμβιότυπου, προσδιορίζοντας την ταξινομική τους θέση σε σχέση με άλλες απομονώσεις ανά τον κόσμο.

- Η επιβεβαίωση του μικροσυμβιωτικού χαρακτήρα των ριζοβίων του κουκιού και φασολιάς και η επίδραση του εμβολιασμού των ριζοβίων του κουκιού στο κουκί.
- Η μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας ριζοβιακών απομονώσεων φτερωτού μπιζελιού από την Κρήτη. Η ταυτοποίηση αντιπροσωπευτικών στελεχών σε επίπεδο είδους-συμβιότυπου και η συσχέτιση τους με άλλες απομονώσεις από τη διεθνή βιβλιογραφία.
- Η ταυτοποίηση επιλεγμένων ενδοφυτικών μη ριζοβιακών απομονώσεων σε επίπεδο γένους.

## **2.3) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.3.1) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΡΙΖΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΑΠΟ ΦΥΜΑΤΙΑ ΨΥΧΑΝΘΩΝ ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ**

#### **2.3.1.1) Συλλογή φυματίων**

Φυμάτια διαφόρων τοπικών ποικιλιών καλλιεργούμενων ψυχανθών φυτών (κουκιού και φασολιάς), αλλά και φυμάτια από αυτοφυή ψυχανθή (*Tetragonolobus purpureus*, *Ebenus cretica*) συλλέχθηκαν από διάφορες γεωγραφικές περιοχές της ηπειρωτικής και νησιωτικής Ελλάδας, ακολουθώντας δυο τρόπους δειγματοληψίας. Με τον πρώτο, η δειγματοληψία των φυματίων του κουκιού και της φασολιάς έγινε απευθείας από την περιοχή απομόνωσης (Πίνακας 2.1). Σε όλες τις περιπτώσεις, οι περιοχές κάλυψης της δειγματοληψίας δεν είχαν ιστορικό εμβολιασμού με μικροβιακά (ριζοβιακά) σκευάσματα. Τα εδάφη από όπου έγινε η δειγματοληψία των φυματίων ήταν ελαφρώς όξινα προς βασικά με pH, από 6,2 έως 8,1 και από 6,9 έως 8,1 για τα εδάφη καλλιέργειας του κουκιού και της φασολιάς, αντίστοιχα.

Με το δεύτερο τρόπο, σπόροι φασολιάς από διάφορες τοπικές ποικιλίες συλλέχθηκαν από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας (Πίνακας 2.1) και φυτεύτηκαν προκειμένου να γίνει συλλογή ριζικών φυματίων από φυτά ανεπτυγμένα σε εργαστηριακές συνθήκες. Η καλλιεργητική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη συλλογή φυματίων από τη φασολιά, ήταν η εξής:

- i. Αρχικά έγινε απολύμανση των σπόρων φασολιάς σε 3% υποχλωριώδες νάτριο (χλωρίνη, NaClO) για 3 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση και έκπλυση με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό (distilled water, dH<sub>2</sub>O) για 1 -2 λεπτά (6 φορές).
- ii. Στη συνέχεια, έλαβε χώρα η προβλάστηση των σπόρων.

iii. Τέλος, 3 σπόροι φασολιάς φυτεύτηκαν σε μικρά αυτοσχέδια πλαστικά γλαστράκια, με το ριζίδιο προς τα κάτω. Τα γλαστράκια ήταν συμπληρωμένα με αποστειρωμένο υπόστρωμα μίγματος βερμικουλίτη:περλίτη σε αναλογία 3:1. Το μέσο παροχής θρεπτικών και ενυδάτωσης ήταν το Fähræus. Όλα τα φυτά αναπτύχθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης του εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας σε συνθήκες υγρασίας 70%, θερμοκρασίας 25°C και φωτοπεριόδου 16 ώρες φως, 8 ώρες σκοτάδι.

- Παρασκευή μέσου Fähræus (Fähræus, 1957)

Πίνακας 2.1: Θρεπτικό μέσο Fähræus.					
Πυκνά διαλύματα (Stock solutions)		Συγκέντρωση των πυκνών διαλυμάτων (Stock concentration)		Όγκος (ml) (για 1 λίτρο του 1x μέσου)	Τελική συγκέντρωση
		g/l	M		
Μακροθρεπτικά (Macronutrients) <sup>1</sup>	MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	123,2	0,5	1,0	0,5 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	95,3	0,7	1,0	0,7 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	71,2	0,4	2,0	0,8 mM
	Fe-EDTA	20 mM		2,5	50 μM
Μικροθρεπτικά (Micronutrients) <sup>2</sup>	MnSO <sub>4</sub> , CuSO <sub>4</sub> , ZnSO <sub>4</sub> , H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	1mg/ml για κάθε μικροστοιχείο		0,1 για κάθε μικροστοιχείο	0,1 μg/l για κάθε μικροστοιχείο

<sup>1</sup> τα αποστειρωμένα πυκνά δ/τα των μακροθρεπτικών συστατικών είναι σταθερά σε θερμοκρασία δωματίου. Φυλάσσονται στους 4 °C μετά το άνοιγμα του περιέκτη.  
<sup>2</sup> τα μικροθρεπτικά διαλύματα αποθηκεύονται στους -20 °C.  
 - Για την παρασκευή υγρού θρεπτικού μέσου με ενσωματωμένη την πηγή αζώτου, προστίθεται NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> ή KNO<sub>3</sub>, στην επιθυμητή συγκέντρωση. Για την στερεοποίηση του μέσου προστίθενται 15 g/l άγαρ πριν από την αποστείρωση.  
 - Ρύθμιση του pH στο 6,5 και αποστείρωση (120 °C, 20 λεπτά).  
 - Προσθήκη αποστειρωμένου, σε αυτόκαυστο, CaCl<sub>2</sub> (διάλυμα με αρχική συγκέντρωση 1 M) στο μέσο (τελική συγκέντρωση 1 mM) πριν τη χρήση, για την αποφυγή συν-καταβύθισης με φωσφορικά ιόντα.

iv. Μετά από 20-30 ημέρες συλλέχθηκαν τα φυμάτια.

Πίνακας 2.2: Καταγραφή των περιοχών κάλυψης της δειγματοληψίας των ριζικών φυματίων κουκιού και φασολιάς.			
Δειγματοληπτική Μέθοδος	Ξενοστής απομόνωσης	Νομός	Περιοχή
1 <sup>η</sup>	Κουκί	Ημαθίας	Τριπόταμος
	<<	Πρεβέζης	Πρέβεζα
	<<	Αττικής	Αθήνα
	<<	Κορινθίας	Φενεός
	<<	Λευκάδας	Λευκάδα
	<<	Κυθήρων	Κύθηρα
	<<	Ηρακλείου	Ηράκλειο
	Φασολιά	Ημαθίας	Τριπόταμος & Μελίκη
	<<	Ιωαννίνων	Μέτσοβο
	<<	Πρεβέζης	Πρέβεζα
	<<	Κυκλάδων	Τήνος
	<<	Δωδεκανήσων	Κάρπαθος
2 <sup>η</sup>	Φασολιά	Καβάλας	Καβάλα & Χρυσούπολη



<<	Καστοριάς	Πρέσπες
<<	Λαρίσης	Λάρισα
<<	Φθιώτιδας	Δομοκός
<<	Αρκαδίας	Τρίπολη
<<	Βοιωτία	Σαγματά
<<	Λέσβος	Μεσότοπος

### 2.3.1.2) Απομόνωση ριζοβακτηρίων και αποθήκευση βιολογικού υλικού

Ανεξαρτήτως του τρόπου δειγματοληψίας, τέσσερα φυμάτια ανά φυτό επιλέχθηκαν τυχαία από τέσσερα φυτά κάθε περιοχής και τουλάχιστον τρία ριζοβακτήρια απομονώθηκαν από κάθε φυμάτιο. Ένας μεγάλος αριθμός ριζοβακτηρίων απομονώθηκε σε καθαρή καλλιέργεια, σύμφωνα με τις τυπικές εργαστηριακές τεχνικές που είθισται να χρησιμοποιούνται για την απομόνωση στελεχών από φυμάτια (Vincent, 1970). Εν συντομία:

- Τα φυμάτια απολυμάνθηκαν επιφανειακά με εμβάπτιση σε 70% αιθανόλη για 1 λεπτό και στη συνέχεια σε διάλυμα 3-5% υποχλωριώδους νατρίου για 2-4 λεπτά, έπειτα εκπλύθηκαν για 10 λεπτά επί έξι φορές με αποστειρωμένο dH<sub>2</sub>O και στο τέλος το απιονισμένο νερό απομακρύνθηκε.
- Κάποια από τα επιφανειακά απολυμασμένα φυμάτια αποθηκεύτηκαν στους -80°C και κάποια άλλα χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση ριζοβακτηρίων. Τα θρεπτικά μέσα ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το YMA (Yeast Mannitol Agar) και το TY (Tryptone Tryptone yeast extract), παρουσία της χρωστικής Congo Red.

<b>Πίνακας 2.3:</b> Παρασκευή μέσου YMA (Fred & Waksman, 1928; Vincent, 1970) και TY (Berlinger, 1974).			
<b>YMA</b>		<b>TY</b>	
<b>Συστατικά</b>	<b>Ποσότητα (g/l)</b>	<b>Συστατικά</b>	<b>Ποσότητα (g/l)</b>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5	Tryptone	5,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2	Yeast extract	3,0
NaCl	0,1	CaCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (ή 2H <sub>2</sub> O)	1,3 (ή 0,87)
Mannitol	5		
Yeast extract	0,4		
Προσθήκη απιονισμένου νερού έως 1l		Προσθήκη απιονισμένου νερού έως 1l	
Agar	15		15
- Ρύθμιση του pH σε 6,8 - 7 πριν από το αυτόκλειστο και πριν από την προσθήκη άγαρ. - Αποστείρωση στους 120 °C για 20 λεπτά.			

- Παρασκευή χρωστικής Congo Red

Η συγκεκριμένη χρωστική αποτελεί δείκτη για τη διαφοροποίηση των ριζοβίων από επιμολύνσεις, π.χ. τα θετικά κατά Gram βακτήρια, διότι τα περισσότερα ριζόβια δεν απορροφούν τη χρωστική.

Πίνακας 2.4: Χρωστική Congo Red.		
	Πυκνά διαλύματα (Stock solutions) 100x	Τελική συγκέντρωση 1x
Συγκέντρωση δ/τος	0,25 g/100 ml απιονισμένου νερού	25 mg/l

Το 100x δ/μα είτε αποστειρώθηκε και στη συνέχεια προστέθηκε στο αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης (1x), είτε προστέθηκε στην τελική συγκέντρωση πριν από το αυτόκλειστο για να αποστειρωθεί μαζί με το θρεπτικό μέσο.

- iii. Τα απολυμασμένα φυμάτια θρυμματίστηκαν-έσπασαν σε 100μl αποστειρωμένου μίγματος γλυκερόλης: θρεπτικού μέσου YMA σε αναλογία 1:1 (50% γλυκερόλη).
- iv. Από το «χυμό-ζωμό» των φυματίων, 20 μl επιστρώθηκαν σε στρόγγυλα τρυβλία petri dish γεμισμένα με το εκλεκτικό θρεπτικό μέσο YMA παρουσία της χρωστικής Congo Red.
- v. Η υπόλοιπη ποσότητα του «ζωμού» διατηρήθηκε στους -80°C για μακροχρόνια χρήση.

Μετά από 2-5 ημέρες επώασης στους 28°C έγινε επιλογή μονών αποικιών και με τη μέθοδο γραμμικής επίστρωσης (streaking) σε στερεό θρεπτικό μέσο TY/ Congo Red έγινε καθαρισμός. Στη συνέχεια έγινε εκ νέου απομόνωση μονών αποικιών με τον ίδιο τρόπο προκειμένου να απομονωθεί καθαρή μονή αποικία, η οποία επαναιωρήθηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο TY. Η ανάπτυξη των βακτηρίων έγινε στους 28°C υπό ανάδευση στα 180 rpm/min για 24-48 ώρες. Σε αποστειρωμένους μικροσωλήνες των 1,5ml προστέθηκε καθαρή υγρή καλλιέργεια και αποστειρωμένη γλυκερόλη σε αναλογία 1:1 (50%).

Εν ολίγοις, ακέραια και θρυμματισμένα επιφανειακά απολυμασμένα φυμάτια διατηρήθηκαν σε αποστειρωμένο μίγμα 50% γλυκερόλης στους -80°C για μακροχρόνια χρήση. Όλες οι καλλιέργειες των καθαρών απομονώσεων που προέκυψαν διατηρήθηκαν σε μίγμα 50% γλυκερόλης, όμοια με πριν.

### **2.3.1.3) Διαχωρισμός ριζοβακτηρίων σε ριζόβια και μη ριζόβια ενδοφυτικά βακτήρια**

Ο διαχωρισμός των ριζοβακτηρίων σε ριζόβια και μη ριζόβια ενδοφυτικά βακτήρια βασίστηκε αρχικά στα μορφοφυσιολογικά χαρακτηριστικά των αποικιών (π.χ. ρυθμός ανάπτυξης, σχήμα και χρώμα) και στην ικανότητα των βακτηρίων να αναπτύσσονται σε

διάφορα θρεπτικά μέσα όπως το LB (Luria-Bertani), το PM και το PYC (Glucose yeast extract broth),

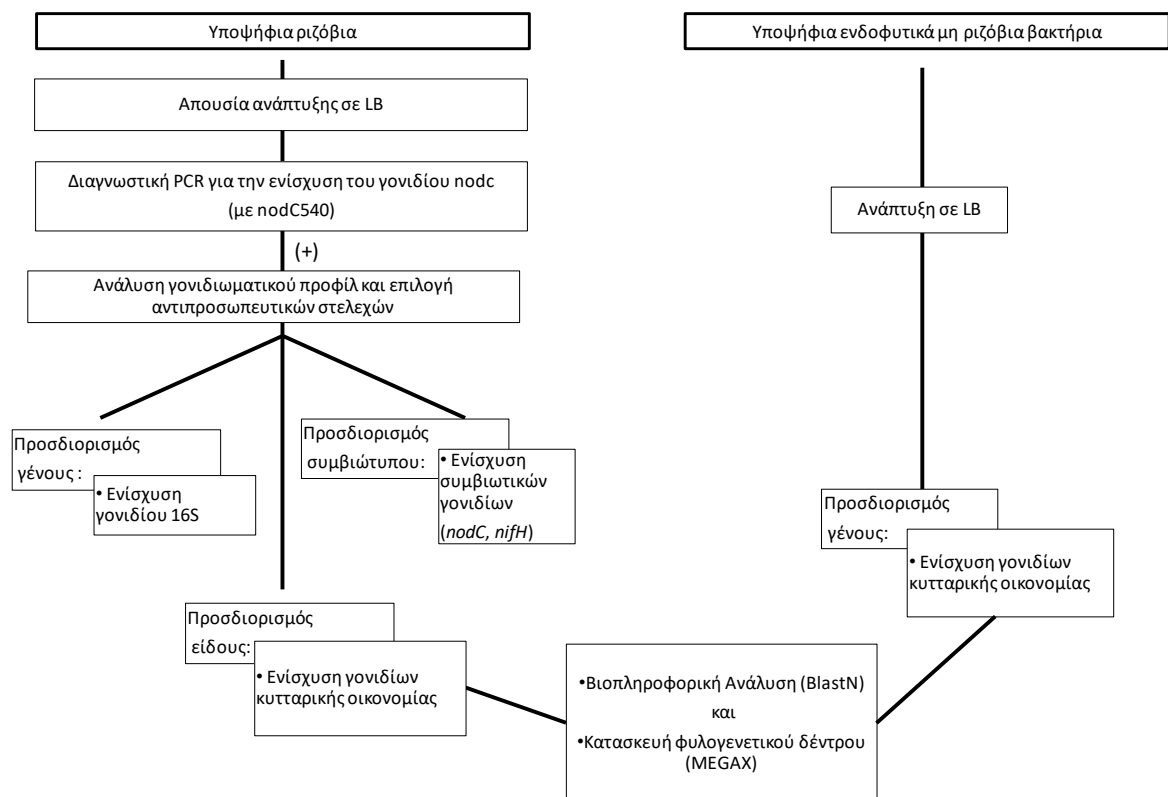
- Παρασκευή μέσου LB (Hirsch et al., 1980).

Πίνακας 2.5: Παρασκευή μέσου LB.	
Συστατικά	Ποσότητα (g/l)
Tryptone	10,0
Yeast extract	5,0
NaCl	3,0
Προσθήκη απιονισμένου νερού έως 1l. Προσαρμογή του pH σε 7,5.	

- Παρασκευή μέσου PM και PYC.

Πίνακας 2.6: Παρασκευή θρεπτικού μέσου με βάση την πεπτόνη.			
PM		PYC	
Συστατικά	Ποσότητα (g/l)	Συστατικά	Ποσότητα (g/l)
Peptone	4,0	Peptone	10,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5	Yeast extract	3,0
		NaCl	5,0
Προσθήκη απιονισμένου νερού έως 1 l. Προσαρμογή του pH σε 6,8–7,0.			

### 2.3.2) ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ - ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΡΙΖΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΦΥΜΑΤΙΑ ΨΥΧΑΝΘΩΝ



**Εικόνα 2.1:** Σχηματική απεικόνιση του διαγράμματος ροής για το μοριακό χαρακτηρισμό και ταυτοποίηση ριζοβακτηρίων απομονωμένων από φυμάτια ψυχανθών.

### 2.3.2.1) Απομόνωση γονιδιωματικού DNA

Η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA πραγματοποιήθηκε με τρεις μεθόδους. Στην 1<sup>ο</sup> μέθοδο απομονώθηκε crude DNA, στην 2<sup>ο</sup> ακολουθήθηκε η τροποποιημένη μέθοδος CTAB, ενώ στην 3<sup>ο</sup> έγινε χρήση του PureLink™ Genomic DNA kit για απομόνωση καθαρού γονιδιωματικού DNA της εταιρείας Thermo Fisher Scientific, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας.

- Μέθοδος με crude DNA

- Βακτηριακή καλλιέργεια 1ml φυγοκεντρήθηκε στα 13.000 rpm, για 5 λεπτά και στη συνέχεια απομακρύνθηκε το υπερκείμενο.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναωρήθηκε σε 100 μl αποστειρωμένο δις απιονισμένο νερό (double distilled water, ddH<sub>2</sub>O), επώαστηκε στους 100°C για 10 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στα 13.000 rpm, για 10 λεπτά.
- Το υπερκείμενο φυλάχθηκε στους -20°C για να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα στην αντίδραση της PCR.

- Τροποποιημένη μέθοδος CTAB

Μία μεμονωμένη αποικία από κάθε βακτηριακό στέλεχος αναπτύχθηκε σε 2ml υγρό θρεπτικό μέσο TY, για 24 ώρες στους 30°C, υπό ανάδευση στα 180 rpm/min. Ακολούθησε η απομόνωση του DNA των βακτηριακών στελεχών με την τροποποιημένη μέθοδο CTAB σύμφωνα με την παρακάτω διαδικασία:

- 1,5 ml βακτηριακής καλλιέργειας τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα erpendorf και ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 12.000 – 16.000 rpm, για 2 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και απορρίφθηκε.
- 400 μl διαλύματος 2x CTAB (2% w/v CTAB, 1,4M NaCl, 100mM Tris-HCl pH=8, 20mM EDTA pH=8) προστέθηκαν στο ίζημα των βακτηριακών κυττάρων και αναδεύτηκαν καλά.
- Το μίγμα επώαστηκε σε υδατόλουτρο στους 60°C για 1 ώρα.
- Στο διάλυμα προστέθηκαν 10 μl ενζύμου RNAase A συγκέντρωσης 1 mg/ml. Το μίγμα αναμίχθηκε και αφέθηκε σε επώαση 30 λεπτά στους 37°C.
- Προστέθηκαν σε ίση αναλογία χλωροφόρμιο (φαινόλη-χλωροφόρμιο):ισοαμυλική αλκοόλη (400 μl:400 μl)
- Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε σε 1500 rpm για 10 λεπτά. Η υγρή φάση μεταφέρθηκε σε καινούριο σωλήνα erpendorf. Έπειτα προστέθηκαν 400 μl 2-προπανόλης (1:1, υγρή φάση: 2-προπανόλη), το μίγμα αναμίχθηκε και αφέθηκε να επωαστεί σε θερμοκρασία δωματίου όλο το βράδυ.

- Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε σε 1500 rpm για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και απορρίφθηκε.
- Το ίζημα (DNA) διαλυτοποιήθηκε σε 50-100 μl διαλύματος ddH<sub>2</sub>O.
- Το δείγμα φυλάχθηκε στου -20°C.

### 2.3.2.2) Προσδιορισμός γονιδιωματικού προφίλ

Η ανάλυση του ολικού γονιδιωματικού προφίλ-αποτυπώματος εξετάστηκε αρχικά μέσω της ERIC- PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές (primers) ERIC1R και ERIC2. Ωστόσο, στη συνέχεια αντικαταστάθηκε από την BOX – PCR που χρησιμοποιεί τον primer BOX A1R (**Πίνακας 2.7**), η οποία οριστικοποιήθηκε ως την κατεξοχήν μέθοδο PCR για τη μελέτη του ολικού γονιδιωματικού αποτυπώματος των βακτηρίων ενδιαφέροντος.

Η διεξαγωγή της συγκεκριμένης μελέτης έλαβε χώρα σε δυο φάσεις. Στην πρώτη φάση αναλύθηκε το ολικό γονιδιωματικό προφίλ των απομονώσεων ανά περιοχή χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το DNA που απομονώθηκε με την τροποποιημένη μέθοδο CTAB. Στη δεύτερη φάση, έγινε συγκριτική ανάλυση του ολικού γονιδιωματικού προφίλ αντιπροσωπευτικών απομονώσεων από όλες τις περιοχές. Στην περίπτωση αυτή, ως υπόστρωμα της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε το DNA που απομονώθηκε με kit (PureLink™ GenomicDNA kit, Thermo Fisher Scientific).

Οι PCR αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο αντίδρασης 25 μl με 100ng γονιδιωματικού DNA ως υπόστρωμα, 1X ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης [75 mM Tris-HCl pH 8,8, 20mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01% Tween 20, 2 mM MgCl<sub>2</sub>], 0,2 mM dNTPs, 2,5 U DreamTaq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific) και 50 pmol εκκινητών. Οι συνθήκες των αντιδράσεων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2.7**, ενώ όλα τα PCR προϊόντα διαχωρίστηκαν μέσω ηλεκτροφόρισης σε 1,5 % gel αγαρόζης τα οποία περιείχαν 0,5 μg ml<sup>-1</sup> βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Η ηλεκτροφόριση έλαβε χώρα για 3 ώρες, στα 60 V. Εκτός από τα PCR προϊόντα χρησιμοποιήθηκε και ο μοριακός δείκτης (μάρτυρας) 1 kb DNA Ladder, (Invitrogen), ο οποίος φορτώθηκε στην αριστερή πλευρά των gels. Όλα τα gels σαρώθηκαν με τη χρήση του συστήματος απεικόνισης GelDoc (Bio-Rad, Hercules, CA).

### 2.3.2.3) Ενίσχυση γονιδίων και αλληλούχιση

Τμήματα γονιδίων που εδρεύουν είτε εντός συμβιωτικής νησίδας είτε εκτός («χρωμοσωμικό» DNA) επιλέχθηκαν για ενίσχυση. Συγκεκριμένα τμήματα ιδιοσυστατικών γονιδίων (γονιδίων κυτταρικής οικονομίας): 16S rRNA, *recA* (DNA recombination protein), *atpD* (ATP synthase subunit beta), *gyrB* (DNA gyrase B) ή/ *glnII* (Glutamine synthetase), καθώς και των συμβιωτικών γονιδίων *nodC* (N-acetylglucosaminyltransferase) ή και *nifH* (Nitrogenase)

ενισχύθηκαν με PCR, χρησιμοποιώντας τα ζεύγη εκκινητών που περιγράφονται στον **Πίνακα 2.7**. Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε είτε πάρθηκε από τη βιβλιογραφία είτε σχεδιάστηκε από την καθηγήτρια Ταμπακάκη Αναστασία. Σε όλες τις περιπτώσεις η αλληλουχία των εκκινητών τροποποιήθηκε με τέτοιο τρόπο ώστε στο άκρο της 5' αλυσίδας του εκκινητή να περιλαμβάνεται είτε η T7 (TAATACGACTCACTATAGGG) είτε η SP6 (GATTTAGGTGACACTATAG) ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία προκειμένου να διευκολυνθεί η άμεση αλληλουχία των αμπλικονίων.

Όλες οι PCR αντιδράσεις έγιναν σε τελικό όγκο 50 µl με 50 -100 ng γονιδιωµατικού DNA ως υπόστρωµα [αποµονωµένο µε το PureLink™ GenomicDNA kit (Thermo Fisher Scientific)], 20 pmol ανά εκκινητή, 200 µM dNTPs(Invitrogen), Phusion High Fidelity DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific), 1X ρυθµιστικό διάλυµα αντίδρασης, συνοδευτικού της πολυµεράσης που χρησιµοποιήθηκε. Οι συνθήκες των αντιδράσεων για την ενίσχυση των παραπάνω γονιδίων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2.7** και τα PCR προϊόντα των γονιδίων καθαρίστηκαν µε το PureLink™ Quick Gel Extraction kit (Thermo Fisher Scientific), σύµφωνα µε τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα καθαρά τµήµατα DNA αλληλουχήθηκαν απευθείας και στις δύο αλυσίδες χρησιµοποιώντας τέτοιους εκκινητές που να συνδέονται στην αντίστοιχη αλληλουχία εκκινητών. Όλα τα προϊόντα PCR αναλύθηκαν από την εταιρία CEMIA (cemia.eu), στην Ελλάδα.

#### **2.3.2.4) Φυλογενετική ανάλυση γονιδίων**

Οι αλληλουχίες των γονιδίων *rrs* των υπό µελέτη βακτηρίων συγκρίθηκαν µε εκείνες των πρότυπων στελεχών (type strains) του ίδιου γένους µέσω του server EzTaxon-e (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net>). Παράλληλα πραγµατοποιήθηκε ανάλυση οµοιότητας µε σύγκριση των αλληλουχιών µε τις διαθέσιµες αλληλουχίες στη βάση δεδοµένων GenBank χρησιµοποιώντας τη µηχανή αναζήτησης BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al., 1990) του NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Για τη φυλογενετική ανάλυση, οι αλληλουχίες στενά συγγενικών πρότυπων στελεχών, όπως αυτά είναι καταχωρηµένα στον κατάλογο «List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (LPSN)» ([www.bacterio.net](http://www.bacterio.net)), καθώς και στελεχών αναφοράς ανακτήθηκαν από τη βάση δεδοµένων GenBank/EMBL database (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/nucleotide.html>). Αρχικά, οι αλληλουχίες ευθυγραµµίστηκαν µε τον αλγόριθµο CLUSTALW (Thompson et al., 1994) µε τη βοήθεια του προγράµµατος MEGA X (Tamura et al., 2021) προκειµένου να γίνει η κατάλληλη περικοπή (trimming) στα άκρα των αλληλουχιών, ώστε όλες οι αλληλουχίες να έχουν το ίδιο µήκος, διατηρώντας ταυτόχρονα το σωστό πλαίσιο ανάγνωσης.

Για την ταξινόμηση σε επίπεδο γένους – είδους και συμβιότυπου, κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δέντρα με τη μέθοδο σύνδεσης γειτονίας (Neighbor Joining, NJ) ή μεγίστης πιθανοφάνειας (Maximum likelihood, ML) (Saitou & Nei, 1987) του προγράμματος MEGA X. Με το ίδιο πρόγραμμα καθορίστηκε και επιλέχθηκε το κατάλληλο μοντέλο νουκλεοτιδικής υποκατάστασης για την κατασκευή δέντρων ML. Επίσης, η αξιοπιστία των δενδρογραμμάτων εκτιμήθηκε μέσω της στατιστικής μεθόδου bootstrap. Επιπλέον, μέσω του αλγόριθμου CLUSTAL Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), ο οποίος παρέχεται από το Ευρωπαϊκό Ινστιτούτο Βιοπληροφορικής (European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI)), υπολογίστηκε το ποσοστό ομοιότητας ανά ζεύγη μεταξύ των αλληλουχιών.

<b>Πίνακας 2.7:</b> Παρουσίαση των εκκινητών και των PCR συνθηκών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία					
<b>Oligonucleotide name</b>	<b>Oligonucleotide sequence<sup>1</sup> (5'----&gt;3')</b>	<b>Gene/ Sequence</b>	<b>Amplicon size (bp)</b>	<b>PCR conditions</b>	<b>Reference</b>
BOX A1R	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	BOX-sequences	Variable sizes	5 min 95 °C, 30 × (30 s 94 °C, 1 min 50 °C, 8 min 65 °C), 16 min 65 °C	Versalovic J et al., 1994
16S-F1-T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> <u>GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG</u>	16S rRNA	~1,500	5 min 95 °C, 30 × (1 min 95 °C, 1 min 55 °C, 2.0 min 72 °C), 10 min 72 °C	Παρούσα εργασία κατόπιν τροποποίησης από Weisburg et al., 1991
16S-R1-SP6	<u>GATTTAGGTGACACTATAGA</u> <u>AAGGAGGTGATCCAGCC</u>	16S rRNA			
<i>atpD</i> -F52-T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> <u>GTTATCGGCGCCGTYGTSGACGT</u>	<i>atpD</i>	~850	5 min 95 °C, 30 × (1 min 95 °C, 1 min 54 °C, 1.0 min 72 °C), 10 min 72 °C	Παρούσα εργασία
<i>atpD</i> -F902-SP6	<u>GATTTAGGTGACACTATAGG</u> <u>TSGTSGTRATGCYTCTGCATC-3'</u>	<i>atpD</i>			Παρούσα εργασία
<i>gyrB</i> 340F-T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> <u>TTCGACCARAAYTCYTACAAGG</u>	<i>gyrB</i>	~700	5 min 95 °C, 30 × (1 min 95 °C, 1 min 58 °C, 1.0 min 72 °C), 10 min 72 °C	Tampakaki et al., 2017b
<i>gyrB</i> 1057rhi-R-SP6	<u>GATTTAGGTGACACTATAG</u> <u>CSAGCTTRTCCTTGGTCTGCG</u>	<i>gyrB</i>			Παρούσα εργασία
<i>recA</i> 41F-T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> <u>TTCGGCAAGGGMTCGRTSATG</u>	<i>recA</i>	~700	5 min 95 °C, 30 × (1 min 95 °C, 1 min 56 °C, 1.0 min 72 °C), 10 min 72 °C	Tampakaki et al., 2017b
<i>recA</i> 827R-SP6	<u>GATTTAGGTGACACTATAG</u> <u>CCATACATGATRTCGAAYTC</u>	<i>recA</i>			Tampakaki et al., 2017b
<i>gyrB</i> 340F-T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> <u>TTCGACCARAAYTCYTACAAGG</u>	<i>gyrB</i>	~700	5 min 95 °C, 30 × (1 min 95 °C, 1 min 58 °C, 1.0 min 72 °C), 10 min 72 °C	Tampakaki et al., 2017b
<i>gyrB</i> 1057rhi-R-SP6	<u>GATTTAGGTGACACTATAG</u> <u>CSAGCTTRTCCTTGGTCTGCG</u>	<i>gyrB</i>			Παρούσα εργασία
<i>nifH</i> -FP-T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> <u>TACGGCAAAGGGGSATCGGCAA</u>	<i>nifH</i>	~850	5 min 95 °C, 30 × (1 min 95 °C, 1 min 55 °C, 1.0 min 72 °C), 10 min 72 °C	Παρούσα εργασία
<i>nifH</i> -RPV-SP6	<u>GATTTAGGTGACACTATAG</u> <u>AGCATGTCYTCVAGYTCYTCCA</u>	<i>nifH</i>			Παρούσα εργασία
<i>nifH</i> -FP-T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> <u>TACGGCAAAGGGGSATCGGCAA</u>	<i>nifH</i>	~850	5 min 95 °C, 30 × (1 min 95 °C, 1 min 55 °C, 1.0 min 72 °C), 10 min 72 °C	Παρούσα εργασία
<i>nifH</i> -RPV-SP6	<u>GATTTAGGTGACACTATAG</u> <u>AGCATGTCYTCVAGYTCYTCCA</u>	<i>nifH</i>			Παρούσα εργασία



<i>nodC</i> -F352P-T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGGGTYGGYAAACGGA</u> AGGCACAGAT	<i>nodC</i>	~800	5 min 95 °C, 30 × (1 min 95 °C, 1 min 55 °C, 1.0 min 72 °C), 10 min 72 °C	Παρούσα εργασία
<i>nodC</i> ms-R-SP6	<u>GATTTAGGTGACACTATAGCGHGACAGCCAR</u> TCGCTRRTG	<i>nodC</i>			Tampakaki et al., 2017a
<i>nodC</i> -F352P-T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGGGTYGGYAAACG</u> GAAGGCACAGAT	<i>nodC</i>	~800	5 min 95 °C, 30 × (1 min 95 °C, 1 min 55 °C, 1.0 min 72 °C), 10 min 72 °C	Παρούσα εργασία
<i>nodC</i> ms-R-SP6	<u>GATTTAGGTGACACTATAGCGHGACAGCCAR</u> TCGCTRRTG	<i>nodC</i>			Tampakaki et al., 2017a
<i>nodC</i> -540-T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGGTGATYGAYATGG</u> ARTAYTGGCT	<i>nodC</i>	~540	5 min 95 °C, 30 × (1 min 95 °C, 1 min 55 °C, 1.0 min 72 °C), 10 min 72 °C	Παρούσα εργασία
<i>nodC</i> ms-R-SP6	<u>GATTTAGGTGACACTATAGCGHGACAGCCAR</u> TCGCTRRTG	<i>nodC</i>			Tampakaki et al., 2017a

### **2.3.3) ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΣΗΜΑΝΣΗ ΡΙΖΟΒΙΩΝ ΜΕ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ**

#### **2.3.3.1) Μετατροπή κυττάρων *Escherichia coli* (*E.coli*) σε επιδεκτικά (competent cells)**

- Σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB έγινε επίστρωση, διασπορά βακτηρίων *E.coli* S17-1 και επώαση στους 37°C για 24 ώρες.
- Από μονή αποικία έγινε εμβολιασμός 100ml υγρού θρεπτικού μέσου LB, το οποίο επώαστηκε για 2-3 ώρες στους 37°C, υπό ανάδευση στα 180 rpm/min. Η επώαση έλαβε χώρα μέχρι η οπτική πυκνότητα να ανέλθει σε  $OD_{600}=0,35$ , με την τιμή αυτή να αντιστοιχεί για τα περισσότερα στελέχη *E.coli* σε συγκέντρωση κυττάρων περίπου σε  $10^8$  κύτταρα/ml καλλιέργειας.
- Στη συνέχεια η βακτηριακή καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε ψυγμένους σε πάγο φυγοκεντρικούς σωλήνες των 50ml και επώαστηκε για 10 λεπτά σε πάγο. Έπειτα, ακολούθησε φυγοκέντρηση της καλλιέργειας σε 2.700xg για 10 λεπτά στους 4°C, και προσεκτική απόχυση του υπερκειμένου ώστε να απομακρυνθεί όλο το υπερκείμενο.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρήθηκε ήπια σε 30ml ρυθμιστικού δ/τος μετασχηματισμού 1 (100 mM  $CaCl_2$ ), σε θερμοκρασία 0°C (σε πάγο), φυγοκεντήθηκε σε 2.700xg για 10 λεπτά στους 4°C και μετά ακολούθησε προσεκτική απόχυση του υπερκειμένου ώστε να απομακρυνθεί όλο το θρεπτικό.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρήθηκε ήπια σε 4ml ρυθμιστικού δ/τος μετασχηματισμού 2 (85% v/v 100 mM  $CaCl_2$  και 15% v/v γλυκερόλης), σε θερμοκρασία 0°C (σε πάγο).

Το βακτηριακό εναιώρημα των επιδεκτικών πλέον κυττάρων διαμοιράστηκε σε 100μl εντός erpendorf των 1,5ml και στη συνέχεια προστέθηκε ίσος όγκος αποστειρωμένης γλυκερόλης (50% βακτηριακού εναιωρήματος γλυκερόλης), για την αποθήκευση αυτών στους -80°C για μελλοντική χρήση.

#### **2.3.3.2) Μετασχηματισμός κυττάρων *E.coli***

Για το μετασχηματισμό των επιδεκτικών κυττάρων *E.coli* S17-1 με τα πλασμίδια pBBR5 και psbA, φορείς των φθοριζόντων πρωτεϊνών mcherry και GFP(UV) προηγήθηκε η διασπορά των των βακτηριακών τους φορέων με τέτοιο τρόπο ώστε να αναπτυχθεί μονή αποικία, η οποία στη συνέχεια ενοφθαλμίστηκε σε 5 ml θρεπτικού μέσου ανάπτυξης LB (αντίστοιχα) μετά από 24 ώρες επώασης στους 37°C, υπό ανάδευση στα 180 rpm/min. Τα πλασμίδια απομονώθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του GenElute Plasmid Kit της εταιρίας Sigma-Aldrich.

Για τον μετασχηματισμό των κυττάρων *E.coli* S17-1, ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Κύτταρα *E.coli* όγκου 100 μl φυλαγμένα σε errendorf των 1,5ml στους -80°C, μεταφέρθηκαν σε πάγο.
- Στη συνέχεια προστέθηκαν 10-100ng/μl πλασμιδιακού DNA σε όγκο που να μην ξεπερνά το 1/10 του όγκου των προς μετασχηματισμό κυττάρων (<10μl)
- Το μίγμα κυττάρων-πλασμιδίου επωάστηκε για 30 λεπτά στο πάγο.
- Για την είσοδο του πλασμιδίου εντός των κυττάρων, το μίγμα κυττάρων-πλασμιδίου υποβάλλεται σε θερμικό σοκ. Το errendorf μεταφέρθηκε απευθείας από τον πάγο σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 42-43°C για ένα διάστημα από 0,45 έως 2 λεπτά και στη συνέχεια μεταφέρθηκε απευθείας σε πάγο για 1-3 λεπτά.
- Στο μίγμα κυττάρων-πλασμιδίου προστέθηκε 1ml θρεπτικό μέσο LB και επωάστηκε στους 37°C για μισή με μια ώρα, χωρίς ανάδευση. Με την επώαση επιτράπη η ανάρρωση των κυττάρων από το θερμικό σοκ και η έκφραση της φθορίζουσας πρωτεΐνης.
- Η καλλιέργεια υπέστη διασπορά μέσω επίστρωσης 100μl σε τρυβλία με LB-αντιβιοτικό (Gm15), για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων που εκφράζουν την πρωτεΐνη και είναι ανθεκτικά στο αντιβιοτικό έναντι στα μη μετασχηματισμένα που δεν την εκφράζουν και είναι ευαίσθητα στο αντιβιοτικό και θανατώνονται.

### 2.3.3.3) Σύζευξη κυττάρων *E.coli* – ριζοβίων

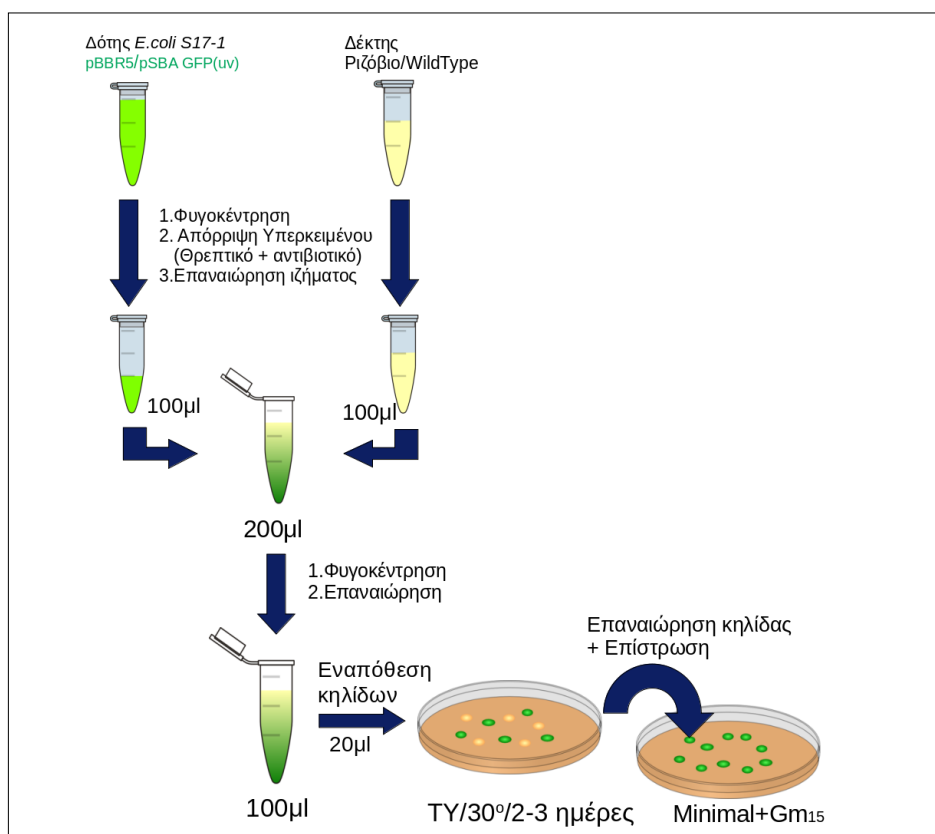
Η σήμανση των ριζοβίων με φθορίζουσες πρωτεΐνες έγινε μέσω της διαδικασίας σύζευξης και τα πλασμίδια που επιλέχθηκαν για δότες , ήταν τρία (Πίνακας 2.8):

- pMRE145-mScarlet-I (Addgene, Schlechter et al., 2018)
- pBBR5/psbA-GFPuv (Tampakaki, αδημοσίευτα αποτελέσματα)
- pBBR5/psbA-mCherry (Tampakaki, αδημοσίευτα αποτελέσματα)

Πίνακας 2.8: Καταγραφή του βακτηριακού δότη πλασμιδίων με γονίδια που εκφράζουν φθορίζουσες πρωτεΐνες και άλλων πληροφοριών						
Βακτηριακοί δότες πλασμιδίων με γονίδια που εκφράζουν φθορίζουσες πρωτεΐνες	Βακτηριακός φορέας	Πλασμιδιακός φορέας/ υποκινητής γονιδίου	Φθορίζουσα πρωτεΐνη	Ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά	Μέγιστο μήκος κύματος (nm)	
					Διέγερσης	Εκπομπής
<i>E. coli</i> S17-1::pMRE145/nptII.-mScarlet-I	<i>E. coli</i> S17-1	pMRE145/nptII	mScarlet-I	Km <sub>50</sub> , Cam <sub>15</sub> , Gm <sub>15</sub>	569	594
<i>E. coli</i> S17-1::pBBR5/psbA-GFP(uv)	<i>E. coli</i> S17-1	pBBR5/ psbA	GFPuv	Gm <sub>15</sub>	395	509
<i>E. coli</i> S17-1::pBBR5/psbA-mCherry	<i>E. coli</i> S17-1	pBBR5/ psbA	mCherry	Gm <sub>15</sub>	587	610

#### Διμερής σύζευξη:

- Καλλιέργεια από τα στελέχη του δότη και του δέκτη μεταφέρθηκαν σε erpendorf των 1,5ml.
- Η καλλιέργεια του δότη φυγοκεντρήθηκε στις 3000xg για 3 λεπτά, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το βακτηριακό ίζημα των κυττάρων του δότη επαναιωρήθηκε σε 1ml θρεπτικό μέσο LB, ώστε να απομακρυνθεί το αντιβιοτικό (η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε άλλες 2 φορές).
- Σε αναλογία 1:1 μεταφέρθηκε ποσότητα καλλιεργειών δότη:δέκτη, σε erpendorf των 1,5ml.
- Το μίγμα δότη-δέκτη αρχικά επαναιωρήθηκε με απαλές κινήσεις για την αποφυγή της καταστροφής των σχηματιζόμενων συζευκτικών τριχιδίων και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στις 3000xg για 3 λεπτά.
- Το υπερκείμενο αποχύθηκε και το ίζημα κυττάρων δότη-δέκτη επαναιωρήθηκε σε 100μl TY. Από το επαιωρημένο μίγμα έγινε spotting 20μl σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα TY, το οποίο επώαστηκε για 48 ώρες στους 30°C.
- Μετά το πέρας των 48 ωρών, η κάθε κηλίδα επαναιωρήθηκε σε 100μl TY και στη συνέχεια έγινε διασπορά μέσω επίστρωσης σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό μέσο minimal (MM), παρουσία Gm15 και επώαση για 3-5 ημέρες στους 30° C (μέχρι να ενοφθαλμιστεί μονή φθορίζουσα αποικία). Με την χρήση του θρεπτικού μέσου Minimal Agar Medium (Harder et al., 1973) ( $1,62 \text{ gL}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$ ,  $0,2 \text{ gL}^{-1} \text{ MgSO}_4$ ,  $1,59 \text{ gL}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$ ,  $1,8 \text{ gL}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $15 \text{ gL}^{-1} \text{ agar}$ , με τα ακόλουθα ιχνοστοιχεία:  $15 \text{ m gL}^{-1} \text{ Na}_2\text{EDTA}_2\text{H}_2\text{O}$ ,  $4,5 \text{ gL}^{-1} \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $3 \text{ gL}^{-1} \text{ CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,6 \text{ gL}^{-1} \text{ MnCl}_2$ ,  $1 \text{ gL}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$ ,  $3,0 \text{ gL}^{-1} \text{ CaCl}_2$ ,  $0,4 \text{ gL}^{-1} \text{ Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $3 \text{ gL}^{-1} \text{ FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,3 \text{ gL}^{-1} \text{ CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) συμπληρωμένο με 0,4% w/v succinate) επιτράπη μέσω αντιεπιλογής παρουσία αντιβιοτικού σε minimal, η επιλογή μόνο του συζευγμένου βακτηρίου καθώς η *E. coli* S17-1 είναι αυξότροφη και δεν αναπτύσσεται στο θρεπτικό αυτό (Schlechter et al., 2018).



**Εικόνα 2.2:** Σχηματική περιγραφή της σύζευξης ριζοβίου με το βακτήριο *E. coli* S17-1: pBBR5/psba /GFP(uv).

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, τα πράσινα φθορίζοντα ριζόβια διακρίθηκαν σε μήκος κύματος διέγερσης (excitation) 395 nm, το οποίο είναι το μέγιστο μήκος κύματος διέγερσης για την πρωτεΐνη GFPuv και περιέχεται στο φάσμα μήκους κύματος της ακτινοβολίας UV (10-400 nm). Αντίθετα, τα μωβ και κόκκινα φθορίζοντα ριζόβια μπορούν να διακριθούν ακόμη και στο ορατό φως, διότι οι πρωτεΐνες mCherry και mScarlet-I έχουν μέγιστο μήκος κύματος διέγερσης (excitation) στα 587 nm και 569 nm, αντίστοιχα, δηλαδή μήκη κύματος εντός του φάσματος του ορατού φωτός (400-700 nm).

#### **2.3.4) *in planta* ΜΕΛΕΤΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΕΠΙΣΗΜΑΣΜΕΝΩΝ ΡΙΖΟΒΙΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥΣ ΣΤΗ ΦΑΣΟΛΙΑ**

Η διεξαγωγή της συγκεκριμένης μελέτης βασίστηκε στην ικανότητα των ριζοβίων να επάγουν το σχηματισμό φυματίων στον ξενιστή απομόνωσης (δοκιμή επιβεβαίωσης ταυτότητας) και στις αρχές του Koch. Επιπλέον, ο πειραματικός σχεδιασμός στόχευσε στη διερεύνηση της επίδρασης της απολύμανσης των φυματίων και της παρουσίας αντιβιοτικού στο θρεπτικό υπόστρωμα στην ανίχνευση φθορισμού στα βακτήρια. Ως ξενιστής επιλέχθηκε μικρόσπερμο φασόλι και ως εκτούτου επιλέχθηκαν επισημασμένα με φθορίζουσες πρωτεΐνες ριζόβια φασολιάς. Για την ανάπτυξη της φασολιάς εφαρμόστηκε υδροπονικό σύστημα,

χρησιμοποιώντας σακούλες ανάπτυξης φυτών (growth rouches) σε θάλαμο ανάπτυξης, κάτω από ημι-ασηπτικές συνθήκες. Ως θρεπτικό μέσω ενυδάτωσης χρησιμοποιήθηκε το Fähræus απουσία πηγής αζώτου.

Τα growth rouches που χρησιμοποιήθηκαν είναι κατασκευές από σακουλάκια πολυαιθυλενίου εντός των οποίων γίνεται εφικτή η ανάπτυξη σπόρων ψυχανθών μικρού ή μεσαίου μεγέθους. Η κατασκευή αυτή έχει πάχος περίπου 0,12mm και διάσταση μήκους και ύψους: ~ 130 mm × 140 mm, αντίστοιχα. Στο εσωτερικό του growth rouch είχε τοποθετηθεί απορροφητικό χαρτί για να συγκρατεί τους σπόρους στο πάνω μέρος της σακούλας και να παρέχει στο υπό ανάπτυξη ριζικό σύστημα του φυτού, υγρασία. Το growth rouch εξωτερικά καλύφθηκε με καφέ χάρτινη σακούλα ώστε η ριζόσφαιρα έχει μειωμένη έκθεση στο εξωτερικό φως (Howieson & Dilworth, 2016).



**Εικόνα 2.3:** Υδροπονική ανάπτυξη φυτών με το σύστημα των σακουλιών ανάπτυξης (Howieson & Dilworth, 2016).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

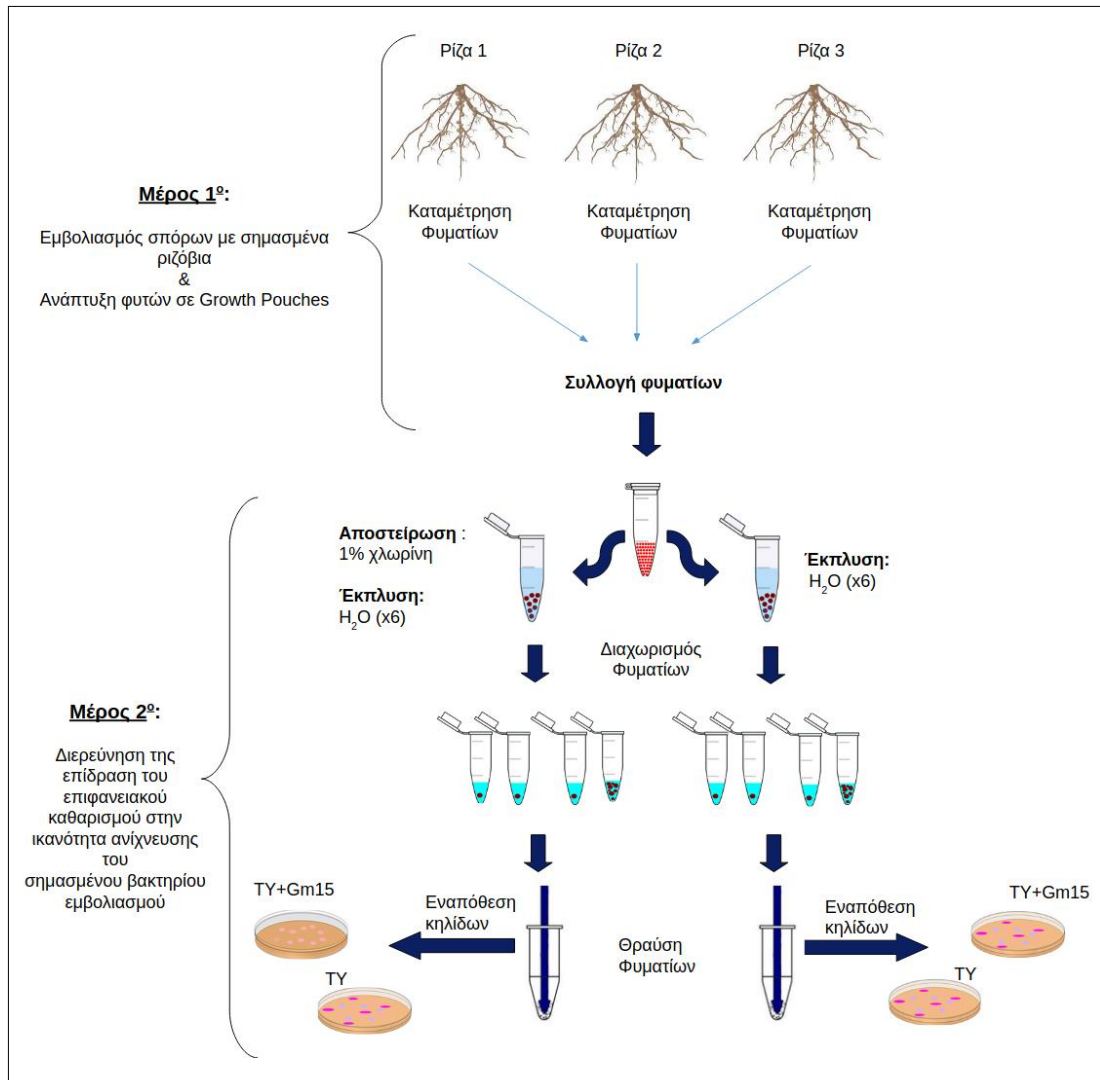
- Επιφανειακή απολύμανση σπόρου με υδατικό διάλυμα χλωρίνης 3% για 10 λεπτά και έκπλυση με αποστειρωμένο νερό (6 φορές).
- Προβλάστηση σπόρων σε αποστειρωμένο υγρό διηθητικό χαρτί απουσία φωτισμού για 3-4 ημέρες στους 22°C.
- Φύτευση 3 προβλαστημένων σπόρων φασολιάς σε κάθε growth rouch, με το ριζίδιο να διέρχεται μέσω οπής στο χαρτί με κατεύθυνση προς τα κάτω. Εμβολιασμός προβλαστημένου σπόρου με 1ml ριζοβιακού εναιωρήματος Fähræus ( $10^9$  κύτταρα  $ml^{-1}$ ) ανά σπόρο. Τα ριζόβια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν σημασμένα με φθορίζουσα πρωτεΐνη, ανεπτυγμένα σε υγρό θρεπτικό παρουσία αντιβιοτικού, το οποίο στη συνέχεια απομακρύνθηκε μαζί με το θρεπτικό μέσο, μέσω φυγοκέντρησης (12000 rpm για 5 λεπτά).

Συνολικά, το κάθε βακτηριακό ίζημα επαναϊωρήθηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο Fåhraeus 3 φορές.

- Ως αρνητικοί μάρτυρες ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκαν μη εμβολιασμένοι σπόροι ανεπτυγμένοι σε Fåhraeus απουσία πηγής αζώτου και ως θετικοί, μη εμβολιασμένοι σπόροι ανεπτυγμένοι σε Fåhraeus παρουσία πηγής αζώτου (5 mM KNO<sub>3</sub>).
- Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης του εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας σε συνθήκες: 70% υγρασία, 25°C, 16 ώρες φως, 8 ώρες σκοτάδι.
- Μετά από 15 ημέρες αξιολογήθηκε η ικανότητα σχηματισμού φυματίων καταγράφοντας θετικά (Nod+) και αρνητικά (Nod-), την παρουσία και απουσία των φυματίων, αντίστοιχα. Η αποτελεσματικότητα της αζωτοδέσμευσης αξιολογήθηκε από το χρώμα στο εσωτερικό των φυματίων. Ως αζωτοδεσμευτικά (Fix+) θεωρήθηκαν τα φυμάτια που το εσωτερικό τους ήταν ροζ-κόκκινα, ενώ ως μη αζωτοδεσμευτικά (Fix-) θεωρήθηκαν εκείνα που το εσωτερικό τους ήταν άσπρο.

Από αζωτοδεσμευτικά φυμάτια έγινε απομόνωση σημασμένων ριζοβίων εξετάζοντας παράλληλα την επίδραση του επιφανειακού καθαρισμού στην ικανότητα ανίχνευσης του σημασμένου βακτηρίου εμβολιασμού. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- Από κάθε μεταχείριση τα φυμάτια που συλλέχθηκαν ισομοιράστηκαν.
- Στα μισά φυμάτια έλαβε χώρα απολύμανση με βάση την τροποποιημένη μέθοδο του Vincent, 1970 (1% χλωρίνη, για 3 λεπτά και έκπλυση με αποστειρωμένο νερό για 10 λεπτά, με τη διαδικασία της έκπλυσης να επαναλαμβάνεται άλλες 6 φορές), ενώ τα υπόλοιπα φυμάτια δεν απολυμάνθηκαν.
- Τρία μεμονωμένα εύρωστα και καλά μεγαλωμένα φυμάτια επιλέχθηκαν από τις παραπάνω 2 περιπτώσεις, τα οποία τοποθετήθηκαν το καθένα σε ξεχωριστό σωλήνα erpendorf χωρητικότητας 1,5 ml και τα υπόλοιπα όλα μαζί θεωρήθηκαν ένα δείγμα, αντίστοιχα. Συνεπώς από κάθε μεταχείριση πραγματοποιήθηκε διαχείριση 4 δειγμάτων με επιφανειακά καθαρά φυμάτια και άλλων τεσσάρων από μη επιφανειακά καθαρά.
- Σε όλα τα δείγματα των μεταχειρίσεων έλαβε χώρα μηχανική θραύση των φυματίων με πλαστικό μικρογουδοχέρι (pestle), σε 100 μl μίγματος γλυκερόλης: TY σε αναλογία 1:1.
- Στη συνέχεια, έγινε εναπόθεση κηλίδας 20 μl σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο TY και με TY παρουσία Gm<sub>15</sub>. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 30°C για τουλάχιστον 3 ημέρες.



**Εικόνα 2.3:** Σχηματική περιγραφή της αποστείρωσης φυματίων και απομόνωσης σημασμένων ριζόβιων βακτηρίων από φυμάτια φασολιάς από θρεπτικό μέσο TY παρουσία ή μη του αντιβιοτικού Gm15.

### 2.3.5) Μελέτη της αποδοτικότητας των ριζοβιακών απομονώσεων κουκιού ως προς το σχηματισμό αζωτοδεσμευτικών φυματίων και την ενίσχυση της ανάπτυξης του ξενιστή απομόνωσης

Για τη μελέτη της αποδοτικότητας των ριζοβιακών απομονώσεων κουκιού ως προς το σχηματισμό αζωτοδεσμευτικών φυματίων και την ενίσχυση της ανάπτυξης του ξενιστή απομόνωσης διεξήχθη πείραμα τριών μηνών, χρησιμοποιώντας τις θερμοκηπιακές εγκαταστάσεις του εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η καλλιεργητική περίοδος της διεξαγωγής του πειράματος κάλυψε την περίοδο Ιανουαρίου -Απριλίου 2021. Για την καλλιέργεια του κουκιού χρησιμοποιήθηκε



αποστειρωμένο υπόστρωμα μίγμα περλίτη-βερμικουλίτη, αναλογίας 3:1 και υγρό θρεπτικό διάλυμα, η παρασκευή του οποίου έγινε από το εργαστήριο Κηπευτικών Καλλιεργειών.

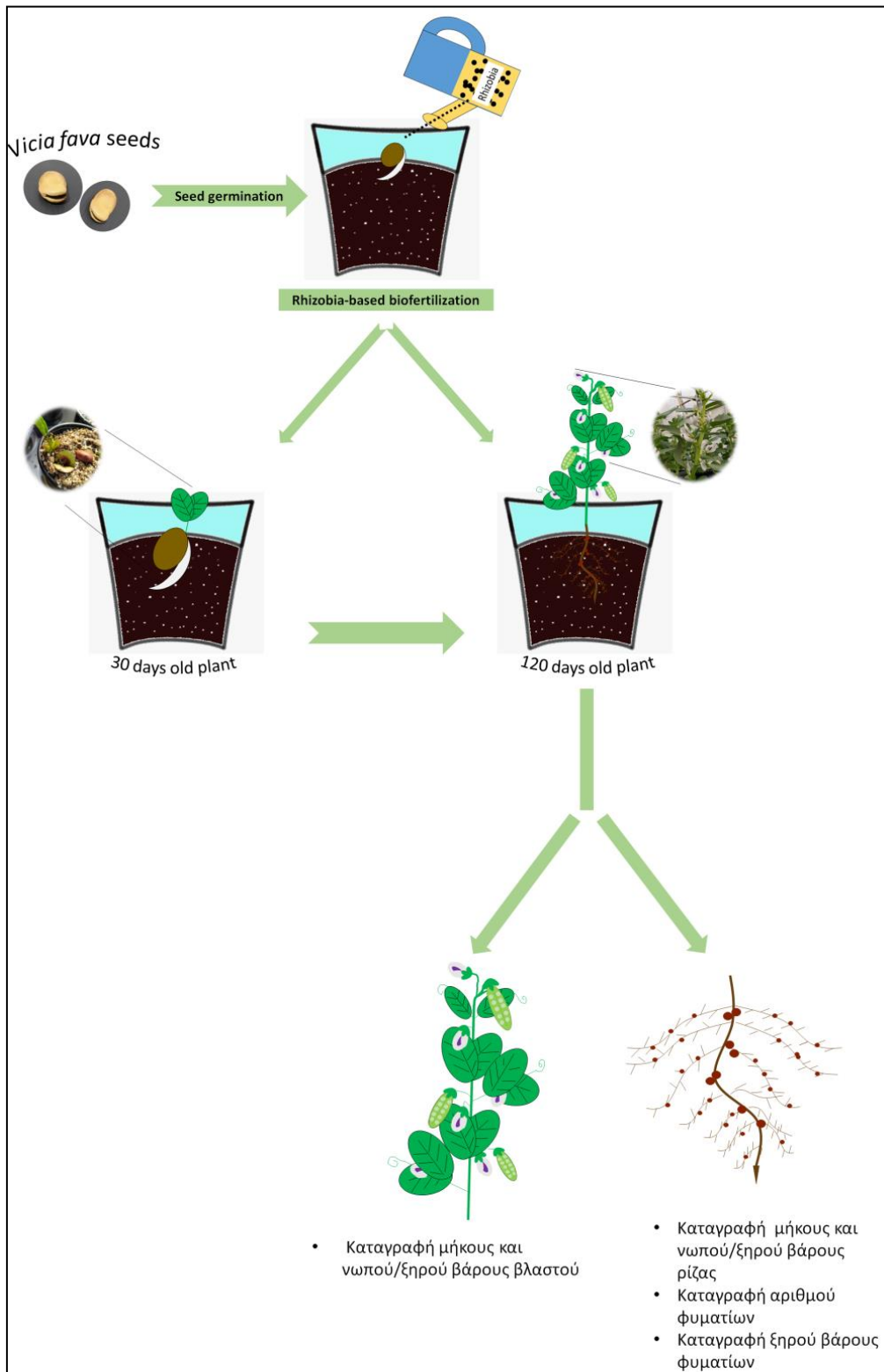
Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- Επιφανειακή απολύμανση σπόρου με υδατικό διάλυμα χλωρίνης 3% για 10 λεπτά και έκπλυση με αποστειρωμένο νερό (6 φορές).
- Προβλάστηση σπόρων κουκιού σε αποστειρωμένο υγρό διηθητικό χαρτί απουσία φωτισμού για 3-4 ημέρες στους 22°C.
- Φύτευση 3 προβλαστημένων σπόρων κουκιού ανά γλαστράκι με το ριζίδιο προς τα κάτω. Για κάθε μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 4 γλαστράκια και 12 σπόροι (3 σπόροι ανά γλάστρα).
- Εμβολιασμός προβλαστημένου σπόρου με 1ml ριζοβιακού εναιωρήματος ( $10^9$  κύτταρα ml<sup>-1</sup>) ανά σπόρο και κάλυψη του σπόρου με υπόστρωμα.
- Μετά από 40 ημέρες έγινε μεταφύτευση του περιεχομένου της κάθε γλάστρας σε γλάστρα μεγέθους 23x25, συμπληρωμένη με μη αποστειρωμένη τύρφη.
- Το πείραμα ολοκληρώθηκε μετά το πέρας 120 ημερών από τον εμβολιασμό των σπόρων με το κάθε ριζοβιακό εναιώρημα.

Η μελέτη της επίδρασης των ριζοβιακών απομονώσεων κουκιού στην ικανότητα σχηματισμού φυματίων και στην ανάπτυξη του κουκιού έγινε λαμβάνοντας υπόψη βασικά αγρονομικά χαρακτηριστικά όπως το μήκος (βλαστού, ρίζας), ο αριθμός φυματίων, το νωπό και ξηρό βάρος (βλαστού, ρίζας, φυματίων) σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα ανάπτυξης (σπόροι μη εμβολιασμένοι με ριζοβιακό εναιώρημα).

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη συνδυαστική χρήση του προγράμματος λογιστικών φύλλων Microsoft Excel και του προγράμματος στατιστικής ανάλυσης SPSS v.26.0. Πριν από την πραγματοποίηση οποιασδήποτε στατιστικής ανάλυσης, έγινε έλεγχος της κανονικότητας (Normality) των δειγμάτων με την πραγματοποίηση του τεστ των Shapiro- Wilk καθώς και έλεγχος ισότητας των διακυμάνσεων των δειγμάτων (τεστ ομοιογένειας, homogeneity test) μέσω του τεστ Levene. Σε δεδομένα δειγμάτων που ακολουθούν κανονική κατανομή και ταυτόχρονα παρουσιάζουν ομοιογένεια, πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης (Analysis Of Variance, ANOVA) κατά έναν παράγοντα (One way). Για τον έλεγχο σημαντικότητας μεταξύ των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε: 1) t-test για τον έλεγχο της διαφοράς δύο μέσων από ανεξάρτητα δείγματα και 2) παραμετρικό τεστ πολλαπλών συγκρίσεων LSD ( $p \leq 0,05$ ) για την ανάδειξη των στατιστικά σημαντικών διαφορών του μέσου όρου μεταξύ όλων των δειγμάτων. Στην περίπτωση που οι

προϋποθέσεις της κανονικότητας παραβιάστηκαν πραγματοποιήθηκε το μη παραμετρικό τεστ πολλαπλών συγκρίσεων Kruskal–Wallis.



**Εικόνα 2.4:** Σχηματική περιγραφή της διαδικασίας προώθησης της ανάπτυξης του κουκιού κάνοντας εμβολιασμό του σπόρου με ριζόβια κουκιού.

## 2.4) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 2.4.1) ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΗΓΕΝΩΝ ΡΙΖΟΒΙΩΝ ΑΠΟ ΦΥΜΑΤΙΑ ΚΟΥΚΙΑΣ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΑ ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ

#### 2.4.1.1) Απομόνωση και μορφοφυσιολογικός χαρακτηρισμός ριζοβίων από φυτά κουκιού

Στην παρούσα διατριβή από ριζικά φυμάτια τοπικών ποικιλιών κουκιού δημιουργήθηκε μια «βιβλιοθήκη» με βιολογικό υλικό: φυμάτια, εκχυλίσματα φυματίων και καθαρές καλλιέργειες ριζοβακτηρίων, αποθηκευμένα για μακροχρόνια χρήση στους -80°C. Μέσω της συνδυαστικής εφαρμογής μικροβιολογικών και μοριακών τεχνικών απομονώθηκαν 70 ριζόβια κουκιού. Η ονοματοδοσία τους βασίστηκε σε δυο συνθετικά μέρη. Το πρώτο αναφέρεται στο ξενιστή απομόνωσης κουκί και το δεύτερο στην περιοχή απομόνωσης (Πίνακας 2.9).

Πίνακας 2.9: Απομόνωση ριζοβίων από φυμάτια τοπικών ποικιλιών κουκιού από διάφορες περιοχές της Ελλάδας.			
Τύπος ψυχανθούς	Περιοχές απομόνωσης φυματίων	Υποψήφια ριζόβια	Κωδική Ονοματοδοσία
Κουκί, <i>V. faba</i> (VF)	Πρέβεζα (EPIROS)	17	VFEP
	Ημαθία (IMATHIA)	4	VFIM
	Αττική (ATHENS)	5	VFAT
	Λευκάδα (LEFKADA)	8	VFLE
	Κύθηρα (KYTHIRA)	6	VFKY
	Ηράκλειο (CRETE)	16	VFCR
	Φενεός (FENEOS)	14	VFFE
Συνολικά		70	

Η διάκριση των παραπάνω απομονώσεων σε ριζόβια βασίστηκε αρχικά στα μορφοφυσιολογικά χαρακτηριστικά των αποικιών, όπως ο ρυθμός ανάπτυξης, το σχήμα, το χρώμα καθώς και η ικανότητα τους να αναπτύσσονται στο θρεπτικό μέσο LB. Όλες οι απομονώσεις ήταν ταχέως αναπτυσσόμενες δίνοντας τη δυνατότητα παρατήρησης μονής αποικίας μετά από 2-4 ημέρες. Οι περισσότερες αποικίες αναπτύχθηκαν εντός τριών έως πέντε ημερών σε YMA, ήταν κυκλικές και σχεδόν όλες βλεννώδεις, ανυψωμένες, διαμέτρου 2-4 mm και χρώματος λευκού ή μπεζ, παρουσία της χρωστικής Congo Red. Η συγκεκριμένη χρωστική χρησιμοποιείται για τη διάκριση των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (όπως τα περισσότερα ριζόβια), καθώς δεν απορροφάται από αυτά. Αντιθέτως η χρωστική αυτή απορροφάται από θετικά κατά Gram βακτήρια και κάποια ριζόβια κατ' εξαίρεση όπως τα βακτήρια *Sinorhizobium* spp, *Burkholderia sprentiae* και άλλα. Τα υπό μελέτη υποψήφια ριζόβια εξετάστηκαν με βάση τα μορφοφυσιολογικά τους χαρακτηριστικά και ως προς την ικανότητα ανάπτυξης σε διαφορετικά θρεπτικά μέσα, εκ των οποίων τα τέσσερα χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη

ριζοβίων (YMA, TY, PM, PYC) και το πέμπτο αποτελεί καθολικό μέσο ανάπτυξης βακτηρίων (LB). Όλα τα βακτήρια αναπτύσσονταν πάρα πολύ καλά στο YMA, πολύ καλά στο TY, καλά στο PM, λιγότερο καλά στο PYC και καθόλου στο LB (YMA> TY> PM> PYC). Ένα χαρακτηριστικό στοιχείο των ριζοβίων είναι η βλεννώδης υφή αποτέλεσμα της παραγωγής εξωπολυσακχαριτών (Ε.Π.Σ.), ειδικά όταν χρησιμοποιούνται συνθετικά μέσα ανάπτυξης (Dudman, 1976; Mort & Bauer, 1980; Tsien & Schmidt, 1980; Ghai et al., 1981). Η παραγωγή των Ε.Π.Σ. επηρεάζεται από το μέσο ανάπτυξης (Wilcockson & Werner, 1978), κάτι που παρατηρήθηκε και στην παρούσα εργασία, σε όλα σχεδόν τα εξεταζόμενα ριζόβια. Η παρατηρούμενη τάση παραγωγής βλέννας ήταν σχεδόν ίδια σε όλα τα ριζόβια και ανάλογη της ικανότητας ανάπτυξης τους στα 4 παραπάνω θρεπτικά, δηλαδή YMA> TY> PM> PYC.

Για το λόγο αυτό, το TY επιλέχθηκε ως το βασικό θρεπτικό ανάπτυξης των ριζοβίων καθώς επιτρέπει μειωμένη παραγωγή Ε.Π.Σ., οι οποίοι αυξάνουν το ιξώδες, καθιστώντας δύσκολη τη συλλογή των κυττάρων (Dudman, 1976; Mort & Bauer, 1980; Tsien & Schmidt, 1980; Ghai et al., 1981). Στην παρούσα εργασία, στις πειραματικές διαδικασίες απομόνωσης DNA (με CTAB και κίτ), πολλές φορές η παρουσία των παραγόμενων Ε.Π.Σ., δυσχέραινε τη διενέργεια της διαδικασίας πιθανόν λόγω της προσκόλλησης τους στα κύτταρα. Σύμφωνα με την εργασία του Tull (1985) η χρήση αλδοπεντοζών, πολυολών, οργανικών οξέων και όξινων σακχάρων προκαλεί υπερπαραγωγή Ε.Π.Σ., ενώ η χρήση αλδοεξοζών (π.χ. D-γαλακτόζη) ή αμινοξέων (π.χ. L-ασπαρτικό), όχι. Έτσι, η έντονη παραγωγή των Ε.Π.Σ. στο YMA οφείλεται στη μορφή της πηγής άνθρακα που περιέχει, δηλαδή στη μαννιτόλη (πολυόλη). Αντιθέτως, στα μέσα όπου χρησιμοποιείται η Τρυπτόνη (TY) και η Πεπτόνη (PM, PYC), το φαινόμενο είναι λιγότερο έντονο, καθώς η πηγή άνθρακα είναι είτε πεπτιδίο (Τρυπτόνη) είτε μίγμα πεπτιδίων με αμινοξέα (Πεπτόνη).

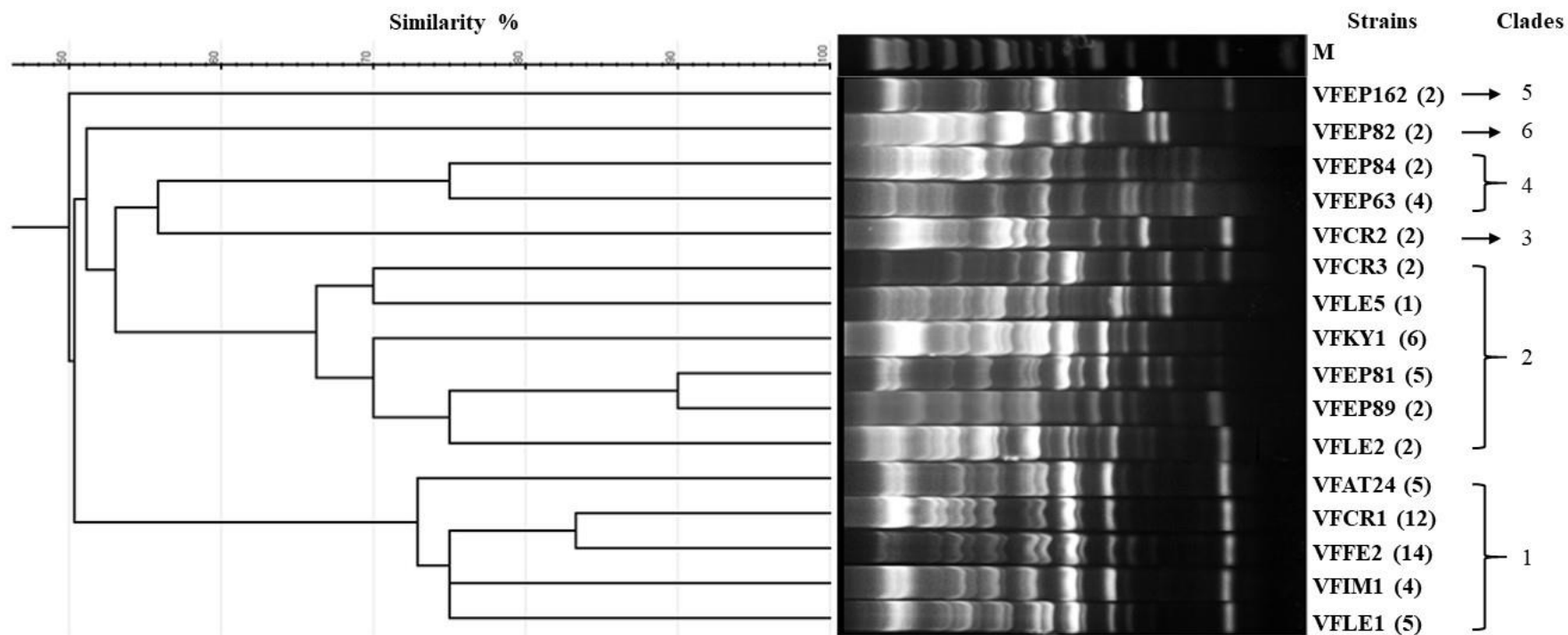
Μετά από αυτόν τον πρώιμο διαχωρισμό των ριζοβακτηρίων σε ριζόβια, τα βακτήρια που θεωρήθηκαν ως υποψήφια ριζόβια εξετάστηκαν μοριακά μέσω της ανίχνευσης του γονιδίου *nodC*. Η ενίσχυση του συγκεκριμένου γονιδίου και στα 70 υποψήφια ριζόβια επαλήθευσε τη μορφοφυσιολογική διάκρισή τους από τα ενδοφυτικά ριζοβακτήρια που δεν είναι ριζόβια. Τα υποψήφια ριζόβια υποβλήθηκαν σε περαιτέρω ανάλυση γενετικής ετερογένειας και φυλογενετικής κατάταξης σε επίπεδο είδους και συμβιοτύπου.

#### **2.4.1.2) Μελέτη γενετικής ετερογένειας ριζοβίων κουκιού**

Η μελέτη της γενετικής ετερογένειας των υποψηφίων ριζοβίων πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή της μεθοδολογίας BOX-PCR, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στην ανάλυση της γενετικής ποικιλομορφίας στενά συγγενικών ριζοβιακών στελεχών (de Lajudie et al., 2019). Στην παρούσα εργασία, η BOX-PCR αρχικά εφαρμόστηκε ανά περιοχή για την επιλογή

αντιπροσωπευτικών στελεχών, που εμφάνιζαν υψηλό ποσοστό ομοιότητας στα πρότυπα ζώνωσης DNA. Στελέχη που εμφανίζουν πολύ όμοια ή πανομοιότυπα πρότυπα γονιδιωματικού αποτυπώματος έχουν συνήθως παρόμοια ή ίδια ιδιοσυστατικά γονίδια (Moschetti et al., 2005; Valverde et al., 2006). Η ανάλυση του προτύπου ζωνών DNA στα αντιπροσωπευτικά στελέχη ανέδειξε 16 ξεχωριστά προφίλ BOX ανεξαρτήτως της μεθόδου απομόνωσης DNA που εφαρμόστηκε. Στελέχη με πανομοιότυπο πρότυπο γονιδιωματικού αποτυπώματος θεωρήθηκαν βακτηριακοί κλώνοι. Με βάση το δενδρόγραμμα της **Εικόνας 2.18** όπως αυτό προέκυψε από τα αποτελέσματα του γονιδιωματικού αποτυπώματος μέσω της BOX-PCR, 16 αντιπροσωπευτικά στελέχη κατανέμονται σε 6 κλάδους με βάση το διαφορετικό πρότυπο ζώνωσης, τα οποία επιλέχθηκαν για περαιτέρω φυλογενετική ανάλυση:

- Κλάδος 1: VFAT24, VFCE1, VFFE2, VFIM1, VFLE1
- Κλάδος 2: VFCE3, VFLE5, VFKY1, VFEP81, VFEP89, VFLE2
- Κλάδος 3: VFCE2
- Κλάδος 4: VFEP84, VFEP63
- Κλάδος 5: VFEP162
- Κλάδος 6: VFEP82



**Εικόνα 2.10:** Πρότυπο ζωνών γονιδιωματικού αποτυπώματος BOX-PCR 16 αντιπροσωπευτικών ριζοβιακών απομονώσεων από φυμάτια τοπικών ποικιλιών κουκιού καλλιεργημένων στον αγρό. Η αναγραφή του αριθμού μέσα σε παρένθεση, δεξιά των στελεχών, υποδηλώνει τον αριθμό των βακτηριακών κλώνων ανά πανομοιότυπο προφίλ- BOX. Στην κορυφή συμπεριλήφθηκε επίσης ένας μοριακός δείκτης 1 kb DNA Ladder (Invitrogen) (M). Η ανάλυση ανά συστάδα-ομάδα (Cluster analysis) πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα GelJ v2.0 χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο UPGMA, τον συντελεστή Dice και επίπεδο ανοχής 1,0%.

### 2.4.1.3) Μοριακός χαρακτηρισμός ριζοβίων κουκιού σε επίπεδο είδους

Για την ταξινόμηση των αντιπροσωπευτικών ριζοβίων κουκιού σε επίπεδο είδους πραγματοποιήθηκε ανάλυση του γονιδίου 16S rDNA καθώς και πολυτοπική φυλογενετική ανάλυση MLSA. Αρχικά, τα υπό μελέτη ριζόβια ταυτοποιήθηκαν μέσω ανάλυσης ομοιότητας των αλληλουχιών τεσσάρων ιδιοσυστατικών γονιδίων, *rrs*, *recA*, *atpD*, *gyrB*, συγκριτικά με τις διαθέσιμες αλληλουχίες στη βάση δεδομένων της GenBank χρησιμοποιώντας τη μηχανή αναζήτησης BLASTN της NCBI. Σε όλες τις περιπτώσεις το αποτέλεσμα της ανάλυσης που εξήχθη ήταν *Rhizobium* spp. Στη συνέχεια, για τη λεπτομερή ανάλυση όλων των αλληλουχιών των υπό μελέτη γονιδίων, μέσω του λογισμικού MEGA X, αντλήθηκαν από τη βάση δεδομένων NCBI οι αριθμοί καταλογράφησης-εισαγωγής (accession number) των αντίστοιχων γονιδίων όλων των πρότυπων στελεχών που ανήκουν στο γένος *Rhizobium*.

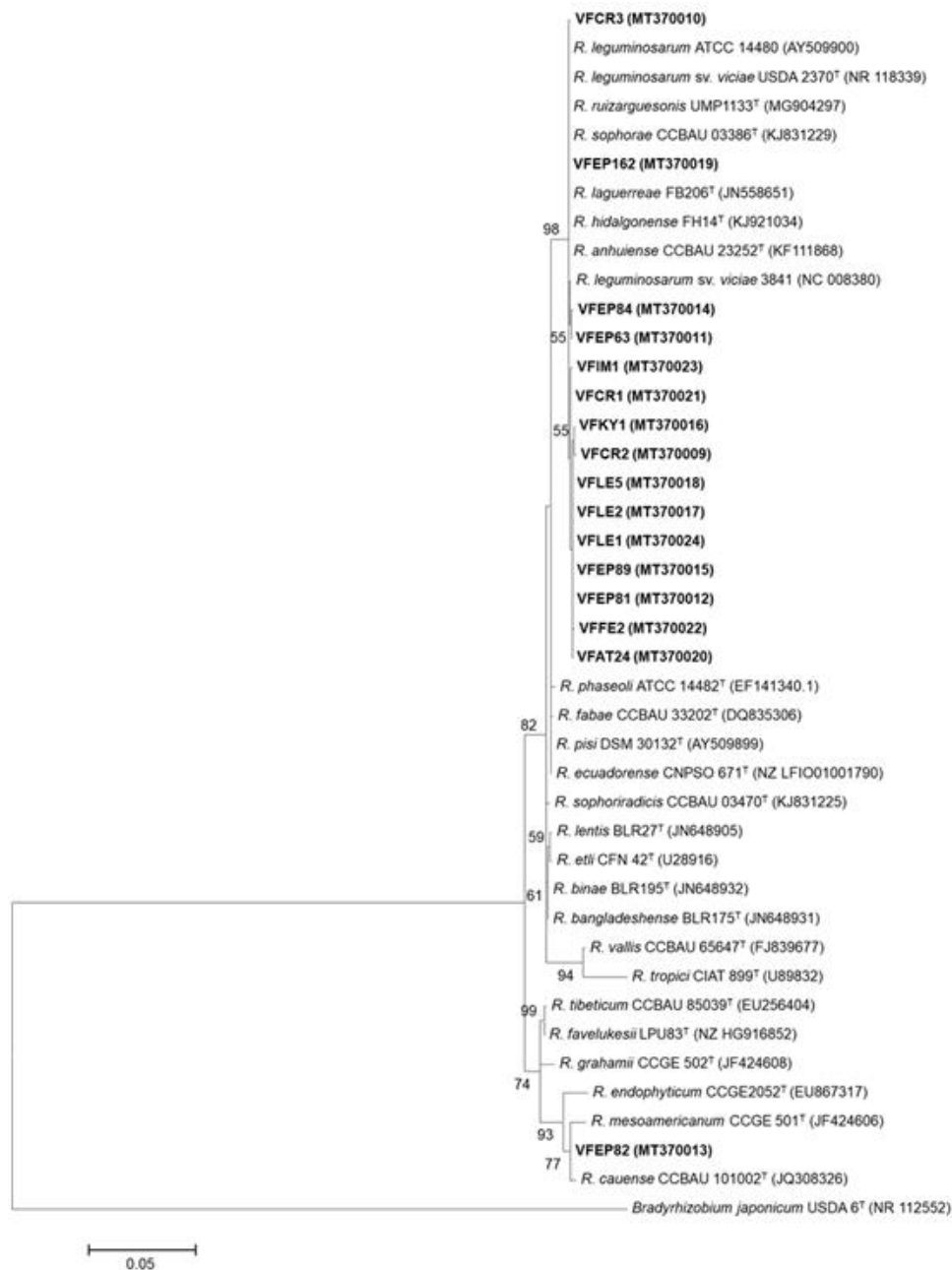
Γενικά, για την ταξινόμηση των ριζοβιακών ειδών σε επίπεδο γένους πραγματοποιείται ανάλυση του γονιδίου *rrs* (16S rDNA), επειδή η αλληλουχία του συγκεκριμένου γονιδίου εμφανίζει υψηλή ομοιότητα σε αρκετά πρότυπα στελέχη των *Rhizobium* ή είναι ταυτόσημη (Mnasri et al., 2012; Saïdi et al., 2014). Σχεδόν πλήρους μήκους αλληλουχίες του γονιδίου *rrs* (~1400bp) ορίστηκαν για όλα τα αντιπροσωπευτικά στελέχη και μια περιοχή μήκους 1303bp χρησιμοποιήθηκε για τη στοίχιση των 16 αντιπροσωπευτικών στελεχών και των πρότυπων στελεχών, για την κατασκευή φυλογενετικού δέντρου. Το δέντρο που προέκυψε έδειξε ότι όλες οι απομονώσεις σχετίζονται στενά με πρότυπα στελέχη ειδών του γένους *Rhizobium*. Το τελικό δέντρο ανακατασκευάστηκε απορρίπτοντας τα φυλογενετικά απόμακρα και κρατώντας τα φυλογενετικά πλησιέστερα (**Εικόνα 2.5**) υπολογίζοντας το μεταξύ τους ποσοστό ομοιότητας (%) χρησιμοποιώντας το βιοπληροφορικό εργαλείο CLUSTAL Omega.

Σύμφωνα με το φυλογενετικό δέντρο της **Εικόνας 2.5** σχεδόν όλα τα στελέχη που απομονώθηκαν από τα φυμάτια κουκιού είχαν στενά συγγενικές αλληλουχίες *rrs* (99,6-100%) με συγκεκριμένα πρότυπα στελέχη, για αυτό και ομαδοποιήθηκαν εντός της φυλογενετικής ομάδας που περιείχε τα στελέχη:

- *Rhizobium anhuiense* CCBAU 23252<sup>T</sup>
- *Rhizobium hidalgonense* FH14<sup>T</sup>
- *Rhizobium laguerreae* FB206<sup>T</sup>
- *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae* (Rlv) USDA 2370<sup>T</sup>
- *Rhizobium ruizarguesonis* UMP1133<sup>T</sup>
- *Rhizobium sophorae* CCBAU 03386<sup>T</sup>
- *Rhizobium leguminosarum* sv. *trifolii* ATCC 14480<sup>T</sup>
- *Rhizobium cauense* CCBAU 101002<sup>T</sup>

Σύμφωνα με τα ποσοστά ομοιότητας του **Πίνακας 2.10**, οι απομονώσεις: VFLE1, VFCE1, VFFE2, VFAT24, VFIM1, VFLE5, VFCE3, VFLE2, VFEP81, VFKY1, VFEP89, VFEP63, VFEP84, VFCE2 εμφάνισαν μεγαλύτερο ποσοστό ομοιότητας με το *Rhizobium laguerreae* FB206<sup>T</sup>. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα *R. anhuiense* CCBAU 23252<sup>T</sup>, *R. hidalgonense* FH14<sup>T</sup>, *R. laguerreae* FB206<sup>T</sup>, *Rln* USDA 2370<sup>T</sup>, *R. ruizarguesonis* UMP1133<sup>T</sup> και *R. sophorae* CCBAU 03386<sup>T</sup> παρουσίασαν πανομοιότυπες αλληλουχίες *rrs*, γεγονός που συναντάται και σε προηγούμενες αναφορές (Saïdi et al., 2014; Jiao, et al., 2015; Yan et al., 2017; Jorriin et al., 2020). Με βάση το ποσοστό ομοιότητας της αλληλουχίας *rrs*, η απομόνωση VFEP162 ομαδοποιήθηκε με το *Rhizobium hidalgonense* FH14<sup>T</sup>. Εξάιρεση αποτέλεσε η απομόνωση VFEP82 η οποία δημιούργησε ένα ξεχωριστό σύμπλεγμα, με φυλογενετικά πλησιέστερο (99,77% ομοιότητα αλληλουχίας *rrs*) το *Rhizobium cauense* CCBAU 101002<sup>T</sup>, το οποίο αρχικά απομονώθηκε από το ποώδες *Kummerowia stipulacea* στην Κίνα (Liu et al., 2012).





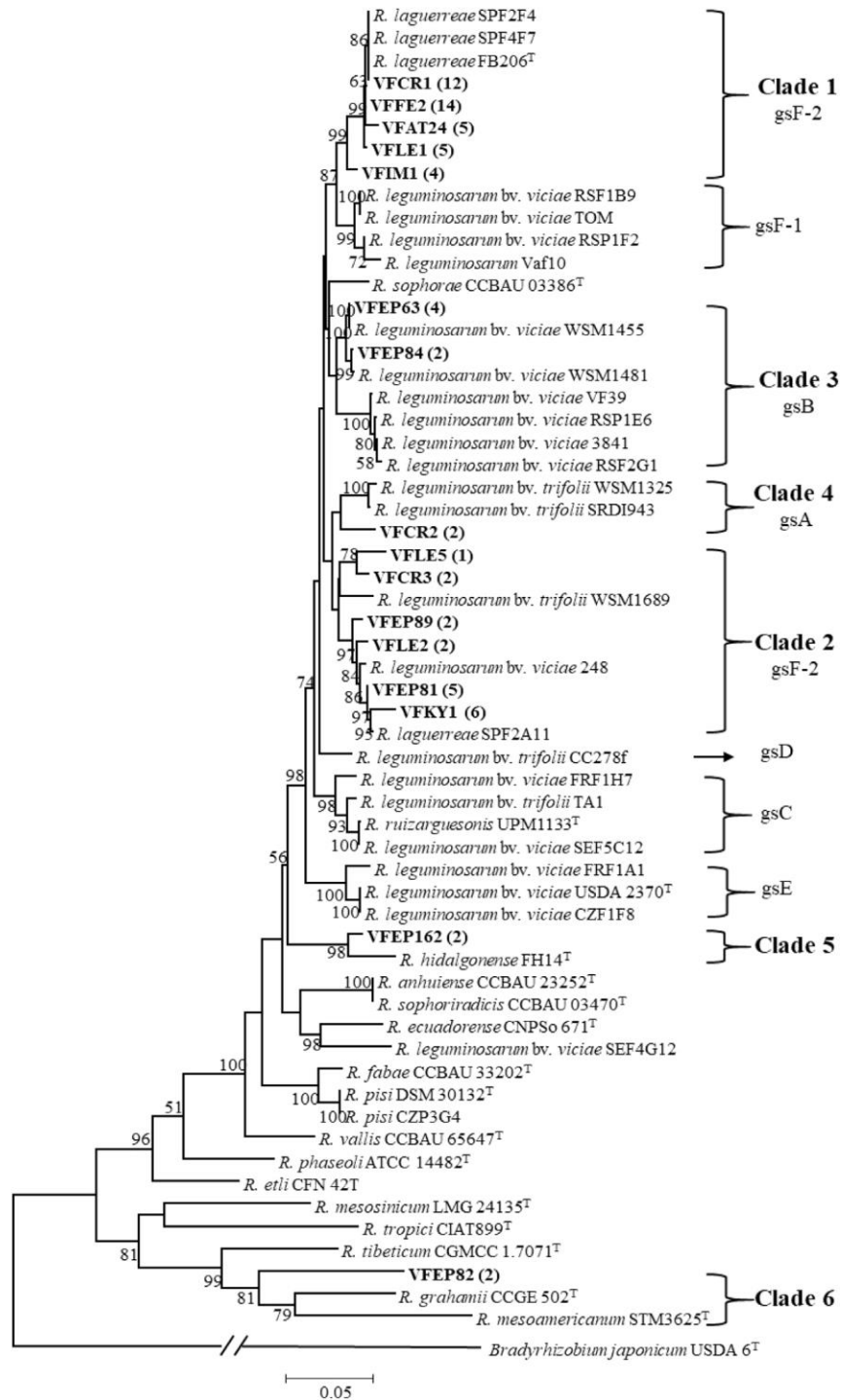
**Εικόνα 2.5:** Maximum Likelihood (ML) φυλογενετικό δέντρο βασισμένο σε σχεδόν ολόκληρη αλληλουχία του γονιδίου 16S rRNA (1303 bp) δείχνει τις ταξινομικές σχέσεις των στελεχών που αντιπροσωπεύουν τις διαφορετικές BOX ομάδες. Οι απομονώσεις της παρούσας εργασίας σημάνθηκαν με έντονη γραφή και τα πρότυπα στελέχη επισημάνθηκαν με εκθέτη "T". Οι κωδικοί εισαγωγής των αλληλουχιών *rrs* της GenBank δηλώθηκαν εντός παρένθεσης. Οι τιμές Bootstrap (πάνω από 50%) υπολογίστηκαν για 500 επαναλήψεις και απεικονίζονται στους κόμβους. Η γραμμή κλίμακας δείχνει τον αριθμό των νουκλεοτιδίων υποκαταστάσεων ανά τοποθεσία. Η φυλογενετική ανάλυση διεξήχθη στο MEGA X χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο ML και το μοντέλο T92 + G + I. Το *B. japonicum* USDA 6<sup>T</sup>, χρησιμοποιήθηκε ως στέλεχος εκτός ομάδας. Το «R.» χρησιμοποιήθηκε ως συντομογραφία του ονόματος του γένους, δηλαδή του *Rhizobium*.

**Πίνακας 2.10:** Ποσοστά ομοιότητας νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του γονιδίου 16S rRNA μεταξύ επιλεγμένων στελεχών *Rhizobium*. Τα πλησιέστερα πρότυπα στελέχη εμφανίζονται με έντονη γραφή.

Στελέχη	Ομοιότητα νουκλεοτιδικών αλληλουχιών rrs (%)																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1 VFLE5 (MT370018)	100	100	100	99,92	99,85	99,92	100	99,69	96,93	100	99,77	99,85	99,77	99,85	99,92	100	99,85	99,85	99,85	99,77	99,85	99,85	96,69	99,85
2 VFLE2 (MT370017)		100	100	99,92	99,85	99,92	100	99,69	96,93	100	99,77	99,85	99,77	99,85	99,92	100	99,85	99,85	99,85	99,77	99,85	99,85	96,69	99,85
3 VFLE1 (MT370024)			100	99,92	99,85	99,92	100	99,69	96,93	100	99,77	99,85	99,77	99,85	99,92	100	99,85	99,85	99,85	99,77	99,85	99,85	96,69	99,85
4 VFKY1 (MT370016)				100	99,77	99,85	99,92	99,77	96,93	99,92	99,85	99,77	99,69	99,92	99,85	99,92	99,77	99,77	99,77	99,69	99,77	99,77	96,69	99,77
5 VFIM1 (MT370023)					100	99,77	99,85	99,69	96,77	99,85	99,77	99,85	99,77	99,69	99,92	99,85	99,85	99,85	99,85	99,77	99,85	99,85	96,54	99,85
6 VFFE2 (MT370022)						100	99,92	99,62	96,85	99,92	99,69	99,77	99,69	99,77	99,85	99,92	99,77	99,77	99,77	99,69	99,77	99,77	96,62	99,77
7 VFEP89 (MT370015)							100	99,69	96,93	100	99,77	99,85	99,77	99,85	99,92	100	99,85	99,85	99,85	99,77	99,85	99,85	96,69	99,85
8 VFEP84 (MT370014)								100	96,69	99,69	99,92	99,85	99,77	99,69	99,77	99,69	99,85	99,85	99,85	99,77	99,85	99,85	96,46	99,85
9 VFEP82 (MT370013)									100	96,93	96,77	96,77	96,69	96,85	96,85	96,93	96,77	96,77	96,77	96,69	96,77	96,77	96,77	96,77
10 VFEP81 (MT370012)										100	99,77	99,85	99,77	99,85	99,92	100	99,85	99,85	99,85	99,77	99,85	99,85	96,69	99,85
11 VFEP63 (MT370011)											100	99,92	99,85	99,77	99,85	99,92	99,92	99,92	99,92	99,85	99,92	99,92	96,54	99,92
12 VFEP162 (MT370019)												100	99,92	99,69	99,92	99,85	100	100	100	99,92	100	100	96,54	100
13 VF3R3 (MT370010)													100	99,62	99,85	99,77	99,92	99,92	99,92	99,85	99,92	99,92	96,46	99,92
14 VF3R2 (MT370009)														100	99,77	99,85	99,69	99,69	99,69	99,62	99,69	99,69	96,62	99,69
15 VF3R1 (MT370021)															100	99,92	99,92	99,92	99,92	99,85	99,92	99,92	96,62	99,92
16 VFAT24 (MT370020)																100	99,85	99,85	99,85	99,77	99,85	99,85	96,69	99,85
17 <i>Rhizobium sophorae</i> CCBAU 03386 <sup>T</sup> (KJ831229)																	100	100	100	99,92	100	100	96,54	100
18 <i>Rhizobium ruizarguesonis</i> UMP1133 <sup>T</sup> (MG904297)																		100	100	99,92	100	100	96,54	100
19 <i>Rhizobium leguminosarum</i> sv. <i>viciae</i> USDA 2370 <sup>T</sup> (NR 118339)																			100	99,92	100	100	96,54	100
20 <i>Rhizobium leguminosarum</i> ATCC 14480 <sup>T</sup> (AY509900)																				100	99,92	99,92	96,46	99,92
21 <i>Rhizobium laguerreae</i> FB206 <sup>T</sup> (JN558651)																					100	100	96,54	100
22 <i>Rhizobium hidalgonense</i> FH14 <sup>T</sup> (KJ921034)																						100	96,54	100
23 <i>Rhizobium cauense</i> CCBAU 101002 <sup>T</sup> (JQ308326)																							100	96,54
24 <i>Rhizobium anhuiense</i> CCBAU 23252 <sup>T</sup> (KF111868)																								100
	Ομοιότητα νουκλεοτιδικών αλληλουχιών rrs (%)																							

Στο σημείο αυτό επισημαίνεται ότι η ανάλυση μόνο του γονιδίου *rrs* δεν θα ήταν αρκετή ώστε τα υπό μελέτη στελέχη να προσδιοριστούν σε επίπεδο είδους. Το γεγονός αυτό συμφωνεί με τη γενικευμένη άποψη ότι το γονίδιο *rrs* είναι ένας ανεπαρκής φυλογενετικός δείκτης για την ανάδειξη των φυλογενετικών γραμμών των ειδών και της τοπολογίας τους επί του αντίστοιχου δέντρου (Gevers et al., 2005). Για το λόγο αυτό διενεργήθηκε MLSA, η οποία εφαρμόζεται ευρέως για τον προσδιορισμό του είδους των *Rhizobium*, καθώς αποτελεί αξιόπιστη και οικονομικά αποδοτική μέθοδος. Σε πολλές περιπτώσεις η μεθοδολογία MLSA συσχετίζεται με τη γονιδιωματική σύγκριση στελεχών με βάση το μέσο όρο τιμών νουκλεοτιδικής ταυτότητας γονιδιωμάτων (ANI). Από προηγούμενες μελέτες έχει φανεί ότι για τον καθορισμό των ειδών το όριο 95% κατά ANI αντιστοιχίζεται με ομοιότητα 97,36% στην ανάλυση MLSA τριών ιδιοσυστατικών γονιδίων (Tong et al., 2018). Παρ'όλα αυτά δεν είναι δυνατό να καθοριστεί ένα καθολικό κατώφλι για τη διάκριση των γονιδιωματικών ειδών των *Rhizobium* στην ανάλυση MLSA, καθώς αυτό μπορεί να διαφοροποιείται ανάλογα με τον αναλυόμενο αριθμό και τύπο τόσο των ειδών όσο και των γονιδίων.

Οι φυλογενετικές συσχετίσεις διερευνήθηκαν περαιτέρω με την ανάλυση τριών ιδιοσυστατικών γονιδίων (*recA*, *atpD* και *gyrB*) τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη διαφοροποίηση των ριζοβίων σε καθορισμένα είδη. Μέρος του τμήματος των παραπάνω γονιδίων ενισχύθηκε και αλληλουχήθηκε από όλα τα αντιπροσωπευτικά στελέχη. Στη συνέχεια, από τη βάση δεδομένων GenBank ανακτήθηκαν οι διαθέσιμες αλληλουχίες των αντίστοιχων γονιδίων των πρότυπων στελεχών *Rhizobium* και μαζί με τις αντίστοιχες αλληλουχίες γονιδίων των υπό μελέτη ριζοβίων επεξεργάστηκαν κατάλληλα, προκειμένου όλες οι αλληλουχίες να είναι ίδιου μήκους. Στην παρούσα ανάλυση, η διαθεσιμότητα των ακολουθιών καθόρισε τόσο τον αριθμό των πρότυπων στελεχών όσο και την ταξινομική ομάδα που περιλαμβάνονται στην ανάλυση, καθώς και το μήκος των στοιχιζόμενων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών. Αποτέλεσμα της παραπάνω διαδικασίας ήταν η ευθυγράμμιση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μήκους 462 bp, 441 bp και 597 bp για τα *recA*, *atpD* και *gyrB*, αντίστοιχα, οι οποίες στη συνέχεια συνδυάστηκαν-ενοποιήθηκαν διαδοχικά οδηγώντας στη δημιουργία ευθυγραμμισμένης αλληλουχίας μήκους 1500 bp (**Εικόνα 2.6**). Στο **Πρόσθετο Υλικό**, παρουσιάζονται τα φυλογενετικά δέντρα ανά μεμονωμένο ιδιοσυστατικό γονίδιο (**Εικόνες Σ2.1-2.3**).



**Εικόνα 2.6:** Maximum Likelihood (ML) φυλογενετικό δέντρο βασισμένο στην ενοποιημένη αλληλουχία των επιμέρους μερικών τμημάτων των αλληλουχιών *recA-atpD-gyrB* (μήκους 1500bp) δείχνει τις ταξινομικές σχέσεις των υπό μελέτη στελεχών, των αντιπροσωπευτικών πρότυπων στελεχών και των γονιδιωματικών ειδών του συμπλέγματος των ειδών των *Rhizobium*. Οι απομονώσεις της παρούσας εργασίας σημάνθηκαν με έντονη γραφή και τα πρότυπα στελέχη επισημάνθηκαν με εκθέτη "T". Ο αριθμός των απομονώσεων που ανήκουν στον ίδιο τύπο με βάση τη BOX-PCR, δηλώθηκαν σε παρένθεση. Οι τιμές bootstraps (πάνω από 50%) υπολογίστηκαν για 500 επαναλήψεις και απεικονίζονται στους κόμβους. Η γραμμή κλίμακας δείχνει τον αριθμό των νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων ανά τοποθεσία. Η φυλογενετική ανάλυση διεξήχθη στο MEGA X χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο ML και το μοντέλο GeneralTime Reversible model plus Gamma rate distribution plus invariant site (GTR + G + I). Το «R.» χρησιμοποιήθηκε ως συντομογραφία του ονόματος του γένους, δηλαδή του *Rhizobium*.

**Πίνακας 2.11:** Ποσοστά ομοιότητας νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του γονιδίου *recA-atpD-gyrB* μεταξύ επιλεγμένων στελεχών *Rhizobium*. Τα πλησιέστερα πρότυπα στελέχη εμφανίζονται με έντονη γραφή.

Στελέχη	Ομοιότητα των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών <i>recA-atpD-gyrB</i> (%)																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1 VFLE5	100	96,71	96,44	96,37	96,3	96,44	96,98	96,84	85,69	96,71	96,91	93,08	97,92	96,71	96,3	96,44	96,03	96,03	95,03	<b>96,3</b>	92,94	85,01	93,62
2 VFLE2		100	96,71	98,59	97,31	96,71	98,79	97,04	85,95	98,92	97,24	92,94	97,72	96,64	96,84	96,71	96,17	96,37	95,36	<b>96,84</b>	92,67	85,75	93,55
3 VFLE1			100	96,37	98,52	99,87	97,04	97,24	85,62	96,71	97,18	93,21	97,11	95,97	99,73	99,87	96,37	96,24	95,36	<b>99,73</b>	92,94	85,22	93,88
4 VFKY1				100	96,71	96,37	98,45	97,24	86,09	99,66	97,31	93,08	97,51	97,04	96,24	96,37	95,97	<b>96,57</b>	95,43	96,24	92,81	86,09	93,88
5 VFIM1					100	98,52	97,38	97,51	85,75	97,04	97,45	93,15	97,11	96,37	98,66	98,52	96,51	96,64	95,43	<b>98,66</b>	92,88	85,42	93,95
6 VFFE2						100	97,04	97,24	85,69	96,71	97,18	93,28	97,11	96,1	99,87	100	96,51	96,24	95,5	<b>99,87</b>	93,01	85,28	93,88
7 VFEP89							100	97,72	85,89	98,79	97,78	93,48	97,58	97,04	96,91	97,04	96,57	96,51	95,56	<b>96,91</b>	93,21	85,69	93,95
8 VFEP84								100	86,42	97,58	99,46	93,68	97,58	96,77	97,11	97,24	97,04	96,91	95,9	<b>97,11</b>	93,41	85,95	94,35
9 VFEP82									100	86,22	86,36	86,63	86,29	86,09	85,69	85,69	86,02	85,62	86,16	85,69	86,42	<b>90,52</b>	86,29
10 VFEP81										100	97,65	93,35	97,85	97,04	96,57	96,71	96,3	96,51	95,36	<b>96,57</b>	93,08	86,02	93,82
11 VFEP63											100	93,62	97,51	96,84	97,04	97,18	97,24	<b>97,11</b>	95,97	97,04	93,35	85,89	94,29
12 VFEP162												100	93,41	93,15	93,15	93,28	93,01	92,94	93,28	93,15	<b>99,6</b>	86,36	93,21
13 VFCE3													100	96,51	96,98	97,11	96,51	96,51	95,43	<b>96,98</b>	93,15	85,48	93,68
14 VFCE2														100	95,97	96,1	96,37	<b>96,71</b>	95,7	95,97	93,01	86,02	94,02
15 VFCE1															100	99,87	96,37	96,1	95,5	<b>100</b>	92,88	85,28	93,75
16 VFAT24																100	96,51	96,24	95,5	<b>99,87</b>	93,01	85,28	93,88
17 <i>Rhizobium sophorae</i> CCBAU 03386 <sup>T</sup>																	100	96,24	95,5	96,37	92,74	85,62	93,82
18 <i>Rhizobium ruizarguesonis</i> UPM1133 <sup>T</sup>																		100	95,77	96,1	92,67	85,42	93,88
19 <i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA 2370 <sup>T</sup>																			100	95,5	93,01	85,69	93,48
20 <i>Rhizobium laguerreae</i> FB206 <sup>T</sup>																				100	92,88	85,28	93,75
21 <i>Rhizobium hidalgonense</i> FH14 <sup>T</sup>																					100	86,09	92,94
22 <i>Rhizobium grahamii</i> CCGE 502 <sup>T</sup>																						100	85,95
23 <i>Rhizobium anhuiense</i> CCBAU 23252 <sup>T</sup>																							100
	Ομοιότητα των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών <i>recA-atpD-gyrB</i> (%)																						

Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις τα δέντρα ομαδοποίησαν τα υπό μελέτη βακτήρια σε διακριτικά καλώς υποστηριζόμενα συμπλέγματα πρότυπων στελεχών *Rhizobium*. Για να προσδιοριστεί η σχέση των στελεχών με τα προηγουμένως καθορισμένα γονιδιωματικά είδη του είδους *Rhizobium leguminosarum* (Young et al., 2021), τα φυλογενετικά δέντρα περιλάμβαναν επίσης εκπροσώπους των επτά γονιδιωματικών ειδών και δύο ακόμα στελεχών (CZP3G4 και SEF4G12) (Kumar et al., 2015; Boivin et al., 2020).

Γενικά, η φυλογένεια που προέκυψε από τα μεμονωμένα γονίδια σύγκλιε με εκείνη των ενοποιημένων τριών γονιδίων. Στη φυλογένεια με βάση την ανάλυση MLSA, σχεδόν όλα τα πρότυπα στελέχη, εκτός από τα VFEP162 και VFEP82, σχημάτισαν ένα διευρυμένο σύμπλεγμα που περιείχε τα πρότυπα στελέχη *R. laguerreae* FB206<sup>T</sup>, *R. leguminosarum* sv. *viciae* (Rlv) USDA 2370<sup>T</sup>, *R. ruizarguesonis* UPM1133<sup>T</sup>, *R. sophorae* CCBAU 03386<sup>T</sup> και γονιδιωματικά είδη του συμπλέγματος *Rhizobium leguminosarum*. Συγκεκριμένα, πέντε διαφορετικοί γενότυποι βρέθηκαν σε σαράντα απομονώσεις (**Πίνακες 2.12 και 2.13**), που αντιπροσωπεύονται από τα VFCE1, VFLE1, VFAT24, VFFE2 και VFIM1 (κλάδος 1). Οι παραπάνω αντιπροσωπευτικές απομονώσεις τοποθετήθηκαν σε ένα σύμπλεγμα στενού εύρους που περιείχε στελέχη του γονιδιωματικού είδους gsF-2, τα οποία φυλογενετικά συσχετίστηκαν με το *Rhizobium laguerreae* FB206<sup>T</sup> με ομοιότητα 100%, 99,73%, 99,27%, 99,87% και 98,66%, αντίστοιχα. Τα στελέχη του κλάδου 1 ορίστηκαν ως *R. laguerreae* λόγω του υψηλού ποσοστού ομοιότητας με το τελευταίο και της θέσης τους στο δέντρο ML.

Λαμβάνοντας υπόψη την ασαφή διάκριση των γονιδιακών ειδών μέσω της ανάλυσης MLSA και τον ορισμό των νέων gsF-2, χωρίς αυτός να είναι σίγουρος, η ταξινομική κατάσταση των απομονώσεων θα χρειαστεί περαιτέρω διευκρίνιση με ανάλυση γονιδιώματος. Ο κλάδος 3 περιείχε έξι απομονώσεις που εκπροσωπήθηκαν από τα στελέχη VFEP63 και VFEP84 (**Πίνακες 2.12 και 2.13**), τα οποία ήταν στενά συγγενικά με τα στελέχη απομονωμένα από φυμάτια κουκιού (WSM1455) και αρακά (WSM1481), από νησιά των Κυκλάδων, στην Ελλάδα (Kumar et al., 2015; Belli et al., 2021) (**Εικόνα 2.6**). Οι ενοποιημένες αλληλουχίες *recA-atpD-gyrB* των VFEP63 και WSM1455 ήταν ίδιες, ενώ εκείνες των VFEP84 και WSM1481 εμφάνισαν ομοιότητα 99,8%. Τα στελέχη WSM1455 και WSM1481 έχουν κατανεμηθεί στο gsB με βάση την ανάλυση γονιδιώματος, το οποίο είναι ισοδύναμο με το *Rhizobium* sp. IX, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (Kumar et al., 2015; Tong et al., 2018; Chirak et al., 2019; Boivin et al., 2020). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα δύο τελευταία στελέχη τοποθετήθηκαν σε κλάδο φυλογενετικά κοντά με το gsB (**Εικόνα 2.6**), με τη φυλογενετική αυτή θέση να επιβεβαιώνεται με βάση γονιδιωματικά δεδομένα (Boivin et al., 2020). Τα αποτελέσματα αυτά, μαζί με τη χαμηλή γονιδιωματική ομοιότητα (~96%) των WSM1455 και WSM1481, συγκριτικά με εκείνα που

ανήκουν στο gsB, κατέστησαν αβέβαιη την καταχώρηση τόσο των WSM1455, WSM1481 όσο και των VFEP63, VFEP84 στο gsB.

Στον κλάδο 4 εντάσσονται 2 στελέχη με εκπρόσωπο το VFCR2 (**Πίνακες 2.12 και 2.13**), τα οποία ομαδοποιήθηκαν μαζί με στελέχη που ανήκουν στο gsA, όπως το SRDI943 (97%) και το WSM1325 (96,73%), εμφανίζοντας μεγαλύτερη ομοιότητα με το πρότυπο στέλεχος *R. ruizarguesonis* UPM1133<sup>T</sup> (96,66%). Αξίζει να σημειωθεί ότι το VFCR2 παρουσίασε σε επίπεδο γονιδίων ομοιότητα με τα στελέχη SPF2A11 (97,06%), Rln 248 (96,8%) και WSM 1689 (97,06%) που ανήκουν στο gsF-2. Τα αποτελέσματα αυτά, σε συνδυασμό με τη θέση του VFCR2 στο φυλογενετικό δέντρο, δεν επέτρεψαν τον βέβαιο προσδιορισμό του VFCR2 με κάποιο καθορισμένο γονιδιωματικό είδος *Rhizobium*.

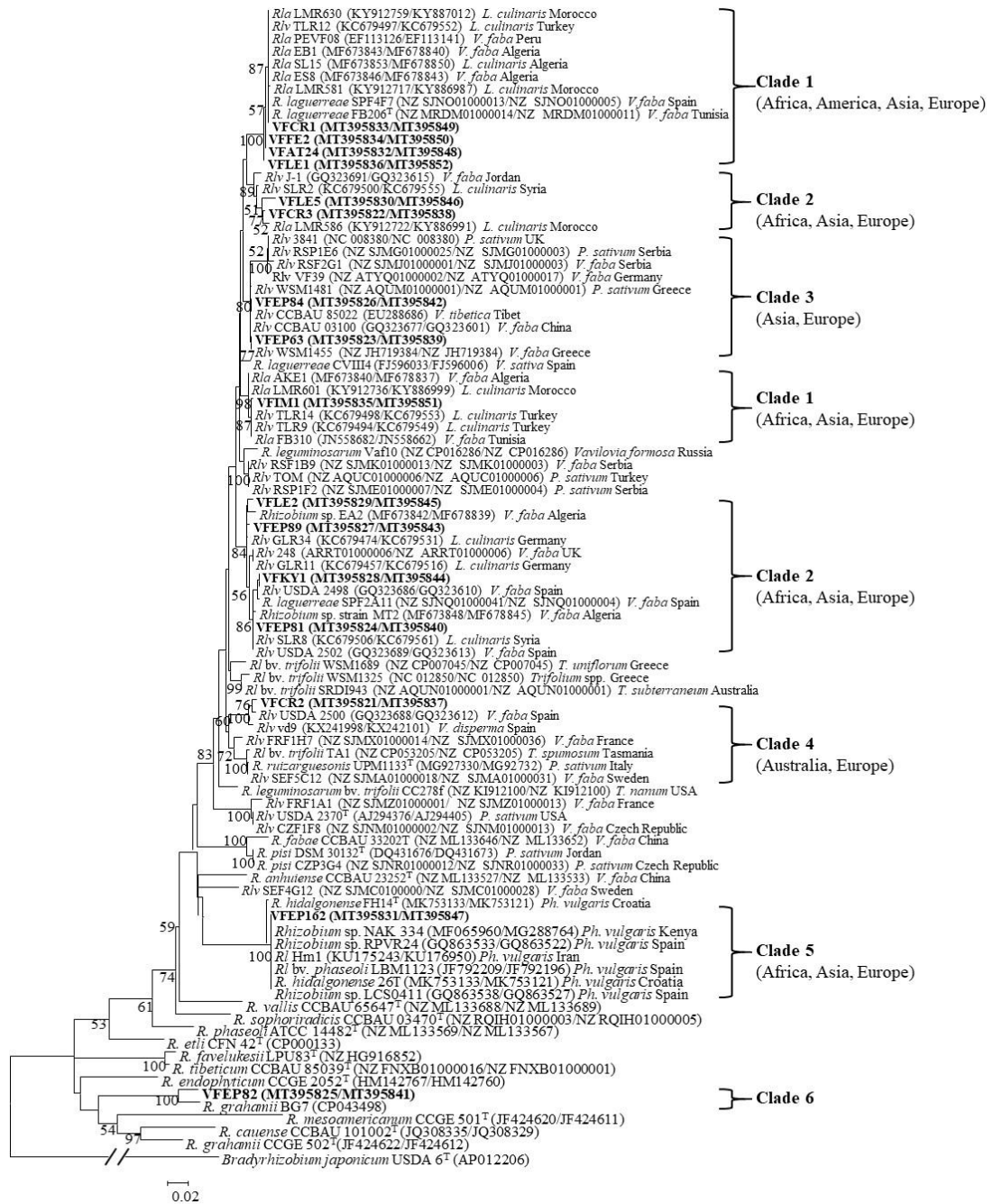
Επίσης από την ξεχωριστή ανάλυση των υπό μελέτη γονιδίων φάνηκε ότι τα ριζόβια των κλάδων 2, 3 και 4, διαθέτουν ανάμικτες χρωμοσωμικές αλληλουχίες των πρότυπων στελεχών *R. laguerreae*, *R. ruizarguesonis* και Rln USDA 2370<sup>T</sup>. Για παράδειγμα, τα γονίδια των *recA* και *atpD* των στελεχών VFLE5 και VFCR3 ήταν παρόμοια με αυτά των *R. ruizarguesonis* (96,54–97,19%) και *R. laguerreae* (96,6–98,87%), αντίστοιχα (**Πίνακας 2.12**). Τα γονίδια *recA*, *atpD* και *gyrB* του VFEP63 ήταν περισσότερο όμοια με τα *R. ruizarguesonis* (99,13%), *R. laguerreae* (97,73%) και Rln USDA 2370<sup>T</sup> (97,14%), αντίστοιχα. Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά δεν ήταν σε συμφωνία με τη θέση των απομονώσεων στα φυλογενετικά δέντρα, η οποία δεν υποστηρίχθηκε από υψηλές τιμές bootstrap. Ως εκ τούτου, το γεγονός αυτό δεν μπορεί να αποδοθεί σε οριζόντια μεταφορά και ανασυνδυασμό των χρωμοσωματικών τόπων μεταξύ ριζοβιακών στελεχών, όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως για στελέχη *Rl* και *R. laguerreae* που σχηματίζουν φυμάτια στο κουκί και σε άλλα είδη του γένους *Vicia* (Tian et al., 2010; Villadas et al., 2017; Taha et al., 2018). Επιπλέον, η συσχέτιση των απομονώσεων των κλάδων 2, 3 και 4 με καθορισμένα γονιδιωματικά είδη πρέπει να εξεταστεί με προσοχή έως ότου η ανάλυση γονιδιώματος αποσαφηνίσει με βεβαιότητα την ταξινομική τους κατάσταση.

Όσον αφορά τον κλάδο 5 εντοπίστηκαν 2 απομονώσεις οι οποίες αντιπροσωπεύονται από το VFEP162. Το VFEP162 αποτέλεσε ξεχωριστό κλάδο και ομαδοποιήθηκε μαζί με το *R. hidalgonense* FH14<sup>T</sup> με ποσοστό ομοιότητα 99,6% (**Εικόνα 2.6**). Το στέλεχος αυτό απομονώθηκε αρχικά από φυμάτια του *Phaseolus vulgaris* στο Μεξικό και είχε συμβίотυπο *phaseoli* (Yan et al., 2017). Μέχρι σήμερα, δεν έχει βρεθεί κανένα στέλεχος *R. hidalgonense* ικανό να σχηματίζει φυμάτια στον κουκί. Παρόμοια περίπτωση αναφέρθηκε στην Κίνα όπου εντοπίστηκαν στελέχη *R. vallis*, από τα οποία το ένα ήταν απομονωμένο από τα φυμάτια *Phaseolus vulgaris* με συμβίотυπο *phaseoli* (Wang et al., 2011), ενώ το άλλο είχε συμβίотυπο *viciae* και ικανότητα σχηματισμού φυματίων στο κουκί (Chen et al., 2018). Για την περίπτωση του στελέχους

VFEP162 είναι πιθανό τα συμβιωτικά γονίδια να αποκτήθηκαν από τα γύρω στελέχη μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων. Από όσα γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη καταγεγραμμένη αναφορά παρουσίας του *sv. nicias* σε στελέχη *R. hidalgonense*.

Τέλος, ο κλάδος 6 περιέχει 2 στελέχη τα οποία αντιπροσωπεύτηκαν από το VFEP82. Το στέλεχος αυτό εμφάνισε υψηλότερη ομοιότητα (90,58%) με το *R. grahamii* CCGE 502<sup>T</sup>, το οποίο απομονώθηκε από φυμάτια *Dalea leporina* στο Μεξικό (López-López et al., 2012). Παρόλο που το γονίδιο *rrs* του VFEP82 ήταν πολύ παρόμοιο με το *R. cauense* CCBAU 101002<sup>T</sup>, το τελευταίο στέλεχος δεν συμπεριλήφθηκε στη φυλογένεια με βάση τη συνένωση των γονιδίων, καθώς το γονίδιο *gyrB* δεν ήταν διαθέσιμο στη GenBank. Παρ' όλα αυτά, από την ανάλυση των *recA-atpD* φάνηκε παρόμοιο αποτέλεσμα με το VFEP82, εμφανίζοντας ομοιότητα κατά 91,05% και 90,5% με τις ενοποιημένες αλληλουχίες *recA-atpD* σε σχέση με εκείνες του *R. grahamii* CCGE502<sup>T</sup> και *R. cauense* CCBAU 101002<sup>T</sup>, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι το VFEP82 μπορεί να αποτελεί νέο είδος *Rhizobium* διαφορετικής γενεαλογικής σειράς.





**Εικόνα 2.7:** Maximum Likelihood (ML) φυλογενετικό δέντρο βασισμένο στην ενοποιημένη αλληλουχία των επιμέρους μερικών τμημάτων των αλληλουχιών *recA-atpD* (726 bp) δείχνει τις ταξινομικές σχέσεις των υπό μελέτη στελεχών και των φυλογενετικά πλησιέστερων τελεχών απομονωμένων από άλλες γεωγραφικές περιοχές. Οι κλάδοι 1-6 αναφέρονται σε εκείνους που προέκυψαν από την MLSA ανάλυση. Οι απομονώσεις της παρούσας εργασίας σημάνθηκαν με έντονη γραφή και τα πρότυπα στελέχη επισημάνθηκαν με εκθέτη "T". Οι αριθμοί καταλογράφησης κατά GenBank των αλληλουχιών δηλώνονται σε παρένθεση. Η φυλογενετική ανάλυση διεξήχθη στο MEGA X χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο ML και το μοντέλο Tamura-Nei plus Gamma rate distribution plus invariant site (TN93 + G+I). Οι τιμές bootstrap (πάνω από 50%) υπολογίστηκαν για 500 επαναλήψεις και απεικονίζονται στους κόμβους. Η γραμμή κλίμακας δείχνει τον αριθμό των νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων ανά τοποθεσία. Η συντομογραφία των ονομάτων των στελεχών είναι η εξής: *L.*, *Lens*; *P.*, *Pisum*; *Ph.*, *Phaseolus*; *R.*, *Rhizobium*; *RI*, *Rhizobium leguminosarum*; *Rlv*, *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae*; *Rla*, *Rhizobium laguerreae*; *V.*, *Vicia*; *T.*, *Trifolium*.

Τα στελέχη *Rhizobium* που απομονώθηκαν από φυμάτια φυτών της οικογένειας *Viciae* σε διάφορες χώρες σε προηγούμενες μελέτες συγκρίθηκαν με τα υπό μελέτη στελέχη και τα πλησιέστερα επιλέχθηκαν για τις αναλύσεις. Ωστόσο, οι αλληλουχίες του γονιδίου *gynB* δεν ήταν διαθέσιμες στη βάση δεδομένων για ορισμένα στελέχη και ένα συνδυασμένο δέντρο με βάση το *recA-atpD* κατασκευάστηκε για να συγκριθούν. Τα στελέχη του κλάδου 1 ομαδοποιήθηκαν με στελέχη *Rhizobium* που απομονώθηκαν από κουκί και φακή σε χώρες της Αφρικής, της Αμερικής, της Ασίας και της Ευρώπης (**Εικόνα 2.7**).

Στην παρούσα εργασία, λόγω της υψηλής συχνότητας εντοπισμού στελεχών *R. laguerreae* του γονιδιωματικού είδους gsF-2 από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας προτάθηκε ότι το *R. laguerreae* είναι πιθανώς το κυρίαρχο συμβιωτικό ριζόβιο του κουκιού στην Ελλάδα. Τα στελέχη του κλάδου 2 ομαδοποιήθηκαν με στελέχη απομονωμένα από το κουκί και τη φακή στην Αφρική, την Ασία και την Ευρώπη, ενώ στον κλάδο 3 εμπεριέχονται στελέχη που απομονώθηκαν προηγουμένως από το κουκί τόσο στην Ελλάδα όσο και την Κίνα. Στενή σχέση εμφάνισε το στέλεχος VF2CR2 με άλλα στελέχη απομονωμένα από είδη *Vicia* στην Ισπανία, ενώ το στέλεχος VFEP162 ομαδοποιήθηκε μαζί με ριζόβια φασολιάς που απομονώθηκαν από την Αφρική, την Ασία και την Ευρώπη. Τέλος, το πλησιέστερο συγγενικό στέλεχος του VFEP82 ήταν το *R. grahamii* BG7 που απομονώθηκε από φυμάτια *Prosopis cineraria*.

Η κατανομή των απομονώσεων της παρούσας εργασίας σε διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας δεν έδειξε κάποια συσχέτιση με τις εδαφικές παραμέτρους ή το γενότυπο του ξενιστή. Οι απομονώσεις των κλάδων 1 και 2, πιθανόν να ανήκουν στο gsF-2, βρέθηκαν σε όλες τις περιοχές με διαφορετική υφή εδάφους και pH κυμαινόμενο από 6,2 έως 7,7 (**Πίνακας 2.13**). Ενδιαφέρουσα παρατήρηση αποτελεί ότι απομονώσεις gsF-2 απομονώθηκαν είτε αποκλειστικά από ορισμένες περιοχές (Αθήνα, Φενεός, Ημαθία, Λευκάδα και Κύθηρα) είτε ήταν κυρίαρχα σε άλλες (Κρήτη και Ήπειρος). Αν και οι απομονώσεις των κλάδων 3, 4, 5 και 6 βρέθηκαν μόνο σε μία περιοχή, τα αποτελέσματα αυτά δεν μπορούσαν να αποκλείσουν την εμφάνιση παρόμοιων απομονώσεων σε άλλες περιοχές, εκτός και αν αναλυθούν περισσότερες απομονώσεις ή να εφαρμοστεί μεταγονιδιωματική προσέγγιση. Επιπλέον, οι γενότυποι του ξενιστή ενδέχεται να μην επηρεάζουν τη ριζοβιακή ποικιλομορφία στις τοποθεσίες δειγματοληψίας αυτής της μελέτης, καθώς χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές τοπικές ποικιλίες. Επομένως, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για τον καθορισμό των παραγόντων που επηρεάζουν την κατανομή διαφόρων γονιδιωματικών και την υψηλή συχνότητα του gsF-2 στα ελληνικά εδάφη.

**Πίνακας 2.12:** Χαρακτηρισμός των υπό μελέτη ριζοβίων κουκιού και φυλογενετική κατάταξη με βάση το πλησιέστερο συγγενικό πρότυπο στέλεχος.

Συγγενικό είδος (ταυτοποίηση αλληλουχίας, %) <sup>a</sup>								
Βακτήρια <sup>b</sup>	BOX Τύπος <sup>c</sup>	Νο Απομονώσεων <sup>d</sup>	MLSA Κλάδος	16S <sup>e</sup>	<i>recA/ atpD/ gyrB</i>	MLSA	Γονοτυπικός προσδιορισμός	Γεωγραφική Περιοχή
VFLE1	1	5	1	Rla FB206 <sup>T</sup> (99,85%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (99,57%)/ Rla FB206 <sup>T</sup> (99,53%)/ Rla FB206 <sup>T</sup> (100%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (99,73%)	gsF-2	Λευκάδα
VFCR1	2	12	1	Rla FB206 <sup>T</sup> (99,92%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (100%)/ Rla FB206 <sup>T</sup> (100%)/ Rla FB206 <sup>T</sup> (100%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (100%)	gsF-2	Κρήτη
VFFE2	3	14	1	Rla FB206 <sup>T</sup> (99,77%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (100%)/ Rla FB206 <sup>T</sup> (99,53%)/ Rla FB206 <sup>T</sup> (100%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (99,87%)	gsF-2	Φενεός
VFAT24	4	5	1	Rla FB206 <sup>T</sup> (99,85%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (100%)/ Rla FB206 <sup>T</sup> (99,53%)/ Rla FB206 <sup>T</sup> (100%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (99,24%)	gsF-2	Αθήνα
VFIM1	5	4	1	Rla FB206 <sup>T</sup> (99,85%)	Rru UPM1133 <sup>T</sup> (98,48%)/ Rla FB206 <sup>T</sup> (99,77%)/ Rla FB206 <sup>T</sup> (100%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (98,66%)	gsF-2	Ημαθία
VFLE5	6	1	2	Rla FB206 <sup>T</sup> (99,85%)	Rru UPM1133 <sup>T</sup> (96,97%)/ Rla FB206 <sup>T</sup> (96,5%)/ Rla FB206 <sup>T</sup> / Rru UPM1133 <sup>T</sup> (96,31%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (96,26%)	gsF-2	Λευκάδα
VFCR3	7	2	2	Rla FB206 <sup>T</sup> (99,92%)	Rru UPM1133 <sup>T</sup> (97,19%)/ Rla FB206 <sup>T</sup> (98,83%)/ Rru UPM1133 <sup>T</sup> (96,65%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (96,93%)	gsF-2	Κρήτη
VFLE2	8	2	2	Rla FB206 <sup>T</sup> (99,85%)	Rru UPM1133 <sup>T</sup> (97,40%)/ Rla FB206 <sup>T</sup> (99,77%)/ Rru UPM1133 <sup>T</sup> (96,48%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (96,86%)	gsF-2	Λευκάδα
VFEP81	9	5	2	Rla FB206 <sup>T</sup> (99,85%)	Rru UPM1133 <sup>T</sup> (97,40%)/ Rla FB206 <sup>T</sup> (98,14%)/ Rla FB206 <sup>T</sup> (96,31%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (99,6%)	gsF-2	Ήπειρος
VFKY1	10	6	2	Rla FB206 <sup>T</sup> (99,77%)	Rru UPM1133 <sup>T</sup> (97,40%)/ Rla FB206 <sup>T</sup> (97,2%)/ Rru UPM1133 <sup>T</sup> (96,48%)	Rru UPM1133 <sup>T</sup> (96,46%)	gsF-2	Κύθηρα
VFEP89	11	2	2	Rla FB206 <sup>T</sup> (99,85%)	Rru UPM1133 <sup>T</sup> (97,40%)/ Rla FB206 <sup>T</sup> (98,37%)/ Rla FB206 <sup>T</sup> (96,98%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (96,93%)	gsF-2	Ήπειρος
VFEP63	12	4	3	Rla FB206 <sup>T</sup> (99,92%)	Rru UPM1133 <sup>T</sup> (99,13%)/ Rla FB206 <sup>T</sup> 2370 <sup>T</sup> (97,32%) (97,67%)/ Rlv USDA	Rru UPM1133 <sup>T</sup> (97,13%)	gsB	Ήπειρος
VFEP84	13	2	3	Rla FB206 <sup>T</sup> (99,85%)	Rru UPM1133 <sup>T</sup> (98,92%)/ Rla FB206 <sup>T</sup> (97,9%)/ Rla FB206 <sup>T</sup> (96,82%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (97,13%)	gsB	Ήπειρος
VFCR2	14	2	4	Rla FB206 <sup>T</sup> (99,69%)	Rru UPM1133 <sup>T</sup> (97,40%)/ Rla FB206 <sup>T</sup> (96,27%)/ Rru UPM1133 <sup>T</sup> (97,32%)	Rru UPM1133 <sup>T</sup> (96,66%)	gsA	Κρήτη
VFEP162	15	2	5	Rhi FH14 <sup>T</sup> (100%)	Rhi FH14 <sup>T</sup> (100%)/ Rhi FH14 <sup>T</sup> (99,07%)/ Rhi FH14 <sup>T</sup> (99,66%)	Rhi FH14 <sup>T</sup> (99,6)	Rhi FH14 <sup>T</sup>	Ήπειρος

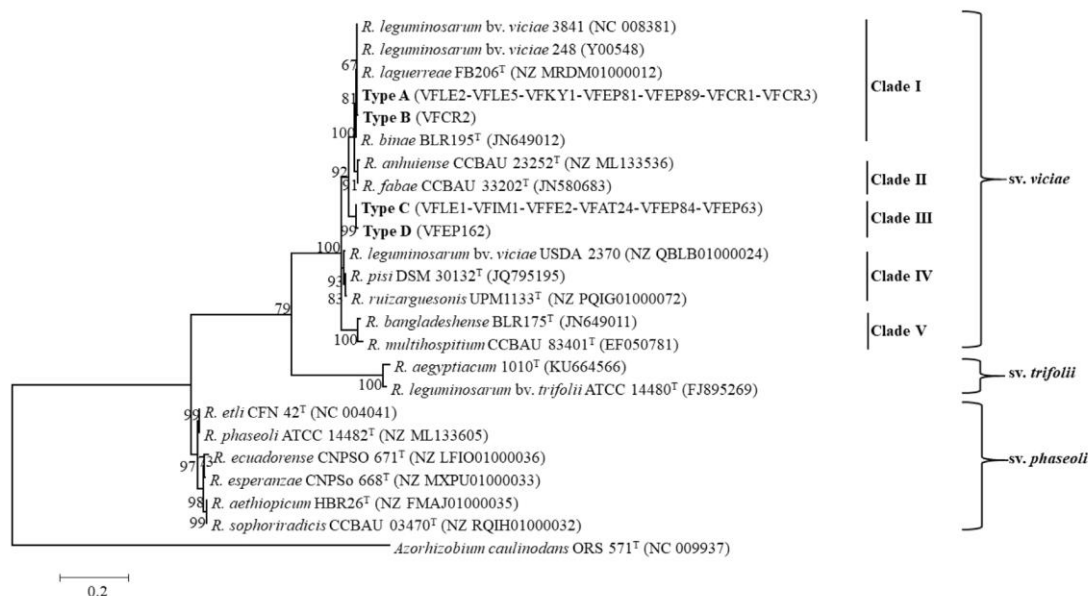
VFEP82	16	2	6	Rca CCBAU 101002 <sup>T</sup> (99,77%)	Rgr CCGE 502 <sup>T</sup> (86,8%)/ Rgr CCGE 502 <sup>T</sup> (96,04%)/ Rgr CCGE 502 <sup>T</sup> (89,45%)	Rgr CCGE 502 <sup>T</sup> (90,58%)	Νέα γενεαλογική σειρά	Ήπειρος
<p><sup>a</sup> Ποσοστό ομοιότητας προσδιοριζόμενο από πολλαπλές ευθυγραμμίσεις αλληλουχιών μερικών νουκλεοτιδικών αλληλουχιών γονιδίων, με τη χρήση αλγορίθμου CLUSTAL Omega.</p> <p><sup>b</sup> Αντιπροσωπευτικές απομονώσεις διαφορετικών BOX-ομάδων. Τα δύο πρώτα γράμματα του ονόματος των απομονώσεων δηλώνουν τον αρχικό ξενιστή (<i>Vicia faba</i>) και τα δύο τελευταία τη γεωγραφική τους προέλευση, ως εξής: LE (Lefkada Island), CR (Crete Island), FE (Feneos), AT (Athens), EP (Epirus), IM (Imathia), KY (Kythira Island).</p> <p><sup>c</sup> Διαφορετικοί αριθμοί κατέγραψαν το κάθε αντιπροσωπευτικό BOX-PCR πρότυπο.</p> <p><sup>d</sup> Αρίθμηση του πλήθους των απομονώσεων που παρουσιάζουν όμοιο πρότυπο με βάση τη BOX-PCR.</p> <p><sup>e</sup> <i>R. laguerreae</i> FB206<sup>T</sup> έχει πανομοιότυπη αλληλουχία <i>rrs</i> με το <i>R. anhuiense</i> CCBAU 23252<sup>T</sup>, <i>R. hidalgonense</i> FH14<sup>T</sup>, <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> USDA 2370<sup>T</sup>, <i>R. ruizarguesonis</i> UMP1133<sup>T</sup> και το <i>R. sophorae</i> CCBAU 03386<sup>T</sup>.</p> <p>Συντομογραφίες: Rca, <i>Rhizobium cauense</i>; Rgr, <i>Rhizobium grahamii</i>; Rhi, <i>Rhizobium hidalgonense</i>; Rla, <i>Rhizobium laguerreae</i>; Rlv, <i>Rhizobium leguminosarum</i> sv. <i>viciae</i>; Rru, <i>Rhizobium ruizarguesonis</i>.</p>								

**Πίνακας 2.13:** Καταγραφή συνολικά όλων των απομονώσεων με βάση την κατανομή και την ομαδοποίηση των αντίστοιχων αντιπροσωπευτικών στελεχών σε διαφορετικούς κλάδους και γενοτύπους ανά περιοχή δειγματοληψίας.

	Κλάδος 1 (gsF-2)	Κλάδος 2 (gsF-2)	Κλάδος 3 (gsB)	Κλάδος 4 (gsA)	Κλάδος 5	Κλάδος 6
<b>Αθήνα</b>	5					
<b>Κρήτη</b>	12	2		2		
<b>Ήπειρος</b>		7	6		2	2
<b>Φενεός</b>	14					
<b>Ημαθία</b>	4					
<b>Κύθηρα</b>		6				
<b>Λευκάδα</b>	5	3				
<b>Σύνολο Απομονώσεων</b>	40	18	6	2	2	2

#### 2.4.1.4) Προσδιορισμός συμβιώτου ριζοβίων κουκιού

Εκτός από τη φυλογενετική ανάλυση των παραπάνω ιδιοσυστατικών γονιδίων έλαβε χώρα αντίστοιχη μελέτη επικεντρωμένη στα συμβιωτικά γονίδια *nodC* και *nifH*. Το γονίδιο *nodC* χρησιμοποιείται ευρέως ως συμβιωτικός δείκτης στην ανάλυση ριζοβίων και σχετίζεται με το εύρος των ξενιστών συμβίωσης και με το βαθμό συμβιωτικής επιδεκτικότητας των ξενιστών σε σχέση με τα ριζόβια (Laguerre et al., 2001; Álvarez-Martínez et al., 2009; Rogel et al., 2011; Peix et al., 2015). Από τους συμβιώτους, ο *sv. viciae* είναι μοναδικός με ικανότητα σχηματισμού φυματίων στο κουκί και σε άλλα ψυχανθή της οικογένειας *Viciae* και διαχωρίζεται εμφανώς από το *sv. phaseoli* και *trifolii* με ποσοστό ομοιότητας κάτω από 80%. Εντός του *sv. viciae*, τα γονίδια *nodC* από στελέχη ανά τον κόσμο εμφανίζουν ομοιότητα υψηλότερη από 90%, υποστηρίζοντας έτσι την κοινή φυλογενετική τους προέλευση. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι οι αλληλουχίες *nodC* από στελέχη που ανήκουν στην ομάδα διασταυρούμενου εμβολιασμού (*cross-inoculation*) των ειδών του γένους *Vicia* σε διαφορετικές χώρες και ηπείρους εμφανίζουν υψηλό βαθμό διαφοροποίησης. Μέχρι σήμερα, οκτώ πρότυπα στελέχη ανήκουν στο *sv. viciae* και φέρουν επτά διακριτούς απλότυπους γονιδίων *nodC*, οι οποίοι κατανέμονται σε τέσσερις ισχυρές φυλογενετικές κλάσεις I, II, IV και V (Εικόνα 2.8), όπως έχει παρατηρηθεί σε προηγούμενες μελέτες (Yuan et al., 2016; Villadas et al., 2017; Belhadi et al., 2018; Taha et al., 2018).



**Εικόνα 2.8:** Maximum Likelihood (ML) φυλογενετικό δέντρο βασισμένο σε μερικό τμήμα της αλληλουχίας του γονιδίου *nodC* (543 bp), αποτυπώνει τις ταξινομικές σχέσεις των υπό μελέτη στελεχών και των φυλογενετικά πλησιέστερων πρότυπων στελεχών *Rhizobium*. Τα πρότυπα στελέχη επισημάνθηκαν με εκθέτη "T" και οι αριθμοί καταλογράφησης κατά GenBank των αλληλουχιών δηλώθηκαν σε παρένθεση. Απομονώσεις με πανομότυπη αλληλουχία *nodC* τοποθετήθηκαν στον ίδιο κλάδο, εντός παρένθεσης. Οι διαφορετικοί κλάδοι δηλώθηκαν ως διαφορετικοί τύποι εντός του *sv. viciae* και σημάνθηκαν με έντονη γραφή. Η φυλογενετική ανάλυση διεξήχθη στο MEGA X χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο ML και το μοντέλο Tamura 3-parameter model plus Gamma rate distribution plus invariant site (T92 + G + I). Οι τιμές bootstrap (πάνω από 50%) υπολογίστηκαν για 500 επαναλήψεις και απεικονίζονται στους κόμβους. Η γραμμή κλίμακας δείχνει τον αριθμό των νουκλεοτιδίων υποκαταστάσεων ανά τοποθεσία. Το όνομα του γένους *Rhizobium* γράφηκε με τη συντομογραφία: *R.*

Στην παρούσα εργασία, με βάση μέρος της αλληλουχίας *nodC* (543 bp), τέσσερις απλότυποι του γονιδίου *nodC* ορίστηκαν (A – D) μεταξύ των απομονώσεων με *sv. viciae* (Πίνακας 2.14).

<b>Πίνακας 2.14:</b> Προσδιορισμός συμβιότυπου και του αντίστοιχου τύπου με βάση το γονίδιο <i>nodC</i> ριζοβίων κουκιού με διαφορετική γονιδιωματική ετερογένεια.						
Βακτήρια <sup>a</sup>	BOX τύπος <sup>b</sup>	No απομονώσεων <sup>c</sup>	MLSA κλάδος	sv	τύπος <i>nodC</i> <sup>d</sup>	Γεωγραφική Περιοχή
VFLE1	1	5	1	<i>viciae</i>	D	Λευκάδα
VFCR1	2	12	1	<i>viciae</i>	A	Κρήτη
VFFE2	3	14	1	<i>viciae</i>	D	Φενεός
VFAT24	4	5	1	<i>viciae</i>	D	Αθήνα
VFIM1	5	4	1	<i>viciae</i>	D	Ημαθία
VFLE5	6	1	2	<i>viciae</i>	A	Λευκάδα
VFCR3	7	2	2	<i>viciae</i>	A	Κρήτη
VFLE2	8	2	2	<i>viciae</i>	A	Λευκάδα
VFEP81	9	5	2	<i>viciae</i>	A	Ήπειρος
VFKY1	10	6	2	<i>viciae</i>	A	Κύθηρα
VFEP89	11	2	2	<i>viciae</i>	A	Ήπειρος
VFEP63	12	4	3	<i>viciae</i>	C	Ήπειρος
VFEP84	13	2	3	<i>viciae</i>	C	Ήπειρος
VFCR2	14	2	4	<i>viciae</i>	B	Κρήτη
VFEP162	15	2	5	<i>viciae</i>	D	Ήπειρος
VFEP82	16	2	6	N/A	N/A	Ήπειρος

<sup>a</sup> Αντιπροσωπευτικές απομονώσεις διαφορετικών BOX-ομάδων. Τα δύο πρώτα γράμματα του ονόματος των απομονώσεων δηλώνουν τον αρχικό ξενιστή (*Vicia faba*) και τα δύο τελευταία τη γεωγραφική τους προέλευση, ως εξής: LE (Lefkada Island), CR (Crete Island), FE (Feneos), AT (Athens), EP (Epirus), IM (Imathia), KY (Kythira Island).

<sup>b</sup> Διαφορετικοί αριθμοί κατέγραψαν το κάθε αντιπροσωπευτικό BOX-PCR πρότυπο.

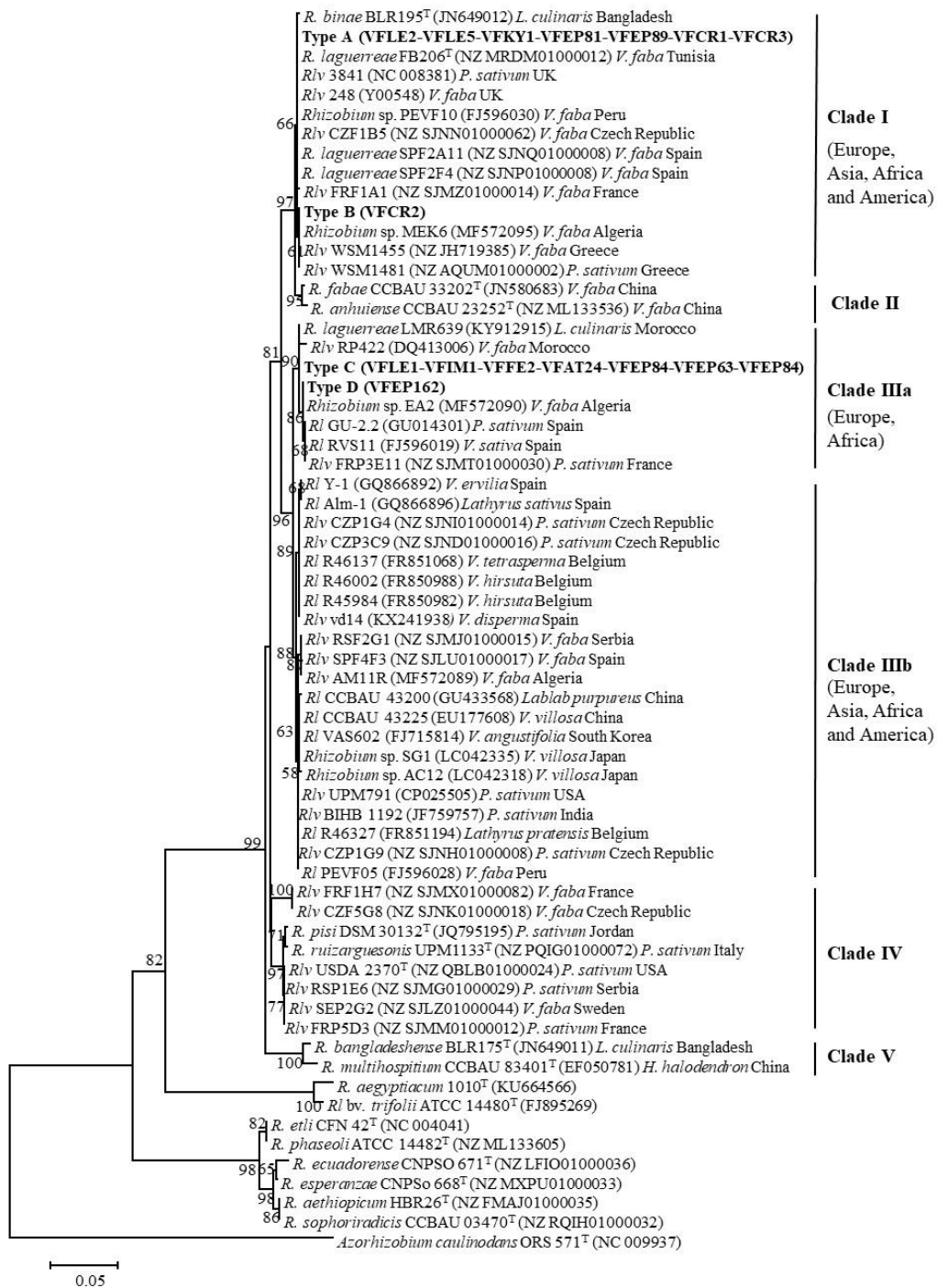
<sup>c</sup> Αρίθμηση του πλήθους των απομονώσεων που παρουσιάζουν όμοιο BOX-PCR πρότυπο.

<sup>d</sup> Κεφαλαία γράμματα για την αντιπροσώπευση διαφορετικών νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *nodC* N/A, non amplified (δεν ενισχύθηκε).

Οι απλότυποι του γονιδίου *nodC* ταξινομήθηκαν σε δύο κλάδους με υψηλή τιμή bootstrap: I και III (Εικόνα 2.8). Οι δύο αυτοί απλότυποι των γονιδίων *nodC*, A και B, κατανεμήθηκαν σε οκτώ στελέχη (VFLE2, VFLE5, VFKY1, VFEP81, VFEP89, VFCR1, VFCR2, VFCR3) και ομαδοποιήθηκαν στον κλάδο I μαζί με τα *R. laguerreae* FB206<sup>T</sup>, *R. binae* BLR195<sup>T</sup>, Rln 3841 και Rln 248 με ποσοστό ομοιότητας πάνω από 99,8%. Ο απλότυπος A ήταν πανομοιότυπος με εκείνο των *R. laguerreae* FB206<sup>T</sup>, Rln 3841 και Rln 248. Ο κλάδος I είχε τιμές ομοιότητας *nodC* που κυμάνθηκε από 97,97% έως 98,9%, 95,95 έως 96,13%, 95,21 έως 95,76% και 90,79 έως 91,53% με τις κατηγορίες II, III, IV και V, αντίστοιχα. Δύο απλότυποι γονιδίων *nodC*, C και D, που βρέθηκαν σε επτά στελέχη (VFLE1-VFIM1-VFFE2-VFAT24-VFEP84-VFEP63, VFEP162) ομαδοποιήθηκαν στο κλάδο III με τιμές ομοιότητας υψηλότερες από 99,6%. Οι απλότυποι *nodC* του κλάδου III είχαν τιμές ομοιότητας κυμαινόμενες από 91,16 έως 91,71%, 94,66 έως 95,4% και 91,71 έως 92,27% για τους κλάδους II, IV και V, αντίστοιχα. Επίσης, ο απλότυπος A του

γονιδίου *nodC* (κλάδο I) που βρέθηκε στο *R. laguerreae* FB206<sup>T</sup> ήταν ίδιος με αυτό των απομονώσεων γονιδιωματικού είδους gF-2 (κλάδοι 1 και 2, **Εικόνα 2.6**). Από την άλλη πλευρά, ο απλότυπος C του γονιδίου *nodC* (κλάδος III) εντοπίστηκε στις απομονώσεις που συνδέονται με το γονιδιωματικό είδος gF-2 και gB (κλάδος 1 και 3, **Εικόνα 2.6**).

Από τα αποτελέσματα αυτά φάνηκε ότι στελέχη με διαφορετικό χρωμοσωμικό υπόβαθρο και ίδιο απλότυπο *nodC* θα μπορούσαν να βρεθούν σε διαφορετικά γονιδιωματικά είδη, κάτι που έχει αποδειχθεί προηγουμένως (Kumar et al., 2014; Boivin et al., 2020). Επιπλέον, το VFEP162, που έχει καταχωρηθεί ως *R. hidalgonense*, είχε ένα ξεχωριστό απλότυπο σε σχέση με τα άλλα στελέχη. Ακόμα, αξίζει να σημειωθεί ότι δεν έγινε εφικτή η ενίσχυση των γονιδίων *nodC* ή *nifH* για την ανάλυση των αντίστοιχων αλληλουχιών από το στέλεχος VFEP82 χρησιμοποιώντας τα ζεύγη εκκινητών υπό πολλές συνθήκες περιγράφονται στον **Πίνακα 2.7**. Επιπρόσθετα, το VFEP82 δεν σχημάτισε φυμάτια στον αρχικό του ξενιστή απομόνωσης, υποδηλώνοντας ότι μπορεί να μην είναι συμβιωτικό βακτήριο για το κουκί.



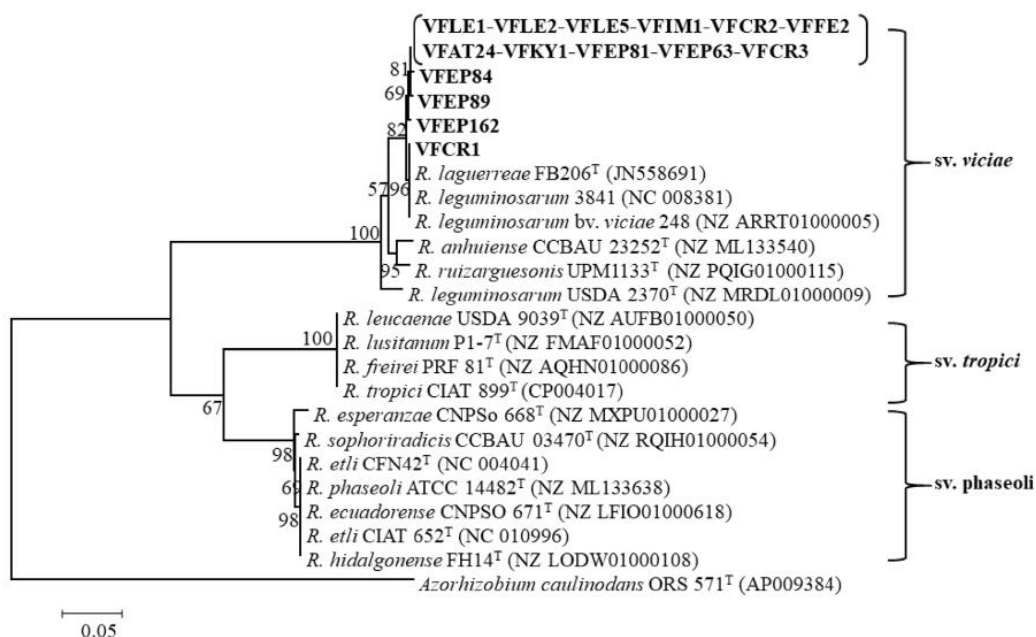
**Εικόνα 2.9:** Maximum Likelihood (ML) φυλογενετικό δέντρο βασισμένο σε μερικό τμήμα της αλληλουχίας του γονιδίου *nodC* (543 bp), αποτυπώνει τις ταξινομικές σχέσεις των συμβιοτύπων *viciae* των υπό μελέτη στελεχών, στελεχών από άλλες γεωγραφικές περιοχές και των φυλογενετικά πλησιέστερων πρότυπων στελεχών *Rhizobium*. Τα πρότυπα στελέχη επισημάνθηκαν με εκθέτη "T" και οι αριθμοί καταλογράφησης κατά GenBank των αλληλουχιών δηλώθηκαν σε παρένθεση. Η φυλογενετική ανάλυση διεξήχθη στο MEGA X χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο ML και το μοντέλο Tamura 3-parameter model plus Gamma rate distribution plus invariant site (T92 + G + I). Οι τιμές bootstrap (πάνω από 50%) υπολογίστηκαν για 500 επαναλήψεις και απεικονίζονται στους κόμβους. Η γραμμή κλίμακας δείχνει τον αριθμό των νουκλεοτιδίων υποκαταστάσεων ανά τοποθεσία. Οι συντομογραφίες των ονομάτων ακολουθούν, ως εξής: *P.*, *Pisum*; *R.*, *Rhizobium*; *Rl*, *Rhizobium leguminosarum*; *Rlv*, *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae*; *V.*, *Vicia*.



Από τη σύγκριση των απλοτύπων του γονιδίου *nodC* που φέρουν τα στελέχη της παρούσας μελέτης και εκείνων άλλων χωρών (Εικόνα 2.9), διαπιστώθηκε ότι ο απλότυπος A (κλάδος I) σε στελέχη που απομονώθηκαν από είδη των γενών *Vicia*, *Pisum* και *Lens* βρέθηκε στην Ευρώπη, στην Ασία, στην Αφρική και στην Αμερική, ενώ ο απλότυπος B (κλάδος I) ήταν πανομοιότυπος με εκείνο που βρέθηκε σε ριζόβια κουκιά που είχαν απομονωθεί προηγουμένως από την Ελλάδα και την Αλγερία. Η σύσταση του κλάδου III είχε ως βάση δυο υποκατηγορίες (IIIa και IIIb) με ομοιότητα 98%. Αν και δεν εντοπίστηκαν πρότυπα στελέχη στο κλάδο αυτό, απομονώθηκαν αρκετά στελέχη από *Vicia*, *Pisum*, *Lens* και *Lathyrus* σε διάφορες χώρες πολλές Ευρώπης, πολλές Ασίας, πολλές Αφρικής και πολλές Αμερικής (Εικόνα 2.9). Είναι ενδιαφέρον ότι οι απλότυποι C και D του *nodC* ήταν πανομοιότυποι με εκείνους ριζοβίων κουκιά από Μαρόκο και Αλγερία, αντίστοιχα. Επιπλέον, οι παραπάνω απλότυποι εμφάνισαν στενή σχέση (99,45–99,82%) με εκείνους των ευρωπαϊκών στελεχών GU-2.2, RVS11 και FRPE11 από *V. sativa* και *P. sativum*. Η δεύτερη υποκατηγορία (IIIb) περιελάμβανε διάφορα στελέχη που απομονώθηκαν σε Ευρώπη, Ασία, Αφρική και Αμερική από διάφορα γένη ψυχανθών της οικογένειας *Viciae*, όπως *Vicia*, *Pisum*, *Lens*, *Lathyrus* και *Lablab*. Τα στελέχη VFEP63 και VFEP84 που έφεραν γονίδιο *nodC* τύπου C ταξινομήθηκαν στον κλάδο III. Αυτό είναι ενδιαφέρον γιατί έρχεται σε αντίθεση με τα πλησιέστερα συγγενικά στελέχη, WSM1455 και WSM1481, τα οποία απομονώθηκαν στην Ελλάδα πριν από πολλά χρόνια, που έφεραν *nodC* τύπου B καταχωρημένο στον κλάδο I. Τόσο από τα αποτελέσματα που προέκυψαν όσο και από προηγούμενες μελέτες, έχει φανεί αρχικά ότι διαφορετικοί τύποι *nodC* θα μπορούσαν να υπάρχουν στο ίδιο χρωμοσωμικό υπόβαθρο και επιπρόσθετα η πιθανή απόκτηση γονιδίων συμβίωσης μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων μεταξύ των τοπικών ριζοβιακών πληθυσμών με την πάροδο των ετών. Οι κλάδοι I και III, περιελάμβαναν απομονώσεις *R. leguminosarum* ή *R. laguerreae* ή μη καθορισμένα γονιδιωματικά είδη, υποδηλώνοντας ότι στελέχη με διάφορα χρωμοσωματικά υπόβαθρα δεν έδειξαν προτίμηση για έναν συγκεκριμένο τύπο *nodC*, όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως (Villadas et al., 2017; Taha et al., 2018).

Τέλος, η φυλογενετική ανάλυση των αλληλουχιών του γονιδίου *nifH* επιβεβαίωσε την φυλογένεια του γονιδίου *nodC* και την ταξινόμηση των απομονώσεων εντός του συμβιότυπου *viciae*. Τμήμα των αλληλουχιών *nifH* (726 bp) των απομονώσεων αναλύθηκε και τα υπό μελέτη ριζόβια ομαδοποιήθηκαν εντός του συμβιότυπου *viciae*, εμφανίζοντας ομοιότητα 99,45-100% με τα *R. laguerreae* FB206<sup>T</sup>, *R. leguminosarum* sv. *viciae* 3841 και *R. leguminosarum* sv. *viciae* 248. Σχεδόν όλες οι απομονώσεις είχαν πανομοιότυπες αλληλουχίες *nifH* με ομοιότητα 99,45% με αυτή του *R. laguerreae* FB206<sup>T</sup> με αντιπροσωπευτικό στέλεχος το VFLE1 στο δέντρο, ενώ

εκείνα με αντιπροσωπευτικά στελέχη τα VFEP162 και VFCR1 ήταν κατά αντιστοιχία όμοια κατά 99,72% και 99,45% με τα άλλα.



**Εικόνα 2.10:** Maximum Likelihood (ML) φυλογενετικό δέντρο βασισμένο σε μερικό τμήμα της αλληλουχίας του γονιδίου *nifH* (726 bp), αποτυπώνει τις ταξινομικές σχέσεις των υπό μελέτη στελεχών και των φυλογενετικά πλησιέστερων πρότυπων στελεχών *Rhizobium*. Τα πρότυπα στελέχη επισημάνθηκαν με εκθέτη “T” και οι αριθμοί καταλογράφησης κατά GenBank των αλληλουχιών δηλώθηκαν σε παρένθεση. Απομονώσεις με πανομότυπη αλληλουχία *nifH* τοποθετήθηκαν στον ίδιο κλάδο μέσα σε παρένθεση και σημάνθηκαν με έντονη γραφή. Η φυλογενετική ανάλυση διεξήχθη στο MEGA Χ χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο ML και το μοντέλο Tamura 3-parameter model plus Gamma rate distribution plus invariant site (T92 + G + I). Οι τιμές bootstrap (πάνω από 50%) υπολογίστηκαν για 500 επαναλήψεις και απεικονίζονται στους κόμβους. Η γραμμική κλίμακας δείχνει τον αριθμό των νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων ανά τοποθεσία. Το όνομα του γένους *Rhizobium* γράφηκε με τη συντομογραφία: *R.*

## 2.4.2) ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΡΙΖΟΒΙΩΝ ΦΑΣΟΛΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

### 2.4.2.1) Απομόνωση ριζοβίων φασολιάς και μελέτη πολλές ικανότητας ανάπτυξης σε διάφορα θρεπτικά μέσα σε βέλτιστες συνθήκες

Στην παρούσα διατριβή δημιουργήθηκε μια «βιβλιοθήκη» με βιολογικό υλικό (ριζοβακτηρίων και ριζικών φυματίων) που συλλέχθηκε από τοπικές ποικιλίες φασολιάς που είχαν καλλιεργηθεί στον αγρό (1<sup>η</sup> δειγματοληπτική μέθοδος), είτε από σπόρο (2<sup>η</sup> δειγματοληπτική μέθοδος). Μέσω της συνδυαστικής εφαρμογής μικροβιολογικών και μοριακών τεχνικών απομονώθηκαν 51 ριζόβια από την 1<sup>η</sup> μέθοδο και άλλα 32 από τη 2<sup>η</sup>. Η ονοματοδοσία βασίστηκε σε δυο συνθετικά μέρη. Το πρώτο αναφέρεται στον ξενιστή

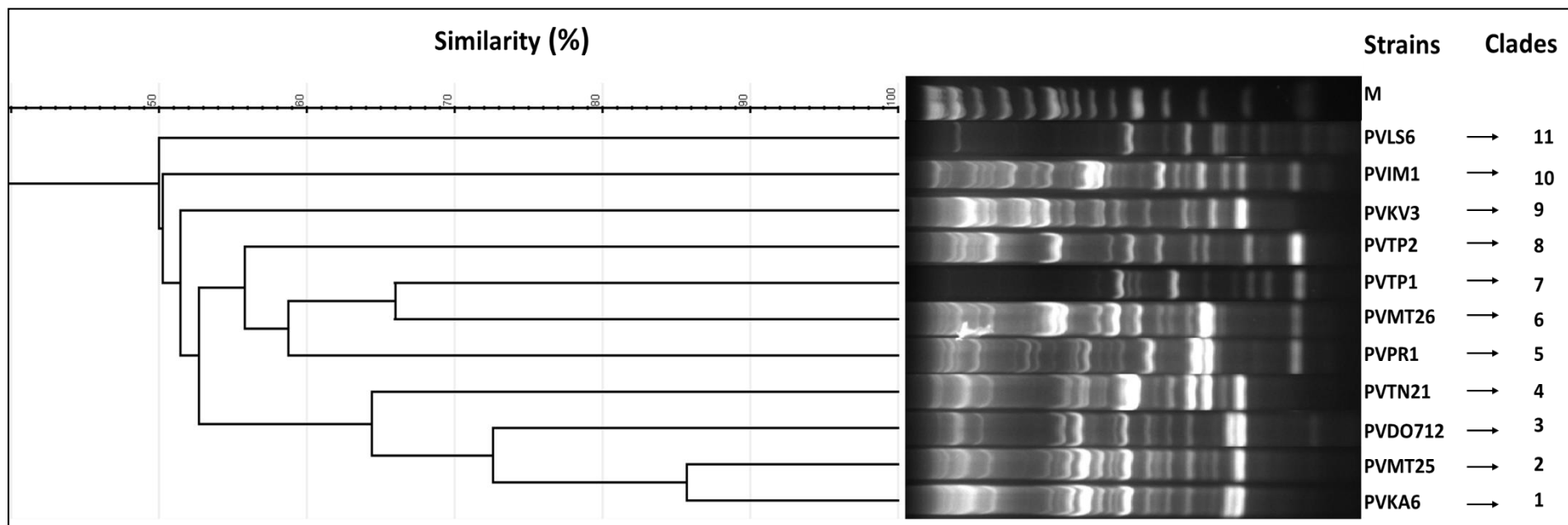
απομόνωσης, φασολιά, και το δεύτερο στην περιοχή απομόνωσης (Πίνακας 2.15). Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για τη διάκριση των ριζοβίων από μη ριζοβιακά ενδοφυτικά βακτήρια ήταν ίδια με εκείνη που έχει περιγραφεί και τα αποτελέσματα ήταν σχεδόν ίδια με εκείνα του εδάφιου 2.4.1.1 και ως προς την ικανότητα ανάπτυξης και ως προς την παραγωγή βλέννας, στα διάφορα θρεπτικά, με τη διαφορά ότι στις απομονώσεις από Λέσβο παρατηρήθηκε ανάπτυξη σε LB. Η διάκριση των βακτηρίων σε ριζόβια επιβεβαιώθηκε με την επιτυχή ενίσχυση του γονιδίου *nodC*, επιτρέποντας έτσι την περαιτέρω ανάλυση τόσο της γενετικής ετερογένειας όσο και φυλογενετικής κατάταξης μέσω του προσδιορισμού γένους-είδους-συμβίοτυπου.

<b>Πίνακας 2.15:</b> Απομόνωση ριζοβίων από φυμάτια τοπικών ποικιλιών φασολιάς ( <i>P. vulgaris</i> ) από διάφορες περιοχές πολλές Ελλάδας.			
<b>Δειγματοληπτική μέθοδος</b>	<b>Περιοχές απομόνωσης φυματίων</b>	<b>Υποψήφια ριζόβια</b>	<b>Κωδική Ονοματοδοσία</b>
1 <sup>η</sup>	Ημαθία (IMATHIA)	8	PVIM
	Μέτσοβο (METSOVO)	9	PVMT
	Πρέβεζα (PREVEZA)	5	PVPR
	Κάρπαθος (KARPATOS)	7	PVKA
	Τήνος (TINOS)	22	PVTN
2 <sup>η</sup>	Πρέσπες (PRESSES)	2	PVPS
	Δομοκός (DOMOKOS)	4	PVDO
	Βοιωτία (VIOTIA)	8	PVVI
	Καβάλα (KAVALA)	5	PVKV
	Τρίπολη (TRIPOLI)	4	PVTP
	Λάρισα (LARISA)	3	PVLA
	Λέσβος (LESVOS)	6	PVLS
Συνολικά		83	

#### 2.4.2.2) Μελέτη γενετικής ετερογένειας ριζοβίων φασολιάς

Οι 83 απομονώσεις πολλές φασολιάς ομαδοποιήθηκαν σε 11 κλάδους, με βάση το πρότυπο ζώνωσης του γονιδιωματικού αποτυπώματος που προέκυψε μέσω BOX-PCR (Εικόνα 2.11, Πίνακας 2.16). Ταυτόχρονα παρατηρήθηκαν και περιπτώσεις όπου ριζόβια διαφορετικών περιοχών εμφανίζουν ίδιο πρότυπο ζωνών, γι' αυτό και κάποιοι κλάδοι φέρουν απομονώσεις από πολλές περιοχές. Τέλος, τυχαία αντιπροσωπευτικά στελέχη από κάθε ομάδα «κλάδο» (συνολικά 12) επιλέχθηκαν για περαιτέρω φυλογενετική ανάλυση:

- Κλάδος 1: PVKA6, PVIM10
- Κλάδος 2: PVMT25
- Κλάδος 3: PVDO712
- Κλάδος 4: PVTN21
- Κλάδος 5: PVPR1
- Κλάδος 6: PVMT26
- Κλάδος 7: PVTP1
- Κλάδος 8: PVTP2
- Κλάδος 9: PVKV3
- Κλάδος 10: PVIM1
- Κλάδος 11: PVLS6



**Εικόνα 2.11:** Πρότυπο ζωνών γονιδιωματικού αποτυπώματος BOX-PCR σε 11 αντιπροσωπευτικές ριζοβιακές απομονώσεις από φυμάτια τοπικών ποικιλιών φασολιάς. Στην κορυφή συμπεριλήφθηκε επίσης ένας μοριακός δείκτης 1 kb DNA Ladder (Invitrogen) (M). Η ανάλυση ανά συστάδα-ομάδα (Cluster analysis) πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα GelJ v2.0 χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο UPGMA, το συντελεστή Dice και επίπεδο ανοχής 1,0%.

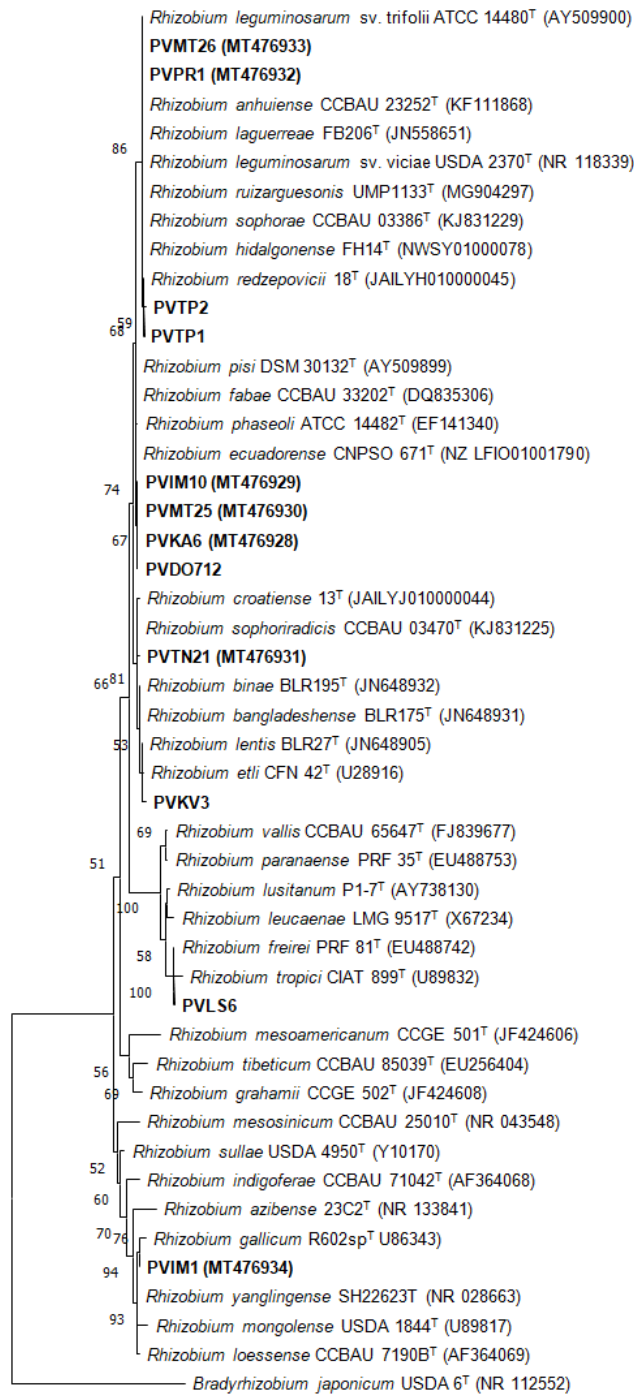
**Πίνακας 2.16:** Καταγραφή όλων των απομονώσεων με βάση την κατανομή και την ομαδοποίηση των αντίστοιχων αντιπροσωπευτικών στελεχών σε διαφορετικούς κλάδους μετά από πολλούς κύκλους BOX-PCR.

Κλάδος	Ριζόβια απομονωμένα από φυμάτια φασολιάς ανεπτυγμένα στην ύπαιθρο					Ριζόβια απομονωμένα από φυμάτια φασολιάς ανεπτυγμένα εργαστηριακά από σπόρο							Απομονώσεις ανά κλάδο (Αντιπροσωπευτικά στελέχη)
	Ημαθία	Μέτσοβο	Πρέβεζα	Κάρπαθος	Τήνος	Πρέσπες	Δομοκός	Βοιωτία	Καβάλα	Τρίπολη	Λάρισα	Λέσβος	
1	1			6									7 (PVKA6, PVIM10)
2		1											1 (PVMT25)
3						2	4	8					14 (PVDO712)
4		1			22								23 (PVTN21)
5			5										5 (PVPR1)
6		7											7 (PVMT26)
7										2			2 (PVTP1)
8										1			1 (PVTP2)
9									5	1	3		9 (PVKV3)
10	1												1 (PVIM1)
11												6	6 (PVLS6)
<b>Απομονώσεις ανά περιοχή</b>	8	9	5	7	22	2	4	8	5	4	3	6	<b>Απομονώσεις ανά περιοχή</b>
<b>Σύνολο Απομονώσεων</b>	83												

### 2.4.2.3) Μοριακός χαρακτηρισμός ριζοβίων φασολιάς σε επίπεδο είδους

Για την ταξινόμηση των αντιπροσωπευτικών ριζοβίων φασολιάς σε επίπεδο γένους, η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν ίδια με εκείνη του **Εδάφιου 2.4.1.3**. Σχεδόν πλήρους μήκους αλληλουχίες του γονιδίου *rrs* (εώς και 1433 bp) ορίστηκαν για όλα τα αντιπροσωπευτικά στελέχη και μια περιοχή μήκους 1224 bp χρησιμοποιήθηκε για τη στοίχιση των 12 αντιπροσωπευτικών και πρότυπων στελεχών, για την κατασκευή φυλογενετικού δέντρου. Το δέντρο που προέκυψε έδειξε ότι όλες οι απομονώσεις σχετίζονται στενά με καθορισμένα είδη του γένους *Rhizobium*, για αυτό και ανακατασκευάστηκε απορρίπτοντας τα φυλογενετικά απόμακρα και κρατώντας τα φυλογενετικά πλησιέστερα (**Εικόνα 2.12**), υπολογίζοντας το μεταξύ τους ποσοστό ομοιότητας (%) χρησιμοποιώντας το on-line βιοπληροφορικό εργαλείο CLUSTAL Omega (**Πίνακας 2.17**).

Σύμφωνα με το φυλογενετικό δέντρο της **Εικόνας 2.12** τα στελέχη PVMT26 και PVPR1 ομαδοποιήθηκαν σε έναν καλά υποστηριζόμενο κλάδο που περιείχε τα *R. anhuiense* CCBAU 23252<sup>T</sup>, *R. hidalgonense* FH14<sup>T</sup>, *R. laguerreae* FB206<sup>T</sup>, *R. ruizarguesonis* UMP1133<sup>T</sup>, *R. sophorae* CCBAU 03386<sup>T</sup> και *R. leguminosarum* sv. *viciae* USDA 2370<sup>T</sup> εμφανίζοντας 100% ίδιες αλληλουχίες *rrs*. Τα παραπάνω πρότυπα στελέχη έχουν ήδη σχολιαστεί σε προηγούμενες μελέτες, ότι εμφανίζουν πανομοιότυπες αλληλουχίες *rrs*. Σε επίπεδο νουκλεοτιδικής αλληλουχίας *rrs*, τα στελέχη PVTP2 και PVTP1 συγκρότησαν μια δική τους ομάδα εμφανίζοντας ποσοστό ομοιότητας 99,92% και 100% με το πλησιέστερο φυλογενετικά σε αυτά, πρότυπο στέλεχος, *Rhizobium redzeponicium* 18<sup>T</sup>. Τα στελέχη PVKA6, PVIM10, PVMT25 και PVDO712 εμφάνισαν πανομοιότυπες αλληλουχίες *rrs* συγκροτώντας μια ξεχωριστή ομάδα που σχετιζόταν στενά με τα πρότυπα στελέχη *R. fabae* CCBAU 33202<sup>T</sup>, *R. ecuadorensis* CNPSO671<sup>T</sup> και *R. pisi* DSM 30132<sup>T</sup> με ποσοστό ομοιότητας 99,92%. Από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία *rrs*, το PVTN21 ομαδοποιήθηκε μαζί με το *R. sophoriradicis* CCBAU 03470<sup>T</sup>, με 99,92% ομοιότητα, το στέλεχος PVKV3 με το *R. lentis* BLR27<sup>T</sup> (κατά 99,84%) και τα *R. etli* CFN 42<sup>T</sup> και *R. sophoriradicis* CCBAU 03470<sup>T</sup> (κατά 99,75%), ενώ το PVLS6 με τα *R. tropici* CIAT 899<sup>T</sup> και *R. freirei* PRF 81<sup>T</sup> κατά 99,51% και 100%, αντίστοιχα. Τέλος, το στέλεχος PVIM1 ομαδοποιήθηκε με τα *R. yanglingense* SH22623<sup>T</sup>, *R. loessense* CCBAU 7190B<sup>T</sup>, *R. gallicum* R602sp<sup>T</sup>, *R. mongolense* USDA 1844<sup>T</sup> εμφανίζοντας 99,92%, 99,84%, 99,75% και 99,42% ομοιότητα, αντίστοιχα.



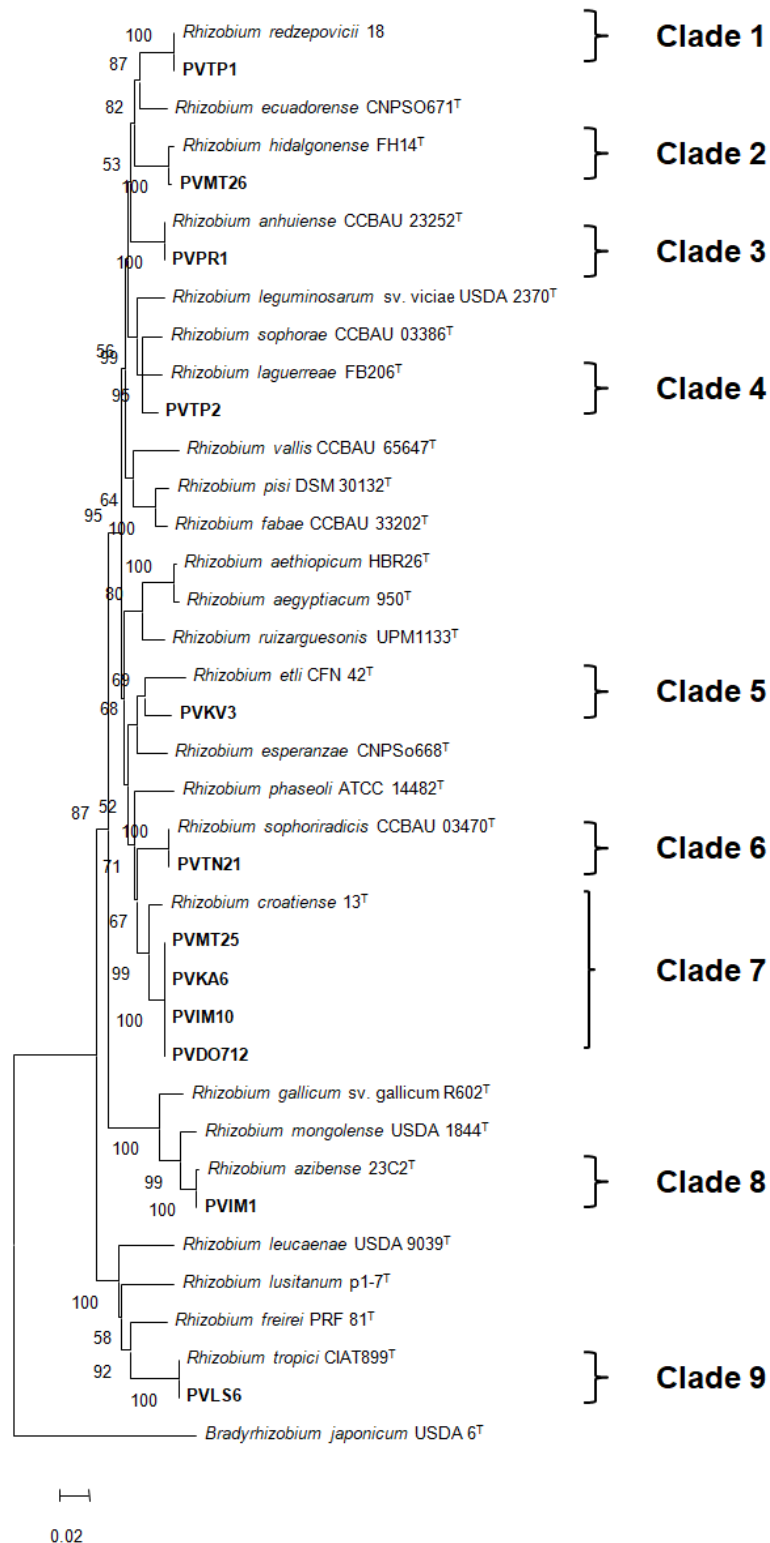
**Εικόνα 2.12:** Maximum Likelihood (ML) φυλογενετικό δέντρο βασισμένο σε σχεδόν ολόκληρη αλληλουχία του γονιδίου 16S rRNA (1224 bp) δείχνει τις ταξινομικές σχέσεις αντιπροσωπευτικών στελεχών από 11 διαφορετικές BOX ομάδες. Οι απομονώσεις της παρούσας εργασίας σημάνθηκαν με έντονη γραφή και τα πρότυπα στελέχη επισημάνθηκαν με εκθέτη "T". Οι κωδικοί εισαγωγής GenBank των αλληλουχιών *rrs* δηλώθηκαν εντός παρένθεσης. Οι τιμές bootstrap (πάνω από 50%) υπολογίστηκαν για 500 επαναλήψεις και απεικονίζονται στους κόμβους. Η γραμμή κλίμακας δείχνει τον αριθμό των νουκλεοτιδίων υποκαταστάσεων ανά τοποθεσία. Η φυλογενετική ανάλυση διεξήχθη στο MEGA X χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο ML και το μοντέλο T92 + G + I. Το *Bradyrhizobium japonicum* USDA 6<sup>T</sup>, χρησιμοποιήθηκε ως στέλεχος εκτός ομάδας.

**Πίνακας 2.17:** Ποσοστά ομοιότητας νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του γονιδίου 16S rRNA μεταξύ επιλεγμένων στελεχών *Rhizobium*. Τα πλησιέστερα πρότυπα στελέχη εμφανίζονται με έντονη γραφή.

Στέλεχος	Ομοιότητα νουκλεοτιδικών αλληλουχιών rrs (%)																															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
1 PVDO712	100	100	99,51	97,03	97,12	100	99,67	99,67	99,67	99,75	99,67	100	99,67	99,67	99,92	99,59	99,92	97,03	96,88	99,67	99,67	99,67	99,67	97,04	99,92	99,75	99,67	99,67	99,75	96,37	97,04	
2 PVKA6 (MT476928)		100	99,51	97,03	97,12	100	99,67	99,67	99,67	99,75	99,67	100	99,67	99,67	99,92	99,59	99,92	97,03	96,87	99,67	99,67	99,67	99,67	97,03	99,92	99,75	99,67	99,67	99,75	96,37	97,03	
3 PVKV3			100	96,86	96,87	99,51	99,18	99,18	99,67	99,26	99,18	99,51	99,18	99,67	99,42	99,75	99,42	96,86	96,63	99,18	99,18	99,18	99,18	99,84	96,79	99,42	99,26	99,18	99,18	99,75	96,2	96,79
4 PVL56				100	95,3	97,03	97,19	97,19	97,03	97,11	97,03	97,19	97,19	97,11	96,95	97,11	100	94,97	97,19	97,19	97,19	97,03	95,3	97,11	97,11	97,19	97,19	97,11	99,51	95,38		
5 PVIM1 (MT476934)					100	97,12	96,79	96,79	97,03	96,87	96,79	97,12	96,79	97,03	97,03	96,95	97,03	95,3	99,75	96,79	96,79	96,79	97,03	99,84	97,03	96,87	96,79	96,79	97,12	94,64	99,92	
6 PVMT25 (MT476930)						100	99,67	99,67	99,67	99,75	99,67	100	99,67	99,67	99,92	99,59	99,92	97,03	96,87	99,67	99,67	99,67	99,67	97,03	99,92	99,75	99,67	99,67	99,75	96,37	97,03	
7 PVMT26 (MT476933)							100	99,34	99,92	99,84	99,67	100	99,51	99,75	99,26	99,75	97,19	96,54	100	100	100	99,34	96,79	99,75	99,92	100	100	99,42	96,53	96,87		
8 PVPR1 (MT476932)								100	99,34	99,92	99,84	99,67	100	99,51	99,75	99,26	99,75	97,19	96,54	100	100	100	99,34	96,79	99,75	99,92	100	100	99,42	96,53	96,87	
9 PVTN1 (MT476931)									100	99,42	99,34	99,67	99,34	99,84	99,59	99,75	99,59	97,03	96,95	99,34	99,34	99,34	99,84	96,95	99,59	99,42	99,34	99,34	99,92	96,37	96,95	
10 PVTP1										100	99,92	99,75	99,92	99,42	99,67	99,34	99,67	97,11	96,63	99,92	99,92	99,92	99,42	96,79	99,67	100	99,92	99,92	99,51	96,45	96,79	
11 PVTP2											100	99,42	99,34	99,67	99,34	99,84	99,59	99,75	99,59	97,03	96,54	99,84	99,84	99,84	99,34	96,71	99,59	99,92	99,84	99,42	96,37	96,71
12 PVIM10 (MT476929)												100	99,67	99,67	99,92	99,59	99,92	97,03	96,87	99,67	99,67	99,67	99,67	97,03	99,92	99,75	99,67	99,67	99,75	96,37	97,03	
13 Rhizobium anhuiense CCB AU 23252 <sup>1</sup> (KF111868)													100	99,51	99,75	99,26	99,75	97,19	96,54	100	100	100	99,34	96,79	99,75	99,92	100	100	99,42	96,53	96,87	
14 Rhizobium croatiense 13 <sup>1</sup> (JALY010000044)														100	99,75	99,75	99,75	97,19	96,79	99,51	99,51	99,51	99,84	97,03	99,75	99,42	99,51	99,51	99,92	96,53	97,12	
15 Rhizobium ecuadorensis CNPSO 671 <sup>1</sup> (NZ LFIO01001790)															100	99,51	100	97,11	96,79	99,75	99,75	99,75	99,59	97,03	100	99,67	99,75	99,75	99,67	96,45	97,12	
16 Rhizobium etli CFN 42 <sup>1</sup> (U28916)																100	99,51	96,95	96,71	99,26	99,26	99,26	99,92	96,87	99,51	99,34	99,26	99,26	99,84	96,29	96,87	
17 Rhizobium fabae CCB AU 33202 <sup>1</sup> (DQ835306)																	100	97,11	96,79	99,75	99,75	99,75	99,59	97,03	100	99,67	99,75	99,75	99,67	96,45	97,12	
18 Rhizobium freirei PRF 81 <sup>1</sup> (EU488742)																		100	94,97	97,19	97,19	97,19	97,03	95,3	97,11	97,11	97,19	97,19	97,11	99,51	95,38	
19 Rhizobium gallicum R602sp <sup>1</sup> (U86343)																			100	96,54	96,54	96,54	96,79	99,59	96,79	96,63	96,54	96,54	96,87	94,31	99,67	
20 Rhizobium hidalgonense FH14 <sup>1</sup> (NWSY01000078)																				100	100	100	99,34	96,79	99,75	99,92	100	100	99,42	96,53	96,87	
21 Rhizobium laguerreae FB206 <sup>1</sup> (JNS58651)																					100	100	99,34	96,79	99,75	99,92	100	100	99,42	96,53	96,87	
22 Rhizobium leguminosarum sv. viciae USDA 2370T (NR 118339)																						100	99,34	96,79	99,75	99,92	100	100	99,42	96,53	96,87	
23 Rhizobium lentis BLR27 <sup>1</sup> (JN648905)																							100	96,95	99,59	99,42	99,34	99,34	99,92	96,37	96,95	
24 Rhizobium loessense CCB AU 7190B <sup>1</sup> (AF364069)																								100	97,03	96,79	96,79	96,79	97,03	94,64	99,84	
25 Rhizobium pisi DSM 30132 <sup>1</sup> (AY509899)																									100	99,67	99,75	99,75	99,67	96,45	97,12	
26 Rhizobium redzeppovicii 18 <sup>1</sup> (JALYH010000045)																										100	99,92	99,92	99,51	96,45	96,79	
27 Rhizobium ruizarguesonis UMP1133 <sup>1</sup> (MG904297)																											100	99,42	96,53	96,87		
28 Rhizobium sophorae CCB AU 03386 <sup>1</sup> (KJ831229)																												100	99,42	96,53	96,87	
29 Rhizobium sophoriradicis CCB AU 03470 <sup>1</sup> (KJ831225)																													100	96,45	97,03	
30 Rhizobium tropici CIAT 899 <sup>1</sup> (U89832)																														100	94,72	
31 Rhizobium yanglingense SH22623 <sup>1</sup> (NR 028663)																															100	
	Ομοιότητα νουκλεοτιδικών αλληλουχιών rrs (%)																															



Για τους λόγους που αναφέρθηκαν στο **Εδάφιο 2.4.1.3** και για την αποσαφήνιση των αποτελεσμάτων του 16S rRNA, πραγματοποιήθηκε MLSA χρησιμοποιώντας τα ιδιοσυστατικά γονίδια: *recA*, *atpD*, *gyrB*, τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την περιγραφή των ειδών *Rhizobium* καθώς και για την ταυτοποίηση των ριζοβίων της φασολιάς (García-Fraile et al., 2010; Mulas et al., 2011; Ribeiro et al., 2012; Faghire et al., 2012; Valverde et al., 2006; Wang et al., 2016). Για την αναγνώριση και ταξινόμηση των υπό μελέτη ριζοβιακών μικροσυμβιωτών του κοινού φασολιού (*Phaseolus vulgaris*) ενισχύθηκε μέρος των τμημάτων *recA*, *atpD*, *gyrB* από όλες τις αντιπροσωπευτικές απομονώσεις. Από την GenBank αντλήθηκαν αλληλουχίες γονιδίων από πρότυπα στελέχη και στελέχη αναφοράς ειδών του γένους *Rhizobium* οι οποίες επεξεργάστηκαν κατάλληλα. Τα μήκη των ευθυγραμμικά στοιχισμένων αλληλουχιών που προέκυψαν ήταν 462 bp, 441 bp και 594 bp για *recA*, *atpD* και *gyrB*, αντίστοιχα. Φυλογενετικά δέντρα κατασκευάστηκαν με βάση τα παραπάνω μεμονωμένα ιδιοσυστατικά γονίδια και στη συνέχεια υπολογίστηκε το ποσοστό ομοιότητας των αλληλουχιών ανά γονίδιο (**Εικόνα Σ2.4-Σ2.6** και **Πίνακας Σ2.5-Σ2.7**). Το αποτέλεσμα της ανάλυσης των ενοποιημένων αλληλουχιών των ιδιοσυστατικών γονιδίων *recA*, *atpD* και *gyrB* (**Εικόνα 2.13**, **Πίνακας 2.18**), αφενός ενίσχυσε την φυλογένεια των υπό μελέτη ριζοβίων και αφετέρου ήταν σύμφωνη με εκείνη των επιμέρους γονιδίων.



**Εικόνα 2.18:** Maximum Likelihood (ML) φυλογενετικό δέντρο με βάση την ενοποίηση τμημάτων αλληλουχιών των γονιδίων *recA*, *atpD*, *gyrB* (1506 bp), για την ανάδειξη των ταξινομικών σχέσεων των απομονώσεων σε σχέση με άλλα πρότυπα στελέχη. Οι απομονώσεις της παρούσας εργασίας έχουν σημειωθεί με έντονη γραφή και τα πρότυπα στελέχη επισημάνθηκαν με τον εκθέτη "T". Εντός παρένθεσης αναφέρονται οι αριθμοί εισαγωγής κατά GenBank των αλληλουχιών. Οι τιμές bootstrap (άνω του 50%) υπολογίστηκαν για 500 επαναλήψεις και φαίνονται στους κόμβους. Η φυλογενετική ανάλυση διεξήχθη στο MEGA X, χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο General Time Reversible model plus Gamma rate distribution plus invariant site (GTR + G + I). Η γραμμική κλίμακα δείχνει τον αριθμό των νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων ανά θέση.

**Πίνακας 2.18:** Ποσοστά ομοιότητας νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του γονιδίου *recA-atpD-gyrB* μεταξύ επιλεγμένων στελεχών *Rhizobium*. Τα πλησιέστερα πρότυπα στελέχη εμφανίζονται με έντονη γραφή.

Στελέχη	Ομοιότητα των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών <i>recA-atpD-gyrB</i> (%)																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		
1 PVDO712	100	86,68	100	100	92,5	86,61	99,93	92,3	92,37	94,78	91,9	92,57	92,44	86,55	<b>97,39</b>	91,37	92,17	92,1	91,9	92,37	94,78	86,55		
2 PVIM1		100	86,68	86,68	86,55	86,28	86,68	87,28	87,62	87,15	86,41	88,29	87,68	<b>99,73</b>	86,48	87,01	87,08	88,02	86,41	87,28	87,15	86,35		
3 PVIM10			100	100	92,5	86,61	99,93	92,3	92,37	94,78	91,9	92,57	92,44	86,55	<b>97,39</b>	91,37	92,17	92,1	91,9	92,37	94,78	86,55		
4 PVKA6				100	92,5	86,61	99,93	92,3	92,37	94,78	91,9	92,57	92,44	86,55	<b>97,39</b>	91,37	92,17	92,1	91,9	92,37	94,78	86,55		
5 PVKV3					100	87,22	92,5	93,11	91,97	91,97	91,9	91,9	91,97	86,41	92,64	<b>94,11</b>	92,97	91,23	91,9	91,5	91,97	87,15		
6 PVLS6						100	86,61	87,01	87,01	86,95	86,68	86,75	87,15	86,14	86,55	88,35	87,01	87,22	86,68	87,28	86,95	<b>99,93</b>		
7 PVMT25								100	92,3	92,37	94,78	91,9	92,57	92,44	86,55	<b>97,32</b>	91,37	92,17	92,1	91,9	92,37	94,78	86,55	
8 PVMT26									100	93,17	91,97	93,04	93,64	93,11	87,28	92,24	91,16	<b>99,53</b>	93,11	93,04	92,97	91,97	86,95	
9 PVPR1										100	92,03	93,44	94,04	<b>99,8</b>	87,48	92,37	90,9	92,97	93,78	93,44	93,91	92,03	86,95	
10 PVTN21											100	91,63	91,7	92,1	86,88	94,85	90,29	91,7	91,77	91,63	91,83	100	86,88	
11 PVTP1												100	93,51	93,37	86,14	91,57	89,63	92,9	92,77	<b>100</b>	93,24	91,63	86,61	
12 PVTP2													100	93,98	88,15	92,37	90,36	93,44	96,85	93,51	<b>96,85</b>	91,7	86,68	
13 <i>Rhizobium anhuiense</i> CCBAU 23252 <sup>T</sup>															100	87,55	92,57	91,03	92,9	93,71	93,37	93,78	92,1	87,08
14 <i>Rhizobium azibense</i> 23C2 <sup>T</sup>																100	86,35	86,88	87,08	88,02	86,14	87,08	86,88	86,21
15 <i>Rhizobium croatiense</i> 13 <sup>T</sup>																100	91,9	92,03	92,24	91,57	92,17	94,85	86,48	
16 <i>Rhizobium etli</i> CFN 42 <sup>T</sup>																	100	91,3	89,76	89,63	89,96	90,29	88,29	
17 <i>Rhizobium hidalgonense</i> FH14 <sup>T</sup>																		100	92,9	92,9	92,77	91,7	86,95	
18 <i>Rhizobium laguerreae</i> FB206 <sup>T</sup>																			100	92,77	96,39	91,77	87,15	
19 <i>Rhizobium redzepovicii</i> 18 <sup>T</sup>																				100	93,24	91,63	86,61	
20 <i>Rhizobium sophorae</i> CCBAU 03386 <sup>T</sup>																					100	91,83	87,22	
21 <i>Rhizobium sophoriradicis</i> CCBAU 03470 <sup>T</sup>																						100	86,88	
22 <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 <sup>T</sup>																							100	
	Ομοιότητα των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών <i>recA-atpD-gyrB</i> (%)																							

Με βάση το MLSA, τα υπό μελέτη στελέχη ομαδοποιήθηκαν σε 9 κλάδους, από τους οποίους οι 8 είναι καλά υποστηριζόμενοι με είδη *Rhizobium* που έχουν περιγραφεί στο παρελθόν. Εξαίρεση αποτέλεσε ο κλάδος 5, που περιείχε το στέλεχος PVKV3, το οποίο αντιπροσώπευσε τον κατά BOX-PCR-κλάδο-9, ο οποίος περιελάμβανε στελέχη που προέρχονταν από 3 γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας (Καβάλα, Λάρισα, Τρίπολη). Το στέλεχος αυτό παρουσιάζει 94,11% ομοιότητα με το φυλογενετικά πλησιέστερο πρότυπο στέλεχος, *R. etli* CFN 42<sup>T</sup>. Το συγκεκριμένο πρότυπο στέλεχος ήταν προηγουμένως γνωστό ως *R. leguminosarum* sv. phaseoli τύπου I, με ικανότητα πρόκλησης σχηματισμού φυματίων στο φασόλι (Segovia et al., 1993). Στελέχη αυτού του είδους είναι ευρέως διαδεδομένα στην Αμερική, αποτελώντας κύριο ενδοσυμβιωτικό ριζοβακτήριο της φασολιάς σε αμερικανικά εδάφη (Aguilar et al., 2004). Σε επίπεδο ομοιότητας των μεμονωμένων γονιδίων της ενοποιημένης αλληλουχίας *recA-atpD-gyrB*, το ποσοστό που υπολογίστηκε ήταν 97,19%, 94,37% και 91,34% με εκείνη των αλληλουχιών των *Rhizobium etli* CFN 42<sup>T</sup>, *Rhizobium aethiopicum* HBR26<sup>T</sup> και *Rhizobium croatiense* 13<sup>T</sup>, αντίστοιχα. Αξιοσημείωτο είναι ότι με βάση την αλληλουχία *recA-atpD*, τα στελέχη που είναι συγγενικά με το PVKV3 είναι το *Rhizobium aethiopicum* HBR26<sup>T</sup> και *Rhizobium* sp. NAK245 με ποσοστό ομοιότητας 98,07%, οι οποίες αποτελούν απομονώσεις από φυμάτια φασολιάς από την Αιθιοπία και την Κένυα (Aserse et al., 2012; Mwenda et al., 2018.)

Το PVTP1 αποτελεί αντιπροσωπευτικό στέλεχος 2 απομονώσεων από την Τρίπολη και ορίστηκε αδιαμφισβήτητα ως *R. redzeponicii*. Σύμφωνα με τη φυλογενετική ανάλυση η ενοποιημένη αλληλουχία των 3 γονιδίων του PVTP1, εμφάνισε 100% ομοιότητα με το *R. redzeponicii* 18T<sup>T</sup>, το οποίο απομονώθηκε από ριζικά φυμάτια φασολιάς στην Κροατία (Rajnovic et al., 2022). Επίσης τόσο η τοπολογία της απομόνωσης όσο και το ποσοστό ομοιότητας της ενοποιημένης αλληλουχίας *recA-atpD-gyrB* ήταν σε συμφωνία με την ανάλυση των αλληλουχιών των μεμονωμένων γονιδίων *recA*, *atpD*, *gyrB* από όπου προέκυψε ομοιότητα κατά 100% με τις αντίστοιχες αλληλουχίες του *R. redzeponicii* 18T<sup>T</sup>. Επιπλέον με βάση την ανάλυση της αλληλουχίας *recA-atpD* φυλογενετικά κοντά στην ελληνική και στην κροατική απομόνωση είναι τα *Rhizobium leguminosarum* CCBAU 65673 και *Rhizobium* sp. L40 από την Κίνα και το *Rhizobium leguminosarum* ANU843 από την Ισπανία, με 100% ποσοστό ομοιότητας, χωρίς να αποκλείεται το ενδεχόμενο να αναταξινομηθούν μελλοντικά σε *R. redzeponicii* 18T<sup>T</sup>.

Το στέλεχος PVMT26, που αντιπροσωπεύει επτά απομονώσεις από την περιοχή του Μετσόβου, σχετίστηκε σε υψηλό βαθμό με την αλληλουχία του *R. hidalgonense* FH14<sup>T</sup> τόσο κατά την ανάλυση της αλληλουχίας καθε γονιδίου ξεχωριστά (100%-99,32%-99,33%), όσο και κατά την ανάλυση της ενοποιημένης αλληλουχίας των 3 γονιδίων (99,53%). Αν και αυτό το στέλεχος απομονώθηκε από φυμάτια φασολιάς καλλιεργημένα στο Μεξικό (Verástegui-Valdés

et al., 2014), δεν είχε την ικανότητα σχηματισμού φυματίων στον ξενιστή απομόνωσης και σε άλλα εξεταζόμενα ψυχανθή, γεγονός που αποκάλυψε την απώλεια της ικανότητας πρόκλησης φυματίων (Yan et al., 2017). Σημειώνεται επίσης ότι αν και δεν ήταν επιτυχής η ενίσχυση του γονιδίου *nodC* του στελέχους FH14<sup>T</sup>, το γονίδιο αυτό υπάρχει στο γονιδίωμα του FH14<sup>T</sup> (NZ LODW01000075). Στελέχη στενά συγγενικά με το *R. hidalgonense* έχουν απομονωθεί από φυμάτια φασολιάς στην Ισπανία (LBM1212, LBM1123, LCS0303, LCS0401, LCS0411, LEV0613 και RPVR24) (García-Fraile et al., 2010; Mulas et al., 2011), στο Μεξικό (NH05) (Verástegui-Valdés et al., 2014), στην Κίνα (CCBAU 65761) (Wang et al., 2016), στο Ιράν (Hm1) (Rouhrazi et al., 2016), στην Κένυα (NAK 327, 321, 334) (Mwenda et al., 2018), και στην Κροατία (25T και 26T) (Rajnovic et al., 2019). Αξιοσημείωτο είναι ότι στελέχη που είναι πολύ συγγενικά με το *R. hidalgonense* έχουν επίσης απομονωθεί και από άλλα ψυχανθή συμπεριλαμβανομένου των *Acacia gummifera* (Degefu et al., 2013), *Indigofera arrecta* στην Αιθιοπία (Aserse et al., 2013), των *Trifolium* spp. στην Αιθιοπία (Reeve et al., 2013), του *T. semipilosum* στην Κένυα (Howieson et al., 2005) και του *Vicia faba* στην Αιθιοπία και την Κίνα (Degefu et al., 2013; Chen et al., 2018). Η ανάλυση της ενοποιημένης αλληλουχίας *recA-atpD* έδειξε ότι όλα αυτά τα στελέχη σχημάτισαν μια ομάδα με το *R. hidalgonense* FH14<sup>T</sup> υποστηριζόμενη με υψηλό bootstrap και με υψηλή νουκλεοτιδική ταυτότητα *recA-atpD* (> 99,4%). Επομένως, αρκετά στελέχη που είχαν ονομαστεί προηγουμένως ως *R. leguminosarum*, όπως LBM1212, LBM1123, LEV0613, WSM2012, NH05 και CCBAU 65761 ή *Rhizobium* sp., όπως το NAK 327, 321, 334, LCS0401, LCS0411 και RPVR24 ενδέχεται να αναταξινομηθούν στο μέλλον ως *R. hidalgonense* λαμβάνοντας υπόψη φαινοτυπικά και χημειοταξονομικά δεδομένα.

Το στέλεχος PVPR1, που αντιπροσωπεύει πέντε απομονωμένα στελέχη από μία περιοχή (Πρέβεζα), ομαδοποιήθηκε στον κλάδο 3 μαζί με το *R. anhuiense* CCBAU 23252<sup>T</sup> και εμφάνισε 99,8% ομοιότητα με την ενοποιημένη αλληλουχία *recA-atpD-gyrB*, αποτέλεσμα που συμφωνεί και με το αντίστοιχο των μεμονωμένων γονιδίων της ενοποιημένης αλληλουχίας. Το *R. anhuiense* CCBAU 23252<sup>T</sup> απομονώθηκε από φυμάτια κουκιού στην Κίνα, σχηματίζοντας μη αποτελεσματικά φυμάτια στη φασολιά (Zhang et al., 2015). Στελέχη που σχετίζονται στενά με το *R. anhuiense* και έχουν προηγουμένως απομονωθεί από φυμάτια φασολιών, ομαδοποιήθηκαν μαζί με το PVPR1 συμπεριλαμβάνοντας τα στελέχη Y27, S10, J3, JX3 από την Κίνα (Cao et al., 2014; Tong et al., 2018), τα *Rhizobium* sp. 1627, L6, L13, NC10, M8 επίσης από την Κίνα (Cao et al., 2014; Wang et al., 2016), το CTG-416 από Τουρκία (Gurkanli et al., 2013; Rouhrazi et al., 2016) και το LPA1410 από την Ισπανία (Mulas et al., 2011). Τα στελέχη αυτού του κλάδου εμφάνισαν ομοιότητα σύμφωνα με την ενοποιημένη νουκλεοτιδική αλληλουχία *recA-atpD* άνω του 99% γεγονός που υποστήριξε την κατάταξη τους στο *R. anhuiense*.

Περίεργως, η φυλογενετική κατάταξη του στελέχους PVTP2 δεν είναι ξεκάθαρη καθώς το ποσοστό ομοιότητας της ενοποιημένης αλληλουχίας *recA-atpD-gyrB* είναι 96,85% με την αντίστοιχη, των πρότυπων στελεχών *R. sophorae* CCBAU 03386<sup>T</sup> και *R. laguerreae* FB206<sup>T</sup>. Το *R. sophorae* CCBAU 03386<sup>T</sup> έχει απομονωθεί από ριζικά φυμάτια του ψυχανθούς *Sophora flavescens* και είναι ικανό να σχηματίζει φυμάτια τόσο στον ξενιστή απομόνωσης όσο και στη φασολιά (Jiao, et al., 2015). Αντιθέτως το *R. laguerreae* FB206<sup>T</sup> αποτελεί ριζόβιο που συχνά συναντάται στο κουκί (Saïdi et al., 2014), με χαρακτηριστικό παράδειγμα τα αποτελέσματα του **Εδαφίου 2.4.1.3** της παρούσας εργασίας. Σε επίπεδο ομοιότητας των μεμονομένων γονιδίων της ενοποιημένης αλληλουχίας *recA-atpD-gyrB*, το ποσοστό που υπολογίστηκε ήταν 97,19%, 95,45% και 97,19% με εκείνη των αντίστοιχων αλληλουχιών του *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae* USDA 2370<sup>T</sup>. Η αδυναμία προσδιορισμού του είδους για το PVTP2, θα μπορούσε να ξεπεραστεί με την ανάλυση περισσότερων γονιδίων, προκειμένου να οριστεί με ακρίβεια η ταξινομική του θέση.

Τα στελέχη του MLSA-κλάδου 7 ανήκουν σε μια διευρυμένη ομάδα απομονώσεων η οποία περιέχει ριζόβια φασολιάς, με φυλογενετικά πλησιέστερο πρότυπο στέλεχος το *R. croatiense* 13T<sup>T</sup>, με βαθμό ομοιότητας 97,32% (PVMT25) και 97,39% (PVKA6, PVIM10, PVDO712). Πριν την πρόσφατη ανακάλυψη του *R. croatiense* 13T<sup>T</sup> (Rajnovic et al., 2022), μέλη της συγκεκριμένης ομάδας είχε προταθεί ότι ανήκουν στο γονιδιωματικό είδος *Rhizobium* sp. I (Efstathiadou et al., 2021). Η ένταξη των ελληνικών απομονώσεων μαζί με αυτήν από την Κροατία συμφωνεί και με την ανάλυση των μεμονομένων γονιδίων, με τις αλληλουχίες *recA*, *atpD* και *gyrB*, να παρουσιάζουν ποσοστό ομοιότητας 98,7%, 98,7% και 98,7% με τις αντίστοιχες του *R. croatiense* 13T<sup>T</sup>. Κατά την ανάλυση που διεξήχθη στην παρούσα εργασία, διαπιστώθηκε ότι κάποια από τα στελέχη που ελήφθησαν από τη βιβλιογραφία δεν αντιστοιχούσαν στα ονόματα των ειδών όταν κατατάχθηκαν, καθώς πολλά ριζόβια φασολιών-κουκιού φυλογενετικά τοποθετήθηκαν ανακριβώς σε επίπεδο είδους, γι' αυτό δεν ταυτοποιήθηκαν σωστά λόγω ελλιπούς χαρακτηρισμού. Οι απομονώσεις του κλάδου 7 ήταν κοντά (>99%) στα *Rhizobium* sp. M1 και M10 που απομονώθηκαν από φυμάτια φασολιάς στην Κίνα (Cao et al., 2014), με τα τελευταία να έχουν καταταχθεί παλιότερα στο μη ορισμένο γονότυπο, *Rhizobium* sp. I (Tong et al., 2018). Η κατάταξη των προαναφερθέντων στελεχών καθώς και στελεχών που παλιότερα ανήκαν στο γονιδιωματικό είδος *Rhizobium* sp. I όπως τα *Rhizobium* sp. 1648, 1652, και 1706 από Κίνα (Wang et al., 2016), CTG-412 και CTG-419 από Τουρκία (Gurkanli et al., 2013), L1, B1 και G2 από Ιράν (Rouhrazi et al., 2016), GR12 από Ισπανία (Herrera-Cervera et al., 1999; Vinuesa et al., 2005) πλέον ανήκουν στην ομάδα του *R. croatiense* 13T<sup>T</sup> (Rajnovic et al., 2022), απομόνωση που προανακαλύφθηκε από τους Rajnovic et al. (2019).

Η απομόνωση PVTN21, αντιπροσωπεύοντας 22 απομονώσεις από την περιοχή της Τήνου και μια του Μετσόβου, έδειξε 100 % νουκλεοτιδική ομοιότητα με το *R. sophoriradicis* CCBAU 03470<sup>T</sup>, το οποίο έχει απομονωθεί από ριζικά φυμάτια του φαρμακευτικού ψυχανθούς *Sophora flavescens* στην Κίνα (Jiao, et al., 2015), γι' αυτό και αδιαμφισβήτητα ταυτοποιήθηκε ως *R. sophoriradicis*. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξε και η ανάλυση του ποσοστού ομοιότητας των μεμονομένων γονιδίων, με τις αλληλουχίες *recA*, *atpD* και *gyrB*, να έχουν όλες 100% ομοιότητα με τις αντίστοιχες του *R. sophoriradicis* CCBAU 03470<sup>T</sup> (**Συμπληρωματικό υλικό, Πίνακες Σ2.5-Σ2.7**). Σύμφωνα με τη φυλογένεια του *recA-atpD*, το PVTN21 σχετίστηκε φυλογενετικά με διάφορες απομονώσεις από φυμάτια φασολιάς, όπως τα στελέχη JJW1, L101, 1587, 1617 και 1532 από την Κίνα (Cao et al., 2014; Wang et al., 2016; Tong et al., 2018), τα NAK368 και NAK378 από την Κένυα (Mwenda et al., 2018), τα RHM67 και RHM19 από το Μαρόκο (Faghire et al., 2012), το Kim5 από ΗΠΑ (Josephson & Pepper, 1984), τα IE4803, IE950, IE4874 και IE4794 από το Μεξικό (Silva et al., 2003) και τα CTG-423 και CTG-430 από την Τουρκία (Gurkanli et al., 2013). Όλα τα παραπάνω στελέχη εντάχθηκαν μαζί με το *R. sophoriradicis* CCBAU 03470<sup>T</sup>, με τα στελέχη JJW1, L101, Kim5 και IE4803 να έχουν επιπλέον καταταχθεί ως *R. sophoriradicis*, βάση γονιδιωματικών δεδομένων (Tong et al., 2018). Συνεπώς, όλα τα παραπάνω στελέχη θα πρέπει να οριστούν ως *R. sophoriradicis*. Από όσο γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη φορά που στελέχη *R. sophoriradicis* έχουν βρεθεί σε ευρωπαϊκά εδάφη. Η ευρεία κατανομή του *R. sophoriradicis* σε φυμάτια φασολιάς σε όλο τον κόσμο υποδηλώνει ότι το είδος αυτό είναι πιθανότατα καλά προσαρμοσμένο σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες και διαφορετικές ποικιλίες φασολιών.

Από τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν, το PVIM1 που αντιπροσώπευε μόνο μια από τις οκτώ απομονώσεις της Ημαθίας, ομαδοποιήθηκε μαζί με *Rhizobium azibense* 23C2<sup>T</sup>, το οποίο έχει απομονωθεί από φυμάτια φασολιάς στη Τυνησία (Mnasri et al., 2012, 2014). Με βάση την κατά ζεύγος σύγκριση των ενοποιημένων 3 αλληλουχιών, το PVIM1 εμφάνισε ομοιότητα 99,73% με το *R. azibense* 23C2<sup>T</sup> και κατά συνέπεια εντάχθηκε σε αυτό το είδος. Ωστόσο σε επίπεδο ομοιότητας των μεμονομένων γονιδίων *recA*, *atpD* και *gyrB*, το ποσοστό ήταν 100%, 89,39% και 100% με τις αντίστοιχες αλληλουχίες των *Rhizobium azibense* 23C2<sup>T</sup>, *Rhizobium anhuiense* CCBAU 23252<sup>T</sup> και *Rhizobium gallicum* R602<sup>T</sup>. Στελέχη που ανήκουν στο *R. azibense* έχουν επίσης απομονωθεί από φυμάτια του *P. vulgaris* όπως το IE4868 από το Μεξικό (Silva et al., 2003) και τα 8C-3, GR42 από την Ισπανία (Rodriguez-Navarro et al., 2000; Mnasri et al., 2012, 2014). Το στέλεχος 8C-3 αρχικά ταξινομήθηκε ως *R. gallicum* (Rodriguez-Navarro et al., 2000) αλλά πρόσφατα επαναταξινομήθηκε ως *R. azibense* με βάση γονιδιωματικά δεδομένα (Tong et al., 2018). Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι τα στελέχη IE4868, 8C-3 και GR42

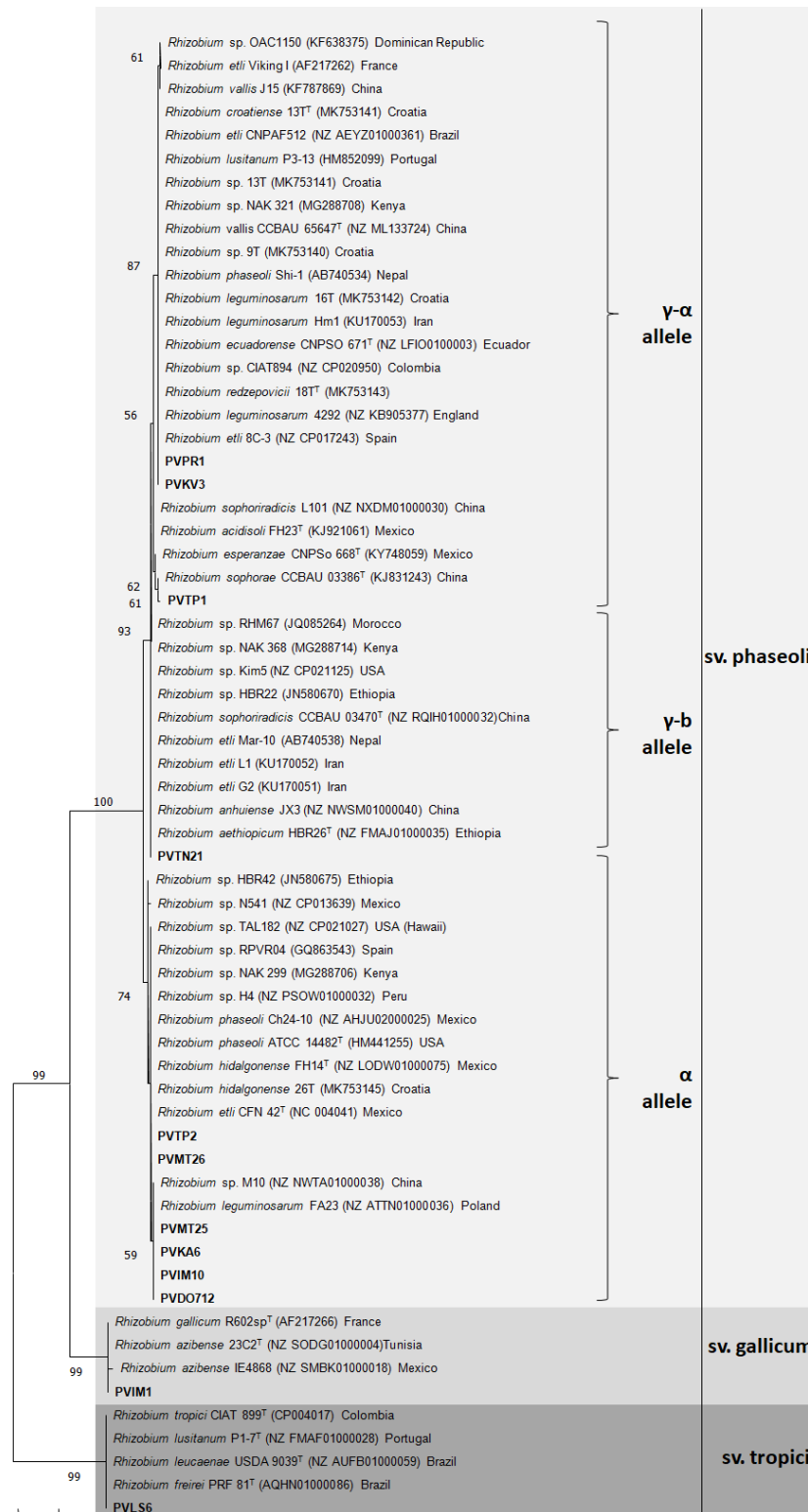
σχετίζονται στενά με το *R. azibense* 23C2<sup>T</sup> με ποσοστό ομοιότητας αλληλουχίας *recA-atpD* από 96,1% έως 96,4%, ενώ η απομόνωση PVIM1 εμφάνισε ομοιότητα 99,88%. Τέλος, τα δέντρα που προέκυψαν από τη φυλογενετική ανάλυση βασισμένη είτε στην αλληλουχία των μεμονωμένων γονιδίων είτε στην ενοποιημένη αλληλουχία αυτών, έδειξαν ότι το PVLS6 (αντιπροσωπευτική απομόνωση 6 ριζοβίων από τη Λέσβο) ανήκει στο *R. tropici* CIAT899<sup>T</sup> με ποσοστά ομοιότητας 99,78% (*recA*), 100% (*atpD*), 100% (*gyrB*) και 99,93% (*recA-atpD-gyrB*).

Η πλούσια «βιβλιοθήκη» ριζοβίων φασολιάς τόσο σε πλήθος όσο και σε επίπεδο είδους αποτέλεσε έναυσμα για την εύρεση μη πρότυπων στελεχών φυλογενετικά κοντά στις παραπάνω απομονώσεις, διερευνώντας κατά μια έννοια την εξάπλωση των ειδών αυτών ανά τον κόσμο. Για την ανάδειξη της γεωγραφικής κατανομής των παραπάνω ειδών αντλήθηκαν αλληλουχίες των γονιδίων *recA*, *atpD* και *gyrB* από διάφορα στελέχη *Rhizobium* spp. Η ανάλυση που ακολούθησε βασίστηκε κυρίως στην ενοποιημένη αλληλουχία των *recA-atpD* και τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται απλοποιημένα στον **Πίνακα Σ2.10** του Πρόσθετου Υλικού. Επομένως, η παρούσα μελέτη δεν μπορεί να καταλήξει σε αποτέλεσμα που να συσχετίζει τη βιοποικιλότητα των ριζοβίων με τις εδαφικές παραμέτρους ή τους γενότυπους ξενιστών στις περιοχές που έλαβε χώρα η δειγματοληψία. Για τον καθορισμό των παραγόντων που επηρεάζουν την κατανομή διαφόρων ειδών ή γονιδιωματικά είδη στο ελληνικό έδαφος, απαιτείται περαιτέρω μελέτη.

#### **2.4.2.4) Προσδιορισμός συμβιώτου ριζοβίων φασολιάς**

Το γονίδιο *nodC* χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του συμβιώτου των ριζοβιακών ειδών. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η φασολιά θεωρείται ξενιστής που προσελκύει μεγάλο εύρος ριζοβίων για φυματογένεση, τόσο σε επίπεδο είδους όσο και σε επίπεδο συμβιώτου (Michiels et al., 1998; Shamseldin & Velázquez, 2020). Μέχρι σήμερα, τουλάχιστον 30 είδη και 8 συμβιώτοι έχουν καταγραφεί, ικανοί να σχηματίζουν φυμάτια στη φασολιά (Rogel et al., 2011; Peix et al., 2015; Shamseldin & Velázquez, 2020). Ανεξαρτήτως του είδους, τα περισσότερα ριζόβια φασολιάς ανήκουν στο συμβιώτο (sv.) phaseoli και σχηματίζουν φυμάτια αποκλειστικά στη φασολιά. Παλιότερα ο sv. phaseoli χωρίζονταν σε 3 υπο-κλάδους, αντιπροσωπεύοντας διαφορετικά αλληλόμορφα του *nodC*, τα οποία έχουν οριστεί ως α, γ-α και γ-β (Aguilar et al., 2004; Rouhrazi et al., 2016; Mwenda et al., 2018). Το γ αλληλόμορφο του γονιδίου *nodC* θεωρείται το πιο διαδεδομένο σε όλο τον κόσμο, που υποδηλώνει την κατανομή του αλληλόμορφου αυτού μαζί με σπόρους φασολιών από τα αμερικανικά κέντρα διανομής (Aguilar et al., 2004; García-Fraile et al., 2010; Valverde et al., 2011; Díaz-Alcántara et al., 2014).





**Εικόνα 2.14:** Maximum Likelihood (ML) φυλογενετικό δέντρο, βασισμένο σε τμήμα της αλληλουχίας του γονιδίου *nodC* (396 bp), αποτυπώνει τις ταξινομικές σχέσεις των υπό μελέτη στελεχών και των φυλογενετικά πλησιέστερων πρότυπων στελεχών *Rhizobium*. Οι απομονώσεις της παρούσας εργασίας παρουσιάζονται με έντονη γραφή. Τα πρότυπα στελέχη επισημάνθηκαν με εκθέτη “T” και αριθμοί καταλογράφησης οι κατά GenBank των αλληλουχιών δηλώθηκαν σε παρένθεση. Η φυλογενετική ανάλυση διεξήχθη στο MEGA X χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο ML και το Kimura 2-parameter model plus Gamma rate distribution (K2+G). Οι τιμές Bootstrap (πάνω από 50%) υπολογίσθηκαν για 500 επαναλήψεις και απεικονίζονται στους κόμβους. Η γραμμή κλίμακας δείχνει τον αριθμό των νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων ανά τοποθεσία.

Λόγω της καλής διακριτικής ικανότητας του γονιδίου *nodC*, ενισχύθηκε και αναλύθηκε μέρος των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μόνο του συγκεκριμένου γονιδίου για όλα τα αντιπροσωπευτικά στελέχη. Στο δέντρο που κατασκευάστηκε (Εικόνα 2.14), οι περισσότερες ελληνικές απομονώσεις τοποθετήθηκαν σε τρεις καλά υποστηριζόμενες ομάδες, οι οποίες αντιστοιχήθηκαν με το συμβίοτυπο *phaseoli*, *gallicum* και *tropici*. Προκειμένου να οριστούν τα αλληλόμορφα *nodC* των υπό μελέτη στελεχών χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά αλληλόμορφα *nodC* από αντιπροσωπευτικά στελέχη της βιβλιογραφίας. Είναι ενδιαφέρον ότι οι υπό μελέτη απομονώσεις με *sv. phaseoli* κατανεμήθηκαν σε 3 υποκλάδους, που αντιστοιχούν στα αλληλόμορφα α, γ-α και γ-β (Mwenda et al., 2018) που περιγράφηκαν προηγουμένως.

Το αλληλόμορφο α που βρέθηκε σε 6 ελληνικά στελέχη σχετίστηκε στενά με το *R. hidalgonense*. Το συγκεκριμένο αλληλόμορφο θεωρείται ότι προέρχεται από την Αμερική και διανεμήθηκε στην Ευρώπη και σε άλλες ηπείρους από τους σπόρους φασολιάς (Aguilar et al., 2004; Lozano et al., 2010; Ribeiro et al., 2013; Díaz-Alcántara et al., 2014). Το στέλεχος PVMT26, που προσδιορίστηκε ως *R. hidalgonense* και το στέλεχος PVTP2, η φυλογένεια του οποίου δεν έχει προσδιοριστεί με ακρίβεια, έφεραν το α αλληλόμορφο του *nodC* το οποίο ήταν πανομοιότυπο (100%) με εκείνο των πρότυπων στελεχών *R. hidalgonense* (Μεξικό), *R. etli* (Μεξικό) και *R. phaseoli* (ΗΠΑ). Τα στελέχη που καταχωρήθηκαν ως *R. croatiense* (PVIM10, PVMT25, PVKA6 και PVDO712) έφεραν και αυτά το α αλληλόμορφο ως προς το γονίδιο *nodC*, το οποίο ήταν μεταξύ τους ίδιο και όμοιο με εκείνο των παραπάνω πρότυπων στελεχών, κατά 99,75%. Το αλληλόμορφο α έχει επίσης βρεθεί σε στελέχη που είχαν χαρακτηριστεί παλιότερα ως: *Rhizobium* sp. I (M1, M10, H4, 1648, 1652, NAK 299, 26 T), *Rhizobium* sp. II (N541), *Rhizobium* sp. IX (FA23), *R. esperanzae* (TAL182), *R. phaseoli* (NAK 299, Ch24-10) και *Rhizobium* sp. RPVR04 και HBR42. Το ποσοστό ομοιότητας των αλληλομόρφων α του *nodC* διαφόρων στελεχών από διαφορετικές χώρες κυμαίνεται από 99,2 έως 100%, ενώ σε ευρωπαϊκά εδάφη, το αλληλόμορφο αυτό έχει βρεθεί σε στελέχη που σχετίζονται με το *R. hidalgonense* στην Κροατία (Rajnovic et al., 2019), το *R. etli* στην Ισπανία (García-Fraile et al., 2010) και το *R. leguminosarum* στην Πολωνία (Reeve et al., 2015).

Τα στελέχη PVPR1 και PVKV3, που κατατάχθηκαν ως *R. anhuiense* και ως πιθανή νέα γενεαλογική σειρά, αντίστοιχα, διέθεταν το αλληλόμορφο γ-α του *nodC*, το οποίο ήταν πανομοιότυπο τόσο μεταξύ τους όσο και με εκείνο των πρότυπων στελεχών *R. vallis* και *R. ecuadorensis* απομονωμένα από φυμάτια φασολιών στην Κίνα και τον Ισημερινό, αντίστοιχα (Wang et al., 2011; Ribeiro et al., 2015). Το αλληλόμορφο αυτό έχει εντοπιστεί επίσης στα πρότυπα στελέχη *R. acidisoli* (Μεξικό), *R. esperanzae* (Μεξικό), *R. sophorae* (Κίνα), *R. redzeponicijii* (Κροατία) και *R. croatiense* (Κροατία) με ποσοστό ομοιότητας από 99-100% συγκριτικά με το

PVPR1 και το PVKV3. Επίσης, το αλληλόμορφο γ-α, το φέρουν και στελέχη άλλων ειδών, όπως τα *R. etli*, *R. leguminosarum*, *R. lusitanum*, *R. phaseoli* και *R. sophoriradicis* με το μεταξύ τους εύρος ομοιότητας να έχει υπολογιστεί από 97,2 έως 100%. Το συγκεκριμένο αλληλόμορφο βρέθηκε σε στελέχη απομονωμένα από φυμάτια φασολιάς διαφόρων χωρών από όλες τις ηπείρους, αποτελώντας το πιο διαδεδομένο εντός των ριζοβιακών ειδών που σχηματίζουν φυμάτια στα φασόλια. Στα ευρωπαϊκά εδάφη, το αλληλόμορφο γ-α του *nodC* είναι το πιο συνηθισμένο μεταξύ των ριζοβίων της φασολιάς ανεξάρτητα από το είδος στο οποίο ανήκουν (Amarger et al., 1997; Laguerre et al., 2001; Aguilar et al., 2004; García-Fraile et al., 2010; Lozano et al., 2010; Mulas et al., 2011; Dall'Agnoletti et al., 2014; Valverde et al., 2011; Rajnovic et al., 2019). Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο sv. *phaseoli* εξελίχθηκε μαζί με το κοινό φασόλι στην Αμερική (Martínez-Romero & Caballero-Mellado, 1996; Aguilar et al., 2004) και πιθανότατα διαδόθηκε παγκοσμίως μαζί με τους σπόρους του (Pérez-Ramírez et al., 1998; Shamseldin & Velázquez, 2020). Τα γηγενή ριζόβια σε διάφορες χώρες είναι πιθανό να έχουν αποκτήσει συμβιωτικά γονίδια όπως αυτά του sv. *phaseoli* μέσω οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς στη ριζόσφαιρα ή εντός των φυματίων (Andrews et al., 2018; Bañuelos-Vazquez et al., 2020).

Τα ελληνικά στελέχη που προσδιορίστηκαν ως *R. sophoriradicis* και αντιπροσωπεύονται από το PVTN21 φάνηκε ότι φέρουν το αλληλόμορφο γ-b, το οποίο έχει εντοπιστεί στα πρότυπα στελέχη *R. aethiopicum* και *R. sophoriradicis* (100%). Αξιοσημείωτο είναι ότι τα αλληλόμορφα γ-b του *nodC* που βρέθηκαν σε διάφορα στελέχη στην Ασία (Κίνα, Ιράν), στην Αφρική (Αιθιοπία, Κένυα, Μαρόκο) και στην Αμερική (ΗΠΑ, Μεξικό) (Aserse et al., 2012; Faghire et al., 2012; Cao et al., 2014; Rouhrazi et al., 2016; Wang et al., 2016; Santamaría et al., 2017; Mwenda et al., 2018) ήταν σε όλα πανομοιότυπα (100%). Τα περισσότερα στελέχη που φέρουν το αλληλόμορφο αυτό είχαν στενή σχέση με το *R. sophoriradicis* (Kim5, IE4803, RHM67, RHM19, NAK368, NAK378, NAK387, L1, S1, G1, B1, 1706, 1587, 1617, και 1532), εκτός από το στέλεχος L101 που έφερε το αλληλόμορφο γ-α και το στέλεχος IE4771 που διέθετε ένα γονίδιο *nodC* παρόμοιο με το sv *gallicum*. Επιπλέον, αυτό το αλληλόμορφο είναι επίσης παρόν σε στελέχη *R. anhuiense*, όπως στα JX3 Y27, S10, C15, J3 από την Κίνα (Cao et al., 2014; Tong et al., 2018), στο *Rhizobium* sp. I (π.χ. *Rhizobium* sp. G2) από το Ιράν (Rouhrazi et al., 2016) και στα *Rhizobium* sp. στελέχη Mar-10 και HBR22 από το Νεπάλ και την Αιθιοπία, αντίστοιχα (Aserse et al., 2012; Adhikari et al., 2013). Επομένως, αυτό το αλληλόμορφο φαίνεται να περιορίζεται σε μερικά ριζοβιακά είδη, κατά προτίμηση στο *R. sophoriradicis*. Αυτή είναι η πρώτη φορά που το αλληλόμορφο γ-b βρέθηκε σε ευρωπαϊκά εδάφη και σε απομονώσεις που έχουν χαρακτηριστεί ως *R. sophoriradicis*.

Τα στελέχη που προσδιορίστηκαν ως *Rhizobium azibense* και αντιπροσωπεύονται από το PVIM1 φέρουν γονίδια *nodC* πανομοιότυπα (100%) με το sv. *gallicum*, το οποίο έχει εντοπιστεί στις απομονώσεις *R. azibense* 23C2<sup>T</sup> και *R. gallicum* R602sp<sup>T</sup> από φυμάτια φασολιάς στην Τυνησία και στη Γαλλία, αντίστοιχα (Amarger et al., 1997; Mnasri et al., 2012, 2014). Ωστόσο, στελέχη *R. azibense* όπως τα 8C-3 και GR42, απομονωμένα από φυμάτια φασόλια στην Ισπανία ανήκουν στο sv. *phaseoli* που φιλοξενεί το αλληλόμορφο γ-α (Herrera-Cervera et al., 1999; Rodriguez-Navarro et al., 2000; Mnasri et al., 2014; Bustos et al., 2017). Στελέχη που ανήκουν στο sv *gallicum* έχουν επίσης απομονωθεί από τα κοινά φασόλια στην Αυστρία (Sessitsch et al., 1997), Τυνησία (Mhamdi et al., 1999; Mnasri et al., 2012), Μαρόκο (Mouhsine et al., 2007; Faghire et al., 2012) και Μεξικό (Sessitsch et al., 1997; Silva et al., 2003). Προηγουμένως, είχε προταθεί ότι η εμφάνιση του sv. *gallicum* στα ευρωπαϊκά εδάφη μπορεί να συσχετιστεί με την εισαγωγή των κοινών φασολιών μαζί με τα συμβιωτικά βακτήρια των σπόρων από την Αμερική (Jorin et al., 2020). Είναι ενδιαφέρον ότι ευρωπαϊκά και αφρικανικά στελέχη διέθεταν πανομοιότυπες αλληλουχίες γονιδίου *nodC* τόσο μεταξύ τους όσο και με το πρότυπο στέλεχος *R. gallicum* R602sp<sup>T</sup>, ενώ οι μεξικανικές απομονώσεις IE4868, FL27 και IE4771 έφεραν πιο αποκλίνοντα γονίδια *nodC*, παρουσιάζοντας ομοιότητα 99,51%, 96,54% και 93,83%, αντίστοιχα. Αν και η μεξικανική απομόνωση FL27 είχε προηγουμένως αποδειχθεί ότι είναι φτωχός αφομοιωτής αζώτου στα φυμάτια της φασολιάς (Pinero et al., 1988), απομένει να διερευνηθεί εάν τα ευρωπαϊκά και αφρικανικά ριζοβιακά στελέχη κατέχουν καλύτερη συμβιωτική αποτελεσματικότητα, δεδομένου ότι φέρουν πιο αποκλίνοντα γονίδια *nodC*.

Σημειώνεται επίσης ότι το sv. *gallicum* έχει αναφερθεί ότι προκαλεί αποτελεσματικά φυμάτια σε ψυχανθή που ανήκουν στα γένη *Leucaena*, *Macroptilium*, *Onobrychis*, *Sesbania*, *Caliandra*, *Gliricidia*, *Leucaena* και *Piptadenia* (Amarger et al., 1997; Sessitsch et al., 1997; Laguerre et al., 1997; Herrera-Cervera et al., 1999; Silva et al., 1999; Rodriguez-Navarro et al., 2000; Mhamdi et al., 2002; Zurdo-Piñeiro et al., 2004; Degefu et al., 2013). Οι αλληλουχίες του γονιδίου *nodC* των υπό μελέτη απομονώσεων ήταν επίσης πανομοιότυπες με αυτές που βρέθηκαν σε στελέχη με sv. *gallicum* απομονωμένα από φυμάτια άλλων ψυχανθών, όπως τα στελέχη: *Rhizobium* sp. AC91a από το *Caliandra calothyrsus* στην Αιθιοπία (Degefu et al., 2013), *R. tarimense* AS1-101a και SPT1 από το *Ammopiptanthus* στην Κίνα, και το *Rhizobium* sp. UPRM 8060 από το *Piptadenia flava* στο Πουέρτο Ρίκο (Bournaud et al., 2013). Η ευρεία κατανομή του sv. *gallicum* σε διαφορετικές ηπείρους σε συνδυασμό με το ευρύ φάσμα των ξενιστών του και την παρουσία του σε διαφορετικά ριζοβιακά είδη το καθιστά ένα πολλά υποσχόμενο εμβόλιο πολλών ξενιστών.

Τέλος, στελέχη που προσδιορίστηκαν ως *Rhizobium tropici* αντιπροσωπεύονται από το PVLS6 φέρουν γονίδια *nodC* πανομοιότυπα (100%) με το *sv. tropici*, το οποίο έχει εντοπιστεί στις απομονώσεις *R. tropici* CIAT 899<sup>T</sup> (Κολομβία), *R. lusitanum* P1-7<sup>T</sup> (Πορτογαλία), *R. leucaenae* USDA 9039<sup>T</sup> (Βραζιλία) και *R. freirei* PRF 81<sup>T</sup> (Βραζιλία) (Dall’Agnol et al., 2013). Το *R. tropici* CIAT 899 έχει αναγνωριστεί σε πολλές χώρες ως ένα εξαιρετικό βακτηριακό στέλεχος (Gomes et al., 2015; Vanlauwe et al., 2019), λόγω της ανταγωνιστικής και αζωτοδεσμευτικής του ικανότητας (Hungria et al., 2000, 2003; Mostasso et al., 2002). Τόσο το πρότυπο αυτό στέλεχος όσο και τα στελέχη *R. freirei* PRF 81 (= SEMIA 4080), *R. tropici* H12 (= SEMIA 4088) χρησιμοποιούνται σε εμπορικά σκευάσματα στη Βραζιλία από το 1998 και το 2004 αντίστοιχα, (Hungria et al., 2000, 2003; Gomes et al., 2015). Η εύρεση του είδους αυτού σε ελληνικά εδάφη (Λέσβος), καθιστά τις απομονώσεις αυτές πολύτιμο «βιολογικό υλικό» για τον εμβολιασμό της φασολιάς και την αύξηση της παραγωγής μειώνοντας τις απαιτήσεις σε χημικά λιπάσματα.

### **2.4.3) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΡΙΖΟΒΙΩΝ ΣΤΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΦΥΜΑΤΙΩΝ ΣΕ ΚΟΥΚΙ ΚΑΙ ΦΑΣΟΛΙΑ**

#### **2.4.3.1) Δοκιμή επιβεβαίωσης ταυτότητας (Authentication Test)**

Η δοκιμή επιβεβαίωσης ταυτότητας είναι μια βιοδοκιμή που πραγματοποιείται για την απόδειξη ότι η προς εξέταση επιλεγμένη βακτηριακή απομόνωση είναι βακτήριο φυματιογένεσης για τον ξενιστή από τον οποίο απομονώθηκε. Η συμβολή της βιοδοκιμής αυτής είναι ουσιαστική και συμβάλλει στον αποκλεισμό της μελέτης βακτηρίων που δεν ευθύνονται για το σχηματισμό φυματίων στον υπό μελέτη ξενιστή. Ωστόσο υπάρχει πιθανότητα εμφάνισης παραλλαγμένων ριζοβίων που δε σχηματίζουν φυμάτια ή περιπτώσεις απώλειας συμβιωτικού πλασμιδίου και κατ’ επέκταση της ικανότητας φυματιογένεσης. Επίσης, υπάρχουν συνεχώς αυξανόμενες ενδείξεις ότι κάποιες φορές μη φυματιογενή στελέχη προέρχονται από το ίδιο φυμάτιο με το φυματιογενές στέλεχος γεγονός που υποδηλώνει πιθανή συν-κατάληψη (π.χ. η αποίκιση του ψυχανθούς *Lebeckia ambigua* από μη φυματιογενή στελέχη *Burkholderia*) (Howieson et al., 2013; Yates et al., 2016).

Η δοκιμή επιβεβαίωσης ταυτότητας έχει ως βάσει τα τρία κριτήρια του Koch. Συγκεκριμένα το ριζόβιο θα πρέπει: 1) να είναι πάντα παρών στον ξενιστή και συγκεκριμένα στη δομή εμφάνισης της μόλυνσης (φυμάτιο), 2) να μπορεί να απομονωθεί από το φυμάτιο, να μπορεί να αναπτυχθεί σε καθαρή καλλιέργεια και να μολύνει (εμβολιάσει) τον ξενιστή απομόνωσης προκαλώντας εκ νέου σχηματισμό φυματίων και 3) το ριζόβιο που χρησιμοποιήθηκε στο προηγούμενο στάδιο, πρέπει να μπορεί να απομονωθεί ξανά από τα φυμάτια, να μπορεί να αναπτυχθεί σε καθαρή καλλιέργεια και να συγκριθεί με την αρχική απομόνωση (Yates et al.,

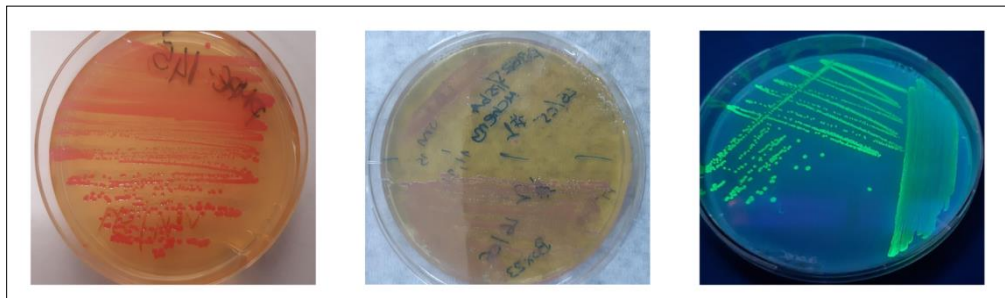
2016). Για την υλοποίηση της δοκιμής επιβεβαίωσης ταυτότητας, πολλά συστήματα ανάπτυξης των φυτών είναι διαθέσιμα (γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες, πλαστικά σακουλάκια ανάπτυξης, Leonard jars, φιαλίδια 'O'Hara', πλαστικές γλάστρες, υδροπονία) με την επιλογή του καταλληλότερου συστήματος να σχετίζεται κυρίως με το μέγεθος του σπόρου, το μέγεθος του αναπτυσσόμενου φυτού, τη διάρκεια και τη φύση του πειράματος (Yates et al., 2016).

Λαμβάνοντας υπόψη τη σημαντικότητα της παρούσας βιοδοκιμής επιλέχθηκαν προς εξέταση 8 αντιπροσωπευτικά στελέχη ριζοβίων κουκιού (VFLE1, VFIM1, VFCE3, VFKY1, VFEP63, VFCE2, VFEP162 και VFLE5) και 10 φασολιάς (PVKA6, PVIM10, PVMT25, PVDO712, PVTN21, PVPR1, PVMT26, PVTP1, PVKV3 και PVIM1). Για την εξέταση των ριζοβίων κουκιού επιλέχθηκε ως σύστημα ανάπτυξης των φυτών η χρήση μικρών αυτοσχέδιων πλαστικών ποτηριών γεμισμένα με αποστειρωμένο υπόστρωμα (βερμικουλίτη, περλίτη) και μέσο ενυδάτωσης και θρέψης το Fåhræus. Το σύστημα αυτό μπορεί να εξετάσει μεγάλου ή μικρού μεγέθους ψυχανθή, αλλά απαιτείται επάρκεια χώρου και καθαρό περιβάλλον ανάπτυξης (Yates et al., 2016). Για την εξέταση των ριζοβίων φασολιάς επιλέχθηκε ως σύστημα ανάπτυξης των φυτών η χρήση πλαστικής σακούλας ανάπτυξης και ως μέσο ενυδάτωσης και θρέψης το Fåhræus. Το σύστημα αυτό παρέχει αποτελεσματικό χώρο και ευκολία στην απεικόνιση του ριζικού συστήματος, δύσκολα όμως ελέγχονται οι αερομεταφερόμενοι επιμολυντές (Yates et al., 2016). Η επιλογή των συγκεκριμένων συστημάτων έγινε με βάση το μέγεθος του σπόρου του κουκιού και φασολιάς καθώς και των αγρονομικών τους χαρακτηριστικών, όπως το μέγεθος του αναπτυσσόμενου φυτού. Για το κουκί επιλέχθηκε τοπική ποικιλία από την Τρίπολη και για τη φασολιά, η τοπική ποικιλία βανίλια Φενεού που είναι μικρόσπερμη. Ο τρόπος διεξαγωγής του πειράματος και της εφαρμογής (εμβολιασμός) των εξεταζόμενων βακτηρίων έγινε όπως έχει περιγραφεί στα εδάφια **2.3.4** και **2.3.5**.

Μετά από περίπου 15-20 ημέρες αξιολογήθηκε η ικανότητα φυματιογένεσης των ριζοβίων στους αντίστοιχους ξενιστές απομόνωσης. Φυτά στα οποία δεν είχαν εφαρμοστεί βακτήρια χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες ελέγχου και σύγκρισης των αποτελεσμάτων. Σε όλες τις εξεταζόμενες περιπτώσεις παρατηρήθηκε σχηματισμός φυματίων ακόμα και σε φυτά που δεν είχαν εμβολιαστεί με βακτήρια. Η παρουσία φυματίων σε φυτά που είχαν εμβολιαστεί ήταν πιο έντονη (Nod+) σε σχέση με τα μη εμβολιασμένα, εκ των οποίων τα περισσότερα ήταν εσωτερικά κόκκινα (Fix+) λόγω της παρουσίας της αιμογλοβίνης των ψυχανθών, η οποία έχει συσχετιστεί με την αζωτοδεσμευτική ικανότητα του φυματίου (Riley & Dilworth, 1985).

Προκειμένου να διευκολυνθεί η μελέτη της συμβιωτικής αλληλεπίδρασης των ριζοβίων με τον ξενιστή απομόνωσης τους στα πλαίσια της διεξαγωγής του τρίτου σταδίου της δοκιμής επιβεβαίωσης ταυτότητας έγινε επισήμανση των υπό μελέτη ριζοβίων με αυτοφθορίζουσες

πρωτεΐνες (Auto Fluorescent Proteins, AFP). Σε επτά ριζόβια φασολιάς (PVKA6, PVTN21, PVMT26, PVPR1, PVIM1, PVMT25, *R. tropici* CIAT899<sup>T</sup>) και 5 ριζόβια κουκιού (VFBL1, VFBL5, VFEP63, VFCE2, VFEP162) μεταφέρθηκε πλασμίδιο που κωδικοποιούσε μία φθορίζουσα πρωτεΐνη (πράσινη, κόκκινη, ή μωβ). Ενδεικτικά στην **Εικόνα 2.15** παρουσιάζεται το εμπορικό ριζόβιο *R. tropici* CIAT 899 το οποίο έχει επισημανθεί με πλασμίδια που φέρουν τα γονίδια για την μωβ, κόκκινη και πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη. Τα ριζόβια που επισημάνθηκαν με την πράσινη αυτοφθορίζουσα πρωτεΐνη ανιχνεύονται με τη βοήθεια λάμπας υπεριώδους φωτός, ενώ εκείνα με την κόκκινη και μωβ είναι ανιχνεύσιμα στο ορατό φως.



**Εικόνα 2.15:** Φθορίζοντα *R. tropici* που έχει επισημανθεί με φθορίζουσες πρωτεΐνες (A) mScarlet-I, (B) mcherry και (Γ) GFP(υv).

Από τα φθορίζοντα ριζόβια επιλέχθηκαν έξι ριζόβια φασολιάς (PVPR1, PVKA6, PVMT26, PVTN21, PVIM1, *R. tropici*) επισημασμένα με κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (pMRE145/mScarlet-I) για τη διεξαγωγή προκαταρκτικής μελέτης η οποία ταυτόχρονα με την ικανότητα ανίχνευσης του εξεταζόμενου βακτηρίου θα εξέταζε και τη σταθερότητα του πλασμιδίου στο ριζόβιο-ξενιστή μετά από μόλυνση της φασολιάς.

Βακτήρια	TY								TY + Gm15							
	Με Αποστείρωση				Χωρίς -Αποστείρωση				Με Αποστείρωση				Χωρίς -Αποστείρωση			
	Φυμάτιο 1	Φυμάτιο 2	Φυμάτιο 3	Πολλά Φυμάτια	Φυμάτιο 1	Φυμάτιο 2	Φυμάτιο 3	Πολλά Φυμάτια	Φυμάτιο 1	Φυμάτιο 2	Φυμάτιο 3	Πολλά Φυμάτια	Φυμάτιο 1	Φυμάτιο 2	Φυμάτιο 3	Πολλά Φυμάτια
Μάρτυρας										-	-	-				
PVPR1									-	-	-	-				
PVKA6									-	-						
PVMT26									-		-	-				
PVTN21											-					
PVIM1										-	-	-				
<i>R. tropici</i> (θετικός μάρτυρας)																

**Εικόνα 2.16:** Ανίχνευση των επισημασμένων με τη φθορίζουσα πρωτεΐνη mScarlet-I βακτηρίων (PVPR1, PVKA6, PVMT26, PVTN21, PVIM1, *R.tropici*) από φυμάτια φασολιάς μετά από εμβολιασμό με τα αντίστοιχα βακτήρια, είτε αυτά είχαν αποστειρωθεί είτε όχι σε στερεό θρεπτικό μέσο TY και TY+Gm<sub>15</sub>.



Στην **Εικόνα 2.16** συγκρίθηκε η επίδραση της απολύμανσης- αποστείρωσης των φυματίων με αυτή στην οποία απουσιάζει και ταυτόχρονα ελέγχθηκε αν η παρουσία του αντιβιοτικού Gm<sub>15</sub> (δείκτης ανθεκτικότητας αντιβιοτικού στο πλασμίδιο) επηρεάζει την ικανότητα ανίχνευσης των φθοριζόντων ριζοβίων από φυμάτια που είτε είχαν αποστειρωθεί είτε όχι. Στην περίπτωση που είχε γίνει εναπόθεση σε τρυβλίο χωρίς αντιβιοτικό (TY), δεν ευνοήθηκε η ανίχνευση φθορισμού είτε είχε προηγηθεί αποστείρωση είτε όχι. Όμοια ήταν η εικόνα με την περίπτωση όπου είχε γίνει εναπόθεση σε τρυβλίο με αντιβιοτικό (TY+Gm<sub>15</sub>) χωρίς όμως να έχει προηγηθεί αποστείρωση. Αντιθέτως, όταν έγινε εναπόθεση σε τρυβλίο με αντιβιοτικό (TY+Gm<sub>15</sub>) από φυμάτια που είχαν προηγουμένως αποστειρωθεί, ανιχνεύθηκε φθορισμός, στα βακτήρια PVTN21 και *R. tropici*. Συμπερασματικά, προκύπτει ότι για την ανίχνευση των επισημασμένων βακτηρίων είναι απαραίτητη τόσο η απολύμανση των φυματίων, όσο και η παρουσία του αντιβιοτικού Gm<sub>15</sub> στο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης των βακτηρίων, Με το διπλό αυτό συνδυασμό επιτυγχάνεται: α) η μείωση του μικροβιακού φορτίου των επιφύτων της εξωτερικής επιφάνειας των φυματίων (Vincent, 1970; Rajendran et al., 2012) και β) η άσκηση πίεσης επιλογής που οδηγεί στην ικανότητα επιβίωσης παρουσία του αντιβιοτικού και ταυτόχρονα στην έκφραση της πρωτεΐνης φθορισμού, με το μηχανισμό αυτό να είναι άρρηκτα συνδεδεμένος με τη σταθερότητα του πλασμιδίου που φέρει το γονίδιο που εκφράζει την φθορίζουσα πρωτεΐνη (Peloquin et al., 2000; Ma et al., 2011; Gomes & Mergulhão, 2017; Sullivan & Ulett, 2018). Επίσης, η ανίχνευση του φθορισμού στα βακτήρια PVTN21 και *R. tropici* υποδηλώνει ότι στα βακτήρια αυτά το πλασμίδιο ήταν σταθερό απουσία αντιβιοτικού, τουλάχιστον για το χρονικό διάστημα που διεξήχθη το πείραμα. Με άλλα λόγια τα παραπάνω φθορίζοντα ριζόβια, ήταν ικανά να διατηρούν το πλασμίδιο pMRE145/mScarlet-I για 15-20 ημέρες εντός φυματίου, σε ένα περιβάλλον χωρίς πίεση (απουσία αντιβιοτικού). Η μη ανίχνευση της φθορίζουσας πρωτεΐνης στα υπόλοιπα επισημασμένα ριζόβια (PVPR1, PVKA6, PVMT26, PVIM1) σε θρεπτικό υπόστρωμα TY+Gm<sub>15</sub> υποδηλώνει ότι το πλασμίδιο δεν είναι σταθερό για μεγάλο χρονικό διάστημα απουσία αντιβιοτικού.

Δεδομένου ότι οι περιπτώσεις ανίχνευσης φθορισμού αποτελούν μειονότητα αξίζει να συζητηθεί γιατί δεν παρατηρήθηκε φθορισμός μετά από εναπόθεση σε τρυβλίο με TY+Gm<sub>15</sub> χωρίς να έχει προηγηθεί απολύμανση των φυματίων και σε τρυβλίο με TY (είτε είχε λάβει χώρα απολύμανση φυματίων είτε όχι). Στο θρεπτικό TY+Gm<sub>15</sub>, η παρατήρηση μη φθοριζόντων βακτηρίων από μη αποστειρωμένα φυμάτια πιθανόν να οφείλεται σε βακτήρια με εγγενή ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό. Τα βακτήρια αυτά ήταν ως επί το πλείστον βακτήρια της επιφάνειας των φυματίων και σε μικρότερο βαθμό ενδογενή των φυματίων. Ο ισχυρισμός αυτός στηρίζεται στο γεγονός ότι όταν έγινε εναπόθεση στο ίδιο θρεπτικό μέσο από

αποστειρωμένα φυμάτια, περισσότερες ήταν οι περιπτώσεις όπου δεν αναπτύχθηκαν ενδογενή βακτήρια και λιγότερες αυτές όπου αναπτύχθηκαν και ήταν μη φθορίζοντα τα βακτήρια. Η μη ανίχνευση φθορισμού των βακτηρίων PVTN21 και *R. tropici* από μη αποστειρωμένα φυμάτια, στο θρεπτικό TY+Gm<sub>15</sub> κατά πάσα πιθανότητα οφείλεται στο γεγονός ότι τα επιφανειακά ανθεκτικά στο αντιβιοτικό βακτήρια κάλυψαν το φθορισμό ή δεν επέτρεψαν στα βακτήρια αυτά να εκφράσουν την πρωτεΐνη σε τέτοιο βαθμό που να είναι ορατός ο φθορισμός ή παρεμπόδισαν την ανάπτυξη τους. Κάτι αντίστοιχο πιθανώς να συνέβη και στην περίπτωση που είχε γίνει εναπόθεση σε τρυβλίο με TY.

Συμπερασματικά, η χρήση επισημασμένων βακτηρίων και η ανίχνευση φθορισμού συσχετίστηκε με το βήμα 3 των κριτηρίων του Koch στην επιβεβαίωση ταυτότητας. Η ανίχνευση και εκ νέου απομόνωση των κόκκινων επισημασμένων βακτηρίων εμβολιασμού PVTN21 και *R. tropici*, καλύπτει σε μεγάλο βαθμό το τρίτο βήμα, αποτελώντας ισχυρή ένδειξη ότι τα PVTN21 και *R. tropici* ήταν τα βακτήρια που προκάλεσαν το σχηματισμό φυματίων. Επιπλέον, η ανίχνευση των βακτηρίων αυτών ενισχύει κατά κάποιον τρόπο τον ισχυρισμό πως ο εμβολιασμός της συγκεκριμένης ποικιλίας φασολιάς με τα συγκεκριμένα βακτήρια ήταν επιτυχής και πως η αύξηση του αριθμού των φυματίων δεν ήταν τυχαία αλλά οφείλονταν στα βακτήρια εμβολιασμού. Σύμφωνα με την εργασία του Kumar (2004) για να θεωρηθεί ένας εμβολιασμός επιτυχής θα πρέπει τα ριζόβια με τα οποία εμβολιάζονται τα φυτά να μπορούν να εγκαθίστανται στην ριζόσφαιρα και να ανταγωνίζονται με επιτυχία τα ενδογενή ριζόβια του φυτού τα οποία συχνά περιλαμβάνουν αναποτελεσματικά στελέχη. Αυτό πιθανώς συνέβη και με τα βακτήρια PVTN21 και *R. tropici*, τα οποία κατάφεραν να ανταγωνιστούν τα ενδογενή ριζόβια και να σχηματίσουν φυμάτια.

#### **2.4.3.3) Αξιολόγηση της ικανότητας προώθησης της ανάπτυξης του κουκιού μετά από εμβολιασμό του σπόρου με στελέχη *Rhizobium***

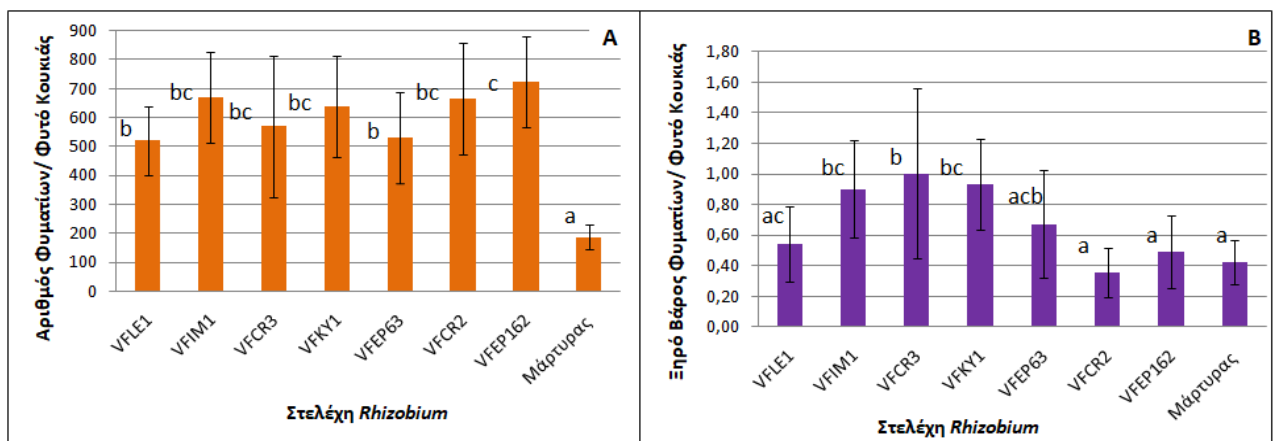
Στην παρούσα εργασία επτά απομονώσεις κουκιού γένους *Rhizobium* δοκιμάστηκαν για την αποτελεσματικότητά τους σε τοπική ποικιλία κουκιού από τη Τρίπολη. Μετά τη λήξη της πειραματικής διαδικασίας, το πρώτο πράγμα που διαπιστώθηκε ήταν η παρουσία φυματίων σε μη εμβολιασμένα φυτά κουκιού, ως αποτέλεσμα της δράσης των ριζοβίων που έφερε ο ίδιος ο σπόρος. Στη συνέχεια έγινε καταμέτρηση του αριθμού φυματίων και μέτρηση του βάρους των φυματίων ανά φυτό σε όλες τις μεταχειρίσεις, δηλαδή σε όλες τις περιπτώσεις. Επιπλέον μετρήθηκε η νωπή/ξηρή βιομάζα του συνόλου των φυματίων ανά φυτό, ανά μεταχείριση.

**Πίνακας 2.19:** Καταγραφή του αριθμού φυματίων ανά φυτό και της βιομάζας του συνόλου των φυματίων ανά φυτό (νωπό και ξηρό βάρος).

Στελέχη (Μεταχειρίσεις)	Α.Φ./Φυτό	Ν.Β. Φ. (g/Φυτό)	Ξ.Β. Φ (g/Φυτό)
VFLE1	521,04±118,85b	2,18±0,67a	0,54±0,11ac
VFIM1	668,50±157,43bc	3,20±1,09 a	0,90±0,32bc
VFCR3	569,57±244,83bc	3,43±1,80a	1,00±0,55b
VFKY1	638,50±173,58bc	3,18±0,53a	0,93±0,30bc
VFEP63	530,21±156,90b	2,48±1,29a	0,67±0,45acb
VFCR2	665,00±191,16bc	3,83±1,38a	0,35±0,16a
VFEP162	723,75±155,10c	3,49±1,32a	0,49±0,24a
Μάρτυρας	188,05±44,59a	2,31±0,89a	0,42±0,15a

Οι μέσες τιμές στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους σύμφωνα με το LSD ( $p \leq 0,05$ ). Α.Φ.: Αριθμός Φυματίων ανά φυτό, Ν.Β.Φ. (g): Νωπό Βάρος Φυματίων σε γραμμάρια ανά φυτό, Ξ.Β.Φ (g): Ξηρό Βάρος Φυματίων σε γραμμάρια ανά φυτό. Μάρτυρας: μη εμβολιασμένα φυτά. Ως «±» συμβολίζεται η τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή.

Σύμφωνα με τον Πίνακα 2.19 και την Εικόνα 2.17, όλα τα φυτά που εμβολιάστηκαν εμφάνισαν στατιστικά σημαντική αύξηση του αριθμού των ριζικών φυματίων (521,04-723,75) σε σχέση με τα μη εμβολιασμένα φυτά (188,05). Από τη στατιστική ανάλυση και με κριτήριο το  $p \leq 0,05$  έγινε εφικτή η κατάταξη των βακτηρίων με την εξής σειρά : VFEP162>VFCR2~VFKY1~VFIM1~VFCR3>VFLE1~VFEP63. Το νωπό και ξηρό βάρος των φυματίων εμβολιασμένων και μη εμβολιασμένων φυτών δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά, με εξαίρεση το ξηρό βάρος των φυματίων σε φυτά εμβολιασμένα με VFIM1, VFCR3 και VFKY1, το οποίο ήταν σχεδόν διπλάσιο σε σχέση με το μάρτυρα.



**Εικόνα 2.17:** Διάγραμμα παρουσίασης του συνολικού αριθμού φυματίων ανά φυτό (Α) και του ξηρού βάρους των φυματίων ανά φυτό (Β) ανά μεταχείριση. Η γραμμή σφάλματος υποδεικνύει την τυπική απόκλιση ( $\pm$ ) από τη μέση τιμή.

Εκτός από τον αριθμό των φυματίων εξετάστηκε επιπλέον και η επίδραση του εμβολιασμού στο υπόγειο (ρίζα) και υπέργειο (βλαστός) τμήμα των φυτών κουκιάς μετρώντας το μήκος και το νωπό-ξηρό βάρος των τμημάτων αυτών. Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν

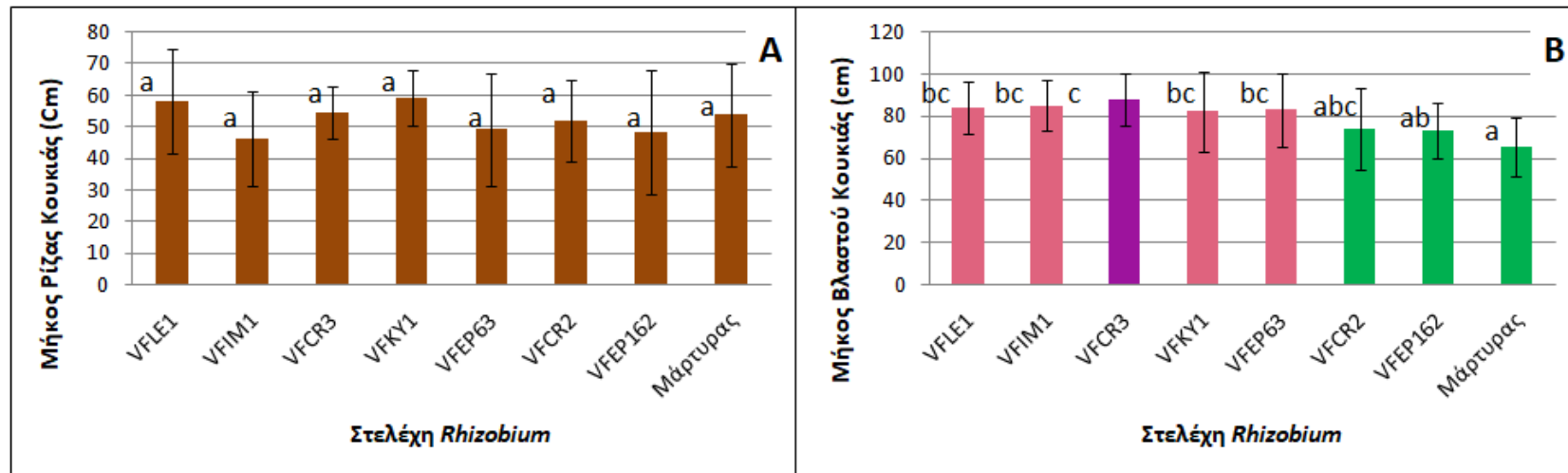
φαίνεται ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο μήκος ρίζας των φυτών που εμβολιάστηκαν με εκείνα που δεν εμβολιάστηκαν (μάρτυρας) με τα υπό μελέτη ριζόβια (**Πίνακας 2.20, Εικόνα 2.18**). Αντιθέτως, φάνηκε ότι ο εμβολιασμός ευνόησε την αύξηση του μήκους του βλαστού σε όλες τις περιπτώσεις σε σχέση με το μάρτυρα, με την αύξηση αυτή να μην είναι στατιστικά σημαντική σε όλες τις περιπτώσεις (**Πίνακας 2.20**). Για την ακρίβεια φυτά που εμβολιάστηκαν με τα VFLE1, VFIM1, VFCE3, VFKY1 και VFEP63 σημείωσαν στατιστικά σημαντική αύξηση του μήκους του βλαστού ( $p \leq 0,05$ ) το οποίο κυμάνθηκε από 82,34-87,89 cm σε σχέση με το μήκος μη εμβολιασμένων φυτών (65,63 cm). Μεταξύ των φυτών κουκιού που εμβολιάστηκαν με τα παραπάνω πέντε *Rhizobium*, το μεγαλύτερο μήκος βλαστού καταγράφηκε σε αυτά που είχε εφαρμοστεί το VFCE3 και στη συνέχεια με φθίνουσα σειρά τα VFIM1~VFLE1~VFKY1>VFEP63>VFCE2~VFEP162. Αξιολογώντας το μήκος ρίζας του φυτού ανά μεταχείριση, δε σημειώθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με το μάρτυρα. Αντίθετα, στατιστικά σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε στο ξηρό βάρος φυτών που είχαν εμβολιαστεί με VFLE1, VFIM1, VFCE3, VFKY1 και VFEP63 ( $p \leq 0,05$ ) σημειώνοντας αύξηση κατά 27,80%, 29,79%, 33,92%, 25,46% και 26,47 % σε σχέση με τα μη εμβολιασμένα φυτά.

Στη συνέχεια τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το καταγεγραμμένο νωπό και ξηρό βάρος ριζών ανά μεταχείριση δεν ήταν στατιστικά σημαντικό (**Πίνακας 2.20**). Κάτι αντίστοιχο παρατηρήθηκε για το νωπό βάρος του βλαστού των περισσότερων μεταχειρίσεων με τη διαφορά ότι φυτά εμβολιασμένα με το VFLE1 είχαν σχεδόν διπλάσια νωπή βιομάζα σε σχέση με το μάρτυρα ( $p \leq 0,05$ ). Ως προς το ξηρό βάρος του βλαστού, όλα τα φυτά που είχαν εμβολιαστεί εμφάνισαν στατιστικά σημαντική αύξηση (47,57 -200,45g) έναντι του μάρτυρα (27,87g), με εξαίρεση τη μεταχείριση με το VFEP162.

**Πίνακας 2.20:** Καταγραφή του μήκους του υπόγειου και υπέργειου τμήματος ανά φυτό, της αντίστοιχης νωπής και ξηρής βιομάζας και της βιολογικής αποτελεσματικότητας.

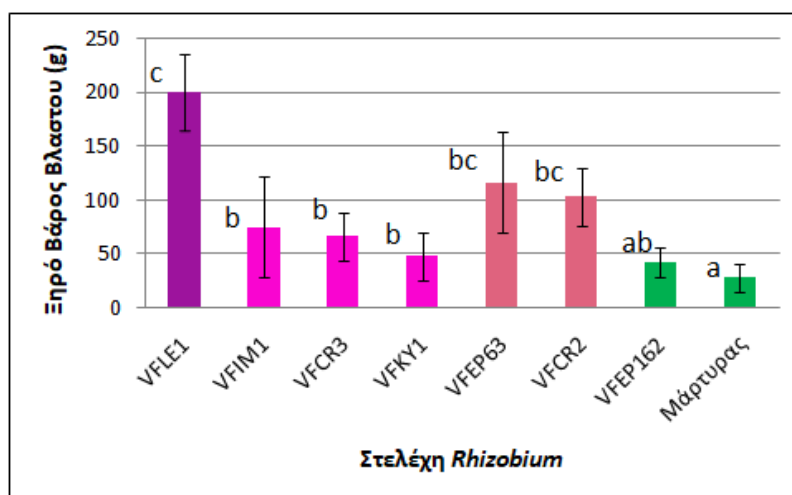
Στελέχη	Ρίζα/Φυτό			Βλαστός/Φυτό			Συμβιωτική αποτελεσματικότητα, SE (%)
	Μήκος (cm)	N.B. (g)	Ξ.Β. (g)	Μήκος (cm)	N.B. (g)	Ξ.Β. (g)	
VFLE1	58,25±16,44a	99,69±15,36a	9,56±1,44a	83,875±12,19bc	400,89±70,64b	200,45±35,32c	737,62
VFIM1	46,36±14,88a	66,05±16,75a	8,52±1,85a	85,18±12,29bc	238,40±106,87ab	74,73±46,87b	292,40
VF3R3	54,67±8,32a	76,33±25,07a	9,30±3,90a	87,89±12,44c	231,05±76,58ab	66,43±22,22b	265,99
VFKY1	59,17±8,61a	88,03±6,83a	9,08±2,32a	82,339±18,93bc	339,63±119,38ab	47,57±22,03b	198,97
VFEP63	49,2±17,86a	101,44±33,13a	10,09±3,67a	83±17,3bc	326,24±100,59ab	116,35±46,91bc	444,09
VF3R2	51,86±12,77a	93,26±43,63a	7,57±4,56a	74±19,74abc	278,57±83,65ab	102,96±27,44bc	388,22
VFEP162	48,4±19,73a	99,87±50,042a	11,17±7,00a	73,4±13,11ab	212,06±164,63ab	42,24±14,37ab	187,58
Μάρτυρας	53,75±16,48a	67,49±30,20a	5,35±1,23a	65,63±13,82a	192,58±50,87a	27,87±12,81a	100,00

Οι μέσες τιμές στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους σύμφωνα με το Kruskal-Wallis ( $p \leq 0,05$ ). N.B. (g): Νωπό Βάρος σε γραμμάρια, Ξ.Β. (g): Ξηρό Βάρος σε γραμμάρια, SE = Symbiotic Efficiency (%): (Συνολικό ξηρό βάρος εμβολιασμένου φυτού/ Συνολικό ξηρό βάρος μη-εμβολιασμένου φυτού) x 100. Ως «±» συμβολίζεται η τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή.



**Εικόνα 2.18:** Διάγραμμα παρουσίασης του μήκους της ρίζας (A), του βλαστού (B) ανά μεταχείριση. Η γραμμή σφάλματος υποδεικνύει την τυπική απόκλιση ( $\pm$ ) από τη μέση τιμή.

Τέλος εκτιμήθηκε η συμβιωτική αποτελεσματικότητα των αντιπροσωπευτικών απομονώσεων που χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό του κουκιού. Σε όλες τις περιπτώσεις εμβολιασμού το SE ήταν πάνω από το 100% του μάρτυρα. Το VFLE1 είχε τη μεγαλύτερη τιμή SE (737,62%) με αμέσως επόμενα τα VFEP63 και VFCR2 με 444,09% και 388,22%, αντίστοιχα (Εικόνα 2.19).



**Εικόνα 2.19:** Διάγραμμα παρουσίασης ξηρού βάρους βλαστού ανά μεταχείριση. Η γραμμή σφάλματος υποδεικνύει την τυπική απόκλιση ( $\pm$ ) από τη μέση τιμή.

Με βάση τα αγρονομικά χαρακτηριστικά που σημειώθηκαν διαπιστώθηκε αρχικά ότι η τοπική ποικιλία Τριπόλεως είναι επιδεκτική σε γεωργικές πρακτικές βιολογικής γεωργίας. Αν και οι συνθήκες διεξαγωγής του πειράματος διέφεραν από εκείνες των Ntatsi et al. (2018), αξίζει να σημειωθεί ότι η ποικιλία που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία σημείωσε μεγαλύτερο μήκος (119,38cm) σε σχέση με τις ποικιλίες που χρησιμοποιήθηκαν και κυρίως με αυτή της Λευκάδας, η οποία σημείωσε ύψος φυτού (74,4cm). Το γεγονός ότι στην παρούσα εργασία, ο εμβολιασμός του κουκιού ενίσχυσε το σχηματισμό φυματίων και στις περισσότερες περιπτώσεις επηρέασε το μήκος βλαστού είναι σημαντικό. Στο παρελθόν η χρήση συστημάτων βιολογικής και συμβατικής γεωργίας δεν έδειξε ότι επηρεάζει σημαντικά τα αγρονομικά στοιχεία που αφορούν το ξηρό βάρος της ρίζας και του μήκους άλλων ελληνικών ποικιλιών κουκιού (Ntatsi et al., 2018) σε αντίθεση με την ποικιλία Τριπόλεως που είναι επιδεκτική σε αυτού του είδους τη γεωργική πρακτική (εμβολιασμός-βιολίπανση). Επίσης η βελτίωση της ικανότητας φυματιογένεσης στο κουκί είναι κάτι που συναντάται και έχει συσχετιστεί με την εφαρμογή συστημάτων βιολογικής γεωργίας (Yfantopoulos et al., 2022), αλλά και με την ανταγωνιστικότητα των ριζοβίων εμβολιασμού σε σχέση με τα υπάρχοντα γηγενή στελέχη ριζόβιων (Habtemichial et al., 2007; El-Khateeb et al., 2012; Yohannes et al., 2015 Woldekiros et al., 2018; Gedamu et al., 2021; Kebede & Lele, 2022; Alemayehu & Dechassa, 2022).

Φυτά εμβολιασμένα με το VFLE1 είχαν το μεγαλύτερο ξηρό βάρος βλαστού, τη μεγαλύτερη συμβιωτική αποτελεσματικότητα, αλλά όχι τη μεγαλύτερη ξηρή βιομάζα φυματίων. Στο σημείο αυτό αξίζει να επισημανθεί ότι το VFLE1 έχει χρησιμοποιηθεί προηγουμένως από τους Karavidas et al. (2020) ως βακτήριο εμβολιασμού στην ποικιλία κουκιού Λευκάδας, με τα εμβολιασμένα φυτά να παρουσιάζουν σημαντική αύξηση στη βιομάζα τους και στη συνολική ποσότητα βιολογικά καθηλωμένου N<sub>2</sub> ανά μονάδα καλλιεργούμενης έκτασης. Η διαφορετική δράση της νιτρογενάσης των φυματίων θα μπορούσε να εξηγήσει γιατί η καθήλωση του αζώτου δεν συσχετίζεται πάντα θετικά με τη φυματιογένεση. Έχει παρατηρηθεί ότι η φυματιογένεση μπορεί να είναι χαμηλή αλλά τα επίπεδα της νιτρογενάσης να είναι υψηλά οδηγώντας σε υψηλή δέσμευση αζώτου (Yang et al., 2017; Boughribil et al., 2018). Η παρατήρηση αυτή θα μπορούσε ίσως να ερμηνεύσει γιατί το μήκος του βλαστού και το συνολικό ύψος των φυτών που είχαν εμβολιαστεί με τα VFLE1, VFIM1, VFCE3, VFKY1 ήταν μεγαλύτερα από εκείνα που είχε εφαρμοστεί το VFEP162, παρόλο που φυτά εμβολιασμένα με το τελευταίο σημείωσαν το μεγαλύτερο αριθμό φυματίων μεταξύ των άλλων μεταχειρίσεων.

Η αλληλεπίδραση ριζοβίου και ποικιλίας επηρεάζει τόσο την απόδοση του κουκιού (Allito et al., 2021), όσο και το ξηρό βάρος των φυματίων (Solomon et al., 2012) επιφέροντας αύξηση του βάρους των φυματίων (Argaw & Mnalku, 2017; Pereira et al., 2019; Birhanu, 2021; Alemayehu & Dechassa, 2022). Αυτό παρατηρήθηκε και στην παρούσα εργασία αλλά όχι σε όλα τα φυτά πιθανόν λόγω της διαφορετικής επίδρασης του εμβολιαστικού στελέχους. Για την αξιολόγηση του εμβολιαστικού στελέχους (Graham et al., 2004), η αύξηση του ξηρού βάρους των φυματίων έχει συσχετιστεί με τη συμβιωτική αποτελεσματικότητα (Voisin et al., 2003), όπως επίσης και η βελτίωση της ικανότητας πρόσληψης αζώτου στο κουκί με την αύξηση του ξηρού βάρους φυματίων λόγω εμβολιασμού με ριζόβια (Habtemichial et al., 2007; El-Khateeb et al., 2012; Yohannes et al., 2015; Woldekiros et al., 2018; Gedamu et al., 2021; Kebede & Lele, 2022; Alemayehu & Dechassa, 2022). Τόσο η φυματιογένεση όσο και η πρόσληψη του αζώτου έχουν προταθεί ως δείκτες για τη διερεύνηση της δυνατότητας δέσμευσης αζώτου από ριζοβιακά στελέχη (Patra et al., 2012).

### **2.3.4) ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΗΓΕΝΩΝ ΡΙΖΟΒΙΩΝ ΑΠΟ ΦΥΜΑΤΙΑ ΦΤΕΡΩΤΟΥ ΜΠΙΖΕΛΙΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΑ ΑΠΟ ΤΗ ΚΡΗΤΗ**

#### **2.3.4.1) Απομόνωση και μορφοφυσιολογικός χαρακτηρισμός ριζοβίων από φυτά φτερωτού μπιζελιού**

Στην παρούσα διατριβή από ριζικά φυμάτια φτερωτού μπιζελιού (*Tetragonolobus purpureus*), απομονώθηκαν 13 ριζόβια εφαρμόζοντας συνδυαστικά μικροβιολογικές και



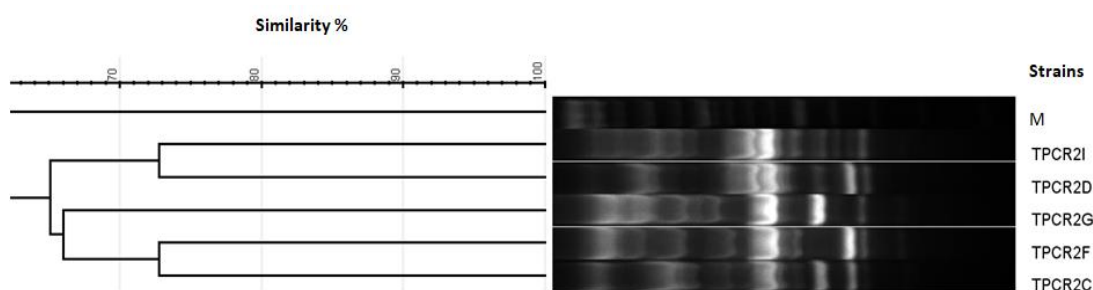
μοριακές τεχνικές. Η ονοματοδοσία τους βασίστηκε σε δυο συνθετικά μέρη. Το πρώτο αναφέρεται στον ξενιστή απομόνωσης και το δεύτερο στην περιοχή απομόνωσης (**Πίνακας 2.21**). Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για τη διάκριση των ριζοβίων από μη ριζοβιακά ενδοφυτικά βακτήρια ήταν ίδια με εκείνη που έχει περιγραφεί και τα αποτελέσματα ήταν ίδια και ως προς την ικανότητα ανάπτυξης και ως προς την παραγωγή βλέννας, στα διάφορα θρεπτικά. Σε όλες τις απομονώσεις ήταν επιτυχής η ενίσχυση του γονιδίου *nodC*, επιτρέποντας έτσι την περαιτέρω ανάλυση τους για τη μελέτη της γενετικής τους ετερογένειας καθώς και της φυλογενετικής τους κατάταξης μέσω του προσδιορισμού γένους-είδους-συμβιότυπου.

<b>Πίνακας 2.21:</b> Απομόνωση ριζοβίων από φυμάτια φτερωτού μπιζελιού.			
Ψυχανθές φυτό	Περιοχές απομόνωσης φυματίων	Υποψήφια ριζόβια	Κωδική Ονοματοδοσία
<i>Tetragonolobus purpureus</i>	Ηράκλειο (CRETE)	13	TPCR
Συνολικά		13	

Παρόλο που το φτερωτό μπιζέλι είναι κατεξοχήν μεσογειακό φυτό και θα μπορούσε να αποτελέσει αντικείμενο μελέτης για πολλές μεσογειακές χώρες, δεν έχει μελετηθεί στο βαθμό που έχουν μελετηθεί άλλα καλλιεργήσιμα και αυτοφυή ψυχανθή. Πρώτοι οι Muresu et al. (2008) έκαναν δειγματοληψία φυματίων φτερωτού μπιζελιού, αδυνατώντας όμως να απομονώσουν βακτήρια για αυτό και έκαναν ενίσχυση του 16S rRNA απευθείας στο περιεχόμενο του φυματίου για την ταυτοποίηση των βακτηρίων σε επίπεδο γένους. Αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής ήταν η ανάδειξη των φυλογενετικών ομάδων των μικροσυμβιωτών *Enterobacter* spp., *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp. και *Mesorhizobium* spp.

#### 2.3.4.2) Μελέτη γενετικής ετερογένειας ριζοβίων φτερωτού μπιζελιού

Οι 13 απομονώσεις του φτερωτού μπιζελιού ομαδοποιήθηκαν σε 5 κλάδους. Στην **Εικόνα 2.20** παρουσιάζεται το πρότυπο ζώνωσης του γονιδιωματικού αποτυπώματος των 5 αντιπροσωπευτικών απομονώσεων (TPCR2C, TPCR2D, TPCR2F, TPCR2G, TPCR2I), όπως αυτό προέκυψε μέσω BOX-PCR, τα οποία και επιλέχθηκαν για περαιτέρω φυλογενετική ανάλυση.



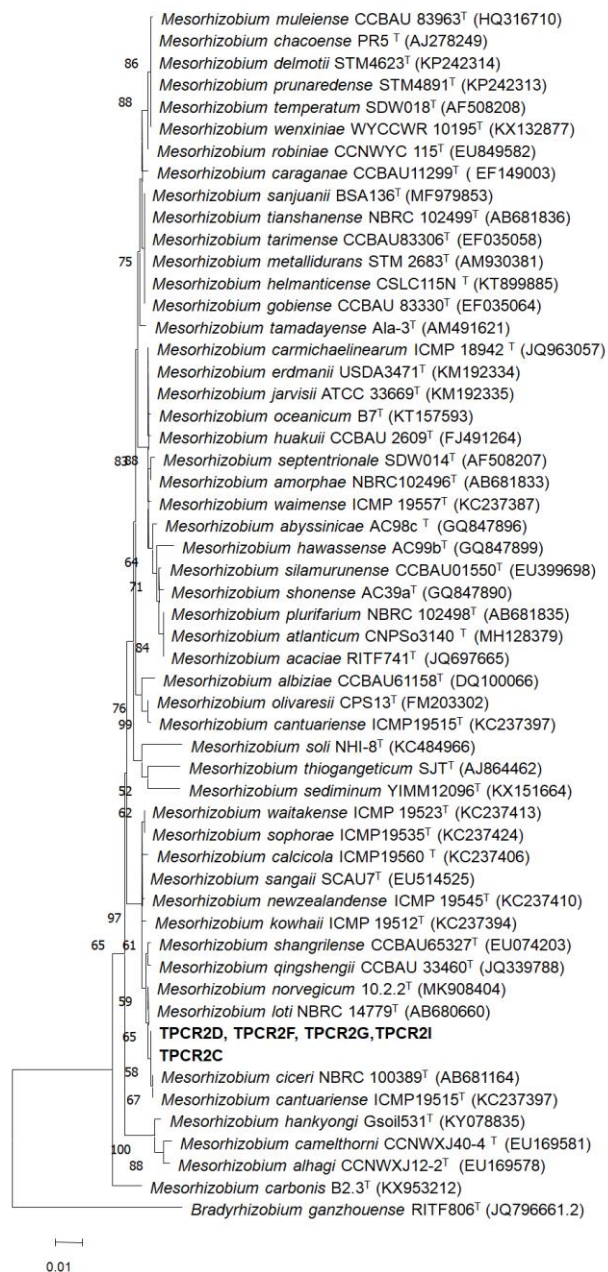
**Εικόνα 2.20:** Πρότυπο ζώνων γονιδιωματικού αποτυπώματος BOX-PCR σε 5 αντιπροσωπευτικές ριζοβιακές απομονώσεις από φυμάτια φτερωτού μπιζελιού. Στην κορυφή συμπεριλήφθηκε επίσης ένας μοριακός δείκτης 1 kb DNA Ladder (Invitrogen) (M). Η ανάλυση ανά συστάδα-ομάδα (Cluster analysis)

πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα GelI v2.0 χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο UPGMA, το συντελεστή Dice και επίπεδο ανοχής 1,0%.

### **2.3.4.3) Μοριακός χαρακτηρισμός ριζοβίων φτερωτού μπιζελιού σε επίπεδο είδους και συμβίotypου**

Για την ταξινόμηση των 5 αυτών αντιπροσωπευτικών ριζοβίων σε επίπεδο γένους, η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν ίδια με εκείνη των προηγούμενων υποενοτήτων. Σχεδόν πλήρους μήκους αλληλουχίες του γονιδίου *rrs* ορίστηκαν για όλα τα αντιπροσωπευτικά στελέχη και μια περιοχή μήκους 1275 bp χρησιμοποιήθηκε για τη στοίχιση των αντιπροσωπευτικών και πρότυπων στελεχών, για την κατασκευή φυλογενετικού δέντρου. Το δέντρο που προέκυψε έδειξε ότι όλες οι απομονώσεις σχετίζονται στενά με καθορισμένα είδη του γένους *Mesorhizobium* (**Εικόνα 2.21**) και στη συνέχεια υπολογίστηκε το ποσοστό ομοιότητας (%) μεταξύ των 5 απομονώσεων και των φυλογενετικά πλησιέστερων πρότυπων στελεχών χρησιμοποιώντας το on-line βιοπληροφορικό εργαλείο CLUSTAL Omega.

Σύμφωνα με το φυλογενετικό δέντρο της **Εικόνας 2.21** και του **Πίνακα 2.22** και τα πέντε στελέχη έδειξαν ότι συγκροτούν μια καλά καθορισμένη ομάδα. Τα στελέχη TPCR2D, TPCR2F, TPCR2G, TPCR2I εμφάνισαν πανομοιότυπες αλληλουχίες *rrs* και καταχωρήθηκαν στο *Mesorhizobium ciceri* NBRC 100389<sup>T</sup> με ποσοστό ομοιότητας αλληλουχίας 99,92%. Στο ίδιο πρότυπο στέλεχος ανήκει και η απομόνωση TPCR2C της οποίας η αλληλουχία *rrs*, ήταν όμοια με το *Mesorhizobium ciceri* NBRC 100389<sup>T</sup> και με τις υπόλοιπες απομονώσεις κατά 99,75% και 99,83%, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, ενισχύθηκε το ιδιοσυστατικό γονίδιο *recA* το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την περιγραφή ειδών *Mesorhizobium* (Vinueza et al., 2005; Zhang et al., 2014; Zhang et al., 2017; León-Barrios et al., 2021). Από τη GenBank αντλήθηκαν αλληλουχίες γονιδίων από πρότυπα στελέχη του γένους *Mesorhizobium* οι οποίες επεξεργάστηκαν κατάλληλα. Το μήκος των ευθυγραμμικά στοιχισμένων αλληλουχιών που προέκυψε ήταν 316 bp. Το φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε, το ποσοστό ομοιότητας της αλληλουχίας *recA* όπως αυτό υπολογίστηκε από το CLUSTAL Omega και οι επεξεργασμένες αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται στο Πρόσθετο Υλικό (**Εικόνα Σ2.7, Πίνακας Σ2.12 και Σ2.13**). Το αποτέλεσμα της ανάλυσης της αλληλουχίας του γονιδίου αυτού έδειξε ότι όντως οι πέντε αυτές απομονώσεις φτιάχνουν μια ομάδα, με τις αλληλουχίες *recA* των TPCR2G και TPCR2D να είναι μεταξύ τους ίδιες 100% και όμοιες με το *Mesorhizobium ciceri* NBRC 100389<sup>T</sup> κατά 96,84%. Στο *Mesorhizobium ciceri* NBRC 100389<sup>T</sup> ανήκουν και οι υπόλοιπες τρεις απομονώσεις με ποσοστό ομοιότητας 96,84%, 97,15% και 96,84% για τα TPCR2I, TPCR2F και TPCR2C, αντίστοιχα. Καθώς σε όλες τις περιπτώσεις το ποσοστό ομοιότητας των αλληλουχιών *rrs* και *recA* ήταν μεγαλύτερο από 95%, θεωρήθηκε ότι όλες οι ριζοβιακές απομονώσεις που μελετήθηκαν από το φτερωτό μπιζέλι ανήκουν στο *Mesorhizobium ciceri* NBRC 100389<sup>T</sup>.



**Εικόνα 2.21:** Neighbor-joining (NJ) φυλογενετικό δέντρο βασισμένο σε σχεδόν ολόκληρη αλληλουχία του γονιδίου 16S rRNA (1275 bp) δείχνει τις ταξινομικές σχέσεις 5 αντιπροσωπευτικών στελεχών από 5 διαφορετικές BOX ομάδες. Οι απομονώσεις της παρούσας εργασίας σημάνθηκαν με έντονη γραφή και τα πρότυπα στελέχη επισημάνθηκαν με τον εκθέτη “T”. Οι κωδικοί εισαγωγής GenBank των αλληλουχιών *rrs* δηλώθηκαν εντός παρένθεσης. Οι τιμές bootstrap (πάνω από 50%) υπολογίσθηκαν για 500 επαναλήψεις και απεικονίζονται στους κόμβους. Η γραμμή κλίμακας δείχνει τον αριθμό των νουκλεοτιδίων υποκαταστάσεων ανά τοποθεσία. Η φυλογενετική ανάλυση διεξήχθη στο MEGA X και το *Bradyrhizobium ganzhouense* RITF806<sup>T</sup>, χρησιμοποιήθηκε ως στέλεχος εκτός ομάδας.

**Πίνακας 2.23:** Ποσοστά ομοιότητας νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του γονιδίου 16S rRNA μεταξύ επιλεγμένων στελεχών *Mesorhizobium*. Τα πλησιέστερα πρότυπα στελέχη εμφανίζονται με έντονη γραφή.

Στελέχη	Ποσοστά ομοιότητας αλληλουχίας <i>rrs</i> (%)													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 TPCR2G,TPCR2,TPCR2D,TPCR2I	100	99,83	99,58	99,58	99,58	99,67	99,75	99,92	99,75	99,92	99,5	<b>99,92</b>	98,75	99,42
2 TPCR2C		100	99,41	99,41	99,41	99,5	99,58	99,75	99,58	99,75	99,33	<b>99,75</b>	98,58	99,25
3 <i>Mesorhizobium waitakense</i> ICMP 19523T (KC237413)			100	100	99,42	99,92	99,5	99,67	99,83	99,67	99,67	99,58	98,5	99,75
4 <i>Mesorhizobium sophorae</i> ICMP19535T (KC237424)				100	99,42	99,92	99,5	99,67	99,83	99,67	99,67	99,58	98,5	99,75
5 <i>Mesorhizobium shangrilense</i> CCBAU65327T (EU074203)					100	99,42	99,83	99,67	99,5	99,67	99,42	99,67	98,83	99,33
6 <i>Mesorhizobiumsangaii</i> SCAU7T (EU514525)						100	99,58	99,75	99,92	99,75	99,67	99,58	98,58	99,75
7 <i>Mesorhizobium qingshengii</i> CCBAU 33460T JQ339788							100	99,83	99,67	99,83	99,42	99,67	99	99,33
8 <i>Mesorhizobium norvegicum</i> 10.2.2T (MK908404)								100	99,83	100	99,58	99,83	98,83	99,5
9 <i>Mesorhizobium newzealandense</i> ICMP 19545T (KC237410)									100	99,83	99,75	99,67	98,66	99,67
10 <i>Mesorhizobium loti</i> NBRC 14779T (AB680660)										100	99,58	99,83	98,83	99,5
11 <i>Mesorhizobium kowhaii</i> ICMP 19512T (KC237394)											100	99,58	98,41	99,58
12 <i>Mesorhizobium ciceri</i> NBRC 100389T (AB681164)												100	98,66	99,5
13 <i>Mesorhizobium cantuariense</i> ICMP19515 T (KC237397)													100	98,33
14 <i>Mesorhizobium calcicola</i> ICMP19560 T (KC237406)														100
	Ποσοστά ομοιότητας αλληλουχίας <i>rrs</i> (%)													

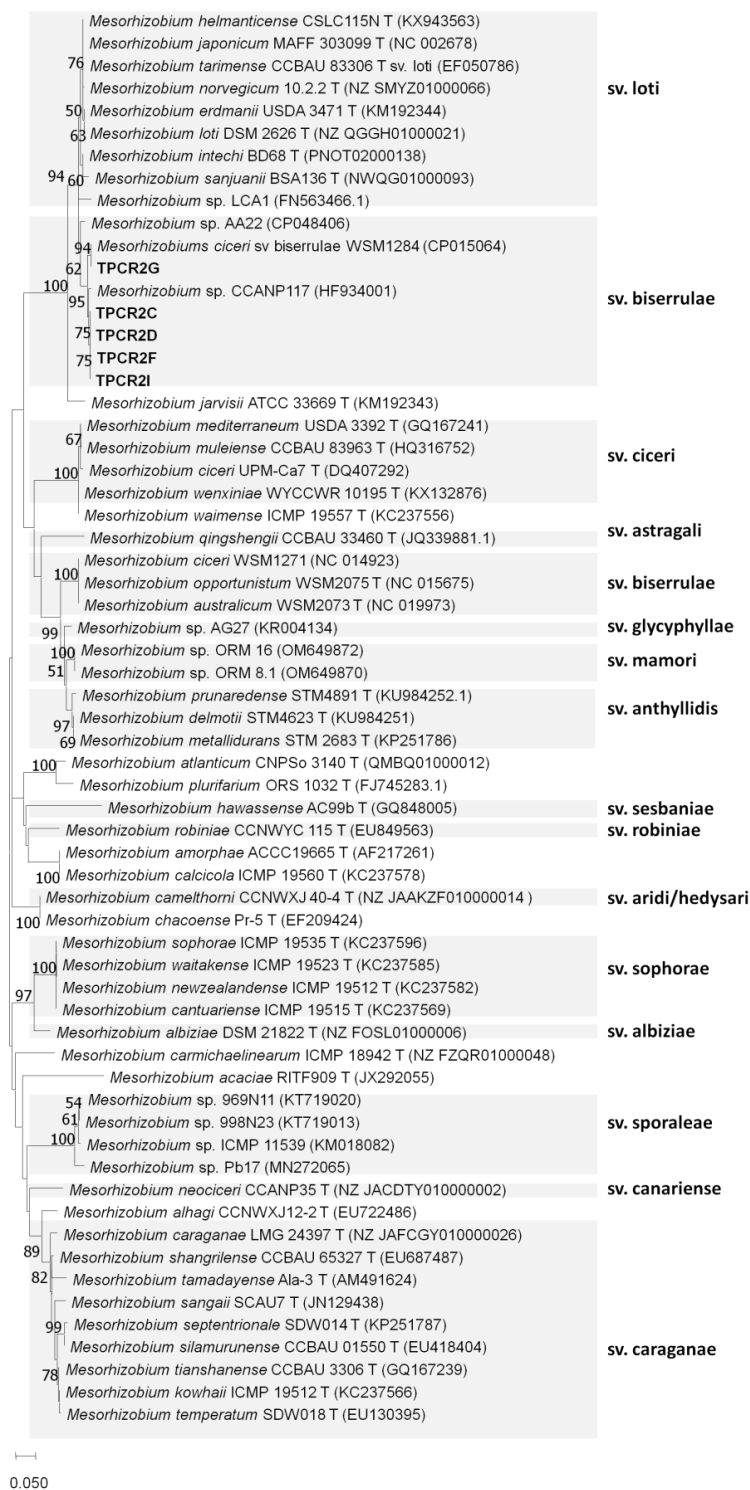
Η απομόνωση βακτηρίων γένους *Mesorhizobium* δεν προκάλεσε έκπληξη δεδομένου ότι σε φυμάτια φτερωτού μπιζελιού έχει ανιχνευτεί ξανά η παρουσία *Mesorhizobium loti* (Muresu et al., 2008) χρησιμοποιώντας όμως τεχνικές που δε στηρίζονται στις κλασικές μικροβιολογικές (μη καλλιεργητικές). Για τον προσδιορισμό του συμβιότυπου των 5 αντιπροσωπευτικών απομονώσεων χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *nodC*. Μέχρι στιγμής σε τουλάχιστον 58 στελέχη (συμπεριλαμβανομένων πρότυπων και μη πρότυπων στελεχών) έχουν καταγραφεί 15 συμβιότυποι οι οποίοι είναι: ο *loti*, ο *ciceri*, ο *astragali*, ο *biserrulae*, ο *glycyphyllae*, ο *anthyllidis*, ο *aridi/hedysari*, ο *robiniae*, ο *sesbaniae*, ο *sporaleae*, ο *sophorae*, ο *albisiae*, ο *canariense*, ο *caraganae* και ο *maamori* (León-Barrios et al., 2021; Laadraoui et al., 2023). Στην παρούσα εργασία αναλύθηκε τμήμα της αλληλουχίας *nodC* μήκους 306bp από τις πέντε απομονώσεις και από πρότυπα και μη πρότυπα στελέχη του γένους *Mesorhizobium*, οι οποίες αντλήθηκαν από την Genbank. Στο δέντρο που κατασκευάστηκε, οι απομονώσεις τοποθετήθηκαν στην ομάδα που αντιστοιχεί στο συμβιότυπο *biserrulae*, μαζί με τα στελέχη *Mesorhizobium* sp. CCANP117, *Mesorhizobium* sp. AA22 και κυρίως με το *Mesorhizobium ciceri* sv. *biserrulae* WSM1284, που απομονώθηκε από φυμάτια *Biserrula pelecinus* (Nandasena et al., 2007). Το στέλεχος WSM1284 είναι αποτελεσματικός μικροσυμβιώτης του ξενιστή απομόνωσης, με ικανότητα σχηματισμού φυματίων σε μεγάλο εύρος ξενιστών, όπως σε είδη *Astragalus*, *Dorycnium*, *Glycyrrhiza*, *Leucaena*, *Lotus* και *Ornithopus* (Nandasena et al., 2001; Nandasena et al., 2004; Howieson et al., 2011), αλλά όχι στο *Cicer arietinum* (ρεβίθι).

Αξίζει να συζητηθεί το γεγονός πως άλλα στελέχη του ίδιου είδους με τις ελληνικές απομονώσεις φέρουν κυρίως το συμβιότυπο *ciceri* και *biserrulae*, όπως το *Mesorhizobium ciceri* UPM-Ca7<sup>T</sup> και *Mesorhizobium ciceri* WSM1271, αντίστοιχα (**Εικόνα 2.22**). Το στέλεχος WSM1271 (Nandasena et al., 2014) μαζί με το WSM1497 (Nandasena et al., 2004), αποτελούν απομονώσεις του ψυχανθούς φυτού *Biserrula pelecinus* και είναι αποκλειστικοί συμβιώτες του σε αντίθεση με το στέλεχος WSM1284. Το *Mesorhizobium ciceri* UPM-Ca7<sup>T</sup> (León-Barrios et al., 2021) είναι ο κύριος εκπρόσωπος της ομάδας sv. *ciceri*, αν και στην ομάδα του sv. *loti* έχει αναφερθεί προηγουμένως από τους Donate-Correa, et al. (2010), ο εντοπισμός στελέχους *Mesorhizobium ciceri* sv. *loti* απομονωμένο από *Lotus spp.* με αποτελεσματική δράση συμβιώτη σε πολλά είδη *Lotus*.

Στην παρούσα μελέτη, ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι στελέχη με sv. *biserrulae* δεν ομαδοποιούνται όλα μαζί σε έναν καλά συγκροτημένο κλάδο, αλλά εντοπίζονται σε δύο ξεχωριστούς και διακριτούς κλάδους φυλογενετικά μακριά ο ένας από τον άλλο (**Εικόνα 2.22**). Οι υπό μελέτη απομονώσεις σε σχέση με τα άλλα τρία στελέχη (WSM1284, CCANP117 και AA22) του κλάδου τους παρουσιάζουν ποσοστό ομοιότητας αλληλουχίας *nodC* που κυμάνθηκε από 96,73- 99,02%. Αντίθετα το ποσοστό ομοιότητας της αλληλουχίας *nodC* των ελληνικών

απομονώσεων σε σχέση με τις απομονώσεις που ανήκουν στην άλλη ομάδα του sv. biserrulae (*Mesorhizobium opportunistum* WSM2075<sup>T</sup>, *Mesorhizobium ciceri* WSM1271, *Mesorhizobium australicum* WSM2073<sup>T</sup>) είναι 79,41%, (Πίνακας Σ2.13). Από όλα τα παραπάνω, η κατάταξη των ριζοβιακών απομονώσεων από το φτερωτό φασόλι στο sv. biserrulae δεν είναι ξεκάθαρη και θα έπρεπε να γίνει περαιτέρω ανάλυση με βάση άλλα συμβιωτικά γονίδια όπως το *nifH* καθώς και δοκιμασία επιβεβαίωσης ταυτότητας (nodulation test) τόσο στον ξενιστή απομόνωσης τους, όσο και σε ψυχανθή που τα WSM1284, AA22 και CCANP117 σχηματίζουν φυμάτια, με το τελευταίο να έχει απομονωθεί από φυμάτια του *Cicer canariense*.

Στον Πίνακα 2.23 γίνεται σύντομη παρουσίαση των αντιπροσωπευτικών ανά ομάδα BOX-PCR στελεχών και προσδιορισμός του είδους στον οποίο ανήκουν καθώς και του συμβιώτου που φέρουν με βάση τα φυλογενετικά πλησιέστερα πρότυπα στελέχη.



**Εικόνα 2.22:** Neighbor-joining (NJ) φυλογενετικό δέντρο βασισμένο σε τμήμα αλληλουχίας του γονιδίου *nodC* μήκους 306 bp δείχνει τις ταξινομικές σχέσεις των υπό μελέτη στελεχών σε σχέση με άλλα στελέχη *Mesorhizobium*. Οι απομονώσεις της παρούσας εργασίας σημάνθηκαν με έντονη γραφή και τα πρότυπα στελέχη επισημάνθηκαν με εκθέτη "T". Οι κωδικοί εισαγωγής GenBank των αλληλουχιών *rrs* δηλώθηκαν εντός παρένθεσης. Οι τιμές bootstrap (πάνω από 50%) υπολογίσθηκαν για 500 επαναλήψεις και απεικονίζονται στους κόμβους. Η γραμμή κλίμακας δείχνει τον αριθμό των νουκλεοτιδίων υποκαταστάσεων ανά τοποθεσία. Η φυλογενετική ανάλυση διεξήχθη στο MEGA X.

**Πίνακας 2.23:** Μοριακός προσδιορισμός είδους και συμβιώτου των υπό μελέτη ριζοβίων φτερωτού μπιζελιού από τη Κρήτη με βάση το πλησιέστερο συγγενικό πρότυπο στέλεχος.

Συγγενικό είδος (ταυτοποίηση αλληλουχίας, %)					
Βακτήρια	Αριθμός Απομονώσεων ανά διαφορετικό BOX πρότυπο	16S	<i>recA</i>	<i>nodC</i>	Συμβίωτος (sv.)
TPCR2C	1	<i>Mesorhizobium ciceri</i> NBRC 100389 <sup>T</sup> (99,75%)	<i>Mesorhizobium ciceri</i> NBRC 100389 <sup>T</sup> (96,84%)	<i>Mesorhizobium</i> sp.CCANP117 (99,02%)	biserrulae
TPCR2D	3	<i>Mesorhizobium ciceri</i> NBRC 100389 <sup>T</sup> (99,92%)	<i>Mesorhizobium ciceri</i> NBRC 100389 <sup>T</sup> (96,84%)	<i>Mesorhizobium ciceri</i> WSM128(100%)	biserrulae
TPCR2F	5	<i>Mesorhizobium ciceri</i> NBRC 100389 <sup>T</sup> (99,92%)	<i>Mesorhizobium ciceri</i> NBRC 100389 <sup>T</sup> (97,15%)	<i>Mesorhizobium</i> sp.CCANP117 (98,69)	biserrulae
TPCR2G	2	<i>Mesorhizobium ciceri</i> NBRC 100389 <sup>T</sup> (99,92%)	<i>Mesorhizobium ciceri</i> NBRC 100389 <sup>T</sup> (96,84%)	<i>Mesorhizobium</i> sp.CCANP117 (99,02%)	biserrulae
TPCR2I	2	<i>Mesorhizobium ciceri</i> NBRC 100389 <sup>T</sup> (99,92%)	<i>Mesorhizobium ciceri</i> NBRC 100389 <sup>T</sup> (96,84%)	<i>Mesorhizobium</i> sp.CCANP117 (99,02%)	biserrulae



## 2.3.5) ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΓΗΓΕΝΩΝ ΕΝΔΟΦΥΤΙΚΩΝ ΡΙΖΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΦΥΜΑΤΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΩΝ ΚΑΙ ΑΓΡΙΩΝ ΨΥΧΑΝΘΩΝ

### 2.3.5.1) Ενδοφυτικά ριζοβακτήρια κουκιού

Από φυμάτια κουκιάς απομονώθηκαν 20 βακτήρια, η ταυτοποίηση των οποίων έγινε με βάση την αλληλούχιση ιδιοσυστατικών γονιδίων και την ανάλυση ομοιότητας των αλληλουχιών του φυλογενετικά πρότυπου ή και μη πρότυπου στελέχους, όπως αυτές είναι διαθέσιμες στη βάση δεδομένων GenBank της βάσης δεδομένων, NCBI. Με αυτόν τον τρόπο οι 18 απομονώσεις κουκιού προσδιορίστηκαν ως *Bacillus* (1), *Enterobacter* (1), *Ochrobactrum sp* (1), *Shinella spp* (2) και ως *Pseudomonas spp* (15). Η περιοχή απομόνωσης, το μήκος της αλληλουχίας του γονιδίου που αλληλουχήθηκε και τα ποσοστά ομοιότητας που προέκυψαν παρουσιάζονται στο Πρόσθετο Υλικό (Πίνακες Σ2.14 και Σ2.16).

Πίνακας 2.24: Καταγραφή ενδοφυτικών απομονώσεων από φυμάτια κουκιού και ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους.	
Στέλεχος	Γένος
VFAT314	<i>Enterobacter</i>
VFFN21	<i>Bacillus</i>
VFFN#7	<i>Ochrobactrum</i>
VFAT9	<i>Shinella</i>
VFAT10	<i>Shinella</i>
VFPA11FF5	<i>Pseudomonas</i>
VFFN2A	<i>Pseudomonas</i>
VFFN4	<i>Pseudomonas</i>
VFFN9	<i>Pseudomonas</i>
VFCR2A8	<i>Pseudomonas</i>
VFCR2A16	<i>Pseudomonas</i>
VFCR2A18	<i>Pseudomonas</i>
VFCR2A21	<i>Pseudomonas</i>
VFCR2A9	<i>Pseudomonas</i>
VFCR2A1	<i>Pseudomonas</i>
VFCR2A26	<i>Pseudomonas</i>
VFCR2A20	<i>Pseudomonas</i>
VFFN24	<i>Pseudomonas</i>
VFFN30	<i>Pseudomonas</i>
VFFN31	<i>Pseudomonas</i>

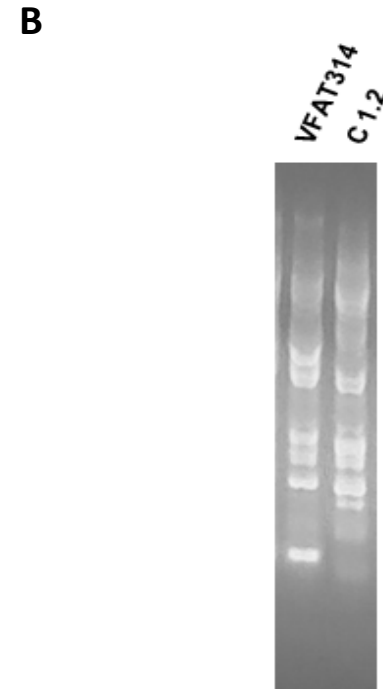
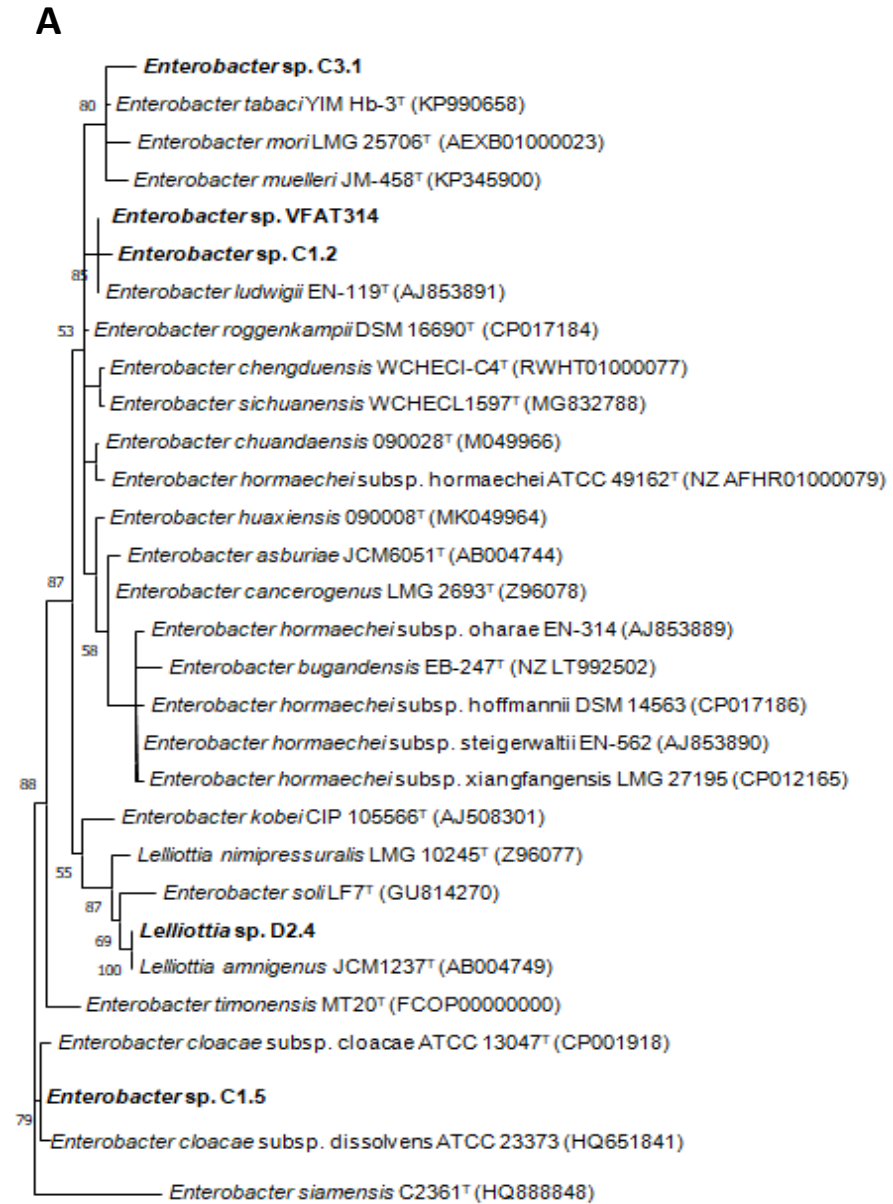
Από τις παραπάνω απομονώσεις επιλέχθηκαν τα VFAT314 και VFFN21 προς περαιτέρω μελέτη.

#### 2.3.5.1.1) *Enterobacter sp.* VFAT314

Το βακτηριακό στέλεχος VFAT314 απομονώθηκε από ώριμα φυμάτια κουκιού καλλιεργημένα στο πειραματικό αγρό του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και για την ταυτοποίηση του ενισχύθηκε το γονίδιο 16S rDNA. Χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο BLASTn

για την ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας που προέκυψε, η απομόνωση αυτή χαρακτηρίστηκε ως γ-πρωτεοβακτήριο γένους *Enterobacter* sp. Για την περαιτέρω επιβεβαίωση της ταυτότητας της απομόνωσης αυτής σε επίπεδο γένους και την ανάδειξη της ταξινομικής του θέσης σε σχέση με άλλα είδη του ίδιου γένους, κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο, χρησιμοποιώντας τμήμα της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rDNA, μήκους 1360 bp. Όμοια με πριν, η ανάλυση των αλληλουχιών έγινε μέσω του λογισμικού MEGA X, αντλώντας τους αριθμούς καταλογράφησης-εισαγωγής (accession number) για το 16S rDNA των πρότυπων στελεχών από την NCBI. Στην παρούσα φυλογενετική ανάλυση προστέθηκαν 4 βακτήρια γένους *Enterobacter* spp. (C3.1, C1.2, C1.5) και 1 γένους *Lelliottia* spp. (D2.4), που είχαν απομονωθεί από φυμάτια μαυρομάτικου φασολιού και μελετήθηκαν προγενέστερα στο εργαστήριο από τους κ. Φωτιάδη Χρήστο και την κα. Γιαννακοπούλου Μελίνα.

Με βάση το φυλογενετικό δέντρο που προέκυψε (**Εικόνα 2.23A**), το VFAT314 ομαδοποιήθηκε μαζί με το πρότυπο στέλεχος *Enterobacter ludwigii* EN-119<sup>T</sup> και την ενδοεργαστηριακή απομόνωση C1.2. Τα ποσοστά ομοιότητας που υπολογίστηκαν από το βιοπληροφορικό εργαλείο Clustal Omega, έδειξαν ότι το VFAT314 εμφάνισε 99,56% ομοιότητα με το *Enterobacter ludwigii* EN-119<sup>T</sup> και το C1.2, ενώ το C1.2 εμφάνισε 99,70% με το αντίστοιχο πρότυπο στέλεχος (*Enterobacter ludwigii* EN-119<sup>T</sup>) (**Πίνακας 2.25**). Το γεγονός ότι στο φυλογενετικό δέντρο τα VFAT314 και C1.2 ανήκουν στην ίδια ομάδα, στον κλάδο του *Enterobacter ludwigii* EN-119<sup>T</sup> και παρουσιάζουν μεταξύ τους μεγάλο ποσοστό ομοιότητας, αποτέλεσαν σημαντικοί λόγοι για την διεξαγωγή BOX-PCR. Από τη μοριακή μελέτη της γονιδιωματικής τους ετερογένειας προέκυψε διαφοροποιημένο πρότυπο ζωνών (**Εικόνα 2.23B**). Έτσι, μέσω της διακριτικής ικανότητας της τεχνικής αυτής, έγινε εφικτή η ενίσχυση αλλά και η ανάδειξη της διαφορετικότητας των συγκεκριμένων δυο στελεχών *Enterobacter ludwigii*, απορρίπτοντας το ενδεχόμενο να είναι κλώνοι, γεγονός που δικαιόλογησε την περαιτέρω μελέτη του.



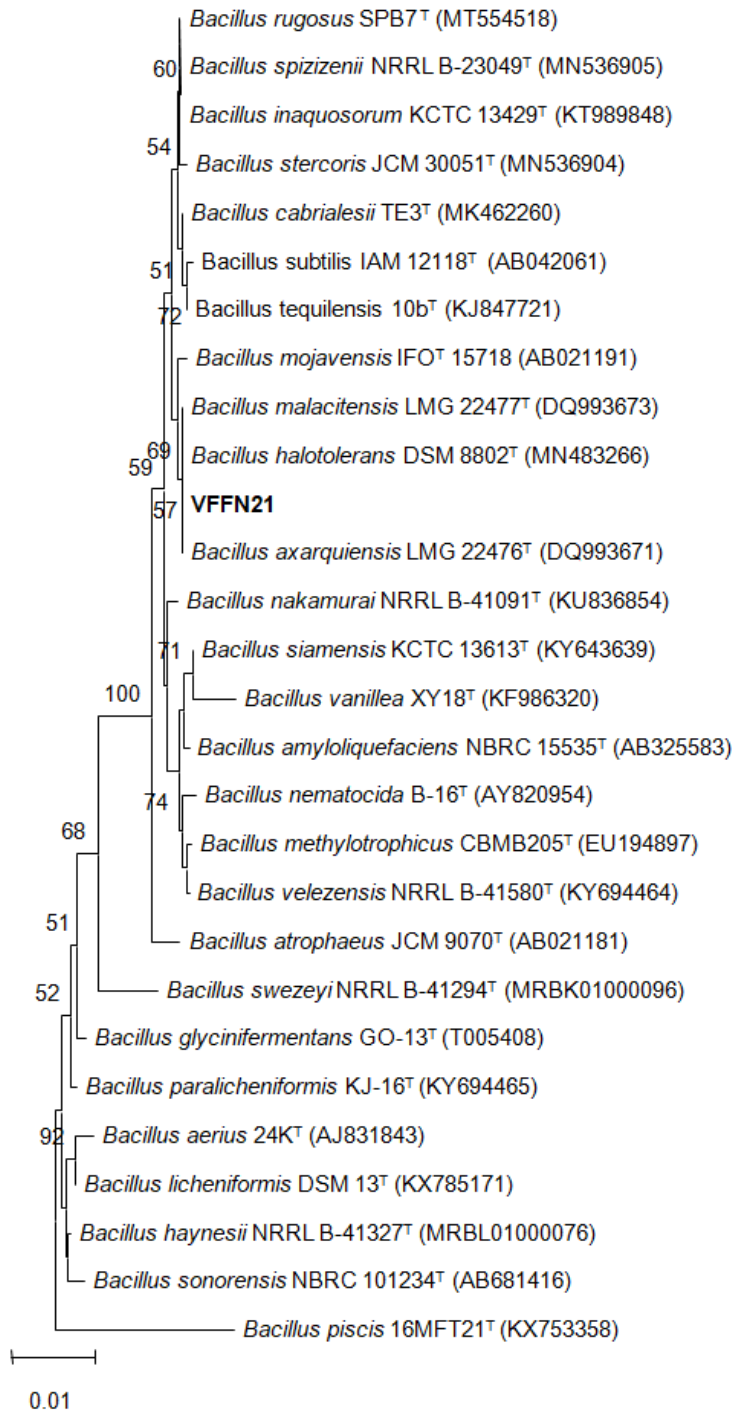
**Εικόνα 2.23:** **A)** Maximum Likelihood (ML) φυλογενετικό δέντρο με βάση τη νουκλεοτιδική αλληλουχία γονιδίου 16S rRNA (1360 bp). Τα στελέχη αναφοράς του εργαστηρίου που χρησιμοποιήθηκαν εμφανίζονται με έντονη γραφή. Τα πρότυπα στελέχη υποδεικνύονται με τον εκθέτη "T" και οι αριθμοί καταλογογράφησης GenBank για τις αλληλουχίες *rrs* σημειώθηκαν μέσα σε παρένθεση. Τιμές Bootstrap (άνω των 50%) υπολογίστηκαν για 500 επαναλήψεις και εμφανίζονται στους κόμβους των δέντρων. Η γραμμή κλίμακας δείχνει τον αριθμό των νουκλεοτιδικών αντικαταστάσεων ανά θέση. Η φυλογενετική ανάλυση διεξήχθη στο MEGAX χρησιμοποιώντας το μοντέλο TN93+G+I. **B)** Γονιδιωματικό πρότυπο με βάση BOX-PCR των *Enterobacter* VFAT314 και C1.2.

**Πίνακας 2.25:** Ποσοστά ομοιότητας νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *rrs* (1360bp) μεταξύ στελεχών *Enterobacter*. Με έντονη γραφή εμφανίζεται ο βαθμός ομοιότητας με τα φυλογενετικά πλησιέστερα πρότυπα στελέχη.

Στελέχη	Ποσοστά ομοιότητας αλληλουχίας <i>rrs</i> (%)																														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
1 VFAT314	100	99,56	98,22	97,7	97,55	98,66	98,44	98,44	99,04	98,96	98,22	96,29	98,14	98,37	98,81	98,66	98,44	98,29	98,74	97,25	<b>99,56</b>	98,59	97,92	99,26	96,36	99,18	97,25	98,89	97,7	97,47	97,32
2 Cl.2		100	98,66	98,14	97,62	99,11	98,59	98,59	99,48	99,11	98,59	96,66	98,59	98,81	98,96	99,11	98,89	98,74	98,89	97,4	99,7	98,74	98,3	99,41	96,51	99,63	97,7	99,33	97,85	97,55	97,47
3 Cl.5			100	98,15	97,63	98,29	98,07	97,85	98,59	98,22	99,93	97,55	99,93	97,99	98,07	98,29	98,07	98,22	97,85	97,7	98,37	97,7	97,26	98,22	97,55	98,74	97,92	98,29	98,89	97,55	97,63
4 C3.1				100	97,33	98,22	97,7	97,62	98,37	97,85	98,07	95,85	98,15	97,77	97,85	98,22	97,99	97,99	97,77	97,1	97,85	98,22	97,26	98,14	96,07	98,37	97,62	98,66	97,33	97,33	97,03
5 D2.4					100	97,77	97,84	97,77	97,62	97,7	97,63	95,47	97,63	97,32	97,55	97,62	97,4	97,4	98,07	98,07	97,92	97,47	96,36	97,99	95,99	97,62	98,74	97,47	97,55	99,93	98,81
6 <i>Enterobacter asburiae</i> JCM6051 <sup>1</sup> (AB004744)						100	99,33	99,41	99,18	98,74	98,22	96,14	98,29	99,41	98,51	99,41	99,63	99,48	99,18	97,25	98,81	98,44	97,63	99,11	96,21	99,18	98,44	99,03	97,85	97,7	97,62
7 <i>Enterobacter bugandensis</i> EB-247 <sup>1</sup> (NZ L1992502)							100	99,48	98,81	99,41	98,07	95,62	98,07	99,18	99,18	99,18	99,41	99,56	99,26	97,47	98,89	98,51	97,26	99,03	96,28	98,96	97,84	98,51	98,29	97,77	97,55
8 <i>Enterobacter cancerogenus</i> LMG 2693 <sup>1</sup> (Z96078)								100	98,66	98,89	97,85	95,62	97,85	98,89	98,66	98,89	99,11	99,04	99,18	97,1	98,89	98,44	97,11	99,11	96,06	98,74	97,84	98,44	97,85	97,7	97,62
9 <i>Enterobacter chengduensis</i> WCHECI-C4 <sup>1</sup> RWHT01000077)									100	99,33	98,51	96,14	98,59	98,59	99,18	99,03	98,81	98,96	99,11	97,4	99,18	98,96	98,44	99,48	96,36	99,85	97,84	99,56	97,77	97,55	97,32
10 <i>Enterobacter chuandaensis</i> 090028 <sup>1</sup> (M049966)										100	98,22	95,77	98,22	98,59	99,7	99,03	98,81	98,96	99,26	97,62	99,41	99,04	97,92	99,56	96,43	99,48	97,32	99,04	98,22	97,62	97,4
11 <i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i> <sup>1</sup> (ATCC											100	97,48	99,85	97,92	98,07	98,22	97,99	98,14	97,85	97,7	98,37	97,7	97,18	98,22	97,48	98,66	97,85	98,22	98,89	97,55	97,63
12 <i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> ATCC 13047 <sup>1</sup> (CP001918)												100	97,48	95,84	95,62	96,14	95,91	95,77	95,54	95,4	96,36	95,39	94,81	96,06	95,25	96,29	95,7	95,99	96,81	95,4	95,47
13 <i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i> LMG 2683 <sup>1</sup> (Z96079)													100	97,99	98,07	98,29	98,07	98,22	97,85	97,7	98,29	97,7	97,26	98,22	97,55	98,74	97,92	98,29	98,81	97,55	97,63
14 <i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>hoffmannii</i> DSM 14563 <sup>1</sup> (CP017186)														100	98,66	99,56	99,78	99,63	98,59	97,1	98,51	97,99	97,33	98,51	96,06	98,74	97,84	98,59	97,77	97,25	97,17
15 <i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>hormaechei</i> ATCC 49162 <sup>1</sup> (NZ AFHR01000079)															100	99,11	98,89	99,03	99,04	97,47	99,26	99,04	97,92	99,41	96,43	99,33	97,17	99,04	97,92	97,47	97,25
16 <i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i> EN-314 <sup>1</sup> (AJ853889)																100	99,78	99,63	98,89	97,4	98,81	98,44	97,63	98,96	96,36	99,18	97,92	99,03	98,07	97,55	97,47
17 <i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i> EN-562 <sup>1</sup> (AJ853890)																	100	98,85	98,81	97,17	98,59	98,22	97,41	98,74	96,13	98,96	98,07	98,81	97,85	97,32	97,25
18 <i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>xiangfangensis</i> LMG 27195 <sup>1</sup> (CP012165)																		100	98,81	97,17	98,44	98,22	97,55	98,59	96,13	99,11	97,99	98,81	97,99	97,32	97,1
19 <i>Enterobacter huaxiensis</i> 090008 <sup>1</sup> (MK049964)																			100	97,25	99,18	98,96	97,7	99,48	95,91	99,11	97,77	98,96	97,7	97,99	97,77
20 <i>Enterobacter kobei</i> CIP 105566 <sup>1</sup> (AJ508301)																				100	97,54	97,1	96,07	97,62	96,07	97,7	97,33	97,25	97,7	98	97,55
21 <i>Enterobacter ludwigii</i> EN-119 <sup>1</sup> (AJ853891)																					100	99,04	98	99,7	96,51	99,33	97,4	99,04	97,99	97,84	97,77
22 <i>Enterobacter mori</i> LMG 25706 <sup>1</sup> (AEXB01000023)																						100	98,15	99,33	95,91	98,96	97,18	98,26	97,33	97,47	97,18
23 <i>Enterobacter muelleri</i> JM-458 <sup>1</sup> (KP345900)																							100	98,07	95,62	98,44	96,29	98,59	96,44	96,29	96,07
24 <i>Enterobacter roggenskampi</i> DSM 16690 <sup>1</sup> (CP017184)																								100	96,43	99,48	97,7	99,33	97,85	97,92	97,84
25 <i>Enterobacter siamensis</i> C2361 <sup>1</sup> (HQ888848)																									100	96,51	95,77	96,06	96,96	95,99	96,07
26 <i>Enterobacter sichuanensis</i> WCHECI1597 <sup>1</sup> (MG832788)																										100	97,84	99,56	97,92	97,55	97,32
27 <i>Enterobacter soli</i> LF7 <sup>1</sup> (GU814270)																											100	97,7	97,11	98,74	98,22
28 <i>Enterobacter tabaci</i> YIM Hb-3 <sup>1</sup> (KP990658)																												100	97,47	97,4	97,17
29 <i>Enterobacter timonensis</i> MT20 <sup>1</sup> (FCOP00000000)																													100	97,48	97,55
30 <i>Lelliottia amnigenus</i> JCM1237 <sup>1</sup> (AB004749)																														100	98,74
31 <i>Lelliottia nimipressuralis</i> LMG 10245-1 <sup>1</sup> (Z96077)																															100

#### 2.3.5.1.2) *Bacillus* sp. VFFN21

Το βακτηριακό στέλεχος VFFN21 απομονώθηκε από ώριμα φυμάτια κουκιού από την περιοχή του Φενεού και για την ταυτοποίηση του ενισχύθηκε το γονίδιο *rrs*, η ανάλυση του οποίου έδειξε ότι ανήκει στο γένος *Bacillus* sp. Για τον προσδιορισμό της ταξινομικής του θέσης σε σχέση με άλλα είδη του ίδιου γένους, κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο (**Εικόνα 2.24**), χρησιμοποιώντας τμήμα της αλληλουχίας του γονιδίου *rrs* μήκους 1448 bp. Το στέλεχος VFFN21 ομαδοποιήθηκε μαζί με τα πρότυπα στελέχη *Bacillus axarquiensis* LMG 22476<sup>T</sup>, *Bacillus malacitensis* LMG 22477<sup>T</sup> και *Bacillus halotolerans* DSM 8802<sup>T</sup> με ποσοστό ομοιότητας αλληλουχίας 99,86% (**Πίνακας 2.26**). Η χρήση βιοπληροφορικών εργαλείων ανάλυσης του γονιδιώματος έχει κάνει εφικτή την ανακατάταξη διαφόρων ειδών στο γένος *Bacillus* (Dunlap et al., 2016). Στελέχη όπως *Bacillus axarquiensis*, *Bacillus malacitensis* και *Brevibacterium halotolerans* (= *Bacillus halotolerans*) έχουν χαρακτηριστεί ομοειδή και έχουν οριστεί ως *Bacillus halotolerans* (Ben-Gad & Gerchman, 2017). Γι' αυτό και η απομόνωση VFFN21 με βάση το *rrs*, θεωρείται ότι ανήκει στο *Bacillus halotolerans*.



**Εικόνα 2.24:** Maximum Likelihood (ML) φυλογενετικό δέντρο βασισμένο σε σχεδόν πλήρους μήκους αλληλουχία του γονιδίου *rrs* (1448 bp). Οι απομονώσεις της παρούσας εργασίας σημάνθηκαν με έντονη γραφή και τα πρότυπα στελέχη επισημάνθηκαν με τον εκθέτη “T”. Οι κωδικοί εισαγωγής GenBank των αλληλουχιών *rrs* sequences δηλώθηκαν εντός παρένθεσης. Οι τιμές bootstrap (πάνω από 50%) υπολογίστηκαν για 500 επαναλήψεις και απεικονίζονται στους κόμβους. Η γραμμή κλίμακας δείχνει τον αριθμό των νουκλεοτιδίων υποκαταστάσεων ανά τοποθεσία. Η φυλογενετική ανάλυση διεξήχθη στο MEGA Χ χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο ML και το μοντέλο Hasegawa-Kishino-Yano (HKY).

**Πίνακας 2.26:** Ποσοστά ομοιότητας νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *rrs* (1448 bp) μεταξύ στελεχών *Bacillus*. Με έντονο χαρακτήρα εμφανίζεται ο βαθμός ομοιότητας με τα φυλογενετικά πλησιέστερα πρότυπα στελέχη.

Στελέχη	Ποσοστά ομοιότητας αλληλουχίας <i>rrs</i> (%)																												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
1 VFFN21	100	<b>99,86</b>	99,13	99,21	95,74	99,57	97,54	<b>99,86</b>	97,32	99,64	97,25	<b>99,86</b>	99,13	99,71	99,49	99,06	97,47	95,52	99,64	99,64	99,57	99,28	99,42	97,25	97,11	98,7	97,24	99,21	
2 <i>Bacillus axarquiensis</i> LMG 22476 <sup>T</sup> (DQ993671)		100	99,28	99,35	95,88	99,71	97,69	100	97,47	99,78	97,4	100	99,28	99,86	99,64	99,21	97,61	95,66	99,21	99,21	99,13	99,42	99,13	97,4	97,4	98,41	97,17	99,35	
3 <i>Bacillus atrophaeus</i> JCM 9070 <sup>T</sup> (AB021181)			100	99,35	95,88	99,28	97,69	99,28	97,47	99,21	97,4	99,28	99,28	99,28	99,49	99,21	97,61	95,66	99,21	99,21	99,13	99,42	99,13	97,4	97,4	98,41	97,17	99,35	
4 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NBRC 15535 <sup>T</sup> (AB325583)				100	95,95	99,49	97,61	99,35	97,4	99,42	97,47	99,35	99,71	99,35	99,57	99,57	97,54	95,73	99,42	99,42	99,49	99,71	99,35	97,18	97,32	98,63	97,61	99,64	
5 <i>Bacillus aerius</i> 24K <sup>T</sup> (AJ831843)					100	96,1	97,98	95,88	98,34	96,03	98,56	95,88	95,81	95,88	95,95	95,66	98,19	95,38	96,03	96,03	96,1	95,74	95,95	97,69	98,27	95,23	93,83	95,74	
6 <i>Bacillus cabrialesii</i> TE3 <sup>T</sup> (MK462260)						100	97,9	99,71	97,69	99,93	97,61	99,71	99,57	99,71	99,64	99,49	97,83	95,88	99,93	99,93	99,86	99,42	99,86	97,47	97,47	99,13	97,39	99,64	
7 <i>Bacillus glycinifermentans</i> GO-13 <sup>T</sup> (T005408)							100	97,69	99,64	97,83	99,42	97,69	97,47	97,69	97,61	97,47	99,78	96,53	97,83	97,83	97,76	97,4	97,76	98,7	99,42	97,04	95,5	97,54	
8 <i>Bacillus halotolerans</i> DSM 8802 <sup>T</sup> (MN483266)								100	97,47	99,78	97,4	100	99,28	99,86	99,64	99,21	97,61	95,66	99,78	99,78	99,71	99,42	99,57	97,4	97,25	98,84	97,39	99,35	
9 <i>Bacillus haynesii</i> NRRL B-41327 <sup>T</sup> (MRBL01000076)									100	97,61	99,78	97,47	97,25	97,47	97,4	97,25	99,86	96,82	97,61	97,61	97,54	97,18	97,54	99,06	99,78	96,82	95,28	97,32	
10 <i>Bacillus inaquosorum</i> KCTC 13429 <sup>T</sup> (KT989848)										100	97,54	99,78	99,49	99,64	99,57	99,42	97,76	95,81	100	100	99,93	99,35	99,78	97,54	97,4	99,06	97,32	99,57	
11 <i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13 <sup>T</sup> (KX785171)											100	97,4	97,33	97,4	97,47	97,18	99,64	96,89	97,54	97,54	97,61	97,25	97,47	99,13	99,71	96,75	95,35	97,25	
12 <i>Bacillus malacitensis</i> LMG 22477 <sup>T</sup> (DQ993673)												100	99,28	99,86	99,64	99,21	97,61	95,66	99,78	99,78	99,71	99,42	99,57	97,4	97,25	98,84	97,39	99,35	
13 <i>Bacillus methylotrophicus</i> CBMB205 <sup>T</sup> (EU194897)													100	99,28	99,49	99,64	97,4	95,74	99,49	99,49	99,57	99,86	99,57	97,18	97,18	98,84	97,61	99,93	
14 <i>Bacillus mojavensis</i> IFO 15718 <sup>T</sup> (AB021191)														100	99,64	99,21	97,61	95,66	99,64	99,64	99,57	99,42	99,57	97,25	97,25	98,84	97,39	99,35	
15 <i>Bacillus nakamurai</i> NRRL B-41091 <sup>T</sup> (KU836854)															100	99,42	97,54	95,59	99,57	99,57	99,49	99,64	99,49	97,18	97,18	98,77	97,46	99,57	
16 <i>Bacillus nematocida</i> B-16 <sup>T</sup> (AY820954)																100	97,4	95,44	99,42	99,42	99,35	99,49	99,35	96,96	97,03	98,63	97,31	99,71	
17 <i>Bacillus paralicheniformis</i> KJ-16 <sup>T</sup> (KY694465)																	100	96,75	97,76	97,76	97,69	97,32	97,69	98,92	99,64	96,96	95,42	97,47	
18 <i>Bacillus piscis</i> 16MFT21 <sup>T</sup> (KX753358)																		100	95,81	95,81	95,88	95,66	95,88	96,17	96,75	95,16	93,75	95,66	
19 <i>Bacillus rugosus</i> SPB7 <sup>T</sup> (MT554518)																			100	99,93	99,35	99,78	97,54	97,4	99,06	97,32	99,57		
20 <i>Bacillus spizizenii</i> NRRL B-23049 <sup>T</sup> (MNS36905)																				100	99,93	99,35	99,78	97,54	97,4	99,06	97,32	99,57	
21 <i>Bacillus stercoris</i> JCM 30051 <sup>T</sup> (MNS36904)																					100	99,42	99,71	97,61	97,47	98,99	97,39	99,49	
22 <i>Bacillus siamensis</i> KCTC 13613 <sup>T</sup> (KY643639)																						100	99,42	97,11	97,11	98,7	97,75	99,78	
23 <i>Bacillus subtilis</i> IAM 12118 <sup>T</sup> (AB042061)																							100	97,32	97,32	99,13	97,39	99,64	
24 <i>Bacillus suezeyi</i> NRRL B-41294 <sup>T</sup> (MRBK01000096)																								100	99,13	96,6	95,06	97,11	
25 <i>Bacillus sonorensis</i> NBRC 101234 <sup>T</sup> (AB681416)																									100	96,6	95,28	97,11	
26 <i>Bacillus tequilensis</i> 10b <sup>T</sup> (KJ847721)																										100	96,66	98,92	
27 <i>Bacillus vanillea</i> XY18 <sup>T</sup> (KF986320)																											100	97,53	
28 <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-41580 <sup>T</sup> (KY694464)																												100	
																													100
																													100

### 2.3.5.2) Ενδοφυτικά ριζοβακτήρια φασολιάς

Από φυμάτια φασολιάς απομονώθηκαν 11 βακτήρια, η ταυτοποίηση των οποίων έγινε με βάση την αλληλούχιση ιδιοσυστατικών γονιδίων και την ανάλυση ομοιότητας των αλληλουχιών του φυλογενετικά πρότυπου ή και μη πρότυπου στελέχους, όπως αυτές είναι διαθέσιμες στη βάση δεδομένων GenBank της βάσης δεδομένων, NCBI. Με αυτόν τον τρόπο οι 11 απομονώσεις της φασολιάς προσδιορίστηκαν ως *Achromobacter* sp (1), *Microbacterium* spp. (5) και *Pseudomonas* spp (15). Η περιοχή απομόνωσης, το μήκος της αλληλουχίας του γονιδίου που αλληλουχήθηκε και τα ποσοστά ομοιότητας που προέκυψαν παρουσιάζονται στο Πρόσθετο Υλικό (Πίνακες Σ2.14 και Σ2.16).

Πίνακας 2.27: Καταγραφή ενδοφυτικών απομονώσεων από φυμάτια φασολιάς και ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους.	
Στέλεχος	Γένος
PVTRIP#9	<i>Achromobacter</i>
FXS8.27	<i>Microbacterium</i>
FXS11.35	<i>Microbacterium</i>
FXS10.38	<i>Microbacterium</i>
FXS11.33	<i>Microbacterium</i>
FXS8.23	<i>Microbacterium</i>
PCAUATRAPP1	<i>Pseudomonas</i>
PCAUATRAPP4	<i>Pseudomonas</i>
PCAUATRAPP5	<i>Pseudomonas</i>
PCAUATRAPP13	<i>Pseudomonas</i>
PCAUATRAPP11	<i>Pseudomonas</i>

### 2.3.5.3) Ενδοφυτικά ριζοβακτήρια αυτοφυών ψυχανθών

Ενδοφυτικά βακτήρια απομονώθηκαν από ριζικά φυμάτια του ενδημικού φυτού της Κρήτης, *Ebenus cretica*. Αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής ήταν η απομόνωση εννέα βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν ως *Georgenia* sp. (1), *Kocuria* spp. (3), *Microbacterium* spp.(2), *Roseomonas* sp. (1), *Sphingomonas* sp. (1) και *Phyllobacterium* sp. (1). Τα ποσοστά ομοιότητας που προέκυψαν καθώς και οι επεξεργασμένες αλληλουχίες των γονιδίων παρουσιάζονται στο Πρόσθετο Υλικό (Πίνακες Σ2.15 και Σ2.16).

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το **Εδάφιο 2.3.5**, τα στελέχη του γένους *Ochrobactrum* είναι φυλογενετικά κοντά με εκείνα του γένους *Brucella*, με κάποια από τα είδη του γένους *Brucella* να εμφανίζουν παθογόνο χαρακτήρα κυρίως στον άνθρωπο και είναι ευκαιρικά παθογόνα σε διάφορους ξενιστές (Ryan & Pembroke, 2020). Στην περίπτωση των απομονώσεων *Shinella*, λίγα είναι τα είδη αυτού του γένους που έχουν απομονωθεί από φυμάτια ψυχανθών με κυριότερα το *Shinella kummerowiae* sp CCBAU 25048<sup>T</sup> (χωρίς ικανότητα πρόκλησης φυματιογένεσης στον ξενιστή απομόνωσης) και τις Τυνησιακές απομονώσεις AGR1 και AGR14, από τα ψυχανθή *Kummerowia stipulacea* και κουκιού, αντίστοιχα (Lin et al., 2008; Saïdi et al., 2011). Όσον αφορά το *Achromobacter*, έχει καταγραφεί απομόνωση από φυμάτια



του *Genista cinerea*, με διάφορα στελέχη του είδους να αποτελούν ενδοφυτικά βακτήρια με ικανότητα αποικισμού των φυματίων διαφορετικών ψυχανθών (Aserse et al., 2013; El-Batanony et al., 2020; Berza et al., 2022). Αντίθετα, η απομόνωση στελέχους *Georgenia* sp, από φυμάτια ήταν κάτι μη αναμενόμενο, γιατί προηγουμένως είχαν απομονωθεί από άλλες περιβαλλοντικές πηγές, όπως το έδαφος (*Georgenia soli*, *Georgenia thermotolerans*, *Georgenia ruanii* (Li et al., 2007; Hamada et al., 2009; Kampfer, et al., 2010). Τα στελέχη *Kocuria* αποτελούν βακτήρια με πολλαπλές ιδιότητες που έχουν απομονωθεί είτε από τη ριζόσφαιρα του ρεβυθιού (Zaheer, 2017), είτε ως ενδόφυτο από το ψυχανθές *Prosopis laegivata* με δράση προώθησης της ανάπτυξης της τομάτας (Guendouz et al., 2021).

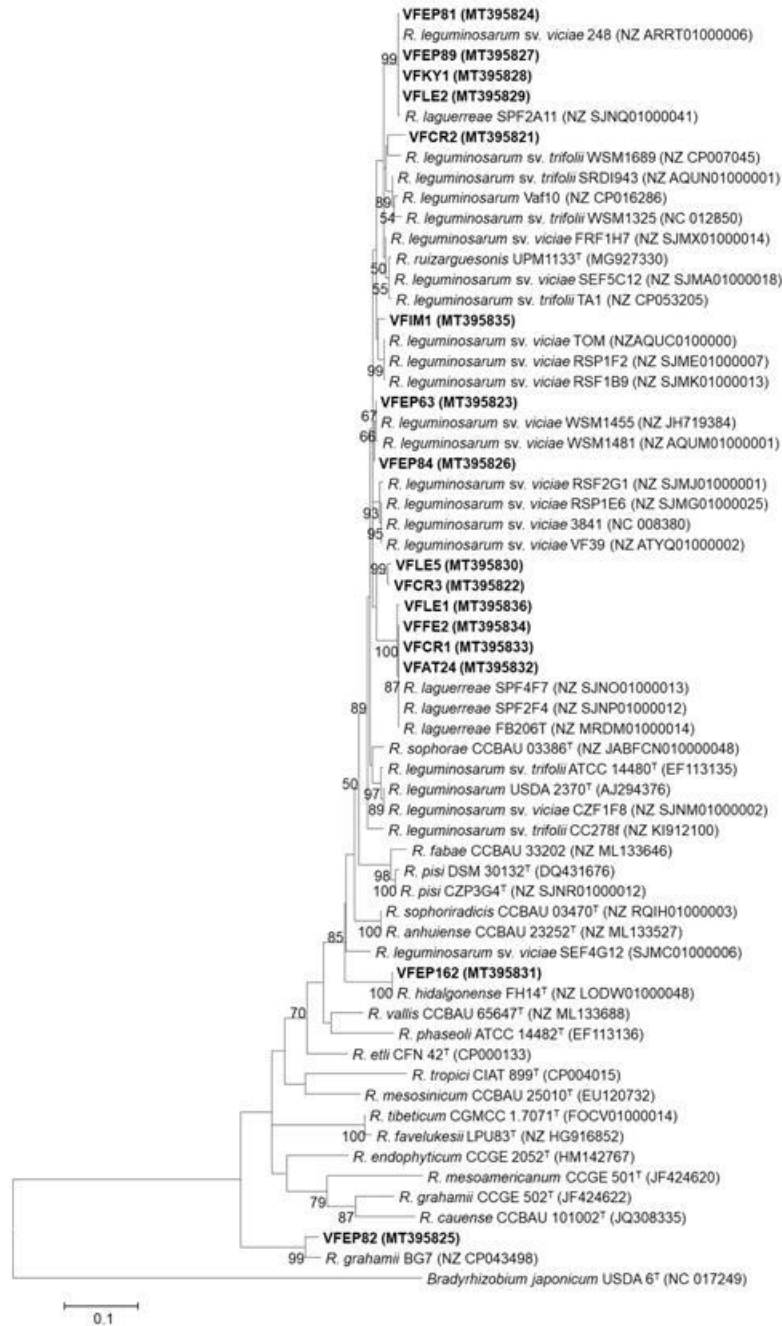
Από τα ενδοφυτικά των φυματίων, τα βακτήρια *Pseudomonas* είναι εκείνα που συναντώνται με τη μεγαλύτερη συχνότητα μετά τα βακτήρια *Bacillus* (de Meyer et al., 2015) και παρουσιάζουν έντονο ενδιαφέρον λόγω της ωφέλιμης δράσης τους. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ως παράδειγμα το *Pseudomonas aureofaciens*, το οποίο αποτελεί συστατικό βακτηριακού βιοσκευάσματος εμπορικά διαθέσιμο από την Ecosoil ([www.ecosoil.com](http://www.ecosoil.com)) για την αποτελεσματική καταπολέμηση διαφόρων ασθενειών μυκητιακής προέλευσης (Goswami et al., 2016).

Τα *Microbacterium* σχετίζονται με διάφορα φυτά (McInroy & Klopper, 1995; Sturz & Kimpirinski, 2004) και η παρουσία τους σε φυμάτια ψυχανθών είτε ως ενδόφυτα είτε ως επίφυτα είναι αρκετά συνηθισμένη (Hakim et al., 2020; Zaid et al., 2021; Ilyas et al., 2022). Βακτήρια γένους *Roseomonas* έχουν απομονωθεί είτε από φυλλόσφαιρα (Nutaratat et al., 2012; Damtab et al., 2016) είτε από ρίζες (Rat et al., 2021) διαφόρων φυτών, ενώ πρόσφατα απομονώθηκε από φυμάτια τρυφυλλιού (Rahal & Chekireb 2021). Μια ακόμη περίπτωση ενδοφυτικών βακτηρίων σε φυμάτια αποτελούν τα *Sphingomonas* καθώς έχουν εντοπιστεί σε φυμάτια μαυρομάτικου φασολιού (da Silva et al., 2022), σόγιας (Bender et al., 2022), ασπαλάθου (Bessadok et al., 2020) και αράπικου φουστικιού (Zakhia et al., 2006). Τέλος μια ακόμη κατηγορία βακτηρίων που συσχετίζεται με τα φυτά είναι τα *Phyllobacterium*, τα οποία συναντώνται ως ενδοφυτικά των φυματίων (Kalita et al., 2020; Flores-Félix et al., 2021), ενώ πρόσφατη εργασία έδειξε την ύπαρξη στελεχών *Phyllobacterium* ικανών να προκαλούν φυμάτια στο ψυχανθές *Cajanus cajan* (Borape et al., 2023).

Η απομόνωση των παραπάνω ενδοφυτικών βακτηρίων αποτελεί βάση για περαιτέρω μελλοντική μελέτη τόσο ως προς την προώθηση της ανάπτυξης των φυτών, όσο και ως προς την πιθανή δράση τους τους έναντι φυτοπαθογόνων οργανισμών.

## ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

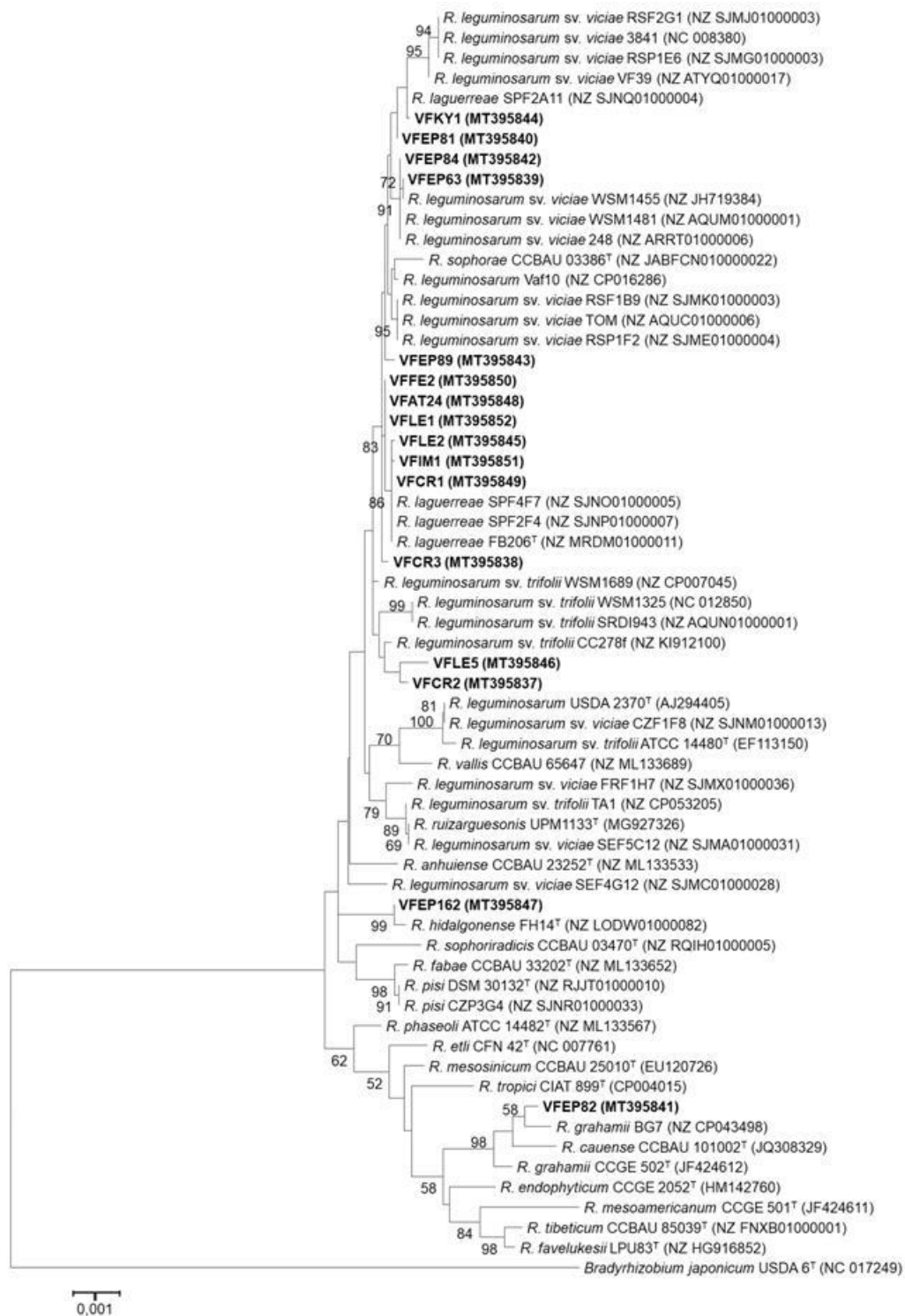
### ΜΕΡΟΥΣ 2.3.1



**Εικόνα Σ2.1:** Maximum Likelihood (ML) φυλογενετικό δέντρο βασισμένο σε μερική αλληλουχία τμήματος του γονιδίου *recA* (462 bp) δείχνει τις ταξινομικές σχέσεις των υπό μελέτη στελεχών, των αντιπροσωπευτικών πρότυπων στελεχών και των γονιδιωματικών ειδών του συμπλέγματος των ειδών των *Rhizobium*. Οι απομονώσεις της παρούσας εργασίας σημάνθηκαν με έντονη γραφή και τα πρότυπα στελέχη επισημάνθηκαν με εκθέτη “T”. Οι κωδικοί εισαγωγής κατά GenBank των αλληλουχιών δηλώθηκαν εντός παρένθεσης. Η φυλογενετική ανάλυση διεξήχθη στο MEGA X χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο ML και το μοντέλο T92 + G + I. Οι τιμές bootstrap (πάνω από 50%) υπολογίστηκαν για 500 επαναλήψεις και απεικονίζονται στους κόμβους. Η γραμμή κλίμακας δείχνει τον αριθμό των νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων ανά τοποθεσία. Το *B. japonicum* USDA 6<sup>T</sup>, χρησιμοποιήθηκε ως στέλεχος εκτός ομάδας. Το «R.» χρησιμοποιήθηκε ως συντομογραφία του ονόματος του γένους, δηλαδή του *Rhizobium*.

**Πίνακας Σ2.1:** Ποσοστά ομοιότητας νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του γονιδίου *recA* μεταξύ επιλεγμένων στελεχών *Rhizobium*. Τα πλησιέστερα πρότυπα στελέχη εμφανίζονται με έντονη γραφή.

Στελέχη	Ομοιότητα νουκλεοτιδικών αλληλουχιών <i>recA</i> (%)																									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
1 VFLE5 (MT395830)	100	95,67	96,1	95,67	96,32	96,1	95,67	97,62	86,36	95,67	97,4	91,99	99,35	95,24	96,1	96,1	95,89	<b>96,97</b>	96,32	96,32	96,1	91,99	83,55	85,28	93,29	
2 VFLE2 (MT395829)		100	95,45	100	97,19	95,45	100	97,19	86,15	100	97,4	91,77	95,45	96,54	95,45	95,45	96,1	<b>97,4</b>	96,54	96,54	95,45	91,77	84,85	86,15	93,72	
3 VFLE1 (MT395836)			100	95,45	95,89	99,57	95,45	96,75	85,93	95,45	96,97	91,56	95,89	94,81	99,57	99,57	96,1	96,54	96,54	96,54	<b>99,57</b>	91,56	83,55	84,85	93,51	
4 VFY1 (MT395828)				100	97,19	95,45	100	97,19	86,15	100	97,4	91,77	95,45	96,54	95,45	95,45	96,1	<b>97,4</b>	96,54	96,54	95,45	91,77	84,85	86,15	93,72	
5 VFIM1 (MT395835)					100	95,89	97,19	98,27	86,58	97,19	98,48	91,99	96,54	96,75	95,89	95,89	97,19	<b>98,48</b>	96,97	96,97	95,89	91,99	84,42	85,06	94,37	
6 VFPE2 (MT395834)						100	95,45	96,75	86,15	95,45	96,97	91,77	95,89	95,24	100	100	96,54	96,54	96,97	96,97	<b>100</b>	91,77	83,77	85,28	93,51	
7 VFPE89 (MT395827)							100	97,19	86,15	100	97,4	91,77	95,45	96,54	95,45	95,45	96,1	<b>97,4</b>	96,54	96,54	95,45	91,77	84,85	86,15	93,72	
8 VFPE84 (MT395826)								100	87,45	97,19	99,78	92,86	97,84	97,19	96,75	96,75	97,84	<b>98,92</b>	97,84	97,84	96,75	92,86	84,85	86,36	95,24	
9 VFPE82 (MT395825)									100	86,15	87,23	88,1	86,58	87,88	86,15	86,15	87,23	87,66	87,23	87,23	86,15	88,1	<b>86,8</b>	86,36	87,66	
10 VFPE81 (MT395824)										100	97,4	91,77	95,45	96,54	95,45	95,45	96,1	<b>97,4</b>	96,54	96,54	95,45	91,77	84,85	86,15	93,72	
11 VFPE63 (MT395823)											100	92,64	97,62	96,97	96,97	98,05	<b>99,13</b>	97,62	97,62	96,97	92,64	84,63	86,15	95,02		
12 VFPE162 (MT395831)												100	92,21	92,64	91,77	91,77	92,21	93,07	93,07	93,07	91,77	<b>100</b>	85,5	85,93	92,42	
13 VFCE3 (MT395822)													100	95,45	95,89	95,89	96,1	<b>97,19</b>	96,54	96,54	95,89	92,21	83,33	85,06	93,51	
14 VFCE2 (MT395821)														100	95,24	95,24	96,32	<b>97,4</b>	96,75	96,75	95,24	92,64	85,93	86,36	93,72	
15 VFCE1 (MT395833)															100	100	96,54	96,54	96,97	96,97	<b>100</b>	91,77	83,77	85,28	93,51	
16 VFAT24 (MT395832)																100	96,54	96,54	96,97	96,97	<b>100</b>	91,77	83,77	85,28	93,51	
17 <i>Rhizobium sophorae</i> CCB AU 03386 <sup>T</sup> (NZ JABFCN010000048)																		100	97,62	97,4	97,62	96,54	92,21	84,42	86,36	94,37
18 <i>Rhizobium ruizarguesonis</i> UPM1133 <sup>T</sup> (MG927330)																			100	97,62	97,62	96,54	93,07	84,85	85,5	95,02
19 <i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA 2370 <sup>T</sup> (AJ294376)																			100	99,35	96,97	93,07	84,42	86,15	94,37	
20 <i>Rhizobium leguminosarum</i> sv. trifolii ATCC 14480 <sup>T</sup> (EF113135)																				100	96,97	93,07	84,42	86,58	94,37	
21 <i>Rhizobium laguerreae</i> FB206 <sup>T</sup> (NZ MRDM01000014)																					100	91,77	83,77	85,28	93,51	
22 <i>Rhizobium hidalgense</i> FH14 <sup>T</sup> (NZ LODW01000048)																							100	85,5	85,93	92,42
23 <i>Rhizobium grahamii</i> CCGE 502 <sup>T</sup> (JF424622)																								100	91,34	84,85
24 <i>Rhizobium cauense</i> CCB AU 101002T (JQ308335)																									100	85,71
25 <i>Rhizobium anhuense</i> CCB AU 23252 <sup>T</sup> (NZ ML133527)																										100
Ομοιότητα νουκλεοτιδικών αλληλουχιών <i>recA</i> (%)																										



**Εικόνα Σ2.2:** Maximum Likelihood (ML) φυλογενετικό δέντρο βασισμένο σε μερική αλληλουχία τμήματος του γονιδίου *atpD* (441 bp) δείχνει τις ταξινομικές σχέσεις των υπό μελέτη στελεχών, των αντιπροσωπευτικών πρότυπων στελεχών και των γονιδιωματικών ειδών του συμπλέγματος των ειδών του *Rhizobium*. Οι απομονώσεις της παρούσας εργασίας σημάνθηκαν με έντονη γραφή και τα πρότυπα στελέχη επισημάνθηκαν με εκθέτη "T". Οι κωδικοί εισαγωγής της GenBank των αλληλουχιών δηλώθηκαν εντός παρένθεσης. Η φυλογενετική ανάλυση διεξήχθη στο MEGA 6 χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο ML και το μοντέλο T92 + G. Οι τιμές bootstrap (πάνω από 50%) υπολογίσθηκαν για 500 επαναλήψεις και απεικονίζονται στους κόμβους. Η γραμμή κλίμακας δείχνει τον αριθμό των νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων ανά τοποθεσία. Το *B. japonicum* USDA 6<sup>T</sup>, χρησιμοποιήθηκε ως στέλεχος εκτός ομάδας. Το «*R.*» χρησιμοποιήθηκε ως συντομογραφία του ονόματος του γένους, δηλαδή του *Rhizobium*.

**Πίνακας Σ2.2:** Ποσοστά ομοιότητας νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του γονιδίου *atpD* μεταξύ επιλεγμένων στελεχών *Rhizobium*. Τα πλησιέστερα πρότυπα στελέχη εμφανίζονται με έντονη γραφή.

Στελέχη	Ομοιότητα νουκλεοτιδικών αλληλουχιών <i>atpD</i> (%)																									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
1 VFLE5 (MT395846)	100	96,27	96,97	96,04	96,27	96,97	97,67	96,74	88,58	96,97	96,5	94,41	96,74	97,44	96,5	96,97	96,27	94,64	92,54	91,84	96,5	93,94	88,11	87,18	95,1	
2 VFLE2 (MT395845)		100	99,3	96,97	99,53	99,3	98,14	97,67	89,28	97,9	97,44	93,94	98,6	96,04	99,77	99,3	96,74	95,1	93,01	92,31	99,77	93,01	88,81	87,65	94,17	
3 VFLE1 (MT395852)			100	97,67	99,3	100	98,83	98,37	89,51	98,6	98,14	94,64	99,3	96,74	99,53	100	97,44	95,8	93,24	92,54	99,53	93,71	89,04	87,88	94,87	
4 VFKY1 (MT395844)				100	96,97	97,67	97,44	97,9	88,81	99,07	97,67	93,94	97,44	97,2	97,67	96,04	95,8	93,24	92,54	97,2	93,01	89,04	87,18	94,87		
5 VFIM1 (MT395851)					100	99,3	98,14	97,67	89,28	97,9	97,44	93,94	98,6	96,04	99,77	99,3	96,74	95,1	93,01	92,31	99,77	93,01	88,81	87,65	94,17	
6 VFFE2 (MT395850)						100	98,83	98,37	89,51	98,6	98,14	94,64	99,3	96,74	99,53	100	97,44	95,8	93,24	92,54	99,53	93,71	89,04	87,88	94,87	
7 VFEP89 (MT395843)							100	98,14	88,81	98,37	97,9	94,87	98,6	96,97	98,37	98,83	97,2	95,57	92,54	92,31	98,37	93,94	88,34	87,18	95,1	
8 VFEP84 (MT395842)								100	89,51	98,83	99,77	94,64	98,14	96,5	97,9	98,37	96,74	95,57	92,54	91,84	97,9	93,71	89,04	87,88	94,64	
9 VFEP82 (MT395841)									100	89,04	89,28	89,98	89,28	88,34	89,51	89,51	88,81	87,88	88,34	87,65	89,51	89,04	96,04	95,34	88,81	
10 VFEP81 (MT395840)										100	98,6	94,64	98,37	97,2	98,14	98,6	96,97	95,34	92,77	92,07	98,14	93,71	88,58	87,41	94,41	
11 VFEP63 (MT395839)											100	94,41	97,9	96,27	97,67	98,14	96,5	95,34	92,31	91,61	97,67	93,47	88,81	87,65	94,41	
12 VFEP162 (MT395847)												100	94,41	93,47	94,17	94,64	93,47	92,77	92,54	91,84	94,17	99,07	89,51	89,74	93,01	
13 VFCR3 (MT395838)													100	96,5	98,83	99,3	97,67	95,57	93,01	92,31	98,83	93,47	88,81	87,88	94,64	
14 VFCR2 (MT395837)														100	96,27	96,74	96,5	95,1	93,47	92,77	96,27	93,01	88,34	87,18	95,57	
15 VFCR1 (MT395849)															100	99,53	96,97	95,34	93,24	92,54	100	93,24	89,04	87,88	94,41	
16 VFAT24 (MT395848)																100	97,44	95,8	93,24	92,54	99,53	93,71	89,04	87,88	94,87	
17 <i>Rhizobium sophorae</i> CCBAU 03386 <sup>T</sup> (NZ JABFCN01000022)																		100	94,17	92,54	91,84	96,97	92,54	88,34	87,41	94,17
18 <i>Rhizobium ruizarguesonis</i> UPM1133 <sup>T</sup> (MG927326)																			100	93,24	92,54	95,34	91,84	87,88	86,01	93,94
19 <i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA 2370 <sup>T</sup> (AJ294405)																				100	98,83	93,24	91,61	89,04	88,11	92,77
20 <i>Rhizobium leguminosarum</i> sv. <i>trifolii</i> ATCC 14480 <sup>T</sup> (EF113150)																					100	92,54	90,91	88,34	86,95	92,54
21 <i>Rhizobium laguerreae</i> FB206 <sup>T</sup> (NZ MRDM01000011)																						100	93,24	89,04	87,88	94,41
22 <i>Rhizobium hidalgonense</i> FH14 <sup>T</sup> (NZ LODW01000082)																							100	88,58	88,81	92,07
23 <i>Rhizobium grahamii</i> CCGE 502 <sup>T</sup> (JF424612)																								100	94,87	89,28
24 <i>Rhizobium cauense</i> CCBAU 101002 <sup>T</sup> (JQ308329)																									100	87,65
25 <i>Rhizobium anhuiense</i> CCBAU 23252 <sup>T</sup> (NZ ML133533)																										100
	Ομοιότητα νουκλεοτιδικών αλληλουχιών <i>atpD</i> (%)																									



**Εικόνα Σ2.3:** Maximum Likelihood (ML) φυλογενετικό δέντρο βασισμένο σε μερική αλληλουχία τμήματος του γονιδίου *gyrB* (597 bp) δείχνει τις ταξινομικές σχέσεις των υπό μελέτη στελεχών, των αντιπροσωπευτικών πρότυπων στελεχών και των γονιδιωματικών ειδών του συμπλέγματος των ειδών των *Rhizobium*. Οι απομονώσεις της παρούσας εργασίας σημάνθηκαν με έντονη γραφή και τα πρότυπα στελέχη επισημάνθηκαν με εκθέτη "T". Οι κωδικοί εισαγωγής της GenBank των αλληλουχιών δηλώθηκαν εντός παρένθεσης. Η φυλογενετική ανάλυση διεξήχθη στο MEGA 6 χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο ML και το μοντέλο T92 + G. Οι τιμές bootstrap (πάνω από 50%) υπολογίστηκαν για 500 επαναλήψεις και απεικονίζονται στους κόμβους. Η γραμμή κλίμακας δείχνει τον αριθμό των νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων ανά τοποθεσία. Το *B. japonicum* USDA 6<sup>T</sup>, χρησιμοποιήθηκε ως στέλεχος εκτός ομάδας. Το «R.» χρησιμοποιήθηκε ως συντομογραφία του ονόματος του γένους, δηλαδή του *Rhizobium*.

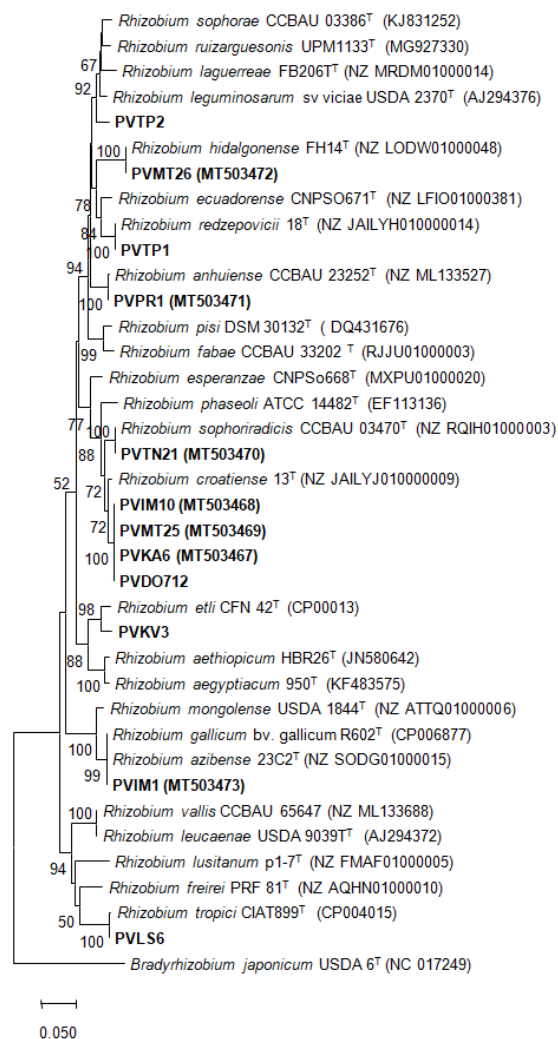
**Πίνακας Σ2.3:** Ποσοστά ομοιότητας νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του γονιδίου *gyrB* μεταξύ επιλεγμένων στελεχών *Rhizobium*. Τα πλησιέστερα πρότυπα στελέχη εμφανίζονται με έντονη γραφή.

Στελέχη	Ομοιότητα των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών <i>gyrB</i> (%)																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1 VFLE5 (MT395862)	100	97,82	96,31	97,15	96,31	96,31	97,49	96,31	83,08	97,32	96,82	92,96	97,65	97,32	96,31	96,31	95,98	<b>96,31</b>	95,81	<b>96,31</b>	92,96	83,92	92,8
2 VFLE2 (MT395861)		100	95,81	98,66	95,81	95,81	98,32	96,48	83,42	98,83	96,98	93,13	98,83	97,15	95,81	95,81	95,81	<b>96,48</b>	96,15	95,81	93,13	84,25	92,96
3 VFLE1 (MT395868)			100	96,15	100	100	96,98	96,82	82,58	96,31	96,65	93,47	96,48	96,31	100	100	95,81	96,31	95,98	<b>100</b>	93,47	83,75	93,47
4 VFKY1 (MT395860)				100	96,15	96,15	97,99	96,82	84,09	99,83	96,98	93,47	99,16	97,15	96,15	96,15	95,81	<b>96,48</b>	96,15	96,15	93,47	84,92	93,3
5 VFIM1 (MT395867)					100	100	96,98	96,82	82,58	96,31	96,65	93,47	96,48	96,31	100	100	95,81	96,31	95,98	<b>100</b>	93,47	83,75	93,47
6 VFPE2 (MT395866)						100	96,98	96,82	82,58	96,31	96,65	93,47	96,48	96,31	100	100	95,81	96,31	95,98	<b>100</b>	93,47	83,75	93,47
7 VFPE89 (MT395859)							100	97,82	83,58	98,16	97,99	93,8	98,49	97,49	96,98	96,98	96,48	96,48	96,98	<b>96,98</b>	93,8	84,42	93,3
8 VFPE84 (MT395858)								100	83,42	96,98	98,99	93,63	96,98	96,65	96,82	96,82	96,65	96,31	96,82	<b>96,82</b>	93,63	84,59	93,47
9 VFPE82 (MT395857)									100	84,25	83,58	83,08	83,92	83,08	82,58	82,58	83,08	82,41	83,75	82,58	83,25	<b>89,45</b>	83,42
10 VFPE81 (MT395856)										100	97,15	93,63	99,33	97,32	96,31	96,31	95,98	96,65	96,31	<b>96,31</b>	93,63	85,09	93,47
11 VFPE63 (MT395855)											100	93,8	97,15	97,15	96,65	96,65	97,15	96,82	<b>97,32</b>	96,65	93,8	84,76	93,63
12 VFPE162 (MT395863)												100	93,63	93,3	93,47	93,47	93,3	92,96	93,97	93,47	<b>99,66</b>	84,76	93,97
13 VFCE3 (MT395854)													100	97,32	96,48	96,48	95,98	<b>96,65</b>	96,31	96,48	93,63	84,76	93,13
14 VFCE2 (MT395853)														100	96,31	96,31	96,31	<b>97,32</b>	96,48	96,31	93,3	84,42	93,13
15 VFCE1 (MT395865)															100	100	95,81	96,31	95,98	<b>100</b>	93,47	83,75	93,47
16 VFAT24 (MT395864)																100	95,81	96,31	95,98	<b>100</b>	93,47	83,75	93,47
17 <i>Rhizobium sophorae</i> CCBAU 03386 <sup>T</sup> (NZ JABFCN010000066)																	100	96,65	96,15	95,81	93,3	84,59	93,13
18 <i>Rhizobium ruizarguesonis</i> UPM1133 <sup>T</sup> (NZ PQIG010000084)																		100	96,15	96,31	92,96	84,09	92,96
19 <i>Rhizobium leguminosarum</i> sv. <i>viciae</i> USDA 2370 <sup>T</sup> (NZ QBLB010000011)																			100	95,98	93,97	84,25	93,3
20 <i>Rhizobium laguerreae</i> FB206 <sup>T</sup> (NZ MRDM010000011)																				100	93,47	83,75	93,47
21 <i>Rhizobium hidalgonense</i> FH14 <sup>T</sup> (NZ NWSY010000030)																					100	84,76	93,97
22 <i>Rhizobium grahamii</i> CCGE 502 <sup>T</sup> (NZ AEYE020000029)																						100	84,42
23 <i>Rhizobium anhuiense</i> CCBAU 23252 <sup>T</sup> (NZ ML133530)																							100
	Ομοιότητα των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών <i>gyrB</i> (%)																						

Πίνακας Σ2.4: Κωδικοί εισαγωγής γονιδίων κατά Genbank.						
Στελέχη	<i>rrs</i>	<i>recA</i>	<i>atpD</i>	<i>gyrB</i>	<i>nodC</i>	<i>nifH</i>
VFLE5	MT370018	MT395830	MT395846	MT395862	MT395877	MT395892
VFLE2	MT370017	MT395829	MT395845	MT395861	MT395876	MT395891
VFLE1	MT370024	MT395836	MT395852	MT395868	MT395883	MT395898
VFKY1	MT370016	MT395828	MT395844	MT395860	MT395875	MT395890
VFIM1	MT370023	MT395835	MT395851	MT395867	MT395882	MT395897
VFFE2	MT370022	MT395834	MT395850	MT395866	MT395881	MT395896
VFEP89	MT370015	MT395827	MT395843	MT395859	MT395874	MT395889
VFEP84	MT370014	MT395826	MT395842	MT395858	MT395873	MT395888
VFEP82	MT370013	MT395825	MT395841	MT395857		
VFEP81	MT370012	MT395824	MT395840	MT395856	MT395872	MT395887
VFEP63	MT370011	MT395823	MT395839	MT395855	MT395871	MT395886
VFEP162	MT370019	MT395831	MT395847	MT395863	MT395878	MT395893
VFCR3	MT370010	MT395822	MT395838	MT395854	MT395870	MT395885
VFCR2	MT370009	MT395821	MT395837	MT395853	MT395869	MT395884
VFCR1	MT370021	MT395833	MT395849	MT395865	MT395880	MT395895
VFAT24	MT370020	MT395832	MT395848	MT395864	MT395879	MT395894



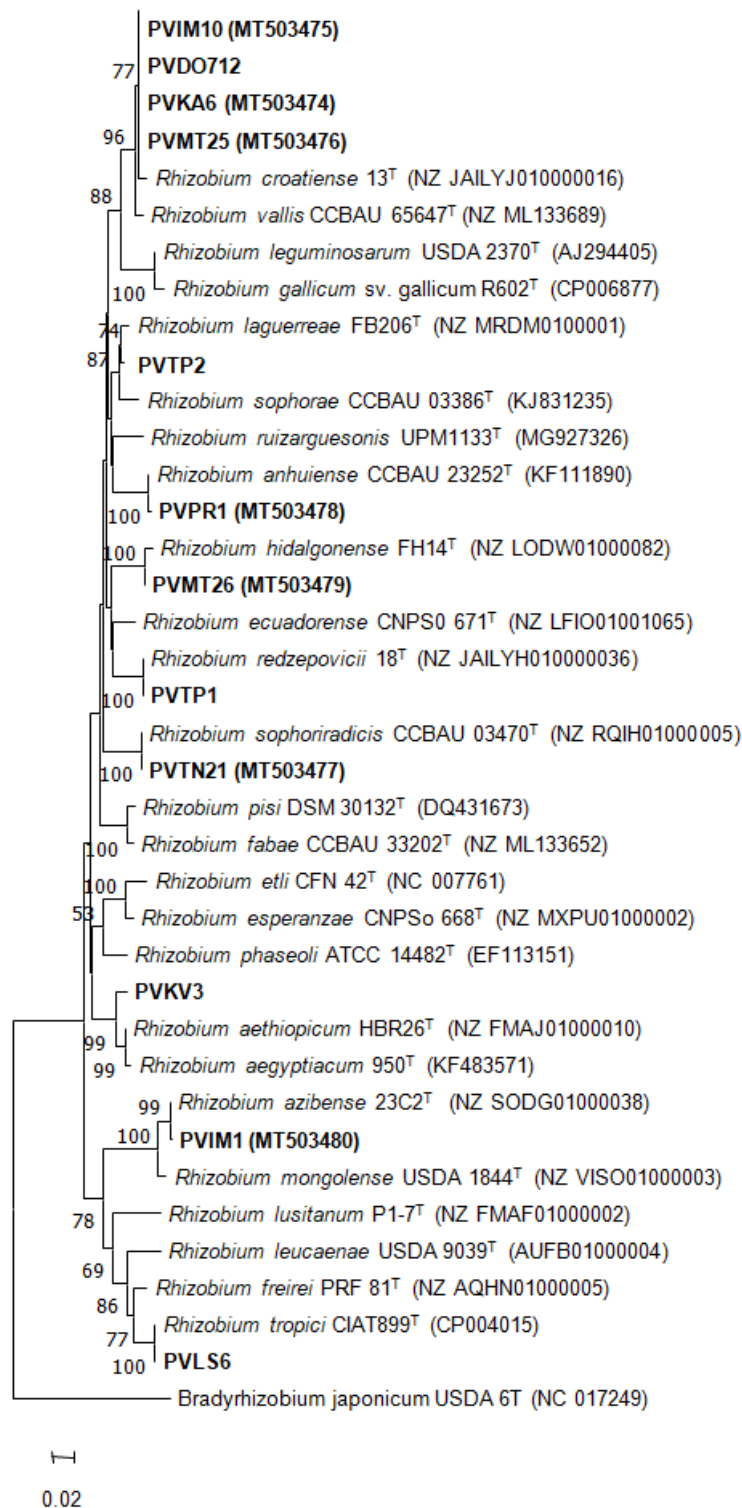
## ΜΕΡΟΣ 2.3.2



**Εικόνα Σ2.4:** Maximum Likelihood (ML) φυλογενετικό δέντρο με βάση την αλληλουχία του γονιδίου *recA* (462 bp). Οι απομονώσεις της παρούσας εργασίας έχουν σημειωθεί με έντονη γραφή και τα πρότυπα στελέχη επισημάνθηκαν με τον εκθέτη “T”. Εντός παρένθεσης γραφήκαν οι αριθμοί εισαγωγής κατά GenBank των αλληλουχιών. Οι τιμές bootstrap (άνω του 50%) υπολογίστηκαν για 500 επαναλήψεις και φαίνονται στους κόμβους. Η φυλογενετική ανάλυση διεξήχθη στο MEGA X χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο maximum likelihood και το μοντέλο Tamura 3-parameter, Gamma rate distribution (T92 + G). Η γραμμική κλίμακα δείχνει τον αριθμό των νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων ανά τοποθεσία. Το *Bradyrhizobium japonicum* USDA 6<sup>T</sup>, χρησιμοποιήθηκε ως στέλεχος εκτός ομάδας.

**Πίνακας Σ2.5:** Ποσοστά ομοιότητας νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του γονιδίου *recA* μεταξύ επιλεγμένων στελεχών *Rhizobium*. Τα πλησιέστερα πρότυπα στελέχη εμφανίζονται με έντονη γραφή.

Στελέχη	Ομοιότητα νουκλεοτιδικών αλληλουχιών <i>recA</i> (%)																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1 PVDO712	100	100	90,91	86,8	88,53	100	89,83	91,77	97,4	91,34	91,13	100	91,99	88,53	<b>98,7</b>	90,69	89,83	91,77	91,34	97,4	86,58	
2 PVKA6 (MT503467)		100	90,91	86,8	88,53	100	89,83	91,77	97,4	91,34	91,13	100	91,99	88,53	<b>98,7</b>	90,69	89,83	91,77	91,34	97,4	86,58	
3 PVKV3			100	87,45	88,1	90,91	90,04	90,48	90,48	90,26	90,48	90,91	90,69	88,1	91,34	<b>97,19</b>	90,04	90,48	90,26	90,48	87,23	
4 PVLS6				100	86,36	86,8	86,8	87,45	87,45	87,23	86,58	86,8	87,66	86,36	87,45	87,45	86,8	87,66	87,23	87,45	<b>99,78</b>	
5 PVIM1 (MT503473)					100	88,53	87,45	89,61	88,1	88,53	89,83	88,53	89,39	<b>100</b>	88,74	87,88	87,45	89,61	88,53	88,1	86,58	
6 PVMT25 (MT503469)						100	89,83	91,77	97,4	91,34	91,13	100	91,99	88,53	<b>98,7</b>	90,69	89,83	91,77	91,34	97,4	86,58	
7 PVMT26 (MT503472)							100	92,64	89,61	93,51	92,64	89,83	92,42	87,45	90,04	90,04	<b>100</b>	93,07	93,51	89,61	86,58	
8 PVPR1 (MT503471)								100	91,77	94,37	94,37	91,77	<b>99,78</b>	89,61	91,99	91,34	92,64	94,59	94,37	91,77	87,23	
9 PVTN21 (MT503470)									100	91,13	90,91	97,4	91,99	88,1	97,84	90,48	89,61	91,34	91,13	<b>100</b>	87,23	
10 PVTP1										100	94,59	91,34	94,16	88,53	91,56	90,91	93,51	94,59	<b>100</b>	91,13	87,01	
11 PVTP2											100	91,13	94,16	89,83	91,34	91,13	92,64	<b>97,19</b>	94,59	90,91	86,36	
12 PVIM10 (MT503468)												100	91,99	88,53	<b>98,7</b>	90,69	89,83	91,77	91,34	97,4	86,58	
13 <i>Rhizobium anhuiense</i> CCBAU 23252 <sup>T</sup> (NZ ML133527)														100	89,39	92,21	91,56	92,42	94,37	94,16	91,99	87,45
14 <i>Rhizobium azibense</i> 23C2 <sup>T</sup> (NZ SODG01000015)															100	88,74	87,88	87,45	89,61	88,53	88,1	86,58
15 <i>Rhizobium croatiense</i> 13 <sup>T</sup> (NZ JAILY010000009)																100	91,13	90,04	91,99	91,56	97,84	87,23
16 <i>Rhizobium etli</i> CFN 42 <sup>T</sup> (CP00013)																	100	90,04	90,69	90,91	90,48	87,23
17 <i>Rhizobium hidalgonense</i> FH14 <sup>T</sup> (NZ LODW01000048)																		100	93,07	93,51	89,61	86,58
18 <i>Rhizobium leguminosarum</i> sv. <i>viciae</i> USDA 2370 <sup>T</sup> (AJ294376)																			100	94,59	91,34	87,45
19 <i>Rhizobium redzepevicii</i> 18 <sup>T</sup> (NZ JAILY010000014)																				100	91,13	87,01
20 <i>Rhizobium sophoriradicis</i> CCBAU 03470 <sup>T</sup> (NZ RQIH01000003)																					100	87,23
21 <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 <sup>T</sup> (CP004015)																						100
<b>Ομοιότητα νουκλεοτιδικών αλληλουχιών <i>recA</i> (%)</b>																						

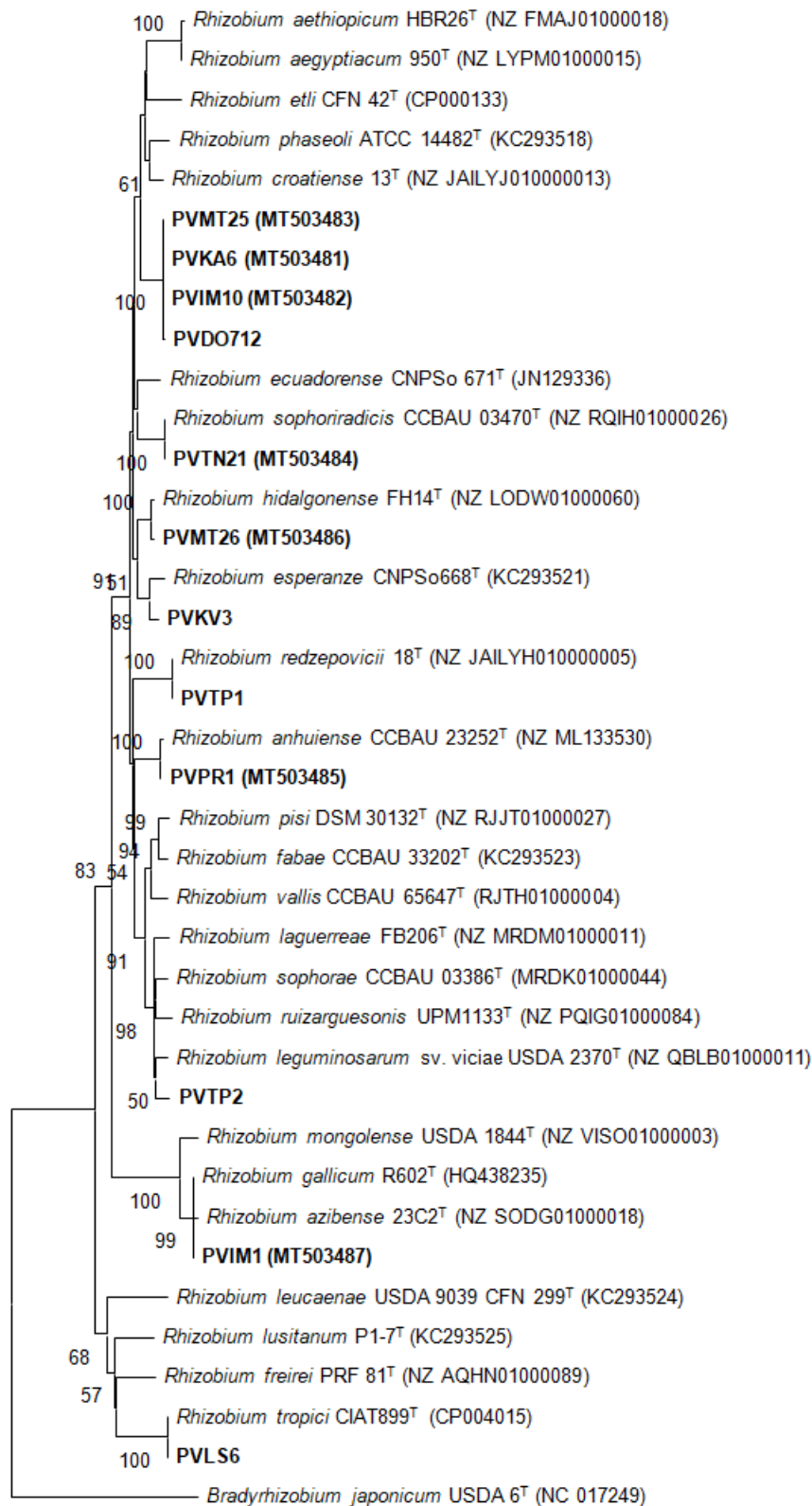


**Εικόνα Σ2.5:** Maximum

Likelihood (ML) φυλογενετικό δέντρο με βάση την αλληλουχία του γονιδίου *atpD* (450 bp) για την ανάδειξη των φυλογενετικών σχέσεων των απομονώσεων φασολιάς σε σχέση με πρότυπα στελέχη του ίδιου γένους. Οι απομονώσεις της παρούσας εργασίας έχουν σημειωθεί με έντονη γραφή και τα πρότυπα στελέχη επισημάνθηκαν με τον εκθέτη "T". Εντός παρένθεσης γραφήκαν οι αριθμοί εισαγωγής κατά GenBank των αλληλουχιών. Οι τιμές bootstrap (άνω του 50%) υπολογίστηκαν για 500 επαναλήψεις και φαίνονται στους κόμβους. Η φυλογενετική ανάλυση διεξήχθη στο MEGA X, χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο maximum likelihood και το μοντέλο Tamura-Nei, Gamma rate distribution (TN93 + G). Η γραμμική κλίμακα δείχνει τον αριθμό των νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων ανά θέση. Το *Bradyrhizobium japonicum* USDA 6<sup>T</sup>, χρησιμοποιήθηκε ως στέλεχος εκτός ομάδας.

**Πίνακας Σ2.6:** Ποσοστά ομοιότητας νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του γονιδίου *atpD* μεταξύ επιλεγμένων στελεχών *Rhizobium*. Τα πλησιέστερα πρότυπα στελέχη εμφανίζονται με έντονη γραφή.

Στελέχη	Ομοιότητα των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών <i>atpD</i> (%)																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1 PVDO712	100	100	90,91	86,8	88,53	100	89,83	91,77	97,4	91,34	91,13	100	89,83	89,61	91,99	<b>98,7</b>	89,83	90,04	91,34	97,4	86,58
2 PVKA6 (MT503474)		100	90,91	86,8	88,53	100	89,83	91,77	97,4	91,34	91,13	100	89,83	89,61	91,99	<b>98,7</b>	89,83	90,04	91,34	97,4	86,58
3 PVKV3			100	87,45	88,1	90,91	90,04	90,48	90,48	90,26	90,48	90,91	93,72	<b>94,37</b>	90,69	91,34	90,04	89,61	90,26	90,48	87,23
4 PVLS6				100	86,36	86,8	86,8	87,45	87,45	87,23	86,58	86,8	87,01	87,01	87,66	87,45	86,8	87,45	87,23	87,45	<b>99,78</b>
5 PVIM1 (MT503480)					100	88,53	87,45	89,61	88,1	88,53	89,83	88,53	88,53	88,53	<b>89,39</b>	88,74	87,45	88,74	88,53	88,1	86,58
6 PVMT25 (MT503476)						100	89,83	91,77	97,4	91,34	91,13	100	89,83	89,61	91,99	<b>98,7</b>	89,83	90,04	91,34	97,4	86,58
7 PVMT26 (MT503479)							100	92,64	89,61	93,51	92,64	89,83	89,39	89,61	92,42	90,04	<b>100</b>	91,77	93,51	89,61	86,58
8 PVPR1 (MT503478)								100	91,77	94,37	94,37	91,77	91,77	91,56	<b>99,78</b>	91,99	92,64	93,72	94,37	91,77	87,23
9 PVTN21 (MT503477)									100	91,13	90,91	97,4	89,39	89,18	91,99	97,84	89,61	90,04	91,13	<b>100</b>	87,23
10 PVTP1										100	94,59	91,34	90,91	90,69	94,16	91,56	93,51	93,29	<b>100</b>	91,13	87,01
11 PVTP2											100	91,13	91,56	91,34	94,16	91,34	92,64	<b>95,45</b>	94,59	90,91	86,36
12 PVIM10 (MT503475)												100	89,83	89,61	91,99	<b>98,7</b>	89,83	90,04	91,34	97,4	86,58
13 <i>Rhizobium aegyptiacum</i> 950 <sup>T</sup> (KF483571)													100	98,7	91,56	90,04	89,39	89,61	90,91	89,39	86,8
14 <i>Rhizobium aethiopicum</i> HBR26 <sup>T</sup> (NZ FMAJ01000010)														100	91,34	90,26	89,61	89,61	90,69	89,18	86,8
15 <i>Rhizobium anhuiense</i> CCBAU 23252 <sup>T</sup> (KF111890)															100	92,21	92,42	93,51	94,16	91,99	87,45
16 <i>Rhizobium croatiense</i> 13 <sup>T</sup> (NZ JAILY010000016)																100	90,04	90,26	91,56	97,84	87,23
17 <i>Rhizobium hidalgonense</i> FH14 <sup>T</sup> (NZ LODW01000082)																	100	91,77	93,51	89,61	86,58
18 <i>Rhizobium laguerreae</i> FB206 <sup>T</sup> (NZ MRDM0100001)																		100	93,29	90,04	87,23
19 <i>Rhizobium redzeponicijii</i> 18 <sup>T</sup> (NZ JAILY010000036)																			100	91,13	87,01
20 <i>Rhizobium sophoriradicis</i> CCBAU 03470 <sup>T</sup> (NZ RQIH01000005)																				100	87,23
21 <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 <sup>T</sup> (CP004015)																					100
	Ομοιότητα των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών <i>atpD</i> (%)																				



**Εικόνα Σ2.6:** Maximum Likelihood (ML) φυλογενετικό δέντρο με βάση την αλληλουχία του γονιδίου *gyrB* (594 bp), από όπου προκύπτουν οι ταξινομικές σχέσεις των απομονώσεων σε σχέση με άλλα πρότυπα στελέχη. Οι απομονώσεις της παρούσας εργασίας έχουν σημειωθεί με έντονη γραφή και τα πρότυπα στελέχη επισημάνθηκαν με τον εκθέτη "T". Εντός παρένθεσης αναφέρονται οι αριθμοί εισαγωγής κατά GenBank των αλληλουχιών. Οι τιμές bootstrap (άνω του 50%) υπολογίστηκαν για 500 επαναλήψεις και φαίνονται στους κόμβους. Η φυλογενετική ανάλυση διεξήχθη στο MEGA X, χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο maximum likelihood και το μοντέλο Tamura 3-parameter, Gamma rate distribution (T92 + G). Η γραμμική κλίμακα δείχνει τον αριθμό των νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων ανά θέση.

**Πίνακας Σ2.7:** Ποσοστά ομοιότητας νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του γονιδίου *gyrB* μεταξύ επιλεγμένων στελεχών *Rhizobium*. Τα πλησιέστερα πρότυπα στελέχη εμφανίζονται με έντονη γραφή.

Στελέχη	Ομοιότητα των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών <i>gyrB</i> (%)																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1 PVDO712	100	100	90,91	86,8	88,53	100	89,83	91,77	97,4	91,34	91,13	100	91,99	88,53	<b>98,7</b>	96,32	88,53	89,83	91,77	91,34	97,4	86,58
2 PVKA6 (MT503481)		100	90,91	86,8	88,53	100	89,83	91,77	97,4	91,34	91,13	100	91,99	88,53	<b>98,7</b>	96,32	88,53	89,83	91,77	91,34	97,4	86,58
3 PVKV3			100	87,45	88,1	90,91	90,04	90,48	90,48	90,26	90,48	90,91	90,69	88,1	<b>91,34</b>	90,91	88,1	90,04	90,48	90,26	90,48	87,23
4 PVLS6				100	86,36	86,8	86,8	87,45	87,45	87,23	86,58	86,8	87,66	86,36	87,45	87,01	86,36	86,8	87,66	87,23	87,45	<b>99,78</b>
5 PVIM1 (MT503487)					100	88,53	87,45	89,61	88,1	88,53	89,83	88,53	89,39	100	88,74	90,26	<b>100</b>	87,45	89,61	88,53	88,1	86,58
6 PVMT25 (MT503483)						100	89,83	91,77	97,4	91,34	91,13	100	91,99	88,53	<b>98,7</b>	96,32	88,53	89,83	91,77	91,34	97,4	86,58
7 PVMT26 (MT503486)							100	92,64	89,61	93,51	92,64	89,83	92,42	87,45	90,04	90,69	87,45	<b>100</b>	93,07	93,51	89,61	86,58
8 PVPR1 (MT503485)								100	91,77	94,37	94,37	91,77	<b>99,78</b>	89,61	91,99	93,72	89,61	92,64	94,59	94,37	91,77	87,23
9 PVTN21 (MT503484)									100	91,13	90,91	97,4	91,99	88,1	97,84	94,59	88,1	89,61	91,34	91,13	<b>100</b>	87,23
10 PVTP1										100	94,59	91,34	94,16	88,53	91,56	92,21	88,53	93,51	94,59	<b>100</b>	91,13	87,01
11 PVTP2											100	91,13	94,16	89,83	91,34	92,42	89,83	92,64	<b>97,19</b>	94,59	90,91	86,36
12 PVIM10 (MT503482)												100	91,99	88,53	<b>98,7</b>	96,32	88,53	89,83	91,77	91,34	97,4	86,58
13 <i>Rhizobium anhuiense</i> CCB AU 23252 <sup>T</sup> (NZ ML133530)													100	89,39	92,21	93,51	89,39	92,42	94,37	94,16	91,99	87,45
14 <i>Rhizobium azibense</i> 23C2 <sup>T</sup> (NZ SODG01000018)															100	88,74	90,26	100	87,45	89,61	88,53	88,1
15 <i>Rhizobium croatiense</i> 13 <sup>T</sup> (NZ JAILY010000013)																100	95,89	88,74	90,04	91,99	91,56	97,84
16 <i>Rhizobium esperanze</i> CNPSo668 <sup>T</sup> (KC293521)																100	90,26	90,69	93,07	92,21	94,59	86,8
17 <i>Rhizobium gallicum</i> R602 <sup>T</sup> (HQ438235)																	100	87,45	89,61	88,53	88,1	86,58
18 <i>Rhizobium hidalgonense</i> FH14 <sup>T</sup> (NZ LODW01000060)																		100	93,07	93,51	89,61	86,58
19 <i>Rhizobium leguminosarum</i> sv. <i>viciae</i> USDA 2370 <sup>T</sup> (NZ QBLB01000011)																			100	94,59	91,34	87,45
20 <i>Rhizobium redzepevicii</i> 18 <sup>T</sup> (NZ JAILY010000005)																				100	91,13	87,01
21 <i>Rhizobium sophoriradicis</i> CCB AU 03470 <sup>T</sup> (NZ RQIH010000026)																					100	87,23
22 <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 <sup>T</sup> (CP004015)																						100
	<b>Ομοιότητα των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών <i>gyrB</i> (%)</b>																					

<b>Πίνακας Σ2.8:</b> Κωδικοί εισαγωγής γονιδίων κατά Genbank.							
Στελέχη	<i>rrs</i>	<i>recA</i>	<i>atpD</i>	<i>gyrB</i>	<i>glnII</i>	<i>nodC</i>	<i>nifH</i>
PVIM1	MT476934	MT503473	MT503480	MT503487	MT503494	MT503501	MT503508
PVIM10	MT476929	MT503468	MT503475	MT503482	MT503489	MT503496	MT503503
PVKA6	MT476928	MT503467	MT503474	MT503481	MT503488	MT503495	MT503502
PVMT25	MT476930	MT503469	MT503476	MT503483	MT503490	MT503497	MT503504
PVMT26	MT476933	MT503472	MT503479	MT503486	MT503493	MT503500	MT503507
PVPR1	MT476932	MT503471	MT503478	MT503485	MT503492	MT503499	MT503506
PVTN21	MT476931	MT503470	MT503477	MT503484	MT503491	MT503498	MT503505

Πίνακας Σ2.10: Παρουσίαση διαφόρων στελεχών φυλογενετικά κοντά με τις <i>Rhizobium</i> απομονώσεις της φασολιάς ανά τον κόσμο.				
Αντιπροσωπευτικά στελέχη (MLSA-κλάδος)	Πρότυπο Στέλεχος Κλάδου MLSA	Στελέχη <i>Rhizobium</i>	Αριθμοί καταλογράφησης ( <i>recA/atpD</i> )	Γεωγραφική Περιοχή
PVTP1 (1)	<i>Rhizobium redzeponicii</i> 18T <sup>†</sup>		MK753131/ MK753119	Κροατία
		<i>Rhizobium leguminosarum</i> CCBAU 65673	EU622113/ EU617989	Κίνα
		<i>Rhizobium</i> sp. L40	MH561784/ MH561772	Κίνα
		<i>Rhizobium leguminosarum</i> ANU843	HQ394253/ HQ394214	Ισπανία
PVMT26 (2)	<i>Rhizobium hidalgonense</i> FH14 <sup>†</sup>		LODW01000048/LODW01000082	Μεξικό
		<i>Rhizobium leguminosarum</i> NH05	KJ921109/ KJ921077	Μεξικό
		<i>Rhizobium</i> sp LCS0303	GQ863535/ GQ863524	Ισπανία
		<i>Rhizobium</i> sp RPVR24	GQ863533/ GQ863522.1	Ισπανία
		<i>Rhizobium</i> sp LCS0401	GQ863536/ GQ863525	Ισπανία
		<i>Rhizobium</i> sp LCS0411	GQ863538/ GQ863527	Ισπανία
		<i>Rhizobium</i> sp LBM1123	JF792209/ JF792196	Ισπανία
		<i>Rhizobium</i> sp LBM1212	JF792206/ JF792193	Ισπανία
		<i>Rhizobium</i> sp LEV0613	JF792211/ JF792198	Ισπανία
		<i>Rhizobium leguminosarum</i> Hm1	KU175243/ KU176950	Ιράν
		<i>Rhizobium hidalgonense</i> 26T	MK753133/ MK753121	Κροατία
		<i>Rhizobium hidalgonense</i> 25T	MK753132/ MK753120	Κροατία
		<i>Rhizobium leguminosarum</i> CCBAU 65761	EU622114/ EU617990	Κίνα
		<i>Rhizobium</i> sp. NAK 327	MG288731/ MG288762	Κένυα
<i>Rhizobium</i> sp. NAK 321	MG288730/ MG288761	Κένυα		
<i>Rhizobium</i> sp. NAK 334	MF065960/ MG288764	Κένυα		
PVPR1 (3)	<i>Rhizobium anhuiense</i> CCBAU 23252 <sup>†</sup>		NZ ML133527/ KF111890	Κίνα
		<i>Rhizobium leguminosarum</i> L13	KF787844/ KF787806	Κίνα
		<i>Rhizobium</i> sp. 1627	KR262771/ KR262731	Κίνα
		<i>Rhizobium etli</i> NC10	KX573670/ KX573305	Κίνα
		<i>Rhizobium leguminosarum</i> L6	KF787842/ KF787804	Κίνα
		<i>Rhizobium leguminosarum</i> M8	KF787854/ KF787816	Κίνα
		<i>Rhizobium anhuiense</i> JX3	NWSM01000001/NWSM01000011	Κίνα
		<i>Rhizobium anhuiense</i> J3	NWSJ01000009/ NWSJ01000014	Κίνα
		<i>Rhizobium anhuiense</i> Y27	NWSL01000011/ NWSL01000010	Κίνα
		<i>Rhizobium anhuiense</i> S10	NWSK01000016/NWSK01000015	Κίνα



		<i>Rhizobium leguminosarum</i> LPA1410	JF792212/ JF792199	Ισπανία
		<i>Rhizobium</i> sp. CTG-416	JX971664/ JX971672	Τουρκία
PVTP2 (4)				
PVKV3 (5)		<i>Rhizobium aethiopicum</i> HBR26 <sup>T</sup>	FMAJ01000001/FMAJ01000010	Αιθιοπία
		<i>Rhizobium</i> sp. NAK 245	MF065955/ MG288750	Κένυα
PVTN21 (6)		<i>Rhizobium sophoriradicis</i> CCBAU 03470 <sup>T</sup>	RQIH01000003/ RQIH01000005	Κίνα
		<i>Rhizobium</i> sp. 1532	KR262767/KR262727	Κίνα
		<i>Rhizobium sophoriradicis</i> JJW1	NXDN01000005/ NXDN01000032	Κίνα
		<i>Rhizobium sophoriradicis</i> L101	NXDM01000001/ NXDM01000002	Κίνα
		<i>Rhizobium</i> sp. 1587	KR262770/ KR262729	Κίνα
		<i>Rhizobium</i> sp. 1617	KR262782/ KR262742	Κίνα
		<i>Rhizobium etli</i> IE4794	AY907454/ AY907435	Μεξικό
		<i>Rhizobium etli</i> IE950	AY907460/ AY907444	Μεξικό
		<i>Rhizobium sophoriradicis</i> IE4803	CP007641/CP007641	Μεξικό
		<i>Rhizobium etli</i> IE4874	AY907462/ AY907443	Μεξικό
		<i>Rhizobium</i> sp. CTG-430	JX971668/ JX971676	Τουρκία
		<i>Rhizobium</i> sp. CTG-423	JX971666/ JX971674	Τουρκία
		<i>Rhizobium</i> sp. Kim5	CP021124/CP021124	ΗΠΑ
		<i>Rhizobium</i> sp. NAK 368	MG288736/ MG288770	Κένυα
		<i>Rhizobium</i> sp. NAK 378	MG288737/ MG288771	Κένυα
	<i>Rhizobium</i> sp. RHM67	JQ085279/ JQ085258	Μαρόκο	
	<i>Rhizobium</i> sp. RHM19	JQ085276/ JQ085255	Μαρόκο	
PVMT25, PVKA6, PVIM10, PVDO712 (7)		<i>Rhizobium croatiense</i> 13T <sup>T</sup>	MK753129/ MK753117	Κροατία
		<i>Rhizobium croatiense</i> 9T	MK753128/ MK753116	Κροατία
		<i>Rhizobium</i> sp. 1706	KR262773/ KR262733	Κίνα
		<i>Rhizobium</i> sp. 1648	KR262783/ KR262743	Κίνα
		<i>Rhizobium</i> sp. 1652	KR262768/KR262730	Κίνα
		<i>Rhizobium</i> sp M1	NWSW01000018/NWSW0100001	Κίνα
		<i>Rhizobium</i> sp M10	NWTA01000003/NWTA01000005	Κίνα
		<i>Rhizobium etli</i> B1	KU175241/ KU176948	Ιράν
		<i>Rhizobium etli</i> G2	KU175242/ KU176949	Ιράν
		<i>Rhizobium etli</i> CFN 42 <sup>T</sup>	NC 007761/ NC 007761	Μεξικό
		<i>Rhizobium</i> sp. CTG-412	JX971663/ JX971671	Τουρκία
		<i>Rhizobium</i> sp. CTG-419	JX971665/ JX971673	Τουρκία
	<i>Rhizobium etli</i> GR12	AY907361/ AY907375	Ισπανία	
PVIM1 (8)		<i>Rhizobium azibense</i> 23C2 <sup>T</sup>	SODG01000015/ SODG01000038	Τυνησία

		<i>Rhizobium</i> sp.Gr42	SMBJ01000016/SMBJ01000007	Ισπανία
		<i>Rhizobium</i> sp.8C-3	NZ CP017241/NZ CP017241	Ισπανία
		<i>Rhizobium</i> sp.IE4868	SMBK01000025/ SMBK01000008	Μεξικό
PVLS6 (9)	<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 <sup>T</sup>		CP004015/ CP004015	Κολομβία
		<i>Rhizobium tropici</i> RHM14	JQ085274/ JQ085253	Μαρόκο
		<i>Rhizobium tropici</i> / Hm7	KU175244/ KU176951	Ιράν
		<i>Rhizobium freirei</i> PRF 81 <sup>T</sup>	AQHN01000010/ AQHN01000005	Βραζιλία
		<i>Rhizobium</i> sp. LBP2-2	JX855198/ JX855208	Μεξικό
		<i>Rhizobium vallis</i> CCBAU 65647	ML133688/ ML133689	Κίνα
		<i>Rhizobium leucaenae</i> USDA 9039 <sup>T</sup>	LNCJ01000010/LNCJ01000004	Βραζιλία

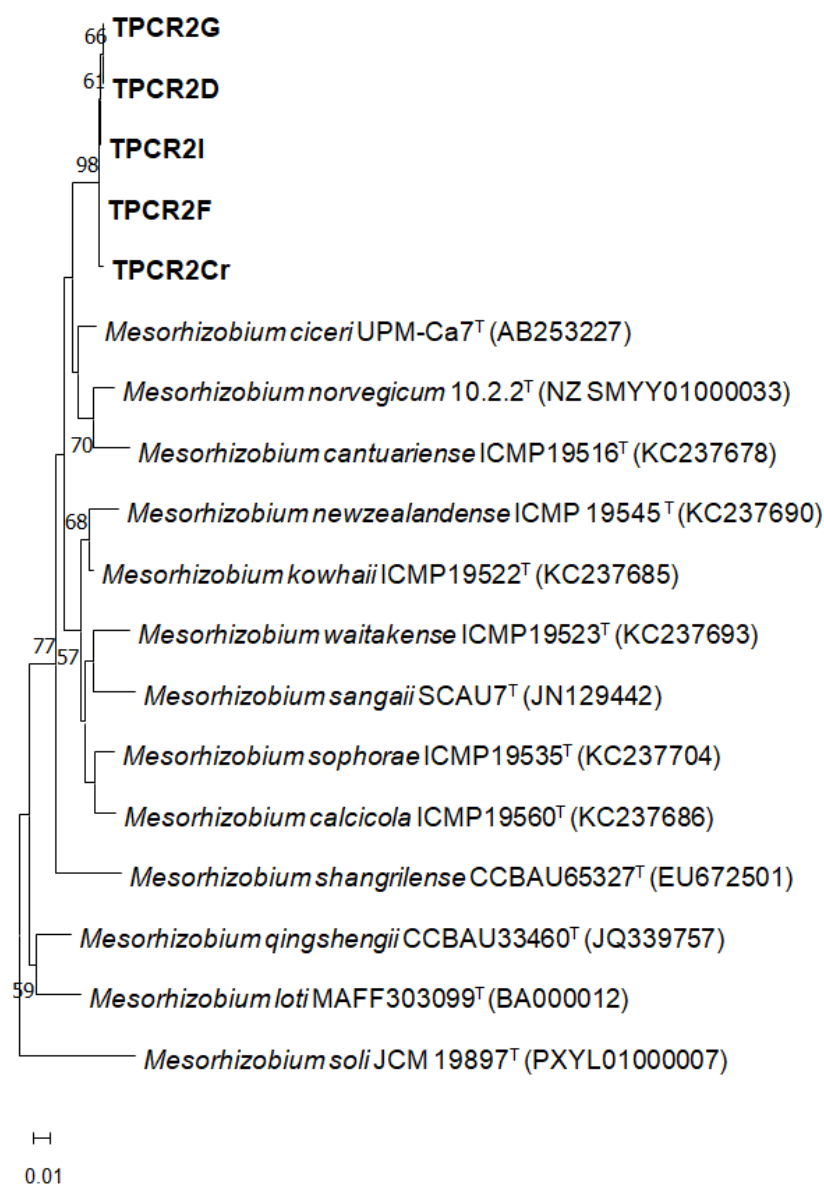
**Πίνακας Σ2.11:** Χαρακτηρισμός ριζοβιακών στελεχών φασολιάς και φυλογενετική συσχέτιση αυτών σε σχέση με τα πλησιέστερα στελέχη αναφοράς του γένους.

Τα πιο συγγενικά είδη (ομοιότητα ακολουθίας, %)											
Αντιπροσωπευτικό Στέλεχος	BOX πρότυπο	Αριθμός απομονώσεων	MLSA κλάδοι	16S	<i>recA</i>	<i>atpD</i>	<i>gyrB</i>	MLSA	<i>sv</i>	αλληλόμορφο <i>nodC</i>	Γεωγραφική περιοχή
PVKA6	1	6	7	R.ec CNPSO 671 <sup>T</sup> ; R. fa CCBAU 33202 <sup>T</sup> ; R. pi DSM 30132 <sup>T</sup> (99,92%)	R. cr 13 <sup>T</sup> (98,7%)	R. cr 13 <sup>T</sup> (98,7%)	R. cr 13 <sup>T</sup> (98,7%)	R. cr 13 <sup>T</sup> (97,39%)	phaseoli	α	Κάρπαθος
PVIM10	1	1	7	R.ec CNPSO 671 <sup>T</sup> ; R. fa CCBAU 33202 <sup>T</sup> ; R. pi DSM 30132 <sup>T</sup> (99,92%)	R. cr. 13 <sup>T</sup> (98,7%)	R. cr. 13 <sup>T</sup> (98,7%)	R. cr 13 <sup>T</sup> (98,7%)	R. cr 13 <sup>T</sup> (97,39%)	phaseoli	α	Ημαθία
PVMT25	2	1	7	R.ec CNPSO 671 <sup>T</sup> ; R. fa CCBAU 33202 <sup>T</sup> ; R. pi DSM 30132 <sup>T</sup> (99,92%)	R. cr. 13 <sup>T</sup> (98,7%)	R. cr. 13 <sup>T</sup> (98,7%)	R. cr 13 <sup>T</sup> (98,7%)	R. cr 13 <sup>T</sup> (97,39%)	phaseoli	α	Μέτσοβο
PVDO712	3	14	7	R.ec CNPSO 671 <sup>T</sup> ; R. fa CCBAU 33202 <sup>T</sup> ; R. pi DSM 30132 <sup>T</sup> (99,92%)	R. cr. 13 <sup>T</sup> (98,7%)	R. cr. 13 <sup>T</sup> (98,7%)	R. cr 13 <sup>T</sup> (98,7%)	R. cr 13 <sup>T</sup> (97,39%)	phaseoli	α	Δομοκός
PVTN21	4	23	6	R. so. CCBAU 03470 <sup>T</sup> (99,92%)	R. so. CCBAU 03470 <sup>T</sup> (100%)	R. so. CCBAU 03470 <sup>T</sup> (100%)	R. so. CCBAU 03470 <sup>T</sup> (100%)	R. so. CCBAU 03470 <sup>T</sup> (100%)	phaseoli	γ-b	Τήνος
PVPR1	5	5	3	R. hi FH14 <sup>T</sup> ; R. la. FB206 <sup>T</sup> ; Rlv. USDA 2370 <sup>T</sup> ; R.ru.UMP1133 <sup>T</sup> ; R.sop.CCBAU 03386 <sup>T</sup> (100%)	R. an. CCBAU 23252 <sup>T</sup> (99,78%)	R. an. CCBAU 23252 <sup>T</sup> (99,78%)	R. an. CCBAU 23252 <sup>T</sup> (99,78%)	R. an. CCBAU 23252 <sup>T</sup> (99,8%)	phaseoli	γ-b	Πρέβεζα
PVMT26	6	7	2	R. hi FH14 <sup>T</sup> ; R. la. FB206 <sup>T</sup> ; Rlv. USDA 2370 <sup>T</sup> ; R.ru.UMP1133 <sup>T</sup> ; R.sop.CCBAU 03386 <sup>T</sup> (100%)	R. hi FH14 <sup>T</sup> (100%)	R. hi FH14 <sup>T</sup> (100%)	R. hi FH14 <sup>T</sup> (100%)	R. hi FH14 <sup>T</sup> (99,53%)	phaseoli	γ-a	Μέτσοβο

PVTP1	7	2	1	R. re.18 <sup>T</sup> (100%)	R. re. 18 <sup>T</sup> (100%)	R. re. 18 <sup>T</sup> (100%)	R. re. 18 <sup>T</sup> (100%)	R. re. 18 <sup>T</sup> (100%)	phaseoli	α	Τρίπολη
PVTP2	8	1	4	R. re.18 <sup>T</sup> (99,92%)	Rlv. USDA 2370 <sup>T</sup> (97,19%)	Rlv. USDA 2370 <sup>T</sup> (95,45%)	Rlv. USDA 2370 <sup>T</sup> (97,19%)	R.sop CCBAU 03386 <sup>T</sup> (96,85%)	phaseoli	γ-a	Τρίπολη
PVKV3	9	9	5	Rlv USDA .BLR27 <sup>T</sup> (99,84%)	R. et CFN 42 <sup>T</sup> (97,19%)	R. ae. HBR26 <sup>T</sup> (94,37%)	R.es. CNPSo668 <sup>T</sup> (90,96%)	R. et CFN 42 <sup>T</sup> (94,11%)	phaseoli	α	Καβάλα
PVIM1	10	1	8	R. ya.SH22623 <sup>T</sup> (99,92%)	R. az.23C2 <sup>T</sup> (100%)	R.an. CCBAU 23252 <sup>T</sup> (89,39%)	R. ga.R602 <sup>T</sup> (100%)	R. az.23C2 <sup>T</sup> (99,73%)	gallicum	N/A	Ημαθία
PVLS6	11	6	9	R. tr. CIAT899 <sup>T</sup> (99,51%)	R. tr. CIAT899 <sup>T</sup> (99,78%)	R. tr. CIAT899 <sup>T</sup> (99,78%)	R. tr. CIAT899 <sup>T</sup> (99,78%)	R. tr. CIAT899 <sup>T</sup> (99,93%)	tropici	N/A	Λέσβος

Συντομογραφίες: R. ec, *Rhizobium ecuadorensis*; R. fa, *Rhizobium fabae*; R. pi, *Rhizobium pisi*; R. cr, *Rhizobium croatiense*; R. so, *Rhizobium sophoriradicis*; R.hi, *Rhizobium hidalgonense*; R. an, *Rhizobium anhuiense*; R. la, *Rhizobium laguerreae*; Rlv, *Rhizobium leguminosarum* sv. viciae; R.ru, *Rhizobium ruizarguesonis*; R.sop, *Rhizobium sophorae*, R. re, *Rhizobium redzeponicij*, R. et, *Rhizobium etli*; R. ae, *Rhizobium aethiopicum*; R.es, *Rhizobium esperanze*; R. ga, *Rhizobium gallicum*; R.az, *Rhizobium azibense*; R.tr, *Rhizobium tropici*.

### ΜΕΡΟΥΣ 2.3.4



**Εικόνα Σ2.7:**Neighbor-joining (NJ) φυλογενετικό δέντρο με βάση την τμήμα του γονιδίου *recA* (316 bp), από όπου προκύπτουν οι ταξινομικές σχέσεις των απομονώσεων σε σχέση με άλλα πρότυπα στελέχη *Mesorhizobium*. Οι απομονώσεις της παρούσας εργασίας έχουν σημειωθεί με έντονη γραφή και τα πρότυπα στελέχη επισημάνθηκαν με τον εκθέτη "T". Εντός παρένθεσης αναφέρονται οι αριθμοί εισαγωγής κατά GenBank των αλληλουχιών. Οι τιμές bootstrap (άνω του 50%) υπολογίστηκαν για 500 επαναλήψεις και φαίνονται στους κόμβους. Η φυλογενετική ανάλυση διεξήχθη στο MEGA X. Η γραμμική κλίμακα δείχνει τον αριθμό των νουκλεοτιδικών υποκαταστάσεων ανά θέση.

**Πίνακας Σ2.12:** Ποσοστά ομοιότητας νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του γονιδίου *recA* μεταξύ επιλεγμένων στελεχών *Mesorhizobium*. Τα πλησιέστερα πρότυπα στελέχη εμφανίζονται με έντονη γραφή.

Στελέχη	Ποσοστά ομοιότητας αλληλουχίας <i>recA</i> (%)																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1 TPCR2I	100	99,68	99,68	99,68	99,37	94,3	95,89	95,25	88,29	93,99	93,35	92,72	93,99	92,41	95,57	<b>96,84</b>	94,62	96,52
2 TPCR2G		100	99,68	100	99,37	94,62	95,89	95,25	88,29	94,3	93,35	92,72	93,99	92,41	95,57	<b>96,84</b>	94,62	96,52
3 TPCR2F			100	99,68	94,3	96,2	95,57	88,61	93,99	93,67	93,04	94,3	92,72	95,89	<b>97,15</b>	94,94	96,84	
4 TPCR2D				100	99,37	94,62	95,89	95,25	88,29	94,3	93,35	92,72	93,99	92,41	95,57	<b>96,84</b>	94,62	96,52
5 TPCR2C					100	93,99	95,89	95,25	88,92	94,3	93,35	93,35	93,99	93,04	95,57	<b>96,84</b>	94,62	96,52
6 <i>Mesorhizobium waitakense</i> ICMP19523T (KC237693)						100	93,04	95,89	88,61	92,09	95,57	91,77	95,25	91,14	97,15	93,99	92,41	95,57
7 <i>Mesorhizobium norvegicum</i> 10.2.2T ( NZ SMYY01000033)							100	93,67	89,87	93,04	92,41	92,72	94,94	92,41	95,89	96,84	96,84	95,25
8 <i>Mesorhizobium sophorae</i> ICMP19535T (KC237704)								100	88,29	92,72	96,2	92,09	96,2	92,09	96,84	94,94	92,72	97,78
9 <i>Mesorhizobium soli</i> JCM 19897 (PXYL01000007)									100	88,92	88,29	91,46	89,56	90,51	90,51	89,87	90,82	89,24
10 <i>Mesorhizobium shangrilense</i> CCBAU65327T (EU672501)										100	92,72	92,72	93,35	92,09	93,67	93,35	92,41	93,35
11 <i>Mesorhizobium sangaai</i> SCAU7T (JN129442)											100	92,41	94,94	91,77	95,89	93,99	91,77	94,94
12 <i>Mesorhizobium qingshengii</i> CCBAU33460T (JQ339757)												100	92,72	95,57	94,3	95,25	92,72	93,67
13 <i>Mesorhizobium newzealandense</i> ICMP 19545T (KC237690)													100	92,09	98,1	95,25	93,99	95,57
14 <i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099T (BA000012)														100	93,67	93,99	92,09	93,04
15 <i>Mesorhizobium kowhii</i> ICMP19522T (KC237685)															100	96,84	95,25	97,47
16 <i>Mesorhizobium ciceri</i> UPM-Ca7T (AB253227)																100	96,2	96,84
17 <i>Mesorhizobium cantuariense</i> ICMP19516 (KC237678)																	100	94,62
18 <i>Mesorhizobium calcicola</i> ICMP19560T (KC237686)																		100
	Ποσοστά ομοιότητας αλληλουχίας <i>recA</i> (%)																	

**Πίνακας Σ2.13:** Ποσοστά ομοιότητας νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του γονιδίου *nodC* μεταξύ επιλεγμένων στελεχών *Mesorhizobium* sv biserrulae. Τα στελέχη (πρότυπα και μη πρότυπα) με το μεγαλύτερο ποσοστό ομοιότητας εμφανίζονται με έντονη γραφή.

Στελέχη	Ποσοστά ομοιότητας αλληλουχίας <i>nodC</i> (%)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 TPCR2I	100	98,37	99,67	100	100	<b>98,37</b>	<b>99,02</b>	<b>96,73</b>	79,41	79,41	79,41
2 TPCR2G		100	98,04	98,37	98,37	<b>100</b>	<b>98,04</b>	<b>96,41</b>	78,43	78,43	78,43
3 TPCR2F			100	99,67	99,67	<b>98,04</b>	<b>98,69</b>	<b>96,41</b>	79,08	79,08	79,08
4 TPCR2D				100	100	<b>98,37</b>	<b>99,02</b>	<b>96,73</b>	79,41	79,41	79,41
5 TPCR2C					100	<b>98,37</b>	<b>99,02</b>	<b>96,73</b>	79,41	79,41	79,41
6 <i>Mesorhizobium ciceri</i> sv. <i>biserrulae</i> WSM1284						100	98,04	96,41	78,43	78,43	78,43
7 <i>Mesorhizobium</i> sp. CCANP117							100	96,41	78,43	78,43	78,43
8 <i>Mesorhizobium</i> sp. AA22								100	79,74	79,74	79,74
9 <i>Mesorhizobium</i> opportunatum WSM2075 T									100	100	100
10 <i>Mesorhizobium ciceri</i> WSM1271										100	100
11 <i>Mesorhizobium australicum</i> WSM2073 T											100
	Ποσοστά ομοιότητας αλληλουχίας <i>nodC</i> (%)										

<b>Πίνακας Σ2.14:</b> Καταγραφή ενδοφυτικών απομονώσεων από φυμάτια καλλιεργούμενων ψυχανθών φυτών και ταυτοποίηση με βάση ιδιοσυστατικά γονίδια.				
<b>Στέλεχος</b>	<b>Ξενιστής απομόνωσης</b>	<b>Νομός/Περιοχή</b>	<b>Γονίδιο αλληλούχισης /μεγεθος (bp)</b>	<b>Φυλογενετικά συγγενέστερο στέλεχος (Κωδικός GenBank)/ Ομολογία (%)</b>
PVTRIP#9	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Τριπόταμος	16S/1470bp	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> LSBU4 EV1 (MN394127)/ 100%; <i>Achromobacter animicus</i> R46662 <sup>T</sup> (HE613448)/99,54%
FXS8.27, FXS11.35, FXS10.38	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Σαγματά	<i>recA</i> /572bp	<i>Microbacterium foliorum</i> DSM 12966 <sup>T</sup> (AM181516,1)/ <b>92,09%</b> ; <i>Microbacterium foliorum</i> M2(CP041040,1)/ 98,95%
FXS11.33	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Σαγματά	<i>recA</i> /572bp	<i>Microbacterium foliorum</i> DSM 12966 <sup>T</sup> (AM181516,1)/ <b>91,21%</b> ; <i>Microbacterium foliorum</i> M2(CP041040,1)/ <b>92,44%</b>
FXS8.23	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Σαγματά	<i>recA</i> /572bp	<i>Microbacterium foliorum</i> DSM 12966 <sup>T</sup> (AM181516,1)/ <b>91,04%</b> ; <i>Microbacterium foliorum</i> M2(CP041040,1)/ <b>92,27</b>
VFFN#7	<i>Vicia faba</i>	Φενεός	16S/1359bp	<i>Ochrobactrum quorumnocens</i> A44 <sup>T</sup> (MG835335)/100%
VFFN#7	<i>Vicia faba</i>	Φενεός	<i>gyrB</i> /704bp	<i>Ochrobactrum quorumnocens</i> A44 <sup>T</sup> (MG913146)/ <b>87,28%</b>
VFFN#7	<i>Vicia faba</i>	Φενεός	<i>recA</i> /696bp	<i>Ochrobactrum quorumnocens</i> A44 <sup>T</sup> (MG970142)/99,43%
VFAT9, VFAT10	<i>Vicia faba</i>	Αθήνα	<i>atpD</i> /810bp	<i>Shinella kummerowiae</i> CCBAU 25048T (NZ_WUMK01000008)/ 96,91% και 96,42%
VFAT9, VFAT10	<i>Vicia faba</i>	Αθήνα	<i>gyrB</i> /675bp	<i>Shinella kummerowiae</i> CCBAU 25048T (NZ_WUMK01000007)/ <b>91,56%</b> και <b>91,70%</b>
PCAUATRAPP1, PCAUATRAPP4, PCAUATRAPP5, PCAUATRAPP13	<i>Phaseoli coccineus</i>	Μέτσοβο	16S/892bp	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> JAJ28 (AJ249382)/ 99,78%
PCAUATRAPP11	<i>Phaseoli coccineus</i>	Μέτσοβο	16S/892bp	<i>Pseudomonas</i> sp, Zw47 (MH337959)/100%; <i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 914 <sup>T</sup> (AF468452)/ 98,65%
VFPA11FF5	<i>Vicia faba</i>	Πρέβεζα	16S/892bp	<i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 914 <sup>T</sup> (AF468452)/ 99,44%
VFFN2A	<i>Vicia faba</i>	Φενεός	16S/892bp	<i>Pseudomonas orientalis</i> CFML 96170 <sup>T</sup> (AF064457)/ 99,78%
VFFN4	<i>Vicia faba</i>	Φενεός	16S/892bp	<i>Pseudomonas fluorescens</i> IAM 12022 (D84013)/ 99,10%; <i>Pseudomonas orientalis</i> CFML 96170 <sup>T</sup> (AF064457)/ 98,65%
VFFN9	<i>Vicia faba</i>	Φενεός	16S/892bp	<i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 914 <sup>T</sup> (AF468452)/ 98,76%
VFCCR2A8	<i>Vicia faba</i>	Ηράκλειο	<i>gyrB</i> /654bp	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pfar1 (LR782234)/ 96,02%; <i>Pseudomonas fluorescens</i> CREAC16 (NZ CP017951)/ 95,87%; <i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525 <sup>T</sup> (QVNA01000002)/ <b>89,60%</b>

VFCR2A16,VFCR2A18, VFCR2A21	<i>Vicia faba</i>	Ηράκλειο Ηράκλειο	<i>gyrB</i> /654bp	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pfar1 (LR782234)/ 96,18%; <i>Pseudomonas fluorescens</i> CREAC16 (NZ CP017951)/ 96,02%; <i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525 <sup>T</sup> (QVNA01000002)/ <b>89,76%</b>
VFCR2A9	<i>Vicia faba</i>	Ηράκλειο	<i>gyrB</i> /654bp	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pfar1 (LR782234)/ 96,18% <i>Pseudomonas fluorescens</i> CREAC16 (NZ CP017951)/ <b>96,02%</b> <i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525 <sup>T</sup> (QVNA01000002)/ <b>89,76%</b>
VFCR2A1	<i>Vicia faba</i>	Ηράκλειο	<i>gyrB</i> /654bp	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pfar1 (LR782234)/ <b>94,80%</b> <i>Pseudomonas fluorescens</i> CREAC16 (NZ CP017951)/ <b>94,95%</b> ; <i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525 <sup>T</sup> (QVNA01000002)/ <b>88,99%</b>
VFCR2A26	<i>Vicia faba</i>	Ηράκλειο	<i>gyrB</i> /654bp	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pfar1 (LR782234)/ 97,55%; <i>Pseudomonas fluorescens</i> CREAC16 (NZ CP017951)/ 97,09%; <i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525 <sup>T</sup> (QVNA01000002)/ <b>88,69%</b>
VFCR2A20	<i>Vicia faba</i>	Ηράκλειο	<i>gyrB</i> /654bp	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pfar1 (LR782234)/ 98,93%; <i>Pseudomonas fluorescens</i> CREAC16 (NZ CP017951)/ 99,69%; <i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525 <sup>T</sup> (QVNA01000002)/ <b>89,14%</b>
VFFN24, VFFN30, VFFN31	<i>Vicia faba</i>	Φενεός	<i>gyrB</i> /654bp	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> 93F8 ( KX696678)/ 98,62% <i>Pseudomonas brassicacearum</i> CFBP 11706 <sup>T</sup> (AM084675)/ 98,17%
Με έντονη γραφή έχει σημειωθεί το ποσοστό ομοιότητας αλληλουχίας κάτω από 95% σε σχέση με εκείνου του πρότυπου στελέχους. Ποσοστά ≤95% υποδηλώνουν με επιφύλαξη νέα γενεαλογική σειρά.				



<b>Πίνακας Σ2.15:</b> Καταγραφή ενδοφυτικών απομονώσεων από φυμάτια από το αυτοφυές ψυχανθές φυτό <i>Ebenus cretica</i> και ταυτοποίηση με βάση ιδιοστατικά γονίδια.				
Στέλεχος	Ξενιστής απομόνωσης	Νομός	Γονίδιο αλληλούχισης/μεγεθος (bp)	Φυλογενετικά συγγενέστερο πρότυπο στέλεχος στέλεχος (Κωδικός GenBank)/ Ομολογία(%)
EC2J	<i>Ebenus cretica</i>	Ηράκλειο	<i>recA</i> /717 bp	<i>Georgenia yuyongxinii</i> Z443 <sup>T</sup> (CP040915) / <b>90,00%</b>
EC2I	<i>Ebenus cretica</i>	Ηράκλειο	16S/1417bp	<i>Kocuria atrinae</i> P30 (FJ607311)/ 98,68%
EC2K	<i>Ebenus cretica</i>	Ηράκλειο	<i>recA</i> /693bp	<i>Kocuria flava</i> HO9041 <sup>T</sup> (CP013254)/ <b>93,51%</b>
EC2F	<i>Ebenus cretica</i>	Ηράκλειο	<i>recA</i> /693bp	<i>Kocuria flava</i> HO9041 <sup>T</sup> (CP013254)/ <b>92,78%</b>
EC2A	<i>Ebenus cretica</i>	Ηράκλειο	16S/1158 bp	<i>Microbacterium saccharophilum</i> K1 (AB736273)/ <b>98,62%</b>
EC2D	<i>Ebenus cretica</i>	Ηράκλειο	<i>recA</i> /572bp	<i>Microbacterium saccharophilum</i> NBRC 108778 <sup>T</sup> (BKAH01000007)/ <b>94,90%</b>
EC2C	<i>Ebenus cretica</i>	Ηράκλειο	16S/1334bp	<i>Roseomonas pecuniae</i> N75 <sup>T</sup> (GU168019)/ 98,67%
EC2L	<i>Ebenus cretica</i>	Ηράκλειο	<i>recA</i> /696bp	<i>Sphingomonas radiodurans</i> S95 <sup>T</sup> (NZ_CP086594)/ <b>89,35%</b>
EC1A	<i>Ebenus cretica</i>	Ηράκλειο	16S/1011bp	<i>Phyllobacterium endophyticum</i> PEPV15 <sup>T</sup> (NR 109517) / <b>100%</b>
EC1A	<i>Ebenus cretica</i>	Ηράκλειο	<i>atpD</i> /855bp	<i>Phyllobacterium endophyticum</i> strain PEPV15 <sup>T</sup> (NZ_VSZT01000008)/ <b>40,03%</b> ; <i>Phyllobacterium zundukense</i> A18/3m (CP104973)/ <b>90,27%</b>
Με έντονη γραφή έχει σημειωθεί το ποσοστό ομοιότητας αλληλουχίας κάτω από 95% σε σχέση με εκείνου του πρότυπου στελέχους. Ποσοστά ≤95% υποδηλώνουν με επιφύλαξη νέα γενεαλογική σειρά.				

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΡΙΖΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΑΠΟ ΦΥΜΑΤΙΑ  
ΨΥΧΑΝΘΩΝ**

### 3.1) ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στη δημιουργία βιοσκευασμάτων, η εύρεση βακτηρίων ανθεκτικών σε αβιοτικές καταπονήσεις είναι σημαντική καθώς προάγουν την ανάπτυξη των φυτών σε συνθήκες καταπόνησης συμβάλλοντας έτσι στην ενίσχυση της βιώσιμης γεωργίας. Ένας από τους παράγοντες αβιοτικής πίεσης που μειώνει τη βιωσιμότητα των βακτηρίων είναι η θερμοκρασία. Παρ' όλα αυτά, έχουν εντοπιστεί στελέχη ανθεκτικά σε υψηλές θερμοκρασίες όπως στελέχη *Rhizobium* (Igiehon et al., 2019), *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1997) και *Bacillus* (Slama et al., 2019; Fahsi et al., 2021). Εκτός από τη θερμοκρασία, το pH και συγκεκριμένα το χαμηλό pH αποτελεί έναν ακόμη παράγοντα μείωσης της βακτηριακής βιωσιμότητας, ειδικά για τα ριζόβια (Lebrazi & Benbrahim, 2014). Ωστόσο ριζόβια όπως το *Rhizobium grahamii* CGE 502<sup>T</sup> (López-López et al., 2012), *Rhizobium freirei* PRF 81T (Dall'Agnol et al., 2013), *Rhizobium mesoamericanum* CCGE 501<sup>T</sup> (López-López et al., 2012), *Rhizobium multihospitium* CCBAU 83401<sup>T</sup>, *Rhizobium tropici* (Martínez-Romero et al., 1991) ξεχωρίζουν για την ικανότητα ανάπτυξης τους σε όξινες συνθήκες.

Παρότι, η υψηλή αλατότητα και η ξηρασία είναι σημαντικοί αβιοτικοί παράγοντες καταπόνησης, εντοπίζονται βακτήρια προσαρμοσμένα σε τέτοιου είδους περιβάλλοντα. Για παράδειγμα, διάφορες μελέτες αναφέρουν τον εντοπισμό βακτηρίων ανθεκτικών σε υψηλή αλατότητα συμπεριλαμβάνοντας στελέχη *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1997), *Rhizobium* (Mohammad et al., 1991; Zhang et al., 2011; Qin et al., 2012; Bibi et al., 2012; Shen et al., 2022), *Bacillus* (Ruiz-García et al., 2005; Slama et al. 2019; Fahsi et al., 2021; Gao et al., 2022; Wu et al., 2022) και *Enterobacter* (Karoor et al., 2017; Haque et al., 2022). Επίσης, βακτήρια όπως στελέχη *Bacillus* (Gao et al., 2022), *Pseudomonas*, *Enterobacter hormaechei* (Niu et al., 2018), *Rhizobium* (Abdel-Salam et al., 2010), *Sinorhizobium fredii* και *Bradyrhizobium diazoefficiens* (Kibido et al., 2020), αποτελούν μερικά ενδεικτικά παραδείγματα βακτηρίων που έχουν δείξει ανοχή στην υδατική καταπόνηση. Ειδικά η εύρεση βακτηρίων ανθεκτικών στην ξηρασία είναι πολύ σημαντική καθώς πολλά βιοσκευάσματα είναι αφυδατωμένης μορφής με τα βακτήρια να είναι λυοφιλοποιημένα (Crowe et al., 1998).

Στην παραγωγή βιοσκευασμάτων, κριτήρια για την επιλογή βακτηρίων είναι η ανεκτικότητα σε αβιοτικές καταπονήσεις και η παρουσία λειτουργικών χαρακτηριστικών με φυτοπροωθητική ή/και φυτοπροστατευτική δράση. Βακτήρια με ικανότητα διαλυτοποίησης φωσφορικών αλάτων συμβάλλουν στην αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας των φωσφορικών αλάτων στο έδαφος (Timofeeva et al., 2022), ενισχύοντας άμεσα τη θρέψη του φυτού. Στους διαλυτοποιητές φωσφόρου ανήκουν βακτήρια από διάφορα γένη, όπως στελέχη *Bradyrhizobium japonicum* (Boiero et al., 2007), *Mesorhizobium* (Peix et al., 2001), *Ensifer* (Oves

et al., 2017; Baliyan et al., 2022; Aslani borj et al., 2022), *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, κ.α. (Kumari et al., 2019). Η ικανότητα διαλυτοποίησης του φωσφόρου έχει άμεση σχέση με τη χρήση της διαθέσιμης πηγής άνθρακα γιατί ο καταβολισμός της οδηγεί στην παραγωγή οξέων που μέσω της οξύνισης που προκαλούν, ο ανόργανος φώσφορος διαλυτοποιείται (Singal et al., 1994; Fasim et al., 2002; Puente et al., 2004; Rajguru & Bhatt, 2022). Τα οξέα που σχετίζονται με την παραπάνω ικανότητα είναι συνήθως το: γλυκονικό, οξαλικό, ηλεκτρικό, κιτρικό, γαλακτικό οξύ, μηλικό, φουμαρικό, τρυγικό, κιτρικό, 2-κετογλυκονικό, πυροσταφυλικό οξύ, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις η ικανότητα αυτή συνδέεται με την παρουσία της φωσφατάσης (Al, 2022). Επιπλέον σε βακτήρια που εμφανίζουν ιδιότητα διαλυτοποίησης φωσφόρου εντοπίζονται γονίδια που σχετίζονται με την ιδιότητα αυτή, όπως το γονίδιο *pstS* (Sachman-Ruíz et al., 2022). Η βιοσύνθεση τόσο του IAA όσο και των σιδηροφόρων αποτελεί ιδιότητα που απαντά σε μεγάλο εύρος βακτηρίων όπως τα *Arthrobacter*, *Azorhizobium*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Enterobacter*, *Bradyrhizobium* κ.α. (Kumari et al., 2019). Στελέχη των παραπάνω γενών όταν χρησιμοποιούνται για εμβολιασμό φυτών όπως το ρύζι, το σιτάρι, βατόμουρο, το καλαμπόκι, η σόγια κ.α. επιφέρουν πολλαπλά οφέλη ακόμα και σε συνθήκες καταπόνησης, είτε είναι αβιοτικές είτε βιοτικές (Kumari et al., 2019).

Στη βιώσιμη γεωργία, η προώθηση της ανάπτυξης φυτών μπορεί να επιτευχθεί και με έμμεσους μηχανισμούς από βακτήρια με φυτοπροστατευτική δράση, μετριάζοντας τα συμπτώματα ασθενειών από φυτοπαθογόνους οργανισμούς. Ωστόσο πριν την *in planta* εφαρμογή βακτηρίων με εν δυνάμει δράση βιολογικού παράγοντα ελέγχου προηγούνται *in vitro* δοκιμασίες. Τέτοιες δοκιμασίες έχουν αναδείξει πληθώρα βακτηρίων με παρεμποδιστική δράση ενάντι φυτοπαθογόνων μυκήτων και βακτηρίων. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι στελέχη ριζοβίων *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer* έχουν αντιμυκητιακή δράση κατά των *Fusarium* spp., *Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium graminearum*, *Pyricularia oryzae*, *Colletotrichum gloesporioides*, *Rosellinia necatrix*, *Helicobasidium tompra* (Ramírez et al., 2021). Αντιμυκητιακή δράση συναντάται επίσης και σε μη ριζοβιακά ενδοφυτικά βακτήρια όπως στελέχη *Enterobacter* και *Bacillus* έναντι σε *Fusarium* spp, *Botrytis cinerea*, *Ceratocystis paradoxa*, *Sporisorium scitamineum*, *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia bataticola*, *Alternaria alternate* και *Pythium schmitthenneri* (Slama et al., 2019; Guo et al., 2020; Legrifi et al., 2022). Τέλος, σημαντική είναι η συμβολή βακτηρίων όπως στελέχη *Bacillus* και *Raenibacillus* στην αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων βακτηρίων όπως, τα *Xanthomonas campestris*, *Erwinia carotovora* και *Pseudomonas syringae* (Raymaekers et al., 2020).

### 3.2) ΣΤΟΧΟΙ ΕΡΕΥΝΑΣ

➤ Η αξιολόγηση της ικανότητας των ριζοβακτηρίων (ριζόβιων και μη ριζοβιακών ενδοφυτικών ριζοβακτηρίων) να επιβιώνουν σε συνθήκες αβιοτικής πίεσης (αλατότητα, pH, υψηλές θερμοκρασίες, υδατική καταπόνηση).

➤ Η διερεύνηση της ικανότητας των υπό μελέτη ριζοβακτηρίων να παρουσιάζουν *in vitro* φαινοτυπικά χαρακτηριστικά σχετικά με την προώθηση της ανάπτυξης των φυτών, όπως: α) η ικανότητα διαλυτοποίησης του φωσφόρου β) η ικανότητα παραγωγής σιδηροφόρων γ) η ικανότητα παραγωγής αυξίνης (IAA).

➤ Η διερεύνηση της ικανότητας των υπό μελέτη ριζοβακτηρίων α) να παρουσιάζουν *in vitro* ανταγωνιστική δράση ενάντια σε φυτοπαθογόνους μύκητες και βακτήρια και β) να παράγουν βιοεπιφανειοδραστικές ενώσεις.

### 3.3) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.3.1) Έλεγχος αντοχής σε υψηλή θερμοκρασία, αλατότητα και οξύτητα/αλκαλικότητα

Τα επιλεγμένα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για τις βιοδοκιμές αβιοτικών καταπονήσεων αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο TY στους 28-30°C για 24 ώρες, υπό ανάδευση στα 180 rpm/min. Στη συνέχεια έγινε φασματοφωτομετρική μέτρηση στα 600 nm και κανονικοποίηση ώστε η κάθε βακτηριακή καλλιέργεια να αντιστοιχεί σε οπτική πυκνότητα  $OD_{600}=0,1$ . Από κάθε βακτηριακή καλλιέργεια με  $OD_{600}=0,1$  έγινε εναπόθεση κηλίδας (spotting) όγκου 20 μl σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο TY, προσαρμοσμένο στις ανάγκες της κάθε βιοδοκιμής.

Στη βιοδοκιμή για τη μελέτη της αντοχής βακτηρίων υπό την επίδραση της θερμοκρασίας, χρησιμοποιήθηκε TY παρασκευασμένο με τη συνήθη διαδικασία, ενώ τα δείγματα επώαστηκαν για 72 ώρες στους 28-30°C, στους 37°C και στους 42°C. Στη βιοδοκιμή για την εξέταση της ικανότητας ανάπτυξης των υπό μελέτη βακτηρίων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αλατότητας, παρασκευάστηκε TY προσαρμοσμένο έτσι ώστε να περιέχει 1%, 1,5% και 2% NaCl. Συμπληρωματικά εξετάστηκε η ικανότητα επιβίωσης των βακτηρίων σε θρεπτικό μέσο LB, επειδή περιέχει 1% w/v NaCl, ως εναλλακτική πρόταση που θα μπορούσε να λειτουργήσει ως καλό οδηγό για τη διερεύνηση της ανάπτυξης των βακτηρίων αντί του TY με 1% w/v NaCl. Για τη βιοδοκιμή ελέγχου ανάπτυξης των εξεταζόμενων αντιπροσωπευτικών απομονώσεων σε όξινο και αλκαλικό περιβάλλον, παρασκευάστηκε TY διαφορετικών τιμών pH (5, 6, 7, 8, 9). Τόσο στην περίπτωση που αφορά την αλατότητα όσο και το pH η επώαση των δειγμάτων έγινε στους 28-30°C για 72 ώρες.

Σε όλες τις περιπτώσεις, η εκτίμηση ήταν ποιοτική και βασίστηκε στην ανάπτυξη ή όχι των βακτηρίων σε σχέση με τις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης. Ως συνθήκη βέλτιστης ανάπτυξης, με βάση την οποία έγινε η σύγκριση (θετικός μάρτυρας), θεωρήθηκε η ανάπτυξη σε TY με pH=6,8-7, 0% NaCl, 28-30°C. Βακτήρια ανθεκτικά σε 1% αλατότητα αξιολογήθηκαν ποσοτικά, υπολογίζοντας την ανάπτυξη τους σε υγρό θρεπτικό μέσο LB παρουσία διαφορετικής περιεκτικότητας NaCl (1%, 7%, 8% και 9%). Τα επιλεγμένα βακτηριακά στελέχη αναπτύχθηκαν αρχικά σε υγρό θρεπτικό μέσο LB στους 30°C για 24 ώρες, υπό ανάδευση στα 180 rpm/min. Στη συνέχεια έγινε φωτομέτρηση και αναπροσαρμογή ώστε η εναρκτήρια καλλιέργεια κάθε δείγματος όγκου 5ml να έχει OD<sub>600nm</sub>=0,1. Έπειτα, τα δείγματα επώαστηκαν για 72 ώρες στους 30°C, υπό ανάδευση στα 180 rpm/min, όπου ακολούθησε εκ νέου φωτομέτρηση. Η ικανότητα ανάπτυξης εκφράστηκε ως % ανάπτυξη σε σχέση με τη βέλτιστη συνθήκη ανάπτυξης (LB-1% w/v NaCl).

### **3.3.2) Έλεγχος αντοχής σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης**

Επιλεγμένα βακτηριακά στελέχη εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα τους να αναπτύσσονται σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης. Για τη διεξαγωγή της συγκεκριμένης βιοδοκιμής χρησιμοποιήθηκε η χημική ένωση PEG 6000 (Polyethyleneglycol, πολυαιθυλενογλυκόλη), σε δυο διαφορετικές περιεκτικότητες (10 και 20% v/v). Ο προσδιορισμός της ανάπτυξης έγινε φασματοφωτομετρικά και η ικανότητα ανάπτυξης εκφράστηκε ως % ανάπτυξη σε σχέση με τη βέλτιστη συνθήκη ανάπτυξης, δηλαδή απουσία της ένωσης PEG 6000 (0% PEG).

Αρχικά παρασκευάστηκαν:

- 40% αποστειρωμένο υδατικό (dH<sub>2</sub>O) διάλυμα PEG 6000.
- 2xTY.

Και στη συνέχεια, παρασκευάστηκαν τα θρεπτικά μέσα περιεκτικότητας 0% v/v, 10% v/v και 20% v/v PEG 6000:

- 0% v/v, 2xTY: αποστειρωμένο dH<sub>2</sub>O σε αναλογία 1:1.
- 10% v/v, 2xTY: 40% PEG: αποστειρωμένο dH<sub>2</sub>O σε αναλογία 2:1:1.
- 20% v/v, 2xTY: 40% PEG σε αναλογία 1:1.

Για τον έλεγχο της αντοχής των βακτηρίων σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Ανάπτυξη επιλεγμένων βακτηρίων σε υγρό θρεπτικό μέσο TY στους 28-30°C για 24 ώρες, υπό ανάδευση στα 180 rpm/min.
- Προσαρμογή της οπτικής πυκνότητας της κάθε βακτηριακής καλλιέργειας σε OD<sub>600nm</sub>=1.

- Εμβολιασμός των θρεπτικών μέσων περιεκτικότητας 0% v/v, 10% v/v και 20% v/v PEG 6000 έτσι ώστε η οπτική πυκνότητα της κάθε καλλιέργειας να αντιστοιχεί σε 0,1.
- Επώαση των καλλιεργειών στους 30°C υπό ανάδευση στα 180 rpm/min μέχρι τις 72 ώρες, όπου και μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση των καλλιεργειών.

### 3.3.3) Διαλυτοποίηση Φωσφόρου

Η διαλυτοποίηση του φωσφόρου μελετήθηκε τόσο ποιοτικά σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα όσο και ποσοτικά με υπολογισμό της αλλαγής του pH και του χρώματος σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα.

#### 3.3.3.1) Ποιοτική εκτίμηση σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα

Για τη μελέτη και την ανάδειξη της συγκεκριμένης ιδιότητας, η επιλογή της πηγής άνθρακα είναι υψίστης σημασίας καθώς έχουν αναφερθεί περιπτώσεις ριζοβίων, που έδειξαν αδυναμία εμφάνισης διαλυτοποίησης φωσφόρου σε θρεπτικό μέσο με μαννιτόλη, ενώ εμφανίζουν την ιδιότητα αυτή παρουσία γλυκόζης (Alikhani et al., 2007). Εκτός από την πηγή άνθρακα, ακόμα και η πηγή αζώτου (π.χ.  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{KNO}_3$ ) στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης επηρεάζει την ικανότητα στελεχών (π.χ. *Rhizobium*) να διαλυτοποιούν τον ανόργανο φώσφορο (Halder & Chakrabartty, 1993).

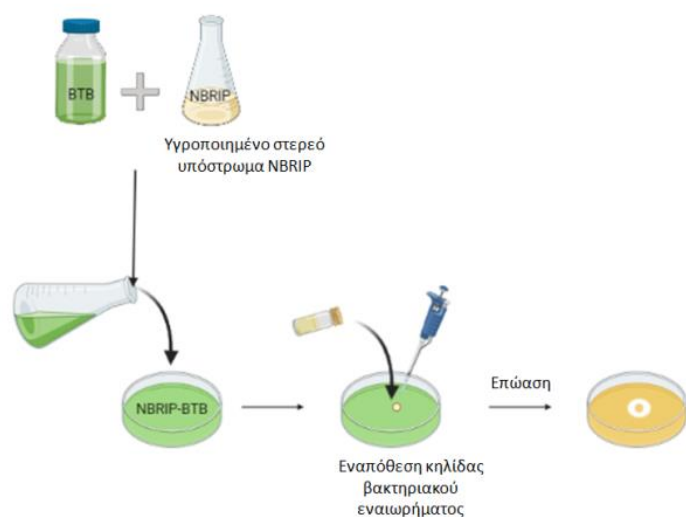
Στην παρούσα εργασία η διερεύνηση της ικανότητας διαλυτοποίησης του φωσφόρου από τα υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη εξετάστηκε ποιοτικά σε στερεό θρεπτικό μέσο NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate growth medium, Nautiyal, 1999). Ως πηγή αδιάλυτου συμπλοκοποιημένου φωσφόρου χρησιμοποιήθηκε το φωσφορικό ασβέστιο [ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ] και για την ενίσχυση της διάκρισης του φαινομένου, χρησιμοποιήθηκε η χρωστική μπλε της βρωμοθυμόλης (Bromothymol Blue, BTB). Ο συγκεκριμένος δείκτης pH έχει 3 διαφορετικές περιοχές αλλαγής χρώματος: κίτρινο (pH<6), πράσινο (6< pH < 7,6) και μπλε (pH>7,6).

<b>Πίνακας 3.1:</b> Παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου ανάπτυξης NBRIP (Nautiyal, 1999).	
<b>Συστατικά</b>	<b>Ποσότητα (g/l)</b>
Glucose	10
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	5
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	5
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,25
KCl	0,2
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,1
dH <sub>2</sub> O, μέχρι το 1 λίτρο (1l)	
Άγαρ	15
Ρύθμιση του pH σε 6,8 - 7 πριν από το αυτόκαυστο και πριν από την προσθήκη άγαρ.	

Το θρεπτικό αποστειρώθηκε στους 121°C για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, σε υγροποιημένο στερεό θρεπτικό μέσο προστέθηκε η χρωστική BTB από πυκνό διάλυμα συγκέντρωσης 0,25 % w/v, προσαρμόζοντας την τελική συγκέντρωση στα 0,025 g/l. Στο κέντρο του τρυβλίου έγινε εναπόθεση κηλίδας από βακτηριακή καλλιέργεια με OD=0,1. Τα τρυβλία επώστηκαν στους 28°C για 12 ημέρες μέχρι το σχηματισμό διαυγούς ζώνης περιμετρικά της κηλίδας, ενδεικτικό της διαλυτοποίησης του φωσφόρου και παράλληλα παρακολουθήθηκε η σταδιακή αλλαγή χρώματος του θρεπτικού μέσου ανάλογα με τη μεταβολή του pH. Η ικανότητα διαλυτοποίησης του φωσφόρου αξιολογήθηκε με βάση το δείκτη διαλυτοποίησης φωσφόρου (Phosphate Solubilisation Index, PSI), ο οποίος υπολογίστηκε από την εξίσωση (Prenomo et al., 1996):

$$\text{Phosphate solubilization index, PSI} = \frac{\text{Colony diameter} + \text{halozone diameter}}{\text{Colony diameter}}$$

Ο δείκτης αποτελεί το πηλίκο της συνολικής διαμέτρου (αποικία και διαυγής ζώνη διαλυτοποίησης) προς τη διάμετρο της αποικίας. Στελέχη με PSI > 2 θεωρούνται θετικά ως προς την ικανότητα διαλυτοποίησης φωσφόρου και επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση. Η σχηματική απεικόνιση του διαγράμματος ροής της βιοδοκιμής αυτής παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3.1**.



Created in BioRender.com bio

**Εικόνα 3.1:** Σχηματική απεικόνιση του διαγράμματος ροής για τη βιοδοκιμή της ποιοτικής εκτίμησης της ικανότητας διαλυτοποίησης του φωσφόρου.

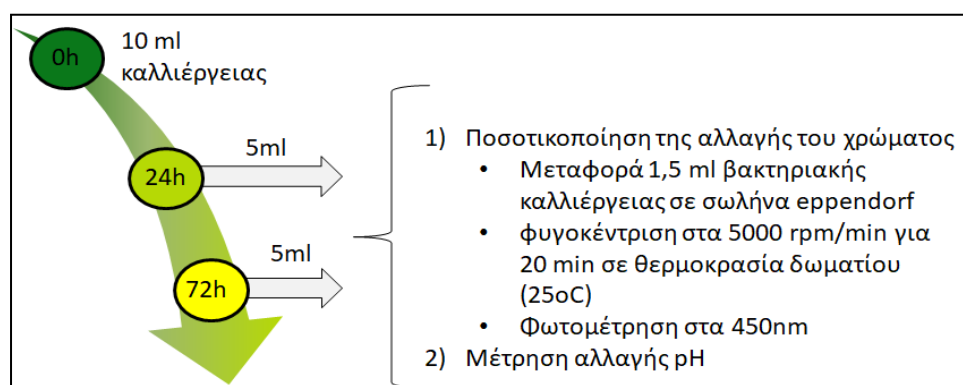


### 3.3.3.2) Ποσοτική εκτίμηση της αλλαγής του pH και του χρώματος σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα

Τα υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο TY για 24 ώρες στους 30°C, υπό ανάδευση στα 180 rpm/min. Στη συνέχεια, έγινε εμβολιασμός του θρεπτικού μέσου NBRIIP-BTB αναπροσαρμόζοντας την οπτική πυκνότητα της βακτηριακής καλλιέργειας (τελικού όγκου 10 ml) ώστε να αντιστοιχεί σε  $OD_{600nm}=0,1$ . Οι υγρές καλλιέργειες επώαστηκαν στους 30°C υπό ανάδευση στα 180 rpm/min, για 72 ώρες. Η ποσοτικοποίηση της αλλαγής του χρώματος του θρεπτικού μέσου πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικά στα 450 nm κάνοντας μέτρηση στις 24 και 72 ώρες μετά τον εμβολιασμό, ως εξής:

-Υπό ασηπτικές συνθήκες, 5ml βακτηριακής καλλιέργειας μεταφέρθηκαν σε γυάλινο σωλήνα μετά από 24 ώρες επώασης. Βακτηριακή καλλιέργεια όγκου 1,5 ml μεταφέρθηκε σε σωλήνα errendorf, φυγοκεντρήθηκε στα 5000 rpm/min για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) και το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για τη φασματοφωτομετρική μέτρηση στα 450nm. Το υπόλοιπο της βακτηριακής καλλιέργειας (3,5ml) μεταφέρθηκε σε γυάλινο σωλήνα και χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση pH του θρεπτικού μέσου.

-Τα υπόλοιπα 5ml βακτηριακής καλλιέργειας συνέχισαν την επώαση. Η διαδικασία ολοκληρώθηκε στις 72 ώρες, όπου ακολουθήθηκε η παραπάνω διαδικασία.



**Εικόνα 3.2:** Σχηματική απεικόνιση του διαγράμματος ροής για τη βιοδοκιμή της ποσοτικής εκτίμησης της αλλαγής του χρώματος και του pH κατά τη διαλυτοποίηση του φωσφόρου.

### 3.3.4) Παραγωγή σιδηροφόρων

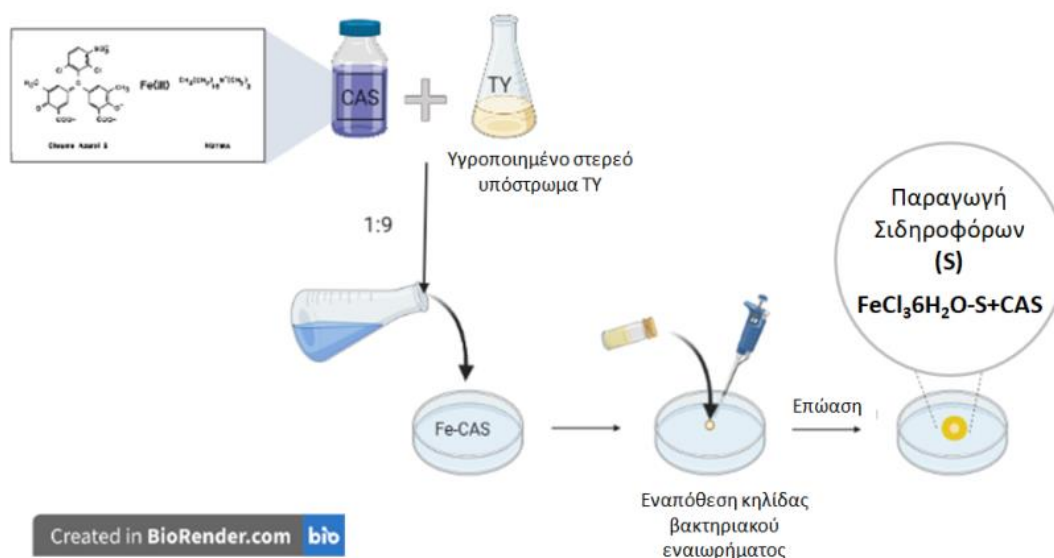
#### 3.3.4.1) Ποιοτική εκτίμηση σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα

Η ικανότητα παραγωγής σιδηροφόρων ελέγχθηκε με τη μέθοδο Chrome Azurol S (CAS) Agar (Schwyn & Neilands, 1987). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ικανότητα του παραγόμενου σιδηροφόρου να αναπτύσσει ανταγωνιστική δράση, δρώντας ως χηλικός παράγοντας, προκειμένου να δεσμεύσει το συμπλοκοποιημένο τρισθενές σίδηρο της χρωστικής chrome

Azurol S (Fe-CAS), υπό μορφή τριχλωριούχου σιδήρου ( $\text{Cl}_3\text{Fe}$ ). Για την προετοιμασία του διαλύματος Fe-CAS, παρασκευάστηκαν τρία επιμέρους διαλύματα:

- Διάλυμα I: 0,065g Chrome Azurol S (CAS) σε 50ml ddH<sub>2</sub>O.
- Διάλυμα II: 0,0027 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (1mM) σε 10 ml HCl (10 mM).
- Διάλυμα III: 0,073 g CTAB (ή αλλιώς HDTMA) (1,83 mg ml<sup>-1</sup>) σε 40 ml ddH<sub>2</sub>O.

Έπειτα υπό συνεχή αργή ανάδευση αναμειγνύονται τα Διαλύματα I, II και III παρασκευάζοντας με αυτό τον τρόπο το Fe-CAS (Διάλυμα IV), το οποίο αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο (121°C, 20 λεπτά). Το αποστειρωμένο Διάλυμα IV αναμείχθηκε σε αναλογία 1:9 με αποστειρωμένο υγροποιημένο στερεό θρεπτικό TY. Σε στερεοποιημένο θρεπτικό μέσο- CAS, στο κέντρο του τρυβλίου, έγινε εναπόθεση κηλίδας 10 μl από υγρή βακτηριακή καλλιέργεια με OD=0,1. Μετά από επώαση 4-7 ημερών στους 28°C, στο σημείο εμβολιασμού, παρατηρήθηκε η αλλαγή χρώματος από πρασινό-μπλε σε κίτρινο-πορτοκαλί, υποδηλώνοντας την παραγωγή σιδηροφόρων. Η σχηματική απεικόνιση του διαγράμματος ροής της βιοδοκιμής της ποιοτικής ανίχνευσης στελεχών με ικανότητα παραγωγής σιδηροφόρων παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3.3**.



**Εικόνα 3.3:** Σχηματική απεικόνιση βιοδοκιμής για τη διαδικασία ποιοτικής εκτίμησης των παραγόμενων σιδηροφόρων με τη μέθοδο CAS σε στερεό θρεπτικό μέσο.

### 3.3.4.2) Ποσοτική εκτίμηση σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα

Στη συνέχεια ακολούθησε η φωτομετρική ποσοτική εκτίμηση της παραγωγής των σιδηροφόρων από τα υπό μελέτη βακτήρια, ακολουθώντας την παρακάτω διαδικασία (Masum et al., 2018):

- Σε αποστειρωμένο σωληνάριο errendorf όγκου 1,5 ml προστέθηκε 1 ml υγρό θρεπτικό μέσο TY, το οποίο εμβολιάστηκε με 10 μl φρέσκιας βακτηριακής καλλιέργειας (10<sup>8</sup> CFU/ml) και επώαστηκε στους 28° C για 48 ώρες.

- Η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε στα 16.800 g για 10 min και το υπερκείμενο συλλέχθηκε σε νέο σωληνάριο για την εκτίμηση των σιδηροφόρων.

- Υπερκείμενο όγκου 500 μl αναμείχθηκε με 500 μl αντιδραστήριου CAS και μετά από επώαση 20 min σε θερμοκρασία δωματίου έγινε καταγραφή της οπτικής πυκνότητας στα 630 nm σε φασματοφωτόμετρο.

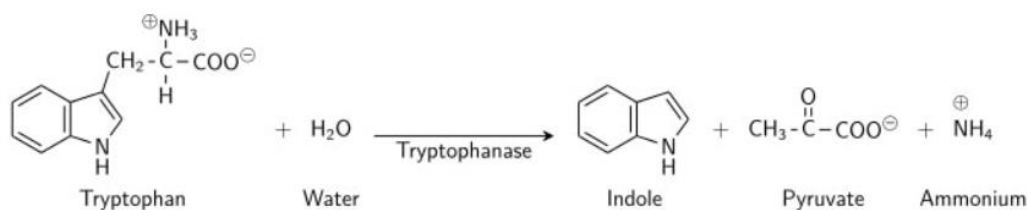
Η μέτρηση της παραγωγής σιδηροφόρων υπολογίστηκε ως επί τοις εκατό ποσοστό σιδηροφόρου (percent siderophore unit, psu), χρησιμοποιώντας την εξίσωση που ακολουθεί:

$$\text{Siderophore production (psu)} : \frac{(Ar - As) \times 100}{Ar}$$

όπου Ar = απορρόφηση αναφοράς (αντιδραστήριο CAS) και As = απορρόφηση του δείγματος στα 630 nm.

### 3.3.5) Παραγωγή ινδολοξικού οξέως (IAA)

Το ινδολοξικό οξύ (Indole Acetic Acid, IAA) ή αυξίνη, αποτελεί προϊόν της αντίδρασης απαμίνωσης της τρυπτοφάνης (L-Tryptophan, L-Trp), η οποία καταλύεται από το ένζυμο τρυπτοφανάση και οδηγεί στην παραγωγή IAA, πυρουβικού οξέος, αμμωνίας και ενέργειας (Εικόνα 3.4).



**Εικόνα 3.4:** Ενζυμική αντίδραση υδρόλυσης της τρυπτοφάνης από την τρυπτοφανάση (<https://microbiologyinfo.com/indole-test-principle-reagents-procedure-result-interpretation-and-limitations>).

Από τα παραγόμενα προϊόντα, το πυρουβικό οξύ μεταβολίζεται, ενώ το ινδολοξικό οξύ όχι, καθώς αδυνατεί να διασπαστεί και συσσωρεύεται στο θρεπτικό μέσο. Το τελευταίο γεγονός αποτελεί βάση βιοδοκιμών για την ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών τα οποία παράγουν τρυπτοφανάση. Για την ανίχνευση του παραγόμενου ινδολοξικού οξέος (IAA) από τους υπό μελέτη μικροοργανισμούς εφαρμόστηκαν δυο χρωματομετρικές τεχνικές, η PC (Pilet & Chollet, 1970) και η S2 (Tang & Bonner, 1948), στις οποίες χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο Salkowski,

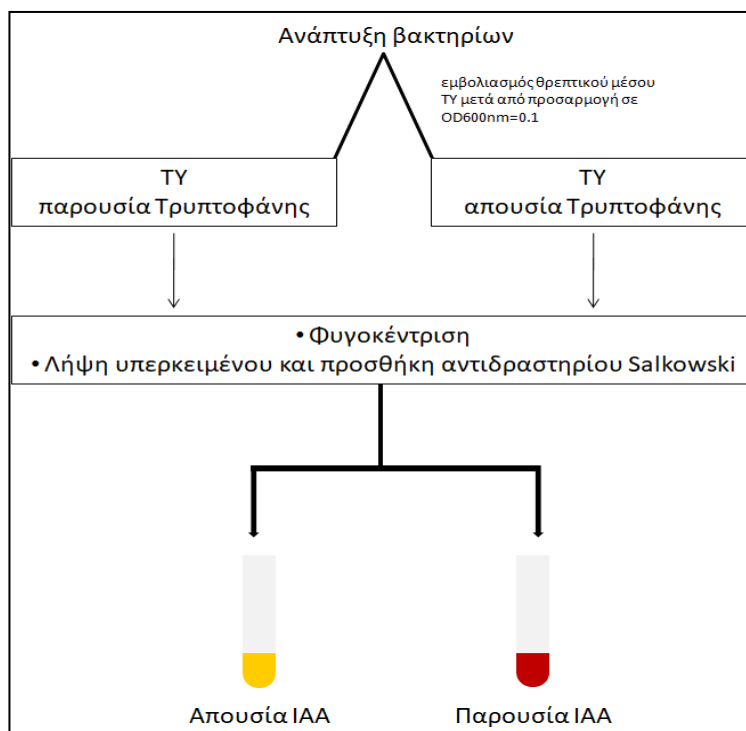
ως R1 και R2 για την τεχνική PC και S2, αντίστοιχα. Τα παραπάνω αντιδραστήρια παρασκευάστηκαν ως εξής:

- R1: 12 g/L  $\text{FeCl}_3$  σε διάλυμα 7,9 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .
- R2: 4,5 g/L σε διάλυμα 10,8 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Αποτέλεσμα της αντίδρασης του IAA με το αντιδραστήριο Salkowski είναι η παραγωγή ενός ροζ ή κόκκινου χρωμοφόρου, με την ένταση του παραγόμενου χρώματος να είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του IAA στο μέσο ανάπτυξης. Για το λόγο αυτό εφαρμόστηκαν οι προαναφερόμενες δυο τεχνικές, καθώς εμφανίζουν διαφορετική ευαισθησία. Με την τεχνική PC γίνεται εφικτή η ανίχνευση χαμηλών συγκεντρώσεων IAA (0,3-20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), ενώ με την S2 μεγαλύτερων (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ -200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Παράλληλα, εξετάστηκε η επίδραση διαφόρων παραγόντων π.χ. ο χρόνος, η παρουσία και απουσία του αμινοξέος τρυπτοφάνη (L-Trp) καθώς και η ακρίβεια της κάθε τεχνικής στην παραγωγή, αλλά και στην ποσοτική εκτίμηση του ινδολοξικού οξέος.

Αρχικά τα βακτηριακά στελέχη αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό TY. Από εκεί έγινε εμβολιασμός σε θρεπτικό TY στο οποίο είχε προστεθεί L-Trp περιεκτικότητας 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  καθώς και σε υγρό TY απουσία εξωγενούς L-Trp, κάνοντας αναπροσαρμογή της οπτικής πυκνότητας ώστε οι καλλιέργειες των υπό ανάπτυξη μικροοργανισμών να αντιστοιχούν σε  $\text{OD}_{600\text{nm}}=0,1$ . Η σχηματική απεικόνιση του διαγράμματος ροής της βιοδοκιμής αυτής παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3.5**. Για την τεχνική PC χρησιμοποιήθηκε 1 ml R1 σε 1 ml υπερκειμένου κάθε καλλιέργειας, ενώ στην τεχνική S2, χρησιμοποιήθηκαν, 2 ml R2 σε 1 ml υπερκειμένου κάθε βακτηριακής καλλιέργειας. Και στις δυο τεχνικές, το διάλυμα μεταφέρθηκε στο σκοτάδι για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου 25°C, όπου και ακολούθησαν φασματοφωτομετρικές μετρήσεις στα 530 nm, σε χρονικά διαστήματα 2, 4 και 7 ημερών.

Στη μέθοδο PC, οι τιμές απορρόφησης μετατράπηκαν στις ισοδύναμες συγκεντρώσεις IAA χρησιμοποιώντας την εξίσωση  $y=0,0427x+0,1696$  με εύρος συγκεντρώσεων 0,5, 10, 20, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Στις περιπτώσεις που οι συγκεντρώσεις IAA δεν ήταν εντός των ορίων της τεχνικής PC (0,3-20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) χρησιμοποιήθηκε η τεχνική S2 η οποία εφαρμόζεται για την ανίχνευση μεγαλύτερων συγκεντρώσεων IAA (5-200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Οι τιμές απορρόφησης μετατράπηκαν στις ισοδύναμες συγκεντρώσεις IAA χρησιμοποιώντας την εξίσωση  $y=0,0092x+0,2407$ , με εύρος συγκεντρώσεων 0, 5, 10, 20, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Εκτός από τη συγκεκριμένη τεχνική, σε άλλες εργασίες για την ανίχνευση και τη μέτρηση της αυξίνης (IAA), χρησιμοποιούνται η υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (Perrig et al., 2007) και η φασματομετρία μάζας ενωμένη σε συστήματα διαχωρισμού υγρής χρωματογραφίας (HPLC-MS/MS), με τη συγκέντρωση της εκτιμώμενης IAA να είναι μικρότερη από εκείνη μέσω της τεχνικής Salkowski (Jiménez-Gómez et al., 2018).



**Εικόνα 3.5:** Σχηματική απεικόνιση του διαγράμματος ροής για την ανίχνευση βακτηριακά παραγόμενης αυξίνης (IAA) σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης TY.

### 3.3.6) Εφαρμογή μεθόδου ταυτόχρονης διπλής καλλιέργειας (dual culture) μεταξύ βακτηρίου και μύκητα

Για την αξιολόγηση της ικανότητας των βακτηρίων να ασκούν βιολογικό έλεγχο ενάντια σε φυτοπαθογόνους μύκητες, επιλέχθηκαν οι παρακάτω τέσσερις μύκητες (συλλογή Ε. Μαρκάκη, Τμήμα Αμπελουργίας, Λαχανικών, Ανθοκομίας και Προστασίας Φυτών, ΕΛΓΟ «Δήμητρα», Ηράκλειο Κρήτης):

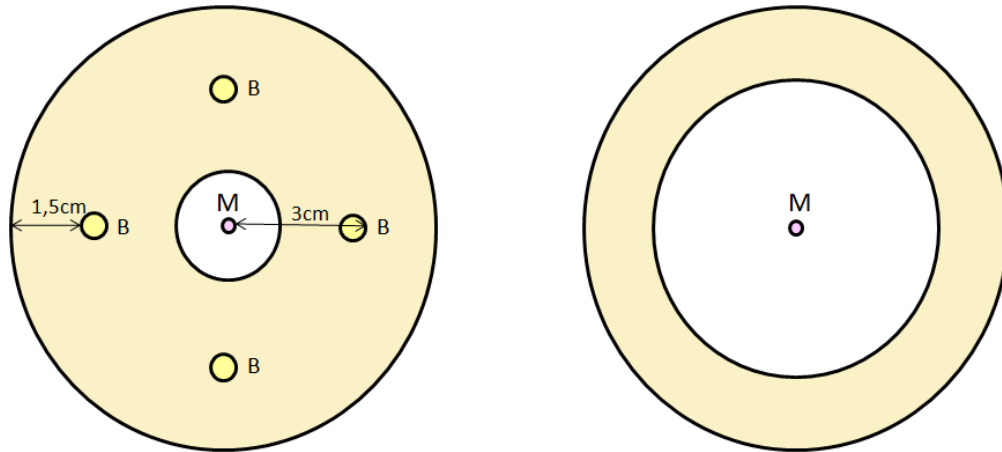
- *Alternaria alternata*
- *Botrytis cinerea*
- *Verticillium dahliae*
- *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*

Όλοι οι μύκητες καλλιεργήθηκαν σε στερεοποιημένο θρεπτικό μέσο εκχυλίσματος πατάτας συμπληρωμένο με δεξτρόζη (Potato Dextrose Agar, PDA).

Πίνακας 3.2: Παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου PDA.	
Συστατικά	Ποσότητα (g/l)
Πατάτα	200
Γλυκόζη	20
Προσθήκη απιονισμένου νερού έως 1l	
Άγαρ	15

Η ανταγωνιστική δράση των υπό εξέταση βακτηριακών απομονώσεων ελέγχθηκε μαζικά ανά γένος βακτηρίων σε PDA. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε αποτελεί συνδυασμό της μεθόδου “διπλής καλλιέργειας” (Fokkema, 1978) και της παραλλαγής αυτής για την ταυτόχρονη εξέταση πολλών μυκήτων παρουσία ενός εξεταζόμενου βακτηρίου (Anith et al., 2021; Nysanth et al., 2022), αλλά και το αντίστροφο (δηλαδή την εξέταση πολλών βακτηρίων κατά ενός παθογόνου μύκητα). Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την ποιοτική εκτίμηση και τη μαζική ανίχνευση υποψήφιων βιολογικών παραγόντων ελέγχου από μια συλλογή βακτηρίων διαφορετικών γενών. Θεωρώντας τη μέθοδο αυτή ως την πρώτη γραμμή για την επιλογή βακτηρίων με πιθανή ανταγωνιστική δράση ενάντια σε φυτοπαθογόνους μύκητες (Ali et al. 2020), σε κάθε τρυβλίο εξετάστηκαν 4 βακτήρια ίδιου γένους ανά μύκητα (**Εικόνα 3.6**). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- Εμβολιασμός στερεοποιημένου PDA με 10μl από υγρή βακτηριακή καλλιέργεια 48 ωρών (σε απόσταση 1,5 cm από την άκρη του τρυβλίου) και επώαση για 72 ώρες.
- Κομμάτι (5 mm) στερεής καλλιέργειας μύκητα 7 (για την περίπτωση των *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*) και 30 ημερών (για την περίπτωση του *Verticillium dahliae*) τοποθετήθηκε στη μέση του τρυβλίου και επώαστηκε στους 25°C. Η διαδικασία αυτή έλαβε χώρα σε τρυβλία με PDA στα οποία είχε προηγηθεί βακτηριακός εμβολιασμός και σε καθαρά τρυβλία τα οποία λειτούργησαν ως θετικός μάρτυρας ανάπτυξης για τον κάθε εξεταζόμενο μύκητα.
- Τα τρυβλία μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης θερμοκρασίας 26°C και επώαστηκαν για 7 (*Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*) και 30 ημέρες (*Verticillium dahliae*). Η εκτίμηση της ανταγωνιστικής δράσης των βακτηρίων έναντι των 4 μυκήτων έγινε σε σχέση με το θετικό μάρτυρα (ανάπτυξη μύκητα απουσία βακτηρίων).
- Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε συνολικά 3 φορές διατηρώντας το πρότυπο τοποθέτησης βακτηρίων και μυκήτων ίδιο.

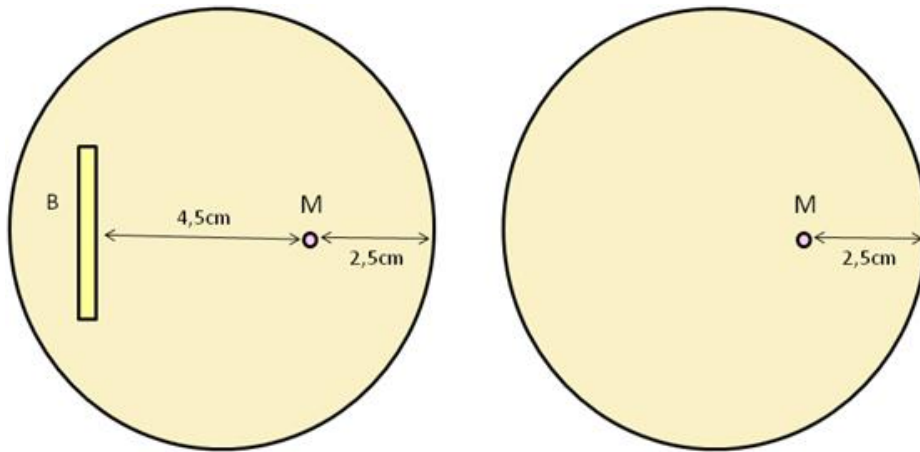


**Εικόνα 3.6:** Σχηματική απεικόνιση της τροποποιημένης μεθόδου ταυτόχρονης διπλής καλλιέργειας (dual culture). Τοποθέτηση μύκητα - βακτηρίων (αριστερά) και τοποθέτηση μόνο του μύκητα ως θετικός μάρτυρας ανάπτυξης του μύκητα (δεξιά). Όπου «Μ», το σημείο τοποθέτησης του μύκητα. Όπου «Β», το σημείο τοποθέτησης των βακτηρίων. Ο άσπρος κύκλος αποτυπώνει την εξάπλωση του μυκηλίου του μύκητα παρουσία και απουσία βακτηρίου, ενώ ο ροζ-φουξ μικρός κύκλος στο κέντρο, την εναρκτήρια θέση εξάπλωσης στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης.

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν έγινε επιλογή εκείνων των βακτηρίων που εμφάνισαν *in vitro* ικανότητα βιοελέγχου. Στη συνέχεια έλαβε χώρα η κλασική μέθοδος της διπλής καλλιέργειας, εξετάζοντας ένα βακτήριο ανά μύκητα σε ένα τρυβλίο (**Εικόνα 3.7**):

- Από μονή αποικία έγινε γραμμική επίστρωση υπό μορφή λωρίδας του βακτηρίου (streaking) σε τρυβλίο με PDA (σε απόσταση 1,5-2cm από την άκρη του τρυβλίου) και επώαση στους 25°C για 3-5 ημέρες.
- Στη συνέχεια τοποθετήθηκε τμήμα μυκηλίου με τη μορφή δίσκου διαμέτρου 5mm από στερεή καλλιέργεια, σε απόσταση 2,5cm από την άκρη του τρυβλίου, με την ενδιάμεση απόσταση βακτηρίου-μύκητα να είναι 4,5cm). Ως θετικός μάρτυρας ανάπτυξης των μυκήτων ήταν τρυβλίο με ανάπτυξη του μύκητα απουσία βακτηρίου.
- Η διαδικασία ολοκληρώθηκε μετά από 7 (*Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*) και 30 ημέρες (*Verticillium dahliae* (999-1) επώασης των μυκήτων.
- Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε συνολικά τρεις φορές.

Όταν ολοκληρώθηκε η διαδικασία, πραγματοποιήθηκε φωτογράφιση για την αποτύπωση της ανταγωνιστικής δράσης των βακτηρίων κατά των μυκήτων, του μάρτυρα καθώς και επεξεργασία των αποτελεσμάτων με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος ImageJ (Schneider et al., 2012).



**Εικόνα 3.7:** Σχηματική απεικόνιση της κλασικής μεθόδου ταυτόχρονης διπλής καλλιέργειας (dual culture). Τοποθέτηση μύκητα και βακτηρίων (αριστερά) και τοποθέτηση μόνο του μύκητα ως θετικός μάρτυρας ανάπτυξης του μύκητα (δεξιά). Όπου «M», το σημείο τοποθέτησης του μύκητα. Όπου «B», το σημείο τοποθέτησης του βακτηρίου.

### 3.3.7) Αξιολόγηση της επίδρασης εκκρινόμενων εξωκυτταρικών μεταβολιτών έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων

Για την αξιολόγηση της επίδρασης εκκρινόμενων εξωκυτταρικών μεταβολιτών παρασκευάστηκε υπερκείμενο από την καλλιέργεια ανάπτυξης των μυκήτων το οποίο ήταν απαλλαγμένο από κύτταρα (Cell free supernatant, CFS). Η διαδικασία περιελάμβανε δυο μέρη. Στο 1<sup>ο</sup> μέρος έγινε προετοιμασία για τη λήψη του CFS για την εξέταση των φυτοπαθογόνων μυκήτων εξής (Zhao et al., 2022):

- Ανάπτυξη βακτηριακής καλλιέργειας για 24 ώρες στους 28-30°C, υπό ανάδευση στα 180 rpm/min.
- Εμβολιασμός υγρού θρεπτικού μέσου LB μεγαλύτερου όγκου, ώστε η καλλιέργεια να ξεκινά με  $OD_{600nm}=0,1$  και επώαση για 72 ώρες στους 30°C, υπό ανάδευση στα 180 rpm/min.
- Φυγοκέντριση βακτηριακής καλλιέργειας στους 4°C για 10- 15 λεπτά στα 6000xg, για τη λήψη υπερκειμένου.
- Φιλτράρισμα της βακτηριακής καλλιέργειας με φίλτρο 0,22 μm για την αποστείρωση του υπερκειμένου μέσω της απομάκρυνσης των κυττάρων, ώστε να ληφθούν CFS.
  - Η λήψη των απαλλαγμένων από κύτταρα υπερκειμένων προήλθε από υγρή καλλιέργεια με  $OD_{600nm}$  1,52 (για το VFFN21), 2,96 (για το VFAT314) , 2,41 (για το C1.2), 2,47 C1.5), 2,11 (για το C3.1) και 2,15 (για το D2.4).

Όσον αφορά το 2<sup>ο</sup> μέρος, το κάθε CFS αραιώθηκε κατά 50% με υγροποιημένο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα 2x PDA και το αποτέλεσμα της ανάμιξης χρησιμοποιήθηκε για την



παρασκευή των τρυβλίων (2xPDA: CFS, σε αναλογία 1:1). Μετά τη στερεοποίηση του μέσου ανάπτυξης τοποθετήθηκε στο κέντρο του τρυβλίου τμήμα μυκηλίου ως δίσκος διαμέτρου 5 mm αποκομμένος από στερεή καλλιέργεια μύκητα. Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε χρησιμοποιώντας ως μέσο ανάπτυξης 2xPDA αναμεμιγμένο με LB (2xPDA: LB, σε αναλογία 1:1). Η μεταχείριση αυτή θεωρήθηκε ως θετικός μάρτυρας ανάπτυξης των μυκήτων. Όταν ολοκληρώθηκε η διαδικασία, πραγματοποιήθηκε φωτογράφιση για την αποτύπωση της ανταγωνιστικής δράσης των βακτηρίων κατά των μυκήτων, του μάρτυρα καθώς και επεξεργασία των αποτελεσμάτων με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος ImageJ.

### 3.3.8) Διερεύνηση της αντιβακτηριακής δράσης εφαρμόζοντας την τεχνική της διασταυρούμενης επίστρωσης (cross-streak) και τη μέθοδο διάχυσης δίσκων αντιβακτηριακών ενώσεων σε στερεό θρεπτικό (Agar-(Disk)-Diffusion Method)

Για την αξιολόγηση της αντιβακτηριακής ικανότητας των υπό μελέτη ριζοβακτηρίων επιλέχθηκαν 14 φυτοπαθογόνα βακτήρια, από τα οποία τα 11 ήταν αρνητικά κατά Gram και τα υπόλοιπα 3 θετικά κατά Gram. Τα φυτοπαθογόνα που επιλέχθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω ανά γένος:

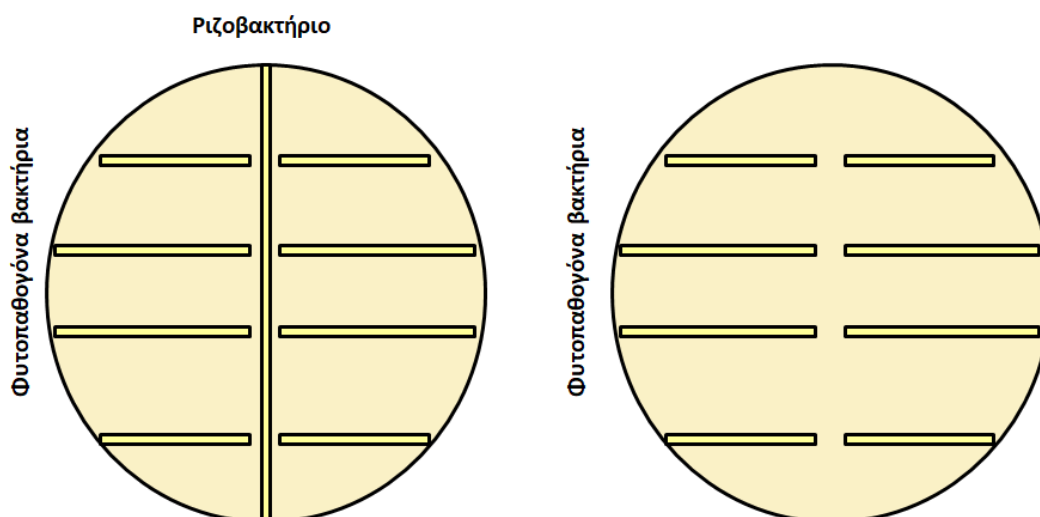
Πίνακας 3.3: Καταγραφή των φυτοπαθογόνων βακτηρίων που εξετάστηκαν.	
Αρνητικά κατά Gram	Στελέχη
<i>Pseudomonas syringae</i>	pv. pisi race 3, pv. phaseolicola NPS3121, pv. tomato DC3000
<i>Dickeya solani</i>	IPO2222 <sup>T</sup>
<i>Acidovorax citrulli</i> (Συλλογή Δ. Γκούμας, Τμήμα Γεωπονίας, ΕΛΜΕΠΑ)	AAC00-1 <sup>T</sup> , HMU 50556 (Malliarakis et al., 2021), HMU 1367 (μη δημοσιευμένο στέλεχος)
<i>Xanthomonas campestris</i>	pv. vesicatoria 8510
<i>Erwinia amylovora</i>	
<i>Pectobacterium brasiliense</i> (Συλλογή Δ. Γκούμας, Τμήμα Γεωπονίας, ΕΛΜΕΠΑ)	HMU 3751, HMU 3753 (μη δημοσιευμένα στελέχη)
Θετικά κατά Gram	Στελέχη
<i>Clavibacter</i> (Συλλογή Δ. Γκούμας, Τμήμα Γεωπονίας, ΕΛΜΕΠΑ)	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> CFBP 4999 <sup>T</sup> , <i>Clavibacter</i> HMU 4521 (στέλεχος υπό δημοσίευση), <i>Clavibacter</i> HMU 4998 (μη δημοσιευμένο στέλεχος)

#### 3.3.8.1) Μέθοδος διασταυρούμενης επίστρωσης (cross-streak method)

Για την ταχεία εξέταση της ανταγωνιστικής δράσης των μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της διασταυρούμενης επίστρωσης (Lertcanawanichakul & Sawangnor, 2008; Velho-Pereira & Kamat, 2011). Από μονή αποικία έγινε γραμμική επίστρωση των ριζοβακτηρίων υπό μορφή λωρίδας στο κέντρο του τρυβλίου που περιείχε θρεπτικό μέσο TY. Μετά από επώαση 7 ημερών στους 26±2°C, από μονή αποικία έγινε γραμμική επίστρωση υπό μορφή λωρίδας του κάθε φυτοπαθογόνου βακτηρίου. Στη συνέχεια ακολούθησε επώαση 2-3 ημερών στους 26±2°C

και παρατήρηση των τρυβλίων σε σχέση με το θετικό μάρτυρα ανάπτυξης των φυτοπαθογόνων βακτηρίων. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε τρυβλίο στο οποίο είχαν αναπτυχθεί τα φυτοπαθογόνα βακτήρια απουσία του ριζοβακτηρίου, τηρώντας καθορισμένες αποστάσεις:

- μήκος και πλάτος λωρίδας ριζοβακτηρίου: 7 και 0,5 cm, αντίστοιχα.
- μήκος και πλάτος λωρίδας φυτοπαθογόνου βακτηρίου: 3 και 0,5 cm, αντίστοιχα.
- απόσταση μεταξύ των φυτοπαθογόνων βακτηρίων: 1 cm.



Εικόνα 3.8: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου της διασταυρούμενης επίστρωσης.

### 3.3.8.2) Μέθοδος διάχυσης αντιβακτηριακών ενώσεων σε στερεό θρεπτικό παρουσία και απουσία χάρτινων δίσκων (Agar-(Disk)-Diffusion Method)

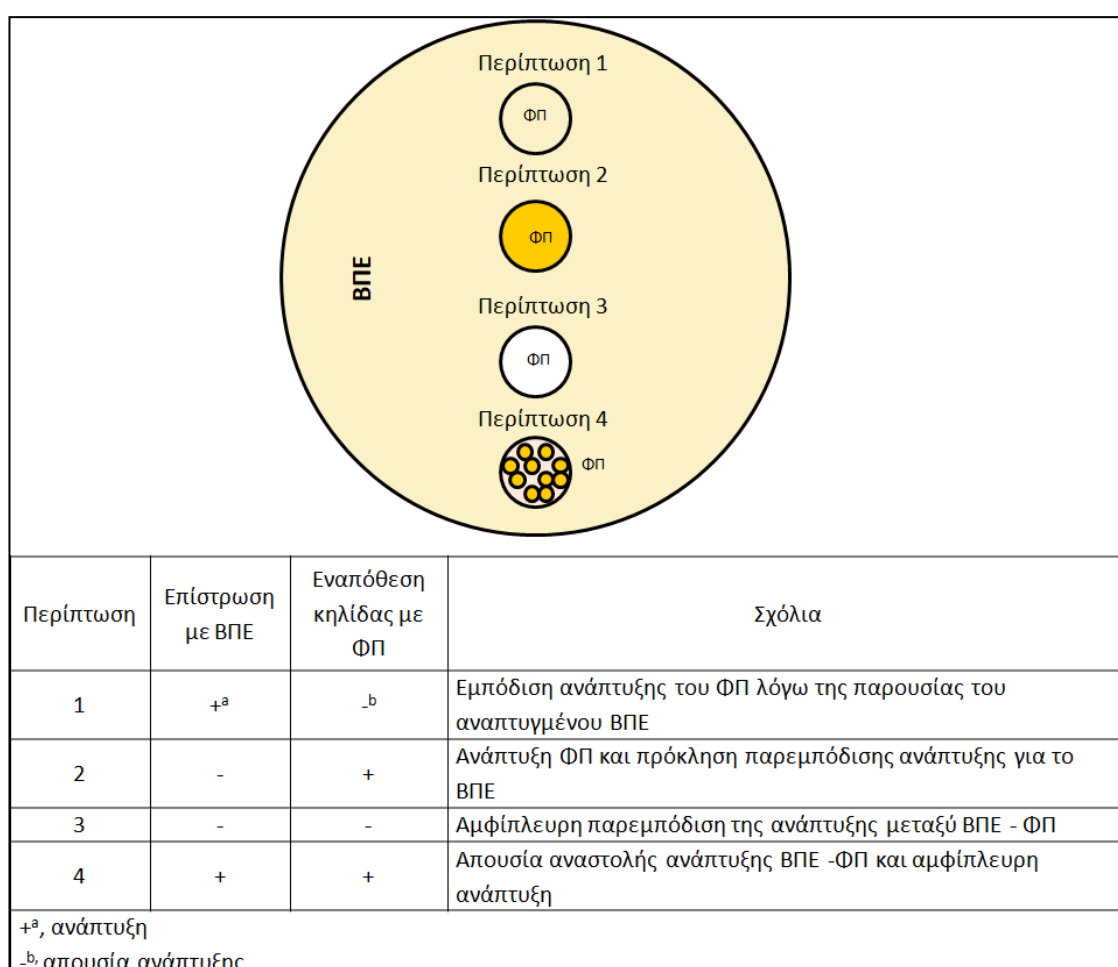
Συμπληρωματικά της μεθόδου cross streak, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος διάχυσης σε άγαρ με τη χρήση χάρτινων αποστειρωμένων δίσκων (Heatley, 1944), η οποία αποτελεί την επίσημη δοκιμή για την εξέταση της αντιμικροβιακής δράσης διαφόρων παραγόντων ακόμα και βακτηρίων. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- Τρυβλία με στερεοποιημένο TY εμβολιάστηκαν και επιστρώθηκαν με 100 μl βακτηριακού εναιωρήματος φυτοπαθογόνου,  $OD_{600nm}=0,1$ .
- Αμέσως μετά, ειδικοί χάρτινοι αποστειρωμένοι δίσκοι τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια του στερεοποιημένου θρεπτικού, εμποτίστηκαν με 10μl βακτηριακού εναιωρήματος ριζοβακτηρίων,  $OD_{600nm}=0,1$  και επώαστηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης θερμοκρασίας  $28\pm 2^{\circ}C$  για 48-72 ώρες.
- Η αντιμικροβιακή δράση των ριζοβακτηρίων αξιολογήθηκε ως προς την ικανότητα σχηματισμού ζώνης αναστολής ανάπτυξης.

Επειδή δεν μπορούν να ελεγχθούν με ακρίβεια όλα τα βακτήρια, μέσω της παραπάνω μεθόδου ακολουθήθηκε μια τροποποιημένη εκδοχή της, που αποτελεί συνδυασμό της

μεθόδου διάχυσης με δισκία σε άγαρ (agar disk-diffusion method) και της μεθόδου διάχυσης σε άγαρ μετά από τοποθέτηση κομματιού άγαρ εμβολιασμένου (Agar plug diffusion method) (Jiménez-Esquilín & Roane, 2005; Elleuch et al., 2010), η μέθοδος διάχυσης αντιβακτηριακών ενώσεων σε στερεό θρεπτικό μέσο απουσία χάρτινων δίσκων (agar -diffusion method).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε χωρίστηκε σε δυο φάσεις. Στην πρώτη φάση, τρυβλία με στερεοποιημένο ΤΥ εμβολιάστηκαν και επιστρώθηκαν με 100 μl βακτηριακού εναιωρήματος φυτοπαθογόνου,  $OD_{600nm}=0,1$ . Όταν τα τρυβλία στέγνωσαν καλά και απορροφήθηκε το εναιώρημα του φυτοπαθογόνου, έγινε εναπόθεση κηλίδας με 10μl βακτηριακού εναιωρήματος ριζοβακτηρίων,  $OD_{600nm}=0,1$  και επώστηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης θερμοκρασίας  $28\pm 2^{\circ}C$  για 48-72 ώρες.

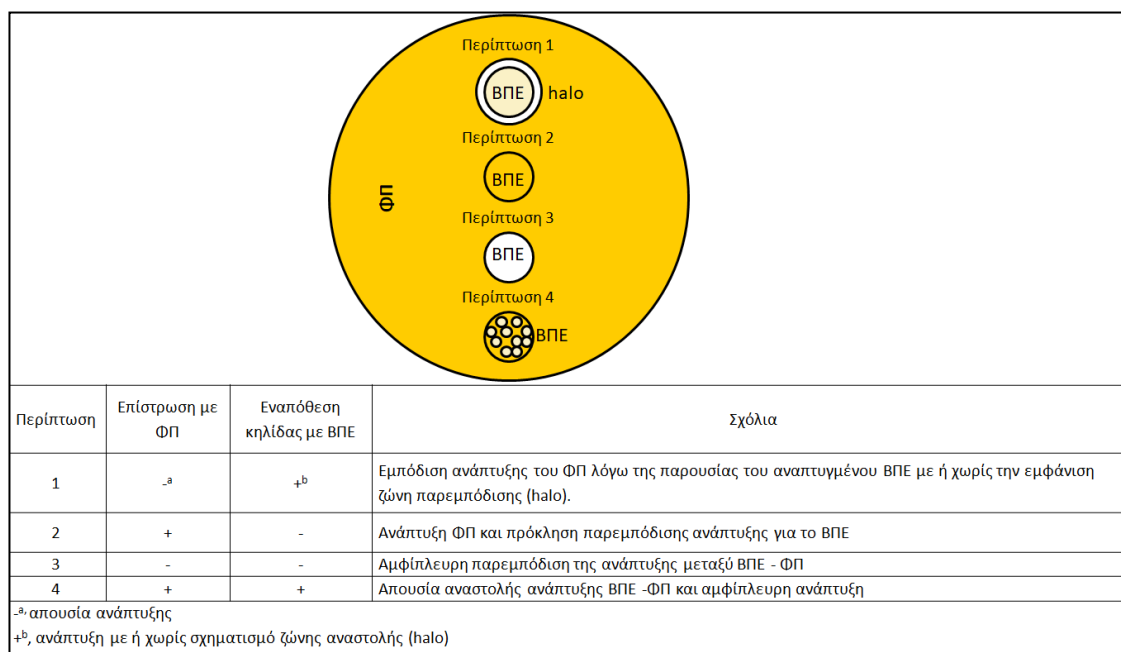


**Εικόνα 3.9:** Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου διάχυσης σε άγαρ για την εξέταση 4 περιπτώσεων με βακτήριο επίστρωσης υποψήφιο Βιολογικό Παράγοντα Ελέγχου (Β.Π.Ε.) παρουσία Φυτοπαθογόνου Παράγοντα (ΦΠ).

Στη δεύτερη φάση, η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε αντίστροφα:

- Τρυβλία με στερεοποιημένο ΤΥ εμβολιάστηκαν και επιστρώθηκαν με 100 μl βακτηριακού εναιωρήματος ριζοβακτηρίου,  $OD_{600nm}=0,1$ .

- Με το εναιώρημα του φυτοπαθογόνου να έχει απορροφηθεί και τα τρυβλία στεγνά, έγινε εναπόθεση κηλίδας με 10 μl βακτηριακού εναιωρήματος φυτοπαθογόνων,  $OD_{600nm}=0,1$  και επώαση σε θάλαμο ανάπτυξης θερμοκρασίας  $28\pm 2^{\circ}C$  για 48-72 ώρες.



**Εικόνα 3.10:** Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου διάχυσης σε άγαρ για την εξέταση 4 περιπτώσεων με βακτήριο επίστρωσης φυτοπαθογόνου Παράγοντα (ΦΠ) παρουσία βιολογικού παράγοντα ελέγχου (Β.Π.Ε.).

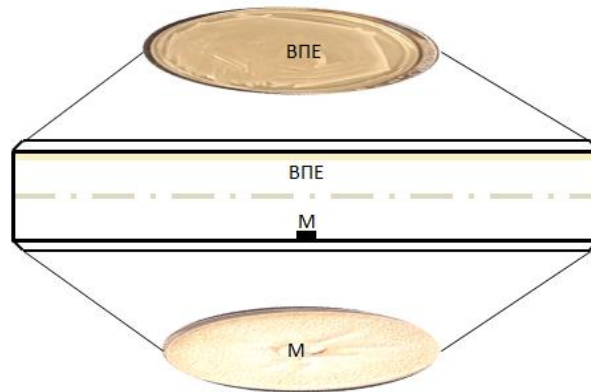
### 3.3.9) Αξιολόγηση της επίδρασης εκλυόμενων οργανικών πτητικών ενώσεων (Volatile Organic Compounds, VOCs) ενάντια σε φυτοπαθογόνους μύκητες και βακτήρια

Για την αξιολόγηση της επίδρασης εκλυόμενων οργανικών πτητικών ενώσεων (Volatile Organic Compounds, VOCs) από τα υπό μελέτη βακτήρια ενάντια σε φυτοπαθογόνους μύκητες ακολουθήθηκε η τροποποιημένη εκδοχή της διαδικασίας που περιγράφηκε από τους Ali et al. (2020), ως εξής:

- Από μονή αποικία έγινε γραμμική επίστρωση του βακτηρίου σε όλη την επιφάνεια τρυβλίου που περιείχε LB, για 24-48 ώρες στους  $28-30^{\circ}C$ .
- Σε διαφορετικό τρυβλίο με PDA, έγινε τοποθέτηση κομμένου μυκηλιακού δίσκου διαμέτρου 5 mm από στερεή καλλιέργεια, στο κέντρο του τρυβλίου.
- Τα δυο τρυβλία δημιούργησαν μια διάταξη υπό μορφή σάντουιτς κατά την οποία το τρυβλίο TY με το καλά αναπτυγμένο βακτήριο τοποθετήθηκε “πρόσωπο με πρόσωπο” και πάνω από το τρυβλίο PDA με το μύκητα, αποφεύγοντας τη φυσική επαφή μεταξύ βακτηρίου-μύκητα. Το σημείο ένωσης των δυο τρυβλίων σφραγίστηκε καλά με παραφίλμ

και χαρτοταινία για να αποφευχθεί η απώλεια των παραγόμενων πτητικών ενώσεων (Εικόνα 3.11).

- Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης ρυθμισμένο στους 26°C για 7 (*Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*) και 30 ημέρες (*Verticillium dahliae*).



**Εικόνα 3.11:** Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου των επάλληλων και ανάστροφων τρυβλίων (διάταξη τρυβλίων υπό μορφή σάντουιτς) για την αξιολόγηση της επίδρασης VOCs (Ebadzadsahrai et al., 2020; Raymaekers et al., 2020).

Για την αξιολόγηση της επίδρασης εκλυόμενων οργανικών πτητικών ενώσεων από τα υπό μελέτη βακτήρια ενάντια σε φυτοπαθογόνα βακτήρια, η παραπάνω διαδικασία, τροποποιήθηκε ως εξής:

- Στο κάτω τρυβλίο το θρεπτικό μέσο αντί για PDA ήταν TY, στο οποίο έγινε εναπόθεση κηλίδας 10μl από βακτηριακό εναιώρημα  $OD_{600nm}=0,1$ .

Η ανάπτυξη του μύκητα αξιολογήθηκε σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα, όπου στο πάνω τρυβλίο με TY ήταν απουσία βακτηρίου.

### 3.3.10) Υπολογισμός ποσοστού παρεμπόδισης ανάπτυξης του μύκητα από βακτήρια

Στις βιοδοκιμές διπλής καλλιέργειας, εκλυόμενων οργανικών πτητικών ενώσεων και των CFSs εκτιμήθηκε το εμβαδόν εξάπλωσης του μύκητα παρουσία και απουσία βακτηρίου, μέσω της χρήσης του λογισμικού προγράμματος ImageJ. Στη συνέχεια υπολογίσθηκε το ποσοστό παρεμπόδισης της ανάπτυξης του μυκηλίου (% Growth Inhibition) των φυτοπαθογόνων μυκήτων σύμφωνα με τον εξής τύπο (Ji et al., 2013):

$$\% \text{ Ποσοστό αναχαίτισης του μύκητα} = \frac{(A1-A2)}{A1} \times 100,$$

όπου A1: εμβαδόν εξάπλωσης του μύκητα στο μάρτυρα και A2: εμβαδόν εξάπλωσης του μύκητα παρουσία βιολογικού παράγοντα.

### 3.3.11) Ανίχνευση παραγόμενων επιφανειοδραστικών ενώσεων

Για την ανίχνευση επιφανειοδραστικών ενώσεων παραγόμενων από τα υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος κατάρρευσης σταγόνας (Drop collapse assay). Η αρχή της συγκεκριμένης μεθόδου στηρίζεται στην αμφίφιλη δομή των επιφανειοδραστικών ενώσεων (de Bruijn & Raaijmakers, 2009; Townsley et al., 2018), δηλαδή της ταυτόχρονης υδρόφιλης και υδρόφοβης δομής, η οποία μειώνει την επιφανειακή και διεπιφανειακή τάση. Ως εκ τούτου, όταν διαλύματα με ισχυρές επιφανειοδραστικές ενώσεις βρεθούν σε ελαιώδεις επιφάνειες, δε σχηματίζουν σταθερές σταγόνες και τελικά καταρρέουν. Η διαδικασία ακολουθήθηκε ως εξής:

- Ανάπτυξη βακτηριακής καλλιέργειας για 48 ώρες στους 28-30°C, υπό ανάδευση στα 180 rpm/min.
- Μεταφορά υγρής βακτηριακής καλλιέργειας όγκου 1 ml σε errendorf, φυγοκέντρηση για 2 min σε 11.000 x g και λήψη υπερκείμενου σε νέο errendorf.
- Εναπόθεση κηλίδας καθαρού υπερκείμενου, όγκου 25 μl σε παραφίλμ που είναι ελαιώδης επιφάνεια και αναμονή μέχρι την κατάρρευση της σταγόνας (~5 λεπτά).

Ως θετικός και αρνητικός μάρτυρας εφαρμόστηκε μια σταγόνα ορυκτέλαιου (baby oil) και μια σταγόνα dH<sub>2</sub>O όγκου 25 μl, αντίστοιχα. Για τη διευκόλυνση της διάκρισης των αποτελεσμάτων, πριν από την εναπόθεση της κάθε κηλίδας στο παραφίλμ έγινε ανάμιξη με 2μl χρωστικής Evans Blue, η οποία δεν επηρεάζει η δομή της σταγόνας.

### 3.3.12) Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων του κεφαλαίου πραγματοποιήθηκε με τη συνδυαστική χρήση των προγραμμάτων λογιστικών φύλλων Microsoft Excel και στατιστικής ανάλυσης SPSS v.26.0. Πριν από την πραγματοποίηση οποιασδήποτε στατιστικής ανάλυσης, έγινε έλεγχος της κανονικότητας (Normality) των δειγμάτων με την πραγματοποίηση του τεστ των Shapiro- Wilk καθώς και έλεγχος ισότητας των διακυμάνσεων των δειγμάτων (τεστ ομοιογένειας, homogeneity test) μέσω του τεστ Levene. Σε δεδομένα δειγμάτων που ακολουθούν κανονική κατανομή και ταυτόχρονα παρουσιάζουν ομοιογένεια, πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης (Analysis Of Variance, ANOVA) κατά έναν παράγοντα (One way). Για τον έλεγχο σημαντικότητας μεταξύ των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε: 1) t-test για τον έλεγχο της διαφοράς δυο μέσων από ανεξάρτητα δείγματα και 2) παραμετρικό τεστ πολλαπλών συγκρίσεων LSD ( $p \leq 0,05$ ) για την ανάδειξη των στατιστικά σημαντικών διαφορών του μέσου όρου μεταξύ όλων των δειγμάτων. Στην περίπτωση που οι προϋποθέσεις της κανονικότητας παραβιάστηκαν πραγματοποιήθηκε το μη παραμετρικό τεστ πολλαπλών συγκρίσεων Kruskal-Wallis.

### 3.4) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### 3.4.1) ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΦΥΜΑΤΙΑ ΨΥΧΑΝΘΩΝ ΦΥΤΩΝ ΣΕ ΑΒΙΟΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η αντοχή επιλεγμένων βακτηρίων σε αβιοτικές συνθήκες καταπόνησης. Τα ριζόβια που επιλέχθηκαν ανήκαν στα γένη *Rhizobium* (VFLE1, VFIM1, VFCE3, VFLE5, VFEP63, VFCE2, VFEP162, PVTN21, PVKA6, PVMT25, PVDO712, PVIM10, PVTP1, PVKV3, PVPR1, PVIM1, PVMT26, *R. tropici* CIAT899<sup>T</sup>), *Mesorhizobium* (TPCR2C, TPCR2D, TPCR2F, TPCR2G, TPCR2I), *Bradyrhizobium* (VUCR24, VUEP21, VULI11) και *Ensifer* (VUKA2). Τα στελέχη των γενών *Bradyrhizobium* και *Ensifer* είχαν απομονωθεί από φυμάτια μαυρομάτικου φασολιού και είχαν χαρακτηριστεί σε προγενέστερο χρόνο (Tampakaki et al., 2017a, 2017b). Από τα ενδοφυτικά ριζοβακτήρια μελετήθηκαν περισσότερο τα VFAT314 και VFFN21 και λιγότερο τα C1.2, C1.5, C3.1 και D2.4 καθώς τα τελευταία είχαν μελετηθεί από το Φωτιάδη Χρήστο και τη Γιαννακοπούλου Μελίνα.

##### 3.4.1.1) Έλεγχος αντοχής σε διαφορετικές συνθήκες pH, θερμοκρασίας, αλατότητας

Οι περιβαλλοντικές πιέσεις που εφαρμόστηκαν ήταν σχετικές με τη θερμοκρασία (37°C και 42°C), την αλατότητα (1-9% w/v NaCl), την οξύτητα (pH με τιμές 5 και 6) και την αλκαλικότητα (pH με τιμές 8 και 9) του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης. Επιπλέον συγκρίθηκε η ικανότητα ανάπτυξης των βακτηρίων ανεπτυγμένων σε TY (1% w/v NaCl) με εκείνη σε θρεπτικό μέσο LB, που περιέχει 1% w/v NaCl. Η αξιολόγηση της ικανότητας επιβίωσης των ριζοβίων στις παραπάνω συνθήκες έγινε συγκριτικά με το θετικό μάρτυρα ανάπτυξης, δηλαδή σε TY απουσία άλατος (0% w/v NaCl) με pH=6,8-7 σε θερμοκρασία 30°C (βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης). Ως δεύτερος θετικός μάρτυρας ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το *R. tropici* CIAT899<sup>T</sup>, η ανάπτυξη του οποίου συμβάδιζε με αυτή της βιβλιογραφίας.

Στον Πίνακα 3.4 καταγράφεται η ικανότητα ανάπτυξης 18 *Rhizobium* spp. σε διαφορετικές συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης. Τα υπο μελέτη βακτήρια αποτελούν απομονώσεις της παρούσας εργασίας με εξαίρεση το πρότυπο στέλεχος *Rhizobium tropici* CIAT899<sup>T</sup> και τα στελέχη των γενών *Bradyrhizobium* και *Ensifer*.

Πίνακας 3.4: Καταγραφή ικανότητας επιβίωσης επιλεγμένων <i>Rhizobium</i> spp. κουκιού και φασολιάς σε διαφορετικές τιμές pH, θερμοκρασίας και αλατότητας.											
Βακτηριακά στελέχη	TY										LB
	pH				T (°C)		NaCl (%)				NaCl (%)
	5	6	8	9	37	42	1	3	4	5	1
<i>Rhizobium</i> sp.											
VFLE1	- <sup>α</sup>	+	+	+ <sup>β</sup>	-	-	-	-	-	-	-
VFIM1	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
VFCR3	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
VFLE5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
VFEP63	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
VFCR2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
VFEP162	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
PVTN21	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
PVKA6	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
PVMT25	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
PVDO712	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
PVIM10	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
PVTP1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
PVKV3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
PVPR1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
PVIM1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
PVMT26	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>R.tropici</i> CIAT899 <sup>T</sup>	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+
<i>Mesorhizobium</i> sp.											
TPCR2C	-	+	+	ΔE	-	-	-	-	-	-	-
TPCR2D	-	+	+	ΔE	-	-	-	-	-	-	-
TPCR2F	-	+	+	ΔE	-	-	-	-	-	-	-
TPCR2G	-	+	+	ΔE	-	-	-	-	-	-	-
TPCR2I	-	+	+	ΔE	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ensifer</i> sp.											
VUKA2	-	+	+	ΔE	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bradyrhizobium</i> sp.											
VUEP21	-	+	+	ΔE	+	-	+	+	+	-	-
VULI11	-	+	-	ΔE	-	-	+	+	-	-	-
VUCR24	+	+	-	ΔE	-	-	+	+	-	-	-

<sup>α</sup> "-": απουσία ανάπτυξης βακτηρίου, <sup>β</sup> "+": ανάπτυξη βακτηρίου.  
Όπου T, θερμοκρασία και ΔE, δεν εξετάστηκε.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν όλα τα βακτήρια αναπτύχθηκαν στις συνθήκες ανάπτυξης του θετικού μάρτυρα (30°C, 0% w/v NaCl, pH=6,8-7). Στους 37°C αναπτύχθηκαν έξι ριζόβια φασολιάς (PVTN21, PVDO712, PVTP1, PVIM1, PVIM10, *R. tropici*) και ένα ριζόβιο μαυρομάτικου φασολιού (VUEP21). Στους 42°C εμφάνισαν θερμοαντοχή μόνο τα στελέχη PVDO712, *R.tropici*. Σε συνθήκες αλατότητας 1% w/v NaCl κανένα βακτήριο δεν αναπτύχθηκε, με εξαίρεση το *R.tropici* και τα VUEP21, VULI11, VUCR24, από τα οποία ξεχώρισαν όλα τα *Bradyrhizobium* καθώς μπόρεσαν και αναπτύχθηκαν σε 3% NaCl (VUEP21, VULI11, VUCR24) και 4% NaCl (VUEP21). Ως προς την ικανότητα ανάπτυξης των βακτηρίων σε όξινο και αλκαλικό περιβάλλον, όλα τα *Rhizobium* ήταν ικανά να αναπτυχθούν σε pH από 6-9, με



εξαίρεση το VFCR2 που δεν αναπτύχθηκε σε pH 9. Τα *Mesohizobium*, το *Ensifer* και τα *Bradyrhizobium* ήταν ικανά να αναπτυχθούν σε pH από 6-8, με εξαίρεση τα VULI11, VUCR24 που δεν αναπτύχθηκαν σε pH 8. Σε όξινο περιβάλλον με pH=5 παρατηρήθηκε ανάπτυξη στα περισσότερα *Rhizobium* (με εξαίρεση τα VFLE1, VFIM1, VFCR3, VFEP162, PVTN21, PVKA6, PVMT25 και *R.tropici*), αλλά όχι στα *Mesohizobium*, στο *Ensifer* και στα *Bradyrhizobium* με εξαίρεση τα VULI11, VUCR24 (**Πίνακας 3.4**).

Στη συνέχεια συγκρίθηκε το αβιοτικό προφίλ ανάπτυξης των ριζοβίων με εκείνο των φυλογενετικά συγγενικών προτύπων βακτηριακών στελεχών. Στον **Πίνακα 3.5** παρουσιάζεται το αβιοτικό προφίλ των φυλογενετικά συγγενικών προτύπων βακτηριακών στελεχών των ριζοβιακών απομονώσεων κουκιού και φασολιάς με βάση προηγούμενες μελέτες.

**Πίνακας 3.5:** Καταγραφή προφίλ ανάπτυξης επιλεγμένων προτύπων στελεχών *Rhizobium* spp. σε διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης.

Βακτηριακά στελέχη	YMA					Αναφορές
	pH			T (°C)	NaCl (%)	
	5	6	8	37	1	
<i>Rhizobium laguerreae</i> FB206 <sup>T</sup>	- <sup>α</sup>	+ <sup>β</sup>	+	+	-	Saidi et al., 2014
<i>Rhizobium leguminosarum</i> DSM 30132 <sup>T</sup>	-	+	+	-	-	Frank 1879
<i>Rhizobium hidalgonense</i> FH14 <sup>T</sup>	-	+	+	+	+	Yan et al., 2017
<i>Rhizobium anhuiense</i> CCBAU 23252 <sup>T</sup>	+	+	+	+	W <sup>γ</sup>	Zhang et al., 2015
<i>Rhizobium azibense</i> 23C2 <sup>T</sup>	+	+	+	+	-	Mnasri et al., 2014
<i>Rhizobium sophoriradicis</i> CCBAU03470 <sup>T</sup>	+	+	+	+	+	Jiao et al., 2015
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 <sup>T</sup>	+/+	+/+	+/ΔΑ	+/+	+/+	Παρούσα εργασία/(Martinez- Romero et al., 1991)
<i>Rhizobium croatiense</i> 13T	+	+	+	+	-	Rajnovic et al., 2022
<i>Rhizobium redzeponicijii</i> 18T	+	+	+	+	-	Rajnovic et al., 2022
<i>Rhizobium etli</i> CFN 42 <sup>T</sup>	+	+	+	ΔΑ	-	Martinez-Romero et al., 1991

<sup>α</sup> “-” : απουσία ανάπτυξης βακτηρίου, <sup>β</sup> “+” : ανάπτυξη βακτηρίου, <sup>γ</sup> “W” : ασθενής ανάπτυξη.  
Όπου *R.*, *Rhizobium* ΔΑ, δεν αναφέρεται.

Παρότι τα βακτήρια VFLE1, VFIM1, VFCR3 και VFY1 είναι φυλογενετικά κοντά στο *R. laguerreae* FB206<sup>T</sup>, εμφάνισαν αδυναμία ανάπτυξης στους 37°C. Ομοίως αδυναμία ανάπτυξης στους 37°C εμφάνισαν και τα VFEP162, PVMT26 και PVPR1 που είναι φυλογενετικά κοντά με τα *R. laguerreae* FB206<sup>T</sup>, *R. hidalgonense* FH14<sup>T</sup> και *R. anhuiense* CCBAU 23252<sup>T</sup>, αντίστοιχα. Τα βακτήρια που ανήκουν στο είδος *R. leguminosarum* (VFEP63, VFCR2), στο *R. sophoriradicis* (PVTN21), στο *R. azibense* (PVIM1) και αυτά που τοποθετούνται κοντά στο *R. redzeponicijii* 18<sup>T</sup> (PVTP1) δε διέφεραν σε αυτήν την ιδιότητα με τα αντίστοιχα πρότυπα στελέχη. Παρότι τα PVKA6, PVMT25 ανήκουν φυλογενετικά στην ίδια ομάδα με τα PVDO712, PVIM1 και είναι συγγενικά με το *R. croatiense* 13<sup>T</sup> εμφάνισαν διαφορετικά χαρακτηριστικά ανάπτυξης στους

37°C, με τα δύο πρώτα στελέχη να εμφανίζουν αδυναμία ανάπτυξης. Όμοίως το PVKV3 δεν αναπτύχθηκε σε θερμοκρασία 37°C εν αντιθέσει με το φυλογενετικά πλησιέστερο του, *R. etli* CFN 42<sup>T</sup>, που εμφάνισε βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 35°C.

Όσον αφορά την ικανότητα ανάπτυξης των υπό μελέτη *Rhizobium* σε συνθήκες αλατότητας, η παρατηρούμενη αδυναμία ανάπτυξης των απομονώσεων σε περιεκτικότητα 1% w/v NaCl, ήταν αναμενόμενη. Με εξαίρεση τα *R. hidalgonense* FH14<sup>T</sup> και *R. anhuiense* CCBAU23252<sup>T</sup> που είναι γνωστό ότι εμφανίζουν σε κάποιο βαθμό ανοχή στις συνθήκες αυτές, τα υπόλοιπα πρότυπα στελέχη δεν είναι ανθεκτικά και δεν αναπτύσσονται. Τέλος, παρατηρώντας το προφίλ ανάπτυξης των υπό μελέτη βακτηρίων σε διαφορετικά pH και συγκρίνοντάς το με εκείνο των αντίστοιχων προτύπων στελεχών, προέκυψε συμφωνία αποτελεσμάτων για pH από 6 έως 8. Όμως διαφοροποιημένη ήταν η εικόνα σε pH 5, όπου δεν συναντάται η ίδια τάση παντού. Από τα 18 *Rhizobium* τα 11 αναπτύχθηκαν σε pH 5, ενώ τα υπόλοιπα όχι. Η εικόνα και στις δυο περιπτώσεις δεν ήταν και τόσο αναμενόμενη, διότι σε αρκετές περιπτώσεις δεν ήταν ίδια με εκείνη των αντίστοιχων προτύπων στελεχών. Η τάση ανάπτυξης των *Rhizobium* σε διάφορα εύρη τιμών pH, είναι διαφορετική και ποικίλει, καθώς έχουν καταγραφεί περιπτώσεις ανάπτυξης τόσο σε όξινα, όσο και σε αλκαλικά περιβάλλοντα.

Στην περίπτωση των *Mesorhizobium* το προφίλ της ανάπτυξης τους συγκρίθηκε με εκείνη άλλων βακτηρίων του ίδιου γένους. Ως προς τη θερμοκρασία καμία από τις απομονώσεις *Mesorhizobium* δεν αναπτύχθηκε στους 37°C, με την ανεκτικότητα σε αυτό το παράγοντα πίεσης να αποτελεί μια ακόμη περίπτωση προσαρμογής στις συνθήκες του περιβάλλον απομόνωσης. Για παράδειγμα στελέχη *Mesorhizobium plurifarium* αναλόγως της γεωγραφικής περιοχής απομόνωσης εμφανίζουν ή στερούνται της ικανότητας ανάπτυξης στους 37°C συνθέτοντας διαφορετικούς οικολογικούς τύπους μέσα στο ίδιο είδος (Wang et al., 2003). Όσον αφορά την αλατότητα, αν και η παρουσία 1% άλατος είναι ανασταλτική της ανάπτυξης των εξεταζόμενων *Mesorhizobium*, έχουν σημειωθεί περιπτώσεις ριζοβίων του ίδιου γένους με και χωρίς ανοχή (Brígido et al., 2012).

Στην περίπτωση του *Ensifer* VUKA2, αν και το συγγενικό πρότυπο στέλεχος του, *Ensifer fredii* USDA 205<sup>T</sup> αναπτύσσεται καλά σε pH από 4,5 και πάνω αλλά όχι σε 9,5, το εξεταζόμενο στέλεχος δεν αναπτύσσεται σε pH 5. Ως προς την ανοχή του VUKA2 στην αλατότητα, το συγκεκριμένο στέλεχος δεν αναπτύσσεται στην παρουσία 1% w/v NaCl σε αντίθεση με το πρότυπο στέλεχος του που δεν αναπτύσσεται σε 3% w/v NaCl (Scholla & Elkan, 1984). Καθώς τα περισσότερα βακτήρια αναπτύσσονται από 28-31°C (Graham, 1992), η αύξηση της θερμοκρασίας στους 37°C αποτέλεσε ανασταλτικό παράγοντα ανάπτυξης για το VUKA2. Ο εντοπισμός στελεχών *Ensifer* ανεκτικών σε υψηλές θερμοκρασίες (Elboutahiri et al., 2010;

Sakrouhi et al., 2016) πολλές φορές αποτελεί ένδειξη προσαρμογής τους στη θερμοκρασία της περιοχής απομόνωσης (Meriem et al., 2015).

Από τα εξεταζόμενα *Bradyrhizobium* η εικόνα ανάπτυξης διέφερε ανά στέλεχος, ενώ οι μικροδιαφοροποιήσεις που παρατηρήθηκαν θα μπορούσαν να οφείλονται στη διαφορετική τους φυλογενετική κατάταξη (Tampakaki et al., 2017b). Τα VUL111, VUCR24 είναι συγγενικά με τα πρότυπα στελέχη *B. pachyrhizi* PAC48<sup>T</sup>, *B. ferriligni* CCBAU 51502<sup>T</sup> και το *B. elkanii* USDA 76<sup>T</sup>, για αυτό συγκρίθηκαν τα αβιοτικά τους προφίλ. Σύμφωνα με τα καταγεγραμμένα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, το *B. pachyrhizi* PAC48 αναπτύσσεται σε pH 4,5 και σε θερμοκρασία 37°C, αλλά όχι σε 1% w/v NaCl (Ramirez-Bahena et al., 2009). Το *Bradyrhizobium ferriligni* CCBAU 51502 αναπτύσσεται σε 1 % w/v NaCl, σε pH 5–8 και σε θερμοκρασία από 4–45° C (Yao et al., 2015). Το στέλεχος *B. elkanii* LMG 6135 αναπτύσσεται σε 1 % w/v NaCl, σε pH 4,5 αλλά όχι σε θερμοκρασία 37°C (Ramirez-Bahena et al., 2009). Από τη μεταξύ τους σύγκριση, φαίνεται ότι οι εξεταζόμενες απομονώσεις ήταν ευαίσθητες σε όξινες συνθήκες εκτός από το VUCR24, κάτι που το διαφοροποιεί από τα *B. pachyrhizi*, *B. ferriligni* και *B. elkanii*. Επίσης ως προς την παρατηρούμενη θερμοευαισθησία τα VUL111, VUCR24 μοιάζουν περισσότερο στο *B. elkanii*, ενώ και οι δυο απομονώσεις αναπτύσσονται παρουσία 1% w/v NaCl όπως και τα *B. ferriligni* CCBAU 51502, *B. elkanii* LMG 6135. Όσον αφορά το VUEP21 που στο ML δέντρο εμφανίζεται σε διακριτό κλάδο με πλησιέστερο φυλογενετικά πρότυπο στέλεχος το *B. liaoningense* USDA 3622<sup>T</sup>, η εικόνα του ήταν διαφοροποιημένη από εκείνη του *B. liaoningense*. Με βάση τα αποτελέσματα των Ramirez-Bahena et al. (2009), το πρότυπο στέλεχος *B. liaoningense* αδυνατεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασία 37°C και σε 1 % (w/v) NaCl, εν αντιθέσει με το VUEP21, ενώ αδυναμία ανάπτυξης παρατηρείται και σε pH 4,5 (Ramirez-Bahena et al., 2009; Chahboune et al., 2011). Φαινοτυπική ετερογένεια για τους συγκεκριμένους παράγοντες ανάπτυξης έχει σημειωθεί σε διάφορα στελέχη *Bradyrhizobium* με κάποια από αυτά να είναι ανθεκτικά και άλλα ευαίσθητα στην παρουσία άλατος, ακόμα και σε αλατότητα <1% NaCl (Missbah El Idrissi et al., 2021; Lamrabet et al., 2022; Hsouna et al., 2022).

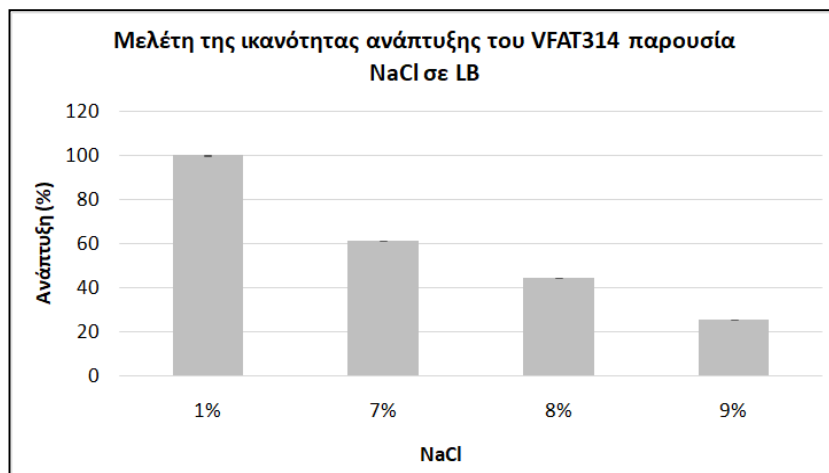
Ως προς την ικανότητα επιβίωσης στις παραπάνω συνθήκες περιβαλλοντικής πίεσης, μελετήθηκαν οι ενδοφυτικές βακτηριακές απομονώσεις VFAT314 και VFFN21. Η εκτίμηση της ανάπτυξης τους ήταν αρχικά ποιοτική. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με εκείνα σε βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης (pH 6,8-7, θερμοκρασία 28±2 °C, 0 % NaCl), εξετάζοντας την ανάπτυξη βακτηριακής κηλίδας μετά από μια ημέρα επώασης. Στον **Πίνακα 3.6** παρουσιάζεται η ικανότητα ανάπτυξης σημειώνοντας με «+» την ικανότητα επιβίωσης, με «-» την αδυναμία επιβίωσης, σε θρεπτικό μέσο TY ανάπτυξης και με «T» τη θερμοκρασία.

Πίνακας 3.6: Καταγραφή ικανότητας επιβίωσης του <i>Enterobacter</i> sp. VFAT314 σε διάφορες τιμές pH, θερμοκρασίας και αλατότητας.									
Βακτηριακά στελέχη	pH		T(°C)		NaCl (%)				
	5	8	37	42	1	3	4	5	7
<i>Enterobacter</i> sp. VFAT314	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus</i> sp. VFFN21	+	+	+	+	+	-	-	-	-

Με βάση τα αποτελέσματα που καταγράφηκαν στον Πίνακα 3.6, φαίνεται ότι τα δυο παραπάνω βακτήρια έχουν ικανότητα ανάπτυξης σε pH από 5 έως 8 και σε θερμοκρασίες από 28-42°C. Σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας, μόνο η απομόνωση VFAT314 φαίνεται ότι μπορεί να αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο περιεκτικότητας μέχρι 7% w/v NaCl. Δεδομένου ότι τα στελέχη *Bacillus halotolerans* είναι ανθεκτικά στην αλατότητα (Gao et al., 2022), η αδυναμία ανάπτυξης του VFFN21 σε θρεπτικό μέσο αυξημένης αλατότητας (4-7% w/v NaCl) ήταν μη αναμενόμενη. Στην περίπτωση του *Enterobacter* sp. VFAT314, λόγω του καλού αβιοτικού προφίλ ανάπτυξης του βακτηρίου αυτού, συνεχίστηκε επιπλέον η μελέτη ικανότητας ανοχής του σε διάφορες συγκεντρώσεις NaCl, κάνοντας ποσοτική εκτίμηση σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης LB περιεκτικότητας 7-9 % w/v NaCl. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με εκείνα του θετικού μάρτυρα ανάπτυξης, δηλαδή σε LB (1% w/v NaCl), εκφρασμένα με % ποσοστό ανάπτυξης (Πίνακας 3.7, Εικόνα 3.12) την 3<sup>η</sup> ημέρα επώασης.

Πίνακας 3.7: Καταγραφή ικανότητας επιβίωσης του <i>Enterobacter</i> sp. VFAT314 εκφρασμένο ως ποσοστό ανάπτυξης σε LB με διαφορετικές περιεκτικότητες NaCl.				
Στέλεχος	1% NaCl	7% NaCl	8% NaCl	9% NaCl
	(OD600nm ± STDV)	(OD600nm ± STDV)	(OD600nm ± STDV)	(OD600nm ± STDV)
VFAT314	2,5 ± 0,28	1,525 ± 0,035	1,108 ± 0,024	0,638 ± 0,014

Ως «±» συμβολίζεται η τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή.



Εικόνα 3.12: Διάγραμμα απεικόνισης της ικανότητας ανάπτυξης του *Enterobacter* VFAT314 παρουσία 1% και 7-9% w/v NaCl σε υγρό θρεπτικό μέσο LB. Η γραμμική σφάλματος υποδεικνύει την τυπική απόκλιση (±) από τη μέση τιμή.

Τα αποτελέσματα που σημειώθηκαν την 3<sup>η</sup> ημέρα επώασης, συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα των *Enterobacteriaceae* C1.2, C1.5, C3.1 και D2.4 όταν μελετήθηκαν σε προγενέστερο χρόνο (Tampakaki et al., αδημοσίευτα αποτελέσματα). Σε LB έως 8%, η ικανότητα ανάπτυξης του VFAT314 ήταν παρόμοια με εκείνη των C1.2, C1.5, C3.1, D2.4, εμφανίζοντας την ίδια σχεδόν τάση ανάπτυξης. Όμως, η αύξηση της περιεκτικότητας του NaCl σε 9% οδήγησε σε διαφοροποίηση αποτελεσμάτων, με το VFAT314 να εμφανίζει ανάπτυξη ακόμα και αν αυτή ήταν μειωμένη, σε αντιθεση με τα αλλά 4 *Enterobacteriaceae* που εμφάνισαν αδυναμία. Το *Enterobacter* sp. VFAT314 που είναι φυλογενετικά κοντά στο C1.2 και στο πρότυπο στέλεχος *Enterobacter ludwigii* συμβαδίζει με την εικόνα ανάπτυξης του τελευταίου, το οποίο επιβιώνει στους 15-42°C και σε pH 5-10 (Hoffmann et al., 2005).

Στην παρούσα μελέτη φαίνεται η διαφορετικότητα των στελεχών ακόμα και του ίδιου είδους λόγω απόκλισης στην απόκριση στις εξεταζόμενες συνθήκες. Ο εντοπισμός ενδοφυτικών ριζοβακτηρίων αλλά και ριζοβίων με ανοχή σε pH 5 αναδεικνύει ένα πιθανό προσαρμοστικό χαρακτηριστικό σε όξινα περιβάλλοντα. Αυτό είναι σημαντικό κυρίως στα ριζόβια που λόγω έλλειψης ικανότητας ρύθμισης του εσωτερικού τους pH (O'Hara et al., 1989), εμφανίζουν αδυναμία ανάπτυξης σε χαμηλό pH για αυτό και στελέχη με αυτή την ιδιότητα δε βρίσκονται σε αφθονία (Harwani, 2006; Ali et al., 2009). Αντίθετα, οι περισσότερες μελέτες αναφέρουν ικανότητα βακτηριακής ανάπτυξης σε τιμές pH 6-8 (Blair, 1967; Shen et al., 2022), καθώς το αλκαλικό pH είναι περιβάλλον λιγότερο επιβλαβές για την επιβίωση τους (Lebrazi & Benbrahim, 2014). Με εξαίρεση τα ενδοφυτικά ριζοβακτήρια που έδειξαν θερμοανεκτικότητα, λίγες ήταν οι περιπτώσεις εντοπισμού ριζοβίων με το προσαρμοστικό αυτό χαρακτηριστικό. Βακτήρια ανθεκτικά σε υψηλή θερμοκρασία παράγουν το σάκχαρο τρεχαλόζη μέσω του γονιδίου συνθάση της 6-φωσφορικής τρεχαλόζης (Suarez et al. 2008), στη βιοσύνθεση του οποίου εμπλέκονται γονίδια όπως τα *otsAB/treS/treZY* (Reina-Bueno et al., 2012). Το σάκχαρο αυτό σχηματίζει μια στρώση γέλης καθώς τα κύτταρα αφυδατώνονται, αντικαθιστώντας το νερό, μειώνοντας έτσι τις επιπτώσεις από την ξηρασία και την αλατότητα π.χ. οσμωτική πίεση (Glick, 2012). Με εξαίρεση τα *Bradyrhizobium* και το *Rhizobium tropici*, σε όλα τα υπόλοιπα ριζόβια η παρουσία του NaCl έστω και περιεκτικότητας 1% w/v ήταν ανασταλτική της επιβίωσης τους. Σε ριζόβια με ανεκτικότητα στην αλατότητα, έχουν εντοπιστεί πολλαπλά γονιδιακά συστήματα που δυνητικά εμπλέκονται σε μηχανισμούς ανοχής στην αλατότητα και στην ωσμωρύθμιση (Zhou et al., 2012), όπως τα γονίδια *otsA*, *Auc* και *Usp* (Yadav et al., 2021).

#### **3.4.1.2) Έλεγχος αντοχής σε υδατική καταπόνηση**

Επιλεγμένα ριζόβια και ενδοφυτικά ριζοβακτήρια μελετήθηκαν ως προς την ικανότητα ανάπτυξης τους σε συνθήκες ξηρασίας με την προσθήκη πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG 6000),

καταγράφοντας την οπτική πυκνότητα (OD=600nm) την 3<sup>η</sup> ημέρα επώασης. Η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) με μοριακό βάρος 6000 είναι ένα φυσικό, υδατοδιαλυτό, μη ιονικό πολυμερές (Ranjbarfordoei et al., 2000). Η ένωση αυτή επιτρέπει τη δημιουργία ενός περιβάλλοντος που μιμείται τις συνθήκες καταπόνησης λόγω ξηρασίας, ως αποτέλεσμα της μείωσης του υδατικού δυναμικού. Η πρόκληση οσμωτικής καταπόνησης σε φυτά (Muscolo et al., 2014) και σε βακτήρια (Marulanda et al., 2009; Wang et al., 2014), επιφέρει μείωση του δυναμικού του νερού χωρίς όμως να μειώνει την πραγματική περιεκτικότητα της υγρής καλλιέργειας σε νερό (Serraj & Sinclair, 2002).

Στον Πίνακα 3.7, παρουσιάζεται η ικανότητα ανάπτυξης του κάθε στελέχους *Rhizobium* απουσία (κανονικές συνθήκες ανάπτυξης-θετικός μάρτυρας) και παρουσία 10% και 20% v/v PEG 6000. Επίσης, η ανάπτυξη του κάθε βακτηριακού στελέχους στις παραπάνω συνθήκες συσχετίστηκε με την ανάπτυξη απουσίας PEG, ώστε να υπολογισθεί το ποσοστό ανάπτυξης του κάθε στελέχους (Εικόνα 3.13).

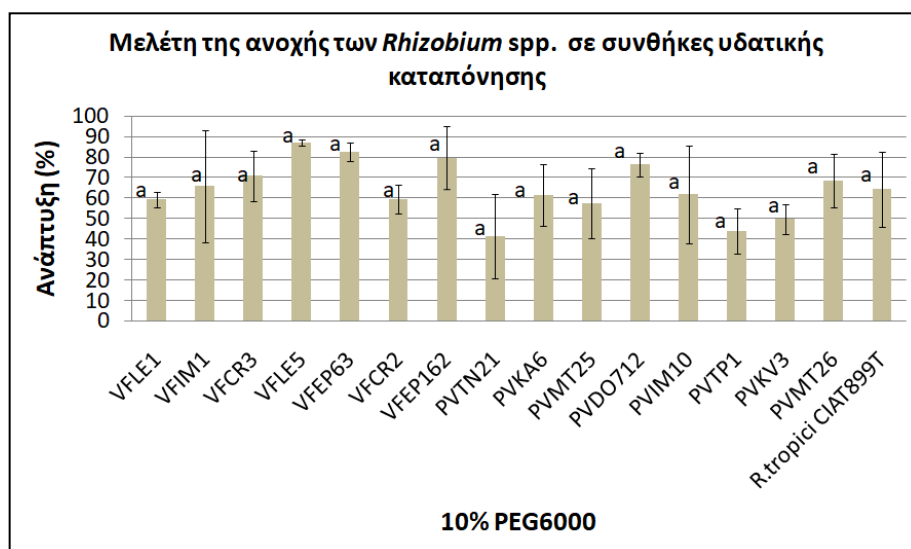
**Πίνακας 3.7:** Επίδραση της ξηρασίας στην ικανότητα ανάπτυξης βακτηρίων του γένους *Rhizobium*.

Βακτηριακά στελέχη	0% PEG	10% PEG	20% PEG	Ανάπτυξη (%)		
	OD <sub>600nm</sub> ±STDV	OD <sub>600nm</sub> ±STDV	OD <sub>600nm</sub> ±STDV	0% PEG	10% PEG ±STDV	20% PEG
VFLE1	0,47±0,074	0,280±0,071	0	100%	59,21% ±3,8 a	0%
VFIM1	0,47±0,037	0,34±0,166	0	100%	65,91% ±27,32 a	0%
VFRC3	0,40±0,080	0,34±0,031	0	100%	70,78% ±12,33 a	0%
VFLE5	0,41±0,016	0,36±0,028	0	100%	87,22% ±1,5 a	0%
VFEP63	0,41±0,040	0,35±0,042	0	100%	82,57% ±4,39	0%
VFRC2	0,47±0,030	0,23±0,041	0	100%	59,43%±7,15 a	0%
VFEP162	0,5±0,027	0,39±0,064	0	100%	79,58%±15,31 a	0%
PVTN21	1,89±0,51	0,74±0,37	0	100%	41,35% ±20,52 a	0%
PVKA6	1,60±0,24	1,01±0,38	0	100%	61,36%±15,13 a	0%
PVMT25	1,73±0,18	0,99±0,29	0	100%	57,58% ±17,05 a	0%
PVDO712	1,95±0,53	1,48±0,33	0	100%	76,43% ±5,75 a	0%
PVIM10	2,11±0,08	1,32±0,33	0	100%	61,72% ±24,01 a	0%
PVTP1	2,60±0,40	1,04±0,10	0	100%	43,91% ±10,88 a	0%
PVKV3	2,43±0,27	1,22±0,28	0	100%	49,73% ±7,19 a	0%
PVMT26	2,03±0,33	1,37±0,04	0	100%	68,40% ±12,90 a	0%
<i>R. tropici</i> CIAT899 <sup>T</sup>	2,18±0,16	1,41±0,43	0	100%	64,33% ±18,35 a	0%

Οι μέσες τιμές στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους σύμφωνα με το Kruskal-Wallis ( $p \leq 0,05$ ). Ως «±» συμβολίζεται η τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή.

Σε πειράματα μελέτης της αντοχής των βακτηρίων σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης χρησιμοποιείται κλίμακα με βάση την οπτική πυκνότητα, η οποία επιτυγχάνει την κατηγοριοποίηση των βακτηρίων σε τέσσερις ομάδες (Alikhani & Mohamadi, 2010). Με αυτό

τον τρόπο επιτρέπεται ο χαρακτηρισμός των βακτηρίων ως πολύ ευαίσθητα ( $OD_{600nm} < 0,3$ ), ευαίσθητα ( $0,3 < OD_{600nm} < 0,4$ ), ανεκτικά ( $0,4 < OD_{600nm} < 0,5$ ) και πολύ ανεκτικά ( $0,5 < OD_{600nm}$ ). Με βάση την κλίμακα αυτή θα μπορούσαν να θεωρηθούν τα VFLE1 και VFCE2 ως πολύ ευαίσθητα, τα VFIM1, VFCE3, VFLE5, VFCE63, VFCE2, VFCE162 ως ευαίσθητα και όλα τα υπόλοιπα ως πολύ ανεκτικά σε 10% PEG 6000. Αντίθετα, σε 20% PEG 6000 κανένα από τα στελέχη δεν αναπτύχθηκε. Αν και η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας αποτελεί έναν ακριβή και γρήγορο τρόπο για την εκτίμηση της συγκέντρωσης της βιομάζας, οι τιμές των μετρήσεων επηρεάζονται από μια σειρά παραγόντων, όπως οι συνθήκες καλλιέργειας (τύπος θρεπτικού μέσου, στάδιο ανάπτυξης, συνθήκες καταπόνησης, γεωμετρία των κυττάρων/αποικιών, ενδογενής ρυθμός ανάπτυξης, παρουσία και συγκέντρωση εκκρινόμενων ενώσεων) και οι προδιαγραφές της μέτρησης (μοντέλο φασματοφωτόμετρου και μήκος κύματος) (Myers et al., 2013). Για το λόγο αυτό, οι τιμές της οπτικής πυκνότητας χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της σχετικής ποσοστιαίας ανάπτυξης (%) σε υδατική καταπόνηση (10 και 20% PEG) σε σύγκριση με την ικανότητα ανάπτυξης των στελεχών απουσία καταπόνησης. Ακολούθως, με βάση το ποσοστό ανάπτυξης του κάθε στελέχους έγινε και η μεταξύ τους σύγκριση προκειμένου να αξιολογηθεί η αντοχή τους στις υπό μελέτη συνθήκες καταπόνησης.



**Εικόνα 3.13:** Διαγραμματική παρουσίαση του ποσοστού ανάπτυξης των υπό μελέτη στελεχών του γένους *Rhizobium* σε συνθήκες ξηρασίας. Η γραμμή σφάλματος υποδεικνύει την τυπική απόκλιση ( $\pm$ ) από τη μέση τιμή.

Σύμφωνα με την **Εικόνα 3.13**, η αύξηση της περιεκτικότητας του PEG προκάλεσε μείωση του ποσοστού ανάπτυξης όλων των βακτηρίων σε σχέση με τη βέλτιστη συνθήκη ανάπτυξης (0% PEG). Ωστόσο, το ποσοστό της μείωσης που προκλήθηκε, από την παρουσία 10 και 20% PEG, διέφερε σημαντικά. Συγκεκριμένα, σε σχέση με τις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης η παρουσία 10 % PEG στο μέσο ανάπτυξης των βακτηρίων διαμόρφωσε ένα εύρος τιμών ποσοστών

ανάπτυξης που κυμάνθηκε από 41,34% - 87,22%. Το VFLE5 εμφάνισε το μεγαλύτερο ποσοστό ανάπτυξης (87,22%), ενώ το PVTN21 εμφάνισε το χαμηλότερο (41,34%). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι τα ριζόβια που ελέγχθηκαν εμφάνισαν αντοχή σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης που δημιουργούνται από την προσθήκη 10% v/v PEG. Αντίθετα, η προσθήκη 20% PEG στο μέσο ανάπτυξης των βακτηρίων αποτέλεσε ανασταλτικό παράγοντα ανάπτυξης (0%), που συναντάται ορισμένες φορές σε στελέχη *R. leguminosarum* sv. *viciae* (Abdel-Lateif et al., 2016).

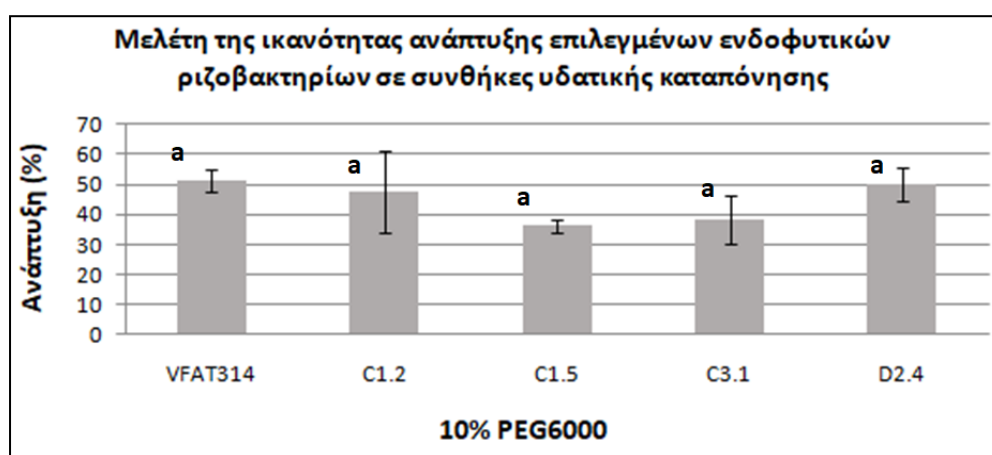
Από τα ενδοφυτικά ριζοβακτήρια επιλέχθηκαν προς μελέτη τα *Enterobacter* sp. VFAT314, C1.2, C1.5, C3.1, η *Lelliottia* sp. D2.4 και ο *Bacillus* sp. VFFN21. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.8** και στην **Εικόνα 3.14**, όπου και συγκρίνεται η ικανότητα ανάπτυξης του κάθε βακτηρίου απουσία (κανονικές συνθήκες ανάπτυξης-θετικός μάρτυρας) και παρουσία 10% και 20% v/v PEG 6000. Επίσης, η ανάπτυξη του κάθε βακτηριακού στελέχους στις παραπάνω συνθήκες συσχετίστηκε με την ανάπτυξη απουσίας PEG, ώστε να υπολογισθεί το ποσοστό ανάπτυξης του κάθε βακτηρίου.

<b>Πίνακας 3.8:</b> Επίδραση της ξηρασίας στην ικανότητα ανάπτυξης επιλεγμένων ριζοβακτηρίων.						
Βακτηριακά στελέχη	0% PEG	10% PEG	20% PEG	Ανάπτυξη (%)		
	OD <sub>600nm</sub> ±STDV	OD <sub>600nm</sub> ±STDV	OD <sub>600nm</sub> ±STDV	0% PEG	10% PEG ±STDV	20% PEG
VFAT314	3,14±0,410	1,61±0,093	0	100%	51,52% ±3,756 a	0%
C1.2	2,73±0,064	1,30±0,337	0	100%	47,68% ±13,465 a	0%
C1.5	3,21±0,382	1,17±0,211	0	100%	36,30% ±2,269 a	0%
C3.1	3,71±0,721	1,40±0,026	0	100%	38,41% ± 8,172 a	0%
D2.4	3±0,057	1,51±0,134	0	100%	50,22% ±5,425 a	0%

Οι μέσες τιμές στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους σύμφωνα με το Kruskal-Wallis ( $p \leq 0,05$ ). Ως «±» συμβολίζεται η τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή.



Γενικά οι βάκιλλοι δείχνουν ανοχή στην υδατική καταπόνηση λόγω της ικανότητάς τους να σχηματίζουν σπόρια (Yuanting et al., 2017). Παρότι η ανάπτυξη της απομόνωσης VFFN21 παρεμποδίστηκε ακόμα και σε 10% PEG, άλλα στελέχη του ίδιου είδους όπως τα *Bacillus* sp. III1 και III4 όχι μόνο έδειξαν ικανότητα επιβίωσης σε 20% και 30% PEG αλλά εμφάνισαν παράλληλα θερμοανεκτικότητα και ανοχή σε υψηλή αλατότητα (El Arbi et al., 2016). Με εξαίρεση το VFFN21, όλες οι υπόλοιπες απομονώσεις εμφάνισαν ποσοστά ανάπτυξης σε 10% PEG, από 36,29% (C1.5) - 51,51 % (VFAT314) (Πίνακας 3.8, Εικόνα 3.14). Αντίθετα, η παρουσία 20% PEG δεν επέτρεψε την ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών.



**Εικόνα 3.14:** Διαγραμματική παρουσίαση του ποσοστού ανάπτυξης επιλεγμένων ριζοβακτηρίων παρουσία 10% PEG 6000. Η γραμμή σφάλματος υποδεικνύει την τυπική απόκλιση ( $\pm$ ) από τη μέση τιμή.

Η συμπεριφορά των εξεταζόμενων *Enterobacter* παρουσία 20% PEG, έρχεται σε αντίθεση με τη συμπεριφορά άλλων στελεχών του ίδιου γένους (Abdelaal et al., 2021; Taha et al., 2022) που αν και έχουν ικανότητα 20% και 35% PEG είναι μειωμένη λόγω της αύξησης περιεκτικότητας του μέσου σε PEG.

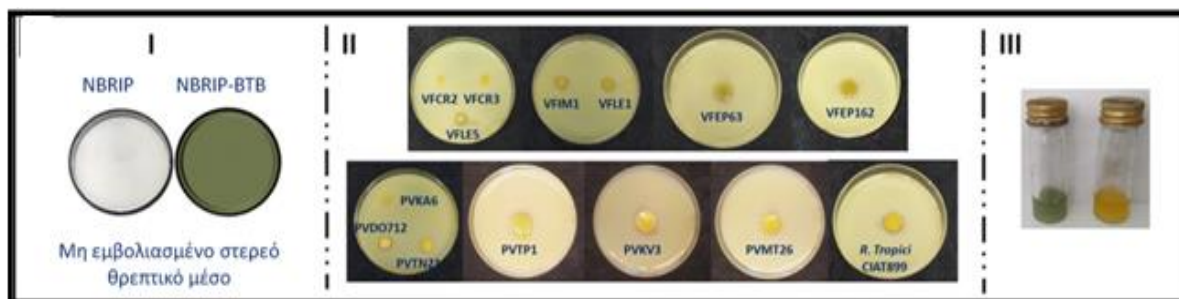
### 3.4.2) *in vitro* ΜΕΛΕΤΗ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΑΓΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΑΠΟ ΡΙΖΟΒΑΚΤΗΡΙΑ

#### 3.4.2.1) Μελέτη της ικανότητας διαλυτοποίησης φωσφόρου σε θρεπτικό υλικό NBRI-BTB

Στην παρούσα εργασία, η ικανότητα διαλυτοποίησης του φωσφόρου από ριζόβια και ενδοφυτικά ριζοβακτήρια εξετάστηκε σε στερεό θρεπτικό υλικό NBRI-BTB, διήρκεσε περίπου 10-14 ημέρες και σε όλη τη διάρκεια της επώασης παρατηρούνταν η πορεία της εμφάνισης διαυγούς ζώνης διαλυτοποίησης παράλληλα με την αλλαγή του χρώματος στο θρεπτικό μέσο. Την τελευταία ημέρα της επώασης μετρήθηκε η διάμετρος της ζώνης και έγινε φωτογράφιση. Συμπληρωματικά, η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό NBRI-BTB, από

όπου εκτιμήθηκε φασματοφωτομετρικά η αλλαγή του χρώματος στο θρεπτικό μέσο και παράλληλα έγινε μέτρηση της αλλαγής του pH στις 24 και 72 ώρες.

Η ικανότητα διαλυτοποίησης του φωσφόρου εξετάστηκε σε 14 στελέχη *Rhizobium* και όλα εμφάνισαν αλλαγή χρώματος (από πράσινο σε κίτρινο), η οποία ήταν αναμενόμενη και ενδεικτική της ικανότητας διαλυτοποίησης του φωσφόρου (**Εικόνα 3.15**). Ο δείκτης διαλυτοποίησης φωσφόρου (PSI) υπολογίστηκε για κάθε στέλεχος και οι τιμές κυμάνθηκαν από 2-2,8 με την μεγαλύτερη τιμή PSI να παρουσιάζει το στέλεχος VFLE5.



**Εικόνα 3.15: Α)** Ποιοτική εκτίμηση της ικανότητας διαλυτοποίησης του φωσφόρου των υπό μελέτη *Rhizobium* με βάση την αλλαγή χρώματος από πράσινο σε κίτρινο και το σχηματισμό διαγούσης ζώνης σε στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης. Στο Τμήμα I: παρουσιάζεται το μη εμβολιασμένο στερεό υπόστρωμα NBRIP με ή χωρίς BTB. Στο Τμήμα II: παρουσιάζεται η όψη του εμβολιασμένου στερεού υποστρώματος NBRIP-BTB. Στο Τμήμα III: παρουσιάζεται η όψη μη εμβολιασμένου και εμβολιασμένου υγρού θρεπτικού μέσου NBRIP-BTB

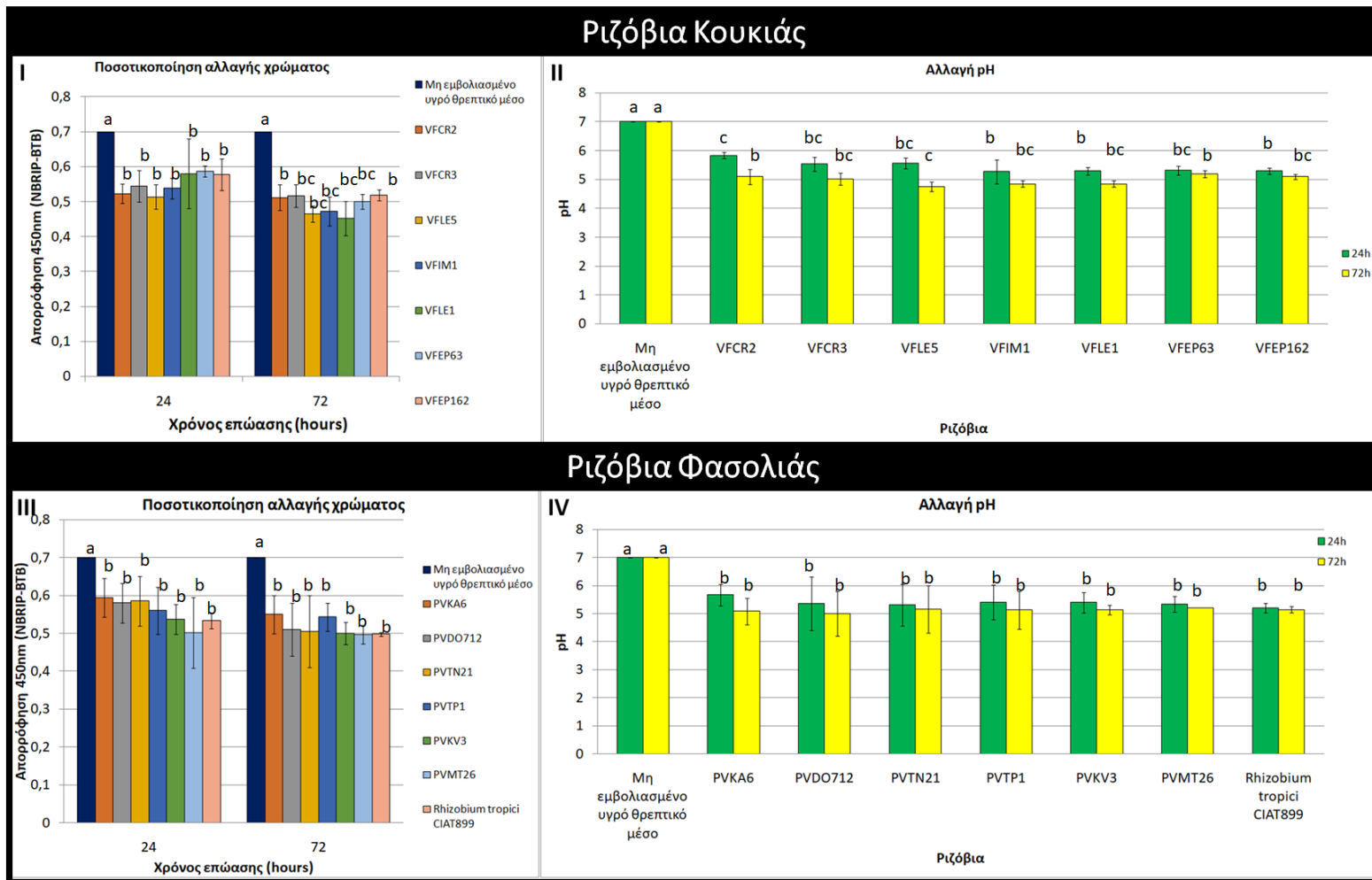
Η ικανότητα διαλυτοποίησης φωσφόρου στα υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη εξετάστηκε επιπρόσθετα και σε υγρό θρεπτικό μέσο NBRIP-BTB παρατηρώντας την αλλαγή χρώματος του θρεπτικού μέσου λόγω της πτώσης του pH. Η καταγραφή της φασματοφωτομετρικής αλλαγής του χρώματος στα 450 nm και της αλλαγής του pH πραγματοποιήθηκε κάνοντας δειγματοληψία στις 24 και 72 ώρες μετά την έναρξη της καλλιέργειας.

**Πίνακας 3.9:** Καταγραφή φασματοφωτομετρικής αλλαγής του χρώματος και αλλαγής του pH στις 24 και 72 ώρες εμβολιασμού του υγρού θρεπτικού μέσου NBRIP/BTB με στελέχη *Rhizobium*.

Βακτηριακά Στελέχη	24h		72h	
	OD <sub>450nm</sub>	pH	OD <sub>450nm</sub>	pH
Μάρτυρας	0,7 a	7a	0,7 a	7a
<i>Rhizobium</i> κουκιού				
VFCR2	0,523±0,027b	5,83±0,11c	0,512±0,036b	5,095±0,27b
VFCR3	0,544±0,045b	5,53±0,24bc	0,517±0,032b	5,016±0,20bc
VFLE5	0,513±0,035b	5,56±0,18bc	0,465±0,023bc	4,75±0,167c
VFIM1	0,538±0,029b	5,27±0,41b	0,472±0,041bc	4,85±0,11bc
VFLE1	0,58±0,1b	5,29±0,13b	0,452±0,049bc	4,85±0,11bc
VFEP63	0,587±0,016b	5,32±0,15bc	0,5±0,022bc	5,18±0,12b
VFEP162	0,577±0,045b	5,29±0,10b	0,519±0,016b	5,1±0,08bc
<i>Rhizobium</i> φασολιάς				
PVKA6	0,594±0,051b	5,67±0,38b	0,55±0,05b	5,08±0,47b
PVDO712	0,58±0,052b	5,36±0,96b	0,51±0,07b	5±0,8b
PVTN21	0,585±0,065b	5,31±0,74b	0,505±0,095b	5,16±0,84b
PVTP1	0,56±0,062b	5,4±0,62b	0,543±0,037b	5,13±0,67b

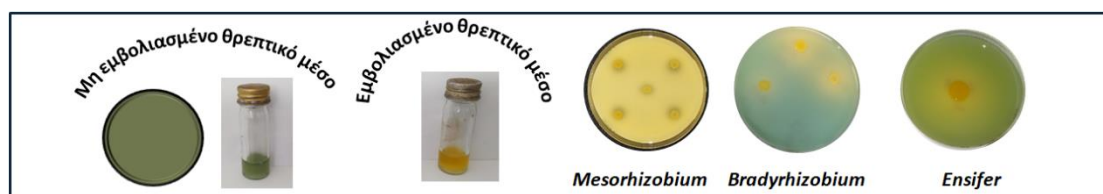
PVKV3	0,537±0,039b	5,4±0,36b	0,5±0,03b	5,13±0,17b
PVMT26	0,502±0,093b	5,33±0,28b	0,497±0,024b	5,21±0,01b
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 <sup>T</sup>	0,533±0,02b	5,2±0,17b	0,498±0,005b	5,14±0,11b
Οι μέσες τιμές στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους σύμφωνα με το LSD ( $p \leq 0,05$ ). Ως «±» συμβολίζεται η τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή.				

Από τις φασματοφωτομετρικές μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση της αλλαγής του χρώματος του θρεπτικού μετά από μόλυνση με ριζόβια κουκιού, οι τιμές κυμάνθηκαν από 0,513-0,587 μετά από 24 ώρες και από 0,452-0,519 στις 72 ώρες. Κάτι αντίστοιχο παρατηρήθηκε και στην περίπτωση των ριζοβίων της φασολιάς, όπου τιμές του OD κυμάνθηκαν από 0,502-0,594 και από 0,497-0,55 στις 24 και στις 72 ώρες, αντίστοιχα μετά τη μόλυνση του θρεπτικού μέσου. Ακόμα, σύμφωνα με τις μετρήσεις pH, η επώαση των *Rhizobium* οδήγησε σε μείωση της τιμής pH. Έτσι στην περίπτωση των ριζοβίων κουκιού, από αρχική τιμή 7, το pH διαμορφώθηκε σε 5,27-5,83 στις 24 ώρες και σε 4,75-5,18 στις 72. Ομοίως στην περίπτωση των ριζοβίων φασολιάς, από αρχική τιμή 7 το pH κυμάνθηκε σε 5,2-5,67 και σε 5-5,21 στις 24 και στις 72 ώρες αντίστοιχα. Με βάση τη στατιστική ανάλυση που έγινε μεταξύ των στελεχών ανά δειγματοληψία, δεν ξεχώρισε κάποιο στέλεχος. Αντιθέτως η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων που πρέκυψαν σχετικά με την αλλαγή του χρώματος του θρεπτικού και του pH μεταξύ της 24<sup>ης</sup> και 72<sup>ης</sup> ώρας επώασης ανά βακτήριο έδειξε ότι η αλλαγή των καταγραφόμενων τιμών για τα περισσότερα στελέχη είναι στατιστικά σημαντική. Γενικά, η πτώση της τιμής του pH οδηγεί σε οξίνιση του θρεπτικού μέσου και αποτελεί ένδειξη της ικανότητας διαλυτοποίησης, η οποία όμως μπορεί να οφείλεται και σε άλλους παράγοντες, όπως είναι η παραγωγή και η έκκριση οργανικών οξέων στο μέσο καλλιέργειας. Από τα παραπάνω η παρατηρούμενη πτωτική τάση της ποσοτικοποίησης της αλλαγής του χρώματος θα μπορούσε να είναι ανάλογη εκείνης της πτώσης του pH.



**Εικόνα 3.16:** Ποσοτική εκτίμηση της αλλαγής χρώματος (Τμήμα I και III) και του pH (Τμήμα II, IV) σε υγρό θρεπτικό μέσο NBRIP-BTB για τα στελέχη *Rhizobium* κουκιάς και φασολιάς. Η γραμμή σφάλματος υποδεικνύει την τυπική απόκλιση ( $\pm$ ) από τη μέση τιμή.

Ανάλογη μελέτη έγινε για τη διερεύνηση της ικανότητας διαλυτοποίησης του φωσφόρου σε 5 *Mesorhizobium*, 3 *Bradyrhizobium* και ένα *Ensifer*. Από την παρούσα βιοδοκιμή σε στερεοποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα NBRIP-BTB φάνηκε ότι όλα τα στελέχη είχαν ικανότητα αλλαγής χρώματος και σχημάτιζαν ζώνη διαλυτοποίησης, με PSI 2,6 (*Mesorhizobium*) και 2,1 (*Bradyrhizobium*, *Ensifer*). Από όλες τις εξεταζόμενες περιπτώσεις, στα *Mesorhizobium* ήταν η πιο έντονη ζώνη (**Εικόνα 3.17**).



**Εικόνα 3.17:** Παρουσίαση μη εμβολιασμένου στερεού και υγρού θρεπτικού υποστρώματος NBRIP-BTB και της αλλαγής του χρώματος από πράσινο σε κίτρινο μετά από εμβολιασμό του υγρού θρεπτικού μέσου με *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* και *Ensifer*.

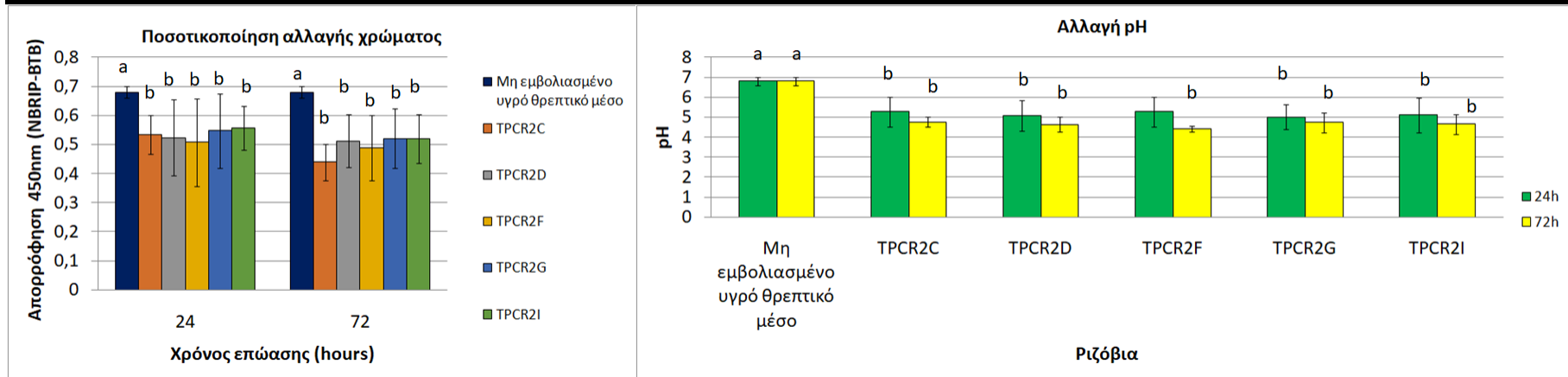
Η μελέτη της συγκεκριμένης ιδιότητας πραγματοποιήθηκε και σε υγρό θρεπτικό μέσο NBRIP-BTB, όπου στην περίπτωση των *Mesorhizobium* καταγράφηκε μεταβολή στο χρώμα του μέσου ανάπτυξης από 0,7 σε 0,507-0,556 (στις 24 ώρες) και σε 0,439-0,521 (στις 72 ώρες). Παράλληλα πτωτική τάση είχε και η τιμή του pH από 7 σε 5,01-5,28 (στις 24 ώρες) και σε 4,41-4,76 (στις 72 ώρες). Λιγότερο έντονη ήταν η αλλαγή χρώματος και η πτώση στην τιμή του pH, στην περίπτωση των *Bradyrhizobium*. Τα συγκεκριμένα ριζόβια άλλαξαν την τιμή του χρώματος του θρεπτικού από 0,7 σε 0,6- 0,65 (στις 24 ώρες) και σε 0,527-0,573 (στις 72 ώρες). Ως προς την αλλαγή της τιμής του pH, από 7 μειώθηκε σε 6,3- 6,65 (στις 24 ώρες) και σε 5,54-5,84 (στις 72 ώρες) (**Εικόνα 3.18-3.19**). Τέλος στην περίπτωση του *Ensifer* η καταγραφόμενη μείωση της αλλαγής χρώματος ήταν ανάλογη της μείωσης του pH. Στις 24 ώρες επώασης η τιμή για την αλλαγή του χρώματος το pH έφτασε στο 0,58 και στο 5,8, αντίστοιχα, ενώ στις 72 ώρες επώασης στο 0,42 και το 4,2, αντίστοιχα (**Εικόνα 3.20**).

**Πίνακας 3.10:** Καταγραφή φασματοφωτομετρικής αλλαγής του χρώματος και αλλαγής του pH στις 24 και 72 ώρες εμβολιασμού του υγρού θρεπτικού μέσου NBRIP/BTB με στελέχη *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* και *Ensifer*.

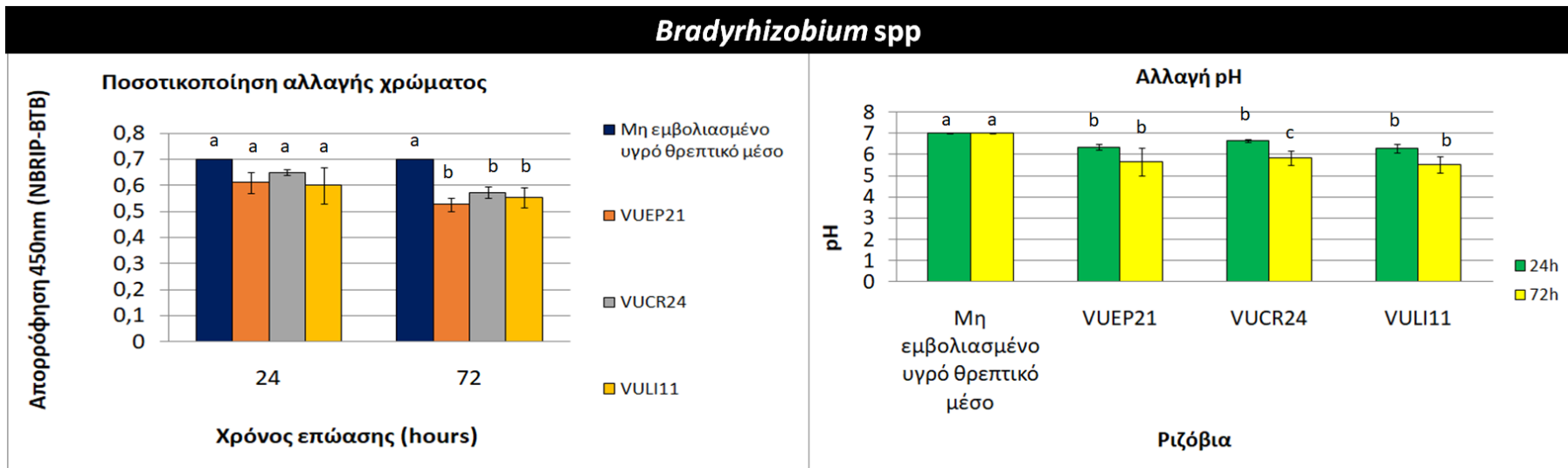
Βακτηριακά Στελέχη	24		72	
	OD <sub>450nm</sub>	pH	OD <sub>450nm</sub>	pH
Μάρτυρας	0,7 a	7a	7 a	7 a
<b><i>Mesorhizobium</i></b>				
TPCR2C	0,535±0,067b	5,28±0,74b	0,439±0,0620b	4,76±0,25b
TPCR2D	0,523±0,131b	5,07±0,77b	0,512±0,091b	4,64±0,38b
TPCR2F	0,507±0,15b	5,27±0,74b	0,488±0,113b	4,41±0,15b
TPCR2G	0,547±0,127b	5,01±0,63b	0,521±0,102b	4,73±0,5b
TPCR2I	0,556±0,076b	5,1±0,88b	0,52±0,084b	4,65±0,49b
<b><i>Bradyrhizobium</i></b>				
VUEP21	0,61±0,04a	6,35±0,15b	0,527±0,026b	5,66±0,65b
VUCR24	0,65±0,01a	6,65±0,05c	0,573±0,021b	5,84±0,32b
VULI11	0,6±0,07a	6,3±0,2b	0,554±0,038b	5,54±0,38b
<b><i>Ensifer</i></b>				
VUKA2	0,58±0,06b	5,8±0,6b	0,42±0,02b	4,2±0,2c

Οι μέσες τιμές στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους σύμφωνα με το LSD ( $p \leq 0,05$ ). Ως «±» συμβολίζεται η τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή.

## Mesorhizobium spp

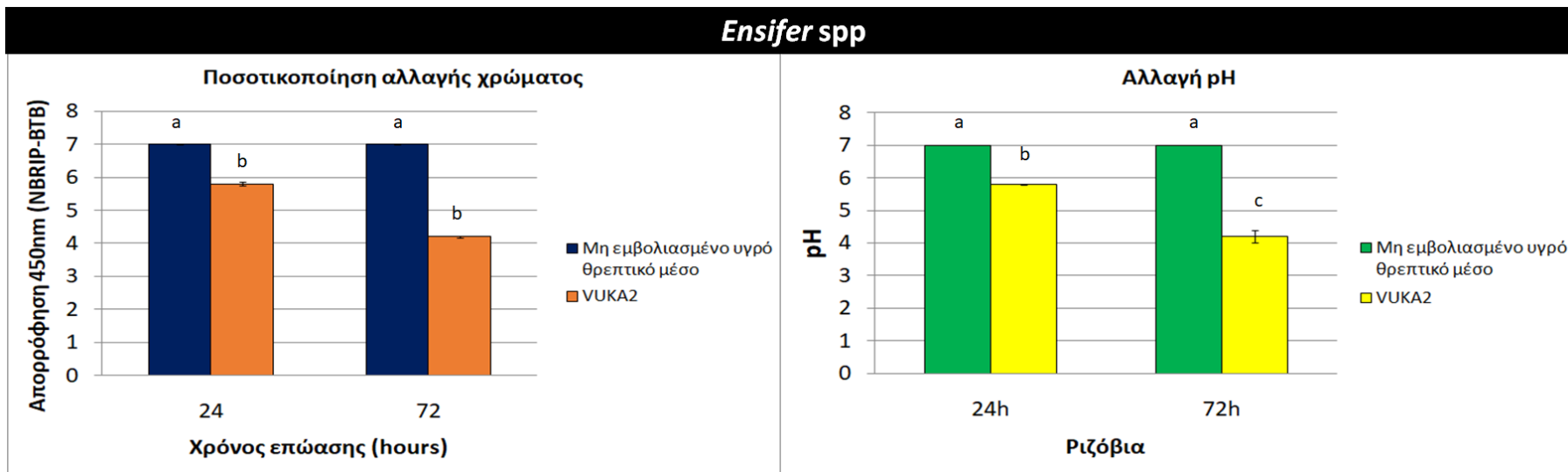


**Εικόνα 3.18:** Ποσοτική εκτίμηση της αλλαγής χρώματος και του pH σε υγρό θρεπτικό μέσο NBRIP-BTB για τα *Mesorhizobium*. Η γραμμή σφάλματος υποδεικνύει την τυπική απόκλιση ( $\pm$ ) από τη μέση τιμή.



**Εικόνα 3.19:** Ποσοτική εκτίμηση της αλλαγής χρώματος και του pH σε υγρό θρεπτικό μέσο NBRIP-BTB για τα *Bradyrhizobium*. Η γραμμή σφάλματος υποδεικνύει την τυπική απόκλιση ( $\pm$ ) από τη μέση τιμή.





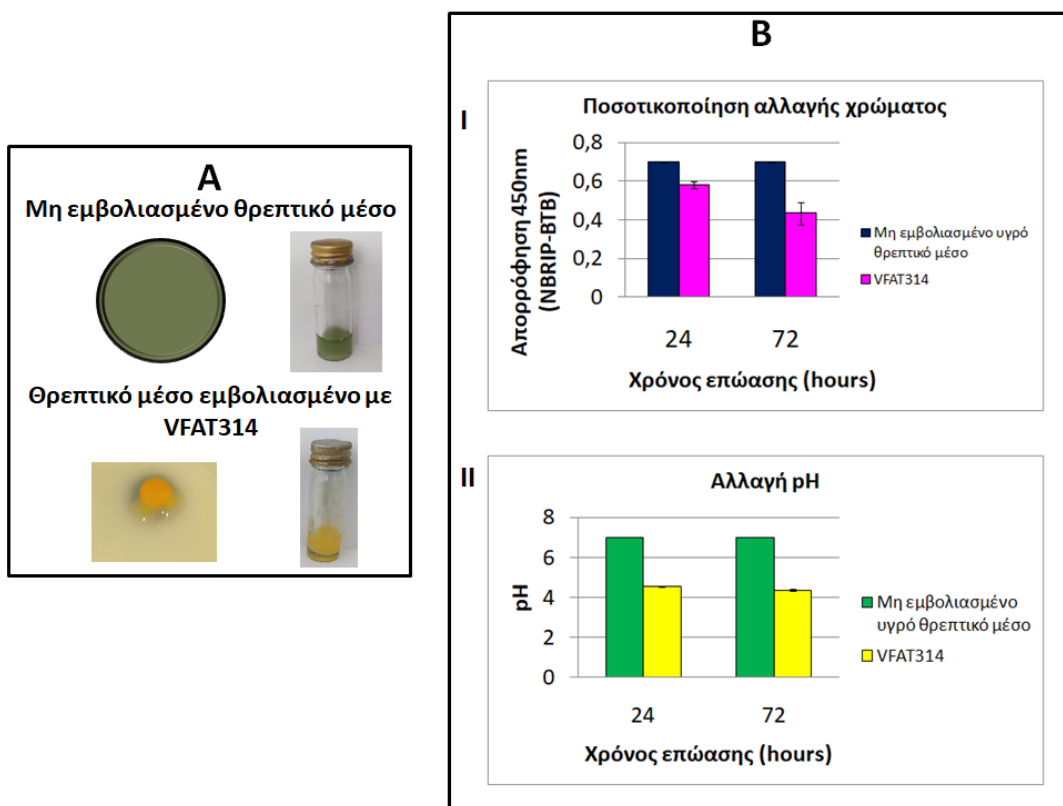
**Εικόνα 3.20:** Ποσοτική εκτίμηση της αλλαγής χρώματος και του pH σε υγρό θρεπτικό μέσο NBRIP-BTB για το *Ensifer*. Η γραμμή σφάλματος υποδεικνύει την τυπική απόκλιση ( $\pm$ ) από τη μέση τιμή.

Ικανότητα διαλυτοποίησης φωσφόρου έχει αναφερθεί σε στελέχη ριζοβίων που ανήκουν σε όλα σχεδόν τα γένη, όπως για παράδειγμα στα *Mesorhizobium* (Peix et al., 2001), *Rhizobium* (Shiri et al., 2012), *Bradyrhizobium* (Boiero et al., 2007), *Ensifer* (Oves et al., 2017; Aslani borj et al., 2022; Baliyan et al., 2022). Στην περίπτωση των *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae* έχουν αναφερθεί στελέχη που διαλυτοποιούν το φώσφορο (Alikhani et al., 2006), όπως παρατηρήθηκε και με τα στελέχη VF3R3, VFLE5, VFIM1, VFLE1 της παρούσας μελέτης, ενώ άλλα δεν έχουν την ικανότητα αυτή, όπως το *Rhizobium leguminosarum* sv. *viceae* ATCC 10004<sup>T</sup> (Peix et al., 2001). Στην περίπτωση των *Bradyrhizobium* έχουν αναφερθεί στελέχη που διαλυτοποιούν το φώσφορο (Boiero et al., 2007), όπως παρατηρήθηκε και με τα στελέχη VUEP21, VUCR24, VULI11 της παρούσας μελέτης. Το ίδιο ισχύει και για τις περιπτώσεις των *Mesorhizobium ciceri* και *Ensifer fredii*, καθώς έχουν αναφερθεί στελέχη που διαλυτοποιούν το φώσφορο (Zafar et al., 2017; Shi et al., 2022) όπως παρατηρήθηκε και με τα στελέχη TPCR2C, TPCR2D, TPCR2F, TPCR2G, TPCR2I και VUKA2 της παρούσας εργασίας.

Τα ενδοφυτικά βακτήρια *Enterobacter* sp. VFAT314 και *Bacillus* sp. VFFN21 εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα διαλυτοποίησης του φωσφόρου σε στερεοποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα NBRIP-BTB. Τα στελέχη αυτά έδειξαν ικανότητα αλλαγής χρώματος και σχηματισμού ζώνης διαλυτοποίησης φωσφόρου με τιμή PSI ίση με 3 (VFAT314) και 2,1 (VFFN21) (Εικόνα 3.17 και 3.18). Το *Enterobacter* sp. VFAT314 σε σχέση με το *Bacillus* sp. VFFN21, εκτός από το ότι είχε μεγαλύτερο PSI, παρουσίασε ικανότητα αλλαγής χρώματος σε μικρότερο χρονικό διάστημα σχηματίζοντας πιο έντονη και διαυγή ζώνη. Ικανότητα διαλυτοποίησης φωσφόρου έχει αναφερθεί σε στελέχη *Enterobacter ludwigii* (Walrola & Yoon, 2013; Li et al., 2021) και *Bacillus halotolerans* (Elakhdar et al., 2020) όπως παρατηρήθηκε και με τα στελέχη *Enterobacter ludwigii* VFAT314 και *Bacillus halotolerans* VFFN21 της παρούσας μελέτης.

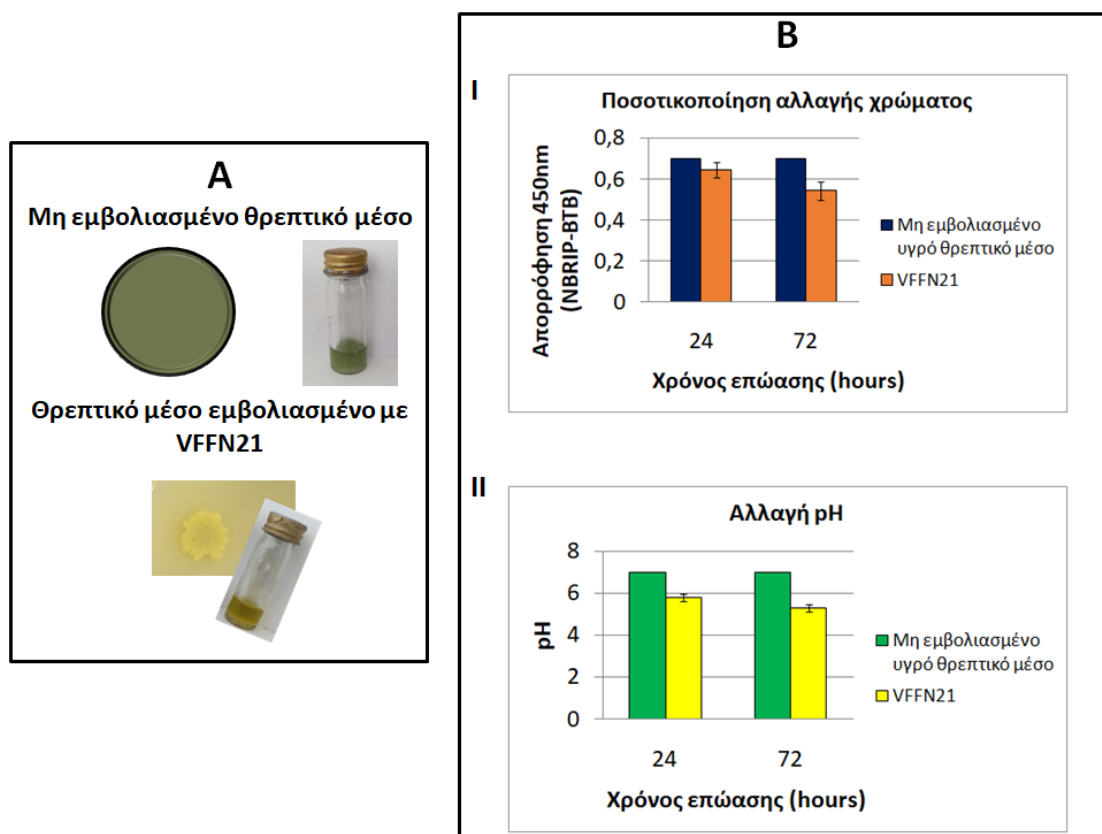
<b>Πίνακας 3.11:</b> Καταγραφή φασματοφωτομετρικής αλλαγής του χρώματος και αλλαγής του pH στις 24 και 72 ώρες εμβολιασμού του υγρού θρεπτικού μέσου NBRIP/BTB με στελέχη <i>Enterobacter</i> και <i>Bacillus</i> .				
	24		72	
	OD <sub>450nm</sub>	pH	OD <sub>450nm</sub>	pH
Μάρτυρας	0,7	7	0,7	7
<i>Enterobacter</i>				
VFAT314	0,582±0,018	4,55±0,27	0,434±0,055	4,37±0,28
<i>Bacillus</i>				
VFFN21	0,643±0,038	5,79±0,19	0,544±0,045	5,28±0,17
Οι μέσες τιμές στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους σύμφωνα με το LSD ( $p \leq 0,05$ ). Ως «±» συμβολίζεται η τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή.				

Ως προς την ποσοτικοποίηση της αλλαγής του χρώματος και της αλλαγής της τιμής του pH, το VFAT314 σημείωσε πτώση από 0,7 σε 0,582 και 0,434 εντός 24 και 72 ωρών αντίστοιχα, και από 7 σε 4,55 και 4,37 μετά από 24 και 72 ώρες, αντίστοιχα (Πίνακας 3.11).



**Εικόνα 3.21: A)** Ποιοτική εκτίμηση της ικανότητας διαλυτοποίησης του φωσφόρου του *Enterobacter* sp. VFAT314 με βάση την αλλαγή χρώματος από πράσινο σε κίτρινο σε στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης και το σχηματισμό διαυγούς στεφάνης. **B)** Ποσοτική εκτίμηση της αλλαγής χρώματος (I) και του pH (II) σε υγρό θρεπτικό μέσο NBRIP-BTB. Η γραμμή σφάλματος υποδεικνύει την τυπική απόκλιση ( $\pm$ ) από τη μέση τιμή.

Όσον αφορά το VFFN21 η αλλαγή του χρώματος δεν ήταν τόσο έντονη, αφού το πρώτο 24ωρο η καταγραφόμενη τιμή ήταν 0,64 και στις 72 ώρες ήταν 0,544. Η τιμή του pH στις χρονικές αυτές περιόδους δεν είχε μεγάλη διαφορά καθώς στις 24 και στις 72 ώρες η μέτρηση pH έδειξε 5,79 και 5,28, γεγονός που θα μπορούσε να δικαιολογήσει την αργή αλλαγή του χρώματος στο μέσο ανάπτυξης.



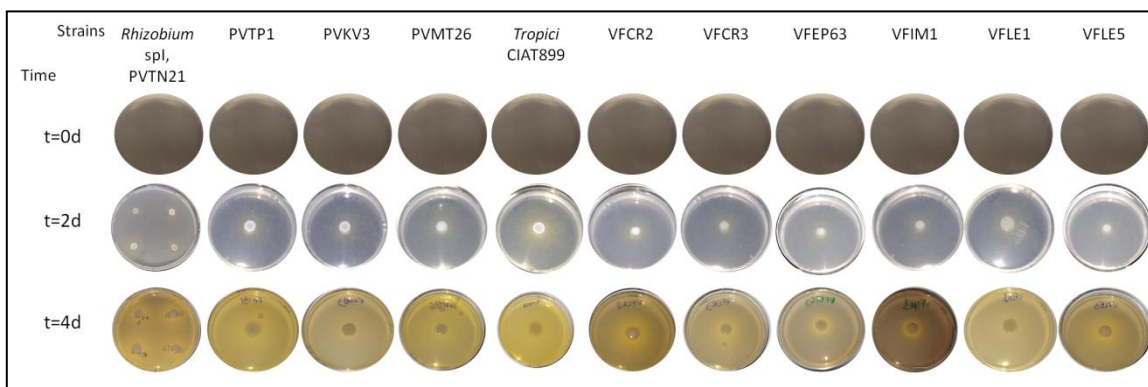
**Εικόνα 3.22:** **A)** Ποιοτική εκτίμηση της ικανότητας διαλυτοποίησης του φωσφόρου του *Bacillus* sp. VFFN21 με βάση την αλλαγή χρώματος από πράσινο σε κίτρινο σε στερεό και υγρό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης. **B)** Ποσοτική εκτίμηση της αλλαγής χρώματος (I) και του pH (II) σε υγρό θρεπτικό μέσο NBRIP-BTB. Η γραμμή σφάλματος υποδεικνύει την τυπική απόκλιση ( $\pm$ ) από τη μέση τιμή.

Εκτός από τα VFAT314 και VFFN21 εξετάστηκαν επιπλέον σε στερεό θρεπτικό μέσο NBRI-BTB άλλα 9 ενδοφυτικά ριζοβακτήρια (FXS11.30, FXS11.37, FXS11.33, FXS10.27, FXS8.23, EC2F, EC1A, VFFN7, VFAT10), από τα οποία μόνο το VFAT10 και το EC1A 2,5 θεωρήθηκαν πιθανοί διαλυτοποιητές φωσφόρου με PSI 2,2 και 2,5, αντίστοιχα (Πρόσθετο Υλικό, Πίνακας Σ3.1).

### 3.4.2.2) Μελέτη της ικανότητας παραγωγής σιδηροφόρων

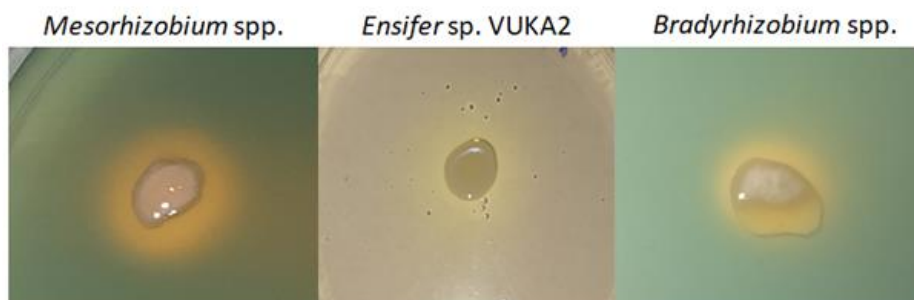
Η διερεύνηση της ικανότητας παραγωγής σιδηροφόρων πραγματοποιήθηκε με την τεχνική CAS η οποία διήρκεσε 7 ημέρες και καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής της βιοδοκιμής παρατηρούνταν το χρώμα του θρεπτικού μέσου. Όλα τα εξεταζόμενα ριζόβια φασολιάς και κουκιούεμφάνισαν ικανότητα αλλαγής χρώματος στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης. Ήδη από την

2<sup>η</sup>-3<sup>η</sup> ημέρα επώασης των βακτηρίων στο συγκεκριμένο μέσο ανάπτυξης παρατηρήθηκαν διαυγείς ζώνες κίτρινου χρώματος περιμετρικά της σχηματιζόμενης βακτηριακής κηλίδας, ενώ την 7<sup>η</sup> ημέρα διαπιστώθηκε η εξάπλωση της αλλαγής χρώματος σε όλη την επιφάνεια του στερεού θρεπτικού μέσου.



**Εικόνα 3.23:** Παραγωγή σιδηροφόρων από τα στελέχη *Rhizobium* φασολιάς και κουκιού.

Η ικανότητα παραγωγής σιδηροφόρων εξετάστηκε και στις απομονώσεις των *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* και *Ensifer*, με αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αλλαγής χρώματος από πράσινο σε κίτρινο τις περιπτώσεις των *Mesorhizobium* TPCR2C και *Bradyrhizobium* (VUCR24) της **Εικόνας 3.24**.



**Εικόνα 3.24:** Παραγωγή σιδηροφόρων από αντιπροσωπευτικά στελέχη απομονώσεων για τα γένη *Mesorhizobium* (TPCR2C), *Ensifer* (VUKA2), *Bradyrhizobium* (VUCR24).

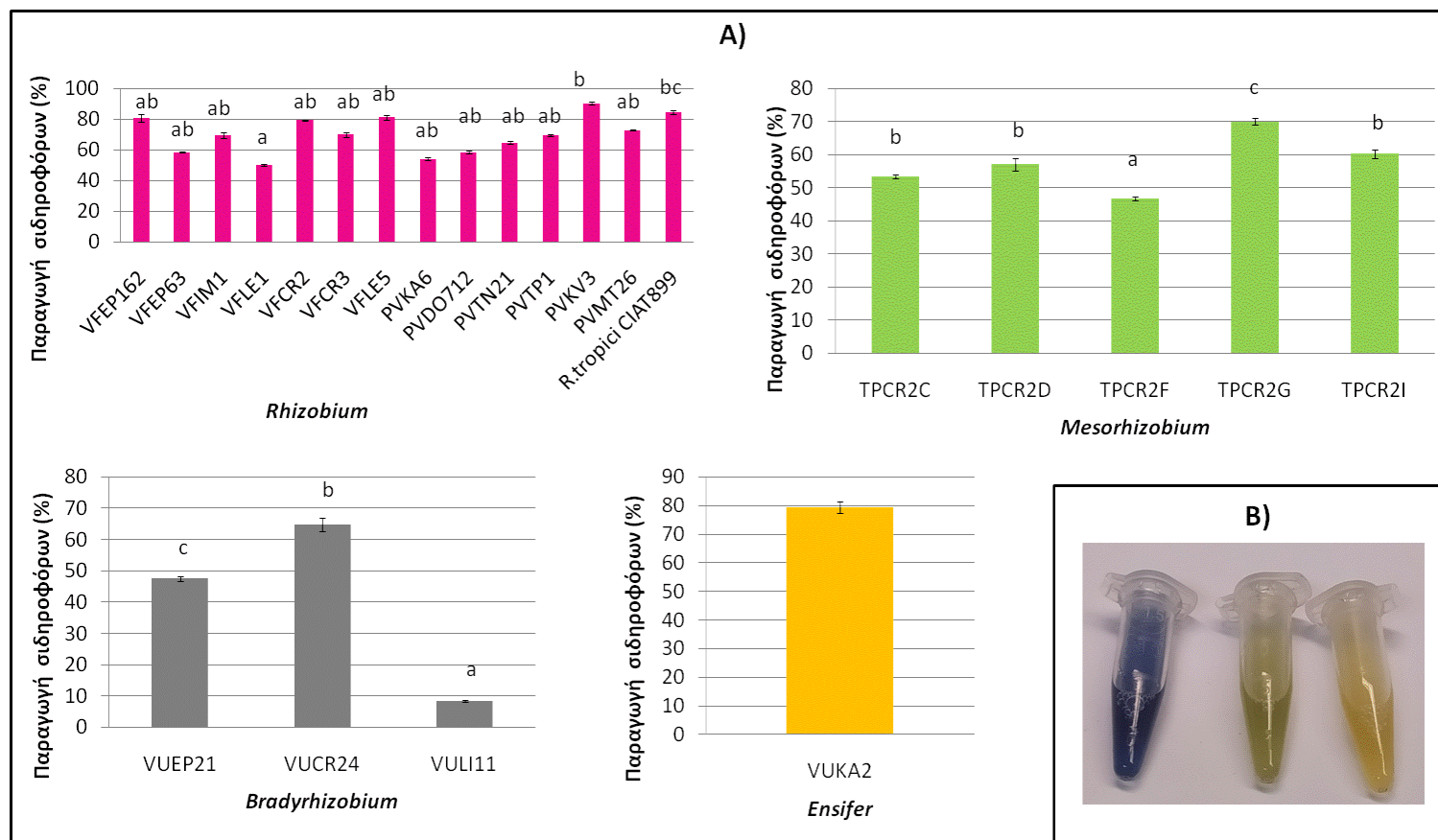
Η παραγωγή σιδηροφόρων εξετάστηκε επιπλέον με τη μέθοδο CAS σε υγρό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης, όπου εκτός από την καταγραφή της αλλαγής χρώματος μέσω αποχρωματισμού, έγινε και εκτίμηση του % παραγωγής σιδηροφόρων.

**Πίνακας 3.12:** Ποσοστό (%) παραγωγής σιδηροφόρων από στελέχη ριζοβίων στα γένη *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer*, *Bradyrhizobium*.

<b><i>Rhizobium</i></b>	<b>Παραγωγή σιδηροφόρων (%)</b>
VFEP162	80,72±2,48ab
VFEP63	58,55±0,49 ab
VFIM1	69,64±1,70 ab
VFLE1	50,36±0,76 a
VFCR2	79,28±0,57 ab
VFCR3	70,07±1,60 ab
VFLE5	81,20±1,54 ab
PVKA6	54,22±0,78 ac
PVDO712	58,55±0,88 ab
PVTN21	64,82±1,04 ab
PVTP1	69,64±0,87 ab
PVKV3	90,36±0,91 b
PVMT26	73,01±0,47 ab
<i>R.tropici</i> CIAT899	84,48±1,10 bc
<b><i>Mesorhizobium</i></b>	<b>Παραγωγή σιδηροφόρων (%)</b>
TPCR2C	53,49±0,64b
TPCR2D	57,13±1,87b
TPCR2F	46,70±0,59a
TPCR2G	69,98±1,01c
TPCR2I	60,27±1,42b
<b><i>Bradyrhizobium</i></b>	<b>Παραγωγή σιδηροφόρων (%)</b>
VUEP21	47,52±0,82c
VUCR24	64,72±2,18b
VULI11	8,43±0,43a
<b><i>Ensifer</i></b>	<b>Παραγωγή σιδηροφόρων (%)</b>
VUKA2	79,37±2,00

Οι μέσες τιμές στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους σύμφωνα με το Kruskal-Wallis ( $p \leq 0,05$ ) για τα στελέχη *Rhizobium*, *Mesorhizobium* και με το LSD ( $p \leq 0,05$ ) για τα στελέχη *Bradyrhizobium*. Ως «±» συμβολίζεται η τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή.

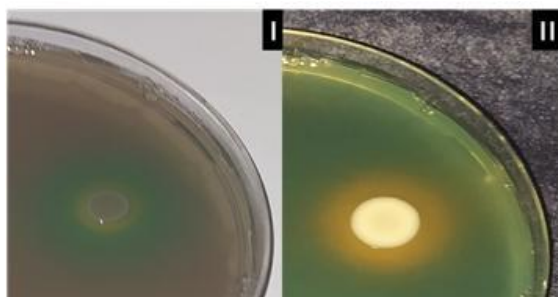
Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.12 και την Εικόνα 3.25 τα επίπεδα παραγωγής σιδηροφόρων κυμάνθηκαν από 50,36% (VFLE1) έως 90,36% (PVKV3) για τα στελέχη *Rhizobium*, από 46,70% (TPCR2F) έως 69,98% (TPCR2G) για τα στελέχη *Mesorhizobium*, από 8,43% (VULI11) έως 64,72% (VUCR24) για τα στελέχη *Bradyrhizobium* και για την μοναδική εξεταζόμενη απομόνωση *Ensifer* sp VUKA2, 79,37%.



**Εικόνα 3.25: Α)** Ποσοτική εκτίμηση της παραγωγής σιδηροφόρων σε στελέχη ριζοβίων στα γένη *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer*. **Β)** Αλλαγή του χρώματος του μέσου από μπλε σε πράσινο και κίτρινο, ανάλογη της ικανότητας παραγωγής σιδηροφόρων. Η γραμμή σφάλματος υποδεικνύει την τυπική απόκλιση ( $\pm$ ) από τη μέση τιμή.

Η παραγωγή σιδηροφόρων από τα *Ensifer* όπως το VUKA2 εντοπίζεται και σε άλλα στελέχη του γένους όπως στο *Ensifer adhaerens* MSN12 (43,17%), ενώ άλλα στελέχη δεν εμφανίζουν την ιδιότητα αυτή (Baliyan et al., 2022). Ως προς την ικανότητα παραγωγής σιδηροφόρων από τα *Bradyrhizobium*, υπάρχουν αναφορές τόσο για απομονώσεις που έχουν την ικανότητα αυτή (Lamrabet et al., 2022), εμφανίζοντας για παράδειγμα 98,7%  $\mu\text{g/ml}$  (Kumawat et al., 2022), όσο και στελέχη που δεν έχουν (Abd-Alla, 1998; Cavalcanti et al., 2020; Lamrabet et al., 2022; Chattopadhyay et al., 2022). Όσον αφορά τα *Mesorhizobium* και τα *Rhizobium*, υπάρχει πληθώρα αναφορών με παραγωγούς σιδηροφόρων (Wani et al., 2009; Bhagat et al., 2014; Mir et al., 2021), ενώ έχουν καταγραφεί και περιπτώσεις με στελέχη διαφορετικών ειδών του γένους *Mesorhizobium* που στερούνται της ικανότητας παραγωγής σιδηροφόρων (Fan et al., 2018).

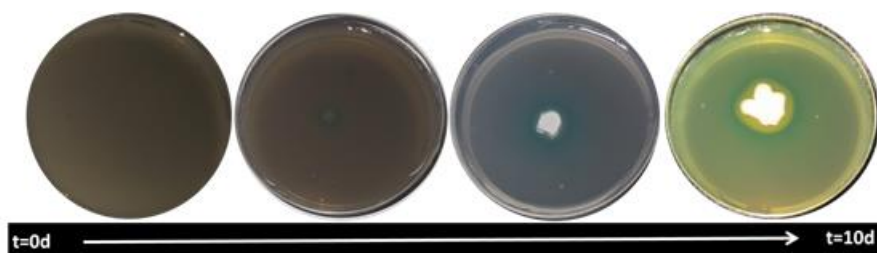
Στην περίπτωση των εξεταζόμενων ενδοφυτικών ριζοβακτηρίων, τα VFAT314 και VFFN21 παράγουν σιδηροφόρα, αλλά το χρονικό διάστημα που απαιτείται για τη συσσώρευση τους είναι μικρότερο για το VFAT314 (~4 μέρες, **Εικόνα 3.26**) σε σχέση με το VFFN21 (~10 μέρες, **Εικόνα 3.27**). Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.26** ήδη τη 2<sup>η</sup> ημέρα επώασης παρατηρείται αλλαγή του χρώματος, από πράσινο σε κίτρινο, περιμετρικά της βακτηριακής κηλίδας του *Enterobacter* sp. VFAT314, με την αλλαγή να είναι αρκετά πιο έντονη την 4<sup>η</sup> ημέρα επώασης σχηματίζοντας ευδιάκριτη κίτρινη ζώνη.



**Εικόνα 3.26:** Ικανότητα παραγωγής σιδηροφόρων από το *Enterobacter* sp. VFAT314, την 2<sup>η</sup> (I) και την 4<sup>η</sup> (II) ημέρα επώασης.

Αξίζει να αναφερθεί ότι στο VFFN21 σχηματίζεται μια επιπλέον ζώνη πράσινου-μπλε χρώματος που περιβάλλει τόσο την κίτρινη ζώνη όσο και τη βακτηριακή κηλίδα (**Εικόνα 3.27**). Η εικόνα αυτή είναι διαφορετική από εκείνη τόσο του VFAT314 όσο και των υπολοίπων εξεταζόμενων ριζοβίων.



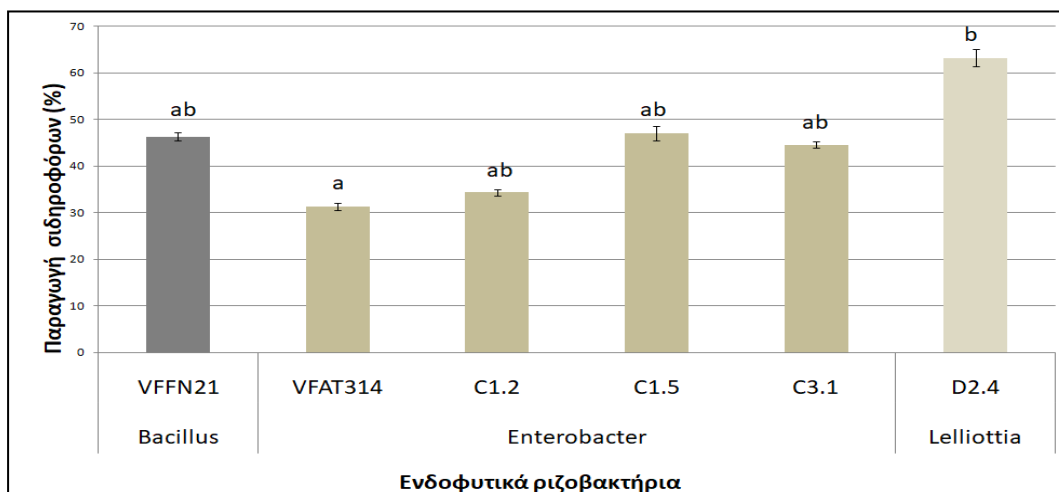


**Εικόνα 3.27:** Πορεία παραγωγής σιδηροφόρων από το *Bacillus* VFFN21 (την 1<sup>η</sup>, 3<sup>η</sup>, 7<sup>η</sup> ημέρα και 10<sup>η</sup> ημέρα επώασης).

Επιπρόσθετα, η ικανότητα παραγωγής σιδηροφόρων εξετάστηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης με τη χρήση του CAS, και διαπιστώθηκε αλλαγή χρώματος (αποχρωματισμός). Ταυτόχρονα έγινε εφικτός ο υπολογισμός της % μονάδας παραγωγής σιδηροφόρων των VFFN21 και VFAT314. Στη βιοδοκιμή αυτή συμπληρωματικά προστέθηκαν τα C1.2, C1.5, C3.1 και D2.4, που είναι γνωστό από προηγούμενη μελέτη ότι παράγουν σιδηροφόρα (Γιαννακοπούλου Μ., Μάστερ 2019).

<b>Πίνακας 3.13:</b> Καταγραφή του ποσοστού (%) παραγωγής σιδηροφόρων από τα ενδοφυτικά ριζοβακτήρια <i>Bacillus</i> , <i>Enterobacter</i> και <i>Lelliottia</i> .	
<i>Bacillus</i> sp. VFFN21	46,26±0,86ab
<i>Enterobacter</i> sp. VFAT314	31,3±0,75a
<i>Enterobacter</i> sp. C1.2	34,38±0,69ab
<i>Enterobacter</i> sp. C1.5	46,98±1,53ab
<i>Enterobacter</i> sp. C3.1	44,57±0,73ab
<i>Lelliottia</i> sp. D2.4	63,13±1,82b
Οι μέσες τιμές στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους σύμφωνα με το Kruskal-Wallis ( $p \leq 0,05$ ). Ως «±» συμβολίζεται η τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή.	

Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 3.13** και στην **Εικόνα 3.28**, για τη *Lelliottia* sp. D2.4 και το *Bacillus* sp. VFFN21 η παραγωγή σιδηροφόρων που υπολογίσθηκε ήταν 63,13 % και 46,26%, αντίστοιχα. Ενώ, μεταξύ των τεσσάρων στελεχών *Enterobacter*, η παραγωγή σιδηροφόρων κυμάνθηκε από 31,3 (VFAT314) - 46,98% (C1.5).



**Εικόνα 3.28:** Ποσοτική εκτίμηση της παραγωγής σιδηροφόρων από τα VFFN21, VFAT314, C1.2, C1.5, C3.1 και D2.4. Η γραμμή σφάλματος υποδεικνύει την τυπική απόκλιση ( $\pm$ ) από τη μέση τιμή.

Η ικανότητα παραγωγής σιδηροφόρων του VFAT314 είναι εντός των επιπέδων που έχουν αναφερθεί σε στελέχη που ανήκουν στο ίδιο ή διαφορετικό είδος. Για παράδειγμα, σε στελέχη *Enterobacter ludwigii* έχει σημειωθεί παραγωγή 43,14%, 24,51% (Karoor et al., 2017) και 60% (Sarkar et al., 2018), ενώ σε άλλα είδη έχει αναφερθεί παραγωγή 28,0%, 31,63% (Shreya et al., 2022; Wang et al., 2022) και 54% (Kumar & Dubey, 2022). Παρ' όλ' αυτά δε λείπουν και περιπτώσεις με στελέχη *Enterobacter ludwigii* και *Enterobacter* spp. που στερούνται της ικανότητας παραγωγής σιδηροφόρων (de Melo Pereira et al., 2012). Όσον αφορά την παραγωγή σιδηροφόρων από το στέλεχος VFFN21 (46,26%) η ικανότητα αυτή ήταν αναμενόμενη καθώς και άλλα βακτήρια του ίδιου είδους είναι παραγωγικοί (Tsalgatidou et al., 2022; Gao et al., 2022). Μάλιστα, το ποσοστό παραγωγής σιδηροφόρων που έχει καταγραφεί σε *Bacillus halotolerans* ήταν 23,9% και 34,4% (Abd El-Megeed & Mohiy, 2022), ενώ σε άλλα είδη του γένους έχουν αναφερθεί ποσοστά 40,2% (Shreya et al., 2022), 51,4% (Abd El-Megeed & Mohiy, 2022) και 82,6% (Sawant et al., 2022).

Με βάση τα παραπάνω, ικανότητα παραγωγής σιδηροφόρων έχουν όλα ριζόβια και τα ενδοφυτικά ριζοβακτήρια που εξετάστηκαν. Στα ριζόβια, οι περισσότερες συντιθέμενες σιδηροφόρες ενώσεις συνήθως είναι υδροξαμικού τύπου όπως η βισιβακτίνη που συναντάται στα *Rhizobium leguminosarum* (vicibactin, VB) (Dilworth et al., 1998; Yeoman et al., 2003; Wright et al., 2013) και η ριζοβακτίνη 1021 (RB1021) που συναντάται σε πολλά στελέχη *S. meliloti* (Johnston, 2004). Ωστόσο έχουν εντοπιστεί και περιπτώσεις παραγωγής κατεχολικού τύπου σιδηροφόρα σε ριζόβια γένους *Bradyrhizobium* (Bharti et al., 2022), ενώ σε στελέχη *Mesorhizobium* έχουν εντοπιστεί σιδηροφόρα και των δυο τύπων (Roy et al., 1994; Dhul et al., 1998). Για τα μέλη της οικογένειας των *Enterobacteriaceae*, το πιο σύνηθες παραγόμενο σιδηροφόρο είναι η εντεροβακτίνη ή αλλιώς εντεροχελίνη (enterobactin ή enterochelin), που

ανήκει στα κατεχολικού τύπου σιδηροφόρα (O'Brien et al., 1970; Pollack & Neilands, 1970), ενώ βάσει γονιδιωματικής ανάλυσης έχουν εντοπιστεί γονίδια που σχετίζονται και με την αεροβακτίνη σε *Enterobacter* (Saikia et al., 2022). Ένα άλλο σιδηροφόρο είναι η βακιλλισίνη (bacillibactin) που συναντάται σε διάφορα στελέχη *Bacillus*, όπως στα *Bacillus halotolerans* (Tsalgatidou et al., 2022). Από τις παραπάνω πηγές γίνεται αντιληπτό ότι τα παραγόμενα σιδηροφόρα διαφέρουν συνήθως από γένος σε γένος, ενώ ο ρυθμός πρόσληψης σιδήρου διαφέρει από βακτήριο σε βακτήριο (Carson et al., 2000).

#### **3.4.2.3) Μελέτη της ικανότητας παραγωγής ινδολοξικού οξέος (IAA)**

Για τη διερεύνηση της ικανότητας παραγωγής ινδολοξικού οξέος (IAA) εφαρμόστηκε στα υπό μελέτη βακτήρια αρχικά η τεχνική PC, η οποία ανιχνεύει συγκεντρώσεις IAA στο εύρος 0,3-20 µg/ml, ενώ για την ανίχνευση μεγαλύτερων συγκεντρώσεων IAA (5-200 µg/ml) εφαρμόστηκε η τεχνική S2 (**Εδάφιο 3.3.5**). Παράλληλα, εξετάστηκαν και άλλοι παράμετροι που πιθανόν επηρεάζουν την παραγωγή IAA, όπως η παρουσία τρυπτοφάνης. Οι απομονώσεις αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό TY απουσίας και παρουσίας 500 µg/ml εξωγενούς-L-Trp. Οι φασματοφωτομετρικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στα 530 nm, χρησιμοποιώντας το υπερκείμενο των βακτηριακών καλλιεργειών σε χρονικά διαστήματα 2, 4 και 7 ημερών.

Στην παρούσα βιοχημική δοκιμασία, εξετάστηκε η ικανότητα παραγωγής IAA από ριζόβια τεσσάρων διαφορετικών γενών, δεδομένου ότι το 80% των ριζοβίων έχουν την ικανότητα να παράγουν IAA και ενώσεις που σχετίζονται με την ορμόνη αυτή (Sarkar et al., 2018). Αρχικά εξετάστηκαν τα στελέχη *Rhizobium* spp. του κουκιού με την τεχνική PC (**Εικόνα 3.29A**). Από τη σύγκριση του εμβολιασμένου υγρού θρεπτικού μέσου ανάπτυξης, απουσία και παρουσία εξωγενούς Trp (TY και TY+Trp), σημειώθηκαν ποια στελέχη εμφανίζουν ικανότητα παραγωγής ινδολοξικού. Συγκεκριμένα απουσία Trp, τα στελέχη VFIM1 και VFEP63 δεν είχαν ικανότητα παραγωγής ινδολοξικού, ενώ στα υπόλοιπα 5 παρατηρήθηκε αλλαγή χρώματος κυμαινόμενης έντασης, η οποία όμως ήταν μη μετρήσιμη φασματοφωτομετρικά. Μεταξύ αυτών, η απομόνωση που ξεχώρισε για τη μεγαλύτερη χρωματική ένταση σε TY χωρίς Trp ήταν εκείνη του VFEP162. Αντίθετα, στα ριζόβια της φασολιάς δεν καταγράφηκε χρωματική αλλαγή απουσία Trp. Σχετικά με την επίδραση της εξωγενούς Trp για την παραγωγή ινδολοξικού, σε όλα τα εξεταζόμενα ριζόβια κουκιού και φασολιάς παρατηρήθηκε χρωματική αλλαγή του μέσου, υποδηλώνοντας έτσι την παρουσία IAA στο μέσο ανάπτυξης (**Εικόνα 3.29B**).















Στη συνέχεια εξετάστηκε η παραγωγή ινδολοξικού τη 2<sup>η</sup>, 4<sup>η</sup> και 7<sup>η</sup> ημέρα επώασης από τα *Rhizobium*. Η στατιστική ανάλυση που διεξήχθη επέτρεψε την κατάταξη των *Rhizobium* κουκιού σε φθίνουσα σειρά, ξεκινώντας από την απομόνωση που παρήγαγε την μεγαλύτερη ποσότητα IAA: VF3CR> VFLE1> VFEP162> VFLE5> VF3CR2= VFIM1> VFEP63 (τη 2<sup>η</sup> ημέρα), VF3CR> VFLE1=

VFEP162> VFLE5= VFCE2= VFIM1> VFEP63 (την 4<sup>η</sup> ημέρα) και VFEP162= VFLE5≥ VFLE1≥ VFCE2= VFCE3= VFIM1> VFEP63 (την 7<sup>η</sup> ημέρα). Για τα *Rhizobium* φασολιάς, η στατιστική ανάλυση που διεξήχθη επέτρεψε την κατάταξη τους σε φθίνουσα σειρά, ξεκινώντας από την απομόνωση που παρήγαγε την μεγαλύτερη ποσότητα IAA: PVTN21=PVMT26> PVDO712= PVTP1= PVKA6> PVKV3> *Rhizobium tropici* CIAT899<sup>T</sup> (τη 2<sup>η</sup> ημέρα), PVTN21≥ PVDO712≥ PVKA6= PVMT26> PVKV3≥ PVTP1> *Rhizobium tropici* CIAT899<sup>T</sup> (την 4<sup>η</sup> ημέρα) και PVMT26> PVTN21> PVKA6> PVTP1≥ PVDO712≥ PVKV3≥ *Rhizobium tropici* CIAT899<sup>T</sup> (την 7<sup>η</sup> ημέρα) (Πίνακας 3.14).






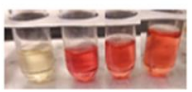




<b>Πίνακας 3.14:</b> Έκτιμηση της ικανότητας παραγωγής αυξίνης (IAA) από τα <i>Rhizobium</i> κουκιού και φασολιάς, σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης TY+Trp την 2 <sup>η</sup> , 4 <sup>η</sup> και 7 <sup>η</sup> ημέρα επώασης.			
<b>Παραγωγή IAA (μg/ml)</b>			
<b>Στελέχη</b>	<b>2<sup>η</sup> ημέρα</b>	<b>4<sup>η</sup> ημέρα</b>	<b>7<sup>η</sup> ημέρα</b>
<b><i>Rhizobium</i> κουκιού</b>			
VFCE2	11,37±2,51e	11,81±1,78c	13,48±2,51bc
VFCE3	28,49±2,44d	31,16±3,98d	12,05±3,19bc
VFLE5	15,72±1,66c	14,97±0,26c	19,05±0,30ab
VFIM1	9,63±1,50e	10,97±1,34c	11,09±1,15bc
VFLE1	32,05±3,23d	25,33±3,07b	15,26±2,79b
VFEP63	2,37±0,89b	3,76±0,48a	4,90±0,91c
VFEP162	20,78±3,66a	23,33±3,67b	24,93±2,75a
<b><i>Rhizobium</i> φασολιάς</b>			
PVKA6	15,59±0,85d	15,17±1,55b	15,64±1,57f
PVDO712	15,84±2,79d	17,70±1,34bd	4,24±1,56a
PVTN21	21,07±2,82b	21,07±5,01d	24,62±5,50d
PVTP1	15,47±1,94d	2,63±2,35ac	5,64±0,60c
PVKV3	3,83±1,66ac	7,05±2,74c	2,11±0,99ac
PVMT26	20,32±3,93b	13,84±3,56b	29,18±2,48b
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 <sup>T</sup>	0,19±0,13a	0,43±0,66ac	0,73±0,45a
Οι μέσες τιμές στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους σύμφωνα με το LSD ( $p \leq 0,05$ ). Ως «±» συμβολίζεται η τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή.			

Η ικανότητα παραγωγής IAA διαφέρει ακόμα και μεταξύ στελεχών του ίδιου είδους π. χ. σε στελέχη *R. laguerreae* τα οποία παρήγαγαν 50–123 μg IAA/ml (Taha et al., 2022). Επίσης σε διάφορες εργασίες, όπως στην εργασία των Patel et al. (2020), η παραγόμενη IAA αυξάνεται με την αύξηση του χρόνου.

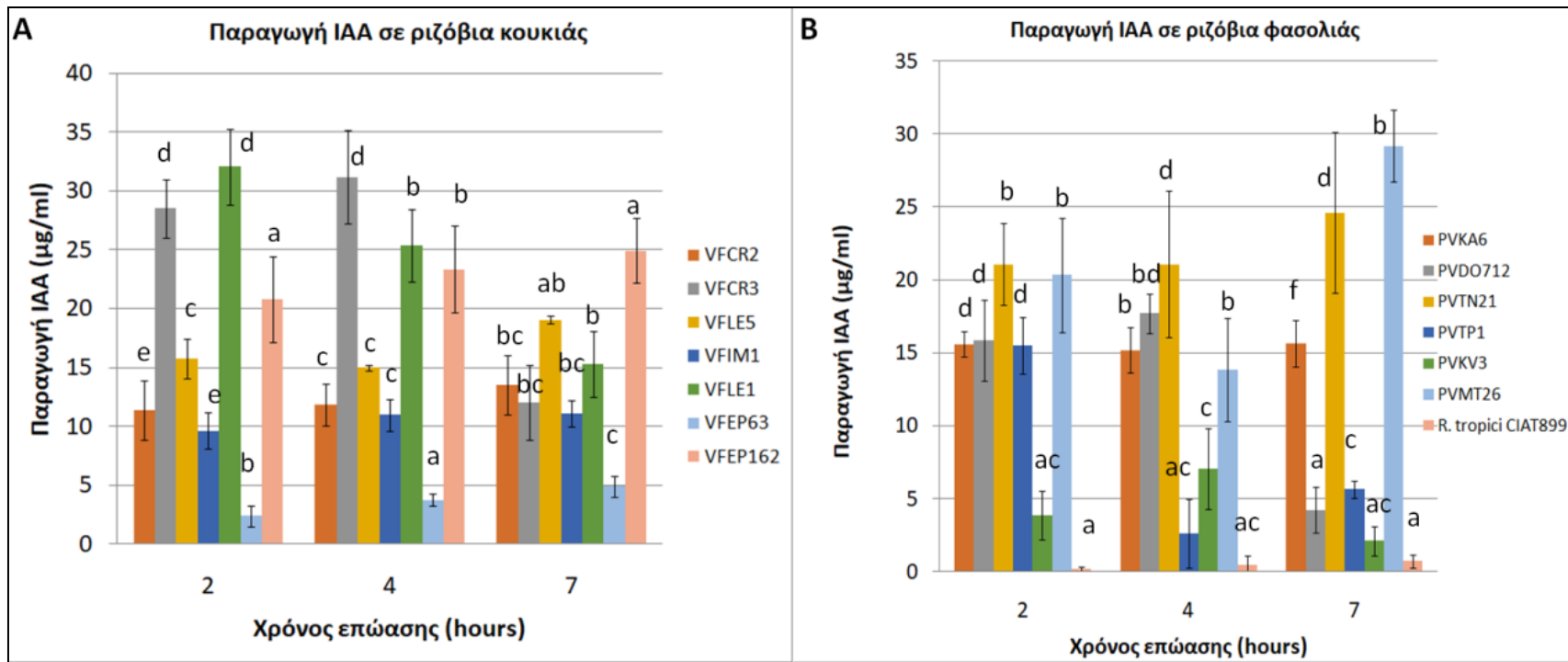
**A**

Θρεπτικό μέσο	Ριζόβια κουκιάς						
	VFCR2	VFCR3	VFLE5	VFIM1	VFLE1	VFEP63	VFEP162
TY							
TY + Trp							

**B**

Θρεπτικό μέσο	Ριζόβια φασολιάς				
	PVKA6-PVDO712-PVTN21	PVTP1	PVKV3	PVMT26	<i>R. tropici</i>
TY					
TY + Trp					













**Εικόνα 3.29:** Ικανότητα παραγωγής IAA από στελέχη *Rhizobium* spp. κουκιάς σε θρεπτικό μέσο TY, παρουσία και απουσία Τρυπτοφάνης (Trp). Το κόκκινο χρώμα είναι ενδεικτικό της ικανότητας παραγωγής IAA.



**Εικόνα 3.30:** Διάγραμμα παρουσίασης της ικανότητας παραγωγής ινδολοξικού σε συνάρτηση με το χρόνο σε ΤΥ παρουσία τρυπτοφάνης από τα **A) *Rhizobium* κουκιάς** και **B) *Rhizobium* φασολιάς**, καθώς και αποτύπωση της αλλαγής του χρώματος του μέσου ανάπτυξης λόγω της παραγωγής ινδολοξικού (ΙΑΑ). Η γραμμή σφάλματος υποδεικνύει την τυπική απόκλιση ( $\pm$ ) από τη μέση τιμή.

Αξίζει να σημειωθεί ότι στην ικανότητα παραγωγής αυξίνης, σημαντικό ρόλο παίζει η σύσταση του μέσου ανάπτυξης του βακτηρίου είτε αυτή αφορά τη προσθήκη Trp είτε τη προσθήκη πηγής αζώτου (Imada et al., 2017). Αν και το θρεπτικό μέσο TY επέτρεψε την παραγωγή αυξίνης από τις *Rhizobium* απομονώσεων παρουσία Trp, ίσως να μην αποτελεί βέλτιστο θρεπτικό για την ανάδειξη αυτής της ικανότητας. Στην παρούσα μελέτη το *Rhizobium tropici* CIAT899<sup>T</sup> παρήγαγε τη μικρότερη ποσότητα IAA, η οποία υπολογίστηκε κάτω από 1μg/ml και ήταν σημαντικά μικρότερη από την αναφερόμενη άλλων εργασιών. Η διαφοροποίηση της ικανότητας παραγωγής IAA από το *Rhizobium tropici* CIAT899<sup>T</sup> θα μπορούσε να οφείλεται στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης. Για παράδειγμα στην εργασία των Imada et al. (2017), το *Rhizobium tropici* CIAT899<sup>T</sup> σε YMA και παρουσία Trp έδειξε ικανότητα παραγωγής ινδολικών συστατικών της τάξης των 47,83μg/ml. Συνεπώς θα είχε ενδιαφέρον η εκτίμηση της ικανότητας παραγωγής IAA από το *Rhizobium tropici* CIAT899<sup>T</sup> σε θρεπτικό μέσο YMA με Trp και στη συνέχεια και των υπόλοιπων *Rhizobium* απομονώσεων.

Στη συνέχεια εξετάστηκαν πέντε *Mesorhizobium* spp., τρία *Bradyrhizobium* spp. και ένα *Ensifer* sp. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα 9 στελέχη ριζοβίων μόνο 3 ήταν ικανά να παράγουν αυξίνη (*Ensifer* sp. VUKA2, *Bradyrhizobium* sp. VUCR24 και VULI11). Η ικανότητα παραγωγής αυξίνης από το *Ensifer* sp. VUKA2 αναφέρεται και σε άλλα στελέχη του ίδιου γένους, με το *Ensifer meliloti* 1021 να αποτελεί καλό παράδειγμα βακτηριακού στελέχους που υπερπαραγάγει την ορμόνη αυτή (Defez et al., 2017). Η μη ικανότητα παραγωγής αυξίνης από τα στελέχη *Mesorhizobium* της παρούσας μελέτης δεν αποτελεί χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου γένους, καθώς έχει καταγραφεί παραγωγή της τάξης από 0,31-95,15 μg/ml (Knežević et al., 2022). Τα στελέχη *Bradyrhizobium* που εξετάστηκαν ανήκουν σε διαφορετικά είδη και ικανότητα παραγωγής αυξίνης εμφανίζουν τα VUCR24, VULI11, ενώ το VUEP21 παρήγαγε αυξίνη (**Εικόνα 3.31**). Για το λόγο αυτό επιλέχθηκαν τα *Bradyrhizobium* VUCR24 και VULI11 προς περαιτέρω μελέτη, απουσία και παρουσία εξωγενούς Trp.

<i>Bradyrhizobium</i>	Θρεπτικό Μέσο Ανάπτυξης	Χρόνος επώασης(days)		
		2	4	7
VUCR24	TY			
	TY + Trp			
VULI11	TY			
	TY + Trp			

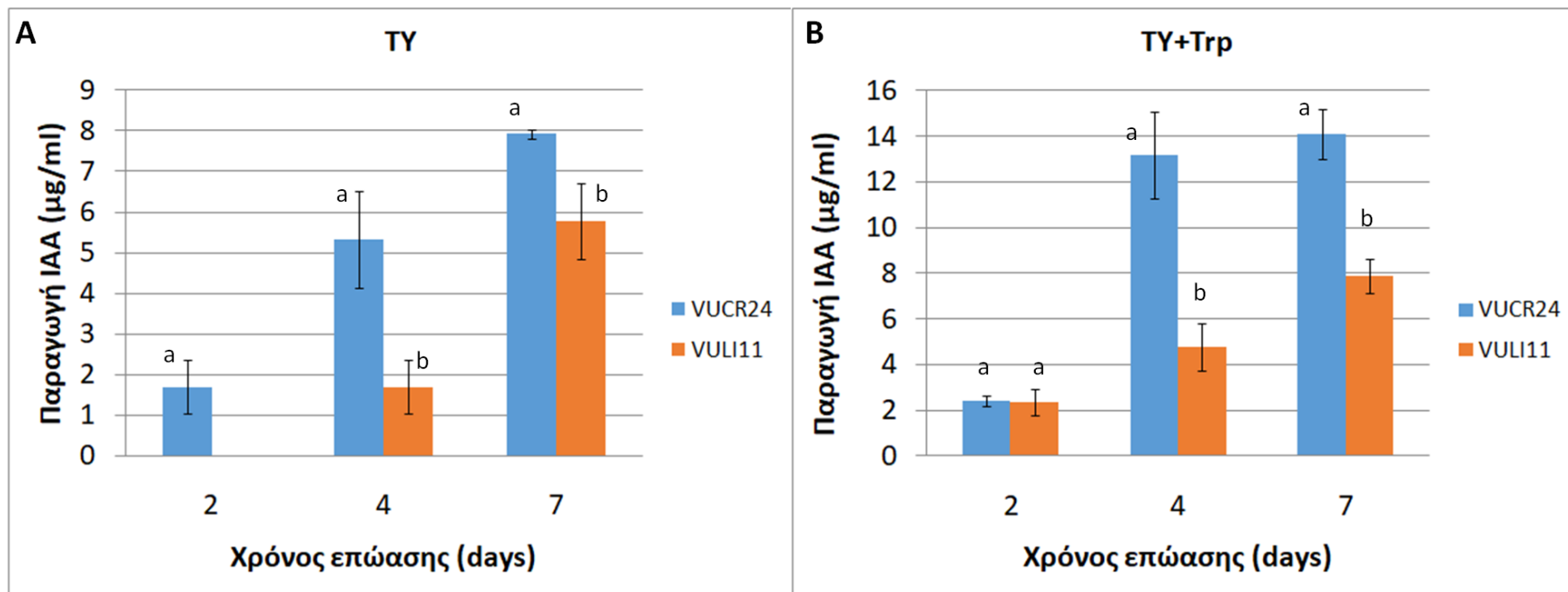
**Εικόνα 3.31:** Μεταβολή χρώματος στο μέσο ανάπτυξης (TY) με και χωρίς Τρυπτοφάνη (Trp) από τα *Bradyrhizobium* VUCR24, VUEP21 και VULI11 τη 2<sup>η</sup>, 4<sup>η</sup> και 7<sup>η</sup> ημέρα επώασης.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν αποτυπώνονται στον **Πίνακα 3.15** και στην **Εικόνα 3.32**, από όπου φαίνεται ότι το VUCR24 ήταν ικανό να παράγει IAA τόσο απουσία όσο και παρουσία Trp, ήδη από τη 2<sup>η</sup> ημέρα, σε αντίθεση με το VULI11, το οποίο δε φάνηκε να παράγει ινδολοξικό απουσία Trp. Επιπλέον, η παρατηρούμενη διαφορά στην ένταση της αλλαγής χρώματος ειδικά την 7<sup>η</sup> ημέρα ενίσχυσε τον ισχυρισμό ότι το VUCR24 ήταν καλύτερος παραγωγός ινδολοξικού σε σχέση με το VULI11. Για την εκτίμηση της παραγόμενης ποσότητας αυξίνης έγινε δειγματοληψία τη 2<sup>η</sup>, 4<sup>η</sup> και 7<sup>η</sup> ημέρα επώασης απουσία και παρουσία Trp, από όπου προέκυψε ότι το VUCR24 παρήγαγε περισσότερη αυξίνη σε σχέση με το VULI11 με ή χωρίς Trp στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης.

<b>Πίνακας 3.15:</b> Εκτίμηση της ικανότητας παραγωγής αυξίνης (IAA) από τα <i>Bradyrhizobium</i> , σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης TY απουσία και παρουσία Trp την 2 <sup>η</sup> , 4 <sup>η</sup> και 7 <sup>η</sup> ημέρα επώασης.						
Παραγωγή IAA (ug/ml)						
Στελέχη	TY			TY+Trp		
	2 <sup>η</sup> ημέρα	4 <sup>η</sup> ημέρα	7 <sup>η</sup> ημέρα	2 <sup>η</sup> ημέρα	4 <sup>η</sup> ημέρα	7 <sup>η</sup> ημέρα
VUCR24	1,69±0,67a	5,32±1,2a	7,92±0,1a	2,42±0,23a	13,16±1,9a	14,1±1,10a
VULI11	0,00±0,0b	1,68±0,65b	5,76±0,93b	2,36±0,58a	4,75±1,04b	7,85±0,75b

Οι μέσες τιμές στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους σύμφωνα με το LSD ( $p \leq 0,05$ ). Ως «±» συμβολίζεται η τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή.





**Εικόνα 3.32:** Διάγραμμα παρουσίασης της ικανότητας παραγωγής αυξίνης τη 2<sup>η</sup>, 4<sup>η</sup> και 7<sup>η</sup> ημέρα επώασης σε TY απουσία και παρουσία Τρυπτοφάνης από τα *Bradyrhizobium* VUCR24 και VULI11. Η γραμμή σφάλματος υποδεικνύει την τυπική απόκλιση ( $\pm$ ) από τη μέση τιμή.

Η ικανότητα παραγωγής IAA από τα *Bradyrhizobium* έχει παρατηρηθεί και σε άλλες εργασίες (Dabo et al., 2019; Missbah El Idrissi et al., 2021) όπου η παραγόμενη αυξίνη κυμάνθηκε για παράδειγμα από 0,64 έως 56,46 µg/ml (Dabo et al., 2019). Ωστόσο έχουν εντοπιστεί και στελέχη *Bradyrhizobium* που αδυνατούν να συσσωρεύσουν την ορμόνη αυτή στο μέσο καλλιέργειας (Minamisawa & Fukai, 1991) και άλλα που, αν και την καταναλώνουν, υπό ανάδευση, με την προσθήκη τρυπτοφάνης στο μέσο ανάπτυξης μπορούν να την παράγουν (Wahyudi, 2013).

Για τη διερεύνηση της ικανότητας παραγωγής ινδολοξικού οξέος (IAA) από τα ενδοφυτικά ριζοβακτήρια VFAT314 και VFFN21, εφαρμόστηκε αρχικά η τεχνική PC. Με βάση την τεχνική αυτή, διαπιστώθηκε ότι το στέλεχος VFFN21 δεν είχε την ικανότητα παραγωγής IAA απουσία και παρουσία εξωγενούς L-Trp (**Εικόνα 3.33**). Εντελώς διαφορετική ήταν η εικόνα που παρουσίασε η απομόνωση VFAT314 καθώς εμφάνισε ικανότητα παραγωγής IAA τη 2<sup>η</sup>, 4<sup>η</sup> και 7<sup>η</sup> ημέρα επώασης απουσία και παρουσία Trp. Συνδυάζοντας τα δεδομένα από την ποιοτική εκτίμηση της ικανότητας παραγωγής IAA με εκείνα που προέκυψαν από μη δημοσιευμένα δεδομένα (Γιαννακοπούλου Μ., Μάστερ 2019) που αφορούν τα C1.2, C1.5 και C3.1, κρίθηκε απαραίτητη η ποσοτική αξιολόγηση της παραγόμενης ποσότητας IAA με τη μέθοδο PC, αλλά και με τη μέθοδο S2 (**Εικόνα 3.34**).

Ενδοφυτικά ριζοβακτήρια	Θρεπτικό Μέσο Ανάπτυξης	Χρόνος επώασης (days)		
		2	4	7
<i>Bacillus</i> VFFN21	TY			
	TY + Trp			
<i>Enterobacter</i> VFAT314	TY			
	TY + Trp			

**Εικόνα 3.33:** Αλλαγή του χρώματος στο μέσο ανάπτυξης (TY) απουσία και παρουσία τρυπτοφάνης (Trp) από το *Bacillus* sp. VFFN21 και από το *Enterobacter* sp. VFAT314, λόγω παραγωγής ινδολοξικού τη 2<sup>η</sup>, 4<sup>η</sup> και 7<sup>η</sup> ημέρα επώασης.

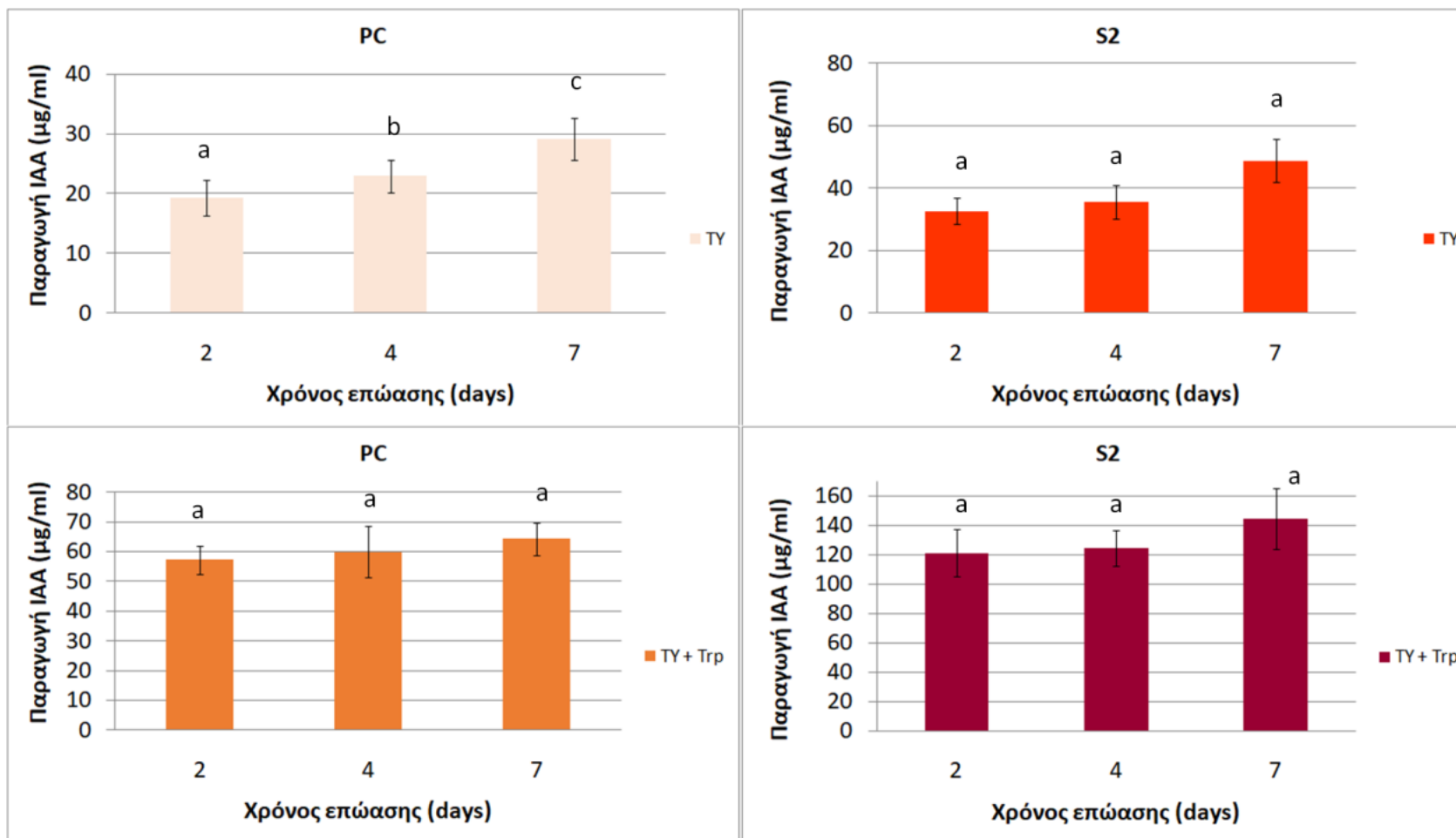
Ανατρέχοντας στη βιβλιογραφία πολλά είναι τα στελέχη *Bacillus* που έχουν καταγραφεί με ικανότητα παραγωγής αυξίνης με ή χωρίς την προσθήκη τρυπτοφάνης, χωρίς να λείπουν και εξαιρέσεις με μη παραγωγούς IAA (Poveda & González-Andrés, 2021; Wang et al., 2022). Η ικανότητα παραγωγής ποικίλει τόσο μεταξύ στελεχών του ίδιου είδους όσο και μεταξύ των ειδών. Στη συνέχεια μελετήθηκε το *Enterobacter* VFAT314 τόσο με την τεχνική PC όσο και με την τεχνική S2 απουσία και παρουσία τρυπτοφάνης, με την προσέγγιση αυτή να ακολουθείται και από τους Cui et al. (2022). Τα αποτελέσματα της μελέτης του VFAT314 παρουσιάζονται στον

**Πίνακα 3.16** και στην **Εικόνα 3.34**, από όπου φάνηκε ότι τόσο απουσία όσο και παρουσία Trp, η IAA είναι πάνω από το ανώτερο όριο της τεχνικής PC, δηλαδή τα 20 µg/ml. Για αυτό και η μέθοδος αυτή κρίθηκε ανεπαρκής για τον προσδιορισμό της παραγόμενης αυξίνης με τη μέγιστη δυνατή ακρίβεια. Αντιθέτως, με τη μέθοδο S2, φάνηκε ότι το VFAT314 παράγει 32,49 µg IAA/ml, 35,46 µg IAA/ml και 48,65 µg IAA/ml τη 2<sup>η</sup>, 4<sup>η</sup> και 7<sup>η</sup> ημέρα ανάπτυξης. Αξίζει να σημειωθεί ότι η προσθήκη Trp προκάλεσε περαιτέρω αύξηση της παραγόμενης IAA καταγράφοντας την 2<sup>η</sup> ημέρα 120,93 µg IAA/ml, την 4<sup>η</sup> 124,48 µg IAA/ml και την 7<sup>η</sup> 144,41 µg IAA/ml.

<b>Πίνακας 3.16:</b> Εκτίμηση της ικανότητας παραγωγής αυξίνης (IAA) από το <i>Enterobacter</i> VFAT314, σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης TY απουσία και παρουσία Trp την 2 <sup>η</sup> , 4 <sup>η</sup> και 7 <sup>η</sup> ημέρα επώασης εφαρμόζοντας τη μέθοδο PC και S2.				
Παραγωγή IAA (ug/ml)				
Μέθοδος PC				
Μέθοδος S2				
Ημέρα	TY-Trp	TY+Trp	TY-Trp	TY+Trp
2 <sup>η</sup>	19,31±3,03a	57,22±4,81a	32,50±4,24a	120,94±16,13a
4 <sup>η</sup>	22,89±2,69b	59,89±8,66a	35,47±5,35a	124,49±11,86a
7 <sup>η</sup>	29,14±3,54c	64,27±5,48a	48,66±6,86a	144,42±20,45a

Οι μέσες τιμές στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους σύμφωνα με το LSD ( $p \leq 0,05$ ). Ως «±» συμβολίζεται η τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή.

Βακτήρια του ίδιου είδους με το VFAT314 εμφανίζουν ικανότητα παραγωγής αυξίνης. Για παράδειγμα έχει καταγραφεί ότι *Enterobacter ludwigii* παράγουν αυξίνη από 8,06 µg/ml έως 92,4 µg/ml (Gopalakrishnan et al., 2011; Susilowati et al., 2018; Habibi et al., 2019). Παραγωγή αυξίνης έχει καταγραφεί και από το *Enterobacter ludwigii* C1.2 (Γιαννακοπούλου Μ., Μάστερ 2019, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα), όταν αυτό εξετάστηκε σε LB, με τη συγκέντρωση της αυξίνης να είναι μεγαλύτερη από εκείνη του VFAT314. Δεδομένου ότι το C1.2 και το VFAT314 είναι συγγενικά μεταξύ τους θα είχε ενδιαφέρον η σύγκριση της ικανότητας παραγωγής αυξίνης (IAA) τόσο σε LB όσο και σε TY κάτω από τις ίδιες συνθήκες διεξαγωγής της μελέτης προκειμένου να αποσαφηνιστεί ποιος από τους δυο παράγει περισσότερη αυξίνη.



**Εικόνα 3.34:** Διάγραμμα παρουσίασης της ικανότητας παραγωγής αυξίνης τη 2<sup>η</sup>, 4<sup>η</sup> και 7<sup>η</sup> ημέρα επώασης απουσία (TY) και παρουσία Τρυπτοφάνης (TY+Trp) από το *Enterobacter VFAT314* με τη μέθοδο PC και S2. Η γραμμή σφάλματος υποδεικνύει την τυπική απόκλιση ( $\pm$ ) από τη μέση τιμή.

**Πίνακας 3.17:** Καταγραφή της ικανότητας διαλυτοποίησης φωσφόρου , παραγωγής σιδηροφόρων και αυξίνης από ριζόβια και μη ριζοβιακά ενδοφυτικά βακτήρια.

<b>Βακτηριακά Στελέχη</b>	<b><i>In vitro</i> PGP ιδιότητες</b>		
<b><i>Rhizobium</i></b>	<b>Διαλυτοποίηση φωσφόρου</b>	<b>Παραγωγή σιδηροφόρων</b>	<b>Παραγωγή IAA</b>
VFCR2	+ <sup>α</sup>	+	+
VFCR3	+	+	+
VFLE5	+	+	+
VFIM1	+	+	+
VFLE1	+	+	+
VFEP63	+	+	+
VFEP162	+	+	+
PVKA6	+	+	+
PVDO712	+	+	+
PVTN21	+	+	+
PVTP1	+	+	+
PVKV3	+	+	+
PVMT26	+	+	+
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 <sup>T</sup>	+	+	+
<b><i>Mesorhizobium</i></b>	<b>Διαλυτοποίηση φωσφόρου</b>	<b>Παραγωγή σιδηροφόρων</b>	<b>Παραγωγή IAA</b>
TPCR2C	+	+	- <sup>β</sup>
TPCR2D	+	+	-
TPCR2F	+	+	-
TPCR2G	+	+	-
TPCR2I	+	+	-
<b><i>Bradyrhizobium</i></b>	<b>Διαλυτοποίηση φωσφόρου</b>	<b>Παραγωγή σιδηροφόρων</b>	<b>Παραγωγή IAA</b>
VUEP21	+	+	-
VUCR24	+	+	+
VULI11	+	+	+
<b><i>Ensifer</i></b>	<b>Διαλυτοποίηση φωσφόρου</b>	<b>Παραγωγή σιδηροφόρων</b>	<b>Παραγωγή IAA</b>
VUKA2	+	+	-
<b><i>Enterobacter</i></b>	<b>Διαλυτοποίηση φωσφόρου</b>	<b>Παραγωγή σιδηροφόρων</b>	<b>Παραγωγή IAA</b>
VFAT314	+	+	+

C1.2	+	+	+
C1.5	+	+	+
C3.1	+	+	+
<b>Lelliottia</b>	<b>Διαλυτοποίηση φωσφόρου</b>	<b>Παραγωγή σιδηροφόρων</b>	<b>Παραγωγή ΙΑΑ</b>
D2.4	+	+	+
<b>Bacillus</b>	<b>Διαλυτοποίηση φωσφόρου</b>	<b>Παραγωγή σιδηροφόρων</b>	<b>Παραγωγή ΙΑΑ</b>
VFFN21	+	+	-
<sup>α</sup> '+': παρουσία χαρακτηριστικού, <sup>β</sup> '-': απουσία χαρακτηριστικού.			

### 3.4.3) *in vitro* ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΡΙΖΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΤΑ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΚΑΙ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

#### 3.4.3.1) Διερεύνηση της αντιμυκητιακής δράσης ριζοβίων και ενδοφυτικών ριζοβακτηρίων με την τεχνική της διπλής καλλιέργειας, μέσω πτητικών οργανικών ενώσεων και CFSs

Η ικανότητα βιοελέγχου επιλεγμένων βακτηρίων εξετάστηκε αρχικά ενάντια σε τέσσερις φυτοπαθογόνους μύκητες (*Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae*), χρησιμοποιώντας τη μέθοδο διπλής καλλιέργειας. Στην αρχή, εξετάστηκαν τα ριζόβια που όπως φάνηκε κανένα από τα 27 εξεταζόμενα (18 *Rhizobium*, 5 *Mesorhizobium*, 1 *Ensifer* και 3 *Bradyrhizobium*), δεν σχηματίζει ζώνη παρεμπόδισης. Ως εκ τούτου τα υπό μελέτη ριζόβια δε θεωρήθηκαν ως βιολογικοί παράγοντες ελέγχου (Β.Π.Ε.) για τους συγκεκριμένους μύκητες. Στη συνέχεια εξετάστηκε η αντιμυκητιακή δράση του *Enterobacter* sp. VFAT314 ενάντια στους παραπάνω φυτοπαθογόνους μύκητες αλλά και σε σχέση με τη δράση των στελεχών C1.2, C1.5, C3.1 και D2.4, στοχεύοντας στην ανάδειξη εκείνου του βακτηρίου που θα μπορούσε να ενεργήσει ως παράγοντας βιολογικής καταπολέμησης. Τα αποτελέσματα της βιοδοκιμής προέκυψαν με βάση το εμβαδόν του μυκηλίου και εκφράστηκαν σε ποσοστό αναστολής ανάπτυξης (%) σε σχέση με το θετικό μάρτυρα ανάπτυξης των μυκήτων (απουσία βακτηρίου) (Πίνακας 3.18 και Εικόνα 3.35).

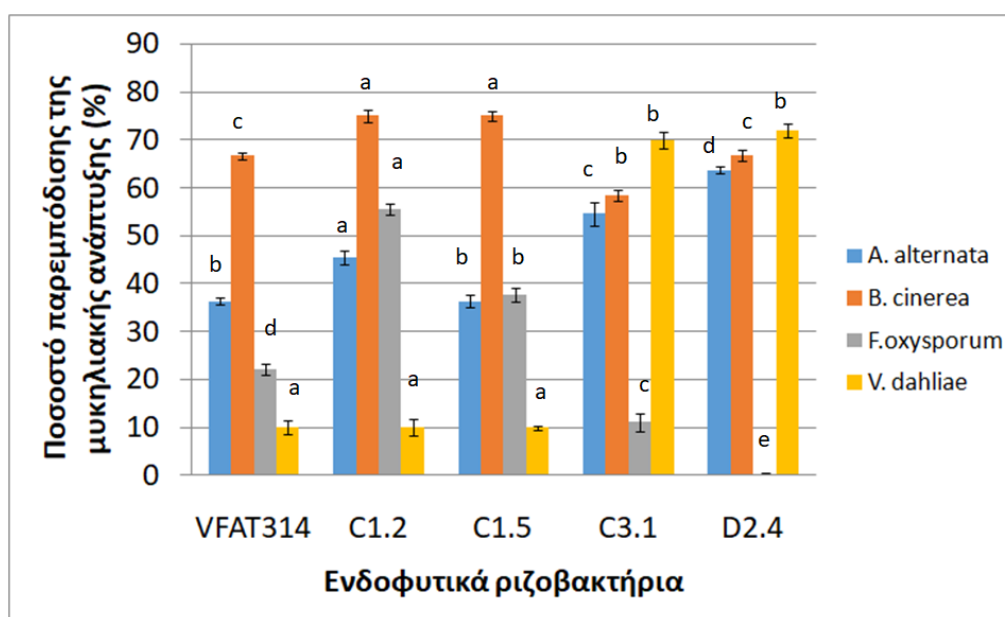
**Πίνακας 3.18:** Καταγραφή του ποσοστού παρεμπόδισης της ανάπτυξης (%) του μυκηλίου παρουσία βακτηρίων.

Βακτηριακά Στελέχη	Μύκητες			
	<i>A. alternata</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>V. dahliae</i>
VFAT314	36,36±0,70b	66,67±0,70c	22,22±1,18d	10,00±1,49a
C1.2	45,45±1,30a	75,00±1,27a	55,56±1,10a	10,00±1,72a
C1.5	36,36±1,41b	75,00±1,07a	37,78±1,47b	10,00±0,44a
C3.1	54,55±2,33c	58,33±1,19b	11,11±1,88c	70,00±1,76b
D2.4	63,64±0,74d	66,67±1,12c	0,00±0,00e	72,00±1,49b

Οι μέσες τιμές στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους σύμφωνα με το LSD ( $p \leq 0,05$ ). Ως «±» συμβολίζεται η τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή.

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις σημειώθηκε παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μυκηλίου των μυκήτων συγκριτικά με τις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης (απουσία βακτηρίου), γι' αυτό και τα βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν θεωρήθηκαν Β.Π.Ε. Τοποθετώντας με φθίνουσα σειρά τα βακτήρια ως προς την ικανότητα παρεμπόδισης του μυκηλίου ανά μύκητα, για το *A. alternata* παρατηρήθηκε ότι: D2.4 (63,64%) > C3.1 > C1.2 >

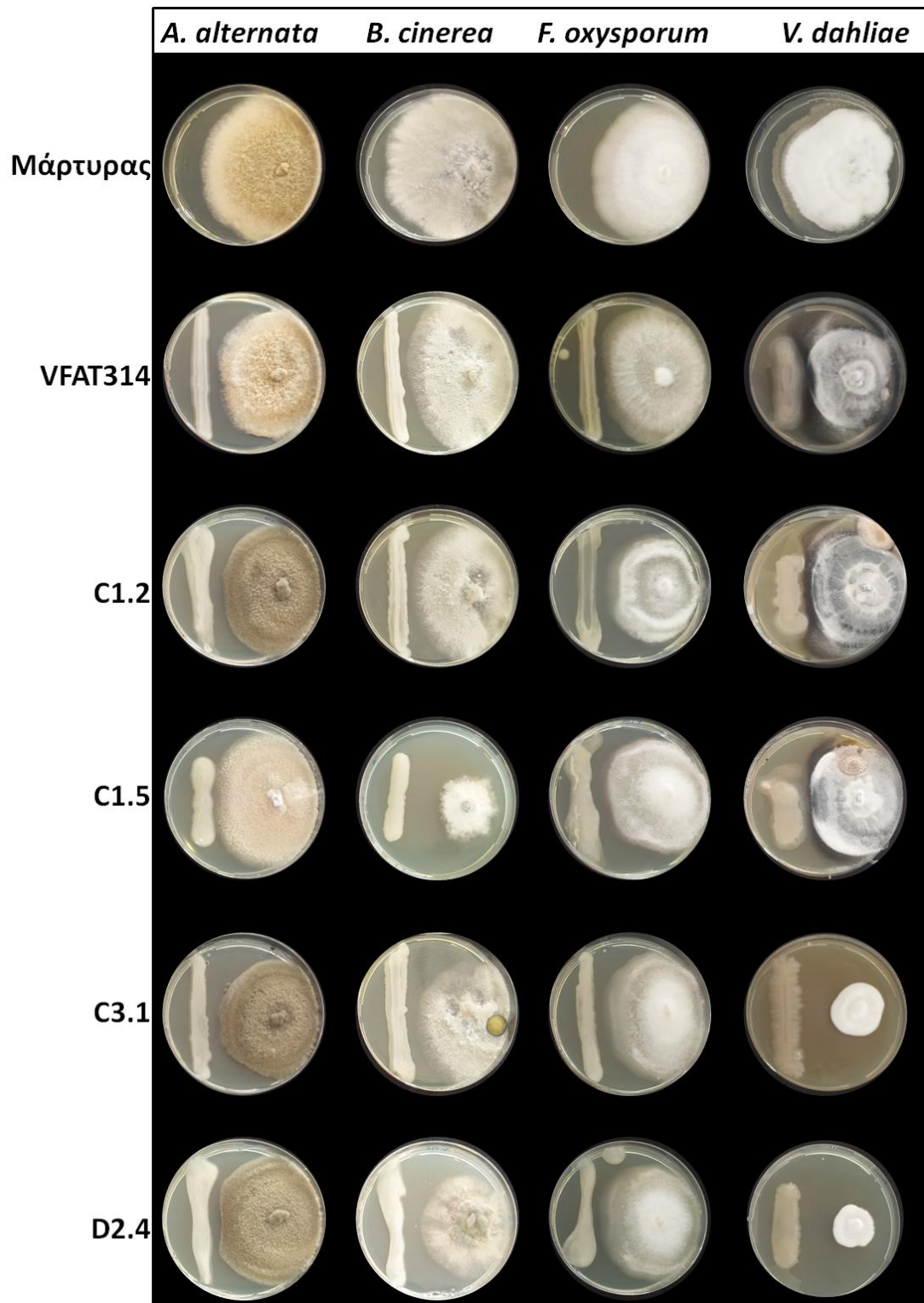
C1,5=VFAT314 (36,36%), ενώ για το *B. cinerea*: C1.2 = C1.5 (75%) > VFAT314=D2.4 > C3.1 (58,33%). Αρκετά διαφοροποιημένη ήταν η εικόνα παρεμπόδισης του *F. oxysporum*, ο οποίος δεν ήταν το ίδιο ευαίσθητος με τους προηγούμενους δυο μύκητες καθώς η παρουσία των βακτηρίων προκάλεσε ποσοστό αναστολής ανάπτυξης του μυκηλίου από 0% (απουσία παρεμποδιστικής δράσης) έως και 55,56 % (μέγιστη παρεμποδιστική δράση), ακολουθώντας την εξής σειρά: C1.2>C1.5>VFAT314>C3.1> D2.4. Ενδιαφέρουσα ήταν η εικόνα ανάπτυξης του μυκηλίου του *V. dahliae*, διότι ήταν ευαίσθητο στην παρουσία των C3.1 και D2.4 (τα οποία προκάλεσαν μείωση της ανάπτυξης του μυκηλίου κατά 70% και 72%, αντίστοιχα), αλλά όχι στα C1.2, C1.5 και VFAT314, τα οποία προκάλεσαν μείωση του μυκηλίου μόνο 10%.



**Εικόνα 3.35:** Παρεμποδιστική δράση των βακτηριακών στελεχών C1.2, C1.5, C3.1, VFAT314, D2.4 κατά των μυκήτων *A. alternata*, *B. cinerea*, *F. oxysporum* και *V. dahliae*. Η γραμμή σφάλματος υποδεικνύει την τυπική απόκλιση ( $\pm$ ) από τη μέση τιμή.

Η αποτύπωση των αποτελεσμάτων την τελευταία μέρα της παρούσας βιοδοκιμής παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3.36** όπου μπορεί να παρατηρηθεί ζώνη παρεμπόδισης μεταξύ βακτηρίων –μυκήτων, εκεί όπου υπάρχει αντιμυκητιακή δράση.





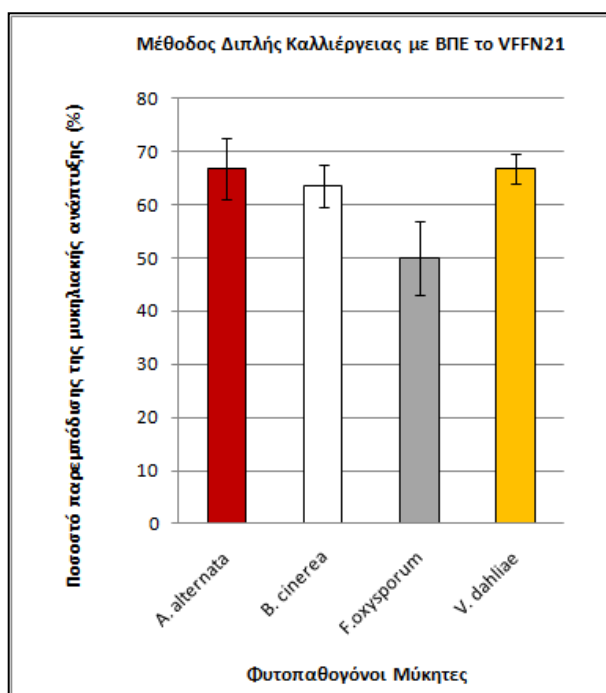
**Εικόνα 3.36:** Παρεμποδιστική δράση των βακτηριακών στελεχών VFAT314, C1.2, C1.5, C3.1 και D2.4 μετά από εφαρμογή της μεθόδου διπλής καλλιέργειας, κατά των μυκήτων *A. alternata*, *B. cinerea*, *F. oxysporum* και *V. dahliae*.

Η αντιμυκητιακή δράση στελεχών του γένους *Enterobacter* αναφέρεται και σε άλλες εργασίες με αντικείμενο μελέτης διάφορους φυτοπαθογόνους μύκητες (Katiyar et al., 2017; Ullah et al., 2017; Guo et al., 2020). Η αντιμυκητιακή δράση του VFFN21 έναντι των παραπάνω μυκήτων εξετάστηκε με την ίδια διαδικασία. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε

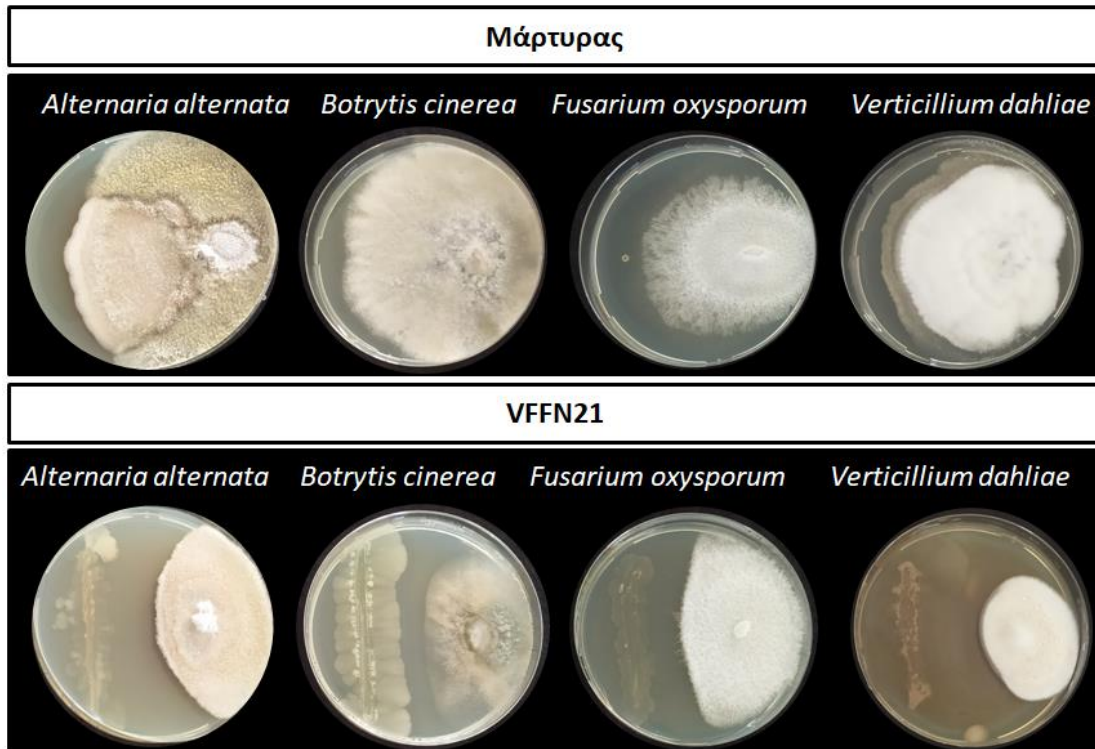
σχηματισμός ζώνης παρεμπόδισης μεταξύ VFFN21-μύκητα, γι' αυτό το συγκεκριμένο βακτήριο χαρακτηρίστηκε ως Β.Π.Ε. με *in vitro* ανταγωνιστική δράση κατά των εξεταζόμενων μυκήτων (Εικόνα 3.38). Παράλληλα, υπολογίσθηκε η ανάπτυξη του μυκηλίου των φυτοπαθογόνων μυκήτων παρουσία και απουσία του VFFN21 την τελευταία μέρα παρατήρησης, καταγράφοντας τη μείωση του εμβαδού του μυκηλίου, ως αποτέλεσμα της εφαρμογής του VFFN21 (Εικόνα 3.37).

Πίνακας 3.19: Καταγραφή του ποσοστού παρεμπόδισης της ανάπτυξης (%) του μυκηλίου παρουσία VFFN21.				
Βακτηριακά Στελέχη	Μύκητες			
	<i>A. alternata</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>V. dahliae</i>
VFFN21	66,82±5,75	63,48±4,03	63,48±6,98	66,82±2,74
Ως «±» συμβολίζεται η τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή.				

Όπως προέκυψε το στέλεχος VFFN21 ήταν ικανό να αναστείλει την ανάπτυξη του μυκηλίου των *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* και *Verticillium dahliae* κατά 66,82%, 63,48%, 49,89% και 66,82%, αντίστοιχα, σε σύγκριση με το θετικό μάρτυρα ανάπτυξης. Η ανταγωνιστική δράση στελεχών ίδιου είδους με το VFFN21 παρουσιάζεται και στην εργασία των Gao et al. (2022), με διάφορα είδη αυτού του γένους να εμφανίζουν αντιμυκητιακή δράση άλλα όχι σε όλο το σύνολο των εξεταζόμενων μυκήτων (Sharma et al., 2021).



**Εικόνα 3.37:** Ποσοστό παρεμπόδισης των μυκήτων *A. alternata*, *B. cinerea*, *F. oxysporum*, και *V. dahliae* παρουσία μέσω της τεχνικής διπλής καλλιέργειας με το VFFN21. Η γραμμή σφάλματος υποδεικνύει την τυπική απόκλιση (±) από τη μέση τιμή.



**Εικόνα 3.38:** Παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μυκηλίου των μυκήτων *A. alternata*, *B. cinerea*, *F. oxysporum* και *V. dahlia* μέσω της τεχνικής διπλής καλλιέργειας με το VFFN21.

Στην παρούσα εργασία διαπιστώθηκε ότι το κάθε βακτήριο (Β.Π.Ε.) εμφάνισε διαφορετικό βαθμό παρεμπόδισης κατά την εξέταση της ανταγωνιστικής του δράσης έναντι μυκήτων. Η διαφοροποίηση ως προς το βαθμό ικανότητας εμφάνισης αντιμυκητιακής δράσης από τη πλευρά των βακτηρίων παρουσιάζεται σε διάφορες εργασίες. Για παράδειγμα στην εργασία των Sharma et al. (2021), το κάθε εξεταζόμενο βακτήριο εμφάνισε διαφορετικό βαθμό παρεμπόδισης έναντι των *Fusarium oxysporum*, *Fusarium graminearum* και *Rhizoctonia solani*, ενώ καταγράφηκαν και περιπτώσεις βακτηρίων που δεν είχαν ικανότητα παρεμπόδισης της ανάπτυξης όλων των εξεταζόμενων μυκήτων. Η στρατηγική παρεμπόδισης ανάπτυξης των μυκήτων που εφαρμόζει το κάθε βακτήριο εξαρτάται από τη φύση του φυτοπαθογόνου, καθώς το τελευταίο επηρεάζει την παραγωγή μεταβολιτών με αντιμυκητιακές ιδιότητες (Liu et al., 2014), αλλά και από τους μηχανισμούς που διαθέτει το ίδιο το βακτήριο. Για παράδειγμα, οι Wang et al. (2021) απέδωσαν την παρεμποδιστική δράση που παρατήρησαν στην αναστολή της βλάστησης των κονιδίων λόγω έκκρισης χιτινάσης, β-1,3-γλυκανάσης και λιποπεπτιδίων. Επίσης, η ανταγωνιστική ικανότητα έχει συνδεθεί με την παραγωγή λυτικών ενζύμων (όπως χιτινάση, πρωτεάση, αμυλάση), με την ικανότητα παραγωγής σιδηροφόρων και το σχηματισμό βιοϋμενίων. Επίσης, πτητικές ενώσεις όπως το HCN και η αμμωνία, αλλά και εκκρινόμενες ενώσεις στο υγρό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης (CFS), είναι εξωκυτταρικοί μεταβολίτες με αντιμυκητιακή δράση (Wu et al., 2014; Sharma et al., 2021; Wang et al., 2022). Σε διάφορες

περιπτώσεις, αποτέλεσμα της αντιμυκητιακής δράσης είναι η εμφάνιση μορφολογικών αλλαγών στο μυκήλιο ακόμα και σχισμένων μυκηλιακών άκρων (Zhao et al., 2017). Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι η συμπεριφορά ενός βακτηρίου με ανταγωνιστική δράση μπορεί να διαφέρει σε δοκιμασίες με στερεοποιημένο θρεπτικό μέσο, ακόμα και όταν το μέσο ανάπτυξης είναι ίδιο. Η διαφορά αυτή οφείλεται στη διαφορετική σύνθεση του άγαρ, γι' αυτό και τα αποτελέσματα από *in vitro* βιοδοκιμασίες πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή (Bosmans et al., 2016).

Λόγω των διαφορετικών μηχανισμών αντιμυκητιακής δράσης που μπορεί να έχει ένας Β.Π.Ε., εξετάστηκε το ενδεχόμενο η αντιμυκητιακή δράση των *Enterobacter* VFAT314, C1.2, C1.5, C3.1, *Lelliottia* D2.4 και *Bacillus* VFFN21 να οφείλεται στην παραγωγή VOCs. Ακολουθώντας τη μέθοδο των επάλληλων και ανάστροφων τρυβλίων (διάταξη τρυβλίων υπό μορφή σάντουιτς), αξιολογήθηκε η ικανότητα των παραγόμενων βακτηριακών VOCs να παρεμποδίζουν την εξάπλωση του μυκηλίου του κάθε μύκητα.



**Εικόνα 3.38:** Έλεγχος αντιμυκητιακής δράσης των βακτηρίων μέσω παραγωγής VOCs.

Τα υπό μελέτη βακτήρια ήταν αρνητικά ως προς αυτόν τον τρόπο δράσης για αυτό η αντιμυκητιακή δράση, που παρατηρήθηκε μέσω της μεθόδου διπλής καλλιέργειας, είναι πολύ πιθανό να μην οφείλεται στην παρουσία VOCs κάτω από τις συνθήκες καλλιέργειας που εφαρμόστηκαν στην παρούσα μελέτη. Ωστόσο, η αντιμυκητιακή παρεμπόδιση λόγω παραγωγής VOCs δεν μπορεί να αποκλειστεί γιατί η σύνθεση και οι αντιμυκητιακές ιδιότητες των πτητικών που παράγονται από μικροοργανισμούς μπορεί να ποικίλλουν ανάλογα με το καλλιεργητικό μέσο. Οι Fiddaman & Rossall (1994) παρατήρησαν διακύμανση στην παραγωγή VOCs ανάλογα με τη φύση των υδατανθράκων, καθώς η προσθήκη D-γλυκόζης αύξησε σημαντικά την αντιμυκητιακή δράση των μικροβιακά παραγόμενων VOCs, χωρίς να ενισχύει τη βακτηριακή ανάπτυξη. Επίσης, διαπίστωσαν ότι ακόμα και η προέλευση της πεπτόνης παίζει ρόλο στην εκδήλωση της αντιμυκητιακής δράσης των VOCs, με την πεπτόνη μυκητιακής προέλευσης να είναι καλύτερη από ότι η βακτηριακή ή από πρωτεάση. Αλλαγές στις συνθήκες μικροβιακής ανάπτυξης έχουν ως αποτέλεσμα αλλαγές τόσο στους τύπους όσο και στις ποσότητες των παραγόμενων πτητικών οργανικών ενώσεων, γι' αυτό και έχει παρατηρηθεί ότι η διατήρηση σταθερών μικροβιακών καλλιεργητικών συνθηκών ανάπτυξης και η αλλαγή μόνο

του αμινοξέος του θρεπτικού (L-φαινυλαλανίνη, L-αργινίνη ή γλουταμίνη), μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικές αλλαγές στα παραγόμενα VOCs (Wheatley, 2002). Επίσης, η σύσταση του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης επηρεάζει την αντιμυκητιακή δράση των παραγόμενων βακτηριακών VOCs (Gotor-Vila et al., 2017; Asari et al., 2016).

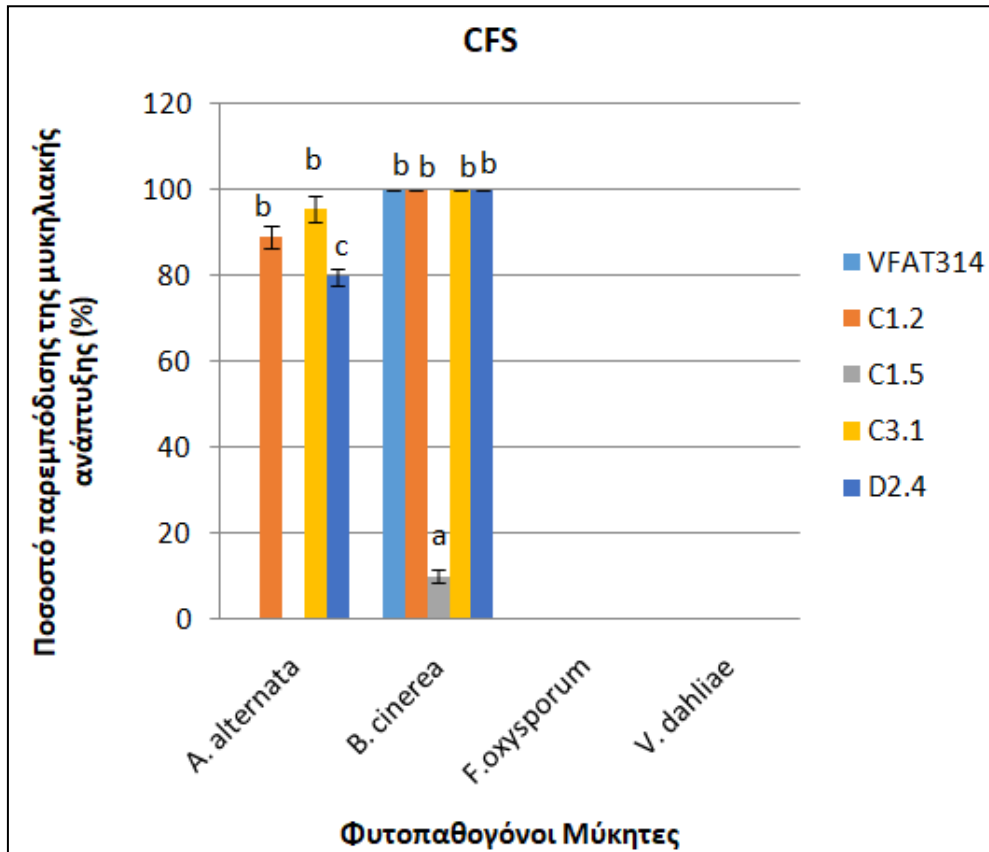
Ως εκ τούτου, η αδυναμία εμφάνισης αντιμυκητιακής δράσης μέσω παραγωγής οργανικών πτητικών ενώσεων από τα πέντε *Enterobacteriaceae* και το *Bacillus* sp. VFFN21 θα μπορούσε να οφείλεται στη χρήση του TY ως μέσο ανάπτυξης των υπό μελέτη βακτηρίων. Γι' αυτό δεν αποκλείεται το ενδεχόμενο τα βακτήρια αυτά σε άλλο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης όπως το PDA, που είχε προηγουμένως χρησιμοποιηθεί στη μέθοδο διπλής καλλιέργειας και που η προσφερόμενη πηγή άνθρακα είναι υπό μορφή σακχάρου (γλυκόζη) και όχι αμινοξική, να παράγουν VOCs με αντιμυκητιακή δράση.

Η διερεύνηση της αντιμυκητιακής δράσης ενδοφυτικών ριζοβακτηρίων ολοκληρώθηκε εξετάζοντας την παρεμποδιστική δράση των CFSs του κάθε βακτηρίου ενάντια στους 4 φυτοπαθογόνους μύκητες ξεχωριστά. Η λήψη των CFSs έγινε την 3<sup>η</sup> ημέρα ανάπτυξης σε LB, κατά τη στατική φάση ανάπτυξης των βακτηρίων ( $OD_{600nm} = 1,52 - 2,96$ ). Σε όλη τη διάρκεια της παρούσας βιοδοκιμής γίνονταν μακροσκοπικές παρατηρήσεις, αλλά η τελική αποτύπωση του αποτελέσματος έλαβε χώρα μετά από μια (*Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*) και τρεις εβδομάδες (*Verticillium dahliae*) από την ημέρα έναρξης επώασης των αντίστοιχων μυκήτων, λόγω του διαφορετικού ρυθμού ανάπτυξης του κάθε μύκητα. Συμπληρωματικά, υπολογίσθηκε η ανάπτυξη του μυκηλίου των φυτοπαθογόνων μυκήτων σε μέσο ανάπτυξης στο οποίο είχε ενσωματωθεί φιλτραρισμένο υπερκείμενο καλλιέργειας και σε μέσο όπου είχε ενσωματωθεί LB (θετικός μάρτυρας ανάπτυξης). Η ενσωμάτωση των παραγόμενων εκκρινόμενων ενώσεων των πέντε *Enterobacteriaceae* (VFAT314, C1.2, C1.5, C3.1, D2.4) στο μέσο ανάπτυξης έδειξε ότι τα βακτήρια αυτά ήταν ικανά να αναστείλουν την ανάπτυξη του μυκηλίου των μυκήτων αλλά όχι σε όλες τις περιπτώσεις (**Εικόνα 3.39** και **Εικόνα 3.40**).

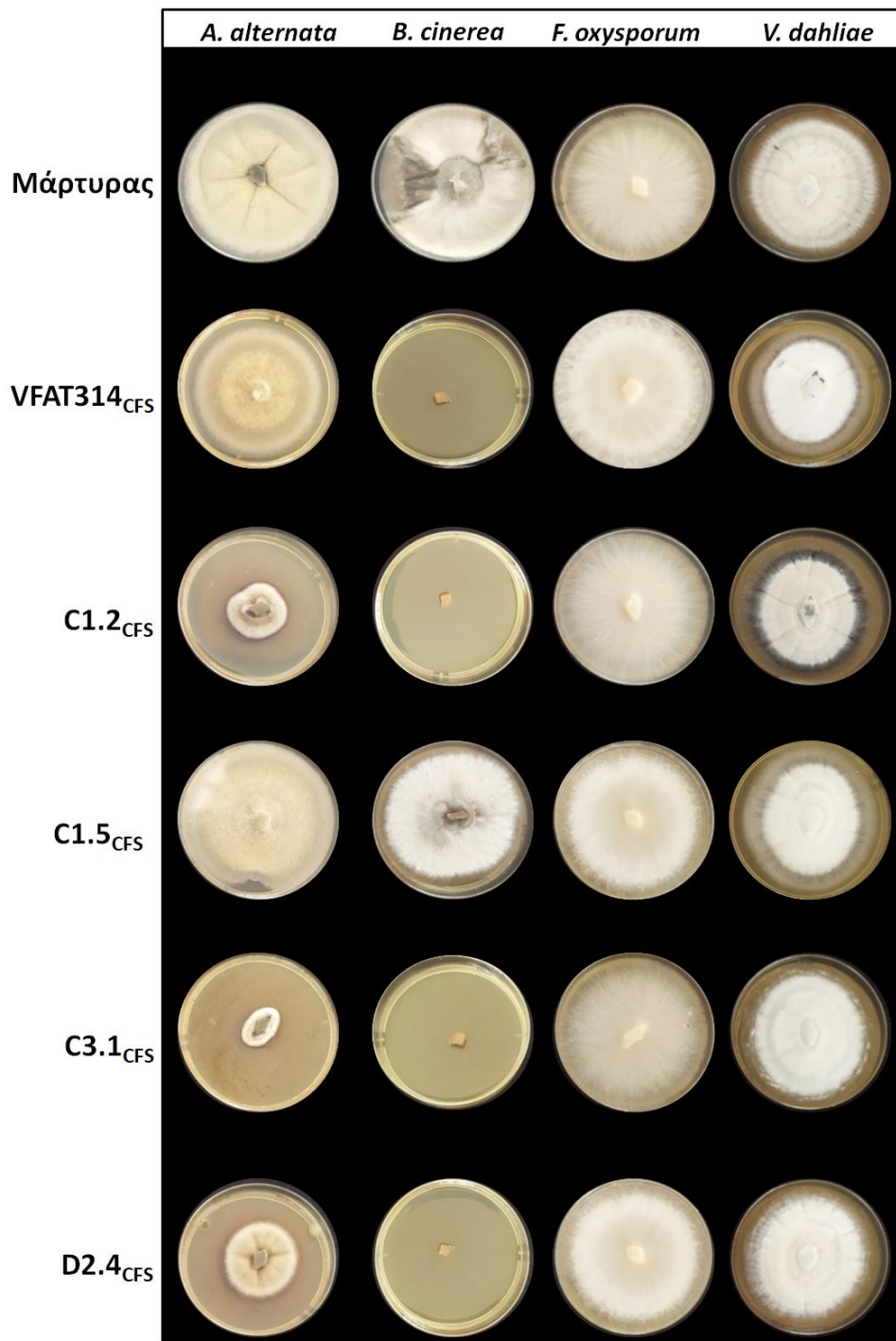
<b>Πίνακας 3.20:</b> Καταγραφή του ποσοστού παρεμπόδισης της ανάπτυξης (%) του μυκηλίου σε CFS προερχόμενο από το VFFN21.				
Βακτηριακά Στελέχη	Μύκητες			
	<i>A. alternata</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>V. dahliae</i>
VFAT314	0±0,0a	100±0,0b	0±0,0a	0±0,0a
C1.2	88,96±2,5b	100±0,0b	0±0,0a	0±0,0a
C1.5	0±0,00a	10±1,7a	0±0,0a	0±0,0a
C3.1	95,44±3,1b	100±0,0b	0±0,0a	0±0,0a
D2.4	79,65±1,8c	100±0,0b	0±0,0a	0±0,0a

Οι μέσες τιμές στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους σύμφωνα με το LSD ( $p \leq 0,05$ ). Ως «±» συμβολίζεται η τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή.

Με βάση τα ποσοστά παρεμπόδισης (**Εικόνα 3.39**), η ανάπτυξη του *A. alternata* μειώθηκε κατά 95,44%, 88,96% και 79,65% λόγω της αντιμυκητιακής δράσης των παραγόμενων CFS από τα C3.1, C1.2 και D2.4, αντίστοιχα. Ενώ τα CFS των VFAT314 και C1.5 δεν είχαν αντιμυκητιακή δράση (0%). Τα ίδια CFS με πριν είχαν διαφορετική επίπτωση στην ανάπτυξη του *B. cinerea*, με τα CFS των C1.2, C3.1, VFAT314 και D2.4 να σημειώνουν 100% παρεμπόδιση της ανάπτυξης, εναντιθέσει με εκείνο του C1.5, που σημείωσε μείωση 10%. Αν και η εφαρμογή των CFS κατά των *A. alternata* και *B. cinerea* δεν είχε ανασταλτικό χαρακτήρα σε όλες τις περιπτώσεις, παρατηρήθηκε ικανότητα παρεμπόδισης της ανάπτυξης του μυκηλίου, ενώ κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε κατά την εξέταση των *F. oxysporum* και *V. dahliae*. Συγκεκριμένα, κανένα από τα CFS δεν περιόρισε την ανάπτυξη του *F. oxysporum* και *V. dahliae* (0% αντιμυκητιακή δράση). Από τα CFS που χρησιμοποιήθηκαν αξίζει να συζητηθεί η επίπτωση εκείνων από τα C1.2 και VFAT314. Η διαφοροποιημένη εικόνα της ανάπτυξης του *A. alternata* στο μέσο ανάπτυξης με CFS των βακτηρίων C1.2 και VFAT314 υποδηλώνει πως αν και ανήκουν στο ίδιο είδος, εντούτοις εμφανίζουν διαφορετικό βαθμό παρεμπόδισης έναντι του μύκητα *A. alternata*. Η διαφοροποίηση των δύο στελεχών ενισχύεται και από το διαφορετικό πρότυπο ζωνών με βάση τη BOX-PCR.



Εικόνα 3.39: Υπολογισμός του ποσοστού παρεμπόδισης της μυκηλίας ανάπτυξης ανά CFS.



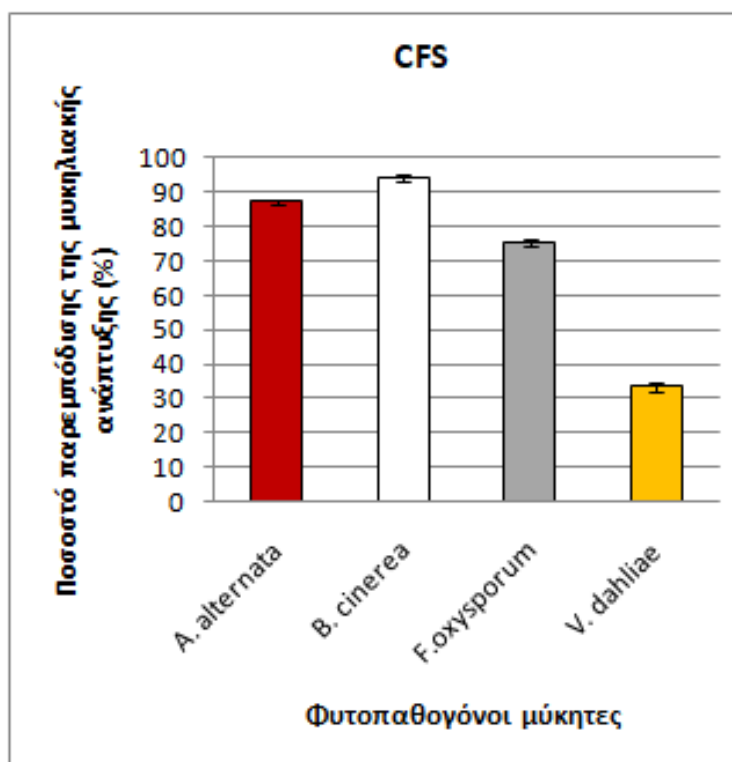
**Εικόνα 3.40:** Ανάπτυξη μυκηλίου των μυκήτων *A. alternata*, *B. cinerea*, *F. oxysporum* και *V. dahliae* απουσία και παρουσία φιλτραρισμένων υπερκειμένων (CFS) τεσσάρων Β.Π.Ε. (VFAT314, C1.2, C1.5, C3.1 και D2.4).



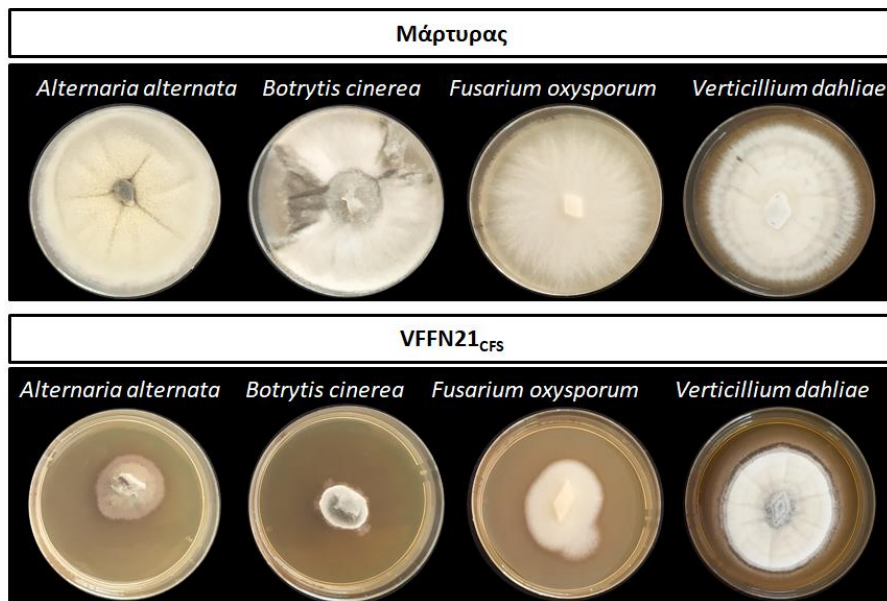
Εκτός από τα CFS των πέντε *Enterobacteriaceae*, εξετάστηκε επιπλέον η αντιμυκητιακή δράση των CFS προερχόμενο από το *Bacillus* sp. VFFN21.

Πίνακας 3.21: Καταγραφή του ποσοστού παρεμπόδισης της ανάπτυξης (%) του μυκηλίου σε CFS προερχόμενο από το VFFN21.				
Βακτηριακά Στελέχη	Μύκητες			
	<i>A. alternata</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>F.oxysporum</i>	<i>V. dahliae</i>
VFFN21	87,23±0,63	94,23±0,82	75,46±0,71	33,33±1,63
Ως «±» συμβολίζεται η τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή.				

Βάσει των αποτελεσμάτων, το VFFN21 ήταν ικανό να αναστείλει σε μεγάλο βαθμό την ανάπτυξη του μυκηλίου των μυκήτων *Alternaria alternata* (87,23%), *Botrytis cinerea* (94,23%), *Fusarium oxysporum* (75,46%) και λιγότερο του *Verticillium dahliae* (33,33), που όπως φάνηκε είχε τη μικρότερη ευαισθησία **Εικόνα 3.41**.



**Εικόνα 3.41:** Υπολογισμός του ποσοστού παρεμπόδισης της μυκηλίας ανάπτυξης ανά CFS. Η γραμμή σφάλματος υποδεικνύει την τυπική απόκλιση (±) από τη μέση τιμή.



**Εικόνα 3.42:** Ανάπτυξη μυκηλίου των μυκήτων *A. alternata*, *B. cinerea*, *F. oxysporum* και *V. dahliae* απουσία και παρουσία CFS προερχόμενο από το VFFN21.

Η εκδήλωση αντιμυκητιακής δράσης των CFS και ο βαθμός παρεμπόδισης της ανάπτυξης των μυκήτων επηρεάζεται από τη φάση ανάπτυξης του βακτηρίου και είναι δοσοεξαρτώμενη, δηλαδή επηρεάζεται από το κατ'όγκο ποσοστό του ενσωματωμένου CFS στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης του μύκητα (Χυ et al., 2019). Από διάφορες εργασίες φαίνεται ότι η μέγιστη αντιμυκητιακή δράση εμφανίζεται στη φάση θανάτου, πιθανόν λόγω αυξημένης συγκέντρωσης μεταβολιτών στο μέσο καλλιέργειας (Χυ et al., 2019). Η συσχέτιση της συσσώρευσης ανταγωνιστικών ενώσεων συναρτήσεως του χρόνου επώασης για την απόδοση της αντιμυκητιακής δράσης των CFS αποτελεί εύρημα σε πολλές εργασίες. Για παράδειγμα, στην εργασία των Jimenez-Quiros et al. (2022), η μέγιστη αντιμυκητιακή δράση παρατηρήθηκε στις 72 ώρες όπου ο αριθμός βακτηριακών κυττάρων στελεχών *Bacillus* ήταν μεγαλύτερος. Η εμφάνιση αντιμυκητιακής δράσης συναρτήσεως της περιεκτικότητας του μέσου σε CFS, αποτελεί παρατήρηση σε διάφορες εργασίες. Για παράδειγμα στην εργασία των Zhang et al. (2022), θετική ήταν η συσχέτιση της αντιμυκητιακής δράσης των CFS του *Bacillus velezensis* YB-185 έναντι του *Fusarium pseudograminearum* με την αύξηση της περιεκτικότητας τους στο μέσο ανάπτυξης.

Στην παρούσα εργασία το μέσο ανάπτυξης των μυκήτων αποτελούνταν από 50% PDA και 50% CFS και η λήψη των CFS πραγματοποιήθηκε την 3<sup>η</sup> ημέρα της καλλιέργειας των βακτηρίων. Βάσει των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη διερεύνηση της ικανότητας των CFS των *Enterobacteriaceae* και του *Bacillus* να εμφανίζουν παρεμποδιστική δράση κατά των εξεταζόμενων φυτοπαθογόνων μυκήτων, παρατηρήθηκε διαφοροποίηση αποτελεσμάτων. CFS που έδειξαν αντιμυκητιακή ιδιότητα, υποδηλώνουν την ικανότητα των αντίστοιχων βακτηρίων

να παράγουν αντιμυκητιακές ενώσεις, υπό κανονικές συνθήκες ανάπτυξης απουσία του μύκητα. Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι η δράση των CFSs ανα βακτήριο δεν είναι καθολική για όλους τους εξεταζόμενους μύκητες, καθώς παρατηρήθηκε αδυναμία παρεμπόδισης της ανάπτυξης του μυκηλίου του *Fusarium oxysporum* (CFS των *Enterobacteriaceae*) και *Verticillium dahliae* (CFS). Η διαφοροποίηση του βαθμού δράσης των CFSs αλλά και της ικανότητας ή μη ικανότητας εμφάνισης αντιμυκητιακής δράσης, πιθανόν να οφείλεται στη διαφοροποίηση της σύστασης του υπερκειμένου της κάθε καλλιέργειας των εξεταζόμενων βακτηρίων, είτε ως προς το περιεχόμενο των αντιμυκητιακών παραγόντων είτε ως προς τη συγκέντρωση αυτών.

Η αντιμυκητιακή δράση των CFSs, ειδικά των βακίλλων, έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητικών ομάδων και από βιβλιογραφικές αναφορές μπορούν να αντληθούν πληροφορίες σχετικά με το φάσμα της αντιμυκητιακής δράσης ανά εξεταζόμενο είδος αλλά και για πιθανούς μηχανισμούς που επηρεάζουν τη φυσιολογία και την ανάπτυξη των φυτοπαθογόνων μυκήτων. Γενικά, ο προτεινόμενος μηχανισμός δράσης των αντιμικροβιακών ουσιών είναι η στόχευση των κυτταρικών μεμβρανών των παθογόνων μικροοργανισμών προκαλώντας κυτταρική λύση και τέλος τη θανάτωση του οργανισμού (Li et al., 2015). Είναι γνωστό ότι τα CFSs διαφόρων στελεχών *Bacillus subtilis* έχουν αντιμυκητιακή δράση, που οφείλεται στην παρουσία surfactin και fengycin στο υπερκείμενο, καθώς και στην παραγωγή πρωτεάσης, κυτταρινάσης και σιδηροφόρων (Ali et al., 2020). Σε άλλη μελέτη, η αντι-*B. cinerea* δράση από CFSs βακίλλου συνδέθηκε με την έκκριση αντιμυκητιακών λιποπεπτιδίων και πρωτεϊνών (Zhang et al., 2013).

Για την ανάδειξη της ικανότητας παρεμπόδισης της ανάπτυξης του μυκηλίου η επιλογή της βιοδοκιμής που θα εφαρμοστεί παίζει βασικό ρόλο. Στην παρούσα εργασία, η ικανότητα παρεμπόδισης της ανάπτυξης του μυκηλίου ήταν διαφοροποιημένη όταν αυτή εξετάστηκε με τη βιοδοκιμή της διπλής καλλιέργειας και μέσω CFS. Η παρατήρηση αυτή ήταν περισσότερο έντονη όταν χρησιμοποιήθηκαν οι μύκητες *Fusarium oxysporum* και *Verticillium dahliae*, καθώς, παρουσία των *Enterobacteriaceae* εμφανίστηκε παρεμποδιστική-αντιμυκητιακή δράση, αλλά όχι με τα αντίστοιχα CFSs τους. Η παρατήρηση αυτή αναφέρεται στην εργασία των Torres et al. (2016) και δεν περιορίζεται μόνο στις βιοδοκιμές διπλής καλλιέργειας και CFS. Για παράδειγμα στην εργασία των Gorai et al. (2021) εφαρμόστηκε η βιοδοκιμή της διπλής καλλιέργειας και της διάχυσης με πηγάδι στο άγαρ, όπου περισσότερο έντονη ήταν η αντιμυκητιακή δράση μέσω διπλής καλλιέργειας.

Τέλος, στην παρούσα εργασία η τροποποίηση ή η αλλαγή του μέσου ανάπτυξης των βακτηρίων ίσως να άλλαζε την ένταση της δραστηριότητας των CFSs, όπως έχει παρατηρηθεί στην εργασία των Rajaofera et al. (2019). Ενδιαφέρον θα είχε η επανεξέταση της

αντιμυκητιακής δράσης των CFSs κατά των εξεταζόμενων μυκήτων και κυρίως των *Fusarium oxysporum* και *Verticillium dahlia*, στα οποία δεν παρατηρήθηκε αντιμυκητιακή δράση με την χρήση CFSs. Συγκεκριμένα, η αντιμυκητιακή δράση των CFSs θα μπορούσε να εξεταστεί με την ενσωμάτωση τους σε υγρό θρεπτικό μέσο πατάτας-γλυκόζης (potato dextrose broth), προερχόμενα από βακτηριακή καλλιέργεια ανεπτυγμένη σε υγρό θρεπτικό μέσο LB με 2% γλυκόζη, όπως στη μελέτη των Zhao et al. (2022).

**Πίνακας 3.22:** Καταγραφή της ικανότητας εμφάνισης παρεμποδιστικής δράσης ριζοβίων και μη ριζοβιακών ρνδοφυτικών βακτηρίων έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων μέσω διπλής καλλιέργειας, CFSs και VOCs.

Βακτηριακά Στελέχη	Φυτοπαθογόνα Βακτήρια											
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
<b><i>Rhizobium</i></b>	Διπλή καλλιέργεια				CFSs				VOCs			
VFCR2	- <sup>α</sup>	-	-	-	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
VFCR3	-	-	-	-	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
VFLE5	-	-	-	-	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
VFIM1	-	-	-	-	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
VFLE1	-	-	-	-	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
VFEP63	-	-	-	-	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
VFEP162	-	-	-	-	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
PVKA6	-	-	-	-	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
PVDO712	-	-	-	-	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
PVTN21	-	-	-	-	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
PVTP1	-	-	-	-	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
PVKV3	-	-	-	-	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
PVMT26	-	-	-	-	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 <sup>†</sup>	-	-	-	-	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
<b><i>Mesorhizobium</i></b>	Διπλή καλλιέργεια				CFSs				VOCs			
TPCR2C	-	-	-	-	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
TPCR2D	-	-	-	-	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
TPCR2F	-	-	-	-	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
TPCR2G	-	-	-	-	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
TPCR2I	-	-	-	-	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
<b><i>Bradyrhizobium</i></b>	Διπλή καλλιέργεια				CFSs				VOCs			
VUEP21	-	-	-	-	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
VUCR24	-	-	-	-	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
VULI11	-	-	-	-	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
<b><i>Ensifer</i></b>	Διπλή καλλιέργεια				CFSs				VOCs			
VUKA2	-	-	-	-	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
<b><i>Enterobacter</i></b>	Διπλή καλλιέργεια				CFSs				VOCs			

VFAT314	+ <sup>β</sup>	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
C1.2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
C1.5	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
C3.1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<b>Lelliottia</b>	<b>Διπλή καλλιέργεια</b>				<b>CFSs</b>				<b>VOCs</b>			
D2.4	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<b>Bacillus</b>	<b>Διπλή καλλιέργεια</b>				<b>CFSs</b>				<b>VOCs</b>			
VFFN21	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<sup>α</sup> '-': αδυναμία παρεμπόδισης ανάπτυξης φυτοπαθογόνου, <sup>β</sup> '+': παρεμπόδιση ανάπτυξης φυτοπαθογόνου. <b>1) A. alternata, 2) B. cinerea, 3) F. oxysporum και 4) V. dahlia.</b> ΔΕ, Δεν Εξετάστηκαν.												

### 3.4.3.2) *In vitro* ανταγωνιστική δράση ριζοβακτηρίων κατά φυτοπαθογόνων βακτηρίων

Για την ανάδειξη βακτηρίων με αντιβακτηριακή δράση εφαρμόστηκε η μέθοδος της διασταυρούμενης επίστρωσης (cross-streak), η μέθοδος διάχυσης σε στερεό θρεπτικό με χρήση δισκίων (Agar-Disk-Diffusion Method) και η μέθοδος «εξ' επαφής» διάχυσης σε στερεό θρεπτικό (Agar-Diffusion Method).

Στην παρούσα βιοδοκιμή αρχικά εξετάστηκε ένα σύνολο 27 ριζοβίων κατανεμημένα στα γένη *Rhizobium*(18), *Mesorhizobium* (5), *Ensifer* (1) και *Bradyrhizobium* (3). Η αντιβακτηριακή δράση του συνόλου των παραπάνω ριζοβιακών απομονώσεων εξετάστηκε έναντι σε 14 φυτοπαθογόνα βακτήρια με τρεις μεθόδους. Την τελευταία ημέρα επώασης έγινε μακροσκοπική παρατήρηση, αξιολόγηση της αντιβακτηριακής δράσης και σύγκριση των μεταξύ τους αποτελεσμάτων. Κανένα στέλεχος από τα *Rhizobium*, *Mesorhizobium* και *Ensifer* (ομάδα ταχείας ανάπτυξης) δεν έδειξε αντιβακτηριακή δράση με τις τρεις μεθόδους που εφαρμόστηκαν και για αυτό δεν εξετάστηκαν περαιτέρω. Όμως, από στελέχη *Bradyrhizobium* VUEP21, VUCR24, VULI11 (ομάδα βραδείας ανάπτυξης), μόνο το τελευταίο εμφάνισε εκλεκτική αντιβακτηριακή δράση έναντι των θετικά κατά Gram βακτηρίων του γένους *Clavibacter*. Μεταξύ των τριών μεθόδων που εφαρμόστηκαν μόνο η μέθοδος «εξ' επαφής» διάχυσης σε στερεό θρεπτικό, επέτρεψε την οπτική παρατήρηση και διάκριση της αντι-*Clavibacter* δράσης του *Bradyrhizobium* sp. VULI11, ακολουθώντας την πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στο **Εδάφιο 3.3.8.2**, εναλλάσσοντας δηλαδή κάθε φορά το βακτηριο επίστρωσης με εκείνα που εναποτίθενται ως βακτηριακή κηλίδα (**Πίνακας 3.23**).

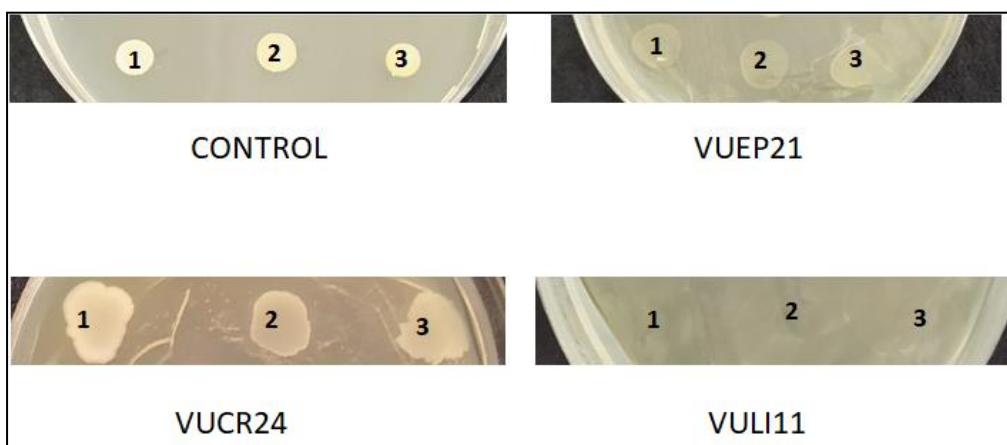
**Πίνακας 3.23:** Μελέτη της αντιβακτηριακής δράσης επιλεγμένων ριζοβακτηρίων έναντι σε δεκατέσσερα φυτοπαθογόνα βακτήρια εφαρμόζοντας την «εξ'επαφής» μέθοδο διάχυσης σε άγαρ.

Βακτήρια	Ομάδα ταχείας ανάπτυξης ριζοβίων	Ομάδα βραδείας ανάπτυξης ριζοβίων		
		VUEP21	VUCR24	VULI11
<i>P. syringae</i> pv. pisi race 3	- <sup>α</sup>	-	-	-
<i>P. syringae</i> pv. phaseolicola 3121	-	-	-	-
<i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000	-	-	-	-
<i>D. solani</i> IPO2222	-	-	-	-
<i>A. citrulli</i> AAC00-1	-	-	-	-
<i>A. citrulli</i> 50556	-	-	-	-
<i>A. citrulli</i> 1367	-	-	-	-
<i>X. campestris</i> pv. vesicatora (Xcv8510)	-	-	-	-
<i>E. Amylovora</i>	-	-	-	-
<i>P. brasiliensis</i> 3751	-	-	-	-
<i>P. brasiliensis</i> 3753	-	-	-	-
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. michiganensis CFBP 4999 <sup>T</sup>	-	-	-	+ <sup>β</sup>
<i>Clavibacter</i> HMU 4521	-	-	-	+
<i>Clavibacter</i> HMU 4998	-	-	-	+

<sup>α</sup> -: ανάπτυξη φυτοπαθογόνου, <sup>β</sup> +: αδυναμία ανάπτυξης φυτοπαθογόνου.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν το αντιβακτηριακό προφίλ του *Bradyrhizobium* sp. VULI11 ήταν ίδιο με εκείνο των υπόλοιπων ριζοβίων μόνο για τα αρνητικά κατά Gram παθογόνα *Pseudomonas*, *Dickeya*, *Acidovorax*, *Erwinia*, *Pectobacterium*, παρατηρώντας συνανάπτυξη. Η παρατήρηση του VULI11 ως κηλίδα δεν οδήγησε σε ξεκάθαρα αποτελέσματα, καθώς τα αποτελέσματα παρέπεμπαν σε συνανάπτυξη μεταξύ των δύο βακτηρίων ή ανάπτυξη μόνο του *Bradyrhizobium* (βακτηριακή κηλίδα) και θανάτωση του βακτηρίου επίστρωσης (*Clavibacter*). Εντελώς διαφορετική ήταν η συμπεριφορά των θετικά κατά Gram παθογόνων (*Clavibacter michiganensis* subsp. michiganensis CFBP 4999, *Clavibacter* HMU 4521 και *Clavibacter* HMU 4998) τα οποία δεν αναπτύχθηκαν καθόλου (απουσία βακτηριακής κηλίδας) γι' αυτό και θεωρήθηκαν ότι είναι ευαίσθητα στην παρουσία μόνο του στελέχους *Bradyrhizobium* sp. VULI11. Συνεπώς η αντι-*Clavibacter* δράση έγινε έντονα αισθητή μόνο όταν το βακτήριο επίστρωσης ήταν το VULI11 (**Εικόνα 3.43**) και όχι το αντίθετο.





**Εικόνα 3.43:** Παρουσίαση της ικανότητας των VUEP21, VUCR24 και VULI11 (ως βακτήρια επίστρωσης σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου) να εμφανίζουν αντιβακτηριακή δράση έναντι σε στελέχη *Clavibacter* (ως βακτήρια τοποθετημένα με μορφή κηλίδας). Η αδυναμία ανάπτυξης των κηλίδων *Clavibacter* είναι ενδεικτική της αντιβακτηριακής δράσης του βακτηρίου επίστρωσης. 1) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* CFBP 4999<sup>T</sup>, 2) *Clavibacter* HMU 4521, 3) *Clavibacter* HMU 4998.

Σημειώνεται επιπρόσθετα, ότι στελέχη του γένους *Bradyrhizobium*, παράγουν μικροβιακά μεταβολικά προϊόντα με πολλαπλές ιδιότητες που δεν περιορίζονται μόνο στο αντιμυκητιακό φάσμα. Αν και στην περίπτωση των εξεταζομένων *Bradyrhizobium* μόνο το VULI11, έδειξε «εξ'επαφής» αντι-*Clavibacter* δράση, έχουν καταγραφεί περιπτώσεις αντιβακτηριακής δράσης κατά των *Escherichia coli* DH5α και *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* CIAT 555 (Kelemu et al., 1995) με τη χρήση CFSs από *Bradyrhizobium*. Από την εξέταση των *Bradyrhizobium* σε επίπεδο γονιδιώματος έχουν ανιχνευτεί λειτουργικοί χαρακτήρες (Godoy et al., 2008), γονίδια που προσδίδουν προσαρμοστικά οφέλη (Tian et al., 2012) και δευτερογενείς μεταβολίτες με πιθανή αντιμυκητιακή, αντιβιοτική και αντι-ική δράση (Kohlmeier et al., 2015).

Στη συνέχεια εξετάστηκε ποιοτικά η αντιβακτηριακή δράση των πέντε *Enterobacteriaceae* VFAT314, C1.2, C1.5, C3.1, D2.4 και του *Bacillus* sp. VFFN21 κατά των ίδιων 14 φυτοπαθογόνων βακτηρίων ακολουθώντας μόνο τη μέθοδο «εξ'επαφής» διάχυσης σε στερεό θρεπτικό (Agar - Diffusion Method), όπως πριν. Η εφαρμογή αποκλειστικά αυτής της μεθόδου έγινε γιατί η Agar-Disk-Diffusion Method δε διευκόλυνε την παρατήρηση της ανάπτυξης της βακτηριακής κηλίδας προερχόμενη είτε από το παθογόνο είτε από το εξεταζόμενο ριζοβακτήριο. Επίσης, η επιλογή αυτής της μεθόδου και όχι της cross-streak έγινε γιατί η τελευταία ενδείκνυται περισσότερο στις περιπτώσεις διάχυσης αντιβιοτικών και αντιβακτηριακών παραγόντων στο μέσο ανάπτυξης του υποψήφιου Β.Π.Ε. και του φυτοπαθογόνου (Balouiri et al., 2016), και όχι σε περιπτώσεις με διαφορετικό μηχανισμό δράσης.

Βάσει των αποτελεσμάτων που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.24**, όλα τα εξεταζόμενα ριζοβακτήρια εμφάνισαν αντιβακτηριακό χαρακτήρα καθώς σημειώθηκαν πολλές περιπτώσεις στις οποίες δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη των φυτοπαθογόνων όταν τα ριζοβακτήρια

εφαρμόστηκαν για την επίστρωση του τρυβλίου. Σε κανένα φυτοπαθογόνο βακτήριο δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη κηλίδας όταν το βακτήριο επίστρωσης του τρυβλίου ανήκε στην οικογένεια των *Enterobacteriaceae*. Περισσότερο στενό ήταν το αντιβακτηριακό φάσμα δράσης που έδειξε ο *Bacillus* sp. VFFN21, καθώς δεν εμφάνισε ανάλογη δράση σε όλα τα εξεταζόμενα φυτοπαθογόνα. Για το λόγο αυτό παρατηρήθηκε ανάπτυξη βακτηριακής κηλίδας από τα *P. syringae* pv. pisi race 3, *P. syringae* pv. tomato DC3000, *X. campestris* pv. vesicatoria (Xcv8510), *E. amylovora*, *P. brasiliensis* 3751 και *P. brasiliensis* 3753, αλλά όχι από τα *P. syringae* pv. phaseolicola 3121, *D. solani* IPO2222, *A. citrulli* AAC00-1, *A. citrulli* 50556, *A. citrulli* 1367, *Clavibacter michiganensis* subsp. michiganensis CFBP 4999, *Clavibacter* HMU 4521 και *Clavibacter* HMU 4998. Ως εκ τούτου θεωρήθηκε ότι η απομόνωση VFFN21 δρα παρεμποδιστικά της ανάπτυξης των *P. syringae* pv. phaseolicola 3121, *D. solani* IPO2222, *A. citrulli* AAC00-1, *A. citrulli* 50556, *A. citrulli* 1367, *Clavibacter michiganensis* subsp. michiganensis CFBP 4999, *Clavibacter* HMU 4521 και *Clavibacter* HMU 4998.

**Πίνακας 3.24:** Αντιβακτηριακή δράση επιλεγμένων ριζοβακτηρίων έναντι σε δεκατέσσερα φυτοπαθογόνα βακτήρια, εφαρμόζοντας τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ χωρίς τη χρήση δισκίων.

Gram	Βακτήρια	<i>Enterobacteriaceae</i>					<i>Bacillaceae</i>
		<i>Enterobacter</i>				<i>Lelliottia</i>	<i>Bacillus</i>
		VFAT314	C1.2	C1.5	C3.1	D2.4	VFFN21
-	<i>P. syringae</i> pv. pisi race 3	-/+ <sup>a</sup>	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+ <sup>b</sup>
	<i>P. syringae</i> pv. phaseolicola 3121	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
	<i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+
	<i>D. solani</i> IPO2222	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
	<i>A. citrulli</i> AAC00-1	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
	<i>A. citrulli</i> 50556	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
	<i>A. citrulli</i> 1367	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
	<i>X. campestris</i> pv. vesicatoria (Xcv8510)	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+
	<i>E. amylovora</i>	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+
	<i>P. brasiliensis</i> 3751	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+
<i>P. brasiliensis</i> 3753	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	
+	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. michiganensis CFBP 4999	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
	<i>Clavibacter</i> HMU 4521	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
	<i>Clavibacter</i> HMU 4998	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+

<sup>a</sup> “-/+:” αδυναμία ανάπτυξης φυτοπαθογόνου/ ανάπτυξη ριζοβακτηρίου, <sup>b</sup> “+/+”: ανάπτυξη φυτοπαθογόνου/ ανάπτυξη ριζοβακτηρίου.

Η αλληλεπίδραση των ριζοβακτηρίων με τα παραπάνω φυτοπαθογόνα βακτήρια είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς παρατηρήθηκαν δυο διαφορετικά προφίλ, τόσο από τη μεριά των *Enterobacteriaceae* όσο και από τη μεριά του VFFN21. Με βάση το προφίλ αλληλεπίδρασης,

στο 1<sup>ο</sup> κατηγοριοποιήθηκαν τα φυτοπαθογόνα βακτήρια που ήταν «ευαίσθητα» στην παρουσία των *Enterobacteriaceae* και *Bacillus* sp. VFFN21 (απουσία ανάπτυξης βακτηριακής κηλίδας). Τα «ευαίσθητα» φυτοπαθογόνα βακτήρια χωρίστηκαν στις ομάδες Α και Β, καθώς η αποτύπωση της αντιβακτηριακής δράσης των *Enterobacteriaceae* και *Bacillus* sp. VFFN21 ήταν διαφοροποιημένη μεταξύ των δύο αυτών ομάδων (**Πίνακας 3.24, Εικόνα 3.44**). Συγκεκριμένα στην ομάδα Β φαίνεται ότι, η βακτηριακή κηλίδα αφήνει ένα οριοθετημένο αποτύπωμα ενώ στην Α όχι, προκαλώντας ασάφεια για την ικανότητα ανάπτυξης του βακτηρίου επίστρωσης, δηλαδή των ριζοβακτηρίων. Στο 2<sup>ο</sup> προφίλ κατηγοριοποιήθηκαν τα φυτοπαθογόνα που δεν ήταν «ευαίσθητα» στην παρουσία των *Enterobacteriaceae* και *Bacillus* sp. VFFN21 (ομάδα Γ) και δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη βακτηριακής κηλίδας (**Πίνακας 3.24, Εικόνα 3.44**).

Επίστρωση τρυβλίου με	Εναπόθεση κηλίδας με φυτοπαθογόνο βακτήριο		
	Ομάδα Α	Ομάδα Β	Ομάδα Γ
-			
<b>Ριζοβακτήρια</b>			

**Εικόνα 3.44:** Παρουσίαση του προφίλ αλληλεπίδρασης των ριζοβακτηρίων *Enterobacteriaceae* και *Bacillus* sp. VFFN21 ως βακτήρια επίστρωσης και ομαδοποίηση των φυτοπαθογόνων βακτηρίων με βάση την όψη του αποτυπώματος της βακτηριακής κηλίδας.

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.25**, φαίνεται ότι όλα τα εξεταζόμενα ριζοβακτήρια παρεμπόδισαν την ανάπτυξη των τριών *A. citrulli* (ομάδα Α) και των τριών *Clavibacter* (ομάδα Β). Τα *P. syringae* pv. tomato DC3000, *D. solani* IPO2222, *P. brasiliensis* 3751 και *P. brasiliensis* 3753 κατατάχθηκαν στην ομάδα Α και Γ παρουσία των *Enterobacteriaceae* και VFFN21, αντίστοιχα. Διαφοροποίηση του αποτυπώματος παρεμπόδισης παρατηρήθηκε ακόμα και μεταξύ των *Enterobacteriaceae*, όπου τα *P. syringae* pv. pisi, *X. campestris* pv. vesicatora (Xcv8510) και *E. amylovora* κατατάχθηκαν στην ομάδα Α και Β παρουσία των στελεχών *Enterobacter* και *Lelliottia*, αντίστοιχα.

**Πίνακας 3.25:** Κατηγοριοποίηση δεκατεσσάρων φυτοπαθογόνων βακτηρίων σε ομάδες με βάση την όψη του αποτυπώματος της βακτηριακής κηλίδας του φυτοπαθογόνου σε τρυβλίο επιστρωμένο με ριζοβακτήριο.

Εναπόθεση βακτηριακής κηλίδας	Βακτήριο επίστρωσης					
	VFAT314	C1.2	C1.5	C3.1	D2.4	VFFN21
<i>P. syringae</i> pv. pisi race 3	A	A	A	A	B	Γ
<i>P. syringae</i> pv. phaseolicola 3121	A	A	A	A	A	A
<i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000	A	A	A	A	A	Γ
<i>D. solani</i> IPO2222	A	A	A	A	A	A
<i>A. citrulli</i> AAC00-1	B	B	B	B	B	B
<i>A. citrulli</i> 50556	B	B	B	B	B	B
<i>A. citrulli</i> 1367	B	B	B	B	B	B
<i>X. campestris</i> pv. vesicatora (Xcv8510)	A	A	A	A	B	Γ
<i>E. amylovora</i>	A	A	A	A	B	Γ
<i>P. brasiliensis</i> 3751	A	A	A	A	A	Γ
<i>P. brasiliensis</i> 3753	A	A	A	A	A	Γ
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> CFBP 4999	A	A	A	A	A	A
<i>Clavibacter</i> HMU 4521	A	A	A	A	A	A
<i>Clavibacter</i> HMU 4998	A	A	A	A	A	A




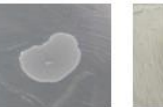












Στη συνέχεια έγινε επιλογή επτά φυτοπαθογόνων βακτηρίων για την εκ νέου διεξαγωγή της Agar-Diffusion Method, αντιστρέφοντας το βακτήριο επίστρωσης και εναπόθεσης κηλίδας. Τα επτά φυτοπαθογόνα βακτήρια είχαν προηγουμένως χαρακτηριστεί ως βακτήρια «ευαίσθητα» -1<sup>ο</sup> προφίλ (ομάδα Α, Β) και ως βακτήρια μη «ευαίσθητα»-2<sup>ο</sup> προφίλ (ομάδα Γ). Η εκτίμηση των αποτελεσμάτων ήταν ποιοτική και βασίστηκε στην παρατήρηση της ανάπτυξης των *Enterobacteriaceae* και VFFN21 (ως κηλίδα) παρουσία και απουσία επιστρωμένου φυτοπαθογόνου σε όλη την επιφάνεια στερεού θρεπτικού μέσου ΤΥ. Μετά από 2-3 ημέρες επώασης έγινε λήψη φωτογραφιών από την πάνω και την κάτω όψη του τρυβλίου για την αποτύπωση των αποτελεσμάτων. Ο χαρακτηρισμός στηρίχθηκε στην ικανότητα ανάπτυξης βακτηρίου-βακτηρίου μετά από τη μεταξύ τους αλληλεπίδραση και σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα του **Πίνακα 3.24**.

Στην περίπτωση των *Enterobacteriaceae* και με βάση την πάνω όψη του τρυβλίου (**Εικόνα 3.45**), όλα τα υπό μελέτη ριζοβακτήρια μπόρεσαν να αναπτυχθούν υπό μορφή βακτηριακής κηλίδας σε τρυβλίο που είχε επιστρωθεί προηγουμένως με το κάθε φυτοπαθογόνο βακτήριο. Το γεγονός αυτό μαρτυρά ότι οι φυτοπαθογόνοι μικροοργανισμοί δεν έχουν ανασταλτική και παρεμποδιστική επίδραση στην ανάπτυξη των *Enterobacteriaceae*. Η παρατήρηση αυτή δεν προκάλεσε έκπληξη όταν τα *Enterobacteriaceae* εξετάστηκαν σε επιστρωμένο τρυβλίο με τα επιλεγμένα παθογόνα της ομάδας Α (*C. michiganensis* 4999, *D. solani* IPO2222, Xcv 8510 *P. syringae* pv. phaseolicola 3121, *P. syringae* pv. tomato DC3000, *P. brasiliensis* 3751), ενώ επιπρόσθετα διαλευκάνθηκε η ανταγωνιστική τους δράση έναντι των επιλεγμένων παθογόνων της ομάδας Β (*A. citrulli* 50556, Xcv 8510) κάτι που προηγουμένως ήταν ασαφές (**Εικόνα 3.44**,

**Πίνακας 3.25).** Το φυτοπαθογόνο Xcn 8510 είχε προηγουμένως καταταχθεί ως βακτήριο ομάδας A όταν εξετάστηκε η αλληλεπίδραση του με τα *Enterobacter* και ως βακτήριο ομάδας B όταν εξετάστηκε η αλληλεπίδραση του με το *Lelliottia* D2.4.

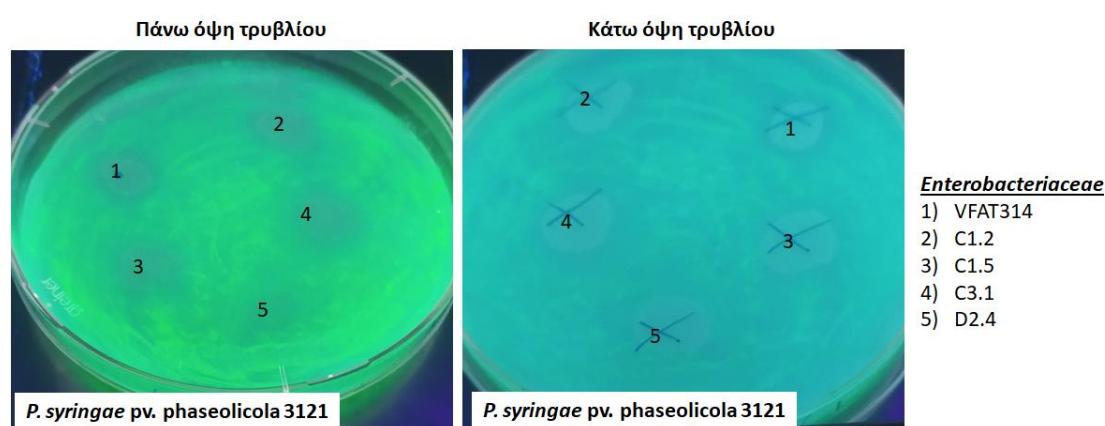
Έπειτα έγινε παρατήρηση της κάτω όψης του κάθε τρυβλίου χωριστά επιτρέποντας τη διάκριση διαφορετικών τύπων αποτύπωσης (I, II, III και IV) της βακτηριακής κηλίδας των *Enterobacteriaceae* ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης με τα φυτοπαθογόνα της ομάδας A και B (**Εικόνα 3.45**). Το σημείο ανάπτυξης της βακτηριακής κηλίδας του τύπου I ήταν αδιαφανές, εν αντιθέσει με το αντίστοιχο σημείο του τύπου II που ήταν διαφανές επιτρέποντας την παρατήρηση του φόντου πίσω από το τρυβλίο. Στον τύπο III, περιμετρικά της βακτηριακής κηλίδας εντοπίστηκε μια καλά σχηματισμένη λεπτή ζώνη διαχωρισμού και οριοθέτησης της βακτηριακής κηλίδας από το βακτήριο επίστρωσης, ενώ στον τύπο IV αχνοφάνηκε ζώνη τύπου στεφάνης-άλως (halo), διαφορετική από την αντίστοιχη ζώνη του τύπου III.

Έτσι σε φυτοπαθογόνα της ομάδας A διακρίθηκαν όλοι οι τύποι αποτυπώματος κηλίδας στην πίσω όψη του τρυβλίου, ενώ σε φυτοπαθογόνα της ομάδας B, ο τύπος II. Ακόμα σημειώνεται ότι όλα τα *Enterobacteriaceae* εμφάνισαν τον ίδιο τύπο στο σημείο της κηλίδας ανά εξεταζόμενο φυτοπαθογόνο, με εξαίρεση το βακτήριο επίστρωσης *P. syringae* pv. *phaseolicola* 3121. Στο φυτοπαθογόνο αυτό σημειώθηκε ο τύπος II και IV, όταν η κηλίδα ανήκε στην *Lelliottia* και στα *Enterobacter*, αντίστοιχα. Ανεξάρτητα από τον τύπο αποτυπώματος της κηλίδας των ριζοβακτηρίων και της ομάδας των φυτοπαθογόνων, τα ριζοβακτήρια εμφάνισαν παρεμποδιστική δράση κατά των φυτοπαθογόνων. Το γεγονός όμως ότι παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις στο αποτύπωμα της παρεμποδιστικής δράσης θα μπορούσε να αποτελεί ένδειξη του διαφορετικού τρόπου αλληλεπίδρασης και του μηχανισμού δράσης μεταξύ των ριζοβακτηρίων ανά φυτοπαθογόνο.

Εναπόθεση <i>Enterobacteriaceae</i> ως κηλίδα	Επίστρωση με φυτοπαθογόνο βακτήριο/ομάδα							
	<i>C. michiganensis</i> 4999 /A	<i>A. citrulli</i> 50556/B	<i>D. solani</i> IPO2222/A	Χcv 8510/ A &B	<i>P. syringae</i> pv. phaseolicola 3121/A		<i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000/A	<i>P. brasiliensis</i> 3751/A
	+++ <sup>a</sup>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
πάνω όψη								
κάτω όψη								
<b>VFAT314</b>	✓ <sup>b</sup>	✓	✓	✓	✓	×	✓	✓
<b>C1.2</b>	✓	✓	✓	✓	✓	×	✓	✓
<b>C1.5</b>	✓	✓	✓	✓	✓	×	✓	✓
<b>C3.1</b>	✓	✓	✓	✓	✓	×	✓	✓
<b>D2.4</b>	✓	✓	✓	✓	× <sup>c</sup>	✓	✓	✓
<b>Τύπος αποτυπώματος κηλίδας ριζοβακτηρίων</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>II</b>	<b>IV</b>	<b>II</b>	<b>I</b>	<b>II</b>
<sup>a</sup> “+++”: ανάπτυξη ριζοβακτηρίων, <sup>b</sup> “✓”: εμφάνιση τύπου αποτυπώματος, <sup>c</sup> “x”: απουσία εμφάνισης τύπου αποτυπώματος.								

**Εικόνα 3.45:** Παρουσίαση του αποτυπώματος βακτηριακής κηλίδας μεταξύ φυτοπαθογόνων βακτηρίων (βακτήριο επίστρωσης) και των *Enterobacteriaceae* (βακτηριακή κηλίδα).

Για την καλύτερη αποτύπωση του φαινομένου της παρεμποδιστικής δράσης των *Enterobacteriaceae* στην ανάπτυξη των φυτοπαθογόνων, η διαδικασία επαναλήφθηκε χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά το φθορίζον στέλεχος *P. syringae* pv. *phaseolicola* 3121::GFP(υν) (**Εικόνα 3.46**). Όπως φάνηκε τόσο στην πάνω όσο και στην κάτω όψη του τρυβλίου, η παρουσία του *P. syringae* pv. *phaseolicola* 3121::GFP(υν) είναι έντονη σε όλο το τρυβλίο κάνοντας το να φθορίζει με χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα, πλην των σημείων που αναπτύχθηκαν οι βακτηριακές κηλίδες των *Enterobacteriaceae*. Η απουσία του φθορισμού στα σημεία αυτά αποτυπώνει περισσότερο έντονα την ανταγωνιστική και παρεμποδιστική δράση των *Enterobacteriaceae* έναντι της ανάπτυξης του συγκεκριμένου φυτοπαθογόνου.



**Εικόνα 3.46:** Παρουσίαση του αποτυπώματος βακτηριακής κηλίδας μεταξύ του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *P. syringae* pv. *phaseolicola* 3121::GFP(υν) (βακτήριο επίστρωσης) και των *Enterobacteriaceae* (βακτηριακή κηλίδα).















Τέλος, για την αξιολόγηση της δράσης του VFFN21, διεξήχθη όμοια με πριν η Agar-Diffusion Method, χρησιμοποιώντας τα ίδια επτά φυτοπαθογόνα βακτήρια, ακολουθώντας τον ίδιο τρόπο αξιολόγησης των αποτελεσμάτων (**Εικόνα 3.47**). Με βάση τον **Πίνακα 3.25** τα φυτοπαθογόνα της ομάδας Α ήταν τα *C. michiganensis* 4999, *D. solani* IPO2222, *P. syringae* pv. *phaseolicola* 3121, της Β το *A. citrulli* 50556 και της Γ τα Xcv 8510, *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 *P. brasiliensis* 3751. Στην πάνω όψη του τρυβλίου, σχεδόν σε όλα τα επιστρωμένα φυτοπαθογόνα βακτήρια παρατηρήθηκε ανάπτυξη βακτηριακής κηλίδας, γεγονός που μαρτυρά ότι οι φυτοπαθογόνοι μικροοργανισμοί δεν έχουν ανασταλτική και παρεμποδιστική επίδραση στην ανάπτυξη του VFFN21. Εξαιρέση αποτέλεσε η περίπτωση ανάπτυξης κηλίδας VFFN21 επί του Xcv8510, όπου παρατηρήθηκε περιορισμένη ικανότητα ανάπτυξης της κηλίδας.

Μετά ακολούθησε η παρατήρηση της κάτω όψης του κάθε τρυβλίου χωριστά επιτρέποντας τη διάκριση αποτύπωσης βακτηριακής κηλίδας στους τύπους I, III, V, VI, ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης με τα φυτοπαθογόνα της ομάδας Α, Β και Γ (**Εικόνα 3.47**). Οι τύποι I και III περιγράφηκαν κατά την εξέταση των *Enterobacteriaceae* ενώ οι τύποι V και VI εμφανίστηκαν μόνο κατά την εξέταση του VFFN21.

Στους τύπους I και II, παρατηρήθηκε καλά ανεπτυγμένη βακτηριακή κηλίδα με τους συγκεκριμένους φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς της ομάδας A και B να μην έχουν ανασταλτική και παρεμποδιστική επίδραση στην ανάπτυξη του συγκεκριμένου ριζοβακτηρίου. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.25** για τα συγκεκριμένα φυτοπαθογόνα. Περιμετρικά της βακτηριακής κηλίδας παρατηρήθηκε ζώνη παρεμπόδισης διαφορετικής διαμέτρου η οποία θεωρήθηκε ότι είναι αποτέλεσμα της παρεμποδιστικής δράσης του VFFN21. Η παρατηρούμενη διαφοροποίηση του αποτυπώματος της παρεμποδιστικής δράσης του VFFN21 θα μπορούσε να αποτελεί ένδειξη του διαφορετικού τρόπου αλληλεπίδρασης ή του μηχανισμού δράσης ανά φυτοπαθογόνο ή του διαφορετικού βαθμού παρεμπόδισης.

Οι τύποι IV και V διακρίθηκαν όταν το VFFN21 εξετάστηκε σε τρυβλίο επιστρωμένο με Xcv8510 και *P. syringae* pv. tomato DC3000, *P. brasiliensis* 3751, αντίστοιχα. Τα φυτοπαθογόνα αυτά ανήκουν στην ομάδα Γ και είχαν χαρακτηριστεί προηγουμένως ως μη ευαίσθητα στην παρουσία του συγκεκριμένου ριζοβακτηρίου (**Εικόνα 3.47** και **Πίνακας 3.25**). Αυτό που διαφοροποιεί τους τύπους IV και V είναι η ικανότητα ανάπτυξης του VFFN21 ως κηλίδα. Στον τύπο IV, η ανάπτυξη της βακτηριακής κηλίδας δεν ήταν παρόμοια με εκείνη των τύπων I και III, ενώ στον τύπο V ήταν. Στον τύπο V η ανάπτυξη του VFFN21 επί των *P. syringae* pv. tomato DC3000, *P. brasiliensis* 3751 σε συνδυασμό με την αδυναμία εμφάνισης παρεμποδιστικής δράσης (**Εικόνα 3.47** και **Πίνακας 3.25**), ίσως οφείλεται στην ικανότητα συνύπαρξης των βακτηρίων αυτών στο ίδιο μέσο ανάπτυξης. Αντίθετα στον τύπο IV η μειωμένη ανάπτυξη του VFFN21 επί του Xcv8510 σε συνδυασμό με την αδυναμία εμφάνισης παρεμποδιστικής δράσης εναντίον του (**Εικόνα 3.47** και **Πίνακας 3.25**), ίσως οφείλεται στην έλλειψη παρεμποδιστικής δράσης έναντι του Xcv8510 ή στην εμφάνιση μειωμένης ανταγωνιστικής ικανότητας.



Εναπόθεση κηλίδας VFFN21	Επίστρωση με φυτοπαθογόνο βακτήριο/ ομάδα						
	<i>C. michiganensis</i> 4999 /A	<i>A. citrulli</i> 50556/B	<i>D. solani</i> IPO2222/A	Xcv 8510/Γ	<i>P. syringae</i> pv. phaseolicola 3121/A	<i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000/Γ	<i>P. brasiliensis</i> 3751/Γ
	+++ <sup>a</sup>	+++	+++	+ <sup>b</sup>	+++	+++	+++
πάνω όψη							
κάτω όψη							
Τύπος αποτυπώματος κηλίδας VFFN21	III	I	III	V	I	VI	VI
<sup>a</sup> “+++”: ανάπτυξη ριζοβακτηρίου VFFN21, <sup>b</sup> “+”: ασθενής ανάπτυξη ριζοβακτηρίου VFFN21							

Εικόνα 3.47: Παρουσίαση του αποτυπώματος βακτηριακής κηλίδας μεταξύ φυτοπαθογόνου βακτηρίου (βακτήριο επίστρωσης) και *Bacillus* sp. VFFN21 (βακτηριακή κηλίδα).

Βακτήρια που εμφάνισαν αντιβακτηριακή ιδιότητα εξετάστηκαν περαιτέρω, διερευνώντας το ενδεχόμενο η αντιβακτηριακή δράση να οφείλεται σε εξ' αποστάσεως μηχανισμό όπως για παράδειγμα της παραγωγής VOCs. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτή των επάλληλων και αναστροφών τρυβλίων, από όπου διαπιστώθηκε ότι τα βακτήρια που προηγουμένως είχαν «εξ' επαφής» αντιβακτηριακή δράση, εξ' αποστάσεως δεν εμφάνισαν την ιδιότητα αυτή. Σε ανάλογες περιπτώσεις που έχει παρατηρηθεί αντιβιοτική ή/και ανταγωνιστική δράση, η ιδιότητα αυτή αποδόθηκε στην παραγωγή πρωτεασών και λιπασών και όχι VOCs (Safara et al., 2022). Η αδυναμία εκδήλωσης αντιβακτηριακής δράσης εξ' αποστάσεως δεν αποκλείει το ενδεχόμενο τα υπό μελέτη βακτήρια να έχουν ικανότητα παραγωγής VOCs με αντιβακτηριακή δράση καθώς η σύνθεση τους είναι πολύπλοκη και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η σύσταση του θρεπτικού μέσου, το pH, ο αερισμός, το στάδιο ανάπτυξης της καλλιέργειας (Blom et al., 2011; Bailly & Weisskopf, 2012). Η σημαντικότητα των συνθηκών ανάπτυξης στην παραγωγή αντιβακτηριακών VOCs έχει αναφερθεί προηγουμένως στην περίπτωση παραγωγής της αντιβιοτικής πτητικής ένωσης, αμμωνίας όταν στο μέσο ανάπτυξης υπήρχε γλυκίνη (Avalos et al. 2020).

Με βάση τις βιοδοκιμές που έλαβαν χώρα στο πλαίσιο της μελέτης της αντιβακτηριακής δράσης των ενδοφυτικών ριζοβακτηρίων αναδείχθηκε η ανταγωνιστική και αντιβακτηριακή δράση των *Enterobacteriaceae* και του *Bacillus* sp. VFFN21. Αυτό δεν προκάλεσε έκπληξη καθώς στελέχη *Enterobacter* και *Bacillus* σε άλλες εργασίες έχουν δείξει *in vitro* ανταγωνιστική δράση π.χ. κατά των φυτοπαθογόνων *Xanthomonas campestris* και *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* και pv. *juglandis*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Acidovorax citrulli* και *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Monteiro et al., 2005; Fan et al., 2017; Adhikari et al., 2017; Albert et al., 2021; Maung et al., 2022). Σε διάφορες εργασίες η αντιμικροβιακή δράση έχει αποδοθεί είτε στην παρουσία του ίδιου του οργανισμού ως βακτηριακή καλλιέργεια, είτε στη δράση υπερκείμενου απουσία κυττάρων και πιο εξειδικευμένα στη δράση λιποπεπτιδίων όπως η σουρφακτίνη (surfactin) (Fan et al., 2017; Nikolić et al., 2019).

Από *in vitro* μελέτες ανταγωνισμού μεταξύ βακτηρίων είναι γνωστό ότι η διαφορά στην αποτελεσματικότητα οφείλεται σε αλλαγές της φύσης και της συγκέντρωσης των εκκρινόμενων μεταβολιτών όπως αντιβιοτικά (Defago & Haas 1990), λυτικά ένζυμα και σιδηροφόρα (Bakker et al. 1990). Όταν ο μηχανισμός άμυνας είναι «εξ' επαφής» εξαρτώμενος, οι μηχανισμοί που χρησιμοποιούνται είναι το σύστημα αναστολής εξ' επαφής (Contact dependent inhibition, CDI), τα εκκριτικά συστήματα Esx, 4 και 6, οι πρωτεΐνες WapA κ.α. (Peterson et al., 2020), με στενή

και ευρεία δράση σε σχέση με τα βακτήρια στόχους, ανά περίπτωση. Αυτή η άμεση επαφή κυττάρου –κυττάρου παίζει ρόλο στον ανταγωνισμό μεταξύ βακτηρίων (Aoki et al., 2010), αποτελώντας έναν ακόμη μηχανισμό δράσης των βακτηρίων πέρα από την έκκριση χημικών ουσιών και πεπτιδίων. Το σύστημα τοξίνης-αντιτοξίνης (Aoki et al., 2005) σχετίζεται με τον «εξ'επαφής» μηχανισμό ανταγωνισμού, γονίδια του οποίου (π.χ. γονίδια *cdi* και *rhs*) εντοπίζονται σε πολλά παθογόνα βακτήρια (Hayes et al., 2014). Το σύστημα αυτό είναι πολύ πιθανό να υπάρχει στα *Enterobacter* καθώς οι Beck et al. (2014) εντόπισαν το γονίδιο *cdiA* στο *Enterobacter cloacae*, η ύπαρξη του οποίου συνδέθηκε με τη μεταφορά τοξικής ριβοσωμικής RNAσης στα βακτήρια στόχους.

Επίσης έχει αναφερθεί ότι στελέχη *Bacillus* και *Enterobacter* στο πλαίσιο της ανάπτυξης μηχανισμών άμυνας επιστρατεύουν την παραγωγή βακτηριοσινών που δρουν θανατηφόρα για στενά συγγενικά στελέχη σε σχέση με το βακτηριακό παραγωγό. Αντιπροσωπευτικά αναφέρεται η παραγωγή της μεγασίνης (megacins) και κλοασίνης από το *Bacillus megaterium* και *Enterobacter cloacae*, αντίστοιχα (Cascales et al., 2007). Η παραγωγή βακτηριοσίνης εντοπίζεται και σε ριζόβια με χαρακτηριστική περίπτωση τα *Bradyrhizobium* (Tagg et al., 1976; Gross & Vidaver, 1978), ως μηχανισμός περισσότερο για την κυρίαρχη εγκατάσταση τους στα σχηματιζόμενα φυμάτια (Oresnik et al., 1999; Venter et al., 2001). Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη, αν και υπάρχουν ενδείξεις για «εξ'επαφής» μηχανισμό δράσης, δεν αποκλείεται το ενδεχόμενο υπό διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης τα εξεταζόμενα ριζοβακτήρια να παράγουν VOCs διαφορετικής σύνθεσης, συνεπώς και διαφορετικής δράσης. Ως εκ τούτου και δεδομένου της πολυπλοκότητας των συστημάτων ανταγωνισμού μεταξύ των βακτηρίων και της μεταξύ τους αντιβακτηριακής δράσης, θα πρέπει να διερευνηθεί μελλοντικά ο μηχανισμός αντιβακτηριακής δράσης του κάθε ριζοβακτηρίου.

**Πίνακας 3.26:** Καταγραφή της ικανότητας εμφάνισης παρεμποδιστικής δράσης ριζοβίων και μη ριζοβιακών ενδοφυτικών βακτηρίων έναντι φυτοπαθογόνων βακτηρίων.

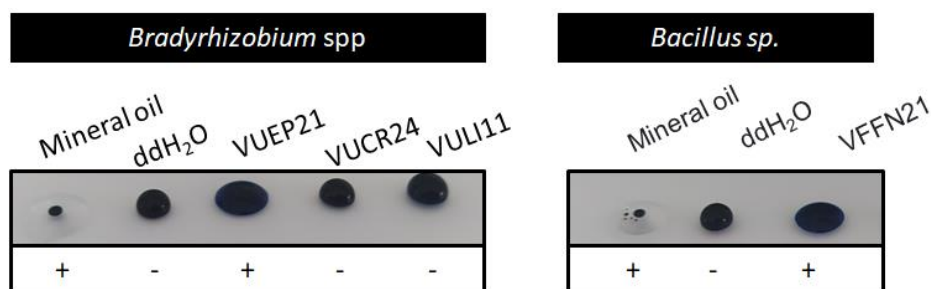
<b>Βακτηριακά Στελέχη</b>	<b>Φυτοπαθογόνα Βακτήρια</b>													
<b><i>Rhizobium</i></b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
VFCR2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VFCR3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VFLE5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VFIM1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VFLE1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VFEP63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VFEP162	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PVKA6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PVDO712	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PVTN21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PVTP1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PVKV3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PVMT26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b><i>Mesorhizobium</i></b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
TPCR2C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TPCR2D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TPCR2F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TPCR2G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TPCR2I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b><i>Bradyrhizobium</i></b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
VUEP21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VUCR24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VULI11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<b><i>Ensifer</i></b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
VUKA2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<b>Enterobacter</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
VFAT314	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C1.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C1.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C3.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Lelliottia</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
D2.4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Bacillus</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
VFFN21	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+

<sup>α</sup> '-': αδυναμία παρεμπόδισης ανάπτυξης φυτοπαθογόνου, <sup>β</sup> '+': παρεμπόδιση ανάπτυξης φυτοπαθογόνου .  
**1)** *P. syringae* pv. pisi race 3, **2)** *P. syringae* pv. phaseolicola 3121, **3)** *P. syringae* pv. tomato DC3000, **4)** *D. solani* IPO2222, **5)** *A. citrulli* AAC00-1, **6)** *A. citrulli* 50556, **7)** *A. citrulli* 1367, **8)** *X. campestris* pv. vesicatora (Xcv8510), **9)** *E. amylovora*, **10)** *P. brasiliensis* 3751, **11)** *P. brasiliensis* 3753, **12)** *Clavibacter michiganensis* subsp. michiganensis CFBP 4999, **13)** *Clavibacter* HMU 4521 και **14)** *Clavibacter* HMU 4998.

### 3.4.3.3) Παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ενώσεων από ριζόβια και μη ριζοβιακά ενδοφυτικά ριζοβακτήρια

Η ικανότητα έκκρισης παραγόμενων βιοεπιφανειοδραστικών ενώσεων από 27 ριζόβια και 6 μη ριζοβιακά ενδοφυτικά ριζοβακτήρια, εξετάστηκε μέσω της μεθόδου κατάρρευσης σταγόνας, μετά από 2 ημέρες επώασης σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης TY. Η τεχνική αυτή έτσι όπως υλοποιήθηκε επέτρεψε την κατηγοριοποίηση των 33 υπο μελέτη βακτηρίων σε δυο ομάδες με βάση την παραγωγή ή όχι βιοεπιφανειοδραστικών ενώσεων. Στην 1<sup>η</sup> ομάδα, των μη παραγωγών, εντάχθηκαν 31 βακτήρια τα οποία περιελάμβαναν όλα τα *Rhizobium*, τα *Mesorhizobium*, το *Ensifer* VUKA2, δύο από τα τρία *Bradyrhizobium* (VUCR24, VULI11) και τα πέντε *Enterobacteriaceae*. Στη 2<sup>η</sup> ομάδα, των παραγωγών, εντάχθηκαν μόνο δύο βακτήρια, το *Bradyrhizobium* sp. VUEP21 και ο *Bacillus* sp. VFFN21. Στην **Εικόνα 3.48** αποτυπώνεται ξεκάθαρα η ικανότητα κατάρρευσης σταγόνας από τα *Bradyrhizobium* sp. VUEP21 και VFFN21, εν' αντιθέσει με τα άλλα δυο *Bradyrhizobium* sp. VUCR24, VULI11. Η εικόνα των τελευταίων δυο βακτηρίων είναι αντιπροσωπευτική της εικόνας της σταγόνας από την ομάδα των μη παραγωγών βιοεπιφανειοδραστικών ενώσεων. Με «+» σημειώνεται η κατάρρευση σταγόνας στο θετικό μάρτυρα (ορυκτό έλαιο, mineral oil) και στους παραγωγούς και με «-», η σταγόνα με συνοχή που δεν έχει καταρρεύσει στον αρνητικό μάρτυρα (ddH<sub>2</sub>O) και στους μη παραγωγούς.



**Εικόνα 3.48:** Παραγωγή βιοεπιφανειοδραστικών ενώσεων με την τεχνική της κατάρρευσης σταγόνας.

Παραγωγή επιφανειοδραστικών ενώσεων έχει αναφερθεί σε στελέχη *Bradyrhizobium*, τα οποία είτε παρήγαγαν βιογαλακτωματοποιητές (Mendes Lopes, 2014) είτε την ένωση rhizoleucinoside, που έχει ως βάση το ραμνολιπίδιο, μια ένωση με αντιμικροβιακή και εντομοκτόνα δράση (Chen et al., 2016). Παρομοίως, εντοπισμός επιφανειοδραστικών έχει αναφερθεί σε στελέχη *Bacillus* spp. (Gayathiri et al., 2022) καθώς και σε στελέχη *Bacillus halotolerans* (Tsalgatidou et al., 2022). Τα επιφανειοδραστικά που έχουν εντοπιστεί σε στελέχη αυτού του είδους είναι συνήθως λιποπεπτίδια με αντιμικροβιακό χαρακτήρα (Torres et al., 2016), όπως iturin, surfactin και fengycin (Kefi et al., 2015; Sendi et al., 2020; Li et al., 2022). Το

γεγονός ότι τα στελέχη VUEP21 και VFFN21 είναι παραγωγοί επιφανειοδραστικών, είναι σημαντικό καθώς τέτοιες ενώσεις έχουν ικανότητα ενίσχυσης της ομαδικής κίνησης (Roongsawang et al., 2002; Jaques, 2011), δράση αντιβιοτικού, ικανότητα αντιμικροβιακού και αντι-ιικού παράγοντα, ικανότητα αναστολής του σχηματισμού βιοϋμενίου και ικανότητα διάσπασης πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs) (Das et al., 2008; Rivardo et al., 2009; Plaza et al., 2013; Huang et al., 2006, 2011).

Το γεγονός ότι στις υπόλοιπες απομονώσεις δεν παρατηρήθηκε κατάρρευση σταγόνας δεν αποκλείει το ενδεχόμενο να παράγουν επιφανειοδραστικές ουσίες. Για τη διαλεύκανση αυτού του σημείου, οι απομονώσεις που χαρακτηρίστηκαν ως μη παραγωγοί με βάση τις εξεταζόμενες συνθήκες θα μπορούσαν να υποβληθούν σε περαιτέρω μελέτη χρησιμοποιώντας άλλες τεχνικές, όπως η μέθοδος ελαιο-ψεκασμού (atomized oil assay) (Burch et al., 2010) και η βιοδοκιμή για τον εντοπισμό αιμολυτικής δράσης (Youssef et al., 2004). Επιπλέον, για να θεωρηθεί ολοκληρωμένη μια μελέτη για την ανίχνευση βιοεπιφανειοδραστικών παραγωγών θα πρέπει να αξιολογηθεί τόσο η εξάπλωση ελαίου (Mulligan et al., 1984) όσο και ο δείκτης γαλακτωματοποίησης (Bodour & Maier, 2003). Ακόμα, η ικανότητα παραγωγής τέτοιων ενώσεων θα μπορούσε επίσης να εξεταστεί έμμεσα μέσω της ομαδικής κίνησης καθώς η ιδιότητα αυτή απαιτεί AHL-εξαρτοσυντιθέμενες βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες. Για τον εντοπισμό επιφανειοδραστικών AHL συνιστάται η μέθοδος ελαιο-ψεκασμού βάση της οποίας εντοπίστηκαν AHL μακράς αλυσίδας σε *Rhizobium* (Burch et al., 2011). Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι εκτός από την παραγωγή εξωκυτταρικών βιοεπιφανειοδραστικών ενώσεων, ορισμένα βακτήρια π.χ. βακτήρια γαλακτικού οξέος παράγουν κυτταρικά-συνδεδεμένα-βιοεπιφανειοδραστικά με διαφορετικές ιδιότητες το καθένα (Vecino et al., 2015; Sharma et al., 2015; Cornea et al., 2016; Vera et al., 2017). Συνεπώς, δεν αποκλείεται το ενδεχόμενο οι απομονώσεις που δεν είχαν ικανότητα κατάρρευσης σταγόνας να παράγουν επιφανειοδραστικές ενώσεις επί της κυτταρικής μεμβράνης, θεωρώντας όλο το κύτταρο ως βιοεπιφανειοδραστικό παράγοντα.

## ΠΡΟΣΘΕΤΟ ΥΛΙΚΟ

<b>Πίνακας Σ3.1:</b> Διερεύνηση ικανότητας διαλυτοποίησης του φωσφόρου από διάφορα μη ριζοβιακά ενδοφυτικά ριζοβακτήρια.			
<b>Βακτήρια</b>	<b>Χρώμα</b>	<b>Διαλυτοποίηση φωσφόρου</b>	<b>PSI</b>
FXS11.30	κίτρινο	-	<2
FXS11.37	κίτρινο	-	<2
FXS11.33	κίτρινο	-	<2
FXS10.27	κίτρινο	-	<2
FXS8.23	κίτρινο	-	<2
EC2F	κίτρινο	-	<2
EC1A	κίτρινο	+	2,5
VFFN7	κίτρινο	-	<2
VFAT10	κίτρινο	+	2,2



**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΡΙΖΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΗΝ ΠΡΟΩΘΗΣΗ ΤΗΣ  
ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΕ ΜΗ ΨΥΧΑΝΘΗ ΦΥΤΑ ΚΑΙ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΑΠΟ  
ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ (*in planta* assays)**

#### 4.1) ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα βακτήρια που έχουν χρησιμοποιηθεί περισσότερο σε μελέτες εμβολιασμού, περιλαμβάνουν διαφορετικά γένη αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων όπως *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Pseudomonas* και *Bacillus* (Bashan et al., 2014), ενώ τα τελευταία χρόνια, ενδιαφέρον παρουσιάζει η χρήση των *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter*, *Streptomyces*, *Erwinia*, *Rhodococcus*, *Azotobacter*, *Gluconacetobacter*, *Klebsiella* και *Pantoea*, για τη βελτίωση της ανάπτυξης των φυτών (Souza et al., 2015; dos Santos et al., 2017).

Διάφορα PGPB έχουν χρησιμοποιηθεί ως βιοδιεγέρτες στην τομάτα, όπως το *Enterobacter* 15S και το *Enterobacter* sp. CPSB49, συμβάλλοντας στην προώθηση της ανάπτυξης (Zuluaga et al., 2021), ακόμα και παρουσία βαρέων μετάλλων, όπως το χρώμιο (Gurta et al., 2020). Στην τομάτα, αύξηση της φυτικής βιομάζας έχει σημειωθεί από στελέχη *Bacillus*, όπως τα *B. amyloliquefaciens* D29, *B. amyloliquefaciens* Am1, *B. subtilis* D16, *B. methylotrophicus* H8, *B. velezensis* C2 και *B. circulans* CB7 (Almoneafy et al., 2014; Mehta et al., 2015; Dhoub et al., 2019). Προώθηση της ανάπτυξης φυτών έχει παρατηρηθεί και από το στέλεχος *Bacillus licheniformis* FMCH001 τόσο στην τομάτα όσο και στο καλαμπόκι ακόμα και υπό συνθήκες ξηρασίας (Akhtar et al., 2020; de Nunes et al., 2022). Εκτός από την ξηρασία, η αλατότητα αποτελεί έναν ακόμα παράγοντα περιορισμού της φυτικής ανάπτυξης. Ο παράγοντας αυτός μπορεί να αντιμετωπιστεί με τη χρήση βακτηρίων, όπως τα βακτήρια *Bacillus halotolerans* MSR-H4 και *Lelliottia amnigena* MSR-M49 ευνοώντας την ανάπτυξη του σιταριού (*Triticum aestivum*) (Elakhdar et al., 2020).

Υπό συνθήκες βιοτικής καταπόνησης, φυτά εμβολιασμένα με ωφέλιμα βακτήρια είναι σε θέση όχι μόνο να αντιμετωπίζουν φυτοπαθογόνους οργανισμούς αλλά και να προωθούν την ανάπτυξη των φυτών. Για παράδειγμα, τα στελέχη *Bacillus halotolerans* Hil4 (Thomludi et al., 2021) και *Bacillus halotolerans* Cal.l.30 (Tsalgatidou et al., 2022) έχουν αντιμυκητιακή δράση κατά του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea*, περιορίζοντας μετασυσπαστικά την εξάπλωση της γκρι μούχλας σε φρούτα τομάτας και σε ρόγες σταφυλιού. Στελέχη όπως τα *Bacillus safensis* SJ4, *Bacillus nakamurai*, *Bacillus pseudomycooides*, *Bacillus proteolyticus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilis* και *Bacillus subtilis* αποτελούν αντιπροσωπευτικά παραδείγματα βακτηρίων με ανταγωνιστική δράση κατά του *Botrytis cinerea* συμβάλλοντας είτε στην ανάπτυξη (Foughalia et al., 2022) είτε παρέχοντας προστασία στον καρπό φυτών όπως η τομάτα και η φράουλα (Donmez et al., 2011; Chaouachi et al., 2021). Για την αντιμετώπιση του *Botrytis cinerea* στην τομάτα έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία βακτήρια όπως τα *Streptomyces ahyscopicus* var. wuyiensis, *Streptomyces globisporus* JK-1, *Pseudomonas* QBA5, *Pseudomonas aeruginosa* CQ-40, *Enterobacter asburiae*

και *Enterobacter cloacae* (Li et al., 2012; Ge et al., 2015; Gao et al., 2018; Wang et al., 2020; Chaouachi et al., 2021). Για τη βιολογική αντιμετώπιση του *Botrytis cinerea* στη μελιτζάνα, φυτό της οικογένειας *Solanaceae* όπως και η τομάτα, η χρήση στελεχών *Bacillus amyloliquefaciens* (Akca & Tozlu, 2021), *Bacillus megaterium* TV-87A (Gökçe & Kotan, 2016), *Pseudomonas aeruginosa* (Çiftçi & Altınok, 2019) έχει θετικά αποτελέσματα. Δράση βιολογικού παράγοντα ελέγχου μπορούν να ασκούν και ορισμένα στελέχη *Enterobacter* έναντι των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Pythium* spp, *Phytophthora capsici* και *Colletotrichum musae*, για το μετριασμό των συμπτωμάτων ασθενειών που αυτά προκαλούν σε αγγούρι, αρακά, παντζάρι, πιπεριά και μπανάνα (Hadar et al., 1983; Park et al., 1989; Khleekorn et al., 2015).

Η χρήση βακτηρίων ως βιολογικοί παράγοντες ελέγχου έχει εφαρμοστεί και στην αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων βακτηρίων. Χαρακτηριστική περίπτωση της ωφέλιμης δράσης τους αποτελεί η εφαρμογή τους για την αντιμετώπιση του *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) ενός από τα κυριότερα φυτοπαθογόνα βακτήρια της τομάτας (Smith, 1910; Volcani, 1985; Kleitman et al., 2008). Για παράδειγμα, η χρήση διαφόρων στελεχών όπως τα *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp. K203, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Azotobacter chroococcum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas* sp. 23S, *Pseudomonas aeruginosa* FG106 (Utkhede & Koch, 2004; Takishita et al., 2018; Abo-Elyousr et al., 2019; Kolomiiets et al., 2019; Solano-Alvarez et al., 2021; Ghadamgahi et al., 2022; Jang et al., 2022) έχει δείξει θετικά αποτελέσματα στη μείωση του ποσοστού μόλυνσης και συμπτωμάτων του Cmm.

#### 4.2) ΣΤΟΧΟΙ ΕΡΕΥΝΑΣ

➤ Η διερεύνηση της ικανότητας επιλεγμένων ριζοβακτηρίων να προωθούν την ανάπτυξη της τομάτας α) σε κανονικές συνθήκες και β) παρουσία του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) εκτιμώντας παράλληλα τη σοβαρότητα της ασθένειας των μολυσμένων φυτών.

➤ Η διερεύνηση της ικανότητας επιλεγμένων ριζοβακτηρίων να παρεμβαίνουν στην πρόκληση τεφράς σήψης (σήψη λαιμού ή έλκος) από το φυτοπαθογόνο μύκητα *Botrytis cinerea*, σε νεαρά φυτάρια τομάτας και μελιτζάνας.

➤ Η διερεύνηση της ικανότητας επιλεγμένων ριζοβακτηρίων να παρεμποδίζουν την πρόκληση μαλακής σήψης σε κονδύλους πατάτας και καρότου προκαλούμενη από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Dickey solani* IPO 2222<sup>T</sup>.

### 4.3) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 4.3.1) Υλικά

- Φυτάρια τομάτας (*Solanum lycopersicum* cv. belladonna) με δύο πραγματικά φύλλα (2 εβδομάδων) ανεπτυγμένα σε δίσκο σποράς (ευγενική χορηγία της εταιρίας AGRIS A.E., Επιχειρησιακή Μονάδα Κρήτης – Ιεράπετρας).
- Φυτάρια μελιτζάνας (*Solanum melongena* 'Black Beauty') με δύο πραγματικά φύλλα (2 εβδομάδων) ανεπτυγμένα σε δίσκο σποράς.
- Κόνδυλοι πατάτας και καρότου.
- Βιολογικοί παράγοντες ελέγχου (Β.Π.Ε): τα ριζοβακτήρια VFFN21, VFAT314, C1.2, C1.5, C3.1 και D2.4.
- Μολυσματικοί παράγοντες: ο φυτοπαθογόνος μύκητας *Botrytis cinerea* (BC) και τα φυτοπαθογόνα βακτήρια *Dickey solani* IPO 2222<sup>T</sup> (*Dickey solani*) και *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm).

#### 4.3.2) Συνθήκες ανάπτυξης/εκτέλεσης πειραμάτων

Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών σε συνθήκες: 70% υγρασία, 22±2°C, 16 ώρες φως, 8 ώρες σκοτάδι, στις εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Βιολογικών και Βιοτεχνολογικών Εφαρμογών (Ε.Β.Β.Ε.), Τμήματος Γεωπονίας, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Ελληνικού Μεσογειακού Πανεπιστημίου (ΕΛΜΕΠΑ). Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε: φυτόχωμα : περλίτης: βερμικουλίτης (σε αναλογία 3:2:1) και ως μέσο ενυδάτωσης νερό βρύσης ανά δύο-τρεις ημέρες και το υγρό θρεπτικό Fahraeus μια φορά την εβδομάδα.

##### 4.3.2.1) Μελέτη της ικανότητας επιλεγμένων ριζοβακτηρίων να προωθούν την ανάπτυξη της τομάτας

Για τη μελέτη της ικανότητας των ριζοβακτηρίων να προωθούν την ανάπτυξη της τομάτας, η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- Μεταφύτευση φυταρίων από το δίσκο σποράς σε μικρά γλαστράκια με υπόστρωμα. Μετά από 4 ημέρες έγινε εμβολιασμός του συστήματος (υπόστρωμα-φυτό) με 50 ml βακτηριακού εναιωρήματος OD<sub>600nm</sub>=0,1-0,2. Μετά από τις επόμενες 2 ημέρες εφαρμόστηκε επαναληπτικός εμβολιασμός 50 ml βακτηριακού εναιωρήματος OD<sub>600nm</sub>=0,1-0,2, διαβρέχοντας και πάλι το ριζικό σύστημα της τομάτας.
- ο Για την προετοιμασία του βακτηριακού εναιωρήματος, σε υγρό θρεπτικό μέσο ΤΥ των 5 ml έγινε επαναιώρηση μονής αποικίας και επώαση για 20 ώρες, στους 28±2°C και 180 rpm/min (προκαλλιέργεια).

- Στη συνέχεια έγινε μεταφορά 1 ml προκαλλιέργειας σε κωνική φιάλη των 50 ml με φρέσκο θρεπτικό TY και επώαση στους 30°C για 24 ώρες.
- Φυγοκέντρηση της κάθε καλλιέργειας στα 8.000 x g στους 4°C για 15 λεπτά και επαναδιάλυση του βακτηριακού ιζήματος σε νερό βρύσης.
- Τέλος έγινε κανονικοποίηση ώστε 50 ml ριζοβακτηριακού εναιωρήματος να αντιστοιχούν σε OD<sub>600nm</sub>=0,1-0,2.

Η δειγματοληψία έλαβε χώρα στις 35 ημέρες μετά από τον πρώτο βακτηριακό εμβολιασμό. Η επίδραση του εμβολιασμού στην ανάπτυξη των φυταρίων τομάτας έγινε λαμβάνοντας υπόψη βασικά αγρονομικά χαρακτηριστικά όπως το μήκος βλαστού-ρίζας και το νωπό/ξηρό βάρος βλαστού-ρίζας σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα ανάπτυξης (φυτάρια μη εμβολιασμένα). Η συγκεκριμένη μελέτη έγινε στα πλαίσια προκαταρκτικού πειράματος και πραγματοποιήθηκε μια φορά χρησιμοποιώντας 5 φυτά ανά μεταχείριση.

#### **4.3.2.2) Εφαρμογή ριζοβακτηρίων για τη βιολογική προστασία φυταρίων τομάτας και μελιτζάνας από το φυτοπαθογόνο μύκητα *Botrytis cinerea***

Για τη διερεύνηση της ικανότητας των ριζοβακτηρίων να παρεμποδίζουν την πρόκληση τεφράς σήψης (σήψη λαιμού ή έλκος) από το φυτοπαθογόνο μύκητα *Botrytis cinerea*, χρησιμοποιήθηκαν νεαρά φυτάρια τομάτας (*Solanum lycopersicum* cv. Belladonna) και μελιτζάνας (*Solanum melongena* 'Black Beauty') με δυο πραγματικά φύλλα (2 εβδομάδων) ανεπτυγμένα σε δίσκο σποράς. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε χωρίστηκε σε τρία στάδια. Το πρώτο ήταν ίδιο με αυτό στο **Εδάφιο 4.3.2.1** και παράλληλα με αυτό έλαβε χώρα το 2<sup>ο</sup> στάδιο, ως εξής:

- Ανάπτυξη φυτοπαθογόνου μύκητα σε στερεή καλλιέργεια PDA για συνολικά 10 ημέρες.
- Εμβολιασμός υγρού θρεπτικού μέσου πατάτας-δεξτρόζης (Potato Dextrose Broth, PDBroth) με κομμένο μυκηλιακό δίσκο διαμέτρου 5 mm και επώαση για 7 ημέρες, στους 24°C στα 120 rpm/min.
- Φυγοκέντρηση της καλλιέργειας στα 8.000xg στους 4°C για 15 λεπτά, απομάκρυνση του υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε νερό βρύσης.
- Μέτρηση του αριθμού των σπορίων με τη χρήση αιματοκυτταρόμετρου και προσαρμογή της συγκέντρωσής τους σε 10<sup>6</sup> σπόρια/ml.

Μετά από 7 ημέρες από τον 1<sup>ο</sup> εμβολιασμό με τα ριζοβακτήρια, έλαβε χώρα το 3<sup>ο</sup> στάδιο:

- Πρόκληση πληγής στο ριζικό σύστημα των φυταρίων τομάτας και μελιτζάνας.
- Μόλυνση των φυτών με διαβροχή του ριζικού συστήματος του φυτού και του υποστρώματος με 30 ml εναιωρήματος σπορίων μύκητα.

Η ανάπτυξη των φυτών σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών στις συνθήκες που αναφέρονται στο **Εδάφιο 4.3.2**. Η διαδικασία ολοκληρώθηκε 7-14 ημέρες μετά από τη μόλυνση των φυταρίων από το *Botrytis cinerea* και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ποσοστό επί τοις % θνησιμότητας σε σχέση με το θετικό μάρτυρα μόλυνσης, ο οποίος είχε μολυνθεί με *Botrytis cinerea* αλλά δεν είχε γίνει εμβολιασμός με ριζοβακτήριο. Ως αρνητικοί μάρτυρες μόλυνσης χρησιμοποιήθηκαν φυτά στα οποία δεν είχε γίνει μόλυνση με μύκητα, ενώ είχαν ή δεν είχαν εμβολιαστεί με ριζοβακτήρια. Η συγκεκριμένη μελέτη έγινε στα πλαίσια προκαταρκτικού πειράματος, πραγματοποιήθηκε μια φορά χρησιμοποιώντας ανά μεταχείριση 5 και 10 φυτά τομάτας και μελιτζάνας, αντίστοιχα.

#### **4.3.2.3) Εφαρμογή ριζοβακτηρίων για τη βιολογική προστασία κονδύλων πατάτας και καρότου από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *D. solani* IPO 2222<sup>T</sup>**

Για τη διερεύνηση της ικανότητας έξι επιλεγμένων ριζοβακτηρίων να παρεμποδίζουν την πρόκληση μαλακής σήψης από το *D. solani* IPO 2222<sup>T</sup>, χρησιμοποιήθηκαν κόνδυλοι πατάτας (*Solanum tuberosum*) και καρότου (*Daucus carota*), κομμένοι σε στρογγυλά τεμάχια. Επιπλέον πριν τη διεξαγωγή της εξεταζόμενης βιοδοκιμής προετοιμάστηκαν βακτηριακές καλλιέργειες ριζοβακτηρίων και φυτοπαθογόνου βακτηρίου, ως εξής:

- Από μονή αποικία ριζοβακτηρίων και *D. solani* IPO 2222<sup>T</sup> έγινε εμβολιασμός υγρού θρεπτικού μέσου TY όγκου 5 ml και επώαση για 24 ώρες, στους 28±2°C, στα 180 rpm/min (προκαλλιέργεια).
- Η κάθε καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε στα 8.000xg στους 4°C για 15 λεπτά και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε αποστειρωμένο dH<sub>2</sub>O.
- Μίγμα βακτηριακού εναιωρήματος ριζοβακτηρίου- *D. solani* IPO 2222<sup>T</sup> αναλογίας 100:1 παρασκευάστηκε σε 10 μl. Συγκεκριμένα, σε 10 μl το OD<sub>600nm</sub> του ριζοβακτηρίου και του *D. solani* IPO 2222<sup>T</sup> ήταν 1,0 και 0,01, αντίστοιχα. Τέλος, παρασκευάστηκε διάλυμα με αποστειρωμένο dH<sub>2</sub>O (αρνητικός μάρτυρας) και μεμονωμένα βακτηριακά εναιωρήματα ριζοβακτηρίου και *D. solani* IPO 2222<sup>T</sup>, όπου σε 10 μl το OD<sub>600nm</sub> του ριζοβακτηρίου ήταν 1,0 (αρνητικός μάρτυρας) και το OD<sub>600nm</sub> του *D. solani* IPO 2222<sup>T</sup> ήταν 0,01 (θετικός μάρτυρας).

Η διαδικασία μόλυνσης των κονδύλων πατάτας και καρότου ακολουθήθηκε ως εξής (Torres et al., 2016; Vega et al., 2020):

- Πλύσιμο κονδύλων πατάτας και καρότου με νερό βρύσης.
- Επιφανειακή απολύμανση των κονδύλων αρχικά με υδατικό διάλυμα εμπορικής χλωρίνης περιεκτικότητας 1% (v/v) και στη συνέχεια με 70% (v/v) αιθανόλη. Τέλος οι κόνδυλοι εκπλύθηκαν με αποστειρωμένο dH<sub>2</sub>O.

- Οι κόνδυλοι πατάτας και καρότου κόπηκαν σε τεμάχια (πλάτους 0,5 εκ.) υπό ασηπτικές συνθήκες και τοποθετήθηκαν σε επιφανειακά αποστειρωμένα πλαστικά δοχεία.
- Με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα προκλήθηκαν πληγές στο κέντρο του κάθε τεμαχίου για τη διευκόλυνση της μόλυνσης.
- Ανά μεταχείριση, στο σημείο πρόκλησης πληγών έγινε τοποθέτηση κηλίδας όγκου 10 μl από μίγμα βακτηριακού εναιωρήματος, 10 μl από τους αρνητικούς μάρτυρες, 10 μl από το θετικό μάρτυρα και κάλυψη του δοχείου με το καπάκι του.

Μετά από 24–48 ώρες επώασης στους  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ , έγινε παρατήρηση και υπολογισμός της επιφάνειας της έκτασης της προκαλούμενης αλλοίωσης - σήψης με τη χρήση του προγράμματος ImageJ (Schneider et al., 2012). Η σύγκριση έγινε χρησιμοποιώντας αρνητικό και θετικό μάρτυρα και η διαδικασία επαναλήφθηκε συνολικά 3 φορές, χρησιμοποιώντας 3 τεμάχια/μεταχείριση.

#### **4.3.2.4) Εφαρμογή ριζοβακτηρίων για τη βιολογική προστασία φυταρίων τομάτας από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* CFBP 4999<sup>T</sup> (Cmm)**

Για τη διερεύνηση της ικανότητας των ριζοβακτηρίων να παρεμβαίνουν στην πρόκληση κορυνοβακτηριώσης ή βακτηριακού έλκους από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* CFBP 4999<sup>T</sup>, χρησιμοποιήθηκαν νεαρά φυτάρια τομάτας (*Solanum lycopersicum* cv. Belladonna) με δυο πραγματικά φύλλα (2 εβδομάδων) ανεπτυγμένα σε δίσκο σποράς. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε πραγματοποιήθηκε σε δυο στάδια. Το 1<sup>ο</sup> ήταν ίδιο με αυτό στο **Εδάφιο 4.3.2.1** και το 2<sup>ο</sup> στάδιο είχε σχέση με τη μόλυνση των φυταρίων με Cmm και η εφαρμογή προσαρμόστηκε στις ιδιαιτερότητες του συγκεκριμένου μολυσματικού παράγοντα. Επτά ημέρες μετά τον εμβολιασμό των φυταρίων με ριζοβακτήρια, προκλήθηκε πληγή στο στέλεχος του κάθε φυτού με μεταλλική βελόνα πολλαπλής χρήσης. Επάνω στην πληγή έγινε τοποθέτηση κηλίδας 10 μl με  $\text{OD}_{600\text{nm}}=0,1$ . Το πείραμα διήρκεσε 5 εβδομάδες παρατηρώντας και καταγράφοντας την πορεία της ασθένειας σε σχέση με το θετικό μάρτυρα μόλυνσης. Ως θετικός μάρτυρας θεωρήθηκαν οι μεταχειρίσεις στις οποίες είχε γίνει μόλυνση μόνο με Cmm χωρίς να προηγηθεί εμβολιασμός με ριζοβακτήριο.

Η επίδραση στην ανάπτυξη των φυταρίων τομάτας λόγω μόλυνσης μόνο με Cmm και του συνεμβολιασμού ριζοβακτηρίων-Cmm, αξιολογήθηκε λαμβάνοντας υπόψη βασικά αγρονομικά χαρακτηριστικά όπως το μήκος βλαστού-ρίζας και το νωπό/ ξηρό βάρος βλαστού-ρίζας σε σχέση με το θετικό μάρτυρα μόλυνσης (φυτάρια μόνο με Cmm). Επιπλέον υπολογίστηκε η σοβαρότητα της ασθένειας και ορίστηκε κλίμακα με βάση τον αριθμό προσβεβλημένων φύλλων. Από 1-4 ορίστηκε η προσβολή ενός έως τεσσάρων φύλλων κατά αναλογία, ενώ ως 5 ορίστηκε η προσβολή πέντε φύλλων και πάνω (de León et al., 2008; Ghadamgahi et al., 2022).

Η συγκεκριμένη μελέτη έγινε στα πλαίσια προκαταρκτικού πειράματος και πραγματοποιήθηκε μια φορά χρησιμοποιώντας 5 φυτά ανά μεταχείριση.

#### 4.3.3) Εκτίμηση πορείας ασθένειας

Για τον υπολογισμό της σοβαρότητας της ασθένειας προερχόμενη είτε από το μύκητα *Botrytis cinerea* (τεφρά σήψη) είτε από το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* CFBP 4999<sup>T</sup> (βακτηριακό έλκος), ακολουθήθηκε το παρακάτω τυπολόγιο:

- Ποσοστό σοβαρότητας ασθένειας (Disease severity ή infection index, DSI) (Lu G. et al., 2008):

$$DSI = \frac{\text{Άθροισμα βαθμονόμησης ασθένειας των παρατηρούμενων φυτών ανά μεταχείριση}}{\text{Αριθμός επαναλήψεων * τη μέγιστη τιμή κλίμακας}} * 100$$

Το άθροισμα βαθμονόμησης ασθένειας αποτελεί το άθροισμα των γινομένων του αριθμού των φυτών επί την τιμή κλίμακας ασθένειας. Υπενθυμίζεται ότι η τιμή κλίμακας ορίστηκε με βάση τον αριθμό προσβεβλημένων φύλλων ανά φυτό ανά μεταχείριση.

- Ποσοστό θνησιμότητας (%) =  
$$\frac{\text{ο αριθμός νεκρών φυτών} * 100}{\text{συνολικός αριθμός φυτών ανά μεταχείριση}}$$
- Περιοχή κάτω από την καμπύλη προόδου της ασθένειας (Area under the disease progress curve, AUDPC) (Madden et al., 2007):

$$AUDPC = \sum_{i=1}^{n-1} \left( \frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

Όπου:  $y_i$ , η εκτίμηση της ασθένειας (DSI) στην  $i^{\text{th}}$  παρατήρηση;  $t_i$ , ο χρόνος (σε ημέρες) στην  $i^{\text{th}}$  παρατήρηση και  $n$ , ο αριθμός αριθμός των υπολογιζόμενων AUDPC ανά  $i^{\text{th}}$  παρατήρηση.

#### 4.3.4) Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων του κεφαλαίου πραγματοποιήθηκε με τη συνδυαστική χρήση των προγραμμάτων λογιστικών φύλλων Microsoft Excel και στατιστικής ανάλυσης SPSS v.26.0. Πριν από την πραγματοποίηση οποιασδήποτε στατιστικής ανάλυσης, έγινε έλεγχος της κανονικότητας (Normality) των δειγμάτων με την πραγματοποίηση του τεστ των Shapiro- Wilk καθώς και έλεγχος ισότητας των διακυμάνσεων των δειγμάτων (τεστ ομοιογένειας, homogeneity test) μέσω του τεστ Levene. Σε δεδομένα δειγμάτων που ακολουθούν κανονική κατανομή και ταυτόχρονα παρουσιάζουν ομοιογένεια, πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης (Analysis Of Variance, ANOVA) κατά έναν

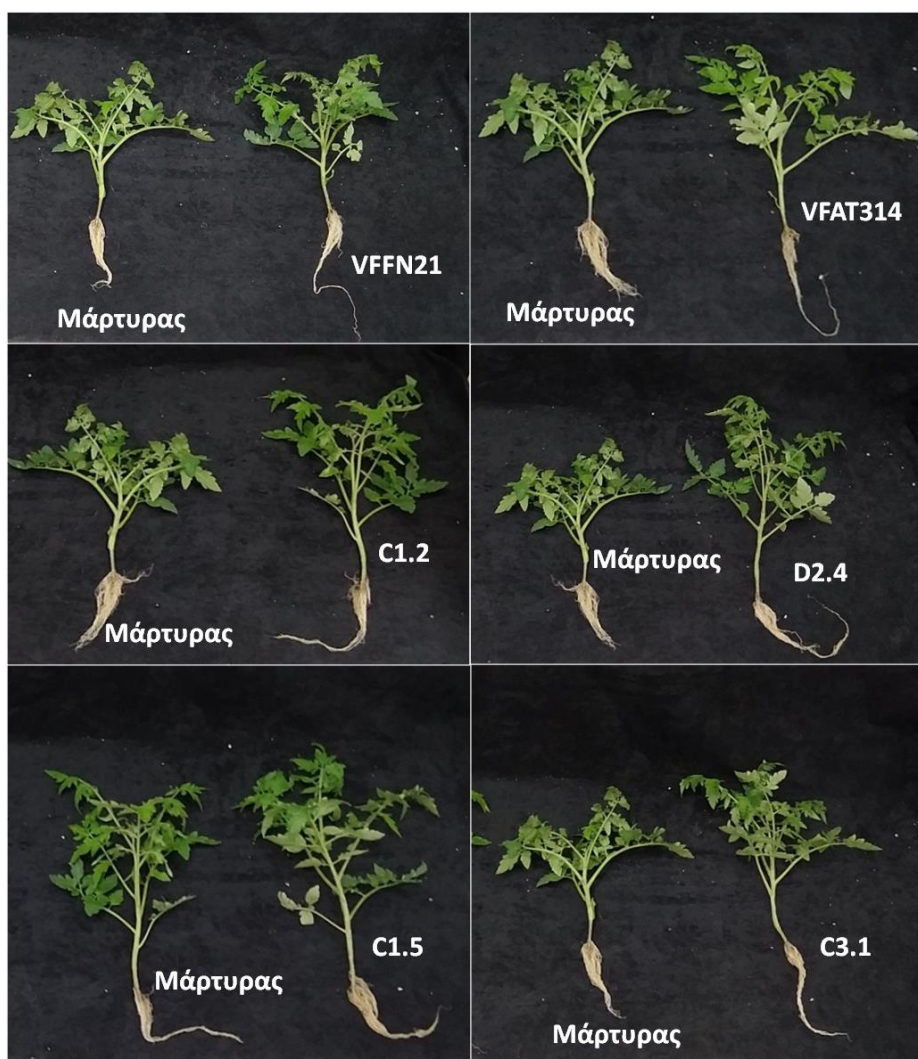


παράγοντα (One way). Για τον έλεγχο σημαντικότητας μεταξύ των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε: 1) t-test για τον έλεγχο της διαφοράς δυο μέσων από ανεξάρτητα δείγματα και 2) παραμετρικό τεστ πολλαπλών συγκρίσεων LSD ( $p \leq 0,05$ ) για την ανάδειξη των στατιστικά σημαντικών διαφορών του μέσου όρου μεταξύ όλων των δειγμάτων. Στην περίπτωση που οι προϋποθέσεις της κανονικότητας παραβιάστηκαν πραγματοποιήθηκε το μη παραμετρικό τεστ πολλαπλών συγκρίσεων Kruskal–Wallis.

#### 4.4) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

##### 4.4.1) Έλεγχος προώθησης της ανάπτυξης φυτών τομάτας μετά από εφαρμογή ριζοβακτηρίων

Η ικανότητα έξι επιλεγμένων ριζοβακτηρίων (VFFN21, VFAT314, C1.2, C1.5, C3.1 και D2.4) να προωθούν την ανάπτυξη φυταρίων τομάτας, αξιολογήθηκε την 35<sup>η</sup> ημέρα από τον εμβολιασμό τους με ριζοβακτήρια, κάνοντας αρχικά μακροσκοπική εκτίμηση της επίδρασης των παραπάνω βακτηρίων στην ανάπτυξη των φυταρίων τομάτας και λήψη φωτογραφιών. Η **Εικόνα 4.1** είναι ενδεικτική της ανάπτυξης των φυτών, απουσία και παρουσία εμβολιασμού, ενώ η αξιολόγηση της ικανότητας των έξι ριζοβακτηρίων βασίστηκε στη μελέτη αγρονομικών χαρακτηριστικών, όπως το μήκος βλαστού και ρίζας καθώς και η νωπή/ξηρή βιομάζα των δύο παραπάνω τμημάτων του φυτού (**Πίνακας 4.1, Εικόνα 4.1**).



**Εικόνα 4.1:** Φυτάρια τομάτας 35 ημερών μετά από εμβολιασμό με ενδοφυτικά βακτήρια (VFFN21, VFAT314, C1.2, C1.5, C3.1, D2.4) και απουσία εμβολιασμού (μάρτυρας).

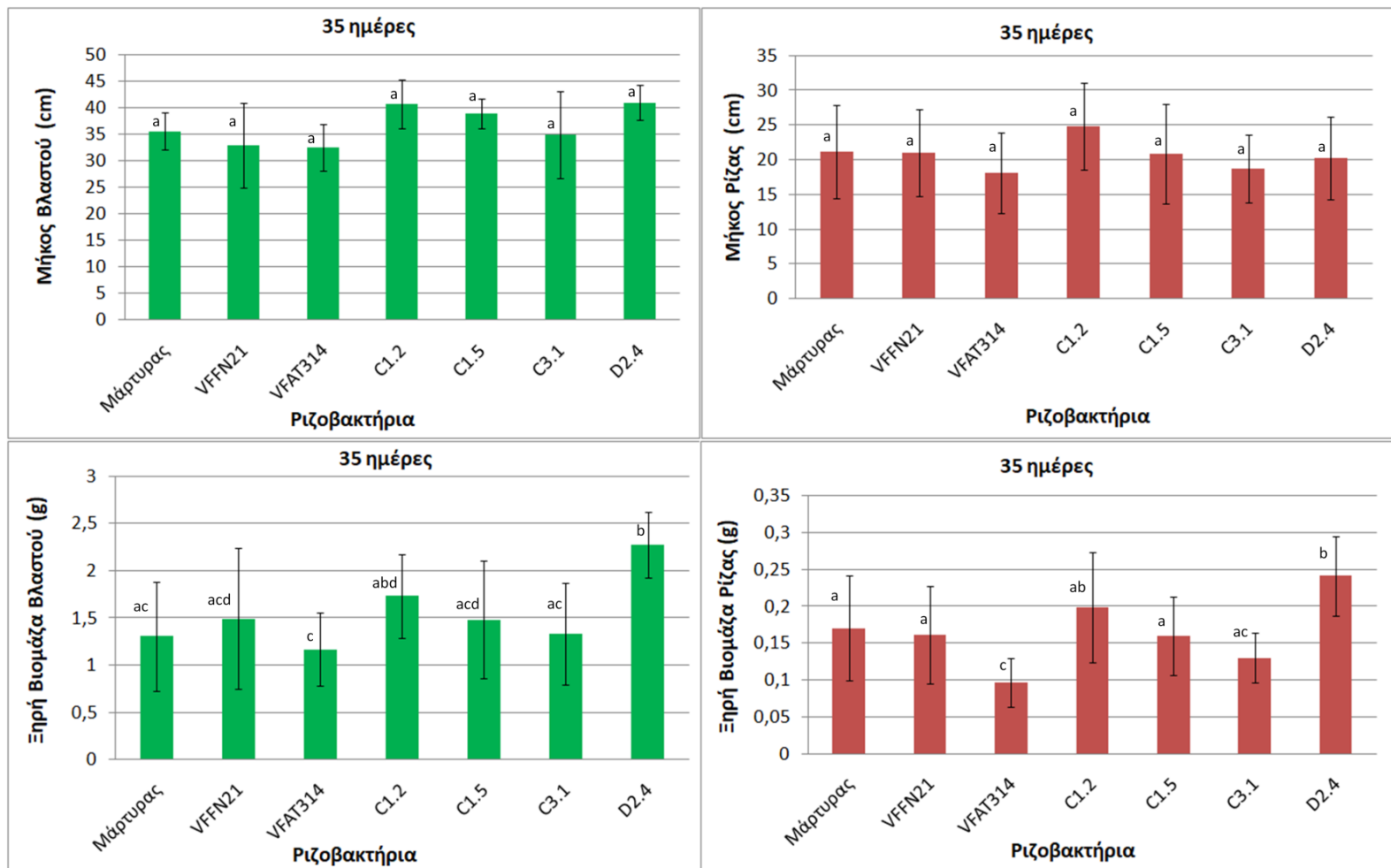
Βάσει των αποτελεσμάτων που προέκυψαν (**Πίνακας 4.1**), 35 ημέρες μετά τον εμβολιασμό των φυταρίων τομάτας με τα επιλεγμένα ριζοβακτήρια, μόνο η εφαρμογή του D2.4 προκάλεσε σημαντική αύξηση της φυτικής βιομάζας ( $p \leq 0,05$ ), σε σχέση με το μάρτυρα. Φυτάρια τομάτας εμβολιασμένα με τα υπόλοιπα ριζοβακτήρια (VFFN21, VFAT314, C1.2, C1.5, C3.1, D2.4) δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές αποκλίσεις σε σχέση με τα μη εμβολιασμένα (μάρτυρας).

<b>Πίνακας 4.1:</b> Καταγραφή του μήκους και της νωπής/ξηρής βιομάζας του υπέργειου και υπόγειου τμήματος ανά φυτό.						
Στελέχη (Μεταχειρίσεις)	Βλαστός			Ρίζα		
	Μήκος (cm)	Νωπή βιομάζα (g)	Ξηρή βιομάζα (g)	Μήκος (cm)	Νωπή βιομάζα (g)	Ξηρή βιομάζα (g)
Μάρτυρας	35,63± 3,57 a	16,85± 3,99 bce	1,304± 0,58ac	21,157± 6,69a	1,634± 0,932 a	0,170± 0,07a
VFFN21	32,94± 7,93a	15,81± 6,23b	1,493± 0,74acd	21,000± 6,30a	1,370± 0,935 a	0,161± 0,07a
VFAT314	32,62± 4,401 a	12,64± 5,134 b	1,169± 0,38c	18,144± 5,77a	1,054± 0,394a	0,097± 0,03c
C1.2	40,76± 4,65 a	19,55± 3,60 ade	1,734± 0,44abd	24,800± 6,21a	1,843± 0,928 a	0,199± 0,07ab
C1.5	38,90± 2,73 a	21,09± 2,96 ae	1,481± 0,62acd	20,800± 7,20a	1,587± 0,489 a	0,160± 0,05a
C3.1	34,99± 8,16a	15,72± 5,39 bce	1,333± 0,54ac	18,643± 4,88 a	1,433± 0,472 a	0,130± 0,03ac
D2.4	40,97± 3,30a	23,32± 1,596 a	2,271± 0,34b	20,229± 5,96 a	2,129± 0,521 a	0,241± 0,05b

Οι μέσες τιμές (n=5) στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους σύμφωνα με το LSD ( $p \leq 0,05$ ). Ως «±» συμβολίζεται η τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή.

Σε σχέση με το μάρτυρα, φυτά εμβολιασμένα με το D2.4 σημείωσαν στατιστικά σημαντική αύξηση της νωπής και ξηρής βιομάζας του βλαστού και της ξηρής βιομάζας της ρίζας κατά 38,4%, 74,2% και 41,76%, αντίστοιχα (**Πίνακας 4.2**).

<b>Πίνακας 4.2:</b> Καταγραφή του ποσοστού μεταβολής νωπής και ξηρής βιομάζας βλαστού και της ξηρής βιομάζας ρίζας ανά φυτό μετά από ριζοπότισμα με D2.4, σε σχέση με το μάρτυρα.			
Μεταχείριση	Βλαστός		Ρίζα
	Ποσοστό μεταβολής νωπής βιομάζας (%)	Ποσοστό μεταβολής ξηρής βιομάζας (%)	Ποσοστό μεταβολής ξηρής βιομάζας (%)
D2.4	38,4	74,2	41,76



**Εικόνα 4.2:**Εφαρμογή των ενδοφυτικών βακτηριακών στελεχών VFFN21, VFAT314, C1.2, C1.5, C3.1 και D2.4 ως μεμονωμένα στελέχη σε φυτά τομάτας, αναπτυγμένα σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών. Η γραμμή σφάλματος υποδεικνύει την τυπική απόκλιση ( $\pm$ ) από τη μέση τιμή.

Όπως προέκυψε, στην παρούσα μελέτη το D2.4 ήταν το βακτήριο που ξεχώρισε για την αύξηση της βιομάζας των φυτών εμβολιασμένων με αυτό. Η προώθηση της ανάπτυξης των φυτών μετά από εμβολιασμό με PGPB θα μπορούσε να έχει επηρεαστεί από τις συνθήκες ανάπτυξης των φυτών είτε αυτές αφορούν τον πειραματικό σχεδιασμό είτε την παρουσία αβιοτικού παράγοντα καταπόνησης. Για το λόγο αυτό είναι δυνατό να εντοπιστούν διαφοροποιήσεις ως προς την ικανότητα προώθησης των φυτών ακόμα και όταν χρησιμοποιούνται τα ίδια στελέχη. Χαρακτηριστική περίπτωση αποτελεί η εργασία των Kalouzoumis et al. (2021), στην οποία χρησιμοποιήθηκαν τα περισσότερα από τα εξεταζόμενα ριζοβακτήρια της παρούσας εργασίας. Παρότι στην παρούσα εργασία το βακτήριο που ξεχώρισε για την αύξηση της φυτικής βιομάζας ήταν το D2.4, στην εργασία των Kalouzoumis et al. (2021) ήταν το μίγμα C1.2 και C1.5, υπό συνθήκες αλατότητας και το C3.1, σε κανονικές συνθήκες. Η παρατηρούμενη διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων δύναται να οφείλεται στο διαφορετικό πειραματικό σχεδιασμό και στις διαφορετικές συνθήκες διεξαγωγής του πειράματος, όπως η χρήση μη αυτόριζων υποκειμένων, το αναπτυξιακό στάδιο στο οποίο έγινε ο εμβολιασμός με τα ριζοβακτήρια και ο τρόπος με τον οποίο πραγματοποιήθηκε, οι θερμοκηπιακές συνθήκες ανάπτυξης, το υπόστρωμα, η συχνότητα ενυδάτωσης καθώς και το ίδιο το υγρό θρεπτικό μέσο (Savvas, et al, 2013).

Επίσης, η προώθηση της ανάπτυξης των φυτών από τα PGPB μπορεί να οφείλεται στην ικανότητα τους να διεγείρουν την ανάπτυξη των φυτών μέσω μιας σειράς μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης της βελτίωσης της πρόσληψης θρεπτικών στοιχείων (Gurta et al., 2020), όπως η πρόσληψη του αζώτου (Masood et al., 2020), αλλά και της απέκκρισης ουσιών που δρουν ως ρυθμιστές ανάπτυξης των φυτών ή της διέγερσης της βιοσύνθεσής τους από τα φυτά (Choudhary et al., 2011). Η προώθηση της ανάπτυξης της τομάτας από τα PGPB συνοδεύεται από αύξηση της απόδοσης του φυτού, του μήκους βλαστού-ρίζας (Ahmed et al., 2017) και της αύξησης της φυτικής βιομάζας (Ahmed et al., 2017; Kalouzoumis et al., 2021). Στην παρούσα εργασία η εφαρμογή του βακτηρίου D2.4 ήταν ωφέλιμη για την ανάπτυξη της τομάτας καθώς φυτά εμβολιασμένα με το βακτήριο αυτό είχαν αυξημένο νωπό και ξηρό βάρος. Παρόμοια ήταν η επίδραση στην ανάπτυξη του φυτού όταν οι Almoneafy et al. (2014) εμβολίασαν φυτά τομάτας με στέλεχος *Bacillus*, όπου η αυξημένη νωπή και ξηρή βιομάζα του φυτού συσχετίστηκε θετικά με την παραγωγή αυξίνης.

Στη βελτίωση της ανάπτυξης των φυτών, η ικανότητα αποίκησης, εγκατάστασης και ανταγωνισμού μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο καθώς σχετίζονται με την ανάπτυξη ενδοφυτικού χαρακτήρα από πλευράς βακτηρίου. Η ένταση εμφάνισης των παραπάνω χαρακτηριστικών πιθανόν επηρεάζεται τόσο από την προέλευση του βακτηρίου όσο και από το

φυτό-ξενιστή (Salehin et al., 2020,2021), όπως η περίπτωση του εμπορικού στέλεχους *Bacillus* sp OYK, το οποίο προώθησε την ανάπτυξη της τομάτας αλλά όχι της γλυκοπατάτας(Salehin et al., 2020, 2021).

Με βάση όλα τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι απαιτείται περαιτέρω μελέτη του βακτηρίου D2.4 είτε υπό θερμοκηπιακές συνθήκες είτε σε συνθήκες πεδίου για την αξιολόγηση της δράσης του στην τομάτα. Το ίδιο ισχύει και για τα υπόλοιπα εξεταζόμενα βακτήρια καθώς θα μπορούσαν να έχουν ικανότητα προώθησης κάποιου άλλου φυτού-ξενιστή είτε της τομάτας υπό διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης.

#### 4.4.2) Εφαρμογή ριζοβακτηρίων σε φυτά τομάτας και μελιτζάνας για βιολογική προστασία από το φυτοπαθογόνο μύκητα *Botrytis cinerea*

Στην παρούσα μελέτη, αξιολογήθηκε η ικανότητα των στελεχών VFAT314, C1.2, C1.5, C3.1, D2.4 και VFFN21 να δρουν ως βιολογικοί παράγοντες ελέγχου (Β.Π.Ε) του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea in vivo* σε φυτά τομάτας (*Solanum lycopersicum* cv. belladonna) και μελιτζάνας (*Solanum melongena*, 'Black Beauty'). Η εφαρμογή των Β.Π.Ε έγινε με ριζοπότισμα και προηγήθηκε εκείνης του φυτοπαθογόνου μύκητα κατά 5-7 ημέρες, ενώ η αξιολόγηση της φυτοπροστατευτικής δράσης των Β.Π.Ε έγινε μέσω καταγραφής των νεκρών και των ζωντανών φυτών τη 2<sup>η</sup>, 5<sup>η</sup>, 7<sup>η</sup> ημέρα από τη μόλυνση τους με το *Botrytis cinerea*. Επίσης, καταγράφηκε η κατάσταση της υγείας των φυτών που είχαν εμβολιαστεί με τον κάθε Β.Π.Ε ξεχωριστά και με τον παθογόνο μύκητα (θετικός μάρτυρας παθογένειας) καθώς και των φυτών που δεν είχαν υποστεί κάποια μεταχείριση (H<sub>2</sub>O, αρνητικός μάρτυρας παθογένειας). Τέλος, η αξιολόγηση της δράσης τους εκφράστηκε ως ποσοστό θνησιμότητας, μετά τη μόλυνση των φυτών με το *Botrytis cinerea* και υπολογίσθηκε η περιοχή κάτω από την καμπύλη προόδου της νόσου, AUDPC (area under the disease progress curve).

Πίνακας 4.3: Καταγραφή του αριθμού νεκρών φυτών τομάτας και του ποσοστού θνησιμότητας μετά από 7 ημέρες από τη μόλυνση τους με <i>Botrytis cinerea</i> .										
Μεταχείριση	Συνολικός αριθμός φυτών	Αριθμός νεκρών φυτών			Ποσοστό θνησιμότητας (%)			AUDPC		
		dpi <sup>δ</sup>			dpi			dpi		
		2	5	7	2	5	7	2	5	7
H <sub>2</sub> O <sup>α</sup>	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BC <sup>β</sup>	5	2	5	5	40	100	100	800	4200	0
VFFN21(Β.Π.Ε) <sup>γ</sup>	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VFAT314(Β.Π.Ε)	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C1.2 (Β.Π.Ε)	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C1.5(Β.Π.Ε)	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C3.1(Β.Π.Ε)	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D2.4(Β.Π.Ε)	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VFFN21+BC	5	0	2	4	0	40	80	0	800	2400
VFAT314 +BC	5	2	5	5	40	100	100	800	4200	0
C1.2+BC	5	1	1	3	20	20	60	200	0	1600

C1.5 +BC	5	0	1	1	0	20	20	0	200	0
C3.1 +BC	5	0	1	2	0	20	40	0	200	600
D2.4 +BC	5	0	2	2	0	40	40	0	800	0
<sup>α</sup> «H <sub>2</sub> O» αρνητικός μάρτυρας, <sup>β</sup> «BC»: <i>Botrytis cinerea</i> , <sup>γ</sup> «B.Π.Ε.=βιολογικός παράγοντας ελέγχου», <sup>δ</sup> «dpi»: days post inoculation (μέρες μετά από τη μόλυνση με BC).										

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4.3**, φυτά που είχαν ριζοποτιστεί με νερό και βιολογικό παράγοντα ήταν υγιή. Όμως φυτά που είχαν μολυνθεί με BC εμφάνισαν συμπτώματα ασθένειας που ραγδαία τα οδήγησε σε ολική νέκρωση. Την 5<sup>η</sup> και 7<sup>η</sup> ημέρα από τη μόλυνση τους, όλα τα φυτά τομάτας που μολύνθηκαν μόνο με BC ήταν νεκρά. Ακριβώς ίδια ήταν η εικόνα των φυτών στη μεταχείριση με VFAT314 + BC. Αντίθετα, στα φυτά που είχε προηγηθεί ριζοπότισμα με τους βιολογικούς παράγοντες VFFN21, C1.2, C1.5, C3.1 και D2.4 παρατηρήθηκε μειωμένος αριθμός νεκρών φυτών την 5<sup>η</sup> και 7<sup>η</sup> ημέρα. Στις περιπτώσεις που δεν αυξήθηκε ο αριθμός νεκρών φυτών μεταξύ των ημερών καταγραφής θνησιμότητας, το AUDPC υπολογίσθηκε μηδέν. Με βάση το ποσοστό θνησιμότητας, τα ριζοβακτήρια ταξινομήθηκαν με φθίνουσα πορεία ξεκινώντας από εκείνο που έδειξε τη μεγαλύτερη ικανότητα βιολογικής προστασίας στο BC προς αυτό με την μικρότερη ή μηδενική: C1.5> C3.1= D2.4> C1.2> VFFN21> VFAT314. Τα φυτά εμφάνισαν τη μικρότερη θνησιμότητα (20 %) μετά από εφαρμογή του C1.5, ενώ η εφαρμογή των C3.1 και D2.4 οδήγησε σε 40% θνησιμότητα και των C1.2, VFFN21, VFAT314 σε 60%, 80% και 100% θνησιμότητα, αντίστοιχα.

Όλα τα φυτά που επιβίωσαν από τη θνησιγόνο δράση του μύκητα εκδήλωσαν το χαρακτηριστικό σύμπτωμα της σήψης λαιμού ή ημιπληγίας. Στην **Εικόνα 4.3** παρουσιάζεται αντιπροσωπευτική εικόνα φυτών: (1) ριζοπότισμα με νερό (αρνητικός μάρτυρας), (2) εφαρμογή μέσω ριζοποτίσματος ενός B.Π.Ε (VFAT314, C1.2, C1.5, C3.1, D2.4, VFFN21), (3) μόλυνση με BC και (4) εφαρμογή αρχικά ενός B.Π.Ε και εν συνεχεία μόλυνση με BC. Στην τελευταία περίπτωση όσα φυτά επέζησαν, εμφάνισαν βλαστό με σήψη λαιμού (**Εικόνα 4.3B**) και τα υπόλοιπα που δεν επέζησαν είχαν την εικόνα της γλάστρας 3, δηλαδή εκείνης νεκρού φυτού. Φυτά της περίπτωσης 4 που επέζησαν με σήψη λαιμού παρέμειναν στο θάλαμο ανάπτυξης των φυτών για άλλες 7 μέρες μετά τη λήξη του πειράματος, χωρίς να νεκρωθούν.



**Εικόνα 4.3:** **A)** Βιολογική αντιμετώπιση του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea* σε φυτά τομάτας. **B)** Βλαστός σε φυτό τομάτας με σήψη λαιμού.

Επίσης υπολογίστηκε η πορεία της ασθένειας των φυτών τομάτας τη 2<sup>η</sup>, 5<sup>η</sup> και 7<sup>η</sup> ημέρα από τη μόλυνση τους με BC, η οποία εκφράστηκε ως ποσοστό δείκτης ασθένειας (%) καθώς και η περιοχή κάτω από τη καμπύλη της ασθένειας. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο δείκτης ασθένειας ταυτίστηκε με το ποσοστό θνησιμότητας των φυτών μετά από τη μόλυνση με το φυτοπαθογόνο παράγοντα.

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η ικανότητα των παραπάνω έξι ριζοβακτηρίων να προάγουν φυτοπροστατευτική δράση κατά του BC στη μελιτζάνα. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν αντίστοιχη με πριν καλύπτοντας ένα διάστημα 11 ημερών. Η πορεία της ασθένειας παρακολουθούνταν σε καθημερινή βάση, ενώ έγινε καταγραφή των συμπτωμάτων που εκδήλωσαν τα φυτά την 3<sup>η</sup>, 5<sup>η</sup>, 9<sup>η</sup> και 11<sup>η</sup> ημέρα μετά από τη μόλυνση με το φυτοπαθογόνο παράγοντα. Η κλίμακα βαθμολόγησης των συμπτωμάτων ήταν από 0 έως 4 όπως περιγράφεται από τους Klement et al. (1990). Δηλαδή με 0 για φυτά χωρίς συμπτώματα (ανθεκτικά) και με 1-2-3-4 για φυτά με μαρασμό σε ποσοστό 1–25% (ανεκτικά) - 26–50% (μέτρια ανεκτικά) - 51–75% (ευαίσθητα) - 76–100% (πολύ επιρρεπή ή νεκρά φυτά). Η εκτίμηση του μαρασμού έγινε καταγράφοντας τον αριθμό των φύλλων που παρουσίαζαν το χαρακτηριστικό γνώρισμα φύλλο σημαίας. Επίσης υπολογίστηκε, η πορεία της ασθένειας των φυτών μελιτζάνας την 3<sup>η</sup>, 5<sup>η</sup>, 9<sup>η</sup> και 11<sup>η</sup> ημέρα από τη μόλυνση τους με BC, η οποία εκφράστηκε ως ποσοστό δείκτης ασθένειας (%) καθώς και η περιοχή κάτω από την καμπύλη της ασθένειας.



**Πίνακας 4.4:** Καταγραφή της σοβαρότητας ασθένειας κατά τη διάρκεια 11 ημερών από τη μόλυνση της μελιτζάνας με το *Botrytis cinerea*.

Μεταχείριση	Συνολικός αριθμός φυτών	% Δείκτης σοβαρότητας ασθένειας (disease severity index, DSI)				AUDPC			
		dpi <sup>β</sup>				dpi			
		3	5	9	11	3	5	9	11
BC <sup>α</sup> (Θετικός Μάρτυρας)	10	67,5	67,5	77,5	77,5	2278,13	0	725	0
VFFN21+BC	10	50	62,5	62,5	62,5	1250	703,13	0	0
VFAT314 +BC	10	27,5	40	50	50	378,13	421,88	450	0
C1.2+BC	10	12,5	12,5	12,5	12,5	78,2	0	0	0
C1.5 +BC	10	43,75	46,9	46,9	46,9	957	141,6	0	0
C3.1 +BC	10	59,38	62,5	62,5	62,5	1762,66	190,43	0	0
D2.4 +BC	10	37,5	46,9	62,5	62,5	703,13	395,5	854,5	0

<sup>α</sup> «BC»: *Botrytis cinerea*, <sup>β</sup> «dpi»: days post inoculation (μέρες μετά από τη μόλυνση με BC).

Φυτά που είχαν ριζοποτιστεί μόνο με νερό ή βιολογικό παράγοντα ήταν υγιή, αντιθέτως φυτά που είχαν μολυνθεί με BC εμφάνισαν συμπτώματα ασθένειας από την 3<sup>η</sup> ημέρα έκθεσης στο μολυσματικό παράγοντα (**Πίνακας 4.4**). Η σοβαρότητα της ασθένειας ήταν διαφορετική μεταξύ των μεταχειρίσεων. Φυτά που είχαν μολυνθεί μόνο με BC (θετικός μάρτυρας) εμφάνισαν το ίδιο ποσοστό του δείκτη σοβαρότητας ασθένειας την 3<sup>η</sup> και 5<sup>η</sup> ημέρα, ο οποίος αυξήθηκε την 9<sup>η</sup> αλλά έμεινε σταθερός έως την 11<sup>η</sup> ημέρα. Από την 3<sup>η</sup> έως την 5<sup>η</sup> ημέρα ο (%) δείκτης σοβαρότητας ασθένειας φυτών εμβολιασμένα με τα VFFN21, C1.5 και C3.1 αυξήθηκε, ενώ από την 5<sup>η</sup> έως και την 11<sup>η</sup> ημέρα ο δείκτης είχε την ίδια τιμή για αυτό και το AUDPC είναι «0». Στις μεταχειρίσεις με VFAT314 και D2.4, ο % δείκτης σοβαρότητας ασθένειας φυτών αυξήθηκε από την 3<sup>η</sup> έως την 9<sup>η</sup> ημέρα και στη συνέχεια έμεινε σταθερός στην ίδια τιμή (AUDPC «0» από την 9<sup>η</sup> στην 11<sup>η</sup> ημέρα). Τέλος, φυτά εμβολιασμένα με D2.4 είχαν την ίδια τιμή για το ποσοστό του δείκτη ασθένειας από την 3<sup>η</sup>-11<sup>η</sup> ημέρα για αυτό και το AUDPC είναι «0» στις αντίστοιχες ημέρες. Από όλα τα παραπάνω προκύπτει ότι, σε όλες τις μεταχειρίσεις η πορεία της ασθένειας είναι σταθερή από την 9<sup>η</sup> έως την 11<sup>η</sup> ημέρα μόλυνσης.

**Πίνακας 4.5:** Καταγραφή του ποσοστού σοβαρότητας της ασθένειας φυτών στα οποία είχε προηγηθεί ριζοπότισμα, σε σχέση με το μάρτυρα, την 11<sup>η</sup> ημέρα από τη μόλυνση τους με το *Botrytis cinerea* (BC).

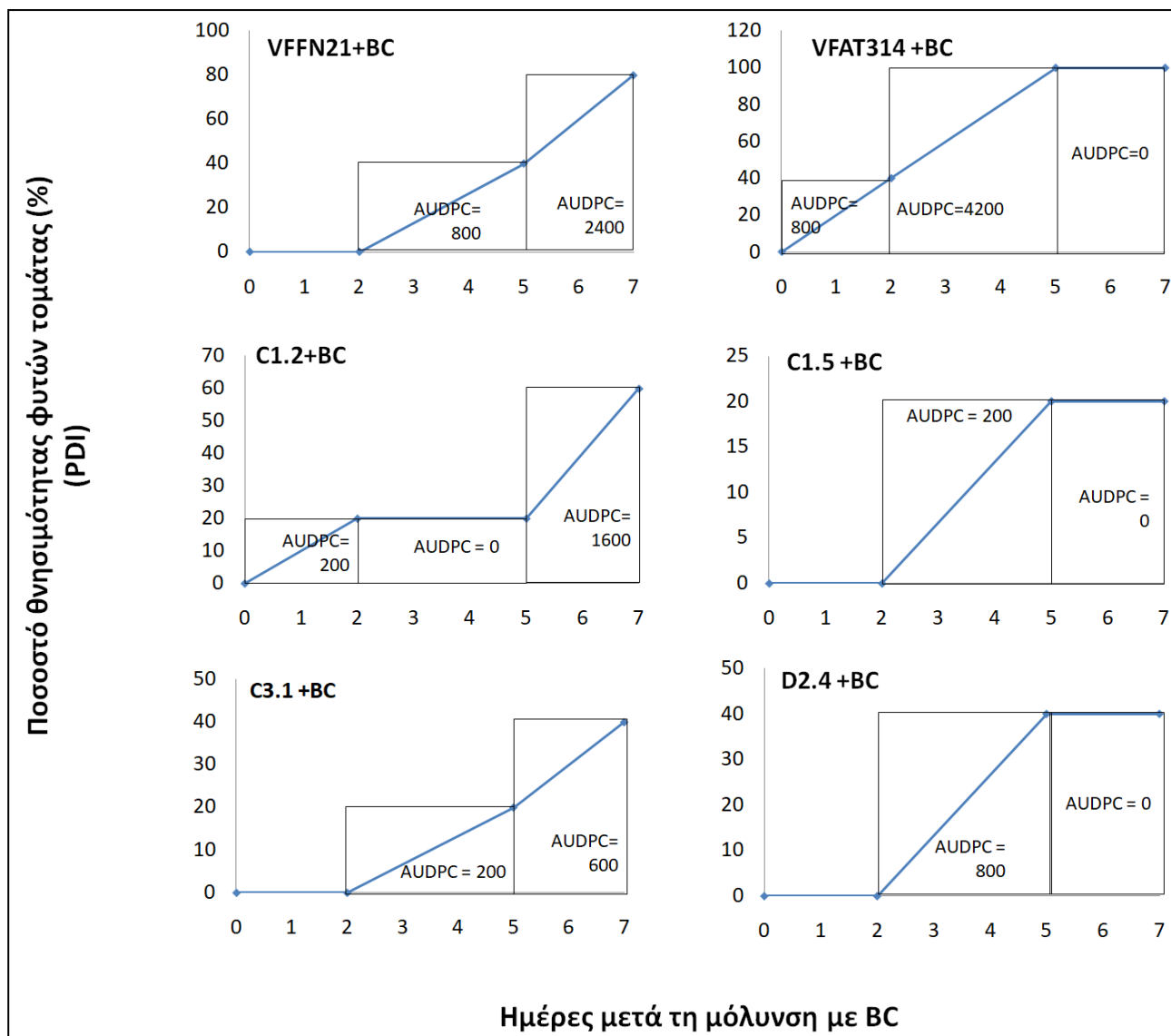
Μεταχείριση	Ποσοστό σοβαρότητας ασθένειας (%)
BC <sup>α</sup> (Θετικός Μάρτυρας)	100
VFFN21+BC	80,64
VFAT314 +BC	64,5
C1.2+BC	16,12
C1.5 +BC	60,51
C3.1 +BC	80,64
D2.4 +BC	80,64

Συγκρίνοντας τις μεταχειρίσεις με το θετικό μάρτυρα, η σοβαρότητα της ασθένειας μειώθηκε όταν τα φυτά εμβολιάστηκαν: με C1.2 στο 16,12%, με C1.5 στο 60,51%, με VFAT314 στο 64,51% και με τα C3.1, D2.4, VFFN21 στο 80,64%. Ως εκ τούτου, με βάση το ποσοστό του δείκτη ασθένειας τα ριζοβακτήρια ταξινομήθηκαν με φθίνουσα πορεία ξεκινώντας από εκείνο που έδειξε τη μεγαλύτερη ικανότητα βιολογικής προστασίας στο BC προς αυτό, με τη μικρότερη: C1.2> C1.5> VFAT314 > C3.1= D2.4= VFFN21 (Πίνακας 4.5).

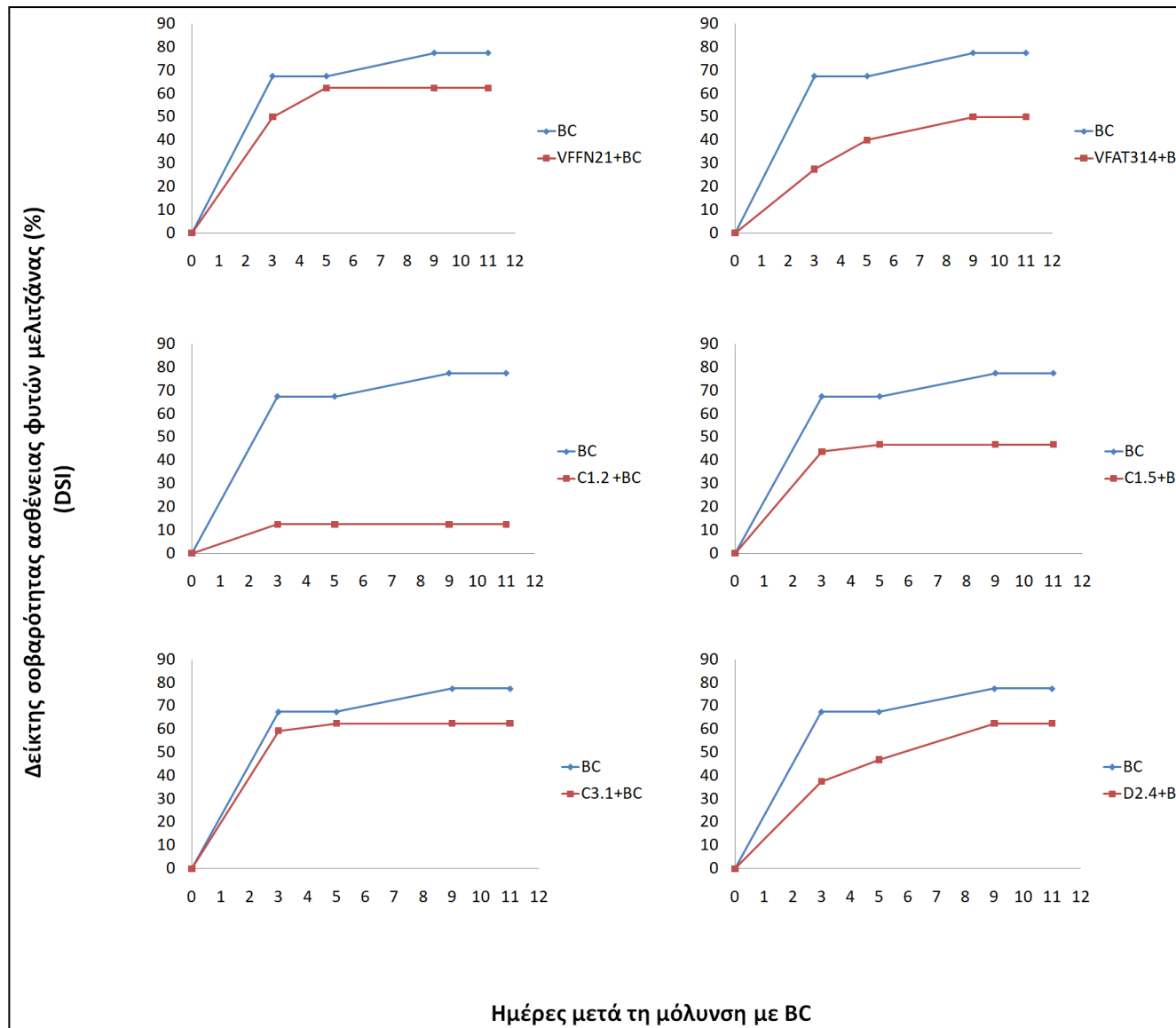
Ειδικά στην περίπτωση των C1.2 και VFAT314, στελέχη του ίδιου είδους εμφανίζουν απόκλιση ως προς τη μεταξύ τους ικανότητα να ασκούν βιοέλεγχο κατά του BC στη μελιτζάνα, παρόλο που *in vitro* εμφάνισαν παρόμοια ανασταλτική δράση στην εξάπλωση του μυκηλίου του συγκεκριμένου μύκητα. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί πως το C1.2 ήταν από τα βακτήρια που ξεχώρισαν για την ανταγωνιστικότητα τους, τόσο *in vitro* όσο και *in planta*. Αντίθετα βακτήρια όπως το D2.4 και το VFAT314, που έδειξαν σε μεγάλο βαθμό ανταγωνιστικότητα κατά του BC *in vitro*, δεν έδειξαν την ανάλογη δράση όταν εξετάστηκαν *in planta* στη μελιτζάνα. Συνεπώς με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, φυτά εμβολιασμένα με το C1.2 χαρακτηρίστηκαν ως ανεκτικά, φυτά εμβολιασμένα με τα C1.5 και VFAT314 χαρακτηρίστηκαν ως μέτρια ανεκτικά και τα φυτά με τα υπόλοιπα τρία ως ευαίσθητα. Στην **Εικόνα 4.4** παρουσιάζεται αντιπροσωπευτική εικόνα φυτών: (1) ριζοπότισμα μόνο με νερό, (2) εφαρμογή μέσω ριζοποτίσματος ενός Β.Π.Ε. (VFAT314, C1.2, C1.5, C3.1, D2.4, VFFN21), (3) μόλυνση με BC και (4) εφαρμογή αρχικά ενός Β.Π.Ε. και εν συνεχεία μόλυνση με BC. Στην τελευταία περίπτωση όσα φυτά ασθένησαν, εμφάνισαν φύλλα σημαίας, όμοια με εκείνα της γλάστρας 3.



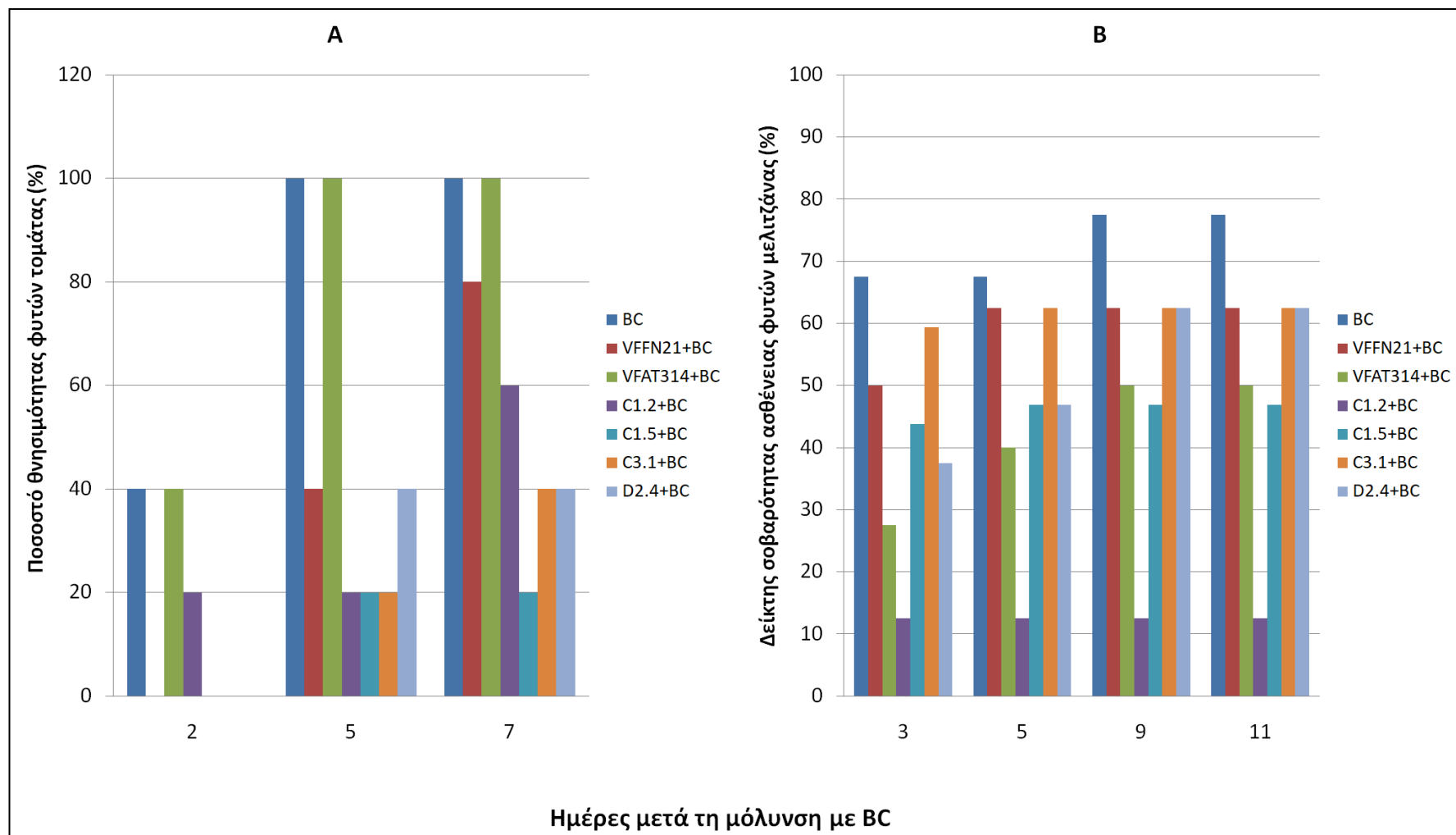
**Εικόνα 4.4:** Βιολογική αντιμετώπιση του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea* σε φυτά μελιτζάνας.



**Εικόνα 4.5:** Παρουσίαση καμπύλης προόδου της θνησιμότητας φυτών τομάτας που προηγουμένως είχαν εμβολιαστεί με ένα Β.Π.Ε. (VFFN21, VFAT314, C1.2, C1.5, C3.1, D2.4) και στη συνέχεια μολύνθηκαν με BC (*Botrytis cinerea*), τη 2<sup>η</sup>, 5<sup>η</sup> και 7<sup>η</sup> ημέρα και υπολογισμός της περιοχής κάτω από την καμπύλη αυτή. Η κατασκευή της καμπύλης έγινε με βάση το δείκτη θνησιμότητας εκφρασμένος επί τοις %.



**Εικόνα 4.6:** Παρουσίαση καμπύλης πρόοδου της ασθένειας φυτών μελιτζάνας που προηγουμένως είχαν μολυνθεί μόνο με το BC και που είχαν εμβολιαστεί με ένα Β.Π.Ε. (VFFN21, VFAT314, C1.2, C1.5, C3.1, D2.4) και στη συνέχεια μολυνθεί με BC (*Botrytis cinerea*), την 3<sup>η</sup>, 5<sup>η</sup>, 9<sup>η</sup> και 11<sup>η</sup> ημέρα. Η κατασκευή της καμπύλης έγινε με βάση το δείκτη θνησιμότητας εκφρασμένος επί τοις %.



**Εικόνα 4.7:** Γραφική παράσταση **A)** του ποσοστού της θνησιμότητας των φυτών τομάτας (%) τη 2<sup>η</sup>, 5<sup>η</sup> και 7<sup>η</sup> ημέρα και **B)** του δείκτη σοβαρότητας ασθένειας φυτών μελιτζάνας (%) τη 3<sup>η</sup>, 5<sup>η</sup>, 9<sup>η</sup> και 11<sup>η</sup> ημέρα, από τη μόλυνση των φυτών με BC. Όπου «BC», μόλυνση των φυτών με *Botrytis cinerea* χωρίς να έχει προηγηθεί ριζοπότισμα με Β.Π.Ε και όπου VFFN21+BC, VFAT314 +BC, C1.2+BC, C1.5 +BC, C3.1 +BC, D2.4 +BC, μόλυνση των φυτών με *Botrytis cinerea* κατόπιν ριζοποτίσματος με ένα Β.Π.Ε. (VFFN21, VFAT314, C1.2, C1.5, C3.1, D2.4).

Η ικανότητα των εξεταζόμενων ριζοβακτηρίων να λειτουργούν ως Β.Π.Ε. κατά του *Botrytis cinerea* μπορεί να οφείλεται στην ανάπτυξη διαφόρων μηχανισμών δράσης, όπως η ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών άμυνας του φυτού διαμεσολαβούμενα από το ιασμονικό οξύ (JA) και το αιθυλένιο, προκαλώντας εναπόθεση καλλόζης και ενίσχυση της φυτικής ανάπτυξης (Torai et al., 2020). Επίσης, η αντιμυκητιακή δράση έναντι του *Botrytis cinerea* μπορεί να οφείλεται στη δράση σιδηροφόρων τα οποία αναστέλουν τον αποικισμό του μύκητα (Sansone et al., 2011) και παρέχουν προστασία σε φυτά τομάτας (Audenaert et al., 2002), διεγείροντας τη διασυστηματική άμυνα στα φυτά. Επίσης, ο ανταγωνισμός για θρεπτικά συστατικά (Guinebretiere et al., 2000) και η παραγωγή εντεροχελίνης (σιδηροφόρο τύπου catecholates) (Sansone et al., 2011; Brady, 2013) αποτελούν παράγοντες που έχουν συσχετιστεί με την παρεμποδιστική δράση των *Enterobacteriaceae*. Από διάφορες μελέτες είναι γνωστό ότι, ενώσεις όπως η χιτοζάνη και το σαλικυλικό οξύ διαδραματίζουν σημαντικό αντιμυκητιακό ρόλο στη μελιτζάνα, καθώς οδηγούν σε αύξηση της δράσης της υπεροξειδάσης, στην ενίσχυση της ενζυμικής δράσης της λυάσης φαινυλαλανίνης-αμμωνίας, στη συσσώρευση φαινολικών ενώσεων, στην αύξηση του περιεχομένου των φυτών σε χλωροφύλλη και στην επαγωγή διασυστηματικής αντίδρασης (Trotel-Aziz et al., 2006; Bui et al., 2019; Al-Juboory & Al-Hadithy, 2021).

PGPB με δράση Β.Π.Ε.. *in planta* έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων, έχουν *in vitro* παρεμποδιστική δράση, όμως PGPB με *in vitro* παρεμποδιστική δράση, *in planta* μπορεί να μην εμφανίζουν παρόμοια δράση ως Β.Π.Ε. (Utkhede & Sholberg, 1986; Boulahouat et al., 2022). Η παρούσα μελέτη αποτελεί ένα επιπλέον παράδειγμα εφαρμογής βακτηρίων με *in vitro* ανταγωνιστική δράση η οποία είναι διαφοροποιημένη κατά την *in vivo* εξέτασή τους σε φυτά τομάτας και μελιτζάνας. Η διαφοροποίηση αυτή θα μπορούσε να οφείλεται στις βιοτικές αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται, καθώς οι αλληλεπιδράσεις αυτές τόσο στο έδαφος όσο και στο φυτό μπορεί να οδηγήσουν σε μη επιτυχή δράση του παράγοντα βιοελέγχου (Knudsen et al., 1997; Pliego et al., 2011). Η *in vivo* εξέταση της ικανότητας ανάπτυξης ανταγωνιστικής δράσης έναντι φυτοπαθογόνων σε σύστημα γλάστρας- φυτού-παθογόνου – PGPB είναι περισσότερο κατάλληλη για τη διερεύνηση της παρεμπόδισης εμφάνισης ασθενειών, καθώς χρησιμοποιείται υπόστρωμα που μοιάζει περισσότερο με το έδαφος από το άγαρ, και αυτό μπορεί να αυξήσει τις πιθανότητες επιλογής των καλύτερων παραγόντων ελέγχου (Knudsen et al., 1997). Η αλληλεπίδραση μεταξύ μικροοργανισμών είναι εξαιρετικά δυναμική και εξαρτάται από τις πειραματικές συνθήκες, από τις μεταβλητές που μετρήθηκαν και από τον τρόπο με τον οποίο αποικίζουν τον ξενιστή (Chen et al., 2021).

Συγκρίνοντας την κατάταξη των ριζοβακτηρίων ως προς την ικανότητα βιολογικής αντιμετώπισης του BC σε φυτά τομάτας (C1.5> C3.1= D2.4> C1.2> VFFN21> VFAT314) και μελιτζάνας (C1.2> C1.5> VFAT314 > C3.1= D2.4= VFFN21), παρατηρήθηκε διαφοροποίηση της σειράς κατάταξης των ριζοβακτηρίων. Στα φυτά τομάτας περισσότερο ωφέλιμη ήταν η δράση του C1.5, ενώ της μελιτζάνας του C1.2. Η διαφοροποίηση αυτή θα μπορούσε να οφείλεται στη διαφορετική ικανότητα αποτελεσματικής αποίκησης του φυτού από τα εξεταζόμενα ριζοβακτήρια. Η συσχέτιση της αποτελεσματικής αποίκησης των βακτηρίων με την ικανότητα τους να ασκούν βιοελεγκο αναφέρεται και στην εργασία των Myresiotis et al. (2012) όπου ο αποικισμός των ριζών των φυτών θεωρείται απαραίτητος τόσο για την προαγωγή του βιοελέγχου έναντι φυτοπαθογόνων οργανισμών όσο και για την προαγωγή της ανάπτυξης τους.

Η αλλαγή του φυτού μοντέλου επέτρεψε την ανάδειξη της φυτοπροστατευτικής δράσης των *Enterobacter* spp και λιγότερο της *Lelliottia* sp. D2.4 και του *Bacillus* sp. VFFN21. Η μειωμένη ικανότητα άσκησης βιοελέγχου από το D2.4 και από το VFFN21 θα μπορούσε να οφείλεται σε μη επιτυχή αποικισμό του φυτού. Μειωμένη ικανότητα βιοελέγχου έχει παρατηρηθεί και στην εργασία των Myresiotis et al. (2012), η οποία συσχετίστηκε με την έλλειψη ικανότητας αποικισμού αρχικά της ριζόσφαιρας και στη συνέχεια του φυτού. Η διαφοροποίηση της σειράς κατάταξης των βακτηρίων ως προς την ικανότητα άσκησης βιοελέγχου του BC στην τομάτα και στη μελιτζάνα, θα μπορούσε να οφείλεται επιπλέον στη διαφορετική ικανότητα παραμονής του ριζοβακτηρίου ως ενδόφυτο για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η πρόταση αυτή βασίστηκε στην εργασία των Myresiotis et al. (2012), σύμφωνα με την οποία οι πληθυσμοί των στελεχών *Bacillus amyloliquefaciens* IN937a και *Bacillus pumilus* SE34 μειώθηκαν κατά τη διάρκεια ανάπτυξης της τομάτας, με τα βακτήρια αυτά να μην εμφανίζουν δράση βιοελέγχου κατά του *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl).

Ένας ακόμη παράγοντας που θα μπορούσε να παίζει ρόλο στον επιτυχή αποικισμό των φυτών από τα ριζοβακτήρια που εξετάστηκαν θα μπορούσε να είναι το ήδη υπάρχον και μόνιμο μικροβίωμα του φυτού. Τα χαρακτηριστικά προσαρμογής του κάθε ριζοβακτηρίου είναι σημαντικά για την επιβίωση και τον επιτυχή βιοελεγκο (Legein et al., 2020). Όταν εφαρμόζονται Β.Π.Ε.. σε φυσικά περιβάλλοντα, τα Β.Π.Ε.. δε δρουν ανεξάρτητα από το περιβάλλον τους, αλλά αλληλεπιδρούν με πολλά αυτόχθονα μικρόβια για να γίνουν συστατικά των τοπικών μικροβιακών κοινοτήτων. Τα μέλη τέτοιων κοινοπραξιών μπορεί να εξελίξουν εξειδικευμένες μικροβιακές αλληλεπιδράσεις για να επηρεάσουν την υγεία των φυτών (Whipps, 2001). Το μόνιμο φυτικό μικροβίωμα μπορεί να επηρεάσει θετικά ή αρνητικά τη δραστηριότητα βιοελέγχου και την επιτυχία του αποικισμού του παράγοντα βιοελέγχου (Massart et al., 2015).

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι για τη βιολογική καταπολέμηση του *Botrytis cinerea* σε φυτά μελιτζάνας, ίσως είναι η πρώτη φορά που στελέχη *Enterobacter* spp εκδηλώνουν *in vivo* αντιμυκητιακή δράση. Επιπλέον από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας φάνηκε ότι τα C1.2 και C1.5 είχαν καλύτερη παρεμποδιστική δράση κατά του εξεταζόμενου μύκητα (*Botrytis cinerea*) στα φυτά που εξετάστηκαν για αυτό η χρήση τεχνικών –omic θα μπορούσε να βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση των αναπτυσσόμενων μηχανισμών. Οι τεχνικές αυτές θα μπορούσαν να περιλαμβάνουν αναλύσεις μεταγονιδιώματος, μετατρανσκριπτώματος, μεταπρωτεώματος και μεταβολισμού και έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την κατανόηση μηχανισμών που παίζουν ρόλο σε πολύπλοκες κοινότητες στη φυλλόσφαιρα (Legein et al., 2020).

#### **4.4.3) Αξιολόγηση της βιολογικής προστασίας κονδύλων πατάτας και καρότου από το φυτοπαθογόνο *D. solani* IPO 2222 με τη χρήση ενδοφυτικών ριζοβακτηρίων**

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η δράση των ριζοβακτηρίων (VFFN21, VFAT314, C1.2, C1.5, C3.1, και D2.4) να παρεμποδίζουν την πρόκληση μαλακής σήψης σε τεμάχια πατάτας και καρότου προκαλούμενη από το *D. solani* IPO 2222<sup>T</sup>. Η εκτίμηση στηρίχθηκε στη σύγκριση της επιφάνειας αλλοίωσης των κονδύλων, όταν αυτοί μολύνθηκαν με *D. solani* IPO 2222<sup>T</sup> (θετικός μάρτυρας), με τα έξι επιλεγμένα ριζοβακτήρια, ξεχωριστά, καθώς και με το μίγμα ριζοβακτήριο + *D. solani* IPO 2222<sup>T</sup>. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν τεμάχια στα οποία είχε γίνει εναπόθεση αποστειρωμένου νερού (dH<sub>2</sub>O). Η βιοδοκιμή αυτή διήρκησε τρεις ημέρες και την τελευταία ημέρα έγινε λήψη φωτογραφιών για την αποτύπωση του αποτελέσματος. Ως κριτήριο της αποτελεσματικής καταπολέμησης ή περιορισμού της εξάπλωσης του *D. solani* IPO 2222<sup>T</sup> από τα έξι ριζοβακτήρια ορίστηκε το μέγεθος της ζώνης σήψης στην αλλοιωμένη περιοχή.

Η παρουσία των έξι ριζοβακτηρίων, ως υποψήφια B.Π.Ε., από μόνη της δεν οδήγησε σε αλλοίωση του κονδύλου, όμως η παρουσία του *D. solani* IPO 2222<sup>T</sup> ακόμα και ως συστατικό μέρος μίγματος στο οποίο είχε προστεθεί ριζοβακτήριο ήταν ικανό να προκαλέσει αλλοίωση στον ίδιο βαθμό με εκείνο του θετικού μάρτυρα (απουσία ριζοβακτηρίου). Συνεπώς τα *Enterobacter* VFAT314, C1.2, C1.5, C3.1, η *Lelliottia* D2.4 και ο *Bacillus* VFFN21 αν και είχαν ανταγωνιστική δράση σε επίπεδο *in vitro* δεν έδειξαν ανάλογη δράση σε επίπεδο *in vivo*. Η εξέταση των ριζοβακτηρίων σε *in vitro* συνθήκες ήταν ιδανικές και επέτρεψαν την εμφάνιση ανταγωνιστικής δράσης χωρίς να μεσολαβείται κάποιος άλλος παράγοντας αλληλεπίδρασης. Αντιθέτως η αλλαγή του τρόπου και των συνθηκών εξέτασης της ανταγωνιστικής δράσης των ριζοβακτηρίων σε *in vivo* με τη χρήση κονδύλων, επέτρεψε την ανάπτυξη αλληλεπίδρασεων σε περιβάλλον μη ιδανικό που προσομοιάζει περισσότερο το φυσικό περιβάλλον. Για το λόγο αυτό απορρίφθηκαν ως εργαλείο περιορισμού της δράσης του *D. solani* για την αντιμετώπιση



ασθενειών που αυτό προκαλεί στα εξεταζόμενα μοντέλα μελέτης (κόνδυλοι πατάτας και καρότου). Στην **Εικόνα 4.8** αποτυπώνεται ενδεικτικά το αποτέλεσμα της δράσης του *D. solani* IPO 2222<sup>T</sup> μετά από την εφαρμογή του είτε ξεχωριστά είτε ως συστατικό μέρος μίγματος, σε φέτες πατάτας και καρότου, στις οποίες είχαν προηγηθεί τεχνητές πληγές.



**Εικόνα 4.8:** Πρόκληση μαλακής σήψης από τη δράση του *D. solani* IPO 2222<sup>T</sup> σε τεμάχια πατάτας και καρότου.

Γενικά, το *in vitro* υψηλό δυναμικό ανταγωνιστικού δεν αποτελεί πάντα προϋπόθεση για επιτυχή φυτοπροστατευτική δράση (Besset-Manzoni et al., 2019) κατά την εξέταση των RGPB *in vivo*. Για αυτό *in planta* θερμοκηπιακές βιοδοκιμασίες έχουν δείξει ότι στελέχη που έχουν ξεχωρίσει *in vitro* δεν είναι πάντα αυτά που δείχνουν τα καλύτερα αποτελέσματα *in vivo* και αντίστροφα (Comby et al., 2017). Σε *in vivo* μελέτες, η μη επιτυχής προστασία του φυτού συνήθως αποδίδεται στις βιοτικές αλληλεπιδράσεις του φυτού που μπορεί να οδηγήσουν σε μη επιτυχή δράση του παράγοντα βιοελέγχου (Knudsen et al., 1997; Pliego et al., 2011). Συνεπώς για τη διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων για την ανταγωνιστική δράση ενός βακτηρίου δεν αρκεί μόνο *in vitro* εξέταση καθώς η αλληλεπίδραση μεταξύ μικροοργανισμών είναι εξαιρετικά δυναμική και εξαρτάται από τις πειραματικές συνθήκες, από τις μεταβλητές που μετρήθηκαν αλλά και από τον τρόπο με τον οποίο αποικίζουν τον ξενιστή (Chen et al., 2021).

Για τη βιολογική καταπολέμηση του *D. solani* IPO 2222<sup>T</sup>, ο αριθμός των βακτηρίων που έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία είναι πάρα πολύ περιορισμένος. Η μολυσματική δράση του παθογόνου καθορίζεται από ένα πλήθος μηχανισμών (Lisicka et al., 2018) που αφορούν: 1) την έκκριση ενζύμων αποικοδόμησης φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων (π.χ. πηκτινολυτικά ένζυμα, πρωτεάσες) μέσω του συστήματος έκκρισης Out (Σύστημα Έκκρισης Τύπου II, T2SS), αλλά και κυτταρινασών, που εκκρίνονται στο εξωτερικό χώρο, μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου I, 2) την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες των μαστιγίων και συμβάλλουν στην κολυμβητική κινητικότητα και στην ομαδική κίνηση, για την κίνηση των βακτηρίων σε υγρά μέσα και σε στερεές επιφάνειες ή σε μέσα υψηλού ιξώδους, αντίστοιχα, 3) την παραγωγή

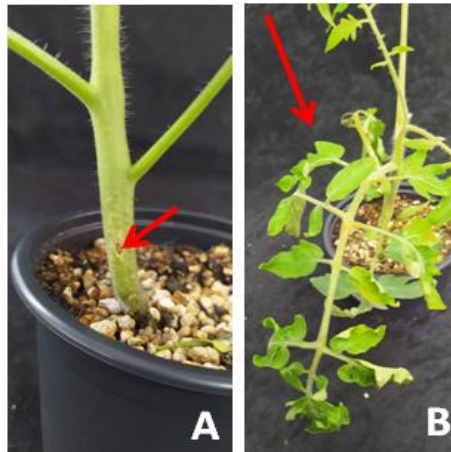
σιδηροφόρων, π.χ. χρυσοβακτίνης και αχρωμοβακτίνης (Dellagi et al., 2005; Franza et al., 2005), 4) του ρυθμού ανάπτυξης, 5) τη χρήση πηγών άνθρακα και αζώτου, αλλά και 6) την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων.

Παρά τη δυσκολία βιολογικής καταπολέμησης του *D. solani* IPO 2222<sup>T</sup> έχουν αναφερθεί ως βιολογικοί παράγοντες ελέγχου τα βακτήρια *Serratia plymuthica* A30, (Czajkowski et al., 2012), *Pseudomonas segetis* P6 (Rodríguez et al., 2020) και *Staphylococcus equorum* EN21 (Vega et al., 2019). Σημαντικό ρόλο στον περιορισμό των συμπτωμάτων της μαλακής σήψης που προκαλεί το *D. solani* φαίνεται να έχουν οι λακτόνες N-ακυλομοσερίνης (AHL) (Fuqua et al., 1994), καθώς εμπλέκονται στο μηχανισμό παρέμβασης (quorum quenching, QQ) του μηχανισμού αίσθησης απαρτίας (quorum sensing, QS) (Rodríguez et al., 2020).

#### **4.4.4) Αξιολόγηση της βιολογικής δράσης επιλεγμένων ενδοφυτικών βακτηρίων σε φυτάρια τομάτας μολυσμένα με *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm)**

Για την αξιολόγηση της *in planta* δράσης των VFAT314, C1.2, C1.5, C3.1, D2.4 και VFFN21 τα βακτήρια αυτά εφαρμόστηκαν σε φυτά τομάτας (*Solanum lycopersicum* cv. belladonna) μέσω ριζοποτίσματος για τη βιολογική καταπολέμηση του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* 4999<sup>T</sup> (Cmm). Η εφαρμογή τους προηγήθηκε εκείνης του φυτοπαθογόνου βακτηρίου κατά 5-7 ημέρες. Η μόλυνση με Cmm έγινε με πρόκληση τεχνητής πληγής για την απευθείας μόλυνση στο σημείο εκείνο αλλά και με συμπληρωματικό ριζοπότισμα.

Η συγκεκριμένη μελέτη διήρκησε 35 ημέρες από την έκθεση των φυτών στο Cmm. Τα φυτά παρακολουθούνταν κάθε μέρα καθ' όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής του πειράματος και σε τακτά χρονικά διαστήματα γίνονταν η καταγραφή των συμπτωμάτων που εκδηλώθηκαν. Η κλίμακα βαθμολόγησης των συμπτωμάτων ορίστηκε από 0 έως 5 με βάση τον αριθμό φύλλων που παρουσίαζαν το χαρακτηριστικό γνώρισμα φύλλο σημαίας ή ημιπληγία (μάρανση μέρους του φυτού). Δηλαδή 0 για φυτά χωρίς συμπτώματα (μηδέν συμπτωματικά φύλλα) και με 1-2-3-4-5 για φυτά που παρουσίαζαν 1-2-3-4 συμπτωματικά φύλλα αντίστοιχα. Με 5 αξιολογήθηκαν τα φυτά εκείνα που εμφάνισαν 5 ή και παραπάνω συμπτωματικά φύλλα. Στη συνέχεια η κλίμακα αυτή χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της σοβαρότητας της ασθένειας, ενώ ακολούθησε συμπληρωματικά και ο υπολογισμός της περιοχής κάτω από την καμπύλη προόδου της νόσου, AUDPC (area under the disease progress curve). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν φυτά μολυσμένα μόνο με Cmm.



**Εικόνα 4.9:** **A)** Σημείο πρόκλησης τεχνητής πληγής και **B)** εμφάνιση «φύλλου σημαίας» σε φυτό τομάτας μολυσμένο με Cmm.

Με βάση τα αποτελέσματα που καταγράφονται στον **Πίνακα 4.6**, σχεδόν σε όλες τις μεταχειρίσεις τα συμπτώματα της ασθένειας εκδηλώθηκαν μετά την 14<sup>η</sup> ημέρα από την έκθεση των φυτών στο Cmm. Εξαίρεση αποτέλεσε η μεταχείριση C1.2, όπου τα συμπτώματα εκδηλώθηκαν μετά την 21<sup>η</sup> ημέρα από την έκθεση των φυτών στο Cmm. Το ποσοστό του αριθμού των συμπτωματικών φυτών είχε αυξητική τάση από την 21<sup>η</sup> έως την 35<sup>η</sup> ημέρα, αλλά όχι σε όλες τις μεταχειρίσεις. Συγκεκριμένα στις μεταχειρίσεις VFFN21+ Cmm και VFAT314 + Cmm, το ποσοστό αυτό ήταν ίδιο από την 21<sup>η</sup> έως την 28<sup>η</sup> ημέρα (AUDPC μηδέν) και την 35<sup>η</sup> μεγαλύτερο.

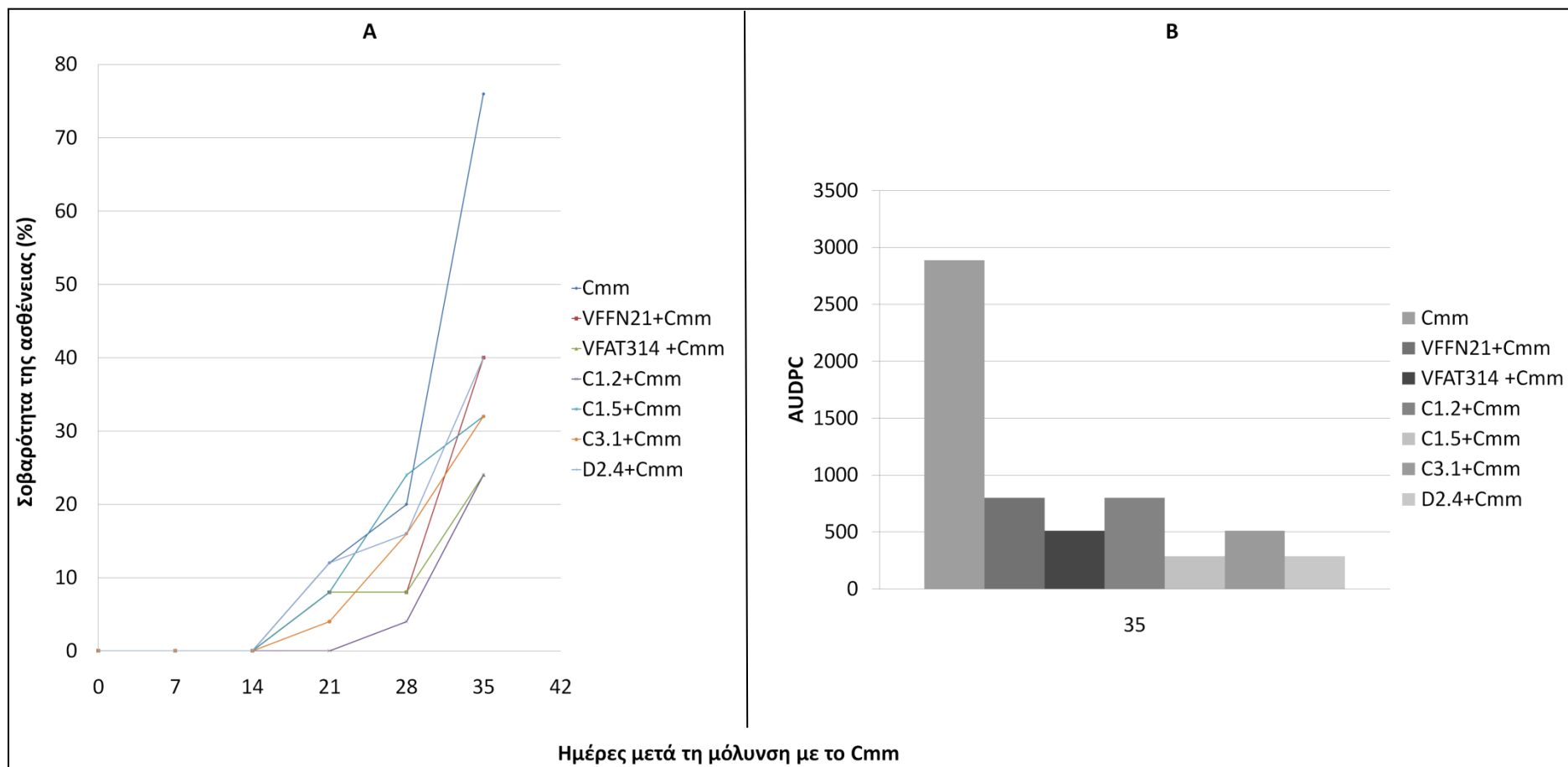
Όσον αφορά το ποσοστό σοβαρότητας της ασθένειας, είχε αυξητική τάση από την 21<sup>η</sup> έως την 35<sup>η</sup> ημέρα έκθεσης των φυτών στο Cmm. Την 35<sup>η</sup> μέρα, φυτά που είχαν μολυνθεί μόνο με Cmm (μάρτυρας), ήταν 100% συμπτωματικά και η σοβαρότητα της ασθένειας ορίστηκε στο 76%. Φυτά στα οποία είχε προηγηθεί εμβολιασμός με VFFN21 και D2.4 ήταν 60% συμπτωματικά και η σοβαρότητα της ασθένειας ορίστηκε στο 40% συμβάλλοντας δηλαδή στη μείωση της σοβαρότητας της ασθένειας σε σχέση με το μάρτυρα στο 52,62%. Φυτά στα οποία είχε προηγηθεί εμβολιασμός με C1.2 και C1.5 ήταν 60% συμπτωματικά και η σοβαρότητα της ασθένειας ορίστηκε στο 24% και 32%, αντίστοιχα. Σε σχέση με το μάρτυρα η εφαρμογή των C1.2 και C1.5 μείωσε τη σοβαρότητα της ασθένειας στο 31,6% και στο 42,10%, αντίστοιχα. Τέλος, φυτά στα οποία είχε προηγηθεί εμβολιασμός με VFAT314 και C3.1 ήταν 40% συμπτωματικά και η σοβαρότητα της ασθένειας ορίστηκε στο 24% και 32%, αντίστοιχα. Σε σχέση με το μάρτυρα η εφαρμογή τους μείωσε τη σοβαρότητα της ασθένειας στο 31,6% και στο 42,10%, αντίστοιχα. Ως εκ τούτου, το βακτήριο που ξεχώρισε για τη δράση του ως Β.Π.Ε. με ικανότητα μείωσης του ποσοστού συμπτωματικών φυτών και της σοβαρότητας ασθένειας λόγω μόλυνσης με Cmm, ήταν το VFAT314.

Στην **Εικόνα 4.10A** παρουσιάζεται με διάγραμμα το ποσοστό σοβαρότητας της ασθένειας την 7<sup>η</sup>, 14<sup>η</sup>, 21<sup>η</sup>, 28<sup>η</sup> και 35<sup>η</sup> ημέρα από τη μόλυνση των φυτών τομάτας με το Cmm, από όπου διαπιστώνεται ότι η σοβαρότητα των συμπτωμάτων είναι σχεδόν διπλάσια στα φυτά που είχαν μολυνθεί μόνο με Cmm. Ακόμα, η εξάπλωση της ασθένειας στα φυτά αποτυπώνεται χαρακτηριστικά και στην **Εικόνα 4.10B** όπου το AUDPC την 35<sup>η</sup> ημέρα, είναι εμφανώς μειωμένο σε φυτά εμβολιασμένα με τα ριζοβακτήρια.

**Πίνακας 4.6:** Καταγραφή της σοβαρότητας ασθένειας σε φυτά τομάτας με *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm).

Μεταχείριση	dpi <sup>β</sup>														
	7			14			21			28			35		
	Συμπτωματικά φυτά %	Σοβαρότητα ασθένειας %	AUDPC	Συμπτωματικά φυτά %	Σοβαρότητα ασθένειας %	AUDPC	Συμπτωματικά φυτά %	Σοβαρότητα ασθένειας %	AUDPC	Συμπτωματικά φυτά %	Σοβαρότητα ασθένειας %	AUDPC	Συμπτωματικά φυτά %	Σοβαρότητα ασθένειας %	AUDPC
Cmm <sup>α</sup> (Μάρτυρας)	0	0	0	0	0	0	60	12	72	80	20	128	100	76	2688
VFFN21+ Cmm	0	0	0	0	0	0	40	8	32	40	8	0	60	40	768
VFAT314 + Cmm	0	0	0	0	0	0	20	8	31,99	20	8	0	40	24	256
C1.2+ Cmm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	4	8	60	24	280
C1.5 + Cmm	0	0	0	0	0	0	20	8	31,99	60	24	256	60	32	224
C3.1 + Cmm	0	0	0	0	0	0	20	4	7,988	40	16	120	40	32	384
D2.4 + Cmm	0	0	0	0	0	0	20	12	71,99	40	16	56	60	40	672

<sup>α</sup> «Cmm»: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* 4999<sup>T</sup>, <sup>β</sup> «dpi»: post inoculated days (μέρες μετά από τη μόλυνση με Cmm).



**Εικόνα 4.10:** Καταγραφή της πορείας ασθένειας σε φυτά τομάτας έως και την 35<sup>η</sup> ημέρα από τη μόλυνση τους με Cmm (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), έχοντας προηγηθεί εμβολιασμός με Β.Π.Ε. (VFAT314, C1.2, C1.5, C3.1, D2.4, VFFN21). **A)** Παρουσίαση της σοβαρότητας της ασθένειας εκφρασμένης επί τοις % και **B)** υπολογισμός της περιοχής κάτω από την καμπύλη προόδου της ασθένειας.



**Εικόνα 4.11:** Φυτά τομάτας 35 ημερών μετά από τη μόλυνση με Cmm (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) που είτε είχαν προηγουμένως εμβολιαστεί με VFFN21, VFAT314, C1.2, C1.5, C3.1, D2.4, είτε όχι (μάρτυρας). Το βέλος δείχνει την μακροσκοπική αύξουσα σειρά ανάπτυξης ανά μεταχείριση.

Την τελευταία ημέρα διεξαγωγής της μελέτης καταγράφηκαν βασικά αγρονομικά χαρακτηριστικά φυτών που είχαν μολυνθεί με Cmm με ή χωρίς εφαρμογή Β.Π.Ε.. Τα χαρακτηριστικά αυτά αφορούσαν το νωπό/ξηρό βάρος βλαστού - ρίζας καθώς και το αντίστοιχο μήκος των τμημάτων αυτών ανά φυτό. Η αξιολόγηση της επίδρασης των Β.Π.Ε.. στην ανάπτυξη φυτών μολυσμένων με Cmm έγινε σε σχέση με το Cmm (μάρτυρα) (**Πίνακας 4.7**).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν, στις μεταχειρίσεις που είχε προηγηθεί εμβολιασμός με VFAT314, C1.5 και D2.4 παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση ( $p \leq 0,05$ ) του μήκους του βλαστού τομάτας κατά 37,17%, 32,62 και 36,56% αντίστοιχα, σε σχέση με το μάρτυρα. Στα φυτά των μεταχειρίσεων αυτών παρατηρήθηκε επίσης στατιστικά σημαντική αύξηση ( $p \leq 0,05$ ) του μήκους της ρίζας της τομάτας κατά 110,19%, 85,14% και 62,5% αντίστοιχα, σε σχέση με το μάρτυρα. Το νωπό και ξηρό βάρος του βλαστού σημείωσε επίσης στατιστικά σημαντική αύξηση κατά 82,69%, 88,17%, 103,56% αντίστοιχα για το νωπό βάρος και κατά 250,56%, 214,77%, 103,97% για το ξηρό βάρος του βλαστού, σε σχέση με το μάρτυρα. Το ξηρό και νωπό βάρος της ρίζας του μάρτυρα, ήταν σημαντικά μικρότερο ( $p \leq 0,05$ ) από εκείνα που εμβολιάστηκαν με τα VFAT314, C1.5 και D2.4. Φυτά που εμβολιάστηκαν με τα παραπάνω ριζοβακτήρια σημείωσαν αύξηση του νωπού και ξηρού βάρους της ρίζας των φυτών κατά 111,58%, 96,99%, 38,62% αντίστοιχα και κατά 175%, 145%, 45% αντίστοιχα. (**Πίνακας 4.8, Εικόνα 4.12**).



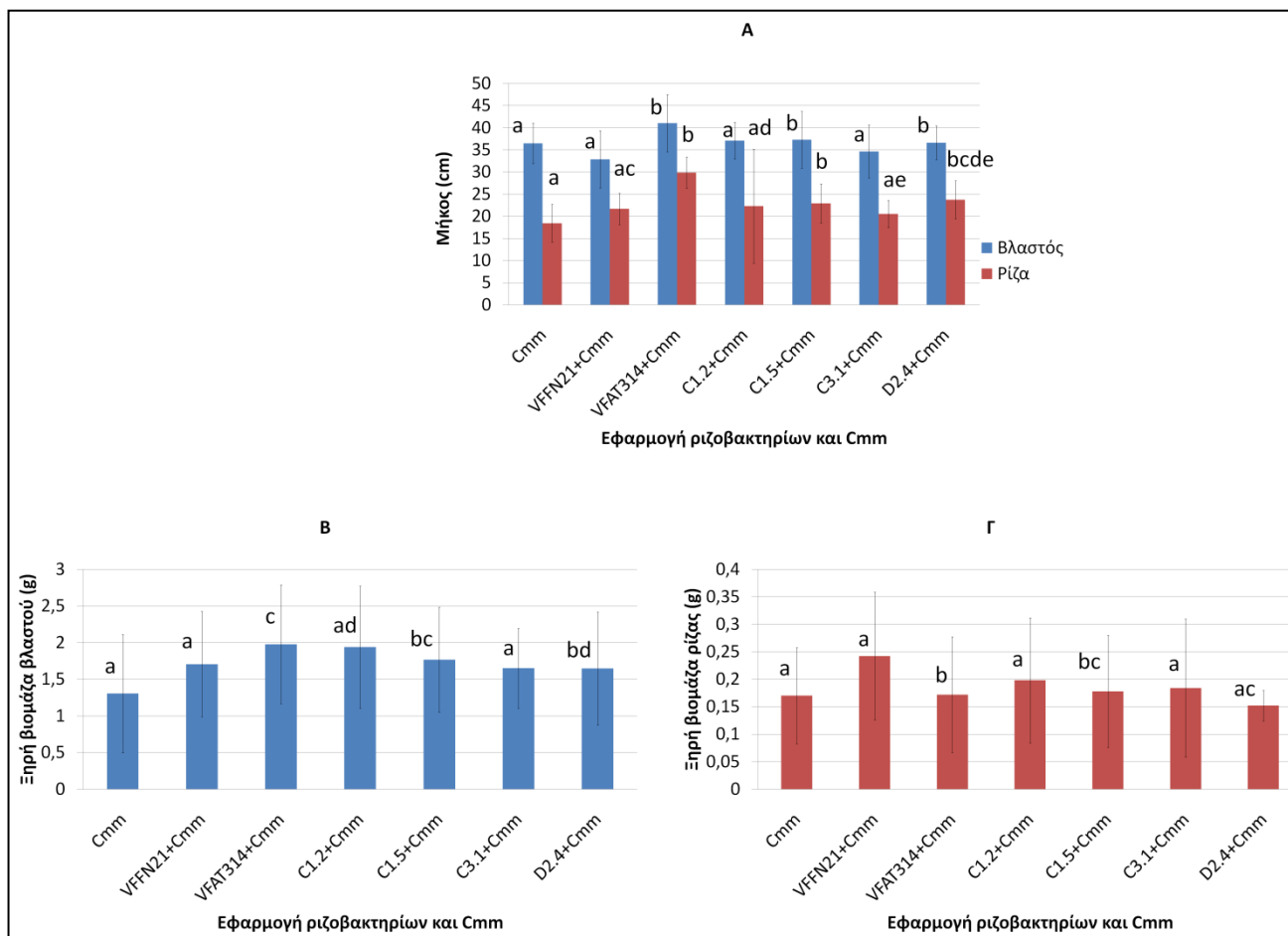
**Πίνακας 4.7:** Καταγραφή του μήκους και της νωπής/ξηρής βιομάζας του υπέργειου και υπόγειου τμήματος ανά φυτό.

Μεταχείριση	35 ημέρες μετά από τον εμβολιασμό με <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Cmm)					
	Μήκος (cm)		Νωπή Βιομάζα (g)		Ξηρή Βιομάζα (g)	
	Βλαστός	Ρίζα	Βλαστός	Ρίζα	Βλαστός	Ρίζα
Cmm	36,48±6,48 a	18,44±3,54 a	15,14±6,20 a	2,33±1,09 a	1,76±0,71 a	0,20±0,087 a
VFFN21+Cmm	32,88± 6,48 a	21,7±3,54 ac	15,41±7,05 a	1,83±0,98 a	1,70± 0,81a	0,24±0,11 a
VFAT314+Cmm	50,04±4,15 b	38,76±12,92 b	27,66±8,13 b	4,93±0,92 bc	6,17±0,83 c	0,55±0,10 b
C1.2+Cmm	37,08±6,39 a	22,28±4,43 ad	19,69±5,56 a	2,16±1,53 a	1,93±0,71 ad	0,19±0,11 a
C1.5+Cmm	48,38±5,97 b	34,14±3,04 b	28,49±7,24 b	4,59±1,41 bc	5,54±0,54 bc	0,49±0,10 bc
C3.1+Cmm	34,64±3,81 a	20,54±4,29 ae	16,55±6,31 a	1,79±0,78 a	1,65±0,77 a	0,18±0,12 a
D2.4+Cmm	49,82±5,95 b	29,96±8,21 bcde	30,82±8,13 b	3,23±0,92 c	3,59±0,74 bd	0,29±0,027 ac

Οι μέσες τιμές στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους σύμφωνα με το LSD ( $p \leq 0,05$ ). Ως «±» συμβολίζεται η τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή.

**Πίνακας 4.8:** Καταγραφή του ποσοστού μεταβολής της αύξησης του μήκους, νωπής και ξηρής βιομάζας βλαστού και ρίζας ανά φυτό μετά από εμβολιασμό με ριζοβακτήρια και μόλυνση με το Cmm, σε σχέση με το μάρτυρα (Cmm) .

Μεταχείριση	Βλαστός			Ρίζα		
	Ποσοστό μεταβολής μήκους (%)	Ποσοστό μεταβολής νωπής βιομάζας (%)	Ποσοστό μεταβολής ξηρής βιομάζας (%)	Ποσοστό μεταβολής μήκους (%)	Ποσοστό μεταβολής νωπής βιομάζας (%)	Ποσοστό μεταβολής ξηρής βιομάζας (%)
VFAT314+Cmm	37,17	82,69	250,56	110,19	111,58	175
C1.5+Cmm	32,62	88,17	214,77	85,14	96,99	145
D2.4+Cmm	36,56	103,56	103,97	62,47	38,62	45



**Εικόνα 4.12:** Καταγραφή του μήκους **(Α)** και της ξηρής βιομάζας **(Β)** του βλαστού και **(Γ)** της ρίζας φυτών τομάτας μολυσμένων με Cmm με ή χωρίς προηγούμενο εμβολιασμό με ένα από τα ριζοβακτήρια (VFFN21, VFAT314, C1.2, C1.5, C3.1 και D2.4). Η γραμμή σφάλματος υποδεικνύει την τυπική απόκλιση ( $\pm$ ) από τη μέση τιμή.

Στις περιπτώσεις βιολογικής αντιμετώπισης του Cmm στην τομάτα, η φυτοπροστατευτική δράση των PGPB έχει αποδοθεί σε μια σειρά διαδικασιών που αφορούν το φυτό αλλά και το ίδιο το φυτοπαθογόνο. Διαδικασίες που έχουν φυτοπροστατευτική δράση αφορούν την αλλαγή της γονιδιακής έκφρασης στην τομάτα, την πρόκληση επαγόμενης διασυστηματικής ανθεκτικότητας (induced systemic resistance, ISR) από το σαλικιλικό οξύ, τη συσσώρευση καροτενοειδών και χλωροφύλλης α και β, την πάχυνση της άνω και κάτω επιδερμίδας των φύλλων, την εναπόθεση βιοπολυμερών με προστατευτικές ιδιότητες στα επιδερμικά κύτταρα, τη δράση του ενζύμου υπεροξειδάση (Takishita et al., 2018; Kolomiiets et al., 2019). Από την άλλη, η δράση των PGPB στη μείωση της δραστηριότητας του Cmm για τον περιορισμό της αποίκησης και της ανάπτυξης του στο πάνω μέρος του εσωτερικού της τομάτας (Jang et al., 2022) και η παραγωγή λυτικών ενζύμων (Gautam et al., 2019) έχουν συνδεθεί με τη δράση των PGPB με δράση Β.Π.Ε. κατά του Cmm, αλλά και άλλων φυτοπαθογόνων βακτηρίων (Saber et al., 2015). Πέρα από τον έλεγχο του Cmm σε φυτά τομάτας, έχει δειχθεί ότι τα PGPB, όπως στελέχη *Pseudomonas* ενισχύουν παράλληλα αναπτυξιακές φυτικές παραμέτρους, πιθανόν λόγω της παραγωγής IAA, η οποία έχει συνδεθεί με την αύξηση του μήκους της ρίζας (Ghadamgahi et al., 2022).

Στην παρούσα εργασία το VFFN21 φάνηκε ότι έχει ικανότητα περιορισμού της εξάπλωσης της ασθένειας στα φυτά τομάτας και μείωσης της σοβαρότητας των συμπτωμάτων τους, χωρίς να ευνοεί την ανάπτυξη τους, κάτι που είχε παρατηρηθεί και σε μη προσβεβλημένα από το Cmm φυτά τομάτας. Ωστόσο η φυτοπροστατευτική δράση του VFFN21 δεν ήταν το ίδιο καλή σε σχέση με τα *Enterobacter*. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν αναφορές στις οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί PGPB του γένους *Enterobacter* ή *Lelliottia* για την αντιμετώπιση αυτού του παθογόνου. Ίσως η παρούσα εργασία, να αποτελεί την πρώτη αναφορά εφαρμογής *Enterobacter* και *Lelliottia* ως Β.Π.Ε. για το μετριασμό των συμπτωμάτων που εμφανίζονται μετά από μόλυνση Cmm σε φυτά τομάτας προάγοντας ταυτόχρονα την ανάπτυξη τους. Τέλος, ενδιαφέρον θα είχε η συνέχιση της διερεύνησης της φυτοπροστατευτικής και φυτοπροωθητικής δράσης των υπό μελέτη βακτηρίων κατά του Cmm στην τομάτα κάνοντας πειράματα μεγαλύτερης κλίμακας υπό θερμοκηπιακές συνθήκες.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη, από τα ριζόβια του κουκιού, η συντριπτική τους πλειονότητα ανήκε στα γονιδιωματικά είδη gsF-2, gsB και gsA του *Rhizobium leguminosarum* species complex καθώς και των *Rhizobium laguerreae* και *Rhizobium ruizarguesonis*. Τα υπόλοιπα ριζόβια ταξινομήθηκαν ως *Rhizobium hidalgonense* και ως *Rhizobium* sp. VFEP82 διαφορετικής φυλογένειας από εκείνη του φυλογενετικά πλησιέστερου είδους *Rhizobium*, το οποίο είναι πολύ πιθανό να αποτελεί μια νέα γενεαλογική σειρά. Το γεγονός ότι στελέχη *Rhizobium laguerreae* βρέθηκαν σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας υποδηλώνει ότι είναι πιθανώς ο κύριος συμβιώτης του κουκιού στις περιοχές δειγματοληψίας. Επιπλέον, δε βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της ριζοβιακής ποικιλότητας και της σχετικής αφθονίας με τους γονότυπους του ξενιστή και τα χαρακτηριστικά του εδάφους. Με εξαίρεση την απομόνωση VFEP82 όπου δεν κατέστη εφικτή η ενίσχυση του γονιδίου *nodC*, τα ριζόβια του κουκιού έφεραν το συμβίοτυπο sv. *viciae* με τους δύο κύριους τύπους *nodC* (A και C) να έχουν βρεθεί επίσης και σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ των απλοτύπων *nodC*, της γεωγραφικής προέλευσης και του χρωμοσωμικού υποβάθρου των απομονώσεων, γεγονός που επιβεβαίωσε τα προηγούμενα ευρήματα. Ο sv. *viciae* περιλαμβάνει στελέχη με εξαιρετικά διαφοροποιημένα γονίδια *nodC*, ανεξάρτητα από το χρωμοσωμικό υπόβαθρο, τη γεωγραφική περιοχή ή τον ξενιστή απομόνωσης.

Τα ριζόβια της φασολιάς συνδέθηκαν με τα στελέχη *Rhizobium redzepovicii*, *Rhizobium hidalgonense*, *Rhizobium anhuiense*, *Rhizobium croatiense*, *Rhizobium sophoriradicis*, *Rhizobium azibense*, *Rhizobium tropici*, ενώ ένα σύνολο ριζοβίων που τα εκπροσωπούσε το PVKV3 είναι πολύ πιθανό να αποτελούν μια νέα γενεαλογική σειρά. Τα περισσότερα στελέχη ανήκαν στο συμβίοτυπο sv. *phaseoli* και έφεραν τα αλληλόμορφα α-, γ-α και γ-β του γονιδίου *nodC*, ενώ λίγα από αυτά ανήκαν στο sv. *gallicum* και *tropici*. Η ανάλυση των αλληλουχιών *nodC* του sv. *phaseoli* είναι σύμφωνη με προηγούμενα ευρήματα σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες υποδηλώνοντας την αμερικανική προέλευση του συμβιότυπου. Τα ευρήματα που προέκυψαν αυξάνουν τη γνώση αναφορικά με τη ποικιλομορφία, τη γεωγραφική κατανομή και την εξέλιξη των ριζοβίων φασολιάς στα ευρωπαϊκά εδάφη και επιπλέον παρέχουν έναν φυσικό πόρο για την επιλογή ριζοβίων περισσότερο ανταγωνιστικών, προσαρμοσμένων στις τοπικές συνθήκες και με υψηλή απόδοση. Τα ριζόβια του φτερωτού μπιζελιού ταυτοποιήθηκαν ως *Mesorhizobium ciceri* με συμβίοτυπο sv. *biserrulae*, ενώ η ταυτοποίηση των μη φυματιογενών ενδοφυτικών ριζοβακτηρίων από φυμάτια κουκιού, φασολιάς και εβένου κατέταξε τις απομονώσεις ως *Enterobacter* sp., *Bacillus* sp., *Ochrobactrum* sp, *Shinella* spp, *Pseudomonas*

spp, *Achromobacter* sp., *Microbacterium* spp., *Georgenia* sp., *Kocuria* spp., *Roseomonas* sp., *Sphingomonas* sp. και *Phyllobacterium* sp.

Η δοκιμασία επιβεβαίωσης ταυτότητας επιβεβαίωσε ότι τα ριζόβια κουκιού και φασολιάς είναι πραγματικοί μικροσυμβιώτες για τα φυτά αυτά. Η αξιολόγηση της ικανότητας προώθησης της ανάπτυξης του κουκιού μετά από εμβολιασμό του σπόρου με στελέχη *Rhizobium* έδειξε ότι το στέλεχος VFLE1 συνέβαλε στην αύξηση του μήκους και της ξηρής βιομάζας του βλαστού των φυτών, ενώ ο μέγιστος αριθμός φυματίων παρατηρήθηκε σε φυτά εμβολιασμένα με το VFEP162. Η παρατήρηση αυτή αποτελεί ένδειξη ότι μόνο η προώθηση της αύξησης του αριθμού φυματίων δε συσχετίζεται πάντα με την ικανότητα βελτίωσης της ανάπτυξης του φυτού-ξενιστή.

Με βάση τις συνθήκες διεξαγωγής των βιοδοκιμασιών, όλα τα εξεταζόμενα στελέχη είχαν ικανότητα διαλυτοποίησης φωσφόρου και παραγωγής σιδηροφόρων, ενώ ικανότητα παραγωγής αυξίνης καταγράφηκε μόνο στα *Rhizobium*, στα *Bradyrhizobium*, VUCR24 και VULI11, και στο *Enterobacter* sp. VFAT314. Ικανότητα παραγωγής βιοεπιφανειοδραστικών ενώσεων καταγράφηκε μόνο στο *Bradyrhizobium* VUEP21 και στο *Bacillus* VFFN21. Η αξιολόγηση της ικανότητας επιβίωσης των επιλεγμένων ριζοβακτηρίων σε αβιοτικές συνθήκες καταπόνησης (θερμοκρασία, αλατότητα pH, υδατική καταπόνηση), έδειξε διαφορετικό αβιοτικό προφίλ ανοχής μεταξύ των εξεταζόμενων γενών. Αναλόγως της εξεταζόμενης βιοδοκιμασίας, περισσότερο ευαίσθητα χαρακτηρίστηκαν τα ριζόβια και ο *Bacillus* VFFN21, ενώ τα *Enterobacter* και η *Lelliottia* D2.4 επέδειξαν σημαντικά αυξημένη ικανότητα επιβίωσης στις περισσότερες συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης.

Η αξιολόγηση της αντιμυκητιακής δράσης των ριζοβίων με την τεχνική της διπλής καλλιέργειας έδειξε ότι τα εξεταζόμενα στελέχη δεν είχαν ανταγωνιστική δράση κατά των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*, *Verticillium dahliae* εν αντιθέσει με τα εξεταζόμενα ενδοφυτικά ριζοβακτήρια (*Enterobacter*, *Lelliottia* D2.4 και *Bacillus* VFFN21) που αποδείχθηκε ότι δρουν ως βιολογικοί παράγοντες ελέγχου (Β.Π.Ε.). Επιπλέον, η μελέτη της ανταγωνιστικότητας των εξεταζόμενων Β.Π.Ε. λόγω παραγωγής πτητικών οργανικών ενώσεων έδειξε απουσία αντιμυκητιακής δράσης, η οποία όμως μπορεί να οφείλεται στην επιλογή του μέσου ανάπτυξης των βακτηρίων. Η χρήση των CFSs των Β.Π.Ε. περιόρισε ή παρεμπόδισε την ανάπτυξη των μυκηλίων των *Alternaria alternate* και *Botrytis cinerea*, αλλά όχι σε όλες τις περιπτώσεις, ενώ παρατηρήθηκε αδυναμία εμφάνισης αντιμυκητιακής δράσης κατά των *Fusarium oxysporum* και *Verticillium dahliae*, με εξαίρεση το VFFN21<sub>CFS</sub> το οποίο περιόρισε την ανάπτυξη του μυκηλίου του *Fusarium oxysporum*. Η χρήση διαφορετικών βιοδοκιμασιών για τη διερεύνηση της

αντιμυκητιακής δράσης ανέδειξε διαφοροποιήσεις ως προς το βαθμό παρεμπόδισης των παθογόνων μυκήτων αλλά και μεταξύ των Β.Π.Ε. Η ύπαρξη αντιβακτηριακής δράσης έναντι των *Pseudomonas syringae* (3), *Dickeya solani*, *Acidovorax citrulli* (3), *Xanthomonas campestris*, *Erwinia amylovora*, *Pectobacterium brasiliense* (2), και *Clavibacter* (3) πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο «εξ' επαφής» διάχυσης σε στερεό θρεπτικό (Agar-Diffusion Method). Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την ύπαρξη αντιβακτηριακής δράσης έναντι των προαναφερόμενων μικροοργανισμών από τα εξεταζόμενα ενδοφυτικά ριζοβακτήρια (*Enterobacter*, *Lelliottia* D2.4 και *Bacillus* VFFN21), ενώ από τα ριζόβια μόνο το VUL11 εμφάνισε παρεμποδιστική δράση κατά των τριών *Clavibacter*. Από τα ενδοφυτικά ριζοβακτήρια ξεχώρισαν περισσότερο τα *Enterobacter*, *Lelliottia* D2.4 (λόγω της παρεμποδιστικής τους δράσης και στα 14 φυτοπαθογόνα βακτήρια) και λιγότερο το *Bacillus* VFFN21 που παρεμπόδισε την ανάπτυξη 8 εκ των 14 φυτοπαθογόνων βακτηρίων.

Η *in planta* εφαρμογή των Β.Π.Ε (*Enterobacter*, *Lelliottia* D2.4 και *Bacillus* VFFN21) ως εμβολιαστικό υλικό σε μη ψυχανθή φυτά οδήγησε στην ανάδειξη διαφορετικών στελεχών. Με βάση τις συνθήκες διεξαγωγής των βιοδοκιμασιών, το στέλεχος D2.4 ευνόησε την ανάπτυξη φυτών τομάτας απουσία και παρουσία του *Clavibacter* ως βιοτικού παράγοντα καταπόνησης. Στην πρώτη περίπτωση τα φυτά εμφάνισαν μεγαλύτερη νωπή και ξηρή βιομάζα βλαστού και περισσότερη ξηρή βιομάζα ρίζας. Στη 2<sup>η</sup> περίπτωση το D2.4 συνέβαλε τόσο στην ανάπτυξη των μολυσμένων φυτών τομάτας όσο και στο μετριασμό των συμπτωμάτων της ασθένειας που προκαλεί το *Clavibacter*. Εκτός από το D2.4, το *Enterobacter* VFAT314 συνέβαλε και αυτό στην ανάπτυξη φυτών τομάτας που ήταν μολυσμένα με *Clavibacter*, καθώς φυτά που ήταν εμβολιασμένα με το στέλεχος αυτό είχαν μεγαλύτερο μήκος, νωπή και ξηρή βιομάζα και ήταν περισσότερο υγιή σε σχέση με τα φυτά που είτε είχαν εμβολιαστεί με τους υπόλοιπους Β.Π.Ε., είτε όχι. Η αξιολόγηση της βιολογικής προστασίας κονδύλων πατάτας και καρότου από το φυτοπαθογόνο *D. solani* IPO 2222 έδειξε ότι η εφαρμογή των παραπάνω Β.Π.Ε. δεν παρεμπόδισε την πρόκληση μαλακής σήψης, παρότι *in vitro* αυτοί λειτούργησαν ανταγωνιστικά. Τέλος, με βάση τις συνθήκες διεξαγωγής των βιοδοκιμασιών, σε φυτά τομάτας και μελιτζάνας εμβολιασμένα με το *Enterobacter* C1.5 και το *Enterobacter* C1.2, αντίστοιχα, η θνησιγόνος και μολυσματική δράση του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea* ήταν μικρότερη. Η παρατηρούμενη διαφοροποίηση της φυτοπροστατευτικής δράσης αποτελεί ένδειξη της σημασίας της αλληλεπίδρασης μεταξύ φυτού-Β.Π.Ε. παρουσία και απουσία φυτοπαθογόνου παράγοντα και ενισχύει την αναγκαιότητα για την εύρεση βακτηρίων για την εξατομικευμένη αντιμετώπιση ασθενειών (βακτηριακής ή μυκητιακής προέλευσης) που αναπτύσσει το κάθε φυτό-ξενιστής.

## ΠΡΩΤΟΤΥΠΙΑ ΚΑΙ ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η παρούσα διδακτορική συνέβαλε στην παροχή νέας γνώσης στον τομέα της φυλογένειας και της ταξινόμησης στελεχών απομονωμένων από φυμάτια ψυχανθών φυτών, καθώς και στον τομέα της βιολογικής καταπολέμησης ασθενειών προκαλούμενες από φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς, με τη χρήση γενετικών πόρων απομονωμένων από φυμάτια ψυχανθών. Τα πρωτότυπα στοιχεία που προέκυψαν από την παρούσα διατριβή είναι τα εξής:

- Πρώτη φορά παγκοσμίως εντοπίστηκε ο συμβιότυπος *viciae* σε *Rhizobium hidalgonense*, ενώ σε φυμάτια κουκιού εντοπίστηκε *Rhizobium* sp. με διαφορετική γενεαλογική σειρά από εκείνη του φυλογενετικά πλησιέστερου *Rhizobium grahamii* και είναι πολύ πιθανό να ανήκει σε μια νέα γενεαλογική σειρά.
- Πρώτη φορά σε ευρωπαϊκά εδάφη καταγράφηκε στέλεχος *Rhizobium sophoriradicis* sv. *phaseoli* με γονίδιο *nodC* που φέρει το αλληλόμορφο  $\gamma$ -b.
- *Rhizobium* sp. sv. *phaseoli* με διαφορετική γενεαλογική σειρά από εκείνη του φυλογενετικά πλησιέστερου *Rhizobium etli* εντοπίστηκε για πρώτη φορά και θεωρήθηκε ως νέο είδος.
- Διαπιστώθηκε η μείωση του ποσοστού θνησιμότητας και ασθένειας φυτών τομάτας και μελιτζάνας που ήταν προσβεβλημένα από το φυτοπαθογόνο μύκητα *Botrytis cinerea* ως αποτέλεσμα της δράσης στελεχών *Enterobacter* spp.
- Διαπιστώθηκε η μείωση του ποσοστού ασθένειας και η προώθηση της ανάπτυξης φυτών τομάτας που ήταν προσβεβλημένα από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ως αποτέλεσμα της δράσης στελεχών *Enterobacter* spp. και *Lelliottia* sp.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή συνέβαλε, μέσω παροχής κατάλληλου βιολογικού υλικού, στην εκπόνηση μέρους των πειραματικών δραστηριοτήτων των διδακτορικών διατριβών των κ. Αναστάσιου Γάτσιου, κ. Ιωάννη Καραβίδα και κ. Παναγιώτη Καλοζούμη, στο Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής του ΓΠΑ.

Τα συνολικά ευρήματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής έχουν πολυεπίπεδη απήχηση και θα συμβάλουν σε διάφορους τομείς, επιτρέποντας: i) την ανάπτυξη της βιώσιμης γεωργίας σε περιοχές με διαφορετικές τοπικές αγρο-κλιματικές συνθήκες λόγω της επιλογής και αξιοποίησης κατάλληλων συνδυασμών εγχώριων γενετικών πόρων (γηγενείς ποικιλίες, τοπική μικροβιακή χλωρίδα), ii) την ανάδειξη των συγκριτικών πλεονεκτημάτων και τη βελτίωση της

αναγνωρισιμότητας και της ανταγωνιστικότητας των εγχώριων γενετικών πόρων στις διεθνείς αγορές μέσω αξιοποίησης και προώθησης στην αγορά σπόρων υψηλής αγρονομικής και διατροφικής αξίας, καθώς και μικροβιακών σκευασμάτων, iii) τη μείωση των εθνικών δαπανών για την εισαγωγή οσπρίων για ανθρώπινη κατανάλωση και ζωοτροφές, προσδίδοντας στην Ελλάδα αυξημένη αυτάρκεια, καθώς ένα πολύ υψηλό ποσοστό (60%-95%) των καταναλωτικών αναγκών καλύπτεται με εισαγωγές, iv) αυξημένα οικονομικά οφέλη στους παραγωγούς αφενός λόγω της μείωσης κόστους καλλιέργειας, (δυνατότητα παραγωγής εγχώριων σπόρων, μείωση αζωτούχων λιπασμάτων και γεωργικών φαρμάκων) και αφετέρου λόγω της υψηλής προστιθέμενης αξίας στα γεωργικά προϊόντα όχι μόνο των ψυχανθών αλλά κι άλλων καλλιεργειών, όπως τα σιτηρά και τα λαχανοκομικά, μέσω της εφαρμογής σχημάτων αμειψισποράς, v) τη μείωση συνθετικών εισροών αγροχημικών μειώνοντας το οικολογικό αποτύπωμα και προσδίδοντας έτσι αυξημένα περιβαλλοντικά οφέλη.



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abatenh, E., Gizaw, B., Tsegaye, Z. & Wassie, M. (2017). The role of microorganisms in bioremediation— A Review. *Open Journal of Environmental Biology*, 2, 38–46.
- Abd El-Megeed, F. H., & Mohiy, M. (2022). Improving productivity of some bread wheat cultivars under water deficit stress using endophytic *Bacillus* sp. NGB-WhE3. *Egyptian Journal of Botany*, 62(1), 275–290. <https://doi.org/10.21608/ejbo.2021.102234.1814>.
- Abd-Alla, M. H. (1998). Growth and siderophore production in vitro of *Bradyrhizobium* (*Lupin*) strains under iron limitation. *European Journal of Soil Biology*, 34(2), 99–104. [https://doi.org/10.1016/S1164-5563\(99\)80007-7](https://doi.org/10.1016/S1164-5563(99)80007-7).
- Abdelaal, K., AlKahtani, M., Attia, K., Hafez, Y., Király, L., & Künstler, A. (2021). The role of plant growth-promoting bacteria in alleviating the adverse effects of drought on plants. *Biology*, 10(6), 520. <https://doi.org/10.3390/biology10060520>.
- Abdelfattah, A., Tack, A. J. M., Lobato, C., Wassermann, B., & Berg, G. (2022). From seed to seed: The role of microbial inheritance in the assembly of the plant microbiome. *Trends in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.10.009>.
- Abdelfattah, A., Wisniewski, M., Schena, L., & Tack, A. J. M. (2021). Experimental evidence of microbial inheritance in plants and transmission routes from seed to phyllosphere and root. *Environmental Microbiology*, 23(4), 2199–2214. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15392>.
- Abdel-Lateif, K. S., Hewedy, O. A., & El-Zanaty, A. F. M. (2016). Phylogenetic analysis of 23S rRNA gene sequences of some *Rhizobium leguminosarum* isolates and their tolerance to drought. *African Journal of Biotechnology*, 15(35). <https://doi.org/10.4314/ajb.v15i35>
- Abdel-Salam, M. S., Ibrahim, S. A., Abd-El-Halim, M. M., Badawy, F. M., & Abo-Aba, S. E. M. (2010). Phenotypic characterization of indigenous Egyptian Rhizobial strains for abiotic stresses performance. *Journal of American Science*, 6(9).
- Abeles, F. B., Morgan, P. W., & Saltveit, M. E. Jr. (1992). *Ethylene in Plant Biology*, 2nd Edn. San Diego, CA: Academic Press.
- Abi-Ghanem, R., Carpenter-Boggs, L., & Smith, J. L. (2011). Cultivar effects on nitrogen fixation in peas and lentils. *Biology and Fertility of Soils*, 47(1), 115–120. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0492-6>
- Abo-Elyousr, K. A. M., Khalil Bagy, H. M. M., Hashem, M., Alamri, S. A. M., & Mostafa, Y. S. (2019). Biological control of the tomato wilt caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* using formulated plant growth-promoting bacteria. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 29(1), 54. <https://doi.org/10.1186/s41938-019-0152-6>.
- Acevedo, E., Galindo-Castañeda, T., Prada, F., Navia, M. & Romero, H. M. (2014). Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Colombia. *Applied Soil Ecology*, 80, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.03.011>.
- Adams, M. A., Buchmann, N., Sprent, J., Buckley, T. N., & Turnbull, T. L. (2018). Crops, nitrogen, water: are legumes friend, foe, or misunderstood ally? *Trends in Plant Science*, 23(6), 539–550. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.02.009>
- Adhikari, D., Itoh, K., & Suyama, K. (2013). Genetic diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodulating rhizobia in Nepal. *Plant and Soil*, 368(1), 341–353. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1518-7>
- Adhikari, M., Yadav, D. R., Kim, S. W., Um, Y. H., Kim, H. S., Lee, S. C., Song, J. Y., Kim, H. G., & Lee, Y. S. (2017). Biological control of bacterial fruit blotch of watermelon pathogen (*Acidovorax citrulli*) with rhizosphere associated bacteria. *The Plant Pathology Journal*, 33(2), 170–183. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.09.2016.0187>
- Aguilar, O. M., López, M. V., Riccillo, P. M., González, R. A., Pagano, M., Grasso, D. H., Pühler, A., & Favelukes, G. (1998). Prevalence of the *Rhizobium etli*-like allele in genes coding for 16S rRNA among the indigenous rhizobial populations found associated with wild beans from the Southern Andes in Argentina. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3520–3524. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.9.3520-3524.1998>
- Aguilar, O. M., Riva, O., & Peltzer, E. (2004). Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(37), 13548–13553. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405321101>.
- Ahmad, P., Alyemeni, M.N., Wijaya, L., Alam, P., Ahanger, M. A. & Alamri SA (2017). Jasmonic acid alleviates negative impacts of cadmium stress by modifying osmolytes and antioxidants in faba bean

- (*Vicia faba* L.) *Archives of Agronomy and Soil Science*, 63 (13), 1889-1899. <https://doi.org/10.1080/03650340.2017.1313406>.
- Ahemad, M., & Khan, M.S. (2012). Assessment of plant growth promoting activities of rhizobacterium *Pseudomonas putida* under insecticide stress. *Annals of Microbiology*, 62(2),1531-1540. DOI: 10.1007/s13213-011-0407-2.
- Ahmed, B., Zaidi, A., Khan, Mohd. S., Rizvi, A., Saif, S., & Shahid, M. (2017). Perspectives of plant growth promoting rhizobacteria in growth enhancement and sustainable production of tomato. In A. Zaidi & M. S. Khan (Eds.), *Microbial Strategies for Vegetable Production* (pp. 125–149). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-54401-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-54401-4_6).
- Ahmed, A. & Hasnain, S. (2014). Auxins as one of the factors of plant growth improvement by plant growth promoting rhizobacteria. *Polish Journal of Microbiology*, 63, 261–266.
- Akça, A., & Tozlu, E. (2021). The investigation of biological control opportunities against gray mold causing *Botrytis cinerea* in eggplant. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.a.vi.953977>.
- Akhtar, S. S., Amby, D. B., Hegelund, J. N., Fimognari, L., Großkinsky, D. K., Westergaard, J. C., Müller, R., Moelbak, L., Liu, F., & Roitsch, T. (2020). *Bacillus licheniformis* FMCH001 increases water use efficiency via growth stimulation in both normal and drought conditions. *Frontiers in Plant Science*, 11, 297. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00297>.
- Alam, S., Khalil, S., Ayub, N., & Rashid, M. (2002). *In vitro* solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganism (PSM) from maize rhizosphere. *International Journal of Agriculture and Biology*, 4(4):454-458.
- Alami, Y., Achouak, W., Marol, C., & Heulin, T. (2000). Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3393–3398. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3393-3398.2000>.
- Albert, O. M., OlajumokeAfuape, A., & Jiboku, O. O. (2021). Biocontrol abilities of six selected rhizospheric bacteria from edible fruit bearing trees against phytopathogenic (*Xanthomonas campestris* and *Pseudomonas syringae*). 3(8).
- Alemayehu, D., & Dechassa, N. (2022). Inoculating faba bean seed with *Rhizobium* bacteria increases the yield of the crop and saves farmers from the cost of applying phosphorus fertilizer. *International Journal of Plant Production*, 16(2), 261–273. <https://doi.org/10.1007/s42106-022-00187-3>.
- Ali, B. (2015). Bacterial auxin signaling: comparative study of growth induction in *A. thaliana* and *Triticum aestivum*. *Turkish Journal of Botany*, 39, 1–9.
- Ali, B., Sabri, A.N., Ljung, K. & Hasnain, S. (2009). Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum*. *Letters in Applied Microbiology*, 48(5), 542–547. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02565.x>.
- Ali, N., Pang, Z., Wang, F., Xu, B., & El-Seedi, H. R. (2022). Lipopeptide biosurfactants from *Bacillus* spp.: types, production, biological activities, and applications in food. *Journal of Food Quality*, e3930112. <https://doi.org/10.1155/2022/3930112>.
- Ali, S. F., Rawat, L. S., Meghvansi, M. K., & Mahna, S. K. (2009). Selection of stress-tolerant rhizobial isolates of wild legumes growing in dry regions of Rajasthan, India. *Journal of Agricultural and Biological Science*. [http://www.arnjournals.com/jabs/research\\_papers/rp\\_2009/jabs\\_0109\\_105.pdf](http://www.arnjournals.com/jabs/research_papers/rp_2009/jabs_0109_105.pdf).
- Ali, S., Hameed, S., Shahid, M., Iqbal, M., Lazarovits, G., & Imran, A. (2020). Functional characterization of potential PGPR exhibiting broad-spectrum antifungal activity. *Microbiological Research*, 232, 126389. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126389>.
- Alikhani, H. A., & Mohamadi, L. (2010). Assessing tolerance of rhizobial lentil symbiosis isolates to salinity and drought in dry land farming condition. 4.
- Alikhani, H. A., Saleh-Rastin, N., & Antoun, H. (2006). Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. *Plant and Soil*, 287(1), 35–41. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9059-6>.
- Alikhani, H. A., Saleh-Rastin, N., & Antoun, H. (2007). Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. In E. Velázquez & C. Rodríguez-Barrueco (Eds.), *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*, 5–41. Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5765-6\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5765-6_4).
- Allen, O. N., & Allen, E. K. (1981). *The Leguminosae, a Source Book of Characteristics, Uses, and Nodulation*. University of Wisconsin Press.
- Allito, B. B., Ewusi-Mensah, N., Logah, V., & Hunegnaw, D. K. (2021). Legume-rhizobium specificity effect on nodulation, biomass production and partitioning of faba bean (*Vicia faba* L.). *Scientific Reports*, 11(1), 3678. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83235-8>.

- Almoneafy, A. A., Kakar, K. U., Nawaz, Z., Li, B., saand, M. A., Chun-lan, Y., & Xie, G.-L. (2014). Tomato plant growth promotion and antibacterial related-mechanisms of four rhizobacterial *Bacillus* strains against *Ralstonia solanacearum*. *Symbiosis*, 63(2), 59–70. <https://doi.org/10.1007/s13199-014-0288-9>.
- Almoneafy, A.A., Moustafa-Farag, M., & Mohamed, H.I. (2021). The auspicious role of plant growth-promoting rhizobacteria in the sustainable management of plant diseases. In *Plant Growth-Promoting Microbes for Sustainable Biotic and Abiotic Stress Management*, Springer Nature, 251–283. DOI: 10.1007/978-3-642-13612-2\_7.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- Álvarez-Martínez, E. R., Valverde, Á., Ramírez-Bahena, M. H., García-Fraile, P., Tejedor, C., Mateos, P. F., Santillana, N., Zúñiga, D., Peix, A., & Velázquez, E. (2009). The analysis of core and symbiotic genes of rhizobia nodulating *Vicia* from different continents reveals their common phylogenetic origin and suggests the distribution of *Rhizobium leguminosarum* strains together with *Vicia* seeds. *Archives of Microbiology*, 191(8), 659–668. <https://doi.org/10.1007/s00203-009-0495-6>
- Amarger, N. (2001). Rhizobia in the field. *Advances in Agronomy*, 73, 109–168. [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2113\(01\)73006-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2113(01)73006-4).
- Amarger, N., Macheret, V., & Laguerre, G. (1997). *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(4), 996–1006. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-4-996>
- Ambreetha, S. & Balachandar, D. (2019). Rhizobacteria-mediated root architectural improvement: a hidden potential for agricultural sustainability. In: Kumar, A., Meena, V. (eds) *Plant growth promoting rhizobacteria for agricultural sustainability*. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-7553-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-981-13-7553-8_6).
- Ampomah, O. Y., & Huss-Danell, K. (2016). Genetic diversity of rhizobia nodulating native *Vicia* spp. in Sweden. *Systematic and Applied Microbiology*, 39(3), 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.02.002>.
- Andrews, M., De Meyer, S., James, E. K., Stępkowski, T., Hodge, S., Simon, M. F., & Young, J. P. W. (2018). Horizontal transfer of symbiosis genes within and between rhizobial genera: occurrence and importance. *Genes*, 9(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/genes9070321>.
- Anderson, A. J., and Kim, Y. C. (2018). Biopesticides produced by plantprobiotic *Pseudomonas chlororaphis* isolates. *Crop Protection*, 105, 62–69. doi: 10.1016/j.cropro.2017.11.009.
- Anith, K. n., Nysanth, N. S., & Natarajan, C. (2021). Novel and rapid agar plate methods for *in vitro* assessment of bacterial biocontrol isolates' antagonism against multiple fungal phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 73(2), 229–236. <https://doi.org/10.1111/lam.13495>.
- Ansari, R.A., Mahmood, I., Rizvi, R., Sumbul, A. Safiuddin. (2017). Siderophores: augmentation of soil health and crop productivity. In: Kumar, V., Kumar, M., Sharma, S., Prasad, R. (eds) *Probiotics in agroecosystem*. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-4059-7\\_15](https://doi.org/10.1007/978-981-10-4059-7_15).
- Ashraf, M., Hasnain, S., & Berge, O. (2006). Effect of exo-polysaccharides producing bacterial inoculation on growth of roots of wheat (*Triticum aestivum*) plants grown in a salt-affected soil. *International Journal of Environmental Science & Technology*, 3, 43–51. <https://doi.org/10.1007/BF03325906>.
- Antony, A. R, Janani, R. & Kannan V. R. (2017). Biofilm instigation of plant pathogenic bacteria and its control measures. *Biofilms in Plant and Soil Health*, 21, <https://doi.org/10.1002/9781119246329.ch21>.
- Aoki, S. K., Diner, E. J., de Roodenbeke, C. T., Burgess, B. R., Poole, S. J., Braaten, B. A., Jones, A. M., Webb, J. S., Hayes, C. S., Cotter, P. A., & Low, D. A. (2010). A widespread family of polymorphic contact-dependent toxin delivery systems in bacteria. *Nature*, 468(7322), 439–442. <https://doi.org/10.1038/nature09490>.
- Aoki, S. K., Pamma, R., Hernday, A. D., Bickham, J. E., Braaten, B. A., & Low, D. A. (2005). Contact-dependent inhibition of growth in *Escherichia coli*. *Science*, 309(5738), 1245–1248. <https://doi.org/10.1126/science.1115109>.
- Argaw, A., & Mnalku, A. (2017). Effectiveness of native *Rhizobium* on nodulation and yield of faba bean (*Vicia faba* L.) in Eastern Ethiopia. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 63(10), 1390–1403. <https://doi.org/10.1080/03650340.2017.1287353>.
- Arora, N. K., Khare, E., & Maheshwari, D. K. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: Constraints in bioformulation, commercialization, and future strategies. In D. K. Maheshwari (Ed.), *Plant Growth and Health Promoting Bacteria* (97–116). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-13612-2\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-13612-2_5).

- Arora, N. K., & Verma, M. (2017). Modified microplate method for rapid and efficient estimation of siderophore produced by bacteria. *3 Biotech*, *7*(6), 381. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-1008-y>.
- Arshad, M., & Frankenberger, W. T. (1991). Microbial production of plant hormones. *Plant and Soil* *133*, 1–8.
- Asari, S., Matzén, S., Petersen, M. A., Bejai, S., & Meijer, J. (2016). Multiple effects of *Bacillus amyloliquefaciens* volatile compounds: Plant growth promotion and growth inhibition of phytopathogens. *FEMS Microbiology Ecology*, *92*(6), fiw070. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw070>.
- Aserse, A. A., Räsänen, L. A., Aseffa, F., Hailemariam, A., & Lindström, K. (2013a). Diversity of sporadic symbionts and nonsymbiotic endophytic bacteria isolated from nodules of woody, shrub, and food legumes in Ethiopia. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*(23), 10117–10134. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5248-4>.
- Aserse, A. A., Räsänen, L. A., Assefa, F., Hailemariam, A., & Lindström, K. (2012). Phylogeny and genetic diversity of native rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Ethiopia. *Systematic and Applied Microbiology*, *35*(2), 120–131. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.11.005>.
- Aserse, A. A., Woyke, T., Kypides, N. C., Whitman, W. B., & Lindström, K. (2017). Draft genome sequence of type strain HBR26T and description of *Rhizobium aethiopicum* sp. nov. *Standards in Genomic Sciences*, *12*(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s40793-017-0220-z>.
- Askeland, R. A., & Morrison, S. M. (1983). Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, *45*(6), 1802–1807. <https://doi.org/10.1128/aem.45.6.1802-1807.1983>.
- Aslani borj, M., Etesami, H., & Alikhani, H. A. (2022). Silicon improves the effect of phosphate-solubilizing bacterium and arbuscular mycorrhizal fungus on phosphorus concentration of salinity-stressed alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Rhizosphere*, *24*, 100619. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100619>.
- Audenaert, K., Pattery, T., Cornelis, P., & Höfte, M. (2002). Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: Role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, *15*, 1147–1156. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.11.1147>.
- Avalos, M., Garbeva, P., Raaijmakers, J. M., & van Wezel, G. P. (2020). Production of ammonia as a low-cost and long-distance antibiotic strategy by *Streptomyces* species. *The ISME Journal*, *14*(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0537-2>.
- Azarmi, F., Mozafari, V., Dahaji, P. A., & Hamidpour, M. (2016). Biochemical, physiological and antioxidant enzymatic activity responses of pistachio seedlings treated with plant growth promoting rhizobacteria and Zn to salinity stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, *38*(21). <https://doi.org/10.1007/s11738-015-2032-3>.
- Babalola, O. O & Glick, B. R. (2012). The use of microbial inoculants in African agriculture: current practice and future prospects. *Journal of Food Agriculture and Environment* *10*(3&4), 540-549.
- Badr, M. A., Shafei, A. M., & Sharaf El-Deen, S. H. (2006). The dissolution of K and P-bearing minerals by silicate dissolving bacteria and their effect on sorghum growth. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, *2*(1), 5-11.
- Bailly, A., & Weisskopf, L. (2012). The modulating effect of bacterial volatiles on plant growth: Current knowledge and future challenges. *Plant Signaling & Behavior*, *7*(1), 79–85. <https://doi.org/10.4161/psb.7.1.18418>
- Bak, S., Tax, F. E., Feldmann, K. A., Galbraith, D. W., & Feyereisen, R. (2001). CYP83B1, a cytochrome P450 at the metabolic branch point in auxin and indole glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *13*(1), 101–111. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.1.101>
- Baliyan, N., Qureshi, K. A., Jaremko, M., Rajput, M., Singh, M., Dhiman, S., Maheshwari, D. K., Kant, C., & Kumar, A. (2022a). Bioformulation containing cohorts of *Ensifer adhaerens* MSN12 and *Bacillus cereus* MEN8 for the nutrient enhancement of *Cicer arietinum* L. *Plants*, *11*(22). <https://doi.org/10.3390/plants11223123>.
- Balloux, F., Brønstad Brynildsrud, O., van Dorp, L., Shaw, L. P., Chen, H., Harris, K. A., Wang, H., & Eldholm, V. (2018). From theory to practice: Translating whole-genome sequencing (WGS) into the clinic. *Trends in Microbiology*, *26*(12), 1035–1048. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.08.004>.
- Balouri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, *6*(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
- Balsanelli, E., de Baura, V. A., de Oliveira Pedrosa, F., de Souza, E. M., & Monteiro, R. A. (2014). Exopolysaccharide biosynthesis enables mature biofilm formation on abiotic surfaces by *Herbaspirillum seropedicae*. *Plos One*, *9*: e110392.

- Banat, I. M., De Rienzo, M. A., & Quinn, G. A. (2014). Microbial biofilms: biosurfactants as antibiofilm agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(24), 9915–9929. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6169-6>.
- Bañuelos-Vazquez, L. A., Cazares, D., Rodríguez, S., Cervantes-De la Luz, L., Sánchez-López, R., Castellani, L. G., Tejerizo, G. T., & Brom, S. (2020). Transfer of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 to endophytic bacteria inside nodules. *Frontiers in Microbiology*, 0. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01752>.
- Bartling, D., Seedorf, M., Mithofer, A. & Weiler, E.W. (1992). Cloning and expression of an *Arabidopsis* nitrilase which can convert indole-3-acetonitrile to the plant hormone, indole-3-acetic acid. *European journal of biochemistry*, 205(1), 417–424. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb16795.x>.
- Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., & Hernandez, J. P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil*, 378(1), 1–33. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>.
- Beck, C. M., Morse, R. P., Cunningham, D. A., Iniguez, A., Low, D. A., Goulding, C. W., & Hayes, C. S. (2014). CdiA from *Enterobacter cloacae* delivers a toxic ribosomal RNase into target bacteria. *Structure*, 22(5), 707–718. <https://doi.org/10.1016/j.str.2014.02.012>.
- Behera, B.C., Singdevsachan, S.K., Mishra, R.R., Dutta, S.K. & Thatoi, H.N.(2014). Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove-A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3, 97–110. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.09.008>.
- Belhadi, D., de Lajudie, P., Ramdani, N., Le Roux, C., Boulila, F., Tisseyre, P., Boulila, A., Benguedouar, A., Kaci, Y., & Laguerre, G. (2018). *Vicia faba* L. in the Bejaia region of Algeria is nodulated by *Rhizobium leguminosarum* sv. viciae, *Rhizobium laguerreae* and two new genospecies. *Systematic and Applied Microbiology*, 41(2), 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.10.004>
- Belimov, A.A., Dodd, I.C., Safronova, V.I., Dumova, V.A., Shaposhnikov, A.I., Ladatko, A.G. & Davies, W.J., (2014). Abscisic acid metabolizing rhizobacteria decrease ABA concentrations in planta and alter plant growth. *Plant Physiology and Biochemistry* 74, 84–91.
- Belli, S., Milazzo, C., Pearse E., Lui K.Y., Williams G. & Lemon J.(2021) Growing faba beans on the south coast of Western Australia, State of Western Australia (Department of Primary Industries and Regional Development).
- Bender, F. R., Alves, L. C., da Silva, J. F. M., Ribeiro, R. A., Pauli, G., Nogueira, M. A., & Hungria, M. (2022). Microbiome of nodules and roots of soybean and common bean: searching for differences associated with contrasting performances in symbiotic nitrogen fixation. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19). <https://doi.org/10.3390/ijms231912035>.
- Benedito, V. A. et al., (2008). A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 55(3), 504–513. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03519.x>.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and molecular biology*, 35(4), 1044–1051. <https://doi.org/10.1590/s1415-47572012000600020>.
- Ben-Gad, D., & Gerchman, Y. (2017). Reclassification of *Brevibacterium halotolerans* DSM8802 as *Bacillus halotolerans* comb. Nov. based on microbial and biochemical characterization and multiple gene sequence. *Current Microbiology*, 74(1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1143-4>.
- Berde, C.P., Rawool, P., Berde, V.B. (2021). Phosphate-solubilizing bacteria: recent trends and applications in agriculture. In Mandal SD and Passari AK (ed) Recent advancement in microbial biotechnology. *Academic Press*, 2, 27–47. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822098-6.00004-5>.
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., & Bakker, P. A. H. M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17(8), 478–486. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.001>.
- Beringer, J.E. (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology*, 84, 188–198.
- Bernal, G., & Graham, P. H. (2001). Diversity in the rhizobia associated with *Phaseolus vulgaris* L. in Ecuador, and comparisons with Mexican bean rhizobia. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(6), 526–534. <https://doi.org/10.1139/w01-037>.
- Berza, B., Sekar, J., Vaiyapuri, P., Pagano, M. C., & Assefa, F. (2022). Evaluation of inorganic phosphate solubilizing efficiency and multiple plant growth promoting properties of endophytic bacteria isolated from root nodules *Erythrina brucei*. *BMC Microbiology*, 22(1), 276. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02688-7>.

- Bessadok, K., Navarro-Torre, S., Pajuelo, E., Mateos-Naranjo, E., Redondo-Gómez, S., Caviedes, M. Á., Fterich, A., Mars, M., & Rodríguez-Llorente, I. D. (2020). The ACC-deaminase producing bacterium *Variovorax* sp. CT7.15 as a tool for improving *Calicotome villosa* nodulation and growth in Arid Regions of Tunisia. *Microorganisms*, 8(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040541>.
- Besset-Manzoni, Y., Joly, P., Brutel, A., Gerin, F., Soudière, O., Langin, T., & Prigent-Combaret, C. (2019). Does *in vitro* selection of biocontrol agents guarantee success in planta? A study case of wheat protection against *Fusarium* seedling blight by soil bacteria. *PLOS ONE*, 14(12), e0225655. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225655>.
- Bhagat, D., Sharma, P., Sirari, A., & Kumawat, K. C. (2014). Screening of *Mesorhizobium* spp. For control of *Fusarium* wilt in chickpea *in vitro* conditions. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(4):923-930.
- Bhaskar, P. V. & Bhosle, N. B. (2005). Microbial extracellular polymeric substances in marine biogeochemical processes. *Current Science*, 88 (1), 45–53.
- Bharti, A., Maheshwari, H. S., Garg, S., Anwar, K., Pareek, A., Satpute, G., Prakash, A., & Sharma, M. P. (2022). Exploring potential soybean bradyrhizobia from high trehalose-accumulating soybean genotypes for improved symbiotic effectiveness in soybean (SSRN Scholarly Paper No. 4247386). <https://doi.org/10.2139/ssrn.4247386>
- Bibi, F., Chung, E. J., Khan, A., Jeon, C. O., & Chung, Y. R. (2012). *Rhizobium halophytocola* sp. nov., isolated from the root of a coastal dune plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(Pt\_8), 1997–2003. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.029488-0>.
- Bottini, R., Cassán, F., & Piccoli, P. (2004). Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(5), 497–503. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1696-1>.
- Bittsánszky, A., Pilinszky, K., Gyulai, G., & Komives, T. (2015). Overcoming ammonium toxicity. *Plant Science*, 231, 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.12.005>.
- Blair, I. D. (1967). Studies on *Rhizobium* strains. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 10(1), 66–81. <https://doi.org/10.1080/00288233.1967.10423078>.
- Blank, L., Cohen, Y., Borenstein, M., Shulhani, R., Lofthouse, M., Sofer, M., & Shtienberg, D. (2016). Variables associated with severity of bacterial canker and wilt caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato greenhouses. *Phytopathology*, 106(3), 254–261. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-15-0159-R>.
- Blevins, D. G. (1989). An overview of nitrogen metabolism in higher plants. In: *Plant nitrogen metabolism*. Springer, Boston, MA, 1–41.
- Blom, D., Fabbri, C., Connor, E. C., Schiestl, F. P., Klausner, D. R., Boller, T., Eberl, L., & Weiskopf, L. (2011). Production of plant growth modulating volatiles is widespread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions. *Environmental Microbiology*, 13(11), 3047–3058. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02582.x>
- Bodour, A. A., & Maier, R. M. (2003). Biosurfactants: Types, screening methods, and applications. In *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/0471263397.env250>.
- Bogino, P. C., Oliva, M.deL., Sorroche, F. G., & Giordano, W. (2013). The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(8), 15838–15859. <https://doi.org/10.3390/ijms140815838>.
- Boiero, L., Perrig, D., Masciarelli, O., Penna, C., Cassán, F., & Luna, V. (2007). Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(4), 874–880. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0731-9>.
- Boivin, S. et. al. (2020). Host-specific competitiveness to form nodules in *Rhizobium leguminosarum* symbiovar *viciae*. *New Phytologist*, 226(2), 555–568. <https://doi.org/10.1111/nph.16392>.
- Bopape, F. L., Beukes, C. W., Katlego, K., Hassen, A. I., Steenkamp, E. T., & Gwata, E. T. (2023). Symbiotic performance and characterization of pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp.) Rhizobia Occurring in South African Soils. *Agriculture*, 13(1). <https://doi.org/10.3390/agriculture13010030>.
- Borruso, L., Esposito, A., Bani, A., Cicazzo, S., Papa, M., Zerbe, S., Brusetti, L. (2017). Ecological diversity of sediment rhizobacteria associated with *Phragmites australis* along a drainage canal in the Yellow River watershed. *Journal of Soils and Sediments*, 17, 253–265.

- Bosmans, L., De Bruijn, I., De Mot, R., Rediers, H., & Lievens, B. (2016). Agar composition affects in vitro screening of biocontrol activity of antagonistic microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, *127*, 7–9. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.05.004>.
- Boubekri, K., Soumare, A., Mardad, I., Lyamlouli, K., Hafidi, M., Ouhdouch, Y., & Kouisni, L. (2021). The Screening of potassium- and phosphate-solubilizing actinobacteria and the assessment of their ability to promote wheat growth parameters. *Microorganisms*, *9*(3), 470. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030470>.
- Boughribil, S., Abumsimir, B., Montassir, L., Tarek, F., Ennaji, M. M., & Bessi, H. (2018). Effect of competitiveness on nodulation and nitrogen fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Materials and Environmental Science*, *9*, 828–833.
- Boulahouat, S., Cherif-Silini, H., Silini, A., Chenari Bouket, A., Luptakova, L., Saadaoui, N., Alenezi, F. N., & Belbahri, L. (2022). Critical evaluation of biocontrol ability of bayoud infected date palm phyllospheric *Bacillus* spp. suggests that *in vitro* selection does not guarantee success *in planta*. *Agronomy*, *12*(10). <https://doi.org/10.3390/agronomy12102403>.
- Bourion, V., Heulin-Gotty, K., Aubert, V., Tisseyre, P., Chabert-Martinello, M., Pervent, M., Delaitre, C., Vile, D., Siol, M., Duc, G., Brunel, B., Burstin, J., & Lepetit, M. (2018). Co-inoculation of a pea core-collection with diverse rhizobial strains shows competitiveness for nodulation and efficiency of nitrogen fixation are distinct traits in the interaction. *Frontiers in Plant Science*, *0*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02249>.
- Bournaud, C., Faria, S. M. de, Santos, J. M. F. dos, Tisseyre, P., Silva, M., Chaintreuil, C., Gross, E., James, E. K., Prin, Y., & Moulin, L. (2013). *Burkholderia* species are the most common and preferred nodulating symbionts of the piptadenia group (Tribe *Mimoseae*). *PLOS ONE*, *8*(5), e63478. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063478>.
- Braeken, K., Daniels, R., Vos, K., Fauvart, M., Bachaspatimayum, D., Vanderleyden, J., & Michiels, J. (2008). Genetic determinants of swarming in *Rhizobium etli*. *Microbial Ecology*, *55*(1), 54–64. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9250-1>.
- Bright, M., & Bulgheresi, S. (2010). A complex journey: Transmission of microbial symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, *8*(3). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2262>.
- Brígido, C., Alexandre, A., & Oliveira, S. (2012). Transcriptional analysis of major chaperone genes in salt-tolerant and salt-sensitive mesorhizobia. *Microbiological Research*, *167*(10), 623–629. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.01.006>.
- Broughton, W. J., Jabbouri, S., & Perret, X. (2000). Keys to Symbiotic Harmony. *Journal of Bacteriology*, *182*(20), 5641–5652.
- Buch, A., Archana, G., & Naresh Kumar, G. (2008). Metabolic channeling of glucose towards gluconate in phosphate-solubilizing *Pseudomonas aeruginosa* P4 under phosphorus deficiency. *Research in Microbiology*, *159*(9-10), 635–642. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.09.012>.
- Budi, S.W., van Tuinen, D., Arnould, C., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. (2000). Hydrolytic enzyme activity of *Paenibacillus* sp. strain B2 and effects of the antagonistic bacterium on cell integrity of two soil borne pathogenic bacteria. *Applied Soil Ecology*, *15*(2), 191-199.
- Bui, T. T., Wright, S. A., Falk, A. B., Vanwalleghem, T., Van Hemelrijck, W., Hertog, M. L., Keulemans, J., & Davey, M. W. (2019). *Botrytis cinerea* differentially induces postharvest antioxidant responses in 'Braeburn' and 'Golden Delicious' apple fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *99*(13), 5662–5670. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9827>.
- Burch, A. Y., Browne, P. J., Dunlap, C. A., Price, N. P., & Lindow, S. E. (2011). Comparison of biosurfactant detection methods reveals hydrophobic surfactants and contact-regulated production. *Environmental Microbiology*, *13*(10), 2681–2691. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02534.x>.
- Burch, A. Y., Shimada, B. K., Browne, P. J., & Lindow, S. E. (2010). Novel high-throughput detection method to assess bacterial surfactant production. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(16), 5363–5372. <https://doi.org/10.1128/AEM.00592-10>.
- Burg, S. P., & Burg, E. A. (1966). The interaction between auxin and ethylene and its role in plant growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *55*(2), 262–269. <https://doi.org/10.1073/pnas.55.2.262>.
- Bustos, P. et. al. (2017). Complete Genome sequences of three *Rhizobium gallicum* symbionts associated with common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Genome Announcements*, *5*(11), e00030-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00030-17>.

- Buttery, B. R., & Dirks, V. A. (1987). The effects of soybean cultivar, rhizobium strain and nitrate on plant growth, nodule mass and acetylene reduction rate. *Plant and Soil*, 98(2), 285–293. <https://doi.org/10.1007/BF02374832>
- Caba, J. M., Centeno, M. L., Fernández, B., Gresshoff, P. M., & Ligeró, F. (2000). Inoculation and nitrate alter phytohormone levels in soybean roots: differences between a supernodulating mutant and the wild type. *Planta*, 211(1), 98–104. <https://doi.org/10.1007/s004250000265>.
- Caboche, S., Leclère, V., Pupin, M., Kucherov, G., Jacques, P. (2010). Diversity of monomers in nonribosomal peptides: Towards the prediction of origin and biological activity. *Journal of bacteriology*, 192(19), 5143–5150. <https://doi.org/10.1128/JB.00315-10>.
- Calvert, H. E., Pence, M. K., Pierce, M., Malik, N. S. A., & Bauer, W. D. (1984). Anatomical analysis of the development and distribution of *Rhizobium* infections in soybean roots. *Canadian Journal of Botany*, 62(11), 2375–2384. <https://doi.org/10.1139/b84-324>.
- Calvo, H., Mendiara, I., Arias, E., Gracia, A. P., Blanco, D., & Venturini, M. E. (2020). Antifungal activity of the volatile organic compounds produced by *Bacillus velezensis* strains against postharvest fungal pathogens. *Postharvest Biology and Technology*, 166, 111208. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111208>.
- Cao, Y., Wang, E.-T., Zhao, L., Chen, W.-M., & Wei, G.-H. (2014). Diversity and distribution of rhizobia nodulated with *Phaseolus vulgaris* in two ecoregions of China. *Soil Biology and Biochemistry*, 78, 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.07.026>.
- Carson, K. C., Meyer, J.-M., & Dilworth, M. J. (2000). Hydroxamate siderophores of root nodule bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(1), 11–21. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00107-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00107-8).
- Cascales, E., Buchanan, S. K., Duché, D., Kleantous, C., Loubès, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S., & Cavard, D. (2007). Colicin Biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(1), 158–229. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00036-06>.
- Castulo-Rubio, D.Y., Alejandre-Ramírez, N.A., Orozco-Mosqueda, M. et al. (2015). Volatile organic compounds produced by the rhizobacterium *Arthrobacter arthrobacter* UMCV2 modulate sorghum bicolor (strategy ii plant) morphogenesis and SbfRO1 transcription *in vitro*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34, 611–623. <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9495-8>.
- Caúper, F. R. M. (2017). Potencial de produção de biossurfactantes por bactérias do gênero rhizobium utilizando óleo de cozinha como fonte de carbono. *Scientia Amazonia*, 6(1), 10.
- Cavassim, M. I. A., Moeskjær, S., Moslemi, C., Fields, B., Bachmann, A., Vilhjálmsson, B. J., Schierup, M. H., W. Young, J. P., & Andersen, S. U. (2020). Symbiosis genes show a unique pattern of introgression and selection within a *Rhizobium leguminosarum* species complex. *Microbial Genomics*, 6(4), e000351. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000351>.
- Chahboune, R., Carro, L., Peix, A., Barrijal, S., Velázquez, E., & Bedmar, E. J. (2011). *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Cytisus villosus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(12), 2922–2927. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.027649-0>.
- Chakraborty, U., Chakraborty, B. N., Chakraborty, A. P., & Dey, P. L. (2013). Water stress amelioration and plant growth promotion in wheat plants by osmotic stress tolerant bacteria. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 29(5), 789–803. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1234-8>.
- Chandankere, R., Ravikumar, Y., Zabeed, H. M., Sabapathy, P. C., Yun, J., Zhang, G., & Qi, X. (2020). Conversion of agroindustrial wastes to rhamnolipid by *Enterobacter* sp. UJS-RC and its role against biofilm-forming foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(52), 15478–15489. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c05028>.
- Chandran, H., Meena, M., & Swapnil, P. (2021). Plant growth-promoting rhizobacteria as a green alternative for sustainable agriculture. *Sustainability*, 13(19). <https://doi.org/10.3390/su131910986>.
- Chaouachi, M., Marzouk, T., Jallouli, S., Elkahoui, S., Gentzmittel, L., Ben, C., & Djébal, N. (2021). Activity assessment of tomato endophytic bacteria bioactive compounds for the postharvest biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology*, 172, 111389. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111389>.
- Chattopadhyay, P., Banerjee, G., & Handique, P. J. (2022). Use of an abscisic acid-producing *Bradyrhizobium japonicum* isolate as biocontrol agent against bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 129(4), 869–879. <https://doi.org/10.1007/s41348-022-00604-9>.
- Chen, F., Gao, Y., Chen, X., Yu, Z., & Li, X. (2013). Quorum quenching enzymes and their application in degrading signal molecules to block quorum sensing-dependent infection. *International journal of molecular sciences*, 14(9), 17477–17500. <https://doi.org/10.3390/ijms140917477>.



- Chen, S., Zou, J., Hu, Z., Chen, H., Lu, Y. (2014). Global annual soil respiration in relation to climate, soil properties and vegetation characteristics: Summary of available data. *Agricultural and Forest Meteorology*, 198, 335–346.
- Chen, J., Sun, J., Deering, R. W., DaSilva, N., Seeram, N. P., Wang, H., & Rowley, D. C. (2016). Rhizoleucinoside, a rhamnolipid–amino alcohol hybrid from the rhizobial symbiont *Bradyrhizobium* sp. BTAi1. *Organic Letters*, 18(6), 1490–1493. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.6b00461>.
- Chen, W.-M., Moulin, L., Bontemps, C., Vandamme, P., Béna, G., & Boivin-Masson, C. (2003). Legume symbiotic nitrogen fixation by  $\beta$ -Proteobacteria is widespread in nature. *Journal of Bacteriology*, 185(24), 7266–7272. <https://doi.org/10.1128/JB.185.24.7266-7272.2003>.
- Chen, X., Landschoot, S., Detavernier, C., De Saeger, S., Rajkovic, A., & Audenaert, K. (2021). Cross-talk between *Fusarium verticillioides* and *Aspergillus flavus* *in vitro* and *in planta*. *Mycotoxin Research*, 37(3), 229–240. <https://doi.org/10.1007/s12550-021-00435-x>.
- Chen, Y. X., Zou, L., Penttinen, P., Chen, Q., Li, Q. Q., Wang, C. Q., & Xu, K. W. (2018). Faba Bean (*Vicia faba* L.) nodulating rhizobia in Panxi, China, are diverse at species, plant growth promoting ability, and symbiosis related gene levels. *Frontiers in Microbiology*, 0. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01338>.
- Chen, Y., Zhao, S., Li, Z., & Kang, Y. (2018). Multi-object control of an isolated DC–DC modular multilevel converter. *IET Power Electronics*, 11(8), 1338–1349. <https://doi.org/10.1049/iet-pel.2017.0151>.
- Chen, Y. P., Rekha, P. D., Arunshen, A. B., Lai, W. A., & Young, C. C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*, 34(1), 33–41. doi: 10.1016/j.apsoil.2005.12.002.
- Chen, Y., Gozzi, K., Yan, F., & Chai, Y. (2015). Acetic acid acts as a volatile signal to stimulate bacterial biofilm formation. *MBio* 6, e392–e415. doi: 10.1128/ mBio.00392- 15.
- Chet, I., & Inbar, J. (1994). Biological control of fungal pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 48(1), 37–43. <https://doi.org/10.1007/BF02825358>.
- Chhabra, S., Brazil, D., Morrissey, J., Burke, J. I., O'Gara, F. & Dowling D.N. (2013). Characterization of mineral phosphate solubilization traits from a barley rhizosphere soil functional metagenome. *MicrobiologyOpen*, 2(5), 717–891. <https://doi.org/10.1002/mbo3.110>.
- Chirak, E. R., Kimeklis, A. K., Karasev, E. S., Kopat, V. V., Safronova, V. I., Belimov, A. A., Aksenova, T. S., Kabilov, M. R., Provorov, N. A., & Andronov, E. E. (2019). Search for ancestral features in genomes of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae strains isolated from the relict legume *Vavilovia formosa*. *Genes*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/genes10120990>.
- Cho, S. M., Kim, Y. H., Anderson, A. J., & Kim, Y. C. (2013). Nitric oxide and hydrogen peroxide production are involved in systemic drought tolerance induced by 2R,3R-Butanediol in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Pathology Journal*, 29(4), 427–434. <https://doi.org/10.5423/ PPJ.OA.07.2013.0069>.
- Choudhary, D. K., Prakash, A., & Johri, B. N. (2007). Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian Journal of Microbiology*, 47(4), 289–297. <https://doi.org/10.1007/s12088-007-0054-2>.
- Choudhary, D. K., Sharma, K. P., and Gaur, R. K. (2011). Biotechnological perspectives of microbes in agro-ecosystems. *Biotechnology Letters*, 33, 1905–1910. doi: 10.1007/s10529-011-0662-0.
- Choudhary, D. K., Varma, A., & Tuteja, N. (2016). Plant-microbe interaction: an approach to sustainable agriculture. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-2854-0>.
- Chun, J., Lee, I., Kim, Y., & Park, S.-C. (2015). OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000760>.
- Çiftçi, G., & Altınok, H. H. (2019). Effects of plant growth promoting rhizobacteria treatments of eggplant seeds against grey mold (*Botrytis cinerea* Pers.: Fr.) disease. *KSÜ Tarım ve Doga Dergisi*, 22(3), 421–429.
- Clark, E., Manulis, S., Ophir, Y., Barash, I., & Gafni, Y. (1993). Cloning and characterization of *iaaM* and *iaaH* from *Erwinia herbicola* pathovar gypsophilae. *Phytopathology*, 83, 234–240.
- Cohen, A.C., Travaglia, C.N., Bottini, R. & Piccoli, P.N. (2009). Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic *Azospirillum* in the alleviation of drought effects in maize. *Botany* 87, 455–46.
- Cohen, A.C., Bottini, R., Pontin, M., Berli, F.J., Moreno, D., Boccanlandro, H., Travaglia, C.N. & Piccoli, P.N. (2015). *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *A. thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels. *Physiologia Plantarum* 153, 79–90.

- Coenye, T., Spilker, T., Martin, A., & LiPuma, J. J. (2002). Comparative assessment of genotyping methods for epidemiologic study of *Burkholderia cepacia* genomovar III. *Journal of Clinical Microbiology*, *40*(9), 3300–3307. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.9.3300-3307.2002>.
- Comby, M., Gacoin, M., Robineau, M., Rabenoelina, F., Ptas, S., Dupont, J., Profizi, C., & Baillieux, F. (2017). Screening of wheat endophytes as biological control agents against *Fusarium* head blight using two different *in vitro* tests. *Microbiological Research*, *202*, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.04.014>.
- Compant, S., Clément, C., & Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, *42*(5), 669–678. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>.
- Contesto, C., Milesi, S., Mantelin, S., Zancarini, A., Desbrosses, G., Varoquaux, F., Bellini, C., Kowalczyk, M., & Touraine, B. (2010). The auxin-signaling pathway is required for the lateral root response of *Arabidopsis* to the rhizobacterium *Phyllobacterium brassicacearum*. *Planta*, *232*(6), 1455–1470. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1264-0>.
- Cordeiro, A. B., Ribeiro, R. A., Helene, L. C. F., & Hungria, M. (2017). *Rhizobium esperanzae* sp. nov., a N<sub>2</sub>-fixing root symbiont of *Phaseolus vulgaris* from Mexican soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *67*(10), 3937–3945. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002225>.
- Cornea, C. P., Israel-Roming, F., Siciua, O., Voaides, C., Zamfir, M., & Grosu-Tudor, S. (2016). Biosurfactant production by *Lactobacillus* spp. Strains isolated from Romanian traditional fermented food products. *21*, 11312–11320.
- Cortleven, A., & Schmölling, T. (2015). Regulation of chloroplast development and function by cytokinin. *Journal of Experimental Botany*, *66*(16), 4999–5013. doi: 10.1093/jxb/erv1.
- Crespi, M., & Frugier, F. (2008). De novo organ formation from differentiated cells: Root nodule organogenesis. *Science Signaling*, *1*(49), re11. <https://doi.org/10.1126/scisignal.149re11>.
- Crowe, J. H., Carpenter, J. F., & Crowe, L. M. (1998). The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*, *60*(1), 73–103. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.60.1.73>.
- Cui, L., Yang, C., Wang, Y., Ma, T., Cai, F., Wei, L., Jin, M., Osei, R., Zhang, J., & Tang, M. (2022). Potential of an endophytic bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* 3–5 as biocontrol agent against potato scab. *Microbial Pathogenesis*, *163*, 105382. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105382>.
- Czarny, J.C., Shah, S., Glick, B.R. (2007). Response of canola plants at the transcriptional level to expression of a bacterial ACC deaminase in the roots. In: Ramina A, Chang C, Giovannoni J, Klee H, Perata P, Woltering E, editors. Advances in plant ethylene research. Dordrecht, Netherlands: Springer;377–82.
- Czajkowski, R., de Boer, W. J., van Veen, J. A., & van der Wolf, J. M. (2012). Studies on the interaction between the biocontrol agent, *Serratia plymuthica* A30, and blackleg-causing *Dickeya* sp. (Biovar 3) in potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Pathology*, *61*(4), 677–688. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02565.x>.
- Dabo, M., Jaiswal, S. K., & Dakora, F. D. (2019). Phylogenetic evidence of allopatric speciation of bradyrhizobia nodulating cowpea (*Vigna unguiculata* L. walp) in South African and Mozambican soils. *FEMS Microbiology Ecology*, *95*(6), fiz067. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz067>.
- Dall'Agnol, R. F., Ribeiro, R. A., Delamuta, J. R. M., Ormeño-Orrillo, E., Rogel, M. A., Andrade, D. S., Martínez-Romero, E., & Hungria, M. (2014). *Rhizobium paranaense* sp. nov., an effective N<sub>2</sub>-fixing symbiont of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with broad geographical distribution in Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *64*(Pt\_9), 3222–3229. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.064543-0>.
- Dall'Agnol, R. F., Ribeiro, R. A., Ormeño-Orrillo, E., Rogel, M. A., Delamuta, J. R. M., Andrade, D. S., Martínez-Romero, E., & Hungria, M. (2013a). *Rhizobium freirei* sp. nov., a symbiont of *Phaseolus vulgaris* that is very effective at fixing nitrogen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *63*(Pt\_11), 4167–4173. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.052928-0>.
- Damtab, J., Nutaratat, P., Boontham, W., Srisuk, N., Duangmal, K., Yurimoto, H., Sakai, Y., Muramatsu, Y., & Nakagawa, Y. (2016). *Roseomonas elaeocarpi* sp. nov., isolated from olive (*Elaeocarpus hygrophilus* Kurz.) phyllosphere. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *66*(1), 474–480. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000748>.
- Daniels, R., Reynaert, S., Hoekstra, H., Verreth, C., Janssens, J., Braeken, K., Fauvart, M., Beullens, S., Heusdens, C., Lambrichts, I., De Vos, D. E., Vanderleyden, J., Vermant, J., & Michiels, J. (2006). Quorum signal molecules as biosurfactants affecting swarming in *Rhizobium etli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(40), 14965–14970. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511037103>.

- Darvishi, P., Ayatollahi, S., Mowla, D., & Niazi, A. (2011). Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPP1-2. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84(2), 292–300. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.01.011>.
- Das, P., Mukherjee, S., & Sen, R. (2008). Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin. *Chemosphere*, 72(9), 1229–1234. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.05.015>.
- Dasgupta, D., Kumar, A., Mukhopadhyay, B. & Sengupta, T.K. (2015). Isolation of phenazine 1,6-dicarboxylic acid from *Pseudomonas aeruginosa* strain HRW.1-S3 and its role in biofilm-mediated crude oil degradation and cytotoxicity against bacterial and cancer cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(20), 8653–8665. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6707-x>.
- da Silva, T. R., Rodrigues, R. T., Jovino, R. S., Carvalho, J. R. de S., Leite, J., Hoffman, A., Fischer, D., Ribeiro, P. R. de A., Rouws, L. F. M., Radl, V., & Fernandes-Júnior, P. I. (2022). Not just passengers, but co-pilots! Non-rhizobial nodule-associated bacteria promote cowpea growth and symbiosis with (brady)rhizobia. *Journal of Applied Microbiology*, lxac013. <https://doi.org/10.1093/jambio/lxac013>.
- Davis, E. O., Evans, I. J., & Johnston, A. W. B. (1988). Identification of nodX, a gene that allows *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae strain TOM to nodulate Afghanistan peas. *Molecular and General Genetics MGG*, 212(3), 531–535. <https://doi.org/10.1007/BF00330860>.
- de Lajudie et. al (2019). Minimal standards for the description of new genera and species of rhizobia and agrobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(7), 1852–1863. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003426>.
- de Melo Pereira, G. V., Magalhães, K. T., Lorenzetti, E. R., Souza, T. P., & Schwan, R. F. (2012). A multiphasic approach for the identification of endophytic bacterial in strawberry fruit and their potential for plant growth promotion. *Microbial Ecology*, 63(2), 405–417. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9919-3>.
- De Meyer, S. E., De Beuf, K., Vekeman, B., & Willems, A. (2015). A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). *Soil Biology and Biochemistry*, 83, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.01.002>.
- De Meyer, S. E., Van Hoorde, K., Vekeman, B., Braeckman, T., & Willems, A. (2011). Genetic diversity of rhizobia associated with indigenous legumes in different regions of Flanders (Belgium). *Soil Biology and Biochemistry*, 43(12), 2384–2396. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.08.005>.
- de O. Nunes, P. S., de Medeiros, F. H. V., de Oliveira, T. S., de Almeida Zago, J. R., & Bettiol, W. (2022). *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* promote tomato growth. *Brazilian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00874-3>.
- de Oliveira Mendes, G., Moreira de Freitas, A.L., Liparini Pereira, O. et al. (2014). Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Annals of Microbiology*, 64, 239–249 <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0656-3>.
- de Paula, F., Vieira, N. V., da Silva, G. F., Delforno, T. P., & Duarte, I. C. S. (2022). A comparison of microbial communities of mango and orange residues for bioprospecting of biosurfactant producers. *Ecologies*, 3(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/ecologies3020010>.
- de Santi Ferrara, F. I., Oliveira, Z. M., Gonzales, H. H. S., Floh, E. I. S., & Barbosa, H. R. (2012). Endophytic and rhizospheric enterobacteria isolated from sugar cane have different potentials for producing plant growth-promoting substances. *Plant and Soil*, 353(1–2), 409–417. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1042-1>.
- Defez, R., Andreozzi, A., Dickinson, M., Charlton, A., Tadini, L., Pesaresi, P., & Bianco, C. (2017). Improved drought stress response in alfalfa plants nodulated by an IAA over-producing *Rhizobium* strain. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.02466>.
- Degefu, T., Wolde-Meskel, E., & Frostegård, Å. (2012). Phylogenetic multilocus sequence analysis identifies seven novel *Ensifer* genospecies isolated from a less-well-explored biogeographical region in East Africa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(9), 2286–2295. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.039230-0>.
- Degefu, T., Wolde-meskel, E., & Frostegård, Å. (2013). Phylogenetic diversity of *Rhizobium* strains nodulating diverse legume species growing in Ethiopia. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(4), 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.03.004>.
- Dellagi, A., Rigault, M., Segond, D., Roux, C., Kraepiel, Y., Cellier, F., Briat, J.-F., Gaymard, F., & Expert, D. (2005). Siderophore-mediated upregulation of *Arabidopsis* ferritin expression in response to *Erwinia chrysanthemi* infection. *The Plant Journal*, 43(2), 262–272. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02451.x>.

- Deng, Z. S., Zhao, L. F., Kong, Z. Y., Yang, W. Q., Lindström, K., Wang, E. T., & Wei, G. H. (2011). Diversity of endophytic bacteria within nodules of the *Sphaerophysa salsula* in different regions of Loess Plateau in China. *FEMS Microbiology Ecology*, 76(3), 463–475. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01063.x>.
- Deng, Z.-S., Kong, Z.-Y., Zhang, B.-C., & Zhao, L.-F. (2020). Insights into non-symbiotic plant growth promotion bacteria associated with nodules of *Sphaerophysa salsula* growing in northwestern China. *Archives of Microbiology*, 202(2), 399–409. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01752-7>.
- Tekdal, D., Akça, İ., Küçükrecep, A., ÇetiNer, S., & HatiPoğlu, R. (2021). Characterization of root-associated bacterial species of Leklek variety of common bean (*Phaseolus* sp.). *Romanian Biotechnological Letters*, 26(5), 3008–3013. <https://doi.org/10.25083/rbl/26.5/3008.3013>.
- Depret, G., Houot, S., Allard, M.-R., Breuil, M.-C., Nouaim, R., & Laguerre, G. (2004). Long-term effects of crop management on *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae populations. *FEMS Microbiology Ecology*, 51(1), 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.07.009>.
- Dhul, M., Suneja, S., & Dadarwal, K. R. (1998). Role of siderophores in chickpea (*Cicer arietinum* L.)—*Rhizobium* symbiosis. *Microbiological Research*, 153(1), 47–53. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(98\)80020-7](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(98)80020-7)
- Díaz-Alcántara, C.-A., Ramírez-Bahena, M.-H., Mulas, D., García-Fraile, P., Gómez-Moriano, A., Peix, A., Velázquez, E., & González-Andrés, F. (2014). Analysis of rhizobial strains nodulating *Phaseolus vulgaris* from Hispaniola Island, a geographic bridge between Meso and South America and the first historical link with Europe. *Systematic and Applied Microbiology*, 37(2), 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.09.005>.
- Dilworth, M. J., Carson, K. C., Giles, R. G. F., Byrne, L. T., & Glenn, A. R. (1998). *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* produces a novel cyclic trihydroxamate siderophore, vicibactin. *Microbiology (Reading, England)*, 144(3), 781–791. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-3-781>
- Dober, R. C., Breil, B. T., & Triplett, E. W. (1994). DNA sequence of the common nodulation genes of *Bradyrhizobium elkanii* and their phylogenetic relationship to those of other nodulating bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 7(5), 564–572. <https://doi.org/10.1094/mpmi-7-0564>.
- Dong, Y. H., & Zhang, L. H. (2005). Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, 43 (101–109).
- Donmez, M. F., Esitken, A., Yildiz, H., & Ercisli, S. (2011). Biocontrol of *Botrytis Cinerea* on strawberry fruit by plant growth promoting bacteria. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 21(4), 758-763.
- Dombrecht, B., Marchal, K., Vanderleyden, J., & Michiels, J. (2002). Prediction and overview of the RpoN-regulon in closely related species of the Rhizobiales. *Genome Biology*, 3(12), RESEARCH0076. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-12-research0076>.
- dos Santos, C. L. R., Alves, G. C., de Matos Macedo, A. V., Giori, F. G., Pereira, W., Urquiaga, S., & Reis, V. M. (2017). Contribution of a mixed inoculant containing strains of *Burkholderia* spp. and *Herbaspirillum* ssp. to the growth of three sorghum genotypes under increased nitrogen fertilization levels. *Applied Soil Ecology*, 113, 96–106. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.02.008>.
- Doyle, J. J., & Luckow, M. A. (2003). The rest of the iceberg. legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiology*, 131(3), 900–910. <https://doi.org/10.1104/pp.102.018150>.
- Dresler-Nurmi, A., Fewer, D. P., Räsänen, L. A., & Lindström, K. (2007). The diversity and evolution of rhizobia. In K. Pawlowski (Ed.), *Prokaryotic Symbionts in Plants* (Vol. 8, pp. 3–41). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/7171\\_2007\\_099](https://doi.org/10.1007/7171_2007_099).
- Dubey, R. C., Maheshwari, D. K., Kumar, H., & Choure, K. (2010). Assessment of diversity and plant growth promoting attributes of rhizobia isolated from *Cajanus cajan* L. *African Journal of Biotechnology*, 9(50). <https://doi.org/10.4314/ajb.v9i50>.
- Dudman, W. F. (1976). The extracellular polysaccharides of *Rhizobium japonicum*: Compositional studies. *Carbohydrate Research*, 46(1), 97–110. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)83534-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)83534-X).
- Dunlap, C. A., Bowman, M. J., Schisler, D. A., & Rooney, A. P. (2016). Genome analysis shows *Bacillus axarquiensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus mojavensis*; reclassification of *Bacillus malacitensis* and *Brevibacterium halotolerans* as heterotypic synonyms of *Bacillus axarquiensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(6), 2438–2443. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001048>.
- Dupont, L., Alloing, G., Pierre, O., El, S., Hopkins, J., Hrouart, D., & Frendo, P. (2012). The legume root nodule: from symbiotic nitrogen fixation to senescence. In T. Nagata (Ed.), *Senescence*. InTech. <https://doi.org/10.5772/34438>.

- Dusane, D.H., Dam, S., Nancharaiyah, Y.V., Kumar, A.R., Venugopalan V.P, & Zinjarde S.S. (2012). Disruption of *Yarrowia lipolytica* biofilms by rhamnolipid biosurfactant. *Aquatic Biosystems*, 8(1), 1.
- Dwivedi, D. & Johri, B.N. (2003) Antifungals from fluorescent pseudomonads: Biosynthesis and regulation. *Current Science*,85(12), 1693–1703.
- Eardly, B. D., Wang, F. S., Whittam, T. S., & Selander, R. K. (1995). Species limits in *Rhizobium* populations that nodulate the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), 507–512. <https://doi.org/10.1128/aem.61.2.507-512.1995>.
- Ebadzadsahrai, G., Higgins Keppler, E. A., Soby, S. D., & Bean, H. D. (2020). Inhibition of fungal growth and induction of a novel volatillome in response to *Chromobacterium vaccinii* volatile organic compounds. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.01035>
- Effmert, U., Kalderás, J., Warnke, R., & Piechulla, B. (2012). Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. *Journal of Chemical Ecology*, 38(6), 665–703. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0135-5>
- Efstathiadou, E., Ntatsi, G., Savvas, D., & Tampakaki, A. P. (2021). Genetic characterization at the species and symbiovar level of indigenous rhizobial isolates nodulating *Phaseolus vulgaris* in Greece. *Scientific Reports*, 11(1), 8674. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88051-8>.
- Egamberdieva D, Davranov K, Wirth S, Hashem A, & Abd-Allah E F. (2017). Impact of soil salinity on the plant-growth-promoting and biological control abilities of root associated bacteria. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24, 1601–1608. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.07.004>.
- Egamberdieva, D., Wirth, S., Bellingrath-Kimura, S. D., Mishra, J., & Arora, N. K. (2019). Salt-tolerant plant growth promoting rhizobacteria for enhancing crop productivity of saline soils. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2791. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02791>.
- Egebo, L. A., Nielsen, S. V., & Jochimsen, B. U. (1991). Oxygen-dependent catabolism of indole-3-acetic acid in *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology*, 173(15), 4897–4901. <https://doi.org/10.1128/jb.173.15.4897-4901.1991>.
- El Arbi, A., Rochex, A., Chataigné, G., Béchet, M., Lecouturier, D., Arnauld, S., Gharsallah, N., & Jacques, P. (2016). The Tunisian oasis ecosystem is a source of antagonistic *Bacillus* spp. Producing diverse antifungal lipopeptides. *Research in Microbiology*, 167(1), 46–57. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.09.003>.
- El Yahyaoui, F., Küster, H., Ben Amor, B., Hohnjec, N., Pühler, A., Becker, A., Gouzy, J., Vernié, T., Gough, C., Niebel, A., Godiard, L., & Gamas, P. (2004). Expression profiling in *Medicago truncatula* identifies more than 750 genes differentially expressed during nodulation, including many potential regulators of the symbiotic program. *Plant Physiology*, 136(2), 3159–3176. <https://doi.org/10.1104/pp.104.043612>.
- Elakhdar, I., Elsakhawy, T., & Abokoura, H. (2020). Alleviation of Salt Stress on Wheat (*Triticum aestivum* L.) by plant growth promoting bacteria strains *Bacillus halotolerans* MSR-H4 and *Lelliottia amnigena* MSR-M49.
- El-Batanony, N. H., Castellano-Hinojosa, A., Correa-Galeote, D., & Bedmar, E. J. (2020). Phylogenetic diversity of bacterial strains from root nodules of legumes grown wild in Egypt. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 27, 101692. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101692>.
- Elboutahiri, N., Thami-Alami, I., & Udupa, S. M. (2010). Phenotypic and genetic diversity in *Sinorhizobium meliloti* and *Sinorhizobium medicae* from drought and salt affected regions of Morocco. *BMC Microbiology*, 10(1), 15. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-15>.
- Elhaissofi, W., Ghoulam, C., Barakat, A., Zeroual, Y., & Bargaz, A. (2022). Phosphate bacterial solubilization: A key rhizosphere driving force enabling higher P use efficiency and crop productivity. *Journal of Advanced Research*, 38, 13–28. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.08.014>
- El-Khateeb, N. M. M., Shalaby, M. E., Belal, E. B. A., & El-Gremi, Sh. M. A. (2012). Symbiotic nitrogen fixation of faba bean plants inoculated with salt-tolerant *Rhizobium* isolates. *Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 3(10), 411–423. <https://doi.org/10.21608/jacb.2012.55014>
- Elleuch, L., Shaaban, M., Smaoui, S., Mellouli, L., Karray-Rebai, I., Fourati-Ben Fguira, L., Shaaban, K. A., & Laatsch, H. (2010). Bioactive secondary metabolites from a new terrestrial *Streptomyces* sp. TN262. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(2), 579–593. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8808-4>.
- Esmaeel, Q., Pupin, M., Jacques, P., & Leclère, V. (2018). Nonribosomal peptides and polyketides of Burkholderia: new compounds potentially implicated in biocontrol and pharmaceuticals. *Environmental Science and Pollution Research International*, 25(30), 29794–29807. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9166-3>.

- Etesami, H. (2022). Root nodules of legumes: A suitable ecological niche for isolating non-rhizobial bacteria with biotechnological potential in agriculture. *Current Research in Biotechnology*, 4, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2022.01.003>.
- Evans, J., Gregory, A., Dobrowolski, N., Morris, S. G., O'Connor, G. E., & Wallace, C. (1996). Nodulation of field-grown *Pisum sativum* and *Vicia faba*: Competitiveness of inoculant strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae determined by an indirect, competitive ELISA method. *Soil Biology and Biochemistry*, 28(2), 247–255. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(95\)00121-2](https://doi.org/10.1016/0038-0717(95)00121-2).
- Fadji, A. E., Santoyo, G., Yadav, A. N., & Babalola, O. O. (2022). Efforts towards overcoming drought stress in crops: Revisiting the mechanisms employed by plant growth-promoting bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 13, 962427. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.962427>.
- Faghire, M., Mandri, B., Oufdou, K., Bargaz, A., Ghoulam, C., Ramírez-Bahena, M. H., Velázquez, E., & Peix, A. (2012). Identification at the species and symbiovar levels of strains nodulating *Phaseolus vulgaris* in saline soils of the Marrakech region (Morocco) and analysis of the *otsA* gene putatively involved in osmotolerance. *Systematic and Applied Microbiology*, 35(3), 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.02.003>.
- Fåhræus, G. (1957). The Infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide Technique. *Microbiology*, 16(2), 374–381. <https://doi.org/10.1099/00221287-16-2-374>.
- Fahsi, N., Mahdi, I., Mesfioui, A., Biskri, L., & Allaoui, A. (2021). Plant growth-promoting rhizobacteria isolated from the Jujube (*Ziziphus lotus*) plant enhance wheat growth, Zn Uptake, and heavy metal tolerance. *Agriculture*, 11(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/agriculture11040316>.
- Fan, H., Zhang, Z., Li, Y., Zhang, X., Duan, Y., & Wang, Q. (2017). Biocontrol of bacterial fruit blotch by *Bacillus subtilis* 9407 via surfactin-mediated antibacterial activity and colonization. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.01973>.
- Fan, M., Liu, Z., Nan, L., Wang, E., Chen, W., Lin, Y., & Wei, G. (2018). Isolation, characterization, and selection of heavy metal-resistant and plant growth-promoting endophytic bacteria from root nodules of *Robinia pseudoacacia* in a Pb/Zn mining area. *Microbiological Research*, 217, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.09.002>.
- Farag, M. A., Ryu, C. M., Sumner, L. W., & Paré, P. W. (2006). GC-MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants. *Phytochemistry*, 67(20), 2262–2268. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.07.021>.
- Ferguson, B. J. & Mathesius, U. (2003). Signalling interactions during nodule development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 22 (1), 47e72.
- Fisch, K. M. (2013). Biosynthesis of natural products by microbial iterative hybrid PKS–NRPS. *RSC Advances*, 3(40), 18228. <https://doi.org/10.1039/c3ra42661k>.
- Fasim, F., Ahmed, N., Parsons, R., & Gadd, G. M. (2002). Solubilization of zinc salts by a bacterium isolated from the air environment of a tannery. *FEMS Microbiology Letters*, 213(1), 1–6. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11277.x>.
- Fiddaman, P. J., & Rossall, S. (1993). The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. *The Journal of Applied Bacteriology*, 74(2), 119–126. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb03004.x>.
- Fiddaman, P. J., & Rossall, S. (1994). Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*, 76(4), 395–405. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb01646.x>.
- Filho, G. N. S., & Vidor, C. (2000). Phosphate solubilization by microorganisms in the presence of different carbon sources. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*, 24(2). <https://doi.org/10.1590/S0100-06832000000200008>.
- Fisch, K. M. (2013). Biosynthesis of natural products by microbial iterative hybrid PKS–NRPS. *RSC Advances*, 3(40), 18228. <https://doi.org/10.1039/c3ra42661k>.
- Fischer, H. M. (1994). Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiological Reviews*, 58(3), 352–386. <https://doi.org/10.1128/mr.58.3.352-386.1994>.
- Fisher, R. F. (2006). Global gene expression in the rhizobial-legume symbiosis. *Symbiosis*, 42, 1-24.
- Flores-Félix, J. D., Velázquez, E., Martínez-Molina, E., González-Andrés, F., Squartini, A., & Rivas, R. (2021). Connecting the lab and the field: genome analysis of *Phyllobacterium* and *Rhizobium* Strains and field performance on two vegetable crops. *Agronomy*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/agronomy11061124>
- Fokkema, N. J. (1978). Fungal antagonisms in the phyllosphere. *Annals of Applied Biology*, 89(1), 115–119. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1978.tb02582.x>.
- Foughalia, A., Bouaoud, Y., Chandeysson, C., Djedidi, M., Tahirine, M., Aissat, K., & Nicot, P. (2022). *Acinetobacter calcoaceticus* SJ19 and *Bacillus safensis* SJ4, two Algerian rhizobacteria protecting

- tomato plants against *Botrytis cinerea* and promoting their growth. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 32(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s41938-022-00511-z>.
- Frankowski, J., Lorito, M., Scala, F., Schmid, R., Berg, G., & Bahl, H. (2001). Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. *Archives of Microbiology*, 176(6), 421–426. <https://doi.org/10.1007/s002030100347>.
- Franza, T., Mahé, B., & Expert, D. (2005). *Erwinia chrysanthemi* requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection. *Molecular Microbiology*, 55(1), 261–275. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04383.x>.
- Fred E.B. & Waksman S.A. (1928). Laboratory manual of general microbiology. McGraw-Hill Book Company: New York.
- Fuqua, W. C., Winans, S. C., & Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 176(2), 269–275. <https://doi.org/10.1128/jb.176.2.269-275.1994>.
- Fusco, G. M., Nicastro, R., Roupael, Y., & Carillo, P. (2022). The effects of the microbial biostimulants approved by EU regulation 2019/1009 on yield and quality of vegetable crops. *Foods*, 11(17), Article 17. <https://doi.org/10.3390/foods11172656>.
- Fusconi, R., & Godinho, M. J. (2002). Screening for exopolysaccharide-producing bacteria from sub-tropical polluted groundwater. *Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia*, 62(2), 363–369. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842002000200020>.
- G A, P., A, T., E, K. I, & R, S. (2013). Antifungal and antibacterial properties of surfactin isolated from *Bacillus subtilis* growing on molasses. *African Journal of Microbiology Research*, 7(25), 3165–3170. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.5565>.
- Gage, D. J. (2002). Analysis of infection thread development using Gfp- and DsRed-Expressing *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 184(24), 7042–7046. <https://doi.org/10.1128/JB.184.24.7042-7046.2002>.
- Gage, D. J. (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 68(2), 280–300. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.280-300.2004>.
- Gao, J., Khan, M. S., Sun, Y., Xue, J., Du, Y., Yang, C., Chebotar, V. K., Tikunov, V. S., Rubanov, I. N., Chen, X., & Zhang, X. (2022). Characterization of an endophytic antagonistic bacterial strain *Bacillus halotolerans* LBG-1-13 with multiple plant growth-promoting traits, stress tolerance, and its effects on lily growth. *BioMed Research International*, 2022, 5960004. <https://doi.org/10.1155/2022/5960004>.
- Gao, P., Qin, J., Li, D., & Zhou, S. (2018). Inhibitory effect and possible mechanism of a *Pseudomonas* strain QBA5 against gray mold on tomato leaves and fruits caused by *Botrytis cinerea*. *PLOS ONE*, 13(1), e0190932. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190932>.
- García-Fraile, P., Mulas-García, D., Peix, A., Rivas, R., González-Andrés, F., & Velázquez, E. (2010). *Phaseolus vulgaris* is nodulated in northern Spain by *Rhizobium leguminosarum* strains harboring two *nodC* alleles present in American *Rhizobium etli* strains: Biogeographical and evolutionary implications. *Canadian Journal of Microbiology*, 56(8), 657–666. <https://doi.org/10.1139/W10-048>.
- Gautam, S., Chauhan, A., Sharma, R., Sehgal, R., & Shirkot, C. K. (2019). Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* for biocontrol of bacterial canker of tomato incited by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Microbial Pathogenesis*, 130, 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.03.006>.
- Gaur, Y. D. (1993). Microbiology, physiology and agronomy of nitrogen fixation: Legume-rhizobium symbiosis. *Proceedings of the Indian National Science Academy. Part B Biological Sciences*, 59 (3–4), 333–58.
- Gayathiri, E., Prakash, P., Karmegam, N., Varjani, S., Awasthi, M. K., & Ravindran, B. (2022). Biosurfactants: Potential and eco-friendly material for sustainable agriculture and environmental Safety—A Review. *Agronomy*, 12(3), 662. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030662>.
- Ge, B. B., Cheng, Y., Liu, Y., Liu, B. H., & Zhang, K. C. (2015). Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants using *Streptomyces ahygroscopicus* strain CK-15. *Letters in Applied Microbiology*, 61(6), 596–602. <https://doi.org/10.1111/lam.12500>.
- Gedamu, S. A., Tsegaye, E. A., & Beyene, T. F. (2021). Effect of rhizobial inoculants on yield and yield components of faba bean (*Vicia faba* L.) on vertisol of Wereillu District, South Wollo, Ethiopia. *CABI Agriculture and Bioscience*, 2(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s43170-021-00025-y>.

- Geniaux, E., Laguerre, G., & Amarger, N. (1993). Comparison of geographically distant populations of *Rhizobium* isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Molecular Ecology*, 2(5), 295–302. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00022.x>
- Gevers, D., Cohan, F. M., Lawrence, J. G., Spratt, B. G., Coenye, T., Feil, E. J., Stackebrandt, E., de Peer, Y. V., Vandamme, P., Thompson, F. L., & Swings, J. (2005). Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 733–739. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1236>.
- Geudens, N. & Martins, J.C. (2018). Cyclic lipodepsipeptides from *Pseudomonas* spp. - biological swiss-army knives. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1867. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01867>.
- Ghadamgahi, F., Tarighi, S., Taheri, P., Saripella, G. V., Anzalone, A., Kalyandurg, P. B., Catara, V., Ortiz, R., & Vetukuri, R. R. (2022). Plant growth-promoting activity of *Pseudomonas aeruginosa* FG106 and its ability to act as a biocontrol agent against potato, tomato and taro pathogens. *Biology*, 11(1), 140. <https://doi.org/10.3390/biology11010140>.
- Ghai, S. K., Hisamatsu, M., Amemura, A., & Harada, T. (1981). Production and chemical composition of extracellular polysaccharides of *Rhizobium*. *Microbiology*, 122(1), 33–40. <https://doi.org/10.1099/00221287-122-1-33>.
- Gkorezis, P., Daghigho, M., Franzetti, A., Van Hamme, J. D., Sillen, W., & Vangronsveld, J. (2016). The interaction between plants and bacteria in the remediation of petroleum hydrocarbons: An Environmental Perspective. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1836. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01836>.
- Glaeser, S. P., & Kämpfer, P. (2015). Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(4), 237–245. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.03.007>
- Glick, B.R., Cheng, Z., Czarny, J., Duan, J. (2007). Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. In: Bakker, P.A.H.M., Raaijmakers, J.M., Bloemberg, G., Höfte, M., Lemanceau, P., Cooke, B.M. (eds) *New Perspectives and Approaches in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Research*. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6776-1\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6776-1_8).
- Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. *Scientifica*, 963401. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>.
- Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169(1), 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>.
- Godoy, L. P., Vasconcelos, A. T. R., Chueire, L. M. O., Souza, R. C., Nicolás, M. F., Barcellos, F. G., & Hungria, M. (2008). Genomic panorama of *Bradyrhizobium japonicum* CPAC 15, a commercial inoculant strain largely established in Brazilian soils and belonging to the same serogroup as USDA 123. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(11), 2743–2753. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.07.016>.
- Gökçe, A. Y., & Kotan, R. (2016). Investigation of biological control possibilities of wheat root rot disease caused by *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) using PGPR and bio-control bacteria in controlled condition. *Plant Protection Bulletin*, 56(1).
- Göker, M., Grimm, G. W., Auch, A. F., Aurahs, R., & Kučera, M. (2010). A clustering optimization strategy for molecular taxonomy applied to planktonic foraminifera SSU rDNA. *Evolutionary Bioinformatics*, 6, EBO.S5504. <https://doi.org/10.4137/EBO.S5504>.
- Goldstein, A.H. (1994) Solubilization of exogenous phosphates by Gram-negative bacteria. In *Cellular and molecular biology of phosphate and phosphorylated compounds in microorganisms* ed. Silver, S. et al. pp. 197–203. Washington,DC: ASM.
- Gomes, D. F., Ormeño-Orrillo, E., & Hungria, M. (2015). Biodiversity, symbiotic efficiency, and genomics of *Rhizobium tropici* and related species. In *Biological Nitrogen Fixation* (pp. 747–756). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119053095.ch74>.
- Gomes, L. C., & Mergulhão, F. J. (2017). Effects of antibiotic concentration and nutrient medium composition on *Escherichia coli* biofilm formation and green fluorescent protein expression. *FEMS Microbiology Letters*, 364(5). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx042>.
- Gong, A.D. et al., (2019). Antifungal activity of volatile emitted from *Enterobacter asburiae* Vt-7 against *Aspergillus flavus* and aflatoxins in peanuts during storage. *Food Control*, 106 <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106718>.
- Gopalakrishnan, S., Humayun, P., Kiran, B. K., Kannan, I. G. K., Vidya, M. S., Deepthi, K., & Rupela, O. (2011). Evaluation of bacteria isolated from rice rhizosphere for biological control of charcoal rot of sorghum caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(6), 1313–1321. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0579-0>.
- Gorai, P. S., Ghosh, R., Mandal, S., Ghosh, S., Chatterjee, S., Gond, S. K., & Mandal, N. C. (2021). *Bacillus siamensis* CNE6- a multifaceted plant growth promoting endophyte of *Cicer arietinum* L. having broad



- spectrum antifungal activities and host colonizing potential. *Microbiological Research*, 252, 126859. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126859>.
- Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P., & Tiedje, J. M. (2007). DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(1), 81–91. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64483-0>.
- Goswami, D., Thakker, J. N., & Dhandhukia, P. C. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1). <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1127500>.
- Gotor-Vila, A., Teixidó, N., Di Francesco, A., Usall, J., Ugolini, L., Torres, R., & Mari, M. (2017). Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. *Food Microbiology*, 64, 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.006>.
- Gouzou, L., Burtin, R., Philippy, R., Bartoli, F., & Heulin, T. (1993). Effect of inoculation with *Bacillus polymyxa* on soil aggregation in the wheat rhizosphere: preliminary examination. *Geoderma* 56, 479–491. doi: 10.1016/0016-7061(93)90128-8.
- Goodlass, G. & Smith, K.A. (1979). Effects of ethylene on root extension and nodulation of pea (*Pisum sativum* L.) and white clover (*Trifolium repens* L.). *Plant Soil* 51, 387–395. <https://doi.org/10.1007/BF02197785>.
- Graham, P. H. (1981). Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: A review. *Field Crops Research*, 4, 93–112. [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(81\)90060-5](https://doi.org/10.1016/0378-4290(81)90060-5).
- Graham, P. H. (1992). Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(6), 475–484. <https://doi.org/10.1139/m92-079>.
- Graham, P. H., Hungria, M., & Tlustý, Becki. (2004). Breeding for better nitrogen fixation in grain legumes: Where do the rhizobia fit in? *Crop Management*, 3(1), 1–6. <https://doi.org/10.1094/CM-2004-0301-02-RV>.
- Grandclément, C., Tannières, M., Moréra, S., Dessaux, Y., & Faure, D. (2016). Quorum quenching: Role in nature and applied developments. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(1), 86–116. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv038>.
- Grange, L., & Hungria, M. (2004). Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(9), 1389–1398. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.03.005>.
- Griesmann, M. et al. (2018). Phylogenomics reveals multiple losses of nitrogen-fixing root nodule symbiosis. *Science (New York, N.Y.)*, 361(6398), eaat1743. <https://doi.org/10.1126/science.aat1743>.
- Gross, D. C., & Vidaver, A. K. (1978). Bacteriocin-like substances produced by *Rhizobium japonicum* and other slow-growing rhizobia. *Applied and Environmental Microbiology*, 36(6), 936–943.
- Grosskinsky, D. K., et al. (2011). Cytokinins mediate resistance against *Pseudomonas syringae* in tobacco through increased antimicrobial phytoalexin synthesis independent of salicylic acid signaling. *Plant Physiology*, 157(2), 815–830. <https://doi.org/10.1104/pp.111.182931>.
- Guendouz, D., Belaouni, H. A., Yacine, G., Yekkour, A., Djemouai, N., & Zitouni, A. (2021). Potential for plant growth promotion of *Kocuria arsenatis* Strain ST19 on tomato under salt stress conditions. *South African Journal of Botany*, 138, 94–104. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.12.014>.
- Guinebretiere, M. H., Nguyen-The, C., Morrison, N., Reich, M., & Nicot, P. (2000). Isolation and characterization of antagonists for the biocontrol of the postharvest wound pathogen *Botrytis cinerea* on strawberry fruits. *Journal of Food Protection*, 63(3), 386–394. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-63.3.386>
- Guo, J. & Chi, J. (2014) Effect of Cd-tolerant plant growth-promoting rhizobium on plant growth and Cd uptake by *Lolium multiflorum* Lam. and *Glycine max* (L.) Merr. in Cd-contaminated soil. *Plant Soil*, 375, 205–214.
- Guo, D.-J., Singh, R. K., Singh, P., Li, D.-P., Sharma, A., Xing, Y.-X., Song, X.-P., Yang, L.-T., & Li, Y.-R. (2020). Complete Genome Sequence of *Enterobacter roggenskampii* ED5, a nitrogen fixing plant growth promoting endophytic bacterium with biocontrol and stress tolerance properties, isolated from sugarcane root. *Frontiers in Microbiology*, 11, 580081. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.580081>.
- Gupta, P., Kumar, V., Usmani, Z., Rani, R., Chandra, A., & Gupta, V. K. (2020). Implications of plant growth promoting *Klebsiella* sp. CPSB4 and *Enterobacter* sp. CPSB49 in luxuriant growth of tomato plants under chromium stress. *Chemosphere*, 240, 124944. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124944>.

- Gurkanli, C. T., Ozkoc, I., & Gunduz, I. (2013). Genetic diversity of rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Central Black Sea Region of Turkey. *Annals of Microbiology*, 63(3), 971–987. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0551-3>.
- Haas, D., & Defago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *nature reviews microbiology*, 3, 307–319. doi: 10.1038/nrmicro1129.
- Habibi, S., Djedidi, S., Ohkama-Ohtsu, N., Sarhadi, W. A., Kojima, K., Rallos, R. V., Ramirez, M. D. A., Yamaya, H., Sekimoto, H., & Yokoyama, T. (2019). Isolation and screening of indigenous plant growth-promoting rhizobacteria from different rice cultivars in Afghanistan Soils. *Microbes and Environments*, 34(4), 347–355. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME18168>.
- Habtegebrial Habtemichael, K., Ram Singh, B., & Aune, J. B. (2007). Wheat response to N<sub>2</sub> fixed by faba bean (*Vicia faba* L.) as affected by sulfur fertilization and rhizobial inoculation in semi-arid Northern Ethiopia. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 170(3), 412–418. <https://doi.org/10.1002/jpln.200625006>.
- Hakim, S., Mirza, B. S., Imran, A., Zaheer, A., Yasmin, S., Mubeen, F., Mclean, J. E., & Mirza, M. S. (2020). Illumina sequencing of 16S rRNA tag shows disparity in rhizobial and non-rhizobial diversity associated with root nodules of mung bean (*Vigna radiata* L.) growing in different habitats in Pakistan. *Microbiological Research*, 231, 126356. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126356>.
- Halder, A. K., & Chakrabarty, P. K. (1993). Solubilization of inorganic phosphate by *Rhizobium*. *Folia Microbiologica*, 38(4), 325–330. <https://doi.org/10.1007/BF02898602>.
- Han, N., Qiang, Y., & Zhang, W. (2016). ANItools web: A web tool for fast genome comparison within multiple bacterial strains. *Database: The Journal of Biological Databases and Curation*, 2016, baw084. <https://doi.org/10.1093/database/baw084>.
- Han, S.-Z., Wang, E.-T., & Chen, W.-X. (2005). Diverse bacteria isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* and species within the genera *Campylotropis* and *Cassia* grown in China. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(3), 265–276. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2004.12.005>.
- Handley, B. A., Hedges, A. J., & Beringer, J. E. (1998). Importance of host plants for detecting the population diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(2), 241–249. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(97\)00103-X](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00103-X).
- Haque, M. M., Biswas, M. S., Mosharaf, M. K., Haque, M. A., Islam, M. S., Nahar, K., Islam, M. M., Shozib, H. B., Islam, M. M., & Ferdous-E-Elahi. (2022). Halotolerant biofilm-producing rhizobacteria mitigate seawater-induced salt stress and promote growth of tomato. *Scientific Reports*, 12(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09519-9>.
- Harder, W., Attwood, M. M., & Quayle, J. R. (1973). Methanol assimilation by *Hyphomicrobium* sp. *Microbiology* 78, 155–163.
- Hartmann, M., Frey, B., Mayer, J., Mäder, P., & Widmer, F. (2015). Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming. *The ISME Journal*, 9(5), 1177–1194. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.210>.
- Hauser, F. et al. (2007). Dissection of the *Bradyrhizobium japonicum* NifA+sigma54 regulon, and identification of a ferredoxin gene (*fdxN*) for symbiotic nitrogen fixation. *Molecular Genetics and Genomics : MGG*, 278(3), 255–271. <https://doi.org/10.1007/s00438-007-0246-9>.
- Hayes, C. S., Koskiniemi, S., Ruhe, Z. C., Poole, S. J., & Low, D. A. (2014). Mechanisms and biological roles of contact-dependent growth inhibition systems. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(2), a010025–a010025. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010025>.
- Heatley, N. G. (1944). A method for the assay of penicillin. *Biochemical Journal*, 38(1), 61–65.
- Heinz, S.(1988). *Microbial Ecology : Organisms, Habitats, Activities*. Cambridge Studies in Ecology.
- Heras, J., Domínguez, C., Mata, E., Pascual, V., Lozano, C., Torres, C., & Zarazaga, M. (2016). A survey of tools for analysing DNA fingerprints. *Briefings in Bioinformatics*, 17(6), 903–911. <https://doi.org/10.1093/bib/bbv016>.
- Herrera-Cervera, J. A., Caballero-Mellado, J., Laguerre, G., Tichy, H.-V., Requena, N., Amarger, N., Martínez-Romero, E., Olivares, J., & Sanjuan, J. (1999). At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 30(1), 87–97. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00638.x>.
- Herridge, D. F., Peoples, M. B., & Boddey, R. M. (2008). Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil*, 311(1), 1–18. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9668-3>.
- Hershey, D. M., Lu, X., Zi, J., & Peters, R. J. (2014). Functional conservation of the capacity for ent-kaurene biosynthesis and an associated operon in certain rhizobia. *Journal of Bacteriology*, 196(1), 100–106. <https://doi.org/10.1128/JB.01031-13>.

- Himabindu, Y., Chakradhar, T., Reddy, M.C., Kanygin, A., Redding, K.E., Chandrasekhar, T. (2016). Salt-tolerant genes from halophytes are potential key players of salt tolerance in glycophytes. *Environmental and Experimental Botany*, *124*, 39–63.
- Hider, R.C. & Kong, X. (2010). Chemistry and biology of siderophores. *Natural product reports*, *27*(5), 637–657. <https://doi.org/10.1039/b906679a>.
- Hirsch, P. (2002). Spret, J.I. Nodulation in legumes. *Annals of Botany*, *89*(6), 797–798. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf128>.
- Hirsch, P. R., Van Montagu, M., Johnston, A. W. B., Brewin, N. J., & Schell, J. Y. (1980). Physical identification of bacteriocinogenic, nodulation and other plasmids in strains of *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology*, *120*(2), 403–412. <https://doi.org/10.1099/00221287-120-2-403>.
- Hoffman, B. M., Lukoyanov, D., Yang, Z.-Y., Dean, D. R., & Seefeldt, L. C. (2014). Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: The Next Stage. *Chemical Reviews*, *114*(8), 4041–4062. <https://doi.org/10.1021/cr400641x>.
- Hoffmann, H., Stindl, S., Stumpf, A., Mehlen, A., Monget, D., Heesemann, J., Schleifer, K. H., & Roggenkamp, A. (2005). Description of *Enterobacter ludwigii* sp. nov., a novel *Enterobacter* species of clinical relevance. *Systematic and Applied Microbiology*, *28*(3), 206–212. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2004.12.009>.
- Hořková, M., Schreiberová, O., Jeřdík, R., Chudoba, J., Masák, J., Sigler, K., & Řezanka, T. (2013). Characterization of rhamnolipids produced by non-pathogenic *Acinetobacter* and *Enterobacter* bacteria. *Bioresource Technology*, *130*, 510–516. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.085>
- Hou, B. C., Wang, E. T., Li, Y., Jia, R. Z., Chen, W. F., Gao, Y., Dong, R. J., & Chen, W. X. (2009). *Rhizobium tibeticum* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from *Trigonella archiducis-nicolai* (Sirj.) Vassilcz. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *59*(12), 3051–3057. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.009647-0>.
- Howieson, J. G., De Meyer, S. E., Vivas-Marfisi, A. I., Ratnayake, S., Ardley, J. K., & Yates, R. J. (2013). Novel *Burkholderia* bacteria isolated from *Lebeckia ambigua* – A perennial suffrutescent legume of the fynbos. *Soil Biology and Biochemistry*, *60*, 55–64.
- Howieson, J. G., Yates, R. J., O'Hara, G. W., Ryder, M., & Real, D. (2005). The interactions of *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii in nodulation of annual and perennial *Trifolium* spp. from diverse centres of origin. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, *45*(3), 199–207. <https://doi.org/10.1071/EA03167>.
- Howieson, J. G., & Dilworth, M. J. (2016). Working with rhizobia. Australian Centre for International Agricultural Research.
- Hsouna, J., Gritli, T., Ilahi, H., Ellouze, W., Mansouri, M., Chihaoui, S., Bouhnik, O., Missbah El Idrissi, M., Abdelmoumen, H., Wipf, D., Courty, P. E., Bekki, A., Tambong, J. T., & Mnasri, B. (2022). Genotypic and symbiotic diversity studies of rhizobia nodulating *Acacia saligna* in Tunisia reveal two novel symbiovars within the *Rhizobium leguminosarum* complex and Bradyrhizobium. *Systematic and Applied Microbiology*, *45*(4), 126343. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2022.126343>.
- Huang, X., Lu, Z., Zhao, H., Bie, X., Lü, F., & Yang, S. (2006). Antiviral activity of antimicrobial lipopeptide from *Bacillus subtilis* fmbj Against *Pseudorabies* virus, Porcine Parvovirus, Newcastle Disease virus and infectious bursal disease virus *in vitro*. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, *4*(12), 373–377. <https://doi.org/10.1007/s10989-006-9041-4>.
- Huang, X., Suo, J., & Cui, Y. (2011). Optimization of antimicrobial activity of surfactin and polylysine against *Salmonella enteritidis* in milk evaluated by a response surface methodology. *Foodborne Pathogens and Disease*, *8*(3), 439–443. <https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0738>.
- Hulton, C. S. J., Higgins, C. F., & Sharp, P. M. (1991). ERIC sequences: A novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Molecular Microbiology*, *5*(4), 825–834. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb00755.x>.
- Hungria, M., Andrade, D. de S., Chueire, L. M. de O., Probanza, A., Guttierrez-Mañero, F. J., & Megías, M. (2000). Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biology and Biochemistry*, *32*(11), 1515–1528. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00063-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00063-8).
- Hungria, M., Campo, R. J., & Mendes, I. C. (2003). Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. *Biology and Fertility of Soils*, *39*(2), 88–93. <https://doi.org/10.1007/s00374-003-0682-6>.
- Hungria, M., Campo, R.J., Mendes, I.C., & Graham, P.H. (2006). Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* L. Merr.) in South

- America. In: Singh, R.P.; Shankar, N.; Jaiwal, P.K., eds. Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity. Houston, Texas: Studium Press, LLC, 43-93.
- Hurria H Al-Juboory, & Al-Hadithy, H. B. (2021). Evaluation of chitosan and salicylic acid to induce systemic resistance in eggplant against under plastic *Botrytis cinerea* house conditions *Manuscript Number: 000 NAAS Rating: 4.96*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.17194.34241>.
- Hynes, M. F., & O'Connell, M. P. (1990). Host plant effect on competition among strains of *Rhizobium leguminosarum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 36(12), 864–869. <https://doi.org/10.1139/m90-150>.
- Igarashi, R. Y., & Seefeldt, L. C. (2003). Nitrogen fixation: The mechanism of the Mo-dependent nitrogenase. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 38(4), 351–384. <https://doi.org/10.1080/10409230391036766>.
- Igiehon, N. O., Babalola, O. O., & Aremu, B. R. (2019). Genomic insights into plant growth promoting rhizobia capable of enhancing soybean germination under drought stress. *BMC Microbiology*, 19(1), 159. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1536-1>.
- Ilangumaran, G., & Smith, D. L. (2017). Plant growth promoting rhizobacteria in amelioration of salinity stress: A systems biology perspective. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1768. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01768>.
- Ilangumaran, G., & Smith, D. L. (2017). Plant growth promoting rhizobacteria in amelioration of salinity stress: A systems biology perspective. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1768. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01768>.
- Ilyas, N., Yang, Y., Zhang, C., Singh, R. P., Yu, Q., Yuan, Y., You, X., & Li, Y. (2022). Temporal dynamics and variation in the alfalfa root nodule and rhizosphere microbial communities of coastal sand and lawn soil. *Journal of Plant Interactions*, 17(1), 173–182. <https://doi.org/10.1080/17429145.2021.2024899>.
- Illmer, P. & Schinner F. (1995). Solubilization of inorganic calcium phosphates—solubilization mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(3), 257-263. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)00190-C](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)00190-C)
- Imada, E. L., Rolla dos Santos, A. A. de P., Oliveira, A. L. M. de, Hungria, M., & Rodrigues, E. P. (2017). Indole-3-acetic acid production via the indole-3-pyruvate pathway by plant growth promoter *Rhizobium tropici* CIAT 899 is strongly inhibited by ammonium. *Research in Microbiology*, 168(3), 283–292. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.10.010>.
- Ipsilantis, I., Lotos, L., & Tsialtas, I. T. (2019). Diversity and nodulation effectiveness of rhizobia and mycorrhizal presence in climbing dry beans grown in Prespa lakes plain, Greece. *Archives of Microbiology*, 201(9), 1151–1161. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01679-z>.
- Irie, Y., O'toole, G. A., & Yuk, M. H. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids disperse *Bordetella bronchiseptica* biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, 250(2), 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.07.012>
- Iqbal, A. & Hasnain, S. (2013). *Aeromonas punctata* PNS-1: a promising candidate to change the root morphogenesis of *A. thaliana* in MS and sand system. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, 657–665.
- Ivanchenko, M. G., Muday, G. K., & Dubrovsky, J. G. (2008). Ethylene-auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology*, 55(2), 335–347. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03528.x>.
- Ivanov, S., Fedorova, E., & Bisseling, T. (2010). Intracellular plant microbe associations: Secretory pathways and the formation of perimicrobial compartments. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(4), 372–377. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.04.005>.
- Izoré, T. & Cryle, M.J. (2018). The many faces and important roles of protein-protein interactions during non-ribosomal peptide synthesis. *Natural Product Reports.*, 35(11), 1120–1139.
- Jadhav, M., Kagalkar, A., Jadhav, S., & Govindwar, S. (2011). Isolation, characterization, and antifungal application of a biosurfactant produced by *Enterobacter* sp. MS16. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(11), 1347–1356. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201100023>.
- Jain, R., Saxena, J., & Sharma, V. (2010). The evaluation of free and encapsulated *Aspergillus awamori* for phosphate solubilization in fermentation and soil plant system. *Applied Soil Ecology*;46(1):90–4. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.06.008>.
- James, E. K., Gyaneshwar, P., Mathan, N., Barraquio, W. L., Reddy, P. M., Iannetta, P. P. M., Olivares, F. L., & Ladha, J. K. (2002). Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(9), 894–906. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.9.894>.

- James, E. K., Iannetta, P. P. M., Deeks, L., Sprent, J. I., & Minchin, F. R. (2000). Detopping causes production of intercellular space occlusions in both the cortex and infected region of soybean nodules. *Plant, Cell & Environment*, 23(4), 377–386. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2000.00549.x>.
- James, E. K., & Olivares, F. L. (1998). Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 17(1), 77–119. <https://doi.org/10.1080/07352689891304195>.
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761–2764. <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>.
- Jang, H., Kim, S. T., & Sang, M. K. (2022). Suppressive effect of bioactive extracts of *Bacillus* sp. H8-1 and *Bacillus* sp. K203 on tomato wilt caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Microorganisms*, 10(2), 403. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020403>.
- Jarvis, B. D. W., Van Berkum, P., Chen, W. X., Nour, S. M., Fernandez, M. P., Cleyet-Marel, J. C., & Gillis, M. (1997). Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(3), 895–898. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-3-895>.
- Jha SK, Ahmad Z & Crowley D.E.(2018) Fuzzy-genetic approaches for estimation of microbial rock phosphate solubilization in sandy clay loam textured soil. *Computers and Electronics in Agriculture*;150:125–33. doi: <https://doi.org/10.1016/j.compag.2018.04.014>.
- Jha, Y., & Subramanian, R. B. (2014). PGPR regulate caspase-like activity, programmed cell death, and antioxidant enzyme activity in paddy under salinity. *Physiology and Molecular Biology of Plants :An International Journal of Functional Plant Biology*, 20(2), 201–207. <https://doi.org/10.1007/s12298-014-0224-8>.
- Jiang, F., et al. (2012). Multiple impacts of the plant growthpromoting rhizobacterium *Variovorax paradoxus* 5C-2 on nutrient and ABA relations of *Pisum sativum*. *Journal of Experimental Botany* 63, 6421–6430.
- Jiao, Y. S., Yan, H., Ji, Z. J., Liu, Y. H., Sui, X. H., Wang, E. T., Guo, B. L., Chen, W. X., & Chen, W. F. (2015). *Rhizobium sophorae* sp. nov. and *Rhizobium sophoriradicis* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of the medicinal legume *Sophora flavescens*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(Pt\_2), 497–503. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.068916-0>.
- Jiménez-Esquilín, A. E., & Roane, T. M. (2005). Antifungal activities of actinomycete strains associated with high-altitude sagebrush rhizosphere. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32(8), 378–381. <https://doi.org/10.1007/s10295-005-0007-x>.
- Jiménez-Gómez, A., Flores-Félix, J. D., García-Fraile, P., Mateos, P. F., Menéndez, E., Velázquez, E., & Rivas, R. (2018). Probiotic activities of *Rhizobium laguerreae* on growth and quality of spinach. *Scientific Reports*, 8(1), 295. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18632-z>.
- Jimenez-Quiros, C., Okechukwu, E. C., Hong, Y., Baysal, Ö., & Tör, M. (2022). Comparison of antifungal activity of *Bacillus* strains against *Fusarium graminearum* *in vitro* and *in planta*. *Plants*, 11(15), Article 15. <https://doi.org/10.3390/plants11151999>.
- Johnston, A. W. B. (2004). Mechanisms and regulation of iron uptake in the rhizobia. In *Iron Transport in Bacteria* (pp. 469–488). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1128/9781555816544.ch30>.
- Jones, K. M., Kobayashi, H., Davies, B. W., Taga, M. E., & Walker, G. C. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: The *Sinorhizobium–Medicago* model. *Nature Reviews. Microbiology*, 5(8), 619–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1705>.
- Jorin, B., & Imperial, J. (2015). Population genomics analysis of legume host preference for specific rhizobial genotypes in the *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* symbioses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(3), 310–318. Scopus. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-14-0296-FI>.
- Jorin, B., Palacios, J. M., Peix, Á., & Imperial, J. (2020). *Rhizobium ruizarguesonis* sp. nov., isolated from nodules of *Pisum sativum* L. *Systematic and Applied Microbiology*, 43(4), 126090. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126090>.
- Josephson, K. L., & Pepper, I. L. (1984). Competitiveness and effectiveness of strains of *Rhizobium phaseoli* isolated from the sonoran desert. *Soil Biology and Biochemistry*, 16(6), 651–655. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(84\)90086-5](https://doi.org/10.1016/0038-0717(84)90086-5).
- Jouve, L., Hoffmann, L., & Hausman, J. F. (2004). Polyamine, carbohydrate, and proline content changes during salt stress exposure of aspen (*Populus tremula* L.): involvement of oxidation and osmoregulation metabolism. *Plant Biology (Stuttgart, Germany)*, 6(1), 74–80. <https://doi.org/10.1055/s-2003-44687>.

- Jung, W. J., Mabood, F., Souleimanov, A., Whyte, L. G., Niederberger, T. D., & Smith, D. L. (2014). Antibacterial activity of antagonistic bacterium *Bacillus subtilis* DJM-51 against phytopathogenic *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* ATCC 7429 *in vitro*. *Microbial Pathogenesis*, *77*, 13–16. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.10.008>.
- Júnior, R.F.G., Pedrinho, E.A.N., Castellane, T.C.L., & de Macedo Lemos, E.G., 2011. Auxin producing bacteria isolated from the roots of *Cattleya walkeriana*, an endangered Brazilian orchid, and their role in acclimatization. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* *35*, 729–737.
- Kai, M., & Piechulla, B. (2009). Plant growth promotion due to rhizobacterial volatiles--an effect of CO<sub>2</sub>?. *FEBS Letters*, *583*(21), 3473–3477. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.09.053>.
- Kalita, M., Małek, W., & Coutinho, T. A. (2020). Putative novel *Bradyrhizobium* and *Phyllobacterium* species isolated from root nodules of *Chamaecytisus ruthenicus*. *Systematic and Applied Microbiology*, *43*(2), 126056. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126056>.
- Kalozoumis, P., Savvas, D., Aliferis, K., Ntatsi, G., Marakis, G., Simou, E., Tampakaki, A., & Karapanos, I. (2021). Impact of plant growth-promoting rhizobacteria inoculation and grafting on tolerance of tomato to combined water and nutrient stress assessed via metabolomics analysis. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 670236. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.670236>.
- Kan, F. L., Chen, Z. Y., Wang, E. T., Tian, C. F., Sui, X. H., & Chen, W. X. (2007). Characterization of symbiotic and endophytic bacteria isolated from root nodules of herbaceous legumes grown in Qinghai–Tibet plateau and in other zones of China. *Archives of Microbiology*, *188*(2), 103–115. <https://doi.org/10.1007/s00203-007-0211-3>.
- Kapoor, R., Gupta, M. K., Kumar, N., & Kanwar, S. S. (2017a). Analysis of *nhaA* gene from salt tolerant and plant growth promoting *Enterobacter ludwigii*. *Rhizosphere*, *4*, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2017.07.002>.
- Karavidas, I., Ntatsi, G., Ntanasi, T., Vlachos, I., Tampakaki, A., Iannetta, P. P. M., & Savvas, D. (2020). Comparative assessment of different crop rotation schemes for organic common bean production. *Agronomy*, *10*(9), 1269. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091269>.
- Kareem, M. A., & Ahmed, S. A. (2016). Determining the optimum conditions for bioemulsifier produced by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* isolated from *Vicia faba* root nodules. *Iraqi Journal of Science*, 2188–2196.
- Kasim W A, Gaafar R M, Abou-Ali R M, Omar M N, & Hewait H M. (2016). Effect of biofilm forming plant growth promoting rhizobacteria on salinity tolerance in barley. *Annals of Agricultural Sciences*. *61*(2), 217–227. <https://doi.org/10.1016/j.aosas.2016.07.003>.
- Katiyar, D., Hemantaranjan, A., Singh, B., & Malakar, A. (2017). Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacteria *Enterobacter hormaechei* and their suppression efficacy against *Colletotrichum falcatum* in combination with chitosan. *International Journal of Plant & Soil Science*, *14*, 1–12. <https://doi.org/10.9734/IJPSS/2017/31549>.
- Kebede, P. K., & Lele, T. T. (2022). Evaluation of best performing indigenous Rhizobium strains on productivity of faba bean in Gumer District, south-eastern Ethiopia. *10*(2).
- Kefi, A., Slimene, I. B., Karkouch, I., Rihouey, C., Azzeiz, S., Bejaoui, M., Belaid, R., Cosette, P., Jouenne, T., & Limam, F. (2015). Characterization of endophytic *Bacillus* strains from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) displaying antifungal activity against *Botrytis cinerea* Pers. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *31*(12), 1967–1976. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1943-x>.
- Kelemu, S., Thomas B, R. J., Moreno, C. X., & Ocampo B, G. I. (1995). Strains of Bradyrhizobium from tropical forage legumes inhibit *Rhizoctonia solani* AG-I *in vitro*. *24*, 5.
- Khan, M.S, Zaidi, A & Musarrat, J. (2014). Phosphate solubilizing microorganisms: Principles and application of microphos technology. [10.1007/978-3319-08216-5](https://doi.org/10.1007/978-3319-08216-5).
- Khan, Z., Rho, H., Firrincieli, A., Hung, S. H., Luna, V., Masciarelli, O., Kim, S.-H., & Doty, S. L. (2016). Growth enhancement and drought tolerance of hybrid poplar upon inoculation with endophyte consortia. *Current Plant Biology*, *6*, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2016.08.001>.
- Khan, M.R. & Siddiqui, Z.A. (2019). Potential of *Pseudomonas putida*, *Bacillus subtilis*, and their mixture on the management of *Meloidogyne incognita*, *Pectobacterium betavasculorum*, and *Rhizoctonia solani* disease complex of beetroot (*Beta vulgaris* L.). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, *29*(73). <https://doi.org/10.1186/s41938-019-0174-0>.
- Khleekorn, S., McGovern, R., & Wongrueng, S. (2015). Control of the banana anthracnose pathogen using antagonistic microorganisms. *International Journal of Agricultural Technology*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Control-of-the-banana-anthracnose-pathogen-using-Khleekorn-McGovern/aab7ddfe974fed74b7e5067289f64af4de48607c>.

- Kibido, T., Kunert, K., Makgopa, M., Greve, M., & Vorster, J. (2020). Improvement of rhizobium-soybean symbiosis and nitrogen fixation under drought. *Food and Energy Security*, 9(1), e177. <https://doi.org/10.1002/fes3.177>.
- Kiran, G. S., Ninawe, A. S., Lipton, A. N., Pandian, V., & Selvin, J. (2016). Rhamnolipid biosurfactants: evolutionary implications, applications and future prospects from untapped marine resource. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(3), 399–415. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.979758>
- Klaic, R., Giroto, A.S., Guimarães, G. G.F., Plotegher, F., Ribeiro, C., Zangirolami, T.C, et al. (2018). Nanocomposite of starch-phosphate rock bioactivated for environmentally-friendly fertilization. *Minerals Engineering*, 128, 230–7. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2018.09.002>.
- Kleitman, F., Barash, I., Burger, A., Iraki, N., Falah, Y., Sessa, G., Weinthal, D., Chalupowicz, L., Gartemann, K.-H., Eichenlaub, R., & Manulis-Sasson, S. (2008). Characterization of a *Clavibacter michiganensis* subsp. michiganensis population in Israel. *European Journal of Plant Pathology*, 121(4), 463–475. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9264-z>.
- Klement, Z., et al. (1990) Isolation of Bacteria. In: Klement, Z., Rudolph, K. and Sands, D.C., Eds., *Methods in Phytobacteriology*, Akademiai Kiado, Budapest, 95-124.
- Knežević, M., Berić, T., Buntić, A., Jovković, M., Avdović, M., Stanković, S., Delić, D., & Stajković-Srbinić, O. (2022). Native *Mesorhizobium* strains improve yield and nutrient composition of the common bird's-foot trefoil grown in an acid soil. *Rhizosphere*, 21, 100487. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100487>.
- Knudsen, I. M. B., Hockenhull, J., Jensen, D. F., Gerhardson, B., Hökeberg, M., Tahvonen, R., Teperi, E., Sundheim, L., & Henriksen, B. (1997). Selection of biological control agents for controlling soil and seed-borne diseases in the field. *European Journal of Plant Pathology*, 103(9), 775–784. <https://doi.org/10.1023/A:1008662313042>.
- Kobayashi, M., Suzuki, T., Fujita, T., Masuda, M., & Shimizu, S. (1995). Occurrence of enzymes involved in biosynthesis of indole-3-acetic acid from indole-3-acetonitrile in plant-associated bacteria, *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(3), 714–718. doi: 10.1073/pnas.92.3.714
- Kohlmeier, M. G., Yudistira, H., Zhang, X. L., Fristensky, B., Levin, D. B., Sparling, R., & Oresnik, I. J. (2015). Draft genome sequence of the bacteriocin-producing *Bradyrhizobium japonicum* strain FN1. *Genome Announcements*, 3(4), e00812-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00812-15>.
- Kolomiiets, Y., Grygoryuk, I., Likhanov, A., Butsenko, L., & Blume, Y. (2019). Induction of bacterial canker resistance in tomato plants using plant growth promoting rhizobacteria. *The Open Agriculture Journal*, 13(1), 215–222. <https://doi.org/10.2174/1874331501913010215>.
- Kondorosi, E., Roudier, F., & Gendreau, E. (2000). Plant cell-size control: Growing by ploidy? *Current Opinion in Plant Biology*, 3(6), 488–492. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00118-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00118-7).
- Konstantinidis, K. T., Ramette, A., & Tiedje, J. M. (2006). Toward a more robust assessment of intraspecies diversity, using fewer genetic markers. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 7286–7293. <https://doi.org/10.1128/AEM.01398-06>.
- Konstantinidis, K. T., & Tiedje, J. M. (2005). Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(7), 2567–2572. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409727102>.
- Kucey, R. M. N., Janzen, H. H., and Leggett, M. E. (1989). Microbial mediated increases in plant available phosphorus. *Advances in Agronomy*, 42, 199–228. doi: 10.1016/S0065-2113(08)60525-8.
- Kuhad, R.C., Singh, S., Lata & Singh, A. (2011) Phosphate solubilizing microorganisms. In: Singh, A., Parmar, N. and Kuhad, R.C., Eds., *Bioaugmentation, Biostimulation and Biocontrol*, Soil Biology Series, 28, Springer, Heidelberg, 65-84. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-19769-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-642-19769-7_4).
- Kumar, N., & Dubey, R. C. (2022). Plant growth-promoting attributes of an endophyte *Enterobacter roggenkampii* BLS02 isolated from *Barleria lupulina* Lindl. *Organic Agriculture*, 12(1), 137–145. <https://doi.org/10.1007/s13165-021-00375-x>.
- Kumar, N., Lad, G., Giuntini, E., Kaye, M. E., Udomwong, P., Shamsani, N. J., Young, J. P. W., & Bailly, X. (2015). Bacterial genospecies that are not ecologically coherent: Population genomics of *Rhizobium leguminosarum*. *Open Biology*, 5(1), 140133. <https://doi.org/10.1098/rsob.140133>.
- Kumar, R. P. (2004). 'Molecular basis of nodulation competitiveness among strains of *Bradyrhizobium* specific to mungbean'. New Delhi: Indian Agricultural Research Institute.
- Kumari, B., Mallick, M., Solanki, M., Solanki, A., Hora, A., & Guo, W. (2019). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): *Modern Prospects for Sustainable Agriculture* (pp. 109–127). [https://doi.org/10.1007/978-981-13-6040-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-981-13-6040-4_6).

- Kumawat, K. C., Singh, I., Nagpal, S., Sharma, P., Gupta, R. K., & Sirari, A. (2022). Co-inoculation of indigenous *Pseudomonas oryzae* and *Bradyrhizobium* sp. modulates the growth, symbiotic efficacy, nutrient acquisition, and grain yield of soybean. *Pedosphere*, 32(3), 438–451. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(21\)60085-1](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(21)60085-1).
- Kurtz, S., Phillippy, A., Delcher, A. L., Smoot, M., Shumway, M., Antonescu, C., & Salzberg, S. L. (2004). Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biology*, 5(2), R12. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-2-r12>.
- Kusale, S. P., Attar, Y. C., Sayyed, R. Z., Malek, R. A., Ilyas, N., Suriani, N. L., Khan, N., & El Enshasy, H. A. (2021). Production of plant beneficial and antioxidants metabolites by *Klebsiella variicola* under salinity stress. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(7), 1894. <https://doi.org/10.3390/molecules26071894>.
- Kwon, S.-W., Park, J.-Y., Kim, J.-S., Kang, J.-W., Cho, Y.-H., Lim, C.-K., Parker, M. A., & Lee, G.-B. (2005). Phylogenetic analysis of the genera *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* on the basis of 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), 263–270. <https://doi.org/10.1099/ijls.0.63097-0>.
- Kwong, J. C., McCallum, N., Sintchenko, V., & Howden, B. P. (2015). Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. *Pathology*, 47(3), 199–210. <https://doi.org/10.1097/PAT.000000000000235>
- Laguerre, G., Geniaux, E., Mazurier, S. I., Casartelli, R. R., & Amarger, N. (1993). Conformity and diversity among field isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae, bv. trifolii, and bv. phaseoli revealed by DNA hybridization using chromosome and plasmid probes. *Canadian Journal of Microbiology*, 39(4), 412–419. <https://doi.org/10.1139/m93-060>.
- Laguerre, G., Louvrier, P., Allard, M.-R., & Amarger, N. (2003). Compatibility of rhizobial genotypes within natural populations of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae for nodulation of host legumes. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 2276–2283. Scopus. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.2276-2283.2003>.
- Laguerre, G., Mavingui, P., Allard, M. R., Charnay, M. P., Louvrier, P., Mazurier, S. I., Rigottier-Gois, L., & Amarger, N. (1996). Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: Application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(6), 2029–2036. <https://doi.org/10.1128/aem.62.6.2029-2036.1996>.
- Laguerre, G., Mazurier, S. I., & Amarger, N. (1992). Plasmid profiles and restriction fragment length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae in field populations. *FEMS Microbiology Letters*, 101(1), 17–26. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90693-I](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90693-I).
- Laguerre, G., Nour, S. M., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P., & Amarger, N. (2001). Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology (Reading, England)*, 147(4), 981–993. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-4-981>.
- Laguerre, G., van Berkum, P., Amarger, N., & Prévost, D. (1997). Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12), 4748–4758. <https://doi.org/10.1128/aem.63.12.4748-4758.1997>.
- Lai, W.-A., Hameed, A., Lin, S.-Y., Hung, M.-H., Hsu, Y.-H., Liu, Y.-C., Shahina, M., Shen, F.-T., & Young, C.-C. (2015). *Paenibacillus medicaginis* sp. nov. a chitinolytic endophyte isolated from a root nodule of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(Pt\_11), 3853–3860. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000505>.
- Lamrabet, M., ElFaik, S., Laadraoui, C., Bouhnik, O., Lamin, H., Alami, S., Abdelmoumen, H., Bedmar, E. J., & El Idrissi, M. M. (2022). Phylogenetic and symbiotic diversity of *Lupinus albus* and *L. angustifolius* microsymbionts in the Maamora forest, Morocco. *Systematic and Applied Microbiology*, 45(4), 126338. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2022.126338>.
- Lavin, M., Herendeen, P. S., & Wojciechowski, M. F. (2005). Evolutionary rates analysis of Leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the Tertiary. *Systematic Biology*, 54(4), 575–594. <https://doi.org/10.1080/10635150590947131>.
- Lazazzara, V., Perazzolli, M., Pertot, I., Biasioli, F., Puopolo, G., & Cappellin, L. (2017). Growth media affect the volatilome and antimicrobial activity against *Phytophthora infestans* in four *Lysobacter* type strains. *Microbiological Research*, 201, 52–62. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.04.015>.



- Lebrazi, S., & Benbrahim, K. F. (2014). Environmental stress conditions affecting the N<sub>2</sub> fixing Rhizobium-legume symbiosis and adaptation mechanisms. *African Journal of Microbiology Research* 8(53):4053-4061.
- Legein, M., Smets, W., Vandenheuevel, D., Eilers, T., Muyshondt, B., Prinsen, E., Samson, R., & Lebeer, S. (2020). Modes of action of microbial biocontrol in the phyllosphere. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1619. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01619>.
- Legrifi, I., Al Figuigui, J., El Hamss, H., Lazraq, A., Belabess, Z., Tahiri, A., Amiri, S., Barka, E. A., & Lahlali, R. (2022). Potential for biological control of *Pythium schmitteneri* root rot disease of olive trees (*Olea europaea* L.) by antagonistic bacteria. *Microorganisms*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081635>.
- Lei, X., Wang, E. T., Chen, W. F., Sui, X. H., & Chen, W. X. (2008). Diverse bacteria isolated from root nodules of wild Vicia species grown in temperate region of China. *Archives of Microbiology*, 190(6), 657–671. <https://doi.org/10.1007/s00203-008-0418-y>.
- León-Barrios, M., Flores-Félix, J.-D., Pérez-Yépez, J., Ramirez-Bahena, M.-H., Pulido-Suárez, L., Igual, J. M., Velázquez, E., & Peix, Á. (2021). Definition of the novel symbiovar canariense within *Mesorhizobium neociceri* sp. nov., a new species of genus *Mesorhizobium* nodulating *Cicer canariense* in the “Caldera de Taburiente” National Park (La Palma, Canary Islands). *Systematic and Applied Microbiology*, 44(5), 126237. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2021.126237>.
- Lertcanawanichakul, M., & Sawangnop, S. (2008). A comparison of two methods used for measuring the antagonistic activity of *Bacillus* species. *Walailak Journal of Science and Technology*, 5, 161–171. <https://doi.org/10.2004/wjst.v5i2.86>.
- Lewis, G., & Castellanos M., C. (2019). Colombian Legume Genera and their Placement in the New Six Subfamily Classification of Leguminosae (11–19).
- Li, G. E., Wu, X. Q., Ye, J. R., Hou, L., Zhou, A. D., & Zhao, L. (2013). Isolation and identification of phytate-degrading rhizobacteria with activity of improving growth of poplar and *Masson pine*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 29(11), 2181–2193. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1384-3>.
- Li, K. S., Zeghbrock J., V., Liu, Q., & Zhang, S. (2021). Isolating and characterizing phosphorus solubilizing bacteria from rhizospheres of native plants grown in Calcareous soils. *Frontiers in Environmental Science*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenvs.2021.802563>.
- Li, L., Shi, Y., Cheng, X., Xia, S., Cheserek, M. J., & Le, G. (2015). A cell-penetrating peptide analogue, P7, exerts antimicrobial activity against *Escherichia coli* ATCC25922 via penetrating cell membrane and targeting intracellular DNA. *Food Chemistry*, 166, 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.113>.
- Li, Q., Ning, P., Zheng, L., Huang, J., Li, G., & Hsiang, T. (2012). Effects of volatile substances of *Streptomyces globisporus* JK-1 on control of *Botrytis cinerea* on tomato fruit. *Biological Control*, 61(2), 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.10.014>.
- Li, S., Xu, J., Fu, L., Xu, G., Lin, X., Qiao, J., & Xia, Y. (2022). Biocontrol of wheat crown rot using *Bacillus halotolerans* QTH8. *Pathogens*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/pathogens11050595>.
- Lian, B., Chen, Y., Zhu, L. & Yang, R. (2008). Effect of microbial weathering on carbonate rocks. *Earth Science Frontiers*, 15 (6), 90–99. [https://doi.org/10.1016/S1872-5791\(09\)60009-9](https://doi.org/10.1016/S1872-5791(09)60009-9).
- Lie, T. A., Gökten, D., Engin, M., Pijnenborg, J., & Anlarsal, E. (1987). Co-evolution of the legume-*Rhizobium* association. *Plant and Soil*, 100(1), 171–181. <https://doi.org/10.1007/BF02370940>.
- Limpens, E., Franken, C., Smit, P., Willemse, J., Bisseling, T., & Geurts, R. (2003). LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science, New Series*, 302(5645), 630–633.
- Lin, D. X., Wang, E. T., Tang, H., Han, T. X., He, Y. R., Guan, S. H., & Chen, W. X. (2008). *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(6), 1409–1413. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65723-0>.
- Lindow, S. E., & Brandl, M. T. (2003). Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 1875–1883. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.1875-1883.2003>.
- Lisicka, W., Fikowicz-Krosko, J., Jafra, S., Narajczyk, M., Czaplewska, P., & Czajkowski, R. (2018). Oxygen availability influences expression of *Dickeya solani* genes associated with virulence in potato (*Solanum tuberosum* L.) and chicory (*Cichorium intybus* L.). *Frontiers in Plant Science*, 9, 374. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00374>.
- Liu, J., Hagberg, I., Novitsky, L., Hadj-Moussa, H., & Avis, T. J. (2014). Interaction of antimicrobial cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* influences their effect on spore germination and membrane

- permeability in fungal plant pathogens. *Fungal Biology*, 118(11), 855–861. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.07.004>.
- Liu, W., Wang, Q., Wang, B. et al. (2015). Plant growth-promoting rhizobacteria enhance the growth and Cd uptake of *Sedum plumbizincicola* in a Cd-contaminated soil. *Journal of Soils and Sediments*, 15, 1191–1199. <https://doi.org/10.1007/s11368-015-1067-9>.
- LIU, P., BHATTACHARJEE, S., KLESSIG, D. F., & MOFFETT, P. (2009). Systemic acquired resistance is induced by R gene-mediated responses independent of cell death. *Molecular Plant Pathology*, 11(1), 155–160. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00564.x>.
- Liu, T. Y., Li, Y., Liu, X. X., Sui, X. H., Zhang, X. X., Wang, E. T., Chen, W. X., Chen, W. F., & Puławska, J. (2012). *Rhizobium cauense* sp. nov., isolated from root nodules of the herbaceous legume *Kummerowia stipulacea* grown in campus lawn soil. *Systematic and Applied Microbiology*, 35(7), 415–420. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.08.006>.
- López-López, A., Rogel-Hernández, M. A., Barois, I., Ortiz Ceballos, A. I., Martínez, J., Ormeño-Orrillo, E., & Martínez-Romero, E. (2012). *Rhizobium grahamii* sp. nov., from nodules of *Dalea leporina*, *Leucaena leucocephala* and *Clitoria ternatea*, and *Rhizobium mesoamericanum* sp. nov., from nodules of *Phaseolus vulgaris*, siratro, cowpea and *Mimosa pudica*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(9), 2264–2271. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.033555-0>.
- Lorite, M. J., Donate-Correa, J., del Arco-Aguilar, M., Pérez Galdona, R., Sanjuán, J., & León-Barrios, M. (2010). Lotus endemic to the Canary Islands are nodulated by diverse and novel rhizobial species and symbiotypes. *Systematic and Applied Microbiology*, 33(5), 282–290. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.03.006>
- Lozano, L., Hernández-González, I., Bustos, P., Santamaría, R. I., Souza, V., Young, J. P. W., Dávila, G., & González, V. (2010). Evolutionary dynamics of insertion sequences in relation to the evolutionary histories of the chromosome and symbiotic plasmid genes of *Rhizobium etli* Populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(19), 6504–6513. <https://doi.org/10.1128/AEM.01001-10>.
- Lu, C., & Tian, H. (2017). Global nitrogen and phosphorus fertilizer use for agriculture production in the past half century: Shifted hot spots and nutrient imbalance. *Earth System Science Data* 9(1):181-192.
- Lu, G., Jian, W., Zhang, J., Zhou, Y., & Cao, J. (2008). Suppressive effect of silicon nutrient on phomopsis stem blight development in *Asparagus*, *HortScience* 43(3), 811-817. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.43.3.811>
- Ludwig, W., & Klenk, H.-P. (2001). Overview: A phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics. In D. R. Boone, R. W. Castenholz, & G. M. Garrity (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume One: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria* (pp. 49–65). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-21609-6\\_8](https://doi.org/10.1007/978-0-387-21609-6_8).
- Ma, Y., Rajkumar, M., Zhang, C. & Freitas, H. (2016). Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *Journal of environmental management*, 174, 14–25. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.02.047>.
- Ma, L., Zhang, G., & Doyle, M. P. (2011). Green fluorescent protein labeling of *Listeria*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* O157:H7 for safety-related studies. *PLOS ONE*, 6(4), e18083. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018083>.
- Madden, L. V., Hughes, G., and van den Bosch, F. (2007). The study of plant disease epidemics. *American Phytopathological Society*, St. Paul, MN.
- Madigan, M. M., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2014). *Brock's Biology of Microorganisms*. 14th ed. Pearson.
- Madsen, E. B., Madsen, L. H., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwalska, M., Szczygłowski, K., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., & Stougaard, J. (2003). A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature*, 425(6958), 637–640. <https://doi.org/10.1038/nature02045>.
- Malliarakis, D., Mpalantinaki, E., Pagoulatou, M. G., Lorenzou, K., & Goumas, D. E. (2021). First report of *Acidovorax citrulli* causing a leaf spot disease on tomato plants in Greece. *Journal of Plant Pathology*, 103(1), 353–353. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00677-1>.
- Marahiel, M.A. (2016). A structural model for multimodular NRPS assembly lines. *Natural product reports*, 33(2), 136–140. <https://doi.org/10.1039/c5np00082c>.
- Mariotti, F., Tomé, D., & Mirand, P. P. (2008). Converting nitrogen into protein—Beyond 6.25 and Jones' factors. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(2), 177–184. <https://doi.org/10.1080/10408390701279749>

- Martens, M., Dawyndt, P., Coopman, R., Gillis, M., De Vos, P., & Willems, A. (2008). Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: A case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(Pt 1), 200–214. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.65392-0>.
- Martin, B., Humbert, O., Camara, M., Guenzi, E., Walker, J., Mitchell, T., Andrew, P., Prudhomme, M., Alloing, G., Hakenbeck, R., Morrison, D. A., Boulnois, G. J., & Claverys, J.-P. (1992). A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Research*, 20(13), 3479–3483. <https://doi.org/10.1093/nar/20.13.3479>.
- Martínez, E., Pardo, M. A., Palacios, R., & Miguel, A. C. (1985). Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *Microbiology*, 131(7), 1779–1786. <https://doi.org/10.1099/00221287-131-7-1779>.
- Martínez-Hidalgo, P., & Hirsch, A. M. (2017). The nodule microbiome: N<sub>2</sub>-fixing rhizobia do not live alone. *Phytobiomes Journal*, 1(2), 70–82. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-12-16-0019-RVW>.
- Martínez-Romero, E. (2003). Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: Overview and perspectives. *Plant and Soil*, 252(1), 11–23. <https://doi.org/10.1023/A:1024199013926>.
- Martínez-Romero, E., & Caballero-Mellado, J. (1996). *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 15(2), 113–140. <https://doi.org/10.1080/07352689.1996.10393183>.
- Martínez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F. M., Franco, A. A., Graham, P., & Pardo, M. A. (1991). *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(3), 417–426. <https://doi.org/10.1099/00207713-41-3-417>.
- Marulanda, A., Barea, J.-M., & Azcón, R. (2009). Stimulation of plant growth and drought tolerance by native microorganisms (AM Fungi and Bacteria) from dry environments: mechanisms related to bacterial effectiveness. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28(2), 115–124. <https://doi.org/10.1007/s00344-009-9079-6>.
- Masood, S., Zhao, X. Q., & Shen, R. F. (2020). *Bacillus pumilus* promotes the growth and nitrogen uptake of tomato plants under nitrogen fertilization. *Scientia Horticulturae*, 272, 109581. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109581>.
- Massart, S., Martínez-Medina, M., & Jijakli, M. H. (2015). Biological control in the microbiome era: Challenges and opportunities. *Biological Control*, 89, 98–108. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.06.003>.
- Maunoury, N., Kondorosi, A., Kondorosi, E., & Mergaert, P. (2008). Cell biology of nodule infection and development. In M. J. Dilworth, E. K. James, J. I. Sprent, & W. E. Newton (Eds.), *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses* (153–189). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3548-7\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3548-7_6).
- Maymon, M., Martínez-Hidalgo, P., Tran, S., Ice, T., Craemer, K., Anbarchian, T., Sung, T., Hwang, L., Chou, M., Fujishige, N., Villella, W., Ventosa, J., Sikorski, J., Sanders, E., Faull, K., & Hirsch, A. (2015). Mining the phytomicrobiome to understand how bacterial coinoculations enhance plant growth. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00784>.
- McInroy, J., & Kloepper, J. (1995). McInroy JA, Kloepper JW.. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil*, 173, 337–342. <https://doi.org/10.1007/BF00011472>.
- Meera Krishna, B., Khan, M. A., & Khan, S. T. (2019). Next-Generation Sequencing (NGS) Platforms: An exciting era of genome sequence analysis. In V. Tripathi, P. Kumar, P. Tripathi, A. Kishore, & M. Kamle (Eds.), *Microbial Genomics in Sustainable Agroecosystems: Volume 2* (89–109). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-981-32-9860-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-981-32-9860-6_6).
- Meena, R K., et al. (2015). Isolation of low temperature surviving plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) from pea (*Pisum sativum* L.) and documentation of their plant growth promoting traits. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4), 806–811. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.08.006>.
- Meena, M., Swapnil, P., Zehra, A., Dubey, M.K., Upadhyay, R.S. (2017) Antagonistic assessment of *Trichoderma* spp. by producing volatile and non-volatile compounds against different fungal pathogens. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 50(13-14), 629–648. <https://doi.org/10.1080/03235408.2017.1357360>.
- Meena, M., Swapnil, P., Zehra, A., Dubey, M.K., Aamir, M., Patel, C.B., Upadhyay, R.S. (2019). Virulence factors and their associated genes in microbes. In *New and Future Developments in Microbial*

- Biotechnology and Bioengineering: Microbial Genes *Biochemistry and Applications*, 11, 181–208. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63503-7.00011-5>.
- Mehta, M. P., Butterfield, D. A., & Baross, J. A. (2003). Phylogenetic diversity of nitrogenase (*nifH*) genes in deep-sea and hydrothermal vent environments of the Juan de Fuca Ridge. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 960–970. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.960-970.2003>.
- Mendes Lopes, E. (2014). Emulsification properties of bioemulsifiers produced by wild-type and mutant *Bradyrhizobium elkanii* strains. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 05(06). <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000245>.
- Mendoza-Arroyo, G. E. et al. (2020). Inorganic phosphate solubilization by a novel isolated bacterial strain *Enterobacter* sp. ITCB-09 and its application potential as biofertilizer. *Agriculture*, 10(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/agriculture10090383>.
- Mergaert, P., Uchiumi, T., Alunni, B., Evanno, G., Cheron, A., Catrice, O., Mausset, A.-E., Barloy-Hubler, F., Galibert, F., Kondorosi, A., & Kondorosi, E. (2006). Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(13), 5230–5235. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600912103>.
- Meriem, B.-B., Beddiar, A., & Bouzeraa, H. (2015). Effect of abiotic factors on the *Sinorhizobium* sp growth isolated from *Medicago sativa* cultivated on northeastern Algeria soils and the selection of the highly tolerant strains. *Advances in Environmental Biology*, 9(8).
- Merino, E., Becerril, B., Valle, F., & Bolivar, F. (1987). Deletion of a repetitive extragenic palindromic (REP) sequence downstream from the structural gene of *Escherichia coli* glutamate dehydrogenase affects the stability of its mRNA. *Gene*, 58(2–3), 305–309. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90386-6](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90386-6).
- Mhamdi, R., Jebara, M., Aouani, M. E., Ghir, R., & Mars, M. (1999). Genotypic diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. grown in Tunisian soils. *Biology and Fertility of Soils*, 28(3), 313–320. <https://doi.org/10.1007/s003740050499>.
- Mhamdi, R., Laguerre, G., Aouani, M. E., Mars, M., & Amarger, N. (2002). Different species and symbiotic genotypes of field rhizobia can nodulate *Phaseolus vulgaris* in Tunisian soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 41(1), 77–84. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00968.x>.
- Michiels, J., Dombrecht, B., Vermeiren, N., Xi, C., Luyten, E., & Vanderleyden, J. (1998). *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. *FEMS Microbiology Ecology*, 26(3), 193–205. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1998.tb00505.x>.
- Minamisawa, K., & Fukai, K. (1991). Production of indole-3-acetic acid by *Bradyrhizobium japonicum*. A correlation with genotype grouping and rhizobitoxine production. *Plant and Cell Physiology*, 32. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078042>.
- Mir, M. I., Kumar, B. K., Gopalakrishnan, S., Vadlamudi, S., & Hameeda, B. (2021). Characterization of rhizobia isolated from leguminous plants and their impact on the growth of ICCV 2 variety of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Heliyon*, 7(11), e08321. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08321>.
- Mishra, J., Singh, R., & Arora, N. K. (2017). Alleviation of heavy metal stress in plants and remediation of soil by rhizosphere microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1706. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01706>.
- Missbah El Idrissi, M., Bouhnik, O., ElFaik, S., Alami, S., Lamin, H., Bedmar, E. J., & Abdelmoumen, H. (2021a). Characterization of *Bradyrhizobium* spp. nodulating *Lupinus cosentinii* and *L. luteus* microsymbionts in Morocco. *Frontiers in Agronomy*, 3. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fagro.2021.661295>.
- Miyana, A. (2017). Structure and function of polyketide biosynthetic enzymes: Various strategies for production of structurally diverse polyketides. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 81(12), 2227–2236. <https://doi.org/10.1080/09168451.2017.1391687>.
- Mnasri, B., Liu, T. Y., Saidi, S., Chen, W. F., Chen, W. X., Zhang, X. X., & Mhamdi, R. (2014). *Rhizobium azibense* sp. nov., a nitrogen fixing bacterium isolated from root-nodules of *Phaseolus vulgaris*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(5), 1501–1506. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.058651-0>.
- Mnasri, B., Mrabet, M., Laguerre, G., Aouani, M. E., & Mhamdi, R. (2006). Salt-tolerant rhizobia isolated from a Tunisian oasis that are highly effective for symbiotic N<sub>2</sub>-fixation with *Phaseolus vulgaris* constitute a novel biovar (bv. mediterranense) of *Sinorhizobium meliloti*. *Archives of Microbiology*, 187(1), 79–85. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0173-x>.
- Mnasri, B., Saïdi, S., Chihaoui, S.-A., & Mhamdi, R. (2012a). *Sinorhizobium americanum* symbiovar mediterranense is a predominant symbiont that nodulates and fixes nitrogen with common bean

- (*Phaseolus vulgaris* L.) in a Northern Tunisian field. *Systematic and Applied Microbiology*, 35(4), 263–269. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.04.003>.
- Mohammad, R. M., Akhavan-Kharazian, M., Campbell, W. F., & Rumbaugh, M. D. (1991). Identification of salt- and drought-tolerant *Rhizobium meliloti* L. strains. *Plant and Soil*, 134(2), 271–276. <https://doi.org/10.1007/BF00012045>.
- Mohammed, A. F. (2018). Effectiveness of exopolysaccharides and biofilm forming plant growth promoting rhizobacteria on salinity tolerance of faba bean (*Vicia faba* L.). *African Journal of Microbiology Research*, 12 (17), 399–404. doi: 10.5897/AJMR2018.8822.
- Monteiro, L., Mariano, R. de L. R., & Souto-Maior, A. M. (2005). Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(1), 23–29. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132005000100004>.
- Monteiro, R. A., Balsanelli, E., Wasseem, R., Marin, A. M., Brusamarello-Santos, L. C. C., Schmidt, M. A., Tadra-Sfeir, M. Z., Pankievicz, V. C. S., Cruz, L. M., Chubatsu, L. S., Pedrosa, F. O., & Souza, E. M. (2012). *Herbaspirillum*-plant interactions: Microscopical, histological and molecular aspects. *Plant and Soil*, 356(1–2), 175–196. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1125-7>.
- Mora, V., Baigorri, R., Bacaicoa, E., Zamarreño, A. M., García-Mina, J. M. (2012). The humic acid-induced changes in the root concentration of nitric oxide, IAA and ethylene do not explain the changes in root architecture caused by humic acid in cucumber. *Environmental and Experimental Botany*, 76, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.10.001>.
- Moreira, H., Marques, A.P., Franco, A.R., Rangel, A.O. & Castro, P.M. (2014) Phytomanagement of Cd-contaminated soils using maize (*Zea mays* L.) assisted by plant growth-promoting rhizobacteria. *Environmental Science and Pollution Research International*, 21(16), 9742–9753. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2848-1>.
- Morgan, P. W. & Gausman H.W. (1966). Effects of ethylene on auxin transport. *Plant Physiology*;41(1), 45–52.
- Morris, R.O. (1995). Genes specifying auxin and cytokinin biosynthesis in prokaryotes. In: Davies, P.J. (eds) *Plant Hormones*, 318–339. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-0473-9\\_15](https://doi.org/10.1007/978-94-011-0473-9_15).
- Mort, A. J., & Bauer, W. D. (1980). Composition of the capsular and extracellular polysaccharides of *Rhizobium japonicum*: Changes with culture age and correlations with binding of soybean seed lectin to the bacteria. *Plant Physiology*, 66(1), 158–163. <https://doi.org/10.1104/pp.66.1.158>.
- Moschetti, G., Peluso, A., Protopapa, A., Anastasio, M., Pepe, O., & Defez, R. (2005). Use of nodulation pattern, stress tolerance, *nodC* gene amplification, RAPD-PCR and RFLP–16S rDNA analysis to discriminate genotypes of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(7), 619–631. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.03.009>.
- Mostasso, L., Mostasso, F. L., Dias, B. G., Vargas, M. A. T., & Hungria, M. (2002). Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. *Field Crops Research*, 73(2), 121–132. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(01\)00186-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(01)00186-1).
- Mukhtar, S. et al. (2020). Impact of soil salinity on the cowpea nodule-microbiome and the isolation of halotolerant PGPR strains to promote plant growth under salinity stress. *Phytobiomes Journal*, 4(4), 364–374. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-09-19-0057-R>.
- Mulas, D., García-Fraile, P., Carro, L., Ramírez-Bahena, M.-H., Casquero, P., Velázquez, E., & González-Andrés, F. (2011). Distribution and efficiency of *Rhizobium leguminosarum* strains nodulating *Phaseolus vulgaris* in Northern Spanish soils: Selection of native strains that replace conventional N fertilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(11), 2283–2293. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.07.018>.
- Mulligan, C. N., Cooper, D. G., & Neufeld, R. J. (1984). Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons. *Journal of Fermentation Technology*, 62, 311–314.
- Munemasa, S., Hauser, F., Park, J., Waadt, R., Brandt, B., & Schroeder, J. I. (2015). Mechanisms of abscisic acid-mediated control of stomatal aperture. *Current Opinion in Plant Biology*, 28, 154–162. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.10.010>.
- Muresu, R. et al.(2008). Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes: Non culturable rhizobia and endophytes in legume nodules. *FEMS Microbiology Ecology*, 63(3), 383–400. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00424.x>.
- Muscolo, A., Sidari, M., Anastasi, U., Santonoceto, C., & Maggio, A. (2014). Effect of PEG-induced drought stress on seed germination of four lentil genotypes. *Journal of Plant Interactions*, 9(1), 354–363. <https://doi.org/10.1080/17429145.2013.835880>.

- Mutch, L. A., Tamimi, S. M., & Young, J. P. W. (2003). Genotypic characterisation of rhizobia nodulating *Vicia faba* from the soils of Jordan: A comparison with UK isolates. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(5), 709–714. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00088-9](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00088-9).
- Mutch, L. A., & Young, J. P. W. (2004). Diversity and specificity of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae on wild and cultivated legumes. *Molecular Ecology*, 13(8), 2435–2444. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02259.x>.
- Muthulakshmi, P., Thangavel, S., & Seethapathy, P. (2019). Characterization of antifungal volatile organic compounds produced by bacterial endophytes against *Fusarium oxysporum* through GC-MS Analysis. *Microbiology Research Journal International*, 1–9. <https://doi.org/10.9734/mrji/2019/v29i130153>.
- Mwenda, G. M. (2017). Characterization of nitrogen-fixing bacteria from *Phaseolus vulgaris* L. in Kenya. PhD thesis, Murdoch University.
- Mwenda, G. M., O'Hara, G. W., De Meyer, S. E., Howieson, J. G., & Terpolilli, J. J. (2018). Genetic diversity and symbiotic effectiveness of *Phaseolus vulgaris*-nodulating rhizobia in Kenya. *Systematic and Applied Microbiology*, 41(4), 291–299. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.02.001>.
- Myers, J. A., Curtis, B. S., & Curtis, W. R. (2013). Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density. *BMC Biophysics*, 6(1), 4. <https://doi.org/10.1186/2046-1682-6-4>.
- Myresiotis, C. K., Karaoglanidis, G. S., Vryzas, Z., & Papadopoulou-Mourkidou, E. (2012). Evaluation of plant-growth-promoting rhizobacteria, acibenzolar-S-methyl and hymexazol for integrated control of *Fusarium* crown and root rot on tomato. *Pest Management Science*, 68(3), 404–411. <https://doi.org/10.1002/ps.2277>.
- Narayanasamy, S., Thangappan, S., & Uthandi, S. (2020). Plant growth-promoting *Bacillus* sp. cahoots moisture stress alleviation in rice genotypes by triggering antioxidant defense System. *Microbiological Research*, 239, 126518. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126518>.
- Nautiyal, C. S. (1997). Rhizosphere competence of *Pseudomonas* sp. NBRI9926 and *Rhizobium* sp. NBRI9513 involved in the suppression of chickpea (*Cicer arietinum* L.) pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 23(2), 145–158. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1997.tb00398.x>.
- Nelson, E. B. (2004). Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. *Annual Review of Phytopathology*, 42(1), 271–309. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.121603.131041>.
- Nihorimbere, V., Cawoy, H., Seyer, A., Brunelle, A., Thonart, P., & Ongena, M. (2012). Impact of rhizosphere factors on cyclic lipopeptide signature from the plant beneficial strain *Bacillus amyloliquefaciens* S499. *FEMS Microbiology Ecology*, 79(1), 176–191. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01208.x>.
- Nikolić, I., Berić, T., Dimkić, I., Popović, T., Lozo, J., Fira, D., & Stanković, S. (2019). Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* on sugar beet with *Bacillus pumilus* SS-10.7 and *Bacillus amyloliquefaciens* (SS-12.6 and SS-38.4) strains. *Journal of Applied Microbiology*, 126(1), 165–176. <https://doi.org/10.1111/jam.14070>.
- Nishad, R., Ahmed, T., Rahman, V. J., & Kareem, A. (2020). Modulation of plant defense system in response to microbial interactions. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.01298>.
- Niu, X., Song, L., Xiao, Y., & Ge, W. (2018). Drought-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria associated with foxtail millet in a semi-arid agroecosystem and their potential in alleviating drought stress. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.02580>.
- Ngalimat, M.S., Mohd Hata, E., Zulperi, D., Ismail, S.I., Ismail, M.R., Mohd Zainudin, N.A.I., Saidi, N.B., & Yusof, M.T. (2021). Plant growth-promoting bacteria as an emerging tool to manage bacterial rice pathogens. *Microorganisms*, 9(4), 682. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040682>.
- Ngumbi, E., & Kloepper, J. (2016). Bacterial-mediated drought tolerance: current and future prospects. *Applied Soil Ecology*, 105, 109–125. doi: 10.1016/j.apsoil.2016.04.009.
- Nguyen, N. H., Trotel-Aziz, P., Clément, C., Jeandet, P., Baillieul, F., & Aziz, A. (2022). Camalexin accumulation as a component of plant immunity during interactions with pathogens and beneficial microbes. *Planta*, 255(6), 116. <https://doi.org/10.1007/s00425-022-03907-1>.
- Noori, F., Etesami, H., Najafi Zarini, H., Khoshkholgh-Sima, N. A., Hosseini Salekdeh, G., & Alishahi, F. (2018). Mining alfalfa (*Medicago sativa* L.) nodules for salinity tolerant non-rhizobial bacteria to improve growth of alfalfa under salinity stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 162, 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.092>.
- Ntatsi, G., Karkanis, A., Yfantopoulos, D., Olle, M., Travlos, I., Thanopoulos, R., Bilalis, D., Bebeli, P., & Savvas, D. (2018). Impact of variety and farming practices on growth, yield, weed flora and symbiotic

- nitrogen fixation in faba bean cultivated for fresh seed production. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science*, 68(7), 619–630. <https://doi.org/10.1080/09064710.2018.1452286>.
- Nysanth, N. S., Sivapriya, S. L., Natarajan, C., & Anith, K. N. (2022). Novel *in vitro* methods for simultaneous screening of two antagonistic bacteria against multiple fungal phytopathogens in a single agar plate. *3 Biotech*, 12(6), 140. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03205-3>.
- O'Brien, J.A. & Benkova, E. (2013). Cytokinin cross-talking during biotic and abiotic stress responses. *Frontiers in Plant Science* 4, 451.
- O'Brien, I. G., Cox, G. B., & Gibson, F. (1970). Biologically active compounds containing 2,3-dihydroxybenzoic acid and serine formed by *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 201(3), 453–460. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(70\)90165-0](https://doi.org/10.1016/0304-4165(70)90165-0).
- Oberhansli, T., Defago, G. & Haas, D. (1991). Indole-3-acetic-acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHA0 of *Pseudomonas fluorescens* – role of tryptophan side-chain oxidase. *Journal of general microbiology*, 137(10), 2273–2279. <https://doi.org/10.1099/00221287-137-10-2273>.
- O'Hara, G. W., Goss, T. J., Dilworth, M. J., & Glenn, A. R. (1989). Maintenance of intracellular pH and acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(8), 1870–1876.
- Ojuederie, O. B., Olanrewaju, O. S., & Babalola, O. O. (2019). Plant growth promoting rhizobacterial mitigation of drought stress in crop plants: implications for sustainable agriculture. *Agronomy* 9,12. doi: 10.3390/agronomy9110712.
- Oldroyd, G. E. D. (2013). Speak, friend, and enter: Signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2990>.
- Oldroyd, G. E. D., Murray, J. D., Poole, P. S., & Downie, J. A. (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual Review of Genetics*, 45, 119–144. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132549>.
- Oresnik, I. J., Twelker, S., & Hynes, M. F. (1999). Cloning and characterization of a *Rhizobium leguminosarum* Gene encoding a bacteriocin with similarities to RTX toxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), 2833–2840.
- Orozco-Mosqueda, M. D. C., Duan, J., DiBernardo, M., Zetter, E., Campos-García, J., Glick, B. R., & Santoyo, G. (2019). The production of acc deaminase and trehalose by the plant growth promoting bacterium *Pseudomonas* sp. UW4 synergistically protect tomato plants against salt stress. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1392. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01392>.
- Ortiz-Castro, R., & López-Bucio, J. (2019). Review: Phytostimulation and root architectural responses to quorum-sensing signals and related molecules from rhizobacteria. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 284, 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.04.010>.
- Ossowicki, A., Jafra, S., & Garbeva, P. (2017). The antimicrobial volatile power of the rhizospheric isolate *Pseudomonas donghuensis* P482. *PloS One*, 12(3), e0174362. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174362>.
- Oves, M., Khan, M. S., & Qari, H. A. (2017). *Ensifer adhaerens* for heavy metal bioaccumulation, biosorption, and phosphate solubilization under metal stress condition. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 80, 540–552. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2017.08.026>.
- Pan, J., Huang, T., Yao, F., Huang, Z., Powell, C. A., Qiu, S., & Guan, X. (2008). Expression and characterization of *aiiA* gene from *Bacillus subtilis* BS-1. *Microbiological Research*, 163(6), 711–716. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2007.12.002>.
- Patel, D.K., Archana, G. & Kumar, G.N.(2008).Variation in the nature of organic acid secretion and mineral phosphate solubilization by *Citrobacter* sp. DHRSS in the presence of different sugars. *Current microbiology*, 56(2), 168–174. <https://doi.org/10.1007/s00284-007-9053-0>.
- Patel, A. K., Banjare, U., Kumari, A., Singh, R. K., & Pandey, K. D. (2020). Temperature tolerant *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae strains with plant growth promotion traits. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 14(4), 2603–2609. <https://doi.org/10.22207/JPAM.14.4.36>.
- Patriarca, E. J., Chiurazzi, M., Manco, G., Riccio, A., Lambertini, A., De Paolis, A., Rossi, M., Defez, R., & Iaccarino, M. (1992). Activation of the *Rhizobium leguminosarum glnII* gene by NtrC is dependent on upstream DNA sequences. *Molecular and General Genetics MGG*, 234(3), 337–345. <https://doi.org/10.1007/BF00538692>.
- Paul, M. J., Primavesi, L. F., Jhurrea, D., & Zhang, Y. (2008). Trehalose metabolism and signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 417–441. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092945>.
- Paul P. D., & Nair, S. (2008). Stress adaptations in a plant growth promoting rhizobacterium (PGPR) with increasing salinity in the coastal agricultural soils. *Journal of Basic Microbiology*, 48(5), 378–384. <https://doi.org/10.1002/jobm.200700365>.

- Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., Velázquez, E., & Bedmar, E. J. (2015). Bacterial associations with legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1–3), 17–42. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.897899>.
- Peix, A., Rivas-Boyer, A. A., Mateos, P. F., Rodríguez-Barrueco, C., Martínez-Molina, E., & Velázquez, E. (2001). Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(1), 103–110. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00120-6](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00120-6).
- Peloquin, J. J., Kuzina, L., Lauzon, C. R., & Miller, T. A. (2000). Transformation of internal extracellular bacteria isolated from *Rhagoletis completa* cresson gut with enhanced green fluorescent protein. *Current Microbiology*, 40(6), 367–371. <https://doi.org/10.1007/s002840010072>.
- Peñuelas, J., Asensio, D., Tholl, D., Wenke, K., Rosenkranz, M., Piechulla, B., & Schnitzler, J. P. (2014). Biogenic volatile emissions from the soil. *Plant, Cell & Environment*, 37(8), 1866–1891. <https://doi.org/10.1111/pce.12340>.
- Peoples, M. B., Brockwell, J., Herridge, D. F., Rochester, I. J., Alves, B. J. R., Urquiaga, S., Boddey, R. M., Dakora, F. D., Bhattarai, S., Maskey, S. L., Sampet, C., Rerkasem, B., Khan, D. F., Hauggaard-Nielsen, H., & Jensen, E. S. (2009). The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems. *Symbiosis*, 48(1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/BF03179980>.
- Pereira, S. et al. (2019). Improvement of some growth and yield parameters of faba bean (*Vicia faba*) by inoculation with *Rhizobium laguerreae* and arbuscular mycorrhizal fungi. *Crop and Pasture Science*, 70(7), 595–605. <https://doi.org/10.1071/CP19016>.
- Pérez-Ramírez, N. O., Rogel, M. A., Wang, E., Castellanos, J. Z., & Martínez-Romero, E. (1998). Seeds of *Phaseolus vulgaris* bean carry *Rhizobium etli*. *FEMS Microbiology Ecology*, 26(4), 289–296. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1998.tb00513.x>.
- Perfumo, A., Smyth, T. J. P., Marchant, R., & Banat, I. M. (2010). Production and roles of biosurfactants and bioemulsifiers in accessing hydrophobic substrates. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4\\_103](https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_103).
- Perley, J.W. & Stowe, B.B (1966) .On the ability of *Taphrina deformans* to produce indoleacetic acid from tryptophan by way of tryptamine. *Plant physiology*, 41(2), 234–237. <https://doi.org/10.1104/pp.41.2.234>.
- Perret, X., Staehelin, C., & Broughton, W. J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 64(1), 180–201. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.1.180-201.2000>.
- Perrig, D., Boiero, M. L., Masciarelli, O. A., Penna, C., Ruiz, O. A., Cassán, F. D., & Luna, M. V. (2007). Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(5), 1143–1150. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0909-9>.
- Peterson, S. B., Bertolli, S. K., & Mougous, J. D. (2020). The central role of interbacterial antagonism in bacterial life. *Current Biology*, 30(19), R1203–R1214. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.103>.
- Phillips, D. A., Fox, T. C., King, M. D., Bhuvaneshwari, T. V., & Teuber, L. R. (2004). Microbial products trigger amino acid exudation from plant roots. *Plant Physiology*, 136(1), 2887–2894. <https://doi.org/10.1104/pp.104.044222>.
- Piechulla, B., Lemfack, M. C., & Kai, M. (2017). Effects of discrete bioactive microbial volatiles on plants and fungi. *Plant, Cell & Environment*, 40(10), 2042–2067. <https://doi.org/10.1111/pce.13011>.
- Pieterse, C.M.J., Zamioudis, C., Berendsen, R.L., Weller, D.M., Van Wees, S.C.M. & Bakker, P.A.H.M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52(1), 347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>.
- Pinero, D., Martinez, E., & Selander, R. K. (1988). Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(11), 2825–2832.
- Pliego, C., Ramos, C., de Vicente, A., & Cazorla, F. M. (2011). Screening for candidate bacterial biocontrol agents against soilborne fungal plant pathogens. *Plant and Soil*, 340(1), 505–520. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0615-8>.
- Pollack, J. R., & Neilands, J. B. (1970). Enterobactin, an iron transport compound from *Salmonella typhimurium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 38(5), 989–992. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(70\)90819-3](https://doi.org/10.1016/0006-291X(70)90819-3).
- Poole, P., & Allaway, D. (2000). Carbon and nitrogen metabolism in *Rhizobium*. *Advances in Microbial Physiology*, 43, 117–163. [https://doi.org/10.1016/s0065-2911\(00\)43004-3](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(00)43004-3).



- Porder, S., & Hilley, G. E. (2011). Linking chronosequences with the rest of the world: Predicting soil phosphorus content in denuding landscapes, *Biogeochemistry*, 102(1-3), 153–166. <https://doi.org/10.1007/s10533-010-9428-3>.
- Poveda, J., & González-Andrés, F. (2021). *Bacillus* as a source of phytohormones for use in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(23), 8629–8645. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11492-8>.
- Prayitno, J., Rolfe, B. G., & Mathesius, U. (2006). The Ethylene-insensitive sickle mutant of *Medicago truncatula* shows altered auxin transport regulation during nodulation. *Plant Physiology*, 142(1), 168–180. <https://doi.org/10.1104/pp.106.080093>.
- Priefer, U. B. (1989). Genes involved in lipopolysaccharide production and symbiosis are clustered on the chromosome of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* VF39. *Journal of Bacteriology*, 171(11), 6161–6168. <https://doi.org/10.1128/jb.171.11.6161-6168.1989>.
- Pierik, R., Tholen, D., Poorter, H., Visser, E. J., & Voesenek, L. A. (2006). The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends in Plant Science*, 11(4), 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.02.006>.
- Puente, M. E., Bashan, Y., Li, C. Y., & Lebsky, V. K. (2004). Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. I. Root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biology (Stuttgart, Germany)*, 6(5), 629–642. <https://doi.org/10.1055/s-2004-821100>.
- Pueyo, M. T., Bloch, C., Carmona-Ribeiro, A. M., & Di Mascio P. (2009). Lipopeptides produced by a soil *Bacillus megaterium* strain. *Microbial Ecology*, 57(2), 367–378. <https://doi.org/10.1007/s00248-008-9464-x>
- Qin, S., Feng, W. W., Zhang, Y. J., Wang, T. T., Xiong, Y. W., & Xing, K. (2018). Diversity of bacterial microbiota of coastal halophyte limonium sinense and amelioration of salinity stress damage by symbiotic plant growth-promoting actinobacterium *Glutamicibacter halophytocola* KLBMP 5180. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(19), 01533-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01533-18>.
- Qin, W., Deng, Z. S., Xu, L., Wang, N. N., & Wei, G. H. (2012). *Rhizobium helanshanense* sp. nov., a bacterium that nodulates *Sphaerophysa salsula* (Pall.) DC. in China. *Archives of Microbiology*, 194(5), 371–378. <https://doi.org/10.1007/s00203-011-0766-x>.
- Quiñones, B., Dulla, G., & Lindow, S. E. (2005). Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility, and virulence in *Pseudomonas syringae*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 18(7), 682–693. <https://doi.org/10.1094/MPMI-18-0682>.
- Raaijmakers, J.M., de Bruijn, I., Nybroe, O., & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(6), 1037–1062. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x>.
- Rahal, S., & Chekireb, D. (2021). Diversity of rhizobia and non-rhizobia endophytes isolated from root nodules of *Trifolium* sp. growing in lead and zinc mine site Guelma, Algeria. *Archives of Microbiology*, 203(7), 3839–3849. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02362-y>.
- Rajaofera, M. J. N., Wang, Y., Dahar, G. Y., Jin, P., Fan, L., Xu, L., Liu, W., & Miao, W. (2019). Volatile organic compounds of *Bacillus atropheus* HAB-5 inhibit the growth of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 156, 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.02.019>.
- Rajendran, G., Patel, M. H., & Joshi, S. J. (2012). Isolation and characterization of nodule-associated exiguobacterium sp. from the root nodules of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) and their possible role in plant growth promotion. *International Journal of Microbiology*, 693982. <https://doi.org/10.1155/2012/693982>.
- Rajkumar, M., Sandhya, S., Prasad, M.N., & Freitas, H. (2012). Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnology Advances*, 30 (6), 1562–1574. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.04.011>.
- Rajguru, B. R., & Bhatt, V. D. (2022). Review on mechanism of mineral phosphate solubilization in fast-growing rhizobia based on sugar utilization. *Plant Breeding and Biotechnology*, 10(4), 203–211. <https://doi.org/10.9787/PBB.2022.10.4.203>.
- Rajnovic, I., Ramírez-Bahena, M.-H., Kajic, S., Igual, J. M., Peix, Á., Velázquez, E., & Sikora, S. (2022). *Rhizobium croatiense* sp. nov. and *Rhizobium redzepovicii* sp. nov., two new species isolated from nodules of *Phaseolus vulgaris* in Croatia. *Systematic and Applied Microbiology*, 45(3), 126317. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2022.126317>.
- Rajnovic, I., Ramírez-Bahena, M.-H., Sánchez-Juanes, F., González-Buitrago, J.-M., Kajic, S., Peix, Á., Velázquez, E., & Sikora, S. (2019). Phylogenetic diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* in

- Croatia and definition of the symbiovar phaseoli within the species *Rhizobium pisi*. *Systematic and Applied Microbiology*, 42(6), 126019. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2019.126019>.
- Rajput, V. D., et al (2021). Recent developments in enzymatic antioxidant defence mechanism in plants with special reference to abiotic stress. *Biology*, 10(4), 267. <https://doi.org/10.3390/biology10040267>.
- Ramírez, M. D. A., España, M., Sekimoto, H., Okazaki, S., Yokoyama, T., & Ohkama-Ohtsu, N. (2021). Genetic diversity and characterization of symbiotic bacteria isolated from endemic *Phaseolus* cultivars located in contrasting agroecosystems in Venezuela. *Microbes and Environments*, 36(2), ME20157. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME20157>.
- Ramírez-Bahena, M. H., García-Fraile, P., Peix, A., Valverde, A., Rivas, R., Igual, J. M., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., & Velázquez, E. (2008). Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(11), 2484–2490. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.65621-0>.
- Ramírez-Bahena, M. H., Peix, A., Rivas, R., Camacho, M., Rodríguez-Navarro, D. N., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., Willems, A., & Velázquez, E. (2009). *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(8), 1929–1934. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.006320-0>.
- Ranjbarfordoei, A., Samson, R., Van Damme, P., & Lemeur, R. (2000). Effects of drought stress induced by polyethylene glycol on pigment content and photosynthetic gas exchange of *Pistacia Khinjuk* and *P. Mutica*. *Photosynthetica*, 38(3), 443–447. <https://doi.org/10.1023/A:1010946209484>.
- Rascio, N., & La Rocca, N. (2013). Biological Nitrogen Fixation. In *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.09470-7>.
- Rashid, M. H., Gonzalez, J., Young, J. P. W., & Wink, M. (2014). *Rhizobium leguminosarum* is the symbiont of lentils in the Middle East and Europe but not in Bangladesh. *FEMS Microbiology Ecology*, 87(1), 64–77. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12190>.
- Rashid, Md. H., Schäfer, H., Gonzalez, J., & Wink, M. (2012). Genetic diversity of rhizobia nodulating lentil (*Lens culinaris*) in Bangladesh. *Systematic and Applied Microbiology*, 35(2), 98–109. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.11.008>.
- Rat, A., Naranjo, H. D., Lebbe, L., Cnockaert, M., Krigas, N., Grigoriadou, K., Maloupa, E., & Willems, A. (2021). *Roseomonas hellenica* sp. nov., isolated from roots of wild-growing *Alkanna tinctoria*. *Systematic and Applied Microbiology*, 44(3), 126206. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2021.126206>.
- Rausch, C., Hoof, I., Weber, T., Wohlleben, W., Huson, D.H. (2007). Phylogenetic analysis of condensation domains in NRPS sheds light on their functional evolution. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 78. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-78>.
- Ravin A.W. (1963) Experimental approaches to the study of bacterial phylogeny. *The American Naturalist*, 97(896), 307–318.
- Raymaekers, K., Ponet, L., Holtappels, D., Berckmans, B., & Cammue, B. P. A. (2020). Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management – A review. *Biological Control*, 144, 104240. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104240>.
- Reeve, W., Ardley, J., Tian, R., Eshragi, L., Yoon, J. W., Ngamwisetkun, P., Seshadri, R., Ivanova, N. N., & Kyrpides, N. C. (2015). A genomic encyclopedia of the root nodule bacteria: Assessing genetic diversity through a systematic biogeographic survey. *Standards in Genomic Sciences*, 10(1), 14. <https://doi.org/10.1186/1944-3277-10-14>.
- Reeve, W. et al. (2013). Genome sequence of the *Trifolium rueppellianum* -nodulating *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain WSM2012. *Standards in Genomic Sciences*, 9(2). <https://doi.org/10.4056/sigs.4528262>.
- Reina-Bueno, M., Argandoña, M., Nieto, J. J., Hidalgo-García, A., Iglesias-Guerra, F., Delgado, M. J., & Vargas, C. (2012). Role of trehalose in heat and desiccation tolerance in the soil bacterium *Rhizobium etli*. *BMC Microbiology*, 12(1), 207. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-207>.
- Reinhold-Hurek, B., & Hurek, T. (2011). Living inside plants: Bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(4), 435–443. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.04.004>.
- Remans, R., Ramaekers, L., Schelkens, S., Hernandez, G., Garcia, A., Reyes, J. L., Mendez, N., Toscano, V., Mulling, M., Galvez, L., & Vanderleyden, J. (2008). Effect of *Rhizobium*–*Azospirillum* coinoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across

- different environments in Cuba. *Plant and Soil*, 312(1), 25–37. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9606-4>.
- Remans, R., Spaepen, S., & Vanderleyden, J. (2006). Auxin signaling in plant defense. *Science (New York, N.Y.)*, 313, 171. <https://doi.org/10.1126/science.313.5784.171a>.
- Remigi, P., Zhu, J., Young, J. P. W., & Masson-Boivin, C. (2016). Symbiosis within symbiosis: Evolving nitrogen-fixing legume symbionts. *Trends in Microbiology*, 24(1), 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.10.007>.
- Ribeiro, R. A., Martins, T. B., Ormeño-Orrillo, E., Marçon Delamuta, J. R., Rogel, M. A., Martínez-Romero, E., & Hungria, M. (2015). *Rhizobium ecuadorensis* sp. nov., an indigenous N<sub>2</sub>-fixing symbiont of the Ecuadorian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genetic pool. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(9), 3162–3169. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000392>.
- Ribeiro, R. A., Ormeño-Orrillo, E., Dall'Agnol, R. F., Graham, P. H., Martínez-Romero, E., & Hungria, M. (2013). Novel *Rhizobium* lineages isolated from root nodules of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Andean and Mesoamerican areas. *Research in Microbiology*, 164(7), 740–748. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.05.002>.
- Ribeiro, R. A., Rogel, M. A., López-López, A., Ormeño-Orrillo, E., Barcellos, F. G., Martínez, J., Thompson, F. L., Martínez-Romero, E., & Hungria, M. (2012). Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(5), 1179–1184. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.032912-0>.
- Richter, M., & Rosselló-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(45), 19126–19131. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906412106>.
- Rigottier-Gois, L., Turner, S. L., Young, J. P. W., & Amarger, N. (1998). Distribution of *repC* plasmid-replication sequences among plasmids and isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae from field populations. *Microbiology*, 144(3), 771–780. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-3-771>.
- Riley, I. T., & Dilworth, M. J. (1985). Cobalt requirement for nodule development and function in *Lupinus Angustifolius* L. *New Phytologist*, 100(3), 347–359. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1985.tb02784.x>.
- Rivardo, F., Turner, R. J., Allegrone, G., Ceri, H., & Martinotti, M. G. (2009). Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. Prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83(3), 541–553. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1987-7>.
- Rivas, R., Martens, M., de Lajudie, P., & Willems, A. (2009). Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. *Systematic and Applied Microbiology*, 32(2). <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.12.005>.
- Riva, V., Riva, F., Vergani, L., Crotti, E., Borin, S., & Mapelli, F. (2020). Microbial assisted phytodepuration for water reclamation: Environmental benefits and threats. *Chemosphere*, 241, 124843. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124843>.
- Rodríguez, H., & Fragal, R. (1990). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17(4-5), 319–339. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2).
- Rodríguez, M., Torres, M., Blanco, L., Béjar, V., Sampedro, I., & Llamas, I. (2020). Plant growth-promoting activity and quorum quenching-mediated biocontrol of bacterial phytopathogens by *Pseudomonas segetis* strain P6. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61084-1>
- Rodríguez-Navarro, D. N., Buendía, A. M., Camacho, M., Lucas, M. M., & Santamaria, C. (2000). Characterization of *Rhizobium* spp. bean isolates from South-West Spain. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(11), 1601–1613. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00074-2](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00074-2).
- Rogel, M. A., Ormeño-Orrillo, E., & Martínez Romero, E. (2011). Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(2), 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.11.015>.
- Román-Ponce, B., Jing Zhang, Y., Soledad Vásquez-Murrieta, M., Hua Sui, X., Feng Chen, W., Carlos Alberto Padilla, J., Wu Guo, X., Lian Gao, J., Yan, J., Hong Wei, G., & Tao Wang, E. (2016). *Rhizobium acidisoli* sp. nov., isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* in acid soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(1), 398–406. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000732>.
- Rooney, A. P., Price, N. P. J., Ray, K. J., & Kuo, T.-M. (2009). Isolation and characterization of rhamnolipid-producing bacterial strains from a biodiesel facility. *FEMS Microbiology Letters*, 295(1), 82–87. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01581.x>.

- Roongsawang, N., Thaniyavarn, J., Thaniyavarn, S., Kameyama, T., Haruki, M., Imanaka, T., Morikawa, M., & Kanaya, S. (2002). Isolation and characterization of a halotolerant *Bacillus subtilis* BBK-1 which produces three kinds of lipopeptides: Bacillomycin L, plipastatin, and surfactin. *Extremophiles: Life Under Extreme Conditions*, 6(6), 499–506. <https://doi.org/10.1007/s00792-002-0287-2>.
- Rosselló-Mora, R. (2005). Updating prokaryotic taxonomy. *Journal of Bacteriology*, 187(18), 6255–6257. <https://doi.org/10.1128/JB.187.18.6255-6257.2005>.
- Rosselló-Mora, R., & Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(1), 39–67. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(00\)00040-1](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(00)00040-1).
- Rouhrazi, K., Khodakaramian, G., & Velázquez, E. (2016). Phylogenetic diversity of rhizobial species and symbiovars nodulating *Phaseolus vulgaris* in Iran. *FEMS Microbiology Letters*, 363(5), fnw024. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw024>.
- Roy, N., Bhattacharyya, P., & Chakrabarty, P. K. (1994). Iron acquisition during growth in an iron-deficient medium by *Rhizobium* sp. isolated from *Cicer arietinum*. *Microbiology*, 140(10), 2811–2820. <https://doi.org/10.1099/00221287-140-10-2811>.
- Rubio-Sanz, L., Brito, B., & Palacios, J. (2018). Analysis of metal tolerance in *Rhizobium leguminosarum* strains isolated from an ultramafic soil. *FEMS Microbiology Letters*, 365(4). Scopus. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny010>.
- Ruiz-Díez, B., Fajardo, S., Felipe, M. del R. de, & Fernández-Pascual, M. (2012a). Characterization of rhizobia from legumes of agronomic interest grown in semi-arid areas of Central Spain relates genetic differences to soil properties. *Journal of Basic Microbiology*, 52(1), 66–78. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100058>.
- Ruiz-Díez, B., Fajardo, S., & Fernández-Pascual, M. (2012b). Selection of rhizobia from agronomic legumes grown in semiarid soils to be employed as bioinoculants. *Agronomy Journal*, 104(2), 550–559. <https://doi.org/10.2134/agronj2011.0299>.
- Ruiz-Díez, B., Fajardo, S., Puertas-Mejía, M. A., de Felipe, M. del R., & Fernández-Pascual, M. (2009). Stress tolerance, genetic analysis and symbiotic properties of root-nodulating bacteria isolated from Mediterranean leguminous shrubs in Central Spain. *Archives of Microbiology*, 191(1), 35–46. <https://doi.org/10.1007/s00203-008-0426-y>.
- Ruiz-Díez, B., Quiñones, M. A., Fajardo, S., López, M. A., Higuera, P., & Fernández-Pascual, M. (2012). Mercury-resistant rhizobial bacteria isolated from nodules of leguminous plants growing in high Hg-contaminated soils. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(2), 543–554. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3832-z>.
- Ruiz-García, C., Quesada, E., Martínez-Checa, F., Llamas, I., Urdaci, M. C., & Béjar, V. (2005). *Bacillus axarquiensis* sp. nov. and *Bacillus malacitensis* sp. nov., isolated from river-mouth sediments in southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(3), 1279–1285. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63567-0>.
- Ryan, M. P., & Pembroke, J. T. (2020). The genus *Ochrobactrum* as major opportunistic pathogens. *Microorganisms*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111797>.
- Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Wei, H. X., Paré, P. W., & Kloepper, J. W. (2003). Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(8), 4927–4932. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730845100>.
- Saber, W. I. A., Ghoneem, K. M., Al-Askar, A. A., Rashad, Y. M., Ali, A. A., & Rashad, E. M. (2015). Chitinase production by *Bacillus subtilis* ATCC 11774 and its effect on biocontrol of *Rhizoctonia* diseases of potato. *Acta Biologica Hungarica*, 66(4), 436–448. <https://doi.org/10.1556/018.66.2015.4.8>.
- Sachdev, D. P., & Cameotra, S. S. (2013). Biosurfactants in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(3), 1005–1016. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4641-8>.
- Sachman-Ruiz, B. et al. (2022). Nematicidal, acaricidal and plant growth-promoting activity of *Enterobacter* endophytic strains and identification of genes associated with these biological activities in the genomes. *Plants*, 11(22), Article 22. <https://doi.org/10.3390/plants11223136>.
- Sah, S. K., Reddy, K. R., & Li, J. (2016). Abscisic acid and abiotic stress tolerance in crop plants. *Frontiers in Plant Science*, 7, 571. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00571>.
- Sah, S., & Singh, R. (2016). Phylogenetical coherence of *Pseudomonas* in unexplored soils of Himalayan region. *3 Biotech*, 6(2), 170. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0493-8>.
- Sadowsky, M. J., Cregan, P. B., & Keyser, H. H. (1988). Nodulation and nitrogen fixation efficacy of *Rhizobium fredii* with *Phaseolus vulgaris* Genotypes. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(8), 1907–1910.

- Saeki, K. (2011). Rhizobial measures to evade host defense strategies and endogenous threats to persistent symbiotic nitrogen fixation: A focus on two legume-rhizobium model systems. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(8), 1327–1339. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0650-5>
- Safara, S., Harighi, B., Amini, J., & Bahramnejad, B. (2022). Screening of endophytic bacteria isolated from *Beta vulgaris* and *Beta maritima* plants for suppression of postharvest sugar beet soft rot agent, *Enterobacter roggenkampii*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 121, 101892. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2022.101892>
- Saïdi, S., Mnasri, B., & Mhamdi, R. (2011). Diversity of nodule-endophytic agrobacteria-like strains associated with different grain legumes in Tunisia. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(7), 524–530. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.01.009>.
- Saïdi, S., Ramírez-Bahena, M.-H., Santillana, N., Zúñiga, D., Álvarez-Martínez, E., Peix, A., Mhamdi, R., & Velázquez, E. (2014). *Rhizobium laguerreae* sp. nov. nodulates *Vicia faba* on several continents. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(1), 242–247. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.052191-0>.
- Saikia, J., Kotoky, R., Debnath, R., Kumar, N., Gogoi, P., Yadav, A., & Saikia, R. (2022). De novogenomic analysis of *Enterobacter asburiae* EBR12, a plant growth-promoting rhizobacteria isolated from the rhizosphere of *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Applied Microbiology*, 1xac090. <https://doi.org/10.1093/jambio/1xac090>.
- Saisa-ard K., Saimmai A. & Maneerat S. (2014). Characterization and phylogenetic analysis of biosurfactant-producing bacteria isolated from palm oil contaminated soils. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 36 (2), 163-175.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>.
- Sakrouhi, I., Belfquih, M., Sbabou, L., Moulin, P., Bena, G., Filali-Maltouf, A., & Le Quéré, A. (2016). Recovery of symbiotic nitrogen fixing acacia rhizobia from Merzouga desert sand dunes in South East Morocco – Identification of a probable new species of Ensifer adapted to stressed environments. *Systematic and Applied Microbiology*, 39(2), 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.01.001>.
- Salazar, E., Díaz-Mejía, J. J., Moreno-Hagelsieb, G., Martínez-Batallar, G., Mora, Y., Mora, J., & Encarnación, S. (2010). Characterization of the NifA-RpoN regulon in *Rhizobium etli* in free life and in symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(13), 4510–4520. <https://doi.org/10.1128/AEM.02007-09>.
- Saleemi, M., Kiani, M.Z., Sultan, T. et al. (2017) Integrated effect of plant growth-promoting rhizobacteria and phosphate-solubilizing microorganisms on growth of wheat (*Triticum aestivum* L.) under rainfed condition. *Agriculture & Food Security*, 6, 46. <https://doi.org/10.1186/s40066-017-0123-7>.
- Salehin, A., Hafiz, M. H. R., Hayashi, S., Adachi, F., & Itoh, K. (2020). Effects of the biofertilizer OYK (*Bacillus* sp.) inoculation on endophytic microbial community in sweet potato. *Horticulturae*, 6(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/horticulturae6040081>.
- Salehin, A., Puri, R. R., Hafiz, M. H. R., & Itoh, K. (2021). Effect of co-inoculation of *Bacillus* sp. strain with bacterial endophytes on plant growth and colonization in tomato plant (*Solanum lycopersicum*). *Microbiology Research*, 12(2), 480–490. <https://doi.org/10.3390/microbiolres12020032>.
- Salomon, M. V., Bottini, R., de Souza Filho, G. A., Cohen, A. C., Moreno, D., Gil, M., & Piccoli, P. (2014). Bacteria isolated from roots and rhizosphere of *Vitis vinifera* retard water losses, induce abscisic acid accumulation and synthesis of defense-related terpenes in *in vitro* cultured grapevine. *Physiologia plantarum*, 151(4), 359–374. <https://doi.org/10.1111/ppl.12117>.
- Sandhya, V., Sk, Z. A., Grover, M., Reddy, G., & Venkateswarlu, B. (2009). Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45. *Biology and Fertility of Soils*, 46, 17–26. doi: 10.1007/s00374-009-0401-z.
- Sansone, G., Rezza, I., Fernández, G., Calvente, V., Benuzzi, D., & Sanz, M. I. (2011). Inhibitors of polygalacturonase and laccase of *Botrytis cinerea* and their application to the control of this fungus. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(1), 243–247. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.09.010>.
- Santamaría, R. I. et al., (2017). Complete genome sequences of eight *Rhizobium* symbionts associated with common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Genome Announcements*, 5(30), e00645-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00645-17>.
- Santillana, N., Ramírez-Bahena, M. H., García-Fraile, P., Velázquez, E., & Zúñiga, D. (2008). Phylogenetic diversity based on rrs, atpD, recA genes and 16S–23S intergenic sequence analyses of rhizobial strains

- isolated from *Vicia faba* and *Pisum sativum* in Peru. *Archives of Microbiology*, 189(3), 239–247. <https://doi.org/10.1007/s00203-007-0313-y>
- Saraf, M., Pandya, U., & Thakkar, A. (2014). Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens. *Microbiological Research*, 169(1), 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.08.009>.
- Sarkar, A., Ghosh, P. K., Pramanik, K., Mitra, S., Soren, T., Pandey, S., Mondal, M. H., & Maiti, T. K. (2018). A halotolerant *Enterobacter* sp. Displaying ACC deaminase activity promotes rice seedling growth under salt stress. *Research in Microbiology*, 169(1), 20–32. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.08.005>.
- Saum, S. H., & Müller, V. (2007). Salinity-dependent switching of osmolyte strategies in a moderately halophilic bacterium: glutamate induces proline biosynthesis in *Halobacillus halophilus*. *Journal of Bacteriology*, 189(19), 6968–6975. <https://doi.org/10.1128/JB.00775-07>.
- Savvas, D., Gianquinto, G., Tuzel, Y. & Gruda, N. (2013). Soilless culture. *FAO Plant Production and Protection Paper*, 217, 303–354.
- Sawant, S. S., Song, J., & Seo, H.J. (2022). Characterization of *Bacillus velezensis* RDA1 as a biological control agent against white root rot disease caused by *Rosellinia necatrix*. *Plants*, 11(19). <https://doi.org/10.3390/plants11192486>.
- Schaller, G. E., Street, I. H., & Kieber, J. J. (2014). Cytokinin and the cell cycle. *Current Opinion in Plant Biology*, 21, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.05.015>.
- Schlechter, R. O., Jun, H., Bernach, M., Oso, S., Boyd, E., Muñoz-Lintz, D. A., Dobson, R. C. J., Remus, D. M., & Remus-Emsermann, M. N. P. (2018). Chromatic bacteria – a broad host-range plasmid and chromosomal insertion toolbox for fluorescent protein expression in bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.03052>.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>.
- Scholla, M. H., & Elkan, G. H. (1984). *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34(4), 484–486. <https://doi.org/10.1099/00207713-34-4-484>.
- Schulz, S., & Dickschat, J. S. (2007). Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Natural Product Reports*, 24(4), 814–842. <https://doi.org/10.1039/b507392h>.
- Schwarze, K., Buchanan, J., Taylor, J. C., & Wordsworth, S. (2018). Are whole-exome and whole-genome sequencing approaches cost-effective? A systematic review of the literature. *Genetics in Medicine*, 20(10), 1122–1130. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.247>.
- Segovia, L., Young, J. P. W., & Martinez-Romero, E. (1993). Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type i strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 43(2), 374–377. <https://doi.org/10.1099/00207713-43-2-374>
- Sekine, M., Watanabe, K., & Syono, K. (1989). Molecular cloning of a gene for indole-3-acetamide hydrolase from *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of bacteriology*, 171(3), 1718–1724. <https://doi.org/10.1128/jb.171.3.1718-1724.1989>.
- Selvakumar, G., Panneerselvam, P., and Ganeshamurthy, A. N. (2012). Bacterial mediated alleviation of abiotic stress in crops, in *Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management*, ed. D. K. Maheshwari (Berlin: Springer), 205–224. doi: 10.1007/9783-662-45795-5\_10.
- Sendi, Y., Pfeiffer, T., Koch, E., Mhadhbi, H., & Mrabet, M. (2020). Potential of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) root microbiome in the biocontrol of root rot disease and traits of performance. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 127(4), 453–462. <https://doi.org/10.1007/s41348-020-00338-6>.
- Serraj, R., & Sinclair, T. R. (2002). Osmolyte accumulation: Can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant, Cell & Environment*, 25(2), 333–341. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2002.00754.x>.
- Sessitsch, A., Hardarson, G., Akkermans, A. D. L., & Vos, W. M. D. (1997). Characterization of *Rhizobium etli* and other *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. in an Austrian soil. *Molecular Ecology*, 6(7), 601–608. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1997.00223.x>.
- Sessitsch, A. et al. (2012). Functional Characteristics of an Endophyte Community Colonizing Rice Roots as Revealed by Metagenomic Analysis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(1), 28–36. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-11-0204>.
- Sessitsch, A., Ramirez-Saad, H., Hardarson, G., Akkermans, A. D. L., & De Vos, W. M. Y. (1997). Classification of Austrian rhizobia and the Mexican isolate FL27 obtained from *Phaseolus vulgaris* L. as *Rhizobium*

- gallicum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(4), 1097–1101. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-4-1097>.
- Shade, A., Jacques, M.-A., & Barret, M. (2017). Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. *Current Opinion in Microbiology*, 37, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.03.010>.
- Shah, S. H., Hussain, M. B., Zahir, Z. A., Haq, T. U., & Matloob, A. (2022). Thermal plasticity and cotton production enhancing attributes of phosphate-solubilizing bacteria from cotton rhizosphere. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 22(3), 3885–3900. <https://doi.org/10.1007/s42729-022-00937-2>.
- Shamseldin, A., El-Saadani, M., Sadowsky, M. J., & An, C. S. (2009). Rapid identification and discrimination among Egyptian genotypes of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and *Sinorhizobium meliloti* nodulating faba bean (*Vicia faba* L.) by analysis of nodC, ARDRA, and rDNA sequence analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(1), 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.09.014>.
- Shamseldin, A., & Velázquez, E. (2020). The promiscuity of *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) for nodulation with rhizobia: A review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(5), 63. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02839-w>.
- Sharifi, R., Lee, S. M., & Ryu, C. M. (2018). Microbe-induced plant volatiles. *The New phytologist*, 220(3), 684–691. <https://doi.org/10.1111/nph.14955>.
- Sharma, D., Saharan, B. S., Chauhan, N., Procha, S., & Lal, S. (2015). Isolation and functional characterization of novel biosurfactant produced by *Enterococcus faecium*. *SpringerPlus*, 4(1), 4. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-4-4>.
- Sharma, M., Sood, G., & Chauhan, A. (2021). Bioprospecting beneficial endophytic bacterial communities associated with *Rosmarinus officinalis* for sustaining plant health and productivity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(8), 135. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03101-7>.
- Shen, H., Luo, X., Xia, Z., & Wan, C. (2022). *Rhizobium alarense* sp. nov. and *Rhizobium halophilum* sp. nov. isolated from the nodule and rhizosphere of *Lotus japonicus*. *Archives of Microbiology*, 204(11), 659. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03202-3>.
- Shendure, J., & Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, 26(10). <https://doi.org/10.1038/nbt1486>.
- Shi, P., Zhang, J., Li, X., Zhou, L., Luo, H., Wang, L., Zhang, Y., Chou, M., & Wei, G. (2022). Multiple metabolic phenotypes as screening criteria are correlated with the plant growth-promoting ability of rhizobacterial isolates. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.747982>.
- Shim J S, Seo J S, Seo J S, Kim Y, Koo Y, Do Choi Y, & Jung C. (2019). Heterologous expression of bacterial trehalose biosynthetic genes enhances trehalose accumulation in potato plants without adverse growth effects. *Plant Biotechnology Reports*, 13, 409–418. <https://doi.org/10.1007/s11816-019-00554-z>.
- Shiri, M., Raey, Y., Ghassemi-Golezani, K., & Aliasgharzad, N. (2012). Influence of *Bradyrhizobium japonicum* and phosphate solubilising bacteria on soybean yield at different levels of nitrogen and phosphorus. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 3(11), 544–549.
- Shoebitz, M., Ribaudó, C. M., Pardo, M. A., Cantore, M. L., Ciampi, L., & Curá, J. A. (2009). Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(9), 1768–1774. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.12.031>.
- Shreya, D., Amaresan, N., & Supriya, N. R. (2022). Zinc solubilizing *Bacillus* sp (SS9) and *Enterobacter* sp (SS7) promote mung bean (*Vigna radiata* L.) growth, nutrient uptake and physiological profiles. *Letters in Applied Microbiology*, ovac063. <https://doi.org/10.1093/lambio/ovac063>.
- Sieber, S.A. & Marahiel, M.A. (2005). Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics. *Chemical reviews*, 105(2), 715–738. <https://doi.org/10.1021/cr0301191>.
- Silva, C., Eguiarte, L. E., & Souza, V. (1999). Reticulated and epidemic population genetic structure of *Rhizobium etli* biovar phaseoli in a traditionally managed locality in Mexico. *Molecular Ecology*, 8(2), 277–287. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1999.00564.x>.
- Silva, C., Vinuesa, P., Eguiarte, L. E., Martínez-Romero, E., & Souza, V. (2003). *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in a traditionally managed milpa plot in Mexico: Population Genetics and Biogeographic Implications. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 884–893. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.884-893.2003>.
- Silva, C., Vinuesa, P., Eguiarte, L. E., Souza, V., & Martínez-Romero, E. (2005). Evolutionary genetics and biogeographic structure of *Rhizobium gallicum* sensu lato, a widely distributed bacterial symbiont of

- diverse legumes. *Molecular Ecology*, 14(13), 4033–4050. Scopus. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02721.x>.
- Singal, R., Gupta, R., & Saxena, R. K. (1994). Rock phosphate solubilization under alkaline conditions by *Aspergillus japonicus* and *A. foetidus*. *Folia Microbiologica*, 39(1), 33–36. <https://doi.org/10.1007/BF02814526>.
- Singh, N., Pemmaraju, S.C., Pruthi, P.A., Cameotra S.S., & Pruthi, V. (2013). *Candida* biofilm disrupting ability of di-rhamnolipid (RL-2) produced from *Pseudomonas aeruginosa* DSVP20. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169(8), 2374–2391.
- Siqueira, A. F., Ormeño-Orrillo, E., Souza, R. C., Rodrigues, E. P., Almeida, L. G. P., Barcellos, F. G., Batista, J. S. S., Nakatani, A. S., Martínez-Romero, E., Vasconcelos, A. T. R., & Hungria, M. (2014). Comparative genomics of *Bradyrhizobium japonicum* CPAC 15 and *Bradyrhizobium diazoefficiens* CPAC 7: Elite model strains for understanding symbiotic performance with soybean. *BMC Genomics*, 15(1), 420. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-420>.
- Slama, H. B., Cherif-Silini, H., Chenari Bouket, A., Qader, M., Silini, A., Yahiaoui, B., Alenezi, F. N., Luptakova, L., Triki, M. A., Vallat, A., Oszako, T., Rateb, M. E., & Belbahri, L. (2019). Screening for *Fusarium* antagonistic bacteria from contrasting niches designated the endophyte *Bacillus halotolerans* as plant warden against *Fusarium*. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.03236>.
- Solomon, T., Pant, L. M., & Angaw, T. (2012). Effects of Inoculation by *Bradyrhizobium japonicum* Strains on nodulation, nitrogen fixation, and yield of soybean (*Glycine max* L. Merrill) varieties on nitisols of Bako, Western Ethiopia. *International Scholarly Research Notices*, 2012, e261475. <https://doi.org/10.5402/2012/261475>.
- Someya, N., Kataoka, N., Komagata, T., Hirayae, K., Hibi, T., & Akutsu, K. (2000). Biological control of cyclamen soilborne diseases by *Serratia marcescens* strain B2. *Plant Disease*, 84(3), 334–340. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.3.334>.
- Someya, N., Tsuchiya, K., Yoshida, T., Noguchi, M. T., Akutsu, K., & Sawada, H. (2007). Co-inoculation of an antibiotic-producing bacterium and a lytic enzyme-producing bacterium for the biocontrol of tomato wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici. *Biocontrol science*, 12(1), 1–6. <https://doi.org/10.4265/bio.12.1>.
- Soumare, A., Sarr, D. & Diédhiou, A. G. (2022). Potassium sources, microorganisms, and plant nutrition—challenges and future research directions: A review, *Pedosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.pedsph.2022.06.025>.
- Souza, R. de, Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. P. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, 38, 401–419. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews* 31, 425–448.
- Spaepen, S., & Vanderleyden, J. (2011). Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(4), a001438. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001438>.
- Srinivasan R, Yandigeri MS, Kashyap S, Alagawadi AR.(2012). Effect of salt on survival and P-solubilization potential of phosphate solubilizing microorganisms from salt affected soils. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(4), 427–434. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.05.004>.
- Stackebrandt, E. et al. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(3), 1043–1047. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-3-1043>.
- Stackebrandt, E., & Goebel, B. M. (1994). Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(4), 846–849. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-846>.
- Stearns, J. C., Woody, O. Z., McConkey, B. J., & Glick, B. R. (2012). Effects of bacterial ACC deaminase on *Brassica napus* gene expression. *Molecular Plant-Microbe interactions : MPMI*, 25(5), 668–676. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-11-0213>.
- Stefan, M., Munteanu, N., Stoleru, V. & Mihasan, M. (2013). Effects of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria on photosynthesis, antioxidant status and yield of runner bean. *Romanian Biotechnological Letters*, 18(2):128132–8143.



- Sturz, A. V., & Kimpinski, J. (2004). Endoroot bacteria derived from marigolds (*Tagetes* spp.) can decrease soil population densities of root-lesion nematodes in the potato root zone. *Plant and Soil*, 262(1), 241–249. <https://doi.org/10.1023/B:PLSO.0000037046.86670.a3>.
- Suarez R, Wong A, Ramirez M, Barraza A, OrozcoMdel C, Cevallos MA, Lara M, Hernandez G, Iturriaga G (2008). Improvement of drought tolerance and grain yield in common bean by overexpressing trehalose-6-phosphate synthase in rhizobia. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(7):958–966.
- Sukweenadhi, J.; Balusamy, S.R.; Kim, Y.J.; Lee, C.H.; Kim, Y.J.; Koh, S.C.; Yang, D.C. (2018). A growth-promoting bacteria, *Paenibacillus yonginensis* DCY 84T enhanced salt stress tolerance by activating defense-related systems in *Panax ginseng*. *Frontiers in Plant Science*, 9, 813. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00813>.
- Sullivan, M. J., & Ulett, G. C. (2018). Stable expression of modified green fluorescent protein in group B *Streptococci* to enable visualization in experimental systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(18), e01262-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01262-18>.
- Susilowati, D. N., Riyanti, E. I., Setyowati, M., & Mulya, K. (2018). Indole-3-acetic acid producing bacteria and its application on the growth of rice. *AIP Conference Proceedings*, 2002(1). <https://doi.org/10.1063/1.5050112>.
- Süssmuth, R. D., & Mainz, A. (2017). Nonribosomal Peptide Synthesis—Principles and Prospects. *Angewandte Chemie International Edition*, 56(14), 3770–3821. <https://doi.org/10.1002/anie.201609079>.
- Tagg, J. R., Dajani, A. S., & Wannamaker, L. W. (1976). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews*, 40(3), 722–756.
- Taha, K., Berraho, E. B., El Attar, I., Dekkiche, S., Aurag, J., & Béna, G. (2018). *Rhizobium laguerreae* is the main nitrogen-fixing symbiont of cultivated lentil (*Lens culinaris*) in Morocco. *Systematic and Applied Microbiology*, 41(2), 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.09.008>.
- Taha, K., El Attar, I., Hnini, M., Raif, A., Béna, G., Aurag, J., & Berraho, E. B. (2022). Beneficial effect of *Rhizobium laguerreae* co-inoculated with native *Bacillus* sp. and *Enterobacter aerogenes* on lentil growth under drought stress. *Rhizosphere*, 22, 100523. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100523>.
- Tahlan, K., Moore, M.A., & Jensen, S.E.  $\delta$ -(l- $\alpha$ -aminoadipyl)-l-cysteinyl-d-valine synthetase (ACVS): Discovery and perspectives. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 44(4-5), 517–524. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1850-7>.
- Takeda, R. (1959). *Pseudomonas* pigments. III. Derivatives of pyoluteorin. *Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan*, 23(2), 126-130, DOI: 10.1080/03758397.1959.10857534.
- Takishita, Y., Charron, J.-B., & Smith, D. L. (2018). Biocontrol Rhizobacterium *Pseudomonas* sp. 23S induces systemic resistance in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) against bacterial canker *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2119. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02119>.
- Tampakaki, A. P., Fotiadis, C. T., Ntatsi, G., & Savvas, D. (2017a). A novel symbiovar (aegeanense) of the genus *Ensifer* nodulates *Vigna unguiculata*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(13), 4314–4325. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8281>.
- Tampakaki, A. P., Fotiadis, C. T., Ntatsi, G., & Savvas, D. (2017b). Phylogenetic multilocus sequence analysis of indigenous slow-growing rhizobia nodulating cowpea (*Vigna unguiculata* L.) in Greece. *Systematic and Applied Microbiology*, 40(3), 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.01.001>.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- Teotia P, Kumar V, Kumar M, Prasad R, Sharma S. (2017). Probiotic microbiome: Potassium solubilization and plant productivity. In Kumar V, Kumar M, Sharma S, Prasad R (eds.) *Probiotics in Agroecosystem*. Springer, Singapore, 451–467.
- Theunis, M., Kobayashi, H., Broughton, W. J. & Prinsen, E. (2004). Flavonoids, NodD1, NodD2, and nod-box NB15 modulate expression of the y4wEFG locus that is required for indole-3-acetic acid synthesis in *Rhizobium* sp. strain NGR234. *Molecular plant-microbe interactions*, 17(10), 1153–1161. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.10.1153>.
- Thomine, S., & Lanquar, V. (2011) Iron transport and signaling in plants. In transporters and pumps in plant signaling: signaling and communication in plants; Geisler, M., Venema, K., Eds.; *Springer*, 7, 99–131.
- Thomloui, E.-E., Tsalgatidou, P. C., Baira, E., Papadimitriou, K., Venieraki, A., & Katinakis, P. (2021). Genomic and metabolomic insights into secondary metabolites of the novel *Bacillus halotolerans* Hil4,

- an endophyte with promising antagonistic activity against gray mold and plant growth promoting potential. *Microorganisms*, 9(12), 2508. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122508>.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680.
- Tian, C. F., Wang, E. T., Han, T. X., Sui, X. H., & Chen, W. X. (2007). Genetic diversity of rhizobia associated with *Vicia faba* in three ecological regions of China. *Archives of Microbiology*, 188(3), 273–282. <https://doi.org/10.1007/s00203-007-0245-6>.
- Tian, C. F., Wang, E. T., Wu, L. J., Han, T. X., Chen, W. F., Gu, C. T., Gu, J. G., & Chen, W. X. (2008). *Rhizobium fabae* sp. nov., a bacterium that nodulates *Vicia faba*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(12), 2871–2875. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.2008/000703-0>.
- Tian, C. F., Young, J. P. W., Wang, E. T., Tamimi, S. M., & Chen, W. X. (2010). Population mixing of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* nodulating *Vicia faba*: The role of recombination and lateral gene transfer. *FEMS Microbiology Ecology*, 73(3), 563–576. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00909.x>.
- Tian, C. F., Zhou, Y. J., Zhang, Y. M., Li, Q. Q., Zhang, Y. Z., Li, D. F., Wang, S., Wang, J., Gilbert, L. B., Li, Y. R., & Chen, W. X. (2012). Comparative genomics of rhizobia nodulating soybean suggests extensive recruitment of lineage-specific genes in adaptations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(22), 8629–8634. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120436109>.
- Tilocca, B., Cao, A., & Migheli, Q. (2020). Scent of a killer: Microbial volatolome and its role in the biological control of plant pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.00041>
- Timmers, A. C., Soupène, E., Auriac, M. C., de Billy, F., Vasse, J., Boistard, P., & Truchet, G. (2000). Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 13(11), 1204–1213. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.11.1204>.
- Timofeeva, A., Galyamova, M., & Sedykh, S. (2022). Prospects for using phosphate-solubilizing microorganisms as natural fertilizers in Agriculture. *Plants*, 11(16), Article 16. <https://doi.org/10.3390/plants11162119>.
- Tindall, B. J., Rosselló-Móra, R., Busse, H.-J., Ludwig, W., & Kämpfer, P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(1), 249–266. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.016949-0>.
- Toh, S. C., Samuel, L. & Awang, A. S. A. H. (2016). Screening for antifungal-producing bacteria from *Piper nigrum* plant against *Phytophthora capsici*. *International Food Research Journal*, 23(6): 2616-2622.
- Toledo, I., Lloret, L., & Martínez-Romero, E. (2003). *Sinorhizobium americanus* sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. In Mexico. *Systematic and Applied Microbiology*, 26(1), 54–64. <https://doi.org/10.1078/072320203322337317>.
- Tong, W., Li, X., Huo, Y., Zhang, L., Cao, Y., Wang, E., Chen, W., Tao, S., & Wei, G. (2018). Genomic insight into the taxonomy of *Rhizobium* genospecies that nodulate *Phaseolus vulgaris*. *Systematic and Applied Microbiology*, 41(4), 300–310. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.03.001>.
- Tontou, R., Giovanardi, D., Ferrari, M., & Stefani, E. (2016). Isolation of bacterial endophytes from *Actinidia chinensis* and preliminary studies on their possible use as antagonists against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Journal of Berry Research*, 6(4), 395–406. <https://doi.org/10.3233/JBR-160118>.
- Toral, L., Rodríguez, M., Béjar, V., & Sampedro, I. (2020). Crop protection against *Botrytis cinerea* by rhizosphere biological control agent *Bacillus velezensis* XT1. *Microorganisms*, 8(7), 992. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8070992>.
- Torres, M. J., Brandan, C. P., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., & Audisio, M. C. (2016). Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. *Microbiological Research*, 182, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.09.005>.
- Torres, M., Rubio-Portillo, E., Antón, J., Ramos-Esplá, A. A., Quesada, E., & Llamas, I. (2016). Selection of the N-acylhomoserine lactone-degrading bacterium *Alteromonas stellipolaris* PQQ-42 and of Its Potential for Biocontrol in Aquaculture. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00646>.
- Triplett, E. W., & Sadowsky, M. J. (1992). Genetics of competition for nodulation of legumes. *Annual Review of Microbiology*, 46, 399–428. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.46.100192.002151>.
- Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Vernet, G., & Aziz, A. (2006). Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis Cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 114(4), 405–413. <https://doi.org/10.1007/s10658-006-0005-5>.

- Tsalgatidou, P. C., Thomludi, E.-E., Baira, E., Papadimitriou, K., Skagia, A., Venieraki, A., & Katinakis, P. (2022). Integrated genomic and metabolomic analysis illuminates key secreted metabolites produced by the novel endophyte *Bacillus halotolerans* Cal.I.30 involved in diverse biological control activities. *Microorganisms*, *10*(2), 399. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020399>.
- Tsien, H. C., & Schmidt, E. L. (1980). Accumulation of soybean lectin-binding polysaccharide during growth of *Rhizobium japonicum* as determined by hemagglutination inhibition assay. *Applied and Environmental Microbiology*, *39*(6), 1100–1104. <https://doi.org/10.1128/aem.39.6.1100-1104.1980>.
- Turner, T. R., James, E. K., & Poole, P. S. (2013). The plant microbiome. *Genome Biology*, *14*(6), 209. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-6-209>.
- Tyagi, M. da Fonseca, M.M.R., & de Carvalho, C. (2011). Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, *22*, 231–241.
- Tyc, O., de Jager, V. C. L. et al., (2017). Exploring bacterial interspecific interactions for discovery of novel antimicrobial compounds. *Microbial biotechnology*, *10*(4), 910–925. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12735>.
- Ullah, A., Mushtaq, H., Fahad, Sh., Shah, A., Chaudhary, H. J., & Hakima. (2017). Plant growth promoting potential of bacterial endophytes in novel association with *Olea ferruginea* and *Withania coagulans*. *Microbiology*, *86*(1), 119–127. <https://doi.org/10.1134/S0026261717010155>.
- Upadhyay, S. K., Singh, J. S., & Singh, D. P. (2011). Exopolysaccharide-producing plant growth-promoting rhizobacteria under salinity condition. *Pedosphere*, *21*, 214–222. doi: 10.1016/S1002-0160(11)60120-3.
- Upadhyay, S. K., & Singh, D. P. (2015). Effect of salt-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria on wheat plants and soil health in a saline environment. *Plant Biology (Stuttgart, Germany)*, *17*(1), 288–293. <https://doi.org/10.1111/plb.12173>.
- Uroz, S., Dessaux, Y., & Oger, P. (2009). Quorum sensing and quorum quenching: the yin and yang of bacterial communication. *Chembiochem : A European Journal of Chemical Biology*, *10*(2), 205–216. <https://doi.org/10.1002/cbic.200800521>.
- Utkhede, R., & Koch, C. (2004). Biological treatments to control bacterial canker of greenhouse tomatoes. *BioControl*, *49*(3), 305–313. <https://doi.org/10.1023/B:BICO.0000025373.69584.08>.
- Utkhede, R. S., & Sholberg, P. L. (1986). *In vitro* inhibition of plant pathogens by *Bacillus subtilis* and *Enterobacter aerogenes* and *in vivo* control of two postharvest cherry diseases. *Canadian Journal of Microbiology*, *32*(12), 963–967. <https://doi.org/10.1139/m86-178>.
- Valenzuela-Ruiz, V., Robles-Montoya, R. I., Parra-Cota, F. I., Santoyo, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, Ma., Rodríguez-Ramírez, R., & de los Santos-Villalobos, S. (2019). Draft genome sequence of *Bacillus paralicheniformis* TRQ65, a biological control agent and plant growth-promoting bacterium isolated from wheat (*Triticum turgidum* subsp. durum) rhizosphere in the Yaqui Valley, Mexico. *3 Biotech*, *9*(11), 436. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1972-5>.
- Valverde, A., Igual, J. M., Peix, A., Cervantes, E., & Velázquez, E. (2006). *Rhizobium lusitanum* sp. nov. A bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *56*(11), 2631–2637. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.64402-0>.
- Valverde, A., Velázquez, E., Cervantes, E., Igual, J. M., & van Berkum, P. (2011). Evidence of an American origin for symbiosis-related genes in *Rhizobium lusitanum*. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(16), 5665–5670. <https://doi.org/10.1128/AEM.02017-10>.
- van Berkum, P., Beyene, D., Bao, G., Campbell, T. A., & Eardly, B. D. (1998). *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *48*(1), 13–22. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-1-13>.
- van Berkum, P., Beyene, D., Vera, F. T., & Keyser, H. H. (1995). Variability among *Rhizobium* strains originating from nodules of *Vicia faba*. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*(7), 2649–2653. <https://doi.org/10.1128/aem.61.7.2649-2653.1995>.
- van Berkum, P., & Eardly, B. D. (1998). Molecular evolutionary systematics of the *Rhizobiaceae*. In H. P. Spink, A. Kondorosi, & P. J. J. Hooykaas (Eds.), *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria* (pp. 1–24). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-5060-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-011-5060-6_1).
- van Berkum, P., Terefework, Z., Paulin, L., Suomalainen, S., Lindström, K., & Eardly, B. D. (2003). Discordant phylogenies within the *rrn* loci of rhizobia. *Journal of Bacteriology*, *185*(10), 2988–2998. <https://doi.org/10.1128/JB.185.10.2988-2998.2003>.
- Vandenbussche, F., & Van Der Straeten, D. (2012). The role of ethylene in plant growth and development. *Annual Plant Reviews* *44*, 219–242.

- van Cauwenberghe, J., Lemaire, B., Stefan, A., Efroze, R., Michiels, J., & Honnay, O. (2016). Symbiont abundance is more important than pre-infection partner choice in a *Rhizobium* – legume mutualism. *Systematic and Applied Microbiology*, 39(5), 345–349. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.05.007>.
- van der Ent, S., van Wees, S. C., & Pieterse, C. M. (2009). Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochemistry*, 70(13-14), 1581–1588. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.06.009>.
- van Dijk, K., & Nelson, E. B. (2000). Fatty acid competition as a mechanism by which *Enterobacter cloacae* suppresses *Pythium ultimum* sporangium germination and damping-Off. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5340–5347.
- van Rhijn, P. J., Feys, B., Verreth, C., & Vanderleyden, J. (1993). Multiple copies of *nodD* in *Rhizobium tropici* CIAT899 and BR816. *Journal of Bacteriology*, 175(2), 438–447. <https://doi.org/10.1128/jb.175.2.438-447.1993>.
- Vanlauwe, B., Hungria, M., Kanampiu, F., & Giller, K. E. (2019). The role of legumes in the sustainable intensification of African smallholder agriculture: Lessons learnt and challenges for the future. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 284, 106583. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2019.106583>.
- Vardharajula, S., Zulfikar Ali, S., Grover, M., Reddy, G., & Bandi, V. (2011). Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp.: effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress. *Journal of Plant Interactions*, 6(1) 1–14. doi: 10.1080/17429145.2010.535178.
- Vasse, J., de Billy, F., Camut, S., & Truchet, G. (1990). Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *Journal of Bacteriology*, 172(8), 4295–4306. <https://doi.org/10.1128/jb.172.8.4295-4306.1990>.
- Vater, J., Kablitz, B., Wilde, C., Franke, P., Mehta, N. & Cameotra, S. S. (2002). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 6210–6219, <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.6210-6219.2002>.
- Vecino, X., Barbosa-Pereira, L., Devesa-Rey, R., Cruz, J. M., & Moldes, A. B. (2015). Optimization of extraction conditions and fatty acid characterization of *Lactobacillus pentosus* cell-bound biosurfactant/bioemulsifier. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(2), 313–320. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6720>.
- Vega, C., Rodríguez, M., Llamas, I., Béjar, V., & Sampedro, I. (2019). Silencing of phytopathogen communication by the halotolerant PGPR *Staphylococcus equorum* strain EN21. *Microorganisms*, 8(1), 42. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010042>
- Velho-Pereira, S., & Kamat, N. M. (2011). Antimicrobial screening of actinobacteria using a modified cross-streak method. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73(2), 223. <https://doi.org/10.4103/0250-474x.91566>.
- Venter, A. P., Twelker, S., Oresnik, I. J., & Hynes, M. F. (2001). Analysis of the genetic region encoding a novel rhizobiocin from *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae strain 306. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(6), 495–502. <https://doi.org/10.1139/w01-043>.
- Ventorino, V., Chiurazzi, M., Aponte, M., Pepe, O., & Moschetti, G. (2007). Genetic diversity of a natural population of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae nodulating plants of *Vicia faba* in the Vesuvian Area. *Current Microbiology*, 55(6), 512–517. <https://doi.org/10.1007/s00284-007-9024-5>.
- Vera, E., Azevedo, P., Domínguez, J., Converti, A., & Oliveira, R. (2017). Influence of temperature and pH on the production of biosurfactant, bacteriocin and lactic acid by *Lactococcus lactis* CECT-4434. *CyTA - Journal of Food*, 15, 1–6. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1306806>.
- Verástegui-Valdés, M. M., Zhang, Y. J., Rivera-Orduña, F. N., Cheng, H.-P., Sui, X. H., & Wang, E. T. (2014). Microsymbionts of *Phaseolus vulgaris* in acid and alkaline soils of Mexico. *Systematic and Applied Microbiology*, 37(8), 605–612. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.08.005>.
- Versalovic, J., Koeuth, T., & Lupski, J. R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19(24), 6823–6831.
- Vessey, J. K., Pawlowski, K., & Bergman, B. (2005). Root-based N<sub>2</sub>-fixing symbioses: Legumes, actinorhizal plants, Parasponia sp. and cycads. *Plant and Soil*, 274(1/2), 51–78.
- Villadas, P. J., Lasa, A. V., Martínez-Hidalgo, P., Flores-Félix, J. D., Martínez-Molina, E., Toro, N., Velázquez, E., & Fernández-López, M. (2017). Analysis of rhizobial endosymbionts of *Vicia*, *Lathyrus* and *Trifolium* species used to maintain mountain firewalls in Sierra Nevada National Park (South Spain). *Systematic and Applied Microbiology*, 40(2), 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.11.008>.

- Vincent, J. M. (1970). A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. *A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria*. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19710700726>.
- Vinuesa, P., Silva, C., Lorite, M. J., Izaguirre-Mayoral, M. L., Bedmar, E. J., & Martínez-Romero, E. (2005). Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from *rrs*, *atpD*, *recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of *Sesbania* microsymbionts from Venezuelan wetlands. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(8), 702–716. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.05.007>.
- Voisard, C., Keel, C., Haas, D., & Defago, G. (1989). Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO J.* 8(2), 351–358. doi: 10.1002/j.1460-2075.1989.tb03384.x.
- Voisin, A. S., Salon, C., Jeudy, C., & Warembourg, F. R. (2003). Seasonal patterns of <sup>13</sup>C partitioning between shoots and nodulated roots of N<sub>2</sub>- or Nitrate-fed *Pisum sativum* L. *Annals of Botany*, 91(5), 539–546. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg055>.
- Vorholt, J. A. (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews. Microbiology*, 10(12), 828–840. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2910>.
- Vurukonda, S. S., Vardharajula, S., Shrivastava, M., & SkZ, A. (2016). Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, 184, 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.003>.
- Wahyudi, A. (2013). Production of IAA by *Bradyrhizobium* sp. *WASET*, 74, 152–155.
- Walsh, C. T., O'Brien, R. V., & Khosla, C. (2013). Non proteinogenic amino acid building blocks for nonribosomal peptide and hybrid polyketide scaffolds. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(28), 7098–7124. <https://doi.org/10.1002/anie.201208344>.
- Wang, E. T., Kan, F. L., Tan, Z. Y., Toledo, I., Chen, W. X., & Martínez-Romero, E. (2003). Diverse *Mesorhizobium plurifarium* populations native to Mexican soils. *Archives of Microbiology*, 180(6), 444–454. <https://doi.org/10.1007/s00203-003-0610-z>.
- Wang, E. T., Rogel, M. A., Garcia-de los Santos, A., Martinez-Romero, J., Cevallos, M. A., & Martínez-Romero, E. (1999). *Rhizobium etli* bv. mimosae, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(4), 1479–1491. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-4-1479>.
- Wang, F., Wang, E. T., Wu, L. J., Sui, X. H., Li, Y., & Chen, W. X. (2011a). *Rhizobium vallis* sp. nov., isolated from nodules of three leguminous species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(11), 2582–2588. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.026484-0>.
- Wang, J., Qu, F., Liang, J., Yang, M., & Hu, X. (2022). *Bacillus velezensis* SX13 promoted cucumber growth and production by accelerating the absorption of nutrients and increasing plant photosynthetic metabolism. *Scientia Horticulturae*, 301, 111151. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111151>.
- Wang, L., Cao, Y., Wang, E. T., Qiao, Y. J., Jiao, S., Liu, Z. S., Zhao, L., & Wei, G. H. (2016). Biodiversity and biogeography of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Shaanxi Province. *Systematic and Applied Microbiology*, 39(3), 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.02.001>.
- Wang, Q., Liu, J., & Zhu, H. (2018). Genetic and molecular mechanisms underlying symbiotic specificity in Legume-*Rhizobium* Interactions. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.00313>.
- Wang, S., Ouyang, L., Ju, X., Zhang, L., Zhang, Q., & Li, Y. (2014). Survey of plant drought-resistance promoting bacteria from populus euphratica tree living in arid area. *Indian Journal of Microbiology*, 54(4), 419–426. <https://doi.org/10.1007/s12088-014-0479-3>.
- Wang, W.-Y., Kong, W.-L., Liao, Y.-C.-Z., & Zhu, L.-H. (2022). Identification of *Bacillus velezensis* SBB and its antifungal effects against *Verticillium dahliae*. *Journal of Fungi*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/jof8101021>.
- Wang, X., Wu, Z., Xiang, H., He, Y., Zhu, S., Zhang, Z., Li, X., & Wang, J. (2022). Whole genome analysis of *Enterobacter cloacae* Rs-2 and screening of genes related to plant-growth promotion. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23564-x>.
- Wang, X., Zhou, X., Cai, Z., Guo, L., Chen, X., Chen, X., Liu, J., Feng, M., Qiu, Y., Zhang, Y., & Wang, A. (2020). A biocontrol strain of *Pseudomonas aeruginosa* CQ-40 promote growth and control *Botrytis cinerea* in tomato. *Pathogens*, 10(1), 22. <https://doi.org/10.3390/pathogens10010022>.
- Wang, Y., Wan, S., Yu, W., Yuan, D., & Sun, L. (2022). Newly isolated *Enterobacter cloacae* sp. HN01 and *Klebsiella pneumoniae* sp. HN02 collaborate with self-secreted biosurfactant to improve solubility and

- bioavailability for the biodegradation of hydrophobic and toxic gaseous para-xylene. *Chemosphere*, 304, 135328. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135328>.
- Wani, P. A., Zaidi, A., & Khan, Md. S. (2009). Chromium reducing and plant growth promoting potential of *Mesorhizobium* species under chromium stress. *Bioremediation Journal*, 13(3), 121–129. <https://doi.org/10.1080/10889860903124289>.
- Wayne, L. G. et al. (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37(4), 463–464. <https://doi.org/10.1099/00207713-37-4-463>.
- Wei, H., He, W., Li, Z., Ge, L., Zhang, J., & Liu, T. (2022). Salt-tolerant endophytic bacterium *Enterobacter ludwigii* B30 enhance bermudagrass growth under salt stress by modulating plant physiology and changing rhizosphere and root bacterial community. *Frontiers in Plant Science*, 13, 959427. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.959427>.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
- Wheatley, R. E. (2002). The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81(1), 357–364. <https://doi.org/10.1023/A:1020592802234>.
- Whipps, J. M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52, 487–511. [https://doi.org/10.1093/jexbot/52.suppl\\_1.487](https://doi.org/10.1093/jexbot/52.suppl_1.487).
- Wilcockson, J., & Werner, D. (1978). Nitrogenase activity of *Rhizobium japonicum* growing on agar surfaces in relation to slime production, growth and survival. *Journal of General Microbiology*, 108(1), 151–160. <https://doi.org/10.1099/00221287-108-1-151>.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51(2), 221–271.
- Woldekiros, B., Worku, W., & Abera, G. (2018). Response of faba bean (*Vicia faba* L.) to *Rhizobium* inoculation, phosphorus and potassium fertilizers application at alichu wuriro highland, Ethiopia. *International Journal of Research in Agriculture and Forestry*, 5(5), 43-47.
- Wolska, K., Szweda, P., Wolska, K., & Szweda, P. (2012). Genotyping techniques for determining the diversity of microorganisms. In *Genetic Diversity in Microorganisms*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/35101>.
- Wright, W., Little, J., Liu, F., & Chakraborty, R. (2013). Isolation and structural identification of the trihydroxamate siderophore vicibactin and its degradative products from *Rhizobium leguminosarum* ATCC 14479 bv. trifolii. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, 26(2), 271–283. <https://doi.org/10.1007/s10534-013-9609-3>.
- Wu, X., Fan, Y., Wang, R., Zhao, Q., Ali, Q., Wu, H., Gu, Q., Borriss, R., Xie, Y., & Gao, X. (2022). *Bacillus halotolerans* KKD1 induces physiological, metabolic and molecular reprogramming in wheat under saline condition. *Frontiers in Plant Science*, 13, 978066. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.978066>.
- Wu, Y., Yuan, J., Raza, W., & Huang, Q. S. and Q. (2014). Biocontrol traits and antagonistic potential of *Bacillus amyloliquefaciens* strain NJZSB3 against *Sclerotinia Sclerotiorum*, a causal agent of canola stem rot. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(10), 1327–1336. <https://doi.org/10.4014/jmb.1402.02061>.
- Xie, J., Yan, Z., Wang, G., Xue, W., Li, C., Chen, X., & Chen, D. (2021). A bacterium isolated from soil in a karst rocky desertification region has efficient phosphate-solubilizing and plant growth-promoting ability. *Frontiers in Microbiology*, 11, 625450. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.625450>.
- Xu, K. W., Zou, L., Penttinen, P., Wang, K., Heng, N. N., Zhang, X. P., Chen, Q., Zhao, K., & Chen, Y. X. (2015). Symbiotic effectiveness and phylogeny of rhizobia isolated from faba bean (*Vicia faba* L.) in Sichuan hilly areas, China. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(7), 515–523. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.06.009>.
- Xu, W., Wang, H., Lv, Z., Shi, Y., & Wang, Z. (2019). Antifungal activity and functional components of cell-free supernatant from *Bacillus amyloliquefaciens* LZN01 inhibit *Fusarium oxysporum* f. sp. niveum growth. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), 1042–1052. <https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1637279>.
- Xue, Q.-Y., Chen, Y., Li, S.-M., Chen, L.-F., Ding, G.-C., Guo, D.-W., & Guo, J.-H. (2009). Evaluation of the strains of *Acinetobacter* and *Enterobacter* as potential biocontrol agents against *Ralstonia* wilt of tomato. *Biological Control*, 48(3), 252–258. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.11.004>.
- Yadav, A., Singh, R. P., Singh, A. L., & Singh, M. (2021). Identification of genes involved in phosphate solubilization and drought stress tolerance in chickpea symbiont *Mesorhizobium ciceri* Ca181. *Archives of Microbiology*, 203(3), 1167–1174. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02109-1>.

- Yadav, K. K., & Sarkar, S. (2019). Biofertilizers, Impact on soil fertility and crop productivity under sustainable agriculture. *Environment and Ecology*, 37 (1), 89–93.
- Yan, J., Yan, H., Liu, L. X., Chen, W. F., Zhang, X. X., Verástegui-Valdés, M. M., Wang, E. T., & Han, X. Z. (2017). *Rhizobium hidalgonense* sp. nov., a nodule endophytic bacterium of *Phaseolus vulgaris* in acid soil. *Archives of Microbiology*, 199(1), 97–104. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1281-x>.
- Yang, J., Kloepper, J. W., & Ryu, C. M. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in plant science*, 14(1), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.10.004>.
- Yang, C., & Bisseling, T. (1992). *Developmental aspects of the Rhizobium-legume symbiosis*.
- Yang, C., Bueckert, R., Schoenau, J., Diederichsen, A., Zakeri, H., & Warkentin, T. (2017). Symbiosis of selected *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae strains with diverse pea genotypes: Effects on biological nitrogen fixation. *Canadian Journal of Microbiology*, 63(11), 909–919. <https://doi.org/10.1139/cjm-2017-0281>.
- Yang, Y. X., Ahammed, G. J., Wu, C., Fan, S. Y., & Zhou, Y. H. (2015). Crosstalk among jasmonate, salicylate and ethylene signaling pathways in plant disease and immune responses. *Current protein & peptide science*, 16(5), 450–461. <https://doi.org/10.2174/1389203716666150330141638>.
- Yang, Y., Zhao, Q., Li, X., Ai, W., Liu, D., Qi, W., Zhang, M., Yang, C., & Liao, H. (2017). Characterization of genetic basis on synergistic interactions between root architecture and biological nitrogen fixation in soybean. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.01466>.
- Yao, Y., Sui, X. H., Zhang, X. X., Wang, E. T., & Chen, W. X. (2015). *Bradyrhizobium erythrophlei* sp. nov. and *Bradyrhizobium ferriligni* sp. nov., isolated from effective nodules of *Erythrophleum fordii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(6), 1831–1837. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000183>.
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Whitman, W. B., Euzéby, J., Amann, R., & Rosselló-Móra, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 12(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3330>.
- Yates, R. J., Howieson, J., Hungria, M., BALA, A., O’Hara, G., & Terpolilli, J. (2016). Authentication of rhizobia and assessment of the legume symbiosis in controlled plant growth systems (73–108).
- Yeoman, K. H., Mittelheiser, S., Sawers, G., & Johnston, A. W. B. (2003). The ECF  $\sigma$  factor Rpol of *R. leguminosarum* initiates transcription of the vbsGSO and vbsADL siderophore biosynthetic genes in vitro. *FEMS Microbiology Letters*, 223(2), 239–244. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00386-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00386-0).
- Yfantopoulos, D., Ntatsi, G., Gruda, N., Bilalis, D., & Savvas, D. (2022). Effects of the preceding crop on soil n availability, biological nitrogen fixation, and fresh pod yield of organically grown faba bean (*Vicia faba* L.). *Horticulturae*, 8(6), 496. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8060496>.
- Yi Y, Huang W, Ge Y (2007) Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(7), 1059–1065. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9575-4>.
- Yohannes, D., Kiros, H., & Yirga, W. (2015). Inoculation, phosphorous and zinc fertilization effects on nodulation, yield and nutrient uptake of Faba bean (*Vicia faba* L.) grown on calcareous cambisol of semiarid Ethiopia. *Journal of Soil Science and Environmental Management*, 6(1), 9–15. <https://doi.org/10.5897/JSSEM2013.0406>.
- Young, J. P., Downer, H. L., & Eardly, B. D. (1991). Phylogeny of the phototrophic rhizobium strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *Journal of Bacteriology*, 173(7), 2271–2277. <https://doi.org/10.1128/jb.173.7.2271-2277.1991>.
- Young, J. P. W., Johnston, A. W. B., & Brewin, N. J. (1982). a search for peas (*Pisum sativum* L.) showing strain specificity for symbiotic *Rhizobium leguminosarum*. *Heredity*, 48(2), 197–201.
- Young, J. P. W., & Matthews, P. (n.d.). A distinct class of peas (*Pisum sativum*) from Afghanistan that show strain specificity for symbiotic *Rhizobium*. *Heredity*, 48(2), 203–210.
- Young, J. P. W. et al.,(2021). Defining the *Rhizobium leguminosarum* species complex. *Genes*, 12(1), 111. <https://doi.org/10.3390/genes12010111>.
- Young, J. P. W., & Wexler, M. Y. (1988). Sym plasmid and chromosomal genotypes are correlated in field populations of *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology*, 134(10), 2731–2739. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-10-2731>.
- Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M., & McInerney, M. J. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 56(3), 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.11.001>.

- Yu, Y.B., Adams, D.O., & Yang, S.F. (1979). 1-Aminocyclopropanecarboxylate synthase, a key enzyme in ethylene biosynthesis. *Archives of biochemistry and biophysics*, 198(1), 280–286. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(79\)90420-x](https://doi.org/10.1016/0003-9861(79)90420-x).
- Yu, G. Y., Sinclair, J. B., Hartman, G. L., & Bertagnolli, B. L. (2002). Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(7), 955–963. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00027-5](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00027-5).
- Yuan, K., Miwa, H., Iizuka, M., Yokoyama, T., Fujii, Y., & Okazaki, S. (2016). Genetic diversity and symbiotic phenotype of hairy vetch rhizobia in Japan. *Microbes and Environments*, 31(2), 121–126. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME15184>.
- Yuanting, L., Cong, C., & Dengdi, A. (2017). Characterisation of endophytic bacteria from a desert plant *Lepidium perfoliatum* L. *Plant Protection Science*, 53(No. 1), 32–43. <https://doi.org/10.17221/14/2016-PPS>.
- Zafar, M., Ahmed, N., Mustafa, G., Zahir, Z. A., & Simms, E. L. (2017). Molecular and biochemical characterization of rhizobia from chickpea (*Cicer arietinum*). *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 54(2), 373–381. <https://doi.org/10.21162/PAKJAS/17.5874>.
- Zaheer, A. (2017). Bacterial diversity in the root nodules and rhizosphere of chickpea (*Cicer arietinum* L.). PhD thesis. Department of Biotechnology Pakistan. Institute of Engineering and Applied Sciences.
- Zahir, Z.A., Nadeem, S.M.; Khan, M.Y.; Binyamin, R.; Waqas, M.R. (2019). Role of halotolerant microbes in plant growth promotion under salt stress conditions. In *Saline Soil-Based Agriculture by Halotolerant Microorganisms*; Kumar, M., Ed.; Springer: Singapore, 209–253.
- Zaid, T., Qaddawi, Z., & Mohammed, A. (2021). *Microbacterium* sp. AJ-Z. isolated from the root nodules of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*). 4457–4460.
- Zhao, Y., Christensen, S.K., Fankhauser, C., Cashman, J.R., Cohen, J.D., Weigel, D. & Chory, J. (2001). A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science (New York, N.Y.)*, 291(5502), 306–309. <https://doi.org/10.1126/science.291.5502.306>.
- Zakhia, F., Jeder, H., Willems, A., Gillis, M., Dreyfus, B., & de Lajudie, P. (2006). Diverse bacteria associated with root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for *nifH*-like gene within the genera *Microbacterium* and *Starkeya*. *Microbial Ecology*, 51(3), 375–393. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9025-0>.
- Zeigler, D. R. (2003). Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(6), 1893–1900. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02713-0>.
- Zheng B, Ibrahim M, Zhang D et al (2018). Identification and characterization of inorganic-phosphate-solubilizing bacteria from agricultural fields with a rapid isolation method. *AMB Express*, 8(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0575-6>.
- Zeng, Q., Wu, X., & Wen, X. (2016). Effects of soluble phosphate on phosphate-solubilizing characteristics and expression of *gcd* gene in *Pseudomonas frederiksbergensis* JW-SD2. *Current microbiology*, 72(2), 198–206. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0938-z>.
- Zhang, H., Kim, M. S., Krishnamachari, V., Payton, P., Sun, Y., Grimson, M., Farag, M. A., Ryu, C. M., Allen, R., Melo, I. S., & Paré, P. W. (2007). Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta*, 226(4), 839–851. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0530-2>.
- Zhang, H., Xie, X., Kim, M. S., Kornyejev, D. A., Holaday, S., & Paré, P. W. (2008). Soil bacteria augment *Arabidopsis* photosynthesis by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels in planta. *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology*, 56(2), 264–273. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03593.x>.
- Zhang, H., Murzello, C., Sun, Y., Kim, M. S., Xie, X., Jeter, R. M., Zak, J. C., Dowd, S. E., & Paré, P. W. (2010). Choline and osmotic-stress tolerance induced in *Arabidopsis* by the soil microbe *Bacillus subtilis* (GB03). *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 23(8), 1097–1104. <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-8-1097>.
- Zhang, J. J., Yu, T., Lou, K., Mao, P. H., Wang, E. T., Chen, W. F., & Chen, W. X. (2014). Genotypic alteration and competitive nodulation of *Mesorhizobium muleiense* against exotic chickpea rhizobia in alkaline soils. *Systematic and Applied Microbiology*, 37(7), 520–524. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.07.004>.
- Zhang, J., Yang, X., Guo, C., de Lajudie, P., Singh, R. P., Wang, E., & Chen, W. (2017). *Mesorhizobium muleiense* and *Mesorhizobium* sp. nov. are symbionts of *Cicer arietinum* L. in alkaline soils of Gansu, Northwest China. *Plant and Soil*, 410(1), 103–112. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-2987-x>.



- Zhang, J., Zhu, W., Goodwin, P. H., Lin, Q., Xia, M., Xu, W., Sun, R., Liang, J., Wu, C., Li, H., Wang, Q., & Yang, L. (2022). Response of *Fusarium pseudograminearum* to biocontrol agent *Bacillus velezensis* YB-185 by phenotypic and transcriptome analysis. *Journal of Fungi*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/jof8080763>.
- Zhang, X., Li, B., Wang, Y., Guo, Q., Lu, X., Li, S., & Ma, P. (2013). Lipopeptides, a novel protein, and volatile compounds contribute to the antifungal activity of the biocontrol agent *Bacillus atrophaeus* CAB-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(21), 9525–9534. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5198-x>.
- Zhang, X., Sun, L., Ma, X., Sui, X. H., & Jiang, R. (2011). *Rhizobium pseudoryzae* sp. nov., isolated from the rhizosphere of rice. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(10), 2425–2429. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.026146-0>.
- Zhang, X.-X., Kosier, B., & Priefer, U. B. (2001). Genetic diversity of indigenous *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae isolates nodulating two different host plants during soil restoration with alfalfa. *Molecular Ecology*, 10(9), 2297–2305. <https://doi.org/10.1046/j.0962-1083.2001.01364.x>.
- Zhang, Y. J., Zheng, W. T., Everall, I., Young, J. P. W., Zhang, X. X., Tian, C. F., Sui, X. H., Wang, E. T., & Chen, W. X. (2015). *Rhizobium anhuiense* sp. Nov., isolated from effective nodules of *Vicia faba* and *Pisum sativum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(Pt\_9), 2960–2967. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000365>.
- Zhao, H., Liu, K., Fan, Y., Cao, J., Li, H., Song, W., Liu, Y., & Miao, M. (2022). Cell-free supernatant of *Bacillus velezensis* suppresses mycelial growth and reduces virulence of *Botrytis cinerea* by inducing oxidative stress. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.980022>.
- Zhao, L., Xu, Y., & Lai, X. (2017). Antagonistic endophytic bacteria associated with nodules of soybean (*Glycine max* L.) and plant growth-promoting properties. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(2), 269–278. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.06.007>.
- Zhao, X., Zhou, J., Tian, R., & Liu, Y. (2022). Microbial volatile organic compounds: Antifungal mechanisms, applications, and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.922450>.
- Zheng, M., Li, D., & Lu, X. et.al (2016) Effects of phosphorus addition with and without nitrogen addition on biological nitrogen fixation in tropical legume and non-legume tree plantations. *Biogeochemistry*, 131(1),65–76. <https://doi.org/10.1007/s10533-016-0265-x>.
- Zhou, M., Chen, W., Chen, H., & Wei, G. (2012). Draft genome sequence of *Mesorhizobium alhagi* ccnwxj12-2t, a novel salt-resistant species isolated from the desert of northwestern China. *Journal of Bacteriology*, 194(5):1261-2. doi: 10.1128/JB.06635-11.
- Zhou, S., Hu, W., Deng, X., Ma, Z., Chen, L., Huang, C., Wang, C., Wang, J., He, Y., Yang, G., & He, G. (2012). Overexpression of the wheat aquaporin gene, TaAQP7, enhances drought tolerance in transgenic tobacco. *Plos One*, 7(12), e52439. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052439>.
- Zinniel, D. K., Lambrecht, P., Harris, N. B., Feng, Z., Kuczmariski, D., Higley, P., Ishimaru, C. A., Arunakumari, A., Barletta, R. G., & Vidaver, A. K. (2002). Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2198–2208. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2198-2208.2002>
- Zuluaga, M. Y. A., Milani, K. M. L., Miras-Moreno, B., Lucini, L., Valentinuzzi, F., Mimmo, T., Pii, Y., Cesco, S., Rodrigues, E. P., & Oliveira, A. L. M. de. (2021). Inoculation with plant growth-promoting bacteria alters the rhizosphere functioning of tomato plants. *Applied Soil Ecology*, 158, 103784. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103784>.
- Zurdo-Piñeiro, J. L., Velázquez, E., Lorite, M. J., Brelles-Mariño, G., Schröder, E. C., Bedmar, E. J., Mateos, P. F., & Martínez-Molina, E. (2004). Identification of fast-growing rhizobia nodulating tropical legumes from Puerto Rico as *Rhizobium gallicum* and *Rhizobium tropici*. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(4), 469–477. <https://doi.org/10.1078/0723202041438437>.
- Zushi, K. & Matsuzoe, N. (2009). Seasonal and cultivar differences in salt-induced changes in antioxidant system in tomato. *Scientia Horticulturae*,120(2), 181–187.

## Ελληνόγλωσση Βιβλιογραφία

Ολύμπιος, Χ. Μ. 2019. Η Τενική Της Καλλιέργειας Των Υπαίθριων Κηπευτικών. Σταμούλη Α.Ε.

## Ιστοσελίδες

United Nations. UN News the world Population Continues to Increase, Even If It Is Getting Older. Available online: <https://news.un.org/es/story/2019/06/1457891> (accessed on 20 July 2022).

Market data forecast. (2018). Available online at: <https://www.marketdataforecast.com/market-reports/asia-pacific-biofertilizers-market> (accessed August 2019).

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΚΑΙ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΣΕ ΕΘΝΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

### Δημοσιεύσεις σε έγκριτα διεθνή περιοδικά με σύστημα κριτών

2021 Efstathiadou E, Ntatsi G, Savvas D, Tampakaki AP (2021) Genetic characterization at the species and symbiovar level of indigenous rhizobial isolates nodulating *Phaseolus vulgaris* in Greece. Sci. Rep. 11: 8674. doi:10.1038/s41598-021-88051-8

2020 Efstathiadou E, Savvas D, Tampakaki AP (2020) Genetic diversity and phylogeny of indigenous rhizobia nodulating faba bean (*Vicia faba* L.) in Greece. Syst. Appl. Microbiol. 43(6):126149. doi: 10.1016/j.syapm.2020.126149.

### Δημοσιεύσεις σε πρακτικά διεθνών και εγχώριων επιστημονικών συνεδρίων με σύστημα κριτών

2022 Efstathiadou E. and Tampakaki A. «Endophytic bacteria from legume root nodules inhibit the growth of phytopathogenic fungi». 20<sup>o</sup> Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο, 3- 6 Οκτωβρίου 2022, Porto Palace, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

2021 Efstathiadou E., Ntatsi G., Savvas D. and Tampakaki A. «Genetic characterization at the species and symbiovar level of seed borne rhizobia isolated from pot-grown common bean nodules». 9<sup>th</sup> International Conference of Mikrobiokosmos. 16-18 December 2021, Agricultural University campus, Athens, Greece.

Efstathiadou E., Savvas D. and Tampakaki A. «Genetic diversity of indigenous rhizobia nodulating *Vicia faba* in Greece». 8<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists – FEMS, 7-11 July 2019, Glasgow, Scotland.

Efstathiadou E., Savvas D. and Tampakaki A. «Characterization of strains isolated from root nodules of common bean in Greece». 8<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists – FEMS, 7-11 July 2019, Glasgow, Scotland.

2019 Efstathiadou E., Savvas D. and Tampakaki A.P. «Diverse bacteria isolated from root nodules of common bean grown in different ecoregions of Greece». 8<sup>th</sup> Conference of Mikrobiokosmos, 18-20 April 2019, New Conference Center of FORTH/ICE-HT, Patra, Greece.

Efstathiadou E., Savvas D. and Tampakaki A.P. «Characterization of microsymbionts isolated from root nodules of *Vicia faba* grown in Greek soils». 8<sup>th</sup> Conference of Mikrobiokosmos, 18-20 April 2019, New Conference Center of FORTH/ICE-HT, Patra, Greece.

**ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΟ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΕΡΓΟ (ΑΡΘΡΑ)**



## Genetic diversity and phylogeny of indigenous rhizobia nodulating faba bean (*Vicia faba* L.) in Greece

Evdoxia Efstathiadou<sup>a</sup>, Dimitrios Savvas<sup>b</sup>, Anastasia P. Tampakaki<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of General and Agricultural Microbiology, Department of Crop Science, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Votanikos, 11855 Athens, Greece

<sup>b</sup> Laboratory of Vegetable Production, Department of Crop Science, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Votanikos, 11855 Athens, Greece

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 28 April 2020

Received in revised form 19 August 2020

Accepted 19 September 2020

#### Keywords:

*Vicia faba*

MLSA

Rhizobium

Phylogeny

Symbiovar

*Viciae*

### ABSTRACT

The genetic diversity and phylogeny of fast-growing rhizobia isolated from root nodules of *Vicia faba* grown in different geographical regions of Greece were assessed. Although *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae* is the most common symbiont of *Vicia* spp. in European soils, there is no available information on native rhizobia nodulating faba bean in Greece. Seventy bacterial strains were isolated and grouped into sixteen distinct profiles based on BOX-PCR fingerprinting. The phylogenetic affiliation was further defined by sequence analysis of the *rrs* and multilocus sequence analysis (MLSA) of three housekeeping genes (*recA*, *atpD* and *gyrB*). Fifty-eight isolates were affiliated with recently described genospecies *gsF-2*, represented by *R. laguerreae* FB206<sup>T</sup>, whereas six isolates were closely related to *gsB* and two isolates might belong to *gsA*. Two isolates assigned to *R. hidalgonense* and another two non-nodulating strains could not be assigned to any validly defined species and possibly belong to a new rhizobial lineage. Interestingly, *R. laguerreae* strains were commonly found at all sampling sites, suggesting that they could be the main symbionts of faba beans in Greek soils. According to the phylogenies of two symbiosis-related genes (*nodC* and *nifH*), all nodulating isolates belonged to symbiovar (sv.) *viciae* harboring four distinct *nodC* gene haplotypes and they were grouped into two clades together with strains assigned to *R. laguerreae* and genospecies of *R. leguminosarum* isolated from other countries and continents. This is the first report that *R. hidalgonense* strains belong to sv. *viciae*. No correlation was observed between the *nodC* haplotypes, geographic origin and chromosomal background of the isolates in the study.

© 2020 Elsevier GmbH. All rights reserved.

### Introduction

Nitrogen is one of the most limiting nutrients for plant growth, and nitrogen fertilizers have major costs in crop production. Biological nitrogen fixation (BNF) is a key component in sustainable agriculture, since it represents an economic environmentally friendly and renewable nitrogen resource for crops [37]. BNF is a natural process for the conversion of atmospheric N<sub>2</sub> to ammonia (NH<sub>3</sub>) and it can be performed by free-living, associative, endophytic and symbiotic rhizobacteria. The latter are collectively called rhizobia and they form a symbiotic relationship with legumes in which the plant host provides the rhizobia with nutrients, while rhizobia provide the host with fixed atmospheric dinitrogen in the form of ammonia. Notably, estimates of N fixed annually in agricultural systems have shown that symbiotic BNF has the greatest

annual input of fixed N (~60% of the total BNF inputs) into agricultural systems worldwide [19,44]. Estimates of N<sub>2</sub> fixation in experimental and farmers' fields have shown that faba bean and lupin (*Lupinus* spp.) possess the highest capacity for N<sub>2</sub> fixation, followed by soybean and groundnut, winter and summer pulses and common bean [44]. Therefore, the utilization of N<sub>2</sub>-fixing leguminous crops represents a sustainable way to increase BNF input in agrosystems.

In symbiosis, nitrogen fixation takes place in specialized root organs called nodules that are formed by a highly specific process defined as nodulation. Nodulation specificity is genetically determined by both symbiotic partners. Due to this specificity, a subset of rhizobia can establish symbiosis with certain legumes. Based on the range of rhizobia capable of nodulating a particular legume host, some legumes are considered to be restrictive hosts, since they form nodules with a few rhizobial strains, whereas others are more promiscuous hosts and are nodulated by a wide range of rhizobia [45].

\* Corresponding author.

E-mail address: [tampakaki@ua.gr](mailto:tampakaki@ua.gr) (A.P. Tampakaki).

Faba bean is considered to be a restrictive legume host and commonly establishes effective nitrogen fixation symbiosis with genospecies within *Rhizobium leguminosarum sensu lato* (henceforth abbreviated to *Rl*) that are distributed worldwide [6,26]. Previous studies have shown the existence of seven distinct genospecies (gsA, gsB, gsC, gsD, gsE, gsF-1 and gsF-2) within the *Rhizobium* species complex that are not symbiotype specific [6,26]. Similarly, a number of genospecies that nodulate *Phaseolus vulgaris* have been defined and some of them are equivalent to those found in *Vicia* spp. and *Trifolium* spp. [26,64]. Besides faba bean, some *Rl* genospecies also effectively nodulate cultivated and wild legumes of the tribe *Vicieae*, which comprises the genera *Vicia*, *Pisum*, *Lens* and *Lathyrus* [2,24,29,45]. Despite the fact that wild *Vicia* species are more promiscuous in their interaction with microsymbionts than the crop legumes, *Rl* is the predominant species in the nodules of wild species [25,27,29,33,42,61,81][25,27,29,33,42,61,81].

The symbiotype (sv) *viciae* is the sole symbiotype able to establish effective N<sub>2</sub>-fixing symbiosis with *V. faba* [2], even though it could be present in different chromosomal backgrounds [3,13,25,29,33,38,41,56,61,62,66,67,81]. Previous reports have shown that faba bean also establishes effective nitrogen fixation symbiosis with *R. etli* in China, Peru and Egypt [56,57,61], *R. fabae* in China [9,62], *R. laguerreae* in Algeria, Peru, Spain, and Tunisia [5,6,55,56], *R. mesosinicum* in China [74], *R. anhuiense*, *R. sophorae* and *R. vallis* in China [9,82], the unidentified lineages *Rhizobium* sp. I and II in China [9,74], and *Sinorhizobium/Ensifer meliloti* in Egypt [57].

In European soils, *Rl* is ubiquitous in arable soils and has been isolated from faba bean in Spain, France, Germany, Italy, Serbia, Sweden, and the Czech Republic [6,28,38,41,42,46,49,52,53,63,69,79]. *Rl* isolates have also been found in other crops and wild legumes of the tribe *Vicieae*, such as *Pisum sativum*, *Lens culinaris*, *Lathyrus sativus* and *Vicia* spp. in the UK, Germany, Belgium, Italy, France, Serbia, Czech Republic, Poland, Spain and Sweden [3,4,6,13,23,26,38,41,47,48,51,54,68,69,71].

Even though *Rl* is considered to be the most common symbiotype of *Vicia* spp. worldwide, several lines of evidence have documented that *Rl* indigenous populations are phenotypically and genetically polymorphic and their diversity varies in different legume hosts within the tribe *Vicieae* and across continents [3,6,23,29,30,31,41,55,58]. *Rl* diversity studies have shown the existence of phenotypic and genetic differences between European *Rl* isolates and those from Jordan and China [6,29,33,40,41,56,61,63]. In addition, several lines of evidence have demonstrated that specific *Rl* genotypes show preferences either for different species within the tribe *Vicieae* (*Vicia*, *Pisum*, *Lens* and *Lathyrus*), or for different genotypes within the same legume host species [3,6,8,15,17,21,23,29,41].

Specificity differences within *Rl* strains were recorded in different wild and crop species (faba bean, pea, lentils, vetch and vetchlings) grown in the same soil [17,21,28,29,31,41]. Notably, faba beans were almost exclusively nodulated by *Rl* strains harboring a particular nodulation genotype (*nodD* type *g* or *nodDF-2*) independently of the rhizobial genomic background, while peas and vetches were more promiscuous than faba beans in the selection of nodulation genotypes, but showed preference for particular associations of genomic backgrounds and nod types [29,41]. This nodulation genotype is present in *Rl* strains 248 and 3841, both isolated in the United Kingdom from nodules of *V. faba* and *P. sativum*, respectively [29,41,66].

Moreover, rhizobial strains isolated from nodules of *V. faba* and *P. sativum* growing in Andean and coastal regions of Peru were genetically diverse even though the environmental conditions and/or the host could be responsible for the selection of particular rhizobial genotypes [56]. Notably, distinct preferences of different *V. faba* genotypes for particular *Rl* lineages have been recorded

previously [29,61,74]. Similarly, differences in *Rl* specificity have been reported among different pea lines. *Rl* strains found predominantly in the Middle East and Central Asia (Turkey, Israel and Afghanistan) were capable of nodulating some primitive pea lines from Afghanistan and Iran as well as modern European pea lines. However, European *Rl* strains isolated from cultivated pea plants were unable to nodulate primitive pea lines [34,77,78]. The ability of *Rl* strains to nodulate primitive peas was attributed to the presence of a single gene, *nodX*, located in the *sym* plasmid pRL51 [11]. Depret et al. [14] also found that the ability of particular *Rl* nodulation genotypes to form nodules varied with the pea line and the plant developmental stage. In addition, strain and cultivar effects on nitrogen fixation and nodulation have been reported for different *Rl* strains nodulating lentils, peas and faba beans [1,29,68,76]. Recent pioneering studies confirmed previous findings that differences of partner choice in faba bean- and pea-*Rl* associations were dependent on both legume hosts and *Rl* genotypes [6,7]. Moreover, they showed that competitiveness for nodulation was not associated with BNF efficiency, and genetic determinants linked to *nod* or other symbiosis-related loci can be involved in the differential selection of *Rl* by host plants. Therefore, improvement of biological nitrogen fixation (BNF) by selecting suitable combinations of bacterial strains and legume genotypes will lead to increased productivity and reduced nitrogen (N) fertilizer use.

Therefore, the aim of this study was to isolate and characterize the rhizobial diversity found associated with field-grown faba beans originating from different Greek regions. To our knowledge, there has been no report on the genetic diversity of rhizobia nodulating *V. faba* in Greece, and no data are available concerning the introduction of rhizobial inoculants in the regions analyzed. Thus, all rhizobia isolated from field-grown faba bean nodules were assumed to represent members of the indigenous population. In the present study, the genetic diversity and phylogeny of root nodule bacteria isolated from different local varieties of field-grown *V. faba* in different locations in Greece were assessed.

## Materials and methods

### Nodule and soil sampling

Nodules were collected from local faba bean varieties grown in seven different geographical regions of Greece, namely Athens, Crete, Epirus, Feneos, Imathia, Kythira, and Lefkada (Fig. S1). The sampling sites were located in fields without rhizobial inoculation history. The soil samples were slightly acidic to alkaline, with a pH range of 6.2–8.1.

### Isolation and purification of nodules and rhizobial strains

Four nodules per plant were randomly selected from four plants of each region, and at least three isolates were retained from each nodule. A great number of isolates were non-nodulating bacterial strains that were probably nodule endophytes or contaminants and they were not analyzed further. Finally, a total of 70 rhizobial strains were isolated in pure culture. Standard routine laboratory techniques were applied for the isolation of strains from the nodules, as described by Vincent [72]. Briefly, the nodules were surface disinfected by immersion in 70% ethanol for 60 s and then in a 3–5% (v/v) solution of sodium hypochlorite for 2–4 min, and they were subsequently washed six times with sterile ddH<sub>2</sub>O. Sterilized nodules were crushed in a drop of sterile distilled water. The nodule juice was streaked onto yeast-mannitol agar (YMA) plates [72], which were incubated at 28 °C for 2–5 days. Single colonies were subsequently purified by repeated streaking on YMA medium supplemented with Congo red until pure cultures of the isolates

were obtained. Cultures of pure isolates were maintained in 20% glycerol-YMA broth at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### Nodulation tests

The nodulation capability of each isolate was tested by inoculating seedlings of its original host grown in a greenhouse. Seeds were surface sterilized in 3% sodium hypochlorite for 10 min and rinsed six times. Surface-sterilized seeds were germinated on moist sterile filter paper in the dark at  $22^{\circ}\text{C}$  for 3–4 days and then transferred to 250 mL pots containing vermiculite watered with 0.5X Hoagland nutrient solution without nitrogen [20]. Each seedling was inoculated with 1 mL rhizobial suspension ( $\sim 10^9$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ). Three replicates were performed per isolate and plants were grown in a greenhouse. Unfertilized and uninoculated seedlings were included as negative controls and uninoculated, nitrogen fertilized (5 mM  $\text{KNO}_3$ ) seedlings were used as positive controls. Six weeks after inoculation, one nodule per plant was excised and rhizobia were re-isolated as described above and their identity was confirmed by BOX-PCR fingerprinting. Nodulation capacity was recorded as positive (Nod+) when nodules were present and negative (Nod-) if they were absent. Nitrogen fixation was considered effective when nodules were pink (Fix+) and ineffective if nodules were white (Fix-). Authenticated isolates were stored as above at  $-80^{\circ}\text{C}$  for long-term storage.

#### DNA isolation and BOX-PCR fingerprinting

Total template DNA was extracted from each isolate using the PureLink™ Genomic DNA kit (Thermo Fisher Scientific), according to the manufacturer's instructions. BOX-PCR fingerprint analysis was performed by using the BOX A1R primer [70] (Table S1). PCR reactions were undertaken in a final volume of 25  $\mu\text{L}$  containing 100 ng of genomic template DNA, 1X reaction buffer (75 mM Tris-HCl pH 8.8, 20 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.01% Tween 20, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ), 0.2 mM dNTPs, 2.5 U DreamTaq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific), and 50 pmol of primer. The PCR conditions were initial denaturation at  $94^{\circ}\text{C}$  for 7 min, 30 cycles of denaturation at  $94^{\circ}\text{C}$  for 1 min, annealing at  $50^{\circ}\text{C}$  for 1 min, and extension at  $65^{\circ}\text{C}$  for 8 min. PCR reactions were terminated by a final extension at  $65^{\circ}\text{C}$  for 16 min. All PCR products were separated by electrophoresis in 1.5% agarose gels containing  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ethidium bromide at 60 V for 3.0 h. A molecular marker 1 kb DNA Ladder (Invitrogen) was included on the left-hand side. The gels were scanned with the GelDoc system (Bio-Rad, Hercules, CA). Cluster analysis was performed using the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) and the Dice coefficient by Gelj (v. 2.0) software [18].

#### PCR amplification and sequencing

Fragments of genes located either within or outside the symbiosis island were selected for amplification. The DNA fragments of 16S rRNA, *recA* (DNA recombination protein), *atpD* (ATP synthase subunit beta) and *gyrB* (DNA gyrase B) were amplified by PCR, using the primer pairs described in Table S1. Primers taken from the literature or designed in the present study were slightly modified in such a way as to include at their 5' ends either the T7 or SP6 primer sequence to facilitate direct sequencing of the amplicons. Each PCR mixture contained approximately 50 ng genomic DNA, 20 pmol of each primer, 200  $\mu\text{M}$  dNTPs (Invitrogen), Phusion High Fidelity DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific), and the respective 10X polymerase buffer in a final reaction volume of 50  $\mu\text{L}$ . The PCR conditions for the amplification of each gene fragment are described in Table S1. PCR products from the aforementioned genes were purified using the PureLink™ Quick Gel Extraction kit (Thermo

Fisher Scientific). Purified DNA fragments were directly sequenced on both strands using the standard primers attached to the corresponding primer sequences. All PCR products were commercially sequenced by CeMIA (cemia.eu), Greece.

#### Phylogenetic analyses

The sequences of *rrs* genes were compared with those of bacterial type strains using the EzTaxon-e server (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net>). BLAST searches were undertaken on the National Center for Biotechnology Information (NCBI) server using BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Sequences from closely related type strains, as listed on the List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (LPSN) ([www.bacterio.net](http://www.bacterio.net)), and reference strains were retrieved for phylogenetic analyses from the GenBank/EMBL database (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/nucleotide.html>). For pairwise distance matrixes, the multiple sequence alignments were performed using the algorithm CLUSTAL Omega (<https://www.ebi.ac.uk/tools/msa/clustalo/>) provided by the European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI). For phylogenetic analyses, the partial gene sequences obtained in this study, together with sequences retrieved from GenBank were aligned using the CLUSTAL W software in the MEGA 6.0 software package [60]. Phylogenetic trees were constructed using either the neighbor-joining (NJ) or maximum likelihood (ML) methods in the MEGA 6.0 software package. The gene sequences were appropriately trimmed and concatenated. The best-fit models of nucleotide substitution were determined in MEGA 6 and the most appropriate were selected for the construction of ML trees as detailed in the figure legends.

#### Nucleotide sequence accession numbers

All sequences from faba bean isolates were deposited in the GenBank database and the accession numbers are listed in Table S2.

## Results and discussion

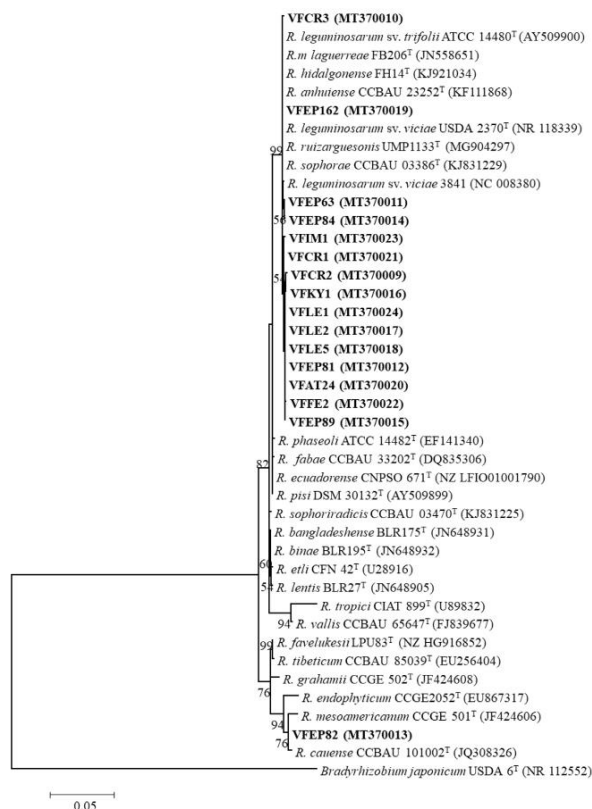
#### Isolated strains and BOX fingerprinting

A total of 70 bacterial strains were isolated from root nodules of local faba bean varieties grown in seven different regions located on the mainland (Athens, Epirus, Feneos, Imathia) and islands (Crete, Kythira, and Lefkada) of Greece. Strains were named "VF", representing the host *V. faba* (VF), followed by two letters representing the region of isolation. Strains isolated from Athens, Crete, Epirus, Feneos, Imathia, Kythira, and Lefkada, were named either "AT", or "CR", or "EP", or "FE", or "IM", or "KY", or "LE", respectively. All isolates were fast growing, acid-producing bacteria and were able to re-infect their original host, except one, and they formed effective pink-red coloured nodules (Nod+/Fix+).

The genetic diversity of the isolates was analyzed by BOX-PCR fingerprinting, which is a technique commonly applied to the genetic diversity analysis of closely related rhizobial strains [12]. In rhizobial diversity studies, strains displaying the same fingerprinting patterns usually have similar or identical housekeeping genes [38,65]. In this current study, the strains showed 16 distinct BOX-PCR profiles (Fig. S2), and strains with identical fingerprint patterns were considered as clonal isolates. Representative strains of each profile were chosen for further phylogenetic analysis.

#### 16S rRNA gene analysis

The analysis of the *rrs* (16S rRNA) gene is currently used to classify rhizobial species at the genus level, since several type strains



**Fig. 1.** Maximum likelihood phylogenetic tree based on nearly complete 16S rRNA gene sequences (1303 bp) showing the taxonomic relationships of the strains representing the different BOX groups. Strains isolated in the present study are shown in boldface and type strains are indicated by a superscript "T". GenBank accession numbers of the rrs sequences are indicated within parentheses. Bootstrap values (greater than 50%) were calculated for 500 replications and are shown at the nodes. The scale bar shows the number of nucleotide substitutions per site. Phylogenetic analysis was conducted in MEGA 6 using the maximum likelihood algorithm with the Tamura 3-parameter model plus Gamma rate distribution plus invariant site (T92 + G + I). *B. japonicum* USDA 6<sup>T</sup> was used as an outgroup to root the tree. The genus names are abbreviated as follows: *R.*, *Rhizobium*.

of *Rhizobium* have highly similar or identical rrs sequences [39,55]. According to the BOX fingerprinting results, 16 isolates representing different BOX profiles were chosen for further phylogenetic analysis. Nearly full-length rrs gene sequences (~1400 bp) were determined for all representative isolates and a region of 1303 bp was considered for the alignment. The 16S rRNA gene phylogenetic trees showed that all isolates were closely related to defined species within the genus *Rhizobium* (Fig. 1).

In the present study, most strains isolated from faba bean nodules had closely related rrs sequences (>99.7%) and they were grouped within the phylogenetic group containing *Rhizobium anhuiense* CCBAU 23252<sup>T</sup>, *Rhizobium hidalgonense* FH14<sup>T</sup>, *Rhizobium laguerreae* FB206<sup>T</sup>, *Rlv* USDA 2370<sup>T</sup>, *Rhizobium ruizarguesonis* UMP1133<sup>T</sup>, *Rhizobium sophorae* CCBAU 03386<sup>T</sup>, and *Rhizobium trifolii* ATCC 14480<sup>T</sup>. The isolates had the highest sequence similarity to the aforementioned type strains (99.8–100%). It was noteworthy that *R. anhuiense* CCBAU 23252<sup>T</sup>, *R. hidalgonense* FH14<sup>T</sup>, *R.*

*laguerreae* FB206<sup>T</sup>, *Rlv* USDA 2370<sup>T</sup>, *R. ruizarguesonis* UMP1133<sup>T</sup> and *R. sophorae* CCBAU 03386<sup>T</sup> displayed identical rrs sequences, which was consistent with previous reports [22,24,55,75]. The isolate VFEP82 formed a distinct cluster with *Rhizobium cauense* CCBAU 101002<sup>T</sup>, which was originally isolated from the herbaceous legume *Kummerowia stipulacea* in China [35], and they showed a 99.77% rrs similarity. The analysis of the rrs gene could not assign the studied strains at the species level, which was in agreement with the general view that the rrs gene is an insufficient phylogenetic marker for species delineation [16].

#### MLSA

MLSA is widely used for defining *Rhizobium* species and it is a reliable, cost-effective method that is highly correlated in many cases with genomic comparison of strains based on average nucleotide identity (ANI) values. Previous studies have shown

that the 95% ANI threshold for species definition corresponds to 97.36% similarity in MLSA based on analysis of three housekeeping genes [64]. However, it is not possible to define a universal threshold in MLSA for discrimination of *Rhizobium* genospecies, since this could be differentiated depending on the number and type of the species and genes analyzed. Even though phylogeny based on three core genes is not as reliable as whole genome ANI, ML analysis of a few genes can still provide an indication of the taxonomic status of rhizobial strains.

In the present study, the phylogenetic affiliations were investigated further with the analysis of the housekeeping genes *recA*, *atpD*, and *gyrB*, which have been widely used to differentiate defined rhizobial species. Partial fragments of *recA*, *atpD*, and *gyrB* were amplified and sequenced from all representative isolates. Sequences of the corresponding housekeeping genes from currently described type strains of *Rhizobium*, if available, were retrieved from GenBank and they were trimmed appropriately. However, the sequence availability in GenBank determined both the number of type strains and taxa included in the analysis, as well as the length of the nucleotide alignments. Hence, the lengths of the alignments used were 462 bp, 441 bp, and 594 bp for *recA*, *atpD*, and *gyrB*, respectively. Concatenated sequences of the three housekeeping genes resulted in a 1497 bp alignment. Phylogenetic trees based on three individual housekeeping genes were constructed (Figs S3–S5). Phylogenetic trees based on individual and concatenated housekeeping gene sequences were also constructed and they grouped the test strains into well-supported clusters containing *Rhizobium* type strains. To determine the relationship of the strains to the previously defined genospecies, the phylogenetic trees also included representatives of the seven genospecies and two strains (CZP3G4 and SEF4G12) with tentative affiliation [6,26]. In general, the individual gene phylogenies were congruent with that of the concatenated gene tree. In the MLSA phylogeny, nearly all test strains, except for VFEP162 and VFEP82, formed a wide cluster containing the type strains *R. laguerreae* FB206<sup>T</sup>, *R. leguminosarum* s.v. *viciae* (*Rlv*) USDA 2370<sup>T</sup>, *R. ruizarguesonis* UPM1133<sup>T</sup>, *R. sophorae* CCB AU 03386<sup>T</sup> and genospecies of the *Rhizobium* species complex. In particular, five different genotypes found in forty isolates (Tables S3 and S4), which were represented by VF CR1, VFLE1, VFAT24, VFEE2 and VFIM1 (Clade 1), were placed in a tight cluster containing strains of genospecies gsF-2 and they showed phylogenetic affiliation to *Rhizobium laguerreae* FB206<sup>T</sup> with similarity values of 100%, 99.73%, 99.27%, 99.87% and 98.66%, respectively. The strains in Clade 1 were assigned as *R. laguerreae* based on their high relatedness to the latter and their position in the ML tree.

Clade 2 contained eighteen isolates, which were represented by VFLE2, VFLE5, VFEP81, VFEP89, VF KY1, and VF CR3 (Tables S3 and S4), and they showed highest similarity to *R. laguerreae* FB206<sup>T</sup> (96.13–96.93%), as well as strains belonging to gsF-2, such as *Rlv* 248 (96.6–99.1%) and WSM1689 (97.06–97.46%). Interestingly, strains of gsF-2 were divided into two clades in the phylogenetic tree, as shown in Fig. 2. This phylogenetic separation could be attributed either to the misassignment of some strains to gsF-2 or to the low resolution of MLSA for genospecies discrimination. It is worth noting that strains WSM1689 and *Rlv* 248, assigned to gsF-2 by Boivin et al. [6], displayed genomic similarities with *R. laguerreae* FB206<sup>T</sup> slightly above the ANI threshold of 95% (~95.3%), which raises the possibility of whether these strains constituted members of an as yet undescribed genospecies. Moreover, the discrimination of five genospecies within the *Rhizobium* species complex was not feasible based on *recA-atpD-gyrB* concatenated sequences, except for gsC and gsE, as shown by their position in the phylogenetic tree and the low bootstrap support. Altogether, these findings suggested that the isolates of Clade 1 possibly belonged to gsF-2, represented by the type strain *R. laguerreae* FB206<sup>T</sup> [6], while those of Clade 2 could be assigned to the same genospecies, albeit with some caution. Tak-

ing into account the ambiguity of genospecies discrimination by MLSA and the uncertain definition of the new genospecies gsF-2, the taxonomic status of our isolates will need further clarification by genome analysis.

Clade 3 contained six isolates that were represented by strains VFEP63 and VFEP84 (Tables S3 and S4). The latter were closely related to strains WSM1455 and WSM1481, which were isolated previously from *V. faba* and *P. sativum* nodules, respectively, in the Cyclades islands of Greece (Figs. 2 and S6). The *recA-atpD-gyrB* concatenated sequences of VFEP63 and WSM1455 were identical, while those of VFEP84 and WSM1481 shared 99.8% identity. Based on genome analysis, strains WSM1455 and WSM1481 have been allocated to gsB, which is equivalent to *Rhizobium* sp. IX, as reported previously [6,10,26,64]. It is worth noting that the latter two strains were placed on nearby branches from the others affiliated to gsB in the phylogenetic tree (Fig. 2), which was in agreement with their phylogenetic position based on genomic data [6]. These results, together with the low genomic similarity (~96%) of WSM1455 and WSM1481, compared with those belonging to gsB, rendered an uncertain assignment of WSM1455 and WSM1481, as well as that of VFEP63 and VFEP84, within gsB.

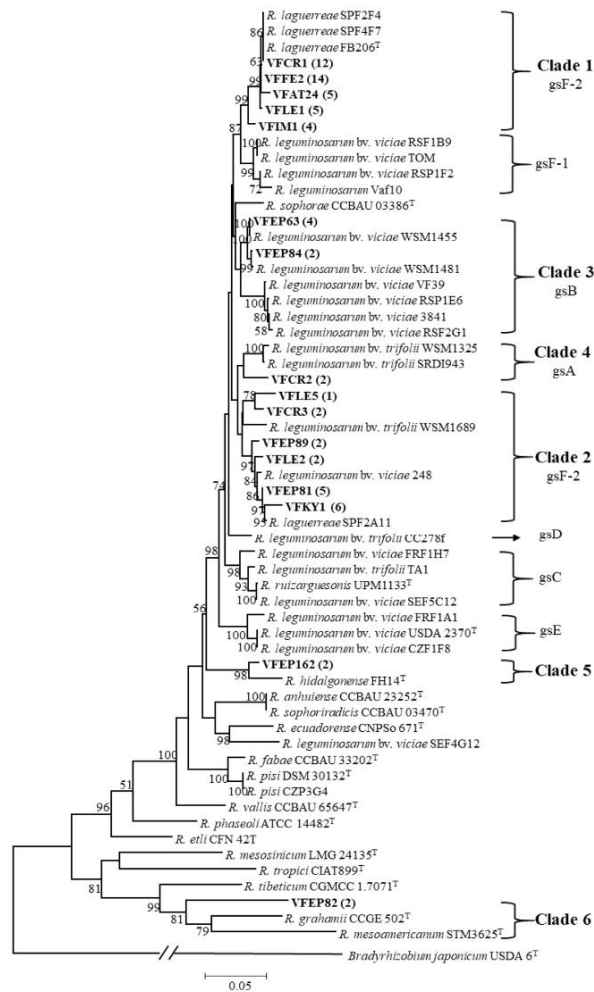
Clade 4 harbored two isolates and was represented by VF CR2 (Tables S3 and S4) that grouped together with strains belonging to gsA, such as SRDI943 (97%) and WSM1325 (96.73%), and showed the highest similarity to the type strain *R. ruizarguesonis* UPM1133<sup>T</sup> (96.66%). It was noteworthy that VF CR2 showed similar levels of gene identities with strains SPF2A11 (97.06%), *Rlv* 248 (96.8%) and WSM1689 (97.06%) belonging to gsF-2. These results, together with the position of VF CR2 in the phylogenetic tree, did not allow us to define its affiliation to any defined *Rhizobium* genospecies with any certainty.

It was also noteworthy that individual analyses of the test genes showed that the isolates of clades 2, 3 and 4 harbored mixed chromosomal sequences of the type strains *R. laguerreae*, *R. ruizarguesonis* and *Rlv* USDA 2370<sup>T</sup> (Table S3). For example, the *recA* and *atpD* genes of strains VFLE5 and VF CR3 were more similar to those of *R. ruizarguesonis* (96.54–97.19%) and *R. laguerreae* (96.6–98.87%), respectively (Table S3). The *recA*, *atpD* and *gyrB* genes of VFEP63 were most similar to *R. ruizarguesonis* (99.13%), *R. laguerreae* (97.73%) and *Rlv* USDA 2370<sup>T</sup> (97.14%), respectively. However, these results were incongruent with the ambiguous position of the isolates in the phylogenetic trees, which was not supported by strong bootstrap values. Therefore, it was not possible to suggest horizontal transfer and recombination of the chromosomal loci among rhizobial strains, as previously reported for *Rl* and *R. laguerreae* strains nodulating *V. faba* and other *Vicia* spp. [59,63,71]. Moreover, the affiliation of the isolates in clades 2, 3 and 4 to defined genospecies should be considered with caution until genome analysis clarifies their taxonomic status with certainty.

Clade 5 contained two isolates represented by VFEP162, which formed a distinct clade that grouped together with *R. hidalgonense* FH14<sup>T</sup> with a similarity of 97.13% (Fig. 2, Tables S3 and S4). Strain FH14 was originally isolated from nodules of *Phaseolus vulgaris* in Mexico and it belonged to s.v. *phaseoli* [75]. To date, no strains belonging to *R. hidalgonense* capable of nodulating faba bean have been found. A similar case was reported in China with a *R. vallis* strain isolated from the nodules of *Phaseolus vulgaris* that belonged to s.v. *phaseoli* [73], while another *R. vallis* strain was able to nodulate faba bean and it belonged to s.v. *viciae* [9]. It is possible that VFEP162 could have acquired the symbiosis genes from local strains through lateral gene transfer. To the best of our knowledge, this is the first record of the existence of s.v. *viciae* in *R. hidalgonense* strains.

Lastly, Clade 6 contained two isolates represented by VFEP82 that showed highest similarity (90.58%) to *R. grahamii* CCGE 502<sup>T</sup> isolated from *Dalea leporina* nodules in Mexico [36]. Although the *rrs* gene of VFEP82 was highly similar to *R. caeuense* CCB AU 101002<sup>T</sup>,



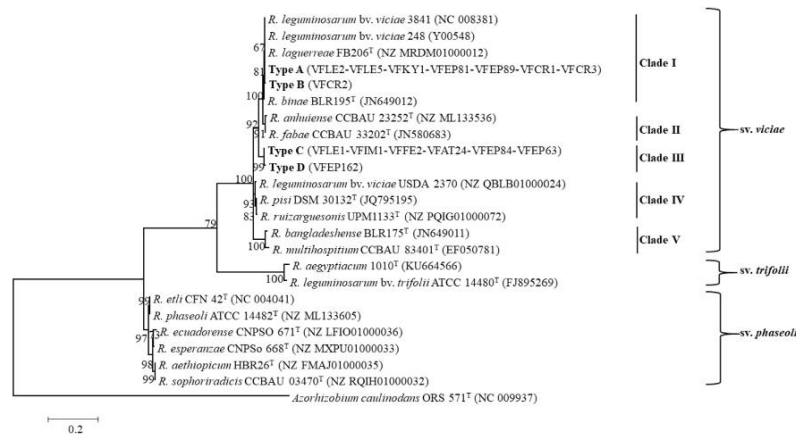


**Fig. 2.** Maximum likelihood phylogenetic tree based on partial concatenated sequences of *recA*, *atpD* and *gyrB* (with a total of 1497 positions) showing the taxonomic relationships of the studied strains, representative related type strains and genospecies of the *Rhizobium* species complex. Strains isolated in the present study are shown in boldface and type strains are indicated by a superscript “<sup>T</sup>”. The number of isolates belonging to the same BOX-PCR type are indicated within parentheses. GenBank accession numbers of the sequences are given in Figs. S3-S5 and Table S2. Bootstrap values (greater than 50%) were calculated for 500 replications and are shown at the nodes. The scale bar shows the number of nucleotide substitutions per site. Phylogenetic analysis was conducted in MEGA 6 using the maximum likelihood algorithm with the General Time Reversible model plus Gamma rate distribution plus invariant site (GTR+G+I). The genus names are abbreviated as follows: *R.*, *Rhizobium*.

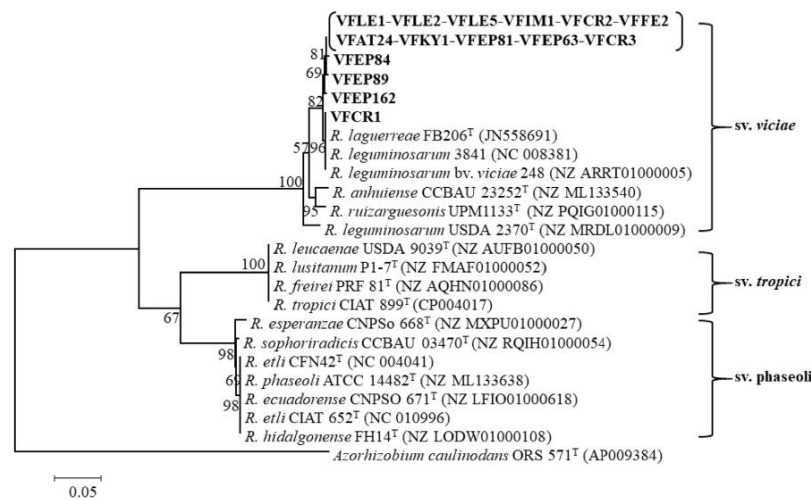
the latter strain was not included in the phylogeny of the concatenated housekeeping genes, since the *gyrB* gene was not available in GenBank. Nevertheless, *recA-atpD* analysis showed similar results with VFEP82 displaying 91.05% and 90.5% similarity values in the *recA-atpD* concatenated sequences to those of *R. grahamii* CCGE 502<sup>T</sup> and *R. cauense* CCBAU 101002<sup>T</sup>, respectively. These results suggested that VFEP82 might constitute a novel *Rhizobium* species or lineage.

*Rhizobium* strains isolated from legumes of tribe *Viciae* in various countries in previous studies were compared to our strains and the closest ones were chosen for the analyses. However, *gyrB* sequences were not available in the database for certain strains and a concatenated tree based on *recA-atpD* was constructed in order to compare the strains (Fig. S6). Strains in Clade 1 grouped with *Rhizobium* strains isolated from *V. faba* and *L. culinaris* in African, American, Asian and European countries. The high frequency of

(A)



(B)



**Fig. 3.** Maximum likelihood phylogenetic trees based on 543-bp and 726-bp alignment of the *nodC* (A) and *nifH* (B) nucleotide sequences, respectively. The taxonomic relationships of the studied strains and the closest type strains of *Rhizobium* species are shown. Strains isolated in the present study (boldface) with identical *nodC* or *nifH* sequences are shown in the same branch, their names are indicated in brackets and accession numbers are given in Table S2. Type strains are indicated by a superscript "T" and the GenBank accession numbers of their sequences are indicated within parentheses. Bootstrap values (greater than 50%) were calculated for 500 replications and are shown at the nodes. The scale bar shows the number of nucleotide substitutions per site. Phylogenetic analysis was conducted in MEGA 6 using the maximum likelihood algorithm with the Tamura 3-parameter model plus Gamma rate distribution plus invariant site (T92 + G + I). The genus names are abbreviated as follows: *R.*, *Rhizobium*.

*R. laguerreae* isolates belonging to genospecies gsF-2 in our samples originating from different regions of Greece suggested that *R. laguerreae* is possibly the predominant symbiont of faba bean in Greece. Strains of Clade 2 clustered with strains isolated from *V. faba* and *L. culinaris* in Africa, Asia and Europe, while Clade 3 also

comprised strains isolated previously from *V. faba* in Greece and China. Strain VFCR2 was closely related to strains isolated from *Vicia* species in Spain, while strain VFEP162 clustered together with common bean nodulating strains isolated from Africa, Asia and Europe.

Lastly, the closest relative of VFEP82 was *R. grahamii* BG7 isolated from *Prosopis cineraria* nodules.

The distribution of the isolates in different regions of Greece did not show any correlation with the edaphic parameters or host genotypes tested. Isolates of clades 1 and 2, possibly belonging to gsF-2, were found in all regions with different soil textures and a pH ranging from 6.2 to 7.7 (Fig. S1 and Table S4). Interestingly, isolates of gsF-2 were either exclusively isolated from certain regions (Athens, Feneos, Imathia, Lefkada, and Kythira) or were predominant in others (Crete and Epirus). Even though isolates of clades 3, 4, 5, and 6 were found only in one region, these results could not rule out the occurrence of similar isolates in other regions if more isolates are analyzed or a metagenomic approach is applied. Moreover, the host genotypes might not affect the rhizobial diversity in the sampling sites in this study, since different local plant cultivars were used. Therefore, further studies are needed to define the factors affecting the distribution of various genospecies and the high frequency of gsF-2 in Greek soils.

#### Phylogenetic analysis of the symbiosis genes *nodC* and *nifH*

The *nodC* gene is widely used as a symbiosis marker in the analysis of the nodulating rhizobia and it is related to the host range of rhizobia and the promiscuity degree of the hosts [3,32,43,50]. The symbiolar *viciae* is the only one capable of nodulating *V. faba* and other legumes of the tribe *Vicieae* and it is clearly separated from symbiolar *phaseoli* and *trifolii* with similarity values lower than 80%. Within sv. *viciae*, *nodC* genes from strains all over the world share similarities of higher than 90%, thus supporting their common phylogenetic origin. Previous studies have shown that *nodC* sequences from strains belonging to the *Vicia* cross-inoculation group in different countries and continents display a high degree of diversification. To date, eight type strains belonging to sv. *viciae* carry seven distinct *nodC* gene haplotypes, which are distributed into the four robust phylogenetic clades I, II, IV and V (Fig. 3A) in agreement with previous studies [5,59,71,80].

Based on partial *nodC* sequences (543 bp), four *nodC* gene haplotypes (A–D) were defined among the isolates that corresponded to sv. *viciae* and they were classified into two highly bootstrapped clades, I and III (Fig. 3). Two *nodC* gene haplotypes, A and B, distributed into eight strains (VFLE2, VFLE5, VFY1, VFEP81, VFEP89, VFCR1, VFCR2, VFCR3) were grouped into Clade I together with those from *R. laguerreae* FB206<sup>T</sup>, *R. binae* BLR195<sup>T</sup>, *Rlv* 3841 and *Rlv* 248 with similarity values higher than 99.8%. Haplotype A was identical to those of *R. laguerreae* FB206<sup>T</sup>, *Rlv* 3841 and *Rlv* 248. Clade I had *nodC* similarity values ranging from 97.97% to 98.9%, 95.95 to 96.13%, 95.21 to 95.76%, and 90.79 to 91.53% with clades II, III, IV and V, respectively. Two *nodC* gene haplotypes, C and D, found in seven strains (VFLE1-VFIM1-VFEE2-VFAT24-VFEP84-VFEP63, VFEP162) were grouped into Clade III with similarity values higher than 99.6%. The *nodC* haplotypes of Clade III had similarity values ranging from 91.16 to 91.71%, 94.66 to 95.4% and 91.71 to 92.27% with those in clades II, IV and V, respectively. Interestingly, *nodC* haplotype A (Clade I) found in *R. laguerreae* FB206<sup>T</sup> was identical to those found in isolates assigned to genospecies gsF-2 (clades 1 and 2, Fig. 2). On the other hand, the *nodC* haplotype C (Clade III) was present in the isolates affiliated to genospecies gsF-2 and gsB (clades 1 and 3, Fig. 2). These results showed that the strains with a different chromosomal background carried different symbiotic genotypes and the same *nodC* haplotype could be found in different genospecies, as also previously demonstrated [6,26]. Moreover, VFEP162, assigned as *R. hidalgonense*, had a distinct *nodC* haplotype compared to the others. It was also noteworthy that no *nodC* or *nifH* gene sequences were amplified from isolate VFEP82 using the primer pairs and the procedures described in Table S1.

Furthermore, VFEP82 did not form nodules on its original host, suggesting that it might be a non-symbiotic bacterium of *V. faba*.

A comparison of the *nodC* gene haplotypes found in the strains of the present study and those in other countries is shown in Fig. S7. Haplotype A (Clade I) was found in strains isolated from *Vicia*, *Pisum* and *Lens* in Europe, Asia, Africa and America, while haplotype B (Clade I) was identical to those found in *V. faba* rhizobia isolated previously from Greece and Algeria. Clade III consisted of two subclades (IIIa and IIIb) with 98% similarity. Although no type strains were found within Clade III, several strains isolated from *Vicia*, *Pisum*, *Lens* and *Lathyrus* in various countries of Europe, Asia, Africa and America belonged to this clade (Fig. S7). Interestingly, the *nodC* haplotypes C and D were identical to those present in *V. faba* rhizobia isolated in Morocco and Algeria, respectively. Moreover, they were closely related (99.45–99.82%) to those found in European strains GU-2.2, RVS11 and FRPE11 isolated from *V. sativa* and *P. sativum*. The second subclade (IIIb) involved several strains isolated in Europe, Asia, Africa and America from various legumes of the tribe *Vicieae*, such as *Vicia*, *Pisum*, *Lens*, *Lathyrus* and *Lablab*. Interestingly, strains VFEP63 and VFEP84 isolated from *V. faba* nodules in this study harbored the *nodC* type C classified in Clade III, whilst the closest relatives WSM1455 and WSM1481, isolated in Greece many years ago, carried the *nodC* type B classified in Clade I. These results and previous findings showed that different *nodC* types could exist in the same chromosomal background and they also provided evidence for possible acquisition of symbiosis genes through horizontal gene transfer among local rhizobial populations over the years. Both clades, I and III, included isolates assigned as *R. leguminosarum* or *R. laguerreae* or unidentified genospecies, indicating that strains with various chromosomal backgrounds did not show a preference for a certain *nodC* type, as also previously reported [59,71]. Collectively, our results and those from other studies showed that symbiolar *viciae* involved strains with highly polymorphic *nodC* genes regardless of the chromosomal background, geographic region or legume host.

The phylogenetic analysis based on *nifH* sequences confirmed the *nodC* phylogeny and the classification of the isolates within symbiolar *viciae* (Fig. 3B). Partial *nifH* sequences (726 bp) of the isolates clustered within symbiolar *viciae* and they displayed similarities with a range of 99.45–100% compared to those of *R. laguerreae* FB206<sup>T</sup>, *R. leguminosarum* sv. *viciae* 3841 and *R. leguminosarum* sv. *viciae* 248. Nearly all isolates had identical *nifH* sequences with a similarity of 99.45% to that of *R. laguerreae* FB206<sup>T</sup> represented by VFLE1 in the tree, while those from isolates VFEP162 and VFCR1 had 99.72% and 99.45% similarities, respectively, to the others.

#### Conclusions

The vast majority of isolates obtained in the present study belonged to genospecies gsF-2, represented by the type strain of *R. laguerreae*, while only a few isolates were related to genospecies gsA and gsB [26,64]. A single isolate was assigned to *R. hidalgonense*, while another non-nodulating rhizobial isolate could not be assigned to any validly described species and it might constitute a novel rhizobial lineage. In European soils, *Rl* is the most common symbiont of *Vicia* spp., while *R. laguerreae* has been previously recorded in *V. sativa* and *V. faba* nodules in Spain [3,6,55]. *R. laguerreae* was commonly found across different geographical regions of Greece, suggesting that it is possibly the main symbiont of faba bean at the sampling sites in the present study. No correlation was found between rhizobial diversity and relative abundance with host genotypes and soil characteristics. Two main *nodC* types (A and C), also found in other European countries, were associated with the rhizobial strains isolated from faba bean nodules. To the

best of our knowledge, this is the first report that *R. hidalgonense* strains belonged to sv. *viciae*. No correlation was observed between the *nodC* haplotypes, geographic origin and chromosomal background of the isolates, which confirmed the previous findings that sv. *viciae* involves strains with highly diversified *nodC* genes regardless of the chromosomal background, the geographic region or the legume host. The results were consistent with previous findings showing that strains with similar chromosomal backgrounds are present in different countries and continents, further supporting the successful intercontinental spread and establishment of rhizobia into different ecoregions with seeds or other human activities [3,4,26,71].

#### Author contributions

EE performed the experiments, APT, EE, and DS participated in collecting faba bean nodules, APT conceived and designed the experiments, analyzed the data and wrote the paper. All authors have read and approved the manuscript.

#### Acknowledgements

This research was funded by European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 727929, project "TOMRES-A novel and integrated approach to increase multiple combined stress tolerance in plants using tomato as a model" and the Hellenic Foundation for Research and Innovation (HFRI) under the HFRI PhD Fellowship grant (Fellowship Number: 957).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126149>.

#### References

- Abi-Ghanem, R., Carpenter-Boggs, L., Smith, J.L. (2011) Cultivar effects on nitrogen fixation in peas and lentils. *Biol. Fertil. Soils* 47, 115–120.
- Allen, O.N., Allen, E.K. 1981 *The Leguminosae—A Book of Characteristics, Uses and Nodulation*, Macmillan, London.
- Akvarez-Martinez, E.R., Valverde, A., Ramírez-Bahena, M.H., García-Fraile, P., Tejedor, C., Mateos, P.F., Santillana, N., Zúñiga, D., Peix, A., Velázquez, E. (2009) The analysis of core and symbiotic genes of rhizobia nodulating *Vicia* from different continents reveals their common phylogenetic origin and suggests the distribution of *Rhizobium leguminosarum* strains together with *Vicia* seeds. *Arch. Microbiol.* 191, 659–668.
- Ampomah, O.Y., Huss-Danell, K. (2016) Genetic diversity of rhizobia nodulating native *Vicia* spp. in Sweden. *Syst. Appl. Microbiol.* 39, 203–210.
- Belhadi, D., de Lajudie, P., Ramdani, N., Le Roux, C., Boulija, F., Tisseyre, P., Boulija, A., Benguedouar, A., Kaci, Y., Laguerre, G. (2018) *Vicia faba* L. in the Bejaia region of Algeria is nodulated by *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae*, *Rhizobium laguerreae* and two new genospecies. *Syst. Appl. Microbiol.* 41, 122–130.
- Boivin, S., Lahmidi, N.A., Sherlock, D., Bonhomme, M., Dijon, D., Heulin-Gotty, K., et al. (2020) Host-specific competitiveness to form nodules in *Rhizobium leguminosarum* symbiovar *viciae*. *New Phytol.* 226, 555–568.
- Bourion, V., Heulin-Gotty, K., Aubert, V., Tisseyre, P., Chabert-Martinello, M., Pervent, M., Delaire, C., Vile, D., Siol, M., Duc, G., et al. (2018) Co-inoculation of a pea core-collection with diverse rhizobial strains shows competitiveness for nodulation and efficiency of nitrogen fixation are distinct traits in the interaction. *Front. Plant Sci.* 8, 2249.
- Cavassani, M.I.A., Moeskjær, S., Moslemi, C., Fields, B., Bachmann, A., Vilhjalmsón, B.J., et al. (2020) Symbiosis genes show a unique pattern of introgression and selection within a *Rhizobium leguminosarum* species complex. *Microb. Genom* 6 (4), e000351.
- Chen, Y.X., Zou, L., Penttinen, P., Chen, Q., Li, Q.Q., Wang, C.Q., Xu, K.W. (2018) Faba Bean (*Vicia faba* L.) nodulating rhizobia in Panxi, China, are diverse at species, plant growth promoting ability, and symbiosis related gene levels. *Front. Microbiol.* 20, 1338.
- Chirak, E.R., Kimeklis, A.K., Karasev, E.S., Kopat, V.V., Safronova, V.I., Belimov, A.A., Aksenova, T.S., Kabilov, M.R., Provorov, N.A., Andronov, E.E. (2019) Search for ancestral features in genomes of *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae* strains isolated from the relict legume *Vavilovia formosa*. *Genes* 10 (12), pii: E990.
- Davis, E.O., Evans, I.J., Johnston, A.W.B. (1988) Identification of *nodX*, a gene that allows the *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* strain TOM to nodulate Afghanistan peas. *Mol. Gen. Genet.* 212, 531–535.
- de Lajudie, P.M., Andrews, M., Ardley, J., Eardly, B., Jumas-Bilak, E., Kuzmanović, N., et al. (2019) Minimal standards for the description of new genera and species of rhizobia and agrobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 69, 1852–1863.
- De Meyer, S.E., van Hoorde, K., Vekeman, B., Braeckman, T., Willems, A. (2011) Genetic diversity of rhizobia associated with indigenous legumes in different regions of Flanders (Belgium). *Soil Biol. Biochem.* 43, 2384–2396.
- Depret, G., Houot, S., Allard, M.R., Breuil, M.C., Nouaim, R., Laguerre, G. (2004) Long-term effects of crop management on *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations. *FEMS Microbiol. Ecol.* 27, 87–97.
- Evans, J., Gregory, A., Dobrowolski, N., Morris, S.G., O'Conner, G.E., Wallace, C. (1996) Nodulation of field-grown *Pisum sativum* and *Vicia faba*: competitiveness of inoculant strains of *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae* determined by an indirect, competitive ELISA method. *Soil Biol. Biochem.* 28, 247–255.
- Gevers, D., Cohan, F.M., Lawrence, J.G., Spratt, B.G., Coenye, T., Feil, E.J., Stackebrandt, E., Van de Peer, Y., Vandamme, P., Thompson, F.L., Swings, J. (2005) Re-evaluating prokaryotic species. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 733–739.
- Handley, B.A., Hedges, A.J., Beringer, J.E. (1998) Importance of host plants for detecting the population diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* in soil. *Soil Biol. Biochem.* 30, 241–249.
- Heras, J., Dominguez, C., Mata, E., Pascual, V., Lozano, C., Torres, C., Zarazaga, M. (2015) Gelf—a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC Bioinf.* 16, 1–8.
- Herridge, D.F., Peoples, M.B., Boddey, R.M. (2008) Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil* 311, 1–18.
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I. 1950 *The Water-Culture Method for Growing Plants Without Soil*, University of California College of Agriculture, California Agricultural Experiment Station, Berkeley, California, Circular-347, 32 pp.
- Hynes, M.F., O'Connell, M.P.O. (1990) Host plant effect on competition among strains of *Rhizobium leguminosarum*. *Can. J. Microbiol.* 36, 864–869.
- Jiao, Y.S., Yan, H., Ji, Z.J., Liu, Y.H., Sui, X.H., Wang, E.T., Guo, B.L., Chen, W.X., Chen, W.F. (2015) *Rhizobium sophorae* sp. nov. and *Rhizobium sophoradicis* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of the medicinal legume *Sophora flavescens*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 497–503.
- Jorin, B., Imperial, J. (2015) Population genomics analysis of legume host preference for specific rhizobial genotypes in the *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae* symbioses. *Mol. Plant Microbe Interact.* 28, 310–318.
- Jorin, B., Palacios, J.M., Peix, A., Imperial, J. (2020) *Rhizobium nutzarguensis* sp. nov., isolated from nodules of *Pisum sativum* L. *Syst. Appl. Microbiol.* 43, 126090.
- Kan, F.L., Chen, Z.Y., Wang, E.T., Tian, C.F., Sui, X.H., Chen, W.X. (2007) Characterization of symbiotic and endophytic bacteria isolated from root nodules of herbaceous legumes grown in Qinghai-Tibet plateau and in other zones of China. *Arch. Microbiol.* 188, 103–115.
- Kumar, N., Lad, G., Giuntini, E., Kaye, M.E., Udomwong, P., Shamsani, N.J., Young, J.P.W., Baillly, X. (2015) Bacterial genospecies that are not ecologically coherent: population genomics of *Rhizobium leguminosarum*. *Open Biol.* 5, 140133.
- Kwon, S.W., Park, J.Y., Kim, J.S., Kang, J.W., Cho, Y.H., Lim, C.K., Parker, M.A., Lee, G.B. (2005) Phylogenetic analysis of the genera *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* on the basis of 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 263–270.
- Laguerre, G., Geniaux, E., Mazurier, S.L., Rodriguez Casarelli, R., Amarger, N. (1993) Conformity and diversity among field isolates of *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae*, sv. *trifolii*, and sv. *phaseoli* revealed by DNA hybridization using chromosome and plasmid probes. *Can. J. Microbiol.* 39, 412–419.
- Laguerre, G., Louvrier, P., Allard, M.R., Amarger, N. (2003) Compatibility of rhizobial genotypes within natural populations of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* for nodulation of host legumes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2276–2283.
- Laguerre, G., Mavingui, P., Allard, M.R., Charnay, M.P., Louvrier, P., Mazurier, S.L., Rigottier-Gois, L., Amarger, N. (1996) Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2029–2036.
- Laguerre, G., Mazurier, S.L., Amarger, N. (1992) Plasmid profiles and restriction fragment length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae* in field populations. *FEMS Microbiol. Ecol.* 101, 17–26.
- Laguerre, G., Nour, S.M., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P., Amarger, N. (2001) Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology* 147, 981–993.
- Lei, X., Wang, E.T., Chen, W.F., Sui, X.H., Chen, W.X. (2008) Diverse bacteria isolated from root nodules of wild *Vicia* species grown in temperate region of China. *Arch. Microbiol.* 190, 657–671.
- Lie, T.A., Göktan, D., Engin, M., Pijnenborg, J., Anlarsal, E. (1987) Co-evolution of the legume-rhizobium association. *Plant Soil* 100, 171–181.
- Liu, T.Y., Li, Y., Jr, Liu, X.X., Sui, X.H., Zhang, X.X., Wang, E.T., Chen, W.X., Chen, W.F., Palawska, J. (2012) *Rhizobium cauense* sp. nov., isolated from root nodules of the herbaceous legume *Kummerowia stipulacea* grown in campus lawn soil. *Syst. Appl. Microbiol.* 35, 415–420.
- López-López, A., Rogel-Hernández, M.A., Barois, I., Ortiz Ceballos, A.I., Martínez, J., Ormeño-Orrillo, E., Martínez-Romero, E. (2012) *Rhizobium grahamii* sp. nov., from nodules of *Dalea leporina*, *Leucaena leucocephala* and *Citroia ternatea*, and *Rhizobium mesoamericanum* sp. nov., from nodules of *Phaseolus vulgaris*, siratro, cowpea and *Mimosa pudica*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 2264–2271.

- [37] Morel, M.A., Braña, V., Castro-Sowinski, S. (2012) Legume crops, importance and use of bacterial inoculation to increase production, in: Goyal, A. (Ed.), *Crop Plant*, 10, pp. 217–240.
- [38] Moschetti, G., Peluso, A., Protopapa, A., Anastasio, M., Pepe, O., Defez, R. (2005) Use of nodulation pattern, stress tolerance, *nodC* gene amplification, RAPD-PCR and RFLP-16S rDNA analysis to discriminate genotypes of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Syst. Appl. Microbiol.* 28, 619–631.
- [39] Mnasri, B., Saidi, S., Chihaoui, S.-A., Mhamdi, R. (2012) *Sinorhizobium americanum* symbiobiovar *mediterraneense* is a predominant symbiont that nodulates and fixes nitrogen with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a Northern Tunisian field. *Syst. Appl. Microbiol.* 35, 263–269.
- [40] Mutch, L.A., Tamimi, S.M., Young, J.P.W. (2003) Genotypic characterization of rhizobia nodulating *Vicia faba* from the soils of Jordan: a comparison with UK isolates. *Soil Biol. Biochem.* 35, 709–714.
- [41] Mutch, L.A., Young, J.P.W. (2004) Diversity and specificity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* on wild and cultivated legumes. *Mol. Ecol.* 13, 2435–2444.
- [42] Patriarca, E.J., Chiurazzi, M., Manco, G., Riccio, A., Lamberti, A., De Paolis, A., Rossi, M., Defez, R., Iaccarino, M. (1992) Activation of the *Rhizobium leguminosarum* *ghnI* gene by NtrC is dependent on upstream DNA sequences. *Mol. Gen. Genet.* 234, 337–345.
- [43] Peix, A., Ramírez-Bahena, M.H., Velázquez, E., Bedmar, E.J. (2015) Bacterial associations with legumes. *Crit. Rev. Plant Sci.* 34, 17–42.
- [44] Peoples, M.B., Murray, J.U., Herridge, D.H. (2009) Measuring symbiotic nitrogen fixation by legumes. In: Emerich, D.W., Krishnan, H.B. (Eds.), *Nitrogen Fixation in Crop Production*, American Society of Agronomy, Madison, WI, USA, pp. 125–170.
- [45] Perret, X., Staehelin, C., Broughton, W.J. (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Mol. Biol. Rev.* 64, 180–201.
- [46] Priefer, U.B. (1989) Genes involved in lipopolysaccharide production and symbiosis are clustered on the chromosome of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* VF39. *J. Bacteriol.* 171, 6161–6168.
- [47] Rashid, M.H., Gonzalez, J., Young, J.P.W., Wink, M. (2014) *Rhizobium leguminosarum* is the symbiont of lentils in the Middle East and Europe but not in Bangladesh. *FEMS Microbiol. Ecol.* 87, 64–77.
- [48] Rashid, M.H., Schäfer, H., Gonzalez, J., Wink, M. (2012) Genetic diversity of rhizobia nodulating lentil (*Lens culinaris*) in Bangladesh. *Syst. Appl. Microbiol.* 35, 98–109.
- [49] Rigottier-Gois, L., Turner, S.L., Young, J.P.W., Amarger, N. (1998) Distribution of *repC* plasmid-replication sequences among plasmids and isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* from field populations. *Microbiology* 144, 771–780.
- [50] Rogel, M.A., Ormeño-Orrillo, E., Martínez Romero, E. (2011) Symbiobvars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Syst. Appl. Microbiol.* 34, 96–104.
- [51] Rubio-Sanz, L., Brito, B., Palacios, J. (2018) Analysis of metal tolerance in *Rhizobium leguminosarum* strains isolated from an ultramafic soil. *FEMS Microbiol. Lett.* 365 (4), fny010.
- [52] Ruiz-Diez, B., Fajardo, S., Felipe, M.R., Fernández-Pascual, M. (2012) Characterization of rhizobia from legumes of agronomic interest grown in semi-arid areas of Central Spain relates genetic differences to soil properties. *J. Basic Microbiol.* 52, 66–78.
- [53] Ruiz-Diez, B., Fajardo, S., Fernández-Pascual, M. (2012) Selection of rhizobia from agronomic legumes grown in semiarid soils to be employed as bioinoculants. *Agron. J.* 104, 550–559.
- [54] Ruiz-Diez, B., Quiñones, M.A., Fajardo, S., López, M.A., Higuera, P., Fernández-Pascual, M. (2012) Mercury-resistant rhizobial bacteria isolated from nodules of leguminous plants growing in high Hg-contaminated soils. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 543–554.
- [55] Saidi, S., Ramírez-Bahena, M.H., Santillana, N., Zúñiga, D., Álvarez-Martínez, E., Peix, A., Mhamdi, R., Velázquez, E. (2014) *Rhizobium laguerreae* sp. nov. nodulates *Vicia faba* on several continents. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 242–247.
- [56] Santillana, N., Ramírez-Bahena, M.H., García-Fraile, P., Velázquez, E., Zúñiga, D. (2008) Phylogenetic diversity based on *rrs*, *atpD*, *recA* genes and 16S-23S intergenic sequence analyses of rhizobial strains isolated from *Vicia faba* and *Pisum sativum* in Peru. *Arch. Microbiol.* 189, 239–247.
- [57] Shamseldin, A., El-Saadani, M., Sadowsky, M.J., An, C.S. (2009) Rapid identification and discrimination among Egyptian genotypes of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and *Sinorhizobium meliloti* nodulating faba bean (*Vicia faba* L.) by analysis of *nodC*, *ARDRA* and rDNA sequence analysis. *Soil Biol. Biochem.* 41, 45–53.
- [58] Silva, C., Vinuesa, P., Eguarte, L.E., Souza, V., Martínez-Romero, E. (2005) Evolutionary genetics and biogeographic structure of *Rhizobium gallicum* sensu lato, a widely distributed bacterial symbiont of diverse legumes. *Mol. Ecol.* 14, 4033–4050.
- [59] Taha, K., Berraho, E.B., El Attar, I., Dekkiche, S., Aurag, J., Béna, G. (2018) *Rhizobium laguerreae* is the main nitrogen-fixing symbiont of cultivated lentil (*Lens culinaris*) in Morocco. *Syst. Appl. Microbiol.* 41, 113–121.
- [60] Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., Kumar, S. (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.
- [61] Tian, C.F., Wang, E.T., Han, T.X., Sui, X.H., Chen, W.X. (2007) Genetic diversity of rhizobia associated with *Vicia faba* in three ecological regions of China. *Arch. Microbiol.* 188, 273–282.
- [62] Tian, C.F., Wang, E.T., Wu, L.J., Han, T.X., Chen, W.F., Gu, C.T., Gu, J.G., Chen, W.X. (2008) *Rhizobium fabae* sp. nov., a bacterium that nodulates *Vicia faba*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 2871–2875.
- [63] Tian, C.F., Young, J.P., Wang, E.T., Tamimi, S.M., Chen, W.X. (2010) Population mixing of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* nodulating *Vicia faba*: the role of recombination and lateral gene transfer. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73, 563–576.
- [64] Tong, W., Li, X., Huo, Y., Zhang, L., Cao, Y., Wang, E., Chen, W., Tao, S., Wei, C. (2018) Genomic insight into the taxonomy of *Rhizobium* genospecies that nodulate *Phaseolus vulgaris*. *Syst. Appl. Microbiol.* 41, 300–310.
- [65] Valverde, A., Igual, J.M., Peix, A., Cervantes, E., Velázquez, E. (2006) *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2631–2637.
- [66] Van Berkum, P., Beyene, D., Vera, F.T., Keyser, H.H. (1995) Variability among *Rhizobium* strains originating from nodules of *Vicia faba*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2649–2653.
- [67] Van Berkum, P., Eardly, B.D. (1998) Molecular evolutionary systematics of the Rhizobiaceae. In: Spaink, H., Kondrosi, A., Hooykaas, P. (Eds.), *The Rhizobiaceae*, Kluwer Academic Pub., Dordrecht, The Netherlands.
- [68] Van Cauwenbergh, J., Lemaire, B., Stefan, A., Efrose, R., Michiels, J., Honnay, O. (2016) Symbiont abundance is more important than pre-infection partner choice in a *Rhizobium*–legume mutualism. *Syst. Appl. Microbiol.* 39, 345–349.
- [69] Ventorino, V., Chiurazzi, M., Aponte, M., Pepe, O., Moschetti, G. (2007) Genetic diversity of a natural population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* nodulating plants of *Vicia faba* in the Vesuvian area. *Curr. Microbiol.* 55, 512–517.
- [70] Versalovic, J., Schneider, M., de Brulin, F.J., Lupski, J.R. (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell. Biol.* 5, 25–40.
- [71] Villadas, P.J., Lasa, A.V., Martínez-Hidalgo, P., Flores-Félix, J.D., Martínez-Molina, E., Toro, N., Velázquez, E., Fernández-López, M. (2017) Analysis of rhizobial endosymbionts of *Vicia*, *Lathyrus* and *Trifolium* species used to maintain mountain firewalls in Sierra Nevada National Park (South Spain). *Syst. Appl. Microbiol.* 40, 92–101.
- [72] Vincent, J.M. (1970) A manual for the practical study of root nodule bacteria. In: *IBP Handbook 15*, Black Well Scientific Publications, Oxford and Edinburgh.
- [73] Wang, F., Wang, E.T., Wu, L.J., Sui, X.H., Li, Y., Jr., Chen, W.X. (2011) *Rhizobium vallis* sp. nov., isolated from nodules of three leguminous species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 2582–2588.
- [74] Xu, K.W., Zou, L., Penttinen, P., Wang, K., Heng, N.N., Zhang, X.P., Chen, Q., Zhao, K., Chen, Y.X. (2015) Symbiotic effectiveness and phylogeny of rhizobia isolated from faba bean (*Vicia faba* L.) in Sichuan hilly areas. *China. Syst. Appl. Microbiol.* 38, 515–523.
- [75] Yan, J., Yan, H., Liu, L.X., Chen, W.F., Zhang, X.X., Verástegui-Valdés, M.M., Wang, E.T., Han, X.Z. (2017) *Rhizobium hidalgense* sp. nov., a nodule endophytic bacterium of *Phaseolus vulgaris* in acid soil. *Arch. Microbiol.* 199, 97–104.
- [76] Yang, C., Bueckert, R., Schoenau, J., Diederichsen, A., Zakeri, H., Warkentin, T. (2017) Symbiosis of selected *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strains with diverse pea genotypes: effects on biological nitrogen fixation. *Can. J. Microbiol.* 63, 909–919.
- [77] Young, J.P.W., Johnston, A.W.B., Brewin, N.J. (1982) A search for peas (*Pisum sativum* L.) showing strain specificity for symbiotic *Rhizobium leguminosarum*. *Heredity* 48, 197–201.
- [78] Young, J.P.W., Matthews, P. (1982) A distinct class of peas (*Pisum sativum* L.) from Afghanistan that show strain specificity for symbiotic rhizobium. *Heredity* 48, 203–210.
- [79] Young, J.P.W., Wexler, M. (1988) Sym plasmid and chromosomal genotypes are correlated in field populations of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 134, 2731–2739.
- [80] Yuan, K., Miwa, H., Iizuka, M., Yokoyama, T., Fujii, Y., Okazaki, S. (2016) Genetic diversity and symbiotic phenotype of hairy vetch rhizobia in Japan. *Microbes Environ.* 31, 121–126.
- [81] Zhang, X.X., Kosier, B., Priefer, U.B. (2001) Genetic diversity of indigenous *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolates nodulating two different host plants during soil restoration with alfalfa. *Mol. Ecol.* 10, 2297–2305.
- [82] Zhang, Y.J., Zheng, W.T., Everall, I., Young, J.P., Zhang, X.X., Tian, C.F., Sui, X.H., Wang, E.T., Chen, W.X. (2015) *Rhizobium onhuiense* sp. nov., isolated from effective nodules of *Vicia faba* and *Pisum sativum* grown in Southern China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 2960–2967.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

### **Genetic diversity and phylogeny of indigenous rhizobia nodulating faba bean (*Vicia faba* L.) in Greece**

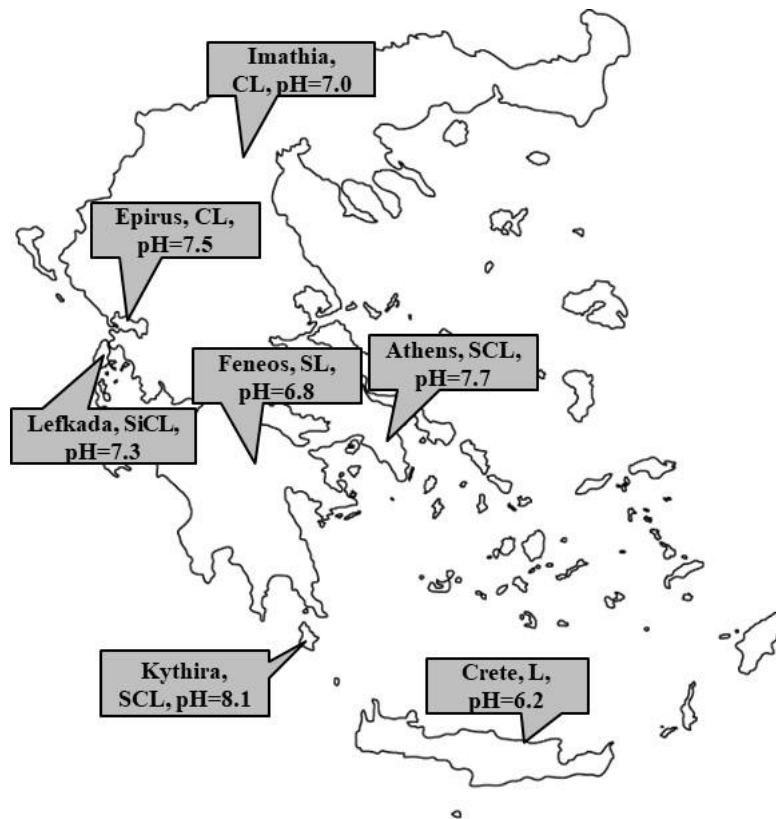
**Evdoxia Efstathiadou<sup>a</sup>, Dimitrios Savvas<sup>b</sup>, Anastasia P. Tampakaki<sup>a\*</sup>**

<sup>a</sup> Laboratory of General and Agricultural Microbiology, Department of Crop Science, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Votanikos, 11855 Athens, Greece.

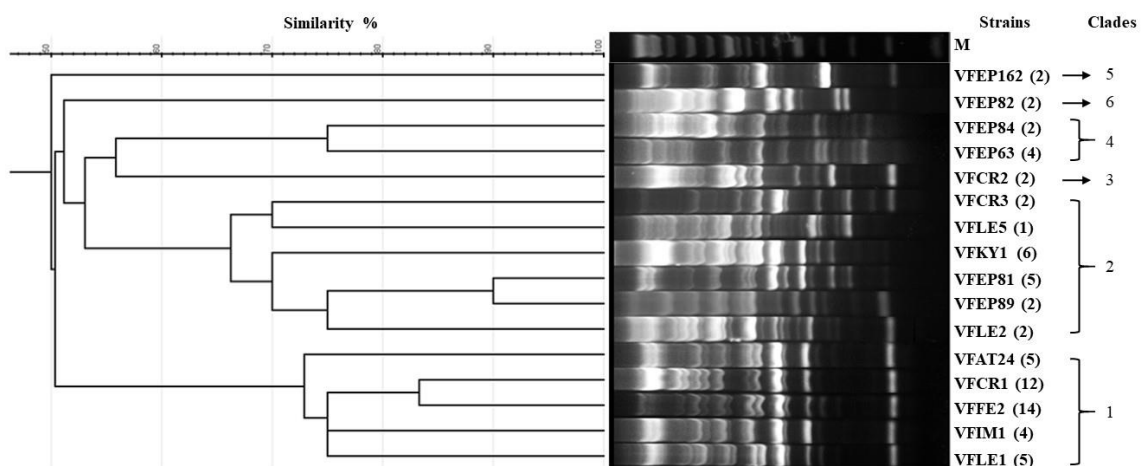
<sup>b</sup> Laboratory of Vegetable Production, Department of Crop Science, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Votanikos, 11855 Athens, Greece.

*\*Correspondence to:* Anastasia P. Tampakaki, Laboratory of General and Agricultural Microbiology, Department of Crop Science, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Votanikos, 11855 Athens, Greece. E-mail: [tampakaki@aua.gr](mailto:tampakaki@aua.gr)

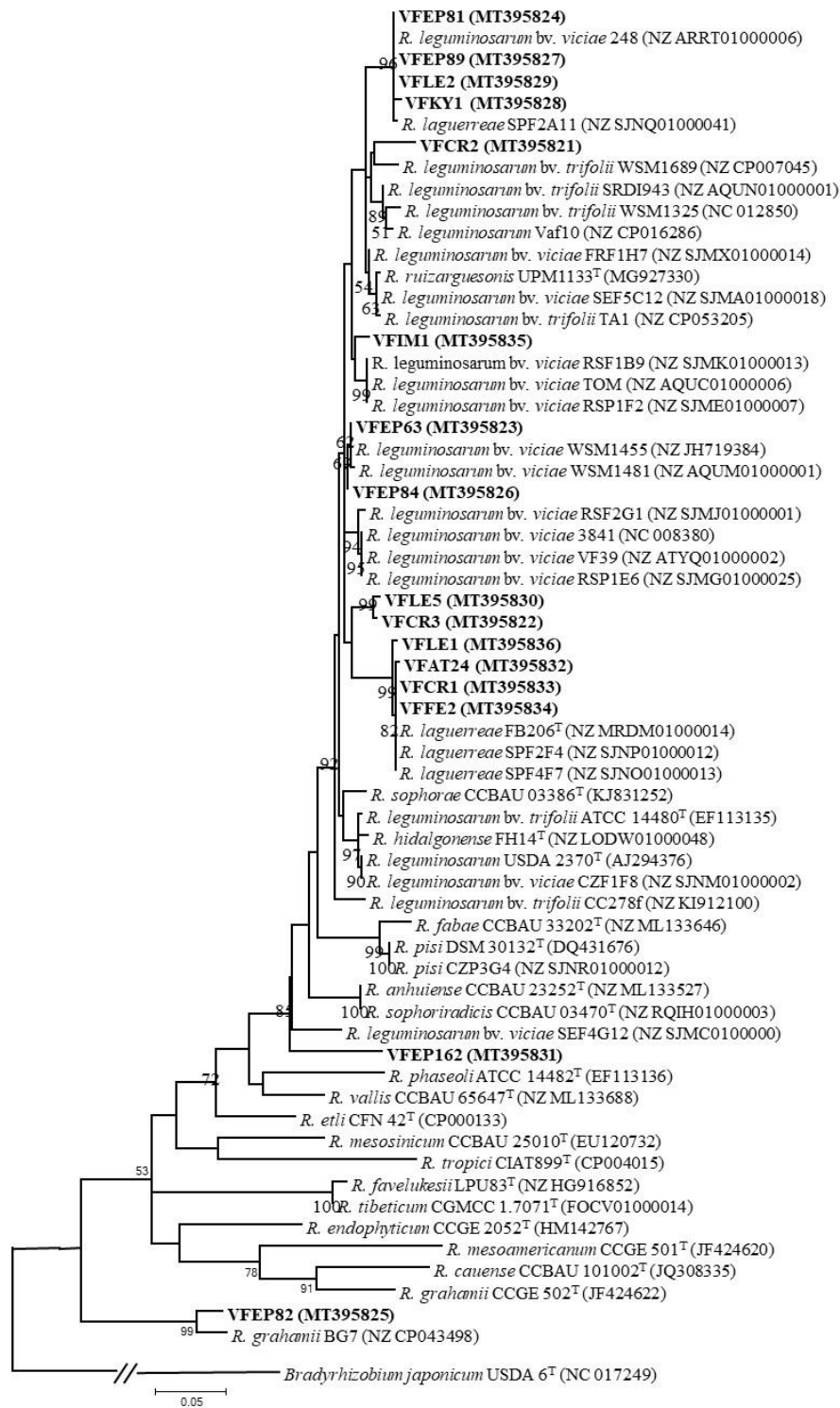
Short title: Characterization of faba bean-nodulating rhizobia in Greece



**Figure S1.** Simplified map of Greece showing the sampling sites for faba bean rhizobia. The coordinates (latitude/longitude) were as follows: Athens, N37°58'53.31" E23°42'20.72"; Crete, N35°09'32.8" E25°18'54.0"; Epirus, N38°59'29.2" E20°45'36.0"; Feneos, N37°57'6.25" E22°19'37.05"; Kythira, N 36°10'57.1" E 22°59'34.8"; Lefkada, N38°37'44.5" E 20°39'03.4"; Imathia, N40°29'19.4" E22°11'13.0". The soil texture class and pH of the sampling sites are indicated within the grey boxes. CL: clay-loam; L: loam; SL: sandy-loam; SCL: sandy-clay-loam; SiCL: Silty-clay-loam.

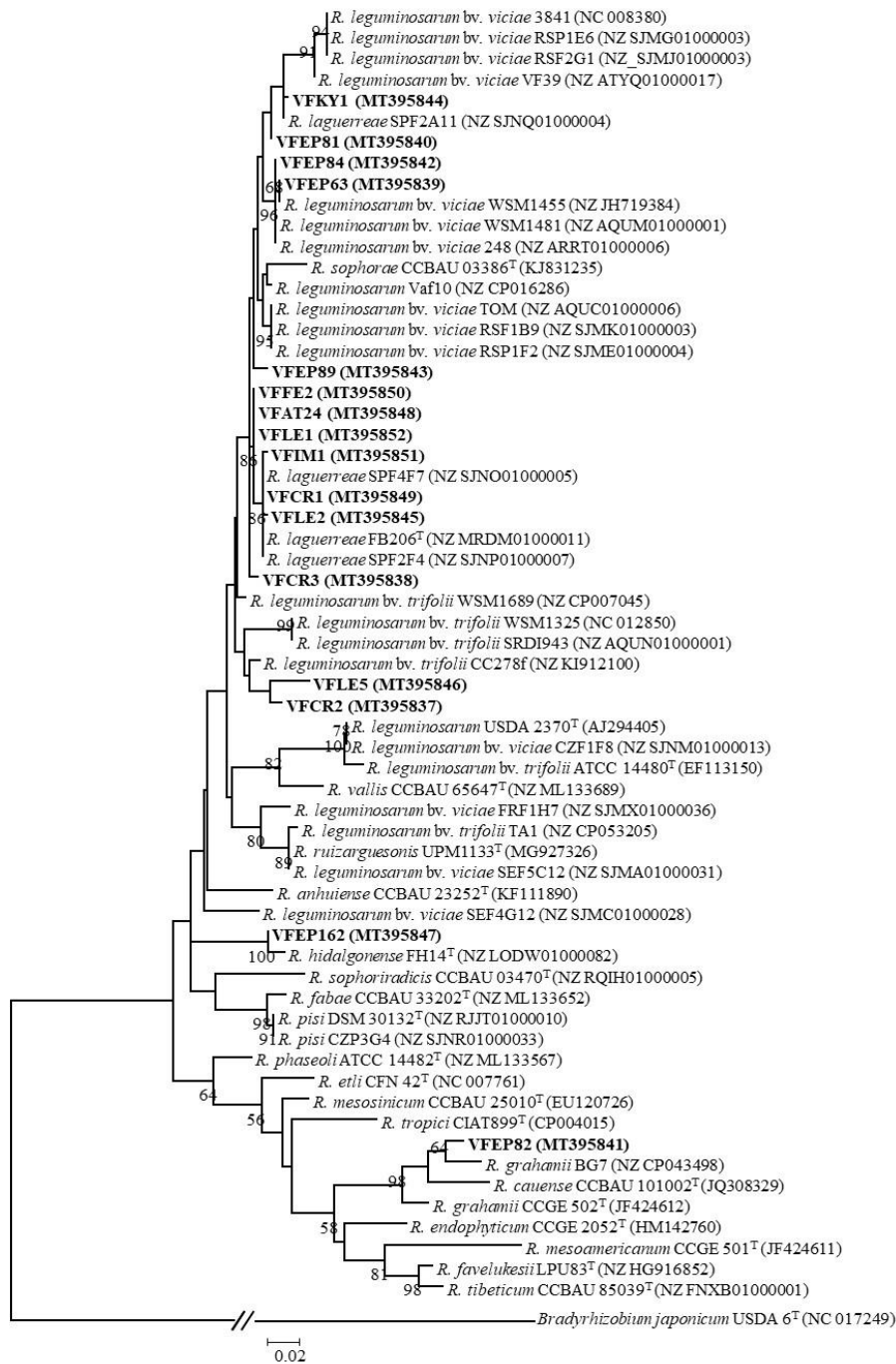


**Figure S2.** BOX-PCR fingerprinting patterns of 16 representative rhizobial isolates from field-grown faba bean nodules. The numbers of isolates displaying nearly identical profiles were considered as clonal isolates and are indicated within parentheses. A molecular marker 1 kb DNA Ladder (Invitrogen) was also included at the top (M). Cluster analysis was performed by GelJ v2.0 using the unweighted pair group arithmetic mean algorithm (UPGMA) at a 1.0% tolerance level using the Dice coefficient.

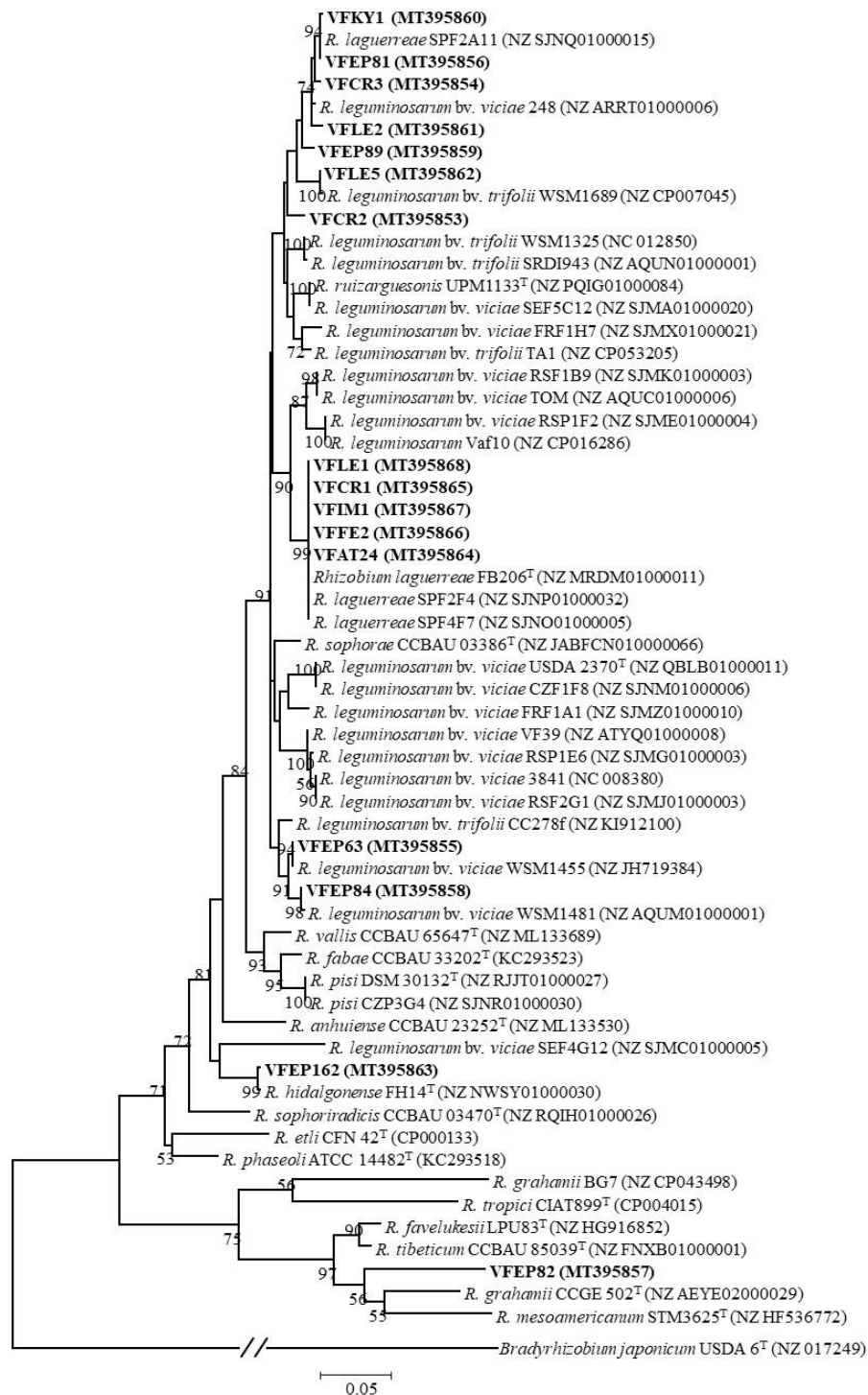


**Figure S3.** Maximum likelihood phylogenetic tree based on *recA* gene sequences (462 bp) showing the taxonomic relationships of the studied strains, representative related type strains and genospecies of the *Rhizobium* species complex. Strains isolated in the present study are shown in boldface and type strains are indicated by a superscript "T". GenBank accession numbers of the sequences are indicated within parentheses. Phylogenetic analysis was conducted in MEGA 6 using the maximum likelihood algorithm with the Tamura 3-parameter model plus Gamma rate distribution plus invariant site (T92 + G + I). Bootstrap values (greater than 50%) were calculated for 500 replications and are shown at the nodes. The scale bar shows the number of nucleotide substitutions per site. The genus names are abbreviated as follows: *R.*, *Rhizobium*.

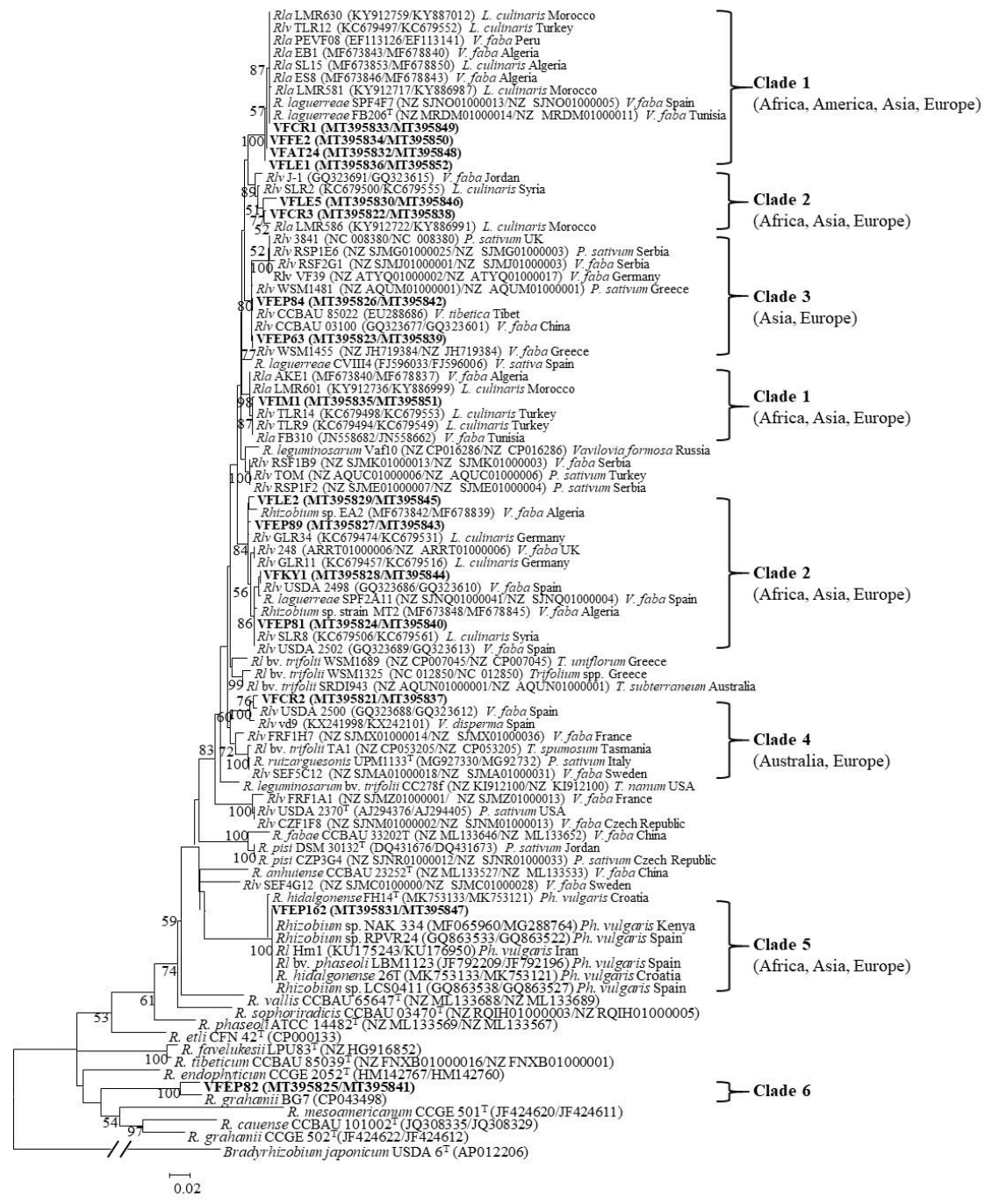


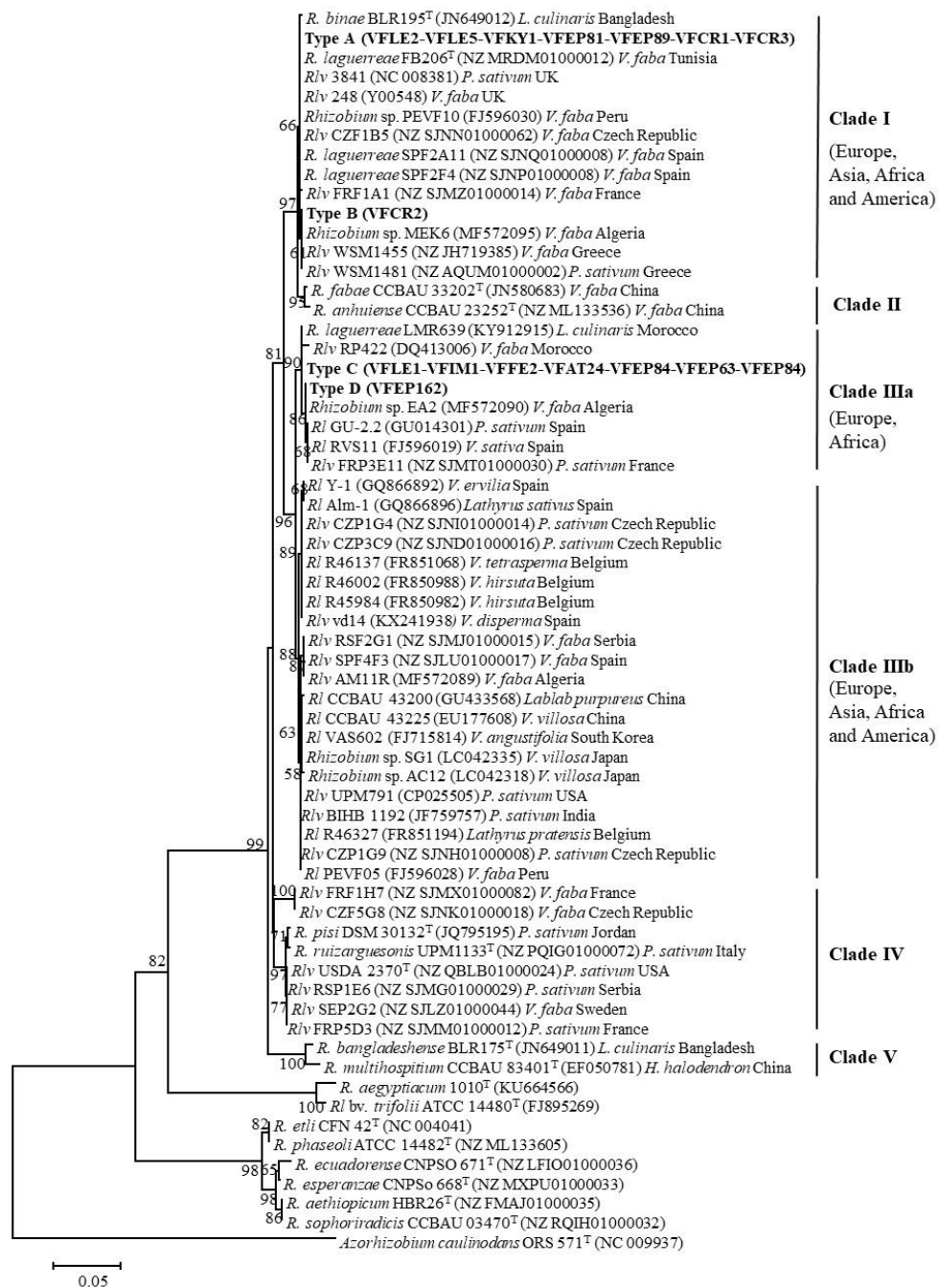


**Figure S4.** Maximum likelihood phylogenetic tree based on *atpD* gene sequences (441 bp) showing the taxonomic relationships of the strains, representative related type strains and genospecies of the *Rhizobium* species complex. Strains isolated in the present study are shown in boldface and type strains are indicated by a superscript “T”. GenBank accession numbers of the sequences are indicated within parentheses. Phylogenetic analysis was conducted in MEGA 6 using the maximum likelihood algorithm with the Tamura 3-parameter model plus Gamma rate distribution (T92 + G). Bootstrap values (greater than 50%) were calculated for 500 replications and are shown at the nodes. The scale bar shows the number of nucleotide substitutions per site. The genus names are abbreviated as follows: *R.*, *Rhizobium*.



**Figure S5.** Maximum likelihood phylogenetic tree based on *gyrB* gene sequences (594 bp) showing the taxonomic relationships of the strains, representative related type strains and genospecies of the *Rhizobium* species complex. Strains isolated in the present study are shown in boldface and type strains are indicated by a superscript "T". GenBank accession numbers of the sequences are indicated within parentheses. Phylogenetic analysis was conducted in MEGA 6 using the maximum likelihood algorithm with the Tamura 3-parameter model plus Gamma rate distribution (T92 + G). Bootstrap values (greater than 50%) were calculated for 500 replications and are shown at the nodes. The scale bar shows the number of nucleotide substitutions per site. The genus names are abbreviated as follows: *R.*, *Rhizobium*.





**Figure S7.** Maximum likelihood phylogenetic tree based on *nodC* gene sequences (543 bp) showing phylogenetic relationships between the strains of the symbiovar *viciae* isolated in this study and in other geographical locations. Strains isolated in the present study are shown in boldface and type strains are indicated by a superscript “T”. Accession numbers of the sequences from strains isolated in the present study are given in Table S2 and those from the strains retrieved from GenBank are indicated within parentheses. Phylogenetic analysis was conducted in MEGA 6 using the maximum likelihood algorithm with the Tamura 3-parameter model plus Gamma rate distribution plus invariant site (T92 + G + I). The scale bar shows the number of nucleotide substitutions per site. Bootstrap values (greater than 50%) were calculated for 500 replications and are shown at the nodes. The strain names are abbreviated as follows: *P.*, *Pisum*; *R.*, *Rhizobium*; *Rl*, *Rhizobium leguminosarum*; *Rlv*, *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae*; *V.*, *Vicia*.

**Table S1.** Primers and PCR conditions used in this study.

Oligonucleotide name	Oligonucleotide sequence <sup>1</sup> (5'----->3')	Gene / Sequence	Amplicon size (bp)	PCR conditions	Reference
BOX A1R	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	BOX-sequences	Variable sizes	5 min 95 °C, 30 × (30 s 94 °C, 1 min 50 °C, 8 min 65 °C), 16 min 65 °C	Versalovic et al., 1994
16S-F1-T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTTGATCCTGG</u> CTCAG	16S rRNA	~1,500	5 min 95 °C, 30 × (1 min 95 °C, 1 min 55 °C, 2.0 min 72 °C), 10 min 72 °C	This study, modified from Weisburg et al. 1991
16S-R1-SP6	<u>GATTTAGGTGACTATAGAAGGAGGTGATCCAG</u> CC	16S rRNA			
<i>atpD</i> -F52-T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGGGTTATCGGCGCCG</u> TYGTSGACGT	<i>atpD</i>	~850	5 min 95 °C, 30 × (1 min 95 °C, 1 min 54 °C, 1.0 min 72 °C), 10 min 72 °C	This study
<i>atpD</i> -F902-SP6	<u>GATTTAGGTGACTATAGGTSGTSGTRATGCGY</u> TCCTGCATC-3'	<i>atpD</i>			
<i>gyrB</i> 340F-T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGGTTCGACCARAAYTC</u> YTACAAGG	<i>gyrB</i>	~700	5 min 95 °C, 30 × (1 min 95 °C, 1 min 58 °C, 1.0 min 72 °C), 10 min 72 °C	Tampakaki et al., 2017a
<i>gyrB</i> 1057rhi-R-SP6	<u>GATTTAGGTGACTATAGCSAGCTTRTCCTTGG</u> TCTGCG	<i>gyrB</i>			
<i>recA</i> 41F-T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGGTTCGGCAAGGGM</u> TCGRTSATG	<i>recA</i>	~700	5 min 95 °C, 30 × (1 min 95 °C, 1 min 56 °C, 1.0 min 72 °C), 10 min 72 °C	Tampakaki et al., 2017a

<i>recA</i> 827R-SP6	<u>GATTTAGGTGACTATAGCCATACATGATR</u> TC GAAYTC	<i>recA</i>			Tampakaki et al., 2017a
<i>nifH</i> -FP-T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGGTACGGCAAAGGG</u> GGSATCGGCAA	<i>nifH</i>			This study
<i>nifH</i> -RPV-SP6	<u>GATTTAGGTGACTATAGAGCATGTCYTCVAG</u> YTCYTCCA	<i>nifH</i>	~850	5 min 95 °C, 30 × (1 min 95 °C, 1 min 55 °C, 1.0 min 72 °C), 10 min 72 °C	This study
<i>nodC</i> -F352P-T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGGGTGYYAAACGGAA</u> GGCACAGAT	<i>nodC</i>			This study
<i>nodC</i> ms-R-SP6	<u>GATTTAGGTGACTATAGCGHGACAGCCARTC</u> GCTRRTG	<i>nodC</i>	~800	5 min 95 °C, 30 × (1 min 95 °C, 1 min 55 °C, 1.0 min 72 °C), 10 min 72 °C	Tampakaki et al., 2017b

<sup>1</sup>Mixtures of bases used at certain positions are given as: R, A or G; Y, C or T; M, A or C; K, G or T; S, G or C; B, C or G or T; V, A or C or G. Underlined sequences indicate nucleotide sequences of T7 or SP6 sequencing primers.

## References

- Tampakaki, A.P., Fotiadis, C.T., Ntatsi, G., Savvas, D. (2017a). Phylogenetic multilocus sequence analysis of indigenous slow-growing rhizobia nodulating cowpea (*Vigna unguiculata* L.) in Greece. *Syst. Appl. Microbiol.* 40, 179-189.
- Tampakaki, A.P., Fotiadis, C.T., Ntatsi, G., Savvas, D. (2017b). A novel symbiovar (*aegeanense*) of the genus *Ensifer* nodulates *Vigna unguiculata*. *J. Sci. Food Agric.* 97, 4314-4325.
- Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J., Lupski, J.R. (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based PCR (rep-PCR). *Methods Mol. Cell Biol.* 5, 25–40.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697–703.

**Table S2.** GenBank accession numbers of the sequenced genes in this study.

Strain	<i>rrs</i>	<i>recA</i>	<i>atpD</i>	<i>gyrB</i>	<i>nodC</i>	<i>nifH</i>
<i>Rhizobium</i> sp. VF0R2	MT370009	MT395821	MT395837	MT395853	MT395869	MT395884
<i>Rhizobium</i> sp. VF0R3	MT370010	MT395822	MT395838	MT395854	MT395870	MT395885
<i>Rhizobium</i> sp. VF0P63	MT370011	MT395823	MT395839	MT395855	MT395871	MT395886
<i>Rhizobium</i> sp. VF0P81	MT370012	MT395824	MT395840	MT395856	MT395872	MT395887
<i>Rhizobium</i> sp. VF0P82	MT370013	MT395825	MT395841	MT395857	N/A*	N/A*
<i>Rhizobium</i> sp. VF0P84	MT370014	MT395826	MT395842	MT395858	MT395873	MT395888
<i>Rhizobium</i> sp. VF0P89	MT370015	MT395827	MT395843	MT395859	MT395874	MT395889
<i>Rhizobium</i> sp. VF0Y1	MT370016	MT395828	MT395844	MT395860	MT395875	MT395890
<i>Rhizobium</i> sp. VF0E2	MT370017	MT395829	MT395845	MT395861	MT395876	MT395891
<i>Rhizobium</i> sp. VF0E5	MT370018	MT395830	MT395846	MT395862	MT395877	MT395892
<i>R. hidalgonense</i> VF0P162	MT370019	MT395831	MT395847	MT395863	MT395878	MT395893
<i>R. laguerreae</i> VF0T24	MT370020	MT395832	MT395848	MT395864	MT395879	MT395894
<i>R. laguerreae</i> VF0R1	MT370021	MT395833	MT395849	MT395865	MT395880	MT395895
<i>R. laguerreae</i> VF0E2	MT370022	MT395834	MT395850	MT395866	MT395881	MT395896
<i>R. laguerreae</i> VF0M1	MT370023	MT395835	MT395851	MT395867	MT395882	MT395897
<i>R. laguerreae</i> VF0E1	MT370024	MT395836	MT395852	MT395868	MT395883	MT395898

\*N/A, not applicable.

**Table S3.** Characteristics of rhizobial strains obtained in this study and their phylogenetic relationships with the closest type strains.

The most related species (sequence identity, %) <sup>a</sup>												
Strain <sup>b</sup>	BOXt type <sup>c</sup>	No isolates <sup>d</sup>	MLSA Clade	16S <sup>e</sup>	<i>recA</i>	<i>atpD</i>	<i>gyrB</i>	MLSA	Genospecies definition	Symbi ovar	<i>nodC</i> type <sup>f</sup>	Geographic origin
VFLE1	1	5	1	Rla FB206 <sup>T</sup> (99.85%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (99.57%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (99.55%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (100%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (99.73%)	gsF-2	<i>viciae</i>	D	Lefkada
VFCR1	2	12	1	Rla FB206 <sup>T</sup> (99.92%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (100%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (100%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (100%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (100%)	gsF-2	<i>viciae</i>	A	Crete
VFFE2	3	14	1	Rla FB206 <sup>T</sup> (99.77%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (100%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (99.54%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (100%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (99.87%)	gsF-2	<i>viciae</i>	D	Feneos
VFAT24	4	5	1	Rla FB206 <sup>T</sup> (99.85%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (99.78%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (99.54%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (100%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (99.24%)	gsF-2	<i>viciae</i>	D	Athens
VFIM1	5	4	1	Rla FB206 <sup>T</sup> (99.85%)	Rru UPM1133 <sup>T</sup> (98.48%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (99.77%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (100%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (98.66%)	gsF-2	<i>viciae</i>	D	Imathia
VFLE5	6	1	2	Rla FB206 <sup>T</sup> (99.85%)	Rru UPM1133 <sup>T</sup> (97.19%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (96.6%)	Rla FB206 <sup>T</sup> / Rru UPM1133 <sup>T</sup> (96.3%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (96.26%)	gsF-2	<i>viciae</i>	A	Lefkada
VFCR3	7	2	2	Rla FB206 <sup>T</sup> (99.92%)	Rru UPM1133 <sup>T</sup> (96.54%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (98.87%)	Rru UPM1133 <sup>T</sup> (96.63%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (96.93%)	gsF-2	<i>viciae</i>	A	Crete
VFLE2	8	2	2	Rla FB206 <sup>T</sup> (99.85%)	Rru UPM1133 <sup>T</sup> (97.40%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (99.77%)	Rru UPM1133 <sup>T</sup> (96.46%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (96.86%)	gsF-2	<i>viciae</i>	A	Lefkada
VFEP81	9	5	2	Rla FB206 <sup>T</sup> (99.85%)	Rru UPM1133 <sup>T</sup> (97.40%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (98.17%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (96.63%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (96.6%)	gsF-2	<i>viciae</i>	A	Epirus



VF KY1	10	6	2	Rla FB206 <sup>T</sup> (99.77%)	Rru UPM1133 <sup>T</sup> (96.97%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (97.28%)	Rru UPM1133 <sup>T</sup> (96.46%)	Rru UPM1133 <sup>T</sup> (96.46%)	gsF-2	<i>viciae</i>	A	Kythira
VF EP89	11	2	2	Rla FB206 <sup>T</sup> (99.85%)	Rru UPM1133 <sup>T</sup> (97.40%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (98.41%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (96.97%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (96.93%)	gsF-2	<i>viciae</i>	A	Epirus
VF EP63	12	4	3	Rla FB206 <sup>T</sup> (99.92%)	Rru UPM1133 <sup>T</sup> (99.13%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (97.73%)	Rlv USDA 2370 <sup>T</sup> (97.14%)	Rru UPM1133 <sup>T</sup> (97.13%)	gsB	<i>viciae</i>	C	Epirus
VF EP84	13	2	3	Rla FB206 <sup>T</sup> (99.85%)	Rru UPM1133 <sup>T</sup> (98.92%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (97.96%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (96.8%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (97.13%)	gsB	<i>viciae</i>	C	Epirus
VF CR2	14	2	4	Rla FB206 <sup>T</sup> (99.69%)	Rru UPM1133 <sup>T</sup> (96.97%)	Rla FB206 <sup>T</sup> (96.37%)	Rru UPM1133 <sup>T</sup> (97.31%)	Rru UPM1133 <sup>T</sup> (96.66%)	gsA	<i>viciae</i>	B	Crete
VF EP162	15	2	5	Rhi FH14 <sup>T</sup> (100%)	Rhi FH14 <sup>T</sup> (100%)	Rhi FH14 <sup>T</sup> (99.09%)	Rhi FH14 <sup>T</sup> (99.66%)	Rhi FH14 <sup>T</sup> (97.13%)	Rhi FH14 <sup>T</sup>	<i>viciae</i>	D	Epirus
VF EP82	16	2	6	Rca CCBAU 101002 <sup>T</sup> (99.77%)	Rgr CCGE 502 <sup>T</sup> (86.8%)	Rgr CCGE 502 <sup>T</sup> (96.15%)	Rgr CCGE 502 <sup>T</sup> (89.39%)	Rgr CCGE 502 <sup>T</sup> (90.58%)	New lineage	N/A	N/A	Epirus

<sup>a</sup>Percentage identities determined by multiple sequence alignments of partial gene sequences using the algorithm CLUSTAL Omega at <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

<sup>b</sup>Representative isolates from different BOX-groups. The first two letters in the isolate name indicate the original host (*Vicia faba*) and the latter two indicate their geographic origins, as follows: LE (Lefkada Island), CR (Crete Island), FE (Feneos), AT (Athens), EP (Epirus), IM (Imathia), KY (Kythira Island).

<sup>c</sup>Different numbers were assigned to represent each BOX-PCR pattern.

<sup>d</sup>Number of isolates displaying identical BOX-PCR pattern.

<sup>e</sup>*R. laguerreae* FB206<sup>T</sup> has identical *rrs* sequences to *R. anhuiense* CCBAU 23252<sup>T</sup>, *R. hidalgonense* FH14<sup>T</sup>, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* USDA 2370<sup>T</sup>, *R. ruizarguesonis* UPM1133<sup>T</sup> and *R. sophorae* CCBAU 03386<sup>T</sup>.

<sup>f</sup>The capital letters represent different *nodC* nucleotide sequences according to Fig. 3.

Abbreviations: Rca, *Rhizobium cauense*; Rgr, *Rhizobium grahamii*; Rhi, *Rhizobium hidalgonense*; Rla, *Rhizobium laguerreae*; Rlv, *Rhizobium leguminosarum* sv. *viciae*; Rru, *Rhizobium ruizarguesonis*; N/A, not applicable.

**Table S4.** Distribution and abundance of isolates clustered in different clades and genospecies by sampling sites.

	<b>Clade 1 (gsF-2)</b>	<b>Clade 2 (gsF-2)</b>	<b>Clade 3 (gsB)</b>	<b>Clade 4 (gsA)</b>	<b>Clade 5</b>	<b>Clade 6</b>
<b>Athens</b>	5					
<b>Crete</b>	12	2		2		
<b>Epirus</b>		7	6		2	2
<b>Feneos</b>	14					
<b>Imathia</b>	4					
<b>Kythira</b>		6				
<b>Lefkada</b>	5	3				
<b>Total isolates</b>	40	18	6	2	2	2



## OPEN Genetic characterization at the species and symbiovar level of indigenous rhizobial isolates nodulating *Phaseolus vulgaris* in Greece

Evdoxia Efstathiadou<sup>1</sup>, Georgia Ntatsi<sup>2</sup>, Dimitrios Savvas<sup>2</sup> & Anastasia P. Tampakaki<sup>1,✉</sup>

*Phaseolus vulgaris* (L.), commonly known as bean or common bean, is considered a promiscuous legume host since it forms nodules with diverse rhizobial species and symbiovars. Most of the common bean nodulating rhizobia are mainly affiliated to the genus *Rhizobium*, though strains belonging to *Ensifer*, *Pararhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, and *Burkholderia* have also been reported. This is the first report on the characterization of bean-nodulating rhizobia at the species and symbiovar level in Greece. The goals of this research were to isolate and characterize rhizobia nodulating local common bean genotypes grown in five different edaphoclimatic regions of Greece with no rhizobial inoculation history. The genetic diversity of the rhizobial isolates was assessed by BOX-PCR and the phylogenetic affiliation was assessed by multilocus sequence analysis (MLSA) of housekeeping and symbiosis-related genes. A total of fifty fast-growing rhizobial strains were isolated and representative isolates with distinct BOX-PCR fingerprinting patterns were subjected to phylogenetic analysis. The strains were closely related to *R. anhuiense*, *R. azibense*, *R. hidalgonense*, *R. sophoriradicis*, and to a putative new genospecies which is provisionally named as *Rhizobium* sp. I. Most strains belonged to symbiovar phaseoli carrying the  $\alpha$ -,  $\gamma$ -a and  $\gamma$ -b alleles of *nodC* gene, while some of them belonged to symbiovar gallicum. To the best of our knowledge, it is the first time that strains assigned to *R. sophoriradicis* and harbored the  $\gamma$ -b allele were found in European soils. All strains were able to re-nodulate their original host, indicating that they are true microsymbionts of common bean.

*Phaseolus vulgaris* (L.), commonly known as bean or common bean, is an important legume crop that is cultivated worldwide as a grain or vegetable crop in many parts of the tropics, subtropics, and temperate regions. In southern Europe, the main common bean producers are Greece, Italy, and Spain (FAOSTAT, 2019) which highlights the socioeconomic importance of this legume crop. In Greece, the main growing areas of bean production are located in north and center of the country accounting for 40.4% of pulse arable land with an annual production of approximately 79,340 tons (FAOSTAT, 2019). Apart from this, traditional farmers still cultivate their own landraces contributing to the national bean production. However, the cultivation of common bean requires high amounts of nitrogen fertilizers which increase production costs and contribute to increased environmental impacts. One sustainable approach to diminish the use of N fertilizers is the exploitation of the Biological Nitrogen Fixation (BNF) that provides nitrogen to plants, in the form of ammonia, through the symbiotic association of legumes with rhizobia.

*P. vulgaris* establishes symbiotic associations, forming nitrogen-fixing root nodules, with diverse rhizobia in different countries and continents<sup>1,2</sup>. Common bean is very promiscuous in its association with rhizobia since it is nodulated by genetically diverse rhizobial species, which are mainly affiliated to the genus *Rhizobium*, though strains belonging to *Ensifer*, *Pararhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, and *Burkholderia* have also been

<sup>1</sup>Laboratory of General and Agricultural Microbiology, Department of Crop Science, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Votanikos, 11855 Athens, Greece. <sup>2</sup>Laboratory of Vegetable Production, Department of Crop Science, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Votanikos, 11855 Athens, Greece. ✉email: tampakaki@aua.gr

reported. To date, more than thirty rhizobial species have been found to form symbiotic associations with common bean such as *R. aethiopicum*<sup>5,4</sup>, *R. acidisoli*<sup>7</sup>, *R. anhuiense*<sup>8</sup>, *R. azibense*<sup>9</sup>, *R. ecuadorensis*<sup>8</sup>, *R. esperanzae*<sup>9</sup>, *R. etli*<sup>10</sup>, *R. freirei*<sup>11</sup>, *R. gallicum*<sup>12</sup>, *R. giardinii*<sup>12</sup>, *R. hidalgonense*<sup>13</sup>, *R. leguminosarum*<sup>10</sup>, *R. leucaena*<sup>14</sup>, *R. lusitanum*<sup>15</sup>, *R. mesoamericanum*<sup>16</sup>, *R. mongolense*<sup>17</sup>, *R. paranaense*<sup>18</sup>, *R. phaseoli*<sup>19</sup>, *R. sophorae* and *R. sophoradicis*<sup>20</sup>, *R. tibeticum*<sup>21</sup>, *R. tropici*<sup>22</sup>, *R. vallis*<sup>23</sup>, *E. meliloti*<sup>24</sup>, *E. fredii*<sup>25</sup>, *E. medicae*<sup>26</sup>, *E. americanum*<sup>27</sup>, *Mesorhizobium* sp.<sup>28</sup>, and *Bradyrhizobium* sp.<sup>29</sup>. Rhizobial species belonging to Betaproteobacteria, such as *Burkholderia phymatum* was also found capable of forming nodules on common bean plants<sup>30</sup>. Moreover, several bean-nodulating strains either misnamed or with uncertain species affiliation were recently assigned to validly described species or to novel *Rhizobium* lineages based on genomic data<sup>6</sup>.

The promiscuity of common bean is not only related to the rhizobial species but also to the symbiotype. Up to date, eight symbiotypes (phaseoli, mimosae, gallicum, orientale, giardinii, tropici, mediterraneense, unnamed) distributed in diverse rhizobial species have been found in common bean nodules<sup>2,31,32</sup>. All symbiotypes, except of mediterraneense, are linked to the genus *Rhizobium*, while the symbiotypes giardinii, gallicum, and phaseoli are also linked to the genus *Pararhizobium*<sup>33</sup>. The sv. mediterraneense is linked to the genus *Ensifer* and an unnamed symbiotype has been found in *R. grahamii* and *R. mesoamericanum*<sup>16,31</sup>. Among the various symbiotypes found in bean nodulating rhizobia, the sv. phaseoli is the most prevalent worldwide and distributed in various chromosomal backgrounds such as *R. phaseoli*, *R. leguminosarum*, *R. etli*, *R. sophoradicis*, *R. vallis*, *R. giardinii*, *R. gallicum*, *R. lusitanum*, *R. ecuadorensis*, *R. sophorae*<sup>8,10,12,15,19,20,23</sup>. Noteworthy, the sv. phaseoli has a narrow host range, limited to *P. vulgaris* while the other symbiotypes have a broader host range<sup>2,31,34</sup>. For instance, the sv. tropici found in *R. tropici*, *R. leucaena*, *R. lusitanum*, and *R. freirei* can nodulate, apart from *P. vulgaris*, several other legumes such as *Leucaena leucocephala* and *Macroptilium atropurpureum*<sup>11,14,15,35</sup>. Besides, the sv. mediterraneense harbored by *E. meliloti*, *E. fredii*, and *E. americanum* confers nodulation and nitrogen fixation on *P. vulgaris*, *L. leucocephala*, and *Acacia*<sup>24,36</sup>. The sv. mimosae has also a broad host range nodulating *Mimosa affinis*, *L. leucocephala* as well as *P. vulgaris*<sup>37</sup>.

Many studies on rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* have revealed that *R. etli* and *R. phaseoli* of the sv. phaseoli are the predominant bean nodulating rhizobia in both the Mesoamerican and Andean centers of origin, though strains belonging to other rhizobial species, such as *R. tropici*, *R. leguminosarum*, *R. gallicum*, have also been reported<sup>10,22,38–43</sup>. Most of the American rhizobial species nodulating common bean have also been found in other continents indicative of their American origin and distribution with bean seeds<sup>44,45</sup>. However, many other rhizobial species have also been isolated from bean nodules in Europe, Africa, and Asia, where common bean has been introduced later. This suggests that resident rhizobia of the introduced regions might obtain symbiotic genes by horizontal transfer from the American strains. In support of this, several European and African strains (with identical or different chromosomal backgrounds) share similar symbiotic genes to those found in American strains<sup>12,15,46,47</sup>.

In European soils, the sv. phaseoli, gallicum, tropici, giardinii and mediterraneense have been found in diverse rhizobial species such as *R. leguminosarum*, *R. etli*, *R. tropici*, *R. gallicum*, *R. lusitanum*, *R. giardinii*, *E. fredii*, and *E. meliloti*. In particular, strains of sv. phaseoli have been found in Spain<sup>45–48</sup>, France<sup>49</sup>, England<sup>50</sup>, and Austria<sup>51</sup> and the sv. gallicum in Austria<sup>52</sup> and France<sup>12</sup>. The sv. tropici of *R. lusitanum* was found in Portugal<sup>15</sup>, while the sv. giardinii and mediterraneense in France and Spain, respectively<sup>12</sup>.

Despite that common bean can establish symbiotic relationships with a great number of rhizobial species carrying different symbiotypes, it displays reduced BNF ability compared to other legumes and thus it is considered a poor nitrogen fixer pulse<sup>45,53–57</sup>. For this reason, the selection of suitable varieties or landraces of common bean with high nitrogen fixation capacity in combination with efficient, competitive, and well-adapted rhizobial strains in different edaphoclimatic zones is considered the most sustainable agricultural practice for maximizing nodulation and nitrogen fixation in common bean and finally achieving optimal biofertilization.

Knowledge about the diversity of rhizobia nodulating common bean in Greece is very limited. Recently, a study analysed the bean rhizobial population in a geographically isolated region, Prespa lakes plain, located in the Northern Greece<sup>58</sup>. Although the isolates were not identified at the species and symbiotype level, analysis of the 16S-23S internal transcribed spacer region showed that they were related to *R. leguminosarum*, *R. etli*, *R. gallicum*, *R. mongolense*, and *E. meliloti*.

The aim of the present study was to isolate and characterize rhizobia that nodulate local common bean varieties grown in five different edaphoclimatic regions of the mainland and the islands of Greece that have not previously been analysed. The genetic diversity of the isolates was assessed by DNA fingerprinting analysis and their phylogenetic affiliation at the species level was determined by sequencing analyses of 16S rRNA, *recA*, *atpD*, *glnII*, and *gyrB*. The taxonomic position at the symbiotype level was determined by analyses of the widely used symbiosis genes *nifH* and *nodC*.

## Results and discussion

**BOX-fingerprinting.** A total of 50 rhizobial strains were isolated from nodules of local common bean varieties grown in five different geographical regions located in the northern mainland of Greece (Imathia, Metsovo, Preveza) as well as in the Greek islands Karpathos, and Tinos (Supplementary Fig. S1). Strains were named "PV", representing the host *P. vulgaris* (PV) followed by two letters representing the region of isolation. Strains isolated from Imathia, Metsovo, Preveza, Karpathos, and Tinos were named either "IM" or "MT" or "PR" or "KA" or "TN", respectively. All isolates were fast-growing, acid-producing bacteria that formed effective pink-red coloured nodules (Nod+/Fix+) on their host of origin (Table 1).

The genetic diversity of the rhizobial isolates was firstly analyzed by BOX-PCR fingerprinting, which allows the differentiation among strains even of the same rhizobial species<sup>59</sup>. The isolates displayed six distinct BOX-PCR profiles (Table 1, Supplementary Fig. S2). The isolates in each BOX profile shared identical fingerprints

Strain <sup>a</sup>	BOXtype <sup>b</sup>	No isolates <sup>c</sup>	MLSA Clade	16S <sup>d</sup>	MLSA <sup>d</sup>	Strain definition	Symbiovar	nodC allele	Nodulation <sup>e</sup>	Geographic origin
PVKA6	1	7	1	Rph ATCC 14482 <sup>T</sup> (99.85%)	Rso CCBAU 03470 <sup>T</sup> (95.21%)	New lineage	Phaseoli	α	NodC+/Fix+	Karpathos
PVIM10	1	-	1	Rph ATCC 14482 <sup>T</sup> (99.85%)	Rso CCBAU 03470 <sup>T</sup> (95.21%)	New lineage	Phaseoli	α	NodC+/Fix+	Imathia
PVMT25	2	1	1	Rph ATCC 14482 <sup>T</sup> (99.85%)	Rso CCBAU 03470 <sup>T</sup> (95.26%)	New lineage	Phaseoli	α	NodC+/Fix+	Metsovo
PVTN21	3	23	2	Rso CCBAU 03470 <sup>T</sup> (99.92%)	Rso CCBAU 03470 <sup>T</sup> (100%)	<i>R. sophoriradicis</i>	Phaseoli	γ-b	NodC+/Fix+	Tinos
PVPR1	4	5	3	Ran CCBAU 23252 <sup>T</sup> (100%)	Ran CCBAU 23252 <sup>T</sup> (99.44%)	<i>R. anhuense</i>	Phaseoli	γ-a	NodC+/Fix+	Preveza
PVMT26	5	7	4	Ran CCBAU 23252 <sup>T</sup> (100%)	Rhi FH14 <sup>T</sup> (99.59%)	<i>R. hidalgonense</i>	Phaseoli	α	NodC+/Fix+	Metsovo
PVIM1	6	7	5	Rya SH22623 <sup>T</sup> (99.92%)	Raz 23C2 <sup>T</sup> (99.75%)	<i>R. azibense</i>	Gallicum	N/A	NodC+/Fix+	Imathia

**Table 1.** Characteristics of rhizobial strains obtained in this study and their phylogenetic relationships with the closest type species. Ran, *Rhizobium anhuense*; Raz, *Rhizobium azibense*; Rhi, *Rhizobium hidalgonense*; Rph, *Rhizobium phaseoli*; Rso, *Rhizobium sophoriradicis*; Rya, *Rhizobium yanglingense*; N/A not applicable. <sup>a</sup>Representative isolates from different BOX-groups and geographic regions. <sup>b</sup>Different numbers were assigned to represent each BOX-PCR pattern. <sup>c</sup>Number of isolates displaying identical BOX-PCR pattern. <sup>d</sup>Percent identities determined by multiple sequence alignments of partial gene sequences using the algorithm CLUSTAL Omega at <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>. <sup>e</sup>Nodulation was tested on common bean, the host of origin for each isolate.

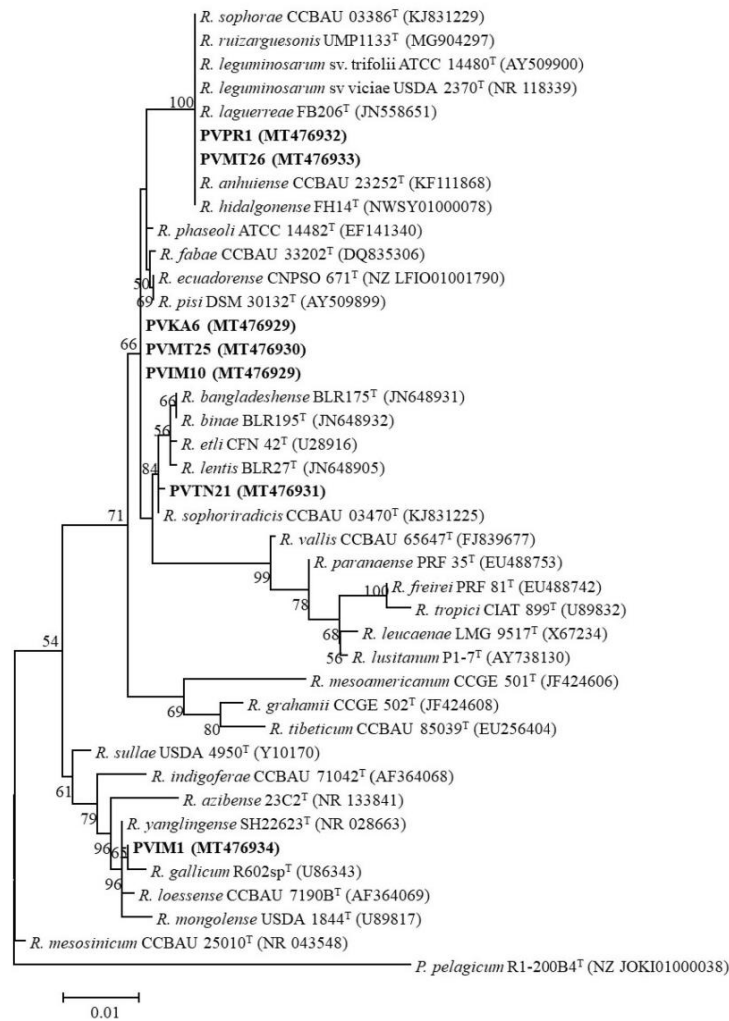
indicating that they might be clones. Noteworthy, isolates obtained from plants at different sampling sites displayed different BOX profiles, except for one, represented by PVKA6, which was present in isolates from Imathia, Karpathos, and Metsovo (Supplementary Fig. S2). Representative strains of each profile were chosen for further phylogenetic analysis.

**16S rRNA gene analysis.** According to the BOX grouping results, seven isolates (PVIM1, PVIM10, PVKA6, PVMT25, PVMT26, PVPR1, and PVTN21) representing six different BOX patterns and originating from different geographic regions were chosen for subsequent analyses. Nearly full-length *rrs* gene sequences (> 1350 bp) were determined for all representative isolates and a region of 1308 bp was considered for the alignment. The 16S rRNA gene phylogenetic tree showed that all isolates were closely related to the defined species within the genus *Rhizobium* (Fig. 1).

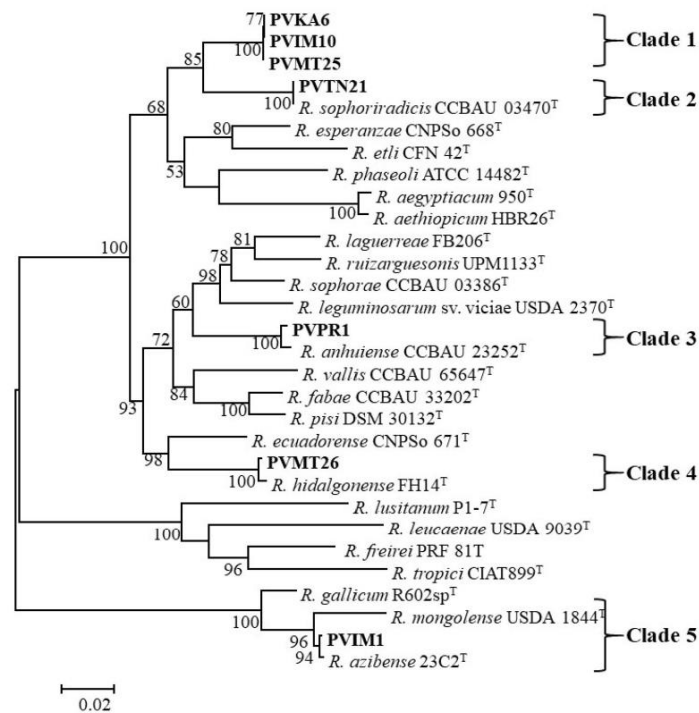
The strains PVKA6, PVIM10, and PVMT25 displayed identical *rfs* sequences and were clustered in a distinct group which was closely related to the type strains of *R. phaseoli* ATCC 14482<sup>T</sup>, *R. fabae* CCBAU 33202<sup>T</sup>, *R. ecuadorensis* CNPSO671<sup>T</sup>, and *R. pisi* DSM 30132<sup>T</sup> with a 99.85% identity. The *rfs* sequence of PVTN21 was clustered along with *R. sophoriradicis* CCBAU 03470<sup>T</sup> with 99.92% identity. The strains PVMT26, and PVPR1 were clustered on a well-supported branch containing *R. anhuense* CCBAU 23252<sup>T</sup>, *R. hidalgonense* FH14<sup>T</sup>, *R. laguerreae* FB206<sup>T</sup>, *R. ruizarguesonis* UMP1133<sup>T</sup>, *R. sophorae* CCBAU 03386<sup>T</sup>, and *R. trifolii* ATCC 14480<sup>T</sup> and shared identical *rfs* sequences. The strain PVIM1 grouped with *R. yanglingense* SH22623<sup>T</sup>, *R. loessense* CCBAU 7190B<sup>T</sup>, *R. gallicum* R602sp<sup>T</sup>, *R. mongolense* USDA 1844<sup>T</sup> with 99.92%, 99.85%, 99.77%, and 97.92% identity, respectively.

Despite that the 16S rRNA gene is widely used as a molecular marker in the taxonomy of prokaryotes, it is not sufficient to differentiate closely related species within the genus *Rhizobium* since different type strains share identical *rfs* sequences<sup>6,60</sup>. In agreement with previous studies, our results showed that *R. anhuense*, *R. laguerreae*, *R. hidalgonense* FH14<sup>T</sup>, *R. ruizarguesonis* UMP1133<sup>T</sup> and *R. sophorae*, as well as *R. ecuadorensis* and *R. pisi* shared identical *rfs* sequences<sup>8,13,61,62</sup>.

**Multilocus sequence analysis of housekeeping genes.** To clarify the 16S rRNA results, multilocus sequence analysis (MLSA) was performed using the housekeeping genes *recA*, *atpD*, *gyrB*, and *glnII* that have widely been used for delineation of *Rhizobium* species as well as for the identification of common bean nodulating rhizobia<sup>14,15,46,47,63,65</sup>. Ribeiro et al. (2009) described a useful MLST scheme for the identification and classification of rhizobial microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by using housekeeping and symbiotic genes. Tong et al. (2018) demonstrated that a 97.36% threshold in MLSA of three housekeeping genes (~1055 bp), was concordant with the 95% ANI threshold for rhizobial species definition. Interestingly, recent genomic and phylogenomic studies have shown that several *Rhizobium* species are organized in well-defined genome clusters with ANI values > 96%, whereas others displayed a continuum of diversity with ANI values > 88%<sup>67,68</sup>. These findings indicated that a default ANI cut-off cannot be applied across all *Rhizobium* species and even more a general threshold for rhizobial species delineation in MLSA cannot be specified as we also



**Figure 1.** Maximum likelihood phylogenetic tree based on nearly complete 16S rRNA gene sequences (1308 bp) showing taxonomic relationships of the strains representing the different BOX groups. Strains isolated in the present study are shown in boldface and their accession numbers are given in Supplementary Table S2. Type strains are indicated by superscript "T" and the GenBank accession numbers of the *rrs* sequences are indicated within parentheses. Bootstrap values (greater than 50%) were calculated for 500 replications and are shown at the nodes. The scale bar shows the number of nucleotide substitutions per site. Phylogenetic analysis was conducted in MEGA 6<sup>104</sup> (<https://www.megasoftware.net/>) using the maximum likelihood algorithm with the Kimura 2 parameter model plus Gamma rate distribution plus invariant site (K2 + G + I). *Pseudorhizobium pelagicum* R1-200B4<sup>T</sup> was used as outgroup to root the tree. The genus names are abbreviated as follows: *R.*, *Rhizobium*; *P.*, *Pseudorhizobium*.



**Figure 2.** Maximum likelihood phylogenetic tree based on partial concatenated sequences of *recA*, *atpD*, *gyrB*, and *glnII* (with a total of 1962 positions) showing taxonomic relationships of the studied strains and representative related type species. Strains isolated in the present study are shown in boldface and type strains are indicated by superscript “T”. GenBank accession numbers of the sequences are given in Supplementary Figs. S3–S6 and Supplementary Table S2. Bootstrap values (greater than 50%) were calculated for 500 replications and are shown at the nodes. The scale bar shows the number of nucleotide substitutions per site. Phylogenetic analysis was conducted in MEGA 6<sup>104</sup> (<https://www.megasoftware.net/>) using the maximum likelihood algorithm with the General Time Reversible model plus Gamma rate distribution plus invariant site (GTR + G + I). The genus names are abbreviated as follows: *R.*, *Rhizobium*.

pointed out previously<sup>69</sup>. Although phylogeny based on three core genes is not as accurate as the entire genome, ML analysis of few genes can still offer a demonstration for the taxonomic status of rhizobial strains.

In the present study, partial fragments of *recA*, *atpD*, *gyrB*, and *glnII* were amplified from all representative isolates. The number of parsimony-informative sites for every selected gene was estimated within the test *Rhizobium* taxa to find those who were the most phylogenetically informative. In our analysis, *gyrB* had the best percentage of parsimony-informative characters (29.12%), as previously reported<sup>64</sup>, followed by *recA* (25.54%), *atpD* (23.13%), and *glnII* (21.5%).

Gene sequences for *Rhizobium* type/reference strains were retrieved from the GenBank and correctly trimmed. The lengths of the alignments used were 462 bp, 441 bp 594 bp, and 465 bp for *recA*, *atpD*, *gyrB*, and *glnII*, respectively. Phylogenetic trees based on four individual housekeeping genes were constructed and the percentage identity of each gene was also calculated (Supplementary Figs. S3–S6, Supplementary Tables S3–S4). The lengths of the alignments used were 462 bp, 441 bp 594 bp, and 465 bp for *recA*, *atpD*, *gyrB*, and *glnII*, respectively.

The analysis of the concatenated sequences of housekeeping genes *recA*, *atpD*, *gyrB*, and *glnII* provided more robust phylogenies of the test strains and congruent with those of the individual gene trees (Fig. 2, Supplementary Figs. S3–S6). The test strains were grouped into five well-supported clades containing defined *Rhizobium* species, except for clade 1 that included the strains PVMT25, PVKA6, and PVIM10 originated from three different geographical regions of Greece (Fig. 2, Table 1). Phylogenetic analysis showed that the above strains belong to

wider cluster containing species nodulating *P. vulgaris*, while the closest relative was *R. sophoriradicis* CCBAU 03470<sup>T</sup> sharing 95.2% identity (Supplementary Table S5). This identity value was lower than those found among *Rhizobium* type strains analysed in the dataset of the present study (Supplementary Table S5). In our pairwise analysis, four pairs of *Rhizobium* type strains showed identity values in the *recA-atpD-glnI-gyrB* concatenated sequences higher than 95.2%, which were presented between the pairs of *R. azibense* 23C2<sup>T</sup> and *R. mongolense* USDA 1844<sup>T</sup> (97.25%), *R. gallicum* R602sp<sup>1</sup> and *R. azibense* 23C2<sup>T</sup> (96.69%), *R. pisi* DSM 30132<sup>T</sup> and *R. fabae* CCBAU 33202<sup>T</sup> (97.6%), *R. aethiopicum* HBR26<sup>1</sup> and *R. aegyptiacum* 950<sup>1</sup> (99.24%). These results, together with the position of PVMT25, PVKA6, and PVIM10 in the phylogenetic tree suggested that they might constitute a putative novel genospecies within *Rhizobium*. Previously, MLSA and whole-genome analyses defined 25 species or genospecies among the bean-nodulating rhizobia, while species affiliations for some previously named strains were reassigned<sup>6</sup>. Comparison of our strains with the defined genospecies and those isolated previously from bean root-nodules in various countries was also performed to determine their relationships. Since not all gene sequences were available for all strains, a concatenated phylogenetic tree based on the *recA* and *atpD* sequences was constructed (Supplementary Fig. S7). To avoid confusing the reader, in our analysis the grouping of strains taken from the literature did not correspond to the given species names at the time of their deposition, since many bean-nodulating strains were inaccurately assigned at the species level and therefore misnamed due to weak characterization. Interestingly, our isolates were closely related (>99.9%) to those of *Rhizobium* sp. M1 and M10 isolated from nodules of *P. vulgaris* in China<sup>70</sup>. Recently, the latter two strains were assigned to an unidentified genospecies named as *Rhizobium* sp. I, based on genomic data<sup>6</sup>. Moreover, strains possibly belonging to the genospecies *Rhizobium* sp. I have also been isolated from nodules of *P. vulgaris*, including *Rhizobium* sp. 1648, 1652, and 1706 from China<sup>65</sup>, CTG-412 and CTG-419 from Turkey<sup>71</sup>, L1, B1 and G2 from Iran<sup>5</sup>, GR12 from Spain<sup>44,72</sup>, *Rhizobium* sp. 9 T and 13 T from Croatia<sup>73</sup>. The strains of clade 1 are closely related to each other with identity values above 98.76% and along with our isolates may belong to a new species within *Rhizobium*.

The isolate PVTN21, representing 23 strains isolated from Tinos island of the Aegean Sea and Metsovo, displayed 100% *recA-atpD-gyrB-glnI* nucleotide identity to *R. sophoriradicis* CCBAU 03470<sup>T</sup>, isolated from the root nodule of the medicinal legume *Sophora flavescens* in China<sup>48</sup> and thus was unambiguously identified as *R. sophoriradicis* (Table 1). According to the *recA-atpD* phylogeny (Supplementary Fig. S7), PVTN21 was phylogenetically related to several strains isolated from *P. vulgaris* nodules, such as the strains JJW1, L101, 1587, 1617 and 1532 from China<sup>6,65,70</sup>, NAK368 and NAK378 from Kenya<sup>71</sup>, RHM67 and RHM19 from Morocco<sup>3</sup>, Kim5 from USA<sup>75</sup>, IE4803, IE950, IE4874, and IE4794 from Mexico<sup>43</sup> and CTG-423 and CTG-430 from Turkey<sup>71</sup>. All strains were grouped in a well-supported cluster (Clade 2) containing *R. sophoriradicis* CCBAU 03470<sup>T</sup> as well as the strains JJW1, L101, Kim5, and IE4803, which were recently assigned to *R. sophoriradicis* based on genomic data<sup>6</sup>. Therefore, all strains of clade 2 should be assigned to *R. sophoriradicis*. To the best of our knowledge, it is the first time that strains belonging to *R. sophoriradicis* were found in European soils. The wide distribution of *R. sophoriradicis* in *P. vulgaris* nodules all over the world suggests that this species is likely well adapted to different environmental conditions and various bean varieties.

The strain PVPRI, representing five isolates from one region (Table 1), was grouped in clade 3 along with *R. anhuiense* CCBAU 23252<sup>T</sup> and displayed 99.4% *recA-atpD-gyrB-glnI* sequence identity (Fig. 2, Table 1, Supplementary Table S5). *R. anhuiense* CCBAU 23252<sup>T</sup> has been originally isolated from nodules of *Vicia faba* in China and formed ineffective nodules with *P. vulgaris*<sup>76</sup>. However, strains closely related to *R. anhuiense* have been previously isolated from bean nodules and clustered in the same clade (Supplementary Fig. S7), including the strains Y27, S10, J3, JX3 from China<sup>70</sup> recently assigned to *R. anhuiense*<sup>6</sup>, *Rhizobium* sp. 1627, L6, L13, NC10, M8 also from China<sup>65,70</sup>, CTG-416 from Turkey<sup>5,71</sup> and LPA1410 from Spain<sup>47</sup>. The strains of clade 3 shared *recA-atpD* identity above 99% supporting their affiliation to *R. anhuiense*.

The strain PVMT26, representing seven isolates from one region (Table 1), showed high sequence relatedness to *R. hidalgonense* FH14<sup>T</sup> in all individual gene phylogenies, with identity values ranging from 99.3 to 100%, and in combined sequences of the four genes (99.6%) (Fig. 2, Supplementary Figs. S3–S6, Supplementary Tables S3–S4). Although this type strain was isolated from nodules of *Phaseolus vulgaris* grown in Mexico<sup>77</sup>, it did not form nodules on its original host *P. vulgaris* and other tested legumes evidenced the loss of its nodulation ability<sup>13</sup>. Despite that *nodC* gene was not amplified from the strain FH14<sup>T</sup>, it is present in the genome sequence of FH14<sup>T</sup> (NZ\_L0DW01000075). Strains closely related to *R. hidalgonense* have also been isolated from nodules of *Phaseolus vulgaris* grown in Spain (LBM1212, LBM1123, LCS0303, LCS0401, LCS0411, LEV0613 and RPVR24)<sup>46,47</sup>, Mexico (NH05)<sup>77</sup>, China (CCBAU 65761)<sup>65</sup>, Iran (Hm1)<sup>5</sup>, Kenya (NAK 327, 321, 334)<sup>74</sup>, and Croatia (25 T and 26 T)<sup>73</sup>. Noteworthy, strains closely related to *R. hidalgonense* have also been isolated from other legumes including *Acacia gummifera*<sup>78</sup>, *Indigofera arrecta* in Ethiopia<sup>3</sup>, *Trifolium* spp. in Ethiopia<sup>79</sup>, *T. semipilosum* in Kenya<sup>80</sup>, *Vicia faba* in Ethiopia and China<sup>78,81</sup>. The concatenated analysis of *recA-atpD* showed that all these strains formed a highly bootstrapped cluster with *R. hidalgonense* FH14<sup>T</sup> and displayed high nucleotide identities of *recA-atpD* (>99.4%). Therefore, several strains previously named as *R. leguminosarum*, such as LBM1212, LBM1123, LEV0613, WSM2012, NH05, and CCBAU 65761, or *Rhizobium* sp., such as NAK 327, 321, 334, LCS0401, LCS0411, and RPVR24 might be reclassified in the future as *R. hidalgonense* taking into account phenotypic and chemotaxonomic data.

Phylogenetic analysis based either on the individual or concatenated gene trees showed that PVIM1, representing seven isolates (Table 1), was clustered together with *Rhizobium azibense* 23C2<sup>T</sup>, isolated from common bean nodules in Tunisia<sup>7,36</sup>. Based on the pair-wise comparisons of concatenated sequences of four genes, PVIM1 displayed 99.75% identity to *R. azibense* 23C2<sup>T</sup> and consequently was assigned to this species (Fig. 2, Supplementary Table S5). Strains belonging to *R. azibense* have also been isolated from nodules of *P. vulgaris* (Supplementary Fig. S7), such as IE4868 from Mexico<sup>43</sup>, 8C-3, and GR42 from Spain<sup>7,36,45</sup>. The strain 8C-3 was originally classified as *R. gallicum*<sup>45</sup> but it was recently reassigned to *R. azibense* based on genomic data<sup>6</sup>. Interestingly, the strains IE4868, 8C-3 and GR42 formed a separate well-supported sub-clade closely related to *R.*



*azibense* 23C2<sup>T</sup> with identity values of *recA-atpD* concatenated sequences ranged from 96.1% to 96.4%, while the isolate PVIM1 displayed 99.88% identity. Therefore, the Spanish isolates appeared to be more similar to the Mexican ones, while the Greek isolates were phylogenetically closer to the Tunisian strain suggesting that the two sub-clades may represent distinct lineages within *R. azibense* species with a different origin.

Concerning the distribution of our isolates in different regions of Greece, Clade 1 isolates, possibly belonging to genospecies *Rhizobium* sp. I, were found in three regions with different soil textures (SCL, CL and SL) and pH ranging from 6.9 to 7.9 (Supplementary Fig. S1 and Supplementary Table S6). Interestingly, isolates of Clade 2 belonging to *R. sphaeroides* were predominant in Tinos (soil SCL, pH 8.1), although one isolate was isolated from another region (Metsovo) with different soil textures (SL) and pH 6.9. Despite that Clade 3, 4, and 5 isolates were identified solely in Preveza, Metsovo, and Imathia, respectively, these findings could not rule out the existence of similar isolates in other regions if more isolates were examined or genomic approaches were used. Therefore, the present study cannot provide conclusive evidence for the association of the rhizobial diversity with the edaphic parameters or host genotypes at our sampling sites. To define the factors influencing the distribution of different species or genospecies in Greek soil, further studies are required.

**Phylogenetic analysis of symbiosis genes *nodC* and *nifH*.** Currently, the *nodC* gene is commonly used to define symbiobars within rhizobial species. *P. vulgaris* is considered to be a promiscuous host since it can be nodulated by different rhizobial species and symbiobars<sup>1,2</sup>. At least thirty rhizobial species and eight symbiobars have been reported to nodulate common bean so far<sup>2,31,32</sup>. However, most bean-nodulating rhizobia, regardless of their species affiliation, belong to sv. phaseoli, which also exclusively nodulates *P. vulgaris*<sup>12,82</sup>. Previously, the sv. phaseoli was divided into three sub-clades, representing different alleles of *nodC* designated  $\alpha$ ,  $\gamma$ -a, and  $\gamma$ -b<sup>5,39,74</sup>. The  $\gamma$  *nodC* allele is considered to be the most widely distributed worldwide, implying a distribution of this allele together with bean seeds from their American distribution centers<sup>39,46,82,83</sup>.

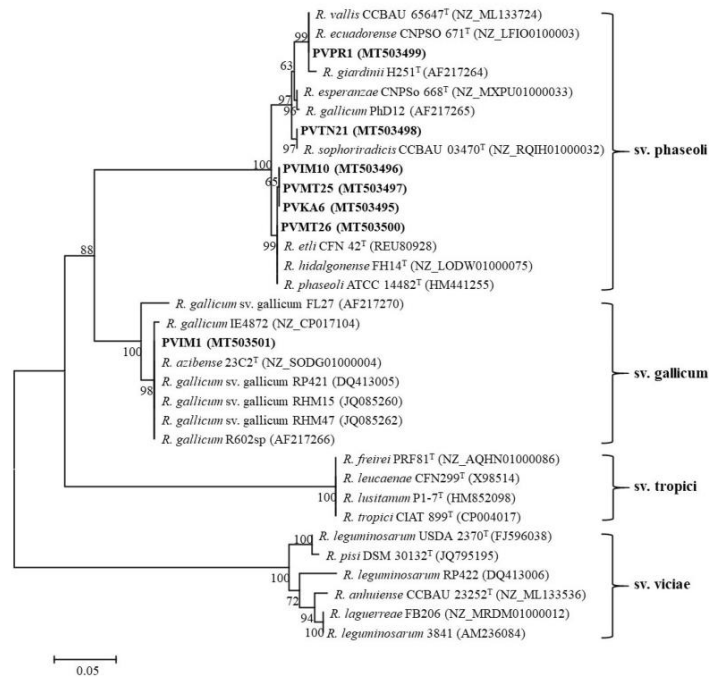
Partial nucleotide sequences of *nodC* and *nifH* were amplified and sequenced for all representative strains and their phylogenetic trees are shown in Figs. 3 and 4, respectively. In the *nodC* and *nifH* trees, most Greek isolates were placed into two well-supported clades that corresponded to symbiobars phaseoli and gallicum. The inclusion of representative strains carrying different *nodC* alleles from previous works in our phylogenetic analysis allowed us to define the *nodC* alleles of the studied strains (Fig. 5). Interestingly, isolates belonging to sv. phaseoli were clustered into three subgroups coincident with the previously described alleles  $\alpha$ ,  $\gamma$ -a, and  $\gamma$ -b<sup>4</sup>.

The  $\alpha$  allele was found in the Greek strains closely related to *R. hidalgonense* and *Rhizobium* sp. I. The  $\alpha$  allele is considered to have originated in America and was distributed to Europe and other continents with bean seeds<sup>39,48,64,83</sup>. The strain PVMT26, assigned as *R. hidalgonense*, carried the  $\alpha$  *nodC* allele, which was identical to that of the type strains *R. hidalgonense* (Mexico), *R. etli* (Mexico), and *R. phaseoli* (USA), and displayed 99.8% identity to the putative new lineages PVIM10, PVMT25, and PVKA6 (Fig. 3). The  $\alpha$  allele has also been found in strains of the undescribed species *Rhizobium* sp. I (M1, M10, H4, 1648, 1652, NAK 299, 26 T), *Rhizobium* sp. II (N541), *Rhizobium* sp. IX (FA23), *R. esperanzae* (TAL182), *R. phaseoli* (NAK 299, Ch24-10) and *Rhizobium* sp. RPVR04 and HBR42 (Fig. 5). For simplification, not all strains carrying the  $\alpha$  allele were included in the *nodC* phylogenetic tree. The identities of a *nodC* alleles found in various strains isolated from various countries ranged between 99.2 and 100%. In European soils, the  $\alpha$  allele has been found in strains affiliated to *R. hidalgonense* in Croatia<sup>73</sup>, *R. etli* in Spain<sup>46</sup>, and *R. leguminosarum* in Poland<sup>84</sup>.

The strain PVPR1 assigned to *R. anhuiense* harbored the  $\gamma$ -a *nodC* allele, which was identical to those of the type strains *R. vallis*, and *R. ecuadorensis* isolated from bean nodules in China and Ecuador, respectively<sup>8,23</sup>. The  $\gamma$ -a allele was also harbored by the type strains of *R. acidisoli* (Mexico), *R. esperanzae* (Mexico), and *R. sphaeroides* (China) sharing 99–99.5% identity with that of PVPR1. The  $\gamma$ -a allele is also present in strains belonging to other species, such as *R. etli*, *R. leguminosarum*, *R. lusitanum*, *R. phaseoli*, and *R. sphaeroides* with identity values among strains ranging from 97.2 to 100% (Fig. 5). Therefore, this allele was not only found in strains isolated from *P. vulgaris* nodules in various countries from all continents but also was the most prevalent within the rhizobial species nodulating common bean. In European soils, the  $\gamma$ -a *nodC* allele is the most frequent among bean-nodulating rhizobia regardless of the species to which they belong<sup>12,18,39,46–48,73,82,85</sup>. Considering that the sv. phaseoli evolved with common beans in America<sup>39,86</sup> and probably disseminated worldwide along with bean seeds<sup>2,87</sup>, it is possible that native rhizobia in various countries have acquired symbiotic genes typical of sv. phaseoli through horizontal gene transfer in the rhizosphere or within nodules<sup>88,89</sup>.

The Greek strains identified as *R. sphaeroides* and represented by PVTN21 harbored the  $\gamma$ -b allele, which is present in the type strains of *R. aethiopicum* and *R. sphaeroides* (Fig. 5). Noteworthy, all  $\gamma$ -b *nodC* alleles found in various strains were identical (100%) and were found in Asia (China, Iran), Africa (Ethiopia, Kenya, Morocco), and America (USA, Mexico)<sup>5,63,65,70,74,90,91</sup>. Most strains carrying this allele were closely related to *R. sphaeroides* (Kim5, IE4803, RHM67, RHM19, NAK368, NAK378, NAK387, L1, S1, G1, B1, 1706, 1587, 1617, and 1532), except for strain L101 that carried the  $\gamma$ -a allele and the strain IE4771 harbored a *nodC* gene similar to the sv. gallicum. Moreover, this allele is also present in *R. anhuiense* strains, such as JX3 Y27, S10, C15, J3 from China<sup>67,70</sup>, in *Rhizobium* sp. I (e.g. *Rhizobium* sp. G2) from Iran<sup>5</sup> and in *Rhizobium* sp. strains Mar-10 and HBR22 from Nepal and Ethiopia, respectively<sup>90,92</sup>. Therefore, this allele seems to be restricted to a few rhizobial species with prevalence in *R. sphaeroides*. To the best of our knowledge, this is the first time that the  $\gamma$ -b allele was found in European soils and within isolates assigned to *R. sphaeroides*.

Finally, strains identified as *Rhizobium azibense* and represented by PVIM1 harbored *nodC* genes identical (100%) to sv. gallicum, which is present in *R. azibense* 23C2<sup>T</sup>, and *R. gallicum* R602sp<sup>T</sup> isolated from bean nodules in Tunisia and France, respectively<sup>7,12,36</sup>. However, the *R. azibense* strains 8C-3, and GR42, isolated from bean nodules in Spain belong to sv. phaseoli harboring the  $\gamma$ -a allele<sup>7,44,45,93</sup> as shown in Fig. 5. Strains belonging to sv. gallicum have also been isolated from common bean in Austria<sup>41</sup>, Tunisia<sup>36,94</sup>, Morocco<sup>63,95</sup>, and Mexico<sup>35,51</sup>.

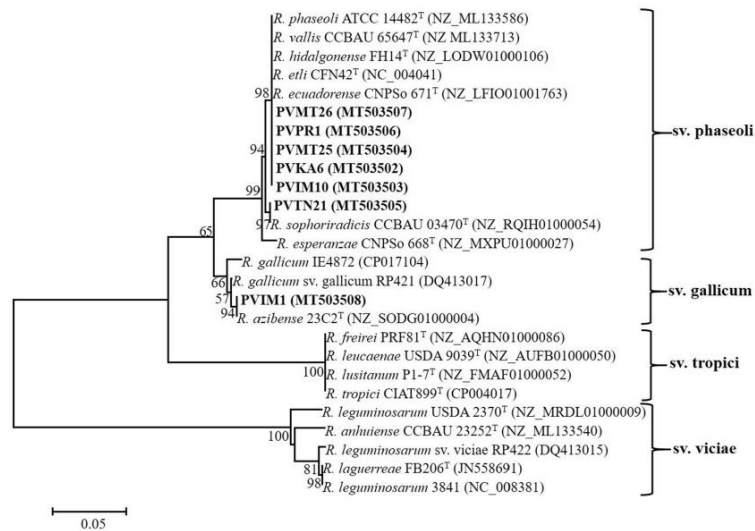


**Figure 3.** Maximum likelihood phylogenetic trees based on 543-bp alignment of the *nodC* nucleotide sequences showing the symbiobars to which the strains isolated in this study belong. The taxonomic relationships of the studied strains and the closest type strains of *Rhizobium* species are shown. Strains isolated in the present study are shown in boldface and their accession numbers are given in Supplementary Table S2. Type strains are indicated by superscript “T” and GenBank accession numbers of their sequences are indicated within parentheses. Bootstrap values (greater than 50%) were calculated for 500 replications and are shown at the nodes. The scale bar shows the number of nucleotide substitutions per site. Phylogenetic analysis was conducted in MEGA 6<sup>104</sup> (<https://www.megasoftware.net/>) using the maximum likelihood algorithm with the Tamura 3-parameter model plus invariant site (T92+I). The genus names are abbreviated as follows: *R.*, *Rhizobium*.

Previously, it was suggested that the occurrence of sv. gallicum in European soils may be correlated with the introduction of common beans along with their seed-borne symbionts from America<sup>61</sup>. Interestingly, the European and African strains harbored identical *nodC* gene sequences and to that of the type strain *R. gallicum* R602sp<sup>7</sup>, while the Mexican isolates IE4868, FL27, and IE4771 carry more diversified *nodC* genes with identity values 99.51%, 96.54%, and 93.83%, respectively. Although the Mexican isolate FL27 was previously demonstrated to be a poor N fixer in common bean nodules<sup>36</sup>, it remains to be investigated whether the European and African strains nodulating common bean possess a better symbiotic efficiency since they carry more divergent *nodC* genes.

Noteworthy, the sv. gallicum has also been reported to effectively nodulate legumes belonging to the genera *Leucaena*, *Macroptilium*, *Onobrychis*, *Sesbania*, *Caliandra*, *Gliricidia*, *Leucaena*, and *Piptadenia*<sup>12,26,44,45,52,78,97–99</sup>. The *nodC* gene sequences of our isolates were also identical to those found in sv. gallicum strains isolated from nodules of other legumes, such as the strains *Rhizobium* sp. AC91a from *Calliandra calothyrsus* in Ethiopia<sup>78</sup>, *R. tarimensis* AS1-101a and SPT1 from *Ammopiptanthus* in China, and *Rhizobium* sp. UPRM 8060 from *Piptadenia flava* in Puerto Rico<sup>100</sup>. For simplification, not all strains from other legumes were included in the *nodC* phylogenetic tree. The wide distribution of sv. gallicum in different continents in combination with its broad host range and its presence in different rhizobial species makes it a promising multi-host inoculant.

Phylogenetic analysis based on partial *nifH* sequences (726 bp) grouped the isolates into two clades that corresponded to symbiobars phaseoli and gallicum (Fig. 4). The phaseoli clade consisted of two sub-clades with an identity 99.3%. One sub-clade included the isolates PVIM10, PVKA6, PVMT25, PVMT26, and PVPR1, which shared identical *nifH* sequences to those of *R. hidalgonense* FH14<sup>T</sup>, *R. phaseoli* ATCC 14482<sup>T</sup>, *R. etli* CFN42<sup>T</sup>, *R.*

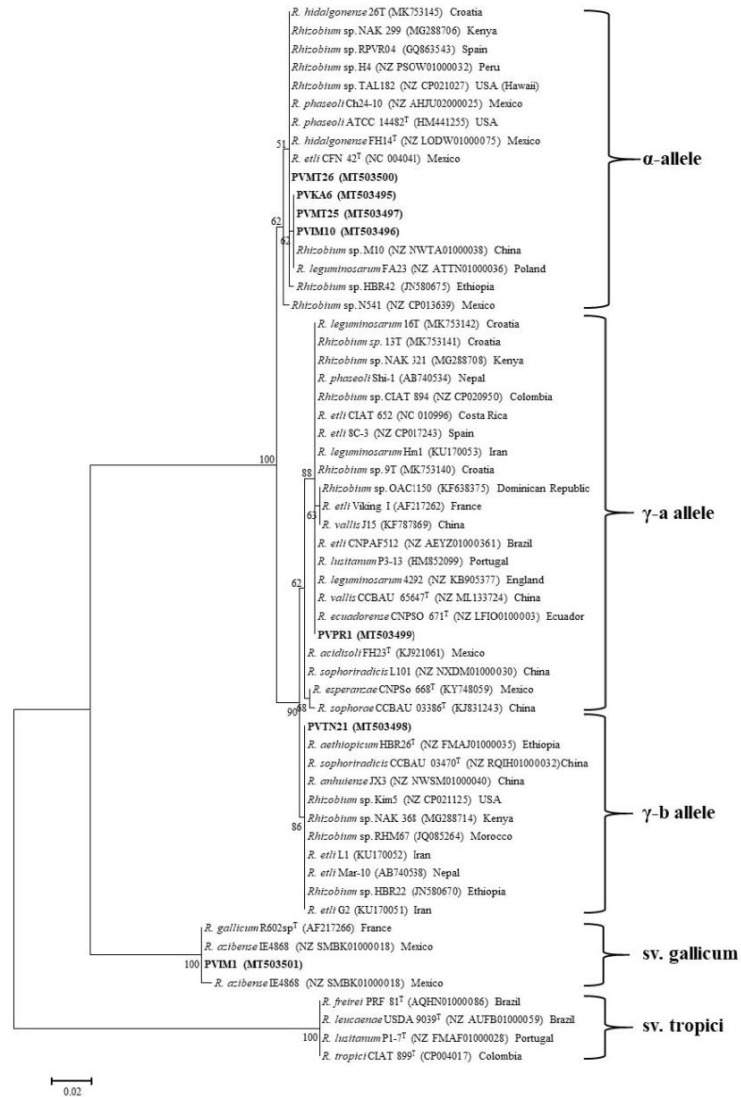


**Figure 4.** Maximum likelihood phylogenetic trees based on 726-bp alignment of *nifH* nucleotide sequences. The taxonomic relationships of the studied strains and the closest type strains of *Rhizobium* species are shown. Strains isolated in the present study are shown in boldface and their accession numbers are given in Supplementary Table S2. Type strains are indicated by superscript “T” and GenBank accession numbers of their sequences are indicated within parentheses. Bootstrap values (greater than 50%) were calculated for 500 replications and are shown at the nodes. The scale bar shows the number of nucleotide substitutions per site. Phylogenetic analysis was conducted in MEGA 6<sup>104</sup> (<https://www.megasoftware.net/>) using the maximum likelihood algorithm with the Tamura 3-parameter model plus Gamma rate distribution (T92 + G). The genus names are abbreviated as follows: *R.*, *Rhizobium*.

*ecuadorensis* CNPSo 671<sup>T</sup>, and *R. vallis* CCBau 65647<sup>T</sup>. Strain PVTN21 was separately clustered along with *R. sophoriradicis* CCBau 03470<sup>T</sup> displaying identical *nifH* sequences. Strain PVIM1 had an identical *nifH* sequence to that of *R. azibense* 23C2<sup>T</sup> and formed a clade that corresponded to symbiobar gallicum. Overall, the phylogenetic analysis of *nifH* was congruent with that of *nodC* phylogeny.

### Conclusions

In summary, the present study provides the first analysis on the phylogenetic diversity of indigenous rhizobia nodulating *P. vulgaris* in Greece by identifying them at the species and symbiobar level. Strains were affiliated to *R. anhuiense*, *R. azibense*, *R. hidalgonense*, *R. sophoriradicis*, and to a putative new genospecies consisting of various strains all over the world and provisionally named as *Rhizobium* sp. f. Most strains belonged to symbiobar phaseoli carrying the  $\alpha$ -,  $\gamma$ -a and  $\gamma$ -b alleles of *nodC* gene, while few of them belonged to symbiobar gallicum. To the best of our knowledge, it is the first time that strains assigned to *R. sophoriradicis* and harbored the  $\gamma$ -b allele were found in European soils. All strains formed effective symbioses with bean plants, suggesting that they are true symbionts of common bean. The analysis of the symbiobar phaseoli *nodC* alleles is congruent with previous findings in other European countries suggesting the American origin of sv. phaseoli. Moreover, the presence of *nodC* alleles in diverse rhizobial strains regardless of the species to which they belong raises the possibility that local rhizobia have acquired symbiosis genes via lateral gene transfer in the rhizosphere or within nodules. However, the *Rhizobium azibense* isolates were closely related and grouped together with African strains in both MLSA and *nodC* phylogenies suggesting their common evolutionary histories. Consequently, the current study increases the knowledge of the diversity, geographic distribution, and evolution of common bean-nodulating rhizobia in European soils and further provides a natural resource for the selection of highly efficient rhizobia that are more competitive and adapted to the local conditions.



**Figure 5.** Maximum likelihood phylogenetic tree based on *nodC* gene sequences (405 bp) showing phylogenetic relationships between the strains of the symbiobars phaseoli and gallicum isolated in this work and those in other geographical locations. Strains isolated in the present study are shown in boldface and type strains are indicated by superscript “T”. GenBank accession numbers of the sequences are indicated within parentheses. Bootstrap values (greater than 50%) were calculated for 1000 replications and are shown at the nodes. The scale bar shows the number of nucleotide substitutions per site. Phylogenetic analysis was conducted in MEGA 6<sup>104</sup> (<https://www.megasoftware.net/>) using the maximum likelihood algorithm with the Tamura 3-parameter model (T92). *R.*, *Rhizobium*.

## Methods

**Nodule and soil sampling.** Nodules were collected from local common bean varieties grown in five different geographical regions of Greece, namely as Imathia, Metsovo, Preveza, Tinos, and Karpathos (Supplementary Fig. S1). The sampling sites were located in fields with no history of rhizobial inoculation. The soil samples were slightly acidic to alkaline, with pH range 6.9 to 8.1.

**Isolation and purification of nodules and rhizobial strains.** Four nodules per plant were randomly selected from four plants of each region and at least three isolates were retained from each nodule. A great number of isolates were non-nodulating bacterial strains which were probably nodule endophytes or contaminants and they were not analyzed further. Finally, a total of 50 rhizobial strains were isolated in pure culture. Standard routine laboratory techniques were applied for the isolation of strains from the nodules<sup>101</sup>. Briefly, the nodules were surface disinfected by immersion in 70% ethanol for 60 s and then in 3–5% (v/v) solution of sodium hypochlorite for 2–4 min and were washed six times with sterile ddH<sub>2</sub>O. To check the absence of surface contamination, sterilized nodules were rolled over yeast-mannitol agar (YMA) plates<sup>101</sup> and aliquots of water from the last washing step were also spread on YMA plates and incubated at 28 °C for 2–5 days. Sterilized nodules were crushed in a drop of sterile distilled water and the nodule juice was streaked onto YMA plates and incubated under the same conditions as the control plates. Only nodules without any contaminants were considered for the isolation of rhizobial strains. Single colonies were subsequently purified by repeated streaking on YMA medium supplemented with Congo red until pure cultures of the isolates were obtained. Cultures of pure isolates were maintained in 20% glycerol–YMA broth at –80 °C.

**Nodulation tests.** The nodulation capability of each isolate was tested by inoculating seedlings of its original host grown in a greenhouse. Seeds were surface sterilised in 3% sodium hypochlorite for 10 min and rinsed six times. Surface-sterilized seeds were germinated on moist sterile filter paper in the dark at 22 °C for 3–4 days and then transferred to 250 ml pots containing vermiculite and watered with 0.5X Hoagland nutrient solution without nitrogen<sup>102</sup>. Each seedling was inoculated with 1 ml of rhizobial suspension (~10<sup>9</sup> cells ml<sup>-1</sup>). Three replicates were performed per isolate and plants were grown in greenhouse. Unfertilized and uninoculated seedlings were included as negative controls and uninoculated, nitrogen fertilized (5 mM KNO<sub>3</sub>) seedlings were used as positive controls. Six weeks after inoculation, one nodule per plant was excised and rhizobia were re-isolated as described above and their identity was confirmed by BOX-PCR fingerprinting. Nodulation capacity was recorded as positive (Nod+) when nodules were present and negative (Nod-) if were absent. Nitrogen fixation was considered effective when nodules were pink (Fix+) and ineffective if nodules were white (Fix-).

**DNA isolation and BOX-PCR fingerprinting.** Total template DNA was extracted from each isolate using the PureLink™ Genomic DNA kit (Thermo Fisher Scientific), according to manufacturer's instructions. BOX-PCR fingerprint analysis was performed by using the BOX A1R primer (Supplementary Table S1)<sup>103</sup>. PCR reactions were carried out in a final volume of 25 µl containing 100 ng of genomic template DNA, 1X reaction buffer (75 mM Tris–HCl pH 8.8, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.01% Tween 20, 2 mM MgCl<sub>2</sub>), 0.2 mM dNTPs, 2.5 U DreamTaq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific), and 50 pmol of primer. The PCR conditions were: initial denaturation at 94 °C for 7 min, 30 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 50 °C for 1 min, and extension at 65 °C for 8 min. PCR reactions were terminated by a final extension at 65 °C for 16 min. All PCR products were separated by electrophoresis in 1.5% agarose gels containing 0.5 µg ml<sup>-1</sup> ethidium bromide at 60 V for 3.0 h. A molecular marker 1 kb DNA Ladder, (Invitrogen) was included on the left. The gels were scanned with the GelDoc system (Bio-Rad, Hercules, CA).

**PCR amplification and sequencing.** The DNA fragments of 16S rRNA, *recA* (DNA recombination protein), *atpD* (ATP synthase subunit beta), *gyrB* (DNA gyrase B) and *glnII* (glutamine synthetase II) were amplified by PCR, using the primer pairs described in Supplementary Table S1. PCR amplification and sequencing were carried out as previously described<sup>69</sup>. Primers taken from the literature or designed in the present study were slightly modified in such a way to include at their 5' ends either T7 or SP6 primer sequence to facilitate direct sequencing of the amplicons. Each PCR mixture contained the following: approximately 50 ng genomic DNA, 20 pmol each primer, 200 µM dNTPs (Invitrogen), Phusion High Fidelity DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific), and the respective 10X polymerase buffer in a final reaction volume of 50 µl. The PCR conditions for the amplification of each gene fragment are described in Supplementary Table S1. PCR products from the aforementioned genes were purified using the PureLink™ Quick Gel Extraction kit (Thermo Fisher Scientific). Purified DNA fragments were directly sequenced on both strands using the standard primers attached in the corresponding primer sequences. All PCR products were commercially sequenced by CEMIA (cemia.eu), Greece.

**Phylogenetic analyses.** The sequences of *rrs* genes were compared with those of bacterial type strains using the EzTaxon-e server (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net>). BLAST searches were done at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) server using BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Sequences from closely related type strains, as listed on the List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (LPSN) ([www.bacterio.net](http://www.bacterio.net)), and reference strains were retrieved for phylogenetic analyses from the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Tools/sss/fasta/nucleotide.html>). For pairwise distance matrices, the multiple sequence alignments were performed using the algorithm CLUSTAL Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) provided by the European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI). For phylogenetic analyses, the partial gene sequences obtained in this study, together with sequences retrieved from GenBank were aligned using the

CLUSTALW software in the MEGA 6.0 software package<sup>104</sup>. Phylogenetic trees were constructed using either the neighbor-joining (NJ) or Maximum likelihood (ML) methods in MEGA 6.0 software package. The gene sequences were appropriately trimmed and were concatenated. The best-fit models of nucleotide substitution were determined in MEGA 6 and the most appropriate were selected for the construction of ML trees as referred in the figure legends.

**Nucleotide sequence accession numbers.** All sequences from common bean isolates were deposited in the GenBank database and the accession numbers are listed in Supplementary Table S2.

**Ethics approval.** This article does not contain any studies with human participants and/or animals performed by any of the authors. The formal consent is not required in this study.

#### Data availability

Sequence data that support the findings of this study have been deposited in GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) with the accession codes: MT476928-MT476934 and MT503467-MT503508. Sequence data MT503467-MT503508 will be publicly available upon article publication but are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 7 December 2020; Accepted: 31 March 2021

Published online: 21 April 2021

#### References

- Michiels, J. et al. *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. *FEMS Microbiol. Ecol.* **26**, 193–205. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1998.tb00505.x> (1998).
- Shamseldin, A. & Velázquez, E. The promiscuity of *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) for nodulation with rhizobia: a review. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 63. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02839-w> (2020).
- Aserse, A. A., Räsänen, L. A., Aseffa, F., Hailemariam, A. & Lindström, K. Diversity of sporadic symbionts and nonsymbiotic endophytic bacteria isolated from nodules of woody, shrub, and food legumes in Ethiopia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 10117–10134. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5248-4> (2013).
- Aserse, A. A., Woyke, T., Kyripides, N. C., Whitman, W. B. & Lindström, K. Draft genome sequence of type strain HBR26T and description of *Rhizobium aethiopicum* sp. nov. *Stand. Genom. Sci.* **12**, 14. <https://doi.org/10.1186/s40793-017-0220-z> (2017).
- Rouhrazzi, K., Khodakaramian, G. & Velázquez, E. Phylogenetic diversity of rhizobial species and symbionts nodulating *Phaseolus vulgaris* in Iran. *FEMS Microbiol. Lett.* **363**, 024. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw024> (2016).
- Tong, W. et al. Genomic insight into the taxonomy of *Rhizobium* genospecies that nodulate *Phaseolus vulgaris*. *Syst. Appl. Microbiol.* **41**, 300–310. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.03.001> (2018).
- Mnasri, B. et al. *Rhizobium azibense* sp. nov., a nitrogen fixing bacterium isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64**, 1501–1506. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.058651-0> (2014).
- Ribeiro, R. A. et al. *Rhizobium ecuadorensis* sp. nov., an indigenous N<sub>2</sub>-fixing symbiont of the Ecuadorian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genetic pool. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**, 3162–3169. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000392> (2015).
- Cordeiro, A. B., Ribeiro, R. A., Helene, L. C. F. & Hungria, M. *Rhizobium esperanzae* sp. nov., a N<sub>2</sub>-fixing root symbiont of *Phaseolus vulgaris* from Mexican soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **67**, 3937–3945. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.002225> (2017).
- Segovia, L., Young, J. P. W. & Martínez-Romero, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**, 374–377. <https://doi.org/10.1099/0020713-43-2-374> (1993).
- Dall'Agnol, R. F. et al. *Rhizobium freirei* sp. nov., a symbiont of *Phaseolus vulgaris* that is very effective at fixing nitrogen. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**, 4167–4173. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.052928-0> (2013).
- Amarger, N., Macheret, V. & Laguerre, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 996–1006. <https://doi.org/10.1099/0020713-47-4-996> (1997).
- Yan, J. et al. *Rhizobium hidalgonense* sp. nov., a nodule endophytic bacterium of *Phaseolus vulgaris* in acid soil. *Arch. Microbiol.* **199**, 97–104. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1281-x> (2017).
- Ribeiro, R. A. et al. Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**, 1179–1184. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.032912-0> (2012).
- Valverde, A., Igual, J. M., Peix, A., Cervantes, E. & Velázquez, E. *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 2631–2637. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64402-0> (2006).
- López-López, A. et al. *Rhizobium grahamii* sp. nov., from nodules of *Dalea leporina*, *Leucaena leucocephala* and *Clitoria ternatea*, and *Rhizobium mesoamericanum* sp. nov., from nodules of *Phaseolus vulgaris*, siratro, cowpea and *Mimosa pudica*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**, 2264–2271. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.033555-0> (2012).
- van Berkum, P., Beyene, D., Bao, G., Campbell, T. A. & Eardly, B. D. *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 13–22. <https://doi.org/10.1099/0020713-48-1-13> (1998).
- Dall'Agnol, R. F. et al. *Rhizobium paranaense* sp. nov., an effective N<sub>2</sub>-fixing symbiont of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with broad geographical distribution in Brazil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64**, 3222–3229. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.064543-0> (2014).
- Ramírez-Bahena, M. H. et al. Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889, *R. phaseoli* Dangeard 1926AL and *R. trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *Rhizobium leguminosarum* DSM 30132<sup>T</sup> (=NCIMB 11478<sup>T</sup>) into the new species *Rhizobium pisi* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 2484–2490. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65621-0> (2008).
- Jiao, Y. S. et al. *Rhizobium sophorae* sp. nov. and *Rhizobium sophoradicis* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of the medicinal legume *Sophora flavescens*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**, 497–503. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.068916-0> (2015).
- Hou, B. C. et al. *Rhizobium tibeticum* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from *Trigonella archiducis-nicolai* (Sirj.) Vassilcz. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 3051–3057. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.009647-0> (2009).
- Martínez-Romero, E. et al. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**, 417–426. <https://doi.org/10.1099/0020713-41-3-417> (1991).
- Wang, F. et al. *Rhizobium vallis* sp. nov., isolated from nodules of three leguminous species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**, 2582–2588. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.026484-0> (2011).

24. Mnasri, B., Mrabet, M., Laguerre, G., Aouani, M. E. & Mhamdi, R. Salt-tolerant rhizobia isolated from a Tunisian oasis that are highly effective for symbiotic N<sub>2</sub>-fixation with *Phaseolus vulgaris* constitute a novel biovar (bv. mediterraneense) of *Sinorhizobium meliloti*. *Arch. Microbiol.* **187**, 79–85. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0173-x> (2007).
25. Sadovsky, M. J., Cregan, P. B. & Keyser, H. H. Nodulation and nitrogen fixation efficacy of *Rhizobium fredii* with *Phaseolus vulgaris* genotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1907–1910 (1988).
26. Mhamdi, R., Laguerre, G., Aouani, M. E., Mars, M. & Amarger, N. Different species and symbiotic genotypes of field rhizobia can nodulate *Phaseolus vulgaris* in Tunisian soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* **41**, 77–84. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00968.x> (2012).
27. Toledo, I., Lloret, L. & Martínez-Romero, E. *Sinorhizobium americanus* sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico. *Syst. Appl. Microbiol.* **26**, 54–64. <https://doi.org/10.1078/0732020032337317> (2003).
28. Grange, L. & Hungria, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. *Soil Biol. Biochem.* **36**, 1389–1398. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.03.005> (2004).
29. Han, S. Z., Wang, E. T. & Chen, W. X. Diverse bacteria isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* and species within the genera *Campylobacter* and *Cassia* grown in China. *Syst. Appl. Microbiol.* **28**, 265–276. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2004.12.005> (2005).
30. Talbi, C. et al. *Burkholderia phymatum* strains capable of nodulating *Phaseolus vulgaris* are present in Moroccan soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 4587–4591. <https://doi.org/10.1128/AEM.02886-09> (2010).
31. Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., Velázquez, E. & Bedmar, E. J. Bacterial associations with legumes. *CRC Crit. Rev. Plant. Sci.* **34**, 17–42. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.897899> (2015).
32. Rogel, M. A., Ormeño-Orrillo, E. & Martínez Romero, E. Symbionts in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Syst. Appl. Microbiol.* **34**, 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.11.015> (2011).
33. Román-Ponce, B. et al. *Rhizobium acidisoli* sp. nov., isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* in acid soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66**, 398–406. <https://doi.org/10.1099/jisem.0.000732> (2016).
34. Martínez, E., Pardo, M. A., Palacios, R. & Cevallos, M. A. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity to *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.* **131**, 1779–1786. <https://doi.org/10.1099/00221287-131-7-1779> (1985).
35. van Rhijn, P. J., van Feys, B., Verreth, C. & Vanderleyden, J. Multiple copies of *nodD* in *Rhizobium tropici* CIAT899 and BR816. *J. Bacteriol.* **175**, 438–447. <https://doi.org/10.1128/jb.175.2.438-447> (1993).
36. Mnasri, B., Saidi, S., Chihouai, S. A. & Mhamdi, R. *Sinorhizobium americanum* symbiotype mediterraneense is a predominant symbiont that nodulates and fixes nitrogen with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a Northern Tunisian field. *Syst. Appl. Microbiol.* **35**, 263–269. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.04.003> (2012).
37. Wang, E. T. et al. *Rhizobium etli* bv. mimosae, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 1479–1491. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-4-1479> (1999).
38. Aguilar, O. M. et al. Prevalence of the *Rhizobium etli*-like allele in genes coding for 16S rRNA among the indigenous rhizobial populations found associated with wild beans from the Southern Andes in Argentina. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3520–3524. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.9.3520-3524> (1998).
39. Aguilar, O. M., Riva, O. & Peltzer, E. Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 13548–13553. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405321101> (2004).
40. Bernal, G. & Graham, P. H. Diversity in the rhizobia associated with *Phaseolus vulgaris* L. in Ecuador, and comparisons with Mexican bean rhizobia. *Can. J. Microbiol.* **47**, 526–534. <https://doi.org/10.1139/w01-037> (2001).
41. Eardly, B. D., Wang, F. S., Whittam, T. S. & Selander, R. K. Species limits in *Rhizobium* populations that nodulate the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 507–512 (1995).
42. Martínez-Romero, E. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: Overview and perspectives. *Plant Soil* **252**, 11–23. <https://doi.org/10.1023/A:1024199013926> (2003).
43. Silva, C., Vinuesa, P., Eguiarte, L. E., Martínez-Romero, E. & Souza, V. *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in a traditionally managed milpa plot in Mexico: Population genetics and biogeographic implications. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 884–893. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.884-893.2003> (2003).
44. Herrera-Cervera, J. A. et al. At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **30**, 87–97. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00638.x> (1999).
45. Rodríguez-Navarro, D. N., Buendía, A. M., Camacho, M., Lucas, M. M. & Santamaría, C. Characterization of *Rhizobium* spp. bean isolates from South-West Spain. *Soil Biol. Biochem.* **32**, 1601–1613. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00074-2](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00074-2) (2000).
46. García-Fraile, P. et al. *Phaseolus vulgaris* is nodulated in northern Spain by *Rhizobium leguminosarum* strains harboring two *nodC* alleles present in American *Rhizobium etli* strains: Biogeographical and evolutionary implications. *Can. J. Microbiol.* **56**, 657–666. <https://doi.org/10.1139/W10-048> (2010).
47. Mulas, D. et al. Distribution and efficiency of *Rhizobium leguminosarum* strains nodulating *Phaseolus vulgaris* in northern Spanish soils: Selection of native strains that replace conventional N fertilization. *Soil Biol. Biochem.* **43**, 2283–2293. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.07.018> (2011).
48. Lozano, L. et al. Evolutionary dynamics of insertion sequences in relation to the evolutionary histories of the chromosome and symbiotic plasmid genes of *Rhizobium etli* populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 6504–6513. <https://doi.org/10.1128/AEM.01001-10> (2010).
49. Geniaux, E., Laguerre, G. & Amarger, N. Comparison of geographically distant populations of *Rhizobium* isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Ecol.* **2**, 295–302. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00022.x> (1993).
50. Young, J. P. W., Downer, H. L. & Eardly, B. D. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTA1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *J. Bacteriol.* **173**, 2271–2277. <https://doi.org/10.1128/jb.173.7.2271-2277.1991> (1991).
51. Sessitsch, A., Hardarson, G., Akkermans, A. D. L. & de Vos, W. M. Characterization of *Rhizobium etli* and other *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. in an Austrian soil. *Mol. Ecol.* **6**, 601–608. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1997.00223.x> (1997).
52. Sessitsch, A., Ramírez-Saad, H., Hardarson, G., Akkermans, A. L. & de Vos, W. M. Classification of Austrian rhizobia and the Mexican isolate FL27 obtained from *Phaseolus vulgaris* L. as *Rhizobium gallicum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 1097–1101. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-4-1097> (1997).
53. Buttery, B. R. & Dirks, V. A. The effects of soybean cultivar, rhizobium strain and nitrate on plant growth, nodule mass and acetylene reduction rate. *Plant Soil* **98**, 285–293. <https://doi.org/10.1007/BF02374832> (1987).
54. Graham, P. H. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: A review. *Field Crop Res.* **4**, 93–112. [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(81\)90060-5](https://doi.org/10.1016/0378-4290(81)90060-5) (1981).
55. Peoples, M. et al. The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems. *Symbiosis* **48**, 1–17. <https://doi.org/10.1007/BF03179980> (2009).
56. Remans, R. et al. Effect of *Rhizobium-Azospirillum* coinoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba. *Plant Soil* **312**, 25–37. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9606-4> (2008).

57. Herridge, D. F., Peoples, M. B. & Boddey, M. B. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil* **311**, 1–18. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9668-3> (2008).
58. Ipsilantis, I., Lotos, L. & Tsialtas, I. T. Diversity and nodulation effectiveness of rhizobia and mycorrhizal presence in climbing dry beans grown in Prespa lakes plain, Greece. *Arch. Microbiol.* **201**, 1151–1161. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01679-z> (2019).
59. de Lajudie, P. M. *et al.* Minimal standards for the description of new genera and species of rhizobia and agrobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **69**, 1852–1863. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003426> (2019).
60. Gevers, D. *et al.* Re-evaluating prokaryotic species. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 733–739. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1236> (2005).
61. Jorin, B., Palacios, J. M., Peix, A. & Imperial, J. *Rhizobium rutargensis* sp. nov., isolated from nodules of *Pisum sativum* L. *Syst. Appl. Microbiol.* **43**, 126090. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126090> (2020).
62. Saidi, S. *et al.* *Rhizobium laguerreae* sp. nov. nodulates *Vicia faba* on several continents. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64**, 242–247. <https://doi.org/10.1099/ijis.0.052191-0> (2014).
63. Faghire, M. *et al.* Identification at the species and symbiovar levels of strains nodulating *Phaseolus vulgaris* in saline soils of the Marrakech region (Morocco) and analysis of the *otsA* gene putatively involved in osmotolerance. *Syst. Appl. Microbiol.* **35**, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.02.003> (2012).
64. Ribeiro, R. A. *et al.* Novel *Rhizobium* lineages isolated from root nodules of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Andean and Mesoamerican areas. *Res. Microbiol.* **164**, 740–748. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.05.002> (2013).
65. Wang, L. *et al.* Biodiversity and biogeography of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Shaanxi Province. *Syst. Appl. Microbiol.* **39**, 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.02.001> (2016).
66. Ribeiro, R. A., Barcellos, F. G., Thompson, F. L. & Hungria, M. Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. *Res. Microbiol.* **160**, 297–306. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.03.009> (2009).
67. González, V. *et al.* Phylogenomic *Rhizobium* species are structured by a continuum of diversity and genomic clusters. *Front. Microbiol.* **10**, 910. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00910> (2019).
68. Young, J. P. W. *et al.* Defining the *Rhizobium leguminosarum* species complex. *Genes* **12**, 111. <https://doi.org/10.3390/genes1201111> (2021).
69. Efstathiadou, E., Savvas, D. & Tampakaki, A. P. Genetic diversity and phylogeny of indigenous rhizobia nodulating faba bean (*Vicia faba* L.) in Greece. *Syst. Appl. Microbiol.* **43**, 126149. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126149> (2020).
70. Cao, Y., Wang, E. T., Zhao, L., Chen, W. M. & Wei, G. H. Diversity and distribution of rhizobia nodulated with *Phaseolus vulgaris* in two ecoregions of China. *Soil Biol. Biochem.* **78**, 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.07.026> (2014).
71. Gurkanli, C. T., Ozkoc, I. & Gunduz, I. Genetic diversity of rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Central Black Sea region of Turkey. *Ann. Microbiol.* **63**, 971–987. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0551-3> (2013).
72. Vinuesa, P. *et al.* Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from *rrs*, *atpD*, *recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of *Sesbania* microsymbionts from Venezuelan wetlands. *Syst. Appl. Microbiol.* **28**, 702–716. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.05.007> (2005).
73. Rajnovic, I. *et al.* Phylogenetic diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* in Croatia and definition of the symbiovar phaseoli within the species *Rhizobium pisi*. *Syst. Appl. Microbiol.* **42**, 126019. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2019.126019> (2019).
74. Mwenda, G. M., O'Hara, G. W., De Meyer, S. E., Howieson, J. G. & Terpolilli, J. J. Genetic diversity and symbiotic effectiveness of *Phaseolus vulgaris*-nodulating rhizobia in Kenya. *Syst. Appl. Microbiol.* **41**, 291–299. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.02.001> (2018).
75. Josephson, K. L. & Pepper, I. L. Competitiveness and effectiveness of strains of *Rhizobium phaseoli* isolated from the Sonoran Desert. *Soil Biol. Biochem.* **16**, 651–655. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(84\)90086-5](https://doi.org/10.1016/0038-0717(84)90086-5) (1984).
76. Zhang, Y. *et al.* *Rhizobium anhuiense* sp. nov., isolated from effective nodules of *Vicia faba* and *Pisum sativum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**, 2960–2967. <https://doi.org/10.1099/ijis.0.000365> (2015).
77. Verástegui-Valdés, M. M. *et al.* Microsymbionts of *Phaseolus vulgaris* in acid and alkaline soils of Mexico. *Syst. Appl. Microbiol.* **37**, 605–612. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.08.005> (2014).
78. Degefu, T., Wolde-Meskel, E. & Frostegård, Å. Phylogenetic diversity of *Rhizobium* strains nodulating diverse legume species growing in Ethiopia. *Syst. Appl. Microbiol.* **36**, 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.05.004> (2013).
79. Reeve, W. *et al.* Genome sequence of the *Trifolium rupeppellianum*-nodulating *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii strain WSM2012. *Stand. Genom. Sci.* **9**, 283–293. <https://doi.org/10.4056/signs.4528262> (2013).
80. Howieson, J. G., Yates, R. J., O'Hara, G. W., Ryder, M. & Real, D. The interactions of *Rhizobium leguminosarum* biovar. trifolii in nodulation of annual and perennial *Trifolium* spp. from diverse centres of origin. *Aust. J. Exp. Agric.* **45**, 199–207. <https://doi.org/10.1071/EA03167> (2005).
81. Chen, Y. X. *et al.* Faba Bean (*Vicia faba* L.) Nodulating rhizobia in Panxi, China, are diverse at species, plant growth promoting ability, and symbiosis related gene levels. *Front. Microbiol.* **20**, 1338. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01338> (2018).
82. Valverde, A., Velázquez, E., Cervantes, E., Igual, J. M. & van Berkum, P. Evidence of an American origin for symbiosis-related genes in *Rhizobium lusitanum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 5665–5670. <https://doi.org/10.1128/AEM.02017-10> (2011).
83. Diaz-Alcántara, C. A. *et al.* Analysis of rhizobial strains nodulating *Phaseolus vulgaris* from Hispaniola Island, a geographic bridge between Meso and South America and the first historical link with Europe. *Syst. Appl. Microbiol.* **37**, 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.09.005> (2014).
84. Recv, W. *et al.* A genomic encyclopedia of the root nodule bacteria: Assessing genetic diversity through a systematic biogeographic survey. *Stand. Genom. Sci.* **10**, 14. <https://doi.org/10.1186/1944-3277-10-14> (2015).
85. Laguerre, G. *et al.* Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology* **147**, 981–993. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-4-981> (2001).
86. Martínez-Romero, E. & Caballero-Mellado, J. *Rhizobium* polygenies and bacterial genetic diversity. *Crit. Rev. Plant Sci.* **15**, 113–140. <https://doi.org/10.1080/07352689.1996.10393183> (1996).
87. Pérez-Ramírez, N. O., Rogel, M. A., Wang, E., Castellanos, J. Z. & Martínez-Romero, E. Seeds of *Phaseolus vulgaris* bean carry *Rhizobium etli*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **26**, 289–296. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1998.tb00513.x> (1998).
88. Andrews, M. *et al.* Horizontal transfer of symbiosis genes within and between rhizobial genera: Occurrence and importance. *Genes* **9**, 321. <https://doi.org/10.3390/genes9070321> (2018).
89. Bañuelos-Vázquez, L. A. *et al.* Transfer of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 to endophytic bacteria inside nodules. *Front. Microbiol.* **11**, 1752. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01752> (2020).
90. Aserse, A. A., Räsänen, L. A., Assefa, F., Hailemariam, A. & Lindström, K. Phylogeny and genetic diversity of native rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Ethiopia. *Syst. Appl. Microbiol.* **35**, 120–131. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.11.005> (2012).
91. Santamaría, R. I. *et al.* Complete genome sequences of eight *Rhizobium* symbionts associated with common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Genome Announc.* <https://doi.org/10.1128/genomeA.00645-17> (2017).
92. Adhikari, D., Itoh, K. & Suyama, K. Genetic diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodulating rhizobia in Nepal. *Plant Soil* **368**, 341–353. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1518-7> (2013).
93. Bustos, P. *et al.* Complete genome sequences of three *Rhizobium gallicum* symbionts associated with common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Genome Announc.* **5**, e00030-117. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00030-17> (2017).



94. Mhamdi, R., Jebara, M., Aouani, M. E., Ghrir, R. & Mars, M. Genotypic diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. grown in Tunisian soils. *Biol. Fert. Soils* **28**, 313–320. <https://doi.org/10.1007/s003740050499> (1999).
95. Mouhsine, B., Prell, J., Filali-Maltouf, A., Priefer, U. B. & Aurag, J. Diversity, phylogeny and distribution of bean rhizobia in salt-affected soils of North-West Morocco. *Symbiosis* **43**, 83–96 (2007).
96. Pñero, D., Martínez, E. & Selander, R. K. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2825–2832 (1988).
97. Laguerre, G., van Berkum, P., Amarger, N. & Prévost, D. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis* and *Onobrychis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4748–4758 (1997).
98. Silva, C., Eguarte, L. E. & Souza, V. Reticulated and epidemic population genetic structure of *Rhizobium etli* biovar phaseoli in a traditionally managed locality in Mexico. *Mol. Ecol.* **8**, 277–287. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1999.00564.x> (1999).
99. Zurdo-Piñeiro, J. et al. Identification of fast-growing rhizobia nodulating tropical legumes from Puerto Rico as *Rhizobium gallicum* and *Rhizobium tropici*. *Syst. Appl. Microbiol.* **27**, 469–477. <https://doi.org/10.1078/0723202041438437> (2004).
100. Bournaud, C. et al. *Burkholderia* species are the most common and preferred nodulating symbionts of the *Pipadenia* group (tribe Mimosaceae). *PLoS ONE* **8**, e63478. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063478> (2013).
101. Vincent, J. M. A *Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria* IBP Handbook (Black Well Scientific, 1970).
102. Hoagland, D. R. & Arnon, D. I. *The Water-Culture Method for Growing Plants Without Soil*. (University of California, College of Agriculture, Agricultural Experiment Station, 1950).
103. Versalovic, J., Schneider, M., de Brulin, F. J. & Lupski, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell Biol.* **5**, 25–40 (1994).
104. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197> (2013).

### Acknowledgements

This research was funded by the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under Grant Agreement No. 727973, project “TRUE- Transition paths to sustainable legume-based systems in Europe” and the Hellenic Foundation for Research and Innovation (HFRI) under the HFRI PhD Fellowship grant (Fellowship Number: 957).

### Author contributions

A.P.T., E.E., G.N., and D.S. conceived and designed the experiments, E.E. performed the experiments, A.P.T., E.E., G.N., and D.S., participated in collecting common bean nodules, A.P.T. analyzed the data and wrote the paper. All authors read and approved the manuscript.

### Competing interests

The authors declare no competing interests.


### Additional information

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88051-8>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to A.P.T.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

### Genetic characterization at the species and symbiovar level of indigenous rhizobial isolates nodulating *Phaseolus vulgaris* in Greece

**Evdoxia Efstathiadou<sup>1</sup>, Georgia Ntatsi<sup>2</sup>, Dimitrios Savvas<sup>2</sup>, Anastasia P. Tampakaki<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Laboratory of General and Agricultural Microbiology, Department of Crop Science, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Votanikos, 11855 Athens, Greece.

<sup>2</sup>Laboratory of Vegetable Production, Department of Crop Science, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Votanikos, 11855 Athens, Greece.

*\*Correspondence to:*

Anastasia P. Tampakaki, E-mail: [tampakaki@aua.gr](mailto:tampakaki@aua.gr)

ORCID identifier: 0000-0003-4439-0920

**Supplementary Table S1.** Primers and PCR conditions used in this study.

Oligonucleotide name	Oligonucleotide sequence <sup>1</sup> (5' to 3')	Gene/Sequence	Amplicon size in bp	PCR conditions	Reference
BOX A1R	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	BOX-sequences	Variable sizes	5 min 95 °C, 30 × (30 s 94 °C, 1 min 52 °C, 8 min 65 °C), 16 min 65 °C	Versalovic et al., 1994
16S-F1-T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG</u>	16S rRNA	~1500	5 min 95 °C, 30 × (1 min 95 °C, 1 min 55 °C, 2.0 min 72 °C), 10 min 72 °C	Modified from Weisburg et al. 1991
16S-R1-SP6	<u>GATTTAGGTGACACTATAGAAGGAGGTGATCCAGCC</u>	16S rRNA			
<i>gyrB</i> 340F-T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGGTTCGACCARAAYTCYTACA</u> AGG	<i>gyrB</i>	~700	5 min 95 °C, 30 × (1 min 95 °C, 1 min 58 °C, 1.0 min 72 °C), 10 min 72 °C	Tampakaki et al 2017a
<i>gyrB</i> 1057rhi-R-SP6	<u>GATTTAGGTGACACTATAGCSAGCTTRTCCTTGGTCTGC</u> G	<i>gyrB</i>			
<i>glnII</i> 12F-rhi-T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGGYAAGCTCGAGTAYATYTGGC</u> T	<i>glnII</i>	~650	5 min 95 °C, 30 × (1 min 95 °C, 1 min 56 °C, 1.0 min 72 °C), 10 min 72 °C	Modified from Vinuesa et al 2005
<i>glnII</i> 689R-rhi-SP6	<u>GATTTAGGTGACACTATAGTGCATGCCCGRCCRTTCCA</u>	<i>glnII</i>			
<i>recA</i> 41F-T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGGTTCGGCAAGGGMTCGRTS</u> ATG	<i>recA</i>	~700	5 min 95 °C, 30 × (1 min 95 °C, 1 min 56 °C, 1.0 min 72 °C), 10 min 72 °C	Tampakaki et al, 2017a
<i>recA</i> 827R-SP6	<u>GATTTAGGTGACACTATAGCCATACATGATRTCGAAYTC</u>	<i>recA</i>			
<i>atpD</i> -F52-T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGGGTTATCGGCGCCGYGTS</u> GACGT	<i>atpD</i>	~850	5 min 95 °C, 30 × (1 min 95 °C, 1 min 54 °C, 1.0 min 72 °C), 10 min 72 °C	Efstathiadou et al, 2020

<i>atpD</i> -F902-SP6	<u>GATTTAGGTGACACTATAG</u> TSGTSGTRATGCGYTCCTG CATC-3'				Efstathiadou et al, 2020
<i>nifH</i> -FP-T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGGT</u> ACGGCAAAGGGGSATC GGCAA	<i>nifH</i>			Efstathiadou et al, 2020
<i>nifH</i> -RPV-SP6	<u>GATTTAGGTGACACTATAG</u> AGCATGTCYTCVAGYTCYTC CA	<i>nifH</i>	~850	5 min 95 °C, 30 × (1 min 95 °C, 1 min 55 °C, 1.0 min 72 °C), 10 min 72 °C	Efstathiadou et al, 2020
<i>nodC</i> -F352P-T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGGG</u> TYGGYAAACGGAAGGCAC AGAT	<i>nodC</i>			Efstathiadou et al, 2020
<i>nodC</i> Mrs-R-SP6	<u>GATTTAGGTGACACTATAG</u> CGHGACAGCCARTCGCTRT TG	<i>nodC</i>	~800	5 min 95 °C, 30 × (1 min 95 °C, 1 min 55 °C, 1.0 min 72 °C), 10 min 72 °C	Tampakaki et al 2017b

<sup>1</sup>Mixtures of bases used at certain positions are given as: R, A or G; Y, C or T; M, A or C; K, G or T; S, G or C; B,C or G or T; V, A or C or G. Underlined sequences indicate nucleotide sequences of T7 or SP6 sequencing primers.

Efstathiadou, E., Savvas, D. & Tampakaki, A. P. Genetic diversity and phylogeny of indigenous rhizobia nodulating faba bean (*Vicia faba* L.) in Greece. *Syst. Appl. Microbiol.* **43**,126149, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126149> (2020).

Tampakaki, A. P., Fotiadis, C. T., Ntatsi, G. & Savvas, D. Phylogenetic multilocus sequence analysis of indigenous slow-growing rhizobia nodulating cowpea (*Vigna unguiculata* L.) in Greece. *Syst. Appl. Microbiol.* **40**,179-189, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.01.001> (2017a).

Tampakaki, A. P., Fotiadis, C.T., Ntatsi, G. & Savvas, D. A novel symbiovar (aegeanense) of the genus *Ensifer* nodulates *Vigna unguiculata*. *J. Sci. Food Agric.* **97**, 4314-4325, DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.8281> (2017b).

Versalovic, J., Schneider, M., de Brulin, F. J. & Lupski, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell Biol.* **5**, 25-40 (1994).

Vinuesa, P., Silva, C., Lorite, M. J., Izaguirre-Mayoral, M. L., Bedmar, E. J. & Martínez-Romero, E. Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from *rrs*, *atpD*, *recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of *Sesbania* microsymbionts from Venezuelan wetlands. *Syst. Appl. Microbiol.* **28**, 702-16, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.05.007> (2005).

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. & Lane, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**, 697–703, DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703> (1991).

**Supplementary Table S2.** GenBank accession numbers of the sequenced genes in this study.

Strain	<i>rrs</i>	<i>recA</i>	<i>atpD</i>	<i>gyrB</i>	<i>glnII</i>	<i>nodC</i>	<i>nifH</i>
<i>Rhizobium</i> sp. PVKA6	MT476928	MT503467	MT503474	MT503481	MT503488	MT503495	MT503502
<i>Rhizobium</i> sp. PVIM10	MT476929	MT503468	MT503475	MT503482	MT503489	MT503496	MT503503
<i>Rhizobium</i> sp. PVMT25	MT476930	MT503469	MT503476	MT503483	MT503490	MT503497	MT503504
<i>R. sophoriradicis</i> PVTN21	MT476931	MT503470	MT503477	MT503484	MT503491	MT503498	MT503505
<i>R. anhuiense</i> PVPR1	MT476932	MT503471	MT503478	MT503485	MT503492	MT503499	MT503506
<i>R. hidalgonense</i> PVMT26	MT476933	MT503472	MT503479	MT503486	MT503493	MT503500	MT503507
<i>R. azibense</i> PVIM1	MT476934	MT503473	MT503480	MT503487	MT503494	MT503501	MT503508

**Supplementary Table S3.** Identities of *recA* (462 bp) and *atpD* (441 bp) nucleotide sequences among *Rhizobium* strains. The closest type strains are shown in bold.

Strain name	Identities of <i>atpD</i> nucleotide sequences (%)																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
1. PVKA6	100.00	<b>100.00</b>	99.77	93.42	92.74	93.42	87.07	91.84	92.29	92.97	87.30	94.10	92.29	90.70	93.42	89.80	94.33	92.74	95.01	94.78	88.21	88.21	87.76	92.06	92.97	93.88	94.33	93.42	88.44	<b>98.64</b>
2. PVIM10	100.00	100.00	99.77	93.42	92.74	93.42	87.07	91.84	92.29	92.97	87.30	94.10	92.29	90.70	93.42	89.80	94.33	92.74	95.01	94.78	88.21	88.21	87.76	92.06	92.97	93.88	94.33	93.42	88.44	<b>98.64</b>
3. PVMT25	100.00	100.00	100.00	93.42	92.74	93.42	87.07	91.84	92.29	92.97	87.30	94.10	92.29	90.70	93.42	89.80	94.33	92.74	95.01	94.78	88.21	88.21	87.76	92.06	92.97	93.88	94.33	93.42	88.44	<b>98.64</b>
4. PVTN21	97.40	97.40	97.40	100.00	92.06	92.97	88.66	92.06	92.52	92.29	88.44	93.20	90.70	89.80	92.97	89.80	90.93	92.29	94.10	91.84	89.34	90.02	88.44	91.84	93.42	93.20	93.65	<b>100.00</b>	89.12	92.97
5. PVPR1	91.77	91.77	91.77	91.77	100.00	<b>92.74</b>	87.30	91.61	92.06	<b>99.77</b>	87.53	93.88	92.06	91.16	92.97	89.12	91.84	92.06	94.33	92.29	88.89	87.76	87.98	92.52	92.74	94.10	94.33	92.06	88.89	92.29
6. PVMT26	89.83	89.83	89.83	89.61	92.64	100.00	<b>88.44</b>	92.52	92.97	92.97	<b>88.66</b>	95.24	92.06	91.38	92.97	90.02	91.16	<b>99.32</b>	94.10	92.06	89.80	90.02	88.21	92.97	92.97	92.74	93.42	92.97	90.25	93.20
7. PVIM1	88.53	88.53	88.53	88.10	89.61	87.45	100.00	<b>88.66</b>	88.89	87.53	<b>99.77</b>	87.30	89.12	88.66	89.34	89.57	85.94	87.76	89.80	86.62	88.66	90.02	97.96	88.66	89.34	87.98	88.21	88.66	90.02	86.85
8. <i>R. aegyptiacum</i> 950 <sup>T</sup>	89.83	89.83	89.83	89.39	91.77	89.39	88.53	100.00	99.55	91.61	88.89	92.52	92.97	92.52	91.84	90.70	90.02	91.84	91.84	90.70	89.57	90.25	89.34	92.97	91.61	91.38	91.84	92.06	90.48	91.84
9. <i>R. aethiopicum</i> HBR26 <sup>T</sup>	89.61	89.61	89.61	89.18	91.56	89.61	88.53	98.70	100.00	92.06	89.12	92.97	93.42	92.97	92.29	91.16	90.25	92.29	92.29	90.93	90.02	90.70	89.57	93.42	92.06	91.84	92.29	92.52	90.93	92.29
10. <i>R. anhuiense</i> CCBAU 23252 <sup>T</sup>	91.99	91.99	91.99	91.99	<b>99.78</b>	92.42	89.39	91.56	91.34	100.00	87.76	94.10	92.06	91.16	92.97	89.34	92.06	92.29	94.56	92.52	89.12	87.98	88.21	92.52	92.97	94.10	94.33	92.29	88.89	92.52
11. <i>R. azibense</i> 23C2 <sup>T</sup>	88.53	88.53	88.53	88.10	89.61	87.45	<b>100.00</b>	88.53	88.53	89.39	100.00	87.53	89.34	88.89	89.57	89.80	86.17	87.98	90.02	86.85	88.89	90.25	98.19	88.89	89.57	88.21	88.21	88.44	90.25	87.07
12. <i>R. ecuadorensis</i> CNPS066 <sup>T</sup>	90.69	90.69	90.69	90.48	94.16	93.94	88.74	91.13	90.91	93.94	88.74	100.00	91.61	90.48	92.06	90.25	92.74	94.56	95.92	93.65	88.66	88.89	87.53	92.97	92.52	93.88	94.78	93.20	90.02	94.33
13. <i>R. esperanzae</i> CNPS0668 <sup>T</sup>	96.32	96.32	96.32	94.59	93.72	90.69	90.26	90.91	90.26	93.51	90.26	91.56	100.00	97.28	92.29	93.88	90.02	91.38	91.61	90.70	92.06	90.48	89.34	95.24	92.06	90.93	91.61	90.70	93.88	91.84
14. <i>R. etli</i> CFN 42 <sup>T</sup>	90.69	90.69	90.69	90.48	91.34	90.04	87.88	93.94	94.16	91.56	87.88	90.48	91.13	100.00	91.61	92.97	88.66	91.61	90.93	89.34	90.93	89.80	88.89	94.10	91.38	90.02	90.48	89.80	92.97	90.25
15. <i>R. fabae</i> CCBAU 33202 <sup>T</sup>	90.48	90.48	90.48	90.48	94.16	91.34	89.39	90.26	90.48	93.94	89.39	92.42	92.86	90.91	100.00	91.38	91.16	92.29	94.10	91.84	90.02	89.80	90.02	92.52	98.64	92.97	93.42	92.97	90.25	92.97
16. <i>R. freirei</i> PRF 81 <sup>T</sup>	88.10	88.10	88.10	88.10	87.66	86.36	87.66	87.88	87.88	87.88	87.66	87.23	88.31	88.53	87.88	100.00	87.76	89.34	91.61	88.44	95.24	92.52	90.25	92.29	91.61	88.89	89.57	89.80	96.83	90.02
17. <i>R. gallicum</i> R602sp <sup>T</sup>	88.53	88.53	88.53	88.10	89.61	87.45	<b>100.00</b>	88.53	88.53	89.39	100.00	88.74	90.26	87.88	89.39	87.66	100.00	<b>90.48</b>	92.06	99.09	86.39	87.98	86.62	90.48	90.70	92.06	91.38	90.93	87.07	94.33
18. <i>R. hidalgonense</i> FH14 <sup>T</sup>	89.83	89.83	89.83	89.61	92.64	<b>100.00</b>	87.45	89.39	89.61	92.42	87.45	93.94	90.69	90.04	91.34	86.36	87.45	100.00	93.42	91.38	89.12	89.34	87.53	92.29	92.29	92.06	92.74	92.29	89.57	92.52
19. <i>R. laguerreae</i> FB206 <sup>T</sup>	90.04	90.04	90.04	90.04	93.72	91.77	88.74	89.61	89.61	93.51	88.74	93.07	91.34	89.61	92.86	87.01	88.74	91.77	100.00	92.97	89.34	89.80	90.02	92.52	94.10	95.46	97.05	94.10	91.38	95.24
20. <i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 <sup>T</sup>	91.77	91.77	91.77	91.34	94.59	93.07	89.61	91.34	91.34	94.37	89.61	94.81	93.07	90.69	93.29	87.66	89.61	93.07	96.97	100.00	<b>87.30</b>	88.44	87.30	91.38	91.38	92.97	92.29	91.84	87.76	94.78
21. <i>R. leucaena</i> USDA 9039 <sup>T</sup>	88.31	88.31	88.31	89.18	88.31	86.58	90.48	88.74	88.53	88.53	90.48	88.10	88.96	87.66	90.04	91.77	90.48	86.58	88.10	88.74	100.00	92.29	89.34	90.93	90.25	88.21	88.66	89.34	94.78	88.89
22. <i>R. lusitanum</i> P1-7 <sup>T</sup>	86.58	86.58	86.58	86.15	86.58	86.36	87.45	87.88	88.10	86.80	87.45	86.80	87.01	87.66	88.31	92.42	87.45	86.36	87.01	87.23	91.13	100.00	<b>90.25</b>	89.12	90.25	88.44	88.44	90.02	92.29	88.21
23. <i>R. mongolense</i> USDA 1844 <sup>T</sup>	88.96	88.96	88.96	88.96	89.18	87.88	97.62	89.39	89.18	88.96	97.62	89.18	90.69	88.31	89.83	88.10	97.62	87.88	89.18	90.04	90.48	87.88	100.00	<b>89.34</b>	90.02	88.21	88.21	88.44	90.02	87.07
24. <i>R. phaseoli</i> ATCC 14482 <sup>T</sup>	96.10	96.10	96.10	95.45	91.13	88.96	88.31	89.83	89.83	91.34	88.31	90.04	94.16	90.48	90.48	88.31	88.31	88.96	89.18	90.48	87.88	87.23	88.31	100.00	92.29	91.38	92.29	91.84	92.06	91.61
25. <i>R. pisi</i> DSM 30132 <sup>T</sup>	90.04	90.04	90.04	90.26	93.94	91.99	88.74	90.48	90.69	93.72	88.74	93.07	92.42	90.69	97.62	88.10	88.74	91.99	94.37	94.37	89.83	88.10	89.18	90.04	100.00	92.52	92.52	93.42	90.25	92.52
26. <i>R. ruizarguesonis</i> UPM1133 <sup>T</sup>	91.99	91.99	91.99	91.99	95.24	93.07	89.61	91.77	91.56	95.02	89.61	95.02	92.86	90.48	93.51	88.31	89.61	93.07	96.54	97.62	88.96	88.10	90.04	90.69	94.59	100.00	94.29	93.15	88.36	93.38
27. <i>R. sophorae</i> CCBAU_03386 <sup>T</sup>	91.34	91.34	91.34	91.34	94.59	92.21	88.53	91.34	91.34	94.37	88.53	93.94	92.64	90.26	92.86	87.88	88.53	92.21	96.54	97.40	88.10	87.23	88.96	90.48	94.37	97.62	100.00	93.65	90.02	94.10
28. <i>R. sophoradicis</i> CCBAU 03470 <sup>T</sup>	<b>97.40</b>	<b>97.40</b>	<b>97.40</b>	<b>100.00</b>	91.77	89.61	88.10	89.39	89.18	91.99	88.10	90.48	94.59	90.48	90.48	88.10	88.10	89.61	90.04	91.34	89.18	86.15	88.96	95.45	90.26	91.99	91.34	100.00	89.12	92.97
29. <i>R. tropici</i> CIAT899 <sup>T</sup>	86.58	86.58	86.58	87.23	87.23	86.58	86.58	86.80	86.80	87.45	86.58	86.80	86.80	87.23	88.53	93.07	86.58	86.58	87.23	87.45	92.86	89.83	87.01	86.15	88.74	87.88	87.66	87.23	100.00	<b>88.89</b>
30. <i>R. vallis</i> CCBAU 65647 <sup>T</sup>	88.31	88.31	88.31	89.18	88.31	86.58	90.48	88.74	88.53	88.53	90.48	88.10	88.96	87.66	90.04	91.77	90.48	86.58	88.10	88.74	100.00	91.13	90.48	87.88	89.83	88.96	88.10	89.18	92.86	100.00

Identities of *recA* nucleotide sequences (%)

Supplementary Table S4. Identities of *gyrB* (594 bp) and *glnII* (465 bp) nucleotide sequences among *Rhizobium* strains. The closest type strains are shown in bold.

Strain name	Identities of <i>glnII</i> nucleotide sequences (%)																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
1. PVKA6	100.00	100.00	100.00	96.56	93.12	93.55	88.82	94.41	94.84	92.90	89.03	95.70	95.91	95.48	94.84	90.75	88.82	93.55	95.27	92.69	90.75	90.54	87.96	94.19	94.41	93.55	92.90	<b>96.56</b>	91.18	92.90
2. PVIM10	100.00	100.00	100.00	96.56	93.12	93.55	88.82	94.41	94.84	92.90	89.03	95.70	95.91	95.48	94.84	90.75	88.82	93.55	95.27	92.69	90.75	90.54	87.96	94.19	94.41	93.55	92.90	<b>96.56</b>	91.18	92.90
3. PVMT25	100.00	100.00	100.00	96.56	93.12	93.55	88.82	94.41	94.84	92.90	89.03	95.70	95.91	95.48	94.84	90.75	88.82	93.55	95.27	92.69	90.75	90.54	87.96	94.19	94.41	93.55	92.90	<b>96.56</b>	91.18	92.90
4. PVTN21	93.77	93.77	93.77	100.00	92.69	92.90	87.96	93.76	94.19	92.47	88.17	94.84	95.05	95.05	94.19	89.68	87.96	92.90	93.76	92.26	89.68	88.60	88.17	93.55	93.76	92.26	92.69	<b>100.00</b>	89.68	92.04
5. PVPR1	92.59	92.59	92.59	92.26	100.00	94.19	89.25	91.61	91.61	98.28	89.03	95.70	92.90	92.69	96.56	89.89	89.25	94.19	93.12	<b>97.85</b>	89.03	89.25	88.17	90.11	96.13	93.76	96.77	92.69	89.03	95.48
6. PVMT26	93.43	93.43	93.43	93.10	93.94	100.00	<b>88.82</b>	91.83	91.61	94.62	88.60	96.13	94.62	93.33	95.27	91.61	88.82	<b>99.78</b>	93.33	94.84	89.89	90.54	87.96	90.75	93.76	93.55	94.62	92.90	90.32	94.19
7. PVIM1	85.02	85.02	85.02	85.35	86.36	86.36	100.00	<b>88.39</b>	88.39	88.82	99.78	89.03	87.96	87.96	89.89	89.25	<b>100.00</b>	88.82	87.74	90.32	88.39	88.60	97.85	88.60	89.25	87.31	89.46	87.96	89.25	88.17
8. <i>R. aegyptiacum</i> 950 <sup>T</sup>	92.09	92.09	92.09	92.09	90.24	90.74	84.34	100.00	98.71	90.97	88.60	94.19	93.98	93.33	92.47	90.54	88.39	91.83	92.26	91.18	89.68	89.25	87.96	94.84	91.83	90.97	91.40	93.76	90.11	91.83
9. <i>R. aethiopicum</i> HBR26 <sup>T</sup>	91.92	91.92	91.92	91.92	90.07	90.57	84.34	99.83	100.00	90.97	88.60	93.76	93.98	93.55	92.47	89.68	88.39	91.61	92.26	91.61	90.11	89.25	88.39	95.27	91.83	90.97	91.18	94.19	90.11	91.40
10. <i>R. anhuiense</i> CCBAU 23252 <sup>T</sup>	92.42	92.42	92.42	92.09	<b>99.83</b>	93.77	86.53	90.07	89.90	100.00	88.60	95.05	93.12	92.47	96.34	89.46	88.82	94.62	92.04	96.99	88.60	88.82	87.53	89.46	96.13	93.76	96.13	92.47	88.82	95.27
11. <i>R. azibense</i> 23C2 <sup>T</sup>	84.51	84.51	84.51	84.85	85.86	86.20	99.49	84.18	84.18	86.03	100.00	89.25	88.17	88.17	89.68	89.46	99.78	88.60	87.96	90.11	88.60	88.82	97.63	88.82	89.03	87.10	89.25	88.17	89.46	87.96
12. <i>R. ecuadorensis</i> CNPS0671 <sup>T</sup>	93.77	93.77	93.77	94.11	93.43	94.11	85.52	90.91	90.74	93.27	85.02	100.00	95.91	95.27	96.56	91.61	89.03	96.13	94.84	94.84	90.11	90.11	88.60	93.12	95.05	94.84	95.05	94.84	91.40	94.62
13. <i>R. esperanzae</i> CNPS0668 <sup>T</sup>	92.59	92.59	92.59	92.26	92.42	94.61	85.69	90.74	90.57	92.26	85.19	92.42	100.00	97.42	94.62	90.11	87.96	94.62	93.98	92.04	89.89	89.46	86.67	92.90	93.33	92.04	93.12	95.05	89.89	92.69
14. <i>R. etli</i> CFN 42 <sup>T</sup>	92.42	92.42	92.42	90.57	90.40	91.92	85.19	91.92	91.75	90.57	84.68	90.57	93.27	100.00	93.76	89.68	87.96	93.33	93.76	91.83	89.46	89.68	86.88	92.69	93.12	91.83	92.90	95.05	89.89	92.47
15. <i>R. fabae</i> CCBAU 33202 <sup>T</sup>	92.42	92.42	92.42	91.92	93.10	93.60	85.02	89.90	89.73	92.93	84.51	92.26	92.09	90.07	100.00	90.54	89.89	95.27	92.69	95.27	90.11	88.82	88.60	91.18	96.99	94.41	95.48	94.19	89.68	95.91
16. <i>R. freirei</i> PRF 81 <sup>T</sup>	86.20	86.20	86.20	86.87	85.86	86.70	84.18	87.54	87.37	86.03	83.67	85.35	85.86	86.53	84.68	100.00	89.25	91.61	89.89	90.32	93.76	94.41	88.39	89.68	89.68	90.32	90.97	89.68	95.27	89.68
17. <i>R. gallicum</i> R602sp <sup>T</sup>	85.02	85.02	85.02	85.35	86.36	86.36	<b>100.00</b>	84.34	84.34	86.53	99.49	85.52	85.69	85.19	85.02	84.18	100.00	<b>88.82</b>	87.74	90.32	88.39	88.60	97.85	88.60	89.25	87.31	89.46	87.96	89.25	88.17
18. <i>R. hidalgonesis</i> FH14 <sup>T</sup>	93.60	93.60	93.60	92.93	93.94	<b>99.33</b>	86.36	91.08	90.91	93.77	86.20	94.28	94.44	92.09	93.60	87.04	86.36	100.00	93.55	95.05	89.89	90.54	87.96	90.75	93.76	93.55	94.84	92.90	90.32	94.19
19. <i>R. laguerreae</i> FB206 <sup>T</sup>	91.75	91.75	91.75	91.25	93.43	93.77	86.20	89.39	89.23	93.27	85.69	92.09	91.41	89.23	93.60	85.86	86.20	93.77	100.00	93.33	88.82	89.68	86.88	91.83	91.40	94.41	93.76	93.76	88.82	90.97
20. <i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 <sup>T</sup>	91.58	91.58	91.58	91.41	93.43	93.43	86.20	89.73	89.56	93.27	86.03	92.26	91.08	89.06	94.28	85.19	86.20	93.43	95.79	100.00	89.46	90.11	89.03	90.11	94.84	93.55	96.77	92.26	89.46	94.84
21. <i>R. leucaena</i> USDA 9039 <sup>T</sup>	84.51	84.51	84.51	85.35	85.19	86.36	83.50	85.35	85.19	85.35	83.00	85.52	86.20	84.85	84.68	87.88	83.50	86.20	84.68	84.18	100.00	92.26	87.96	89.25	88.82	88.60	90.32	89.68	92.90	88.60
22. <i>R. lusitanum</i> P1-7 <sup>T</sup>	85.86	85.86	85.86	86.53	86.53	87.54	83.84	86.70	86.53	86.70	83.33	85.86	85.69	85.69	86.20	91.25	83.84	87.88	86.70	86.03	88.89	100.00	87.31	88.82	87.96	90.11	90.11	88.60	93.76	88.17
23. <i>R. mongolense</i> USDA 1844 <sup>T</sup>	84.34	84.34	84.34	85.19	85.69	86.70	95.79	84.68	84.68	85.52	95.96	85.19	85.19	84.51	84.18	83.67	95.79	86.53	85.02	85.86	83.84	83.67	100.00	87.74	87.74	86.45	88.60	88.17	88.17	87.31
24. <i>R. phaseoli</i> ATCC 14482 <sup>T</sup>	93.43	93.43	93.43	93.43	91.75	92.93	85.19	92.76	92.59	91.92	84.68	91.92	92.26	92.59	90.74	87.71	85.19	93.27	90.40	90.91	85.69	87.04	84.85	100.00	91.18	89.46	90.32	93.55	90.11	89.46
25. <i>R. pisi</i> DSM 30132 <sup>T</sup>	91.75	91.75	91.75	92.09	93.10	93.27	84.85	89.39	89.23	92.93	84.34	91.75	91.75	89.56	97.31	84.51	84.85	92.93	93.77	93.43	84.18	86.20	84.68	90.40	100.00	92.90	94.84	93.76	90.32	95.70
26. <i>R. ruizarguesonis</i> UPM1133 <sup>T</sup>	90.74	90.74	90.74	90.57	92.93	92.93	85.19	89.23	89.06	92.76	84.68	91.25	90.40	88.72	93.94	85.35	85.19	92.93	95.96	96.30	83.50	86.53	84.68	90.91	93.60	100.00	93.33	92.26	89.25	92.04
27. <i>R. sophorae</i> CCBAU_03386 <sup>T</sup>	91.75	91.75	91.75	90.91	93.10	93.27	85.69	89.90	89.73	92.93	85.19	92.09	91.25	89.39	93.77	85.86	85.69	93.27	95.96	95.79	84.34	86.70	85.19	91.25	93.77	96.63	100.00	92.69	89.89	95.05
28. <i>R. sophoradicis</i> CCBAU 03470 <sup>T</sup>	<b>93.77</b>	<b>93.77</b>	<b>93.77</b>	<b>100.00</b>	92.26	93.10	85.35	92.09	91.92	92.09	84.85	94.11	92.26	90.57	91.92	86.87	85.35	92.93	91.25	91.41	85.35	86.53	85.19	93.43	92.09	90.57	90.91	100.00	89.68	92.04
29. <i>R. tropici</i> CIAT899 <sup>T</sup>	85.19	85.19	85.19	85.02	85.35	84.85	83.50	86.20	86.20	85.52	83.00	84.01	85.19	85.69	83.50	89.73	83.50	85.35	84.18	84.01	85.35	89.23	83.00	85.19	83.33	84.18	84.85	85.02	100.00	88.60
30. <i>R. vallis</i> CCBAU 65647 <sup>T</sup>	92.26	92.26	92.26	93.10	93.10	93.10	84.85	90.40	90.24	92.93	84.34	91.75	91.25	90.40	96.13	85.52	84.85	93.10	94.44	94.28	84.68	86.03	84.51	91.58	95.79	93.77	94.78	93.10	84.85	100.00
Identities of <i>gyrB</i> nucleotide sequences (%)																														

**Supplementary Table S5.** Identities of concatenated sequences of *recA*, *atpD*, *gyrB*, and *glnII* among *Rhizobium* *sp.* strains. The closest type strains are shown in bold.

Strain name	Identities of nucleotide sequences (%)																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
1. PVKA6	100.00																													
2. PVIM10	100.00	100.00																												
3. PVMT25	99.95	99.95	100.00																											
4. PVTN21	95.21	95.21	95.26	100.00																										
5. PVPR1	92.56	92.56	92.61	92.20	100.00																									
6. PVMT26	92.61	92.61	92.66	92.20	93.43	100.00																								
7. PVIM1	87.21	87.21	87.26	87.36	88.02	87.67	100.00																							
8. <i>R. aegyptiacum</i> 950 <sup>T</sup>	92.05	92.05	92.10	91.85	91.23	91.08	87.26	100.00																						
9. <i>R. aethiopicum</i> HBR26 <sup>T</sup>	92.15	92.15	92.20	91.95	91.23	91.13	87.31	99.24	100.00																					
10. <i>R. anhuiense</i> CCBAU 23252 <sup>T</sup>	92.56	92.56	92.61	92.20	<b>99.44</b>	93.48	87.97	90.98	90.98	100.00																				
11. <i>R. azibense</i> 23C2 <sup>T</sup>	87.16	87.16	87.21	87.21	87.87	87.61	<b>99.75</b>	87.31	87.36	87.82	100.00																			
12. <i>R. ecuadorensis</i> CNPSo 671 <sup>T</sup>	93.58	93.58	93.63	93.22	94.24	94.80	87.51	92.10	92.00	94.04	87.46	100.00																		
13. <i>R. esperanzae</i> CNPSo668 <sup>T</sup>	94.19	94.19	94.24	93.12	92.76	93.12	88.07	92.05	91.95	92.71	88.02	92.86	100.00																	
14. <i>R. etli</i> CFN 42 <sup>T</sup>	92.35	92.35	92.41	91.44	91.34	91.69	87.26	92.86	93.02	91.39	87.21	91.64	94.65	100.00																
15. <i>R. fabae</i> CCBAU 33202 <sup>T</sup>	92.76	92.76	92.81	92.35	94.14	93.32	88.18	91.03	91.13	93.99	88.02	93.27	92.92	91.49	100.00															
16. <i>R. freirei</i> PRF 81 <sup>T</sup>	88.53	88.53	88.58	88.48	87.97	88.53	87.41	89.04	88.89	88.02	87.36	88.38	89.25	89.19	88.33	100.00														
17. <i>R. gallicum</i> R602sp <sup>T</sup>	88.84	88.84	88.89	87.87	89.04	88.28	96.84	87.56	87.61	88.99	96.69	88.74	88.28	87.26	88.58	87.00	100.00													
18. <i>R. hidalgonesis</i> FH14 <sup>T</sup>	92.51	92.51	92.56	92.00	93.27	<b>99.59</b>	87.51	91.03	91.08	93.32	87.46	94.70	92.92	91.79	93.17	88.48	88.12	100.00												
19. <i>R. laguerreae</i> FB206 <sup>T</sup>	92.86	92.86	92.92	92.25	93.63	93.17	87.97	90.77	90.83	93.32	88.02	93.88	91.95	90.72	93.53	88.18	88.48	93.07	100.00											
20. <i>R. leguminosarum</i> USDA 2370 <sup>T</sup>	92.66	92.66	92.71	91.64	94.50	93.48	88.07	90.57	90.67	94.24	87.92	93.73	91.79	90.21	93.53	87.92	90.88	93.37	94.85	100.00										
21. <i>R. leucaenae</i> USDA 9039 <sup>T</sup>	87.67	87.67	87.72	87.92	87.72	88.18	87.51	88.02	88.02	87.77	87.46	87.92	88.94	88.02	88.12	92.00	87.00	87.97	87.56	87.51	100.00									
22. <i>R. lusitanum</i> P1-7 <sup>T</sup>	87.72	87.72	87.77	87.97	87.41	88.38	87.16	88.48	88.69	87.46	87.10	87.77	88.07	87.97	88.43	92.41	86.70	88.33	87.77	87.87	90.98	100.00								
23. <i>R. mongolense</i> USDA 1844 <sup>T</sup>	87.05	87.05	87.10	87.51	87.61	87.61	97.20	87.61	87.72	87.41	97.25	87.46	87.77	86.95	87.87	87.31	94.65	87.41	87.82	87.67	87.46	87.16	100.00							
24. <i>R. phaseoli</i> ATCC 14482 <sup>T</sup>	93.93	93.93	93.99	93.58	91.39	91.49	87.51	92.61	92.76	91.34	87.46	92.00	93.53	92.46	91.18	89.35	87.92	91.44	91.08	90.57	88.12	88.07	87.36	100.00						
25. <i>R. pisi</i> DSM 30132 <sup>T</sup>	92.25	92.25	92.30	92.35	93.93	93.02	87.82	90.72	90.83	93.88	87.67	93.02	92.35	91.08	97.60	88.18	88.12	92.76	93.32	93.63	87.77	88.18	87.67	90.93	100.00					
26. <i>R. ruizarguesonis</i> UPM1133 <sup>T</sup>	92.39	92.39	92.45	91.88	93.93	93.06	87.34	90.71	90.71	93.82	87.19	93.57	91.48	90.15	93.72	88.00	88.26	92.90	95.71	95.10	87.39	87.80	87.14	90.61	93.42	100.00				
27. <i>R. sophorae</i> CCBAU_03386 <sup>T</sup>	92.51	92.51	92.56	92.05	94.60	93.37	87.82	91.03	91.03	94.34	87.61	93.83	92.10	90.67	93.88	88.38	88.53	93.27	95.77	95.67	87.56	88.07	87.56	91.08	93.88	95.56	100.00			
28. <i>R. sophoriradicis</i> CCBAU 03470 <sup>T</sup>	<b>95.21</b>	<b>95.21</b>	<b>95.26</b>	<b>100.00</b>	92.20	92.20	87.36	91.85	91.95	92.20	87.21	93.22	93.12	91.44	92.35	88.48	87.87	92.00	92.25	91.64	87.92	87.97	87.51	93.58	92.35	91.88	92.05	100.00		
29. <i>R. tropici</i> CIAT899 <sup>T</sup>	87.67	87.67	87.72	87.56	87.46	87.77	87.05	88.23	88.33	87.51	87.00	87.77	88.63	88.69	87.67	93.43	86.39	87.77	87.56	87.00	91.23	90.93	86.75	88.12	87.82	87.19	87.87	87.56	100.00	
30. <i>R. vallis</i> CCBAU 65647 <sup>T</sup>	93.88	93.88	93.93	92.71	93.27	93.12	87.00	91.23	91.13	93.27	86.85	92.97	92.00	91.23	94.29	88.23	88.69	92.97	92.97	93.93	87.56	87.87	86.95	91.23	94.09	93.06	93.83	92.71	87.41	100.00

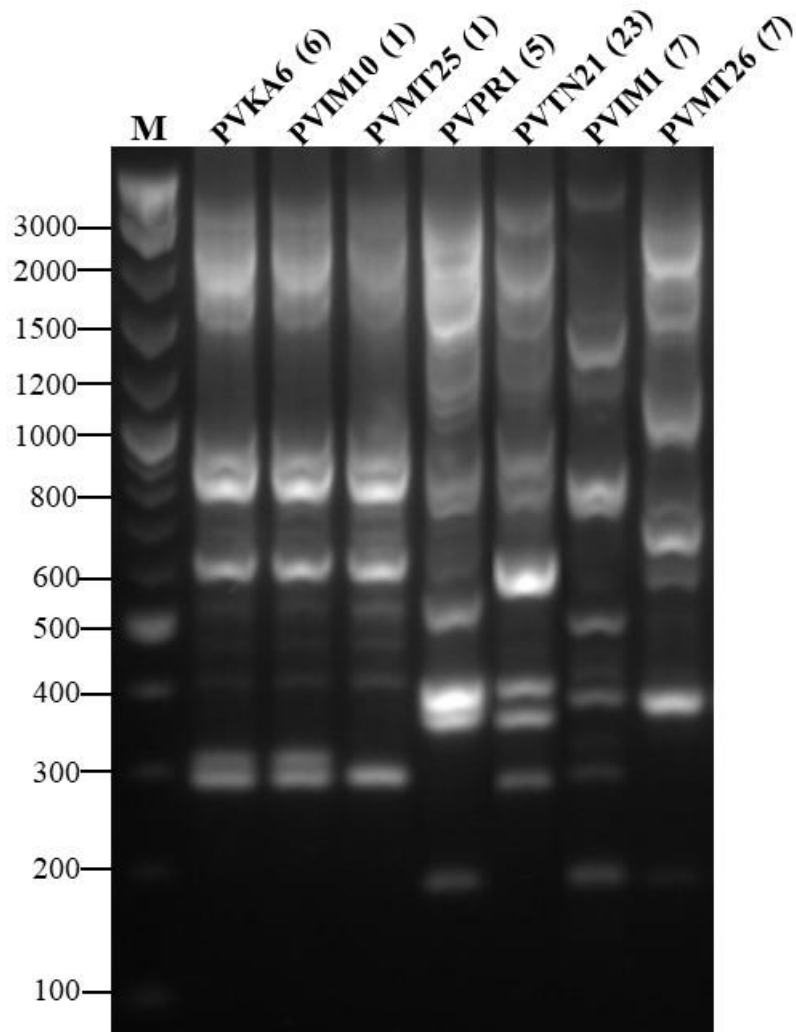


**Supplementary Table S6.** Distribution and abundance of isolates clustered in different clades in sampling sites.

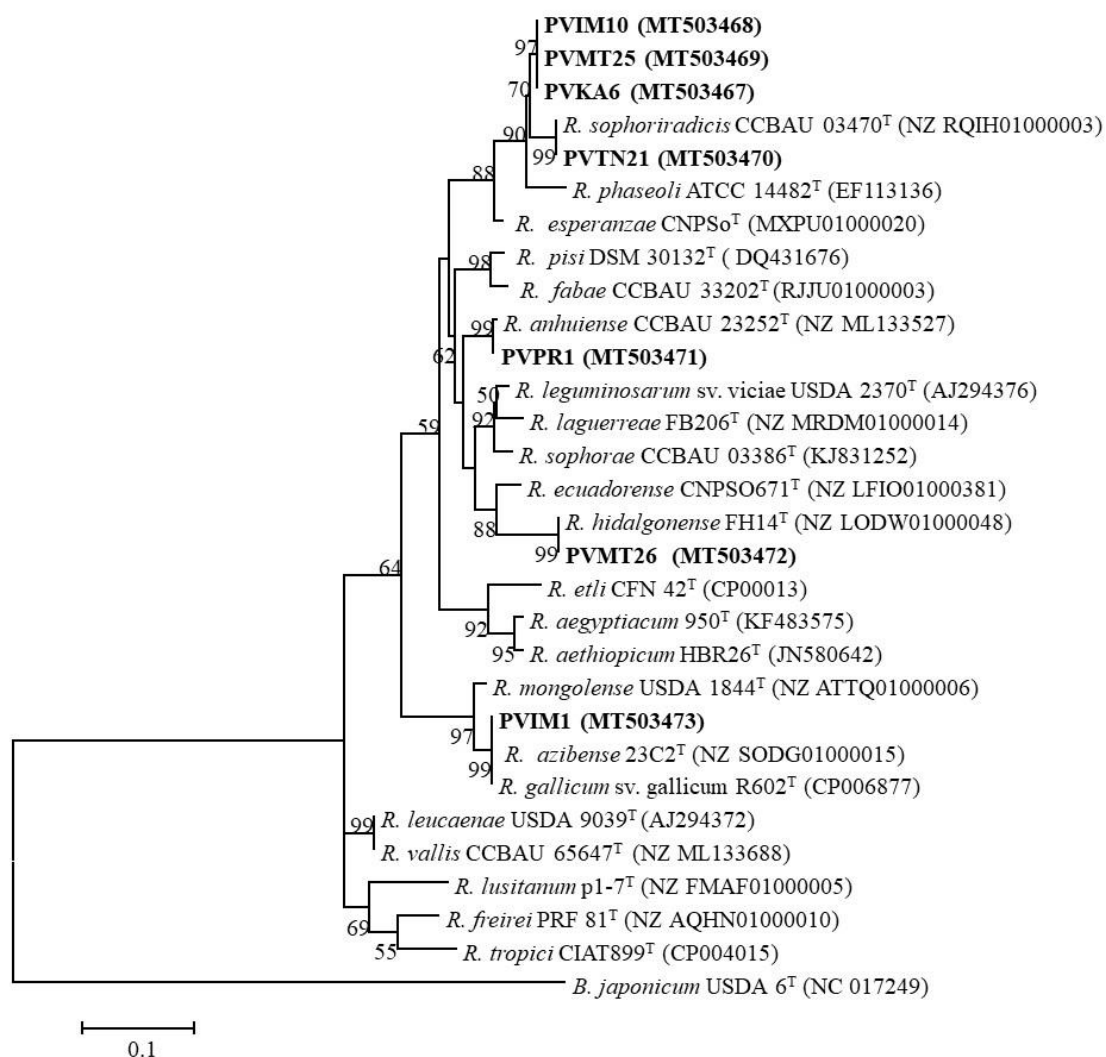
	Clade 1	Clade 2	Clade 3	Clade 4	Clade 5
<b>Imathia</b>	5				7
<b>Karpathos</b>	2				
<b>Metsovo</b>	1	1		7	
<b>Preveza</b>			5		
<b>Tinos</b>		22			
<b>Total isolates</b>	8	23	5	7	7



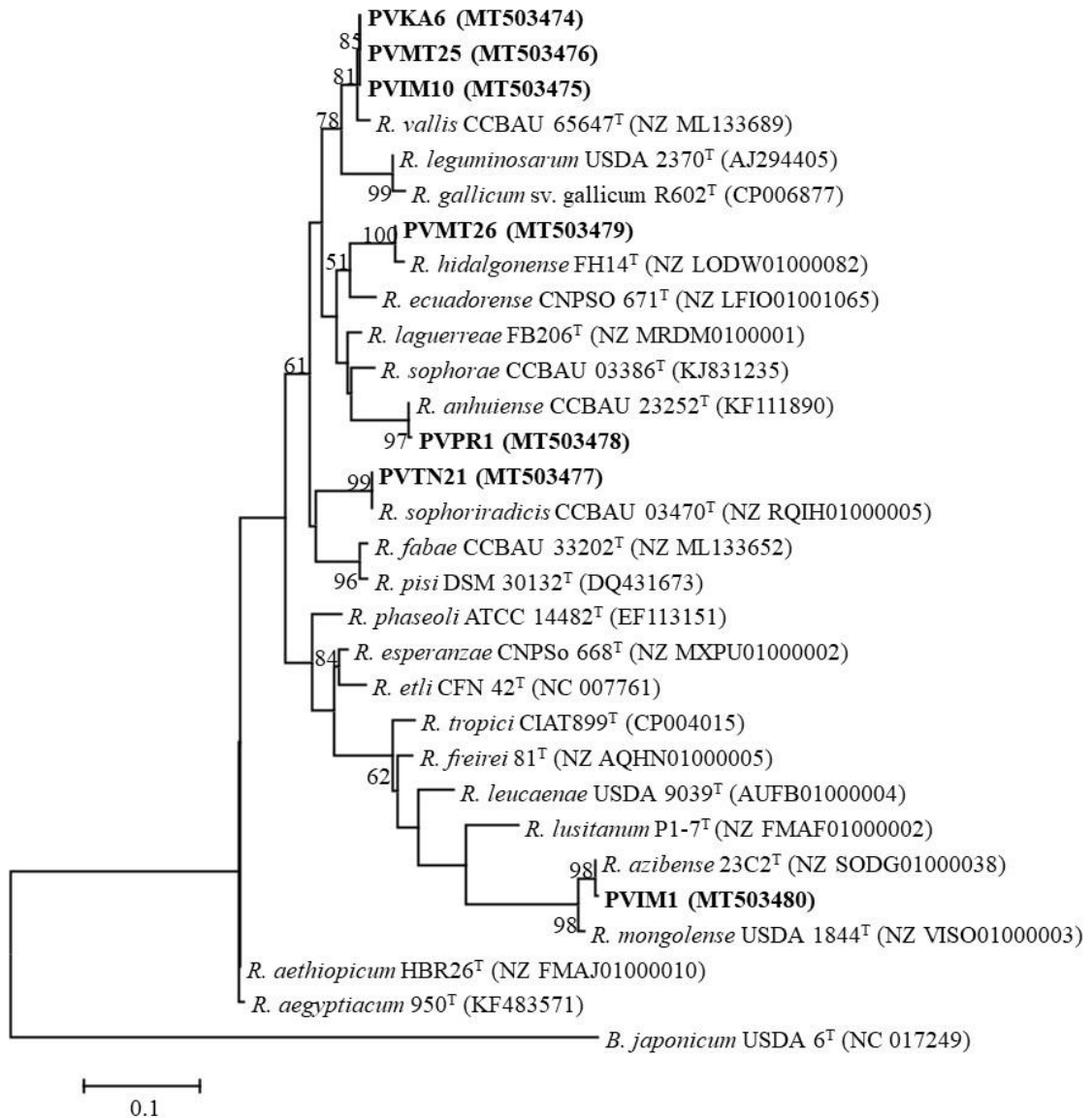
**Supplementary Figure S1.** Simplified map of Greece showing the sampling sites of common bean-nodulating rhizobia. The coordinates (Latitude/Longitude) were as follows: 1: Imathia, N40°29'19.4"/E22°11'13.0"; 2: Metsovo, N39°43'40.0"/E21°03'40.4"; 3: Preveza, N39°16'07.8"/E20°51'18.7"; 4: Tinos island, N37°34'26.8"/E25°10'05.7"; 5: Karpathos island, N35°44'14.3"/E27°10'58.2". The soil texture class and pH of the sampling sites are indicated within grey boxes. CL: clay-loam; SL: sandy-loam; SCL: sandy-clay-loam. Greece map was created by Vemaps.com (<https://vemaps.com/>) and additions were made for the purpose of this work with PowerPoint-Office 365 by A. Tampakaki.



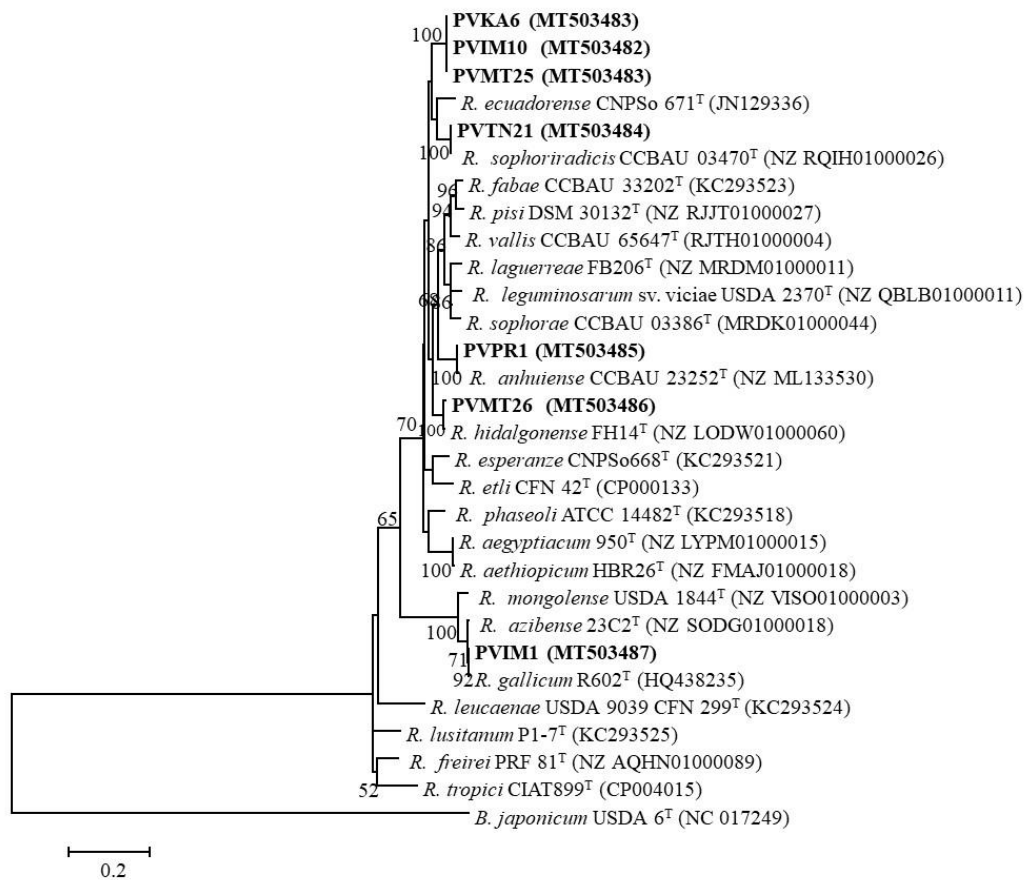
**Supplementary Figure S2.** BOX-PCR fingerprinting patterns of 7 representative rhizobial isolates from field-grown common bean nodules displaying 6 distinct BOX fingerprints. Number of isolates displaying nearly identical profiles were considered as clonal isolates and are indicated within parentheses. Lane M denotes 1 kb DNA ladder and the sizes are indicated in base pairs.



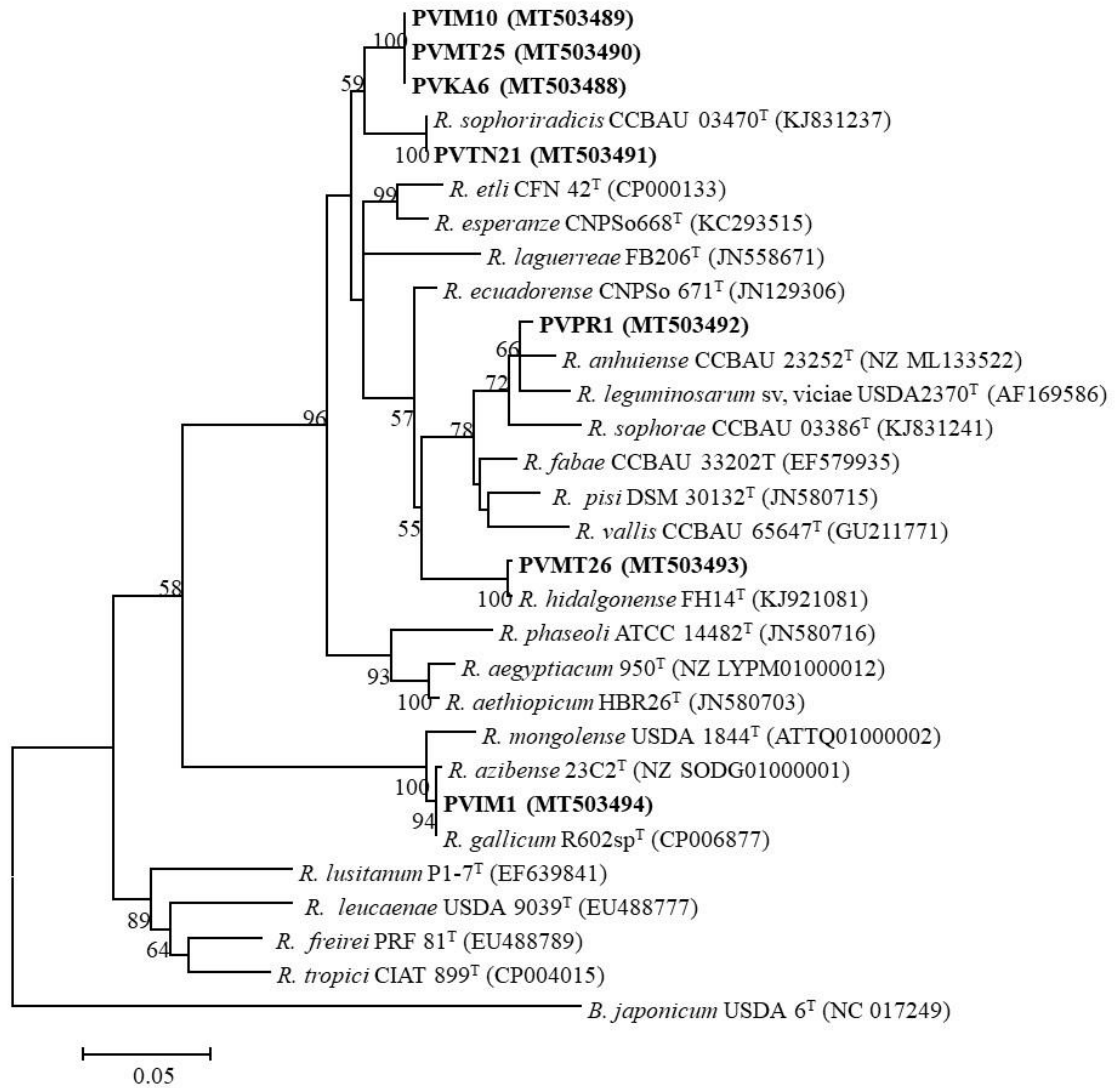
**Supplementary Figure S3.** Maximum likelihood phylogenetic tree based on *recA* gene sequences (462 bp) showing taxonomic relationships of the strains representing different BOX patterns. Strains isolated in the present study are shown in boldface and type strains are indicated by superscript "T". GenBank accession numbers of the sequences are indicated within parentheses. Bootstrap values (greater than 50%) were calculated for 500 replications and are shown at the nodes. Phylogenetic analysis was conducted in MEGA 6<sup>104</sup> (<https://www.megasoftware.net/>) using the maximum likelihood algorithm with the Tamura 3-parameter model plus Gamma rate distribution (T92 + G). The scale bar shows the number of nucleotide substitutions per site. *R.*, *Rhizobium*.



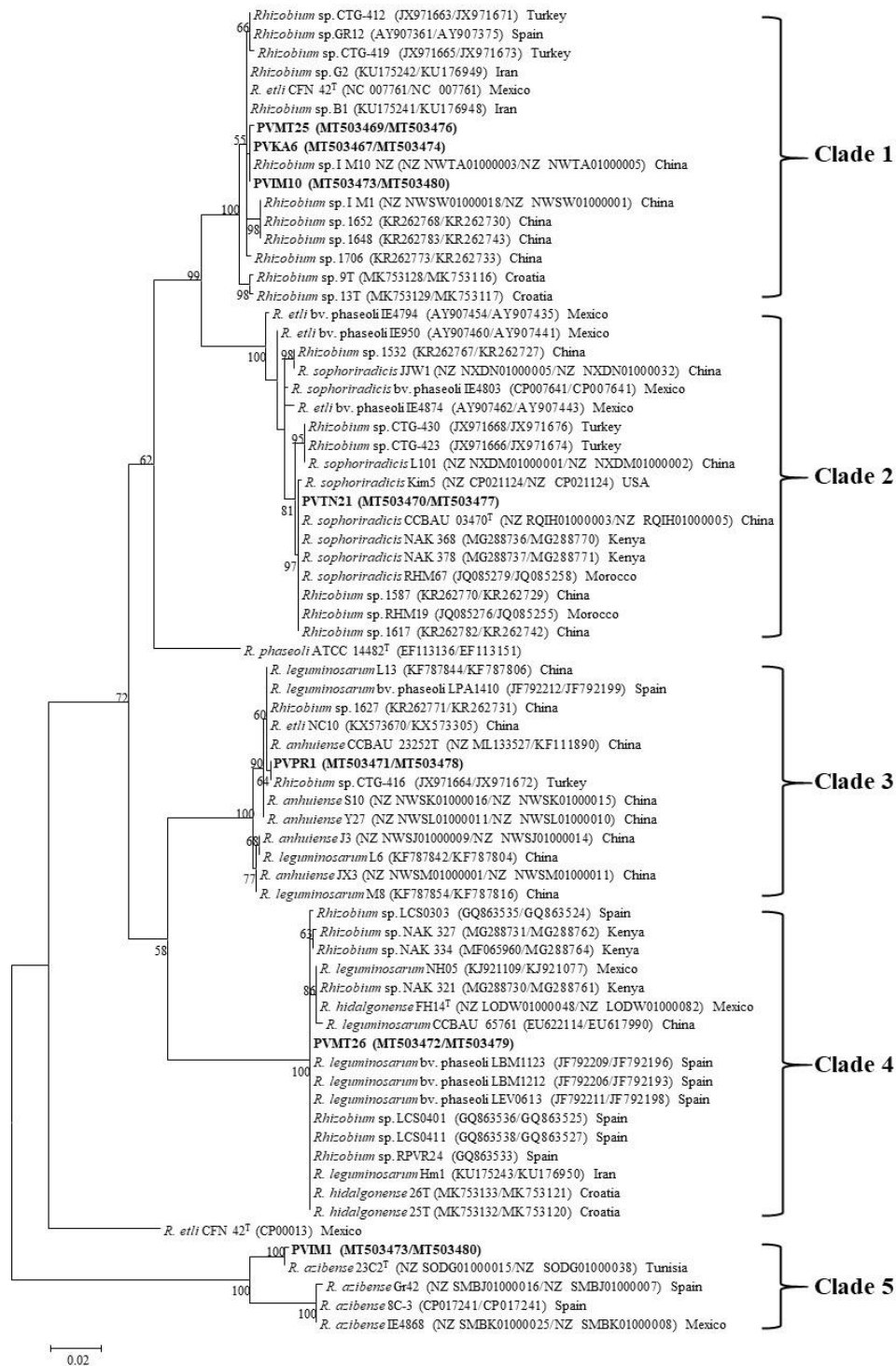
**Supplementary Figure S4.** Maximum likelihood phylogenetic tree based on *atpD* gene sequences (441 bp) showing taxonomic relationships of the strains representing different BOX patterns. Strains isolated in the present study are shown in boldface and type strains are indicated by superscript "T". GenBank accession numbers of the sequences are indicated within parentheses. Bootstrap values (greater than 50%) were calculated for 500 replications and are shown at the nodes. Phylogenetic analysis was conducted in MEGA 6<sup>104</sup> (<https://www.megasoftware.net/>) using the maximum likelihood algorithm with the General Time Reversible model plus Gamma rate distribution (GTR + G). The scale bar shows the number of nucleotide substitutions per site. *R.*, *Rhizobium*.



**Supplementary Figure S5.** Maximum likelihood phylogenetic tree based on *gyrB* gene sequences (594 bp) showing taxonomic relationships of the strains representing different BOX patterns. Strains isolated in the present study are shown in boldface and type strains are indicated by superscript "T". GenBank accession numbers of the sequences are indicated within parentheses. Bootstrap values (greater than 50%) were calculated for 500 replications and are shown at the nodes. Phylogenetic analysis was conducted in MEGA 6<sup>104</sup> (<https://www.megasoftware.net/>) using the maximum likelihood algorithm with the Tamura 3-parameter model plus Gamma rate distribution (T92 + G). The scale bar shows the number of nucleotide substitutions per site. *R.*, *Rhizobium*.



**Supplementary Figure S6.** Maximum likelihood phylogenetic tree based on *glnII* gene sequences (465 bp) showing taxonomic relationships of the strains representing different BOX patterns. Strains isolated in the present study are shown in boldface and type strains are indicated by superscript "T". GenBank accession numbers of the sequences are indicated within parentheses. Bootstrap values (greater than 50%) were calculated for 500 replications and are shown at the nodes. Phylogenetic analysis was conducted in MEGA 6<sup>104</sup> (<https://www.megasoftware.net/>) using the maximum likelihood algorithm with the Tamura-Nei model plus Gamma rate distribution plus invariant site (TN93 + G + I). The scale bar shows the number of nucleotide substitutions per site. *R.*, *Rhizobium*.



**Supplementary Figure S7.** Neighbour-joining phylogenetic tree based on the concatenated *recA-atpD* gene sequences (804 bp) showing the phylogenetic relationships between the studied strains and the closest strains isolated in other geographical regions. Strains isolated in the present study are shown in boldface and type strains are indicated by superscript "T". GenBank accession numbers of the sequences are indicated within parentheses. Bootstrap values (greater than 50%) were calculated for 1000 replications and are shown at the nodes. The scale bar shows the number of nucleotide substitutions per site. Phylogenetic analysis was conducted in MEGA 6<sup>104</sup> (<https://www.megasoftware.net/>) using the maximum likelihood algorithm with the Tamura Nei-parameter model plus invariant site (TN93 + I). *R.*, *Rhizobium*.