

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

ZAKLJUČNA NALOGA
SODOBNI PRISTOPI PRI PROUČEVANJU
MIKROBIOMA IN IZSLEDKI RAZISKAV NA
PODROČJU SREDOZEMSKIH KULTURNIH RASTLIN

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Zaključna naloga

**Sodobni pristopi pri proučevanju mikrobioma in izsledki
raziskav na področju sredozemskih kulturnih rastlin**

(Contemporary Approaches to Microbiome Research and Findings Concerning
Mediterranean Crops)

Ime in priimek: Nika Tomažič
Študijski program: Biodiverziteta
Mentor: doc. dr. Matjaž Hladnik

Koper, junij 2020

Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Nika TOMAŽIČ

Naslov zaključne naloge: Sodobni pristopi pri proučevanju mikrobioma in izsledki raziskav na področju sredozemskih kulturnih rastlin

Kraj: Koper

Leto: 2020

Število listov: 58

Število referenc: 171

Mentor: doc. dr. Matjaž Hladnik

Ključne besede: mikrobiom, metode sekvenciranja naslednje generacije, sredozemske kulturne rastline, trajnostne strategije

Izvleček:

Rastline gostijo širok spekter mikroorganizmov, ki so ključni pri mnogih bioloških procesih. Mikroorganizmi so prisotni na podzemnih delih rastlin (rizosfera), na nadzemnih delih rastlin (filosfera) in v notranjih tkivih rastlin (endosfera). V zaključni nalogi so za vsak mikrobiom oziroma za vsak omenjeni življenjski prostor mikroorganizmov predstavljeni dejavniki, ki vplivajo na gostoto in sestavo združb, in podrobno je proučen pomen mikroorganizmov na rast, razvoj in zdravje gostiteljske rastline. Sodobne ali tako imenovane metode sekvenciranja naslednje generacije omogočajo poglobljeno proučevanje mikrobne združbe, kjer s pomočjo specifične regije (kot npr. za prokariote 16S rRNK, za evkariote pa regiji med ribosomskimi geni oziroma ITS regiji) lahko proučujemo in taksonomsko identificiramo tarčne gene iz določenega vzorca. V nalogi so opisane metode za karakterizacijo mikrobnih združb, in sicer od izolacije DNK pa vse do statističnih analiz, ki nam omogočajo boljše razumevanje interakcij med mikroorganizmi ter med mikroorganizmi in rastlinami. Na področju kmetijstva lahko rezultati prispevajo k razvoju novih trajnostnih strategij, zato so v zadnjem sklopu naloge predstavljene novejšje raziskave mikrobioma sredozemskih kulturnih rastlin, kot so citrusi, oljka in vinska trta.

Key words documentation

Name and SURNAME: Nika TOMAŽIČ

Title of the final project paper: Contemporary Approaches to Microbiome Research and Mediterranean Crops Research Findings

Place: Koper

Year: 2020

Number of pages: 58

Number of references: 171

Mentor: Assist. Prof. Matjaž Hladnik, PhD

Keywords: microbiome, next generation sequencing methods, Mediterranean crops, sustainability strategies

Abstract:

Plants host a wide range of microorganisms which are crucial in many biological processes. Microorganisms can be found on underground portions of plants (rhizosphere), above-ground portions (phyllosphere) and internal tissues of plants (endosphere). The thesis presents factors for each microbiome i.e. for each microbial habitat, which affect the density and community composition as well as a detailed analysis of their significance for growth, development and health of the host plant. Contemporary methods or next generation sequencing methods enable an in-depth examination of microbial communities to examine and taxonomically identify target genes from a specific sample using specific regions (16S rRNA for prokaryotes and regions between ribosomal genes, i.e. Internal transcribed spaced (ITS) regions for eukaryotes). The thesis describes characterisation methods for microbial communities from DNA isolation to statistical analyses that enable a better understanding of interactions among microorganisms as well as among microorganisms and plants. In the field of agriculture, the results could contribute to the development of new sustainability strategies which is why the final section of the thesis represents recent research projects dealing with the microbiome of Mediterranean crops such as the citrus, olive and grape vine.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Matjažu Hladniku za vso strokovno pomoč in usmerjanje pri izdelavi zaključne naloge.

Posebno se zahvaljujem družini, fantu in prijateljem, ki so mi ob izdelavi zaključne naloge stali ob strani in me spodbujali.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
2	HOLOBIOM OZIROMA HOLOGENOM: CELOVIT GENSKI SISTEM.....	2
3	EKOLOGIJA MIKROBIOMA	3
3.1	Rizosfera	3
3.1.1	Dejavniki, ki vplivajo na sestavo rizosfernega mikrobioma	4
3.1.2	Mikrobiota rizosfere	5
3.1.3	Vloga pri rizosfernih mikroorganizmih in vpliv na rast, razvoj in bolezn rastlin	6
3.1.3.1	Vpliv rizosfernih mikroorganizmov na pridobivanje hranilnih snovi.....	6
3.1.3.2	Pomen mikroorganizmov pri obrambi rastline pred patogenimi mikroorganizmi	7
3.1.3.3	Vloga mikroorganizmov pri prilagajanju rastlin na ekstremne razmere..	9
3.2	Filosfera	10
3.2.1	Mikroklimatske razmere.....	11
3.2.2	Mikrobiota filofsere.....	12
3.2.3	Načini prilagajanja mikroorganizmov na razmere v filofsferi.....	13
3.2.4	Vloga filofsfernih mikroorganizmov na rast, razvoj in bolezn rastlin.....	13
3.2.4.1	Vpliv filofsfernih mikroorganizmov na razpoložljivost hranil in sintezo hormonov	14
3.2.4.2	Obramba pred patogenimi mikroorganizmi	15
3.3	Endosfera	15
3.3.1	Vstop endofitov v rastlino in načini širjenja po rastlini.....	16
3.3.2	Mikrobiota endosfere.....	17
3.3.3	Prilagoditve endofitnih mikroorganizmov	17
3.3.4	Vloga endosfernih mikroorganizmov na rast, razvoj in bolezn rastlin	18
3.3.4.1	Vpliv endosfernih mikroorganizmov na pridobivanje hranil in hormonov	18
3.3.4.2	Pomen pri odpornosti rastlin pred patogenimi mikroorganizmi in onesnaževalci.....	19
4	META-OMSKI PRISTOPI ZA KARAKTERIZACIJO MIKROBNIH ZDRUŽB NA OSNOVI DNK	19
4.1	Izolacija DNK	20
4.2	Priprava DNK knjižice za sekvenciranje, molekularni markerji, primerni za metabarkodiranje mikroorganizmov, ter pomen izbora začetnih oligonukleotidov.....	20
4.3	Potek bioinformatične analize zaporedij, pridobljenih z visoko zmogljivimi tehnologijami za sekvenciranje	22

5	PREGLED RAZISKAV MIKROBIOMA SREDOZEMSKIH KULTURNIH RASTLIN	25
5.1	Citrusi.....	25
5.2	Oljka.....	26
5.3	Vinska trta.....	28
6	ZAKLJUČEK.....	30
7	LITERATURA IN VIRI.....	32

SEZNAM KRATIC

ACC	aminociklo-propan 1-karboksilna kislina
angl.	angleško
ASV	različice namnoženih zaporedij oziroma variante (angl. amplicon sequence variant)
CK	citokini
DNK	deoksiribonukleinska kislina
EPS	eksopolisaharidi
ET	etilen
FIT1	transkripcijski faktor, povezan s pomanjkanjem železa (angl. Fe deficiency induced transcription factor 1)
FRO2	železova reduktaza (angl. ferric reductase)
HLB	bakterijska bolezen citrusov Huanglongbing
VOC	hlapne organske spojine (angl. volatile organic compounds)
IAA	indol-3-ocetna kislina
IRT1	železov transporter (angl. iron-regulated transporter 1)
ITS	notranji prepisani vmesnik (angl. Internal Transcribed Spacer)
JA	jasmonska kislina
LPS	lipopolisaharidi
MHB	bakterije, ki pozitivno vplivajo na mikorizo (angl. mycorrhiza helper bacteria)
µm	mikrometer
mm	milimeter
NaCl	natrijev klorid
ng	nanogram
nifH	gen, ki sodeluje pri fiksaciji dušika (angl. nitrogen fixation gene)
nm	nanometer
OTU	operativna taksonomska enota (angl. operational taxonomic unit)
oz.	oziroma
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
PGPR	rast spodbujajoče rizobakterije (angl. plant growth promoting rhizobacteria)
PNA	peptidna nukleinska kislina (angl. peptide nucleic acid)
PSM	fosfat-raztapljajoči mikroorganizmi (angl. phosphate solubilising microorganisms)
pv.	patovar
ROS	reaktivne kisikove spojine (angl. reactive oxygen species)
sp.	vrsta, ki je ni možno oziroma potrebno specificirati

spp.	več pripadnikov nekega rodu, ki jih ni možno oziroma ni potrebno specificirati
subsp.	podvrsta
rRNK	ribosomska ribonukleinska kislina
tj.	to je
var.	varieteta
VBNC	nekultivabilno stanje mikrobnih celic (angl. viable but non culturable microbial cells)

1 UVOD

Rastline so se razvile z raznoliko množico mikroorganizmov, ki imajo pomembno vlogo pri življenjskem ciklu rastlin. Mikrobno združbo rastline imenujemo tudi rastlinska mikrobiota (obsega vse mikroorganizme) ali rastlinski mikrobiom (obsega vse genome mikroorganizmov) (Compant in sod. 2019). Ta raznolika skupina arhej, bakterij, gliv in praživali zavzema tako notranja (endosfera) kot zunanja tkiva rastlin, kar vključuje koreninski sistem in njegovo bližnjo okolico (rizosfera) in vse nadzemne dele rastlin (filosfera), kot so steblo, poganjki, listi in cvetovi. Rizosfera je območje bogate mikrobne raznolikosti, na katero vplivajo koreninski izločki rastlin. Filosfera pa je pod vplivom ekstremnih temperatur, sončnega sevanja in vlage. Mikroorganizmi rizosfere, v bližini ali na rastlinskem tkivu, in filofsere veljajo za epifite, medtem ko mikroorganizmom, ki živijo v notranjih tkivih rastlin, pravimo endofiti (Turner in sod. 2013).

Rastline so s svojimi sobivajočimi mikroorganizmi vzpostavile raznolike odnose. Glede na načine prehranjevanja razlikujemo saprofitizem (mikroorganizmi oziroma saprofiti, ki razgrajujejo organsko snov) in simbiozo (medsebojni odnos). Med odnose s pozitivnim učinkom štejemo mutualizem, kjer imajo tako rastlina kot mikroorganizmi korist, med nevtralne odnose štejemo komenzalizem, pri katerem ima en organizem korist, drugi pa ne škoda ne koristi, ter odnose s škodljivim učinkom oziroma parazitizem, kjer nekateri mikroorganizmi lahko povzročijo bolezni rastlin (Andrews in Harris 2000). Rastline se na stresne razmere prilagajajo s pomočjo mikroorganizmov. Ti jim pomagajo pri črpanju vode, prestajanju nizkih ali visokih temperatur in sončnemu sevanju ter razpoložljivosti hranilnih snovi. Poleg tega nekateri mikroorganizmi preprečujejo razvoj patogenih mikroorganizmov oziroma povzročiteljev bolezni (Turner in sod. 2013).

Proučevanje interakcij in sestave mikrobne združbe omogočajo sodobne metode sekvenciranja. Na področju kmetijstva lahko analize mikrobioma prispevajo k razvoju novih trajnostnih strategij pri pridelavi sredozemskih kulturnih rastlin. Prav zaradi tega se mikroorganizmom v zadnjih letih namenja več pozornosti in zanimanja za proučevanje (Schäfer in Adams 2015).

2 HOLOBIOM OZIROMA HOLOGENOM: CELOVIT GENSKI SISTEM

Tako kot je človeški mikrobiom pomemben za naše zdravje, je tudi rastlinski mikrobiom pomemben za zdravje rastline. Rastline so sesilni organizmi, ki se soočajo s številnimi izzivi pri pridobivanju zadostnih hranil, obrambi pred rastlinojedci in patogeni ter prilagajanju abiotskim dejavnikom, kot so suša, zasoljena tla in razni onesnaževalci. Mikrobiom lahko rastlini pri tem pomaga. Rastlinska genetska prilagodljivost je razmeroma počasna, zato ima sobivajoči mikrobiom prednost, ki omogoča hitrejše prilagajanje spreminjajočemu se okolju. Specifične združbe mikrobioma se lahko razlikujejo glede na okolje, genotip rastline ter abiotske ali biotske stresorje (Doty 2017).

Kopenske rastline in mikroorganizmi sobivajo že 450 milijonov let (Hassani in sod. 2018). Skupaj tvorijo celoto, imenovano holobiont. Termin se nanaša na rastlinskega gostitelja skupaj z vsemi povezanimi mikroorganizmi, ki živijo na gostitelju (t. i. eksosimbionti) ali v notranjih tkivih (t. i. endosimbionti) (vključno z virusi) (Rosenberg in Zilber-Rosenberg 2018). Koncept holobionta zahteva vpogled v funkcije ter interakcije med rastlinskim gostiteljem in z njim povezanimi mikroorganizmi kot eno samo dinamično entiteto. Interakcije na ravni genoma rastline in mikrobioma pa imenujemo hologenom (Vandenkoornhuysse in sod. 2015). Omenjena definicija hologenoma temelji na predpostavki, da selekcijski procesi in prilagajanje tekom evolucije delujejo na celoten holobiont. Koncept evolucije hologenoma temelji na številnih ugotovitvah, in sicer (Rosenberg in Zilber-Rosenberg 2018):

- Vse živali in rastline živijo v simbiozi z bogato in raznoliko mikrobioto, zato vsak posebej predstavlja holobiont.
- Gostitelj s svojim mikrobiomom (tj. holobiont) tekom razvoja in evolucije deluje kot ločena biološka enota, in sicer anatomsko, metabolno in imunološko.
- Pomemben delež mikrobioma se skupaj z gostiteljsko rastlino prenaša iz ene generacije v drugo, s čimer se ohranjajo oziroma prenašajo edinstvene lastnosti holobionta.
- Genetske spremembe v hologenomu so lahko povzročene zaradi sprememb v genomu gostitelja (npr. mutacija, spolna rekombinacija, epigenetske spremembe) kot tudi zaradi sprememb v genomu mikrobiomov (povečanje ali zmanjšanje števila že obstoječih mikrobnih združb, pridobitev novih mikrobnih predstavnikov). Za razliko od mutacije, ki povzroča majhne spremembe obstoječih genomov, lahko pridobitev novih mikroorganizmov povzroči na stotine novih genov v holobiontu.

Koncept hologenoma predstavlja nov pogled na simbiozo. Do nedavnega je bila večina pomembnih raziskav o simbiozi izvedena z manjšim številom modelnih sistemov, ki

vključujejo gostitelja in en primarni simbiot, npr. stročnice (Fabaceae) in dušik fiksirajoča bakterija *Rhizobium*. Študije o modelnih sistemih so pripomogle k boljšemu razumevanju razvoja in ohranjanja simbioze. Koncept hologenoma ni pomemben samo za posamezne uveljavljene simbionte, temveč tudi za izjemno raznolike povezane mikroorganizme, ki so bili v zadnjih letih odkriti z molekularnimi tehnikami (Rosenberg in Zilber-Rosenberg 2014).

3 EKOLOGIJA MIKROBIOMA

V ekologiji je združba temeljna enota organizacije. Mnoge teorije o združbah (tj. sukcesija, multitrofične interakcije, oblikovanje združb (angl. community assembly)) poskušajo razjasniti kompleksne interakcije vrst in te se vedno bolj uporabljajo za proučevanje nekaterih najbolj zapletenih združb našega planeta – mikrobiomov. Nedavni napredek na področju tehnologije sekvenciranja in bioinformatičnih analiz omogoča veliko več kot le vpogled v sestavo in filogenetsko raznolikost mikroorganizmov; omogoča tudi proučevanje interakcij med gostiteljem in raznoliko združbo mikroorganizmov (Christian in sod. 2015).

Mikrobiom sestavljajo številni prokariontski in evkariontski organizmi, ki zavzemajo skoraj vsa tkiva rastlin. Mikroorganizmi so predmet raziskav zaradi njihove vloge pri odvzemu hranil, metabolizmu, fiziologiji in imunologiji gostitelja (Christian in sod. 2015).

3.1 Rizosfera

Tla, ki obdajajo rastline, predstavljajo največji rezervoar biološke raznovrstnosti na Zemlji. V rizosferi so lahko mikroorganizmi prostoživeči ali pa pritrjeni na površino koreninskega sistema, kjer vzpostavijo simbiotične odnose z rastlinami. Skupni genom teh mikrobnih združb je veliko večji od rastlinskega, zato ga pogosto imenujemo tudi drugi rastlinski genom (Berendsen in sod. 2012).

Leta 1904 je rizosfero prvi definiriral nemški agronom in rastlinski fiziolog Lorentz Hiltner kot območje okoli rastlinskega koreninskega sistema, v katerem sobiva edinstvena populacija mikroorganizmov, ki je pod vplivom spojin, ki jih izločajo korenine (Hitner 1904; Singh in sod. 2017). Trenutna definicija deli rizosfero na tri cone, ki so definirane glede na bližino korenini (Singh in sod. 2017):

- Endorizosfera vključuje dele korteksa in endodermisa, kjer so v apoplastu prisotne endofitske bakterije.
- Rizoplana je del tal, ki so neposredno v stiku s korenino, vključno z epidermisom korenine in sluzi.

- Ektorizosfera je najbolj oddaljen del tal, ki se razteza od rizoplane stran od korenin.

Zaradi kompleksnosti in raznolikosti koreninskega sistema velikost in oblika rizosfere nista definirani, vendar se območje lahko opredeli na podlagi različnih kemijskih, bioloških in fizikalnih lastnosti, ki se spreminjajo radialno in longitudinalno vzdolž korenine (Singh in sod. 2017).

3.1.1 Dejavniki, ki vplivajo na sestavo rizosfernega mikrobioma

Rizosfera naj ne bi vključevala več kot nekaj milimetrov debele plasti tal (Lugtenberg 2015). V tem okolju prihaja do interakcij med koreninami rastlin, tlemi in mikrobi, ki bistveno spremenijo fizikalne in kemijske lastnosti tal, kar vpliva na spremembe v mikrobnih populaciji in združbi. Pomemben faktor za interakcije med koreninami in mikrobnimi združbami so eksudati rastlinskih korenin (izločki), ki služijo kot substrat ali signalne molekule za mikroorganizme (Huang in sod. 2014). Korenine izločajo ione, prosti kisik, vodo, encime, polimerizirane sladkorje oziroma sluz, raznoliko paleto primarnih in sekundarnih metabolitov in propadajočih celic koreninskega vršička (Bais in sod. 2006). Eksudati so praviloma razvrščeni v dva razreda, in sicer spojine z nizko molekulsko maso, kot so aminokisliline, organske kisline, sladkorji, fenolne spojine in drugi sekundarni metaboliti, in spojine z visoko molekulsko maso, kot so polisaharidi in proteini (Bais in sod. 2006; Huang in sod. 2014). Izločki koreninskega sistema vsebujejo približno 5–21 % ogljika, ki ga nato mikroorganizmi uporabijo za svoje delovanje (Huang in sod. 2014). Poleg tega so pomembni tudi zaradi vsebnosti sekundarnih metabolitov, kot so protimikrobne spojine, nematocidi in flavonoidi, saj pomagajo pri vzpostavljanju simbioze in preprečevanju rasti patogenov. Pri oblikovanju mikrobne združbe imajo pomembno vlogo abiotski dejavniki, predvsem je ključen pH, ki se zaradi sproščanja in prevzemanja ionov skozi korenine zniža ali zviša za eno do dve enoti. Rastline vplivajo na sestavo mikrobne združbe preko različnih bioloških procesov, kot na primer prevzemanje vode in celično dihanje koreninskega sistema, kar lahko privede do sprememb v tlaku kisika v tleh. Prav tako je tudi razpoložljivost hranilnih snovi pod vplivom izločkov rastlin, saj tako imenovani kelatorji, kamor spadajo tudi fitosiderofori, povečajo biološko razpoložljivost kovin. Sestava mikrobne združbe se lahko spremeni med samim življenjskim ciklom rastlin (Philippot in sod. 2013). V študiji so Chaparro in sod. (2013) ugotovili, da se v zgodnjih fazah razvoja sproščajo alkoholi in sladkorji, v poznejših fazah pa prevladujejo aminokisliline in fenolne spojine, s čimer naj bi rastline v začetku razvoja privabile raznoliko združbo mikroorganizmov, v poznejših fazah razvoja pa selekcionirale določene mikroorganizme. Zaradi razlik v tipu korenin (primarne in sekundarne), conah (apikalni in

lateralni meristem) in tudi gibanju korenin med rastjo so mikroorganizmi v rizosferi nehomogeno porazdeljeni (Philippot in sod. 2013).

Splošno je znano, da raznolika združba rastlin vpliva na raznolikost mikroorganizmov. Ta trditev veliko bolj velja za naravne ekosisteme kakor za kmetijske, saj je raznolikost rastlin v slednjih manjša. Poleg tega obstajajo tudi drugi dejavniki (npr. vrsta rastline, diverzitetna rastlin, tip tal, klima in način kmetijske obdelave tal), ki vplivajo na sestavo mikrobne združbe. Razumevanje teh različnih dejavnikov je zapleteno, saj se mnogi procesi prepletajo. Mikrobiota rizosfere je pod vplivom prostorskih in časovnih sprememb, lastnosti tal in lastnosti korenin, starosti rastline in fiziološkega stanja rastline. Za proučevanja kompleksnega vpliva različnih dejavnikov znanstveniki razvijajo nova analitična orodja, kot je na primer dvodimenzionalna upodobitev dinamike kisika, organskih kislin in pH v rizosferi rastlin (Blossfeld in sod. 2011).

3.1.2 Mikrobiota rizosfere

Gostota mikroorganizmov v rizosferi je zaradi razpoložljivega ogljika v obliki koreninskih izločkov veliko večja kot v tleh, bolj oddaljenih od korenin. Ta fenomen imenujemo tudi učinek rizosfere (Berendsen in sod. 2012). Rizosfero naseljujejo številne bakterije, glive, oomicete, virusi in arheje, kjer se prehranjujejo z rizodepoziti (Philippot in sod. 2013). V študiji avtorjev Nannipieri in sod. (2007) je bilo ugotovljeno, da lahko izločki rastlin različno vplivajo na številčnost bakterij, saj pri gram negativnih vplivajo ugodno, medtem ko imajo pri gram pozitivnih zaviralni učinek. Druga študija pa je pokazala, da na sestavo in relativno številčnost mikrobnih populacij v rizosferi vpliva tudi vrsta rastlin, npr. pri različnih gojenih rastlinskih vrstah, kot so koruza (*Zea mays* L.), oves (*Avena sativa* L.), ječmen (*Hordeum vulgare* L.) in umetno posajena trava (komercialna mešanica trav s prevladujočo vrsto *Lolium perenne* L.) (Garbeva in sod. 2008).

Najbolj dominantna skupina v mikrobioti rizosfere so bakterije iz debla Proteobacteria (Sharma in sod. 2005; DeAngelis in sod. 2009), saj so te hitro rastoči r-strategi z zmožnostjo izkoriščanja široke palete virov ogljika, pridobljenih iz korenin (Philippot in sod. 2013). V rizosferi dominirajo tudi glive iz debla Ascomycota in Glomeromycota, ki prav tako izkoriščajo koreninske substrate (Philippot in sod. 2013). Metagenomske študije so pokazale, da v rizosferi riža prevladujejo predstavniki bakterij iz debel Acidobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria, Actinomycetes in Planctomycetes (Bhattacharyya in sod. 2016), medtem ko je analiza rizosfere pšenice pokazala prisotnost bakterij iz debel Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Chloroflexi in Planctomycetes (Naz in sod. 2014). Večji del rizosfere soje predstavljajo bakterije iz debla Actinobacteria in γ -proteobakterije (Bresolin in sod. 2010). Podobno mikrobno raznolikost najdemo pri sladkornem trsu, kjer so analize pokazale številčno zastopanost predstavnikov

Proteobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes in Actinobacteria (Pisa in sod. 2011).

3.1.3 Vloga pri rizosfernih mikroorganizmih in vpliv na rast, razvoj in bolezni rastlin

Interakcije med rastlino in mikroorganizmi v rizosferi igrajo pomembno vlogo pri številnih vitalnih procesih ekosistemov. Te lahko razvrstimo v tri osnovne skupine: (i) pozitivne interakcije, pri katerih imata oba partnerja koristi (mutualizem) ali pa ima le en partner korist, ne da bi pri tem prizadel drugega (asociativno); (ii) nevtralne interakcije, pri katerih nobeden od partnerjev nima neposredne koristi in v katerem nobeden od njih ni oškodovan; in negativne (patogene) interakcije, pri čemer je en partner (gostitelj) oškodovan (Singh in sod. 2004). V pozitivne interakcije uvrščamo različne rastlinske mikroorganizme, kot so rast spodbujajoče rizobakterije (angl. Plant Growth Promoting Rhizobacteria – PGPR) in mikorizne glive, ki so se izkazale kot učinkoviti akterji pri fiksaciji hranil, proizvodnji rastnih hormonov, zatiranju bolezni ter povečani odpornosti na abiotske in biotske stresorje (Lugtenberg in sod. 2002; Huang in sod. 2014).

3.1.3.1 Vpliv rizosfernih mikroorganizmov na pridobivanje hranilnih snovi

Mikrobiom rizosfere lahko pomembno vpliva na pridobivanje hranil za rastlino. Najbolj poznana skupina mikroorganizmov, ki pomaga pri vezavi dušika, so rizobiji. Biološka fiksacija je najučinkovitejša pri interakciji med stročnicami in znanimi α -proteobakterijami (Lugtenberg in sod. 2002), prav tako pa v študiji Gyaneshwar in sod. (2011) pojasnjujejo interakcijo z β -proteobakterijami. S pomočjo ustvarjenih nodulov se vzpostavi simbioza, kjer rizobiji vnesejo atmosferski dušik v gostiteljsko rastlino (simbiotično fiksiranje dušika), v zameno pa od gostitelja dobijo ogljik oziroma energijo (Lugtenberg 2015). V študiji so Guimarães in sod. (2012) na podlagi poskusa v rastlinjaku določili nukleotidno zaporedje gena 16S rRNK iz sevov, izoliranih iz nodulov graha, in ugotovili, da so najbolj uspešni rodovi pri biološki fiksaciji dušika *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Burkholderia* in *Achromobacter*. Specifični mikroorganizmi so ključni tudi pri kroženju fosforja v tleh. Takim mikroorganizmom pravimo fosfat-raztapljajoči mikroorganizmi (angl. phosphate solubilising microorganisms – PSM), ki raztapljajo različne anorganske fosfate, kot so soli kalcija, aluminija ali železa (Barea in Richardson 2015). V študiji Marschner (2008) povzema, da med omenjene mikroorganizme spadajo predstavniki iz rodov *Bacillus*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Pantthoea*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, med tipične predstavnike gliv pa *Aspergillus*, *Trichoderma* in *Penicillium*. Marschner (2008) povzema avtorje Schmidt in sod. (1988), da lahko rizosferni mikroorganizmi povečajo razpoložljivost fosfatov rastlinam, tako da sproščajo regulatorje rasti rastlin, kot je indol-3-

ocetna kislina oziroma IAA, ali pa stimulirajo mikorizno kolonizacijo (npr. specifične bakterije, t. i. MHB (angl. mycorrhiza helper bacteria), ki pozitivno vplivajo na vzpostavitev mikorize).

Rizosferni mikroorganizmi lahko tudi olajšajo prevzem določenih elementov v sledovih, kot je železo. Železa je v tleh veliko, vendar je v nevtralnih in alkalnih pogojih dostopen le v netopni obliki železovega oksida, ki ni razpoložljiv za rast mikroorganizmov. V primeru pomanjkanja in toksičnosti prostega železa pri povišanih koncentracijah so bakterije razvile različne mehanizme za uravnavanje koncentracij. Gostiteljska rastlina se na omejitev železa odzove s povečanjem topnosti anorganskega železa (strategija I) ali pa s sproščanjem fitosideroforjev (produkt koreninskih celic), ki se nato prenesejo nazaj v tkivo korenine s posebnim sistemom privzema (strategija II) (Walker in Connolly 2008). Rizobakterije lahko za pridobivanje železa aktivirajo tudi lastne mehanizme. Pri rodu rastlin *Arabidopsis* so pokazali, da *Bacillus subtilis* sev GB03 regulira transkripcijo transkripcijskega faktorja, imenovanega »Fe-deficiency-induced transcription factor 1 (FIT1)«, ki je potreben za sintezo železove reduktaze FRO2 in železovega transporterja IRT1 (Zhang in sod. 2009).

Večina rizobakterij pridobiva energijo s pomočjo asimilacije organskih spojin. Razpoložljivost in dostopnost razgradljivih organskih spojin je v večini tal omejena, najpogosteje pa se je kot omejevalni dejavnik za rast bakterij izkazal ogljik. Bakterijske združbe igrajo glavno vlogo pri sproščanju hranilnih kationov iz mineralnih snovi v tleh, ki niso potrebne samo za lastno prehrano, ampak tudi za prehrano rastlin (Aldén in sod. 2001).

3.1.3.2 Pomen mikroorganizmov pri obrambi rastline pred patogenimi mikroorganizmi

Rizosferni mikroorganizmi lahko preprečijo rast patogenov pred in med primarno okužbo ter med sekundarnim širjenjem. Širjenje patogenov preprečujejo s posebnimi mehanizmi, kot so antibioza, parazitizem in inducirana sistemska odpornost (Lugtenberg in Kamilova 2009).

Večina rizosfernih predstavnikov bakterij in gliv proizvaja antibiotične spojine, s katerimi zavirajo rast ali aktivnost konkurenčnih mikroorganizmov. Veliko pozornosti so prejele vrste iz rodu *Trichoderma*, ki proizvedejo več različnih sekundarnih metabolitov in encimov. Poleg tega lahko različni sevi spodbujajo rastline k proizvodnji lastnih protimikrobnih spojin. Dober primer predstavlja kolonizacija korenin kumar s sevom *Trichoderma asperellum* T-203, kjer je prišlo do povečane ravni fenolnih glukozidov v listih. Njihovi aglikoni (fenolni glukozidi z odstranjenim sladkornim delom) namreč močno zavirajo vrsto bakterij in gliv. Izkazalo se je, da je prišlo do povečanja sinteze inhibitornih spojin le pri rastlinah, pri katerih so korenine inokulirali najprej s sevom *T.*

asperellum T-203 in pri katerih so bili listi okuženi z bakterijskim patogenom *Pseudomonas syringae* pv. *lacrymans* (Harman in sod. 2004). Nekateri glivični in bakterijski biokontrolni sevi lahko proizvedejo antibiotične spojine, ki imajo različno stopnjo antimikrobnega delovanja. Na primer bakteriocin, kot je agrocin 84, ki ga proizvede *Agrobacterium radiobacter*, kaže na antibiotične aktivnosti proti tesno sorodnim rodovom (Kim in sod. 2006), medtem ko številni lipopeptidni antibiotiki, proizvedeni s strani glive *Aspergillus*, kažejo na antibiotično aktivnost širokega spektra (Raaijmakers in sod. 2010). Zanimivo je, da imajo lahko različne koncentracije antibiotičnih spojin drugačne učinke na mikroorganizmih. Študija je pokazala, da je delovanje antibiotikov odvisno od subinhibitornih koncentracij, in sicer pri visokih koncentracijah delujejo kot zaviralci rasti, pri nizkih pa kot posredniki medceličnega signaliziranja (Fajardo in Martinez 2008).

V zadnjih letih se vedno več pozornosti posveča hlapnim organskim spojinam (HOS) (angl. volatile organic compounds – VOC), ki jih proizvajajo različni rizosferni mikroorganizmi. Ti posredujejo zapletene interakcije med mikroorganizmi in rastlinami. HOS proizvajajo različne vrste bakterij, kot so *Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia plymuthica*, *Pseudomonas trivialis*, *P. fluorescens*, *Bacillus subtilis* in *Burkholderia cepacia*, ki imajo zaviralni učinek na rast micelija rastlinskih patogenih gliv (Kai in sod. 2007). Prav tako lahko vplivajo na tristrane interakcije med bakterijami, glivami in ogorčicami (Son in sod. 2009). V tem kontekstu so Son in sod. (2009) pokazali, da sta vrsti *Paenibacillus polymyxa* in *P. lentimorbus* na sadikah paradižnika izkazali močne protiglivične aktivnosti, kar je vplivalo na interakcije med patogeno ogorčico *Meloidogyne incognita* in glivo *Fusarium oxysporum*.

Rizobakterije imajo zmožnost uravnavanja rastlinskega imunskega sistema. Sistemski odziv, ki ga povzročajo pri rastlinah, je v mnogih primerih izražen s fitohormoni, kot sta jasmonska kislina (JA) in etilen (ET). Vendar pa nekateri bakterijski sevi ne povzročajo odpornosti preko JA/ET poti, ampak s pomočjo sproščanja salicilne kisline (Van de Mortel in sod. 2012). Spet druge koristne bakterije, kot je *Bacillus cereus* AR156, pa imajo zmožnost aktiviranja obeh signalnih poti (Niu in sod. 2011). Zanimiva študija o uravnavanju rastlinskega imunskega sistema je razkrila, da sta dva različna seva *P. fluorescens* zmanjšala sprejem ogljika rastline, vendar pa v prisotnosti patogena *Pseudomonas syringae* povečala odpornost rastline (Weston in sod. 2012). Ugotovitve študije kažejo, da imajo rizobakterije različno močne učinke na imunski odziv, fiziologijo in presnovo gostiteljske rastline, kar se lahko odraža v povečani sintezi znanih sekundarnih metabolitov ali sintezi neznanih metabolitov (Van de Mortel in sod. 2012).

3.1.3.3 Vloga mikroorganizmov pri prilagajanju rastlin na ekstremne razmere

Rizosferni mikrobiom omogoča nekaterim rastlinskim vrstam preživetje v ekstremnih razmerah (Mayak in sod. 2004). Kot primer navajamo študijo Mayak in sod. (2004), kjer pojasnjujejo, da je rizobakterija *Achromobacter piechaudii* ARV6, izolirana iz sušnega in slanega okolja, bistveno povečala biomaso sadik paradižnika in popra v prehodnem obdobju suše. Na razvoj rastlin močno vpliva tudi slanost tal. V slanih tleh večinoma uspevajo tako imenovane halotolerantne bakterije, ki v povezavi z gostiteljsko rastlino spodbujajo rast le-te (Upadhyay in sod. 2009). V študiji so Upadhyay in sod. (2009) ugotovili, da je imela pšenica v slanih tleh visoko diverzitetu rizobakterij. Nadalje so ugotovili, da je bilo od 130 rizobakterijskih izolatov 24 odpornih na relativno visoko koncentracijo (8 %) NaCl. V slanih razmerah vseh štiriindvajset izolatov proizvaja indol-3-očetno kislino oziroma IAA (fitohormon, ki spodbuja rast korenin), medtem ko je imelo deset izolatov sposobnost raztapljanja fosforja, osem proizvodnje siderofore in šest gibrelina. Prav tako so med vsemi štiriindvajsetimi izolati odkrili dva z genom *nifH* (angl. nitrogen fixation gene), kar kaže na njihov potencial za fiksacijo dušika. Prevladujoč delež bakterij, izoliranih iz slanih tal, je bil iz rodu *Bacillus* (Upadhyay in sod. 2009), vendar so v študiji Jha in sod. (2012) identificirali tudi druge vrste, kot so *Brachybacterium saurashtrense*, *Zhihengliuella* sp., *Brevibacterium casei*, *Haererehalobacter* sp., *Halomonas* sp., *Vibrio* sp., *Cronobacter sakazakii*, *Pseudomonas* spp., *Rhizobium radiobacter* in *Mesorhizobium* sp., ki so bili izolirani iz koreninskega sistema ekstremnega halofita *Salicornia brachiata*.

Nekatere rizobakterije so prilagojene na okolja z nizkimi temperaturami (Katiyar in Goel 2003; Barka in sod. 2006). Kot zanimiv primer lahko izpostavimo *Burkholderia phytofirmans* PsJN, ki pri temperaturah do 4 °C spodbuja fiziološko aktivnost in rast koreninskega sistema vinske trte (Barka in sod. 2006). Pri identifikaciji mehanizmov, ki spodbujajo rast rastlin pri nizkih temperaturah sta Katiyar in Goel (2003) izolirala tolerantne mutante različnih sevov bakterije *Pseudomonas fluorescens*.

Druga dva pomembna abiotska dejavnika, ki lahko negativno vplivata na rast rastlin, sta pH in visoke koncentracije toksičnih spojin. V primeru nizkega pH-ja so v študiji dokazali, da je bakterija *Pseudomonas fluorescens* s spojino 2,4-diacetilgloroglucinolom (DAPG) bistveno zmanjšala poškodbe listov pri koruzi, ki so nastale zaradi nizkega pH-ja. To je prvi dokaz, da lahko bakterije, ki sintetizirajo DAPG, poleg zaviranja rasti patogenov sodelujejo tudi pri prilagajanju rastlin na abiotski stres (Raudales in sod. 2009). Za potrebe zmanjšanja vsebnosti toksičnih spojin v tleh raziskave tečejo tudi v smeri razvoja metod za zmanjšanje toksičnih spojin s pomočjo mikroorganizmov, čemur pravimo bioremediacija. V študiji so dokazali, da so se rastline *Trifolium repens* in *T. subterraneum* sistemsko

odzvale na kontaminacijo s policikličnimi aromatskimi ogljikovodiki. V onesnaženih rizosferah so se povečale populacije bakterij *Verrucomicrobia* in *Actinobacteria*, kar je povzročilo povečanje števila bakterij iz rodu *Denitratisoma*. Ugotovitev kaže na to, da je ta rod lahko pomemben pri rizoremedialnih procesih (Kawasaki in sod. 2012). Pri rizoremediaciji ogljikovodikov je prav tako pomembna endofitna gliva *Lewia* sp. (Cruz-Hernández in sod. 2013).

3.2 Filosfera

Življenjski prostor, ki ga mikroorganizmom nudijo nadzemni deli rastlin, imenujemo filosfera (Morris 2002). Izraz je leta 1955 prvič predstavil rastlinski patolog F. T. Last, ko je proučeval številčnost kvasovk (*Sporobolomyces* sp.) v različnih časovnih obdobjih. Na listni ploskvi žit je ocenjeval njihovo povezavo z okužbo pepelaste plesni (*Erysiphe graminis*) in ob tem ugotovil, da ima filosfera žit bogato mikrofloro (Last 1955). Filosfera poleg listne ploskve vključuje tudi ostale nadzemne dele rastlin, kot so cvetovi, plodovi, poganjki, semena in steblo (Morris 2002). Filosfera je v primerjavi z rizosfero s hranili revno okolje, zato je tudi razporeditev mikroorganizmov neenakomerna (Leveau in Lindow 2001). Najbolj razširjeni celični organizmi filosfere so bakterije, ki zastopajo med 10^5 in 10^7 celic na cm^2 lista (Hirano in Upper 2000), vendar lahko najdemo tudi različne viruse, nitaste glive, kvasovke, alge in občasno tudi protozoje in nematode (Lindow in Brandl 2003). Lindow in Brandl (2003) navajata, da se epifitske bakterijske populacije močno razlikujejo tako med rastlinskimi vrstami kot tudi med rastlinami iste vrste ter med kratkimi časovnimi intervali med rastno dobo. Te razlike so v veliki meri posledica abiotских in biotских dejavnikov ter fizioloških in anatomskih lastnosti rastlinskega lista, ki prispevajo k preživetju in rasti različnih mikroorganizmov (Morris 2002).

Listne reže in ostale topografske lastnosti predstavljajo ugodno okolje za naseljevanje mikroorganizmov, nudijo zaščito pred okoljem in tam je največja gostota mikroorganizmov. Nekatere rastline so na listnih robovih razvile modificirane stomate oziroma vodne pore. V primerjavi z listnimi režami se vodne pore ne odpirajo in zapirajo, temveč izločanje vode in ostalih raztopin poteka stalno. Vodne pore predstavljajo vstopna mesta za mikroorganizme v notranja tkiva rastlin. Naslednji tip specializiranih epidermalnih struktur so trihomi (Vacher in sod. 2016). Žlezni trihomi imajo izločevalno oziroma sekretijsko funkcijo, in sicer sproščanje raznih eksudatov, kot so polisaharidi, lipidi in proteini, medtem ko so nežlezni ključni pri zadrževanju in absorpciji vode, toleranci na visoke temperature in UV-sevanje ter pri zaščiti pred patogenimi mikroorganizmi (Werker 2000). Trihomi predstavljajo pomembno vlogo za mikrobioto, saj nudijo zaščito pred okoljskimi dejavniki (Vacher in sod. 2016).

3.2.1 Mikroklimatske razmere

Mikroklimo listov oziroma filoklimo (angl. phylloclimate) lahko opišemo kot okolje, ki ga ustvarjajo nadzemni organi rastlin. Definiramo jo s številnimi parametri, vključno s spektrom sončnega sevanja, temperaturo in značilnostmi zraka v neposredni bližini lista, kot sta relativna zračna vlaga in hitrost vetra (Chelle 2005). Listna površina je obdana z 1 mm do 10 mm debelo mejno plastjo, pri kateri je hitrost vetra manjša zaradi površinskega trenja. Običajno je hitrost vetra na površini listov nič, razen v primeru močnih sunkov, vendar kljub temu lahko pride do konvektivnega gibanja zraka zaradi temperaturnih razlik na različnih mestih lista. Znotraj mejne plasti se najpogosteje plini izmenjujejo preko difuzije, medtem ko se zunaj mejne plasti plini izmenjujejo zaradi gibanja zraka. Splošno velja, da je relativna zračna vlaga znotraj mejne plasti višja kot zunaj mejne plasti (Morris 2002).

Na razvoj in rast mikroorganizmov v filiosferi neposredno vplivata tudi temperatura in izpostavljenost UV-sevanju. Običajno, ko je temperatura zraka 30 °C oziroma nižja, je lahko temperatura na površini listov kar za 5–7 °C višja od temperature zraka. Temperatura se lahko na enem listu spremeni tudi za 4 °C, robovi listov pa so običajno hladnejši od osrednjega dela lista. Pri temperaturi okolja nad 30 °C je temperatura listov nižja, kar je lahko posledica pomembnih sprememb v notranjosti listov kot odpornost na izhlapevanje vode. To omogoča, da se listi ohladijo, s čimer rastlina prepreči razvoj bolezenskih znamenj (Morris 2002). UV-sevanje je v povprečju 95 % UV-A (320–400 nm) in 5 % UV-B (290–320 nm) (Jacobs in sod. 2005), vendar so učinki sevanja na mikrobne epifite različni: izpostavljenost UV-A vodi do tvorbe reaktivnih kisikovih spojin (angl. reactive oxygen species – ROS), medtem ko UV-B inducira mutacije DNK (Pourzand in Tyrrell 1999). Zaradi možnosti poškodb zaradi UV-sevanja so številni filiosferni mikroorganizmi razvili različne mehanizme (npr. proizvodnjo pigmentov) (Lindow in Brandl 2003).

Količina in porazdelitev vode na listih je še en zelo dinamičen parameter mikroklimat listov, ki močno vpliva na razvoj mikroorganizmov. Voda, ki se zadržuje na listni površini, izhaja iz več virov, in sicer rosenja, padavin (dež in megla), namakanja in gutacije (izločanje tekočin preko hidatod, ko je transpiracija rastline nizka, zlasti v času visoke relativne zračne vlažnosti in majhnega gibanja zraka). V povprečju lahko listna površina zadrži približno 5–30 mg na cm² vode, vendar pa je ta zmogljivost zadrževanja vode odvisna od velikosti vodnih kapljic, omočljivosti površine listov ter nagiba in gibanja lista. Velikost vodnih kapljic rosenja ali megle lahko dosega okoli 10 µm, medtem ko kapljice dežja ali namakalne vode presegajo to velikost. Trajanje proste vode na listih je odvisno tudi od omočenosti lista, saj se na relativno omočenih površinah listov kapljice hitreje razširijo in s tem tvorijo tanko plast, ki hitro izhlapi. Na zelo hidrofobnih površinah se kapljice ne razširijo, te se lahko celo združijo okoli trihomov. Poleg vode je v filiosferi bistvena tudi dostopnost hranil. Možni so številni viri hranilnih snovi preko difuzije

hlapnih spojin iz tkiv listov, hranila v gutacijskih tekočinah, razne spojine iz trihomov, cvetnega prahu in mane oziroma medene rose in pa tudi mrtvi mikroorganizmi (Morris 2002).

3.2.2 Mikrobiota filofere

Mikrobiota filofere je sestavljena iz interakcij med številni mikroorganizmi, gostiteljskimi rastlinami in okoljem (Roat in Saraf 2017). Največjo gostoto mikroorganizmov najdemo na območjih, ki omogočajo tesnejšo interakcijo z gostiteljsko rastlino, in sicer na dnu trihomov, v bližini listnih rež in celičnih stičišč. Ta območja naseljuje raznolika paleta mikroorganizmov, vendar običajno prevladujejo bakterije (Lindow in Brandl 2003). Na listni površini so bili najpogosteje identificirani predstavniki debla Proteobacteria. V tem deblu prevladujejo α -proteobakterije (npr. *Methylobacterium*, *Sphingomonas*) in γ -proteobakterije (npr. *Pseudomonas*) (Delmotte in sod. 2009). Najpomembnejša vrsta je bakterijski patogen *Pseudomonas syringae*, ki povzroča veliko gospodarske škode na številnih rastlinskih vrstah (Mansfield in sod. 2012). Ta v rastlino vstopa skozi listne reže, kjer se v medceličnih prostorih množično razmnožuje (Melotto in sod. 2008). Metilotrofne bakterije iz rodu *Methylobacterium* so za rast rastlin pomembni filoferni mikroorganizmi, ki pogosto uporabljajo metanol kot vir ogljika (Abanda-Nkpwatt in sod. 2006). Naslednji dve prevladujoči bakterijski debli sta Bacteroidetes in Actinobacteria. Pogosti predstavniki Bacteroidetes so iz rodu *Bacteroides*, *Chitinophaga* in *Cytophaga*. Predstavniki Actinobacteria pa vključujejo mikroorganizme, kot so *Mycobacterium*, *Nocardioidea* in *Streptomyces*. O prisotnosti in porazdelitvi arhej je nekoliko manj znanih raziskav, saj v filoferi predstavljajo manjši del mikrobne združbe (Vorholt 2012).

Glive so pomemben sestavni del filoferne mikrobiote, ki opravljajo najrazličnejše ekološke vloge. Pred zimskim mirovanjem oziroma dormanco rastlin prevladujejo glive iz debla Ascomycota, med katere spadajo predstavniki iz *Aureobasidium*, *Cladosporium* in *Taphrina* (Voříšková in Baldrian 2013). Vrsto *Aureobasidium pullulans* se običajno zaradi visoke zmožnosti nadzora patogenov lahko uporablja v biološkem varstvu (Schena in sod. 1999). Glive iz debla Basidiomycota, kamor spadata rodova *Cryptococcus* in *Sporobolomyces*, so na splošno tudi zelo bogato zastopane. Basidiomycota so zaradi visoke sposobnosti razgradnje lignina zelo pomembne pri poznejših fazah razgradnje organske snovi (listnega opada) (Voříšková in Baldrian 2013). Nasploh imajo filoferne glive pomembno vlogo pri kroženju hranil in ostalih pomembnih funkcijah za rast rastlin (Vacher in sod. 2016).

3.2.3 Načini prilagajanja mikroorganizmov na razmere v filozferi

Beattie in Lindow (1999) sta predstavila dve strategiji, ki omogočata epifitskim bakterijam preživetje razmer na površini rastlin.

Strategija tolerance temelji na lastnostih, ki varujejo mikroorganizme in jim pomagajo pri obvladovanju ostrega filozfernega okolja (Beattie in Lindow 1999). Dobra primera sta UV-zaščitna pigmentacija, ki je precej pogosta med bakterijami filozfere, in popravljalni mehanizmi DNK zaradi UV-sevanja (Beattie in Lindow 1999; Zhang in Sundin 2004). V primeru omejene količine hranil v filozferi pa bakterija *P. syringae* uporabi drugačno strategijo, in sicer zmanjša lastno velikost, kar je najverjetneje proces za optimizacijo razmerja med površino in prostornino ter kapaciteto privzema hranil (Monier in Lindow 2003). Filozferni mikroorganizmi so razvili tudi zmožnost prilagajanja na vodni stres. V primeru stresa gliva *Epicoccum nigrum* kopiči raztopine, kot sta glicerol in arabitol, kar pripomore k preživetju na listnih površinah (Pascual in sod. 2003). V študiji Boureau in sod. (2004) navajajo, da so epifiti zmožni tvorjenja skupkov oziroma agregatov za lažjo prilagodljivost na okoljske razmere (pomanjkanje vode, UV-sevanje, zaščita pred patogenimi mikroorganizmi). Če te niso zmožne prenašanja stresnih razmer, lahko nastopi smrt celic, v nekaterih primerih pa samo prehod v nekultivabilno stanje oziroma stanje VBNC (angl. viable but non culturable microbial cells), ki je veliko bolj verjetna za samotni način življenja mikroorganizmov kot pa v skupkih (Boureau in sod. 2004).

Druga strategija se imenuje strategija izogibanja, ki temelji na tako imenovanih zaščitnih mestih na listni površini (Beattie in Lindow 1999). Ta mesta se lahko nahajajo na površini (npr. okolica vdolbine trihomov) in v notranjosti (npr. medcelični prostori) listne površine, ki predstavlja določene prednosti za preživetje. Nekateri listni patogeni se izognejo številnim površinskim stresorjem, s tem ko preidejo v notranjost listnega tkiva. Prav tako je bilo pri rastlinah arašida (*Arachis hypogaea* L.) ugotovljeno, da spodnja (abaksialna) stran lista predstavlja boljšo zaščito mikroorganizmov pred škodljivimi učinki UV-sevanja kot zgornja (adaksialna) stran. Glavna ugotovitev študije je bila, da je toleranca na ultravijolično sevanje pogosta prilagoditev pri filozfernih bakterijah, kar kaže na močan vpliv sončnega sevanja na mikrobo ekološko filozfere (Sundin in Jacobs 1999).

3.2.4 Vloga filozfernih mikroorganizmov na rast, razvoj in bolezn rastlin

Filozferni mikroorganizmi so dobro znani po simbiozi in mutualističnem odnosu z rastlino (Roat in Saraf 2017). Večinoma so ključni pri fiksaciji dušika, kroženju hranil, zaščiti pred patogenimi mikroorganizmi in biosintezi fitohormonov (Morris 2002). Metaproteogenomske študije so pokazale, da lahko mikroorganizmi v filozferi rastlin riža proizvajajo beljakovine, kjer preko porinov in ABC-transporterjev spodbujajo absorpcijo hranilnih snovi in nudijo odpornost na razne okoljske stresorje. Ene od najpogostejših

združb v filozferi so metilobakterije, ki poleg proizvodnje teh pomembnih beljakovin nudijo številne druge koristi za rast in razvoj rastlin (Knief in sod. 2012).

3.1.4.1 Vpliv filozfernih mikroorganizmov na razpoložljivost hranil in sintezo hormonov

Fiksacija dušika je eden od pomembnejših bioloških procesov za rastlino (Roat in Saraf 2017). V študijah so ugotovili, da se hitrost fiksacije dušika v filozferi razlikuje med različnimi habitati. V nekaterih tropskih habitatih lahko filozferni mikrobiom proizvede 62 kg N/ha v enem letu, medtem ko so rastline v zmernih habitatih pokazale relativno nizko fiksacijo dušika, in sicer 0,003–0,35 kg N/ha (Jones 1982; Freiberg 1998). V študiji Freiberg (1998) so želeli pokazati vpliv spreminjanja mikroklima na fiksacijo dušika forofitov (angl. phorophyte). Ugotovili so, da pri najučinkovitejši fiksaciji dušika (26 ng/N na cm²) sodelujeta dve vrsti iz rodu *Syctonema*. V obdobju brez padavin se je fiksacijska aktivnost v roku 2–3 dneh zmanjšala. Dokler so bili epifitski mikroorganizmi na listni površini zadostno preskrbljeni z vodo, so druge mikroklimatske razmere, kot sta temperatura in svetloba, bistveno manj vplivale na hitrost fiksacije. Relativna zračna vlaga in vrsta forofitov pa nista pokazali nobenega neposrednega vpliva na fiksacijo dušika (Freiberg 1998). Izvedena je bila podobna študija, kjer so želeli določiti številčnost N₂-fiksajočih filozfernih mikroorganizmov v deževnih gozdovih v različnih okoljskih razmerah. Ugotovljeno je bilo, da so mikrobne združbe rastlinskih vrst *Carludovica drudei*, *Grias cauliflora* in *Costus laevis* vključene v proces vezave dušika. Ugotovili so, da dejavniki, kot so rastišče, izpostavljenost svetlobi in rastlinska vrsta, pomembno vplivajo na spremembo vezave dušika pri isti bakterijski vrsti. V tej študiji so bili prevladujoči predstavniki Cyanobacteria in Proteobacteria, ki so ključni pri vnosu dušika v ekosistem deževnega gozda (Fürnkranz in sod. 2008).

Mikrobiota filozfere je vključena v biosintezo fitohormonov rastlin, kot so indol-3-očetna kislina (IAA), avksini in citokinini, ki pomagajo pri rasti in razvoju rastlin (npr. delitvi celic, diferenciaciji tkiv, apikalni dominanci) (Costacurta in Vanderleyden 1995). Costacurta in Vanderleyden (1995) navajata, da niso samo rastline zmožne sintetiziranja fitohormonov, ampak tudi mikroorganizmi. Nekateri filozferni mikroorganizmi lahko sintetizirajo IAA, ki bodisi vplivajo na pospešeno rast rastlin bodisi na njihove patogene (Spaepen in sod. 2007). Lindow in Brandl (2003) navajata študijo Holland (2002), da filozferni mikroorganizmi *Methylobacterium* spp. sintetizirajo citokinine, ki sodelujejo pri delitvi rastlinskih celic in v končni fazi pri povečanju pridelka rastlin.

Za rast in razvoj rastlin je zelo pomemben rod *Methylobacterium*, ki sodi med najbolj proučevane filozferne mikroorganizme ter predstavlja pomemben in stalen delež

mikrobiote številnih kulturnih rastlin, kot so sladkorni trs (*S. officinarum* L.), golobji grah (*Cajanus cajan* L.), gorčica (*Brassica campestris* L.), krompir (*Solanum tuberosum* L.) in redkev (*Raphanus sativus* L.) (Meena in sod. 2012). Poleg presnavljanja metanola in nekaterih ogljikovih spojin (npr. alkohol in organske kisline) so bakterije iz omenjenega rodu znane tudi zaradi sodelovanja pri različnih funkcijah, kot so povečanje učinkovitosti fiksacije dušika in pridobivanje fosfatov, proizvodnje fitohormonov, spodbujanje in vzdrževanje sinergije z ostalimi mikroorganizmi (Kumar in sod. 2016).

3.1.4.2 Obramba pred patogenimi mikroorganizmi

Mikrobiom filofere igra pomembno vlogo pri zaviranju rasti in razvoja fitopatogenov (Morris 2002). Kishore in sod. (2005) so proučevali vpliv filofernih mikroorganizmov, kot npr. *Bacillus circulans* GRS 243 in *Serratia marcescens* GPS 5, proti patogenu *Phaeoisariopsis personata*, ki povzroča okužbo listov pri arašidih (*Arachis hypogaea*). Rezultati so pokazali, da so proučevani mikroorganizmi pripomogli k izboljšanju biološke kontrole proti okužbi s *P. personata*. Raziskava, ki so jo izvedli Perazzolli in sod. (2014), pa je privedla do zanimivih ugotovitev o odpornosti naravnih filofernih mikroorganizmov na vinski trti na fitofarmaceutska sredstva, tj. na kemični fungicid (penkonazol) in biološko sredstvo za varstvo rastlin na osnovi *Lysobacter capsici* AZ78. Analiza s sekvenciranjem je pokazala, da je tako kemično kot biološko tretiranje minimalno vplivalo na številčnost in raznolikost populacij bakterij in gliv, kar dokazuje, da so filoferne mikrobne združbe prilagojene na okoljske in biotske dejavnike ter odporne na tretiranja s fitofarmaceutskimi sredstvi.

3.3 Endosfera

Endosfero sestavljajo notranji deli korenin, poganjkov in listov ter razmnoževalnih organov in plodov (Compant in sod. 2011).

Endofitski mikroorganizmi so organizmi, ki se nahajajo znotraj rastlinskih tkiv vsaj del svojega življenjskega cikla (Hardoim in sod. 2008). Hardoim in sod. (2008) navajajo študijo Perotti (1926), da je bilo življenje endofitov prepoznano kot posebna faza v življenju mikroorganizmov, ki ima mutualističen odnos z rastlino. Koncept so kasneje Hallmann in sod. (1997) nekoliko razširili, tako da zajema vse bakterije, izolirane iz notranjih delov rastlin, ki ne povzročajo škode gostiteljskim rastlinam. Ta definicija vključuje širok spekter dela o populacijski dinamiki in učinka nepatogenih kolonizatorjev notranjega rastlinskega tkiva (Hallmann in sod. 1997).

Beseda endofit pomeni »v rastlini« in izhaja iz grških besed endon (znotraj) in phyton (rastlina). Definicij o endofitih je več, vendar pa se na splošno vsi strinjajo, da so to bakterije in glive, ki jih je mogoče v vsakem trenutku zaznati v tkivih zdravih rastlin

(Mercado-Blanco 2015). Mercado-Blanco (2015) navaja študijo Reinhold-Hurek in Hurek (1998), kjer poročajo, da je za identifikacijo pravega endofita pomembna površinska sterilizacija rastlin, s katero se odstrani mikroorganizme iz filofsfe, izoliran endofitski mikroorganizem pa mora imeti sposobnost ponovne naselitve razkuženih sadik. Novejše metode vključujejo tudi uporabo ultrazvočne kopeli, s katero je mogoče odstraniti površinske plasti rastlinskega tkiva in tako omogočiti lažjo izolacijo endofitnih mikroorganizmov (Bulgarelli in sod. 2012).

3.3.1 Vstop endofitov v rastlino in načini širjenja po rastlini

Endofiti vstopijo v rastline pretežno skozi korenine, lahko pa tudi skozi liste, poganjke, stebela ali klične liste, vendar to veliko bolj velja za fitopatogene. Večina endofitov izvira iz rizosfere, zato so številne študije osredotočene na proučevanje mehanizmov prodiranja v rastlino skozi koreninski sistem. Endofitske bakterije prodirajo v korenino skozi razpoke in rane, ki nastanejo zaradi aktivnosti raznih mikroorganizmov, ogorčic in členonožcev (Mercado-Blanco 2015). Eno od najpogostejših vstopnih mest bakterij v rastlino je vrh rastnega vršička korenine, potem pa se po rastlini premikajo po medceličnem prostoru ali pa prodrejo v celice (Hurek in sod. 1994). Drugo pot vstopa predstavljajo koreninski laski (Mercado-Blanco 2015). Specifični dejavniki za vezavo endofita na rastlinsko tkivo vključujejo pilus tipa IV (gre za proteinsko strukturo bakterij, ki sodeluje pri pritrditvi na gostitelja), lipopolisaharide (LPS) in eksopolisaharide (EPS) (Dörr in Reinhold-Hurek 1998; Mercado-Blanco 2015). Endofit diazotrof¹ *Azoarcus* sp. BH72 za pritrditev na koreninsko površino uporablja pilus tipa IV, ki ga kodirata gena pilA in pilB. Pilusi tipa IV so proteinski filamentni celični priveski, sestavljeni predvsem iz ene proteinske podenote, imenovane pilin, in ta vsebuje približno 150 aminokislinskih ostankov (Dörr in Reinhold-Hurek 1998). Vezava diazotrofnega endofita *Herbaspirillum seropedicae* pa je odvisna od LPS. Balsanelli in sod. (2010) so ugotovili, da mutantni sev s spremenjeno sestavo monosaharidov v LPS kaže stokrat nižjo adhezijo in so manj učinkoviti pri kolonizaciji koruze v primerjavi z divjim tipom. Pri proučevanju kolonizacije korenin riža z *Gluconacetobacter diazotrophicus* je bilo ugotovljeno, da so pri kolonizaciji pomembni EPS (Meneses in sod. 2011).

Za aktivni vstop v rastlino morajo biti endofitske bakterije dobro opremljene s celulolitičnimi encimi, ki razgradijo celične stene. Takšni encimi lahko ob vstopu v rastlino sprožijo obrambni mehanizem rastlinskega imunskega sistema, ki je namenjen za preprečevanje širjenja patogenov (Norman-Setterblad in sod. 2000). Prav zaradi tega endofiti vstopajo skozi posebna mesta na rastlini. Compant in sod. (2005) so pri endofitu

¹ Diazotrof je bakterija, sposobna prehranskega sprejemanja molekularnega dušika N₂ (Banič, S. (ur.). Mikrobiološki slovar.).

Burkholderia phytofirmans PsJN ugotovili, da v rastline vinske trte vstopa skozi razpoke stranskih korenin in tako ostane neviden imunskemu sistemu rastlin. Ti endofiti lahko z encimi prodrejo endodermalno steno in naselijo ksilem, nekateri pa lahko dosežejo tudi zgornje dele rastlin, kot so poganjki, listi in reproduktivni organi. Bakterije iz vrste *Burkholderia phytofirmans* PsJN so bile številčnejše v notranjosti listov vinske trte.

3.3.2 Mikrobiota endosfere

Sestava mikrobioma endosfere je pod vplivom različnih dejavnikov, ki povzročajo spremembe v fiziologiji rastline, in sicer abiotski dejavniki (tip tal, razpoložljivost vode), način obdelave tal in biotski dejavniki (gostota in sestava bakterij) (Hardoim in sod. 2012). Robinson in sod. (2016) so ugotovili, da se pri pšenici mikrobiom endosfere v koreninah in listih bistveno razlikuje. Največjo raznolikost so ugotovili v koreninah, kjer so prevladovali predstavniki Proteobacteria. Dominantni rodovi so bili *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* in *Variovorax*. Gram pozitivne bakterije skupin Firmicutes in Actinobacteria pa so sestavljale endosferni mikrobiom listov. Dominantna rodova skupine Firmicutes sta bila *Bacillus* in *Paenibacillus*, v skupini Actinobacteria pa sta prevladovala rodova *Curtobacterium* in *Microbacterium*. Podobna mikrobna sestava je bila odkrita tudi pri rastlinah krompirja, kjer so ugotovili, da so prevladovali predstavniki Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria in Acidobacteria (Manter in sod. 2010).

Glive so prav tako pomembni predstavniki endosfernega mikrobioma. Sun in Guo (2012) navajata, da v večini endosfernega mikrobioma prevladujejo predvsem predstavniki Ascomycota, najdemo pa lahko tudi nekaj predstavnikov iz skupin Basidiomycota, Zygomycota in Oomycota. V endosfernem mikrobiomu dreves *Pinus taeda* so iz najbolj poznane skupine Ascomycota prevladovali predstavniki Dothideomycetes in Leotiomycetes. Endosferne glive pomembno prispevajo pri rasti rastlin, odpornosti abiotskih in biotskih dejavnikov, poleg tega so vključene pri razgradnji odpadnih rastlinskih materialov. V študiji so prišli do zaključkov, da so endofitske glive sestavni del naravnih ekosistemov in igrajo ključno vlogo pri kroženju snovi in energije.

3.3.3 Prilagoditve endofitnih mikroorganizmov

V primerjavi z zelo konkurenčnim zunanjim okoljem rastlin predstavlja notranjost rastlin varno okolje za endofite, saj za nekatere mikroorganizme predstavlja stalen vir hranil (Mercado-Blanco 2015). Zanimiv primer o sposobnosti uporabe hranil v notranjosti tkiv so predstavili v študiji Malfanova in sod. (2013). Ugotovili so, da je bil najbolj razširjen sladkor (L-arabinoza) v ksilemu kumaric večinoma uporabljen s strani endofita *Pseudomonas* spp., kar pomeni, da ta sladkor pomembno prispeva k preživetju endofitne bakterije (Malfanova in sod. 2013).

Endofitni mikroorganizmi morajo biti pri vstopu prilagojeni na odzive rastlinskega obrambnega sistema (Mercado-Blanco 2015). Eden od odzivov rastlinskega obrambnega sistema je sproščanje reaktivnih kisikovih spojin (Mitter in sod. 2013). Mitter in sod. (2013) navajajo, da imajo endofiti številne gene, ki kodirajo encime za razgradnjo reaktivnih kisikovih spojin, kot so katalaze, superoksidne dismutaze, peroksidaze in glutation-S-transferaza oziroma GST (encim, ki kovalentno združi glutation s hidrofobnimi substrati). Fouts in sod. (2008) so ugotovili, da diazotrof *Klebsiella pneumoniae* (Kp) 324 vsebuje gene za katalaze, superoksidne dismutaze in peroksidaze. *K. pneumoniae* ima sposobnosti presnavljanja rastlinskih sladkorjev, ogljikovih hidratov in hemiceluloznih substratov ter ne nazadnje tudi sposobnost vezave dušika, kar pomeni prednost za preživetje v okoljih, kjer primanjkuje dušika. Mitter in sod. (2013) so pri endofitnem sevu *Burkholderia* PsJN odkrili GST. Nekateri mikroorganizmi pa se na odzive rastlinskega obrambnega sistema odzovejo s prehodom v živo, a nekultivabilno stanje (angl. viable but not culturable – VBNC), kjer so le-ti v stanju nizke metabolne aktivnosti (Mercado-Blanco 2015).

3.3.4 Vloga endosfernih mikroorganizmov na rast, razvoj in bolezn rastlin

Endosferni mikroorganizmi igrajo pomembno vlogo pri rasti rastlin, predvsem s sintezo rastnih hormonov, izboljšanjem sprejema hranil in povečanjem odpornosti na različne biotske in abiotske stresorje (Ryan in sod. 2008).

3.3.4.1 Vpliv endosfernih mikroorganizmov na pridobivanje hranil in hormonov

Sevilla in sod. (2001) so dokazali, da endosferni diazotrofi uspešno sprejemajo dušikove spojine, predvsem v tistih tleh, kjer jih primanjkuje. Raziskovali so rastline sladkornega trsa in ugotovili, da *Gluconacetobacter diazotrophicus* lahko sprejme do 0,6 % skupnega dušika in tako rastlini zagotovi potrebna hranila za rast v takšnih pogojih (Sevilla in sod. 2001). Glive so prav tako pomembni predstavniki endosfere, ki spodbujajo rast in razvoj rastlin. Ugotovljeno je bilo, da endofit *Penicillium* spp. uspešno raztaplja slabo topne anorganske oblike fosforja in s tem omogoča lažji vnos hranila v rastlino pšenice (Wakelin in sod. 2004).

Nekatere endofitne bakterije spodbujajo rast s sintezo fitohormonov, zlasti indol-3-ocetno kislino (IAA) in giberelina. To so dokazali pri *G. diazotrophicus*, kjer so ugotovili povečano sintezo omenjenih fitohormonov (Bastián in sod. 1998). Vendar pa imajo mnogi endofiti, ki proizvajajo IAA, tudi zmožnost aktiviranja deaminaze (ACC), ki sodeluje pri zniževanju ravni rastlinskega etilena. Zvišana raven etilena povzroča stres rastlini, saj lahko zavira rast koreninskega sistema (Glick 2005).

3.3.4.2 Pomen pri odpornosti rastlin pred patogenimi mikroorganizmi in onesnaževalci

Melnick in sod. (2008) so s pomočjo različnih sevov *Bacillus* spp. zmanjšali poškodbe plodov, ki jih povzroča patogen *Phytophthora capsici*. Bakterijski endofiti lahko zavirajo rast patogenih gliv tudi s konkuriranjem za nišo in hranila, vendar pa je bil mehanizem inducirane sistemske odpornosti pomembnejši (Berg in Hallmann 2006).

Odziv na patogene je tudi sinteza obrambnih encimov, kot sta na primer hitinaza in lipaza. Kot primer navajamo študijo Benhamou in sod. (2000), kjer je endofit *Serratia plymuthica* pri rastlinah kumar zmanjšal rast hif patogena *Pythium ultimum*. Velika večina glivnih hif, ki so prodrle epidermis rastlin, so bile uničene, kar nakazuje, da je prišlo do razpada citoplazme in v mnogih primerih tudi do izgube protoplasta.

Onesnaževanje tal in vode s herbicidi, poliaromatskimi ogljikovodiki in težkimi kovinami je velik okoljski problem (Mercado-Blanco in Lugtenberg 2014). Za reševanje tega problema je koristna endofitna bakterija *Burkholderia cepacia*, ki je bila genetsko spremenjena za izboljšanje sanacije tal, onesnaženih z organskimi onesnaževalci (ksenobiotiki)². V bakterijo *Burkholderia cepacia* L.S.2.4. so vstavili plazmid za degradacijo toluena³ v rastlinah *Lupinus luteus* (rumeni volčji bob). Dokazali so, da rekombinantni sev izrazito izboljša znotrajcelično razgradnjo toluena in zmanjša evapotranspiracijo skozi listno površino (Barac in sod. 2004).

4 META-OMSKI PRISTOPI ZA KARAKTERIZACIJO MIKROBNIH ZDRUŽB NA OSNOVI DNK

Izraz *metagenomika* se nanaša na analizo mikroorganizmov s sekvenciranjem vseh genomov (z metodo naključnega sekvenciranja, angl. shotgun sequencing) v izbranem okoljskem vzorcu (Riesenfeld in sod. 2004). Za metabarkodiranje pa je značilno namnoževanje in sekvenciranje specifičnih genomskih regij, t. i. barkod, na osnovi katerih temelji identifikacija. Na osnovi pridobljenih zaporedij je mogoč vpogled v filogenetsko sestavo mikrobnih združb. Za bakterije se najpogosteje uporablja gen za 16S rRNK, za večino evkariontov pa gen za 18S rRNK ali pa notranja prepisana vmesnika oziroma ITS1 in ITS2 (angl. internal transcribed spacer) regiji (Abdelfattah in sod. 2018). Za razliko od metabarkodiranja nam metagenomski pristop omogoča veliko boljši vpogled v funkcijski potencial mikrobne združbe (Louca in sod. 2016).

² Ksenobiótik -a m farmakološko, endokrinološko ali toksikološko aktivna snov, ki ni lastna organizmu (npr. naravne spojine, zdravila, karcinogeni, insekticidi itd. (Kališnik, M. (ur.). Slovenski medicinski slovar.).

³ Toluen je brezbarvni tekoči aromatski ogljikovodik, ki se uporablja kot topilo v lepilih, barvah, lakih in pesticidih (Kališnik, M. (ur.). Slovenski medicinski slovar.).

Postopek metabarkodiranja vključuje pet glavnih korakov: i) vzorčenje; ii) izolacija DNK; iii) tarčno pomnoževanje markerja; iv) sekvenciranje; in v) analizo podatkov (Abdelfattah in sod. 2018).

4.1 Izolacija DNK

Izolacija DNK je eden od ključnih korakov za pravilno določitev mikrobne združbe (Abdelfattah in sod. 2018). Izbor najboljše in najučinkovitejše metode za izolacijo DNK ni preprost. Vsaka študija se razlikuje glede na cilje in vrste obravnavanih organizmov, zato je treba metodo za izolacijo izbrati za vsak primer posebej (Belda in sod. 2017[a]). Belda in sod. (2017[a]) navajajo različne pristope, ki se uporabljajo za izolacijo DNK: razgradnja celic z zamrzovanjem in odtaljevanjem, s pomočjo stresalnikov in manjših kroglic (angl. bead beating), trenje v tekočem dušiku, razbitje celic z ultrasonikacijo, inkubacija v predhodno segretem detergentu, uporaba močnih kaotropičnih agensov kot npr. gvanidin hidroklorid ali tretiranje z lizocimi. V naslednji fazi je treba DNK iz razgrajenih celic očistiti oziroma odstraniti ostanke celic in druge nečistoče. Tako kot v prejšnji fazi homogenizacije, kjer se lahko zaradi selektivnega razbitja celic del mikroorganizmov izgubi, lahko tudi med postopkom čiščenja pride do napačnih zaključkov. Možna je tudi kontaminacija z mikrobno DNK iz virov, kot so voda, PCR reagenti in kompleti za izolacijo DNK. Belda in sod. (2017[a]) navajajo, da so najpogostejši viri kontaminantov bakterije iz rodov, kot so *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Herbaspirillum*, *Legionella*, *Leifsonia*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Novosphingobium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas* in *Xanthomonas*, in lahko bistveno vplivajo na rezultate raziskav. Pri vzorcih z manjšo maso mikrobov ima kontaminacija še večji vpliv na končni rezultat (Belda in sod. 2017[a]).

4.2 Priprava DNK knjižice za sekvenciranje, molekularni markerji, primerni za metabarkodiranje mikroorganizmov, ter pomen izbora začetnih oligonukleotidov

Priprava knjižnice DNK temelji na pomnoževanju krajših regij DNK. Potrebna je izbira primerne molekulskega markerja z ohranjenimi regijami, kjer se vežejo začetni oligonukleotidi (Thijs in sod. 2017). Vsak molekularni marker ima svoje posebnosti pri ločevanju taksonomskih enot. Za identifikacijo bakterij in arhej se pogosto uporablja gen 16S rRNK, ki je dolg približno 1600 baznih parov in vključuje devet hipervariabilnih regij (V1-V9) z različno stopnjo ohranjenosti. Bolj konzervirane regije so primerne za identifikacijo višjih taksonomskih enot, medtem ko je z bolj variabilnimi regijami mogoče identificirati celo vrste (Bukin in sod. 2019). Glede na izbrano variabilno regijo so lahko

končni podatki o taksonomski identifikaciji različni. Bokulich in sod. (2012) so primerjali karakterizacijo mikrobiote z regijami V4 in V5 in ugotovili, da nudita primerljive rezultate, le pri nižjih taksonomskih enotah so bile ugotovljene razlike. Kljub temu se je regija V4 izkazala kot nekoliko bolj učinkovita, saj je bilo mogoče bolje identificirati mlečnokislinske bakterije in predstavnike Proteobacteria. Campanaro in sod. (2014) so se osredotočili na regije V3 – V4 in V5 – V6 gena 16S rRNK. Namen študije je bila identifikacija bakterijske združbe po 30-dnevni fermentaciji grozdnih tropin. Z obema regijama je bilo identificiranih 89 rodov, vendar je bilo le 31 skupnih za obe regiji, kar dokazuje, da ima izbor variabilne regije pomembno vlogo pri taksonomski identifikaciji.

Za klasifikacijo splošnih gliv in arbuskularnih mikoriznih gliv (angl. arbuscular mycorrhizal fungi – AMF) se uporablja tudi regijo D1 – D2 gena 26S rRNK (Taylor in sod. 2014) in del gena 18S rRNK (Holland in sod. 2016). Pinto in sod. (2015) so izvedli primerjavo ITS2 regije in regije D2 gena 26S rRNK ter ugotovili, da je bila moč določevanja obeh regij podobna. Nadaljnje študije so pokazale, da ITS regija identificira večje število taksonomskih enot (Pinto in sod. 2015). Bokulich in Mills (2013) sta s testiranjem različnih začetnih oligonukleotidov za ITS regijo ugotovila, da regija ITS1 omogoča najboljšo taksonomsko identifikacijo. Vendar pa Belda in sod. (2017[a]) kljub temu navajajo problematiko o trenutno razpoložljivih molekularnih markerjih, saj ti ne omogočajo identifikacije vseh taksonomskih enot. Menijo, da je te omejitve možno odpraviti z združevanjem več tehnik, kot so metoda polimorfizma dolžin končnih restrikcijskih fragmentov (angl. terminal restriction fragment length polymorphism – T-RFLP), verižna reakcija s polimerazo v realnem času (angl. real-time polymerase chain reaction) in sekvenciranje amplikonov.

Poleg molekularnega markerja oziroma regije DNK ima, kot že omenjeno, pomembno vlogo tudi izbor začetnih oligonukleotidov za namnoževanje izbrane regije. Začetni oligonukleotidi morajo uspešno pomnoževati DNK kar največ organizmov, vključno s tistimi, ki so še nepoznani, vendar pa morajo biti dovolj specifični, da se ne pomnožuje DNK netarčnih organizmov (npr. rastlinska DNK). Drug pomemben vidik pri izbiri ustreznih začetnih oligonukleotidov in regije DNK je cilj raziskave, in sicer za raziskavo celotnega mikrobioma so primerni univerzalni začetni oligonukleotidi, medtem ko so za študije specifičnih taksonov, kot so rastlinski patogeni in biokontrolni mikroorganizmi, primernejši začetni oligonukleotidi oziroma regije, ki bolje ločujejo proučevane mikroorganizme. Ti mikroorganizmi predstavljajo manjši del mikrobne združbe, zato je potrebna večja specifičnost (Abdelfattah in sod. 2018). Neustrezna izbira začetnih oligonukleotidov lahko privede do napačnih zaključkov o zastopanosti posameznih mikroorganizmov v mikrobni združbi (Thijs in sod. 2017). Za študije talne ekologije se najpogosteje uporablja začetna oligonukleota 515f/806r za namnoževanje V4 regije 16S rRNK (Walters in sod. 2016). Omenjena začetna oligonukleotida so npr. uporabili tudi pri

proučevanju mikrobnih združb v vinu in vinski trti, saj zanesljivo identificira širok spekter bakterij in arhej (Belda in sod. 2017[a])

Pri pomnoževanju regije gena 16S rRNK v prisotnosti rastlinskega tkiva se istočasno pomnožuje kloroplastna in mitohondrijska DNK (Thijs in sod. 2017). Za preprečevanje namnoževanja rastlinske DNK sta v uporabi dve metodi: i) oblikovanje ustreznih začetnih oligonukleotidov, ki se prilegajo na mitohondrijsko ali kloroplastno DNK; ii) uporaba zaviralcev (angl. blocker) med reakcijo PCR (Thijs in sod. 2017). V študiji Hanshew in sod. (2013) so težavo istočasnega pomnoževanja kloroplastne DNK zmanjšali s pomočjo modifikacije začetnega oligonukleotida 799f. Vendar je bilo v študiji Sim in sod. (2012) ugotovljeno, da modifikacija začetnih oligonukleotidov negativno vpliva na namnoževanje bakterijske DNK. Druga možnost za zmanjšanje istočasnega pomnoževanja neželenih DNK sekvenc je uporaba zaviralcev iz peptidne nukleinske kisline (angl. peptide nucleic acid (PNA) blocker), ki s specifičnim prileganjem na rastlinsko DNK preprečujejo namnoževanje. Ugotovljeno je bilo, da uporaba PNA zaviralcev ne vpliva na namnoževanje mikrobne DNK (Lundberg in sod. 2013). Oba pristopa sta učinkovita, a v veliki meri odvisna od obravnavane rastlinske vrste. Lundberg in sod. (2013) so navedli rastlinske vrste, pri katerih se razviti PNA zaviralci ujemajo s kloroplastno in mitohondrijsko DNK. PNA zaviralci delujejo tako, da se komplementarno vežejo na kloroplastno in mitohondrijsko DNK oziroma na gen za 16S rRNK, zaradi česar je namnoževanje tega gena iz teh genomov preprečeno. Stoodstotno ujemanje so zasledili pri koruzi, krompirju, navadni kumari, rižu, vinski trti itd.

Sekvenciranje oziroma določevanje zaporedja nukleinskih kislin se lahko izvede na različnih tehnologijah, ki se razlikujejo po številu in dolžini odčitkov. Trenutno sta najpogosteje uporabljeni Illumina (dolžina odčitkov do 300 nukleotidov) in Ion Torrent tehnologija (dolžina odčitkov do 400 nukleotidov). Sekvenciranje daljših fragmentov omogočata tehnologiji PacBio in Nanopore, zaradi česar so te tehnologije še posebej primerne za rekonstrukcijo celotnega genoma (Abdelfattah in sod. 2018; Belda in sod. 2017[a]).

4.3 Potek bioinformatične analize zaporedij, pridobljenih z visoko zmogljivimi tehnologijami za sekvenciranje

Do nedavnega so se najpogosteje uporabljala orodja, kot npr. Mothur, QIIME (angl. Quantitative insights into microbial ecology – QIIME), MG-RAST (angl. metagenomics rapid annotation using subsystem technology) in RAMMCP (angl. server and rapid analysis of multiple metagenomes with clustering and annotation pipeline) (Morgan in sod. 2017). QIIME je nadomestilo orodje QIIME 2, ki je trenutno eno od najpogosteje

uporabljenih orodij (Bolyen in sod. 2019) in zato se bomo v predstavitvi poteka analize večkrat navezali na metode, ki so implementirane v QIIME2.

Analiza podatkov običajno poteka v naslednjih korakih:

1. Ker se običajno istočasno sekvencira večje število vzorcev, pri čemer so produkti PCR posameznih vzorcev označeni s kratkim unikatnim zaporedjem, je mogoče na osnovi teh zaporedij po zaključenem sekvenciranju odčitke ločiti oziroma dodeliti posameznemu biološkemu vzorcu (angl. demultiplexing) (Abdelfattah in sod. 2018).
2. Zaradi morebitnih artefaktov, ki nastanejo pri pomnoževanju (himerni produkti reakcije PCR), oziroma napak pri sekvenciranju je treba odstraniti odčitke slabše kakovosti in odčitke, identificirane kot artefakti. Odstraniti je treba tudi zaporedja, ki pripadajo adapterjem in začetnim oligonukleotidom (Abdelfattah in sod. 2018).

Identifikacija operativnih taksonomskih enot (OTU) z združevanjem oziroma gručenjem podobnih odčitkov (običajno glede na 97 ali 99-% podobnost) (Dumbrell in sod. 2016) ali z uporabo novejšega pristopa – identifikacija zaporedij biološkega izvora, t. i. različic namnoženih zaporedij oziroma variant (angl. amplicon sequence variant – ASV) (Callahan in sod. 2016). Identifikacija različic je mogoča z uporabo orodji DADA2, Deblur (oba sta implementirana v orodje QIIME2) ali UNOISE3. Pri teh algoritmih gre za odpravljanje šuma v odčitkih (angl. denoising) (Nearing in sod. 2018; QIIME2 2019).

DADA2 ustvari parametričen model napak na osnovi vseh odčitkov, nato pa ta model uporabi za popravljanje in določitev različic (oziroma ASV-jev) (Nearing in sod. 2018). Algoritem vključuje odstranjevanje himer, homopolimernih enot, dvoumnih baz in tistih, ki ne ustrezajo določenim parametrom kakovosti baz (npr. Phred vrednosti 20–30) (Morgan in sod. 2017). Deblur na podlagi povprečne stopnje napak odstranjuje odčitke z napakami, nato pa zaporedja poravna v podenote OTU (angl. sub-OTU) (Nearing in sod. 2018).

3. Pri primerjavi treh omenjenih »denoising« orodij so Nearing in sod. (2018) ugotovili, da se je glede na število odkritih ASV-jev, še posebno pri redkeje zastopanih odčitkih, najbolje izkazal DADA2. Vendar pa ugotavljajo, da kljub manjšim razlikam v delovanju vsi trije pristopi dajejo primerljive rezultate o sestavi mikrobne združbe (Nearing in sod. 2018).
4. Po identifikaciji OTU-jev ali ASV-jev sledi identifikacija taksonomskih enot. To izvedemo tako, da OTU enote ali ASV različice primerjamo z referenčnimi zaporedji. Orodje QIIME2 ima implementirani dve skupini metod za taksonomsko identifikacijo: 1) metode, ki temeljijo na poravnavi zaporedji in 2)

metoda, ki temelji na strojnem učenju – naivni Bayesov klasifikator (Bokulich in sod. 2018; QIIME2 2019).

Prva metoda temelji na algoritmih VSEARCH in BLAST+, za katere je značilno, da zaporedja neznanih organizmov poravnata z zaporedji v referenčni podatkovni zbirki (kot npr. SILVA za gen 16S rRNK ali UNITE za ITS regijo), s katerimi deli največjo podobnost. Druga metoda pa temelji na strojnem učenju, kjer je pred identifikacijo treba klasifikator natrenirati na osnovi referenčnih zaporedij. Nato klasifikator določi, katere lastnosti referenčnih zaporedij najboljše definirajo posamezen takson, in izvede taksonomsko klasifikacijo (Bokulich in sod. 2018; QIIME2 2019).

5. Pred izvedbo statistične analize je treba zaradi različnega števila odčitkov po posameznih vzorcih izvesti normalizacijo podatkov. Najprimernejša metoda za to je naključno vzorčenje enakega števila odčitkov iz vsakega vzorca (angl. rarefaction). Z normalizacijo dobimo v vsakem vzorcu enako število podatkov, s čimer vzorci postanejo primerljivi za nadaljnje statistične analize (Dumbrell in sod. 2016).
6. Podatke je mogoče analizirati in prikazati z različnimi metodami (Hill in sod. 2003). Ugotovljena raznolikost se lahko določi z indeksom alfa diverzitete (za ugotavljanje raznolikosti v vzorcih oziroma obravnavanjih) in beta diverzitete (za primerjavo raznolikosti mikrobioma med vzorci oziroma med obravnavanji), ki v ekologiji veljata kot temeljni opisni spremenljivki (Jost 2007).

Najbolj preprost indeks alfa diverzitete je število opaženih OTU enot. Druga dva pogosto uporabljena indeksa alfa diverzitete sta Shannonov in Simpsonov indeks (Dumbrell in sod. 2016). Na Shannonov indeks ima večji vpliv raznolikost oziroma številčnost vrst, medtem ko ima na Simpsonov indeks večji vpliv enakomernost porazdelitve vrst (povzemajo Kim in sod. 2017). Za prikaz sorodnosti med vrstami pa je v uporabi Faithova filogenetska diverziteteta (angl. Faith's phylogenetic diversity), ki pri določitvi raznolikosti združbe upošteva tudi sorodnost med mikroorganizmi (Faith 1992).

Eden od ciljev ekologije je ugotoviti, kako in zakaj se združbe med posameznimi vzorci razlikujejo. Indeks beta diverzitete, Bray-Curtis indeks, ponazarja podobnost taksonomske sestave in pogostost pojavljanja vrst med dvema vzorcema. Če želimo natančno vedeti, katere vrste si dva vzorca delita, pa lahko uporabimo Jaccardov indeks oziroma Jaccardov koeficient podobnosti (Dumbrell in sod. 2016). Prav tako lahko informacijo o sorodnosti uporabimo pri računanju indeksa beta raznolikost, to sta »Unweighted UniFrac« in »Weighted UniFrac« indeksa. Razlika med njima je, da slednji upošteva tudi

številčnosti mikroorganizmov iz posamezne vrste oziroma zastopanost (Lozupone in Knight 2005).

Podobnost med vzorci v trirazsežnem prostoru je mogoče prikazati z analizo glavnih koordinat (angl. Principal Coordinates Analysis) na osnovi indeksa beta diverzitete. Za ugotavljanje prekomerne zastopanosti oziroma obogatenosti posameznih taksonomskih enot sta pri orodju QIIME2 na voljo dve metodi, in sicer ANCOM (angl. analysis of composition of microbiomes) in GNEISS (QIIME2 2019).

5 PREGLED RAZISKAV MIKROBIOMA SREDOZEMSKIH KULTURNIH RASTLIN

5.1 Citrusi

Gojenje citrusov se je začelo pred 4000 leti v jugovzhodni Aziji, sedaj pa jih gojijo v različnih državah v tropskem in subtropskem pasu (Xu in sod. 2018). Citrusi veljajo za ene od vodilnih sadnih rastlin na svetu. Njihova povprečna letna pridelava znaša več kot 146 milijonov ton, medtem ko povprečna letna pridelava le na območju Sredozemlja znaša več kot 10 milijonov ton (FAOSTAT 2019).

V rod citrusov (*Citrus* sp.) spadajo pomaranča (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*), limona (*Citrus lemon*), limeta (*Citrus aurantiifolia*), grenivka (*Citrus paradisi*) in drugi hibridi, kot sta citronovec (*Citrus medica*) in pomelo (*Citrus maxima*) (Saunt 1990). V zadnjih letih so uspešno določili nukleotidno zaporedje mikrobioma različnih sort citrusov, kar je omogočilo tudi boljše razumevanje interakcij med rastlino in mikroorganizmi (Xu in sod. 2018).

V študiji so Xu in sod. (2018) predstavili mikrobiom citrusov iz različnih biogeografskih regij, ki lahko pripomore pri izboljšanju rasti in zdravja samih rastlin. Vzorce rizosfere citrusov so zbrali s 23 reprezentativnih lokacij, ki so vključevale 7 različnih vrst tal (pH od 5,2 do 8,8) in 6 podnebnih tipov. Identificirali so 132 rodov, ki so bili prisotni pri več kot 75 % vzorcev v rizosferi citrusov. Te mikroorganizme so določili kot osnovno združbo rizosfere (angl. core rhizosphere microbes). Identificirani so bili sledeči rodovi: *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Cupriavidus*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Shinella*, *Mesorhizobium*, *Burkholderia*, *Cellvibrio*, *Sphingomonas*, *Variovorax*, *Paraburkholderia*, *Dyadobacter*, *Novosphingobium*, *Devosia* in *Ensifer*. Večina predstavnikov teh rodov velja za koristne mikroorganizme, ki pomagajo vzdrževati ravnovesje rastlinskih hormonov, uravnavajo razvoj korenin, olajšujejo sprejem hranil in preprečujejo razvoj bolezni. Poleg mikroorganizmov so odkrili tudi sedem poglavitnih rodov gliv iz skupine Ascomycota, med katerimi se predstavnike iz rodov *Fusarium* in *Hirsutella* uporablja tudi kot biokontrolne mikroorganizme, medtem ko glive iz rodov *Exophiala* in *Colletotrichum*

uporabljajo za pospeševanje rasti rastlin zaradi povečane sinteze hormonov in absorpcije fosforja v času abiotskega stresa. Vendar pa na sestavo osrednje mikrobne združbe v rizosferi vpliva kar nekaj dejavnikov. Številne funkcijske lastnosti mikrobioma so povezane s kemijskimi lastnostmi okolja, ki ga ustvarjajo koreninski izločki citrusov, zato ima na sestavo osrednje združbe v rizosferi velik vpliv izbira gostitelja. Ne nazadnje pa na oblikovanje združbe mikroorganizmov vplivajo tudi hranila. Rizosfera je bogata s številnimi rastlinskimi spojinami, kot so aminokisliline, peptidi, oligosaharidi in monosaharidi, zato je združba mikroorganizmov v tem delu mikrobioma še posebej raznolika (Xu in sod. 2018). Drugi dve obravnavani študiji opozarjata na negativni vpliv bolezni na sestavo mikrobioma citrusov. Zhang in sod. (2017) ter Wang (2019) so proučevali v svetovnem merilu pomembno bolezen citrusov Huanglongbing (HLB, imenovana tudi bakterijsko zelenenje citrusov). Gre za sistemsko bolezen, ki povzroči zmanjšanje številčnosti dominantnih rodov in aktivnost procesov, ki so značilni v medsebojnih odnosih med mikroorganizmi in rastlino oziroma plodovi (Zhang in sod. 2017). Bolezen povzročajo gram negativne α -proteobakterije *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las), *Ca. L. americanus* (Lam) in *Ca. L. africanus*. Bakteriji Las in Lam prenaša žuželka *Diaphorina citri*, medtem ko Laf prenaša žuželka *Trioza erytreae* (Zhang in sod. 2017; Wang 2019). Bolezen je predvsem uničujoča v Braziliji, karibskih državah in ZDA, vendar pa Wang (2019) navaja, da lahko prisotnost *Trioza erytreae* v Španiji predstavlja grožnjo za širjenje HLB tudi v Sredozemlju.

5.2 Oljka

Oljko so začeli uporabljati v četrtem tisočletju pred našim štetjem v Palestini, kjer se je kasneje razširila v različna obalna območja okoli Sredozemskega morja. Vrsta *Olea europaea* L. se deli na dve podvrsti, in sicer na divjo oljko oziroma z drugo besedo tudi oleaster (subsp. *europaea* var. *sylvestris*) in gojeno oljko (subsp. *europaea* var. *europaea*) (Zohary in Spiegel-Roy 1975). Največje pridelovalke oljke v svetovnem merilu so evropske države, ki predstavljajo približno dve tretjini svetovne pridelave. Skupni pridelek oljk je v letu 2018 znašal 12,9 milijona ton, pri čemer je Španija prispevala 71,9 %, Italija 14,7 %, Grčija 7,3 % in Portugalska 5,6 % (Eurostat [a] 2020).

Oljka je ena od najbolj cenjenih in ekološko pomembnih kulturnih rastlin, ki prispeva k oblikovanju sredozemske pokrajine (Zohary in Spiegel-Roy 1975). V nedavno objavljeni raziskavi so Fernández-González in sod. (2019) proučevali združbo mikroorganizmov v rizosferi oljk in endosferi korenin. V raziskavo je bilo vključenih 36 sort oljke v kolekcijskem nasadu, torej v izenačenih podnebnih in pedoloških razmerah z enako obdelavo tal. Ugotovili so, da se taksonomski profili endosfere in rizosfere razlikujejo. V endosferi 22 sort oljk so prevladovale naslednje skupine bakterij: α -proteobakterije, γ -proteobakterije, δ -proteobakterije, Bacteroidetes in Actinobacteria. Skupno so omenjene

skupine bakterij predstavljale 90 % vseh identificiranih skupin, Actinobacteria pa celo več kot polovico. Odkrili so tudi dva prevladujoča rodova, in sicer *Flavitalea* (Bacteroidetes) in *Actinophytocola* (Actinobacteria). V združbi rizosfere pa je bilo več enakomerno zastopanih taksonomskih enot, pri čemer je pri 36 sortah največji delež predstavljala skupina Acidobacteria (27,5 %). Sledile so α -proteobakterije (18,8 %), Actinobacteria (9,8 %), Gemmatimonadetes (5,2 %) in β -proteobakterije (4,5 %). Najbolj dominantni rodovi v Acidobacteria so bili Gp6, Gp4 in Gp7, v skupini α -proteobakterije pa rodova *Rhizobium* in *Sphingomonas* (Fernández-González in sod. 2019). V študiji Fausto in sod. (2018) navajajo, da je skupina Actinobacteria pomembna zaradi fizioloških in presnovnih lastnosti, kot je sinteza zunajceličnih encimov in različnih sekundarnih metabolitov (npr. antimikrobna sredstva), medtem ko imajo predstavniki debela Proteobacteria sposobnost oksidacije amonijaka, kar lahko vpliva na razpoložljivost dušika za rastlino. Združbe gliv so bile v endosferi in rizosferi po sestavi podobne. Večinoma so prevladovali predstavniki Sordariomycetes, Eurotiomycetes, Agaricomycetes in Dothideomycetes, vključno z Orbiliomycetes v endosferi. V rizosferi oljk so odkrili pomembne predstavnike rodu *Trichoderma*, ki jih uporabljajo kot biokontrolne agente proti patogeni glivi *Verticillium dahliae*. Ključne ugotovitve študije so bile, da je genotip oljke glavni dejavnik za oblikovanje sestave združbe mikroorganizmov v rizosferi in endosferi, kar še posebno velja za združbo bakterij v rizosferi, manj pa pri oblikovanju sestave združb gliv v endosferi (Fernández-González in sod. 2019).

Pomemben dejavnik mikrobioma oljk je način kmetovanja (Fausto in sod. 2018). V študiji, ki so jo izvedli Fausto in sod. (2018), je bilo ugotovljeno, da uporaba trajnostnih praks vpliva na izboljšanje kakovosti talnih ekosistemov, kjer imajo talne bakterije odločilno vlogo pri kroženju hranilnih elementov in spodbujanju rasti rastlin. V takšnih sistemih je bilo ugotovljeno večje število koristnih bakterijskih predstavnikov iz skupine Rhizobiales, ki pomagajo pri fiksaciji dušika v tleh, iz rodu *Rhodoplanes*, ki so vključeni v kroženje ogljika in dušika, ter predstavnikov iz rodu *Rhodanobacter*, ki sodelujejo v denitrifikaciji in jih najdemo izključno v tleh trajnostnih sistemov. Na splošno je bilo ugotovljeno, da lahko specifični koristni mikroorganizmi pripomorejo k boljšemu zdravstvenemu stanju rastlin in višji kakovosti pridelka oljk (Fausto in sod. 2018). Pomembno odkritje je tudi endofit *Bacillus amyloliquefaciens*, ki deluje kot antagonist patogene glive *Verticillium dahliae* (Müller in sod. 2015). Poleg znanih endofitskih bakterij α -proteobakterij so v študiji Müller in sod. (2015) odkrili tudi endofitske arheje Thaumarchaeota, ki z ostalimi mikroorganizmi dominirajo v mikrobiomu oljk. V omenjeni študiji so Thaumarchaeota opisani kot pomemben del rizosfernih združb, kjer zaradi sposobnosti oksidacije amonijaka vplivajo na njegovo razpoložljivost in pH, kar lahko koristi pri obrambi patogenih mikroorganizmov in ohranjanju zdravega mikrobioma (endofitov) (Müller in sod. 2015).

5.3 Vinska trta

Vinska trta je za oljko druga najpomembnejša kulturna rastlina, značilna za sredozemsko pokrajino in širše. Prve najdbe gojenja vinske trte izvirajo iz zgodnje bronaste dobe na območju Palestine, Sirije, Egipta in egejskega območja, od koder so jo kasneje prenesli v hladnejša in vlažnejša podnebja Sredozemlja, in sicer v primerjavi z oljko nekoliko bolj severno (Zohary in Spiegel-Roy 1975). EU predstavlja pomembno vlogo na svetovnem vinskem trgu. Skupna pridelava vinskega grozdja v EU je v letu 2018 znašala 25,7 milijona ton, kjer je Italija prispevala 29,2 %, Španija 26 % in Francija 24,3 % (Eurostat [b] 2020).

Vino ima v Sredozemlju velik sociokulturni pomen. Največje zanimanje so pridobila avtohtona vina, za katera so značilni specifični fizikalni (podnebje) in biološki dejavniki (tla, sorta vinske trte in favna) ter tudi vinogradniške prakse in enološke tehnike. Kombinacija teh dejavnikov je ključna pri razvoju senzoričnih lastnosti vina, ki jih z drugo besedo lahko opišemo kot terroir. Poleg naštetih dejavnikov je izrednega pomena pri kakovosti in organoleptičnih lastnostih vina tudi mikrobiota vinske trte (Belda in sod. 2017[a]). Večina študij o mikrobiomu vinske trte izpostavlja, da so dominantne bakterijske skupine Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria in Bacteroidetes, v katerih so predstavniki epifitskih in endofitskih bakterij (Burns in sod. 2015; Alaimo in sod. 2018). Njihova številčnost se razlikuje glede na rastlinsko tkivo ali organ (Morgan in sod. 2017; Alaimo in sod. 2018). Bakterijski predstavniki iz rodov *Pseudomonas* in *Bacillus* so bolj zastopani na cvetovih, listih in plodovih, predstavniki *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Serratia* in *Streptococcus* so bolj prisotni na listih in grozdju, medtem ko bakterije iz rodu *Erwinia* spp. prevladujejo samo na cvetovih (Alaimo in sod. 2018). V študiji Alaimo in sod. (2018) omenjajo, da so ti rodovi pomembni antagonisti kvasovk. Odkrite so bile tudi mikorizne glive, ki vinski trti omogočajo boljšo učinkovitost rabe vode, sprejem hranil in večjo proizvodnjo biomase. Dominantne skupine gliv so Ascomycota in Basidiomycota. V vseh nadzemnih delih vinske trte prevladuje vrsta *Aureobasidium pullulans*, na listih in grozdju pogosto najdemo *Cryptococcus* spp. in *Rhodotorula* spp., medtem ko sta *Candida* spp. in *Pichia* spp. veliko bolj prisotni na grozdju kot ostalih delih rastline (Alaimo in sod. 2018).

Izsledki študij kažejo, da je mikrobna združba vinske trte povezana z območjem rasti (Bokulich in sod. 2014; Bokulich in sod. 2016). V Kaliforniji so identificirali mikroorganizme na sortah Chardonnay in Cabernet Sauvignon na dveh različnih lokacijah. Ugotovili so, da so na območju Nape (Kalifornija) v moštu sorte Chardonnay prevladovali predstavniki Firmicutes in Eurotiomycetes (vključno z *Aspergillus* in *Penicillium*), na območju Centralne obale Kalifornije predstavniki Bacteroides, Actinobacteria in Saccharomycetes, na območju Sonome pa Proteobacteria (Bokulich in sod. 2014). To

pomeni, da na senzorične in kemijske lastnosti avtohtonih vin vplivajo tudi mikroorganizmi, ki se med lokacijami razlikujejo (Belda in sod. 2017[b]).

Na mikroorganizme vinske trte vplivajo različni dejavniki. Med pomembnejše sodijo vinogradniške tehnike. Razlike med ekološkim in konvencionalnim načinom kmetovanja se lahko odražajo tudi na ravni rodov in vrst, kjer v študiji navajajo različno številčnost fermentativnih gliv *Hanseniaspora* in *Metschnikowia* ter *Aureobasidium pullulans* (Martins in sod. 2014). Drug dejavnik, ki lahko povzroči spremembe v sestavi mikroorganizmov vinske trte, je razvoj bolezni (Faist in sod. 2016). Faist in sod. (2016) so raziskovali razlike v sestavi mikrobiote zaradi patogena *Agrobacterium vitis*, ki povzroča raka koreninskega vratu vinske trte. Ugotovili so, da je vinska trta na območju koreninskega vratu, kjer ni bilo tumorskih zadebelitev, gostila mikrobioto, ki se je spreminjala iz sezone v sezono. Medtem so imele vinske trte s tumorskimi zadebelitvami večjo številčnost treh bakterijskih rodov (*Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp. in *Agrobacterium* sp.), pri čemer se je skozi celo leto vzpostavila stabilna mikrobna združba. V poletnem času se je odstotek treh najpogostejših bakterijskih vrst v tumorskih zadebelitvah zmanjšal, kar je povzročilo izenačenost sestave združbe (angl. evenness). Razlogi za razlike v številčnosti bakterijskih vrst so temperaturne razlike, vlaga, izpostavljenost UV-sevanju in količina hranilnih snovi za bakterije (Faist in sod. 2016). Vplive patogenih mikroorganizmov so raziskovali tudi v povezavi z oetnokislinskimi bakterijami (Bokulich in sod. 2012). Bokulich in sod. (2012) navajajo študijo Joyeux in sod. (1984), da so oetnokislinske bakterije splošno znane fermentirajoče bakterije iz rodu *Acetobacter* in *Gluconacetobacter*, ki se pogosteje pojavljajo v vinih iz okuženega grozdja s patogeno glivo *Botrytis cinerea*. Ugotovljeno je bilo, da se bakterije iz rodu *Gluconacetobacter* pogosteje pojavljajo pri uporabi ekoloških enoloških tehnik. Avtorji pojasnjujejo, da povečana številčnost vrste *G. oxydans* med postopkom fermentacije lahko vodi v razvoj napak oziroma bolezni vin (Piao in sod. 2015).

6 ZAKLJUČEK

Meta-omski pristopi zagotavljajo pomembno orodje pri odkrivanju rastlinskega mikrobioma, saj omogočajo pridobivanje širšega znanja o medsebojnih odnosih med rastlino in mikroorganizmi (Alaimo in sod. 2018). Raziskave so pokazale, da so mikroorganizmi ključni pri delovanju in vzpostavljanju ravnovesja v vseh ekosistemih. Njihova vloga je sodelovanje pri kroženju hranil, razgradnji in vzpostavljanju interakcij. V zadnjih letih je poznavanje vloge mikroorganizmov v določenih ekoloških nišah postalo bistvenega pomena tudi za razvoj trajnostnega kmetijstva. Veliko pozornosti so dobili zaradi zmožnosti prilagajanja rastlin na abiotske in biotske stresne dejavnike (Abdelfattah in sod. 2018).

V okviru zaključne naloge smo ugotovili, da mikroorganizmi naseljujejo skoraj vsa rastlinska tkiva, in sicer vse od notranjih do zunanjih delov rastlin. Najbolj bogato in raznoliko mikrobno združbo tvori rizosfera, kjer se skozi koreninski sistem izločajo številne hranilne snovi za mikroorganizme. Izločki korenin predstavljajo pomemben dejavnik pri delovanju mikroorganizmov, ki rastlini v zameno nudijo številne koristi. Ena od pomembnih skupin so rizobiji, ki s pomočjo ustvarjenih nodulov prispevajo k boljšemu sprejemu dušika in tako vplivajo na izboljšano rast rastlin. Mnogi mikroorganizmi v filozferi kažejo visoko stopnjo adaptacije, saj so izpostavljeni hitro spreminjajočim se razmeram. Mikroorganizmi so v filozferi pod vplivom močnega sončnega sevanja, povečane ali zmanjšane razpoložljivosti vode ter ekstremnih temperaturnih razlik. Kljub temu so se uspeli prilagoditi, tako da so razvili različne strategije, ki omogočajo preživetje razmer na površini rastlin. Zaradi mutualističnega odnosa z rastlino so ti mikroorganizmi dobro proučeni. Pomemben rod je *Methylobacterium*, znan po presnavljanju metanola in ogljikovih spojin, ki je veliko pozornosti pridobil zaradi učinkovitega pridobivanja hranil in vzpostavljanja sinergijskih interakcij z drugimi mikroorganizmi. Nekatere mikroorganizme najdemo tudi v notranjih rastlinskih tkivih. Vstopna mesta predstavljajo od korenin pa do nadzemnih delov rastlin, kot so listi, poganjki in steblo. Pri vstopu v rastlino morajo biti predvsem pozorni na rastlinski obrambni sistem, ki sproži številne obrambne mehanizme. Zaradi sposobnosti reševanja okoljskih problemov je veliko pozornost dobila endofitna bakterija *Burkholderia cepacia*, ki ima zmožnost čiščenja vode in tal, onesnaženih s specifičnimi onesnažili.

Meta-omski pristopi so se izkazali kot dragoceno orodje za karakterizacijo mikrobne raznolikosti različnih okolij. Metode sekvenciranja naslednje generacije nam podajo znanje o funkciji mikrobioma in njegovih pozitivnih učinkih za izboljšanje rasti rastlin, pridelka in kakovosti pridelane hrane (Alaimo in sod. 2018). Vendar pa Philippot in sod. (2013) navajajo, da med različnimi študijami lahko prihaja do velikih odstopanj, ki so posledica

biološke variabilnosti, kot tudi metodoloških napak in različnih pristopov k bioinformatiki in analizi podatkov, zato je lahko splošen opis mikrobioma nekoliko različen.

7 LITERATURA IN VIRI

Abanda-Nkpwatt, D., Müsch, M., Tschiersch, J., Boettner, M., & Schwab, W. (2006). Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. *Journal of experimental botany*, 57(15), 4025-4032.

Abdelfattah, A., Malacrinò, A., Wisniewski, M., Cacciola, S. O., & Schena, L. (2018). Metabarcoding: A powerful tool to investigate microbial communities and shape future plant protection strategies. *Biological Control*, 120, 1-10.

Alaimo, S., Marceca, G. P., Giugno, R., Ferro, A., & Pulvirenti, A. (2018). Current knowledge and computational techniques for grapevine meta-omics analysis. *Frontiers in plant science*, 8, 2241.

Aldén, L., Demoling, F., & Bååth, E. (2001). Rapid method of determining factors limiting bacterial growth in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(4), 1830-1838.

Andrews, J. H., & Harris, R. F. (2000). The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annual review of phytopathology*, 38(1), 145-180.

Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., & Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 233-266.

Balsanelli, E., Serrato, R. V., De Baura, V. A., Sasaki, G., Yates, M. G., Rigo, L. U., Pedrosa, F. O., De Souza, E. M., Monteiro, R. A. (2010). *Herbaspirillum seropedicae* rfbB and rfbC genes are required for maize colonization. *Environmental microbiology*, 12(8), 2233-2244.

Banič, S. (ur.). Mikrobiološki slovar. <https://www.termania.net/slovarji/96/mikrobioloski-slovar>. (Datum dostopa: 12. 2. 2020).

Barac, T., Taghavi, S., Borremans, B., Provoost, A., Oeyen, L., Colpaert, J. V., Vangronsveld, J., van der Lelie, D. (2004). Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nature biotechnology*, 22(5), 583-588.

Barea, J. M., & Richardson, A. E. (2015). Phosphate mobilisation by soil microorganisms. In *Principles of plant-microbe interactions* (pp. 225-234). Springer, Cham.

Barka, E. A., Nowak, J., & Clément, C. (2006). Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth-promoting rhizobacterium, *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(11), 7246-7252.

Bastián, F., Cohen, A., Piccoli, P., Luna, V., Bottini, R., & Baraldi, R. (1998). Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A 1 and A 3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant growth regulation*, 24(1), 7-11.

Beattie, G. A., & Lindow, S. E. (1999). Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. *Phytopathology*, 89(5), 353-359.

Belda, I., Ruiz, J., Esteban-Fernández, A., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., & Moreno-Arribas, M. (2017[b]). Microbial contribution to wine aroma and its intended use for wine quality improvement. *Molecules*, 22(2), 189.

Belda, I., Zarraonaindia, I., Perisin, M., Palacios, A., & Acedo, A. (2017[a]). From vineyard soil to wine fermentation: microbiome approximations to explain the “terroir” concept. *Frontiers in microbiology*, 8, 821.

Benhamou, N., Gagné, S., Le Quéré, D., & Dehbi, L. (2000). Bacterial-mediated induced resistance in cucumber: beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia plymuthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. *Phytopathology*, 90(1), 45-56.

Berendsen, R. L., Pieterse, C. M., & Bakker, P. A. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in plant science*, 17(8), 478-486.

Berg, G., & Hallmann, J. (2006). Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes. In *Microbial root endophytes* (pp. 53-69). Springer, Berlin, Heidelberg.

Bhattacharyya, P., Roy, K. S., Das, M., Ray, S., Balachandar, D., Karthikeyan, S., Nayak, A. K., Mohapatra, T. (2016). Elucidation of rice rhizosphere metagenome in relation to methane and nitrogen metabolism under elevated carbon dioxide and temperature using whole genome metagenomic approach. *Science of the Total Environment*, 542, 886-898.

Blossfeld, S., Gansert, D., Thiele, B., Kuhn, A. J., & Lösch, R. (2011). The dynamics of oxygen concentration, pH value, and organic acids in the rhizosphere of *Juncus* spp. *Soil biology and biochemistry*, 43(6), 1186-1197.

Bokulich, N. A., & Mills, D. A. (2013). Improved selection of internal transcribed spacer-specific primers enables quantitative, ultra-high-throughput profiling of fungal communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79(8), 2519-2526.

Bokulich, N. A., Collins, T. S., Masarweh, C., Allen, G., Heymann, H., Ebeler, S. E., & Mills, D. A. (2016). Associations among wine grape microbiome, metabolome, and fermentation behavior suggest microbial contribution to regional wine characteristics. *MBio*, 7(3), e00631-16.

Bokulich, N. A., Joseph, C. L., Allen, G., Benson, A. K., & Mills, D. A. (2012). Next-generation sequencing reveals significant bacterial diversity of botrytized wine. *PloS one*, 7(5), e36357.

Bokulich, N. A., Kaehler, B. D., Rideout, J. R., Dillon, M., Bolyen, E., Knight, R., Huttley, G. A., Caporaso, J. G. (2018). Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*, 6(1), 90.

Bokulich, N. A., Thorngate, J. H., Richardson, P. M., & Mills, D. A. (2014). Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), E139-E148.

Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., ... & Bai, Y. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature biotechnology*, 37(8), 852-857.

Boureau, T., Jacques, M. A., Berruyer, R., Dessaux, Y., Dominguez, H., & Morris, C. E. (2004). Comparison of the phenotypes and genotypes of biofilm and solitary epiphytic bacterial populations on broad-leaved endive. *Microbial ecology*, 47(1), 87-95.

Bresolin, J. D., Bustamante, M. M. C., Krüger, R. H., Silva, M. R. S. S., & Perez, K. S. (2010). Structure and composition of bacterial and fungal community in soil under soybean monoculture in the Brazilian Cerrado. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(2), 391-403.

Bukin, Y. S., Galachyants, Y. P., Morozov, I. V., Bukin, S. V., Zakharenko, A. S., & Zemskaya, T. I. (2019). The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Scientific data*, 6, 190007.

Bulgarelli, D., Rott, M., Schlaeppi, K., van Themaat, E. V. L., Ahmadinejad, N., Assenza, F., Rauf, P., Huettel, B., Reinhardt, R., Schmelzer, E., Peplies, J., Gloeckner, F. O., Amann, R., Eickhorst, T., Peplies, J. (2012). Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature*, 488(7409), 91-95.

Burns, K. N., Kluepfel, D. A., Strauss, S. L., Bokulich, N. A., Cantu, D., & Steenwerth, K. L. (2015). Vineyard soil bacterial diversity and composition revealed by 16S rRNA genes: differentiation by geographic features. *Soil Biology and Biochemistry*, 91, 232-247.

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, 13(7), 581.

Campanaro, S., Treu, L., Vendramin, V., Bovo, B., Giacomini, A., & Corich, V. (2014). Metagenomic analysis of the microbial community in fermented grape marc reveals that *Lactobacillus fabifermentans* is one of the dominant species: insights into its genome structure. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(13), 6015-6037.

Chaparro, J. M., Badri, D. V., Bakker, M. G., Sugiyama, A., Manter, D. K., & Vivanco, J. M. (2013). Root exudation of phytochemicals in *Arabidopsis* follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. *PloS one*, 8(2).

Chelle, M. (2005). Phylloclimate or the climate perceived by individual plant organs: What is it? How to model it? What for? *New Phytologist*, 166(3), 781-790.

Christian, N., Whitaker, B. K., & Clay, K. (2015). Microbiomes: unifying animal and plant systems through the lens of community ecology theory. *Frontiers in microbiology*, 6, 869.

Compant, S., Mitter, B., Colli-Mull, J. G., Gangl, H., & Sessitsch, A. (2011). Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. *Microbial ecology*, 62(1), 188-197.

Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(4), 1685-1693.

Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: ecology, functions and emerging trends in microbial application. *Journal of advanced research*.

Costacurta, A., & Vanderleyden, J. (1995). Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Critical reviews in microbiology*, 21(1), 1-18.

Cruz-Hernández, A., Tomasini-Campocoso, A., Pérez-Flores, L. J., Fernández-Perrino, F. J., & Gutiérrez-Rojas, M. (2013). Inoculation of seed-borne fungus in the rhizosphere of *Festuca arundinacea* promotes hydrocarbon removal and pyrene accumulation in roots. *Plant and soil*, 362(1-2), 261-270.

DeAngelis, K. M., Brodie, E. L., DeSantis, T. Z., Andersen, G. L., Lindow, S. E., & Firestone, M. K. (2009). Selective progressive response of soil microbial community to wild oat roots. *The ISME journal*, 3(2), 168.

Delmotte, N., Knief, C., Chaffron, S., Innerebner, G., Roschitzki, B., Schlapbach, R., von Mering, C., Vorholt, J. A. (2009). Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(38), 16428-16433.

Dörr, J., Hurek, T., & Reinhold-Hurek, B. (1998). Type IV pili are involved in plant-microbe and fungus-microbe interactions. *Molecular microbiology*, 30(1), 7-17.

Doty, S. L. (2017). Functional importance of the plant endophytic microbiome: implications for agriculture, forestry, and bioenergy. In *Functional Importance of the Plant Microbiome* (pp. 1-5). Springer, Cham.

Dumbrell, A. J., Ferguson, R. M., & Clark, D. R. (2016). Microbial community analysis by single-amplicon high-throughput next generation sequencing: data analysis—from raw output to ecology. In *Hydrocarbon and lipid microbiology protocols* (pp. 155-206). Springer, Berlin, Heidelberg.

Eurostat [a].

https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Agricultural_production_-_crops#Olives. (Datum dostopa: 1. 2. 2020).

Eurostat [b].

https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Agricultural_production_-_crops#Grapes. (Datum dostopa: 1. 2. 2020).

Faist, H., Keller, A., Hentschel, U., & Deeken, R. (2016). Grapevine (*Vitis vinifera*) crown galls host distinct microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.*, 82(18), 5542-5552.

Faith, D. P. (1992). "Conservation evaluation and phylogenetic diversity". *Biological Conservation*, (61), 1-10.

Fajardo, A., & Martínez, J. L. (2008). Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Current opinion in microbiology*, 11(2), 161-167.

FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. (Datum dostopa: 21. 11. 2019).

Fausto, C., Mininni, A. N., Sofu, A., Crecchio, C., Scagliola, M., Dichio, B., & Xiloyannis, C. (2018). Olive orchard microbiome: characterisation of bacterial communities in soil-plant compartments and their comparison between sustainable and conventional soil management systems. *Plant Ecology & Diversity*, 11(5-6), 597-610.

Fernández-González, A. J., Villadas, P. J., Cabanás, C. G. L., Valverde-Corredor, A., Belaj, A., Mercado-Blanco, J., & Fernández-López, M. (2019). Defining the root endosphere and rhizosphere microbiomes from the World Olive Germplasm Collection. *bioRxiv*, 636530.

Fouts, D. E., Tyler, H. L., DeBoy, R. T., Daugherty, S., Ren, Q., Badger, J. H., ... & Dodson, R. J. (2008). Complete genome sequence of the N₂-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice. *PLoS genetics*, 4(7), e1000141.

Freiberg, E. (1998). Microclimatic parameters influencing nitrogen fixation in the phyllosphere in a Costa Rican premontane rain forest. *Oecologia*, 117(1-2), 9-18.

Fürnkranz, M., Wanek, W., Richter, A., Abell, G., Rasche, F., & Sessitsch, A. (2008). Nitrogen fixation by phyllosphere bacteria associated with higher plants and their colonizing epiphytes of a tropical lowland rainforest of Costa Rica. *The ISME Journal*, 2(5), 561.

Garbeva, P., Van Elsas, J. D., & Van Veen, J. A. (2008). Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history. *Plant and soil*, 302(1-2), 19-32.

Glick, B. R. (2005). Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS microbiology letters*, 251(1), 1-7.

Guimarães, A. A., Jaramillo, P. M. D., Nóbrega, R. S. A., Florentino, L. A., Silva, K. B., & de Souza Moreira, F. M. (2012). Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the western Amazon by using cowpea as the trap plant. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78(18), 6726-6733.

Gyaneshwar, P., Hirsch, A. M., Moulin, L., Chen, W. M., Elliott, G. N., Bontemps, C., ... & Young, J. P. W. (2011). Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. *Molecular plant-microbe interactions*, 24(11), 1276-1288.

Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. F., & Kloepper, J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(10), 895-914.

Hanshew, A. S., Mason, C. J., Raffa, K. F., & Currie, C. R. (2013). Minimization of chloroplast contamination in 16S rRNA gene pyrosequencing of insect herbivore bacterial communities. *Journal of microbiological methods*, 95(2), 149-155.

Hardoim, P. R., Hardoim, C. C., van Overbeek, L. S., & van Elsas, J. D. (2012). Dynamics of seed-borne rice endophytes on early plant growth stages. *PLoS One*, 7(2).

Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., & van Elsas, J. D. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in microbiology*, 16(10), 463-471.

Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology*, 2(1), 43-56.

Hassani, M. A., Durán, P., & Hacquard, S. (2018). Microbial interactions within the plant holobiont. *Microbiome*, 6(1), 58.

Hill, T. C., Walsh, K. A., Harris, J. A., & Moffett, B. F. (2003). Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS microbiology ecology*, 43(1), 1-11.

Hirano, S. S., & Upper, C. D. (2000). Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*-a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64(3), 624-653.

Hitner, L. (1904). Über neuer Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie unter besondere Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftsgesellschaft*, 98, 59-78.

Holland, M. A. (2002). *Methylobacterium* spp.: phylloplane bacteria involved in cross-talk with the plant host? *Phyllosphere microbiology*.

Holland, T. C., Bowen, P. A., Bogdanoff, C. P., Lowery, T. D., Shaposhnikova, O., Smith, S., & Hart, M. M. (2016). Evaluating the diversity of soil microbial communities in vineyards relative to adjacent native ecosystems. *Applied soil ecology*, 100, 91-103.

Huang, X. F., Chaparro, J. M., Reardon, K. F., Zhang, R., Shen, Q., & Vivanco, J. M. (2014). Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. *Botany*, 92(4), 267-275.

Hurek, T., Reinhold-Hurek, B., Van Montagu, M., & Kellenberger, E. (1994). Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. *Journal of bacteriology*, 176(7), 1913-1923.

Jacobs, J. L., Carroll, T. L., & Sundin, G. W. (2005). The role of pigmentation, ultraviolet radiation tolerance, and leaf colonization strategies in the epiphytic survival of phyllosphere bacteria. *Microbial Ecology*, 49(1), 104-113.

Jha, B., Gontia, I., & Hartmann, A. (2012). The roots of the halophyte *Salicornia brachiata* are a source of new halotolerant diazotrophic bacteria with plant growth-promoting potential. *Plant and Soil*, 356(1-2), 265-277.

Jones, K. (1982). Nitrogen fixation in the canopy of temperate forest trees: a re-examination. *Annals of Botany*, 50(3), 329-334.

Jost, L. (2007). Partitioning diversity into independent alpha and beta components. *Ecology*, 88(10), 2427-2439.

Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S., & Ribéreau-Gayon, P. (1984). Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48(1), 153-156.

Kai, M., Effmert, U., Berg, G., & Piechulla, B. (2007). Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Archives of microbiology*, 187(5), 351-360.

Kališnik, M. (ur.). Slovenski medicinski slovar.

<https://www.termania.net/slovarji/95/slovenski-medicinski-slovar>. (Datum dostopa: 18. 2. 2020).

Katiyar, V., & Goel, R. (2003). Solubilization of inorganic phosphate and plant growth promotion by cold tolerant mutants of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiological research*, 158(2), 163-168.

Kawasaki, A., Watson, E. R., & Kertesz, M. A. (2012). Indirect effects of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination on microbial communities in legume and grass rhizospheres. *Plant and soil*, 358(1-2), 169-182.

Kim, B. R., Shin, J., Guevarra, R., Lee, J. H., Kim, D. W., Seol, K. H., ... & Isaacson, R. E. (2017). Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 27(12), 2089-2093.

Kim, J. G., Park, B. K., Kim, S. U., Choi, D., Nahm, B. H., Moon, J. S., Reader, J. S., Farrand, S. K., Hwang, I. (2006). Bases of biocontrol: sequence predicts synthesis and mode of action of agrocin 84, the Trojan horse antibiotic that controls crown gall. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(23), 8846-8851.

Kishore, G. K., Pande, S., & Podile, A. R. (2005). Biological control of late leaf spot of peanut (*Arachis hypogaea*) with chitinolytic bacteria. *Phytopathology*, 95(10), 1157-1165.

Knief, C., Delmotte, N., Chaffron, S., Stark, M., Innerebner, G., Wassmann, R., von Mering, C., Vorholt, J. A. (2012). Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. *The ISME journal*, 6(7), 1378-1390.

Kumar, M., Tomar, R. S., Lade, H., & Paul, D. (2016). Methylo-trophic bacteria in sustainable agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(7), 120.

Last, F. T. (1955). Seasonal incidence of *Sporobolomyces* on cereal leaves. *Transactions of the British Mycological Society*, 38(3), 221-239.

Leveau, J. H., & Lindow, S. E. (2001). Appetite of an epiphyte: quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(6), 3446-3453.

Lindow, S. E., & Brandl, M. T. (2003). Microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(4), 1875-1883.

Louca, S., Jacques, S. M., Pires, A. P., Leal, J. S., Srivastava, D. S., Parfrey, L. W., Farjalla, V. F., Doebeli, M. (2016). High taxonomic variability despite stable functional structure across microbial communities. *Nature Ecology & Evolution*, 1(1), 1-12.

Lozupone, C., & Knight, R. (2005). "UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities." *Applied and environmental microbiology*, 71(12), 8228-8235.

Lugtenberg, B. J. (2015). Life of microbes in the rhizosphere. In *Principles of plant-microbe interactions* (pp. 7-15). Springer, Cham.

Lugtenberg, B. J., Chin-A-Woeng, T. F., & Bloemberg, G. V. (2002). Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81(1-4), 373-383.

Lugtenberg, B. J., & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual review of microbiology*, 63, 541-556.

Lundberg, D. S., Yourstone, S., Mieczkowski, P., Jones, C. D., & Dangl, J. L. (2013). Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing. *Nature methods*, 10(10), 999.

Malfanova, N., Kamilova, F., Validov, S., Chebotar, V., & Lugtenberg, B. J. (2013). Is L-arabinose important for the endophytic lifestyle of *Pseudomonas* spp.? *Archives of microbiology*, 195(1), 9-17.

Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., ... & Toth, I. A. N. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(6), 614-629.

Manter, D. K., Delgado, J. A., Holm, D. G., & Stong, R. A. (2010). Pyrosequencing reveals a highly diverse and cultivar-specific bacterial endophyte community in potato roots. *Microbial ecology*, 60(1), 157-166.

Marschner, P. (2008). The role of rhizosphere microorganisms in relation to P uptake by plants. In *The ecophysiology of plant-phosphorus interactions* (pp. 165-176). Springer, Dordrecht.

Martins, G., Vallance, J., Mercier, A., Albertin, W., Stamatopoulos, P., Rey, P., Lonvaud, A., Masneuf-Pomarède, I. (2014). Influence of the farming system on the epiphytic yeasts and yeast-like fungi colonizing grape berries during the ripening process. *International journal of food microbiology*, 177, 21-28.

Mayak, S., Tirosh, T., & Glick, B. R. (2004). Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Science*, 166(2), 525-530.

Meena, K. K., Kumar, M., Kalyuzhnaya, M. G., Yandigeri, M. S., Singh, D. P., Saxena, A. K., & Arora, D. K. (2012). Epiphytic pink-pigmented methylotrophic bacteria enhance germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum*) by producing phytohormone. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 101(4), 777-786.

Melnick, R. L., Zidack, N. K., Bailey, B. A., Maximova, S. N., Gultinan, M., & Backman, P. A. (2008). Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. *Biological control*, 46(1), 46-56.

Melotto, M., Underwood, W., & He, S. Y. (2008). Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 46, 101-122.

Meneses, C. H., Rouws, L. F., Simões-Araújo, J. L., Vidal, M. S., & Baldani, J. I. (2011). Exopolysaccharide production is required for biofilm formation and plant colonization by the nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(12), 1448-1458.

Mercado-Blanco, J. (2015). Life of microbes inside the plant. In *Principles of Plant-Microbe Interactions* (pp. 25-32). Springer, Cham.

Mercado-Blanco, J., & Lugtenberg, B. J. (2014). Biotechnological applications of bacterial endophytes. *Current Biotechnology*, 3(1), 60-75.

Mitter, B., Petric, A., Shin, M. W., Chain, P. S., Hauberg-Lotte, L., Reinhold-Hurek, B., Nowak, J., Sessitsch, A. (2013). Comparative genome analysis of Burkholderia phytotirmans PsJN reveals a wide spectrum of endophytic lifestyles based on interaction strategies with host plants. *Frontiers in plant science*, 4, 120.

Monier, J. M., & Lindow, S. E. (2003). *Pseudomonas syringae* responds to the environment on leaves by cell size reduction. *Phytopathology*, 93(10), 1209-1216.

Morgan, H. H., du Toit, M., & Setati, M. E. (2017). The grapevine and wine microbiome: insights from high-throughput amplicon sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 8, 820.

Morris, C. E. (2002). Phyllosphere. In eLS, (Ed.).

Müller, H., Berg, C., Landa, B. B., Auerbach, A., Moissl-Eichinger, C., & Berg, G. (2015). Plant genotype-specific archaeal and bacterial endophytes but similar *Bacillus* antagonists colonize Mediterranean olive trees. *Frontiers in microbiology*, 6, 138.

Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M. T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G., & Valori, F. (2007). Microbial diversity and microbial activity in the rhizosphere. *Ciencia del suelo*, 25(1), 89-97.

Naz, I., Mirza, M. S., & Bano, A. (2014). Molecular characterization of rhizosphere bacterial communities associated with wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars at flowering stage. *J Animal Plant Sci*, 24(4), 1123-1134.

Nearing, J. T., Douglas, G. M., Comeau, A. M., & Langille, M. G. (2018). Denoising the Denoisers: an independent evaluation of microbiome sequence error-correction approaches. *PeerJ*, 6, e5364.

Niu, D. D., Liu, H. X., Jiang, C. H., Wang, Y. P., Wang, Q. Y., Jin, H. L., & Guo, J. H. (2011). The plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* by simultaneously activating salicylate- and jasmonate/ethylene-dependent signaling pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(5), 533-542.

Norman-Setterblad, C., Vidal, S., & Palva, E. T. (2000). Interacting signal pathways control defense gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(4), 430-438.

Pascual, S., Melgarejo, P., & Magan, N. (2003). Water availability affects the growth, accumulation of compatible solutes and the viability of the biocontrol agent *Epicoccum nigrum*. *Mycopathologia*, 156(2), 93-100.

Perazzolli, M., Antonielli, L., Storari, M., Puopolo, G., Pancher, M., Giovannini, O., Pindo, M., Pertot, I. (2014). Resilience of the natural phyllosphere microbiota of the grapevine to chemical and biological pesticides. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80(12), 3585-3596.

Perotti, R. (1926). On the limits of biological inquiry on soil science. *Proc. Int. Soc. Soil Sci.* 2, 146-161.

Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & van der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 789.

Piao, H., Hawley, E., Kopf, S., DeScenzo, R., Sealock, S., Henick-Kling, T., & Hess, M. (2015). Insights into the bacterial community and its temporal succession during the fermentation of wine grapes. *Frontiers in microbiology*, 6, 809.

Pinto, C., Pinho, D., Cardoso, R., Custódio, V., Fernandes, J., Sousa, S., ... & Gomes, A. C. (2015). Wine fermentation microbiome: a landscape from different Portuguese wine appellations. *Frontiers in microbiology*, 6, 905.

Pisa, G., Magnani, G. S., Weber, H., Souza, E. M., Faoro, H., Monteiro, R. A., ... & Cruz, L. M. (2011). Diversity of 16S rRNA genes from bacteria of sugarcane rhizosphere soil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 44(12), 1215-1221.

Pourzand, C., & Tyrrell, R. M. (1999). Apoptosis, the role of oxidative stress and the example of solar UV radiation. *Photochemistry and Photobiology*, 70(4), 380-390.

QIIME2. Quantitative Insights into Microbial Ecology. <https://docs.qiime2.org/2019.10/>. (Datum dostopa: 12.11.2019).

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.

Raudales, R. E., Stone, E., & McSpadden Gardener, B. B. (2009). Seed treatment with 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing pseudomonads improves crop health in low-pH soils by altering patterns of nutrient uptake. *Phytopathology*, 99(5), 506-511.

Reinhold-Hurek, B., & Hurek, T. (1998). Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: identification, localization, and perspectives to study their function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 17(1), 29-54.

Riesenfeld, C. S., Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2004). Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu. Rev. Genet.*, 38, 525-552.

Roat, C., & Saraf, M. (2017). Unravelling the interaction of plant and their phyllosphere microbiome. In *Understanding Host-Microbiome Interactions - An Omics Approach* (pp. 157-172). Springer, Singapore.

Robinson, R. J., Fraaije, B. A., Clark, I. M., Jackson, R. W., Hirsch, P. R., & Mauchline, T. H. (2016). Endophytic bacterial community composition in wheat (*Triticum aestivum*) is determined by plant tissue type, developmental stage and soil nutrient availability. *Plant and soil*, 405(1-2), 381-396.

Rosenberg, E., & Zilber-Rosenberg, I. (2014). *The hologenome concept: human, animal and plant microbiota*. Springer Science & Business Media.

Rosenberg, E., & Zilber-Rosenberg, I. (2018). The hologenome concept of evolution after 10 years. *Microbiome*, 6(1), 78.

Ryan, R. P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. J., & Dowling, D. N. (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS microbiology letters*, 278(1), 1-9.

Saunt, J. (1990). *Citrus varieties of the world. An illustrated guide*. Sinclair International Ltd.

Schäfer, T., & Adams, T. (2015). The importance of microbiology in sustainable agriculture. In *Principles of Plant-Microbe Interactions* (pp. 5-6). Springer, Cham.

Schena, L., Ippolito, A., Zahavi, T., Cohen, L., Nigro, F., & Droby, S. (1999). Genetic diversity and biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. *Postharvest Biology and Technology*, 17(3), 189-199.

Schmidt, W., Martin, P., Omay, S. H., & Bangerth, F. (1988). Influence of *Azospirillum brasilense* on nodulation of legumes. In *Azospirillum IV* (pp. 92-100). Springer, Berlin, Heidelberg.

Sevilla, M., Burris, R. H., Gunapala, N., & Kennedy, C. (2001). Comparison of benefit to sugarcane plant growth and ¹⁵N₂ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and *nif* mutant strains. *Molecular plant-microbe interactions*, 14(3), 358-366.

Sharma, S., Aneja, M. K., Mayer, J., Munch, J. C., & Schloter, M. (2005). Characterization of bacterial community structure in rhizosphere soil of grain legumes. *Microbial Ecology*, 49(3), 407-415.

Sim, K., Cox, M. J., Wopereis, H., Martin, R., Knol, J., Li, M. S., ... & Kroll, J. S. (2012). Improved detection of bifidobacteria with optimised 16S rRNA-gene based pyrosequencing. *PloS one*, 7(3).

Singh, B. K., Millard, P., Whiteley, A. S., & Murrell, J. C. (2004). Unravelling rhizosphere-microbial interactions: opportunities and limitations. *Trends in microbiology*, 12(8), 386-393.

Singh, R. P., Kothari, R., Koringa, P. G., & Singh, S. P. (Eds.). (2017). *Understanding Host-Microbiome Interactions - An Omics Approach: Omics of Host-Microbiome Association*. Springer.

Son, S. H., Khan, Z., Kim, S. G., & Kim, Y. H. (2009). Plant growth-promoting rhizobacteria, *Paenibacillus polymyxa* and *Paenibacillus lentimorbus* suppress disease complex caused by root-knot nematode and fusarium wilt fungus. *Journal of applied microbiology*, 107(2), 524-532.

Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS microbiology reviews*, 31(4), 425-448.

Sun, X., & Guo, L. D. (2012). Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques. *Mycology*, 3(1), 65-76.

Sundin, G. W., & Jacobs, J. L. (1999). Ultraviolet radiation (UVR) sensitivity analysis and UVR survival strategies of a bacterial community from the phyllosphere of field-grown peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Microbial Ecology*, 38(1), 27-38.

Taylor, M. W., Tsai, P., Anfang, N., Ross, H. A., & Goddard, M. R. (2014). Pyrosequencing reveals regional differences in fruit-associated fungal communities. *Environmental microbiology*, 16(9), 2848-2858.

Thijs, S., Op De Beeck, M., Beckers, B., Truyens, S., Stevens, V., Van Hamme, J. D., ... & Vangronsveld, J. (2017). Comparative evaluation of four bacteria-specific primer pairs for 16S rRNA gene surveys. *Frontiers in microbiology*, 8, 494.

Turner, T. R., James, E. K., & Poole, P. S. (2013). The plant microbiome. *Genome biology*, 14(6), 209.

Upadhyay, S. K., Singh, D. P., & Saikia, R. (2009). Genetic diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from rhizospheric soil of wheat under saline condition. *Current microbiology*, 59(5), 489-496.

Vacher, C., Hampe, A., Porté, A. J., Sauer, U., Compant, S., & Morris, C. E. (2016). The phyllosphere: microbial jungle at the plant–climate interface. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, 47, 1-24.

Van de Mortel, J. E., de Vos, R. C., Dekkers, E., Pineda, A., Guillod, L., Bouwmeester, K., ... & Raaijmakers, J. M. (2012). Metabolic and transcriptomic changes induced in *Arabidopsis* by the rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* SS101. *Plant Physiology*, 160(4), 2173-2188.

Van der Heijden, M. G., Bardgett, R. D., & Van Straalen, N. M. (2008). The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology letters*, 11(3), 296-310.

Vandenkoornhuyse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., & Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*, 206(4), 1196-1206.

Vorholt, J. A. (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 10(12), 828.

Voříšková, J., & Baldrian, P. (2013). Fungal community on decomposing leaf litter undergoes rapid successional changes. *The ISME journal*, 7(3), 477-486.

Wakelin, S. A., Warren, R. A., Harvey, P. R., & Ryder, M. H. (2004). Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. *Biology and Fertility of Soils*, 40(1), 36-43.

Walker, E. L., & Connolly, E. L. (2008). Time to pump iron: iron-deficiency-signaling mechanisms of higher plants. *Current opinion in plant biology*, 11(5), 530-535.

Walters, W., Hyde, E. R., Berg-Lyons, D., Ackermann, G., Humphrey, G., Parada, A., ... & Apprill, A. (2016). Improved bacterial 16S rRNA gene (V4 and V4-5) and fungal internal transcribed spacer marker gene primers for microbial community surveys. *Msystems*, 1(1), e00009-15.

Wang, N. (2019). The Citrus Huanglongbing Crisis and Potential Solutions. *Molecular plant*, 12(5), 607.

Werker, E. (2000). Trichome diversity and development. *Advances in Botanical Research*. Volume 31.

Weston, D. J., Pelletier, D. A., Morrell-Falvey, J. L., Tschaplinski, T. J., Jawdy, S. S., Lu, T. Y., ... & Karve, A. A. (2012). *Pseudomonas fluorescens* induces strain-dependent and strain-independent host plant responses in defense networks, primary metabolism, photosynthesis, and fitness. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(6), 765-778.

Xu, J., Zhang, Y., Zhang, P., Trivedi, P., Riera, N., Wang, Y., ... & Cubero, J. (2018). The structure and function of the global citrus rhizosphere microbiome. *Nature communications*, 9(1), 4894.

Zhang, H., Sun, Y., Xie, X., Kim, M. S., Dowd, S. E., & Paré, P. W. (2009). A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms. *The Plant Journal*, 58(4), 568-577.

Zhang, S., & Sundin, G. W. (2004). Mutagenic DNA repair potential in *Pseudomonas* spp., and characterization of the *ruABPc* operon from the highly mutable strain *Pseudomonas cichorii* 302959. *Canadian journal of microbiology*, 50(1), 29-39.

Zhang, Y., Xu, J., Riera, N., Jin, T., Li, J., & Wang, N. (2017). Huanglongbing impairs the rhizosphere-to-rhizoplane enrichment process of the citrus root-associated microbiome. *Microbiome*, 5(1), 97.

Zohary, D., & Spiegel-Roy, P. (1975). Beginnings of fruit growing in the Old World. *Science*, 187(4174), 319-327.