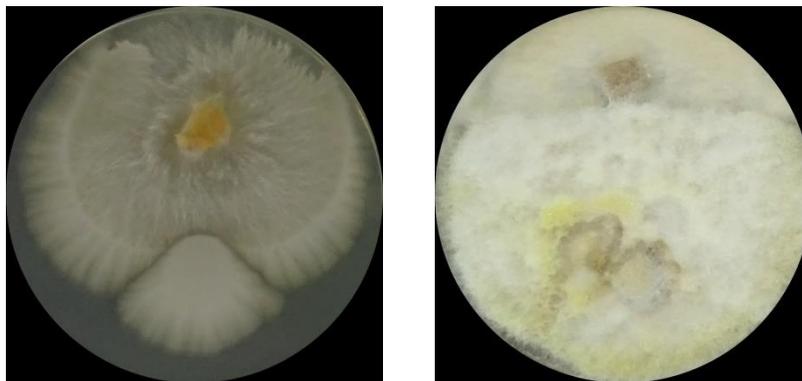


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΥΠΟΔΟΜΩΝ &  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας  
Π.Μ.Σ. ΑΓΡΟΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ  
ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ  
Μεταπτυχιακή Διατριβή

Απομόνωση και χαρακτηρισμός ενδοφυτικών  
μικροοργανισμών από το *Teucrium polium*

Ειρήνη - Ευαγγελία Κ. Θωμλούδη



ΑΘΗΝΑ

2018

Επιβλέπων καθηγητής: Παναγιώτης Κατινάκης

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΥΠΟΔΟΜΩΝ &  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας  
Π.Μ.Σ. ΑΓΡΟΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ  
ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ  
Μεταπτυχιακή Διατριβή

Απομόνωση και χαρακτηρισμός ενδοφυτικών  
μικροοργανισμών από το *Teucrium polium*

Ειρήνη - Ευαγγελία Κ. Θωμλούδη

ΑΘΗΝΑ

2018

Επιβλέπων καθηγητής: Παναγιώτης Κατινάκης

## Μεταπτυχιακή Διατριβή

Απομόνωση και χαρακτηρισμός ενδοφυτικών  
μικροοργανισμών από το *Teucrium polium*

Ειρήνη-Ευαγγελία Κ. Θωμλούδη

Επιβλέπων καθηγητής: Παναγιώτης Κατινάκης

### Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Καθηγητής Παναγιώτης Κατινάκης (Επιβλέπων)

Αναπληρωτής Καθηγητής Γεώργιος Ζερβάκης (Μέλος)

Επίκουρος Καθηγήτρια Μαρία Δήμου (Μέλος)

## Περίληψη

Οι μικροοργανισμοί που διαβιούν στο εσωτερικό ασυμπτωματικών φυτών για όλο ή μέρος του βιολογικού τους κύκλου ονομάζονται ενδοφυτικοί. Τα ενδόφυτα μπορούν να προσφέρουν στο φυτό προστασία από αβιοτικά και βιοτικά στρες. Τα αρωματικά/φαρμακευτικά φυτά φαίνεται να είναι ξενιστές ενδοφυτικών μικροοργανισμών με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Στη συγκεκριμένη μελέτη, απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί από επιφανειακά αποστειρωμένα φύλλα και ρίζα ασυμπτωματικού φυτού *Teucrium polium*.

Τα βακτήρια που χαρακτηρίστηκαν ανήκουν στα γένη *Bacillus*, *Pseudomonas* και *Erwinia* με ποσοστά ομοιότητας 95-99%. Εξετάστηκε η ικανότητα τους για *in vitro* βιολογικό έλεγχο των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* fsp *raphani* και *Botrytis cinerea*. Επέδειξαν ανταγωνισμό μέσω επαφής, εισόδου στην περιοχή του μύκητα και σχηματισμού ζώνης παρεμπόδισης. Ο εκάστοτε μύκητας επιδρούσε στον τύπο αλληλεπίδρασης σε κάποιες περιπτώσεις. Επίσης, διερευνήθηκε η ικανότητα ομαδικής κίνησης που βοηθά στην αποίκιση του φυτού καθώς και παραγωγής σιδηροφόρων και διαλυτοποίησης ιζηματοποιημένου φωσφόρου, ιδιότητες προαγωγής ανάπτυξης του φυτού. Απομονώσεις του γένους *Bacillus* διέθεταν καλύτερη ανταγωνιστικότητα έναντι των τριών φυτοπαθογόνων αλλά και κινητικότητα, ενώ βακτήρια του γένους *Pseudomonas* ήταν καλύτερα στην παραγωγή σιδηροφόρων και διαλυτοποίηση του φωσφόρου.

Οι μύκητες κατηγοριοποιήθηκαν, αρχικά, σε μορφότυπους με βάση φαινοτυπικά χαρακτηριστικά και επιλέχθηκε ένας αντιπρόσωπος από τον καθένα. Τα γένη τους προσδιορίστηκαν ως *Alternaria*, *Phoma* ή *Didymella*, *Fusarium*, *Epicoccum*, *Boeremia* και *Chaetomium* με ποσοστά ομοιότητας 92-100%. Στη συνέχεια, εξετάστηκε η *in vitro* ικανότητα βιολογικού ελέγχου έναντι των φυτοπαθογόνων μυκήτων, όπου επέδειξαν ανταγωνισμό μέσω επαφής, ζώνης παρεμπόδισης και ανάπτυξης πάνω στο φυτοπαθογόνο. Κάποιες απομονώσεις ανταγωνίζονταν και τα τρία φυτοπαθογόνα. Ακόμη, πραγματοποιήθηκε διερεύνηση των σχέσεων μυκήτων του ίδιου ιστού και κατηγοριοποιήθηκαν σε τύπους αλληλεπίδρασης. Διαφάνηκε πως κανένας μύκητας δεν είναι κυρίαρχος επί όλων των υπολοίπων.

Λέξεις κλειδιά: ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί, χαρακτηριστικά προαγωγής της ανάπτυξης των φυτών, βιολογικός έλεγχος, *Teucrium polium*

## Abstract

Microorganisms that reside within asymptomatic plant tissues all or part of their life cycles are termed as endophytes. They can confer protection from abiotic and biotic stresses. Medicinal plants are thought to harbor endophytes with special properties. In this study, endophytes were isolated from surface sterilized leaves and root of the medicinal plant *Teucrium polium* and were further characterized.

The bacteria that were chosen belonged to the genera *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Erwinia* with identity of 95-99%. Their *in vitro* biological control ability was studied against the fungal phytopathogens *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* fsp *raphani* και *Botrytis cinerea*. They showed antagonism through contact, entry in the mycelium territory and formation of inhibition zone. In some cases, the type of the interaction depended on the fungus. The traits investigated were swarming motility that helps the colonization of the plant, the production of siderophores and the solubilization of phosphorous, plant growth promotion traits. Isolations of the genus *Bacillus* were better antagonists and swimmers, while isolation of the genus *Pseudomonas* were better at producing siderophores and solubilizing phosphorous.

The fungi were categorized in morphotypes based on phenotypic characteristics and a representative of each was chosen for further characterization. The genera *Alternaria*, *Phoma* or *Didymella*, *Fusarium*, *Epicoccum*, *Boeremia* και *Chaetomium* were found with 92-100% similarity. They showed antagonism against the three pathogens through contact, inhibition zone and overgrowth. Some fungi were able to antagonize all three phytopathogens. The relationship of the endophytic fungi isolated from the same tissue was investigated and was categorized in types of interaction. It was shown that neither fungus was dominant over all the others.

Key words: endophytic microorganisms, plant growth promoting traits, biological control, *Teucrium polium*



## Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία με θέμα "Απομόνωση και χαρακτηρισμός των ενδοφυτικών μικροοργανισμών από το *Teucrium polium*" πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε έναν αριθμό ανθρώπων που βοήθησαν στην υλοποίηση αυτής της εργασίας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγή κ. Παναγιώτη Κατινάκη για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεχίσω στο εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας υπό την επίβλεψή του. Επίσης, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για το ενδιαφέρον και την καθοδήγηση του αλλά και τις γνώσεις που απλόχερα μου μετέδωσε. Τέλος, τον ευχαριστώ για την υπομονή και την εμπιστοσύνη που έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων και της συγγραφής της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γεώργιο Ζερβάκη και την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Μαρία Δήμου για τη βοήθεια, την καθοδήγηση και τις συμβουλές που μου παρείχαν στη συγγραφή της εργασίας.

Ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω σε όλα τα μέλη του προσωπικού του εργαστηρίου για την αρμονική συνεργασία. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τους υποψήφιους διδάκτορες Δήμητρα Δούκα, Τάσο Σπαντίδο, Πωλίνα Τσαλγατίδου και την δρ Αναστασία Βενιεράκη για το όμορφο κλίμα και την προσφορά βοήθειας οποτεδήποτε τη χρειαζόμουν.

Ακόμη, ένα ευχαριστώ στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας για την ευγενική παραχώρηση των φυτοπαθογόνων μυκήτων που χρησιμοποίησα στις μελέτες μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου τους γονείς μου και τους κοντινούς μου ανθρώπους για την εμπιστοσύνη που μου δείχνουν και τη στήριξη που μου παρέχουν σε όλες μου τις αποφάσεις.

## Περιεχόμενα

Περίληψη .....	4
Abstract .....	5
Ευχαριστίες .....	7
Περιεχόμενα .....	8
1. Εισαγωγή .....	10
1.1 Γεωργία στη σύγχρονη εποχή .....	10
1.2 Οι μικροοργανισμοί που σχετίζονται με τα φυτά (Plant Microbiota) .....	11
1.2.1 Πλεονεκτήματα των φυτικών μικροοργανισμών .....	12
1.3 Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί .....	13
1.3.1 Ορισμός .....	13
1.3.2 Χαρακτηριστικά ενδόφυτων .....	15
1.3.3 Κατηγορίες ενδόφυτων .....	17
1.3.4 Είσοδος και αποίκιση των φυτών από τα ενδόφυτα .....	18
1.3.5 Ταξινομική ποικιλία των ενδόφυτων .....	21
1.3.6 Πλεονεκτήματα των ενδόφυτων .....	24
1.3.7 Μεταβολισμός ενδόφυτων .....	32
1.4 Το φυτό <i>Teucrium polium</i> .....	34
1.4.1 Συστηματική κατάταξη .....	34
1.4.2 Περιγραφή .....	35
1.4.3 Χρήσεις .....	35
1.4.4 Χημεία .....	36
2. Σκοπός της μελέτης .....	37
3. Υλικά και Μέθοδοι .....	38
3.1 Φυτικό υλικό .....	38
3.2 Διαδικασία επιφανειακής απολύμανσης .....	39
3.3 Απομόνωση ενδοφυτικών μικροοργανισμών .....	39
3.3.1 Βακτήρια .....	39
3.3.2 Μύκητες .....	40
3.4 Επιλογή ενδοφυτικών μικροοργανισμών .....	40
3.4.1 Βακτήρια .....	40
3.4.2 Μύκητες .....	41
3.5 Οπτική μικροσκοπία .....	42
3.5.1 Βακτήρια .....	42
3.5.2 Μύκητες .....	43
3.6 Αλληλεπίδραση ενδοφυτικών μικροοργανισμών με φυτοπαθογόνους μύκητες .....	43
3.6.1 Προέλευση φυτοπαθογόνων μυκήτων .....	43
3.6.2 Βακτήρια .....	44
3.6.3 Μύκητες .....	45
3.7 Απομόνωση ολικού γονιδιωματικού υλικού (DNA) .....	46
3.7.1 Βακτήρια .....	46
3.7.2 Μύκητες .....	47
3.8 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων (DNA) .....	48

3.9	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR).....	49
3.9.1	Βακτήρια-Ενίσχυση του τμήματος 16S rRNA .....	50
3.9.2	Μύκητες-Ενίσχυση του τμήματος ITS rRNA.....	51
3.10	Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αγαρόζης.....	52
3.11	Καθαρισμός προϊόντος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.....	53
3.12	<i>In silico</i> ανάλυση των αλληλουχιών.....	54
3.13	Έλεγχος χαρακτηριστικών των βακτηρίων .....	54
3.13.1	Ικανότητα ομαδικής κίνησης (swarming motility) .....	54
3.13.2	Χαρακτηριστικά προαγωγής της ανάπτυξης του φυτού (PGP traits).....	55
3.14	Αλληλεπιδράσεις ενδοφυτικών μυκήτων του ίδιου ιστού μεταξύ τους.....	57
4.	Αποτελέσματα.....	59
4.1	Απομόνωση και χαρακτηρισμός ενδοφυτικών βακτηρίων από το φυτό <i>Teucrium polium</i> .....	59
4.1.1	Απομόνωση ενδοφυτικών βακτηρίων.....	59
4.1.2	Χαρακτηρισμός ενδοφυτικών βακτηρίων.....	61
4.1.2.1	Μικροσκοπική παρατήρηση.....	61
4.1.2.2	Μοριακή ταυτοποίηση .....	61
4.1.2.3	Αλληλεπίδραση με φυτοπαθογόνους μύκητες .....	63
4.1.2.4	Ομαδική κίνηση (Swarming Motility) .....	72
4.1.2.5	Παραγωγή σιδηροφόρων.....	74
4.1.2.6	Διαλυτοποίηση φωσφόρου .....	76
4.2	Απομόνωση και χαρακτηρισμός ενδοφυτικών μυκήτων από το φυτό <i>Teucrium polium</i> .....	79
4.2.1	Απομόνωση ενδοφυτικών μυκήτων.....	79
4.2.2	Χαρακτηρισμός ενδοφυτικών μυκήτων.....	80
4.2.2.1	Μικροσκοπική παρατήρηση.....	80
4.2.2.2	Μοριακή ταυτοποίηση .....	81
4.2.2.3	Αλληλεπίδραση με φυτοπαθογόνους μύκητες .....	84
4.2.2.4	Αλληλεπίδραση των ενδοφυτικών μυκήτων του ίδιου ιστού.....	91
5.	Συζήτηση.....	102
6.	Βιβλιογραφία .....	117

# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Γεωργία στη σύγχρονη εποχή

Οι γεωργικές πρακτικές χρειάζεται να μπορούν να προμηθεύσουν αυξημένη απόδοση της παραγωγής ώστε να τραφεί ο παγκόσμιος πληθυσμός που αναμένεται να ανέλθει στα 9.7 δισεκατομμύρια μέχρι το 2050 (DESA, 2015). Το έτος 2016 815 εκ. άνθρωποι ήταν υποσιτισμένοι (FAO, 2017).

Αβιοτικά και βιοτικά στρες περιορίζουν και κάνουν απρόβλεπτη την απόδοση της παραγωγής. Για παράδειγμα, εκτιμάται πως οι παθογόνοι μύκητες του σιταριού μόνο προκαλούν απώλειες έως και 29% της καλλιέργειας (Oerke & Dehne, 2004), ενώ άλλα φυτοπαθογόνα και διάφορες αβιοτικές καταπονήσεις, όπως η ξηρασία, έχουν ως αποτέλεσμα περισσότερες απώλειες. Ακόμη, προβλέπεται πως με την κλιματική αλλαγή θα αυξηθεί η συχνότητα, οι τοποθεσίες και η σοβαρότητα αυτών των απειλών για την καλλιέργεια (Antón et al., 2012). Οι ασθένειες οδηγούν στην οικονομική απώλεια δις δολαρίων λόγω μείωσης των παραγόμενων προϊόντων σε ποσότητα αλλά και υποβάθμιση της ποιότητας (Savary et al., 2012).

Οι επιβλαβείς παρενέργειες των χημικών φυτοπροστατευτικών και λιπασμάτων για τον άνθρωπο και το περιβάλλον (Carvalho et al., 2017) και η ανάπτυξη ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών στις συμβατικές χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται (Agrios, 2005) έχουν ενθαρρύνει την έρευνα για εναλλακτικά, φιλικά προς το περιβάλλον αγροβιοτεχνολογικά προϊόντα (Tengerdý & Szakács, 1998; Abhilash et al., 2016).

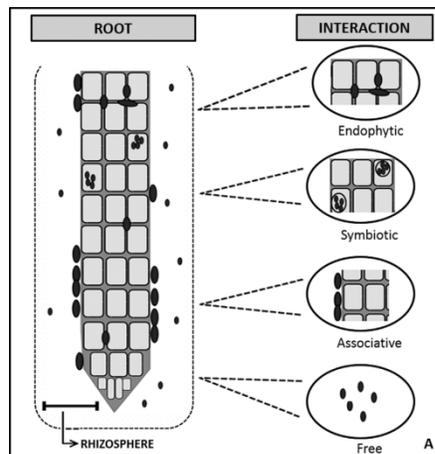
Η ολοκληρωμένη διαχείριση επιβλαβών οργανισμών και θρεπτικών (integrated pest and nutrient management) στοχεύει στη μείωση των αρνητικών συνεπειών της κατάχρησης χημικών προϊόντων και όχι στη σύντομη εξάλειψή τους. Έτσι, δε θα θυσιαστεί η υψηλή αποδοτικότητα της καλλιέργειας βραχυπρόθεσμα, ούτε η βιωσιμότητα μακροπρόθεσμα (Adesemoye et al., 2009). Η έρευνα γύρω από τα μικρόβια που σχετίζονται με τα φυτά και προάγουν την ανάπτυξη τους έχει ήδη οδηγήσει σε εμπορικά προϊόντα για επίτευξη της αιφόρου γεωργίας και στοχεύει στην κατανόηση της σχέσης φυτών-μικροβίων για το σχεδιασμό ακόμα καλύτερων σκευασμάτων (Adesemoye & Kloepper, 2009; Saraf et al., 2013; Sessitsch & Mitter, 2015; Singh, 2015; Busby et al., 2017).

## 1.2 Οι μικροοργανισμοί που σχετίζονται με τα φυτά (Plant Microbiota)

Οι μικροβιακοί πληθυσμοί είναι παρόντες σε ποικίλους οικολογικούς θάκους, συμπεριλαμβανομένων ακραίων περιβάλλοντων όπου οι μεταβολικές τους ικανότητες διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στους γεωχημικούς κύκλους των στοιχείων.

Είναι ευρέως γνωστό πως τα φυτά δε ζουν στην απομόνωση. Αντιθέτως, αλληλεπιδρούν με ένα σύνολο από μικροοργανισμούς (Rodriguez & Redman, 2008; Müller et al., 2016).

Οι μικροοργανισμοί που σχετίζονται με τα φυτά μπορούν να βρεθούν στο εξωτερικό τους, όπως στη ριζο- και φυλλόσφαιρα αλλά και στο εσωτερικό, την ενδόσφαιρα (Brader et al., 2017). Έτσι, υπάρχουν οι ριζοσφαιρικοί μικροοργανισμοί (Mendes et al., 2013), οι επιφυτικοί που είναι προσδεδμεμένοι στις φυτικές επιφάνειες και οι ενδοφυτικοί που διαβιούν στο εσωτερικό των ιστών (Santoyo et al., 2016) (Εικ. 1.1)



Εικόνα 1.1 Διαφορετικοί τύποι αλληλεπιδράσεων ριζόσφαιρας και βακτηρίων. Υπάρχουν τα ενδοφυτικά μέσα στο φυτικό ιστό, τα συμβιωτικά που είναι έγκλειστα σε οργανίδια, τα προσεταιριστικά και τα ελεύθερα διαβιούντα στο έδαφος (Souza et al., 2015).

Η ζώνη του εδάφους που περιβάλλει άμεσα το ριζικό σύστημα ονομάζεται ριζόσφαιρα και είναι το σημείο όπου τα φυτά εκκρίνουν (exudate) ένα μεγάλο μέρος (5-30%) του φωτοσυνθετικά αφομοιωμένου άνθρακα μέσω των ριζών τους (Walker et al., 2003). Οι εκκρίσεις της ρίζας (root exudates) γενικά περιέχουν μεγάλες ποσότητες σακχάρων, οργανικών οξέων και αμινοξέων και είναι ο λόγος για τον οποίο οι μικροοργανισμοί είναι κατά 10-1000 φορές περισσότεροι στη ριζόσφαιρα (Badri & Vivanco, 2009). Η φυλλόσφαιρα και τα εναέρια όργανα συνδέονται με τον ατμοσφαιρικό αέρα και είναι σε μόνιμη ανταλλαγή με το μικροβίωμα που βρίσκεται εκεί

(Vorholt, 2012). Παρ'όλο που υπάρχει ταξονομική και λειτουργική επικάλυψη στους μικροοργανισμούς που σχετίζονται με τα φυτά (Bai et al., 2015), έχουν ταυτοποιηθεί και διακριτά είδη μικροοργανισμών για κάθε μικροπεριβάλλον (Vorholt, 2012; Philippot et al., 2013; Hardoim et al., 2015).

Το φυτικό μικροβίωμα, τα γονιδιώματα των μικροοργανισμών που σχετίζονται με τα φυτά, έχει προταθεί ως προέκταση του φαινότυπου του ξενιστή (Kristin & Miranda, 2013; Hardoim et al., 2015). Το γονιδίωμα του φυτού μαζί με το μικροβίωμα του ορίζονται πλέον ως ολογένωμα (*hologenome*) (Vandenkoornhuysen et al., 2015) ή πανγένωμα (*pangenome*) (Turner et al., 2013). Αυτή η σκέψη έχει οδηγήσει σε καινούργιες ιδέες όσον αφορά την εξέλιξη των φυτών όπου επιλεκτικές πιέσεις δε δρουν απλώς στο φυτικό γονιδίωμα αλλά σε όλο το φυτό, μαζί με τη συσχετιζόμενη μικροβιακή κοινότητα. Οι ιδέες του Lamarck περί επίκτητων κληρονομήσιμων χαρακτηριστικών μπορεί να εξηγηθεί μέσω της έννοιας του ολογενώματος (*hologenome*) καθώς πολύτιμα χαρακτηριστικά μπορούν να μεταβιβαστούν στην επόμενη γενιά μέσω της κατακόρυφης διάδοσης (*vertical transmission*) των ενδόφυτων (Rosenberg et al., 2009).

Μολονότι η δομή του φυτικού μικροβιώματος έχει μελετηθεί αρκετά, υπάρχουν πολλά κενά καθώς οι μελέτες έχουν επικεντρωθεί σε καλλιεργούμενα και φυτά μοντέλα, όπως το *Arabidopsis*, παραλείποντας φυτά των φυσικών οικοσυστημάτων (Bulgarelli et al., 2012). Επίσης, υπάρχουν κενά ως προς τη σχέση λειτουργίας και φυτικής ευρωστίας. Πολύ-ομικές προσεγγίσεις και εργαλεία όπως η πυροαλληλούχιση επιτρέπουν βαθύτερη ανάλυση στη δομή και τη λειτουργία των μικροοργανισμών που σχετίζονται με τα φυτά, η οποία υποστηρίζει και επεκτείνει την υπάρχουσα γνώση (Akinsanya et al., 2016; Jansson & Baker, 2016; Kaul et al., 2016; Berg et al., 2017).

### **1.2.1 Πλεονεκτήματα των φυτικών μικροοργανισμών**

Οι μικροοργανισμοί στη φυλλο-, ριζο-, ή ενδόσφαιρα μπορούν να εδραιώσουν ωφέλιμες, ουδέτερες ή επιβλαβείς σχέσεις με τα φυτά ξενιστές (Turner et al., 2013).

Το φυτικό μικροβίωμα περικλείει μεγάλο πλούτο ειδών που προάγουν την αντοχή στο στρες και την ανάπτυξη των φυτών, καταστέλλουν ασθένειες, αποδομούν ξενοβιοτικές ουσίες και έχουν θετική επίδραση στο έδαφος και την υγεία του αγρο-οικοσυστήματος (Sessitch & Mitter, 2015; Berg et al., 2017). Ένα μικροβίωμα που περιέχει ποικιλία είναι κρίσιμο για υγιή ανάπτυξη των φυτών, ειδικά σε ακραίες συνθήκες (Hallmann et al., 1997; Yan et al., 2017).

Οι μικροοργανισμοί που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (Plant growth promoting microorganisms-PGPMs) είναι βακτήρια και μύκητες που διεγείρουν την ανάπτυξη των φυτών μέσω ενός ή περισσότερων μηχανισμών (Richardson et al., 2009; Reddy & Saravanan, 2013). Οι ωφέλιμοι αυτοί μικροοργανισμοί μπορούν να ενεργήσουν στη ριζόσφαιρα, φυλλόσφαιρα ή ενδόσφαιρα (Compant et al. 2010; Reddy & Saravanan, 2013). Τα ωφέλιμα φυτικά βακτήρια, ανεξάρτητα του πού βρίσκονται στο φυτό, ονομάζονται βακτήρια που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (Plant growth promoting bacteria) (Bashan & Holguin, 1998).

Η προαγωγή της ανάπτυξης των φυτών μπορεί να επιτευχθεί με άμεσους ή έμμεσους μηχανισμούς και η διαφορά μεταξύ τους δεν είναι πάντα εμφανής. Γενικά, έμμεσοι μηχανισμοί είναι εκείνοι που λαμβάνουν χώρα εκτός του φυτού, ενώ οι άμεσοι απαντώνται μέσα στο φυτό και επηρεάζουν το μεταβολισμό (Ahemad & Kibret, 2014; Figueiredo et al., 2016). Αυτοί οι μηχανισμοί πιθανόν να είναι ενεργοί ταυτόχρονα ή διαδοχικά σε διαφορετικά στάδια της φυτικής ανάπτυξης (Chararro et al., 2013).

### **1.3 Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί**

#### **1.3.1 Ορισμός**

Γενικά, το 19<sup>ο</sup> αιώνα, υπήρχε η πεποίθηση πως υγιή φυτά είναι στείρα και άρα ελεύθερα μικροοργανισμών.

Ο αυθεντικός ορισμός των ενδοφυτικών μικροοργανισμών από το De Bary (1866) είναι «όποιοι οργανισμοί απαντώνται μέσα στους φυτικούς ιστούς». Το 1991, ο Orlando Petrini όρισε τα ενδόφυτα ως «όλοι οι οργανισμοί που κατοικούν στα φυτικά όργανα σε κάποια στιγμή στο βιολογικό τους κύκλο και μπορούν να αποικίσουν εσωτερικούς φυτικούς ιστούς χωρίς να προκαλούν εμφανή βλάβη στον ξενιστή τους». Από τότε, πολλοί ορισμοί έχουν διατυπωθεί (Wilson, 1995; Di Fiore & Gallo, 1995; Hallman et al., 1997; Bacon & White, 2000; Stone et al., 2000; Schulz & Boyle, 2005), και όλοι ουσιαστικά αναφέρονται σε μικροοργανισμούς που καθ' όλη τη διάρκεια ή μέρος του βιολογικού τους κύκλου εισβάλλουν σε ιστούς ζωντανών φυτών χωρίς να προκαλούν ασθένεια. Ωστόσο, δεν είναι ξεκάθαρο αν πρέπει να συμπεριλαμβάνονται στον ορισμό μικροοργανισμοί που θεωρούνται λανθάνοντα φυτοπαθογόνα (Photita et al., 2004).

Ο πιο γνωστός ορισμός των ενδόφυτων είναι η πρακτική περιγραφή που δόθηκε από τους Hallmann και συνεργάτες το 1997, που όρισαν πως ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί είναι «...τα βακτήρια που μπορούν να απομονωθούν από επιφανειακά απολυμασμένους φυτικούς ιστούς που δεν προκαλούν εμφανή βλάβη στο φυτό». Αυτός ο ορισμός είναι έγκυρος για καλλιεργήσιμα είδη και αντιστοιχεί στη συνήθη μέθοδο απομόνωσης ενδόφυτων από ασυμπτωματικούς, επιφανειακά απολυμασμένους φυτικούς ιστούς. Ωστόσο, λόγω υποψίας μη επαρκούς εξάλειψης των νουκλεϊκών οξέων με την απολύμανση, αυτός ο ορισμός είναι ακατάλληλος για μη καλλιεργούμενα είδη μετά την εισαγωγή των μοριακών τεχνικών ανίχνευσης ενδόφυτων (Garbeva et al., 2001). Επιπλέον, είναι σημαντικό πως με αυτή τη μέθοδο, επιφυτικοί μικροοργανισμοί ανθεκτικοί στην επιφανειακή αποστείρωση θα εμφανιστούν ως ενδοφυτικοί, ενώ κάποιοι μικροοργανισμοί που βρίσκονται πάνω στη φυτική επιφάνεια μπορεί να υπάρχουν και εσωτερικά. Έτσι, αυστηρές διακρίσεις μεταξύ επιφυτικών και ενδοφυτικών μικροοργανισμών δεν είναι πάντα σωστές.

Ασυμπτωματικά ενδόφυτα έχουν βρεθεί σχετιζόμενα με κάθε φυτικό είδος που έχει εξεταστεί μέχρι σήμερα (Partida-Martinez & Heil, 2011; Hardoim et al., 2015; Esposito-Polesi et al., 2017), με καταγραφές απολιθωμάτων που χρονολογούνται περισσότερο από 400 εκ. χρόνια (Krings et al., 2007; Rodriguez & Redman, 2008; Schardl et al., 2008). Μάλιστα, έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι οι μυκορριζικοί μύκητες είναι αποτέλεσμα εξέλιξης των ενδοφυτικών μυκήτων, οι οποίοι ανέπτυξαν εξωτερικές υφές για να προμηθεύσουν τα φυτά με θρεπτικά (Brundrett et al., 2002). Τα φυτά είναι ξενιστές πολλών τύπων μικροβιακών ενδόφυτων, συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων και μυκήτων (Hardoim et al., 2015), αρχαίων (Chelius & Triplett, 2001; Müller et al., 2015) και μονοκύτταρων ευκαρυωτών, όπως τα φύκη (Trémoullaux-Guiller et al., 2002) και οι αμοιβάδες (Müller & Döring, 2009).

Πρόσφατες ανασκοπήσεις ενδοφυτικών μικροοργανισμών προτείνουν πως ο ενδοφυτισμός (endophytism) είναι μια μοναδική αλληλεπίδραση φυτού-μικροβίου που πρέπει να αναφέρεται «μόνο σε ενδιαίτημα, όχι σε λειτουργία» ("habitat only, not function") και να συμπεριλαμβάνει όλους τους μικροοργανισμούς οι οποίοι για όλη ή μέρος της ζωής τους αποικίζουν εσωτερικούς φυτικούς ιστούς, αναφερόμενες στο συνεχές (continuum) της αλληλεπίδρασης μεταξύ ενός φυτού ξενιστή και των μικροοργανισμών που το αποικίζουν (Schulz & Boyle, 2005; Kusari & Spiteller, 2012b; Hardoim et al., 2015; Brader et al. 2017).

Οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί ορίζονται ως "commensals" όταν τρέφονται από τα θρεπτικά του φυτού χωρίς να έχουν θετική ή αρνητική επίδραση σε αυτό, άρα είναι ουδέτερα (Brader et al.,

2017). Ακόμη, "mutualists" ονομάζονται εκείνοι οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί που αναπτύσσουν αμοιβαία ωφέλιμη σχέση με τους ξενιστές τους (Brader et al., 2017). Αρνητικές επιδράσεις στο φυτό έχουν οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί που είναι "antagonists" ως προς το φυτό, δηλαδή τα παθογόνα που προκαλούν βλάβες (Hardoim et al., 2015).

Έτσι κάποιοι ερευνητές συμπεριλαμβάνουν στους ενδοφυτικούς μικροοργανισμούς και εκείνους που είναι commensals ως προς το φυτό αλλά και πιθανά αδρανή σαπρόφυτα και λανθάνοντα παθογόνα (Compant et al., 2016; Fesel & Zuccaro, 2016), ενώ άλλοι μόνο τους ωφέλιμους συμπεριλαμβανομένων των μυκορριζών (Card et al., 2015). Τέλος, υπάρχει μια πρόταση όπου όλοι οι μικροοργανισμοί θεωρούνται ενδοφυτικοί έως ότου αποδειχθεί πως μπορεί να είναι επιβλαβή για τον ξενιστή (Cocq et al., 2016).

Με την έλευση των μοριακών εργαλείων για την εξερεύνηση μικροβιωμάτων χωρίς την ανάγκη καλλιέργειας τους, που οδηγούν σε μη χαρακτηρισμένα είδη, λειτουργίες όπως η παθογένεια ή η συμβίωση δεν μπορούν να προβλεφθούν. Η παθογένεια είναι ένα περίπλοκο φαινόμενο καθώς ο συνδυασμός πολλών παραγόντων, όπως οι γονότυποι παθογόνου και ξενιστή, το περιβάλλον και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροοργανισμών, καθορίζει την έκβαση της αντίδρασης του φυτού σε ένα μικρόβιο (Hardoim et al., 2015). Υπάρχουν αναφορές ότι ουδέτερα ή ωφέλιμα ενδόφυτα μπορούν να γίνουν παράσιτα και το αντίστροφο (Müller & Krauss, 2005; Schulz & Boyle, 2005; Arnold, 2007; Kloepper et al., 2013). Ως εκ τούτου, αλληλεπιδράσεις ξενιστή-μικροβίου μπορούν να κυμαίνονται από ωφέλιμες έως παρασιτικές με ένα συνεχή τρόπο (Redman et al., 2001). Η ισορροπία μεταξύ mutualism και ανταγωνισμού εξαρτάται από πολλές παραμέτρους και από τη σωστά συντονισμένη αλληλεπίδραση μικροβιακών τελεστών και απόκρισης του φυτού (Sheibani-Tezerji et al., 2015)

### **1.3.2 Χαρακτηριστικά ενδόφυτων**

Οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί έχουν απομονωθεί από ποικίλους φυτικούς ιστούς, όπως σπόρους, κόνδυλους, ρίζες, βλαστό, φύλλα, αγγειακό χυμό, καρπούς (Malfanova, 2013; Truyens et al., 2014), ακόμα και γύρη (Zasloff, 2017). Πληροφορίες που αφορούν τα ενδόφυτα των σπόρων υπάρχουν αλλά παραμένουν περιορισμένες (Gagne-Bourgue et al., 2013; Barret et al., 2015; Johnston-Monje, 2016; Adam et al., 2016; Glassner et al., 2017; Shade et al., 2017). Στα περισσότερα φυτά, οι ρίζες έχουν τον υψηλότερο αριθμό ενδόφυτων σε σύγκριση με τους εναέριους ιστούς (Hardoim et al., 2015).

Η κύρια διαφορά των ενδοφυτικών μικροοργανισμών με εκείνους που ζουν εκτός των φυτών είναι πως μετά την εδραίωσή τους στους ιστούς του φυτού, έχουν καλύτερη πρόσβαση σε θρεπτικά και δεν αντιμετωπίζουν πλέον τις εναλλαγές των συνθηκών του εδάφους και τον ανταγωνισμό με πληθώρα μικροοργανισμών (Dutta et al., 2014). Αυτές οι αλλαγές, που μπορεί να εμποδίζουν τη λειτουργία και τον πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών, περικλείουν εναλλαγές στη θερμοκρασία και pH, καθώς και περιεχόμενο σε νερό ή θρεπτικά (Glick, 2012).

Οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί διαβιούν κυρίως στους μεσοκυττάριους χώρους των φυτικών ιστών, οι οποίοι περιέχουν υψηλά επίπεδα υδατανθράκων, αμινοξέων, ανόργανων θρεπτικών (Bacon & Hinton, 2006) αλλά και αιθανόλης (Reinhold-Hurek et al., 2007). Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, κάποια ενδόφυτα έχουν την ικανότητα να εισέρχονται στο φυτικό κύτταρο (Paungfoo-Lanhienne et al., 2010; Thomas & Sekhar, 2014; Raja et al., 2016; Esposito-Polesi et al., 2017) αλλά αντίθετα με άλλους ενδοσυμβιώντες, δεν είναι έγκλειστα σε οργανίδιο που περικλείεται από μεμβράνη (Reinhold- Hurek & Hurek, 2011). Τέλος, ορισμένα ενδόφυτα μπορεί να βρίσκονται εντοπισμένα σε συγκεκριμένο ιστό και άλλα να βρίσκονται σε περισσότερους από έναν ιστούς (Rodriguez et al., 2009).

Έχει προταθεί πως οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί αναμένεται να έχουν κάποιες διαφορές στο γονιδίωμα τους από τους μη ενδοφυτικούς λόγω της ιδιαιτερότητας τους ως προς την αποίκιση των εσωτερικών φυτικών ιστών. Ωστόσο, μέχρι τώρα δεν έχει ταυτοποιηθεί κάποιο πολύ συγκεκριμένο γκρουπ γονιδίων (Santoyo et al., 2016). Προς αυτή τη μελέτη έχουν κινηθεί διάφοροι ερευνητές και έχουν προτείνει γονίδια που πιθανώς εμπλέκονται στον ενδοφυτικό τρόπο ζωής μέσω βιοπληροφορικής και επαγωγής μεταλλάξεων (Taghavi et al., 2010; Shidore et al., 2012; Ali et al., 2014; Hardoim et al., 2015).

Για παράδειγμα, τα γονίδια που κωδικοποιούν για το εκκριτικό σύστημα τύπου III (T3SS) είναι απόντα ή ατελή στα ωφέλιμα ενδοφυτικά βακτήρια, σε αντίθεση με τα φυτοπαθογόνα, (Reinhold-Hurek & Hurek, 2011; Mitter et al., 2013; Hardoim et al., 2015), υποδεικνύοντας πως η μη έκκριση τελεστών και η αποφυγή της φυτικής άμυνας οδηγεί στην εδραίωση (Iniguez et al., 2005). Στα γονιδιώματα των ωφέλιμων ενδόφυτων εδρεύουν συχνά γονίδια του εκκριτικού συστήματος τύπου VI (T6SS) (Reinhold-Hurek & Hurek, 2011; Mitter et al., 2013). Η απώλεια τους στα φυτοπαθογόνα οδηγεί σε μειωμένη (Schell et al., 2007) ή αυξημένη (Mattinen et al., 2008) μολυσματικότητα, οπότε δεν είναι βέβαια η χρησιμότητα τους στα ενδόφυτα.

Αλλάζοντας το είδος των ριζικών εκκρίσεων τα φυτά μπορούν να «επιλέξουν» μικρόβια ώστε να διαθέτουν ωφέλιμους μικροοργανισμούς στη ριζόσφαιρα αλλά και το εσωτερικό τους (Van

Overbeek & Van Elsas, 2008; Berendsen et al., 2012; Marasco et al., 2012). Κάποιοι ερευνητές έχουν προτείνει περαιτέρω έλεγχο των ενδόφυτων από τον ξενιστή τους, εσωτερικά αυτή τη φορά, με σκοπό την καταστολή της ανεξέλεγκτης ανάπτυξης τους αλλά και της πιθανής παθογένειας τους (Bacon & White, 2015; Persoh, 2015). Αυτό μπορεί να συμβεί με χημικές ενώσεις όπως τα φαινολικά, αλλά και με ενώσεις που διαταράσσουν το σηματοδοτικό σύστημα αίσθησης πληθυσμού (quorum quenching compounds) (Hogan et al., 2006; Bacon & White, 2015).

### 1.3.3 Κατηγορίες ενδόφυτων

Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί που απαιτούν φυτικούς ιστούς για να ολοκληρώσουν το βιολογικό τους κύκλο ονομάζονται «υποχρεωτικά ενδόφυτα» ("obligate endophytes") (Hardoim et al., 2015). Περιλαμβάνουν μυκοριζικούς μύκητες και μέλη των γενών μυκήτων *Balansia*, *Epichloë* και *Neotyphodium* από την οικογένεια Clavicipitaceae (Ασκομύκητες) (Parniske et al., 2008; Schardl et al., 2008).

Τα "ευκαιριακά ενδόφυτα" ("opportunistic endophytes") μπορούν να ευημερούν εκτός των φυτικών ιστών (επιφυτικά) και σποραδικά να εισέρχονται στη φυτική ενδόσφαιρα (Hardoim et al., 2015). Μεταξύ αυτών βρίσκονται τα μικρόβια που είναι ικανά να αποικίζουν τη ριζόσφαιρα, όπως τα βακτήρια των γενών *Pseudomonas* και *Azospirillum* και οι μύκητες των γενών *Hypocrea* και *Trichoderma* (Hardoim et al., 2015). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως ενδοφυτικά που μεταδίδονται στην επόμενη γενιά μέσω των σπόρων, συχνά ανακτώνται και ως επιφυτικά, υπαινίσσοντας πως διάφορα ενδόφυτα αποικίζουν τα περιβάλλοντα φυτικά μέρη (Hardoim et al., 2012).

Μεταξύ των δύο αυτών ακραίων κατηγοριών βρίσκεται μία ενδιάμεση ομάδα, η οποία περικλείει την πλειοψηφία των ενδόφυτων, τα «προαιρετικά ενδοφυτικά» («facultative endophytes») (Hardoim et al., 2015). Το αν αυτή η ομάδα χρησιμοποιεί το φυτό ως μέσο διάδοσης ή επιλέγεται ενεργά ή συμβαίνουν και τα δύο κατά περιπτώσεις είναι ακόμα θέμα συζήτησης (Hardoim et al., 2012). Επικαλύψεις υπάρχουν μεταξύ των τριών αυτών τύπων, οπότε δε μπορεί πάντα να είναι ξεκάθαρη η κατηγοριοποίηση των ενδοφυτικών μικροοργανισμών.

Μία κατάταξη των ενδοφυτικών μυκήτων αφορά αυτή των Rodriguez και συνεργατών (2009) και είναι η εξής:

Κλάση I: *Clavicipitaceous* ενδοφυτικοί μύκητες

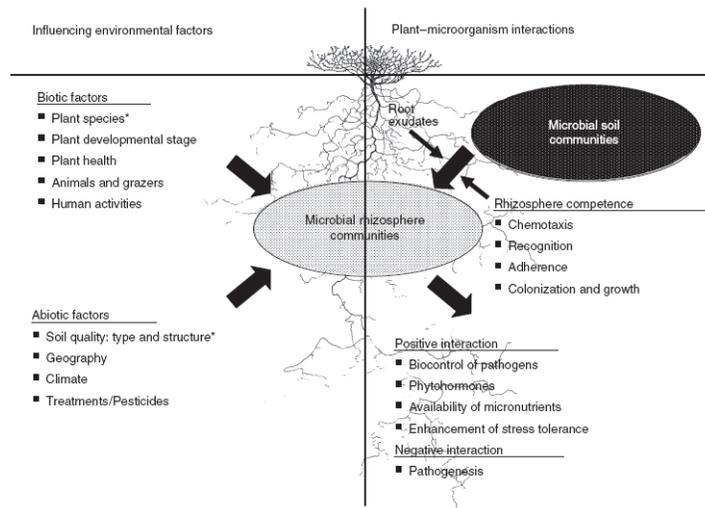
Κλάση II: Μύκητες που αποικίζουν τη ριζόσφαιρα, φυλλόσφαιρα, ενδόσφαιρα και μεταδίδονται οριζόντια ή/και κάθετα

Κλάση III: Ενδοφυτικοί μύκητες που ανήκουν στα φύλα *Ascomycota* ή *Basidiomycota* και βρίσκονται κυρίως στους εναέριους φυτικούς ιστούς ενώ μεταδίδονται με οριζόντιο τρόπο

Κλάση IV: Αφορά τους σκουρόχρωμους ενδοφυτικούς μύκητες που έχουν σέπτα στις υφές (Dark septate endophytes, DSE) και περιορίζονται στα κύτταρα του φλοιού της ρίζας.

### 1.3.4 Είσοδος και αποίκηση των φυτών από τα ενδόφυτα

Οι φυτικές εκκρίσεις (exudates) των ριζών και, σε μικρότερη έκταση, των φύλλων έλκουν τους μικροοργανισμούς που αποικίζουν αρχικά εξωτερικά τις φυτικές επιφάνειες (ρίζα, ριζικά τριχίδια, φύλλα, άνθη, καρπούς) πριν την είσοδο τους στο φυτό. Επιτυχής αποίκηση της ρίζας εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως τον τύπο του φυτικού ιστού, το φυτικό γονότυπο, το ταξινομικό είδος και στέλεχος του μικροβίου, καθώς και οι αβιοτικές και βιοτικές περιβαλλοντικές συνθήκες (Berg & Smalla, 2009) (Εικ. 1.2). Επίσης, τα βακτήρια χρειάζεται να έχουν και την ικανότητα αποίκησης της ριζόσφαιρας (rhizosphere competence), δηλαδή χαρακτηριστικά όπως κινητικότητα, παραγωγή λιποπολυσακχαριδίων, αίσθηση πυκνότητας πληθυσμού και ανταγωνιστικότητα (Compant et al., 2010; Beaugerard et al., 2013) (Εικ. 1.2).



Εικόνα 1.2. Παράγοντες που επηρεάζουν τις ριζοσφαιρικές μικροβιακές κοινότητες και μοντέλο του πώς αυτές επιλέγονται από το έδαφος: από τις ριζικές εκκρίσεις και την ικανότητα αποίκησης της ριζόσφαιρας (Berg and Smalla, 2009).

Οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν διαφορετικούς μηχανισμούς για να εισέλθουν στους φυτικούς ιστούς. Η διείσδυση δεν πραγματοποιείται μόνο με ενεργούς μηχανισμούς, οπότε όλα τα μικρόβια μπορούν να γίνουν ενδοφυτικά σε κάποιο στάδιο του βιολογικού τους κύκλου (Hardoim et al., 2008).

Ο πιο συνήθης τρόπος εισόδου των ενδόφυτων είναι μέσω των πρωτογενών και πλευρικών ριζικών ρωγμών λόγω ανάπτυξης των ριζών, τα οποία έχουν αναγνωριστεί ως «hot spots» βακτηριακής αποίκησης (Sørensen & Sessits, 2006; Hardoim et al., 2008). Επίσης, μπορούν να εισέλθουν μέσω διάφορων πληγών στους ιστούς, από φυτοπαθογόνα ή μηχανική τριβή (Sørensen & Sessitsch, 2006; Reinhold-Hurek & Hurek, 2011). Πρόσφατες μελέτες παρουσίασαν αποδείξεις για την αντίληψη πως τα ριζικά τριχίδια δε διαδραματίζουν ρόλο μόνο στην πρόσδεση αλλά και στην είσοδο των ενδοφυτικών (Mercado-Blanco & Prieto, 2012; Santoyo et al., 2016; Shehata et al., 2017). Όσον αφορά τα φύλλα, μπορούν να εισέλθουν από τα στόματα και διάφορες πληγές (Compant et al., 2010). Άλλα σημεία από τα οποία τα ενδόφυτα εισέρχονται στο φυτό περιλαμβάνουν τα φακίδια, που συνήθως βρίσκονται στο περιδέρμα των βλαστών και ριζών (Santoyo et al., 2016). Τέλος, μπορούν να εισχωρήσουν στους εσωτερικούς ιστούς από τα άνθη και τους καρπούς μετά την αποίκηση της ανθόσφαιρας και καρπόσφαιρας (Compant et al., 2010). Μια μελέτη έδειξε πως ο μύκητας *Trichoderma harzianum* μπορεί να εισέλθει στη ρίζα μέσω μυκοπαρασιτισμού μυκοριζικών μυκήτων (Jaeger et al., 2010).

Για ενεργή είσοδο, οι μικροοργανισμοί πρέπει να παράγουν ένζυμα που υδρολύουν και καταστρέφουν το κυτταρικό τοίχωμα (Compant et al., 2005; Reinhold-Hurek et al., 2006; Reinhold-Hurek & Hurek, 2011; Mukherjee et al., 2012). Αυτά τα ένζυμα δείχνουν να είναι σημαντικά για τη διασπορά μέσα στο φυτό από τους αποπλαστικούς χώρους στο φλοιόμα της ρίζας (Hardoim et al., 2008). Από την άλλη, το βακτήριο *Herbaspirillum seropedicae*, που δε διαθέτει τα γονίδια για την υδρόλυση των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων, είναι επίσης ενδοφυτικό, κάτι που επιβεβαιώνει την ύπαρξη άλλων στρατηγικών για την εισχώρηση των φυτικών ιστών (Pedrosa et al., 2011).

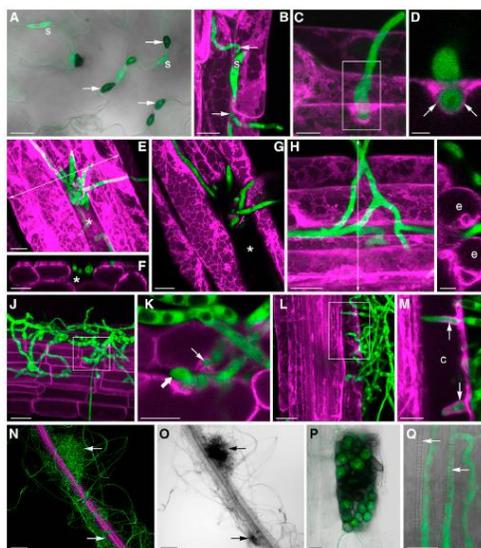
Αφού περάσουν το εξωδερμικό φράγμα της ρίζας, τα ενδόφυτα μπορεί να παραμείνουν στο σημείο της εισόδου ή να προχωρήσουν παραπέρα και να καταλάβουν τον αποπλαστικό χώρο του φλοιού της ρίζας (Mercado-Blanco et al., 2004). Η ενδοδερμίδα είναι το επόμενο εμπόδιο για περαιτέρω αποίκηση (Compant et al., 2010; Mercado-Blanco & Lugtenberg, 2014). Μπορούν να το ξεπεράσουν είτε ενεργητικά με την έκκριση υδρολυτικών ενζύμων είτε παθητικά συνεχίζοντας μέσα από ένα διαρρηγνυόμενο σημείο του στρώματος, λόγω ανάπτυξης δευτερευουσών ριζών

από το περικύκλιο ή επίθεση παθογόνων (Compant et al., 2010). Μετά την ενδοδερμίδα, οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί πρέπει να περάσουν το περικύκλιο ώστε να φτάσουν τα αγγεία του ξύλου του και να διαδοθούν στα εναέρια όργανα του φυτού (Compant et al., 2010; James et al., 2002).

Η μετάδοση από τη μία γενιά στην επόμενη (vertical transmission) μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω των σπόρων, όπως έχει προταθεί από αρκετούς συγγραφείς (Ringelberg et al., 2012; Gagne-Bourgue et al., 2013; Truyens et al., 2014; Mitter et al., 2017).

Δεν είναι μέχρι τώρα γνωστό εάν υπάρχει ειδικός τρόπος επικοινωνίας (εκτός του χημειοτακτισμού) μεταξύ ενδοφυτικών βακτηρίων και φυτών που εμπλέκεται στην αποίκηση των εσωτερικών φυτικών ιστών, που να είναι σχετικός με τους μηχανισμούς που χρησιμοποιούν τα ριζόβια (Santoyo et al., 2016). Ωστόσο, τα τριχίδια (pili) τύπου IV, τα λιποπολυσακχαρίδια (LPS), τα εξωπολυσακχαρίδια (EPS) για το σχηματισμό του βιοϋμενίου και η twitching κίνηση είναι βακτηριακά στοιχεία που διαδραματίζουν ρόλο στην πρόσδεση στο φυτικό ιστό, ενδοφυτική αποίκηση και κίνηση μέσα στο φυτό (Böhm et al., 2007; Balsanelli et al., 2010; Beauregard et al., 2013; Malfanova et al., 2013).

Μεταξύ των πρώτων σοβαρών επιδείξεων εκτενούς ενδοφυτικής αποίκησης έως και των αγγείων μη ασθενών φυτών μέσω οπτικού και ηλεκτρονικού μικροσκοπίου ήταν του διαζωτροφικού βακτηρίου *Azoarcus sp.* BH72 σε γρασίδι (Hurek et al., 1991). Πολλοί ερευνητές έχουν αποδείξει την εσωτερική αποίκηση των φυτικών ιστών με βακτήρια και μύκητες (π.χ. Prieto et al., 2011; Mishra et al., 2015; Hiruma et al., 2016; Raja et al., 2016). Στην εικόνα 1.3 φαίνεται η ενδοφυτική αποίκηση του μύκητα *Colletotrichum tofieldiae* στο φυτό *Arabidopsis thaliana*.



Εικόνα 1.3. Εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με ακτίνες Laser του μύκητα *C. tofieldiae* που εκφράζει την πρωτεΐνη πράσινου φθορισμού (πράσινο) και του *A. thaliana* που εκφράζει το PIP2A-mCherry (ροζ). (A): Σπόρια μύκητα που βλαστάνουν σε ένα φύλλο σχηματίζουν απρεσσόρια, (B) Σπόρια μύκητα που βλαστάνουν στη ρίζα (C & D) Υφές εισέρχονται σε επιδερμικό κύτταρο ρίζας, (E-G): Επιδερμικό κύτταρο ρίζας (αστερίσκος) περιέχει υφές, (H & I) Υφές βρίσκονται μεταξύ 2 επιδερμικών κυττάρων ρίζας, (J & K): Ενδοκυτταρικές (μικρό βέλος) και μεσοκυτταρικές (μεγάλο βέλος) υφές στο φλοιό της ρίζας, (L & M): Ενδοκυτταρικές υφές με κύτταρο φλοιού της ρίζας, (N & O): Υφές πάνω στη ρίζα, (P): Επιδερμικό κύτταρο ρίζας μέσα σε πλέγμα υφών με κυτταρικά τοιχώματα με μελανίνη, (Q): Υφές μέσα στον κεντρικό κύλινδρο της ρίζας (Hiruma et al., 2016).

### 1.3.5 Ταξινομική ποικιλία των ενδόφυτων

Αυτή η ομάδα μικροοργανισμών χαρακτηρίζεται από υψηλή ποικιλομορφία και τοπική ετερογένεια τα οποία περιπλέκουν την κατανόηση του οικολογικού τους ρόλου και των μηχανισμών που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση τους με τα φυτά (Bragina et al., 2012). Η γνώση της ταξινομικής ποικιλίας των ενδοφυτικών μικροοργανισμών είναι σημαντική για την μελλοντική ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών παραγόντων προαγωγής της ανάπτυξης των φυτών.

Οι Hardoiim και συνεργάτες (2015) πραγματοποίησαν μια ταξινομική ανάλυση των ενδοφυτικών μικροοργανισμών με βάση τις αλληλουχίες 16s rDNA για τους προκαρυωτικούς και ITS rDNA για τους ευκαρυωτικούς που έχουν κατατεθεί σε βάση δεδομένων.

Σύμφωνα με αυτή, περισσότερο από το 96% του συνολικού αριθμού ενδοφυτικών προκαρυωτικών αλληλουχιών ( $n=7,348$ ) κατατάσσονται σε τέσσερα βακτηριακά φύλα και συγκεκριμένα, 54% στο φύλο των Πρωτεοβακτήρια, 20% στην ομάδα των Ακτινοβακτηρίων,

16% στην ομάδα των *Firmicutes* και 6% των *Bacteroidetes*. Τα περισσότερα από τα προκαρυωτικά ενδόφυτα (26%) ήταν γ-Πρωτεοβακτήρια και αντιπροσωπευτικά γένη ήταν τα *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter* και *Serratia*. Τα Ακτινοβακτήρια αντιπροσωπεύονταν από το γένος *Streptomyces* και τα *Firmicutes* από τα γένη *Bacillus*, *Paenibacillus* και *Staphylococcus*. Γενικά, άλλα γένη που εμφανίζονται ως ενδοφυτικά είναι τα *Burkholderia*, *Micrococcus* και *Microbacterium* (Reinhold-Hurek & Hurek, 2011).

Σύμφωνα με την ανάλυση των Hardoim και συνεργατών (2015), οι ενδοφυτικοί μύκητες ανήκουν κυρίως στις ομάδες των Γκλομερομυκήτων (40%), Ασκομυκήτων (31%), Βασιδιομυκήτων (20%) και σε μικρότερο ποσοστό των Ζυγομυκήτων (0.1%). Οι Γκλομερομύκητες περιλαμβάνουν τις δενδροειδείς μυκόρριζες. Μεγάλο μέρος των ενδοφυτικών Ασκομυκήτων ανήκουν στην κλάση *Dothideomycetes* (15%) που περιέχει είδη των γενών *Alternaria* και *Epicoccum*. Πολλά μέλη της κλάσης *Sordariomycetes* (9%) είναι ενδοφυτικοί μύκητες, όπως είδη των γενών *Balansia*, *Epichloë*, *Nemania*, *Xylaria*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Verticillium* και *Rosselinia*. Στην ομάδα των Βασιδιομυκήτων, κύρια κλάση ενδοφυτικών μυκήτων είναι η *Agaricomycetes* (18%) που περιλαμβάνει μανιτάρια και εκτομυκόρριζες. Άλλες κλάσεις των Βασιδιομυκήτων που περιέχουν ενδοφυτικούς μύκητες είναι οι *Atractiellomycetes*, *Cystobasidiomycetes*, *Microbotryomycetes* και *Tremellomycetes*. Ακόμη, υπάρχουν διάφοροι ενδοφυτικοί μύκητες που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών, όπως ο *Piriformospora indica* και το γένος *Trichoderma* (Fesel & Zuccaro, 2016). Τέλος, ως ενδοφυτικοί έχουν βρεθεί και εντομοπαθογόνοι μύκητες, όπως τα γένη *Acremonium*, *Beauveria* και *Clonostachys* (Parsa et al., 2013; Jaber & Ownley, 2017).

Ο πληθυσμός των ενδοφυτικών μικροοργανισμών είναι δυναμικής δομής και εξαρτάται από πολλές μεταβλητές σε κάθε χρονική στιγμή.

Γενικά, γενετικά συγγενή φυτά φαίνεται να φιλοξενούν περισσότερο όμοια ενδοφυτικές κοινότητες, αν και επιδράσεις του ξενιστή όπως ο γονότυπος, το στάδιο της ανάπτυξης και ο ιστός, έχουν αναφερθεί επανειλημμένα (van Overbeek & van Elsas, 2008; Manter et al., 2010; Hardoim et al., 2012; Lundberg et al., 2012; Bodenhausen et al., 2013; Ottesen et al., 2013; Coleman-Derr et al., 2015; Andreolli et al., 2016; Jia et al., 2016; Robinson et al., 2016; Fuchs et al., 2017; López-Gonzales et al., 2017). Για παράδειγμα, διαφορετικοί ενδοφυτικοί μικροβιακοί πληθυσμοί ανάλογα με την ηλικία του φυτού μπορεί να είναι χρήσιμοι στην καταπολέμηση φυτοπαθογόνων ή στην βελτίωση της πρόσληψης θρεπτικών (Franche et al., 2009; Chaparro et al. 2013; Ahemad & Kibret, 2014).

Οι μικροοργανισμοί της ενδόσφαιρας επηρεάζονται και από τη μόλυνση των ξενιστών τους με φυτοπαθογόνα αλλά και την αλληλεπίδραση τους με άλλα ενδόφυτα (Bulgari et al., 2011, 2012; Ardanon et al., 2012; Douanla-Meli et al., 2013; Barret et al., 2015). Ακόμα και οι μικροβιακοί ιοί μπορούν να επιφέρουν δραστικές αλλαγές (Buée et al., 2009).

Έρευνες έχουν δείξει πως η μικροβιακή ποικιλότητα επηρεάζεται και από τη βιογεωγραφία (Coleman-Derr et al., 2016), το κλίμα και τις γεωργικές πρακτικές (Bulgari et al., 2011; Klaedtke et al., 2016) αλλά και τον τύπο του εδάφους (Berg & Smalla, 2009; Lundberg et al., 2012).

Τα αρωματικά/φαρμακευτικά φυτά έχουν αξιολογηθεί ως μια ενδιαφέρουσα πηγή μικροβιακής βιοποικιλίας λόγω του πλούσιου δευτερογενή τους μεταβολισμού, ο οποίος επηρεάζει τη μικροβιακή σύσταση (Köberl et al., 2013; Jia et al., 2016; Egamberdieva et al., 2017). Τα ενδημικά φυτά επίσης χαρακτηρίζονται ως ιδιαίτερες πηγές για βιοποικιλότητα και μικροβιακούς ανταγωνιστές (Zachow et al., 2014).

Υπάρχουν αυξανόμενες αποδείξεις πως η σύσταση και ποικιλότητα της φυτικής μικροβιακής κοινότητας διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εδραίωση και ανάπτυξη των φυτικών ασθενειών (Ardanon et al., 2016; Steinrucken et al., 2016) και η απουσία συγκεκριμένων μικροβίων μπορεί να προκαλέσει έκρηξη ασθενειών (Blaser, 2014).

Παρ'όλη τη διαμόρφωση της σύστασης των ενδοφυτικών μικροβίων από παράγοντες βιοτικούς και αβιοτικούς, φαίνεται πως υπάρχει ένα κεντρικό/κύριο (core) μικροβίωμα για το κάθε φυτικό είδος. Θα ήταν, λοιπόν, χρήσιμο αυτό να προσδιοριστεί σε φυτά αγρονομικής σημασίας για την καλύτερη διαχείριση τους (Santoyo et al., 2016; Tian et al., 2017). Μια πρώτη προσέγγιση προς αυτή την κατεύθυνση, ήταν η μελέτη του κεντρικού ριζικού ενδοφυτικού μικροβιώματος του φυτού *Arabidopsis thaliana* (Lundberg et al., 2012). Όσον αφορά το καλαμπόκι, σημαντικά είναι τα ευρήματα των Johnston-Monje και Raizada (2011), που έδειξαν ότι ένα κεντρικό μικροβίωμα των ίδιων βακτηριακών ειδών είναι συντηρημένο από την εποχή του προγόνου του (teosinte), παρά τις εξελικτικές και επιλεκτικές αλλαγές.

Προς το παρόν είναι λίγα τα φυτά που έχουν αναλυθεί αλλά φαίνεται πως οι σπόροι μεταφέρουν ένα κεντρικό μικροβίωμα στα καινούργια φυτά (Bragina et al., 2012, 2015; Truyens et al., 2014; Quesada-Moraga et al., 2014), όπως γίνεται σε όλους τους άλλους οργανισμούς συμπεριλαμβανομένων των βρύων (Bragina et al., 2012) και των ανθρώπων (Blaser, 2014).

### **1.3.6 Πλεονεκτήματα των ενδόφυτων**

Έχει τεκμηριωθεί πως οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να προάγουν την ανάπτυξη των φυτών μέσω άμεσων και έμμεσων μηχανισμών (Hardoim et al., 2015; Santoyo et al., 2016).

Τα ριζοσφαιρικά και τα ενδοφυτικά μικρόβια χρησιμοποιούν παρόμοιους αν όχι πανομοιότυπους μηχανισμούς για να προάγουν τη φυτική ανάπτυξη (Santoyo et al., 2016). Συχνά, οι ωφέλιμες επιδράσεις των ενδοφυτικών είναι μεγαλύτερες από τους μικροοργανισμούς που κατοικούν μόνο στη ριζοσφαιρα, καθώς είναι πιο πιθανό να εμμείνουν στο περιβάλλον σε οποιοσδήποτε συνθήκες (Ali et al., 2012; Santoyo et al., 2016) και να αλληλεπιδράσουν με το φυτό πιο αποτελεσματικά με τις επιδράσεις να είναι άμεσες και έντονες (Hardoim et al., 2008 ; Yadav, 2017). Επιπλέον, τα ενδόφυτα των σπόρων μπορεί να είναι ουσιαστικά για τη διαδικασία της φύτευσης αλλά και το βιολογικό έλεγχο σε διαφορετικά φυτά (Alavi et al., 2013; Verma & White, 2017).

Λόγω των ιδιαίτερων φυσικοχημικών ιδιοτήτων των εσωτερικών φυτικών ιστών είναι πιθανή η ανακάλυψη νέων μηχανισμών προαγωγής της ανάπτυξης των φυτών από τους ενδοφυτικούς μικροοργανισμούς στο μέλλον (Santoyo et al., 2016).

#### **1.3.6.1 Άμεσοι μηχανισμοί προαγωγής της ανάπτυξης των φυτών**

##### **1) Παραγωγή ρυθμιστών της ανάπτυξης των φυτών**

Διάφοροι μικροοργανισμοί μπορούν να αλλάξουν την αρχιτεκτονική της ρίζας και να προωθήσουν την ανάπτυξη του φυτού λόγω της ικανότητας τους να συνθέσουν και να εκκρίνουν φυτικές ορμόνες, όπως το ινδολοξικό οξύ (IAA), γιββερελλίνες (GAs), κυτοκινίνες (CKs) και συγκεκριμένες πτητικές ενώσεις. Ως εκ τούτου, οι μικροοργανισμοί αυτοί ορίζονται ως φυτοδιεγέρτες (phytostimulators) (Bloemberg & Lugtenberg, 2001).

Η παραγωγή φυτικών ορμονών από τους ενδοφυτικούς μικροοργανισμούς είναι πιθανόν ο καλύτερα μελετημένος μηχανισμός της προαγωγής της ανάπτυξης των φυτών, ο οποίος οδηγεί σε μορφολογικές και αρχιτεκτονικές αλλαγές στους ξενιστές τους (Khan et al., 2016). Το ινδολοξικό οξύ, που ανήκει στην ομάδα των αυξινών, οι κυτοκινίνες και οι γιββερελλίνες εμπλέκονται σε κάθε πλευρά της φυτικής ανάπτυξης (Sukumar et al., 2012)

Περίπου 80% της βακτηριακής χλωρίδας στη ριζόσφαιρα παράγει IAA (Patten & Glick, 1996). Έχει βρεθεί πληθώρα ενδοφυτικών μικροοργανισμών που παράγουν IAA και υποστηρίζουν την ανάπτυξη των φυτών (Khan et al., 2012, 2016; Sukumar et al., 2012; Waqas et al., 2012; Etesami et al., 2015) Έχει προταθεί πως αυτό το μόριο αυξάνει την αποτελεσματικότητα της αποίκισης και έχει αναγνωριστεί ως τελεστής στην παθογένεση και τη φυτοδιέγερση (Spaeren & Vanderleyden, 2010). Κυτοκινίνες και γιββερελλίνες επίσης παράγονται από ενδόφυτα (Ortíz-Castro et al., 2008; Vadassery et al., 2008; Glick, 2012; Waqas et al., 2012; Ambawade & Pathade 2015; Hamayun et al., 2017).

Οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί παράγουν και άλλες φυτορυθμιστικές ουσίες. Αδενίνη και αδενοσίνη έχουν αναγνωριστεί ως ουσίες προαγωγής της αύξησης από ενδόφυτα του φυτού *Scots pine* (Pirttilä et al., 2004), ενώ πολυαμίνες παράγονται από το βακτήριο *Azospirillum brasilense* (Perrig et al., 2007). Πτητικές ουσίες, όπως acetoin και 2,3-βουτανοδιόλη μπορούν να διεγείρουν τη φυτική ανάπτυξη και παράγονται από κάποια ενδοφυτικά βακτήρια (Taghavi et al., 2009; Johnston-Monje & Raizada, 2011).

## 2) Παροχή θρεπτικών

Τα θρεπτικά μπορεί να παρέχονται από τους μικροοργανισμούς, όπως το άζωτο, ή να κινητοποιούνται, όπως στην περίπτωση του φώσφορου και σιδήρου. Οι μικροοργανισμοί που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών μέσω της βελτίωσης της πρόσληψης θρεπτικών ορίζονται ως βιολιπαντές (biofertilizers) (Perez-Montano et al., 2014).

Το άζωτο είναι το θρεπτικό που απαιτείται στη μεγαλύτερη ποσότητα και είναι περιοριστικός παράγοντας για την ανάπτυξη των φυτών (Courty et al., 2015). Η βιολογική αζωτοδέσμευση αντιπροσωπεύει μια οικονομική και περιβαλλοντικά φιλική εναλλακτική των χημικών λιπασμάτων (Doty, 2017). Οι αζωτοδεσμευτικοί μικροοργανισμοί περιλαμβάνουν τα συμβιωτικά βακτήρια (ριζόβια) και μη συμβιωτικούς αζωτοδεσμευτικούς μικροοργανισμούς (διαζωτροφικοί) που διακρίνονται σε ελεύθερα διαβιούντες, προσεταιριστικοί (associative) και ενδοφυτικοί (Figueiredo et al., 2016; Doty, 2017)

Αρκετά βακτηριακά ενδόφυτα αζωτοδεσμεύουν, όπως είδη των γενών *Acetobacter*, *Herbaspirillum*, *Azoarcus*, *Gluconacetobacter*, *Paenibacillus*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Nostoc*, *Pseudomonas* (Scherling et al., 2009; Carrell & Frank, 2014; Lowman et al., 2015; Doty, 2017; Pham et al., 2017). Ενδιαφέρον παρουσιάζει μια μελέτη που υποστηρίζει πως ο ενδοφυτικός

εντομοπαθογόνος μύκητας *Metarhizium robertsii* μεταφέρει άζωτο απευθείας από τα έντομα στο φυτό μέσω των υφών του (Behie et al., 2012).

Ο φώσφορος (P), ο δεύτερος σημαντικότερος περιοριστικός παράγοντας μετά το άζωτο, είναι διαθέσιμος σε μεγάλη ποσότητα στο έδαφος και σε οργανική και σε ανόργανη μορφή αλλά είναι μη διαθέσιμος για τα φυτά (Glick, 2012). Ο ανόργανος φώσφορος είναι ιζηματοποιημένος με αργίλιο (Al), σίδηρο (Fe) και ασβέστιο (Ca), ενώ οργανικές μορφές του περιλαμβάνουν φωσφορική ινοσιτόλη, φωσφορικούς μονοεστέρες και φωσφορικούς τριεστέρες (Glick, 2012).

Μικροοργανισμοί που μπορούν να διαλυτοποιήσουν το φώσφορο (PSMs) χαρακτηρίζονται από την ικανότητα τους να διαλυτοποιήσουν ιζηματοποιημένο φώσφορο και περιλαμβάνουν βακτηριακά γένη όπως *Pseudomonas* και *Bacillus*, Ακτινοβακτήρια και γένη μυκήτων όπως *Aspergillus*, *Penicillium*, *Piriformospora* και *Colletotrichum* (Sharma et al., 2013; Gill et al., 2016; Hiruma et al., 2016; Chhabra & Dowling, 2017; Shehata et al., 2017).

Οι κύριοι μηχανισμοί διαλυτοποίησης φωσφόρου περιλαμβάνουν την έκκριση χηλικών παραγόντων που μειώνουν και το pH, όπως ανιόντα οργανικών οξέων (Oteino et al., 2015) και πρωτόνια (Mehta et al., 2014) αλλά και εξωκυτταρικά ένζυμα, όπως φωσφατάσες (Sharma et al., 2013).

Ο σίδηρος (Fe) εμπλέκεται σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια και η έλλειψη του διαταράσσει βασικές διεργασίες του φυτικού μεταβολισμού, όπως την αναπνοή και τη φωτοσύνθεση (Robin et al., 2008). Ο δισθενής σίδηρος ( $Fe^{2+}$ ) είναι διαλυτός αλλά οξειδώνεται γρήγορα προς τρισθενή σίδηρο ( $Fe^{3+}$ ). Αυτή η μορφή του σιδήρου ( $Fe^{3+}$ ) είναι συχνά μη βιοδιαθέσιμη για τα φυτά και τους μικροοργανισμούς, καθώς σχηματίζει αδιάλυτα οξειδία και υδροξείδια (Robin et al., 2008).

Τα σιδηροφόρα είναι ενώσεις μικρού μοριακού βάρους τα οποία περιέχουν λειτουργικές ομάδες ικανές να δεσμεύουν τα οξειδωμένα ιόντα σιδήρου (Neilands, 1989).

Στα φυτά στρατηγικής I, ο σίδηρος πρέπει πρώτα να γίνει διαλυτός με τη βοήθεια έκκρισης οξέων και την απελευθέρωση ενζύμων πριν απορροφηθεί από το φυτό (Robin et al., 2008). Οι ρίζες των φυτών στρατηγικής II (π.χ. οικογένεια *Graminaceae*) εκκρίνουν φυτοσιδηροφόρα και ο σίδηρος μπορεί να προσληφθεί απευθείας ως σύμπλοκο φυτοσιδηροφόρου-σιδήρου. (Robin et al., 2008).

Υπό συνθήκες έλλειψης βιοδιαθέσιμου σιδήρου, οι μικροοργανισμοί που προωθούν την ανάπτυξη των φυτών, συμπεριλαμβανομένων των ενδόφυτων, επίσης παράγουν σιδηροφόρα προμηθεύοντας έτσι και τα φυτά (Johnson et al., 2013; Radzki et al., 2013; Rosconi et al., 2013;

Saha et al., 2013). Βάσει της δομής τους, η πλειοψηφία των γνωστών σιδηροφόρων έχουν κατηγοριοποιηθεί είτε ως catecholates, που παράγονται από βακτήρια, είτε ως hydroxymates, που παράγονται από βακτήρια και μύκητες (Ahmed & Holmström, 2014).

Πολλά ενδοφυτικά βακτήρια, όπως το *Azoarcus* sp. BH72, διαθέτουν αρκετά γονίδια που κωδικοποιούν για υποδοχείς των σιδηροφόρων στην εξωτερική μεμβράνη ενώ μπορεί τα ίδια να μην παράγουν (Krause et al., 2006; Reinhold-Hurek & Hurek, 2011). Έτσι, το εσωτερικό των φυτών φαίνεται να είναι ένα μικροπεριβάλλον με έλλειψη βιοδιαθέσιμου σιδήρου.

### 3) Ύφεση του αβιοτικού στρες

Οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί βοηθούν τα φυτά να ανταπεξέλθουν στη θερμότητα, το ψύχος, την ξηρασία, την αλατότητα και τα βαρέα μέταλλα (Fernandez et al., 2012; Hubbard et al., 2014; Naveed et al., 2014; Qin et al., 2016; Deng & Cao, 2017; Rho et al., 2017).

Η ύφεση του αβιοτικού στρες μπορεί να επιτευχθεί με την παραγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων και οσμωλυτών (Hamilton et al., 2012; Naveed et al., 2014; Bacon & White, 2015). Ακόμη, ένας άλλος μηχανισμός είναι η μείωση της συγκέντρωσης του αιθυλενίου. Το αιθυλένιο δρα ως δευτερογενές σήμα σε καταστάσεις στρες και μπορεί να διεγείρει το γηρασμό, την αποκοπή φύλλων και καρπών και την παρεμπόδιση της ανάπτυξης (Glick et al., 2014). Η σύνθεσή του μπορεί να κατασταλλεί από τη δραστηριότητα του ενζύμου απαμινάση του ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate). Αυτό το ένζυμο διασπά το πρόδρομο μόριο του αιθυλενίου, το ACC, σε αμμωνία και 2-οξοβουτανικό, προλαμβάνοντας τη σηματοδότηση του αιθυλενίου για την παρεμπόδιση της φυτικής ανάπτυξης (Glick et al., 2014). Η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός ενδοφυτικών βακτηρίων που παράγουν αυτό το ένζυμο και έχουν επίδραση στα φυτά έχουν αναφερθεί (Rashid et al., 2012; Ali et al., 2014a; Khan et al., 2016).

Οι Rodriguez και συνεργάτες (2008) πρότειναν πως διαφορετικά ενδόφυτα βοηθούν στην προσαρμογή των φυτών σε διαφορετικά στρες, καθώς τα ενδόφυτα παραθαλάσσιων φυτών πρόσφεραν ανθεκτικότητα στην αλατότητα, ενώ ενδόφυτα φυτών κοντά σε θερμές πηγές πρόσφεραν ανθεκτικότητα στη θερμότητα.

### 3.6.1.2 Έμμεσοι μηχανισμοί

#### 1) Βιολογικός έλεγχος (Biocontrol)

Ο βιολογικός έλεγχος είναι ένας περιβαλλοντικά φιλικός και αποτελεσματικός τρόπος μείωσης των επιβλαβών μικροοργανισμών και των αρνητικών επιδράσεων τους μέσω της χρήσης φυσικών εχθρών.

Οι μικροοργανισμοί που έχουν την ικανότητα βιολογικού ελέγχου των φυτοπαθογόνων είναι μικροοργανισμοί που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών έμμεσα, με το να περιορίζουν την αρνητική επίδραση των παθογόνων στην ανάπτυξη και ευρωστία του φυτού (Saraf et al., 2013; Hardoim et al., 2015).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, παρ'όλο που οι μικροοργανισμοί που σχετίζονται με τα φυτά και οι ενδοφυτικοί καταλαμβάνουν διαφορετικούς θώκους, έχουν παρόμοιους μηχανισμούς προαγωγής ανάπτυξης των φυτών άρα και ελέγχου των φυτοπαθογόνων. Οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί είναι υποσχόμενοι παράγοντες βιολογικού ελέγχου για τη γεωργία (Compant et al., 2016; Eljounaidi et al., 2016)

Μελέτες δείχνουν πως οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί μπορούν να προστατεύσουν το φυτό από επιθέσεις εντόμων (Lopez et al., 2015; Jaber et al., 2017), νηματωδών (Tian et al., 2007; Hu et al., 2017) και μικροβίων (Ben Abdallah et al., 2016; Selim et al., 2017).

Οι μηχανισμοί που χρησιμοποιούνται είναι οι εξής :

#### 1α) Ανταγωνισμός για χώρο και θρεπτικά

Κάποιοι μικροοργανισμοί μπορούν να ανταγωνιστούν με τα φυτοπαθογόνα για θρεπτικά και εδραίωση μέσα στο φυτό. Οι πιο άφθονοι μικροοργανισμοί που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών αποικίζουν γρήγορα τις φυτικές επιφάνειες και χρησιμοποιούν τα περισσότερα από τα διαθέσιμα θρεπτικά, κάνοντας δύσκολη την ανάπτυξη των παθογόνων (Robin et al., 2008; Friesen et al., 2011; Hardoim et al., 2015; Hu et al., 2017). Ο σχηματισμός βιοϋμένων είναι άλλος ένας τρόπος για την προστασία από φυτοπαθογόνα, καθώς λειτουργούν ως φυσικά και χημικά εμπόδια (Haggag, 2010; Mousa et al., 2016).

#### 1β) Επαγωγή της άμυνας του φυτού

Οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί μπορούν να επάγουν τη διασυστηματική ανοχή του φυτού οδηγώντας σε υψηλότερη ανθεκτικότητα στα φυτοπαθογόνα (Pieterse et al., 2014).

Βακτηριακά στελέχη των γενών *Pseudomonas* και *Bacillus* θεωρούνται τα πιο συνήθη για την επαγωγή διασυστηματικής αντοχής (Schilirò et al., 2012; Cabanás et al., 2014; Gond et al., 2015). Σε αντίθεση με τα ενδοφυτικά βακτήρια, οι ενδοφυτικοί μύκητες δεν αναφέρονται συχνά στην εμπλοκή της επαγωγής διασυστηματικής αντοχής, αν και υπάρχουν αναφορές για είδη του γένους *Trichoderma* (Bae et al., 2011; Pieterse et al., 2014) και του *Fusarium solani* (Kavroulakis et al., 2007). Ως παράγοντες υπεύθυνοι για την επαγωγή αυτή έχουν αναγνωριστεί το μαστίγιο και μόρια όπως τα αντιβιοτικά, οι N-ακυλ-λακτόνες της ομο-σερίνης και τα σιδηροφόρα για τα βακτήρια, ενώ ένζυμα όπως ξυλανάσες και κυτταρινάσες για τους μύκητες (Pieterse et al., 2014).

### **1γ) Σύνθεση αντιμικροβιακών ενώσεων**

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από τους μικροοργανισμούς που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών, συμπεριλαμβανομένων των ενδοφυτικών, δρουν εναντίον φυτοπαθογόνων οργανισμών.

Γενικά, οι ενδοφυτικοί ακτινομύκητες είναι τα πιο γνωστά παραδείγματα μικροοργανισμών που παράγουν αντιμικροβιακές ενώσεις (Matsumoto & Takahashi, 2017).

Για πολλά ενδοφυτικά βακτήρια (ειδικά των γενών *Bacillus* και *Pseudomonas* ο πιο συνηθισμένος μηχανισμός για να εξηγηθεί ο ανταγωνισμός εναντίον φυτοπαθογόνων μυκήτων είναι η αντιβίωση. Όσον αφορά τα βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Bacillus* κάποιες από τις παραγόμενες ενώσεις είναι οι subtilin, subtilosin A, TasA και sublancin. Άλλες ενώσεις είναι τα λιποπεπτίδια (lipopeptides), με τις οικογένειες iturins, surfactins και fengycins, τα οποία παράγονται από μη ριβοσωμικές συνθετάσες πεπτιδίων (NRPSs) αλλά και ενώσεις που παράγονται από συνθάσες πολυκετιδίων (PKs) (Ongena & Jacques, 2008; Raaijmakers et al., 2010; Beltran-Gracia et al., 2017). Αντιβιοτικές ενώσεις, όπως τα λιποπεπτίδια επίσης παράγονται από στελέχη του γένους *Pseudomonas*, με τα είδη *Pseudomonas fluorescens* και *Pseudomonas aeruginosa* να είναι τα πιο μελετημένα. Κάποιες από αυτές είναι τα DAPG, Phenazine, Pyoluteorin, Oomycin A, Zwittermycin A και Pseudomonic acid (Loper & Gross, 2007; Raaijmakers et al., 2010). Μία πρόσφατη ανασκόπηση έδειξε την ικανότητα του γένους *Burkholderia* στην παραγωγή ριβοσωμικών πεπτιδίων και πουλυκετιδίων (Esmaeel et al., 2017).

Οι ενδοφυτικοί μύκητες είναι γνωστοί για την ικανότητα τους να παράγουν ενώσεις που παρεμποδίζουν την ανάπτυξη επιβλαβών οργανισμών, όπως τα λιποπεπτίδια (Higginbotham et al., 2013; Tejesvi et al., 2013; Egan et al., 2016). Ακόμη, έχει δειχθεί πως η παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων από τα ενδόφυτα μπορεί να επαχθεί από την παρουσία του παθογόνου (Combès et al., 2012).

Το πρόβλημα της εξάρτησης από τους μικροοργανισμούς που παράγουν αντιμικροβιακές ενώσεις ως παράγοντες βιολογικού ελέγχου είναι ότι κάποια φυτοπαθογόνα μπορεί να αναπτύξουν ανθεκτικότητα λόγω αυξημένης χρήσης αυτών των στελεχών. Για να αποφευχθεί αυτό το σενάριο, οι ερευνητές χρησιμοποιούν στελέχη που παράγουν περισσότερα από ένα αντιβιοτικά (Glick et al., 2012). Επίσης, ενδοφυτικά που στηρίζονται στην παραγωγή αντιβιοτικών συνήθως ανταλλάσσουν την παραγωγή μεταβολιτών με τη γρήγορη ανάπτυξη, οπότε δεν είναι καλοί υποψήφιοι (Mejia et al., 2008). Έτσι, προτιμώνται μικροοργανισμοί που έχουν πολλούς τρόπους δράσης εναντίον μεγάλου εύρους επιβλαβών οργανισμών και παθογόνων μικροοργανισμών.

#### **1δ) Μυκοπαρασιτισμός**

Ο μυκοπαρασιτισμός ορίζεται ως η άμεση επίθεση στο θαλλό του μύκητα ακολουθούμενη από χρήση των θρεπτικών του (Naranayasami et al., 2013). Οι υφές των μυκοπαρασίτων προσδένονται στις υφές του ξενιστή και σε κάποιες περιπτώσεις τυλίγονται (coil) γύρω από αυτές (Viterbo & Horwitz, 2010). Επίσης, πραγματοποιείται έκκριση μεταβολιτών και ενζύμων (Holzlechner et al., 2016; Sharma et al., 2016)

Γνωστοί ενδοφυτικοί μύκητες που ανταγωνίζονται με μυκοπαρασιτισμό ανήκους στο γένος *Trichoderma* (Chen et al., 2016), *Clonostachys* (Karlsson et al., 2015) και *Ampelomyces* (Pintye et al., 2012).

#### **1ε) Παραγωγή σιδηροφόρων**

Ο σίδηρος είναι θρεπτικό ζωτικής σημασίας για σχεδόν όλες τις μορφές ζωής. Όλοι οι μικροοργανισμοί που είναι γνωστοί μέχρι τώρα, με εξαίρεση κάποιους λακτοβακίλλους, απαιτούν σίδηρο (Neilands, 1995). Τα σιδηροφόρα που εκκρίνονται από τους μικροοργανισμούς που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών εμποδίζουν την πρόσληψη του απαραίτητου σιδήρου από τα φυτοπαθογόνα (Ahmed & Holmström, 2014; Hardoim et al., 2015). Αυτό συμβαίνει καθώς τα σιδηροφόρα που παράγουν τα φυτοπαθογόνα έχουν μικρότερη συγγένεια για το σίδηρο (Glick et al., 2015).

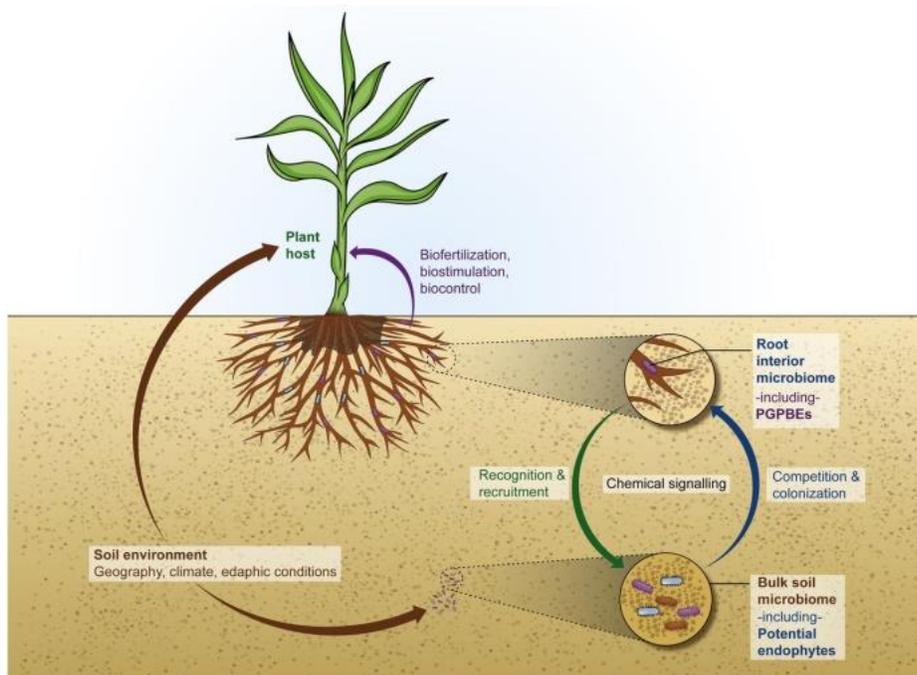
Αντίθετα με τα φυτοπαθογόνα, τα φυτά δεν επηρεάζονται από την τοπική έλλειψη σιδήρου που προκαλείται από τους ωφέλιμους μικροοργανισμούς, καθώς έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις από τους μικροοργανισμούς (Glick et al., 2015). Επιπλέον, όπως αναφέρθηκε ήδη, πολλά φυτά μπορούν να δεσμεύσουν και να προσλάβουν το σύμπλοκο του σιδηροφόρου-σιδήρου. Έχει παρατηρηθεί πως κάποια στελέχη *Pseudomonas*

spp. διαθέτουν πέντε έως είκοσι υποδοχείς στην εξωτερική τους μεμβράνη, ο καθένας από τους οποίους αναγνωρίζει ένα είδος σιδηροφόρου ή μια ομάδα σιδηροφόρων με παρόμοιες δομές (Glick et al., 2015).

### 1στ) Λυτικά ένζυμα

Τα λυτικά ένζυμα αποτελούν έναν από τους μηχανισμούς βιολογικού ελέγχου των φυτοπαθογόνων (Saraf et al., 2013). Το ένζυμο χιτινάση αποδομεί τη χιτίνη, ένα από τα κύρια συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων και των εντόμων. Ακόμη, τα ένζυμα β-1,3-γλουκανάση, πρωτεάση και λιπάση μπορούν να οδηγήσουν ένα κύτταρο στη λύση (Glick et al., 2015).

Στην παρακάτω εικόνα (Εικ. 1.4) συνοψίζονται κάποιες έννοιες που αφορούν τους ενδοφυτικούς μικροοργανισμούς.

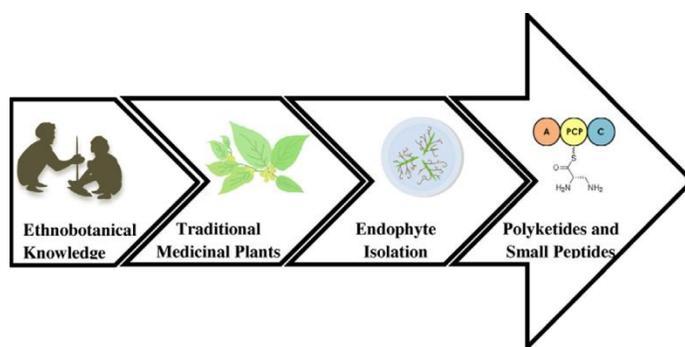


Εικόνα 1.4. Παράγοντες που καθορίζουν τη μικροβιακή κοινότητα μέσα στη ρίζα. Η κατάσταση του εδάφους έχει την ικανότητα να επηρεάζει τη σύνθεση των μικροβίων (καφέ βέλος προς τα κάτω). Επίσης, επηρεάζει τη φυσιολογία του φυτού (καφέ βέλος προς τα πάνω) άρα και τις βιοχημικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ ριζών και μικροοργανισμών. Τα φυτά επιλέγουν πιθανά ενδόφυτα (πράσινο βέλος) μέσω διαφοροποιήσεων στα χημικά σήματα των ριζικών εκκρίσεων. Πιθανά ενδόφυτα ανταγωνίζονται για θέσεις εισόδου στη ρίζα (μπλε βέλος). Μόλις εγκατασταθούν στη ρίζα, κάποια ενδόφυτα μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη των φυτών (μωβ βέλος) μέσω της απελευθέρωσης φυτικών ορμονών (φυτοδιέγερση), της αύξησης παροχής των θρεπτικών (βιολίπανση) και προστασίας από τα φυτοπαθογόνα (βιολογικός έλεγχος). Αυτή η υπο-ομάδα ορίζεται ως ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (PGPEs) (Gaiero et al., 2013).

### 1.3.7 Μεταβολισμός ενδόφυτων

Όπως προαναφέρθηκε, φαρμακευτικά και ενδημικά φυτά έχουν αξιολογηθεί ως ενδιαφέρουσες πηγές μικροβίων που μπορούν να παράγουν πολλούς δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως αλκαλοειδή, τερπένια, φλαβονοειδή (Köberl et al., 2013; Alvin et al., 2014; Jia et al., 2016).

Τα τελευταία έτη έχει βρεθεί πως οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί παράγουν παρόμοιες ή ίδιες δραστικές ουσίες με τους ξενιστές τους (Kusari et al., 2012; Jain & Pundir, 2015; Venieraki et al., 2017). Για παράδειγμα, τα φυτά της οικογένειας *Taxaceae* διαθέτουν ενδοφυτικούς μικροοργανισμούς που μπορούν να παράγουν ταξόλη (Jia et al., 2016). Ακόμη, φαίνεται πως τα ενδόφυτα επηρεάζουν με κάποιο τρόπο το δευτερογενή μεταβολισμό των φυτών με τα οποία σχετίζονται (Zhang et al., 2006). Οι εθνοβοτανικές γνώσεις οδηγούν στη μελέτη των παραδοσιακών αρωματικών φυτών για την απομόνωση φαρμακευτικών ουσιών από τους ενδοφυτικούς μικροοργανισμούς που εδράζονται σε αυτά (Alvin et al., 2014) (Εικ. 1.5).



Εικόνα 1.5 Σχηματική προβολή της προσέγγισης για εξεύρεση νέων φυσικών φαρμακευτικών ουσιών από ενδοφυτικούς μικροοργανισμούς (Alvin et al., 2014).

Οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί παράγουν μια πληθώρα βιοδραστικών μεταβολιτών με πιθανές εφαρμογές στη γεωργία, την ιατρική και τις βιομηχανίες τροφίμων και καλλυντικών (Strobel & Daisy, 2003; Kusari et al., 2012; Brader et al., 2014; Schueffler & Anke, 2014).

Νέες πληροφορίες όσον αφορά τη μοριακή βιολογία βακτηρίων και μυκήτων έχουν δείξει πως το γενετικό τους δυναμικό έχει υποτιμηθεί στο παρελθόν. Η προσέγγιση της συγκαλλιέργειας (co-culture), το να καλλιεργούνται δύο ή περισσότεροι μικροοργανισμοί στον ίδιο χώρο (De Roy et al., 2013), έχει εφαρμοστεί ώστε να δώσει απαντήσεις για τις αλληλεπιδράσεις των ενδοφυτικών μυκήτων μεταξύ τους αλλά και με παθογόνα (Combès et al., 2012; Kusari et al. 2012; Miles et al., 2012; Bertrand et al., 2014; Naidu et al., 2016; López-González et al., 2017; Preto et al., 2017; Terhonen et al., 2017). Επίσης, εφαρμόζεται για την διευρεύνηση παραγωγής νέων χημικών

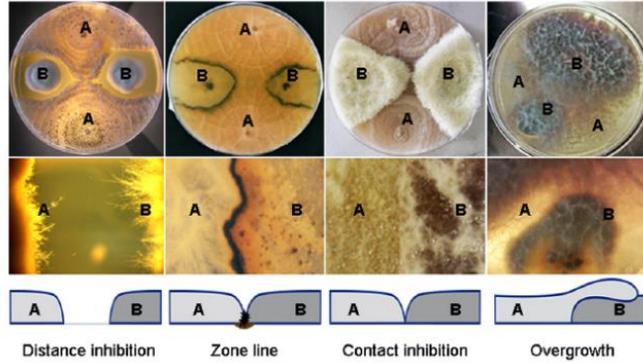
ενώσεων που δεν υπάρχουν στις αξενικές καλλιέργειες λόγω ενεργοποίησης γονιδίων που βρίσκονταν σε σίγηση (Pettit et al., 2009; Ochi & Hosaka, 2012; König et al., 2013; Soliman et al., 2013; Bertrand et al., 2014; Marmann et al., 2014; Netzker et al., 2015; Rutledge et al., 2015; Serrano et al., 2017).

Υπάρχουν δεδομένα πως σε κάποιες περιπτώσεις η ενεργοποίηση τέτοιων γονιδίων απαιτεί τη φυσική παρουσία του δεύτερου μικροβίου καθώς αξενική καλλιέργεια ή μόνο οι μεταβολίτες του δεύτερου μικροβίου (π.χ. κύτταρα θανατωμένα με θέρμανση, στείρο υπερκείμενο καλλιέργειας, εκχυλίσματα) δεν είναι αρκετά για την επαγωγή της παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών (Hynes et al., 2007 ; Schroeckh et al., 2009 ; Combès et al., 2012).

Ιδιαίτερα από άποψη μορφολογίας μοτίβα αλληλεπίδρασης αποκαλύπτονται κατά τη σάρωση συγκαλλιιεργειών μυκήτων. Δύο μοτίβα είναι ιδιαίτερα ενδιαφέροντα, με το ένα να είναι αυτό όπου οι αποικίες των μυκήτων αναπτύσσονται αρκετά ώστε να έρθουν σε επαφή και παράγουν τη σκούρα «γραμμική» ζώνη ("zone line"), όπως παρατηρείται και στο μέτωπο επαφής των μυκήτων που αποδομούν το ξύλο (Εικ. 1.6). Το άλλο μοτίβο είναι αυτό όπου η ανάπτυξη των μυκήτων παύει όταν αυτοί βρίσκονται σε απόσταση ("distance-inhibition") (Εικ. 1.6).

Μία καθαρή παύση ανάπτυξης μεταξύ μικροοργανισμών σε μεγάλη απόσταση συνδέεται με την παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων ως μηχανισμό άμυνας ενός εκ των δύο μικροοργανισμών (Combès et al., 2012; Santos-Villalobos et al., 2012; Bertrand et al., 2013b) ή και των δύο. Μια μελέτη μεγάλου αριθμού συγκαλλιιεργειών μυκήτων έδειξε πως μόνο το 5% επέδειξε τέτοιο μοτίβο αλληλεπίδρασης και ότι δε συνδέονται με ιδιαίτερη επαγωγή μεταβολιτών σε σχέση με τα υπόλοιπα μοτίβα (Bertrand et al., 2013a).

Το μοτίβο zone line είναι μορφολογικά διαφορετικό από τις αξενικές καλλιέργειες. Η ένταση του μαύρου ή άλλου χρωματισμού αυτών των ζωνών είναι ένδειξη σημαντικής μεταβολικής δραστηριότητας που μπορεί να ερευνηθεί για νέους μεταβολίτες (Peiris et al., 2008; Glauser et al., 2009; Bertrand et al., 2013; Bohni et al., 2013b).



Εικόνα 1.6 Μορφολογικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ διάφορων ζευγαριών μυκήτων σε τρυβλίο Petri που αντιπροσωπεύουν τους 4 κύριους τύπους αλληλεπίδρασης (Bertrand et al., 2013a).

## 1.4 Το φυτό *Teucrium polium*

Το *Teucrium polium* L. (συν. *Teucrium capitatum* L.) είναι ένα από τα 300 είδη του γένους *Teucrium* της οικογένειας *Lamiaceae* (Χειλανθή) (El Qualidi et al., 1999).

### 1.4.1 Συστηματική κατάταξη

Βασίλειο: *Plantae*

Υποβασίλειο: *Viridiaeplantae*

Φύλο: *Tracheophyta*

Υποφύλο: *Radiatopses*

Κλάση: *Magnoliopsida*

Υποκλάση: *Lamiidae*

Υπόταξη: *Lamianae*

Τάξη: *Lamiales*

Οικογένεια: *Lamiaceae*

Γένος: *Teucrium*

Είδος: *Teucrium polium*

### 1.4.2 Περιγραφή

*Lamiaceae* ή *Labiatae* (Χειλανθή) είναι μια οικογένεια ανθοκομικών φυτών. Περιλαμβάνει φυτά που χρησιμοποιούνται ευρέως ως μαγειρικά βότανα, όπως ο βασιλικός, η μέντα, το δενδρολίβανο, η ρίγανη και το θυμάρι. Τα φύλλα και οι βλαστοί καλύπτονται συνήθως με αδενώδεις τρίχες από τις οποίες εκκρίνονται αιθέρια έλαια.

Το γένος *Teucrium* είναι μεγάλο και πολυμορφικό. Περιλαμβάνει είδη φυτών που ευδοκιμούν σε όλες τις ηπείρους, ωστόσο η παραμεσόγειος περιοχή αντιπροσωπεύει το σημαντικότερο τομέα της διανομής του γένους, όπου και εμφανίζονται τα περισσότερα είδη (Navvaro & El Oualidi, 2000).

Το φυτό *T. polium* είναι ένας πολυετής θάμνος, με ύψος 20-50 εκατοστά. Το φύλλωμά του απελευθερώνει μια ευχάριστη αρωματική οσμή και τα λουλούδια είναι μικρά, σε συστάδες με χρώμα ροζ έως λευκό (Antunes et al., 2004).

Αυτοφύεται σε άγονα, πετρώδη μέρη και λόφους των μεσογειακών χωρών, της νοτιοδυτικής Ασίας, Ευρώπης και βόρειας Αφρικής αλλά εμφανίζεται μέχρι και σε υψόμετρο 2100 μέτρα (Bahramikia & Yazdanparast, 2011). Είναι ένα φρυγανικό είδος (ξηρόφυτο), καλά προσαρμοσμένο στις συνθήκες καταπόνησης που χαρακτηρίζουν το μεσογειακό κλίμα.

Το λατινικό όνομα του γένους *Teucrium* προέρχεται από τον Τεύκρο, βασιλιά της Τροίας, ο οποίος λέγεται ότι ήταν ο πρώτος που το χρησιμοποίησε σαν θεραπευτικό. Το είδος *T. polium*, παίρνει το όνομά του από το χρώμα του, λόγω των λευκών τριχιδίων ή τα λευκά του άνθη που φύονται επάκρια.

Συναντάται με πολλές κοινές ονομασίες όπως: Τεύκριον το πολιόν, Πολιό, Ασπρόχορτο, Στομαχοβότανο, Λαγοκοιμιθιά, Πολιόν του βουνού, Αγαποβότανο, Παναγιόχορτο, Σπληνοβότανο, Αντωνιάδα, της Κυράς το χόρτο, Λιβανόχορτο.

### 1.4.3 Χρήσεις

Παραδοσιακά, στις μεσογειακές χώρες, έχει χρησιμοποιηθεί για διάφορους τύπους παθολογικών καταστάσεων, όπως διαταραχές του πεπτικού συστήματος, φλεγμονές, διαβήτη και ρευματισμούς (Abdollahi et al., 2003). Επίσης, χρησιμοποιείται ως αντιβακτηριακό, υποτασικό, αντιπυρετικό και κατά του έλκους και των σπασμών (Bahramikia & Yazdanparast, 2011). Θεωρείται, τέλος, άριστο τονωτικό (Simson, 2003).

Οι αρχαίοι Έλληνες εκτιμούσαν πολύ τις ευεργετικές θεραπευτικές ιδιότητες του μικρού αυτού αρωματικού βοτάνου και πίστευαν ότι γιατρεύει τα πάντα, ήταν κάτι σαν πανάκεια. Στο φυτολογικό λεξικό του Θεόφραστου (1998), γίνεται μία λεπτομερής περιγραφή του φυτού και αναφέρεται ότι στην λαϊκή θεραπευτική χρησιμοποιείται για παθήσεις της αναπνευστικής οδού και για δερματικά προβλήματα.

Το *T. polium* έχει δείχθει πως διαθέτει αντιφλεγμονώδεις, αντιβακτηριακές, αντιμυκητιακές, αντι-υπερτασικές, υπολιπιδαιμικές, αντιρευματοειδείς και υπογλυκαιμικές επιδράσεις (Bahramikia & Yazdanparast, 2011). Έχουν ερευνηθεί και οι κυτταροτοξικές, αντικαρκινικές και αντιμεταλλαξιογόνες επιδράσεις των υδατικών και αιθανολικών εκχυλισμάτων του σε διάφορες κυτταρικές σειρές (Bahramikia & Yazdanparast, 2011). Ωστόσο, υπάρχουν πολλές κλινικές αναφορές, συμπεριλαμβανομένων εργασιών από Έλληνες συγγραφείς, που αφορούν την ηπατοτοξικότητα του εκχυλίσματος του *T. polium* (Polymeros et al., 2002; Mazokorakis et al., 2004; Starakis et al., 2006; Savvidou et al., 2007).

#### **1.4.4 Χημεία**

Τα φαρμακευτικά φυτά είναι σημαντικές πηγές νέων χημικών ενώσεων με πιθανές θεραπευτικές δράσεις.

Μέχρι τώρα, πάνω από 134 βιοδραστικές ενώσεις με ευρείες δομικές και χημικές διαφοροποιήσεις έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί από τα εναέρια μέρη, τις ρίζες και τους σπόρους υποειδών του *T. polium*. Αυτά περιέχουν διάφορες κλάσεις ενώσεων, όπως neoclerodane διτερπένια (Bruno et al., 2003), iridoids (Elmasri et al., 2014a), σεσκιτερπένια (Elmasri et al., 2014b), φλαβονοειδή (Sharififar et al., 2009) και στεροειδή (Bahramikia & Yazdanparast, 2011).

Η σύνθεση του αιθέριου ελαίου του έχει συνοψιστεί από τους Cozzani και συνεργάτες (2005) και περιέχει τις ενώσεις carvacrol και caryophyllene (Menichini et al., 2009; De Martino et al., 2010). Φλαβονοειδή όπως τα apigenin, luteolin, rutin, cirsiolol, cirsimaritin, salvigenin και eupatorin βρίσκονται στις ρίζες, εναέρια μέρη και ταξιανθίες του φυτού (Sharififar et al., 2009).

## 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός ενδοφυτικών μικροοργανισμών από το αρωματικό φυτό *Teucrium polium*. Τα αρωματικά φυτά φαίνεται να φιλοξενούν ενδόφυτα με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, λόγω του πλούσιου δευτερογενούς μεταβολισμού τους. Επίσης, το συγκεκριμένο φυτό δεν είναι ιδιαίτερα μελετημένο προς τη συγκεκριμένη κατεύθυνση.

Ο χαρακτηρισμός των ενδοφυτικών μικροοργανισμών θα περιλαμβάνει τη μοριακή ταυτοποίηση τους σε επίπεδο γένους με τη χρήση των τμημάτων 16S και ITS rRNA για τα βακτήρια και τους μύκητες, αντίστοιχα. Ακόμη, τα ενδόφυτα θα χαρακτηριστούν ως προς την ικανότητα προαγωγής της ανάπτυξης των φυτών μέσω της *in vitro* παρεμπόδισης της ανάπτυξης των οικονομικά σημαντικών φυτοπαθογόνων μυκήτων *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* fsp *raphani* και *Botrytis cinerea*. Τα ενδοφυτικά βακτήρια θα ελεγχθούν, επίσης, για την ικανότητα ομαδικής κίνησης, αλλά και την παραγωγή σιδηροφόρων και τη διαλυτοποίηση ιζηματοποιημένου φώσφορου *in vitro*, επίσης χαρακτηριστικά που βοηθούν την προαγωγή της ανάπτυξης των φυτών.

Ένα άλλο κομμάτι του χαρακτηρισμού των ενδοφυτικών μυκήτων είναι η *in vitro* αλληλεπίδραση των ενδοφυτικών μυκήτων κάθε ιστού μεταξύ τους σε ζευγάρια, ώστε να διερευνηθεί το είδος των σχέσεων μεταξύ ενδόφυτων σε ένα ασυμπτωματικό φυτό.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 Φυτικό υλικό

Το ασυμπτωματικό φυτό *Teucrium polium* παραλήφθηκε από τον αγρό του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στα Σπάτα το μήνα Δεκέμβριο (Εικ. 3.1). Με προσοχή συλλέχθηκε ολόκληρο, μαζί με το ριζικό του σύστημα. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε μέσα σε πλαστική σακούλα μίας χρήσης και μεταφέρθηκε στο εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Εκεί, φυλάχθηκε στους 4°C για 24 ώρες.



Εικόνα 3.1 Το φυτό *Teucrium polium* στον αγρό του ΓΠΑ (Σπάτα).

Ακολούθησε η προσεκτική αποκοπή των φύλλων και του ριζικού συστήματος από το σώμα του φυτού με τη βοήθεια αποστειρωμένου ξυραφιού. Ζυγίστηκαν 250 gr από τον κάθε ιστό για την απομόνωση βακτηρίων (500 gr ιστού συνολικά) και άλλα τόσα ξεχωριστά για την απομόνωση μυκήτων. Ακολούθησε διεξοδικό ξέπλυμα τους, αρχικά σε τρεχούμενο νερό βρύσης και αργότερα σε απιονισμένο νερό (dH<sub>2</sub>O) για την απομάκρυνση του χόματος και άλλων επικαθούμενων σωματιδίων. Τα τμήματα του φυτού (φύλλα και ριζικό σύστημα) θεωρήθηκαν καθαρά, όταν κατά τη βύθιση τους σε ξεχωριστά δοχεία με απιονισμένο νερό, αυτό παρέμενε διαυγές.

### **3.2 Διαδικασία επιφανειακής απολύμανσης**

Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο των Kusari και συνεργατών (2012).

Οι καθαρισμένοι πλέον φυτικοί ιστοί, ακέραια φύλλα και ρίζα, τοποθετήθηκαν σε ξεχωριστά δοχεία falcon με 70% αιθανόλη για 1 λεπτό και έγινε καλή ανακίνηση. Η παραπέρα διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο νηματικής ροής για προστασία των δειγμάτων από επιμολύνσεις. Ακολούθησε η βύθιση τους σε δοχεία falcon με 5% χλωρίνη και 0.1% Tween 20 για 3 λεπτά με καλή ανακίνηση. Η διαδικασία απολύμανσης συνεχίστηκε με την τοποθέτηση των τμημάτων σε δοχεία falcon που περιείχαν 70% αιθανόλη για 30 δευτερόλεπτα με καλή ανακίνηση. Τέλος, τα τμήματα ξεπλύθηκαν διεξοδικά σε δοχεία falcons με αποστειρωμένο διπλά απεσταγμένο νερό (ddH<sub>2</sub>O) ώστε να απομακρυνθούν τα αποστειρωτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν. Από το τελευταίο ξέπλυμα κρατήθηκε δείγμα σε δοχείο erpendorf. Τα τμήματα του φυτού απλώθηκαν σε αποστειρωμένο απορροφητικό χαρτί μέχρι να στεγνώσουν τελείως ώστε να πραγματοποιηθεί η απομόνωση.

### **3.3 Απομόνωση ενδοφυτικών μικροοργανισμών**

Η διαδικασία της απομόνωσης των ενδοφυτικών μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκε στο θάλαμο νηματικής ροής.

#### **3.3.1 Βακτήρια**

Αρχικά, κάποια τμήματα από κάθε ιστό κρατήθηκαν ακέραια για να χρησιμοποιηθούν ως μάρτυρες. Τα υπόλοιπα τμήματα κάθε ιστού ξεχωριστά, τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένο γουδί και πολτοποιήθηκαν με γουδοχέρι με την προσθήκη συνολικής ποσότητας 2 ml αποστειρωμένου διπλά απεσταγμένου νερού (ddH<sub>2</sub>O). Στη συνέχεια, ποσότητα 100 μl της φυτικής πάστας επιστρώθηκε σε τρυβλία Petri 9 cm με 25 ml στερεό θρεπτικό μέσο Nutrient Agar (NA) (Nutrient Broth + 1.5% Agar). Το μέγεθος του τρυβλίου και η ποσότητα του θρεπτικού μέσα σε αυτό είναι τα ίδια σε όλες τις παρακάτω πειραματικές διαδικασίες. Το θρεπτικό μέσο περιείχε αντιβιοτικό κυκλοεξαμίδιο (τελική συγκέντρωση 100 μg/ml) για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης μυκήτων. Επίσης, επιστρώθηκε ίδια ποσότητα δείγματος διπλά απιονισμένου νερού από το τελευταίο

ξέπλυμα σε 3 τρυβλία Petri με την ίδια σύσταση θρεπτικού μέσου ώστε να επιβεβαιωθεί πως έγινε επιφανειακή αποστείρωση. Άλλος ένας μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε ήταν η αποτύπωση ακέραιου τμήματος ιστού σε στερεό θρεπτικό μέσο ίδιας σύστασης. Τα τρυβλία σφραγίστηκαν με parafilm και επώαστηκαν στους 30 °C.

### **3.3.2 Μύκητες**

Αρχικά, κάποια τμήματα από κάθε ιστό κρατήθηκαν ακέραια για να χρησιμοποιηθούν ως μάρτυρες. Τα υπόλοιπα τμήματα κάθε ιστού ξεχωριστά κόπηκαν σε τμήματα με τη βοήθεια αποστειρωμένου ξυραφιού. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν 2-5 κομμάτια με απόσταση μεταξύ τους σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό μέσο Potato Dextrose Agar (PDA) (18 g/l PDA) και αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη (τελική συγκέντρωση 50 µg/ml) για την παρεμπόδιση ανάπτυξης βακτηρίων. Τα κομμάτια τοποθετήθηκαν έτσι ώστε να βυθίζονται ελάχιστα στο θρεπτικό μέσο. Επίσης, επιστρώθηκε ποσότητα 100 µl διπλά απεσταγμένου νερού από το τελευταίο ξέπλυμα σε 3 τρυβλία Petri με την ίδια σύσταση θρεπτικού μέσου ώστε να επιβεβαιωθεί πως έγινε επιφανειακή αποστείρωση. Ένας επιπλέον μάρτυρας ήταν η αποτύπωση ακέραιων τμημάτων ιστών σε τρυβλία Petri με την ίδια σύσταση θρεπτικού μέσου. Τα τρυβλία σφραγίστηκαν με parafilm και επώαστηκαν στους 25 °C στο σκοτάδι.

## **3.4 Επιλογή ενδοφυτικών μικροοργανισμών**

### **3.4.1 Βακτήρια**

Γινόταν καθημερινός έλεγχος της ανάπτυξης των βακτηριακών αποικιών έως ότου αυτές εμφανιστούν διακριτά. Την τρίτη μέρα επώασης, επιλέχθηκαν περίπου 50 αποικίες από τον κάθε ιστό, με ιδιαίτερη προσοχή ώστε να επιλεγθούν όλες οι διαφορετικές μορφολογικά αποικίες. Οι επιλεγμένες αποικίες εμβολιάστηκαν ασηπτικά σε τρυβλία Petri που περιείχαν στερεό θρεπτικό μέσο NA με τη μέθοδο streaking και έγινε επώαση στους 30 °C για 18-20 ώρες. Ακολούθησε η ασηπτική μεταφορά τους σε υγρό θρεπτικό μέσο NB και η καλλιέργεια τους σε ανακινούμενο επωαστήρα στις ίδιες συνθήκες με προηγουμένως. Την επόμενη μέρα, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις. Επιστρώθηκε ποσότητα 100 µl από την τελευταία αραιώση σε στερεό θρεπτικό μέσο NA και μετά το τέλος της επώασης, επιλέχθηκε μοναδιαία αποικία. Η αποικία ανακαλλιιεργήθηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο NB στις ίδιες συνθήκες και προστέθηκε σε 20% (v/v)

γλυκερόλη για μακρά αποθήκευση της στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Η διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων επαναλήφθηκε 3 φορές από την αποθηκευμένη καλλιέργεια για επιβεβαίωση. Η βακτηριακή καλλιέργεια διατηρήθηκε, επίσης, σε ενεργή μορφή με την επιστροφή της σε στερό θρεπτικό μέσο NA με τη μέθοδο streaking και τη φύλαξη της, μετά την επώαση, στους  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Όσον αφορά τους μάρτυρες, δεν παρατηρήθηκε βακτηριακή ανάπτυξη μετά το πέρας 10 ημερών, οπότε τα βακτήρια που απομονώθηκαν θα ορίζονται στο εξής ως ενδοφυτικά.

Κατά την αποθήκευση της βακτηριακής καλλιέργειας στη γλυκερόλη της δόθηκε ένα κωδικό όνομα. Το όνομα προκύπτει από το όνομα των βακτηρίων (**Bacteria**), το γένος του φυτού (*Teucrium*) και τον ιστό από όπου απομονώθηκε (**leaves** ή **root**).

### 3.4.2 Μύκητες

Γινόταν καθημερινή παρατήρηση των τρυβλίων για να διαπιστωθεί πως οι μύκητες εξέρχονται μέσα από τα κομμάτια των ιστών. Μετά από δύο εβδομάδες επώασης οι μυκηλιακές υφές από κάθε κομμάτι ήταν ορατές. Έτσι, μεταφέρθηκαν ασηπτικά μικρά κομμάτια άγαρ με υφές σε καινούργια τρυβλία Petri με στερό θρεπτικό μέσο PDA, ώστε να καλλιεργηθούν ξεχωριστά. Η επώαση έγινε στους  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  στο σκοτάδι μέχρι να καλυφθεί όλο το τρυβλίο από τις υφές του μύκητα. Οι καθαρές καλλιέργειες κατηγοριοποιήθηκαν σε μορφότυπους, με βάση το ρυθμό ανάπτυξης, το χρώμα (μπροστινό και πίσω μέρος τρυβλίου Petri) και το φαινότυπο του υφών. Η μορφολογία της αποικίας του μύκητα άλλαζε με την πάροδο του χρόνου, οπότε έγινε παρακολούθηση των μυκήτων για αρκετές εβδομάδες ώστε να βγει ένα ασφαλές συμπέρασμα για τους μορφότυπους.

Σε κάποιες περιπτώσεις ήταν εμφανές πως η καλλιέργεια περιείχε 2 ή και περισσότερους μορφότυπους μυκήτων και έγινε προσπάθεια διαχωρισμού. Μετά το διαχωρισμό, πραγματοποιήθηκαν περίπου 5 ανακαλλιέργειες κάθε μύκητα στις ίδιες συνθήκες ώστε να είναι σίγουρο πως πρόκειται για αξενική καλλιέργεια. Στο τέλος, οι μύκητες κατηγοριοποιήθηκαν σε μορφότυπους και επιλέχθηκε ένας αντιπρόσωπος κάθε μορφότυπου για τις περαιτέρω αναλύσεις. Κάποιες περιπτώσεις μυκήτων όπου υπήρχε αμφιβολία ως προς το μορφότυπο στον οποίο ανήκουν εντάχθηκαν ως νέες κατηγορίες.

Όσον αφορά τους μάρτυρες, δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη μυκηλιακών υφών μετά το πέρας 30 ημερών, οπότε οι μύκητες που απομονώθηκαν θα ορίζονται στο εξής ως ενδοφυτικοί.

Στους αντιπρόσωπους κάθε μορφότυπου, δόθηκε ένα κωδικό όνομα. Τα κωδικά ονόματα προκύπτουν από το όνομα των μυκήτων (**Fungi**), το γένος του φυτού (***Teucrium***) και το μέρος του φυτού από το οποίο προέρχονται (**leaves** ή **root**). Οι μύκητες διατηρούνται σε τρυβλία Petri με στερεό θρεπτικό μέσο PDA και αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη (50 µg/ml) στους 4 °C.

### 3.5 Οπτική μικροσκοπία

Χρησιμοποιήθηκε οπτικό μικροσκόπιο για τη μελέτη της κυτταρικής δομής των ενδοφυτικών βακτηρίων και των σπορίων των ενδοφυτικών μυκήτων.

#### 3.5.1 Βακτήρια

Πραγματοποιήθηκε η μέθοδος χρώσης κατά Gram, η οποία πήρε το όνομα της από τον Hans Christian Joachim Gram που τη δημιούργησε. Η συγκεκριμένη μέθοδος κατατάσσει τα βακτήρια σε δύο μεγάλες ομάδες, τα θετικά και τα αρνητικά κατά Gram. Ο διαχωρισμός οφείλεται σε διαφορές του κυτταρικού τοιχώματος των δύο αυτών ομάδων. Τα βακτήρια θετικά κατά Gram έχουν παχύ κυτταρικό τοίχωμα που περιέχει κυρίως το μόριο πεπτιδογλυκάνη (Madigan et al., 2009). Στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια το τοίχωμα είναι λεπτό και αποτελείται κυρίως από την εξωτερική μεμβράνη λιποπολυσακχαριτών (Madigan et al., 2009). Βακτήρια που ανήκουν στην ομάδα των *Firmicutes*, όπως το γένος *Bacillus* είναι θετικά κατά Gram ενώ βακτήρια της ομάδας των Πρωτεοβακτηρίων, όπως το γένος *Pseudomonas* είναι αρνητικά κατά Gram.

Το πρωτόκολλο της χρώσης που χρησιμοποιήθηκε είναι σύμφωνο με των Smith και Hussey (2005).

Αρχικά, εμβολιάστηκε ασηπτικά ποσότητα της αποθηκευμένης στους -80 °C καλλιέργειας ή μοναδιαία αποικία από τα τρυβλία με streaking σε αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό υλικό NB. Μετά την επώαση στους 30 °C για 18-20 ώρες σε ανακινούμενο επωαστή, τοποθετήθηκαν ασηπτικά 5 µl στο κέντρο αντικειμενοφόρου πλάκας. Αφού η ποσότητα στέγνωσε, σταθεροποιήθηκε πάνω στην πλάκα με ελαφριά θέρμανση.

Αφού κρύωσε η πλάκα, προστέθηκε πάνω σε αυτήν η χρωστική κρυσταλλικό ιώδες (crystal violet) και αφέθηκε για 1 λεπτό. Αυτή η χρωστική βάφει τα κυτταρικά τοιχώματα μπλε. Ακολούθησε ξέπλυμα με απιονισμένο νερό (dH<sub>2</sub>O) και προσθήκη διαλύματος ιωδίου (Iugol), το

οποίο αφέθηκε για 1 λεπτό. Το διάλυμα ιωδίου δημιουργεί σύμπλοκο με το κρυσταλλικό ιώδες και βοηθά στη σταθεροποίηση της χρωστικής στο κυτταρικό τοίχωμα. Αφού πραγματοποιήθηκε ξέπλυμα με απιονισμένο νερό (dH<sub>2</sub>O), προστέθηκε αιθανόλη με συνεχή ροή για 10 δευτερόλεπτα. Η αιθανόλη διασπά τη λιπιδική μεμβράνη των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων και το κρυσταλλικό ιώδες διαχέεται στο μέσο, ενώ αφυδατώνει τα κυτταρικά τοιχώματα των θετικών κατά Gram βακτηρίων και η χρωστική δε διαφεύγει. Ακολούθησε ξέπλυμα με απιονισμένο νερό (dH<sub>2</sub>O) και προσθήκη χρωστικής σαφρανίνης για 1 λεπτό. Η σαφρανίνη βάφει τα αποχρωματισμένα αρνητικά κατά Gram βακτήρια κόκκινα. Τέλος, η πλάκα ξεπλύθηκε με απιονισμένο νερό και αφέθηκε να στεγνώσει. Το δείγμα παρατηρήθηκε μικροσκοπικά με τον ελαιοκαταδυτικό φακό 100x.

### 3.5.2 Μύκητες

Κομμάτι άγαρ με υφές του κάθε μύκητα εμβολιάστηκε ασηπτικά σε τρυβλίο Petri με στερεό θρεπτικό μέσο PDA. Όταν ο μύκητας κάλυψε το τρυβλίο λήφθηκε ασηπτικά μικρή ποσότητα υφών και τοποθετήθηκε σε σταγόνα απιονισμένου νερού πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Τέλος, τοποθετήθηκε καλυπτρίδα και το δείγμα παρατηρήθηκε μικροσκοπικά με το φακό 40x με έμφαση στα σπόρια.

## 3.6 Αλληλεπίδραση ενδοφυτικών μικροοργανισμών με φυτοπαθογόνους μύκητες

### 3.6.1 Προέλευση φυτοπαθογόνων μυκήτων

Οι φυτοπαθογόνοι μύκητες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* fsp *raphani* και *Botrytis cinerea*, οι οποίοι προέρχονται από τη συλλογή του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Αυτοί οι μύκητες επιλέχθηκαν καθώς αποτελούν σημαντικά φυτοπαθογόνα που προκαλούν μεγάλες οικονομικές απώλειες. Ο *R.solani* προκαλεί σηψιρριζίες σε πολλά φυτά, όπως σόγια, πατάτα, αγγούρι και ρύζι. Το παθογόνο αυτό εισέρχεται στη ρίζα μέσω φυσικών ανοιγμάτων αλλά και με τη χρήση ενζύμων και του απρεσορίου. Ο μύκητας *F.oxysporum* προκαλεί αδρομυκώσεις σε φυτά όπως η πατάτα, ντομάτα, πιπεριά, φασολιά, καπνός και βαμβάκι. Το συγκεκριμένο παθογόνο εισέρχεται στη ρίζα

και εδραιώνεται στα αγγεία του ξύλου, όπου παρεμποδίζει τη μεταφορά νερού και θρεπτικών. Το φυτοπαθογόνο *B.cinerea* είναι υπεύθυνο για την τεφρά σήψη λαχανικών και φρούτων, όπως μαρούλι, μπρόκολο, ρεβύθι, φράουλα και σταφύλι. Η καταπολέμηση τους, ειδικά του *F.oxysporum* που βρίσκεται στα αγγεία, είναι δύσκολη καθώς διαχειμιάζουν στο έδαφος. Χρησιμοποιούνται κυρίως καλλιεργητικές πρακτικές και ανθεκτικές ποικιλίες.

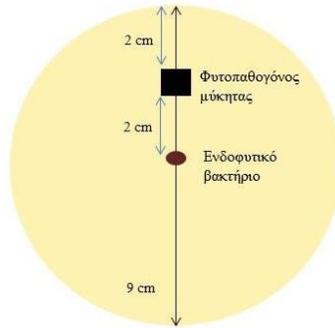
### 3.6.2 Βακτήρια

Η αλληλεπίδραση των απομονωμένων ενδοφυτικών βακτηρίων με τους φυτοπαθογόνους μύκητες πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της διπλής καλλιέργειας (dual culture). Σε αυτή τη μέθοδο το βακτήριο και ο μύκητας τοποθετούνται σε ορισμένη απόσταση μεταξύ τους σε ένα τρυβλίο Petri με στερεό θρεπτικό μέσο.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν αλληλεπιδράσεις όλων των ενδοφυτικών βακτηρίων με το φυτοπαθογόνο μύκητα *Rhizoctonia solani*. Τα βακτήρια που έδειξαν παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μύκητα κατηγοριοποιήθηκαν σε μοτίβα και επιλέχθηκαν οι ισχυρότεροι αντιπρόσωποι του καθενός, 25 βακτήρια συνολικά, τα οποία χαρακτηρίστηκαν περαιτέρω.

Τετράγωνο κομμάτι (6 mm x 6 mm) με υφές του φυτοπαθογόνου μύκητα από καλλιέργεια 7 ημερών σε στερεό θρεπτικό μέσο PDA τοποθετήθηκε 2 cm από την άκρη τρυβλίου Petri με στερεό θρεπτικό μέσο NA. Τα τρυβλία σφραγίστηκαν με παραφιλμ. Οι μύκητες *Rhizoctonia solani* και *Fusarium oxysporum* fsp *raphani* επώαστηκαν στους 25 °C στο σκοτάδι για 1 ημέρα πριν την τοποθέτηση του βακτηρίου, ενώ ο μύκητας *Botrytis cinerea* για 2 ημέρες, λόγω της πιο αργής ανάπτυξής του. Στη συνέχεια, ποσότητα 4 μl υγρής καλλιέργειας βακτηρίου τοποθετήθηκε υπό μορφή κηλίδας (spot) σε απόσταση 2 cm από τον εκάστοτε μύκητα. Παρακάτω φαίνεται σχηματικά ο πειραματικός σχεδιασμός (Σχεδιάγραμμα 3.1). Υπήρχαν 3 μάρτυρες για κάθε φυτοπαθογόνο μύκητα, όπου τοποθετήθηκε μια κηλίδα με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό (dH<sub>2</sub>O). Τα τρυβλία σφραγίστηκαν με παραφιλμ και επώαστηκαν στους 25 °C στο σκοτάδι για 12 ημέρες. Πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις για κάθε ενδοφυτικό βακτήριο. Όλες οι διαδικασίες εμβολιασμού σε θρεπτικό υλικό έγιναν υπό ασηπτικές συνθήκες.

Η πορεία της αλληλεπίδρασης ελεγχόταν καθημερινά και λαμβάνονταν φωτογραφίες ανά 3 ημέρες. Από τις 9 μέχρι τις 12 μέρες δεν υπήρχε αλλαγή του φαινοτύπου άρα κρατήθηκαν οι φωτογραφίες των 9 ημερών. Με βάση τις τελικές παρατηρήσεις, οι αλληλεπιδράσεις κατηγοριοποιήθηκαν σε τύπους, με συμβουλή δύο επιπλέον συναδέλφων, και έγινε εκτίμηση της ικανότητας βιολογικού ελέγχου των απομονωμένων ενδοφυτικών βακτηρίων.



**Σχεδιάγραμμα 3.1 Σχηματική αναπαράσταση των αποστάσεων του φυτοπαθογόνου μύκητα και του ενδοφυτικού βακτηρίου κατά τη διπλή καλλιέργειά τους (dual culture) σε ένα τρυβλίο Petri με θρεπτικό μέσο NA (1.5 % άγαρ).**

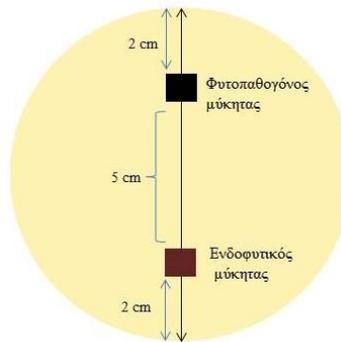
### 3.6.3 Μύκητες

Η αλληλεπίδραση των απομονωμένων ενδοφυτικών μυκήτων με τους φυτοπαθογόνους μύκητες πραγματοποιήθηκε, επίσης, με τη μέθοδο της διπλής καλλιέργειας (dual culture).

Αρχικά, τετράγωνο κομμάτι (6 mm x 6 mm) θρεπτικού μέσου με υφές του ενδοφυτικού μύκητα από καλλιέργεια 10 ημερών σε στερεό θρεπτικό μέσο PDA τοποθετήθηκε 2 cm από την άκρη τρυβλίου Petri με στερεό θρεπτικό μέσο PDA. Παράλληλα, ετοιμάστηκε μάρτυρας για τον κάθε ενδοφυτικό μύκητα, όπου δε θα τοποθετούνταν φυτοπαθογόνος μύκητας. Τα τρυβλία σφραγίστηκαν με παραφιλμ. Οι ενδοφυτικοί μύκητες επώαστηκαν στους 25 °C στο σκοτάδι για 2 ημέρες πριν την τοποθέτηση των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Fusarium oxysporum* fsp *raphani* και *Botrytis cinerea*, ενώ για 3 ημέρες πριν την τοποθέτηση του *Rhizoctonia solani*. Μετά το πέρας των ημερών τοποθετήθηκε τετράγωνο κομμάτι θρεπτικού μέσου (6 mm x 6 mm) του φυτοπαθογόνου μύκητα από καλλιέργεια 7 ημερών σε στερεό θρεπτικό μέσο PDA σε απόσταση 2 εκ. από την άλλη άκρη του τρυβλίου. Παρακάτω φαίνεται σχηματικά ο πειραματικός σχεδιασμός (Σχεδιάγραμμα 3.2). Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε η τοποθέτηση τετράγωνου κομματιού θρεπτικού μέσου με υφές του εκάστοτε παθογόνου σε στερεό θρεπτικό μέσο PDA χωρίς ενδοφυτικό μύκητα, για χρήση μάρτυρα. Τα τρυβλία σφραγίστηκαν με παραφιλμ και επώαστηκαν στους 25 °C στο σκοτάδι. Γενικά, πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις για κάθε ενδοφυτικό μύκητα. Όλες οι διαδικασίες εμβολιασμού σε θρεπτικό υλικό έγιναν υπό ασηπτικές συνθήκες.

Η πορεία της αλληλεπίδρασης των μυκήτων ελεγχόταν καθημερινά και φωτογραφιζόταν ανά 3 ημέρες για 12 ημέρες συνολικά. Η παρατήρηση συνεχίστηκε μέχρι και τις 20 ημέρες αλλά δεν

παρατηρήθηκε αλλαγή φαινοτύπου. Τέλος, οι αλληλεπιδράσεις κατηγοριοποιήθηκαν σε τύπους με συμβουλή δύο επιπλέον ατόμων-παρατηρητών.



Σχεδιάγραμμα 3.2 Σχηματική αναπαράσταση των αποστάσεων του φυτοπαθογόνου και του ενδοφυτικού μύκητα κατά τη διπλή καλλιέργειά τους (dual culture) σε τρυβλίο Petri με θρεπτικό μέσο PDA (1.5 % άγαρ).

### 3.7 Απομόνωση ολικού γονιδιωματικού υλικού (DNA)

#### 3.7.1 Βακτήρια

Για την απομόνωση ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο, όπως ορίζεται από την εταιρεία Macherey-Nagel (Nucleospin<sup>®</sup> Microbial DNA).

Παρακάτω περιγράφεται η απομόνωση ολικού DNA από ένα απομονωμένο βακτήριο. Αρχικά, ολονύχτια καλλιέργεια βακτηρίου φυγοκεντρήθηκε στις 7000 rpm για 10 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο αφορά ίζημα κυττάρων (pellet) έως 40 μg οπότε η ποσότητα που φυγοκεντρείται προσαρμόζεται ανάλογα με την ανάπτυξη της εκάστοτε καλλιέργειας.

Αφού αποκτήθηκε η επιθυμητή ποσότητα κυττάρων, αυτά επαναδιαλύθηκαν σε 100 μl διαλύματος έκλουσης (BE) το οποίο περιέχει διάλυμα 5 mM Tris-HCl pH 8.5. Το εναίωρημα των κυττάρων μεταφέρθηκε στο σωλήνα Τύπου B με σφαιρίδια (Nucleospin<sup>®</sup> Bead Tube Type B), ο οποίος είναι κατάλληλος για βακτήρια. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 40 μl διαλύματος λύσης MG (χατροπικό άλας) και 100 μl διαλύματος Πρωτεΐνάσης K για αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Το δείγμα ανακινήθηκε ισχυρά με τη βοήθεια του μηχανήματος vortex με συχνότητα 30 Hertz για να διασπαστούν τα κυτταρικά τοιχώματα. Ο χρόνος ανακίνησης ήταν 6 και 9 λεπτά για αρνητικά

κατά Gram και θετικά κατά Gram βακτήρια, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, ο σωλήνας φυγοκεντρήθηκε στις 11000 rpm για 30 δευτερόλεπτα για να καθαριστεί το καπάκι από τον αφρό που δημιουργήθηκε. Ακολούθησε προσθήκη 600 μl ρυθμιστικού διαλύματος MG και καλή ανακίνηση ώστε να αποδιαταχθούν όλες οι πρωτεΐνες και να δημιουργηθούν κατάλληλες συνθήκες για την πρόσδεση του DNA στη μεμβράνη. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 30 δευτερόλεπτα ώστε να καθιζάνουν τα σφαιρίδια και τα συστατικά των κυττάρων. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε στην κολώνα (Nucleospin<sup>®</sup> Microbial DNA Column) που είχε τοποθετηθεί μέσα σε δοχείο συλλογής. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 30 δευτερόλεπτα ώστε να περάσει το διάλυμα μέσα από την κολώνα και το DNA να προσδεθεί πάνω στο οξείδιο του πυριτίου (SiO<sub>2</sub>) της μεμβράνης. Το δοχείο συλλογής απορρίφθηκε και τοποθετήθηκε καινούργιο. Στη συνέχεια, προστέθηκε διάλυμα BW (χαοτροπικό άλας και ισοπροπανόλη) στην κολώνα, η οποία φυγοκεντρήθηκε στις 11000 rpm για 30 δευτερόλεπτα και το διάλυμα που πέρασε στο δοχείο συλλογής απορρίφθηκε. Έγινε προσθήκη 500 μl διαλύματος B5, φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 30 δευτερόλεπτα και απόρριψη του διαλύματος του δοχείου συλλογής. Τα δύο τελευταία βήματα πραγματοποιήθηκαν ώστε να διαλυτοποιηθούν όλα τα υπόλοιπα μόρια (κυττάρων και διαλυτών) εκτός του DNA που πιθανώς υπάρχουν πάνω στη μεμβράνη. Στη συνέχεια, η κολώνα φυγοκεντρήθηκε 11000 rpm για 30 δευτερόλεπτα ώστε να απομακρυνθεί όλο το διάλυμα πλύσης. Η κολώνα τοποθετήθηκε σε ένα αποστειρωμένο δοχείο erpendorf και προστέθηκαν 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης BE. Έγινε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 30 δευτερόλεπτα για να γίνει έκλυση του DNA. Το ρυθμιστικό διάλυμα BE βοηθά στην αποδέσμευση του DNA από τη μεμβράνη και την άριστη διατήρηση του.

Τέλος, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση και καθαρότητα του απομονωμένου DNA (βλ. Κεφ. 3.8)

### 3.7.2 Μύκητες

Για την απομόνωση DNA μυκήτων τροποποιήθηκε το πρωτόκολλο των Izumitsu και συνεργατών (2012) και των Dörnte και Kües (2013).

Το παρακάτω πρωτόκολλο στηρίζεται στην εύκολη και γρήγορη απομόνωση DNA μέσω της μηχανικής διάρρηξης και θερμόλυσης του κυτταρικού τοιχώματος.

Κάθε μύκητας ανακαλλιεργήθηκε σε τρυβλίο Petri με στερεό θρεπτικό μέσο PDA και αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη (50 μg/ml) μέχρι την πλήρη κάλυψη του τρυβλίου με μυκηλιακές

υφές. Με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας παραλήφθηκε ασηπτικά μικρό τμήμα υφών (1-5 mg) με μεγάλη προσοχή ώστε να μην παραληφθεί και θρεπτικό μέσο. Το τμήμα αυτό μεταφέρθηκε ασηπτικά σε δοχείο erpendorf που περιείχε 150 μl αποστειρωμένο διπλά απεσταγμένο νερό (ddH<sub>2</sub>O). Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε σε ξηρό υδατόλουτρο (heatblock) ρυθμισμένο στους 70 °C. Ακολούθησε η ανάδευση του στο μηχανήμα vortex για 1 λεπτό. Έγινε επανάληψη των δύο τελευταίων βημάτων. Το δοχείο erpendorf μεταφέρθηκε στους -80 °C για 5 λεπτά και γρήγορα στο ξηρό υδατόλουτρο στους 70 °C για 1 λεπτό και μετά ανακινήθηκε με τη βοήθεια του vortex για 30 δευτερόλεπτα. Ακολούθως, φυγοκεντρήθηκε στις 11000 στροφές για 15 λεπτά ώστε να καθιζάνουν τα κυτταρικά συστατικά. Ποσότητα 80 μl από το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει το DNA του μύκητα, μεταφέρθηκε προσεκτικά σε καινούργιο αποστειρωμένο δοχείο erpendorf . Τέλος, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της συγκέντρωσης και καθαρότητας του (βλ. Κεφ. 3.8).

### **3.8 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων (DNA)**

Η συγκέντρωση και η καθαρότητα των νουκλεϊνικών οξέων σε διάλυμα προσδιορίζονται φωτομετρικά με τη χρήση UV φασματοφωτόμετρου nanodrop (Nano Drop® ND-1000 Spectrophotometer).

Τα νουκλεϊκά οξέα απορροφούν υπεριώδες φως λόγω των ετεροκυκλικών δακτυλίων των νουκλεοτιδίων με μέγιστη σε μήκος κύματος 260 nm.

Αρχικά, επιλέχθηκε η ένδειξη DNA στο λογισμικό της συσκευής. Στη συνέχεια, μηδενίστηκε το όργανο με ποσότητα δείγματος 2 μl από τον εκάστοτε διαλύτη έκλυσης του δείγματος και αφού καθαρίστηκε η υποδοχή, τοποθετήθηκε ποσότητα δείγματος 2 μl. Επιλέχθηκε η ένδειξη της φωτομέτρησης και ακολούθησε η καταγραφή της συγκέντρωσης και των λόγων OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> (απορρόφηση DNA/ απορρόφηση πρωτεϊνών) και OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub>.

Ένα δείγμα DNA θεωρείται ικανοποιητικά καθαρό όταν ο λόγος OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> είναι περίπου 1.8. Μικρότερες τιμές αποτελούν ένδειξη προσμείξεων από την παρουσία πρωτεϊνών ,φαινόλης ,RNA ή άλλων ουσιών που απορροφούν στα 280 nm. Ο λόγος OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> ενός δείγματος υψηλής καθαρότητας κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 1.8 και 2.2. Μικρότερες τιμές αποτελούν

ένδειξη προσμείξεων από οργανικούς διαλύτες, όπως η ουρία και το EDTA και χαοτροπικά άλατα, όπως το GuHCl, ή άλλων ουσιών που απορροφούν στα 230 nm.

### 3.9 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR)

Είναι μια *in vitro* μέθοδος για την ενζυμική σύνθεση συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA. Σχεδιάζονται δύο εκκινητές με βάση τη μήτρα DNA έτσι ώστε να υβριδίζουν εκατέρωθεν του επιθυμητού σημείου αντιγραφής. Αυτοί οι εκκινητές παρέχουν την 3'-OH ομάδα που χρειάζεται το ένζυμο DNA πολυμεράση για να δράσει.

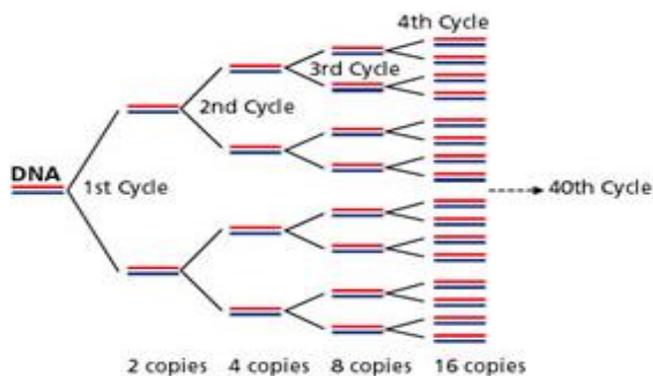
Ένας κύκλος PCR περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

A) Στάδιο αποδιάταξης όπου η δίκλωνη μήτρα αποδιατάσσεται καθώς σπάνε οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των βάσεων των δύο αλυσίδων λόγω αυξημένης θερμοκρασίας.

B) Στάδιο υβριδισμού των εκκινητών όπου οι εκκινητές υβριδίζουν στις αλυσίδες λόγω σχηματισμού δεσμών υδρογόνου μεταξύ συμπληρωματικών βάσεων. Η θερμοκρασία που χρησιμοποιείται είναι ανάλογη της θερμοκρασίας τήξεως  $T_m$  (+/- 5 °C) η οποία υπολογίζεται συναρτήσει του μήκους τους σε νουκλεοτίδια και του περιεχομένου σε GC.

Γ) Στάδιο επέκτασης εκκινητών όπου δρα η DNA πολυμεράση και συμβαίνει η αντιγραφή της μήτρας DNA στα σημεία που υβρίδισαν οι εκκινητές.

Η επαναλαμβανόμενη εκτέλεση του κύκλου έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση αντιγράφων της περιοχής στόχου της μήτρας DNA κατά εκθετικό ρυθμό αφού τα προϊόντα της ενός κύκλου αντιγραφής μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μήτρα για τον επόμενο (Εικ. 3.2).



Εικόνα 3.2. Η πορεία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιείται στο θερμικό κυκλοποιητή όπου προσαρμόζονται οι θερμοκρασίες, οι χρόνοι κάθε σταδίου και ο αριθμός των κύκλων ενίσχυσης. Οι ακριβείς συνθήκες πραγματοποίησης της αντίδρασης PCR προσαρμόζονται κάθε φορά στις απαιτήσεις του συγκεκριμένου πειράματος. Για παράδειγμα ο χρόνος της επιμήκυνσης πρέπει να είναι 1 λεπτό/1 kb επιθυμητού προϊόντος DNA.

### 3.9.1 Βακτήρια-Ενίσχυση του τμήματος 16S rRNA

Το 16S rRNA αποτελεί δομικό κομμάτι της μικρής υπομονάδας (30S) του ριβοσώματος, μαζί με ριβονουκλεοπρωτεΐνες (Madigan et al., 2009).

Το γονίδιο 16S rRNA αποτελεί το πιο αποδεκτό και ευρέως χρησιμοποιούμενο γονίδιο για την βακτηριακή ταξινόμηση (Janda & Abbott, 2007). Οι πιο σημαντικοί λόγοι είναι η παρουσία του σε όλα τα βακτήρια, συχνά ως πολλαπλά γονίδια ή οπερόνια και πως περιέχει τόσο συντηρημένες εξελικτικά όσο και διαφοροποιημένες περιοχές. Επιπροσθέτως, λόγω της μεγάλης χρήσης αυτών των γονιδίων ως ταξινομικούς μάρτυρες, υπάρχει πληθώρα διαθέσιμων αλληλουχιών σε βάσεις δεδομένων.

Για να ενισχυθεί το 16S rRNA γονίδιο χρησιμοποιήθηκαν οι εκφυλισμένοι εκκινητές ευθείας κατεύθυνσης (Forward) 5'-AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG-3' και αντίστροφης κατεύθυνσης (Reverse) 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT -3' (Weisburg et al., 1991). Το μέγεθος του προϊόντος της αντίδρασης PCR με τους συγκεκριμένους εκκινητές υπολογίζεται στα 1450 ζεύγη βάσεων.

Η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε με το kit HotStart Taq DNA Polymerase της εταιρείας Applied Biological Materials Inc. (abm®). Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν από κάθε συστατικό αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα (Πιν. 3.1).

**Πίνακας 3.1 Ποσότητες συστατικών αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).**

Εκκινητής ευθείας κατεύθυνσης (forward) (30 μM)	1 μl
Εκκινητής αντίστροφης κατεύθυνσης (reverse) (30 μM)	1 μl
DNA μήτρα	50-100 ng
Μίγμα τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs) (10mM το καθένα)	1 μl
10x ρυθμιστικό διάλυμα	5 μl
DNA πολυμεράση (5U/μl)	0,5 μl
ddH <sub>2</sub> O	Έως 50 μl

Για κάθε ομάδα δειγμάτων υπήρχαν πάντα και δύο αντιδράσεις μάρτυρες, οι οποίες δεν περιείχαν DNA, ώστε να επιβεβαιωθεί πως η ύπαρξη προϊόντος δεν είναι αποτέλεσμα επιμόλυνσης.

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε στο θερμικό κυκλοποιητή ήταν αρχική αποδιάταξη του DNA για 10 λεπτά στους 94 °C και 35 κύκλοι με τα διαδοχικά βήματα της αποδιάταξης για 30 δευτερόλεπτα στους 94 °C, υβριδισμού των εκκινητών στους 48 °C για 30 δευτερόλεπτα, επιμήκυνση της αλυσίδας DNA στους 72 °C για 30 δευτερόλεπτα. Μετά τους 35 κύκλους ακολούθησε η τελική επιμήκυνση των αλυσίδων στους 72 °C για 5 λεπτά. Μετά το τέλος της αντίδρασης, τα δείγματα φυλάχθηκαν στους 4 °C.

Ποσότητα 8 μl από την αντίδραση ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης (βλ. Κεφ. 3.10) και αφού πιστοποιήθηκε η ύπαρξη προϊόντος, η υπόλοιπη αντίδραση υπέστη καθαρισμό (βλ. Κεφ. 3.11).

### 3.9.2 Μύκητες-Ενίσχυση του τμήματος ITS rRNA

Η μεγάλη υπομονάδα του ριβοσώματος των μυκήτων (80S) αποτελείται από τα 28S, 5.8S και 5S rRNA, ενώ η μικρή από το 18S rRNA μαζί με ριβονουκλεοπρωτεΐνες (Madigan et al., 2009). Υπάρχουν δύο ενδομεταγραφόμενες περιοχές (internal transcribed spacer, ITS) στο γονίδιο των μυκήτων. Η μία, ITS1, είναι μεταξύ των 18S και 5.8S rDNA αλληλουχιών, ενώ η δεύτερη, ITS2, είναι μεταξύ των 5.8S και 28S rDNA αλληλουχιών. Αυτές οι δύο περιοχές μαζί με το γονίδιο 5.8S αναφέρονται γενικά ως ITS.

Μεταξύ των περιοχών των ριβοσωμικών γονιδίων, η περιοχή ITS έχει τη μεγαλύτερη πιθανότητα επιτυχούς ταυτοποίησης πληθώρας μυκήτων (Schoch et al., 2012).

Για να ενισχυθεί η ITS rDNA περιοχή χρησιμοποιήθηκαν οι εκφυλισμένοι εκκινητές ευθείας κατεύθυνσης (Forward) 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' και αντίστροφης κατεύθυνσης (Reverse) 5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (Dörnte & Kües, 2013). Το προϊόν της αντίδρασης περιλαμβάνει τις περιοχές ITS1, 5.8S και ITS2, ενώ το μέγεθος του ανέρχεται στα 600 ζεύγη βάσεων.

Η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε με το kit HotStart Taq DNA Polymerase της εταιρείας Applied Biological Materials Inc. (abm®). Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν από κάθε συστατικό αναφέρονται στον παραπάνω πίνακα (Πιν. 3.1).

Για κάθε ομάδα δειγμάτων υπήρχαν πάντα και δύο αντιδράσεις μάρτυρες, οι οποίες δεν περιείχαν DNA, ώστε να επιβεβαιωθεί πως η ύπαρξη προϊόντος δεν είναι αποτέλεσμα επιμόλυνσης.

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε στο θερμικό κυκλοποιητή ήταν αρχική αποδιάταξη του DNA για 10 λεπτά στους 94 °C και 35 κύκλους με τα διαδοχικά βήματα της αποδιάταξης για 30 δευτερόλεπτα στους 94 °C, υβριδισμού των εκκινητών στους 55 °C για 30 δευτερόλεπτα, επιμήκυνση της αλυσίδας DNA στους 72 °C για 1.5 λεπτό. Μετά τους 35 κύκλους ακολούθησε η τελική επιμήκυνση των αλυσίδων στους 72 °C για 5 λεπτά. Μετά το τέλος της αντίδρασης, τα δείγματα φυλάχθηκαν στους 4 °C.

Ποσότητα 8 μl από την αντίδραση ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης (βλ. Κεφ. 3.10) και αφού πιστοποιήθηκε η ύπαρξη προϊόντος, η υπόλοιπη αντίδραση υπέστη καθαρισμό (βλ. Κεφ. 3.11).

### **3.10 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αγαρόζης**

Ο διαχωρισμός των τμημάτων του DNA γίνεται με βάση το μέγεθος και τη διαμόρφωση τους με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Η αγαρόζη είναι ένα γραμμικό πολυμερές D- και L-γαλακτόζης. Μετά τη διάλυση της σε κατάλληλο διαλύτη τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και αφού κρυώσει και πήξει σχηματίζονται πόροι. Όσο μεγαλύτεροι είναι η συγκέντρωση της αγαρόζης τόσο μικρότεροι οι πόροι που σχηματίζονται άρα τόσο μικρότερα τα μόρια DNA που μπορούν να περάσουν και να διαχωριστούν. Για παράδειγμα, η συγκέντρωση αγαρόζης 1.5 % μπορεί να διαχωρίσει μόρια μεγέθους 200-4000 bp.

Μετά την πήξη προστίθεται ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο είναι αγωγός του ρεύματος και ρυθμίζει το pH (ουδέτερο) ώστε το DNA να είναι σε σταθερή κατάσταση και να διατηρεί το αρνητικό του φορτίο κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού. Όταν εφαρμοστεί ρεύμα στη συσκευή το αρνητικά φορτισμένο μόριο του DNA θα κινηθεί δια μέσου της πηκτής προς το θετικό ηλεκτρόδιο. Στην περίπτωση διαχωρισμού γραμμικών μορίων ο διαχωρισμός είναι ανάλογος του μεγέθους.

Οι ζώνες των νουκλεϊνικών οξέων γίνονται ορατές με τη χρήση της χημικής ουσίας βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) το οποίο παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγαρωμένων βάσεων και φθορίζει υπό υπεριώδη ακτινοβολία.

Για την προετοιμασία της πηκτής, αρχικά κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης διαλύθηκε σε κωνική φιάλη σε ορισμένο όγκο διαλύματος ηλεκτροφόρησης 1xTAE (40 mM Tris, 20 mM οξικό οξύ, 1mM EDTA). Στη συνέχεια, η φιάλη με την αγαρόζη και το διάλυμα TAE θερμάνθηκε σταδιακά σε φούρνο μικροκυμάτων έως την πλήρη διάλυση. Αφού απέκτησε θερμοκρασία 50 °C, προστέθηκε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου τελικής συγκέντρωσης 0.5 μg/ml και στερεοποιήθηκε σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης. Τέλος, προσαρμόστηκε η κατάλληλη «χτένα» ώστε να σχηματιστούν στην πηκτική τα πηγάδια φόρτωσης. Αφού η πηκτική σταθεροποιήθηκε, απομακρύνθηκε η «χτένα» και η συσκευή συμπληρώθηκε με διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1xTAE ώστε η πηκτική να παραμένει βυθισμένη 1-2 mm από την επιφάνεια του. Τα δείγματα των νουκλεοξέων, αφού αναμίχθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (0.25% w/v μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.25% w/v κυανόλη του ξυλενίου, 30% v/v γλυκερόλη) σε ποσότητα 1/10 όγκου του δείγματος, τοποθετήθηκαν στα βοθρία φόρτωσης. Εφαρμόστηκε στα άκρα της συσκευής ηλεκτροφόρησης κατάλληλη τάση ηλεκτρικού πεδίου και χρόνος εφαρμογής ανάλογος των δειγμάτων.

Για τη φωτογράφιση των ζωνών DNA μετά την ηλεκτροφόρηση, η πηκτική αγαρόζης μεταφέρθηκε σε κατάλληλη συσκευή με σύστημα οπτικοποίησης όπου δέχτηκε υπεριώδη ακτινοβολία.

### **3.11 Καθαρισμός προϊόντος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης**

Ο καθαρισμός του προϊόντος PCR πραγματοποιήθηκε με το GeneJET PCR Purification Kit της εταιρείας Thermo Scientific.

Αρχικά, προστέθηκε όγκος 42 μl (1:1) του διαλύματος δέσμευσης (Binding buffer, χαοτροπικό άλας) στην ολοκληρωμένη αντίδραση PCR και έγινε ανάδευση με την πιπέτα. Το χρώμα του διαλύματος πρέπει να αλλάξει κίτρινο ώστε να υπάρχουν οι κατάλληλες συνθήκες pH για την επικείμενη δέσμευση του DNA στη μεμβράνη της κολώνας. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκε το διάλυμα στην κολώνα (GeneJET purification column), η οποία βρισκόταν μέσα σε δοχείο συλλογής. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 1 λεπτό και το δοχείο συλλογής απορρίφθηκε. Προστέθηκαν 700 μl του διαλύματος πλύσης (Wash buffer, αιθανόλη) στην κολώνα, έγινε φυγοκεντρήθηκε στις 13000 rpm για 1 λεπτό και το διάλυμα που πέρασε στο δοχείο συλλογής απορρίφθηκε. Επαναλήφθηκε η φυγοκέντρωση για να απομακρυνθεί πλήρως η

αιθανόλη. Ακολούθησε η μεταφορά της κολώνας σε αποστειρωμένο δοχείο erpendorf και προσθήκη 50 μl διαλύματος έκλουσης (Elution Buffer, Tris-HCl) στο κέντρο της μεμβράνης. Τέλος, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 λεπτό για την έκλουση του DNA.

Το DNA προϊόν μετρήθηκε ως προς τη συγκέντρωση και καθαρότητα του (βλ. Κεφ. 3.8) και αποθηκεύτηκε στους -20 °C.

Τα γονιδιακά προϊόντα στάλθηκαν για αλληλούχιση κατά Sanger στην εταιρεία CeMIA.

### **3.12 *In silico* ανάλυση των αλληλουχιών**

Οι αλληλουχίες των ενδοφυτικών μικροοργανισμών υποβλήθηκαν στο πρόγραμμα BLAST του NCBI (US National Center for Biotechnological Information) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Οι αλληλουχίες υποβλήθηκαν ως ερώτημα στο BLASTn και συγκεκριμένα στη βάση δεδομένων όλων των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (nr/nt-nucleotide collection) χωρίς αλλαγή των προκαθορισμένων ρυθμίσεων του προγράμματος.

Τα αποτελέσματα που έδωσε η βάση δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν για να ταυτοποιηθεί το γένος. Η ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους δεν ήταν εφικτή καθώς τα δεδομένα με το μεγαλύτερο σκορ αντιστοιχούσαν σε διαφορετικά είδη.

### **3.13 Έλεγχος χαρακτηριστικών των βακτηρίων**

#### **3.13.1 Ικανότητα ομαδικής κίνησης (swarming motility)**

Τα ενδοφυτικά βακτήρια ελέγχθηκαν για την ικανότητα ομαδικής κίνησης σε ημι-στερεό θρεπτικό μέσο NA (Nutrient Broth + 0.5% agar).

Συγκεκριμένα, το εκάστοτε βακτήριο εμβολιάστηκε ασηπτικά και καλλιεργήθηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο NB (Nutrient Broth) σε ανακινούμενο επωαστή στους 30 °C για 18-20 ώρες. Ποσότητα 10 μl από αυτή την καλλιέργεια τοποθετήθηκε ασηπτικά στο κέντρο τρυβλίου με ημιστερεό θρεπτικό μέσο NA υπό τη μορφή κηλίδας (spot). Ακολούθησε επώαση στους 30 °C για 4 μέρες, με καθημερινό έλεγχο και φωτογράφιση της βακτηριακής κίνησης. Πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις.

Μετά το πέρας των 4 ημερών τα βακτήρια κατηγοριοποιήθηκαν ως προς την ομαδική τους κίνηση. Ως ισχυρή ικανότητα κίνησης swarming (++++) ορίστηκε η πλήρης κάλυψη του τρυβλίου την πρώτη μέρα επώασης. Αντίστοιχα, ως λιγότερο ισχυρή ικανότητα κίνησης (+++) ορίστηκε η πλήρης κάλυψη του τρυβλίου κάποια από τις επόμενες 3 μέρες, ενώ ως μέτρια (++) ορίστηκε η ικανότητα όταν η διάμετρος της βακτηριακής ανάπτυξης ήταν μεγαλύτερη από 3 και μικρότερη από 9 cm. Μικρή ορίστηκε η ικανότητα όπου η διάμετρος της βακτηριακής ανάπτυξης λόγω κίνησης swarming ήταν μικρότερη από 3 cm. Τέλος ως (-) ορίστηκε η μη ικανότητα κίνησης swarming.

### **3.13.2 Χαρακτηριστικά προαγωγής της ανάπτυξης του φυτού (PGP traits)**

#### **3.13.2.1 Παραγωγή σιδηροφόρων**

Τα σιδηροφόρα είναι μικρά μόρια που συμπλοκοποιούν το σίδηρο.

Η παραγωγή τέτοιων μορίων ελέγχεται με το στερεό θρεπτικό μέσο Chrome Azurol S (CAS). Η αυθεντική μέθοδος είναι των Schwyn και Neilands (1987).

Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην αρχή της λειτουργίας των σιδηροφόρων. Το θρεπτικό μέσο έχει μπλε χρώμα λόγω της ύπαρξης σιδήρου. Τα σιδηροφόρα δεσμεύουν το σίδηρο του θρεπτικού και τον απομακρύνουν από το σύμπλοκο της χρωστικής. Έτσι, δημιουργείται πορτοκαλί ή μωβ χρώμα όπου διαχέονται τα σιδηροφόρα hydroxamates και catecholates, αντίστοιχα (Schwyn and Neilands, 1987).

Αυτό το στερεό θρεπτικό μέσο περιέχει 2 βασικά διαλύματα. Το πρώτο είναι ο δείκτης Fe-CAS (100 ml) και το δεύτερο είναι το θρεπτικό μέσο King's B με 1 % γλυκερόλη και 1,5% αγαρ (900ml). Το πρώτο διάλυμα περιέχει 10 ml 1mM  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  σε 10 mM HCl, 50 ml υδατικού διαλύματος CAS (1.21 mg/ml) και 40 ml υδατικού διαλύματος HDTMA (CTAB) (1.82 mg/ml). Το CAS προστίθεται στο διάλυμα σιδήρου με συνεχές ανακάτεμα και τέλος προστίθεται το διάλυμα HDTMA. Ο δείκτης Fe-CAS και το θρεπτικό μέσο King's B αποστειρώνονται ξεχωριστά στους 121 °C και αφήνονται να κρυώσουν έως τους 50 °C. Τέλος, ο δείκτης προστίθεται στο μέσο, υπό συνεχή ανάδευση ώστε να γίνει ομογενοποίηση του διαλύματος.

Αφού το μέσο πήξει και στεγνώσει στα τρυβλία, αυτά φυλάσσονται στους 4 °C για 24-48 ώρες ώστε να αποκτήσουν το μπλε χρώμα τους.

Ποσότητα 10 μl από υγρή βακτηριακή καλλιέργεια 18-20 ωρών τοποθετήθηκε στο κέντρο τρυβλίου με στερεό θρεπτικό μέσο CAS. Πραγματοποιήθηκε επώαση στους 30 °C για 4 ημέρες,

με καθημερινό έλεγχο και φωτογράφιση. Έγιναν 3 επαναλήψεις. Η ένταση παραγωγής σιδηροφόρων προσδιορίστηκε από τη διάμετρο της πορτοκαλί άλω στις 4 μέρες. Συγκεκριμένα, η ένταση ορίστηκε ως έντονη (+++) όταν η διάμετρος ήταν 7-9 cm, ως μεσαία (+++) όταν η διάμετρος ήταν μικρότερη των 7 και μεγαλύτερη ή ίση των 4 cm και ως μικρή (+), όταν η διάμετρος ήταν μικρότερη των 4 cm. Τέλος, καθόλου ανάπτυξη άλω (-) χαρακτηρίστηκε ως ανικανότητα παραγωγής σιδηροφόρων.

### 3.13.2.2 Διαλυτοποίηση φωσφόρου

Η ικανότητα των απομονωμένων ενδοφυτικών βακτηρίων να διαλυτοποιούν το φώσφορο εξετάστηκε με την ανάπτυξή τους σε θρεπτικό μέσο στερεό θρεπτικό μέσο Pikonskaya (PVK agar) (Pikonskaya, 1948). Η δημιουργία διαφανής άλω γύρω από την κηλίδα του βακτηρίου υποδηλώνει τη διαλυτοποίηση του ιζηματοποιημένου φωσφόρου του θρεπτικού μέσου.

Το μέσο αυτό περιέχει 1% γλυκόζη, 0.5%  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , 0.05%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.01%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0.02% KCl, 0.05% εκχύλισμα ζύμης, 0.0002%  $\text{MnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0.0002%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  και 1.5% αγαρ. Μετά την προσθήκη όλων των συστατικών, το διάλυμα αναδεύεται πολύ καλά και αποστειρώνεται στους 121 °C. Στη συνέχεια, το μέσο αφήνεται να κρυώσει υπό συνεχή και γρήγορη ανάδευση και τοποθετείται στα τρυβλία. Αυτά μπορούν να αποθηκευτούν στους 4 °C μέχρι τη χρήση τους.

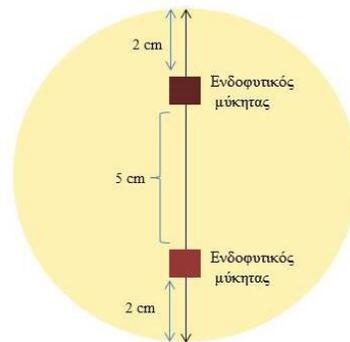
Ποσότητα 10 μl από ολονύχτια βακτηριακή καλλιέργεια τοποθετήθηκε στο κέντρο του τρυβλίου με στερεό θρεπτικό μέσο PVK. Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 30 °C για 7 ημέρες. Η παρατήρηση και η λήψη φωτογραφιών έγιναν στις 4 και τις 7 ημέρες. Το πείραμα περιείχε 3 επαναλήψεις.

Για τον προσδιορισμό της ικανότητας διαλυτοποίησης φωσφόρου πραγματοποιήθηκε μέτρηση της διαμέτρου της διαφανής άλω στο θρεπτικό μέσο, κάτω και γύρω από την κηλίδα του βακτηρίου. Ως μεγάλη ικανότητα (++) θεωρήθηκε όταν η διάμετρος ήταν μεγαλύτερη από 1.5 cm ενώ ως μικρή (+) θεωρήθηκε όταν η διάμετρος ήταν ίση ή μικρότερη των 1.5 cm. Η μη ύπαρξη διαφανής άλω (-) ορίστηκε ως ανικανότητα διαλυτοποίησης φωσφόρου.

### 3.14 Αλληλεπίδρασεις ενδοφυτικών μυκήτων του ίδιου ιστού μεταξύ τους

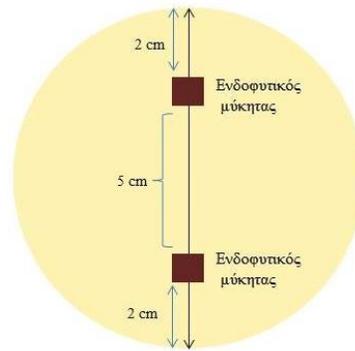
Η αλληλεπίδραση των ενδοφυτικών μυκήτων με τους υπόλοιπους ενδοφυτικούς του ίδιου ιστού πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της διπλής καλλιέργειας (dual culture).

Όλοι οι μύκητες ανακαλλιεργήθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο PDA στους 25 °C στο σκοτάδι για 10 ημέρες. Στη συνέχεια, τετράγωνο κομμάτι θρεπτικού μέσου (6 mm x 6 mm) με υφές ενός ενδοφυτικού μύκητα από την ανακαλλιέργεια τοποθετήθηκε 2 cm από την άκρη τρυβλίου Petri με στερεό θρεπτικό μέσο PDA. Ακολούθησε η τοποθέτηση τετράγωνου κομματιού άγαρ (6 mm x 6 mm) με υφές διαφορετικού ενδοφυτικού μύκητα του ίδιου ιστού από την ανακαλλιέργεια σε απόσταση 2 cm από την άλλη άκρη του τρυβλίου. Παρακάτω φαίνεται σχηματικά ο πειραματικός σχεδιασμός (Σχεδιάγραμμα 3.3). Έγιναν όλοι οι πιθανοί συνδυασμοί αλληλεπίδρασης ενδοφυτικών μυκήτων του ίδιου ιστού από μία φορά ο κάθε συνδυασμός.



**Σχεδιάγραμμα 3.3** Σχηματική αναπαράσταση της θέσης των κομματιών θρεπτικών με τις υφές των δύο αλληλεπιδρώντων ενδοφυτικών μυκήτων κατά τη διπλή καλλιέργειά τους σε τρυβλίο Petri με θρεπτικό μέσο PDA (1.5 % άγαρ).

Ακόμη, με τον ίδιο τρόπο ετοιμάστηκαν τρυβλία που περιείχαν δύο τετράγωνα κομμάτια θρεπτικού μέσου με υφές ενδοφυτικού μύκητα που προέρχονταν από την ίδια καλλιέργεια. Παρακάτω φαίνεται σχηματικά ο πειραματικός σχεδιασμός (Σχεδιάγραμμα 3.4).



**Σχεδιάγραμμα 3.4** Σχηματική αναπαράσταση της θέσης των κομματιών θρεπτικών με τις υφές του εκάστοτε ενδοφυτικού μύκητα από την ίδια καλλιέργεια σε τρυβλίο Petri με θρεπτικό μέσο PDA (1.5 % άγαρ).

Παράλληλα, ετοιμάστηκαν μάρτυρες με ένα τετράγωνο κομμάτι θρεπτικού μέσου με υφές του ενδοφυτικού μύκητα.

Όλες οι διαδικασίες εμβολιασμού σε θρεπτικό μέσο πραγματοποιήθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα τρυβλία σφραγίστηκαν με παραφίλμ και επώαστηκαν στους 25 °C στο σκοτάδι για 30 ημέρες. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε 2 φορές συνολικά με 2 επαναλήψεις την κάθε φορά.

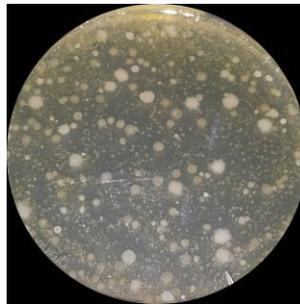
Η αλληλεπίδραση των ενδοφυτικών μυκήτων ήταν καθημερινό αντικείμενο παρατήρησης ενώ λήφθηκαν φωτογραφίες στις 10 και τις 20 μέρες. Εφόσον δεν άλλαξε ο φαινότυπος σε καμία αλληλεπίδραση στις 30 ημέρες, δε λήφθηκαν φωτογραφίες. Με βάση το φαινότυπο, οι αλληλεπιδράσεις κατηγοριοποιήθηκαν σε τύπους, με συμβουλή δύο επιπλέον συναδέλφων.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Απομόνωση και χαρακτηρισμός ενδοφυτικών βακτηρίων από το φυτό *Teucrium polium*

#### 4.1.1 Απομόνωση ενδοφυτικών βακτηρίων

Για την απομόνωση ενδοφυτικών βακτηρίων επιστρώθηκε φυτικός πολτός από τα φύλλα και τη ρίζα σε στερεό θρεπτικό μέσο ΝΑ. Ακολούθησε επώαση στους 30 °C μέχρι να γίνουν ορατές όλες οι αποικίες (Εικ. 4.1).

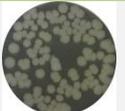
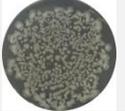
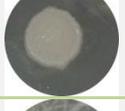
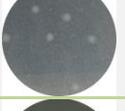
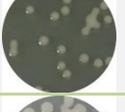
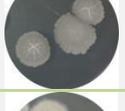
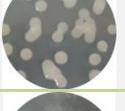


Εικόνα 4.1 Βακτηριακές αποικίες μετά από επίστρωση πολτού ρίζας του φυτού *Teucrium polium* σε στερεό θρεπτικό μέσο ΝΑ και επώαση στους 30 °C για 2 ημέρες.

Από το κάθε τρυβλίο παρελήφθησαν περίπου 50 αποικίες βακτηρίων με προσπάθεια να επιλεγθούν όλες οι μορφολογικά διαφορετικές αποικίες. Αυτές τοποθετήθηκαν με τη μέθοδο του streaking σε στερεό θρεπτικό μέσο ΝΑ και μετά επωάστηκαν στους 30 °C για 18-20 ώρες. Μετά την καλλιέργεια τους σε υγρό θρεπτικό μέσο, πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις ώστε να επιλεγθεί μοναδιαία αποικία, της οποίας η καλλιέργεια αποθηκεύτηκε σε γλυκερόλη στους -80 °C και της δόθηκε ένα κωδικό όνομα (παραδείγματα στον Πιν. 4.1). Το όνομα προκύπτει από το όνομα των βακτηρίων (**Bacteria**), το γένος του φυτού (*Teucrium*) και τον ιστό από όπου απομονώθηκε (**leaves** ή **root**).

Στη συνέχεια, επιλέχθηκαν εκείνα τα ενδοφυτικά βακτήρια με τον ισχυρότερο φαινότυπο έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani*. Αυτά τα 25 βακτήρια χαρακτηρίστηκαν περαιτέρω ως προς το γένος, την ικανότητα παρεμπόδισης των φυτοπαθογόνων *Fusarium oxysporum* fsp *raphani* και *Botrytis cinerea*, την ικανότητα ομαδικής κίνησης σε ημι-στερεό μέσο, την παραγωγή σιδηροφόρων και τη διαλυτοποίηση του φώσφορου.

**Πίνακας 4.1** Τα κωδικά ονόματα και οι αποικίες των 25 απομονωμένων βακτηρίων που χαρακτηρίστηκαν. Οι φωτογραφίες δεν έχουν την ίδια κλίμακα.

Κωδικό όνομα βακτηρίου	Μορφολογία αποικιών	Κωδικό όνομα βακτηρίου	Μορφολογία αποικιών	Κωδικό όνομα βακτηρίου	Μορφολογία αποικιών
B.Tel.31		B.Tel.51		B.Ter.78	
B.Tel.33β		B.Tel.52.2		B.Ter.79	
B.Tel.34		B.Tel.54		B.Ter.80a	
B.Tel.36a		B.Ter.61		B.Ter.82	
B.Tel.40		B.Ter.62		B.Ter.84	
B.Tel.42		B.Ter.67		B.Ter.86	
B.Tel.43		B.Ter.70		B.Ter.90	
B.Tel.46		B.Ter.73			
B.Tel.47		B.Ter.74			

Από τον πίνακα διαφαίνεται πως κάποιες αποικίες μοιάζουν μορφολογικά μεταξύ τους όπως για παράδειγμα της απομόνωσης B.Tel.43 με το B.Ter.74 και της απομόνωσης B.Tel.34 με το B.Tel.54.

## 4.1.2 Χαρακτηρισμός ενδοφυτικών βακτηρίων

### 4.1.2.1 Μικροσκοπική παρατήρηση

Τα βακτήρια ομαδοποιήθηκαν με τη μέθοδο της χρώσης κατά Gram, η οποία διαχωρίζει τα βακτήρια σε Gram θετικά (+) ή αρνητικά (-) λόγω διαφορών στο κυτταρικό τους τοίχωμα (Εικ. 4.2).



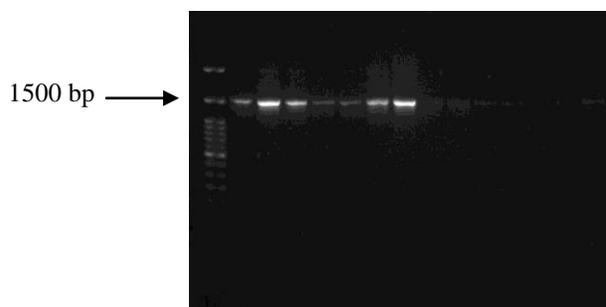
Εικόνα 4.2 Παραδείγματα χρώσης κατά Gram βακτηριακών απομονώσεων σε οπτικό μικροσκόπιο (100x) (1:B.Ter.79, 2: B.Ter.86, 3:B.Ter.67, 4:B.Tel.36a, 5:B.Tel.51, 6:B.Tel.33b).

Παρατηρήθηκε πως υπάρχουν θετικά και αρνητικά κατά Gram βακτήρια, καθώς και ποικιλία όσον αφορά την κυτταρική μορφολογία (μέγεθος, σχήμα).

### 4.1.2.2 Μοριακή ταυτοποίηση

Τα επιλεγμένα βακτήρια ταυτοποιήθηκαν με βάση τις 16s rDNA αλληλουχίες τους.

Πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με εκφυλισμένους εκκινητές και το προϊόν (Εικ. 4.3) απομονώθηκε και εστάλη για αλληλούχιση.



Εικόνα 4.3 Τμήματα (1500 bp) 16s rDNA σε πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης 1.5 % μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης. Στην πρώτη στήλη φαίνεται ο μάρτυρας και ακολουθούν τα βακτηριακά δείγματα.

Για την απόδοση γένους στα βακτήρια με βάση τα αποτελέσματα της αλληλούχισης, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα BLASTn της βάσης δεδομένων GenBank του NCBI. Τα γένη προσδιορίστηκαν ως *Bacillus*, *Pseudomonas* και *Erwinia*. Από τις 25 αλληλουχίες που αναλύθηκαν, 14 αποδόθηκαν ως *Bacillus* sp., 10 ως *Pseudomonas* sp. και 1 ως *Erwinia* sp. με ποσοστό ομοιότητας 95-99%. Αναλυτικά η ταξινόμηση και τα ποσοστά ομοιότητας φαίνονται στον Πίνακα 4.2.

Πίνακας 4.2 Ταξινόμηση των βακτηριακών απομονώσεων με βάση την υποβολή της 16s rDNA αλληλουχία τους στο πρόγραμμα BLAST.

<u>Κωδικό όνομα βακτηρίου</u>	<u>Ομοιότητα</u>	<u>Πιθανά είδη</u>	<u>Ταξινόμηση σε γένος</u>
B.Tel.31	95%	<i>Pseudomonas punonensis</i> <i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i>
B.Tel.33b	97%	<i>Erwinia</i> sp.	<i>Erwinia</i>
B.Tel.34	98%	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i>
B.Tel.36a	98%	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i>
B.Tel.40	98%	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i>
B.Tel.42	98%	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i>
B.Tel.43	98%	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i>
B.Tel.46	98%	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i>
B.Tel.47	98%	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus</i>
B.Tel.51	99%	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i>
B.Tel.52.2	98%	Uncultured <i>Bacillus</i> sp. <i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus</i>
B.Tel.54	98%	<i>Bacillus pumilis</i>	<i>Bacillus</i>

Πίνακας 4.2 (συνέχεια)

B.Ter.61	99%	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i>
B.Ter.62	98%	<i>Bacillus australimaris</i> <i>Bacillus</i> sp. <i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacillus safensis</i>	<i>Bacillus</i>
B.Ter.67	98%	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Pseudomonas koreensis</i> <i>Pseudomonas moraviensis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i>
B.Ter.70	99%	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i>
B.Ter.73	98%	<i>Pseudomonas koreensis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Pseudomonas moraviensis</i>	<i>Pseudomonas</i>
B.Ter.74	99%	<i>Bacillus mycoides</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus weistephanensis</i>	<i>Bacillus</i>
B.Ter.78	97%	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i>
B.Ter.79	99%	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i>
B.Ter.80a	99%	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i>
B.Ter.82	98%	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	<i>Pseudomonas</i>
B.Ter.84	99%	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i>
B.Ter.86	98%	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i>
B.Ter.90	98%	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i>

Οι περισσότερες αλληλουχίες ταυτίστηκαν σε μεγάλο ποσοστό με πάνω από μία αλληλουχίες της βάσης δεδομένων με το ίδιο σκορ. Ακόμη, κάποιες αλληλουχίες ταυτίστηκαν καλύτερα με μία αλληλουχία της βάσης δεδομένων, στην οποία δεν είχε αποδοθεί γένος. Έτσι, δεν ήταν δυνατός ο ακριβής προσδιορισμός του είδους και εφεξής θα αναφέρονται μόνο με τα γένη τους.

#### 4.1.2.3 Αλληλεπίδραση με φυτοπαθογόνους μύκητες

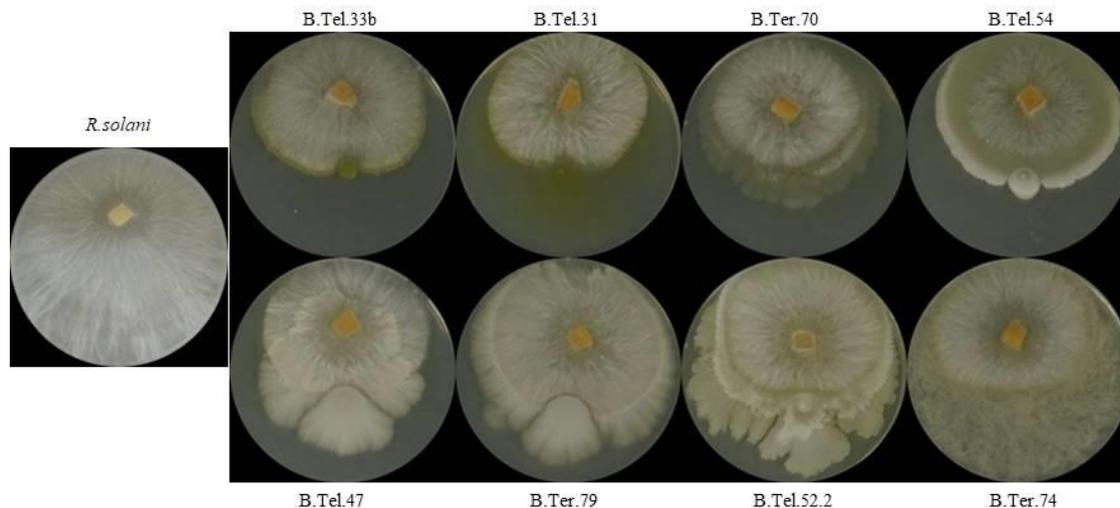
Σκοπός αυτού του πειράματος ήταν η διερεύνηση της ανταγωνιστικής ικανότητας απομονωμένων ενδοφυτικών βακτηρίων έναντι των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* fsp *raphani* και *Botrytis cinerea*.

Η αλληλεπίδραση αξιολογήθηκε με τη χρήση της μεθόδου διπλής καλλιέργειας (dual culture) σε στερεό θρεπτικό μέσο NA (1.5% άγαρ). Στη συγκεκριμένη μέθοδο ο μύκητας και το βακτήριο καλλιεργούνται ταυτόχρονα στο ίδιο τρυβλίο έχοντας ορισμένη απόσταση μεταξύ τους.

Τα βακτήρια που έδειξαν κάποια ανταγωνιστική δράση έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* δοκιμάστηκαν και έναντι των μυκήτων *Fusarium oxysporum* fsp *raphani* και *Botrytis cinerea*. Μετά τη μακροσκοπική παρατήρηση των τρυβλίων, καταγράφηκαν 4 βασικοί τύποι αλληλεπίδρασης μεταξύ των βακτηρίων και των φυτοπαθογόνων μυκήτων για να περιγράψουν επαρκώς το φαινόμενο. Η κατηγοριοποίηση που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

<b>Τύπος 1</b>	Ομαδική κίνηση του βακτηρίου και επαφή με το μύκητα
<b>Υποτύπος 1.1</b>	Κύκλωμα του μύκητα
<b>Υποτύπος 1.2</b>	Κίνηση του βακτηρίου προς τα πίσω
<b>Τύπος 2</b>	Ομαδική κίνηση του βακτηρίου και είσοδος στην περιοχή του μύκητα
<b>Τύπος 3</b>	Ζώνη παρεμπόδισης
<b>Υποτύπος 3.1</b>	Κίνηση του βακτηρίου προς τα πίσω
<b>Τύπος 4</b>	Ο μύκητας καλύπτει το βακτήριο

Οι εικόνες που ακολουθούν δείχνουν αντιπροσωπευτικά παραδείγματα-μοτίβα με τους τύπους αλληλεπίδρασης των ενδοφυτικών βακτηρίων και των φυτοπαθογόνων μυκήτων *R. solani* (Εικ. 4.4), *F.oxysporum* fsp *raphani* (Εικ. 4.5) και *B.cinerea* (Εικ. 4.6). Φαίνεται πως υπάρχουν διαφορές στην ένταση του κάθε τύπου και πιο συγκεκριμένα στην ένταση της κίνησης, της εισόδου στην περιοχή του μύκητα και της ζώνης παρεμπόδισης. Αυτά τα παραδείγματα χαρακτηρίστηκαν ως μοτίβα καθώς έχουν παρατηρηθεί σε δύο ή περισσότερες απομονώσεις.

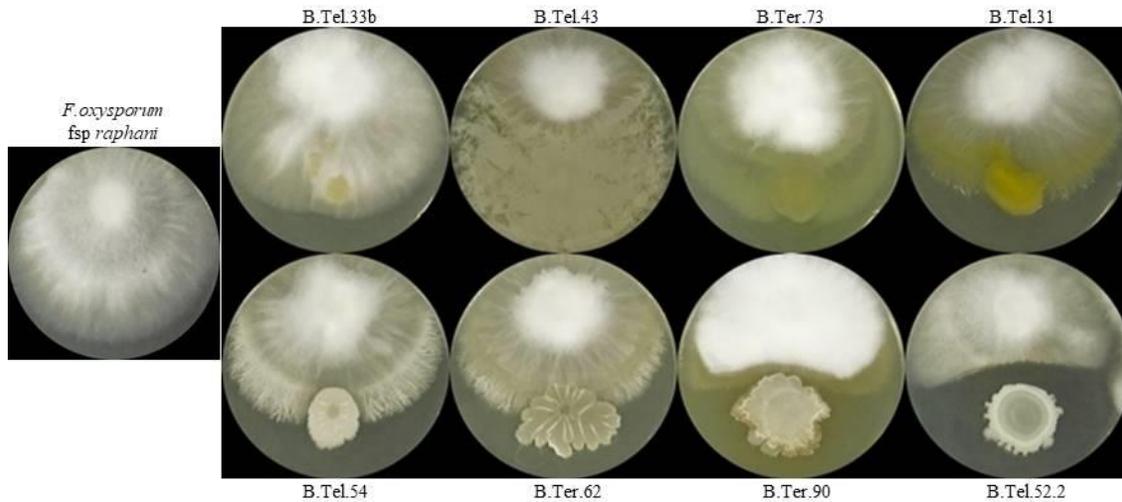


Εικόνα 4.4 Παραδείγματα δράσης ενδοφυτικών βακτηριακών απομονώσεων εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* σε θρεπτικό μέσο NA (1.5% αγαρ). Τα κομμάτια θρεπτικού μέσου με τις υφές του μύκητα μεταφέρθηκαν στο τρυβλίο 1 μέρα πριν τη τοποθέτηση της κηλίδας του βακτηρίου. Οι φωτογραφίες είναι 9 ημερών επώασης στους 25 °C.

Η αλληλεπίδραση με το μύκητα *R.solani* οδηγεί κυρίως σε αλληλεπίδραση τύπου 1 (ομαδική κίνηση του βακτηρίου και επαφή με το μύκητα) ή 2 (ομαδική κίνηση του βακτηρίου και είσοδος στην περιοχή του μύκητα) (Πιν.4.3). Παρατηρείται πως η ένταση της ομαδικής κίνησης ποικίλλει. Ακραία παραδείγματα είναι η απομόνωση B.Tel.33b (Εικ. 4.4), όπου η κίνηση είναι μειωμένη και οι απομονώσεις B.Ter.74 και B.Tel.52.2 (Εικ. 4.4), όπου το βακτήριο απλώνεται σε όλο το διαθέσιμο χώρο. Ακόμη, τα βακτήρια κινούνται κυκλώνοντας το μύκητα, εκτός από την απομόνωση B.Tel.47.

Επίσης, παρατηρείται αραίωση ή αλλαγή της μορφολογίας των υφών του μύκητα λόγω της αλληλεπίδρασης με κάποια βακτήρια, όπως τα B.Tel.31 (Εικ. 4.4) και B.Tel.34 (Εικ. 4.4). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το μοτίβο του βακτηρίου B.Ter.70 (Εικ. 4.4), το οποίο εισέρχεται στην περιοχή του μύκητα, αφήνει μια διακριτή σειρά υφών ανεπηρέαστη και συνεχίζει την είσοδο του.

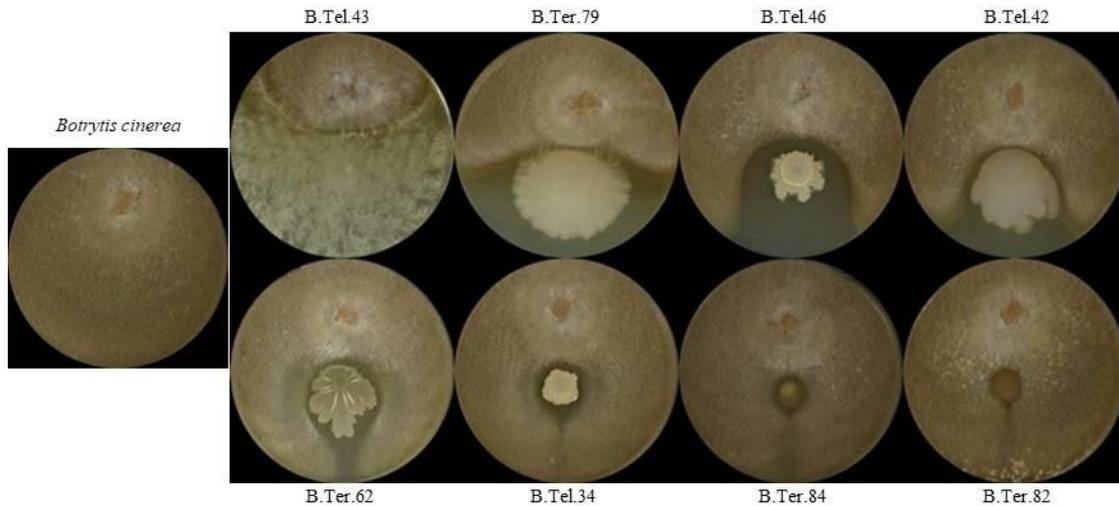
Πρέπει να τονιστεί η διαφορά της έντασης όσον αφορά την είσοδο του βακτηρίου στην περιοχή του μύκητα. Για παράδειγμα, η απομόνωση B.Ter.74 (Εικ. 4.4) εισέρχεται σε μικρότερη έκταση σε σύγκριση με τις απομονώσεις B.Tel.47 και B.Ter.79 (Εικ. 4.4). Με τη σειρά του, το βακτήριο B.Tel.47 εισέρχεται έως και πάνω από τη μέση του συνόλου του μύκητα ενώ B.Ter.79 κινείται σχεδόν σε ολόκληρη την περιοχή όπου έχει αναπτυχθεί ο μύκητας.



**Εικόνα 4.5** Παραδείγματα δράσης ενδοφυτικών βακτηριακών απομονώσεων εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum fsp raphani* σε θρεπτικό μέσο ΝΑ (1.5% αγαρ). Τα κομμάτια άγαρ με τις υφές του μύκητα μεταφέρθηκαν στο τρυβλίο 1 μέρα πριν τη τοποθέτηση της κηλίδας του βακτηρίου. Οι φωτογραφίες είναι 9 ημερών επώασης στους 25 °C.

Τα ενδοφυτικά βακτήρια παρουσιάζουν δύο κύριους τύπους δράσης κατά την αλληλεπίδραση τους με το φυτοπαθογόνο μύκητα *F.oxysporum fsp raphani*, τον τύπο 2 όπου γίνεται είσοδος στην περιοχή του μύκητα και τον τύπο 3 όπου δημιουργείται ζώνη παρεμπόδισης (Πιν. 4.3). Η απομόνωση B.Tel.33b δεν εμφανίζει καμία ανταγωνιστική δράση έναντι του συγκεκριμένου μύκητα (Εικ.4.5).

Υπάρχουν, όπως και προηγουμένως, διαφορές στην ένταση των κατηγοριών αλλά και εμφάνιση συγκεκριμένων μοτίβων. Για παράδειγμα, το βακτήριο B.Tel.43 (Εικ.4.5) κινείται καταλαμβάνοντας όλο το διαθέσιμο χώρο και εισέρχεται στην περιοχή του μύκητα ακολουθούμενο σε ένταση από το βακτήριο B.Ter.73 (Εικ.4.5) και τελευταίο το B.Tel.31 (Εικ.4.5). Τα βακτήρια B.Tel.54 (Εικ.4.5) και B.Ter.62 (Εικ.4.5) παρουσιάζουν ένα παρόμοιο μοτίβο, όπου έχουν εισέλθει στην περιοχή του μύκητα και τον κυκλώνουν ενώ σχηματίζεται ένας ιδιαίτερος φαινότυπος που δεν είναι ξεκάθαρο το τι περιλαμβάνει. Στην αλληλεπίδραση του B.Tel.54, μάλιστα, διαφαίνεται και μία μικρή ζώνη παρεμπόδισης. Ακολουθούν τα βακτήρια B.Ter.90 (Εικ.4.5) και B.Tel.52.2 (Εικ.4.5), κατά την αλληλεπίδραση των οποίων δημιουργείται μια ζώνη παρεμπόδισης, με τη δεύτερη να είναι μεγαλύτερη από την πρώτη.



Εικόνα 4.6 Παραδείγματα δράσης ενδοφυτικών βακτηριακών απομονώσεων εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea* σε θρεπτικό μέσο NA (1.5% άγαρ). Τα κομμάτια άγαρ με τις υφές του μύκητα μεταφέρθηκαν στο τρυβλίο 1 μέρα πριν την τοποθέτηση της κηλίδας του βακτηρίου. Οι φωτογραφίες είναι 9 ημερών επώασης στους 25 °C.

Κυρίαρχος τύπος αλληλεπίδρασης με το μύκητα *B.cinerea* είναι ο τύπος 3 (ζώνη παρεμπόδισης) (Πιν.4.3). Μία από τις εξαιρέσεις είναι το βακτήριο B.Tel.43 (Εικ. 4.6), το οποίο κινείται και καταλαμβάνει όλο το χώρο αλλά και εισέρχεται στην περιοχή του μύκητα. Άλλη μια είναι το βακτήριο B.Ter.79 (Εικ. 4.6) το οποίο έρχεται σε επαφή με το μύκητα στην μπροστινή περιοχή αλλά εμποδίζει την ανάπτυξη του χωρίς επαφή στα πλάγια. Στις υπόλοιπες φωτογραφίες φαίνεται η διαβάθμιση της έντασης της ζώνης παρεμπόδισης από την πιο μεγάλη στην πιο μικρή. Αξιοσημείωτο εδώ είναι πως ακόμα και αν ο μύκητας έχει κυκλώσει την αποικία, η ζώνη υπάρχει και τον κρατάει σε μια απόσταση. Εδώ, διαφαίνεται το φαινόμενο της παρεμπόδισης της ανάπτυξης της μακροαποικίας του βακτηρίου προς τη μεριά που έρχεται σε αντιπαράθεση με το μύκητα στις απομονώσεις B.Tel.43, B.Tel.46, B.Tel.42 και B.Ter.62.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίν. 4.3) σημειώνονται οι τύποι αλληλεπίδρασης ενδοφυτικού βακτηρίου και φυτοπαθογόνου μύκητα που παρατηρήθηκαν για κάθε βακτήριο. Τα περισσότερα βακτήρια παρουσίασαν συνδυασμό των τύπων αλληλεπίδρασης, οι οποίοι σημειώνονται και διαχωρίζονται με παύλα.

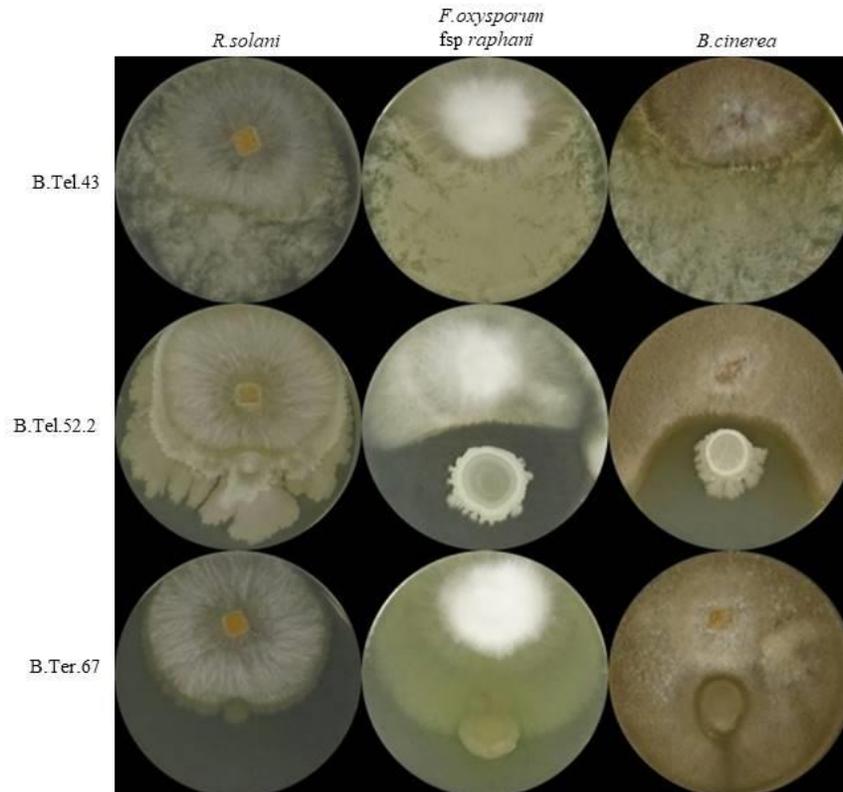
Πίνακας 4.3 Τύποι αλληλεπίδρασης μεταξύ ενδοφυτικών βακτηρίων και των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum fsp raphani* και *Botrytis cinerea*.

<u>Κωδικό όνομα βακτηρίου</u>	<u><i>Rhizoctonia solani</i></u>	<u><i>Fusarium oxysporum fsp raphani</i></u>	<u><i>Botrytis cinerea</i></u>
<b>B.Tel.31</b>	1.1-1.2	1.1-2	3
<b>B.Tel.33b</b>	1.1	4	3
<b>B.Tel.34</b>	1.1-2	2	3
<b>B.Tel.36a</b>	1.1-1.2-2	2	3
<b>B.Tel.40</b>	1.1-2-3	2	3.1
<b>B.Tel.42</b>	2-3	2-3	3.1
<b>B.Tel.43</b>	1.1-2	2	2
<b>B.Tel.46</b>	1.1-1.2-2	3	3.1
<b>B.Tel.47</b>	2-3	1.2-2-3	1.2
<b>B.Tel.51</b>	2-3	2-3	1.2
<b>B.Tel.52.2</b>	1.1-1.2-2	1.2-3	3.1
<b>B.Tel.54</b>	1.1- 2	1.1-2-3	3.1
<b>B.Ter.61</b>	2	1.1-2	3
<b>B.Ter.62</b>	1.1-2-3	1.1-1.2-2	3.1
<b>B.Ter.67</b>	1.1	2	3.1
<b>B.Ter.70</b>	1.1-1.2-2	2	3.1
<b>B.Ter.73</b>	1.1	1.2-2	3.1
<b>B.Ter.74</b>	1.1-2	2	1.2
<b>B.Ter.78</b>	1.1-1.2-2	2	3
<b>B.Ter.79</b>	1.1-2-3	2	3.1
<b>B.Ter.80a</b>	1.1-2	2	3
<b>B.Ter.82</b>	1.1	2	3
<b>B.Ter.84</b>	1.2-2	2	3
<b>B.Ter.86</b>	1.2-2	2	3.1
<b>B.Ter.90</b>	1.1-2	3	3.1

Να σημειωθεί, επίσης, πως υπάρχουν κάποιοι φαινότυποι που εμφανίστηκαν στα ενδοφυτικά βακτήρια και των δύο ιστών, καθώς και κάποιοι που εμφανίστηκαν μόνο στον έναν. Για παράδειγμα, οι αποικίες και το μοτίβο αλληλεπίδρασης των B.Tel.43 και B.Ter.74 είναι παρόμοια. Αντιθέτως, ο φαινότυπος των απομονώσεων B.Tel.42,47,51 παρατηρείται μόνο σε βακτήρια που απομονώθηκαν από φύλλα και ο φαινότυπος των B.Ter.70,84 μόνο σε βακτήρια της ρίζας.

Ένα ακόμα φαινόμενο που παρατηρήθηκε και πρέπει να τονιστεί ήταν η αλλαγή του τύπου αλληλεπίδρασης ενός βακτηρίου ανάλογα με το μύκητα που ήταν απέναντι του. Ωστόσο, δε συνέβη σε όλα τα βακτήρια, καθώς κάποια εμφάνισαν τον ίδιο τύπο σε όλους τους μύκητες. Στην

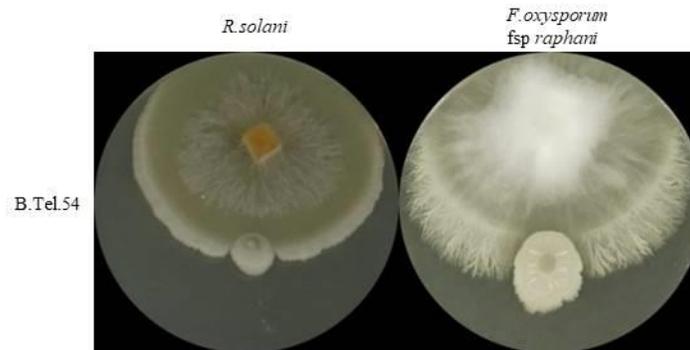
εικόνα 4.7 υπάρχουν παραδείγματα όπου ένα βακτήριο αντιδρά με τον ίδιο τρόπο στους 3 φυτοπαθογόνους μύκητες, ένα διαφορετικό βακτήριο στους 2 από τους 3 και ένα άλλο σε κανένα από τους τρεις.



Εικόνα 4.7 Παραδείγματα βακτηρίων που εμφανίζουν ίδιο τύπο αλληλεπίδρασης με όλους τους φυτοπαθογόνους μύκητες (B.Tel.43), με δύο φυτοπαθογόνους μύκητες (B.Tel.52.2), με κανένα από τους φυτοπαθογόνους μύκητες (B.Ter.67).

Η απομόνωση B.Tel.43 εμφανίζει τον ίδιο τύπο αλληλεπίδρασης, ειδικότερα ομαδική κίνηση και είσοδος στην περιοχή του μύκητα (τύπος 2), και με τους τρεις φυτοπαθογόνους μύκητες. Μια μικρή διαφορά είναι ότι κυκλώνει το *R.solani* ενώ με τους άλλους δύο δημιουργείται απλή επαφή. Στη συνέχεια, η απομόνωση B.Tel.52.2 εμφανίζει τον ίδιο τύπο, συγκεκριμένα ζώνη παρεμπόδισης (τύπος 3), στους μύκητες *F. oxysporum* fsp *raphani* και *B.cinerea*. Μια μικρή διαφορά, πάλι, είναι ότι με τον τελευταίο κινείται έντονα προς τα πίσω. Τέλος, το βακτήριο B.Ter.67 εμφανίζει ξεκάθαρα διαφορετικό τύπο αλληλεπίδρασης και με τους τρεις φυτοπαθογόνους μύκητες, καθώς με το *R.solani* παρατηρείται ομαδική κίνηση και επαφή με κύκλωμα του μύκητα (1.1), με το *F.oxysporum* παρατηρείται είσοδος στην περιοχή του μύκητα (2) και με το *B. cinerea* δημιουργείται ζώνη παρεμπόδισης.

Επιπροσθέτως, μια βακτηριακή απομόνωση μπορεί να εμφανίζει τον ίδιο τύπο αλληλεπίδρασης (π.χ. να εισέρχεται στην περιοχή του μύκητα) αλλά να παρουσιάζει διαφορετικό μοτίβο (Εικ. 4.8).



Εικόνα 4.8 Παράδειγμα αλληλεπίδρασης ενδοφυτικού βακτηρίου και φυτοπαθογόνων μυκήτων όπου ο τύπος 2 (ομαδική κίνηση του βακτηρίου και είσοδος στην περιοχή του μύκητα) αλλάζει μοτίβο ανάλογα με το αν ο φυτοπαθογόνος μύκητας είναι ο *R.solani* ή ο *F. oxysporum fsp raphani*.

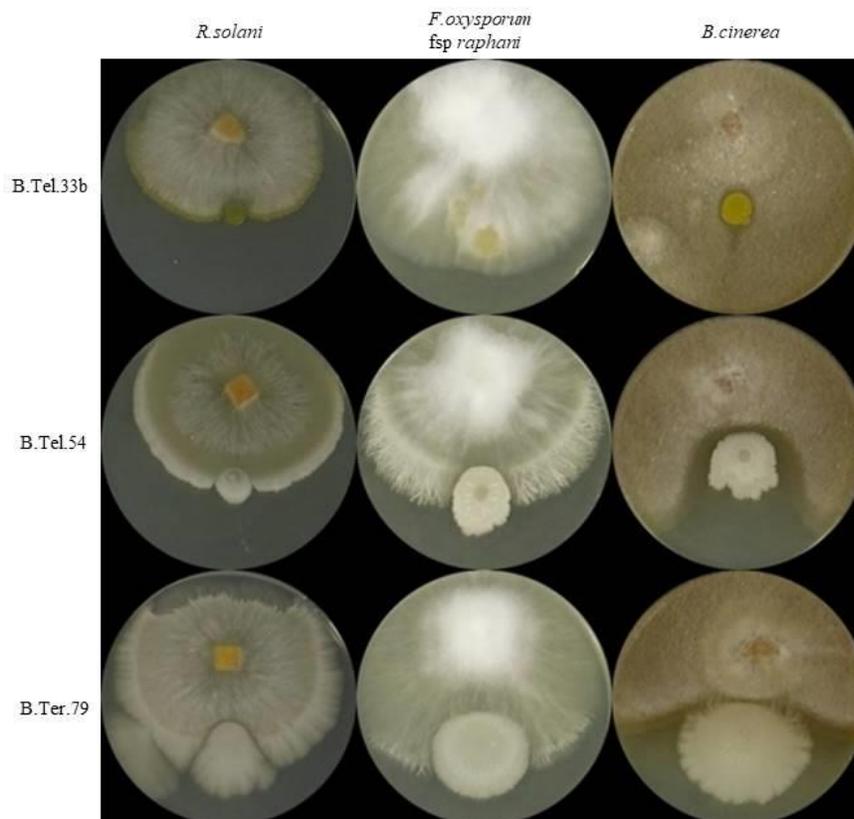
Άλλο ένα φαινόμενο που παρατηρήθηκε σε κάποιες αλληλεπιδράσεις ενδοφυτικών βακτηρίων-φυτοπαθογόνων μυκήτων είναι η αλλαγή της μορφολογίας της μακροαποικίας του βακτηρίου ανάλογα με το μύκητα που έχει απέναντι του (Εικ. 4.9).



Εικόνα 4.9 Παράδειγμα βακτηρίου του οποίου αλλάζει η μορφολογία της μακροαποικίας ανάλογα με το φυτοπαθογόνο μύκητα που βρίσκεται απέναντι του.

Όπως φαίνεται και από τις εικόνες 4.4-4.6 η ένταση και το μοτίβο του κάθε τύπου επηρεάζει και την παρεμπόδιση των φυτοπαθογόνων μυκήτων *in vitro*. Η ένταση της ομαδικής κίνησης του βακτηρίου, η έκταση της εισόδου στην περιοχή του μύκητα, αλλά και το μέγεθος της ζώνης παρεμπόδισης επηρεάζει την ικανότητα ανταγωνισμού των βακτηρίων. Έτσι, δεν είναι όλα τα βακτήρια ανταγωνιστικά σε όλους τους μύκητες. Για παράδειγμα, η βακτηριακή απομόνωση B.Tel.33b δεν είναι καθόλου ανταγωνιστική ως προς το *F.oxysporum* (Εικ. 4.10) αλλά φαίνεται

να είναι ανταγωνιστική ως προς το *R.solani* (Εικ. 4.10). Επίσης, δεν είναι ανταγωνιστική ως προς το *B.cinerea* καθώς η ζώνη παρεμπόδισης που σχηματίζεται είναι πολύ μικρή (Εικ. 4.10). Ένα άλλο παράδειγμα είναι το βακτήριο B.Tel.54 το οποίο φαίνεται να είναι ανταγωνιστικό ως προς το *R.solani* και λιγότερο ως προς τον *B.cinerea* (Εικ. 4.10). Όσον αφορά την ανταγωνιστικότητα του στο *F.oxysporum* δεν μπορεί να βγει ασφαλές συμπέρασμα με τη μακροσκοπική παρατήρηση. Αυτό συμβαίνει διότι δεν είναι ξεκάθαρο το τι περιλαμβάνει αυτή η δομή που σχηματίζεται και αν ο μύκητας είναι ενεργός. Τελευταίο παράδειγμα είναι το βακτήριο B.Ter.79 το οποίο φαίνεται να είναι ανταγωνιστικό έναντι του *R.solani* και του *B. cinerea*. Ωστόσο, δε φαίνεται να είναι ιδιαίτερα ανταγωνιστικό ως προς το *F.oxysporum* καθώς οι υφές μεγαλώνουν, αν και χρήζει περισσότερης διερεύνησης για το αν ο μύκητας είναι ενεργός στα σημεία όπου φαίνεται να τον καλύπτει το βακτήριο.



Εικόνα 4.10 Παραδείγματα ικανότητας παρεμπόδισης των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum fsp raphani* και *Botrytis cinerea* από βακτηριακές απομονώσεις.

Ακολουθεί ο συγκεντρωτικός πίνακας με την αρχική εκτίμηση της ικανότητας ή μη ανταγωνισμού του κάθε βακτηρίου που απομονώθηκε με βάση τη μακροσκοπική παρατήρηση *in vitro* (Πιν. 4.4).

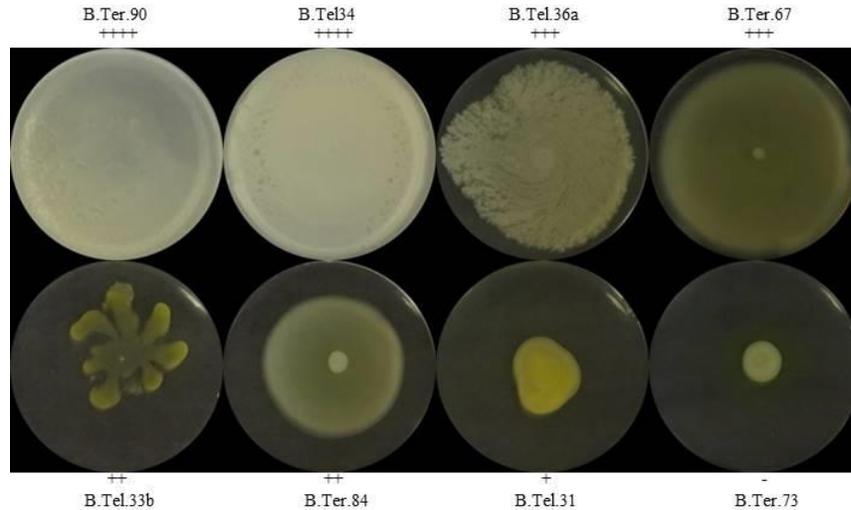
**Πίνακας 4.4** Αρχική εκτίμηση της ικανότητας παρεμπόδισης της ανάπτυξης των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* fsp *raphani*, *Botrytis cinerea* από τα απομονωθέντα ενδοφυτικά βακτήρια (N: Παρεμποδίζει, O: Δεν παρεμποδίζει, Δ: Περαιτέρω διερεύνηση ικανότητας ανταγωνισμού).

<u>Κωδικό όνομα βακτηρίου</u>	<u>Ανταγωνιστικότητα βακτηρίου</u>		
	<u><i>Rhizoctonia solani</i></u>	<u><i>Fusarium oxysporum</i> fsp <i>raphani</i></u>	<u><i>Botrytis cinerea</i></u>
B.Tel.31	N	Δ	N
B.Tel.33b	N	O	O
B.Tel.34	N	Δ	O
B.Tel.36a	N	N	O
B.Tel.40	N	Δ	N
B.Tel.42	N	Δ	N
B.Tel.43	N	N	N
B.Tel.46	N	N	N
B.Tel.47	N	Δ	N
B.Tel.51	N	Δ	N
B.Tel.52.2	N	N	N
B.Tel.54	N	Δ	N
B.Ter.61	N	Δ	N
B.Ter.62	N	Δ	O
B.Ter.67	N	N	O
B.Ter.70	N	N	O
B.Ter.73	N	N	O
B.Ter.74	N	N	N
B.Ter.78	N	N	O
B.Ter.79	N	Δ	N
B.Ter.80a	N	N	O
B.Ter.82	N	N	O
B.Ter.84	N	N	O
B.Ter.86	N	N	O
B.Ter.90	N	N	N

#### 4.1.2.4 Ομαδική κίνηση (Swarming Motility)

Η ομαδική κίνηση μελετήθηκε διότι είναι πολύ σημαντική για τα βακτήρια που αλληλεπιδρούν με τα φυτά, αφού βοηθάει στην προσέγγιση του φυτού και την αποίκιση των ιστών (Venieraki et al., 2016).

Από τα 25 απομονωμένα βακτήρια που μελετήθηκαν τα 24 πραγματοποιούν ομαδική κίνηση σε ημι-στερεό θρεπτικό μέσο (Πιν. 4.5). Η ένταση που παρατηρήθηκε διέφερε για κάθε βακτήριο και αποτυπώνεται στην εικόνα 4.11, όπου υπάρχουν αντιπροσωπευτικά παραδείγματα.



Εικόνα 4.11. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα από τον *in vitro* έλεγχο της ικανότητας ομαδικής κίνησης, όπου 10μl βακτηριακής καλλιέργειας τοποθετήθηκαν στο κέντρο ημι-στερεού θρεπτικού μέσου ΝΑ με 0.5% συγκέντρωση άγαρ υπό μορφή κηλίδας (spot) και έγινε επώαση στους 30 °C. Η επώαση διήρκησε τέσσερις μέρες. Η ικανότητα ομαδικής κίνησης ποίκιλλε από μεγάλη την πρώτη μέρα (B.Ter.90, B.Tel.34), μεγάλη τις επόμενες μέρες (B.Tel.36a, B.Ter.67), έως μέτρια (B.Tel.33b, B.Ter.84), μικρή (B.Tel.31) ή καθόλου (B.Ter.73).

Ο παρακάτω πίνακας (Πιν. 4.5) συγκεντρώνει τα αποτελέσματα όσον αφορά την ομαδική κίνηση και την ένταση της από όλα τα επιλεγμένα βακτήρια.

Πίνακας 4.5. Η ικανότητα και ένταση της ομαδικής κίνησης κάθε βακτηριακής απομόνωσης με βάση τη διάμετρο της αποικίας σε ημι-στερεό θρεπτικό μέσο NA με συγκέντρωση άγαρ 0.5% μετά από επώαση στους 30 °C (++++: 9 cm την πρώτη επώασης, +++: 9 cm έως τις 4 μέρες επώασης, ++: 3-9 cm έως τις 4 μέρες επώασης, +: <3 cm έως τις 4 μέρες επώασης, - : δεν πραγματοποιεί ομαδική κίνηση).

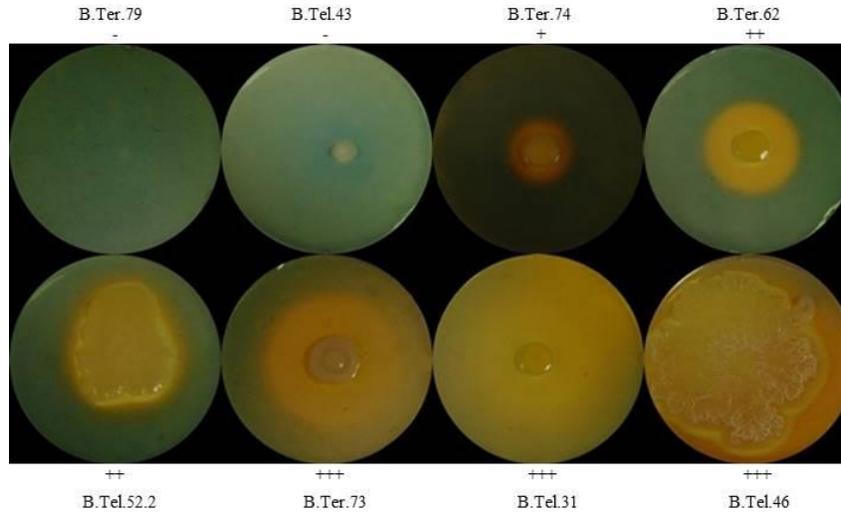
<u>Κωδικό όνομα βακτηρίου</u>	<u>Ένταση ομαδικής κίνησης</u>	<u>Κωδικό όνομα βακτηρίου</u>	<u>Ένταση ομαδικής κίνησης</u>
B.Tel.31	+	B.Ter.62	++++
B.Tel.33b	++	B.Ter.67	+++
B.Tel.34	++++	B.Ter.70	+
B.Tel.36a	+++	B.Ter.73	-
B.Tel.40	++	B.Ter.74	+++
B.Tel.42	+++	B.Ter.78	++
B.Tel.43	+++	B.Ter.79	++
B.Tel.46	++++	B.Ter.80a	+++
B.Tel.47	++++	B.Ter.82	++
B.Tel.51	++++	B.Ter.84	++
B.Tel.52.2	++++	B.Ter.86	+++
B.Tel.54	++++	B.Ter.90	++++
B.Ter.61	++++		

#### 4.1.2.5 Παραγωγή σιδηροφόρων

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό γνώρισμα (trait) των μικροοργανισμών που προωθούν την ανάπτυξη των φυτών και προέρχονται από το έδαφος είναι η παραγωγή σιδηροφόρων, μικρών μορίων που συμπλοκοποιούν το σίδηρο και τον καθιστούν βιοδιαθέσιμο για τα φυτά αλλά όχι για τα φυτοπαθογόνα (Ahmed & Holmström, 2014).

Αυτό το χαρακτηριστικό ελέγχεται *in vitro* με την τοποθέτηση κηλίδας (spot) καλλιέργειας σε στερεό θρεπτικό μέσο CAS (Chrome Azurol S) και την παρατήρηση σχηματισμού πορτοκαλί άλω μετά από επώαση. Η πορτοκαλί άλως είναι αποτέλεσμα παραγωγής σιδηροφόρων που απομακρύνουν το σίδηρο από το σύμπλοκο της χρωστικής με αποτέλεσμα το χρώμα του μέσου να αλλάζει σε πορτοκαλί (Schwyn & Neilands, 1987).

Στη μελέτη αυτή, 20 από τα 25 βακτήρια παρήγαγαν σιδηροφόρα (Πίν.4.6) όπως υποδεικνύεται από το σχηματισμό πορτοκαλί άλω γύρω από την κηλίδα τους (Εικ.4.12). Η έκταση της άλω και άρα της παραγωγής σιδηροφόρων διαφέρει από απομόνωση σε απομόνωση (Πιν. 4.6).



**Εικόνα 4.12** Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα της *in vitro* δοκιμασίας παραγωγής σιδηροφόρων. Ποσότητα 10 μl βακτηριακής καλλιέργειας τοποθετήθηκε υπό μορφή κηλίδας στο κέντρο τρυβλίου με στερεό θρεπτικό μέσο CAS και επώστηκαν για 4 μέρες στους 30 °C. Η ποικιλομορφία της άλω από καθόλου αλλαγή χρώματος έως αλλαγή χρώματος όλου του μέσου φαίνεται στην εικόνα.

Στην εικόνα διαφαίνεται πέρα από την διαφορετική έκταση της αλλαγής του χρώματος του μέσου, και η διαφορετική ανάπτυξη των αποικιών. Για παράδειγμα, το βακτήριο B.Ter.79 δεν αναπτύσσεται καθόλου, πιθανώς λόγω ανικανότητας ανάπτυξης στο συγκεκριμένο μέσο. Το βακτήριο B.Tel.43 σχηματίζει αποικία χωρίς να παράγει σιδηροφόρα. Ακόμη, τα βακτήρια B.Tel.52.2 και B.Tel.46 μεταχρωματίζουν το μέσο περίπου ανάλογα με το μέγεθος της αποικίας τους η οποία είναι πολύ εκτεταμένη. Σε αντίθεση, η απομόνωση B.Tel.31 μεταχρωματίζει όλο το μέσο ενώ η αποικία της δεν είναι εκτεταμένη.

Ο Πίνακας 4.6 συγκεντρώνει τα αποτελέσματα της έντασης παραγωγής σιδηροφόρων για κάθε βακτηριακή απομόνωση.

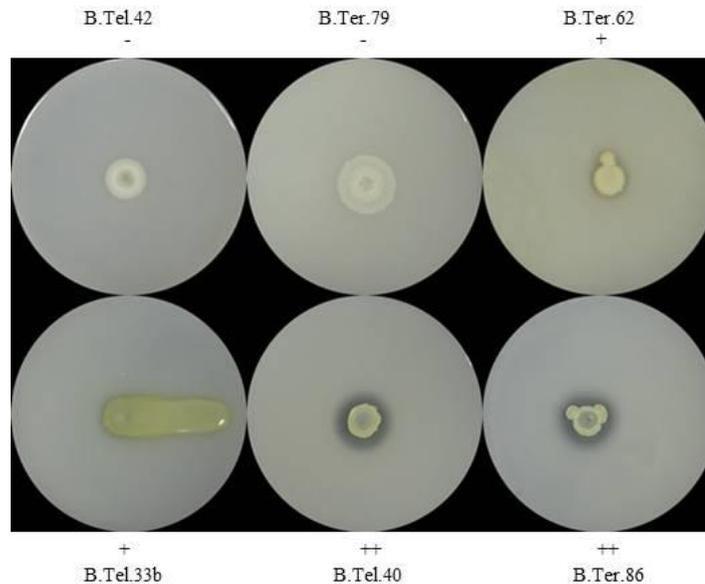
Πίνακας 4.6. Η ικανότητα και ένταση παραγωγής σιδηροφόρων από τις βακτηριακές απομονώσεις με βάση τη διάμετρο ( $\delta$ ) της πορτοκαλί άλω σε στερεό θρεπτικό μέσο CAS μετά από επώαση στους 30 °C για 4 μέρες ( +++ :  $\delta=7-9$  cm, ++ :  $4 \leq \delta < 7$ , + :  $\delta < 4$ , - : καθόλου άλω).

<u>Κωδικό όνομα βακτηρίου</u>	<u>Παραγωγή σιδηροφόρων</u>	<u>Κωδικό όνομα βακτηρίου</u>	<u>Παραγωγή σιδηροφόρων</u>
B.Tel.31	+++	B.Ter.62	++
B.Tel.34	+	B.Ter.67	+++
B.Tel.33b	+	B.Ter.70	+++
B.Tel.36a	+++	B.Ter.73	+++
B.Tel.40	++	B.Ter.74	+
B.Tel.42	-	B.Ter.78	+++
B.Tel.43	-	B.Ter.79	-
B.Tel.46	+++	B.Ter.80a	++
B.Tel.47	-	B.Ter.82	+++
B.Tel.51	-	B.Ter.84	+++
B.Tel.52.2	++	B.Ter.86	+++
B.Tel.54	+++	B.Ter.90	+++
B.Ter.61	+		

#### 4.1.2.6 Διαλυτοποίηση φωσφόρου

Άλλο ένα σημαντικό χαρακτηριστικό (trait) της προαγωγής ανάπτυξης των φυτών είναι η διαλυτοποίηση του φωσφόρου. Αυτό το χαρακτηριστικό μπορεί να ελεγχθεί *in vitro* με το σχηματισμό διαφανής άλω γύρω από την κηλίδα (spot) του βακτηρίου σε στερεό θρεπτικό μέσο PVK.

Από τα 25 απομονωμένα βακτήρια, τα 14 έχουν την ικανότητα να διαλυτοποιούν το φωσφόρο με διαφορετική έκταση της διαφανής άλω (Πιν. 4.7). Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα βρίσκονται στην Εικόνα 4.13.



Εικόνα 4.13 Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα δοκιμασίας ικανότητας διαλυτοποίησης φωσφόρου *in vitro*. 10 μl βακτηριακής καλλιέργειας τοποθετήθηκαν υπό μορφή κηλίδας στο κέντρο στερεού θρεπτικού μέσου PVK και έγινε επώαση στους 30 °C για 7 μέρες. Στην εικόνα φαίνονται οι διαφορετικές εκτάσεις της διαφανής άλω από καθόλου έως μεγάλη.

Ο Πίνακας 4.7 συγκεντρώνει τα αποτελέσματα της έντασης διαλυτοποίησης φωσφόρου για κάθε βακτηριακή απομόνωση.

Πίνακας 4.7 Η ικανότητα και ένταση διαλυτοποίησης φωσφόρου κάθε απομονωμένου βακτηρίου με βάση τη διάμετρο της διαφανής ζώνης (συμπεριλαμβάνοντας τη διάμετρο της αποικίας) σε στερεό θρεπτικό μέσο PVK μετά από επώαση στους 30 °C για 7 μέρες (++ :  $\delta > 1.5$  cm, + :  $\delta \leq 1.5$  cm, - : καθόλου διαφανής ζώνη).

<u>Κωδικό όνομα βακτηρίου</u>	<u>Ένταση διαλυτοποίησης φωσφόρου</u>	<u>Κωδικό όνομα βακτηρίου</u>	<u>Ένταση διαλυτοποίησης φωσφόρου</u>
B.Tel.31	++	B.Ter.62	+
B.Tel.34	-	B.Ter.67	+
B.Tel.33b	+	B.Ter.70	++
B.Tel.36a	++	B.Ter.73	++
B.Tel.40	++	B.Ter.74	++
B.Tel.42	-	B.Ter.78	++
B.Tel.43	-	B.Ter.79	-
B.Tel.46	-	B.Ter.80a	++
B.Tel.47	-	B.Ter.82	++
B.Tel.51	-	B.Ter.84	++
B.Tel.52.2	+	B.Ter.86	++
B.Tel.54	-	B.Ter.90	-
B.Ter.61	-		

Ακολουθεί ο συγκεντρωτικός πίνακας με τους τύπους αλληλεπίδρασης ενδοφυτικών βακτηρίων-φυτοπαθογόνων μυκήτων, την αρχική εκτίμηση της ικανότητας ή μη ανταγωνισμού του κάθε ενδοφυτικού βακτηρίου που απομονώθηκε με βάση τη μακροσκοπική παρατήρηση *in vitro*, καθώς και τα αποτελέσματα ελέγχου ομαδικής κίνησης, παραγωγής σιδηροφόρων και διαλυτοποίησης φωσφόρου (Πιν. 4.8).

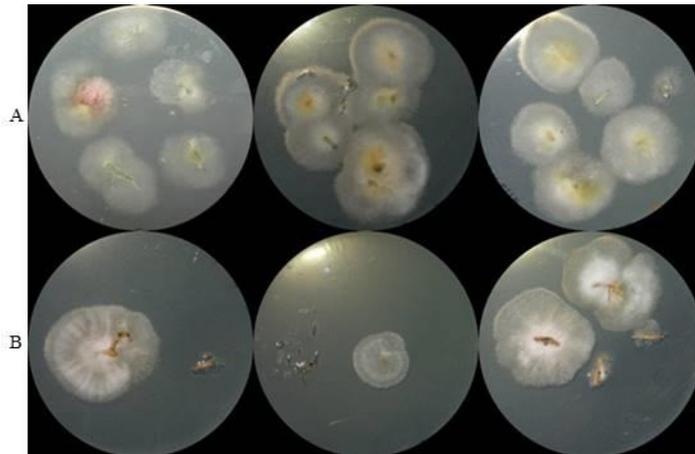
Πίνακας 4.8. Συγκεντρωτικός πίνακας με όλα τα χαρακτηριστικά προώθησης της ανάπτυξης των φυτών των απομονωμένων ενδοφυτικών βακτηρίων. Η σειρά των βακτηρίων είναι ανάλογη με τη σειρά που βρίσκονται στο φυλογενετικό δέντρο.

	Κωδικό όνομα βακτηρίου	<i>In vitro</i> αλληλεπίδραση/ ανταγωνιστική ικανότητα			Ομαδική κίνηση (swarming)	Παραγωγή σιδηροφόρων	Διαλυτοποίηση φωσφόρου
		R.s.	F.ox.	B.c.			
Bacillus sp.	B.Ter74	1.1-2/N	2/N	1.2/N	+++	+	++
	B.Tel43	1.1-2/N	2/N	2/N	+++	-	-
	B.Tel47	2-3/N	1.2-2-3/Δ	1.2/N	++++	-	-
	B.Ter79	1.1-2-3/N	2/Δ	3.1/N	++	-	-
	B.Tel40	1.1-2-3/N	2/Δ	3.1/N	++	++	++
	B.Tel51	2-3/N	2-3/Δ	1.2/N	++++	-	-
	B.Tel42	2-3/N	2-3/Δ	3.1/N	+++	-	-
	B.Ter62	1.1-2-3/N	1.1-1.2-2/Δ	3.1/O	++++	++	+
	B.Tel34	1.1-2/N	2/Δ	3/O	++++	+	-
	B.Ter61	2/N	1.1-2/Δ	3/N	++++	+	-
	B.Tel54	1.1-2/N	1.1-2-3/Δ	3.1/N	++++	+++	-
	B.Tel52.2	1.1-1.2-2/N	1.2-3/N	3.1/N	++++	++	+
	B.Tel46	1.1-1.2-2/N	3/N	3.1/N	++++	+++	+
B.Ter90	1.1-2/N	3/N	3.1/N	++++	+++	-	
Pseudomonas sp.	B.Tel31	1.1-1.2/N	1.1-2/Δ	3/N	++	+++	++
	B.Ter82	1.1/N	2/N	3/O	++	+++	++
	B.Ter73	1.1/N	1.2-2/N	3.1/O	-	+++	++
	B.Ter78	1.1-1.2-2/N	2/N	3/O	++	+++	++
	B.Ter80a	1.1-2/N	2/N	3/O	+++	++	++
	B.Tel36a	1.1-1.2-2/N	2/N	3/O	+++	+++	++
	B.Ter84	1.2-2/N	2/N	3/O	++	+++	++
	B.Ter70	1.1-1.2-2/N	2/N	3.1/O	+	+++	++
	B.Ter86	1.2-2/N	2/N	3.1/O	+++	+++	+
	B.Ter67	1.1/N	2/N	3.1/O	+++	+++	+
Erwinia sp.	B.Tel33b	1.1/N	4/O	3/O	++	+	+

## 4.2 Απομόνωση και χαρακτηρισμός ενδοφυτικών μυκήτων από το φυτό *Teucrium polium*

### 4.2.1 Απομόνωση ενδοφυτικών μυκήτων

Για την απομόνωση ενδοφυτικών μυκήτων τεμαχισμένα τμήματα φύλλων και ρίζας τοποθετήθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο PDA και επώαστηκαν στους 25 °C για περίπου 2 εβδομάδες, έως ότου εμφανιστούν διακριτά οι μυκηλιακές υφές (Εικ. 4.14).

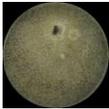
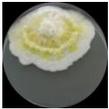
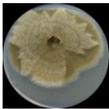
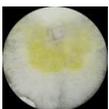
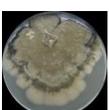
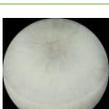


Εικόνα 4.14 Τμήματα φύλλου (A) και ρίζας (B) του φυτού *Teucrium polium* τοποθετημένα σε στερεό θρεπτικό μέσο PDA από όπου αναδύονται μύκητες.

Στη συνέχεια, κάθε μύκητας απομονώθηκε από τα αρχικά τρυβλία και καλλιεργήθηκε με τον ίδιο τρόπο. Η παρατήρηση των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών οδήγησε σε διαχωρισμό των μιγμάτων των απομονωμένων μυκήτων. Κάθε μύκητας υπέστη ανακαλλιέργειες έως ότου γίνει ξεκάθαρο ότι η καλλιέργεια είναι αξενική.

Από τα φύλλα και τις ρίζες του φυτού αποκτήθηκαν συνολικά 65 μύκητες, οι οποίοι εξετάστηκαν ως προς τη μορφολογική ομοιότητα μακροσκοπικά και περιορίστηκαν στους 23. Στους 23 συμπεριλήφθηκαν κάποιοι παρόμοιοι μορφότυποι για λόγους επιβεβαίωσης. Από αυτούς 13 παραλήφθησαν από τη ρίζα του φυτού και 10 από τα φύλλα, στους οποίους δόθηκαν κωδικά ονόματα (Πίν. 4.9). Τα κωδικά ονόματα προκύπτουν από το όνομα των μυκήτων (Fungi), το γένος του φυτού (*Teucrium*) και το μέρος του φυτού από το οποίο προέρχονται (leaves ή root). Οι 23 μύκητες αποθηκεύτηκαν σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο PDA στους 4 °C.

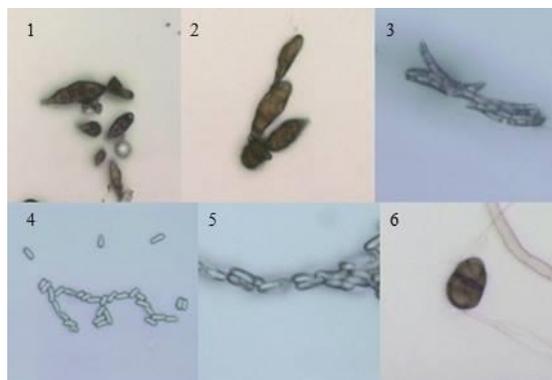
Πίνακας 4.9 Τα κωδικά ονόματα και οι μορφότυποι των απομονωμένων μυκήτων που χαρακτηρίστηκαν.

Κωδικό όνομα μύκητα	Μορφότυπος	Κωδικό όνομα μύκητα	Μορφότυπος	Κωδικό όνομα μύκητα	Μορφότυπος
F.Tel.1		F.Tel.13		F.Ter.7	
F.Tel.2		F.Tel.14		F.Ter.8	
F.Tel.5		F.Ter.1		F.Ter.9	
F.Tel.6		F.Ter.2.1		F.Ter.10	
F.Tel.7		F.Ter.2.2		F.Ter.12	
F.Tel.8		F.Ter.3		F.Ter.13	
F.Tel.9		F.Ter.5		F.Ter.14	
F.Tel.10		F.Ter.6			

## 4.2.2 Χαρακτηρισμός ενδοφυτικών μυκήτων

### 4.2.2.1 Μικροσκοπική παρατήρηση

Οι απομονωμένοι μύκητες παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο και φωτογραφήθηκαν τα σπόρια τους (Εικ. 4.15).



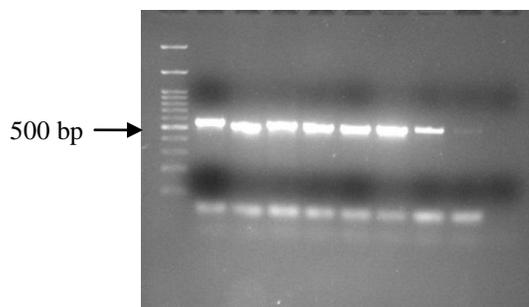
**Εικόνα 4.15** Μικροσκοπικές παρατηρήσεις σπορίων των απομονωθέντων ενδοφυτικών μυκήτων (40x) (1: F.Tel.5, 2: F.Tel.6, 3: F.Tel.14, 4: F.Ter.2.2, 5: F.Ter.10, 6: F.Tel.1).

Κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση κάποιων ενδοφυτικών μυκήτων παρατηρήθηκαν σπόρια που ήταν χαρακτηριστικά για συγκεκριμένα γένη. Για παράδειγμα, οι απομονώσεις F.Tel.5, F.Tel.6, F.Tel.1 (Εικ.4.15) διαθέτουν σπόρια όμοια με του γένους *Alternaria*. Επίσης, η απομόνωση F.Tel.14 (Εικ.4.15) έχει σπόρια όμοια με του γένους *Fusarium*. Ωστόσο, ακριβής ταξινόμηση απαιτεί μοριακή ταυτοποίηση.

#### 4.2.2.2 Μοριακή ταυτοποίηση

Οι μύκητες που απομονώθηκαν από τους ιστούς φύλλο και ρίζα του φυτού *Teucrium polium* ταυτοποιήθηκαν με τη βοήθεια των ITS (internal transcribed space) rDNA αλληλουχιών τους. Η περιοχή ITS συμπεριλαμβάνει τις περιοχές ITS1 και ITS2 που βρίσκονται εκατέρωθεν της συντηρημένης περιοχής 5.8S. Αυτή η αλληλουχία έχει γίνει αποδεκτή ως πρότυπος δείκτης για ταυτοποίηση μυκήτων, καθώς έχει δείξει τη μεγαλύτερη πιθανότητα σωστής ταυτοποίησης για ένα μεγάλο αριθμό μυκήτων (Schoch et al., 2012).

Για την απομόνωση των ITS τμημάτων πραγματοποιήθηκαν αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης με εκφυλισμένους εκκινητές, των οποίων τα προϊόντα (Εικ. 4.16) καθαρίστηκαν και αλληλουχήθηκαν.



**Εικόνα 4.16** Τμήματα (600 bp) ITS rDNA σε πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης 1.5 % μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης. Στην πρώτη στήλη φαίνεται ο μάρτυρας και ακολουθούν τα δείγματα των μυκήτων.

Για την απόδοση γένους στους μύκητες με βάση τα αποτελέσματα της αλληλούχισης, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα BLASTn της βάσης δεδομένων GenBank. Στην ανάλυση βρέθηκαν ως πολυπληθέστερα τα γένη *Alternaria*, *Fusarium*, *Chaetomium*. Αναλυτικά η ταξινόμηση και τα ποσοστά ομοιότητας φαίνονται στον Πίνακα 4.10.

**Πίνακας 4.10** Ταξινόμηση των απομονωθέντων ενδοφυτικών μυκήτων με βάση την υποβολή της αλληλουχίας DNA των μεταγραφόμενων μεσοδιαστημάτων ITS1 και ITS και του 5.8S rRNA γονιδίου στο πρόγραμμα BLAST.

<u>Κωδικό όνομα μύκητα</u>	<u>Ομοιότητα</u>	<u>Πιθανά είδη</u>	<u>Ταξινόμηση σε γένος</u>
<b>F.Tel.1</b>	98%	<i>Alternaria tenuissima</i>	<i>Alternaria</i>
<b>F.Tel.2</b>	100%	>6	<i>Alternaria</i>
<b>F.Tel.5</b>	100%	<i>Alternaria alternata</i> <i>Fungal endophyte isolate</i> <i>Alternaria tenuissima</i> <i>Alternaria brassicicola</i> <i>Alternaria brassicae</i>	<i>Alternaria</i>
<b>F.Tel.6</b>	99%	<i>Alternaria tenuissima</i> <i>Fungal endophyte isolate</i> <i>Alternaria arborescens</i>	<i>Alternaria</i>
<b>F.Tel.7</b>	96%	<i>Epicoccum sp.</i>	<i>Epicoccum</i>
<b>F.Tel.8</b>	99%	<i>Alternaria alternata</i> <i>Alternaria sp.</i> <i>Alternaria dausifolii</i> <i>Alternaria tenuissima</i> <i>Alternaria brassicicola</i> <i>Fungal endophyte isolate</i>	<i>Alternaria</i>
<b>F.Tel.9</b>	100%	<i>Alternaria alternate</i> <i>Alternaria brassicicola</i> <i>Alternaria brassicae</i> <i>Fungal endophyte isolate</i> <i>Alternaria quercus</i>	<i>Alternaria</i>

Πίνακας 4.10 (συνέχεια)

<b>F.Tel.10</b>	99%	<i>Chaetomium globosum</i> <i>Chaetomium sp.</i> <i>Chaetomium cochlioides</i>	<i>Chaetomium</i>
<b>F.Tel.13</b>	99%	<i>Chaetomium globosum</i> <i>Chaetomium sp.</i> <i>Chaetomium cochlioides</i>	<i>Chaetomium</i>
<b>F.Tel.14</b>	99%	<i>Fusarium sambucinum</i> <i>Fusarium sp.</i> <i>Giberella pulicaris (teleomorph)</i>	<i>Fusarium</i>
<b>F.Ter.1</b>	100%	<i>Didymella sp.</i> <i>Phoma tropica</i>	<i>Didymella</i> <i>Phoma</i>
<b>F.Ter.2.1</b>	100%	<i>Fusarium sp.</i> <i>Fusarium equiseti</i>	<i>Fusarium</i>
<b>F.Ter.2.2</b>	100%	<i>Boeremia exigua</i>	<i>Boeremia</i>
<b>F.Ter.3</b>	99%	<i>Chaetomium globosum</i> <i>Chaetomium sp.</i> <i>Chaetomium cochlioides</i>	<i>Chaetomium</i>
<b>F.Ter.5</b>	100%	<i>Fusarium sp.</i> <i>Fusarium incarnatum</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Fusarium camptoceras</i>	<i>Fusarium</i>
<b>F.Ter.6</b>	100%	<i>Fusarium equiseti</i>	<i>Fusarium</i>
<b>F.Ter.7</b>	100%	<i>Fusarium sp.</i> <i>Fusarium equiseti</i>	<i>Fusarium</i>
<b>F.Ter.8</b>	99%	<i>Chaetomium globosum</i> <i>Chaetomium sp.</i> <i>Chaetomium cochlioides</i>	<i>Chaetomium</i>
<b>F.Ter.9</b>	100%	<i>Fusarium sp.</i> <i>Fusarium equiseti</i>	<i>Fusarium</i>
<b>F.Ter.10</b>	100%	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Fusarium</i>
<b>F.Ter.12</b>	92%	<i>Uncultured fungus clone</i> <i>Fusarium equiseti</i>	<i>Fusarium</i>
<b>F.Ter.13</b>	99%	<i>Fusarium chlamydosporum</i>	<i>Fusarium</i>
<b>F.Ter.14</b>	100%	<i>Fusarium chlamydosporum</i> <i>Fusarium sp.</i> <i>Fusarium equiseti</i>	<i>Fusarium</i>

Οι περισσότερες αλληλουχίες ταυτίστηκαν σε μεγάλο ποσοστό με πάνω από μία αλληλουχίες της βάσης δεδομένων με το ίδιο σκορ. Ακόμη, κάποιες αλληλουχίες ταυτίστηκαν καλύτερα με μία αλληλουχία της βάσης δεδομένων, στην οποία δεν είχε αποδοθεί γένος. Έτσι, δεν ήταν δυνατός ο ακριβής προσδιορισμός του είδους και εφεξής θα αναφέρονται μόνο με τα γένη τους.

Στα φύλλα βρέθηκε κυρίως το γένος *Alternaria*, στη ρίζα κυρίως το γένος *Fusarium* ενώ και στους δύο ιστούς βρέθηκαν είδη του γένους *Chaetomium*.

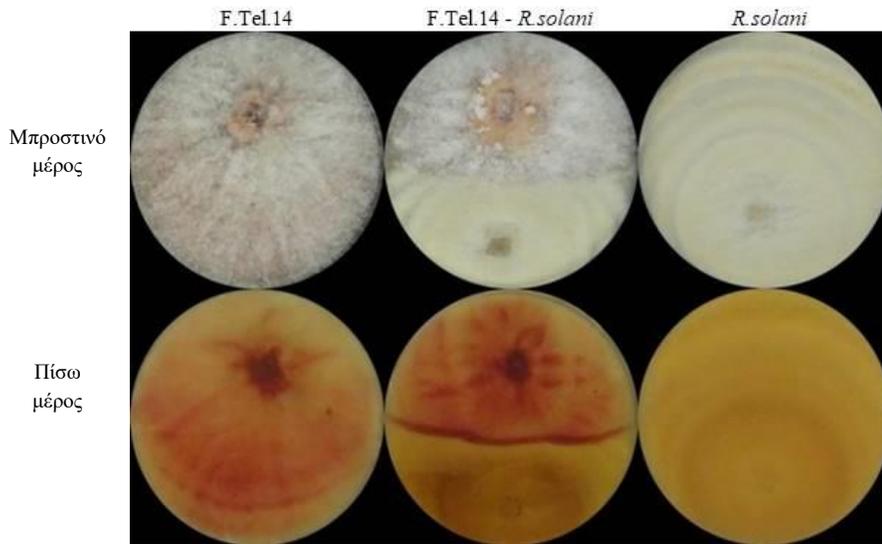
#### 4.2.2.3 Αλληλεπίδραση με φυτοπαθογόνους μύκητες

Εξετάστηκε η ικανότητα *in vitro* παρεμπόδισης της ανάπτυξης των απομονωμένων μυκήτων με τους φυτοπαθογόνους μύκητες *R.solani*, *F.oxysporum* fsp *raphani* και *B.cinerea*.

Παρατηρήθηκαν επαναλαμβανόμενοι φαινότυποι κατά τις αλληλεπιδράσεις, οι οποίοι κατηγοριοποιήθηκαν στους παρακάτω τύπους.

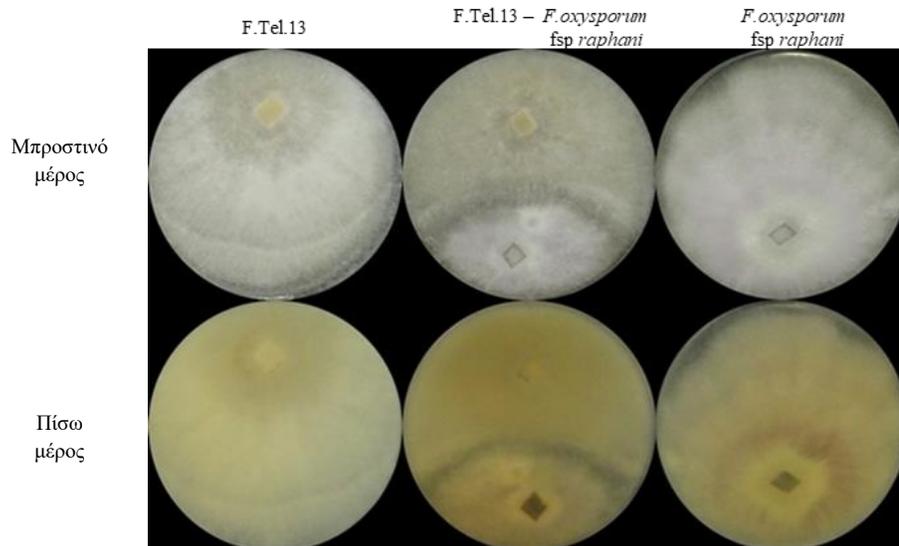
<b>Τύπος Ap</b>	Παύση ανάπτυξης κατά την επαφή (deadlock at contact)
<b>Υποτύπος Ap1</b>	Δημιουργία γραμμικής/χρωματισμένης ζώνης (zone/pigmentation line)
<b>Υποτύπος Ap2</b>	Μη δημιουργία γραμμικής/χρωματισμένης ζώνης (zone/pigmentation line)
<b>Τύπος Bp</b>	Παύση ανάπτυξης σε απόσταση (deadlock at distance)
<b>Τύπος Cp</b>	Ανάπτυξη του ενός μύκητα πάνω στον άλλον (overgrowth)
<b>Υποτύπος Cp1</b>	Ο φυτοπαθογόνος μύκητας αναπτύσσεται πάνω στον ενδοφυτικό (pathogen overgrows endophyte)
<b>Υποτύπος Cp2</b>	Ο ενδοφυτικός μύκητας αναπτύσσεται πάνω στο φυτοπαθογόνο (endophyte overgrows pathogen)

Παρακάτω δίνονται εικόνες (Εικ. 4.17-4.21) με αντιπροσωπευτικά παραδείγματα για τον κάθε τύπο αλληλεπίδρασης.



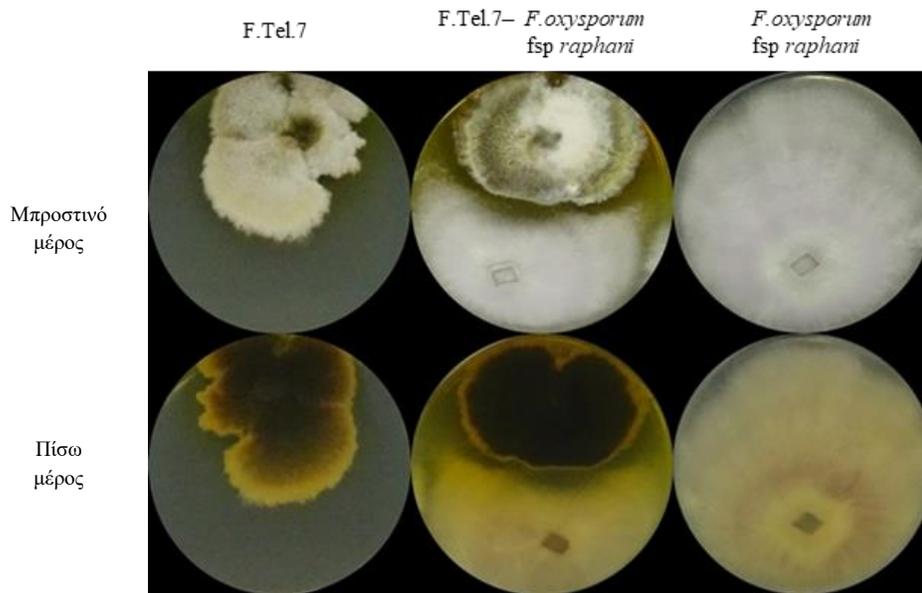
Εικόνα 4.17 Αλληλεπίδραση ενδοφυτικού μύκητα με το φυτοπαθογόνο μύκητα *Rhizoctonia solani* που οδηγεί σε τύπο Ap1 σε διπλή καλλιέργεια (dual culture). Οι φωτογραφίες δείχνουν το μπροστινό και το πίσω μέρος των τρυβλίων. Στη μέση βρίσκεται η αλληλεπίδραση του ενδοφυτικού μύκητα F.Tel.14 και *R.solani* και αριστερά και δεξιά οι μάρτυρες τους αντίστοιχα στις 12 μέρες επώασης.

Στην εικόνα 4.17 η αλληλεπίδραση μεταξύ του ενδοφυτικού και του φυτοπαθογόνου μύκητα είναι τύπου Ap1, όπου η ανάπτυξη τους σταματάει κατά την επαφή και σχηματίζεται χρωματισμένη ζώνη (pigmentation line). Επίσης, φαίνεται πως παρεμποδίζει την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα.



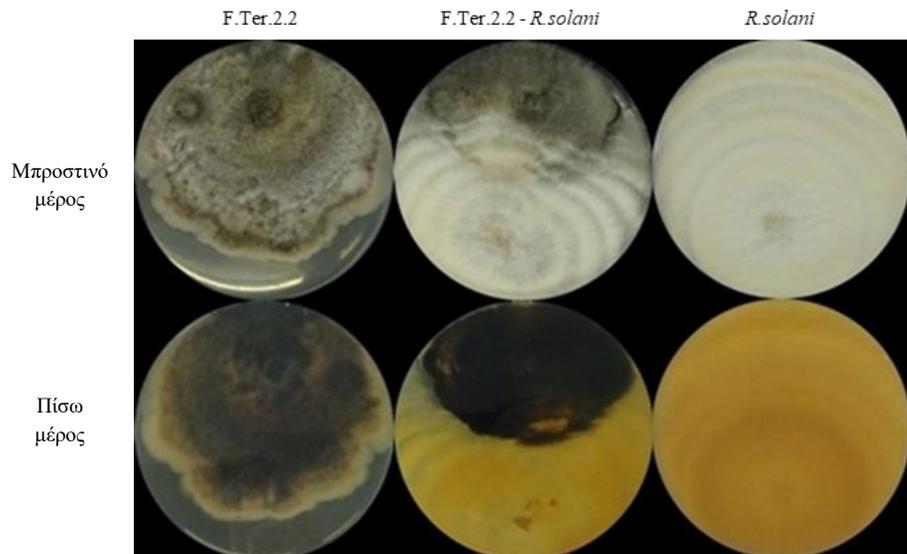
Εικόνα 4.18 Αλληλεπίδραση ενδοφυτικού μύκητα με το φυτοπαθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum fsp raphani* που οδηγεί σε τύπο Ap2 σε διπλή καλλιέργεια (dual culture). Οι φωτογραφίες δείχνουν το μπροστινό και το πίσω μέρος των τρυβλίων. Στη μέση βρίσκεται η αλληλεπίδραση του ενδοφυτικού μύκητα F.Tel.13 και *F.oxysporum fsp raphani* και αριστερά και δεξιά οι μάρτυρες τους αντίστοιχα στις 12 μέρες επώασης.

Η παραπάνω εικόνα (Εικ. 4.18) δείχνει την αλληλεπίδραση ενδοφυτικού και φυτοπαθογόνου μύκητα τύπου Ar2, όπου η ανάπτυξη τους παύει κατά την επαφή αλλά δε σχηματίζεται zone/pigmentation line. Και σε αυτή την εικόνα φαίνεται πως ο φυτοπαθογόνος μύκητας παρεμποδίζεται.



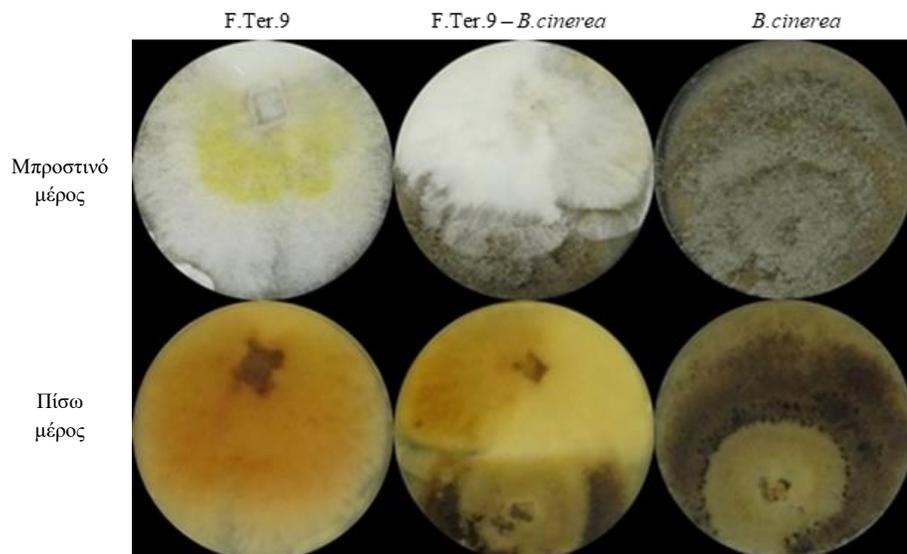
Εικόνα 4.19 Αλληλεπίδραση ενδοφυτικού μύκητα με το φυτοπαθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum* fsp *raphani* που οδηγεί σε τύπο Bp σε διπλή καλλιέργεια (dual culture). Οι φωτογραφίες δείχνουν το μπροστινό και το πίσω μέρος των τρυβλίων. Στη μέση βρίσκεται η αλληλεπίδραση του ενδοφυτικού μύκητα F.Tel.7 και *F.oxysporum* fsp *raphani* και αριστερά και δεξιά οι μάρτυρες τους αντίστοιχα στις 12 μέρες επώασης.

Η εικόνα 4.19 αντιπροσωπεύει τον τύπο Bp, όπου η ανάπτυξη των μυκήτων σταματάει σε απόσταση. Πιθανώς να εκκρίνονται ουσίες που είναι παρεμποδιστικές για την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου.



Εικόνα 4.20 Αλληλεπίδραση ενδοφυτικού μύκητα με το φυτοπαθογόνο μύκητα *Rhizoctonia solani* που οδηγεί σε τύπο Cr1 σε διπλή καλλιέργεια (dual culture). Οι φωτογραφίες δείχνουν το μπροστινό και το πίσω μέρος των τρυβλίων. Στη μέση βρίσκεται η αλληλεπίδραση του ενδοφυτικού μύκητα F.Ter.2.2 και *R.solani* και αριστερά και δεξιά οι μάρτυρες τους αντίστοιχα στις 12 μέρες επώασης. Ο ενδοφυτικός μύκητας τοποθετήθηκε 3 μέρες πριν το φυτοπαθογόνο.

Η παραπάνω εικόνα (Εικ. 4.20) δείχνει ένα παράδειγμα της αλληλεπίδρασης ενδοφυτικού-φυτοπαθογόνου μύκητα τύπου Cr1, όπου το φυτοπαθογόνο αναπτύσσεται πάνω από τον ενδοφυτικό μύκητα, οπότε δεν υφίσταται παρεμπόδιση του.



Εικόνα 4.21 Αλληλεπίδραση ενδοφυτικού μύκητα με το φυτοπαθογόνο μύκητα *Botrytis cinerea* που οδηγεί σε τύπο Cr2 σε διπλή καλλιέργεια (dual culture). Οι φωτογραφίες δείχνουν το μπροστινό και το πίσω μέρος των τρυβλίων. Στη μέση βρίσκεται η αλληλεπίδραση του ενδοφυτικού μύκητα F.Ter.9 και *B.cinerea* και αριστερά και δεξιά οι μάρτυρες τους αντίστοιχα στις 12 μέρες επώασης. Ο ενδοφυτικός μύκητας τοποθετήθηκε 2 μέρες πριν το φυτοπαθογόνο.

Τέλος, η εικόνα 4.21 δείχνει ένα παράδειγμα από τον τύπο αλληλεπίδρασης Cp2, όπου ο ενδοφυτικός μύκητας αναπτύσσεται πάνω από το φυτοπαθογόνο, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της ανάπτυξής του.

Κατά τη διάρκεια αυτών των αλληλεπιδράσεων παρατηρήθηκαν επιπλέον χαρακτηριστικά σε κάποιες περιπτώσεις. Ένα φαινόμενο που καταγράφηκε ήταν ο χρωματισμός των υφών του ενδοφυτικού μύκητα. Ακόμη, η zone line παρατηρήθηκε όχι μόνο κατά την επαφή των μυκήτων αλλά και κατά τον τύπο overgrowth. Τέλος, σε κάποιες περιπτώσεις, ο τύπος overgrowth παρατηρήθηκε μόνο στο σημείο της επαφής με το φυτοπαθογόνο και όχι σε όλη την έκταση της ανάπτυξής του.

Στη συνέχεια, παρατίθεται ένας πίνακας (Πιν. 4.11) με την έκβαση της αλληλεπίδρασης κάθε ενδοφυτικού μύκητα με τους φυτοπαθογόνους *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* fsp *raphani* και *Botrytis cinerea*.

Πίνακας 4.11 Κατηγοριοποίηση της έκβασης αλληλεπίδρασης ενδοφυτικών απομονώσεων μυκήτων με τους φυτοπαθογόνους μύκητες *R.solani*, *F.oxysporum* fsp *raphani*, *B.cinerea* στις 12 μέρες επώασης [\* : ράχη (ridge), \*\*: χρωματισμός μυκηλίων (pigmentation of mycelia), \*\*\*: γραμμική ζώνη (zone line), ^: στο σημείο της επαφής (at the site of contact)].

<u>Κωδικό όνομα μύκητα</u>	<u><i>Rhizoctonia solani</i></u>	<u><i>Fusarium oxysporum</i> fsp <i>raphani</i></u>	<u><i>Botrytis cinerea</i></u>	<u>Κωδικό όνομα μύκητα</u>	<u><i>Rhizoctonia solani</i></u>	<u><i>Fusarium oxysporum</i> fsp <i>raphani</i></u>	<u><i>Botrytis cinerea</i></u>
F.Tel.1	Cp1***	Cp2	Cp2***	F.Ter.2.2	Cp1***	Ap2	Ap1
F.Tel.2	Cp2	Cp2	Cp2***	F.Ter.3	Ap2	Ap2	Ap1
F.Tel.5	Ap2	Ap2	Ap2	F.Ter.5	Cp2***	Cp2	Cp2
F.Tel.6	Ap1	Ap1	Ap1	F.Ter.6	Cp2^	Cp2	Cp2^
F.Tel.7	Ap1	Bp	Bp	F.Ter.7	Ap2	Ap2	Cp2^
F.Tel.8	Cp1***	Ap2	Ap1	F.Ter.8	Cp2^	Ap2	Ap2**
F.Tel.9	Ap1	Cp1	Ap1	F.Ter.9	Ap2	Ap2	Cp2
F.Tel.10	Ap2	Ap2	Cp2^	F.Ter.10	Ap2	Ap2	Ap2
F.Tel.13	Ap2	Ap2	Cp2^	F.Ter.12	Ap2	Cp2	Cp2
F.Tel.14	Ap1	Cp2	Cp2***	F.Ter.13	Cp2***	Cp2	Cp2
F.Ter.1	Cp1	Ap2	Ap2	F.Ter.14	Cp2^	Ap2	Cp2^
F.Ter.2.1	Cp2***	Cp2	Cp2				

Τέλος, έγινε εκτίμηση της ανταγωνιστικής ικανότητας των ενδοφυτικών μυκήτων έναντι των φυτοπαθογόνων που παρατίθεται στον παρακάτω πίνακα (Πιν. 4.12). Ως ανταγωνιστική κρίθηκε

η αλληλεπίδραση που είχε ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της ανάπτυξης του φυτοπαθογόνου μύκητα, έστω κι αν συνοδεύεται από παρεμπόδιση της περαιτέρω ανάπτυξης του ενδόφυτου.

**Πίνακας 4.12** Εκτίμηση της ανταγωνιστικής ικανότητας των απομονωμένων ενδοφυτικών μυκήτων έναντι των φυτοπαθογόνων μυκήτων *R. solani*, *F. oxysporum* fsp *raphani* και *B. cinerea* (N : παρεμπόδιση του φυτοπαθογόνου μύκητα, O : μη παρεμπόδιση του φυτοπαθογόνου μύκητα).

<u>Κωδικό όνομα μύκητα</u>	<u><i>Rhizoctonia solani</i></u>	<u><i>Fusarium oxysporum</i> fsp <i>raphani</i></u>	<u><i>Botrytis cinerea</i></u>	<u>Κωδικό όνομα μύκητα</u>	<u><i>Rhizoctonia solani</i></u>	<u><i>Fusarium oxysporum</i> fsp <i>raphani</i></u>	<u><i>Botrytis cinerea</i></u>
F.Tel.1	O	N	N	F.Ter.2.2	O	N	N
F.Tel.2	N	N	N	F.Ter.3	N	N	N
F.Tel.5	N	N	N	F.Ter.5	N	N	N
F.Tel.6	N	N	N	F.Ter.6	N	N	N
F.Tel.7	N	N	N	F.Ter.7	N	N	N
F.Tel.8	O	N	N	F.Ter.8	N	N	N
F.Tel.9	N	O	N	F.Ter.9	N	N	N
F.Tel.10	N	N	N	F.Ter.10	N	N	N
F.Tel.13	N	N	N	F.Ter.12	N	N	N
F.Tel.14	N	N	N	F.Ter.13	N	N	N
F.Ter.1	O	N	N	F.Ter.14	N	N	N
F.Ter.2.	N	N	N				

Παρατηρείται πως οι περισσότεροι ενδοφυτικοί μύκητες είναι ανταγωνιστικοί και στα 3 φυτοπαθογόνα.

Στον παρακάτω πίνακα (Πιν. 4.13) συσχετίζεται το γένος του κάθε μύκητα, με τον τύπο αλληλεπίδρασης που εμφάνισε κατά την αλληλεπίδραση του με φυτοπαθογόνα, καθώς και την εκτίμηση της ανταγωνιστικής του ικανότητας.

Πίνακας 4.13 Έκβαση αλληλεπιδράσεων των ενδοφυτικών μυκήτων με τους φυτοπαθογόνους μύκητες *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* fsp *raphani* και *Botrytis cinerea*. Αναφέρονται τα κωδικά ονόματα των μυκήτων, η ταξινόμηση τους σε γένη, ο τύπος της αλληλεπίδρασης με τον κάθε φυτοπαθογόνο και η ικανότητα ανταγωνισμού [\*: ράχη (ridge), \*\*: χρωματισμός μυκηλίων (pigmentation of mycelia), \*\*\*: γραμμική ζώνη (zone line), ^: στο σημείο της επαφής (at the site of contact), N: παρεμπόδιση, O: μη παρεμπόδιση].

<u>Κωδικό όνομα μύκητα (γένος)</u>	<u><i>Rhizoctonia solani</i></u>	<u><i>Fusarium oxysporum fsp raphani</i></u>	<u><i>Botrytis cinerea</i></u>	<u>Κωδικό όνομα μύκητα (γένος)</u>	<u><i>Rhizoctonia solani</i></u>	<u><i>Fusarium oxysporum fsp raphani</i></u>	<u><i>Botrytis cinerea</i></u>
<b>F.Tel.1</b> ( <i>Alternaria</i> )	Cp1 <sup>***</sup> /O	Cp2/N	Cp2 <sup>**</sup> /N	<b>F.Ter.2.2</b> ( <i>Boeremia</i> )	Cp1 <sup>***</sup> /O	Ap2/N	Ap1/N
<b>F.Tel.2</b> ( <i>Alternaria</i> )	Cp2/N	Cp2/N	Cp2 <sup>***</sup> /N	<b>F.Ter.3</b> ( <i>Chaetomium</i> )	Ap2/N	Ap2/N	Ap1/N
<b>F.Tel.5</b> ( <i>Alternaria</i> )	Ap2/N	Ap2/N	Ap2/N	<b>F.Ter.5</b> ( <i>Fusarium</i> )	Cp2 <sup>***</sup> /N	Cp2/N	Cp2/N
<b>F.Tel.6</b> ( <i>Alternaria</i> )	Ap1/N	Ap1/N	Ap1/N	<b>F.Ter.6</b> ( <i>Fusarium</i> )	Cp2 <sup>^</sup> /N	Cp2/N	Cp2 <sup>^</sup> /N
<b>F.Tel.7</b> ( <i>Epicoccum</i> )	Ap1/N	Bp /N	Bp /N	<b>F.Ter.7</b> ( <i>Fusarium</i> )	Ap2/N	Ap2/N	Cp2 <sup>^</sup> /N
<b>F.Tel.8</b> ( <i>Alternaria</i> )	Cp1 <sup>***</sup> /O	Ap2/N	Ap1/N	<b>F.Ter.8</b> ( <i>Chaetomium</i> )	Cp2 <sup>^</sup> /N	Ap2/N	Ap2 <sup>**</sup> /N
<b>F.Tel.9</b> ( <i>Alternaria</i> )	Ap1/N	Cp1/O	Ap1/N	<b>F.Ter.9</b> ( <i>Fusarium</i> )	Ap2/N	Ap2/N	Cp2/N
<b>F.Tel.10</b> ( <i>Chaetomium</i> )	Ap2/N	Ap2/N	Cp2 <sup>^</sup> /N	<b>F.Ter.10</b> ( <i>Fusarium</i> )	Ap2/N	Ap2/N	Ap2/N
<b>F.Tel.13</b> ( <i>Chaetomium</i> )	Ap2/N	Ap2/N	Cp2 <sup>^</sup> /N	<b>F.Ter.12</b> ( <i>Fusarium</i> )	Ap2/N	Cp2/N	Cp2/N
<b>F.Tel.14</b> ( <i>Fusarium</i> )	Ap1/N	Cp2/N	Cp2 <sup>***</sup> /N	<b>F.Ter.13</b> ( <i>Fusarium</i> )	Cp2 <sup>***</sup> /N	Cp2/N	Cp2/N
<b>F.Ter.1</b> ( <i>Didymella/Phoma</i> )	Cp1/O	Ap2/N	Ap2/N	<b>F.Ter.14</b> ( <i>Fusarium</i> )	Cp2 <sup>^</sup> /N	Ap2/N	Cp2 <sup>^</sup> /N
<b>F.Ter.2.1</b> ( <i>Fusarium</i> )	Cp2 <sup>***</sup> /N	Cp2/N	Cp2/N				

Διαφαίνεται πως κάποιοι μύκητες, όπως ο F.Tel.5 αλληλεπιδρά με τον ίδιο τρόπο με όλα τα φυτοπαθογόνα, ενώ άλλοι, όπως ο F.Ter.2.2 αλληλεπιδρά με διαφορετικό τρόπο. Αυτό το φαινόμενο παρατηρείται στους μύκητες και των δύο ιστών. Ο μύκητας με το κωδικό όνομα F.Tel.7, του γένους *Epicoccum*, είναι ο μόνος που σχηματίζει ζώνη παρεμπόδισης με τους φυτοπαθογόνους μύκητες. Ακόμη, όλες οι απομονώσεις του γένους *Fusarium* και *Chaetomium* είναι ανταγωνιστικές έναντι και των τριών φυτοπαθογόνων μυκήτων που εξετάστηκαν.

#### 4.2.2.4 Αλληλεπίδραση των ενδοφυτικών μυκήτων του ίδιου ιστού

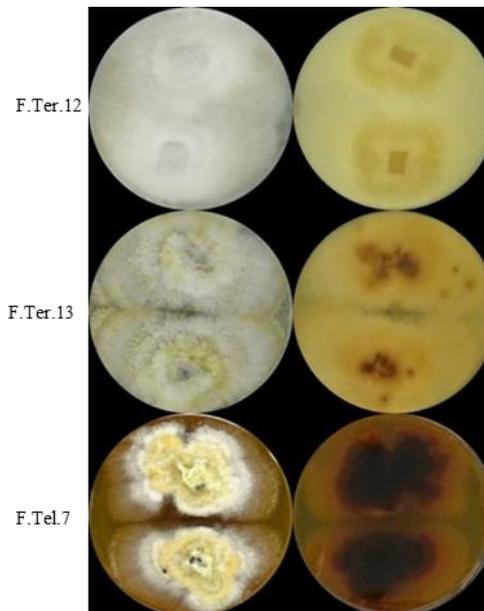
Οι αλληλεπιδράσεις των ενδοφυτικών μυκήτων μεταξύ τους πραγματοποιήθηκαν με σκοπό τη διερεύνηση των σχέσεων που αναπτύσσονται στην ενδοφυτική κοινότητα μέσα στο ίδιο φυτό. Οι μύκητες του ίδιου ιστού είναι περισσότερο πιθανό να αλληλεπιδράσουν απ'ότι οι μύκητες των φύλλων με αυτούς της ρίζας.

Κατά την αλληλεπίδραση των ενδοφυτικών μυκήτων μεταξύ τους, πραγματοποιήθηκαν και αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ίδιων ατόμων.

Οι τύποι που παρατηρήθηκαν κατά τη διπλή καλλιέργεια (dual culture) τμημάτων του ίδιου μύκητα είναι οι εξής:

<b>Τύπος Aa</b>	Πλήρης ένωση (Full merge)
<b>Τύπος Ba</b>	Ένωση με τμήματα μη ενωμένα (Merge with patches)
<b>Τύπος Ca</b>	Μικρή απόσταση (Small distance)

Η παρακάτω εικόνα (Εικ. 4.22) δείχνει αντιπροσωπευτικά παραδείγματα των τριών τύπων που εμφανίστηκαν.



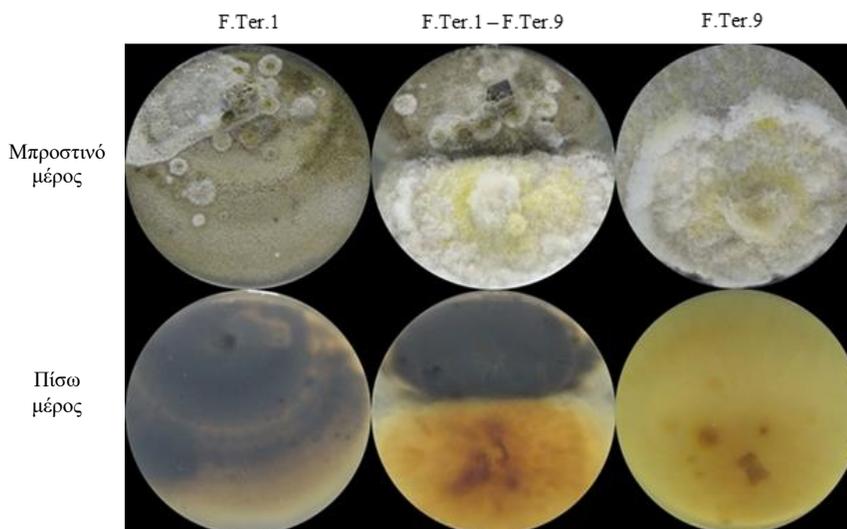
Εικόνα 4.22 Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα των τριών τύπων αλληλεπίδρασης των μυκήτων με τον εαυτό τους. Οι φωτογραφίες δείχνουν το μπροστινό και το πίσω μέρος των τρυβλίων. Φαίνονται ο τύπος Aa (πλήρης ένωση) με την απομόνωση F.Ter.12 στις 20 μέρες, ο τύπος Ba (ένωση με μη ενωμένα τμήματα) με την απομόνωση F.Ter.13 στις 20 μέρες και ο τύπος Ca (μικρή απόσταση) με την απομόνωση F.Tel.7 στις 30 μέρες.

Παρατηρείται πως σε κάποιες περιπτώσεις οι μύκητες δεν ενώνονται, είτε πλήρως είτε καθόλου, ενώ πρόκειται για το ίδιο άτομο και προέρχονται από την ίδια καλλιέργεια.

Κατά την αλληλεπίδραση των μυκήτων, που απομονώθηκαν από τον ίδιο ιστό παρατηρήθηκαν επίσης κάποια επαναλαμβανόμενα μοτίβα. Με βάση τους Badalyan και συνεργάτες (2002) και Bertrand και συνεργάτες (2013), οι αλληλεπιδράσεις κατηγοριοποιήθηκαν σε τέσσερις βασικούς τύπους :

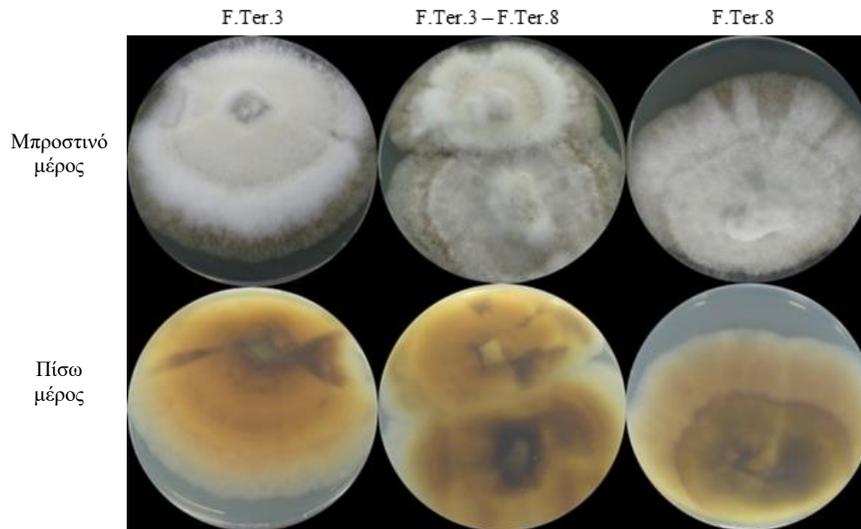
<b>Τύπος A</b>	Παύση ανάπτυξης κατά την επαφή (deadlock at contact)
<b>Υποτύπος A1</b>	Δημιουργία γραμμικής/χρωματισμένης ζώνης (zone/pigmentation line)
<b>Υποτύπος A2</b>	Μη δημιουργία γραμμικής/χρωματισμένης ζώνης (zone/pigmentation line)
<b>Τύπος B</b>	Παύση ανάπτυξης σε απόσταση (deadlock at distance)
<b>Τύπος C</b>	Ανάπτυξη του ενός μύκητα πάνω στον άλλον (overgrowth)
<b>Τύπος CI</b>	Αρχική ανάπτυξη του ενός μύκητα πάνω στον άλλον (overgrowth) με μετέπειτα δημιουργία φαινοτύπου σαν παύση ανάπτυξη σε απόσταση (deadlock at distance-like)

Οι τύποι που αναφέρονται προσδιορίστηκαν την 20η μέρα της επώασης της διπλής καλλιέργειας. Οι παρακάτω εικόνες (Εικ. 4.23-4.28) δείχνουν ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα για τον κάθε τύπο που αναφέρθηκε παραπάνω.

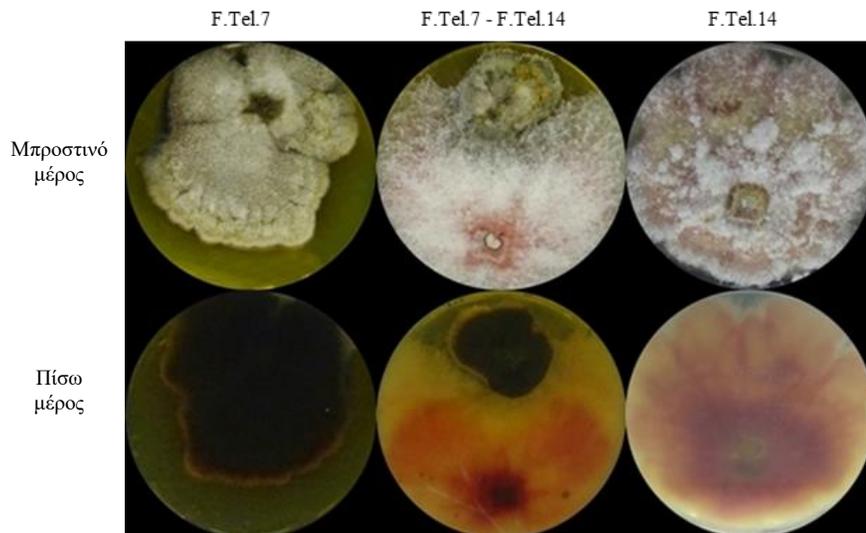


Εικόνα 4.23 Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ απομονώσεων ενδοφυτικών μυκήτων του ίδιου ιστού σε διπλή καλλιέργεια (dual culture) τύπου A1 (παύση ανάπτυξης κατά την επαφή και δημιουργία γραμμικής/χρωματισμένης ζώνης). Οι φωτογραφίες δείχνουν το μπροστινό και το πίσω μέρος των τρυβλίων. Στη μέση βρίσκεται η αλληλεπίδραση των απομονώσεων F.Ter.1 και F.Ter.9 και αριστερά και δεξιά οι μάρτυρες τους αντίστοιχα στις 20 μέρες επώασης. Οι μύκητες τοποθετήθηκαν ταυτόχρονα.

Στην εικόνα 4.23 φαίνεται ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα του τύπου αλληλεπίδρασης A1 όπου η ανάπτυξη των μυκήτων σταματάει κατά την επαφή των υφών τους και σχηματίζεται μία zone line σε κάποιον από τους δύο μύκητες. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα, η σκούρου χρώματος zone line βρίσκεται στο μύκητα με το κωδικό όνομα F.Ter.1. Επίσης, διαφαίνεται ο μαύρος χρωματισμός των υφών του μύκητα F.Ter.1.

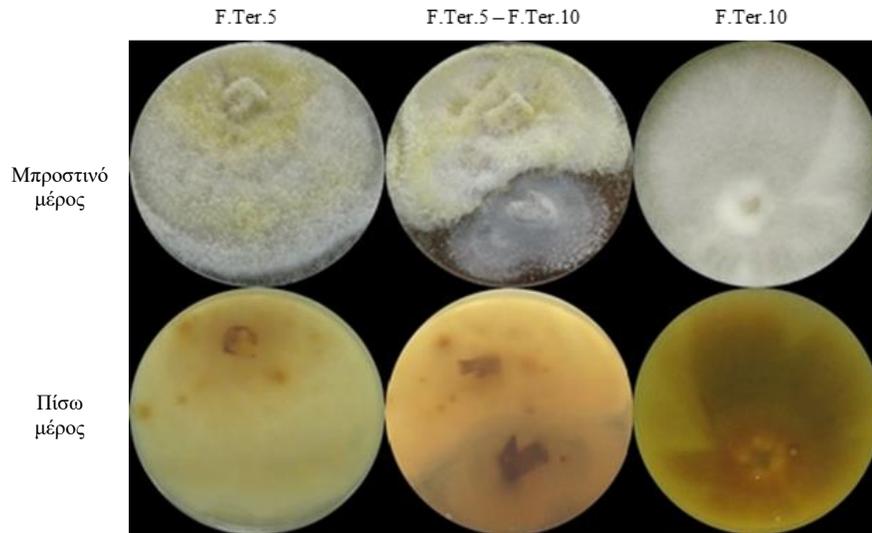


**Εικόνα 4.24** Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ απομονώσεων ενδοφυτικών μυκήτων του ίδιου ιστού σε διπλή καλλιέργεια (dual culture) τύπου A2 (παύση ανάπτυξης κατά την επαφή χωρίς δημιουργία γραμμικής/χρωματισμένης ζώνης). Οι φωτογραφίες δείχνουν το μπροστινό και το πίσω μέρος των τρυβλίων. Στη μέση βρίσκεται η αλληλεπίδραση των απομονώσεων F.Ter.3 και F.Ter.8 και αριστερά και δεξιά οι μάρτυρες τους αντίστοιχα στις 20 μέρες επώασης. Οι μύκητες τοποθετήθηκαν ταυτόχρονα.



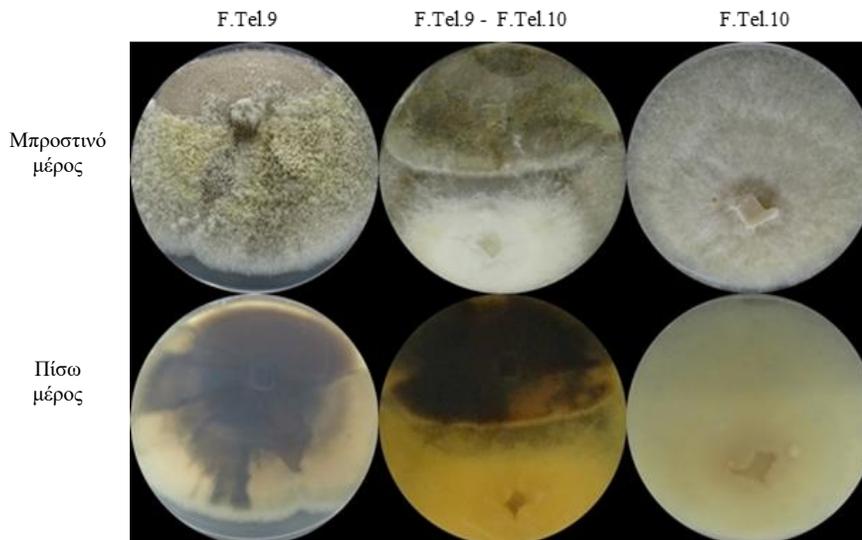
**Εικόνα 4.25** Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ απομονώσεων ενδοφυτικών μυκήτων του ίδιου ιστού σε διπλή καλλιέργεια (dual culture) τύπου A2 (παύση ανάπτυξης κατά την επαφή χωρίς δημιουργία γραμμικής/χρωματισμένης ζώνης). Οι φωτογραφίες δείχνουν το μπροστινό και το πίσω μέρος των τρυβλίων. Στη μέση βρίσκεται η αλληλεπίδραση των απομονώσεων F.Tel.7 και F.Tel.14 και αριστερά και δεξιά οι μάρτυρες τους αντίστοιχα στις 20 μέρες επώασης. Οι μύκητες τοποθετήθηκαν ταυτόχρονα.

Οι εικόνες 4.24 και 4.25 αφορούν την αλληλεπίδραση μυκήτων τύπου A2, όπου η ανάπτυξη σταματά κατά την επαφή των υφών αλλά δε σχηματίζεται zone line. Στην πρώτη εικόνα οι μύκητες δε φαίνεται να έχουν κάποια αλλαγή στο φαινότυπό τους, μακροσκοπικά τουλάχιστον. Αντίθετα, στη δεύτερη εικόνα φαίνεται πως η απομόνωση F.Tel.14 έχει διαφορετικό φαινότυπο στα σημεία επαφής, σε σχέση με το μάρτυρα.



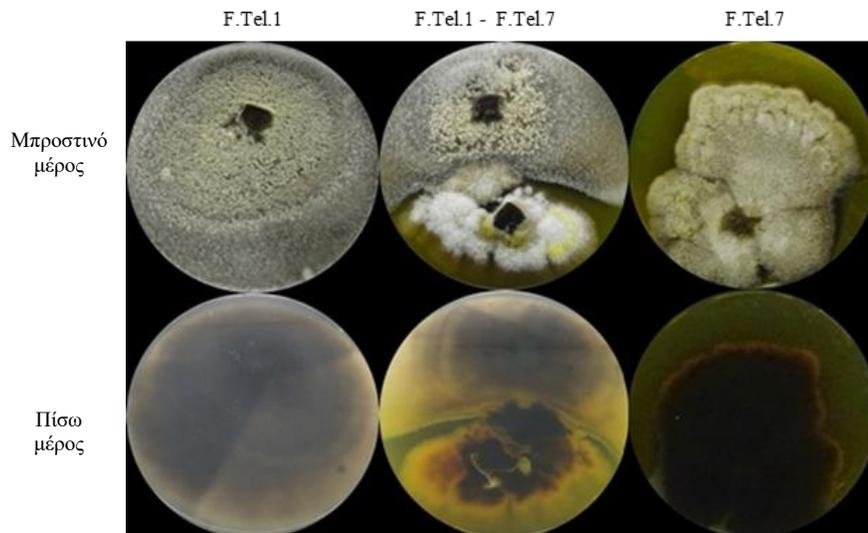
Εικόνα 4.26 Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ απομονώσεων ενδοφυτικών μυκήτων του ίδιου ιστού σε διπλή καλλιέργεια (dual culture) τύπου C (ανάπτυξη του ενός μύκητα πάνω στον άλλον). Οι φωτογραφίες δείχνουν το μπροστινό και το πίσω μέρος των τρυβλίων. Στη μέση βρίσκεται η αλληλεπίδραση των απομονώσεων F.Ter.5 και F.Ter.10 και αριστερά και δεξιά οι μάρτυρες τους αντίστοιχα στις 20 μέρες επώασης. Οι μύκητες τοποθετήθηκαν ταυτόχρονα.

Στην παραπάνω εικόνα φαίνεται ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα της αλληλεπίδρασης τύπου C, όπου ένας μύκητας αναπτύσσεται πάνω σε αυτόν που βρίσκεται απέναντι του. Ειδικότερα στην εικόνα 4.24 η απομόνωση F.Ter.5 αναπτύσσεται πάνω στην απομόνωση F.Ter.10.



Εικόνα 4.27 Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ απομονώσεων ενδοφυτικών μυκήτων του ίδιου ιστού σε διπλή καλλιέργεια (dual culture) τύπου CI (αρχική ανάπτυξη του ενός μύκητα πάνω στον άλλον με μετέπειτα δημιουργία φαινοτύπου σαν παύση ανάπτυξη σε απόσταση). Οι φωτογραφίες δείχνουν το μπροστινό και το πίσω μέρος των τρυβλίων. Στη μέση βρίσκεται η αλληλεπίδραση των απομονώσεων F.Tel.9 και F.Tel.10 και αριστερά και δεξιά οι μάρτυρες τους αντίστοιχα στις 20 μέρες επώασης. Οι μύκητες τοποθετήθηκαν ταυτόχρονα.

Ο πιο ιδιαίτερος τύπος αλληλεπίδρασης είναι ο τύπος CI, όπου αρχικά ένας μύκητας αναπτύσσεται πάνω στον άλλον αλλά στην πορεία σχηματίζεται μια ζώνη με πιθανόν νεκρές υφές. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα, η απομόνωση F.Tel.10 είχε αρχικά αρχίσει να αναπτύσσεται πάνω στην απομόνωση F.Tel.9 στο σημείο επαφής (άσπρη γραμμή υφών) αλλά στην πορεία οι υφές της πιθανόν υδρολύθηκαν.



**Εικόνα 4.28** Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ απομονώσεων ενδοφυτικών μυκήτων του ίδιου ιστού σε διπλή καλλιέργεια (dual culture) που παρουσιάζουν δύο τύπους αλληλεπίδρασης και συγκεκριμένα A1 και C. Οι φωτογραφίες δείχνουν το μπροστινό και το πίσω μέρος των τρυβλίων. Στη μέση βρίσκεται η αλληλεπίδραση των απομονώσεων F.Tel.1 και F.Tel.7 και αριστερά και δεξιά οι μάρτυρες τους αντίστοιχα στις 20 μέρες επώασης. Οι μύκητες τοποθετήθηκαν ταυτόχρονα.

Τέλος, η εικόνα 4.28 δείχνει ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αλληλεπίδρασης η οποία παρουσιάζει δύο τύπους. Συγκεκριμένα, η απομόνωση F.Tel.7 αρχικά έρχεται σε επαφή με την απομόνωση F.Tel.1 και προκαλεί σχηματισμό zone line αλλά στη συνέχεια εκείνο το σημείο δέχεται την ανάπτυξη του μύκητα F.Tel.1.

Γενικά, κατά τη διάρκεια αυτών των αλληλεπιδράσεων παρατηρήθηκαν επιπλέον χαρακτηριστικά σε κάποιες περιπτώσεις. Ένα φαινόμενο που καταγράφηκε ήταν ο χρωματισμός των υφών του ενδοφυτικού μύκητα (Εικ. 4.23). Ένα άλλο φαινόμενο που παρατηρήθηκε στο σημείο της επαφής των ενδοφυτικών με τους φυτοπαθολόγους μύκητες ήταν η ύπαρξη ράχης (ridge), δηλαδή η ανασήκωση των υφών. Ακόμη, η zone line παρατηρήθηκε όχι μόνο κατά την επαφή των μυκήτων αλλά και κατά τον τύπο overgrowth. Τέλος, σε κάποιες περιπτώσεις, ο τύπος overgrowth παρατηρήθηκε μόνο στο σημείο της επαφής των δύο μυκήτων.

Οι παρακάτω πίνακες συγκεντρώνουν όλες τις εκβάσεις των αλληλεπιδράσεων που μελετήθηκαν στους ενδοφυτικούς απομονωμένους μύκητες των φύλλων (Πιν. 4.14) και της ρίζας (Πιν. 4.15).

Πίνακας 4.14. Κατηγοριοποίηση σε τύπους της έκβασης αλληλεπίδρασης ενδοφυτικών απομονώσεων μυκήτων των φύλλων του *Teucrium polium* στις 20 μέρες επώασης [\*: ράχη (ridge), \*\*\*: γραμμική ζώνη (zone line), ^: στο σημείο της επαφής (at the site of contact)].

Κωδικό όνομα μύκητα (γένος)	F.Tel.1	F.Tel.2	F.Tel.5	F.Tel.6	F.Tel.7	F.Tel.8	F.Tel.9	F.Tel.10	F.Tel.13	F.Tel.14
F.Tel.1 ( <i>Alternaria</i> )	Aa	A1*	A1	A1	A1/C	A2*	A1	CI	CI	C***
F.Tel.2 ( <i>Alternaria</i> )		Aa	A1	A2	A2/B	A2*	A2	CI	CI	C^
F.Tel.5 ( <i>Alternaria</i> )			Ca	A2	A1	C	C^	CI	CI	C***
F.Tel.6 ( <i>Alternaria</i> )				Aa	A1/B	A1**/***	C	CI	CI	C***
F.Tel.7 ( <i>Epicoccum</i> )					Ca	A1*	A2	CI	CI	A2
F.Tel.8 ( <i>Alternaria</i> )						Aa	A1	CI	CI	C
F.Tel.9 ( <i>Alternaria</i> )							Aa	CI	CI	C
F.Tel.10 ( <i>Chaetomium</i> )								Ba	Aa	C
F.Tel.13 ( <i>Chaetomium</i> )									Ba	A2
F.Tel.14 ( <i>Fusarium</i> )										Aa

Παρατηρείται πως ο τύπος της αλληλεπίδρασης εξαρτάται αποκλειστικά από το συγκεκριμένο ζευγάρι μυκήτων που αλληλεπιδρά και όχι από τα γένη. Εξαίρεση αποτελεί το γένος *Chaetomium* στα φύλλα όπου εμφανίζει τον τύπο CI στις 9/10 αλληλεπιδράσεις. Ακόμη, μορφότυποι του ίδιου γένους φαίνεται να εμφανίζουν ανταγωνιστικότητα μεταξύ τους.

Μία παρατήρηση επίσης είναι το γεγονός της εμφάνισης ζώνης παρεμπόδισης μόνο κατά τις αλληλεπιδράσεις του γένους *Epicoccum* με άλλους μύκητες, αν και δε συμβαίνει σε όλες τις αλληλεπιδράσεις. Μικρή ζώνη εμφανίζεται και στην αλληλεπίδραση του συγκεκριμένου μύκητα με τον εαυτό του (Εικ. 4.22).

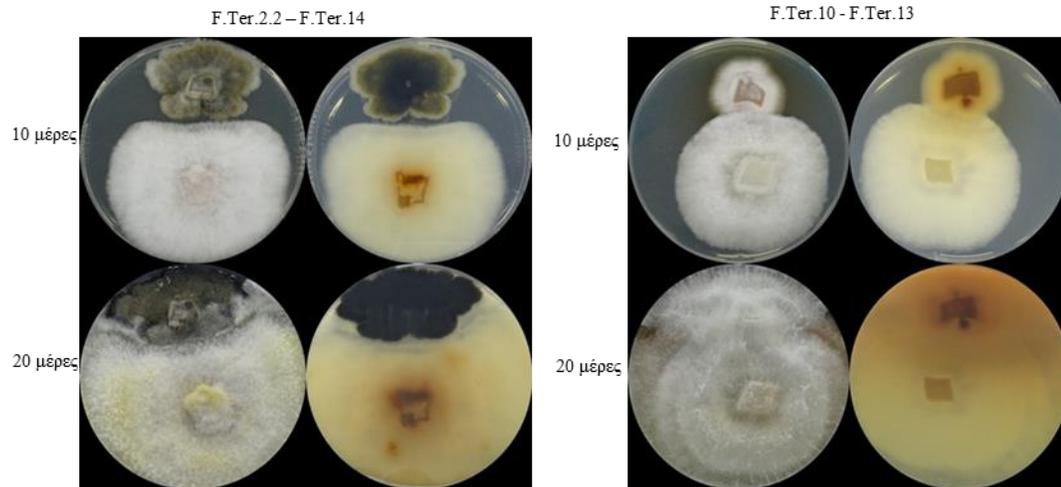
Πίνακας 4.15 Κατηγοριοποίηση σε τύπους της έκβασης αλληλεπίδρασης ενδοφυτικών απομονώσεων μυκήτων της ρίζας του *Teucrium polium* στις 20 μέρες επώασης [\*: ράχη (ridge), \*\*: χρωματισμός μυκηλίων (pigmentation of mycelia), \*\*\*: γραμμική ζώνη (zone line), ^: στο σημείο της επαφής (at the site of contact)].

<u>Κωδικό όνομα μύκητα (γένους)</u>	F.Ter.1	F.Ter.2.1	F.Ter.2.2	F.Ter.3	F.Ter.5	F.Ter.6	F.Ter.7	F.Ter.8	F.Ter.9	F.Ter.10	F.Ter.12	F.Ter.13	F.Ter.14
<b>F.Ter.1</b> ( <i>Didymella/Phoma</i> )	Aa	C^	A2	A2	C	A1	A1**	A1	A1**	C^	C	C	C^
<b>F.Ter.2.1</b> ( <i>Fusarium</i> )		Ba	C	C	A1	A2	A2	C	A2	C	A2	C	A2
<b>F.Ter.2.2</b> ( <i>Boeremia</i> )			Aa	C	C	C	A1**	A1	C	C^***	C	C	CI
<b>F.Ter.3</b> ( <i>Chaetomium</i> )				Ba	A2	A1	C	A2	C^	C***	C^****	A2	A2/B
<b>F.Ter.5</b> ( <i>Fusarium</i> )					Aa	A2	A2	C	A2	C	A2	A1**	A2
<b>F.Ter.6</b> ( <i>Fusarium</i> )						Aa	A2	A1	A2	A2*	A2	A2	A2
<b>F.Ter.7</b> ( <i>Fusarium</i> )							Ba	C	Ba	A2	C	C	A2
<b>F.Ter.8</b> ( <i>Chaetomium</i> )								Ba	C	C***	C	C	C
<b>F.Ter.9</b> ( <i>Fusarium</i> )									Ba	A2	A2	C	Ba
<b>F.Ter.10</b> ( <i>Fusarium</i> )										Ca	C	C	A2
<b>F.Ter.12</b> ( <i>Fusarium</i> )											Aa	C	A1
<b>F.Ter.13</b> ( <i>Fusarium</i> )												Ba	A2
<b>F.Ter.14</b> ( <i>Fusarium</i> )													Ba

Παρατηρείται πως ο τύπος της αλληλεπίδρασης εξαρτάται αποκλειστικά από το ζευγάρι μυκήτων που αλληλεπιδρά και όχι από τα γένη τους. Ακόμη, διαφορετικοί μορφότυποι του ίδιου γένους φαίνεται να εμφανίζουν ανταγωνιστικότητα μεταξύ τους.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι τύποι αλλάζουν κατά τη διάρκεια της επώασης όπως έχουν παρατηρήσει κι άλλοι ερευνητές (Bertrand et al. 2013). Η παρακάτω εικόνα (Εικ.

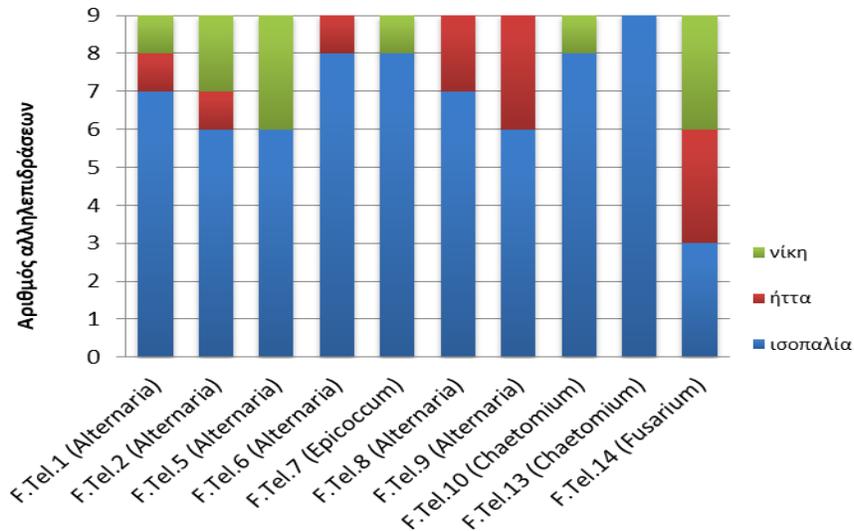
4.29) δίνει ένα παράδειγμα όπου η αλληλεπίδραση αλλάζει στην πορεία του χρόνου και ένα παράδειγμα όπου δεν αλλάζει.



Εικόνα 4.29 Αλληλεπίδραση μεταξύ απομονώσεων ενδοφυτικών μυκήτων στην πορεία του χρόνου. Οι φωτογραφίες δείχνουν αλληλεπιδράσεις δύο διαφορετικών ζευγών ενδοφυτικών μυκήτων στις 10 μέρες και στις 20 μέρες, ενώ φαίνεται το μπροστινό και το πίσω μέρος των τρυβλίων.

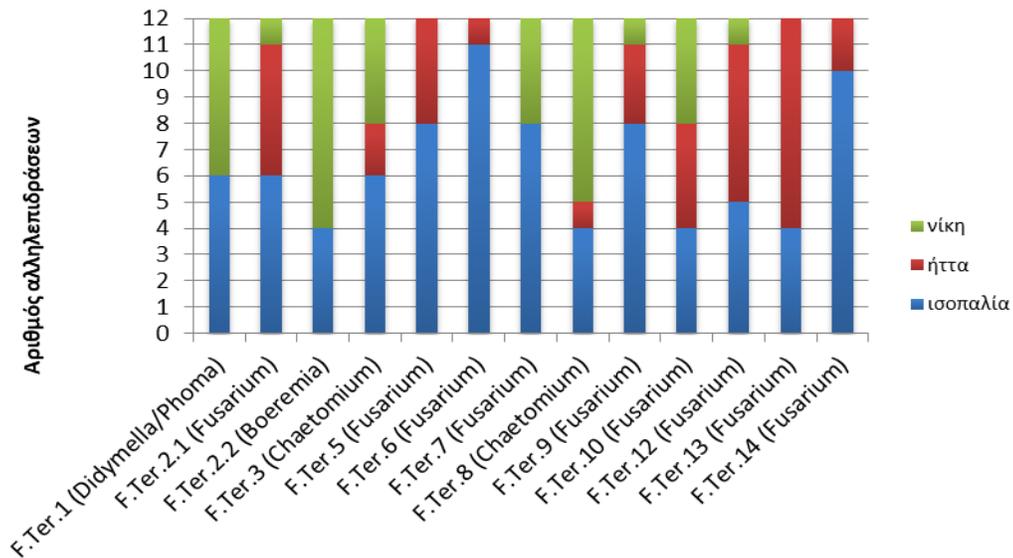
Η αριστερή φωτογραφία δείχνει πως η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση στις 10 μέρες φαίνεται να είναι τύπου B, δηλαδή να παύει η ανάπτυξη των μυκήτων σε απόσταση (deadlock at contact). Ωστόσο, στις 20 μέρες η εικόνα αλλάζει και η αλληλεπίδραση φαίνεται πως είναι τελικά τύπου CI, όπου ο ένας μύκητας αρχικά αναπτύσσεται πάνω στον άλλον αλλά στην πορεία δημιουργείται μια ζώνη διαχωρισμού με πιθανόν νεκρές υφές. Στη δεξιά φωτογραφία φαίνεται ο ίδιος τύπος στις 10 και τις 20 μέρες και συγκεκριμένα ο τύπος C, η ανάπτυξη του ενός μύκητα πάνω στον άλλον.

Θεωρώντας πως οι τύποι A, B και CI οδηγούν στην παρεμπόδιση της περαιτέρω ανάπτυξης και των δύο μυκήτων (ισοπαλία-draw), ενώ ο τύπος C οδηγεί στην επικράτηση ενός εκ των δύο μυκήτων, ο οποίος κερδίζει (νίκη-win), έναντι του άλλου που χάνει (ήττα-defeat), σχεδιάστηκαν τα παρακάτω ιστογράμματα.



Απομονωμένοι ενδοφυτικοί μύκητες των φύλλων

Ιστόγραμμα 4.1 Ο αριθμός των ισοπαλιών, νικών και ηττών του κάθε ενδοφυτικού μύκητα που απομονώθηκε από τα φύλλα με βάση τις εκβάσεις των αλληλεπιδράσεων από τις διπλές καλλιέργειες στις 20 μέρες.



Απομονωμένοι ενδοφυτικοί μύκητες της ρίζας

Ιστόγραμμα 4.2 Ο αριθμός των ισοπαλιών, νικών και ηττών του κάθε ενδοφυτικού μύκητα που απομονώθηκε από τα φύλλα με βάση τις εκβάσεις των αλληλεπιδράσεων από τις διπλές καλλιέργειες στις 20 μέρες.

Από τα ιστογράμματα διαφαίνεται πως κανένας μύκητας δεν είναι ανώτερος από όλους τους άλλους, καθώς μπορεί να ανταγωνίζεται επιτυχώς κάποιους αλλά να έρχεται σε ισοπαλία ή να χάνει από κάποιους άλλους.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αειφόρος γεωργία προϋποθέτει αποτελεσματικές μακροπρόθεσμα λύσεις που είναι περιβαλλοντικά φιλικές, όπως η χρήση των μικροοργανισμών που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (PGPMs). Τα ενδόφυτα έχουν αρχίσει να προκαλούν το ενδιαφέρον στην ιατρική, γεωργία και βιομηχανία, λόγω των ευρείων εφαρμογών των δευτερογενών μεταβολιτών τους αλλά και των ρόλων τους μέσα στο φυτό (Kusari et al., 2012; Brader et al., 2014; Santoyo et al., 2016).

Οι θετικές, ως προς το φυτό, λειτουργίες των ενδοφυτικών μικροοργανισμών είναι η ύφεση του αβιοτικού και βιοτικού στρες αλλά και η παροχή θρεπτικών. Οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί φαίνεται να είναι περισσότερο κατάλληλοι για την προαγωγή της ανάπτυξης του φυτού, καθώς είναι προστατευμένοι, έχουν άμεση επίδραση στο φυτό και διαθέτουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά λόγω του εξειδικευμένου περιβάλλοντος στο οποίο διαβιούν (Strobel and Daisy, 2003; Selim et al., 2012).

Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε η λογική πως τα αρωματικά φυτά, όπως και το *T. polium*, διαθέτουν ενδοφυτικούς μικροοργανισμούς με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά λόγω του πλούσιου δευτερογενούς μεταβολισμού τους (Köberl et al., 2013; Alvin et al., 2014; Egamberdieva et al., 2017).

Μετά την επιτυχή επιφανειακή απολύμανση φύλλων και ρίζας του φυτού, απομονώθηκαν περίπου 100 ενδοφυτικά βακτήρια και 65 ενδοφυτικοί μύκητες.

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να αναφερθεί πως οι μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν ορίστηκαν ως ενδοφυτικοί, καθώς φαίνεται πως επιτεύχθηκε πλήρης απολύμανση της εξωτερικής επιφάνειας των ιστών του φυτού. Ωστόσο, οι απομονώσεις είναι εν δυνάμει ενδόφυτα (putative endophytes) μέχρι την οριστική απόδειξη ότι μπορούν να αποικίσουν το εσωτερικό του φυτού. Μελλοντικά, θα μπορούσε να διερευνηθεί η ικανότητα των μικροβιακών απομονώσεων να αποικίζουν τους εσωτερικούς ιστούς του φυτού *T. polium* και άλλων επιθυμητών φυτών.

Τα ενδοφυτικά βακτήρια, πρώτα ελέγχθηκαν για την *in vitro* ανταγωνιστική ικανότητα τους έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *R. solani* με τη μέθοδο της διπλής καλλιέργειας (dual culture). Σε όσα ήταν ανταγωνιστικά, παρατηρήθηκε πως κάποια μοτίβα δράσης επαναλαμβάνονταν, οπότε επιλέχθηκαν αντιπρόσωποι από το κάθε μοτίβο, συνολικά 25 βακτήρια, για περαιτέρω χαρακτηρισμό.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση των 16S rRNA γονιδίων των επιλεγμένων βακτηρίων. Από τις 25 αλληλουχίες που αναλύθηκαν, 14 αποδόθηκαν ως *Bacillus sp.*, 10 ως *Pseudomonas sp.* και 1 ως *Erwinia sp.* με ποσοστό ομοιότητας 95-99%. Καθώς σε κάποιες περιπτώσεις υπήρχαν πάνω από ένα αποτελέσματα ειδών με το ίδιο σκορ κατά την υποβολή των αλληλουχιών στο πρόγραμμα BLAST, χρειάζεται ανάλυση περαιτέρω γονιδίων για την ακριβή ταυτοποίηση του είδους.

Βακτήρια του γένους *Bacillus* και *Pseudomonas* είναι οι πιο συνήθεις απομονώσεις από την ενδόσφαιρα φυτών (Gagne-Bourgue et al., 2013; Ikeda et al., 2013; Jasim et al., 2014; Jin et al., 2014; Kumar et al., 2014; Romero et al., 2014; Shi et al., 2014; Zhao et al., 2015; Haruna et al., 2017; Thomas et al., 2017). Ενδοφυτικά βακτήρια του γένους *Bacillus* έχουν απομονωθεί και από φυτό *T. polium* στην Αίγυπτο (Hassan, 2017). Κάποιες μελέτες έχουν αναφέρει και ενδοφυτικά βακτήρια του γένους *Erwinia* (Robinson et al., 2016; Egamberdieva et al., 2017)

Στη συνέχεια, τα απομονωμένα ενδοφυτικά βακτήρια καλλιεργήθηκαν με τους φυτοπαθογόνους μύκητες *F. oxysporum* fsp *raphani* και *B. cinerea*. Μετά το πέρας 12 ημερών επώασης καταγράφηκαν οι τύποι αλληλεπίδρασης των ενδοφυτικών βακτηρίων με όλους τους φυτοπαθογόνους μύκητες. Οι τύποι περιλαμβάνουν ομαδική κίνηση του βακτηρίου, επαφή με το μύκητα και κύκλωμα του ή επαφή και κίνηση του βακτηρίου προς τα πίσω. Επίσης, παρατηρήθηκε ομαδική κίνηση του βακτηρίου και είσοδος του στην περιοχή του μύκητα, δημιουργία ζώνης παρεμπόδισης που μπορεί να συνοδεύεται από κίνηση του βακτηρίου προς τα πίσω και κάλυψη του βακτηρίου από το μύκητα. Οι περισσότερες διπλές καλλιέργειες χαρακτηρίστηκαν από μίξη τύπων αλληλεπίδρασης. Για παράδειγμα, μία απομόνωση μπορεί εισέρχεται στην περιοχή του μύκητα αλλά να τον κυκλώνει ταυτόχρονα.

Παρατηρήθηκε πως η ένταση της ομαδικής κίνησης του βακτηρίου και η έκταση της εισόδου στην περιοχή του μύκητα ποίκιλλαν ανάλογα με το βακτήριο αλλά και το μύκητα που είχε απέναντι του και προκάλεσαν διαφοροποιήσεις στην ανταγωνιστικότητα. Επίσης, ρόλο στην ικανότητα ανταγωνισμού διαδραμάτισε το μέγεθος της ζώνης παρεμπόδισης.

Στον ανταγωνισμό με δημιουργία ζώνης παρεμπόδισης, το βακτήριο παράγει αντιμυκητιακές ενώσεις που διαχέονται στο μέσο ή είναι πτητικές και προκαλούν λύση των κυττάρων του μύκητα, οπότε άμεση επαφή δεν είναι απαραίτητη. Στη βιβλιογραφία ως ικανός τρόπος ανταγωνισμού φυτοπαθογόνων μυκήτων αναφέρεται η παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μύκητα από απόσταση, καθώς η ζώνη παρεμπόδισης συνδέεται με την παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων που διαχέονται στο μέσο (Ohike et al., 2013; Kumar et al., 2014; Zhao et al., 2014; Ben

Abdallah et al., 2016; Passari et al., 2016). Διαχεόμενες αντιμικροβιακές ενώσεις μπορεί να είναι τα πεπτίδια μη ριβοσωμικής προέλευσης (NRPs) (Tyc et al., 2016), όπως λιποπεπτίδια και σιδηροφόρα, αλλά και τα ένζυμα. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση πως τα αντιβιοτικά κυρίως διεγείρουν την άμυνα του φυτού και αποτελούν τρόπο επικοινωνίας μεταξύ των μικροοργανισμών, παρά ανταγωνίζονται άμεσα τα φυτοπαθογόνα (Chowdhury et al., 2015b).

Κατά την επίδειξη ανταγωνισμού μετά από επαφή, το βακτήριο πιθανώς παρασιτεί τα κύτταρα του μύκητα και προκαλεί τη λύση τους (Kobayashi & Crouch, 2009). Στην παρούσα μελέτη αναφέρεται και ο ανταγωνισμός μέσω επαφής του ενδοφυτικού βακτηρίου με το φυτοπαθόγνο αλλά και εισόδου του στην περιοχή του. Έχει αναφερθεί ο θάνατος μυκηλιακών μετά την επαφή τους με το ανταγωνιστικό βακτήριο (Tan et al., 2015).

Η αλληλεπίδραση των ενδοφυτικών βακτηρίων με το μύκητα *R.solani* οδήγησε κυρίως σε αλληλεπίδρασεις όπου το βακτήριο έρχεται σε επαφή με το μύκητα ή/και εισέρχεται στην περιοχή ανάπτυξής του. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως σε καμμία αλληλεπίδραση δε σχηματίστηκε ζώνη παρεμπόδισης, χωρίς αυτό να σημαίνει πως δεν μπορεί να παράγονται αντιμικροβιακές ουσίες.

Η συγκαλλιέργεια των ενδοφυτικών βακτηρίων με το μύκητα *F. oxysporum* fsp *raphani* οδήγησε κυρίως σε αλληλεπίδραση όπου το βακτήριο εισέρχεται στην περιοχή του μύκητα ή δημιουργείται ζώνη παρεμπόδισης. Από τα απομονωμένα ενδοφυτικά βακτήρια, 14 φαίνεται να ήταν ανταγωνιστικά ως προς το μύκητα ενώ 1 δεν ήταν. Υπάρχουν και 14 βακτήρια για τα οποία χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση, καθώς σχηματίζονται φαινότυποι κατά την αλληλεπίδραση όπου δεν είναι ξεκάθαρο αν πρόκειται για παρεμπόδιση. Ο ένας φαινότυπος αποτελεί την ανάπτυξη του βακτηρίου πάνω στις υφές του φυτοπαθογόνου μύκητα ενώ αυτός πιθανά αναπτύσσεται και παρατηρείται σε ένα βακτήριο του γένους *Pseudomonas*. Ο άλλος φαινότυπος, όπου πάλι δεν είναι ξεκάθαρο αν οι υφές του μύκητα αναπτύσσονται ενώ πάνω τους βρίσκεται το βακτήριο, παρατηρήθηκε σε βακτήρια του γένους *Bacillus*.

Τέλος, ο κυρίαρχος τύπος αλληλεπίδρασης μεταξύ των ενδοφυτικών βακτηρίων και του *B. cinerea* ήταν η δημιουργία ζώνης παρεμπόδισης. Ανταγωνιστικά ως προς το μύκητα ήταν 13 ενδοφυτικά βακτήρια ενώ υπήρχαν και 12 μη ανταγωνιστικά. Ο μύκητας κύκλωσε τα μη ανταγωνιστικά, ωστόσο διαφάνηκε μια μικρή ζώνη παρεμπόδισης που τον κρατάει σε απόσταση. Έτσι, μία υπόθεση είναι πως εκκρίνονται ουσίες παρεμποδιστικές του μύκητα, οι οποίες δε διαχέονται σε μεγάλη απόσταση στο μέσο, όπως τα λιποπεπτίδια surfactins (Cawoy et al., 2014).

Ζώνη παρεμπόδισης με ικανοποιητική παρεμπόδιση παρατηρήθηκε στις αλληλεπιδράσεις των φυτοπαθογόνων με το γένος *Bacillus*.

Συμπερασματικά, τα ενδοφυτικά βακτήρια που είναι ξεκάθαρα ανταγωνιστικά σε όλους τους φυτοπαθογόνους μύκητες ανήκουν στο γένος *Bacillus*.

Πιθανώς, κάποια βακτήρια εξαπέλυσαν υδρολυτικά ένζυμα καθώς παρατηρήθηκε αραιώση των υφών στο σημείο επαφής ή αλλαγή της μακροσκοπικής μορφολογίας τους σε σχέση με το μάρτυρα. Έτσι, μελλοντικά μπορεί να εξεταστεί η ικανότητα των ενδοφυτικών βακτηρίων να παράγουν και να εκκρίνουν υδρολυτικά ένζυμα, όπως πρωτέασες και χιτινάσες (Tan et al., 2015; Ben Abdallah et al., 2016; Shehata et al., 2016; Ahmad et al., 2017). Ακόμη, η αλλαγή της μορφολογίας και ο θάνατος των υφών στις αλληλεπιδράσεις βακτηρίων-μυκήτων, αλλά και η πρόσδεση των βακτηρίων στις υφές μπορούν στο μέλλον να επιβεβαιωθούν με μικροσκοπία (Zhao et al., 2014; Ohike et al., 2015; Tan et al., 2015; Shehata et al., 2016; Agarwal et al., 2017).

Ένα ακόμα φαινόμενο που παρατηρήθηκε και πρέπει να τονιστεί ήταν η αλλαγή του τύπου αλληλεπίδρασης (επαφή, είσοδος ή ζώνη παρεμπόδισης) ενός βακτηρίου ανάλογα με το μύκητα που ήταν απέναντι του. Κάτι τέτοιο έχει παρατηρηθεί από τους Sasirenka και Srividya (2016), όπου παρεμπόδιση της ανάπτυξης του ενός μύκητα οφείλεται σε παραγωγή σιδηροφόρων, ενώ του άλλου όχι. Γενικά, ένα βακτήριο μπορεί να διαθέτει διάφορους τρόπους ανταγωνισμού και να επιστρατεύει συνδυασμό τους ανάλογα με τον «αντίπαλο» του. Επιπροσθέτως, στη συγκεκριμένη μελέτη, μια βακτηριακή απομόνωση μπορεί να εμφάνισε τον ίδιο τύπο αλληλεπίδρασης στους φυτοπαθογόνους μύκητες αλλά να είχε άλλο φαινότυπο-μοτίβο. Για παράδειγμα, μία απομόνωση εισέρχεται στην περιοχή των φυτοπαθογόνων μυκήτων *R.solani* και *F.oxysporum* fsp *raphani* κυκλώνοντας τους αλλά ο φαινότυπος της αλληλεπίδρασης είναι διαφορετικός σε κάθε περίπτωση. Άλλο ένα φαινόμενο που παρατηρήθηκε σε κάποιες αλληλεπιδράσεις ενδοφυτικών βακτηρίων-φυτοπαθογόνων μυκήτων είναι η αλλαγή της μορφολογίας της μακροαποικίας του βακτηρίου ανάλογα με το μύκητα που έχει απέναντι του. Συμπερασματικά, φαίνεται πως η ταυτότητα του μύκητα έχει επίδραση στην έκβαση της αλληλεπίδρασης με τα βακτήρια σε κάποιες περιπτώσεις.

Τέλος, παρατηρήθηκε πως κάποια βακτήρια κινούνταν περισσότερο προς την αντίθετη μεριά από αυτή που ήταν ο μύκητας παρουσιάζοντας πιθανή καταστροφή της μακροαποικίας που βρισκόταν στο μέτωπο της αλληλεπίδρασης. Τέτοιο φαινόμενο έχει παρατηρηθεί κατά την αλληλεπίδραση ενδοφυτικών μικροοργανισμών, όπου ο μύκητας είχε την ικανότητα να υδρολύει τα λιποπεπτίδια του βακτηρίου αλλά και να εκκρίνει αντιβακτηριακές ουσίες (Vallet et al., 2017).

Πέρα από την *in vitro* ικανότητα βιολογικού ελέγχου μελετήθηκαν και άλλα χαρακτηριστικά των απομονωμένων ενδοφυτικών βακτηρίων. Η ικανότητα ομαδικής κίνησης είναι πολύ σημαντική για την προσέγγιση του φυτού στο έδαφος, για την κίνηση πάνω στις φυτικές επιφάνειες και στο εσωτερικό των ιστών του (Venieraki et al., 2016), αλλά και για την προσέγγιση των φυτοπαθογόνων (Shehata et al., 2016). Στη συγκεκριμένη μελέτη 24 από τα 25 ενδοφυτικά βακτήρια που εξετάστηκαν πραγματοποιούν ομαδική κίνηση σε ημι-στερεό θρεπτικό μέσο. Συγκεκριμένα, 9 βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Bacillus* διαθέτουν την καλύτερη ικανότητα ομαδικής κίνησης καθώς κάλυψαν το τρυβλίο στις 24 ώρες επώασης. Τα αμέσως καλύτερα από άποψη ομαδικής κίνησης είναι εκείνα που κάλυψαν το τρυβλίο στις 3 επόμενες ημέρες και μοιράζονται στα γένη *Bacillus* και *Pseudomonas*. Μια παρατήρηση που έγινε σε σχέση με τους ελέγχους ανταγωνιστικότητας, ήταν πως βακτήρια που κάνουν λίγο ή καθόλου swarming σε ημιστερεό μέσο, κινούνται όταν βρίσκονται μαζί με το φυτοπαθογόνο μύκητα. Μία πρόσφατη μελέτη δείχνει πως πτητικές ενώσεις μυκήτων μπορούν να διεγείρουν ή να καταστείλλουν τη βακτηριακή κινητικότητα swarming και swimming, ειδικά υπό συνθήκες περιορισμού των θρεπτικών (Schmidt et al., 2016).

Τέλος, πραγματοποιήθηκε *in vitro* έλεγχος της παραγωγής σιδηροφόρων και διαλυτοποίησης ιζηματοποιημένου φωσφόρου, χαρακτηριστικά που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών.

Ειδικότερα, η παραγωγή σιδηροφόρων βοηθά το φυτό παρέχοντας του σίδηρο υπό συνθήκες έλλειψης στο έδαφος ενώ το στερεί από τα παθογόνα εκτός και εντός του φυτού (Ahmed & Holmström, 2014; Hardoim et al., 2015). Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η παραγωγή σιδηροφόρων μέσω του πορτοκαλί μεταχρωματισμού στερεού θρεπτικού μέσου CAS γύρω από κηλίδα βακτηρίου. Από τα 25 ενδοφυτικά βακτήρια, τα 20 παρήγαγαν σιδηροφόρα. Τα 9 από τα 12 που αποχρωμάτισαν όλο το μέσο στις 4 ημέρες ανήκουν στο γένος *Pseudomonas* ενώ τα υπόλοιπα 3 στο γένος *Bacillus*. Ακόμη, τα 5 που δεν αποχρωμάτισαν το μέσο ανήκουν στο γένος *Bacillus*. Έτσι, παρατηρείται πως τα απομονωμένα ενδοφυτικά βακτήρια του γένους *Pseudomonas* διαθέτουν μεγαλύτερη ικανότητα παραγωγής σιδηροφόρων από εκείνα του γένους *Bacillus*. Έχουν αναφερθεί ενδοφυτικά βακτήρια των γενών *Bacillus* και *Pseudomonas* που παράγουν σιδηροφόρα (Jasim et al., 2013; Ahmad et al., 2017). Επίσης, υπάρχουν μελέτες όπου απομονωμένα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* παράγουν ενώ του *Bacillus* δεν παράγουν (Kumar et al., 2014). Η έκκριση σιδηροφόρων έχει αναφερθεί ως μέσο παρεμπόδισης της ανάπτυξης φυτοπαθογόνων μυκήτων σε *in vitro* μελέτες (Santos-Villalobos et al., 2012; Sasirenka & Srividya, 2016). Σε κάποιες περιπτώσεις παρατηρήθηκε πως η πορτοκαλί άλως βρισκόταν σε

μικρή απόσταση από την αποικία, ενώ σε άλλες σε μεγάλη. Αυτό ίσως οφείλεται στη φύση των παραγόμενων σιδηροφόρων και την ικανότητα διάχυσής τους στο μέσο.

Όσον αφορά τη διαλυτοποίηση του ιζηματοποιημένου φωσφόρου, τα ενδοφυτικά βακτήρια εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα σχηματισμού διαφανής άλω σε στερεό θρεπτικό μέσο PVK που περιέχει ιζηματοποιημένο φώσφορο. Από τα 25 ενδοφυτικά βακτήρια που εξετάστηκαν τα 24 ήταν ικανά να διαλυτοποιήσουν το φώσφορο. Την πιο μεγάλη άλω εμφάνισαν 2 βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Bacillus* και 8 που ανήκουν στο γένος *Pseudomonas*. Τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, λοιπόν, είναι περισσότερο ικανά και σε αυτό το χαρακτηριστικό γνώρισμα. Σε άλλες μελέτες απομονωμένα ενδοφυτικά βακτήρια του γένους *Bacillus* (Kumar et al., 2014; Ahmad et al., 2017; Hassan, 2017) αλλά και *Pseudomonas* (Kumar et al., 2014; Oteina et al., 2015) ήταν ικανά να διαλυτοποιήσουν το φώσφορο. Γενικά, οι διάμετροι της διαφανής άλω ποικίλλουν από 0.8 cm έως 1.8 cm (Patel et al., 2012; Ben Abdallah et al., 2016).

Πέρα από την ομαδική κίνηση (swarming motility) θα μπορούσε να ελεγχθεί και η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου (biofilm formation), χαρακτηριστικό σημαντικό για την πρόσδεση των ενδόφυτων στους φυτικούς ιστούς αλλά και την καταπολέμηση των φυτοπαθογόνων μυκήτων (Haggag & Timusk, 2008; Haggag, 2010; Shehata et al., 2016). Θα μπορούσαν, επίσης, να ελεγχθούν και άλλα χαρακτηριστικά προαγωγής της αύξησης των φυτών, όπως η παραγωγή ινδολοξικού οξέος (Jasim et al., 2013; Kumar et al., 2014; Ben Abdallah et al., 2016; Herrera et al., 2016) και η *in vitro* προαγωγή της ανάπτυξης του φυτού-μοντέλου *Arabidopsis* (Maldonado-González et al., 2015; Eljounaidi et al., 2016).

Γενικά, βακτήρια του γένους *Pseudomonas* ήταν ικανοποιητικοί ανταγωνιστές των φυτοπαθογόνων μυκήτων *R.solani* και *F.oxysporum* fsp *raphani* μέσω επαφής και εισόδου στην περιοχή του μύκητα και ικανά να παράγουν σιδηροφόρα και να διαλυτοποιήσουν φώσφορο. Ωστόσο, δεν ήταν ανταγωνιστικά εναντίον του *B.cinerea* παρ'όλο που σχηματιζόταν μια μικρή ζώνη παρεμπόδισης. Επίσης, δεν διέθεταν τόσο καλή ομαδική κινητικότητα σε ημιστερεό μέσο. Σε αντίθεση, τα βακτήρια του γένους *Bacillus* ήταν ανταγωνιστικά εναντίον των μυκήτων *R.solani* και *B.cinerea*, με επαφή, είσοδο και δημιουργία ζωνών παρεμπόδισης, ενώ η ανταγωνιστικότητά τους σε αρκετές περιπτώσεις απαιτεί διερεύνηση εναντίον του *F.oxysporum* fsp *raphani*. Ακόμη, τα περισσότερα διαθέτουν άριστη ομαδική κινητικότητα σε ημιστερεό μέσο, αλλά υστερούν στην παραγωγή σιδηροφόρων και τη διαλυτοποίηση φωσφόρου. Έτσι, διαφαίνεται η ανάγκη χρήσης συμβατών ενδοφυτικών βακτηρίων, όπου το καθένα θα επιτελεί διαφορετική λειτουργία (Li et al., 2016).

Ενδιαφέρον θα είχε η διερεύνηση ύπαρξης γονιδίων που κωδικοποιούν για πεπτιδά μη ριβοσωμικής προέλευσης (Zhao et al., 2014; Passari et al., 2016) αλλά και εντοπισμός των γονιδίων που εμπλέκονται στον ανταγωνιστικό φαινότυπο των βακτηρίων μέσω τυχαίας μεταλλαξιγένεσης (Shehata et al., 2016).

Όσον αφορά τους μύκητες, κατηγοριοποιήθηκαν σε μορφότυπους και επιλέχθηκε ένας αντιπρόσωπος από τον καθένα. Η ακριβής κατηγοριοποίηση σε μορφότυπους είναι μία δύσκολη διαδικασία, καθώς απομονώσεις μπορεί να έχουν ολόιδιο φαινότυπο αλλά να ανήκουν σε διαφορετικά είδη και το αντίστροφο (Ibrahim et al., 2017).

Στα φύλλα δέσποζε το γένος *Alternaria* με 6 μορφότυπους, ενώ υπήρχε 1 μορφότυπος που ανήκει στο γένος *Epicoccum*, 2 που ανήκουν στο γένος *Chaetomium* και 1 που ανήκει στο γένος *Fusarium*. Στη ρίζα, δέσποζε το γένος *Fusarium* με 9 αντιπροσωπευτικούς μορφότυπους, ενώ εμφανίστηκαν 2 μορφότυποι που ανήκουν στο γένος *Chaetomium*, 1 στο γένος *Boeremia* και 1 στο γένος *Phoma* ή *Didymella*. Τα γένη ήταν ειδικά για τον κάθε ιστό με εξαίρεση μία απομόνωση του γένους *Fusarium* στα φύλλα και το γένος *Chaetomium* που υπήρχε και στους δύο ιστούς. Αυτό το γεγονός έχει παρατηρηθεί και από άλλους ερευνητές και ορίζεται ως «tissue preference» (Fernandes et al., 2015; López-González et al., 2017). Επίσης, παρατηρήθηκε πως δεν υπήρχε κανένας ίδιος μορφότυπος μεταξύ των δύο ιστών.

Κατά την ανάλυση φυτών *Teucrium polium* στην Αίγυπτο βρέθηκαν ενδοφυτικοί μύκητες του γένους *Penicillium* (Hassan., 2017) και *Alternaria* (Selim et al., 2011).

Άλλοι ερευνητές έχουν αναφέρει την ύπαρξη ενδοφυτικών μικροοργανισμών του γένους *Alternaria* σε φύλλα αρωματικών, καλλιεργούμενων και ενδημικών φυτών (Larran et al., 2007; Rivera- Orduña et al., 2010; Goveas et al., 2011; Anitha et al., 2013; Chowdhary & Kaushik, 2015; Fernandes et al., 2015; Landum et al., 2016; Varanda et al., 2016; López-González et al., 2017). Τα είδη του γένους *Alternaria* είναι συνήθως τα κύρια που απαντώνται στη φυλλική ενδόσφαιρα καθώς διαθέτουν υφές με υψηλή ποσότητα μελανίνης και μπορούν να αναπτυχθούν υπό έντονη UV ακτινοβολία (Varanda et al., 2016).

Μύκητες του γένους *Fusarium* βρίσκονται σχεδόν σε κάθε απομόνωση ενδόφυτων της ρίζας (Demers et al., 2014; Zhang et al., 2014; Fernandes et al., 2015; Yao et al., 2017; Park et al., 2017) και λιγότερο στα φύλλα (Chowdhary & Kaushik, 2015; Fernandes et al., 2015; López-González et al., 2017).

Ενδοφυτικοί μύκητες του γένους *Chaetomium* έχουν βρεθεί σε αρωματικά φυτά (Kusari et al., 2009; Chowdhary & Kaushik, 2015; Yao et al., 2017), ελιά (Landum et al., 2016), ελαιοκράμβη (Zhang et al., 2014) και άλλα φυτά (Miles et al., 2012).

Ενδοφυτικοί μύκητες του γένους *Epicoccum* έχουν απομονωθεί από φύλλα αμπελιού (Pancher et al. 2012; Varanda et al., 2016), σφενδάμου (Lahlali & Hijri, 2010), ελιάς (Landum et al., 2016), σιταριού (Larran et al., 2007) και άλλων φυτών (Miles et al., 2012; Zhang et al., 2014; Hardoim et al., 2015).

Τέλος, υπάρχουν αναφορές για ενδοφυτικούς μύκητες που ανήκουν στο γένος *Boeremia* (Ibrahim et al., 2017; López-González et al., 2017; Rothen et al., 2017) αλλά και *Phoma* (López-González et al., 2017; Park et al., 2017; Vries et al., 2017).

Πρέπει να σημειωθεί πως η ανάλυση των περιοχών 5.8S-ITS πολλές φορές υποτιμά την ταξινομική ποικιλότητα των ενδοφυτικών μυκήτων (Gazis et al., 2011). Ακόμη, δεν είναι όλες οι διαθέσιμες αλληλουχίες των βάσεων δεδομένων σωστές, κάνοντας ακόμα πιο δύσκολη την ταυτοποίηση (Yamamoto & Bibby, 2014). Είναι αναγκαία, λοιπόν, η αλληλούχιση και άλλων περιοχών ώστε ένας μύκητας να ταυτοποιηθεί σε επίπεδο είδους. Ωστόσο, ακόμα και απομονώσεις που ανήκουν στο ίδιο είδος μπορεί να διαφέρουν ως προς τις οικολογικές τους λειτουργίες. Ως παράδειγμα αναφέρεται μια μελέτη των Kandula και συνεργατών (2015), όπου απομονώσεις του είδους *Trichoderma atroviride* διέφεραν στον ανταγωνισμό των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* και *Sclerotinia trifoliorum*. Τέτοιο γεγονός είναι δυνατόν να οφείλεται σε ενδοειδικές διαφοροποιήσεις σε επίπεδο στελέχους ή σε διαειδικές, οι οποίες δεν έγιναν αντιληπτές μόνο με την αλληλουχία της ITS περιοχή (Kdijalg et al., 2013). Έτσι, αναγκαία είναι η ακριβής ταυτοποίηση τους και με άλλα γονίδια-μάρτυρες.

Είναι δύσκολη η απόδοση οικολογικής λειτουργίας σε επίπεδο γένους ή και είδους καθώς σε αυτά μπορεί να περιέχονται φυτοπαθογόνα αλλά και ωφέλιμα ενδόφυτα (Rodríguez-Estrada et al., 2012; Rodríguez et al., 2015). Φαίνεται να υπάρχει ένα συνεχές (continuum) στην αλληλεπίδραση των ενδοφυτικών μικροοργανισμών με τον ξενιστή τους (Redman et al., 2001). Η λειτουργία των μικροοργανισμών ως προς το φυτό (commensalism, mutualism, antagonism) μπορεί να αλλάζει ανάλογα με τα περιβαλλοντικά, χημικά ή μοριακά σιγνάλα (Müller & Krauss, 2005; Schulz & Boyle, 2005; Hyde & Soyong, 2008; Eaton et al., 2011; Klopper et al., 2013; Lahrmann et al., 2013; Hardoim et al., 2015; Sheibani-Tezerji et al., 2015). Επίσης, η υπόθεση πως οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί είναι λανθάνοντα παθογόνα ή σαπρότροφα (Photita et al., 2004) δεν μπορεί να ελεγχθεί με ακρίβεια καθώς τα ενδόφυτα εξετάζονται σε ένα ή λίγα είδη φυτών και η περίοδος

παρατήρησης μπορεί να είναι πολύ μικρή για το συγκεκριμένο μικροοργανισμό. Είναι γνωστό πως φυτοπαθογόνοι μύκητες μπορεί να είναι μη παθογόνοι ή και ωφέλιμοι ενδοφυτικοί σε άλλους φυτικούς ξενιστές (Freeman et al., 2001; Vilhelmsson et al., 2016), όπως στελέχη του *Fusarium oxysporum* (Athman et al., 2006; Aime et al., 2013). Ακόμη, ο μύκητας *F. verticillioides* δρα ως ωφέλιμο ενδόφυτο (Bacon et al., 2008; Lee et al., 2009; Rodriguez- Estrada et al., 2012). Είδη του γένους *Alternaria* έχουν θετικές επιδράσεις σε φυτά ανάλογα με το στέλεχος (Newcombe et al., 2009; Aschehoug et al., 2014). Έτσι, υπάρχει η ανάγκη κατανόησης των οικολογικών και μοριακών μηχανισμών που οδηγούν στην αλλαγή της συμπεριφοράς ενός ενδοφυτικού μικροοργανισμού (Hacquard et al., 2016). Στο μέλλον, θα μπορούσαν να γίνουν εμβολιασμοί επιλεγμένων ενδοφυτικών μυκήτων σε καλλιεργούμενα φυτά ώστε να αξιολογηθεί η πιθανή παθογένειά τους.

Στα πλαίσια αυτής της μελέτης πραγματοποιήθηκαν αλληλεπιδράσεις των ενδοφυτικών μυκήτων μεταξύ τους αλλά και με φυτοπαθογόνους μύκητες. Ιστορικά, οι πρώτες συγκαλλιέργειες μυκήτων πραγματοποιήθηκαν σε στερεό μέσο. Η καλλιέργεια σε τέτοιο μέσο ομοιάζει περισσότερο με τις συνθήκες του περιβάλλοντος όπου αναπτύσσονται οι μύκητες. Η μέθοδος της διπλής καλλιέργειας (dual culture) επιτρέπει τη μελέτη των μορφολογικών και μεταβολικών αλλαγών που συμβαίνουν στο μυκηλιακό μέτωπο αλλά και των μοτίβων που σχηματίζονται κατά την αλληλεπίδραση μυκήτων (Boddy, 2000; Woodward & Boddy, 2008; Bertrand et al., 2013a).

Οι υφές ίδιων μυκήτων συντήκονται όταν οι πόροι είναι περιορισμένοι ενώ διαφορετικά άτομα, ακόμα και του ίδιου είδους, επιδεικνύουν συνήθως ανταγωνιστική συμπεριφορά (Gruber & Seidl-Seiboth, 2012; Yan et al., 2015). Στις ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις, είτε υπάρχει παρεμπόδιση της ανάπτυξης, λόγω έκκρισης μεταβολιτών και λυτικών ενζύμων (interference competition), είτε χρήση θρεπτικών ή/και χώρου του ενός τα οποία δεν είναι διαθέσιμα στον άλλον (exploitation competition). Αυτά τα φαινόμενα μπορούν να εκφραστούν όταν οι μύκητες βρίσκονται σε απόσταση ή μετά την φυσική επαφή των υφών τους (Falconer et al., 2008).

Για τη διερεύνηση της *in vitro* ικανότητας βιολογικού ελέγχου των ενδοφυτικών μυκήτων, πραγματοποιήθηκαν αλληλεπιδράσεις τους με τους φυτοπαθογόνους μύκητες *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* fsp *raphani* και *Botrytis cinerea*, σημαντικά φυτοπαθογόνα που προκαλούν σοβαρές οικονομικές απώλειες παγκοσμίως. Οι αλληλεπιδράσεις των απομονωμένων ενδοφυτικών μυκήτων με τα φυτοπαθογόνα κατηγοριοποιήθηκαν σε τύπους σύμφωνα με τους Badalyan και συνεργάτες (2002) και Bertrand και συνεργάτες (2013a). Συγκεκριμένα,

παρατηρήθηκε η παύση ανάπτυξης των δύο μυκήτων κατά την επαφή με δημιουργία γραμμικής/χρωματισμένης ζώνης ή χωρίς δημιουργία τέτοιας ζώνης, παύση ανάπτυξης των δύο μυκήτων σε απόσταση, ανάπτυξη του ενδόφυτου πάνω από το φυτοπαθογόνο ή το αντίστροφο.

Όσον αφορά το βιολογικό έλεγχο, ένας υποσχόμενος παράγοντας είναι αυτός που παρεμποδίζει την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου. Αυτό μπορεί να απεικονιστεί με τη μεγαλύτερη ανάπτυξη του ενδόφυτου από το παθογόνο, με την ανάπτυξη του πάνω στο παθογόνο ή/και τον παρασιτισμό του (Mejía et al., 2008; Vries et al., 2017). Στη συγκεκριμένη μελέτη κάθε ένας από τους ενδοφυτικούς μύκητες επέδειξε *in vitro* ανταγωνισμό έναντι τουλάχιστον ενός παθογόνου. Έχουν καταγραφεί ενδοφυτικοί μύκητες των γενών *Alternaria* (Chowdhary & Kaushik, 2015), *Fusarium* (Kavroulakis et al., 2007; Rodriguez-Estrada et al. 2012; Chowdhary & Kaushik, 2015; Larran et al. 2016; Šišić et al., 2016), *Chaetomium* (Gao et al., 2005a,b; Gange et al., 2012; Wang et al., 2012; Awad et al., 2014; Busby et al., 2015; Chowdhary & Kaushik, 2015; Larran et al., 2016) και *Epicoccum* (Musetti et al., 2007; Lahlali & Hijri, 2010; Fávares et al., 2012) με ικανότητα ανταγωνισμού φυτοπαθογόνων.

Η εμφάνιση ζώνης παρεμπόδισης υποδεικνύει την παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων από τον έναν ή και τους δύο μικροοργανισμούς που είναι διαχεόμενες στο μέσο ή πτητικές και έχουν ως αποτέλεσμα παύση της ανάπτυξης. Γενικά, θεωρείται ο πλέον κατάλληλος για αξιολόγηση του ανταγωνισμού μεταξύ μικροοργανισμών αλλά και για αναλύσεις μεταβολιτών (Combès et al., 2012; Miles et al., 2012; Bertrand et al., 2013b; Chagas et al., 2013). Στη συγκεκριμένη μελέτη, ζώνη παρεμπόδισης σχηματίστηκε μόνο κατά την αλληλεπίδραση του μύκητα γένους *Epicoccum* έναντι δύο εκ των φυτοπαθογόνων. Μειωμένη επίδειξη αντιβιοτικής ικανότητας έναντι φυτοπαθογόνων έχει παρατηρηθεί από άλλους μελετητές (Mejía et al., 2008).

Ένας μύκητας μπορεί να αναπτύσσεται πάνω από τον άλλον κατά τον ανταγωνισμό για χώρο και θρεπτικά ή/και να τον παρασιτεί (Mejía et al., 2008). Στη συγκεκριμένη εργασία βρέθηκαν μύκητες που ήταν ικανοί να αναπτύσσονται πάνω από άλλους (*overgrowth*), χωρίς να είναι ξεκάθαρο αν εμπλέκεται ο μυκοπαρασιτισμός. Κάποιοι απομονωμένοι ενδοφυτικοί μύκητες, 1 του γένους *Alternaria* και 3 του γένους *Fusarium* παρεμπόδισαν σημαντικά και τα τρία φυτοπαθογόνα μέσω *overgrowth*.

Σε κάποιες περιπτώσεις η παρεμπόδιση πραγματοποιείται μετά τη φυσική επαφή των υφών (Mejía et al., 2008; Miles et al., 2012; Landum et al., 2016; Naidu et al., 2016; Preto et al., 2017). Στη συγκεκριμένη μελέτη υπήρχαν δύο τύποι όπου η ανάπτυξη των αλληλεπιδρώντων μυκήτων σταματούσε κατά την επαφή τους, με δημιουργία ή χωρίς γραμμικής/χρωματισμένης ζώνης.

Όσον αφορά τη γραμμική ζώνη (zone line) αυτή δημιουργήθηκε και σε αλληλεπιδράσεις τύπου overgrowth, πέρα από τις αλληλεπιδράσεις επαφής. Η ένταση του μαύρου ή άλλου χρωματισμού των γραμμικών ζωνών στις αλληλεπιδράσεις μυκήτων είναι ένδειξη σημαντικής μεταβολικής δραστηριότητας που μπορεί να ερευνηθεί για νέους μεταβολίτες (Peiris et al., 2008; Glauser et al., 2009; Bertrand et al., 2013a; Bohni et al., 2013). Ακόμη, σε λίγες περιπτώσεις παρατηρήθηκε χρωματισμός των μυκηλίων κατά την αλληλεπίδραση, γεγονός που έχει καταγραφεί και από άλλες έρευνες (Combés et al., 2012; Naidu et al., 2016; Preto et al., 2017). Ο χρωματισμός του μυκηλίου μπορεί να υποδεικνύει παραγωγή μελανίνης που προστατεύει τα κύτταρα από παράγοντες όπως η υπεριώδης ακτινοβολία και τα λυτικά ένζυμα (Butler et al., 2009).

Στη μελέτη των Cao και συνεργατών (2009) παρατηρήθηκε πως ενδοφυτικοί μύκητες επέδειξαν μυκοπαρσιτισμό και παραγωγή λυτικών ενζύμων εναντίον φυτοπαθογόνων μυκήτων χωρίς τη δημιουργία ζώνης παρεμπόδισης. Ενδιαφέρουσα θα ήταν η μικροσκοπική παρατήρηση της αλληλεπίδρασης ενδοφυτικών μυκήτων και φυτοπαθογόνων, αλλά και η διερεύνηση παραγωγής λυτικών ενζύμων (Gao et al., 2005a,b; Lahlali & Hijri, 2010; Combés et al., 2012; Naidu et al., 2016).

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μυκήτων του ίδιου ιστού κατηγοριοποιήθηκαν σε τύπους, πάλι με πρότυπο τους Badalyan και συνεργάτες (2002) και Bertrand και συνεργάτες (2013a). Οι τύποι που καταγράφηκαν ήταν η παύση ανάπτυξης των δύο μυκήτων κατά την επαφή με δημιουργία γραμμικής/χρωματισμένης ζώνης (zone/pigmentation line) ή χωρίς τη δημιουργία τέτοιας ζώνης, η παύση ανάπτυξης των δύο μυκήτων σε απόσταση, η ανάπτυξη του ενός μύκητα πάνω από τον άλλον (overgrowth) και η ανάπτυξη του ενός μύκητα πάνω στον άλλον με μετέπειτα δημιουργία φαινοτύπου σαν παύση από απόσταση. Ο τελευταίος τύπος παρατηρήθηκε κατά την αλληλεπίδραση των 2 μορφοτύπων από τα φύλλα που ανήκουν στο γένος *Chaetomium* και σε μία αλληλεπίδραση ενός μορφοτύπου του γένους *Fusarium*. Αυτός ο τύπος έχει καταγραφεί μόνο από τους Moya και συνεργάτες (2016), απ' όσο γνωρίζουμε, με μύκητα του γένους *Chaetomium*.

Στα πλαίσια της αλληλεπίδρασης ενδοφυτικών μυκήτων του ίδιου ιστού, πραγματοποιήθηκαν αλληλεπιδράσεις των μυκήτων με τον εαυτό τους. Κατά την αλληλεπίδραση αυτή εντοπίστηκαν συγκεκριμένα μοτίβα που έχουν καταγραφεί και από άλλες μελέτες (Brasier & Webber, 2013). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε η πλήρης ένωση των υφών (Τύπος Aa), ένωση με τμήματα που δεν ήταν ενωμένα (Τύπος Ba) αλλά και μικρή απόσταση μεταξύ των υφών διαφορετικών κομματιών

του ίδιου μύκητα (Τύπος Ca). Η μη πλήρης ένωση των υφών του ίδιου μύκητα έχει παρατηρηθεί και από άλλους μελετητές για τους *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum*, *F. graminearum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rosellinia necatrix* και *Hymenoscyphus pseudoalbidus* (McCallum et al., 2004; Ikeda et al. 2011; Brasier & Webber, 2013; Papaioannou & Typas, 2014).

Στη συγκεκριμένη μελέτη, κατά την αλληλεπίδραση ενδοφυτικών μυκήτων του ίδιου ιστού παρατηρήθηκε ο τύπος παύσης της ανάπτυξης σε απόσταση μόνο σε συνδυασμό με άλλους τύπους που περιείχαν επαφή και μόνο στην απομόνωση F.Tel.7 που ανήκει στο γένος *Epicoccum*. Όσον αφορά τις αλληλεπιδράσεις των ενδοφυτικών μυκήτων με τους φυτοπαθογόνους μύκητες, αυτός ο τύπος παρατηρήθηκε πάλι σε δύο περιπτώσεις με την απομόνωση του γένους *Epicoccum*. Ακόμη, ο μύκητας αυτός εμφάνισε μικρή ζώνη παρεμπόδισης και κατά την αλληλεπίδραση με τον εαυτό του. Ο συγκεκριμένος μύκητας ήταν ικανός να αλλάζει και τη μορφολογία των υφών αντιπάλων του (π.χ. Εικ. 4.25). Τα γεγονότα αυτά δείχνουν πως ο συγκεκριμένος μύκητας είναι ικανός να παράγει αντιμικροβιακές ενώσεις, οι οποίες θα μπορούσαν να μελετηθούν περαιτέρω για την αντιμικροβιακή τους δράση, αλλά και για να εξακριβωθεί αν είναι είναι αποτέλεσμα επαγωγής νέων μεταβολιτών.

Η διάρκεια παρατήρησης αλληλεπιδράσεων μυκήτων διαφέρει σε κάθε μελέτη και μπορεί να είναι από 10 ημέρες έως 2 μήνες (Vries et al., 2017). Στην παρούσα μελέτη με διάρκεια 30 ημερών παρατηρήθηκε αλλαγή του τύπου της αλληλεπίδρασης των ενδοφυτικών μυκήτων σε κάποιες περιπτώσεις με το πέρας των ημερών, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από άλλους ερευνητές (Kusari et al., 2012; Bertrand et al., 2013a).

Ωστόσο, οι φαινότυποι αλληλεπίδρασης μυκήτων της παρούσας μελέτης είναι αποτέλεσμα της καλλιέργειας του σε συγκεκριμένο μέσο, όπως ανέφεραν οι Miles και συνεργάτες (2012). Σύμφωνα με το μοντέλο OSMAC (**o**ne strain, **m**any compounds) (Bode et al., 2002), οι μεταβολίτες που παράγονται από τους μύκητες μπορεί να αλλάζουν ανάλογα με το θρεπτικό μέσο και τις συνθήκες καλλιέργειας. Διαφοροποιήσεις στους τύπους και την ένταση της παρεμπόδισης κατά την παρατήρηση αλληλεπιδράσεων σε ποικίλα θρεπτικά μέσα έχουν αναφερθεί από τους Kusari και συνεργάτες (2012).

Οι ερευνητές πιστεύουν πως για να αναπτυχθούν τα ενδοφυτικά μικρόβια ασυμπτωματικά μέσα στον ξενιστή τους, πρέπει να διατηρήσουν έναν ισορροπημένο ανταγωνισμό (balanced antagonism) με αυτόν αλλά και με τα υπόλοιπα ενδόφυτα (Schulz et al., 2015). Έτσι, παράγονται δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι πιθανώς λειτουργούν ως χημικά σήματα για τον ανταγωνισμό και την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων των μικροοργανισμών, αλλά και μεταξύ

μικροοργανισμών και ξενιστή (Partida-Martinez & Hertweck, 2005; Kusari et al. 2012a; Wang et al., 2015). Παράλληλα, βοηθούν και στην άμυνα εναντίον επιβλαβών οργανισμών (Raman et al., 2012). Στη μελέτη των Chagas και συνεργατών (2013), παρατηρήθηκε η παραγωγή μη φυτοτοξικών μεταβολιτών ενός ενδοφυτικού μύκητα με αργό ρυθμό ανάπτυξης έναντι ενός άλλου με γρηγορότερο μόνο κατά τη διπλή καλλιέργεια τους. Οι ερευνητές συμπέραναν πως αυτό το φαινόμενο οδηγεί στον έλεγχο του δεύτερου ώστε να μην καταλάβει όλο το φυτό χωρίς να προκαλεί βλάβη στον ξενιστή.

Όταν σε ένα οικοσύστημα υπάρχουν δύο μόνο είδη και το ένα είναι καλύτερο από το άλλο, κάποια στιγμή θα επικρατήσει. Ωστόσο, κατά τη συνύπαρξη πολλών ειδών, συνδυάζοντας τις εκβάσεις όλων των πιθανών δυαδικών αλληλεπιδράσεων, δε φαίνεται να υπάρχει ένας νικητής («rock-paper-scissor competition») (Allesina & Levine, 2011). Έτσι, η βιοποικιλότητα μπορεί να διατηρηθεί. Η μελέτη των Maynard και συνεργατών (2017) αφορά την εξέταση αυτού του μοντέλου σε μύκητες που αποδομούν το ξύλο. Συγκεκριμένα, πραγματοποίησαν διπλές καλλιέργειες αυτών των μυκήτων και όρισαν ισοπαλία (deadlock) τη μη εισβολή του ενός μύκητα στην περιοχή που έχει ήδη καταληφθεί από τον άλλον. Κατέγραψαν τις νίκες, ήττες και ισοπαλίες του κάθε ένα και φάνηκε πως κάποιος δεν είναι άτρωτος, αν και υπάρχουν είδη με περισσότερη ανταγωνιστική ικανότητα (competitive ability). Στην παρούσα μελέτη, διερευνήθηκε αυτό το μοντέλο με την ίδια λογική, καθώς οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί συνυπάρχουν στο φυτό-ξενιστή τους. Εξετάστηκαν τα ενδόφυτα κάθε ιστού ξεχωριστά και βρέθηκε πως κανένας μύκητας δεν είναι κυρίαρχος επί των υπολοίπων. Αν και οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη ήταν μόνο οι καλλιεργήσιμοι, αποτελούν έναν ικανό υποπληθυσμό του συνόλου των ενδόφυτων που παρέχει μία ένδειξη για τη λειτουργία όλου του συστήματος.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, κατά την αλληλεπίδραση των ενδοφυτικών μικροοργανισμών με τους φυτοπαθογόνους μύκητες, αλλά και κατά την αλληλεπίδραση των ενδοφυτικών μυκήτων μεταξύ τους πιθανώς παρήχθησαν αντιμικροβιακές ουσίες. Τέτοιες ουσίες υποδεικνύονται με την ύπαρξη γραμμικής/χρωματισμένης ζώνης όσον αφορά τις αλληλεπιδράσεις μυκήτων και ζώνης παρεμπόδισης όσον αφορά τις αλληλεπιδράσεις βακτηρίων-μυκήτων και μυκήτων-μυκήτων. Μελλοντικά, μπορεί να προσδιοριστεί αν οι αντιμικροβιακές ουσίες οφείλονται σε πτητικούς, διαχεόμενους ή μίγμα αυτών των δύο κατηγοριών μεταβολιτών (Herrera et al., 2016; Landum et al., 2016; Lim et al., 2017).

Ο δευτερογενής μεταβολισμός μπορεί να τροποποιηθεί κατά τη συγκαλλιέργεια μυκήτων και βακτηρίων-μυκήτων. Συγκεκριμένα, είναι δυνατόν να επαχθεί η παραγωγή νέων ενώσεων και να

διεγερθεί ή κατασταλλεί η σύνθεση ήδη υπάρχοντων (Pettit et al., 2009; Schroeckh et al., 2009; Brakhage & Schroeckh, 2011; Zuck et al., 2011; Combès et al., 2012; König et al., 2013; Soliman et al., 2013; Li et al., 2014; Marmann et al., 2014; Chowdhury et al., 2015; Chatterjee et al., 2016; Li et al., 2016). Για παράδειγμα, οι Combès και συνεργάτες (2012) έδειξαν πως μόνο κατά τη διπλή καλλιέργεια του ενδοφυτικού μύκητα *Paraconiothyrium variable* και του φυτοπαθογόνου *Fusarium oxysporum* παράχθηκαν ανταγωνιστικοί μεταβολίτες. Ακόμη, στο βακτήριο *Bacillus amyloliquefaciens* η παραγωγή λιποπεπτιδίων αυξήθηκε λόγω σημάτων των μυκήτων *Fusarium oxysporum* και *Botrytis cinerea* (Cawoy et al., 2015). Έτσι, μελλοντικά θα μπορούσε να γίνει έλεγχος του αν οι ενώσεις που παράγονται είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των μικροοργανισμών. Αντιμικροβιακές ενώσεις που παράγονται από μικροοργανισμούς μπορούν να απομονωθούν μέσω των υγρών αξενικών καλλιεργειών τους και να δοκιμαστούν *in vitro* έναντι μυκήτων (Malfanova et al., 2011; Miles et al., 2012; Park et al., 2015; Zouari et al., 2016; Terhonen et al., 2016; Hassan et al., 2017) για να εξακριβωθεί αν ευθύνονται για το φαινόμενο.

Ακόμη, μπορεί να πραγματοποιηθεί εκτομή επιθυμητών περιοχών από τη διπλή καλλιέργεια (dual culture) για την εκχύλιση και τον προσδιορισμό των μεταβολιτών που βρίσκονται εκεί (Glaser et al., 2009; Preto et al., 2017; Serrano et al., 2017). Ενδιαφέρον θα είχε στο μέλλον η εκχύλιση ζωνών παρεμπόδισης από συγκαλλιέργειες βακτηρίων-μυκήτων αλλά και μυκήτων-μυκήτων, καθώς και η εκχύλιση γραμμικών ζωνών από συγκαλλιέργειες μυκήτων-μυκήτων. Η διαδικασία αυτή θα συνέβαλλε στην ταυτοποίηση των ενώσεων που προκαλούν την παρεμπόδιση και πιθανώς να οδηγούσε σε ανακάλυψη νέων αντιμικροβιακών παραγόντων, οι οποίοι παράγονται μόνο κατά τη συγκαλλιέργεια μικροοργανισμών.

Οι κοινότητες ενδοφυτικών βακτηρίων και μυκήτων συνήθως μελετώνται ξεχωριστά, αλλά η αλληλεπίδραση τους θα ήταν ένα ενδιαφέρον κεφάλαιο στην έρευνα των ενδόφυτων (Hardoim et al., 2015). Μια πρόσφατη έρευνα έδειξε την πιθανή επικοινωνία ενδόφυτων μέσω της συσσώρευσης μεταβολιτών ενός μύκητα από ένα βακτήριο, απομονωμένα από τον ίδιο ιστό φυτού (Wang et al., 2015). Οι σχέσεις ενδοφυτικών βακτηρίων και μυκήτων μπορεί να είναι συνεργιστικές για την αποίκιση του ξενιστή ή ανταγωνιστικές ώστε να διατηρείται ισορροπία (Araújo et al., 2001; Wang et al., 2013; Van Overbeek & Saikkonen, 2016).

Οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί φαίνεται να είναι ιδιαίτερα κατάλληλοι για την αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων και ιδιαίτερα των διασυστηματικών (Ben Abdallah et al., 2016; Eljounaidi et al., 2016). Παρ'όλο που ο *in vitro* έλεγχος ανταγωνισμού εναντίον παθογόνων κάποιες φορές δεν έχει τα ίδια θετικά αποτελέσματα *in vivo* (Busby et al., 2016), αποτελεί έναν γρήγορο και εύκολο

τρόπο προκαταρκτικής σάρωσης με λιγότερο κόστος από τα πειράματα αγρού (Silva et al., 2016). Πολλά υποσχόμενη είναι η χρήση μικροβιακών μιγμάτων (consortia), τα οποία ιδανικά θα ήταν εξειδικευμένα για την κάθε καλλιέργεια (Berg et al., 2013).

Η έγκριση σκευασμάτων για την προαγωγή της ανάπτυξης των φυτών με βάση τους ενδοφυτικούς μικροοργανισμούς είναι δύσκολη και χρονοβόρα λόγω της παρουσίας των ενδοφυτικών μικροοργανισμών σε εδάδιμα μέρη του φυτού (Mercado-Blanco & Lugtenberg, 2014), καθώς κάποια από αυτά μπορεί να είναι παθογόνα στον άνθρωπο και τα ζώα (Hardoim et al., 2015). Έτσι, πρέπει να γίνει η ταυτοποίηση τους σε πρώιμο στάδιο της έρευνας μέσω βιοπληροφορικών μελετών και ελέγχους τοξικότητας, ώστε να αποκλειστούν από περαιτέρω μελέτες (Malfanova et al., 2011; Mercado-Blanco & Lugtenberg, 2014). Υπάρχουν ήδη προϊόντα μικροοργανισμών στην αγορά, με μύκητες των γενών *Trichoderma*, *Clonostachys* και βακτήρια των γενών *Bacillus*, *Pseudomonas* και *Burkholderia*, κάποιοι από τους οποίους πιθανώς διαβιούν και ως ενδοφυτικοί (Abhilash et al., 2016).

Υπάρχουν μελέτες με θετικά αποτελέσματα εμβολιασμού ενδοφυτικών μικροοργανισμών από αυτοφυή και αρωματικά φυτά σε καλλιεργούμενα (Puri et al., 2015; Zhao et al., 2015; Ben Abdallah et al., 2016).

Συνοψίζοντας, η συγκεκριμένη μελέτη αφορά την προκαταρκτική σάρωση των ενδοφυτικών μικροοργανισμών του αρωματικού φυτού *Teucrium polium*. Μελετήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις των ενδοφυτικών μυκήτων κάθε ιστού, δείχνοντας πως υπάρχει ένας ισορροπημένος ανταγωνισμός μεταξύ τους. Ενδεχομένως, αυτός είναι ένας μηχανισμός διατήρησης της βιοποικιλότητας. Ανάμεσα στα ενδόφυτα βρίσκονται μικροοργανισμοί που έχουν τη δυνατότητα να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη των 3 φυτοπαθογόνων *R.solani*, *F.oxysporum* fsp *raphani* και *B.cinerea* *in vitro* και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως παράγοντες βιολογικού ελέγχου (biocontrol agents, BCAs). Το ότι πιθανώς υπάρχουν διαφορετικοί τρόποι ανταγωνισμού των φυτοπαθογόνων (αντιμικροβιακές ενώσεις, παρασιτισμός) μέσα σε μια κοινότητα ενδόφυτων δίνει ένα πλεονέκτημα στον ξενιστή. Επίσης, κάποιοι χαρακτηρίζονται από την ικανότητα διαλυτοποίησης ιζηματοποιημένου σιδήρου και φωσφόρου, ιδιότητες που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην προαγωγή της ανάπτυξης του φυτού και την ανάπτυξη σκευασμάτων βιολιπαντών (biofertilizers). Ωστόσο, περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες για τη διεκρίνιση του μηχανισμού βιολογικού ελέγχου των συγκεκριμένων ενδοφυτικών μικροοργανισμών καθώς και την επίδραση τους στο φυτό υπό συνθήκες βιοτικού και αβιοτικού στρες.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdollahi, M. (2003). Antinociceptive effects of *Teucrium polium* L. total extract and essential oil in mouse writhing test. *Pharmacological Research*. doi:10.1016/s1043-6618(03)00059-8
- Abhilash, P., Dubey, R. K., Tripathi, V., Gupta, V. K., & Singh, H. B. (2016). Plant Growth-Promoting Microorganisms for Environmental Sustainability. *Trends in Biotechnology*, 34(11), 847-850. doi:10.1016/j.tibtech.2016.05.005
- Adam, E., Bernhart, M., Müller, H., Winkler, J., & Berg, G. (2016). The *Cucurbita pepo* seed microbiome: genotype-specific composition and implications for breeding. *Plant and Soil*, 422(1-2), 35-49. doi:10.1007/s11104-016-3113-9
- Adesemoye, A. O., & Kloepper, J. W. (2009). Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(1), 1-12. doi:10.1007/s00253-009-2196-0
- Agarwal, M., Dheeman, S., Dubey, R. C., Kumar, P., Maheshwari, D. K., & Bajpai, V. K. (2017). Differential antagonistic responses of *Bacillus pumilus* MSUA3 against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* causing fungal diseases in *Fagopyrum esculentum* Moench. *Microbiological Research*, 205, 40-47. doi:10.1016/j.micres.2017.08.012
- Agrios, G.N., 2005. Plant Pathology. In: Burlington, M.A. (Ed.), fifth ed. Elsevier Academic Press.
- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26(1), 1-20. doi:10.1016/j.jksus.2013.05.001
- Ahmad, Z., Wu, J., Chen, L., & Dong, W. (2017). Isolated *Bacillus subtilis* strain 330-2 and its antagonistic genes identified by the removing PCR. *Scientific Reports*, 7(1). doi:10.1038/s41598-017-01940-9
- Ahmed, E., & Holmström, S. J. (2014). Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial Biotechnology*, 7(3), 196-208. doi:10.1111/1751-7915.12117
- Aimé, S., Alabouvette, C., Steinberg, C., & Olivain, C. (2013). The Endophytic Strain *Fusarium oxysporum* Fo47: A Good Candidate for Priming the Defense Responses in Tomato Roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(8), 918-926. doi:10.1094/mpmi-12-12-0290-r
- Akinsanya, M. A., Goh, J. K., Lim, S. P., & Ting, A. S. (2015). Metagenomics study of endophytic bacteria in *Aloe vera* using next-generation technology. *Genomics Data*, 6, 159-163. doi:10.1016/j.gdata.2015.09.004
- Alavi, P., Starcher, M. R., Zachow, C., Müller, H., & Berg, G. (2013). Root-microbe systems: the effect and mode of interaction of Stress Protecting Agent (SPA) *Stenotrophomonas rhizophila* DSM14405T. *Frontiers in Plant Science*, 4. doi:10.3389/fpls.2013.00141
- Ali, S., Charles, T., & Glick, B. (2012). Delay of flower senescence by bacterial endophytes expressing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1139-1144. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05409.x
- Ali, S., Charles, T. C., & Glick, B. R. (2014a). Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 160-167. doi:10.1016/j.plaphy.2014.04.003

- Ali, S., Duan, J., Charles, T. C., & Glick, B. R. (2014b). A bioinformatics approach to the determination of genes involved in endophytic behavior in *Burkholderia* spp. *Journal of Theoretical Biology*, *343*, 193-198. doi:10.1016/j.jtbi.2013.10.007
- Allesina, S., & Levine, J. M. (2011). A competitive network theory of species diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(14), 5638-5642. doi:10.1073/pnas.1014428108
- Alvin, A., Miller, K. I., & Neilan, B. A. (2014). Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. *Microbiological Research*, *169*(7-8), 483-495. doi:10.1016/j.micres.2013.12.009
- Ambawade, MS., Pathade, GR. (2015) Production of gibberellic acid by *Bacillus siamensis* BE 76 isolated from banana plant (*Musa* spp.). *International Journal of Life Science*, *4*(7), 394–398.
- Andreolli, M., Lampis, S., Zapparoli, G., Angelini, E., & Vallini, G. (2016). Diversity of bacterial endophytes in 3 and 15 year-old grapevines of *Vitis vinifera* cv. *Corvina* and their potential for plant growth promotion and phytopathogen control. *Microbiological Research*, *183*, 42-52. doi:10.1016/j.micres.2015.11.009
- Anitha, D., Vijaya, T., Pragathi, D., Reddy, NV., Mouli, KC., Venkateswarulu, N., Bhargav, DS. (2013) Isolation and characterization of endophytic fungi from endemic medicinal plants of Tirumala hills. *International Journal of Life Science*, *2*(3), 336-374.
- Antunes, T., Sevinate-Pinto, I., Barroso, J. G., Cavaleiro, C., & Salgueiro, L. R. (2004). Micromorphology of trichomes and composition of essential oil of *Teucrium capitatum*. *Flavour and Fragrance Journal*, *19*(4), 336-340. doi:10.1002/ffj.1310
- Antón, J., Kimura, S., Lankoski, J., & Cattaneo, A. (2012). A Comparative Study of Risk Management in Agriculture under Climate Change. *OECD Food, Agriculture and Fisheries Papers*. doi:10.1787/5k94d6fx5bd8-en
- Araújo, W. L., Jr., W. M., Aguilar-Vildoso, C. I., Barroso, P. A., Saridakis, H. O., & Azevedo, J. L. (2001). Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Canadian Journal of Microbiology*, *47*(3), 229-236. doi:10.1139/w00-146
- Ardanov, P., Sessitsch, A., Häggman, H., Kozyrovska, N., & Pirttilä, A. M. (2012). Methylobacterium-Induced Endophyte Community Changes Correspond with Protection of Plants against Pathogen Attack. *PLoS ONE*, *7*(10). doi:10.1371/journal.pone.0046802
- Ardanov, P., Lyastchenko, S., Karppinen, K., Häggman, H., Kozyrovska, N., & Pirttilä, A. M. (2015). Effects of *Methylobacterium* sp. on emergence, yield, and disease prevalence in three cultivars of potato (*Solanum tuberosum* L.) were associated with the shift in endophytic microbial community. *Plant and Soil*, *405*(1-2), 299-310. doi:10.1007/s11104-015-2500-y
- Arnold, A. E. (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews*, *21*(2-3), 51-66. doi:10.1016/j.fbr.2007.05.003
- Aschehoug, E. T., Callaway, R. M., Newcombe, G., Tharayil, N., & Chen, S. (2014). Fungal endophyte increases the allelopathic effects of an invasive forb. *Oecologia*, *175*(1), 285-291. doi:10.1007/s00442-014-2891-0
- Athman, S., Coyne, D., Viljoen, A., Gold, C. S., Labuschagne, N., & Dubois, T. (2007). Effect of endophytic *Fusarium oxysporum* on root penetration and reproduction of *Radopholus similis* in tissue culture-derived banana (*Musa* spp.) plants. *Nematology*, *9*(5), 599-607. doi:10.1163/156854107782024839
- Awad, N., Kassem, H., Hamed, M., El-Naggar, M., & El-Feky, A. (2014). Bioassays guided isolation of compounds from *Chaetomium globosum*. *Journal de Mycologie Médicale*, *24*(2). doi:10.1016/j.mycmed.2013.10.005
- Bacon, C. W., Glenn, A. E., & Yates, I. E. (2008). *Fusarium Verticillioides*: Managing The Endophytic

Association With Maize For Reduced Fumonisin Accumulation. *Toxin Reviews*, 27(3-4), 411-446. doi:10.1080/15569540802497889

Bacon, C. W., & Hinton, D. M. (n.d.). Bacterial endophytes: The endophytic niche, its occupants, and its utility. *Plant-Associated Bacteria*, 155-194. doi:10.1007/978-1-4020-4538-7\_5

Bacon CW, & White J. 2000. Physiological adaptations in the evolution of endophytism in the Clavicipitaceae, p 237–263. In Bacon CW, White J (ed), *Microbial endophytes*. Taylor & Francis, New York, NY.

Bacon, C. W., & White, J. F. (2015). Functions, mechanisms and regulation of endophytic and epiphytic microbial communities of plants. *Symbiosis*, 68(1-3), 87-98. doi:10.1007/s13199-015-0350-2

Badalyan, S. M., Innocenti, G., & Caribyan, N. G. (2002). Antagonistic activity of xylophilic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. *Phytopathologia Mediterranea*, 41, 200-225.

Badri, D. V., & Vivanco, J. M. (2009). Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell & Environment*, 32(6), 666-681. doi:10.1111/j.1365-3040.2009.01926.x

Bae, H., Roberts, D. P., Lim, H., Strem, M. D., Park, S., Ryu, C., . . . Bailey, B. A. (2011). Endophytic *Trichoderma* Isolates from Tropical Environments Delay Disease Onset and Induce Resistance Against *Phytophthora capsici* in Hot Pepper Using Multiple Mechanisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(3), 336-351. doi:10.1094/mpmi-09-10-0221

Bahramikia, S., & Yazdanparast, R. (2011). Phytochemistry and medicinal properties of *Teucrium polium* L. (Lamiaceae). *Clinical Biochemistry*, 44(13). doi:10.1016/j.clinbiochem.2011.08.834

Bai, Y., Müller, D. B., Srinivas, G., Garrido-Oter, R., Potthoff, E., Rott, M., . . . Schulze-Lefert, P. (2015). Functional overlap of the *Arabidopsis* leaf and root microbiota. *Nature*, 528(7582), 364-369. doi:10.1038/nature16192

Balsanelli, E., Serrato, R. V., Baura, V. A., Sasaki, G., Yates, M. G., Rigo, L. U., . . . Monteiro, R. A. (2010). *Herbaspirillum seropedicae* rfbB and rfbC genes are required for maize colonization. *Environmental Microbiology*. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02187.x

Barret, M., Briand, M., Bonneau, S., Prévieux, A., Valière, S., Bouchez, O., . . . Jacques, M. (2014). Emergence Shapes the Structure of the Seed Microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(4), 1257-1266. doi:10.1128/aem.03722-14

Bashan, Y., & Holguin, G. (1998). Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(8-9), 1225-1228. doi:10.1016/s0038-0717(97)00187-9

Beauregard, P. B., Chai, Y., Vlamakis, H., Losick, R., & Kolter, R. (2013). *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(17). doi:10.1073/pnas.1218984110

Behie, S. W., Zelisko, P. M., & Bidochka, M. J. (2012). Endophytic Insect-Parasitic Fungi Translocate Nitrogen Directly from Insects to Plants. *Science*, 336(6088), 1576-1577. doi:10.1126/science.1222289

Beltran-Gracia, E., Macedo-Raygoza, G., Villafaña-Rojas, J., Martinez-Rodriguez, A., Chavez-Castrillon, Y. Y., Espinosa-Escalante, F. M., . . . Beltran-Garcia, M. J. (2017). Production of Lipopeptides by Fermentation Processes: Endophytic Bacteria, Fermentation Strategies and Easy Methods for Bacterial Selection. *Fermentation Processes*. doi:10.5772/64236

Ben Abdallah, R. A., Mokni-Tlili, S., Nefzi, A., Jabnoun-Khiareddine, H., & Daami-Remadi, M. (2016). Biocontrol of *Fusarium* wilt and growth promotion of tomato plants using endophytic bacteria isolated from *Nicotiana glauca* organs. *Biological Control*, 97, 80-88. doi:10.1016/j.biocontrol.2016.03.005

Berendsen, R. L., Pieterse, C. M., & Bakker, P. A. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health.

*Trends in Plant Science*, 17(8), 478-486. doi:10.1016/j.tplants.2012.04.001

Berg, G., & Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 68(1), 1-13. doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x

Berg, G., Zachow, C., Müller, H., Philipps, J., & Tilcher, R. (2013). Next-Generation Bio-Products Sowing the Seeds of Success for Sustainable Agriculture. *Agronomy*, 3(4), 648-656. doi:10.3390/agronomy3040648

Berg, G., Köberl, M., Rybakova, D., Müller, H., Grosch, R., & Smalla, K. (2017). Plant microbial diversity is suggested as the key to future biocontrol and health trends. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(5). doi:10.1093/femsec/fix050

Bertrand, S., Schumpp, O., Bohni, N., Monod, M., Gindro, K., & Wolfender, J. (2013). De Novo Production of Metabolites by Fungal Co-culture of *Trichophyton rubrum* and *Bionectria ochroleuca*. *Journal of Natural Products*, 76(6), 1157-1165. doi:10.1021/np400258f

Bertrand, S., Schumpp, O., Bohni, N., Bujard, A., Azzollini, A., Monod, M., . . . Wolfender, J. (2013). Detection of metabolite induction in fungal co-cultures on solid media by high-throughput differential ultra-high pressure liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. *Journal of Chromatography A*, 1292, 219-228. doi:10.1016/j.chroma.2013.01.098

Bertrand, S., Bohni, N., Schnee, S., Schumpp, O., Gindro, K., & Wolfender, J. (2014). Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnology Advances*, 32(6), 1180-1204. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.03.001

Blaser M. Missing Microbes. London: Oneworld Publications, 2014.

Bloemberg, G. V., & Lugtenberg, B. J. (2001). Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(4), 343-350. doi:10.1016/s1369-5266(00)00183-7

Boddy, L. (2000). Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. *FEMS Microbiology Ecology*, 31(3), 185-194. doi:10.1016/s0168-6496(99)00093-8

Bode, H. B., Bethe, B., Höfs, R., & Zeeck, A. (2002). Big Effects from Small Changes: Possible Ways to Explore Natures Chemical Diversity. *ChemBioChem*, 3(7), 619. doi:10.1002/1439-7633(20020703)3:7<619::aid-cbic619>3.0.co;2-9

Bodenhausen, N., Horton, M. W., & Bergelson, J. (2013). Bacterial Communities Associated with the Leaves and the Roots of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, 8(2). doi:10.1371/journal.pone.0056329

Bohni, N., Schumpp, O., Schnee, S., Bertrand, S., Gindro, K., & Wolfender, J. (2013). Targeted isolation of induced and bioactive metabolites from fungal co-cultures. *Planta Medica*, 79(13). doi:10.1055/s-0033-1351867

Brader, G., Compant, S., Mitter, B., Trognitz, F., & Sessitsch, A. (2014). Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 30-37. doi:10.1016/j.copbio.2013.09.012

Brader, G., Compant, S., Vescio, K., Mitter, B., Trognitz, F., Ma, L., & Sessitsch, A. (2017). Ecology and Genomic Insights into Plant-Pathogenic and Plant-Nonpathogenic Endophytes. *Annual Review of Phytopathology*, 55(1), 61-83. doi:10.1146/annurev-phyto-080516-035641

Bragina, A., Berg, C., Cardinale, M., Shcherbakov, A., Chebotar, V., & Berg, G. (2011). *Sphagnum* mosses harbour highly specific bacterial diversity during their whole lifecycle. *The ISME Journal*, 6(4), 802-813. doi:10.1038/ismej.2011.151

Bragina, A., Berg, C., & Berg, G. (2015). The core microbiome bonds the Alpine bog vegetation to a transkingdom metacommunity. *Molecular Ecology*, 24(18), 4795-4807. doi:10.1111/mec.13342

Brakhage, A. A., & Schroeckh, V. (2011). Fungal secondary metabolites – Strategies to activate silent

gene clusters. *Fungal Genetics and Biology*, 48(1), 15-22. doi:10.1016/j.fgb.2010.04.004

Brasier, C., & Webber, J. (2013). Vegetative incompatibility in the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus* and its ecological implications. *Fungal Ecology*, 6(6), 501-512. doi:10.1016/j.funeco.2013.09.006

Brundrett, M. C. (2002). Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist*, 154(2), 275-304. doi:10.1046/j.1469-8137.2002.00397.x

Bruno, M., Maggio, A. M., Piozzi, F., Puech, S., Rosselli, S., & Simmonds, M. S. (2003). Neoclerodane diterpenoids from *Teucrium polium* subsp. *polium* and their antifeedant activity. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31(9), 1051-1056. doi:10.1016/s0305-1978(03)00042-5

Bulgarelli, D., Rott, M., Schlaeppli, K., Themaat, E. V., Ahmadinejad, N., Assenza, F., . . . Schulze-Lefert, P. (2012). Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature*, 488(7409), 91-95. doi:10.1038/nature11336

Bulgari, D., Casati, P., Crepaldi, P., Daffonchio, D., Quaglino, F., Brusetti, L., & Bianco, P. A. (2011). Restructuring of Endophytic Bacterial Communities in Grapevine Yellow-Diseased and Recovered *Vitis vinifera* L. Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(14), 5018-5022. doi:10.1128/aem.00051-11

Bulgari, D., Bozkurt, A. I., Casati, P., Çağlayan, K., Quaglino, F., & Bianco, P. A. (2012). Endophytic bacterial community living in roots of healthy and '*Candidatus Phytoplasma mali*'-infected apple (*Malus domestica*, Borkh.) trees. *Antonie van Leeuwenhoek*, 102(4), 677-687. doi:10.1007/s10482-012-9766-3

Busby, P. E., Peay, K. G., & Newcombe, G. (2015). Common foliar fungi of *Populus trichocarpa* modify *Melampsorarust* disease severity. *New Phytologist*, 209(4), 1681-1692. doi:10.1111/nph.13742

Busby, P. E., Soman, C., Wagner, M. R., Friesen, M. L., Kremer, J., Bennett, A., . . . Dangl, J. L. (2017). Research priorities for harnessing plant microbiomes in sustainable agriculture. *PLOS Biology*, 15(3). doi:10.1371/journal.pbio.2001793

Butler, M. J., Gardiner, R. B., & Day, A. W. (2009). Melanin synthesis by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycologia*, 101(3), 296-304. doi:10.3852/08-120

Buée, M., Boer, W. D., Martin, F., Overbeek, L. V., & Jurkevitch, E. (2009). The rhizosphere zoo: An overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant and Soil*, 321(1-2), 189-212. doi:10.1007/s11104-009-9991-3

Böhm, M., Hurek, T., & Reinhold-Hurek, B. (2007). Twitching Motility Is Essential for Endophytic Rice Colonization by the N<sub>2</sub>-Fixing Endophyte *Azoarcus* sp. Strain BH72. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(5), 526-533. doi:10.1094/mpmi-20-5-0526

Cabanäs, C. G., Schilirã, E., Valverde-Corredor, A., & Mercado-Blanco, J. (2014). The biocontrol endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* PICF7 induces systemic defense responses in aerial tissues upon colonization of olive roots. *Frontiers in Microbiology*, 5. doi:10.3389/fmicb.2014.00427

Cao, R., Liu, X., Gao, K., Mendgen, K., Kang, Z., Gao, J., . . . Wang, X. (2009). Mycoparasitism of Endophytic Fungi Isolated From Reed on Soilborne Phytopathogenic Fungi and Production of Cell Wall-Degrading Enzymes *In Vitro*. *Current Microbiology*, 59(6), 584-592. doi:10.1007/s00284-009-9477-9

Card, S. D., Hume, D. E., Roodi, D., McGill, C. R., Millner, J. P., & Johnson, R. D. (2015). Beneficial endophytic microorganisms of *Brassica* – A review. *Biological Control*, 90, 102-112. doi:10.1016/j.biocontrol.2015.06.001

Carrell, A. A., & Frank, A. C. (2014). *Pinus flexilis* and *Picea engelmannii* share a simple and consistent needle endophyte microbiota with a potential role in nitrogen fixation. *Frontiers in Microbiology*, 5.

doi:10.3389/fmicb.2014.00333

Carvalho, F. P. (2017). Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security*, 6(2), 48-60. doi:10.1002/fes3.108

Cawoy, H., Debois, D., Franzil, L., Pauw, E. D., Thonart, P., & Ongena, M. (2014). Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. *Microbial Biotechnology*, 8(2), 281-295. doi:10.1111/1751-7915.12238

Chagas, F. O., Dias, L. G., & Pupo, M. T. (2013). A Mixed Culture of Endophytic Fungi Increases Production of Antifungal Polyketides. *Journal of Chemical Ecology*, 39(10), 1335-1342. doi:10.1007/s10886-013-0351-7

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(8). doi:10.1371/annotation/51142aed-2d94-4195-8a8a-9cb24b3c733b

Chatterjee, S., Kuang, Y., Splivallo, R., Chatterjee, P., & Karlovsky, P. (2016). Interactions among filamentous fungi *Aspergillus niger*, *Fusarium verticillioides* and *Clonostachys rosea*: fungal biomass, diversity of secreted metabolites and fumonisin production. *BMC Microbiology*, 16(1). doi:10.1186/s12866-016-0698-3

Chelius, M., & Triplett, E. (2001). The Diversity of Archaea and Bacteria in Association with the Roots of *Zea mays* L. *Microbial Ecology*, 41(3), 252-263. doi:10.1007/s002480000087

Chen, J., Sun, S., Miao, C., Wu, K., Chen, Y., Xu, L., . . . Zhao, L. (2016). Endophytic *Trichoderma gamsii* YIM PH30019: a promising biocontrol agent with hyperosmolar, mycoparasitism, and antagonistic activities of induced volatile organic compounds on root-rot pathogenic fungi of *Panax notoginseng*. *Journal of Ginseng Research*, 40(4), 315-324. doi:10.1016/j.jgr.2015.09.006

Chhabra, S., & Dowling, D. N. (2017). Endophyte-Promoted Nutrient Acquisition: Phosphorus and Iron. *Functional Importance of the Plant Microbiome*, 21-42. doi:10.1007/978-3-319-65897-1\_3

Chowdhary, K., & Kaushik, N. (2015). Fungal Endophyte Diversity and Bioactivity in the Indian Medicinal Plant *Ocimum sanctum* Linn. *Plos One*, 10(11). doi:10.1371/journal.pone.0141444

Chowdhury, S. P., Uhl, J., Grosch, R., Alquéres, S., Pittroff, S., Dietel, K., . . . Hartmann, A. (2015). Cyclic Lipopeptides of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* Colonizing the Lettuce Rhizosphere Enhance Plant Defense Responses Toward the Bottom Rot Pathogen *Rhizoctonia solani*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(9), 984-995. doi:10.1094/mpmi-03-15-0066-r

Cocq, K. L., Gurr, S. J., Hirsch, P. R., & Mauchline, T. H. (2016). Exploitation of endophytes for sustainable agricultural intensification. *Molecular Plant Pathology*, 18(3), 469-473. doi:10.1111/mpp.12483

Coleman-Derr, D., Desgarences, D., Fonseca-Garcia, C., Gross, S., Clingenpeel, S., Woyke, T., . . . Tringe, S. G. (2015). Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species. *New Phytologist*, 209(2), 798-811. doi:10.1111/nph.13697

Combès, A., Ndoye, I., Bance, C., Bruzard, J., Djediat, C., Dupont, J., . . . Prado, S. (2012). Chemical Communication between the Endophytic Fungus *Paraconiothyrium Variabile* and the Phytopathogen *Fusarium oxysporum*. *PLoS ONE*, 7(10). doi:10.1371/journal.pone.0047313

Compant, S., Clément, C., & Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), 669-678. doi:10.1016/j.soilbio.2009.11.024

Courty, P. E., Smith, P., Koegel, S., Redecker, D., & Wipf, D. (2014). Inorganic Nitrogen Uptake and Transport in Beneficial Plant Root-Microbe Interactions. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1-3), 4-16.

doi:10.1080/07352689.2014.897897

Cozzani, S., Muselli, A., Desjobert, J., Bernardini, A., Tomi, F., & Casanova, J. (2005). Chemical composition of essential oil of *Teucrium polium* subsp. *capitatum* (L.) from Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, 20(4), 436-441. doi:10.1002/ffj.1463

De Roy, K., Marzorati, M., Abbeele, P. V., Wiele, T. V., & Boon, N. (2013). Synthetic microbial ecosystems: an exciting tool to understand and apply microbial communities. *Environmental Microbiology*, 16(6), 1472-1481. doi:10.1111/1462-2920.12343

Demers, J. E., Gugino, B. K., & Jiménez-Gasco, M. D. (2014). Highly Diverse Endophytic and Soil Fusarium oxysporum Populations Associated with Field-Grown Tomato Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(1), 81-90. doi:10.1128/aem.02590-14

Deng, Z., & Cao, L. (2017). Fungal endophytes and their interactions with plants in phytoremediation: A review. *Chemosphere*, 168, 1100-1106. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.10.097

Di Fiore, S., & Gallo, M. D. (1995). Endophytic bacteria: their possible role in the host plant. *Azospirillum VI and Related Microorganisms*, 169-187. doi:10.1007/978-3-642-79906-8\_18

Dörnte, B., & Kües, U. (2013). Fast Microwave-based DNA Extraction from Vegetative Mycelium and Fruiting Body Tissues of Agaricomycetes for PCR Amplification. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 7(4), 825-836.

Doty, S. L. (2017). Endophytic N-Fixation: Controversy and a Path Forward. *Functional Importance of the Plant Microbiome*, 7-20. doi:10.1007/978-3-319-65897-1\_2

Douanla-Meli, C., Langer, E., & Mouafo, F. T. (2013). Fungal endophyte diversity and community patterns in healthy and yellowing leaves of *Citrus limon*. *Fungal Ecology*, 6(3), 212-222. doi:10.1016/j.funeco.2013.01.004

Dutta, D., Puzari, K. C., Gogoi, R., & Dutta, P. (2014). Endophytes: exploitation as a tool in plant protection. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(5), 621-629. doi:10.1590/s1516-8913201402043

Eaton, C. J., Cox, M. P., & Scott, B. (2011). What triggers grass endophytes to switch from mutualism to pathogenism? *Plant Science*, 180(2), 190-195. doi:10.1016/j.plantsci.2010.10.002

Egamberdieva, D., Wirth, S., Behrendt, U., Ahmad, P., & Berg, G. (2017). Antimicrobial Activity of Medicinal Plants Correlates with the Proportion of Antagonistic Endophytes. *Frontiers in Microbiology*, 8. doi:10.3389/fmicb.2017.00199

Egan, J. M., Kaur, A., Raja, H. A., Kellogg, J. J., Oberlies, N. H., & Cech, N. B. (2016). Antimicrobial fungal endophytes from the botanical medicine goldenseal (*Hydrastis canadensis*). *Phytochemistry Letters*, 17, 219-225. doi:10.1016/j.phytol.2016.07.031

El Oualidi, J., Verneau, O., Puech, S., & Dubuisson, J. (1999). Utility of rDNA ITS sequences in the systematics of *Teucrium* section *Polium* (*Lamiaceae*). *Plant Systematics and Evolution*, 215(1-4), 49-70. doi:10.1007/bf00984647

Eljounaidi, K., Lee, S. K., & Bae, H. (2016). Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases – Review and future prospects. *Biological Control*, 103, 62-68. doi:10.1016/j.biocontrol.2016.07.013

Elmasri, W. A., Yang, T., Tran, P., Hegazy, M. F., Hamood, A. N., Mechref, Y., & Paré, P. W. (2014). *Teucrium polium* Phenylethanol and Iridoid Glycoside Characterization and Flavonoid Inhibition of Biofilm-Forming *Staphylococcus aureus*. *Journal of Natural Products*, 78(1), 2-9. doi:10.1021/np5004092

Elmasri, W. A., Hegazy, M. F., Aziz, M., Koksai, E., Amor, W., Mechref, Y., . . . Paré, P. W. (2014). Biofilm blocking sesquiterpenes from *Teucrium polium*. *Phytochemistry*, 103, 107-113.

doi:10.1016/j.phytochem.2014.03.029

Esmael, Q., Pupin, M., Jacques, P., & Leclère, V. (2017). Nonribosomal peptides and polyketides of *Burkholderia*: new compounds potentially implicated in biocontrol and pharmaceuticals. *Environmental Science and Pollution Research*. doi:10.1007/s11356-017-9166-3

Esposito-Polesi, N. P., Abreu-Tarazi, M. F., Almeida, C. V., Tsai, S. M., & Almeida, M. D. (2016). Investigation of Endophytic Bacterial Community in Supposedly Axenic Cultures of Pineapple and Orchids with Evidence on Abundant Intracellular Bacteria. *Current Microbiology*, 74(1), 103-113. doi:10.1007/s00284-016-1163-0

Etesami, H., Alikhani, H. A., & Hosseini, H. M. (2015). Indole-3-acetic acid (IAA) production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents. *MethodsX*, 2, 72-78. doi:10.1016/j.mex.2015.02.008

Falconer, R. E., Bown, J. L., White, N. A., & Crawford, J. W. (2008). Modelling interactions in fungi. *Journal of The Royal Society Interface*, 5(23), 603-615. doi:10.1098/rsif.2007.1210

Fernandes, E. G., Pereira, O. L., Silva, C. C., Bento, C. B., & Queiroz, M. V. (2015). Diversity of endophytic fungi in *Glycine max*. *Microbiological Research*, 181, 84-92. doi:10.1016/j.micres.2015.05.010

Fernandez, O., Theocharis, A., Bordiec, S., Feil, R., Jacquens, L., Clément, C., . . . Barka, E. A. (2012). *Burkholderia phytofirmans* PsJN Acclimates Grapevine to Cold by Modulating Carbohydrate Metabolism. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(4), 496-504. doi:10.1094/mpmi-09-11-0245

Fesel, P. H., & Zuccaro, A. (2016). Dissecting endophytic lifestyle along the parasitism/mutualism continuum in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Microbiology*, 32, 103-112. doi:10.1016/j.mib.2016.05.008

Figueiredo, M. D., Bonifacio, A., Rodrigues, A. C., & Araujo, F. F. (2016). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Key Mechanisms of Action. *Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants*, 23-37. doi:10.1007/978-981-10-0388-2\_3

Franche, C., Lindström, K., & Elmerich, C. (2008). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil*, 321(1-2), 35-59. doi:10.1007/s11104-008-9833-8

Freeman, S., Horowitz, S., & Sharon, A. (2001). Pathogenic and Nonpathogenic Lifestyles in *Colletotrichum acutatum* from Strawberry and Other Plants. *Phytopathology*, 91(10), 986-992. doi:10.1094/phyto.2001.91.10.986

Friesen, M. L. (2013). Microbially Mediated Plant Functional Traits. *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*, 87-102. doi:10.1002/9781118297674.ch8

Fuchs, B., Krischke, M., Mueller, M. J., & Krauss, J. (2017). Plant age and seasonal timing determine endophyte growth and alkaloid biosynthesis. *Fungal Ecology*, 29, 52-58. doi:10.1016/j.funeco.2017.06.003

Fávaro, L. C., Sebastianes, F. L., & Araújo, W. L. (2012). *Epicoccum nigrum* P16, a Sugarcane Endophyte, Produces Antifungal Compounds and Induces Root Growth. *PLoS ONE*, 7(6). doi:10.1371/journal.pone.0036826

Gagne-Bourgue, F., Aliferis, K., Seguin, P., Rani, M., Samson, R., & Jabaji, S. (2013). Isolation and characterization of indigenous endophytic bacteria associated with leaves of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) cultivars. *Journal of Applied Microbiology*, 114(3), 836-853. doi:10.1111/jam.12088

Gaiero, J. R., McCall, C. A., Thompson, K. A., Day, N. J., Best, A. S., & Dunfield, K. E. (2013). Inside the root microbiome: Bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American Journal of Botany*, 100(9), 1738-1750. doi:10.3732/ajb.1200572

Gange, A. C., Eschen, R., Wearn, J. A., Thawer, A., & Sutton, B. C. (2011). Differential effects of foliar endophytic fungi on insect herbivores attacking a herbaceous plant. *Oecologia*, 168(4), 1023-1031. doi:10.1007/s00442-011-2151-5

- Gao, K., Liu, X., Kang, Z., & Mendgen, K. (2005). Mycoparasitism of *Rhizoctonia solani* by Endophytic *Chaetomium spirale* ND35: Ultrastructure and Cytochemistry of the Interaction. *Journal of Phytopathology*, *153*(5), 280-290. doi:10.1111/j.1439-0434.2005.00970.x
- Garbeva, P., Overbeek, L. S., Vuurde, J. W., & Elsas, J. D. (2001). Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments. *Microbial Ecology*, *41*(4), 369-383. doi:10.1007/s002480000096
- Gazis, R., Rehner, S., & Chaverri, P. (2011). Species delimitation in fungal endophyte diversity studies and its implications in ecological and biogeographic inferences. *Molecular Ecology*, *20*(14), 3001-3013. doi:10.1111/j.1365-294x.2011.05110.x
- Gill, S. S., Gill, R., Trivedi, D. K., Anjum, N. A., Sharma, K. K., Ansari, M. W., . . . Tuteja, N. (2016). Piriformospora indica: Potential and Significance in Plant Stress Tolerance. *Frontiers in Microbiology*, *7*. doi:10.3389/fmicb.2016.00332
- Glassner, H., Zchori-Fein, E., Yaron, S., Sessitsch, A., Sauer, U., & Compant, S. (2017). Bacterial niches inside seeds of *Cucumis melo* L. *Plant and Soil*, *422*(1-2), 101-113. doi:10.1007/s11104-017-3175-3
- Glauser, G., Gindro, K., Fringeli, J., Joffrey, J. D., Rudaz, S., & Wolfender, J. (2009). Differential Analysis of Mycoalexins in Confrontation Zones of Grapevine Fungal Pathogens by Ultrahigh Pressure Liquid Chromatography/Time-of-Flight Mass Spectrometry and Capillary Nuclear Magnetic Resonance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(4), 1127-1134. doi:10.1021/jf8033539
- Glick, B. R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*, *2012*, 1-15. doi:10.6064/2012/963401
- Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, *169*(1), 30-39. doi:10.1016/j.micres.2013.09.009
- Gond, S. K., Bergen, M. S., Torres, M. S., & Jr, J. F. (2015). Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. *Microbiological Research*, *172*, 79-87. doi:10.1016/j.micres.2014.11.004
- Goveas, S. W., Madtha, R., Nivas, S. K., & D'Souza, L. (2011). Isolation of endophytic fungi from *Coscinium fenestratum*- a red listed endangered medicinal plant. *EurAsian Journal of Biosciences*, *48*-53. doi:10.5053/ejobios.2011.5.0.6
- Gruber, S., & Seidl-Seiboth, V. (2011). Self versus non-self: fungal cell wall degradation in Trichoderma. *Microbiology*, *158*(1), 26-34. doi:10.1099/mic.0.052613-0
- Hacquard, S., Kracher, B., Hiruma, K., Münch, P. C., Garrido-Oter, R., Thon, M. R., . . . O'Connell, R. J. (2016). Survival trade-offs in plant roots during colonization by closely related beneficial and pathogenic fungi. *Nature Communications*, *7*, 11362. doi:10.1038/ncomms11362
- Haggag, W. (2010). The Role of Biofilm Exopolysaccharides on Biocontrol of Plant Diseases. *Biopolymers*. doi:10.5772/10266
- 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. doi:10.1139/m97-131
- Hamayun, M., Hussain, A., Khan, S. A., Kim, H., Khan, A. L., Waqas, M., . . . Lee, I. (2017). Gibberellins Producing Endophytic Fungus *Porostereum spadiceum* AGH786 Rescues Growth of Salt Affected Soybean. *Frontiers in Microbiology*, *8*. doi:10.3389/fmicb.2017.00686
- Hamilton, C. E., Gundel, P. E., Helander, M., & Saikkonen, K. (2012). Endophytic mediation of reactive oxygen species and antioxidant activity in plants: a review. *Fungal Diversity*, *54*(1), 1-10. doi:10.1007/s13225-012-0158-9
- Hardoim, P. R., Hardoim, C. C., Overbeek, L. S., & Elsas, J. D. (2012). Dynamics of Seed-Borne Rice

Endophytes on Early Plant Growth Stages. *PLoS ONE*, 7(2). doi:10.1371/journal.pone.0030438

Hardoim, P. R., Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., . . . Sessitsch, A. (2015). The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 293-320. doi:10.1128/membr.00050-14

Haruna, E., Zin, N. M., Kerfahi, D., & Adams, J. M. (2017). Extensive Overlap of Tropical Rainforest Bacterial Endophytes between Soil, Plant Parts, and Plant Species. *Microbial Ecology*, 75(1), 88-103. doi:10.1007/s00248-017-1002-2

Hassan, S. E. (2017). Plant growth-promoting activities for bacterial and fungal endophytes isolated from medicinal plant of *Teucrium polium* L. *Journal of Advanced Research*, 8(6), 687-695. doi:10.1016/j.jare.2017.09.001

Herrera, S. D., Grossi, C., Zawoznik, M., & Groppa, M. D. (2016). Wheat seeds harbour bacterial endophytes with potential as plant growth promoters and biocontrol agents of *Fusarium graminearum*. *Microbiological Research*, 186-187, 37-43. doi:10.1016/j.micres.2016.03.002

Higginbotham, S. J., Arnold, A. E., Ibañez, A., Spadafora, C., Coley, P. D., & Kursar, T. A. (2013). Bioactivity of Fungal Endophytes as a Function of Endophyte Taxonomy and the Taxonomy and Distribution of Their Host Plants. *PLoS ONE*, 8(9). doi:10.1371/journal.pone.0073192

Hiruma, K., Gerlach, N., Sacristán, S., Nakano, R., Hacquard, S., Kracher, B., . . . Schulze-Lefert, P. (2016). Root Endophyte *Colletotrichum tofieldiae* Confers Plant Fitness Benefits that Are Phosphate Status Dependent. *Cell*, 165(2), 464-474. doi:10.1016/j.cell.2016.02.028

Hogan, D. A. (2006). Talking to Themselves: Autoregulation and Quorum Sensing in Fungi. *Eukaryotic Cell*, 5(4), 613-619. doi:10.1128/ec.5.4.613-619.2006

Holzlechner, M., Reitschmidt, S., Gruber, S., Zeilinger, S., & Marchetti-Deschmann, M. (2016). Visualizing fungal metabolites during mycoparasitic interaction by MALDI mass spectrometry imaging. *Proteomics*, 16(11-12), 1742-1746. doi:10.1002/pmic.201500510

Hu, H., Chen, Y., Wang, Y., Tang, Y., Chen, S., & Yan, S. (2017). Endophytic *Bacillus cereus* Effectively Controls *Meloidogyne incognita* on Tomato Plants Through Rapid Rhizosphere Occupation and Repellent Action. *Plant Disease*, 101(3), 448-455. doi:10.1094/pdis-06-16-0871-re

Hubbard, M., Germida, J., & Vujanovic, V. (2013). Fungal endophytes enhance wheat heat and drought tolerance in terms of grain yield and second-generation seed viability. *Journal of Applied Microbiology*, 116(1), 109-122. doi:10.1111/jam.12311

Hurek, T., Reinhold-Hurek, B., Montagu, M. V., & Kellenberger, E. (1991). Infection of Intact Roots of Kallar Grass and Rice Seedlings by *Azoarcus*. *Nitrogen Fixation*, 235-242. doi:10.1007/978-94-011-3486-6\_41

Hyde KD, Soyong K (2008) The fungal endophyte dilemma. *Fungal Divers* 33:163–173

Hynes, J., Müller, C. T., Jones, T. H., & Boddy, L. (2006). Changes in Volatile Production During the Course of Fungal Mycelial Interactions Between *Hypholoma fasciculare* and *Resinicium bicolor*. *Journal of Chemical Ecology*, 33(1), 43-57. doi:10.1007/s10886-006-9209-6

Ibrahim, M., Sieber, T. N., & Schlegel, M. (2017). Communities of fungal endophytes in leaves of *Fraxinus ornus* are highly diverse. *Fungal Ecology*, 29, 10-19. doi:10.1016/j.funeco.2017.05.001

Ikeda, A. C., Bassani, L. L., Adamoski, D., Stringari, D., Cordeiro, V. K., Glienke, C., . . . Galliterasawa, L. V. (2012). Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. *Microbial Ecology*, 65(1), 154-160. doi:10.1007/s00248-012-0104-0

Ikeda, K., Inoue, K., Nakamura, H., Hamanaka, T., Ohta, T., Kitazawa, H., . . . Park, P. (2011). Genetic

analysis of barrage line formation during mycelial incompatibility in *Rosellinia necatrix*. *Fungal Biology*, 115(1), 80-86. doi:10.1016/j.funbio.2010.10.008

Iniguez, A. L., Dong, Y., Carter, H. D., Ahmer, B. M., Stone, J. M., & Triplett, E. W. (2005). Regulation of Enteric Endophytic Bacterial Colonization by Plant Defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(2), 169-178. doi:10.1094/mpmi-18-0169

Izumitsu, K., Hatoh, K., Sumita, T., Kitade, Y., Morita, A., Tanaka, C., . . . Ota, Y. (2012). Rapid and simple preparation of mushroom DNA directly from colonies and fruiting bodies for PCR. *Mycoscience*, 53(5), 396-401. doi:10.1007/s10267-012-0182-3

Jaber, L. R., & Ownley, B. H. (2018). Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? *Biological Control*, 116, 36-45. doi:10.1016/j.biocontrol.2017.01.018

Jaeger, N. D., Declerck, S., & Providencia, I. E. (2010). Mycoparasitism of arbuscular mycorrhizal fungi: a pathway for the entry of saprotrophic fungi into roots. *FEMS Microbiology Ecology*. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.00903.x

Jain, P., & Pundir, R. K. (2014). Diverse Endophytic Microflora of Medicinal Plants. *Soil Biology Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants*, 341-357. doi:10.1007/978-3-319-13401-7\_17

James, E. K., Gyaneshwar, P., Mathan, N., Barraquio, W. L., Reddy, P. M., Iannetta, P. P., . . . Ladha, J. K. (2002). Infection and Colonization of Rice Seedlings by the Plant Growth-Promoting Bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(9), 894-906. doi:10.1094/mpmi.2002.15.9.894

Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761-2764. doi:10.1128/jcm.01228-07

Jansson, J. K., & Baker, E. S. (2016). A multi-omic future for microbiome studies. *Nature Microbiology*, 1(5). doi:10.1038/nmicrobiol.2016.49

Jaśim, B., Joseph, A. A., John, C. J., Mathew, J., & Radhakrishnan, E. K. (2013). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria from the rhizome of *Zingiber officinale*. *3 Biotech*, 4(2), 197-204. doi:10.1007/s13205-013-0143-3

Jia, M., Chen, L., Xin, H., Zheng, C., Rahman, K., Han, T., & Qin, L. (2016). A Friendly Relationship between Endophytic Fungi and Medicinal Plants: A Systematic Review. *Frontiers in Microbiology*, 7. doi:10.3389/fmicb.2016.00906

Jin, H., Yang, X., Yan, Z., Liu, Q., Li, X., Chen, J., . . . Qin, B. (2014). Characterization of rhizosphere and endophytic bacterial communities from leaves, stems and roots of medicinal *Stellera chamaejasme* L. *Systematic and Applied Microbiology*, 37(5), 376-385. doi:10.1016/j.syapm.2014.05.001

Johnson, L. J., Koulman, A., Christensen, M., Lane, G. A., Fraser, K., Forester, N., . . . Rasmussen, S. (2013). An Extracellular Siderophore Is Required to Maintain the Mutualistic Interaction of *Epichloë festucae* with *Lolium perenne*. *PLoS Pathogens*, 9(5). doi:10.1371/journal.ppat.1003332

Johnston-Monje, D., & Raizada, M. N. (2011). Conservation and Diversity of Seed Associated Endophytes in *Zea* across Boundaries of Evolution, Ethnography and Ecology. *PLoS ONE*, 6(6). doi:10.1371/journal.pone.0020396

Kandula, D., Jones, E., Stewart, A., Mclean, K., & Hampton, J. (2015). Trichoderma species for biocontrol of soil-borne plant pathogens of pasture species. *Biocontrol Science and Technology*, 25(9), 1052-1069. doi:10.1080/09583157.2015.1028892

- Karlsson, M., Durling, M. B., Choi, J., Kosawang, C., Lackner, G., Tzelepis, G. D., . . . Jensen, D. F. (2015). Insights on the Evolution of Mycoparasitism from the Genome of *Clonostachys rosea*. *Genome Biology and Evolution*, 7(2), 465-480. doi:10.1093/gbe/evu292
- Kaul, S., Sharma, T., & Dhar, M. K. (2016). “Omics” Tools for Better Understanding the Plant–Endophyte Interactions. *Frontiers in Plant Science*, 7. doi:10.3389/fpls.2016.00955
- Kavroulakis, N., Ntougias, S., Zervakis, G. I., Ehaliotis, C., Haralampidis, K., & Papadopoulou, K. K. (2007). Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. *Journal of Experimental Botany*, 58(14), 3853-3864. doi:10.1093/jxb/erm230
- Khan, A., Hamayun, M., Kang, S., Kim, Y., Jung, H., Lee, J., & Lee, I. (2012). Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. *BMC Microbiology*, 12(1), 3. doi:10.1186/1471-2180-12-3
- Khan, A., Hossain, M. T., Park, H. C., Yun, D., Shim, S. H., & Chung, Y. R. (2016). Development of root system architecture of *Arabidopsis thaliana* in response to colonization by *Martellella endophytica* YC6887 depends on auxin signaling. *Plant and Soil*, 405(1-2), 81-96. doi:10.1007/s11104-015-2775-z
- Klaedtke, S., Jacques, M., Raggi, L., Prévieux, A., Bonneau, S., Negri, V., . . . Barret, M. (2015). Terroir is a key driver of seed-associated microbial assemblages. *Environmental Microbiology*, 18(6), 1792-1804. doi:10.1111/1462-2920.12977
- Kloepper, J. W., Mcinroy, J. A., Liu, K., & Hu, C. (2013). Symptoms of Fern Distortion Syndrome Resulting from Inoculation with Opportunistic Endophytic Fluorescent *Pseudomonas* spp. *PLoS ONE*, 8(3). doi:10.1371/journal.pone.0058531
- Kobayashi, D. Y., & Crouch, J. A. (2009). Bacterial/Fungal Interactions: From Pathogens to Mutualistic Endosymbionts. *Annual Review of Phytopathology*, 47(1), 63-82. doi:10.1146/annurev-phyto-080508-081729
- Krause, A., Ramakumar, A., Bartels, D., Battistoni, F., Bekel, T., Boch, J., . . . Goesmann, A. (2006). Complete genome of the mutualistic, N<sub>2</sub>-fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Nature Biotechnology*, 24(11), 1-7. doi:10.1038/nbt1243
- Krings, M., Taylor, T. N., Hass, H., Kerp, H., Dotzler, N., & Hermsen, E. J. (2007). Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. *New Phytologist*, 174(3), 648-657. doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02008.x
- Kristin, A., & Miranda, H. (2013). The root microbiota—a fingerprint in the soil? *Plant and Soil*, 370(1-2), 671-686. doi:10.1007/s11104-013-1647-7
- Kumar, V., Kumar, A., Pandey, K. D., & Roy, B. K. (2014). Isolation and characterization of bacterial endophytes from the roots of *Cassia tora* L. *Annals of Microbiology*, 65(3), 1391-1399. doi:10.1007/s13213-014-0977-x
- Kusari, P., Kusari, S., Spiteller, M., & Kayser, O. (2012). Endophytic fungi harbored in *Cannabis sativa* L.: diversity and potential as biocontrol agents against host plant-specific phytopathogens. *Fungal Diversity*, 60(1), 137-151. doi:10.1007/s13225-012-0216-3
- Kusari, S., Zühlke, S., & Spiteller, M. (2009). An Endophytic Fungus from *Camptotheca acuminata* That Produces Camptothecin and Analogues. *Journal of Natural Products*, 72(1), 2-7. doi:10.1021/np800455b
- Kusari, S., Hertweck, C., & Spiteller, M. (2012). Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. *Chemistry & Biology*, 19(7), 792-798. doi:10.1016/j.chembiol.2012.06.004
- Kusari, S., & Spiteller, M. (2012). Metabolomics of Endophytic Fungi Producing Associated Plant Secondary Metabolites: Progress, Challenges and Opportunities. *Metabolomics*. doi:10.5772/31596

- Kõljalg, U., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Tedersoo, L., Taylor, A. F., Bahram, M., . . . Larsson, K. (2013). Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology*, *22*(21), 5271-5277. doi:10.1111/mec.12481
- Köberl, M., Schmidt, R., Ramadan, E. M., Bauer, R., & Berg, G. (2013). The microbiome of medicinal plants: diversity and importance for plant growth, quality and health. *Frontiers in Microbiology*, *4*. doi:10.3389/fmicb.2013.00400
- König, C. C., Scherlach, K., Schroeckh, V., Horn, F., Nietzsche, S., Brakhage, A. A., & Hertweck, C. (2013). Bacterium Induces Cryptic Meroterpenoid Pathway in the Pathogenic Fungus *Aspergillus fumigatus*. *ChemBioChem*, *14*(8), 938-942. doi:10.1002/cbic.201300070
- Lahlali, R., & Hijri, M. (2010). Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants. *FEMS Microbiology Letters*, *311*(2), 152-159. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.02084.x
- Lahrman, U., Ding, Y., Banhara, A., Rath, M., Hajirezaei, M. R., Döhlemann, S., . . . Zuccaro, A. (2013). Host-related metabolic cues affect colonization strategies of a root endophyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(34), 13965-13970. doi:10.1073/pnas.1301653110
- Landum, M. C., Félix, M. D., Alho, J., Garcia, R., Cabrita, M. J., Rei, F., & Varanda, C. M. (2016). Antagonistic activity of fungi of *Olea europaea* L. against *Colletotrichum acutatum*. *Microbiological Research*, *183*, 100-108. doi:10.1016/j.micres.2015.12.001
- Larran, S., Perelló, A., Simón, M. R., & Moreno, V. (2006). The endophytic fungi from wheat (*Triticum aestivum* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *23*(4), 565-572. doi:10.1007/s11274-006-9266-6
- Lee, K., Pan, J. J., & May, G. (2009). Endophytic *Fusarium verticillioides* reduces disease severity caused by *Ustilago maydis* on maize. *FEMS Microbiology Letters*, *299*(1), 31-37. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01719.x
- Li, B., Li, Q., Xu, Z., Zhang, N., Shen, Q., & Zhang, R. (2014). Responses of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to different soilborne fungal pathogens through the alteration of antifungal compounds production. *Frontiers in Microbiology*, *5*. doi:10.3389/fmicb.2014.00636
- Li, G., Kusari, S., Golz, C., Strohmman, C., & Spiteller, M. (2016). Three cyclic pentapeptides and a cyclic lipopeptide produced by endophytic *Fusarium decemcellulare* LG53. *RSC Advances*, *6*(59), 54092-54098. doi:10.1039/c6ra10905e
- Li, X., Geng, X., Xie, R., Fu, L., Jiang, J., Gao, L., & Sun, J. (2016). The endophytic bacteria isolated from elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schumach) promote plant growth and enhance salt tolerance of Hybrid *Pennisetum*. *Biotechnology for Biofuels*, *9*(1). doi:10.1186/s13068-016-0592-0
- Lim, S. M., Yoon, M., Choi, G. J., Choi, Y. H., Jang, K. S., Shin, T. S., . . . Kim, J. (2017). Diffusible and Volatile Antifungal Compounds Produced by an Antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against Various Phytopathogenic Fungi. *The Plant Pathology Journal*, *33*(5), 488-498. doi:10.5423/ppj.oa.04.2017.0073
- Loper, J. E., & Gross, H. (2007). Genomic analysis of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *European Journal of Plant Pathology*, *119*(3), 265-278. doi:10.1007/s10658-007-9179-8
- Lopez, D. C., & Sword, G. A. (2015). The endophytic fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Purpureocillium lilacinum* enhance the growth of cultivated cotton (*Gossypium hirsutum*) and negatively affect survival of the cotton bollworm (*Helicoverpa zea*). *Biological Control*, *89*, 53-60. doi:10.1016/j.biocontrol.2015.03.010
- Lowman, S., Kim-Dura, S., Mei, C., & Nowak, J. (2015). Strategies for enhancement of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) performance under limited nitrogen supply based on utilization of N-fixing bacterial

endophytes. *Plant and Soil*, 405(1-2), 47-63. doi:10.1007/s11104-015-2640-0

Lundberg, D. S., Lebeis, S. L., Paredes, S. H., Yourstone, S., Gehring, J., Malfatti, S., . . . Dangl, J. L. (2012). Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature*, 488(7409), 86-90. doi:10.1038/nature11237

López-González, R. C., Gómez-Cornelio, S., Rosa-García, S. C., Garrido, E., Oropeza-Mariano, O., Heil, M., & Partida-Martínez, L. P. (2017). The age of lima bean leaves influences the richness and diversity of the endophytic fungal community, but not the antagonistic effect of endophytes against *Colletotrichum lindemuthianum*. *Fungal Ecology*, 26, 1-10. doi:10.1016/j.funeco.2016.11.004

Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2009). Brock biology of microorganisms (10th ed.). Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall/Pearson Education.

Maldonado-González, M. M., Bakker, P. A., Prieto, P., & Mercado-Blanco, J. (2015). *Arabidopsis thaliana* as a tool to identify traits involved in *Verticillium dahliae* biocontrol by the olive root endophyte *Pseudomonas fluorescens* PICF7. *Frontiers in Microbiology*, 06. doi:10.3389/fmicb.2015.00266

Malfanova, N.V., (2013). Endophytic Bacteria With Plant Growth Promoting and Biocontrol Abilities, Institute Biology of Leiden (IBL). Faculty of Science, Leiden University.

Malfanova, N., Kamilova, F., Validov, S., Shcherbakov, A., Chebotar, V., Tikhonovich, I., & Lugtenberg, B. (2011). Characterization of *Bacillus subtilis* HC8, a novel plant-beneficial endophytic strain from giant hogweed. *Microbial Biotechnology*, 4(4), 523-532. doi:10.1111/j.1751-7915.2011.00253.x

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. doi:10.1007/s00248-010-9658-x

Marasco, R., Rolli, E., Ettoumi, B., Vigani, G., Mapelli, F., Borin, S., . . . Daffonchio, D. (2012). A Drought Resistance-Promoting Microbiome Is Selected by Root System under Desert Farming. *PLoS ONE*, 7(10). doi:10.1371/journal.pone.0048479

Marmann, A., Aly, A., Lin, W., Wang, B., & Proksch, P. (2014). Co-Cultivation—A Powerful Emerging Tool for Enhancing the Chemical Diversity of Microorganisms. *Marine Drugs*, 12(12), 1043-1065. doi:10.3390/md12021043

Matsumoto, A., & Takahashi, Y. (2017). Endophytic actinomycetes: promising source of novel bioactive compounds. *The Journal of Antibiotics*, 70(5), 514-519. doi:10.1038/ja.2017.20

Mattinen, L., Somervuo, P., Nykyri, J., Nissinen, R., Kouvonen, P., Corthals, G., . . . Pirhonen, M. (2008). Microarray profiling of host-extract-induced genes and characterization of the type VI secretion cluster in the potato pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *Microbiology*, 154(8), 2387-2396. doi:10.1099/mic.0.2008/017582-0

Maynard, D. S., Bradford, M. A., Lindner, D. L., Diepen, L. T., Frey, S. D., Glaeser, J. A., & Crowther, T. W. (2017). Diversity begets diversity in competition for space. *Nature Ecology & Evolution*, 1(6), 0156. doi:10.1038/s41559-017-0156

Mazokopakis, E., Lazaridou, S., Tzardi, M., Mixaki, J., Diamantis, I., & Ganotakis, E. (2004). Acute cholestatic hepatitis caused by *Teucrium polium* L. *Phytomedicine*, 11(1), 83-84. doi:10.1078/0944-7113-00337

Mccallum, B. D., Tekauz, A., & Gilbert, J. (2004). Barrage Zone Formation Between Vegetatively Incompatible *Fusarium graminearum*(*Gibberella zae*) Isolates. *Phytopathology*, 94(5), 432-437. doi:10.1094/phyto.2004.94.5.432

Mehta, P., Walia, A., Kakkar, N., & Shirkot, C. K. (2014). Tricalcium phosphate solubilisation by new endophyte *Bacillus methylotrophicus* CKAM isolated from apple root endosphere and its plant growth-

promoting activities. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(8), 2033-2045. doi:10.1007/s11738-014-1581-1

Mejía, L. C., Rojas, E. I., Maynard, Z., Bael, S. V., Arnold, A. E., Hebbar, P., . . . Herre, E. A. (2008). Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control*, 46(1), 4-14. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.01.012

Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 634-663. doi:10.1111/1574-6976.12028

Menichini, F., Conforti, F., Rigano, D., Formisano, C., Piozzi, F., & Senatore, F. (2009). Phytochemical composition, anti-inflammatory and antitumour activities of four *Teucrium* essential oils from Greece. *Food Chemistry*, 115(2), 679-686. doi:10.1016/j.foodchem.2008.12.067

Mercado-Blanco, J., & Lugtenberg, B. (2014). Biotechnological Applications of Bacterial Endophytes. *Current Biotechnology*, 3(1), 60-75. doi:10.2174/22115501113026660038

Mercado-Blanco, J., Rodríguez-Jurado, D., Hervás, A., & Jiménez-Díaz, R. M. (2004). Suppression of Verticillium wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. *Biological Control*, 30(2), 474-486. doi:10.1016/j.biocontrol.2004.02.002

Mercado-Blanco, J., & Prieto, P. (2012). Bacterial endophytes and root hairs. *Plant and Soil*, 361(1-2), 301-306. doi:10.1007/s11104-012-1212-9

Miles, L. A., Lopera, C. A., González, S., García, M. C., Franco, A. E., & Restrepo, S. (2012). Exploring the biocontrol potential of fungal endophytes from an Andean Colombian Paramo ecosystem. *BioControl*, 57(5), 697-710. doi:10.1007/s10526-012-9442-6

Mishra, Y., Mittal, J., Singh, A., Batra, A., & Sharma, M. M. (2015). In vivo and in vitro histological localization of endophytic fungi in *Tinospora cordifolia* (Willd.) Miers ex Hook F. & Thomas. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(1), 30-33. doi:10.1016/j.jarmap.2014.12.002

Mitter, B., Petric, A., Chain, P. S., Trognitz, F., Nowak, J., Compant, S., & Sessitsch, A. (2013). Genome Analysis, Ecology, and Plant Growth Promotion of the Endophyte *Burkholderia phytofirmans* Strain PsJN. *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*, 865-874. doi:10.1002/9781118297674.ch81

Mitter, B., Pfaffenbichler, N., Flavell, R., Compant, S., Antonielli, L., Petric, A., . . . Sessitsch, A. (2017). A New Approach to Modify Plant Microbiomes and Traits by Introducing Beneficial Bacteria at Flowering into Progeny Seeds. *Frontiers in Microbiology*, 8. doi:10.3389/fmicb.2017.00011

Moya, P., Pedemonte, D., Amengual, S., Franco, M. E., & Sisterna, M. N. (n.d.). Antagonism and modes of action of *Chaetomium globosum* species group, potential biocontrol agent of barley foliar diseases. *Bol. Soc. Argent. Bot.*, 51(4), 569-578. Retrieved 2016.

Mousa, W. K., Shearer, C., Limay-Rios, V., Ettinger, C. L., Eisen, J. A., & Raizada, M. N. (2016). Root-hair endophyte stacking in finger millet creates a physicochemical barrier to trap the fungal pathogen *Fusarium graminearum*. *Nature Microbiology*, 1, 16167. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.167

Mukherjee, M., Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Zachow, C., Berg, G., & Zeilinger, S. (2012). Trichoderma–Plant–Pathogen Interactions: Advances in Genetics of Biological Control. *Indian Journal of Microbiology*, 52(4), 522-529. doi:10.1007/s12088-012-0308-5

Musetti, R., Grisan, S., Polizzotto, R., Martini, M., Paduano, C., & Osler, R. (2011). Interactions between ‘Candidatus Phytoplasma mali’ and the apple endophyte *Epicoccum nigrum* in *Catharanthus roseus* plants. *Journal of Applied Microbiology*, 110(3), 746-756. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.04937.x

Müller, C. B., & Krauss, J. (2005). Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(4), 450-456. doi:10.1016/j.pbi.2005.05.007

Müller, D. B., Vogel, C., Bai, Y., & Vorholt, J. A. (2016). The Plant Microbiota: Systems-Level Insights

and Perspectives. *Annual Review of Genetics*, 50(1), 211-234. doi:10.1146/annurev-genet-120215-034952

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. doi:10.3389/fmicb.2015.00138

Müller, P., & Döring, M. (2009). Isothermal DNA amplification facilitates the identification of a broad spectrum of bacteria, fungi and protozoa in *Eleutherococcus* sp. plant tissue cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 98(1), 35-45. doi:10.1007/s11240-009-9536-8

Naidu, Y., Idris, A. S., Madihah, A. Z., & Kamarudin, N. (2016). In vitro Antagonistic Interactions Between Endophytic Basidiomycetes of Oil Palm (*Elaeis guineensis*) and *Ganoderma boninense*. *Journal of Phytopathology*, 164(10), 779-790. doi:10.1111/jph.12498

Narayanasamy, P. (2013). Mechanisms of Action of Fungal Biological Control Agents. *Biological Management of Diseases of Crops*, 99-200. doi:10.1007/978-94-007-6380-7\_3

Naveed, M., Hussain, M. B., Zahir, Z. A., Mitter, B., & Sessitsch, A. (2013). Drought stress amelioration in wheat through inoculation with *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Plant Growth Regulation*, 73(2), 121-131. doi:10.1007/s10725-013-9874-8

Neilands, J. B. (1995). Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *Journal of Biological Chemistry*, 270(45), 26723-26726. doi:10.1074/jbc.270.45.26723

Neilands JB. Siderophore systems of bacteria and fungi. In: Doyle RJ, editor. Metalions and bacteria. New York, NY: John Wiley & Sons, Inc.; 1989. p. 141–63.

Netzker, T., Fischer, J., Weber, J., Mattern, D. J., König, C. C., Valiante, V., . . . Brakhage, A. A. (2015). Microbial communication leading to the activation of silent fungal secondary metabolite gene clusters. *Frontiers in Microbiology*, 6. doi:10.3389/fmicb.2015.00299

Newcombe, G., Shipunov, A., Eigenbrode, S. D., Raghavendra, A. K., Ding, H., Anderson, C. L., . . . Schwarzländer, M. (2009). Endophytes influence protection and growth of an invasive plant. *Communicative & Integrative Biology*, 2(1), 29-31. doi:10.4161/cib.2.1.7393

Ochi, K., & Hosaka, T. (2012). New strategies for drug discovery: activation of silent or weakly expressed microbial gene clusters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(1), 87-98. doi:10.1007/s00253-012-4551-9

Oerke, E., & Dehne, H. (2004). Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Protection*, 23(4), 275-285. doi:10.1016/j.cropro.2003.10.001

Ohike, T., Makuni, K., Okanami, M., & Ano, T. (2013). Screening of endophytic bacteria against fungal plant pathogens. *Journal of Environmental Sciences*, 25. doi:10.1016/s1001-0742(14)60640-9

Ongena, M., & Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3), 115-125. doi:10.1016/j.tim.2007.12.009

Ortíz-Castro, R., Valencia-Cantero, E., & López-Bucio, J. (2008). Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling. *Plant Signaling & Behavior*, 3(4), 263-265. doi:10.4161/psb.3.4.5204

Oteino, N., Lally, R. D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K. J., & Dowling, D. N. (2015). Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in Microbiology*, 6. doi:10.3389/fmicb.2015.00745

Ottesen, A. R., Peña, A. G., White, J. R., Pettengill, J. B., Li, C., Allard, S., . . . Brown, E. (2013). Baseline survey of the anatomical microbial ecology of an important food plant: *Solanum lycopersicum* (tomato). *BMC Microbiology*, 13(1), 114. doi:10.1186/1471-2180-13-114

Pancher, M., Ceol, M., Corneo, P. E., Longa, C. M., Yousaf, S., Pertot, I., & Campisano, A. (2012).

Fungal Endophytic Communities in Grapevines (*Vitis vinifera* L.) Respond to Crop Management. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), 4308-4317. doi:10.1128/aem.07655-11

Papaioannou, I. A., & Typas, M. A. (2014). Barrage formation is independent from heterokaryon incompatibility in *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology*, 141(1), 71-82. doi:10.1007/s10658-014-0525-3

Park, Y., Kim, Y., Mishra, R. C., & Bae, H. (2017). Fungal endophytes inhabiting mountain-cultivated ginseng (*Panax ginseng* Meyer): Diversity and biocontrol activity against ginseng pathogens. *Scientific Reports*, 7(1). doi:10.1038/s41598-017-16181-z

Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 763-775. doi:10.1038/nrmicro1987

Parsa, S., Ortiz, V., & Vega, F. E. (2013). Establishing Fungal Entomopathogens as Endophytes: Towards Endophytic Biological Control. *Journal of Visualized Experiments*, (74). doi:10.3791/50360

Partida-Martinez, L. P., & Hertweck, C. (2005). Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production. *Nature*, 437(7060), 884-888. doi:10.1038/nature03997

Partida-Martínez, L., & Heil, M. (2015). The Microbe-Free Plant: Fact or Artifact. *Biological Nitrogen Fixation*, 1163-1174. doi:10.1002/9781119053095.ch114

Passari, A. K., Mishra, V. K., Gupta, V. K., Saikia, R., & Singh, B. P. (2016). Distribution and Identification of Endophytic *Streptomyces* Species from *Schima wallichii* as Potential Biocontrol Agents against Fungal Plant Pathogens. *Polish Journal of Microbiology*, 65(3), 319-329. doi:10.5604/17331331.1215611

Patel, H. A., Patel, R. K., Khristi, S. M., Parikh, K., & Rajendran, G. (2012). Isolation and Characterization of Bacterial Endophytes from *Lycopersicon esculentum* Plant and their Plant Growth Promoting Characteristics. *Nepal Journal of Biotechnology*, 2(1). doi:10.3126/njb.v2i1.5679

Patten, C.L., & Glick, B.R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 42, 207-220.

Paungfoo-Lonhienne, C., Rentsch, D., Robatzek, S., Webb, R. I., Sagulenko, E., Näsholm, T., . . . Lonhienne, T. G. (2010). Turning the Table: Plants Consume Microbes as a Source of Nutrients. *PLoS ONE*, 5(7). doi:10.1371/journal.pone.0011915

Pedrosa, F. O., Monteiro, R. A., Wassem, R., Cruz, L. M., Ayub, R. A., Colauto, N. B., . . . Souza, E. M. (2011). Genome of *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1, a Specialized Diazotrophic Endophyte of Tropical Grasses. *PLoS Genetics*, 7(5). doi:10.1371/journal.pgen.1002064

Peiris, D., Dunn, W. B., Brown, M., Kell, D. B., Roy, I., & Hedger, J. N. (2007). Metabolite profiles of interacting mycelial fronts differ for pairings of the wood decay basidiomycete fungus, *Stereum hirsutum* with its competitors *Coprinus micaceus* and *Coprinus disseminatus*. *Metabolomics*, 4(1), 52-62. doi:10.1007/s11306-007-0100-4

Perrig, D., Boiero, M. L., Masciarelli, O. A., Penna, C., Ruiz, O. A., Cassán, F. D., & Luna, M. V. (2007). Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(5), 1143-1150. doi:10.1007/s00253-007-0909-9

Peršoh, D. (2015). Plant-associated fungal communities in the light of meta-omics. *Fungal Diversity*, 75(1), 1-25. doi:10.1007/s13225-015-0334-9

Pettit, R. K. (2009). Mixed fermentation for natural product drug discovery. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83(1), 19-25. doi:10.1007/s00253-009-1916-9

Pham, V. T., Rediers, H., Ghequire, M. G., Nguyen, H. H., Mot, R. D., Vanderleyden, J., & Spaepen, S.

- (2017). The plant growth-promoting effect of the nitrogen-fixing endophyte *Pseudomonas stutzeri* A15. *Archives of Microbiology*, 199(3), 513-517. doi:10.1007/s00203-016-1332-3
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 789-799. doi:10.1038/nrmicro3109
- Photita, W., Lumyong, S., Lumyong, P., McKenzie E.H.C. & Hyde, K.D. (2004). Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens?. *Fungal Diversity*, 16, 131-140.
- Pieterse, C. M., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Wees, S. C., & Bakker, P. A. (2014). Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52(1), 347-375. doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102340
- Pikovskaya, R.I. (1948) Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 17, 362–370.
- Pintye, A., Bereczky, Z., Kovács, G. M., Nagy, L. G., Xu, X., Legler, S. E., . . . Kiss, L. (2012). No Indication of Strict Host Associations in a Widespread Mycoparasite: Grapevine Powdery Mildew (*Erysiphe necator*) Is Attacked by Phylogenetically Distant *Ampelomyces* Strains in the Field. *Phytopathology*, 102(7), 707-716. doi:10.1094/phyto-10-11-0270
- Pirttila, A. M., Joensuu, P., Pospiech, H., Jalonen, J., & Hohtola, A. (2004). Bud endophytes of *Scots pine* produce adenine derivatives and other compounds that affect morphology and mitigate browning of callus cultures. *Physiologia Plantarum*, 121(2), 305-312. doi:10.1111/j.0031-9317.2004.00330.x
- Polymeros, D., Kamberoglou, D., & Tzias, V. (2002). Acute Cholestatic Hepatitis Caused by *Teucrium polium* (Golden Germander) With Transient Appearance of Antimitochondrial Antibody. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 34(1), 100-101. doi:10.1097/00004836-200201000-00022
- Preto, G., Martins, F., Pereira, J. A., & Baptista, P. (2017). Fungal community in olive fruits of cultivars with different susceptibilities to anthracnose and selection of isolates to be used as biocontrol agents. *Biological Control*, 110, 1-9. doi:10.1016/j.biocontrol.2017.03.011
- Prieto, P., Schilirò, E., Maldonado-González, M. M., Valderrama, R., Barroso-Albarracín, J. B., & Mercado-Blanco, J. (2011). Root Hairs Play a Key Role in the Endophytic Colonization of Olive Roots by *Pseudomonas* spp. with Biocontrol Activity. *Microbial Ecology*, 62(2), 435-445. doi:10.1007/s00248-011-9827-6
- Puri, A., Padda, K. P., & Chanway, C. P. (2015). Can a diazotrophic endophyte originally isolated from lodgepole pine colonize an agricultural crop (corn) and promote its growth? *Soil Biology and Biochemistry*, 89, 210-216. doi:10.1016/j.soilbio.2015.07.012
- Pérez-Montaño, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R., Cerro, P. D., Espuny, M., Jiménez-Guerrero, I., . . . Cubo, T. (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*, 169(5-6), 325-336. doi:10.1016/j.micres.2013.09.011
- Qin, Y., Druzhinina, I. S., Pan, X., & Yuan, Z. (2016). Microbially Mediated Plant Salt Tolerance and Microbiome-based Solutions for Saline Agriculture. *Biotechnology Advances*, 34(7), 1245-1259. doi:10.1016/j.biotechadv.2016.08.005
- Raaijmakers, J. M., Bruijn, I. D., 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. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x
- Raja, S., Subhashini, P., & Thangaradjou, T. (2016). Differential methods of localisation of fungal endophytes in the seagrasses. *Mycology*, 7(3), 112-123. doi:10.1080/21501203.2016.1218966

- Raman, A., Wheatley, W., & Popay, A. (2012). Endophytic Fungus-Vascular Plant-Insect Interactions. *Environmental Entomology*, 41(3), 433-447. doi:10.1603/en11317
- Rashid, S., Charles, T. C., & Glick, B. R. (2012). Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Applied Soil Ecology*, 61, 217-224. doi:10.1016/j.apsoil.2011.09.011
- Reddy, C. A., & Saravanan, R. S. (2013). Polymicrobial Multi-functional Approach for Enhancement of Crop Productivity. *Advances in Applied Microbiology*, 53-113. doi:10.1016/b978-0-12-407679-2.00003-x
- Redman, R. S., Dunigan, D. D., & Rodriguez, R. J. (2001). Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? *New Phytologist*, 151(3), 705-716. doi:10.1046/j.0028-646x.2001.00210.x
- Reinhold-Hurek, B., Krause, A., Leyser, B., Miché, L., & Hurek, T. (n.d.). The Rice Apoplast as a Habitat for Endophytic N<sub>2</sub>-Fixing Bacteria. *The Apoplast of Higher Plants: Compartment of Storage, Transport and Reactions*, 427-443. doi:10.1007/978-1-4020-5843-1\_30
- Reinhold-Hurek, B., Maes, T., Gemmer, S., Montagu, M. V., & Hurek, T. (2006). An Endoglucanase Is Involved in Infection of Rice Roots by the Not-Cellulose-Metabolizing Endophyte *Azoarcus* Sp. Strain BH72. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(2), 181-188. doi:10.1094/mpmi-19-0181
- Reinhold-Hurek, B., & Hurek, T. (2011). Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(4), 435-443. doi:10.1016/j.pbi.2011.04.004
- Rho, H., Hsieh, M., Kandel, S. L., Cantillo, J., Doty, S. L., & Kim, S. (2017). Do Endophytes Promote Growth of Host Plants Under Stress? A Meta-Analysis on Plant Stress Mitigation by Endophytes. *Microbial Ecology*, 75(2), 407-418. doi:10.1007/s00248-017-1054-3
- Richardson, A. E., Barea, J., Mcneill, A. M., & Prigent-Combaret, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil*, 321(1-2), 305-339. doi:10.1007/s11104-009-9895-2
- Ringelberg, D., Foley, K., & Reynolds, C. (2012). Bacterial endophyte communities of two wheatgrass varieties following propagation in different growing media. *Canadian Journal of Microbiology*, 58(1), 67-80. doi:10.1139/w11-122
- Rivera-Orduña, F. N., Suarez-Sanchez, R. A., Flores-Bustamante, Z. R., Gracida-Rodriguez, J. N., & Flores-Cotera, L. B. (2010). Diversity of endophytic fungi of *Taxus globosa* (Mexican yew). *Fungal Diversity*, 47(1), 65-74. doi:10.1007/s13225-010-0045-1
- Robin, A., Vansuyt, G., Hinsinger, P., Meyer, J., Briat, J., & Lemanceau, P. (2008). Chapter 4 Iron Dynamics in the Rhizosphere. *Advances in Agronomy*, 183-225. doi:10.1016/s0065-2113(08)00404-5
- Robinson, R. J., Fraaije, B. A., Clark, I. M., Jackson, R. W., Hirsch, P. R., & Mauchline, T. H. (2016). Wheat seed embryo excision enables the creation of axenic seedlings and Koch's postulates testing of putative bacterial endophytes. *Scientific Reports*, 6(1). doi:10.1038/srep25581
- Rodriguez, R., & Redman, R. (2008). More than 400 million years of evolution and some plants still cant make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. *Journal of Experimental Botany*, 59(5), 1109-1114. doi:10.1093/jxb/erm342
- Rodriguez, R. J., Jr, J. F., Arnold, A. E., & Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182(2), 314-330. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x
- Rodriguez-Estrada, A. E., Jonkers, W., Kistler, H. C., & May, G. (2012). Interactions between *Fusarium verticillioides*, *Ustilago maydis*, and *Zea mays*: An endophyte, a pathogen, and their shared plant host. *Fungal Genetics and Biology*, 49(7), 578-587. doi:10.1016/j.fgb.2012.05.001
- Romero, F. M., Marina, M., & Pieckenstain, F. L. (2014). The communities of tomato (*Solanum lycopersicum*L.) leaf endophytic bacteria, analyzed by 16S-ribosomal RNA gene pyrosequencing. *FEMS*

*Microbiology Letters*, 351(2), 187-194. doi:10.1111/1574-6968.12377

Rosconi, F., Davyt, D., Martínez, V., Martínez, M., Abin-Carriquiry, J. A., Zane, H., . . . Fabiano, E. (2013). Identification and structural characterization of serobactins, a suite of lipopeptide siderophores produced by the grass endophyte *Herbaspirillum seropedicae*. *Environmental Microbiology*, 15(3), 916-927. doi:10.1111/1462-2920.12075

Rosenberg, E., Sharon, G., & Zilber-Rosenberg, I. (2009). The hologenome theory of evolution contains Lamarckian aspects within a Darwinian framework. *Environmental Microbiology*, 11(12), 2959-2962. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01995.x

Rothen, C., Miranda, V., Aranda-Rickert, A., Fracchia, S., & Rodríguez, M. (2017). Characterization of dark septate endophyte fungi associated with cultivated soybean at two growth stages. *Applied Soil Ecology*, 120, 62-69. doi:10.1016/j.apsoil.2017.07.033

Rutledge, P. J., & Challis, G. L. (2015). Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. *Nature Reviews Microbiology*, 13(8), 509-523. doi:10.1038/nrmicro3496

Saha, R., Saha, N., Donofrio, R. S., & Bestervelt, L. L. (2012). Microbial siderophores: a mini review. *Journal of Basic Microbiology*, 53(4), 303-317. doi:10.1002/jobm.201100552

Santos-Villalobos, S. D., Barrera-Galicia, G. C., Miranda-Salcedo, M. A., & Peña-Cabriales, J. J. (2012). Burkholderia cepacia XXVI siderophore with biocontrol capacity against *Colletotrichum gloeosporioides*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(8), 2615-2623. doi:10.1007/s11274-012-1071-9

Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Orozco-Mosqueda, M. D., & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183, 92-99. doi:10.1016/j.micres.2015.11.008

Saraf, M., Thakkar, A., Pandya, U., Joshi, M., & Parikh, J. (2013). Potential of plant growth promoting microorganisms as biofertilizers and biopesticides and its exploitation in sustainable agriculture.. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 3 (5), 54-62.

Sasirekha, B., & Srividya, S. (2016). Siderophore production by *Pseudomonas aeruginosa* FP6, a biocontrol strain for *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum gloeosporioides* causing diseases in chilli. *Agriculture and Natural Resources*, 50(4), 250-256. doi:10.1016/j.anres.2016.02.003

Savary, S., Ficke, A., Aubertot, J., & Hollier, C. (2012). Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. *Food Security*, 4(4), 519-537. doi:10.1007/s12571-012-0200-5

Savvidou, S., Goulis, J., Giavazis, I., Patsiaoura, K., Hytioglou, P., & Arvanitakis, C. (2007). Herb-induced hepatitis by *Teucrium polium* L.: report of two cases and review of the literature. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 19(6), 507-511. doi:10.1097/01.meg.0000252634.26538.eb

Schardl, C. L., Craven, K. D., Speakman, S., Stromberg, A., Lindstrom, A., & Yoshida, R. (2008). A Novel Test for Host-Symbiont Codivergence Indicates Ancient Origin of Fungal Endophytes in Grasses. *Systematic Biology*, 57(3), 483-498. doi:10.1080/10635150802172184

Schell, M. A., Ulrich, R. L., Ribot, W. J., Brueggemann, E. E., Hines, H. B., Chen, D., . . . Deshazer, D. (2007). Type VI secretion is a major virulence determinant in *Burkholderia mallei*. *Molecular Microbiology*, 64(6), 1466-1485. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05734.x

Scherling, C., Ulrich, K., Ewald, D., & Weckwerth, W. (2009). A Metabolic Signature of the Beneficial Interaction of the Endophyte *Paenibacillus* sp. Isolate and In Vitro-Grown Poplar Plants Revealed by Metabolomics. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(8), 1032-1037. doi:10.1094/mpmi-22-8-1032

Schilirò, E., Ferrara, M., Nigro, F., & Mercado-Blanco, J. (2012). Genetic Responses Induced in Olive Roots upon Colonization by the Biocontrol Endophytic Bacterium *Pseudomonas fluorescens* PICF7. *PLoS ONE*, 7(11). doi:10.1371/journal.pone.0048646

- Schmidt, R., Etalo, D. W., Jager, V. D., Gerards, S., Zweers, H., Boer, W. D., & Garbeva, P. (2016). Microbial Small Talk: Volatiles in Fungal–Bacterial Interactions. *Frontiers in Microbiology*, 6. doi:10.3389/fmicb.2015.01495
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., . . . Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241-6246. doi:10.1073/pnas.1117018109
- Schroeckh, V., Scherlach, K., Nutzmann, H., Shelest, E., Schmidt-Heck, W., Schuemann, J., . . . Brakhage, A. A. (2009). Intimate bacterial-fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(34), 14558-14563. doi:10.1073/pnas.0901870106
- Schueffler, A., & Anke, T. (2014). Fungal natural products in research and development. *Nat. Prod. Rep.*, 31(10), 1425-1448. doi:10.1039/c4np00060a
- Schulz, B., Haas, S., Junker, C., André, N., & Schobert, M. (2015). Fungal endophytes are involved in multiple balanced antagonisms. *Current Science*, 109(1), 39-45.
- Schulz, B., & Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological Research*, 109(6), 661-686. doi:10.1017/s095375620500273x
- Schwyn, B., & Neilands, J. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1), 47-56. doi:10.1016/0003-2697(87)90612-9
- Selim, H. M., Gomaa, N. M., & Essa, A. M. (2017). Application of endophytic bacteria for the biocontrol of *Rhizoctonia solani* (Cantharellales: ceratobasidiaceae) damping-off disease in cotton seedlings. *Biocontrol Science and Technology*, 27(1), 81-95. doi:10.1080/09583157.2016.1258452
- Selim, K. (2011). Biodiversity and antimicrobial activity of endophytes associated with Egyptian medicinal plants. *Mycosphere*, 2(6), 669-678. doi:10.5943/mycosphere/2/6/7
- Serrano, R., González-Menéndez, V., Rodríguez, L., Martín, J., Tormo, J. R., & Genilloud, O. (2017). Co-culturing of Fungal Strains Against *Botrytis cinerea* as a Model for the Induction of Chemical Diversity and Therapeutic Agents. *Frontiers in Microbiology*, 8. doi:10.3389/fmicb.2017.00649
- Sessitsch, A., & Mitter, B. (2014). 21st century agriculture: integration of plant microbiomes for improved crop production and food security. *Microbial Biotechnology*, 8(1), 32-33. doi:10.1111/1751-7915.12180
- Shade, A., Jacques, M., & Barret, M. (2017). Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. *Current Opinion in Microbiology*, 37, 15-22. doi:10.1016/j.mib.2017.03.010
- Shade, A., Jacques, M., & Barret, M. (2017). Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. *Current Opinion in Microbiology*, 37, 15-22. doi:10.1016/j.mib.2017.03.010
- Sharififar, F., Dehghn-Nudeh, G., & Mirtajaldini, M. (2009). Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry*, 112(4), 885-888. doi:10.1016/j.foodchem.2008.06.064
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2(1), 587. doi:10.1186/2193-1801-2-587
- Sharma, V., Salwan, R., & Sharma, P. N. (2016). Differential Response of Extracellular Proteases of *Trichoderma harzianum* Against Fungal Phytopathogens. *Current Microbiology*, 73(3), 419-425. doi:10.1007/s00284-016-1072-2
- Shehata, H. R., Ettinger, C. L., Eisen, J. A., & Raizada, M. N. (2016). Genes Required for the Anti-fungal Activity of a Bacterial Endophyte Isolated from a Corn Landrace Grown Continuously by

Subsistence Farmers Since 1000 BC. *Frontiers in Microbiology*, 7. doi:10.3389/fmicb.2016.01548

Shehata, H. R., Ettinger, C. L., Eisen, J. A., & Raizada, M. N. (2016). Genes Required for the Anti-fungal Activity of a Bacterial Endophyte Isolated from a Corn Landrace Grown Continuously by Subsistence Farmers Since 1000 BC. *Frontiers in Microbiology*, 7. doi:10.3389/fmicb.2016.01548

Sheibani-Tezerji, R., Naveed, M., Jehl, M., Sessitsch, A., Rattei, T., & Mitter, B. (2015). The genomes of closely related *Pantoea ananatis* maize seed endophytes having different effects on the host plant differ in secretion system genes and mobile genetic elements. *Frontiers in Microbiology*, 6. doi:10.3389/fmicb.2015.00440

Shi, Y., Yang, H., Zhang, T., Sun, J., & Lou, K. (2014). Illumina-based analysis of endophytic bacterial diversity and space-time dynamics in sugar beet on the north slope of Tianshan mountain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(14), 6375-6385. doi:10.1007/s00253-014-5720-9

Shidore, T., Dinse, T., Öhrlein, J., Becker, A., & Reinhold-Hurek, B. (2012). Transcriptomic analysis of responses to exudates reveal genes required for rhizosphere competence of the endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Environmental Microbiology*, 14(10), 2775-2787. doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02777.x

Silva, M. C., Polonio, J. C., Quecine, M. C., Almeida, T. T., Bogas, A. C., Pamphile, J. A., . . . Azevedo, J. L. (2016). Endophytic cultivable bacterial community obtained from the *Paullinia cupana* seed in Amazonas and Bahia regions and its antagonistic effects against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Microbial Pathogenesis*, 98, 16-22. doi:10.1016/j.micpath.2016.06.023

Singh, G. G. (2015). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 07(02). doi:10.4172/1948-5948.1000188

Šišić, A., Baćanović, J., & Finckh, M. R. (2016). Endophytic *Fusarium equiseti* stimulates plant growth and reduces root rot disease of pea (*Pisum sativum* L.) caused by *Fusarium avenaceum* and *Peyronellaea pinodella*. *European Journal of Plant Pathology*, 148(2), 271-282. doi:10.1007/s10658-016-1086-4

Smith, A.C., & Hussey M.A.(2005). Gram stain protocols.

Soliman, S. S., & Raizada, M. N. (2013). Interactions between Co-Habiting fungi Elicit Synthesis of Taxol from an Endophytic Fungus in Host *Taxus* Plants. *Frontiers in Microbiology*, 4. doi:10.3389/fmicb.2013.00003

Sørensen J, Sessitsch A. Plant-associated bacteria lifestyle and molecular interactions. In: van Elsas, J.D. et al., (eds) *Modern Soil Microbiology*, 2nd edn, CRC Press, 2006, 211–236.

Souza, R. D., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, 38(4), 401-419. doi:10.1590/s1415-475738420150053

Spaepen, S., & Vanderleyden, J. (2010). Auxin and Plant-Microbe Interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(4). doi:10.1101/cshperspect.a001438

Starakis, I., Siagris, D., Leonidou, L., Mazokopakis, E., Tsamandas, A., & Karatza, C. (2006). Hepatitis caused by the herbal remedy *Teucrium polium* L. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 18(6), 681-683. doi:10.1097/00042737-200606000-00016

Steinrücken, T. V., Bissett, A., Powell, J. R., Raghavendra, A. K., & Klinken, R. D. (2015). Endophyte community composition is associated with dieback occurrence in an invasive tree. *Plant and Soil*, 405(1-2), 311-323. doi:10.1007/s11104-015-2529-y

Stone JK, Bacon CW, White J. 2000. An overview of endophytic microbes: endophytism defined, p 3–29. In Bacon CW, White J (ed), *Microbial endophytes*. Taylor & Francis, New York, NY. Schulz B, Boyle C: The endophytic continuum. *Mycol Res* 2005, 109:661-686.

Strobel, G., & Daisy, B. (2003). *Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products*.

*Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 491-502. doi:10.1128/mmbr.67.4.491-502.2003

Sukumar, P., Legué, V., Vayssières, A., Martin, F., Tuskan, G. A., & Kalluri, U. C. (2012). Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant-microorganism interactions. *Plant, Cell & Environment*, 36(5), 909-919. doi:10.1111/pce.12036

Sánchez-Fernández, R. E., Díaz, D., Duarte, G., Lappe-Oliveras, P., Sánchez, S., & Macías-Rubalcava, M. L. (2015). Antifungal Volatile Organic Compounds from the Endophyte *Nodulisporium* sp. Strain GS4d2II1a: a Qualitative Change in the Intraspecific and Interspecific Interactions with *Pythium aphanidermatum*. *Microbial Ecology*, 71(2), 347-364. doi:10.1007/s00248-015-0679-3

Taghavi, S., Garafola, C., Monchy, S., Newman, L., Hoffman, A., Weyens, N., . . . Lelie, D. V. (2008). Genome Survey and Characterization of Endophytic Bacteria Exhibiting a Beneficial Effect on Growth and Development of Poplar Trees. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(3), 748-757. doi:10.1128/aem.02239-08

Taghavi, S., Lelie, D. V., Hoffman, A., Zhang, Y., Walla, M. D., Vangronsveld, J., . . . Monchy, S. (2010). Genome Sequence of the Plant Growth Promoting Endophytic Bacterium *Enterobacter* sp. 638. *PLoS Genetics*, 6(5). doi:10.1371/journal.pgen.1000943

Tan, D., Fu, L., Han, B., Sun, X., Zheng, P., & Zhang, J. (2015). Identification of an Endophytic Antifungal Bacterial Strain Isolated from the Rubber Tree and Its Application in the Biological Control of Banana *Fusarium* Wilt. *Plos One*, 10(7). doi:10.1371/journal.pone.0131974

Tejesvi, M. V., Segura, D. R., Schnorr, K. M., Sandvang, D., Mattila, S., Olsen, P. B., . . . Pirttilä, A. M. (2013). An antimicrobial peptide from endophytic *Fusarium tricinctum* of *Rhododendron tomentosum* Harmaja. *Fungal Diversity*, 60(1), 153-159. doi:10.1007/s13225-013-0227-8

Tengerdy, R. P., & Szakács, G. (1998). Perspectives in agrobiotechnology. *Journal of Biotechnology*, 66, 91-99.

Terhonen, E., Sipari, N., & Asiegbu, F. O. (2016). Inhibition of phytopathogens by fungal root endophytes of Norway spruce. *Biological Control*, 99, 53-63. doi:10.1016/j.biocontrol.2016.04.006

Thomas, P., & Sekhar, A. C. (2014). Live cell imaging reveals extensive intracellular cytoplasmic colonization of banana by normally non-cultivable endophytic bacteria. *AoB PLANTS*, 6(0). doi:10.1093/aobpla/plu002

Thomas, P., Sekhar, A. C., & Shaik, S. P. (2017). High taxonomic diversity of cultivation-recalcitrant endophytic bacteria in grapevine field shoots, their in vitro introduction, and unsuspected persistence. *Planta*, 246(5), 879-898. doi:10.1007/s00425-017-2733-5

Tian, B., Yang, J., & Zhang, K. (2007). Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects. *FEMS Microbiology Ecology*, 61(2), 197-213. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00349.x

Tian, B., Zhang, C., Ye, Y., Wen, J., Wu, Y., Wang, H., . . . Zhang, K. (2017). Beneficial traits of bacterial endophytes belonging to the core communities of the tomato root microbiome. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 247, 149-156. doi:10.1016/j.agee.2017.06.041

Tremouillaux-Guiller, J., Rohr, T., Rohr, R., & Huss, V. A. (2002). Discovery of an endophytic alga in *Ginkgo biloba*. *American Journal of Botany*, 89(5), 727-733. doi:10.3732/ajb.89.5.727

Truyens, S., Weyens, N., Cuypers, A., & Vangronsveld, J. (2014). Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants. *Environmental Microbiology Reports*, 7(1), 40-50. doi:10.1111/1758-2229.12181

Turner, T. R., James, E. K., & Poole, P. S. (2013). The plant microbiome. *Genome Biology*, 14(6). doi:10.1186/gb-2013-14-6-209

Tyc, O., Song, C., Dickschat, J. S., Vos, M., & Garbeva, P. (2017). The Ecological Role of Volatile and Soluble Secondary Metabolites Produced by Soil Bacteria. *Trends in Microbiology*, 25(4), 280-292. doi:10.1016/j.tim.2016.12.002

Vadassery, J., Ritter, C., Venus, Y., Camehl, I., Varma, A., Shahollari, B., . . . Oelmüller, R. (2008). The Role of Auxins and Cytokinins in the Mutualistic Interaction Between *Arabidopsis* and *Piriformospora indica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(10), 1371-1383. doi:10.1094/mpmi-21-10-1371

Vallet, M., Vanbellingen, Q. P., Fu, T., Caer, J. L., Della-Negra, S., Touboul, D., . . . Prado, S. (2017). An Integrative Approach to Decipher the Chemical Antagonism between the Competing Endophytes *Paraconiothyrium variabile* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Natural Products*, 80(11), 2863-2873. doi:10.1021/acs.jnatprod.6b01185

Van Overbeek, L. S., & Saikkonen, K. (2016). Impact of Bacterial–Fungal Interactions on the Colonization of the Endosphere. *Trends in Plant Science*, 21(3), 230-242. doi:10.1016/j.tplants.2016.01.003

Van Overbeek, L., & van Elsas, J. D. (2008). Effects of plant genotype and growth stage on the structure of bacterial communities associated with potato (*Solanum tuberosum* L.). *FEMS Microbiology Ecology*, 64(2), 283-296. doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00469.x

Vandenkoornhuyse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Van, A. L., & Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*, 206(4), 1196-1206. doi:10.1111/nph.13312

Varanda, C. M., Oliveira, M., Materatski, P., Landum, M., Clara, M. I., & Félix, M. D. (2016). Fungal endophytic communities associated to the phyllosphere of grapevine cultivars under different types of management. *Fungal Biology*, 120(12), 1525-1536. doi:10.1016/j.funbio.2016.08.002

Venieraki, A., Tsalgatidou, P., Georgakopoulos, D., Dimou, M., & Katinakis, P. (2016). Swarming motility in plant-associated bacteria. *Hellenic Plant Protection Journal*, 9(1). doi:10.1515/hppj-2016-0002

Venieraki, A., Dimou, M., & Katinakis, P. (2017). Endophytic fungi residing in medicinal plants have the ability to produce the same or similar pharmacologically active secondary metabolites as their hosts. *Hellenic Plant Protection Journal*, 10(2). doi:10.1515/hppj-2017-0006

Verma, S. K., & White, J. F. (2017). Indigenous endophytic seed bacteria promote seedling development and defend against fungal disease in browntop millet (*Urochloa ramosa* L.). *Journal of Applied Microbiology*. doi:10.1111/jam.13673

Vilhelmsson, O., Sigurbjörnsdóttir, A., Grube, M., & Höfte, M. (2016). Are lichens potential natural reservoirs for plant pathogens? *Molecular Plant Pathology*, 17(2), 143-145. doi:10.1111/mpp.12344

Viterbo, A., & Horwitz, B. A. (n.d.). Mycoparasitism. *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi*, 676-693. doi:10.1128/9781555816636.ch42

Vorholt, J. A. (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 10(12), 828-840. doi:10.1038/nrmicro2910

Walker, T. S. (2003). Root Exudation and Rhizosphere Biology. *Plant Physiology*, 132(1), 44-51. doi:10.1104/pp.102.019661

Wang, W., Kusari, S., Sezgin, S., Lamshöft, M., Kusari, P., Kayser, O., & Spiteller, M. (2015). Hexacyclopeptides secreted by an endophytic fungus *Fusarium solani* N06 act as crosstalk molecules in *Narcissus tazetta*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(18), 7651-7662. doi:10.1007/s00253-015-6653-7

Wang, X., Yang, B., Wang, H., Yang, T., Ren, C., Zheng, H., & Dai, C. (2013). Consequences of antagonistic interactions between endophytic fungus and bacterium on plant growth and defense responses in *Atractylodes lancea*. *Journal of Basic Microbiology*, 55(5), 659-670. doi:10.1002/jobm.201300601

Wang, Y., Xu, L., Ren, W., Zhao, D., Zhu, Y., & Wu, X. (2012). Bioactive metabolites from

*Chaetomium globosum* L18, an endophytic fungus in the medicinal plant *Curcuma wenyujin*. *Phytomedicine*, 19(3-4), 364-368. doi:10.1016/j.phymed.2011.10.011

Waqas, M., Khan, A. L., Kamran, M., Hamayun, M., Kang, S., Kim, Y., & Lee, I. (2012). Endophytic Fungi Produce Gibberellins and Indoleacetic Acid and Promotes Host-Plant Growth during Stress. *Molecules*, 17(12), 10754-10773. doi:10.3390/molecules170910754

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697-703. doi:10.1128/jb.173.2.697-703.1991

Wilson, D. (1995). Endophyte: The Evolution of a Term, and Clarification of Its Use and Definition. *Oikos*, 73(2), 274. doi:10.2307/3545919

Woodward, S., & Boddy, L. (2008). Chapter 7 Interactions between saprotrophic fungi. *British Mycological Society Symposia Series Ecology of Saprotrophic Basidiomycetes*, 125-141. doi:10.1016/s0275-0287(08)80009-4

Yadav, A. (2017). Exploring the Potential of Endophytes in Agriculture: A Minireview. *Advances in Plants & Agriculture Research*, 6(4). doi:10.15406/apar.2017.06.00221

Yamamoto, N., & Bibby, K. (2014). Clustering of fungal community internal transcribed spacer sequence data obscures taxonomic diversity. *Environmental Microbiology*, 16(8), 2491-2500. doi:10.1111/1462-2920.12390

Yan, J., Broughton, S., Yang, S., & Gange, A. (2015). Do endophytic fungi grow through their hosts systemically? *Fungal Ecology*, 13, 53-59. doi:10.1016/j.funeco.2014.07.005

Yan, Y., Kuramae, E. E., Hollander, M. D., Klinkhamer, P. G., & Veen, J. A. (2016). Functional traits dominate the diversity-related selection of bacterial communities in the rhizosphere. *The ISME Journal*, 11(1), 56-66. doi:10.1038/ismej.2016.108

Yao, Y. Q., Lan, F., Qiao, Y. M., Wei, J. G., Huang, R. S., & Li, L. B. (2017). Endophytic fungi harbored in the root of *Sophora tonkinensis* Gapnep: Diversity and biocontrol potential against phytopathogens. *MicrobiologyOpen*, 6(3). doi:10.1002/mbo3.437

Zasloff, M. (2017). Pollen has a microbiome: implications for plant reproduction, insect pollination and human allergies. *Environmental Microbiology*, 19(1), 1-2. doi:10.1111/1462-2920.13661

Zhang, H. W., Song, Y. C., & Tan, R. X. (2006). Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports*, 23(5), 753. doi:10.1039/b609472b

Zhang, Q., Zhang, J., Yang, L., Zhang, L., Jiang, D., Chen, W., & Li, G. (2014). Diversity and biocontrol potential of endophytic fungi in *Brassica napus*. *Biological Control*, 72, 98-108. doi:10.1016/j.biocontrol.2014.02.018

Zhao, L., Xu, Y., Lai, X., Shan, C., Deng, Z., & Ji, Y. (2015). Screening and characterization of endophytic *Bacillus* and *Paenibacillus* strains from medicinal plant *Lonicera japonica* for use as potential plant growth promoters. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(4), 977-989. doi:10.1590/s1517-838246420140024

Zhao, Y., Selvaraj, J. N., Xing, F., Zhou, L., Wang, Y., Song, H., . . . Liu, Y. (2014). Antagonistic Action of *Bacillus subtilis* Strain SG6 on *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE*, 9(3). doi:10.1371/journal.pone.0092486

Zouari, I., Jlaiel, L., Tounsi, S., & Trigui, M. (2016). Biocontrol activity of the endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* strain CEIZ-11 against *Pythium aphanidermatum* and purification of its bioactive compounds. *Biological Control*, 100, 54-62. doi:10.1016/j.biocontrol.2016.05.012

Zuck, K. M., Shipley, S., & Newman, D. J. (2011). Induced Production of N-Formyl Alkaloids from *Aspergillus fumigatus* by Co-culture with *Streptomyces peuceitius*. *Journal of Natural Products*, 74(7),

1653-1657. doi:10.1021/np200255f

<http://www.fao.org/3/a-I7695e.pdf>