

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΥΠΟΔΟΜΩΝ
& ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

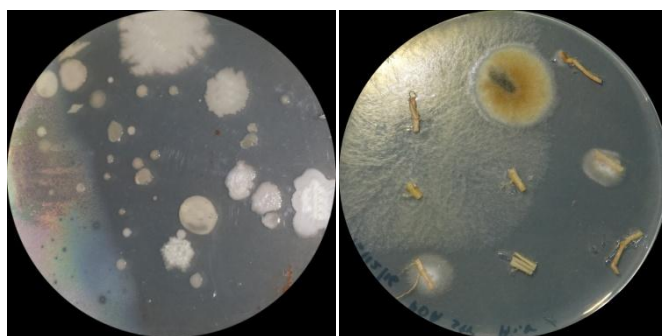
Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας

Π.Μ.Σ ΑΓΡΟΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Απομόνωση και χαρακτηρισμός ενδοφυτικών
μικροοργανισμών από το *Hypericum hircinum*

Αγγελική Σ. Δάβαρη



Αθήνα, 2018

Επιβλέπων καθηγητής: Κατινάκης Παναγιώτης

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 *Hypericum hircinum*

Αγγελική Σ. Δάβαρη

Αθήνα, 2018

Επιβλέπων καθηγητής: Κατινάκης Παναγιώτης

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Απομόνωση και χαρακτηρισμός ενδοφυτικών
μικροοργανισμών από το *Hypericum hircinum*

Αγγελική Σ. Δάβαρη

Επιβλέπων καθηγητής: Κατινάκης Παναγιώτης

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Καθηγητής Παναγιώτης Κατινάκης (Επιβλέπων)

Αναπληρωτής Καθηγητής Γεώργιος Ζερβάκης (Μέλος)

Επίκουρη Καθηγήτρια Μαρία Δήμου (Μέλος)

Περίληψη

Τα φαρμακευτικά φυτά είναι γνωστό πως αποτελούν ξενιστές πλήθους ενδοφυτικών μικροοργανισμών, εκ των οποίων πολλοί είναι παραγωγοί σημαντικών βιοενεργών μεταβολιτών. Στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη ενδοφυτικά βακτήρια και μύκητες απομονώθηκαν από επιφανειακά αποστειρωμένα φύλλα και ρίζα του φαρμακευτικού φυτού *Hypericum hircinum*. Από 100 βακτηριακές απομονώσεις, 18 επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη με βάση την *in vitro* ανταγωνιστικότητά τους έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani*. Από 50 ενδοφυτικούς μύκητες, έγινε επιλογή 14 απομονώσεων για περαιτέρω χαρακτηρισμό, η οποία βασίστηκε σε διακριτές μορφολογικές διαφορές.

Τα ενδοφυτικά βακτήρια χαρακτηρίστηκαν με βάση τις 16s rDNA αλληλουχίες τους, ενώ οι ενδοφυτικοί μύκητες με βάση των ITS rDNA αλληλουχιών τους. Τα βακτήρια χαρακτηρίστηκαν ως *Bacillus* sp., *B.subtilis*, *B.cereus*, *B. amyloliquefaciens* και *B.licheniformis*. Όσον αφορά τους ενδοφυτικούς μύκητες, το κυρίαρχο είδος στα φύλλα ανήκει στο γένος *Alternaria*, ενώ στον ριζικό ιστό παρατηρείται μεγαλύτερη ποικιλία ενδοφυτικών μυκήτων, όπως *Alternaria* spp., *Pyrenochaeta* sp., *Acrocalymma vagum* και *Macrophomina phaseolina*.

Η ανταγωνιστική ικανότητα των ενδοφυτικών βακτηρίων και μυκήτων μελετήθηκε έναντι των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *raphani* και *Botrytis cinerea* με τη μέθοδο της διπλής καλλιέργειας. Η πλειοψηφία των ενδοφυτικών βακτηρίων έδειξαν ανταγωνισμό έναντι των φυτοπαθογόνων με τον σχηματισμό μιας ζώνης παρεμπόδισης. Οι ενδοφυτικοί μύκητες έδειξαν ανταγωνιστική δραστηριότητα μέσω της επαφής, του σχηματισμού ζώνης παρεμπόδισης και της ανάπτυξης του ενός μύκητα πάνω στον άλλον. Τα βακτήρια μελετήθηκαν, επίσης για την ικανότητα ομαδικής κίνησης, αλλά και για παράγοντες που προωθούν την ανάπτυξη του φυτικού οργανισμού, όπως η διαλυτοποίηση του φωσφόρου και η παραγωγή σιδηροφόρων.

Λέξεις κλειδιά: φαρμακευτικά φυτά, ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί, ανταγωνιστική δραστηριότητα, *Hypericum Hircinum*

Summary

Medicinal plants are known to harbour endophytic fungi and bacteria with some of them being the producers of important bioactive metabolites. In the present study endophytic bacteria and fungi were isolated from surfaced sterilized leaves and roots of the medicinal plant *Hypericum hircinum*. From a total of 100 bacterial isolates, 18 isolates were selected for further studies based on their ability to show antagonistic *in vitro* activity against the fungal phytopathogens *Rhizoctonia solani*. The selection of endophytic fungi was based on visible morphological differences, and from the total 50 isolates, 14 isolates were selected for further characterization.

Selected bacterial and fungal isolates were identified based on 16S rRNA gene and ITS region analysis, respectively. All of the bacterial isolates grouped into *Bacillus* genus. The selected bacterial isolates belong to *Bacillus* sp., *B.subtilis*, *B.cereus*, *B. amyloliquefaciens* and *B.licheniformis* species. The dominant endofungal species in leaves was *Alternaria* sp. whereas roots were colonized by a more diverse fungal community composed of *Alternaria* spp., *Pyrenochaeta* sp., *Acrocalymma vagum* and *Macrophomina phaseolina*.

The antagonistic ability of the selected bacteria and fungi was studied against the fungal phytopathogens *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *raphani* and *Botrytis cinerea* were evaluated using the dual-culture technique. The majority of the bacterial isolates showed antagonism mainly through formation of inhibition zone. The fungi showed antagonistic activity through contact, inhibition zone and overgrowth. The selected bacteria were also evaluated for the presence of traits involved in plant colonization (swarming motility) and plant growth promotion (production of siderophores and phosphate solubilization).

Key words: medicinal plants, endophytic microorganisms, antagonistic ability, *Hypericum hircinum*

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη με θέμα ‘‘Απομόνωση και χαρακτηρισμός των ενδοφυτικών μικροοργανισμών από το *Hypericum Hircinum*’’ πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Θα επιθυμούσα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε ένα σύνολο ατόμων, που με στήριξε και με βοήθησε καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας εργασίας.

Αρχικά, εκφράζω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή κ. Παναγιώτη Κατινάκη, που μου έδωσε την ευκαιρία να συνεργαστώ με τον ίδιο και εξαιρετους συναδέλφους υπό την επίβλεψή του, στο εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας. Θα ήθελα ακόμα να τον ευχαριστήσω για τις γνώσεις που μου μετέδωσε, καθώς επίσης και για την καθοδήγηση και την εκπαίδευση που μου παρείχε. Τέλος, εκφράζω τις ευχαριστίες μου στο πρόσωπό του για την στήριξη που μου παρείχε τόσο εργαστηριακά, όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας διατριβής.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Αναπληρωτή καθηγητή κ. Γεώργιο Ζερβάκη και την Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Μαρία Δήμου για τη βοήθεια, την καθοδήγηση και τις συμβουλές που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια της συγγραφής της παρούσας εργασίας.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτωρ Ειρήνη- Ευαγγελία Θωμλούδη για την άριστη συνεργασία και την στήριξη που μου παρείχε σε όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος. Επίσης, ευχαριστίες εκφράζω στους υποψήφιους διδάκτορες κα. Δήμητρα Δούκα, κ. Τάσο Σπαντίδο και κα. Πωλίνα Τσαλγατίδου, καθώς και την δρ. Αναστασία Βενιεράκη για την συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα στο εργαστήριο.

Επίσης, ευχαριστώ το εργαστήριο Φυτοπαθολογίας για την παραχώρηση των φυτοπαθογόνων μυκήτων που χρησιμοποίησα στην μελέτη μου.

Τέλος, ευχαριστώ το οικείο περιβάλλον μου για τη στήριξη που μου παρέχει σε κάθε μου απόφαση.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	4
Summary.....	5
Ευχαριστίες.....	6
1 Εισαγωγή	9
1.1 Η γεωργία σήμερα.....	9
1.2 Φυτικό μικροβίωμα.....	9
1.3 Μικροοργανισμοί που προωθούν την ανάπτυξη των φυτών	10
1.4 Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί.....	10
1.5 Ταξινομική σύσταση των ενδόφυτων	10
1.6 Αποικισμός του φυτού από ενδόφυτα	12
1.7 Κατηγοριοποίηση των ενδόφυτων	12
1.8 Μηχανισμοί προαγωγής της ανάπτυξης των φυτών	14
1.9 Η επίδραση των ωφέλιμων μικροβίων στην ανάπτυξη του φυτού.....	14
1.10 Η επίδραση των ωφέλιμων μικροβίων στην πρόσληψη θρεπτικών συστατικών ..	14
1.11 Η επίδραση των ωφέλιμων μικροβίων στην αντοχή των φυτών σε αβιοτικές καταπονήσεις	16
1) Αλατότητα.....	16
2) Ξηρασία.....	16
3) Ψύχος	17
1.12 Οι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί ως παράγοντες βιολογικού ελέγχου	17
1.13 Τα ενδόφυτα των φαρμακευτικών φυτών.....	18
1.14 Το φαρμακευτικό φυτό <i>Hypericum hircinum</i>	18
1.15 Βιολογική δράση	19
1.16 Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί στα διάφορα είδη του <i>Hypericum</i>	21
2 Σκοπός της μελέτης	21
3 Υλικά και μέθοδοι.....	22
3.1 Φυτικό υλικό	22
3.2 Διαδικασία επιφανειακής απολύμανσης.....	22
3.3 Απομόνωση ενδοφυτικών μικροοργανισμών.....	23
3.3.1 Βακτήρια.....	23
3.3.2 Μύκητες	24
3.4 Επιλογή ενδοφυτικών μικροοργανισμών	24
3.4.1 Βακτήρια.....	24

3.4.2	Μύκητες	25
3.5	Οπτική μικροσκοπία.....	25
3.5.1	Βακτήρια.....	26
3.5.2	Μύκητες	27
3.6	Αλληλεπίδραση ενδοφυτικών μικροοργανισμών με φυτοπαθογόνους μύκητες ..	27
3.6.1	Προέλευση φυτοπαθογόνων μυκήτων	27
3.6.2	Βακτήρια.....	27
3.6.3	Μύκητες	28
3.7	Απομόνωση ολικού γονιδιωματικού υλικού (DNA).....	29
3.7.1	Βακτήρια.....	29
3.7.2	Μύκητες	30
3.8	Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊκών οξέων (DNA)	31
3.9	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR).....	31
3.9.1	Βακτήρια- Ενίσχυση του τμήματος 16S rRNA	32
	Μύκητες- Ενίσχυση του τμήματος ITS rRNA	33
3.10	Ηλεκτροφορηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτη αγαρόζης	34
3.11	Καθαρισμός προϊόντος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.....	35
3.12	In silico ανάλυση των αλληλουχιών	36
3.13	Έλεγχος χαρακτηριστικών των βακτηρίων.....	36
3.13.1	Ικανότητα ομαδικής κίνησης σε επιφάνεια (swarming motility).....	36
3.13.2	Χαρακτηριστικά προαγωγής της ανάπτυξης του φυτού (PGP traits)	37
3.14	Αλληλεπιδράσεις ενδοφυτικών μυκήτων μεταξύ των ίδιων ατόμων	38
4	Αποτελέσματα	39
4.1	Απομόνωση και χαρακτηρισμός ενδοφυτικών βακτηρίων από το φυτό <i>Hypericum hircinum</i>	39
4.1.1	Απομόνωση ενδοφυτικών βακτηρίων	39
4.1.2	Χαρακτηρισμός ενδοφυτικών βακτηρίων	40
4.2	Απομόνωση και χαρακτηρισμός ενδοφυτικών μυκήτων φυτού <i>Hypericum hircinum</i> 54	
4.2.1	Απομόνωση ενδοφυτικών μυκήτων.....	54
4.2.2	Χαρακτηρισμός ενδοφυτικών μυκήτων	57
5	Συζήτηση	69
6	Βιβλιογραφία.....	72

1 Εισαγωγή

1.1 Η γεωργία σήμερα

Η γεωργία, μια από τις παλαιότερες ανθρώπινες δραστηριότητες, εξελίχθηκε σε μια εντατική παραγωγική διαδικασία που επέφερε τη μείωση πολλών καλλιεργούμενων φυτικών ειδών, καθώς και τη συνεχώς μεγαλύτερη εξάρτηση του παραγωγού από πάσης φύσεως εισροές, πολλές από τις οποίες είναι ιδιαίτερα επικίνδυνες.

Τα τελευταία 60 χρόνια οι γεωργικές πρακτικές φυτοπροστασίας και βελτίωσης της παραγωγής στηρίζονται κατά κύριο λόγο σε χημικά φυτοπροστατευτικά προϊόντα (όπως εντομοκτόνα, νηματοδοκτόνα κ.α), καθώς και σε χημικά λιπάσματα. Η ανησυχία που προέκυψε για τις επιπτώσεις της χρήσης χημικών ουσιών τόσο στο περιβάλλον, όσο και στην υγεία του ανθρώπου οδηγεί με ταχείς ρυθμούς στην ανάγκη εύρεσης εναλλακτικών τρόπων βελτίωσης της αγροτικής παραγωγής.

Η αξιοποίηση των μικροοργανισμών που σχετίζονται με τα φυτά δείχνει να κερδίζει συνεχώς έδαφος στον αγροτικό τομέα, μιας και η ανάγκη για βιολογική αντιμετώπιση ασθενειών και φυσικών εχθρών είναι υψίστης σημασίας (Glick et al., 2014).

1.2 Φυτικό μικροβίωμα

Τα φυτά, όπως και κάθε ανώτερος οργανισμός, αποικίζονται από ποικίλες μικροβιακές κοινότητες που αποτελούν το μικροβίωμα τους. Οι μικροοργανισμοί που απαρτίζουν το μικροβίωμα ενός φυτικού οργανισμού μπορεί να αποικίζουν είτε την επιφάνεια του φυτικού ιστού (επιφυτικοί), είτε το εσωτερικό (ενδοφυτικοί), είτε την περιοχή της ριζόσφαιρας (ριζοσφαιρικοί) (Turner et al., 2013; Santoyo et al., 2016). Το έδαφος, κυρίως η περιοχή της ριζόσφαιρας, αποτελεί την κύρια ‘δεξαμενή’ προέλευσης των μικροοργανισμών που απαρτίζουν το φυτικό μικροβίωμα. Μικροοργανισμοί που σχετίζονται με τα φυτά μπορεί, επίσης, να προέρχονται από τον ατμοσφαιρικό αέρα αλλά και από σπόρο (Lebeis, 2014).

Η σύσταση του φυτικού μικροβιώματος εξαρτάται από την ηλικία του φυτικού οργανισμού, τις εδαφικές συνθήκες, τις ριζικές εκκρίσεις, το επίπεδο θρεπτικών συστατικών της ριζόσφαιρας, καθώς και τις κλιματικές συνθήκες (Berg & Smalla, 2009; Lundberg et al., 2012; Andreolli et al., 2016; Jia et al., 2016). Αξίζει να σημειωθεί πως κάθε φυτικός οργανισμός μπορεί να έχει διαφορετικό φυτικό μικροβίωμα, ακόμα κι αν βρίσκεται στο ίδιο οικοσύστημα (Lebeis, 2014).

1.3 Μικροοργανισμοί που προωθούν την ανάπτυξη των φυτών

Μικροοργανισμοί που αποικίζουν την περιοχή της ριζόσφαιρας, αλλά και το εσωτερικό των φυτών, φαίνεται πως διαδραματίζουν έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του φυτού, καθώς και στην αντοχή του έναντι βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης (Berg et al., 2015).

Ωφέλιμοι για τα φυτά είναι οι μικροοργανισμοί που προωθούν την ανάπτυξη των φυτών (Plant Growth Promoting Microorganisms, PGPMs) (Reddy & Saravanan, 2013). Οι ευεργετικές τους επιδράσεις αφορούν την βελτίωση της βλαστικότητας των σπόρων, την ανάπτυξη του ριζικού συστήματος αλλά και του υπέργειου μέρους του φυτού, τη βελτίωση της ανθοφορίας και της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας.

Μελέτες έχουν δείξει ότι ορισμένα στελέχη PGPMs προάγουν την ανάπτυξη των φυτών μέσω της παραγωγής ενώσεων, όπως είναι οι φυτομόνες και οι πτητικές ενώσεις (Harman et al., 2004; Naznin et al., 2013). Η προαγωγή της ανάπτυξης των φυτών είναι δυνατό να προκληθεί και από την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών, τη διαχείριση του αβιοτικού στρες καθώς και τον ανταγωνισμό με τα φυτοπαθογόνα (Wakelin et al., 2007; Hossain et al., 2014).

1.4 Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί

Οι μικροοργανισμοί που διαβιούν στο εσωτερικό του φυτικού οργανισμού χωρίς να προκαλούν συμπτώματα ασθένειας στον ξενιστή τους, αναφέρονται ως ενδόφυτα (Bacon & White, 2000). Τα ενδόφυτα εξαρτώνται από το φυτό ξενιστή τους για την θρέψη και προστασία τους. Οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί ορίζονται ως «commensals» όταν τρέφονται από τα θρεπτικά στοιχεία του φυτού χωρίς να έχουν θετική ή αρνητική επίδραση σε αυτό και άρα είναι ουδέτεροι (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 (Hardoim et al., 2015). Φαίνεται πως υπάρχει εξειδίκευση στη σχέση φυτού-ενδόφυτου, καθώς κάποια ενδόφυτα φαίνεται να αποκτούν συνεργιστική σχέση με συγκεκριμένο φυτικό είδος και όχι με άλλο (Hardoim et al., 2015).

1.5 Ταξινομική σύσταση των ενδόφυτων

Η εξέλιξη στην επιστήμη της μοριακής βιολογίας διευρύνει τους ορίζοντες όσον αφορά την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ φυτικού οργανισμού και μικροοργανισμών.

Οι νέες γενιές τεχνολογίες αλληλούχησης γονιδιώματος και η επιστήμη της Βιοπληροφορικής επιτρέπουν το χαρακτηρισμό μεγάλης ποικιλίας ενδοφυτικών μικροοργανισμών που προέρχονται από ευρύ φάσμα φυτικών οργανισμών.

Ο αριθμός των ενδοφυτικών βακτηριακών κυττάρων αγγίζει τα 10^4 - 10^8 βακτηριακά κύτταρα σε ένα γραμμάριο ριζικού ιστού, που είναι συγκριτικά λιγότερος με τον αριθμό στην περιοχή της ριζόσφαιρας (10^6 - 10^9 βακτηριακά κύτταρα/ γραμμάριο φυτικού ιστού), αλλά και της ευρύτερης εδαφικής περιοχής (10^6 - 10^9 βακτηριακά κύτταρα/ γραμμάριο εδάφους) (Bulgarelli et al., 2013). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει πως οι ρίζες λειτουργούν ως φίλτρα, που περιορίζουν ή επιτρέπουν την είσοδο συγκεκριμένων βακτηριακών κοινοτήτων (Bulgarelli et al., 2012).

Οι Hardoim 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 δένδροειδείς 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).

1.6 Αποικισμός του φυτού από ενδόφυτα

Τα φυτά έχουν τη δυνατότητα να “στρατολογήσουν” ωφέλιμα για εκείνα μικρόβια. Φαίνεται πως η περιοχή της ριζόσφαιρας αποτελεί τη δυναμικότερη δεξαμενή ωφέλιμων μικροοργανισμών και είναι αυτή που επηρεάζει τον μετέπειτα αποικισμό του φυτού. Οι ριζικές εκκρίσεις περιλαμβάνουν ποικίλες ενώσεις όπως οργανικά οξέα, αμινοξέα και πρωτεΐνες και έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν τη σύσταση των μικροβιακών κοινοτήτων (Badri & Vivanco, 2009).

Η είσοδος των μικροοργανισμών στους φυτικούς ιστούς πραγματοποιείται είτε από φυσικά ανοίγματα, όπως τα στομάτια των φύλλων, είτε από πληγές στους ιστούς που προκαλούνται από φυτοπαθογόνα ή από μηχανική τριβή (Sørensen & Sessits, 2006; Hardoim et al., 2008; Reinhold-Hurek & Hurek, 2011).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τον αποικισμό του εσωτερικού του φυτού αφορούν το γονότυπο (Marques et al., 2015; Rodriguez-Blanco et al., 2015), το στάδιο ανάπτυξής του (Ren et al., 2015a; Yu et al., 2015; de Almeida Lopes et al., 2016), το επίπεδο θρέψης του (Hameed et al., 2015), τις κλιματικές και εδαφικές συνθήκες (Edwards et al., 2015), αλλά και τις καλλιεργητικές συνθήκες (Edwards et al., 2015).

1.7 Κατηγοριοποίηση των ενδόφυτων

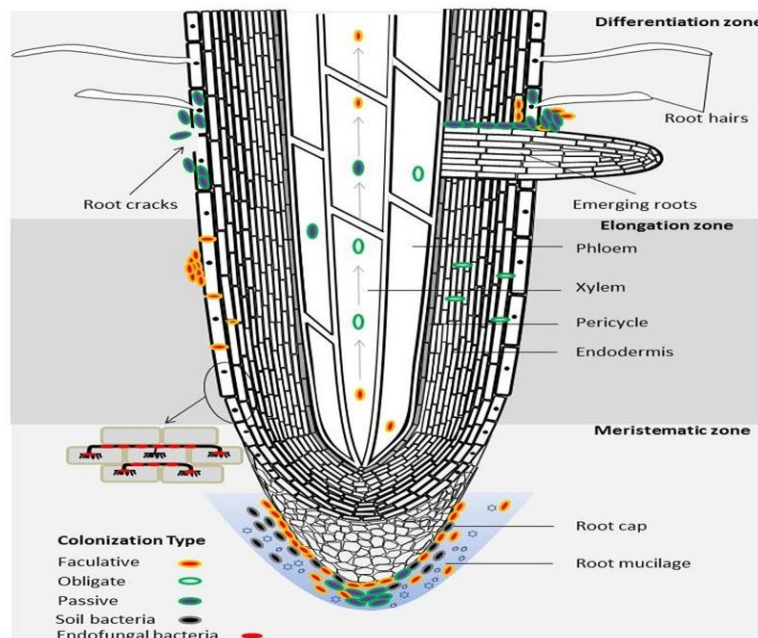
Ο αποικισμός του φυτού από ενδόφυτα μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε “υποχρεωτικό”, “ευκαιριακό” και “προαιρετικό”.

Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί που απαιτούν φυτικούς ιστούς για να ολοκληρώσουν το βιολογικό τους κύκλο ονομάζονται «υποχρεωτικά ενδόφυτα» ("obligate endophytes") (Hardoim et al., 2015)

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 των δύο αυτών κατηγοριών βρίσκεται η ομάδα, η οποία περιλαμβάνει την πλειοψηφία των ενδόφυτων, τα «προαιρετικά ενδόφυτα» («facultative endophytes»)

(Hardoim et al., 2015). Η ομάδα αυτή φαίνεται να χρησιμοποιεί το φυτό ως μέσο διάδοσης όταν οι συνθήκες το επιτρέπουν (Hardoim et al., 2012).



Εικόνα 3.1. Σχηματική απεικόνιση της ρίζας και του αποικισμού της από τα ενδόφυτα (Hongwei Liu et al., 2017)

Μία άλλη κατάταξη ενδόφυτων, και συγκεκριμένα 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.

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

1.8 Μηχανισμοί προαγωγής της ανάπτυξης των φυτών

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 οποιεσδήποτε συνθήκες (Ali et al., 2012; Santoyo et al., 2016) και να αλληλεπιδράσουν με το φυτό πιο αποτελεσματικά (Hardoim et al., 2008 ;Yadav, 2017).

1.9 Η επίδραση των ωφέλιμων μικροβίων στην ανάπτυξη του φυτού

Η παραγωγή φυτοορμονών είναι ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα των ενδοφυτικών βακτηρίων που προωθούν την ανάπτυξη του φυτικού οργανισμού και βελτιώνουν την αντοχή του κατά τη διάρκεια αβιοτικών καταπονήσεων (Pieterse et al., 2009). Γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες βιοσύνθεσης ινδολοξικού οξέους (IAA) (Zúñiga et al., 2013), κυτοκινινών (CKs) (Bhore et al., 2010) και γιββερελινών (GAs) (Shahzad et al., 2016) απαντώνται συνήθως στο γενετικό υλικό των ενδοφυτικών βακτηρίων και μυκήτων (Tian et al., 2015).

Για παράδειγμα, το ενδοφυτικό βακτηριακό στέλεχος *Sphingomonas* sp. *LK11* προκάλεσε την βελτίωση παραγωγής ντομάτας μέσω της παραγωγής GAs και IAA (Khan et al., 2014). Επιπροσθέτως, το βακτηριακό στέλεχος *S. mutabilis* *IA1* που απομονώθηκε από την περιοχή της Σαχάρα φάνηκε να έχει την ικανότητα παραγωγής IAA και GA3, ύστερα από τον εμβολιασμό του σε σπόρους σιταριού. Η εφαρμογή αυτή είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της προσβολής του φυτού από τον παθογόνο μύκητα *F. culmorum* (Toumatia et al., 2016). Οι μελέτες δείχνουν πως η παραγωγή φυτοορμονών από ενδοφυτικούς μικροοργανισμούς μπορεί να βελτιώσει την παραγωγή στη γεωργία.

1.10 Η επίδραση των ωφέλιμων μικροβίων στην πρόσληψη θρεπτικών συστατικών

Η ανάπτυξη του φυτού και η βελτίωση της παραγωγής είναι άρρηκτα συνδεδεμένες με την διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών στο εδαφικό διάλυμα γύρω από την περιοχή του ριζικού συστήματος.

Τα PGPMs είναι δυνατόν να επηρεάσουν τις διαδικασίες πρόσληψης θρεπτικών συστατικών από τα φυτά επηρεάζοντας τη διαθεσιμότητα μακροθρεπτικών και μικροθρεπτικών συστατικών στη ριζόσφαιρα. 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 συμπεριλαμβάνουν τα συμβιωτικά βακτήρια (ριζόβια) και τους 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).

Ο φώσφορος (P) είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη και την παραγωγικότητα των φυτών. Παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές φυσιολογικές δραστηριότητες όπως η κυτταρική διαίρεση, η φωτοσύνθεση και η ανάπτυξη του ριζικού συστήματος (Sharma et al., 2011). Ο φώσφορος βρίσκεται στο εδαφικό διάλυμα σε αδιάλυτη μορφή και καθίσταται αφομοιώσιμος από τα φυτά ύστερα από διαδικασίες διαλυτοποίησης, στις οποίες φαίνεται να συμμετέχουν εδαφικοί μικροοργανισμοί. Βακτήρια που διαλυτοποιούν το φωσφόρο ανήκουν στα γένη *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus* και *Serratia* (Richardson et al., 2009; Ramaekers et al., 2010).

Τέλος, ο σίδηρος (Fe) είναι ένα βασικό μικροθρεπτικό στοιχείο απαραίτητο για την ανάπτυξη των φυτών, το οποίο στο εδαφικό διάλυμα βρίσκεται κατά κύριο λόγο σε μη αφομοιώσιμη μορφή, ως τρισθενές κατίον. Οι μικροοργανισμοί έχουν εξελίξει μηχανισμούς για αφομοίωση σιδήρου όπως η παραγωγή σιδηροφόρων, δηλαδή χηλικών ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους (Neilsen, 1989). Τα σιδηροφόρα έχουν μελετηθεί τόσο για την άμεση, όσο και για την έμμεση προσφορά τους στον φυτικό οργανισμό, προμηθεύοντας το φυτό με σίδηρο ή στερώντας τον από φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς. Βακτήρια που έχουν την

ικανότητα παραγωγής σιδηροφόρων ανήκουν στα γένη *Aeromonas*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* και *Streptomyces* (Johnson et al., 2013; Radzki et al., 2013).

1.11 Η επίδραση των ωφέλιμων μικροβίων στην αντοχή των φυτών σε αβιοτικές καταπονήσεις

1) Αλατότητα

Όταν τα φυτά βρίσκονται υπό συνθήκες στρες, προκαλείται παραγωγή αιθυλενίου, γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο σε υψηλές συγκεντρώσεις. (Glick, 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-οξοβουτανοϊκό, προλαμβάνοντας τη σηματοδότηση του αιθυλενίου για την παρεμπόδιση της φυτικής ανάπτυξης (Glick et al., 2014). Η παραγωγή ACC απαμινάσης είναι ο πιο αποτελεσματικός μηχανισμός των ωφέλιμων μικροοργανισμών για να μειώσουν τις αρνητικές περιβαλλοντικές επιδράσεις που δέχονται οι φυτικοί οργανισμοί (Glick, 2014).

2) Ξηρασία

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει πως οι μεταχειρίσεις με ωφέλιμα μικρόβια μεταβάλλουν την αρχιτεκτονική του ριζικού συστήματος (Kloepper, 1992; Kloepper et al., 2004; Ngumbi, 2011). Οι αλλαγές της αρχιτεκτονικής του ριζικού συστήματος οδηγούν σε αύξηση της συνολικής επιφάνειας της ρίζας, και συνεπώς σε βελτίωση της πρόσληψης νερού και θρεπτικών ουσιών με θετικές επιδράσεις στο σύνολο της ανάπτυξης των φυτών (Somers et al., 2004; Timmusk et al., 2014).

Σε μελέτη των Naseem και Bano (2014) σπόροι καλαμποκιού εμβολιάστηκαν με το βακτηριακό στέλεχος *Alcaligenes faecalis* (AF3). Τρεις εβδομάδες μετά τη φύτευση, τα εμβολιασμένα φυτά σε συνθήκες ξηρασίας παρουσίασαν 10% βελτίωση ανάπτυξης της ρίζας, έναντι των μη εμβολιασμένων. Σε μελέτη των Naveed και συνεργατών (2014) αναφέρεται πως φυτά καλαμποκιού που εμβολιάστηκαν με το βακτηριακό στέλεχος *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN σημειώθηκε σημαντική αύξηση της βιομάζας της ρίζας κατά 70% και 58% στις ποικιλίες *Mazurka* και *Kaleo* αντίστοιχα. Παρόμοια συμπεριφορά σε συνθήκες στρες έδειξαν τα φυτά όταν εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *Enterobacter* sp. FD και συγκεκριμένα παρατηρήθηκε αύξηση της βιομάζας της ρίζας κατά 47% στην ποικιλία *Mazurka* και 40% στην *Kaleo*. Σύμφωνα με τους ερευνητές η αύξηση της βιομάζας της ρίζας οδήγησε στη βελτίωση πρόσληψης νερού στα φυτά σε συνθήκες ξηρασίας. Στο ίδιο

συμπέρασμα κατέληξαν σε μελέτη τους και οι Yasmin και συνεργάτες (2013), οι οποίοι εμβολίασαν φυτά καλαμποκιού σε συνθήκες ξηρασίας με το στέλεχος 9K και παρατήρησαν αύξηση της ρίζας κατά 43,3%. Οι Timmusk και συνεργάτες (2014) παρατήρησαν πως κατά τη διάρκεια ξηρικών συνθηκών, φυτά καλαμποκιού που εμβολιάστηκαν με *Bacillus thuringiensis* AZP2 σημείωσαν τρεις φορές μεγαλύτερη ανάπτυξη ριζικών τριχιδίων και πλευρικών ριζών, συγκριτικά με τα μη εμβολιασμένα φυτά.

3) Ψύχος

Σημειώνονται όλο και περισσότερες μελέτες που αφορούν την επαγωγή της φυτικής αντοχής στο ψύχος από ωφέλιμους μικροοργανισμούς. Φυτά ντομάτας που εμβολιάστηκαν με τα ενδοφυτικά βακτήρια *Pseudomonas vancoverensis* OB155 και *P. Frederiksborgensis* OS261 έδειξαν να είναι ικανά να ανταπεξέλθουν σε θερμοκρασίες 10°-12° C (Subramanian et al., 2015). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μείωση της καταστροφής των κυτταρικών μεμβρανών και βελτίωση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας συγκριτικά με αυτή των μη εμβολιασμένων φυτών. Επιπλέον, εμφανίζεται επαγωγή των γονιδίων που αφορούν την αντοχή στο ψύχος (LeCBF1 and LeCBF3). Παρόμοιο αποτέλεσμα σημειώθηκε σε φυτά *Arabidopsis thaliana*, όπου ύστερα από εμβολιασμό με το ενδόφυτο *Burkholderia phytofirmans* PsJN παρατηρήθηκε αύξηση της ανάπτυξης των φυτών και ενίσχυση των κυτταρικών τοιχωμάτων τους, που οδηγεί τελικά στη ανθεκτικότητα του φυτού έναντι των χαμηλών θερμοκρασιών (Su et al., 2015).

1.12 Οι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί ως παράγοντες βιολογικού ελέγχου

Οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί κερδίζουν συνεχώς έδαφος στη γεωργία όσο αφορά τον έλεγχο των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών, αφού αποικίζουν το ίδιο περιβάλλον (Santoyo et al., 2016). Οι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί μπορούν να επιτύχουν την καταπολέμηση των φυτοπαθογόνων, είτε άμεσα με αναστολή της ανάπτυξης τους, είτε έμμεσα, μέσω της ενίσχυσης του ανοσοποιητικού συστήματος του φυτικού οργανισμού. Η άμεση αναστολή των παθογόνων προκαλείται κυρίως από τη σύνθεση ανασταλτικών ουσιών όπως τα αντιβιοτικά, το υδροκυάνιο (HCN), οι χηλικές ενώσεις σιδήρου και οι αντιμυκητιακοί μεταβολίτες (Compant et al., 2010). Ένας άλλος τρόπος αναστολής της δράσης των φυτοπαθογόνων είναι η ικανότητά τους να διακόπτουν την επικοινωνία μεταξύ των παθογόνων (Quorum Sensing, QS), ύστερα από υποβάθμιση της σηματοδότησης των αυτο-επαγωγέων (autoinducers) (Miller & Bassler, 2001).

Η παραγωγή αντιβιοτικών ενώσεων από ενδοφυτικούς μικροοργανισμούς αποτελεί μια πρακτική προστασίας των φυτών από τα φυτοπαθογόνα (Brader et al., 2014).

Ενδοφυτικά βακτήρια των γενών *Bacillus* και *Pseudomonas* παράγουν αντιβιοτικές ενώσεις όπως οι *subtilin*, *subtilosin A*, *Tas A* και *sublancin* (Loper & Gross, 2007; Raaijmakers et al., 2010). Επίσης, οι ενδοφυτικοί μύκητες είναι γνωστοί για την ικανότητα τους να παράγουν ενώσεις που παρεμποδίζουν την ανάπτυξη επιβλαβών οργανισμών, όπως είναι τα λιποπεπτίδια (Higginbotham et al., 2013; Tejesvi et al., 2013; Egan et al., 2016). Τέλος, έχειδειχθεί πως η παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων από τα ενδόφυτα μπορεί να επαχθεί παρουσία του παθογόνου οργανισμού (Combès et al., 2012).

Το πρόβλημα που παρουσιάζει ο βιολογικός έλεγχος παθογόνων με αντιμικροβιακές ενώσεις είναι η πιθανή ανθεκτικότητα που μπορεί να αποκτήσουν οι παθογόνοι οργανισμοί λόγω της αυξημένης χρήσης αυτών των στελεχών. Για να αποφευχθεί αυτό το γεγονός οι ερευνητές χρησιμοποιούν στελέχη που παράγουν περισσότερα από ένα αντιβιοτικά (Glick et al., 2012). Γενικώς, ωστόσο, προτιμούνται μικροοργανισμοί που παρουσιάζουν ευρύτερο φάσμα δράσης εναντίον επιβλαβών οργανισμών.

1.13 Τα ενδόφυτα των φαρμακευτικών φυτών

Οι ιδιότητες των φαρμακευτικών φυτών έχουν μελετηθεί από πολλούς ερευνητές παγκοσμίως (Tanaka et al., 2006).

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). 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). Οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί αυτοί φαίνεται να έχουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ωφέλιμοι μικροοργανισμοί για καλλιεργούμενα φυτά (Köberl et al., 2013; Alvin et al., 2014; Egamberdieva et al., 2017).

1.14 Το φαρμακευτικό φυτό *Hypericum hircinum*

Το γένος *Hypericum* αριθμεί περίπου 400 είδη και ανήκει στην οικογένεια *Clusiaceae*, η οποία ονομάζεται και *Hypericaceae* διότι τα περισσότερα φυτά της ανήκουν στο συγκεκριμένο γένος. Το συγκεκριμένο γένος απαντάται σχεδόν σε όλο τον κόσμο με εξαίρεση τροπικές περιοχές, ερήμους και αρκτικές περιοχές. Τα είδη του γένους μπορεί να αποτελούνται από μικρά ετήσια φρυγανώδη φυτά ύψους 5-10 cm, θάμνους, αλλά και δέντρα που φτάνουν τα 12 m ύψος. Τα φύλλα τους εκφύονται αντιδιαμετρικά, είναι σχήματος οβάλ, μήκους 1-8 cm και χρώματος πράσινου. Τα λουλούδια τους αποτελούνται από 5 (σπάνια 4) πέταλα μήκους 0,5-6 cm και χρώματος κίτρινου. Ο καρπός συνήθως είναι στεγνή κάψουλα

που διασπάται και απελευθερώνει πάρα πολλούς μικρούς σπόρους. Σε μερικά είδη ο καρπός είναι φρουτώδης σαν μούρο.

Τα είδη του γένους *Hypericum* είναι γνωστά για τις φαρμακευτικές τους ιδιότητες. Πολλά από αυτά τα είδη παράγουν ένα ευρύ φάσμα πολύτιμων ενώσεων, κυρίως ναφθοδιανθρόνες (υπεरिकίνη και ψευδοϋπερικίνη), φλορογλουκινόλες (υπερφορίνη και *adhyperforin*), φλαβονοειδή (*hyperoside*, *rutin* ή *quercitrin*), ξανθόνες και αιθέρια έλαια που σχετίζονται με αντι-ιικές, αντινεοπλασματικές, νευροπροστατευτικές, αντιοξειδωτικές και αντικαταθλιπτικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα, η φαρμακολογική δράση των εκχυλισμάτων του καθορίζεται πλασματικά από τη συγκέντρωση των κύριων και χαρακτηριστικών συστατικών του φυτού, τις υπερικίνες. Οι κοκκινοχρωματισμένες ναφθοδιανθρόνες (υπεरिकίνη, ψευδοϋπερικίνη, πρωτοϋπερικίνη και πρωτοψευδοϋπερικίνη) βρίσκονται σε πολύ λίγα φυτά, ενώ τα υπόλοιπα συστατικά του φυτού είναι κοινότυπα σε όλο το φυτικό βασίλειο. Επίσης, οι υπερικίνες έχουν φωτοδυναμικό αποτέλεσμα, το οποίο όμως πολλές φορές εκδηλώνεται μετά από το καταθρυμματισμό της δρόγης/φαρμάκου και την έκθεση στο ηλιακό φως. Το συνολικό ποσό της υπερικίνης πρέπει να προσδιορίζεται μετά από την έκθεση στο φως, το οποίο μετατρέπεται τα πρόδρομα βιολογικά μόρια, πρωτοϋπερικίνη και πρωτοψευδοϋπερικίνη, σε υπερικίνη και ψευδοϋπερικίνη αντίστοιχα (Kirakosyan et al. 2008).

1.15 Βιολογική δράση

Α) Επίδραση στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

Το παράγωγο της ακυλφλορογλουκινόλης, η υπερφορίνη, φαίνεται ότι κατέχει ισχυρή αντικαταθλιπτική δράση *in vivo* (Beerhues 2006; Medina et al., 2006). Τα συστατικά του συγκεκριμένου φυτού φάνηκε να δρουν πάνω στους υποδοχείς του γ-αμινο-βουτυρικού οξέος (GABA) και της σεροτονίνης (5-HT), που είναι αποδεδειγμένοι στόχοι για φαρμακολογική παρέμβαση στην περίπτωση της κατάθλιψης, προκαλώντας αναστολή τους. Επιπλέον, στόχους αποτελούν και οι διαμεμβρανικοί μεταφορείς της σεροτονίνης, και ουσίες, όπως το εκχύλισμα του φυτού (κυρίως υπερφορίνη), που είναι εκλεκτικοί αναστολείς της επαναπρόσληψης της σεροτονίνης προσυναπτικά, παρουσιάζουν αντικαταθλιπτική δράση. Ταυτόχρονα, αναστέλλεται και η επαναπρόσληψη της νορεπινεφρίνης, ντοπαμίνης και L-γλουταμίνης.

Επιπλέον, προτάθηκε ότι η υπερφορίνη οδηγεί σε συσσώρευση νευροδιαβιβαστών στις νευρικές συνάψεις προκαλώντας την είσοδο ιόντων νατρίου στα προσυναπτικά κύτταρα, απελευθέρωση των ενδοκυτταρικών αποθεμάτων ιόντων ασβεστίου και τελικά την έκκριση των νευροδιαβιβαστών στο συναπτικό χώρο (Roz & Rehavi, 2003; Marsh et al., 2002; Eckert et al., 2001; Wonnemann et al., 2000; Chatterjee et al., 1998).

B) Αντιμικροβιακή δράση

Η υπερφορίνη φαίνεται ότι κατέχει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση *in vivo* (Beerhues, 2006; Medina et al., 2006; Reichling et al., 2001). Επιπλέον, επώαση μικροοργανισμών παρουσία υπερικίνης, υπερφορίνης και των αλάτων τους με δικυκλοεξилаμμώνιο προκάλεσε αναστολή της ανάπτυξης τους (Avato et al., 2004), και ιδιαίτερα των *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pilori* και άλλων gram-θετικών βακτηρίων (Reichling et al., 2001; Schempp et al., 1999, Yesilada et al., 1999). Παρόλα αυτά, το βακτήριο *Staphylococcus aureus* διαπιστώθηκε ότι είναι ικανό να εμφανίσει ανθεκτικότητα ενάντια στην υπερφορίνη, η οποία όμως δεν οδήγησε σε διασταυρούμενη ανθεκτικότητα με άλλα κλινικά δοκιμασμένα αντιβιοτικά (Hubner 2003; Gibbons et al., 2002).

Γ) Αντιϊική δράση

Έχει βρεθεί ότι μια πρωτεΐνη που ταυτοποιήθηκε στο *Hypericum perforatum* ελαττώνει κατά πολύ τα επίπεδα πολλαπλασιασμού του HIV ιού μέσα στα μολυσμένα από αυτόν κύτταρα (Darbinian-Sarkissian et al., 2006; Kubin et al., 2005; Sokmen et al., 1999; Farnet et al., 1998; Lavie et al., 1995; Degar et al., 1992), ενώ η αντιϊική δράση του φυτού (λόγω ύπαρξης της υπερικίνης) εκδηλώνεται και ενάντια στον ιό της ηπατίτιδας C (Kubin et al., 2005), τους ερπητοϊούς, τη δαμαλίτιδα και τον ιό των παραμαγουλάδων (Andersen et al., 1991).

Δ) Αντινεοπλασματική δράση

Η υπερικίνη και η υπερφορίνη έχει βρεθεί ότι εμφανίζουν καταστρεπτικές ιδιότητες απέναντι σε νεοπλάσματα, οι οποίες όμως μεγιστοποιούνται υπό την επίδραση φωτός (Hostanska et al., 2003). Για το λόγο αυτό υπάρχουν προοπτικές για τη συμμετοχή της στη λεγόμενη ‘Φωτοδυναμική Διάγνωση και Θεραπεία’, προκαλώντας απόπτωση σε πολλά είδη καρκινικών κυττάρων.

Ε) Αντιφλεγμονώδης δράση

Η υπερφορίνη, φαίνεται ότι έχει αντιφλεγμονώδη δράση (Medina et al., 2006; Herold et al., 2003). Επιπλέον, η χρήση του φυτού προλαμβάνει την ενεργοποίηση του παράγοντα κάπα Β (NF-kB), μειώνοντας κατά αυτό τον τρόπο τη δημιουργία οξείας φλεγμονώδους καταστάσεως (Menegazzi et al., 2006; de Prati et al., 2005). Ταυτόχρονα, έχει διαπιστωθεί ότι η δράση του συγκεκριμένου φυτού σε φλεγμονώδεις και αλλεργικές καταστάσεις οφείλεται στην αναστολή της έκφρασης γονιδίων προ-αντιφλεγμονωδών παραγόντων όπως είναι η κυκλοοξυγενάση-1, 5-λιποξυγενάση, η ιντερλευκίνη 6 και η συνθετάση του νιτρικού οξειδίου

(Tedeschi et al. 2003). Επίσης, θεραπεία με το φυτό τοπικά ανακουφίζει από φλεγμονή και φαγούρα δέρματος που προήλθε από νευροδερματίτιδα (Albert et al., 1998; Jones & Lau, 2002).

ΣΤ) Αντιοξειδωτική δράση

Το τυποποιημένο εκχύλισμα του φυτού έδειξε σχετικά ισχυρή αντιοξειδωτική δράση τόσο *in vitro* όσο και σε κυτταρικές σειρές, μέσω της αναστολής της παραγωγής ελευθέρων ριζών και της λιπιδικής υπεροξειδωσης (Benedi et al., 2004; Jang et al., 2002; Hunt et al., 2001), ακόμα και αυτής που προήλθε από ακτινοβολία (Trommer et al., 2005). Για το λόγο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μικρές συγκεντρώσεις ως αντιοξειδωτικός παράγοντας σε παράφρονες ασθενείς με υψηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες στον εγκέφαλο (El-Sherbiny et al., 2003).

1.16 Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί στα διάφορα είδη του *Hypericum*

Διάφορα φυτά του γένους *Hypericum* έχουν μελετηθεί ως προς το δυναμικό των ενδοφυτικών μικροοργανισμών τους.

Ενδοφυτικοί μύκητες έχουν βρεθεί στα φύλλα των φυτών *H. mysorens* (Samaga et al., 2014), και *H. japonicum* (Samaga et al., 2016), αλλά και στις ρίζες του *H. perforatum* (Kusari et al., 2008). Ενδοφυτικά βακτήρια έχουν απομονωθεί από φυτά *H. perforatum* και *H. sileonides* (Egamberdieva et al., 2017; López-Fuentes et al., 2012). Οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί που μελετήθηκαν έδειξαν την ικανότητα παραγωγής διάφορων βιοδραστικών και αντιμικροβιακών ενώσεων.

2 Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι απομόνωση και ο χαρακτηρισμός ενδοφυτικών βακτηρίων και μυκήτων από το φυτό *Hypericum hircinum* προκειμένου να διερευνηθεί η ανταγωνιστική τους δράση έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων και η παρουσία χαρακτηριστικών (π.χ. παραγωγή σιδηροφόρων, διαλυτοποίηση του φώσφορου) που προάγουν την θρέψη και την ανάπτυξη των φυτών.

3 Υλικά και μέθοδοι

3.1 Φυτικό υλικό

Το ασυμπτωματικό φυτό *Hypericum hircinum* παραλήφθηκε από τον αγρό του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στην περιοχή Σπάτων Αττικής τον 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 *Hypericum hircinum* στον αγρό του Γ.Π.Α (Σπάτα)

Ακολούθησε η προσεκτική αποκοπή των φύλλων και του ριζικού συστήματος από το σώμα του φυτού με τη βοήθεια αποστειρωμένου ξυραφιού. Ζυγίστηκαν 250 γραμμάρια από τον κάθε ιστό για την απομόνωση βακτηρίων (500 γραμμάρια ριζικού ιστού και φυλλώματος συνολικά) και άλλα τόσα ξεχωριστά για την απομόνωση μυκήτων. Ακολούθησε διεξοδικό ξέπλυμα τους, αρχικά σε τρεχούμενο νερό βρύσης και αργότερα σε απιονισμένο νερό για την απομάκρυνση του χώματος και των άλλων επικαθούμενων σωματιδίων. Τα τμήματα του φυτού (φύλλα και ριζικό σύστημα) θεωρήθηκαν καθαρά όταν κατά τη βύθιση σε ξεχωριστά δοχεία με απιονισμένο νερό (dH₂O), αυτό παρέμενε διαυγές.

3.2 Διαδικασία επιφανειακής απολύμανσης

Ακολούθησε 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 περαιτέρω 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 αιθανόλη για 30 δευτερόλεπτα με καλή ανακίνηση. Τέλος, τα τμήματα ξεπλύθηκαν διεξοδικά σε δοχεία falcon με αποστειρωμένο διπλά απεσταγμένο νερό (ddH_2O), 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 γουδι και πολτοποιήθηκαν με γουδοχέρι με την προσθήκη συνολικής ποσότητας 2 ml αποστειρωμένου διπλά απεσταγμένου νερού (ddH_2O). Στη συνέχεια, ποσότητα 100 μ l της φυτικής πάστας επιστρώθηκε σε τρυβλία Petri 9 cm με 25ml Nutrient Agar (NA) (Nutrient Broth + 1,5% Agar). Το μέγεθος του τρυβλίου και η ποσότητα θρεπτικού μέσου σε αυτό είναι τα ίδια σε όλες τις παρακάτω πειραματικές διαδικασίες. Το θρεπτικό μέσο περιείχε αντιβιοτικό κυκλοεξαμίδιο (τελική συγκέντρωση 100 μ g/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 απώσθησαν 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 αντιβιοτικού στρεπτομυκίνη (τελική συγκέντρωση 50 $\mu\text{g/ml}$) 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 διαφορετικά μορφολογικές 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. Ακλούθησε η ασηπτική μεταφορά τους σε υγρό θρεπτικό μέσο NB και η καλλιέργεια τους σε ανακινούμενο επωαστήρα στις ίδιες συνθήκες με προηγούμενως. 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 ανακαλλιεργήθηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο NB στις ίδιες συνθήκες και προστέθηκε σε 20% (v/v) γλυκερόλη για μακρά αποθήκευσή της στους -80 °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 επίστρωση της σε στερεό θρεπτικό μέσο NA με τη μέθοδο streaking και τη φύλαξή της, μετά την επώαση στους 4 °C.

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

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

3.4.2 Μύκητες

Γινόταν καθημερινή παρατήρηση των τρυβλίων για να διαπιστωθεί εάν 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 καινούρια τρυβλία Petri με στερεό θρεπτικό μέσο PDA, ώστε να καλλιεργηθούν ξεχωριστά. Η επώαση έγινε στους 25 °C στο σκοτάδι μέχρι να καλυφθεί όλο το τρυβλίο από τις υφές του μύκητα. Οι καθαρές καλλιέργειες κατηγοριοποιήθηκαν σε μορφότυπους με βάση τον ρυθμό ανάπτυξης, το χρώμα (το μπροστινό και πίσω μέρος τρυβλίου Petri) και το φαινότυπο των υφών. Η μορφολογία της αποικίας του μύκητα άλλαζε με την πάροδο του χρόνου, οπότε έγινε παρακολούθηση των μυκήτων 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 ως ενδοφυτικοί.

Στους αντιπροσώπους κάθε μορφότυπου δόθηκε ένα κωδικό όνομα. Τα κωδικά ονόματα προκύπτουν από το όνομα των μυκήτων (**Fungi**), το είδος του φυτού (*Hypericum hircinum*) και τον ιστό από τον 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 την επινόησε. Η συγκεκριμένη μέθοδος κατατάσσει τα βακτήρια σε δυο μεγάλες ομάδες, τα θετικά και τα αρνητικά κατά Gram. Ο διαχωρισμός οφείλεται σε διαφορές του κυτταρικού τοιχώματος των δυο αυτών ομάδων. Τα θετικά κατά Gram βακτήρια έχουν παχύ κυτταρικό τοίχωμα που περιέχει κυρίως το μόριο πεπτιδογλυκάνη (Madigan et al., 2009). Στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια το κυτταρικό τοίχωμα είναι λεπτό και περιβάλεται από εξωτερική μεμβράνη (Madigan et al., 2009). Βακτήρια που ανήκουν στην ομάδα των *Fermicutes*, όπως το γένος *Bacillus* είναι θετικά κατά Gram, ενώ βακτήρια που ανήκουν στην ομάδα 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 (dH₂O) και προσθήκη διαλύματος ιωδίου (I₂), 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 (dH₂O), 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 δεν διαφεύγει. Ακολούθησε ξέπλυμα με απιονισμένο νερό (dH₂O) και προσθήκη 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.

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* f.sp *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 απρεσσορίου. 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 των λαχανικών και φρούτων, όπως μπρόκολο, μαρούλι, ρεβύθι, φράουλα και σταφύλι. Η καταπολέμησή τους, ειδικά του *F.oxysporum* που βρίσκεται στα αγγεία του ξύλου είναι δύσκολη καθώς διαχειμάζουν 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 αυτήν 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 απιλέχθηκαν οι ισχυρότεροι αντιπρόσωποι του καθενός, 18 βακτήρια συνολικά, τα οποία χαρακτηρίστηκαν περαιτέρω.

Τετράγωνο κομμάτι (6mm x 6mm) με υφές του παθογόνου 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 πάραφιλμ. Οι μύκητες *Rhizoctonia solani* και *Fusarium oxysporum* f.sp *raphani* επωάστηκαν στους 25 °C για 1 ημέρα πριν την τοποθέτηση του βακτηρίου, ενώ ο μύκητας *Botrytis cinerea* για 2 ημέρες, λόγω της πιο αργής ανάπτυξης του. Στη συνέχεια, ποσότητα 4μl υγρής καλλιέργειας βακτηρίου τοποθετήθηκε υπό μορφή κηλίδας (spot) σε απόσταση 2 cm από τον εκάστοτε μύκητα. Υπήρχαν 3 μάρτυρες για κάθε φυτοπαθογόνο μύκητα, όπου τοποθετήθηκε μια κηλίδα με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό (dH₂O). Τα τρυβλία σφραγίστηκαν με παραφιλμ και επωάστηκαν 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 ημέρες δεν υπήρχε αλλαγή του φαινότυπου και έτσι κρατήθηκαν οι φωτογραφίες των 9 ημερών. Με βάση τις τελικές παρατηρήσεις οι αλληλεπιδράσεις κατηγοριοποιήθηκαν σε τύπους, ύστερα από τη συμβουλή δύο επιπλέον συναδέλφων, και έγινε εκτίμηση της ικανότητας βιολογικού ελέγχου των απομονωμένων ενδοφυτικών βακτηρίων.

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 (6mm x 6mm) με υφές του παθογόνου 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 δεν θα τοποθετούνταν φυτοπαθογόνος μύκητας. Τα τρυβλία σφραγίστηκαν με παραφιλμ. Οι ενδοφυτικοί μύκητες επωάστηκαν στους 25 °C στο σκοτάδι για 2 ημέρες πριν την τοποθέτηση των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Fusarium oxysporum* f.sp *raphani* και *Botrytis cinerea*, ενώ για 3 μέρες πριν την τοποθέτηση του *Rhizoctonia solani*. Μετά το πέρας των ημερών τοποθετήθηκε τετράγωνο κομμάτι θρεπτικού μέσου (6mm x 6mm) του φυτοπαθογόνου μύκητα από καλλιέργεια 7 ημερών σε στερεό θρεπτικό μέσο PDA σε απόσταση 2 εκ. από την άλλη άκρη του τρυβλίου. 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 επωάστηκαν 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 συνολικά μέρες. Η παρατήρηση συνεχίστηκε μέχρι και τις 20 μέρες αλλά δεν παρατηρήθηκε αλλαγή φαινοτύπου. Τέλος, οι αλληλεπιδράσεις κατηγοριοποιήθηκαν σε τύπους με συμβουλή δύο επιπλέον ατόμων-παρατηρητών.

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® Microbial DNA).

Παρακάτω περιγράφεται η απομόνωση ολικού DNA από ένα απομονωμένο βακτήριο. Αρχικά, ολονύκτια 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 σε σωλήνα Τύπου B με σφαιρίδια (Nucleospin® Bead Tube Type B), ο οποίος είναι κατάλληλος για βακτήρια. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 40μl διαλύματος λύσης MG (χαοτροπικό άλας) και 100 μl διαλύματος Πρωτεΐνης 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. 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 στην μεμβράνη. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στις 11000 rpm για 30 δευτερόλεπτα ώστε να καθιζάνουν τα σφαιρίδια και τα συστατικά των κυττάρων. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε στην κολώνα (Nucleospin® Microbial DNA Column) που είχε τοποθετηθεί μέσα σε δοχείο συλλογής. Ακολούθησε φυγοκέντρωση 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 (SiO₂) της μεμβράνης. Το δοχείο συλλογής απορρίφθηκε και τοποθετήθηκε καινούριο. 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, φυγοκέντρωση 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 διαλυμάτων) εκτός του DNA που πιθανώς υπάρχουν πάνω στην 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 erppendorf και προστέθηκαν 100μl ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης BE. Έγινε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό και ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 11000 rpm για 30 δευτερόλεπτα για να γίνει έκλυση του DNA. Το ρυθμιστικό διάλυμα BE βοηθά στην αποδέσμευση του DNA από την μεμβράνη και την άριστη διατήρηση του.

Τέλος, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση και καθαρότητα του απομονωμένου DNA.

3.7.2 Μύκητες

Για την απομόνωση DNA μυκήτων τροποποιήθηκε το πρωτόκολλο των Izumitsu και συνεργατών (2012) και των Dörnte & 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 μg) με μεγάλη προσοχή, ώστε να μην παραληφθεί και θρεπτικό μέσο. Το τμήμα αυτό μεταφέρθηκε ασηπτικά σε δοχείο erppendorf που περιείχε 150 μl αποστειρωμένο διπλά απεσταγμένο νερό (ddH₂O). Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε σε ξηρό υδατόλουτρο (heatblock) ρυθμισμένο στους 70 °C. Ακολούθησε η ανάδυσή του στο μηχανήμα vortex για 1 λεπτό. Έγινε επανάληψη των δυο τελευταίων βημάτων. Το δοχείο erppendorf 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 καινούριο αποστειρωμένο δοχείο erppendorf. Τέλος, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της συγκέντρωσης και καθαρότητας του.

3.8 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊκών οξέων (DNA)

Η συγκέντρωση και η καθαρότητα των νουκλεϊκών οξέων σε διάλυμα προσδιορίζονται φωτομετρικά με τη χρήση UV φασματοφωτομέτρου 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 έκλουσης και αφού καθαρίστηκε η υποδοχή, τοποθετήθηκε ποσότητα δείγματος 2μl. Επιλέχθηκε η ένδειξη της φωτομέτρησης και ακολούθησε η καταγραφή της συγκέντρωσης και των λόγων OD_{260}/OD_{280} (απορρόφηση DNA/απορρόφηση πρωτεϊνών) και OD_{260}/OD_{230} .

Ένα δείγμα DNA θεωρείται ικανοποιητικά καθαρό όταν ο λόγος OD_{260}/OD_{280} είναι περίπου 1,8. Μικρότερες τιμές αποτελούν ένδειξη προσμίξεων από την παρουσία πρωτεϊνών, φαινόλης, RNA ή άλλων ουσιών που απορροφούν στα 280 nm. Ο λόγος OD_{260}/OD_{230} ενός δείγματος υψηλής καθαρότητας κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 1.8 και 2.2. Μικρότερες τιμές αποτελούν ένδειξη προσμίξεων 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 δυο 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:

1. Στάδιο αποδιάταξης όπου η δίκλωνη μήτρα αποδιατάσσεται καθώς σπάνε οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των βάσεων των δυο αλυσίδων λόγω αυξημένης θερμοκρασίας.
2. 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

($\pm 5^{\circ}\text{C}$) η οποία υπολογίζεται συναρτήσει του μήκους τους σε νουκλεοτίδια και του περιεχομένου σε GC.

3. 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 ενός κύκλου αντιγραφής μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μήτρα για τον επόμενο.

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'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' και αντίστροφης κατεύθυνσης (Reverse) 5'-ACGGCTACCTTGTACGACTT -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) (30μM)	1 μl
Εκκινητής αντίστροφης κατεύθυνσης (Reverse)(30μM)	1 μl
DNA μήτρα	50-100 ng
Μίγμα τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (DNTPs) (10 mM το καθένα)	1 μl
10x ρυθμιστικό διάλυμα	5 μl
DNA πολυμεράση (5U/μl)	0.5 μl
ddH₂O	Έως 50 μl

Για κάθε ομάδα δειγμάτων υπήρχαν πάντα και δυο 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 8μl από την αντίδραση ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτη αгарόζης και αφού πιστοποιήθηκε η ύπαρξη προϊόντος, η υπόλοιπη αντίδραση υπέστη καθαρισμό.

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 18S rRNA μαζί με ριβονουκλεοπρωτεΐνες (Madigan et al., 2009). Υπάρχουν δύο ενδομεταγραφόμενες περιοχές (internal transcribed spacer, ITS) στο γονιδίωμα των μυκήτων. Η μια, ITS1, είναι μεταξύ των 18S και 5.8S rDNA αλληλουχιών, ενώ η δεύτερη, ITS2, είναι μεταξύ 5.8S και 28S rDNA αλληλουχιών. Αυτές οι δυο 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' –TCCGTAGGTGACCTGCGG- 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. 6.1).

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

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 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 το τέλος της αντίδρασης τα δείγματα φυλάχθηκαν στους 4 °C.

Ποσότητα 8μl από την αντίδραση ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτη αγαρόζης και αφού πιστοποιήθηκε η ύπαρξη προϊόντος, η υπόλοιπη αντίδραση υπέστη καθαρισμό.

3.10 Ηλεκτροφορηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτη αγαρόζης

Ο διαχωρισμός των τμημάτων του DNA γίνεται με βάση το μέγεθος και τη διαμόρφωση τους με ηλεκτροφόρηση σε πήκτη 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 που πόροι 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 φορτίο κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού. Όταν εφαρμοστεί ρεύμα στη συσκευή το αρνητικά φορτισμένο μόριο του DNA θα κινηθεί δια μέσου της πήκτης προς το θετικό ηλεκτρόδιο. Στην περίπτωση διαχωρισμού γραμμικών μορίων ο διαχωρισμός είναι ανάλογος του μεγέθους.

Οι ζώνες των νουκλεϊκών 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 πήκτης, 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 σταθεροποιήθηκε σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης. Τέλος, προσαρμόστηκε η κατάλληλη <<χτένα>> ώστε να σχηματιστούν στην πήκτη τα πηγάρια φόρτωσης. Αφού η πήκτη σταθεροποιήθηκε, απομακρύνθηκε η <<χτένα>> και η συσκευή συμπληρώθηκε με διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1xTAE ώστε η πήκτη να παραμείνει βυθισμένη 1-2 mm από την επιφάνεια του. Τα δείγματα των νουκλεϊκών οξέων, αφού αναμείχθηκαν 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 βοηθία φόρτωσης. Εφαρμόστηκε στα άκρα της συσκευής ηλεκτροφόρησης κατάλληλη τάση ηλεκτρικού πεδίου και χρόνος εφαρμογής ανάλογος των δειγμάτων.

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

3.11 Καθαρισμός προϊόντος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Ο καθαρισμός του δείγματος 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 σε 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 φυγοκέντρωση 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 φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 1 λεπτό για την έκλουση του DNA.

Το DNA προϊόν μετρήθηκε ως προς τη συγκέντρωση και καθαρότητα του 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), (<https://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 ήταν εφικτή σε ορισμένες μόνο περιπτώσεις, όπου τα δεδομένα με το μεγαλύτερο σκορ αντιστοιχούσαν σε ένα με δυο είδη το μέγιστο.

3.13 Έλεγχος χαρακτηριστικών των βακτηρίων

3.13.1 Ικανότητα ομαδικής κίνησης σε επιφάνεια (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 καλλιερήθηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο NB (Nutrient Broth) σε ανακινούμενο επωαστή στους 30 °C για 18-20 ώρες. Ποσότητα 10 μl από αυτήν την καλλιέργεια τοποθετήθηκε ασηπτικά στο κέντρο τρυβλίου με ημι-στερεό θρεπτικό μέσο NA υπό τη μορφή κηλίδας (spot). Ακολούθησε επώαση στους 30 °C για 4 ημέρες, 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 μεγάλη ικανότητα κίνησης swarming (++++), ορίστηκε η πλήρης κάλυψη του τρυβλίου την πρώτη μέρα επώασης. Αντίστοιχα, μέτρια κινητικότητα (++) χαρακτηρίστηκε

όταν η διάμετρος της βακτηριακής ανάπτυξης ήταν 3-5 cm. Μικρή κινητικότητα (+) ορίστηκε όταν η διάμετρος της βακτηριακής ανάπτυξης ήταν μικρότερη από 3 cm.

3.13.2 Χαρακτηριστικά προαγωγής της ανάπτυξης του φυτού (PGP traits)

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 catexamates, 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 (900 ml). 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 συνεχή ανάδευση και τέλος προστίθεται το διάλυμα HDTMA. Ο δείκτης Fe-CAS και το θρεπτικό 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 μέρες 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 μέγιστη (+++++) όταν η άλως κάλυψε εντελώς το τρυβλίο. Μεσαία παραγωγή (+++++) ορίστηκε όταν η διάμετρος ήταν 5-7 cm, μικρή

παραγωγή (++) όταν ήταν μικρότερη των 4 cm. Τέλος, καθόλου ανάπτυξη άλω (-) χαρακτηρίστηκε ως ανικανότητα παραγωγής σιδηροφόρων.

Διαλυτοποίηση του φωσφόρου

Η ικανότητα των απομονωμένων ενδοφυτικών βακτηρίων να διαλυτοποιούν το φώσφορο εξετάστηκε με την ανάπτυξή τους σε στερεό θρεπτικό μέσο Pikovskaya (PVK agar) (Pikovskaya, 1948). Η δημιουργία διάφανης 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 σε 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 μέρες. Το πείραμα περιείχε 3 επαναλήψεις.

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

3.14 Αλληλεπιδράσεις ενδοφυτικών μυκήτων μεταξύ των ίδιων ατόμων

Η αλληλεπίδραση των ενδοφυτικών μυκήτων μεταξύ των ίδιων ατόμων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο διπλής καλλιέργειας (dual culture).

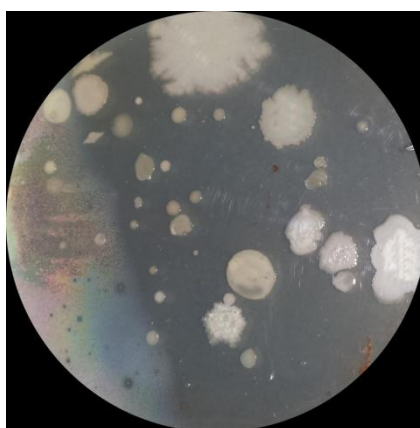
Όλοι οι μύκητες ανακαλλιιεργήθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο PDA στους 25 °C στο σκοτάδι για 10 ημέρες. Στη συνέχεια, τετράγωνο κομμάτι θρεπτικού μέσου (6mm x 6mm) με υφές του εκάστοτε ενδοφυτικού μύκητα από την ανακαλλιέργεια τοποθετήθηκε 2 cm από την άκρη του τρυβλίου Petri με στερεό θρεπτικό μέσο PDA. Ακολούθησε η τοποθέτηση τετράγωνου κομματιού αγαρ (6mm x 6mm) με υφές του ίδιου μύκητα 2 cm από την άλλη άκρη του τρυβλίου.

4 Αποτελέσματα

4.1 Απομόνωση και χαρακτηρισμός ενδοφυτικών βακτηρίων από το φυτό *Hypericum hircinum*

4.1.1 Απομόνωση ενδοφυτικών βακτηρίων

Για την απομόνωση ενδοφυτικών βακτηρίων επιστρώθηκε φυτικός πολτός από τα φύλλα και τη ρίζα, τα οποία είχαν απολυμανθεί επιφανειακά σε στερεό θρεπτικό μέσο ΝΑ. Ακολούθησε επώαση στους 30 °C μέχρι να γίνουν ορατές όλες οι αποικίες.



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

Παρελήφθησαν περίπου 50 αποικίες βακτηρίων από τον κάθε ιστό με προσπάθεια να επιλεγθούν όλες οι μορφολογικά διαφορετικές αποικίες. Αυτές τοποθετήθηκαν με τη μέθοδο της γραμμωτής ανακαλλιέργειας (streaking) σε στερεό θρεπτικό μέσο ΝΑ και μετά επωάστηκαν στους 30 °C για 18-20 ώρες. Μετά την καλλιέργειά 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. Το όνομα των βακτηρίων προκύπτει από το αρχικό γράμμα της λέξης Bacteria (B), το όνομα του είδους του φυτού (*Hypericum hircinum*- **Hi**), τον ιστό από τον οποίο απομονώθηκε (leaves ή root- **l/r**) και έναν αριθμό, για παράδειγμα B.Hil 4, B.Hir 149.

Στη συνέχεια επιλέχθηκαν εκείνα τα βακτήρια με τον ισχυρότερο φαινότυπο έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani*. Αυτά τα 18 βακτήρια χαρακτηρίστηκαν περαιτέρω ως προς το γένος, την ικανότητα παρεμπόδισης των φυτοπαθογόνων *Fusarium*

oxysporum f.sp. *raphani* και *Botrytis cinerea*, την ικανότητα ομαδικής κίνησης σε ημι-στερεό μέσο, την παραγωγή σιδηροφόρων και την διαλυτοποίηση φωσφόρου.

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).



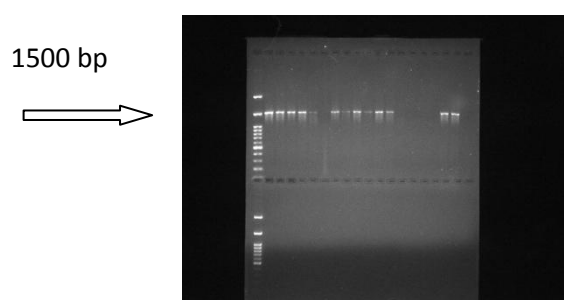
Εικόνα 4.2 Παραδείγματα χρώσης κατά Gram βακτηριακών απομονώσεων σε οπτικό μικροσκόπιο (100x) (1: B.Hir147, 2: B.Hir149, 3: B.Hir136).

Τα αποτελέσματα της μικροσκοπικής ανάλυσης έδειξαν πως τα βακτήρια που παρατηρήθηκαν είναι θετικά κατά Gram, καθώς είναι ραβδόμορφου σχήματος και μωβ χρώματος.

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 από το Εθνικό Κέντρο Βιοτεχνολογικών Πληροφοριών της Αμερικής (NCBI). Στην ανάλυση βρέθηκαν τα γένη *Bacillus* με ποσοστό ομοιότητας 98-99%. Αναλυτικά οι αντιστοιχίες των ονομάτων των βακτηρίων που απομονώθηκαν ύστερα από την ταυτοποίηση και τα ποσοστά ομοιότητας φαίνονται στον Πίνακα 4.1.

Πίνακας 4.1. Ταξινόμηση των βακτηριακών απομονώσεων με βάση τη 16s rDNA αλληλουχία τους στο πρόγραμμα BLAST.

Κωδικό όνομα βακτηρίου που απομονώθηκε	Ομοιότητα	Πιθανά είδη
B.Hil 4	98-99 %	<i>Bacillus axaquiensis</i> <i>Bacillus haloterans</i>
B.Hir 102	98-99%	<i>Bacillus</i> sp.
B.Hir 105	98-99 %	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus methylotrophicus</i>
B.Hir 107	Max 50%	<i>Bacillus</i> sp.
B.Hir 110	98-99 %	<i>Bacillus</i> sp.
B.Hir 113	98-99 %	<i>Bacillus</i> sp.
B Hir 115	98-99 %	<i>Bacillus licheniformis</i>
B.Hir 119	98-99 %	<i>Bacillus cereus</i>
B.Hir 127	98-99%	<i>Bacillus endophyticus</i> us
B.Hir 131	98-99 %	<i>Bacillus</i> sp.

B.Hir 136	98-99 %	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Bacillus cereus</i>
B.Hir 138a	98-99 %	<i>Bacillus sp.</i>
B.Hir 138b	98-99 %	<i>Bacillus sp.</i>
B.Hir 138c	98-99 %	<i>Bacillus sp.</i>
B.Hir 139b	98-99 %	<i>Bacillus sp.</i>
B.Hir 148	98-99 %	<i>Bacillus cereus</i>
B.Hir 149	98-99 %	<i>Bacillus sp.</i>
B.Hir 156	98-99 %	<i>Bacillus subtilis</i>

4.1.2.3 Αλληλεπίδραση των ενδοφυτικών βακτηρίων με φυτοπαθογόνους μύκητες

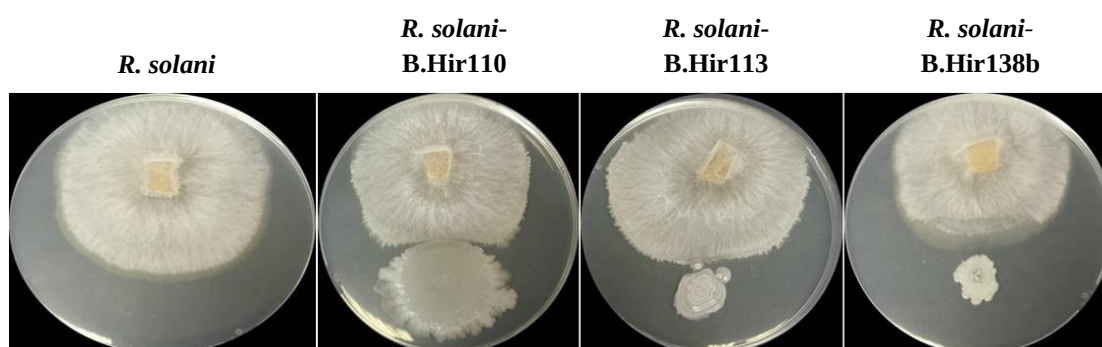
Σκοπός αυτού του πειράματος ήταν η διερεύνηση της ανταγωνιστικής ικανότητας απομονωμένων ενδοφυτικών βακτηρίων έναντι των φυτοπαθογόνων μυκήτων *R. solani*, *F. oxysporum* f.sp. *raphani* και *B. cinerea*.

Η αλληλεπίδραση των απομονωμένων ενδοφυτικών βακτηρίων με τους φυτοπαθογόνους μύκητες 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.

Μετά τη μακροσκοπική παρατήρηση των τρυβλίων, καταγράφηκαν 3 βασικοί τύποι αλληλεπίδρασης μεταξύ των βακτηρίων και των φυτοπαθογόνων μυκήτων για να περιγράψουν επαρκώς το φαινόμενο. Η κατηγοριοποίηση που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

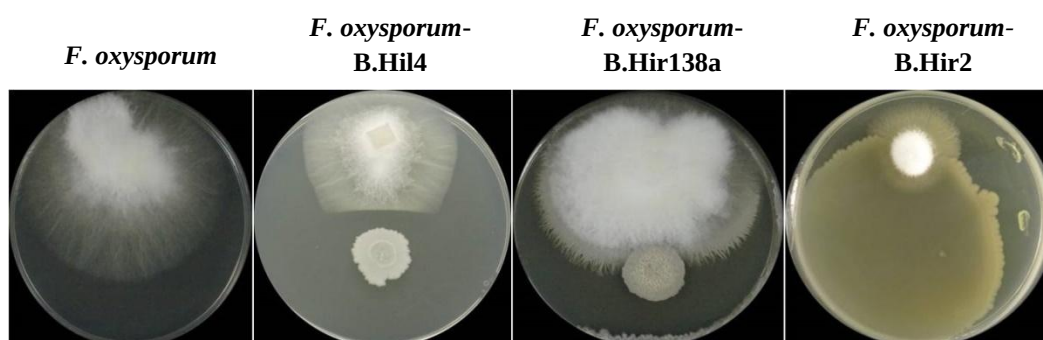
- 1. Ομαδική κίνηση και επαφή με τον μύκητα
- 2. Ζώνη παρεμπόδισης
- 3. Επαφή με ομαδική κίνηση και κύκλωμα του μύκητα

Ακολουθούν αντίστοιχα παραδείγματα αλληλεπιδράσεων των βακτηρίων με τους φυτοπαθογόνους μύκητες *R. solani* (Εικ.4.4), *F. oxysporum* (Εικ.4.5) και *B. cinerea* (Εικ.4.6) για κάθε κατηγορία, ώστε να γίνει αντιληπτή η κατηγοριοποίηση.



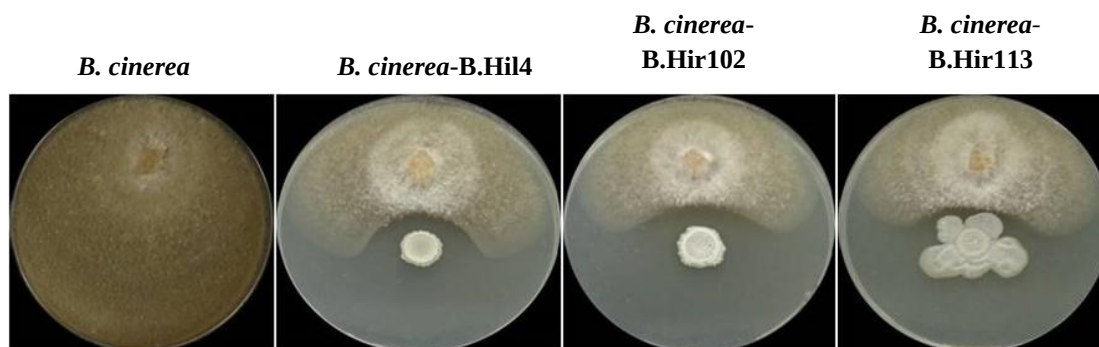
Εικόνα 4.4 Παραδείγματα έκφρασης ενδοφυτικών βακτηριακών απομονώσεων εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *R. solani* σε θρεπτικό μέσο NA (1,5%). Τα κομμάτια άγαρ με τις υφές του μύκητα εμβολιάστηκαν στο τρυβλίο 1 μέρα πριν την τοποθέτηση της κηλίδας του βακτηρίου. Οι φωτογραφίες είναι 9 ημερών επώασης στους 25°C.

Η αλληλεπίδραση των βακτηρίων με τον μύκητα *R.solani* οδηγεί κυρίως σε αλληλεπίδραση τύπου 2 (Ζώνη παρεμπόδισης) και σε μικρότερη κλίμακα τύπου 3 (Επαφή με ομαδική κίνηση και κύκλωμα του μύκητα). Επιπλέον, παρατηρείται σε δυο περιπτώσεις ο τύπος 1 (Ζώνη παρεμπόδισης) σε συνδυασμό με τον τύπο 3 (Επαφή με ομαδική κίνηση και κύκλωμα του μύκητα).



Εικόνα 4.5 Παραδείγματα έκφρασης ενδοφυτικών βακτηριακών απομονώσεων εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *F. oxysporum* σε θρεπτικό μέσο NA (1,5%). Τα κομμάτια άγαρ με τις υφές του μύκητα εμβολιάστηκαν στο τρυβλίο 1 μέρα πριν την τοποθέτηση της κηλίδας του βακτηρίου. Οι φωτογραφίες είναι 9 ημερών επώασης στους 25°C.

Ο τύπος αλληλεπίδρασης που κυριαρχεί με τον μύκητα *F.oxysporum* f.sp. *raphani* είναι ο 2 (Ζώνη παρεμπόδισης), ενώ σε μικρότερη κλίμακα παρατηρείται ο 3 (Επαφή με ομαδική κίνηση και κύκλωμα του μύκητα) και ο συνδυασμός τύπου 1 (Ομαδική κίνηση και κύκλωμα του μύκητα) με τον τύπο 3 (Ζώνη παρεμπόδισης).



Εικόνα 4.6 Παραδείγματα έκφρασης ενδοφυτικών βακτηριακών απομονώσεων εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *B. cinerea* σε θρεπτικό μέσο NA (1,5%). Τα κομμάτια άγαρ με τις υφές του μύκητα εμβολιάστηκαν στο τρυβλίο 1 μέρα πριν την τοποθέτηση της κηλίδας του βακτηρίου. Οι φωτογραφίες είναι 9 ημερών επώασης στους 25°C.

Όπως παρατηρείται στα ανωτέρω παραδείγματα ο κύριος και μοναδικός τύπος αλληλεπίδρασης των βακτηρίων με τον μύκητα *B. cinerea* είναι ο 2 (Ζώνη παρεμπόδισης).

Τέλος, είναι αξιοσημείωτο πως σε κάθε τύπο αλληλεπίδρασης παρατηρούνται διαφορές έντασης της έκφρασης του, το οποίο προφανώς είναι αποτέλεσμα της συνύπαρξης του επιλαχόντος μύκητα με το εκάστοτε ενδοφυτικό βακτήριο. Η παρατήρηση αυτή ισχύει και για τους τρεις μύκητες.

Ένα ακόμα χαρακτηριστικό και στα τρία παραδείγματα ελέγχου έναντι των φυτοπαθογόνων είναι ο διαφορετικός φαινότυπος που παρουσιάζει το ίδιο βακτήριο όπως για παράδειγμα το βακτήριο B.Hil 4 (Εικ.4.4, Εικ.4.5, Εικ.4.6).

Ακολουθεί αναλυτικός πίνακας (Πιν. 4.2) με τις αλληλεπιδράσεις των ενδοφυτικών βακτηρίων και των φυτοπαθογόνων μυκήτων.

Πίνακας 4.2 Τύποι αλληλεπίδρασης μεταξύ ενδοφυτικών βακτηρίων και των φυτοπαθογόνων μυκήτων *R. solani*, *F. oxysporum* f.sp. *raphani* και *B. cinerea*.

Κωδικό όνομα βακτηρίου που απομονώθηκε	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
B.Hil 4	2	2	2
B.Hir 102	3	1	2
B.Hir 105	2	2	2
B.Hir 107	3	2	2
B.Hir 110	1,3	3	2
B.Hir 113	3	2	2
B Hir 115	2	2	2
B.Hir 119	3	2	2
B.Hir 127	2	2	2
B.Hir 131	2	2	2
B.Hir 136	2	2	2
B.Hir 138a	2	3	2
B.Hir 138b	2	2	2
B.Hir 138c	1, 3	1,3	2
B.Hir 139b	2	2	2

B.Hir 148	2	2	2
B.Hir 149	3	2	2
B.Hir 156	2	2	2

Σε κάποιες περιπτώσεις παρατηρήθηκε ο ίδιος τύπος αλληλεπίδρασης ενός βακτηρίου έναντι των φυτοπαθογόνων μυκήτων (Εικ.4.7), ενώ είναι αξιοσημείωτο πως σε κάποιες άλλες περιπτώσεις παρατηρήθηκε διαφορετικός τύπος αλληλεπίδρασης ενός βακτηρίου έναντι των δύο ή τριών φυτοπαθογόνων μυκήτων (Εικ.4.8)

Ένα ακόμα φαινόμενο που παρατηρήθηκε είναι η αλλαγή της μορφολογίας της μακροαποικίας του βακτηρίου ανάλογα με τον φυτοπαθογόνο μύκητα που έχει απέναντί του, το οποίο φαίνεται και στις παρακάτω εικόνες (Εικ.4.7, 4.8).



Εικόνα 4.7 Παράδειγμα έκφρασης του ίδιου τύπου αλληλεπίδρασης (Ζώνη παρεμπόδισης) του βακτηρίου B.Hir105 και με τους 3 φυτοπαθόγονους μύκητες. Οι φωτογραφίες είναι 9 ημερών επώασης στους 25°C.

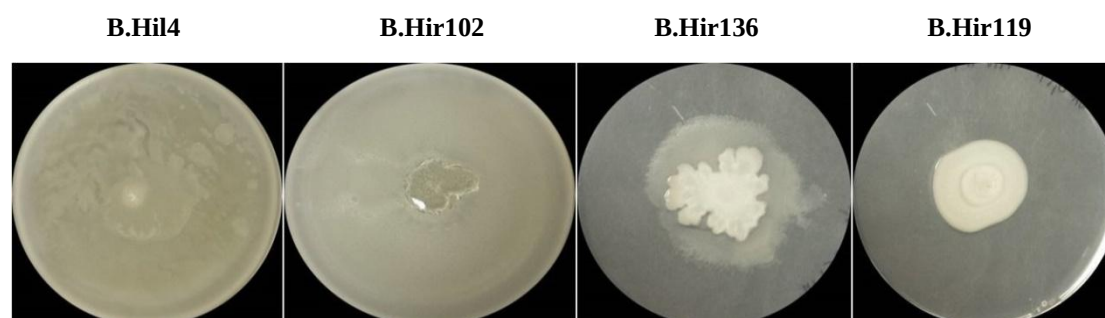


Εικόνα 4.8 Παράδειγμα της διαφορετικής έκφρασης του τύπου αλληλεπίδρασης του βακτηρίου **B.Hir113** όταν βρέθηκε απέναντι στους φυτοπαθογόνους μύκητες *R. solani* και *B. cinerea*.

4.1.2.4 Ομαδική κίνηση σε επιφάνεια (*Swarming motility*)

Η ομαδική κίνηση σε επιφάνειες είναι πολύ σημαντική για τα βακτήρια που αλληλεπιδρούν με τα φυτά, καθώς βοηθάει στην προσέγγιση των φυτικών ιστών και την μετέπειτα αποίκισή τους (Venieraki et al., 2016).

Από τα 18 απομονωμένα βακτήρια που μελετήθηκαν όλα πραγματοποιούν ομαδική κίνηση σε ημι-στερεό θρεπτικό μέσο με διαφορά στην έκφραση της έντασης για κάθε βακτήριο. Ακολουθεί αναλυτικός πίνακας με την κατηγοριοποίηση της έντασης της ομαδικής κίνησης για κάθε βακτήριο (Πίν. 4.3), καθώς και παραδείγματα με ενδεικτικές φωτογραφίες (Εικ. 4.9).



Εικόνα 4.9 Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα από τον *in vitro* έλεγχο της ικανότητας ομαδικής κίνησης σε επιφάνεια των βακτηριακών στελεχών. 10μl βακτηριακής καλλιέργειας τοποθετήθηκαν στο κέντρο ημι-στερεού θρεπτικού μέσου NA με 0.5% συγκέντρωση άγαρ υπό μορφή κηλίδας (spot) και έγινε επώαση 4 ημέρες στους 30°C.

Πίνακας 4.3 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. Όπου: ++++: Μεγάλη κινητικότητα- Κάλυψη του τρυβλίου, ++: Μέτρια κινητικότητα, +: Μικρή κινητικότητα).

Κωδικό όνομα βακτηρίου που απομονώθηκε	Ένταση ομαδικής κίνησης
B.Hil 4	++++
B.Hir 102	++++
B.Hir 105	++++
B.Hir 107	++++
B.Hir 110	++++
B.Hir 113	++++
B Hir 115	++++
B.Hir 119	+
B.Hir 127	++++
B.Hir 131	++++
B.Hir 136	++
B.Hir 138a	++++
B.Hir 138b	++++
B.Hir 138c	++++

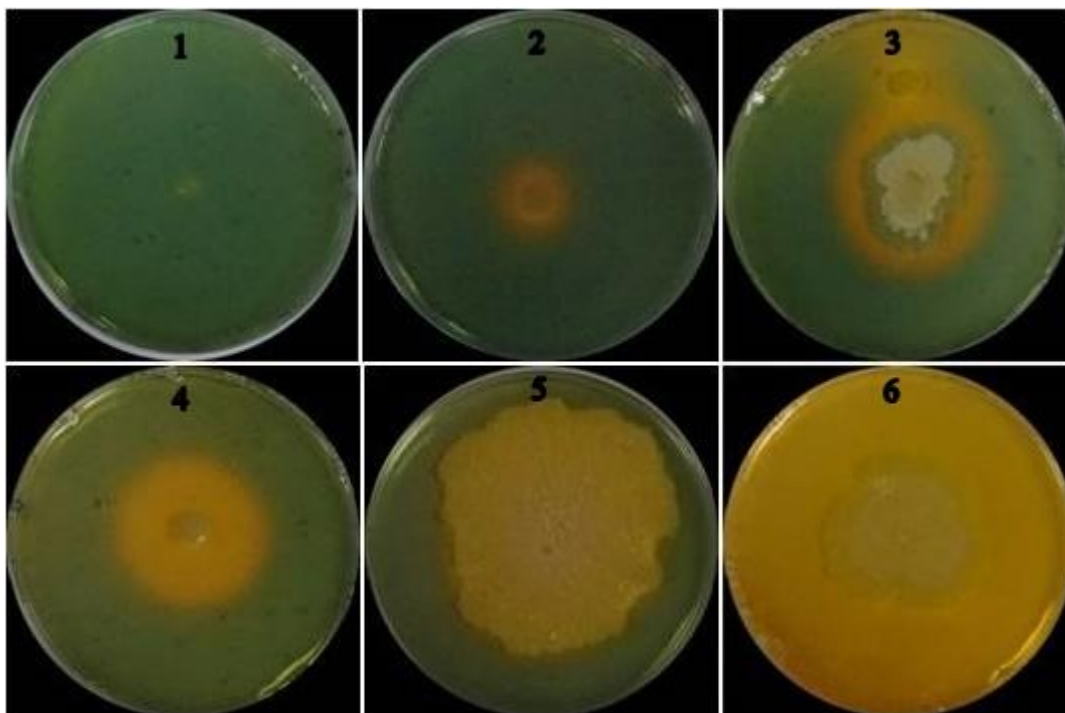
B.Hir 139b	++++
B.Hir 148	+
B.Hir 149	++++
B.Hir 156	++++

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 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 άλω 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).

Σε αυτήν την μελέτη από τα 19 ενδοφυτικά βακτήρια τα 16 φάνηκε πως παράγουν σιδηροφόρα. όπως υποδεικνύεται από το σχηματισμό πορτοκαλί άλω γύρω από την κηλίδα τους. Η έκταση της άλω και άρα της παραγωγής σιδηροφόρων διαφέρει από απομόνωση σε απομόνωση. Αντιπροσωπευτικά πρότυπα δίνονται στην Εικόνα 4.10.



Εικόνα 4.10 Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα της *in vitro* δοκιμασίας παραγωγής σιδηροφόρων. 10 μl βακτηριακής καλλιέργειας τοποθετήθηκαν υπό μορφή κηλίδας στο κέντρο τρυβλίου με στερεό θρεπτικό μέσο CAS και επώαστηκαν για 4 μέρες. Η ποικιλομορφία της άλω από καθόλου αλλαγή χρώματος έως αλλαγή χρώματος όλου του μέσου φαίνεται στην εικόνα (1: B.Hil4, 2: B.Hir102, 3: B.Hir115, 4: B.Hir136, 5: B.Hir107, 6: B.Hir131).

Στην εικόνα διαφαίνεται πέρα από την διαφορετική έκταση της αλλαγής του χρώματος του μέσου και η διαφορετική ανάπτυξη των αποικιών. Για παράδειγμα το B.Hil 4 φαίνεται πως δεν παράγει σιδηροφόρα και αναπτύσσει μικρό μέγεθος της αποικίας. Το B.Hir 115 μεταχρωματίζει το μέσο με μεγαλύτερη ένταση, αλλά καταλαμβάνει και μεγαλύτερη έκταση, ενώ το B.Hir 131 μεταχρωματίζει το μέσο σε όλη του την έκταση και αναπτύσσεται σε μικρότερη έκταση. Ακολουθεί ο Πίνακας 4.4 που συγκεντρώνει όλα τα αποτελέσματα της έντασης της παραγωγής σιδηροφόρων.

Πίνακας 4.4 Η ικανότητα και ένταση παραγωγής σιδηροφόρων από τις βακτηριακές απομονώσεις με βάση τη διάμετρο της πορτοκαλί άλω σε στερεό θρεπτικό μέσο CAS μετά από επώαση στους 30 °C για 4 μέρες. Όπου: : +++++: Μέγιστη παραγωγή- Κάλυψη του μέσου, ++++: Μέτρια παραγωγή, ++: Μικρή παραγωγή, - Όχι παραγωγή.

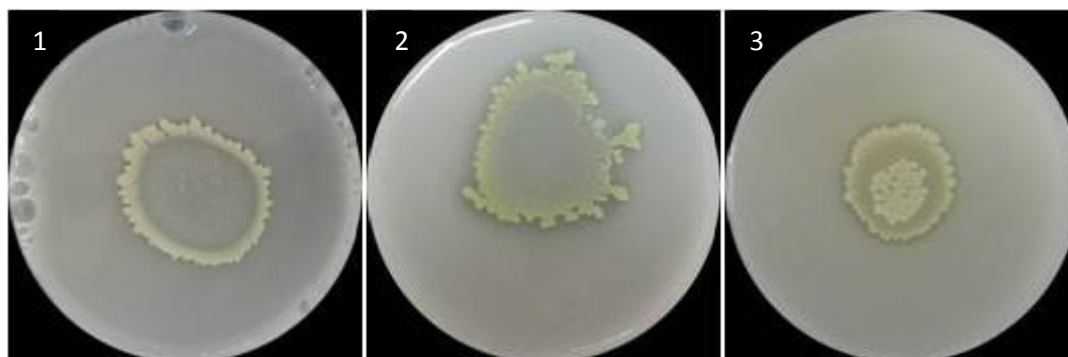
Κωδικό όνομα βακτηρίου που απομονώθηκε	Παραγωγή σιδηροφόρων
B.Hil 4	-
B.Hir 102	++
B.Hir 105	++
B.Hir 107	+++
B.Hir 110	++
B.Hir 113	++
B Hir 115	+++
B.Hir 119	-
B.Hir 127	+++++
B.Hir 131	+++++
B.Hir 136	++
B.Hir 138a	++
B.Hir 138b	++
B.Hir 138c	+++++

B.Hir 139b	+++++
B.Hir 148	+++++
B.Hir 149	+++++
B.Hir 156	+++++

4.1.2.6 Διαλυτοποίηση φωσφόρου

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

Από τα 18 απομονωμένα βακτήρια, τα 9 έχουν την ικανότητα να διαλυτοποιούν το φωσφόρο με διαφορετική έκταση της διάφανης άλω (Πιν. 4.5). Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 4.11.



Εικόνα 4.11 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 (1: B.Hir 102, 2: B.Hir 107, 3: B.Hir 138b).

Ακολουθεί συγκεντρωτικός πίνακας που αποτυπώνει την ικανότητα διαλυτοποίησης του φωσφόρου για κάθε βακτήριο.

Πίνακας 4.5 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 ΡΥΚ μετά από επώαση στους 30°C για 7 μέρες. Όπου: - καθόλου διαφανής ζώνη, + ορατή διαφανής ζώνη.

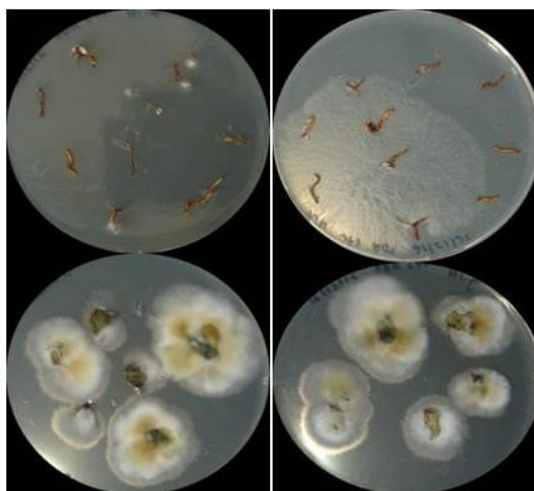
Κωδικό όνομα βακτηρίου που απομονώθηκε	Διαλυτοποίηση Φωσφόρου
B.Hil 4	-
B.Hir 102	+
B.Hir 105	+
B.Hir 107	+
B.Hir 110	+
B.Hir 113	+
B Hir 115	-
B.Hir 119	-
B.Hir 127	-
B.Hir 131	-
B.Hir 136	+
B.Hir 138a	+
B.Hir 138b	+
B.Hir 138c	+
B.Hir 139b	-

B.Hir 148	-
B.Hir 149	-
B.Hir 156	-

4.2 Απομόνωση και χαρακτηρισμός ενδοφυτικών μυκήτων φυτού *Hypericum hircinum*

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. 4.12).



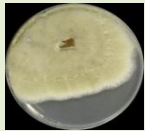
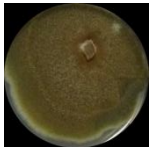
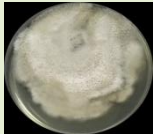
Εικόνα 4.12. Τμήματα ρίζας (πάνω) και φύλλων (κάτω) του φυτού *H. hircinum* τοποθετημένα σε στερεό θρεπτικό μέσο PDA από όπου αναδύονται μύκητες. Φωτογραφίες 2 εβδομάδων επώασης στους 25°C.

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

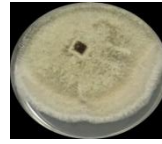
Από τα φύλλα και τις ρίζες απομονώθηκαν περίπου 50 μύκητες, οι οποίοι εξετάστηκαν ως προς τη μορφολογική ομοιότητα μακροσκοπικά και περιορίστηκαν στους 14. Από αυτούς 4 απομονώθηκαν από τη ρίζα του φυτού και 10 από τα φύλλα του. Στους μύκητες αυτούς

δόθηκαν κωδικά ονόματα (Πίν. 4.6), τα οποία προκύπτουν από το όνομα των μυκήτων (Fungi), το είδος του φυτού (*Hypericum hircinum*) και το μέρος του φυτού από το οποίο απομονώθηκαν (leaves ή root). Οι 14 μύκητες αποθηκεύτηκαν σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο PDA στους 4 °C.

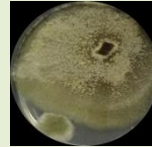
Πίνακας 4.6 Κωδικά ονόματα και μορφότυποι των μυκήτων που απομονώθηκαν από φύλλα και ρίζα του φυτού *H.hircinum*.

Κωδικό Όνομα Μύκητα	Μορφότυπος Μύκητα
F. Hil 1	
F. Hil 4	
F. Hil 5	
F. Hil 6	
F. Hil 7	

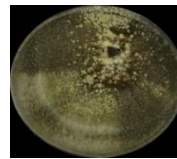
F. Hil 8



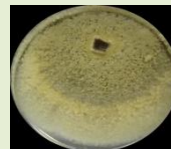
F. Hil 9



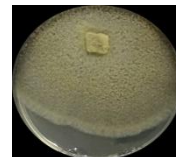
F. Hil 10.1



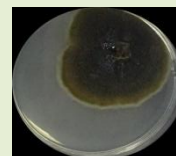
F. Hil 10.2



F. Hil 11



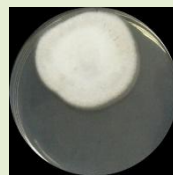
F. Hir 1



F. Hir 3



F. Hir 4.2



F. Hir 7

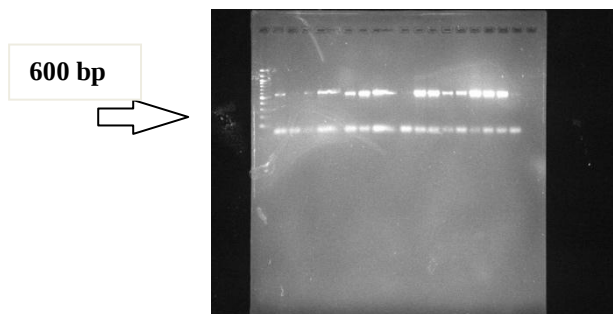


4.2.2 Χαρακτηρισμός ενδοφυτικών μυκήτων

4.2.2.1 Μοριακή ταυτοποίηση μυκήτων

Οι μύκητες που απομονώθηκαν από φύλλο και ρίζα του φυτού *Hypericum hircinum* 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 έναν μεγάλο αριθμό μυκήτων (Schoch et al., 2012).

Για την απομόνωση των ITS τμημάτων πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με εκφυλισμένους εκκινητές, των οποίων τα προϊόντα (Εικ.5.13) καθαρίστηκαν και αλληλουχήθηκαν.



Εικόνα 4.13 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 από το Εθνικό Κέντρο Βιοτεχνολογικών Πληροφοριών της Αμερικής (NCBI). Στην ανάλυση βρέθηκε ως πολυπληθέστερο το γένος *Alternaria*. Αναλυτικά οι αντιστοιχίσεις και τα ποσοστά ομοιότητας φαίνονται στον Πίνακα 4.7.

Πίνακας 4.7 Ταξινόμηση των απομονωθέντων ενδοφυτικών μυκήτων με βάση την αλληλουχία DNA των μεταγραφόμενων μεσοδιαστημάτων ITS1 και ITS και 5.8S rRNA γονιδίου στο πρόγραμμα Blast.

Όνομα μύκητα που απομονώθηκε	Ομοιότητα	Πιθανά είδη
F.Hil 1	98%-100%	<i>Alternaria alternata</i> <i>Alternaria tenuissima</i> <i>Alternaria cerealis</i>
F.Hil 4	98%-100%	<i>Alternaria alternata</i> <i>Alternaria brassicae</i> <i>Alternaria tenuissima</i>
F.Hil 5	98%-100%	<i>Alternaria alternata</i>
F.Hil 6	98%-100%	<i>Alternaria alternata</i> <i>Alternaria tenuissima</i>

F.Hil 7	98%-100%	<i>Alternaria</i> sp.
F.Hil 8	98%-100%	<i>Alternaria alternata</i> <i>Alternaria brassicae</i>
F.Hil 9	98%-100%	<i>Alternaria alternata</i> <i>Alternaria</i> sp.
F.Hil 10.1	98%-100%	<i>Alternaria tenuissima</i> <i>Alternaria alternata</i> <i>Alternaria brassicae</i> <i>Alternaria</i> sp.
F.Hil 10.2	98%-100%	<i>Alternaria alternata</i> <i>Alternaria chartarum</i> <i>Alternaria fasciculata</i>
F.Hil 11	98%-100%	<i>Alternaria alternata</i> <i>Alternaria tenuissima</i> <i>Alternaria citrimacularis</i>
F.Hir 1	98%-100%	<i>Alternaria terricola</i> <i>Alternaria multiformis</i> <i>Ulocladium</i> sp.
F.Hir 3	98%-100%	<i>Macrophomina</i> <i>phaseolina</i>
F.Hir 4.2	98%-100%	<i>Pyrenochaeta</i> sp.
F.Hir 7	98%-100%	<i>Acrocalymma vagum</i>

Στα φύλλα βρέθηκε το γένος *Alternaria*, ενώ στη ρίζα εκτός από είδη του γένους *Alternaria*, βρέθηκαν και τα είδη *Macrophomina phaseolina*, *Pyrenochaeta* sp. και *Acrocalymma vagum*.

4.2.2.2 Αλληλεπίδραση των ενδοφυτικών μυκήτων με φυτοπαθογόνους μύκητες

Κατά την αλληλεπίδραση των απομονωθέντων ενδοφυτικών μυκήτων με τους φυτοπαθογόνους μύκητες *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *raphani* και *Botrytis cinerea* εντοπίστηκαν κάποιοι συγκεκριμένοι τύποι που καταγράφονται παρακάτω:

Τύποι Αλληλεπίδρασης

1. Ανάπτυξη του ενός μύκητα πάνω στον άλλον (overgrowth)
2. Παύση ανάπτυξης κατά την επαφή (deadlock at contact)
3. Δημιουργία γραμμικής/χρωματισμένης ζώνης (zone/pigmentation line)
 - 3.1. Χωρίς δημιουργία γραμμικής ζώνης/ χρωματισμένης ζώνης (no zone/no pigmentation line)
4. Παύση ανάπτυξης σε απόσταση (deadlock at distance)

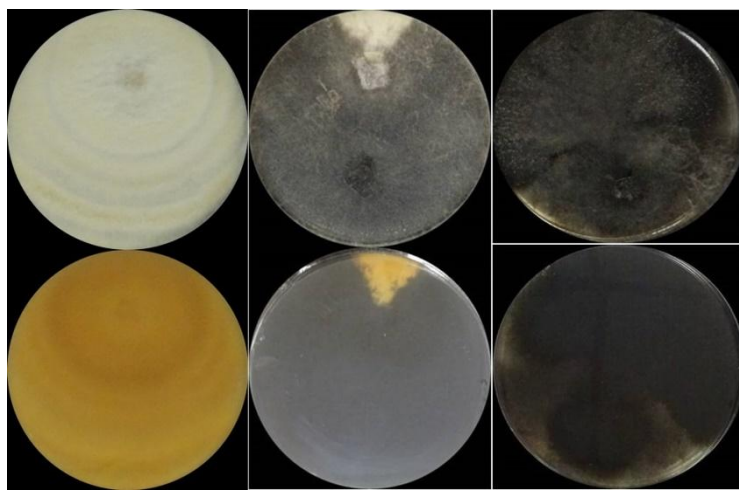
Παρακάτω ακολουθεί ένας συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων, καθώς και εικόνες με αντιπροσωπευτικά παραδείγματα για τον κάθε τύπο αλληλεπίδρασης.

Πίνακας 4.8 Τύποι αλληλεπίδρασης των ενδοφυτικών μυκήτων με τους φυτοπαθογόνους μύκητες *R. solani*, *F. oxysporum* και *B. cinerea*.

Όνομα μύκητα που απομονώθηκε	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
F.Hil 1	1	2	2
F.Hil 4	2,3	1	1

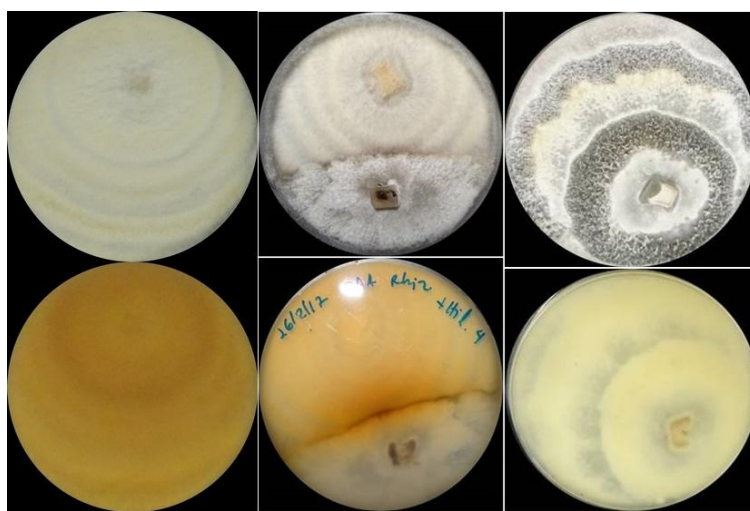
F.Hil 5	1, 3	2	2,3
F.Hil 6	1, 3	2, 3.1	2,3
F.Hil 7	4	4	2
F.Hil 8	1,3	2	1,2
F.Hil 9	1,2	2	1
F.Hil 10.1	1,2	2	1
F.Hil 10.2	2	2	1
F.Hil 11	1	2	2
F.Hir 1	1	2	2
F.Hir 3	1	1	1
F.Hir 4.2	1	2	1
F.Hir 7	1	2	1,2

Ακολουθούν παραδείγματα με φωτογραφίες από την αλληλεπίδραση των φυτοπαθογόνων και ενδοφυτικών μυκήτων.



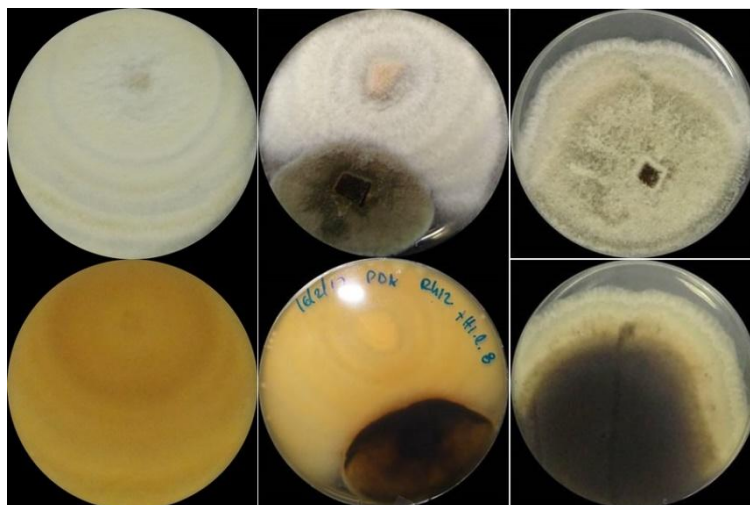
Εικόνα 4.14 Αλληλεπίδραση ενδοφυτικού μύκητα με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Rhizoctonia solani*, που οδηγεί σε τύπο 1 σε διπλή καλλιέργεια (dual culture). Οι φωτογραφίες δείχνουν την μπροστινή και πίσω όψη των τρυβλίων. Στη μέση βρίσκεται η αλληλεπίδραση του ενδοφυτικού μύκητα F.Hir 3 και *R. solani*. Αριστερά και δεξιά βρίσκονται οι μάρτυρες ύστερα από 12 ημέρες επώασης. Ο ενδοφυτικός μύκητας τοποθετήθηκε 3 ημέρες πριν το φυτοπαθογόνο.

Στην εικόνα 4.14 η αλληλεπίδραση μεταξύ του φυτοπαθογόνου και του ενδοφυτικού μύκητα είναι τύπου 1, όπου παρατηρείται η ανάπτυξη του ενός μύκητα πάνω στον άλλον.



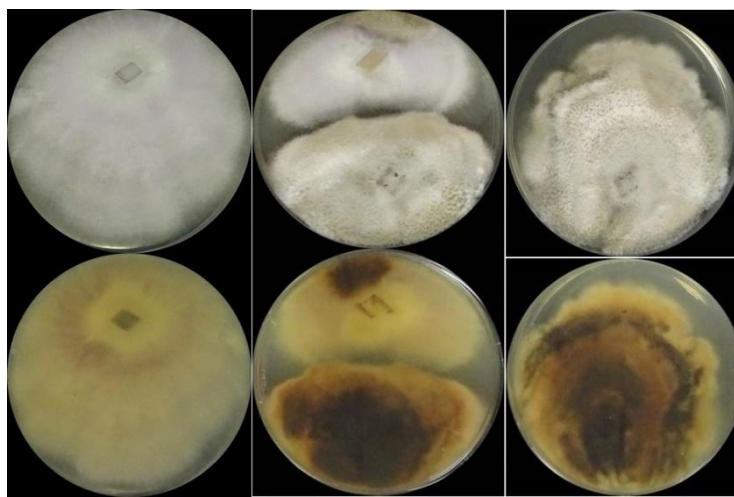
Εικόνα 4.15 Αλληλεπίδραση ενδοφυτικού μύκητα με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Rhizoctonia solani*, που οδηγεί σε τύπο 2 σε διπλή καλλιέργεια (dual culture). Οι φωτογραφίες δείχνουν την μπροστινή και πίσω όψη των τρυβλίων. Στη μέση βρίσκεται η αλληλεπίδραση του ενδοφυτικού μύκητα F.Hil 4 και *R. solani*. Αριστερά και δεξιά βρίσκονται οι μάρτυρες ύστερα από 12 ημέρες επώασης. Ο ενδοφυτικός μύκητας τοποθετήθηκε 3 ημέρες πριν το φυτοπαθογόνο.

Στην εικόνα 4.15 η αλληλεπίδραση μεταξύ του φυτοπαθογόνου και του ενδοφυτικού μύκητα είναι τύπου 2, όπου παρατηρείται η δημιουργία γραμμικής ζώνης με χρωματισμό των υφών σε αυτό το σημείο.



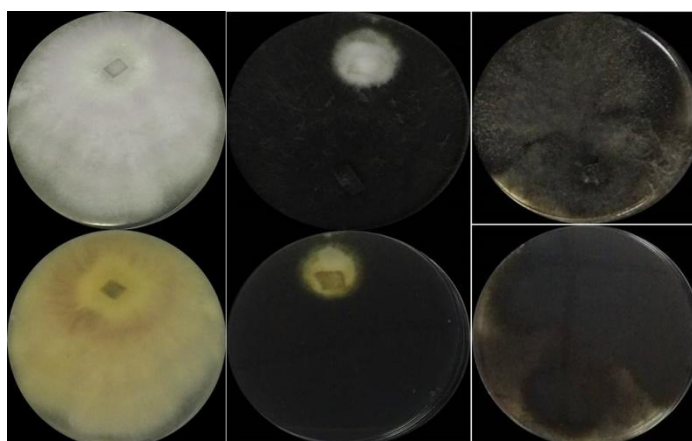
Εικόνα 4.16 Αλληλεπίδραση ενδοφυτικού μύκητα με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Rhizoctonia solani*, που οδηγεί σε τύπο 1 και 3 σε διπλή καλλιέργεια (dual culture). Οι φωτογραφίες δείχνουν την μπροστινή και πίσω όψη των τρυβλίων. Στη μέση βρίσκεται η αλληλεπίδραση του ενδοφυτικού μύκητα F.Hil 8 και *R. solani*. Αριστερά και δεξιά βρίσκονται οι μάρτυρες ύστερα από 12 ημέρες επώασης. Ο ενδοφυτικός μύκητας τοποθετήθηκε 3 ημέρες πριν το φυτοπαθογόνο.

Στην εικόνα 4.16 η αλληλεπίδραση μεταξύ του φυτοπαθογόνου και του ενδοφυτικού μύκητα είναι τύπου 1 σε συνδυασμό με τον τύπο 3, όπου παρατηρείται η ανάπτυξη του ενός μύκητα πάνω στον άλλον, καθώς και η δημιουργία γραμμικής ζώνης και ο χρωματισμός των υφών στο επίμαχο σημείο.



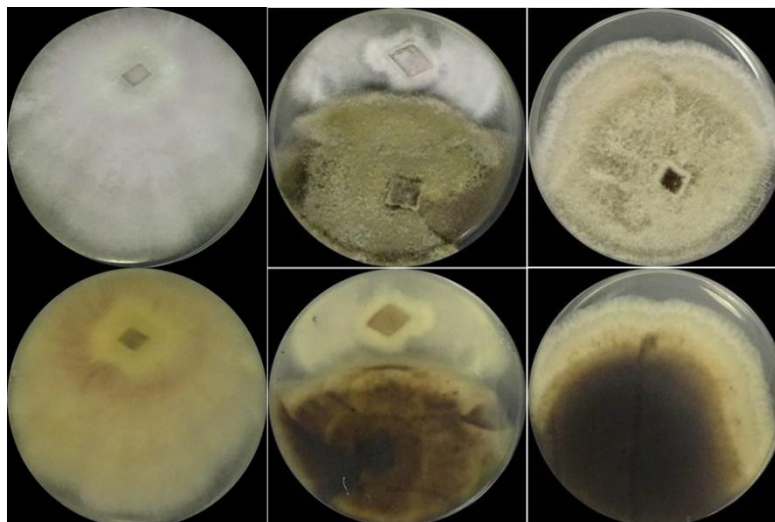
Εικόνα 4.17 Αλληλεπίδραση ενδοφυτικού μύκητα με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum*, που οδηγεί σε τύπο 4 σε διπλή καλλιέργεια (dual culture). Οι φωτογραφίες δείχνουν την μπροστινή και πίσω όψη των τρυβλίων. Στη μέση βρίσκεται η αλληλεπίδραση του ενδοφυτικού μύκητα F.Hil 7 και *F. oxysporum*. Αριστερά και δεξιά βρίσκονται οι μάρτυρες ύστερα από 12 ημέρες επώασης. Ο ενδοφυτικός μύκητας τοποθετήθηκε 3 ημέρες πριν το φυτοπαθογόνο.

Στην εικόνα 4.17 η αλληλεπίδραση μεταξύ του φυτοπαθογόνου και του ενδοφυτικού μύκητα είναι τύπου 4, όπου παρατηρείται παύση ανάπτυξης των μυκήτων σε απόσταση.



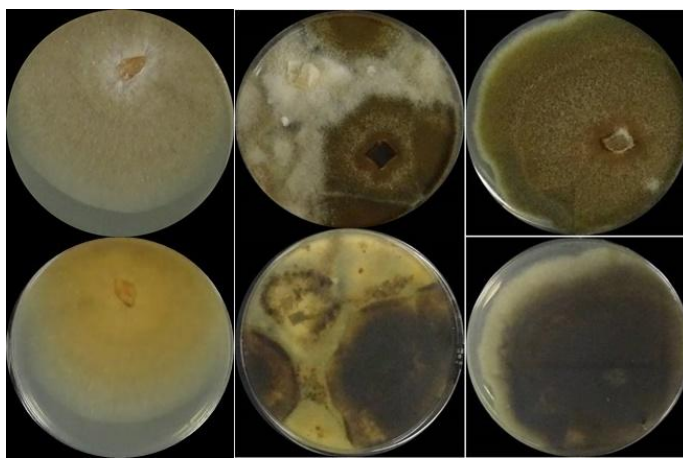
Εικόνα 4.18 Αλληλεπίδραση ενδοφυτικού μύκητα με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum*, που οδηγεί σε τύπο 1 σε διπλή καλλιέργεια (dual culture). Οι φωτογραφίες δείχνουν την μπροστινή και πίσω όψη των τρυβλίων. Στη μέση βρίσκεται η αλληλεπίδραση του ενδοφυτικού μύκητα F.Hir 3 και *F. oxysporum*. Αριστερά και δεξιά βρίσκονται οι μάρτυρες ύστερα από 12 ημέρες επώασης. Ο ενδοφυτικός μύκητας τοποθετήθηκε 3 ημέρες πριν το φυτοπαθογόνο.

Στην εικόνα 4.18 η αλληλεπίδραση μεταξύ του φυτοπαθογόνου και του ενδοφυτικού μύκητα είναι τύπου 1, όπου παρατηρείται ανάπτυξη του ενός μύκητα πάνω στον άλλον.



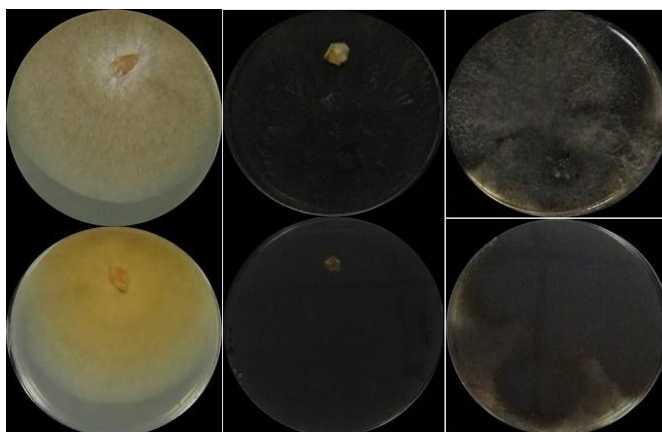
Εικόνα 4.19 Αλληλεπίδραση ενδοφυτικού μύκητα με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum*, που οδηγεί σε τύπο 2 σε διπλή καλλιέργεια (dual culture). Οι φωτογραφίες δείχνουν την μπροστινή και πίσω όψη των τρυβλίων. Στη μέση βρίσκεται η αλληλεπίδραση του ενδοφυτικού μύκητα F.Hil 8 και *F. oxysporum*. Αριστερά και δεξιά βρίσκονται οι μάρτυρες ύστερα από 12 ημέρες επώασης. Ο ενδοφυτικός μύκητας τοποθετήθηκε 3 ημέρες πριν το φυτοπαθογόνο.

Στην εικόνα 4.19 η αλληλεπίδραση μεταξύ του φυτοπαθογόνου και του ενδοφυτικού μύκητα είναι τύπου 2, όπου παρατηρείται παύση ανάπτυξης κατά την επαφή.



Εικόνα 4.20 Αλληλεπίδραση ενδοφυτικού μύκητα με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Botrytis cinerea*, που οδηγεί σε τύπο 2 και 3 σε διπλή καλλιέργεια (dual culture). Οι φωτογραφίες δείχνουν την μπροστινή και πίσω όψη των τρυβλίων. Στη μέση βρίσκεται η αλληλεπίδραση του ενδοφυτικού μύκητα F.Hil 6 και *B. cinerea*. Αριστερά και δεξιά βρίσκονται οι μάρτυρες ύστερα από 12 ημέρες επώασης. Ο ενδοφυτικός μύκητας τοποθετήθηκε 3 ημέρες πριν το φυτοπαθογόνο.

Στην εικόνα 4.20 η αλληλεπίδραση μεταξύ του φυτοπαθογόνου και του ενδοφυτικού μύκητα είναι τύπου 2 και 3, όπου παρατηρείται παύση ανάπτυξης κατά την επαφή και δημιουργία γραμμικής ζώνης, καθώς και χρωματισμός της.



Εικόνα 4.21 Αλληλεπίδραση ενδοφυτικού μύκητα με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Botrytis cinerea*, που οδηγεί σε τύπο 1 σε διπλή καλλιέργεια (dual culture). Οι φωτογραφίες δείχνουν την μπροστινή και πίσω όψη των τρυβλίων. Στη μέση βρίσκεται η αλληλεπίδραση του ενδοφυτικού μύκητα F.Hil 3 και *B. cinerea*. Αριστερά και δεξιά βρίσκονται οι μάρτυρες ύστερα από 12 ημέρες επώασης. Ο ενδοφυτικός μύκητας τοποθετήθηκε 3 ημέρες πριν το φυτοπαθογόνο.

Στην εικόνα 4.21 η αλληλεπίδραση μεταξύ του φυτοπαθογόνου και του ενδοφυτικού μύκητα είναι τύπου 1, όπου παρατηρείται ανάπτυξη του ενός μύκητα πάνω στον άλλον.

4.2.2.3 Αλληλεπίδραση ενδοφυτικών μυκήτων μεταξύ των ίδιων ατόμων

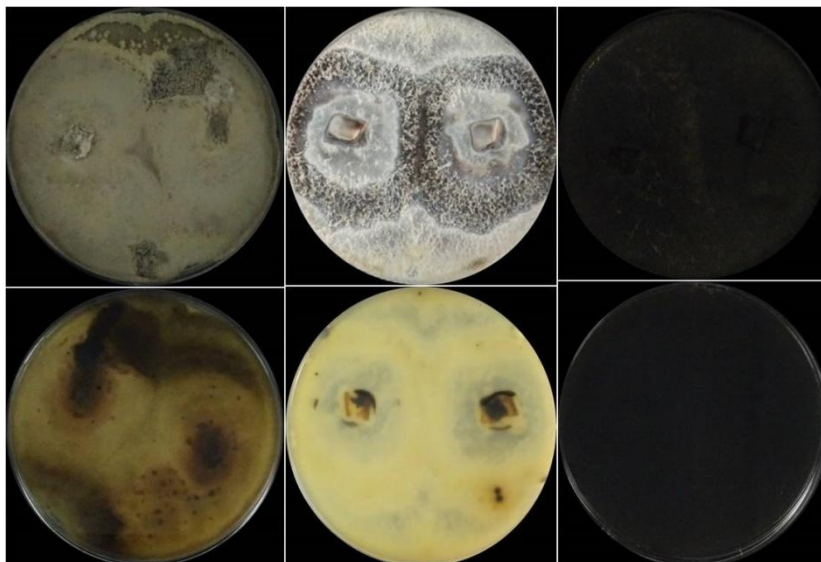
Οι αλληλεπιδράσεις ενδοφυτικών μυκήτων μεταξύ ίδιων ατόμων πραγματοποιήθηκαν με σκοπό την διερεύνηση των σχέσεων που αναπτύσσονται μεταξύ τους στην ενδοφυτική κοινότητα μέσα στο ίδιο το φυτό.

Παρακάτω ακολουθούν οι τύποι που παρατηρήθηκαν κατά τη διπλή καλλιέργεια (dual culture) τμημάτων του ίδιου μύκητα.

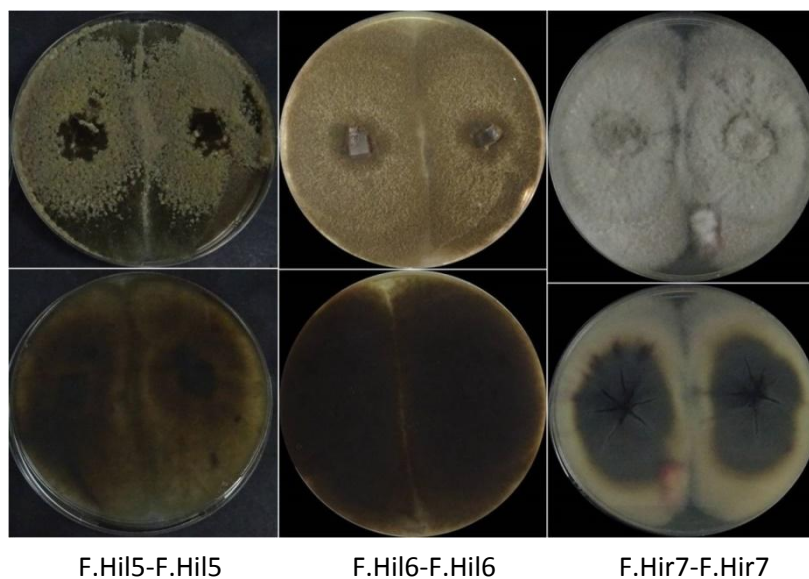
Τύποι αλληλεπίδρασης

1. Πλήρης ένωση (Full merge)
2. Ένωση με τμήματα μη ενωμένα (Merge with patches)
3. Μικρή απόσταση (Small distance)

Ακολουθούν εικόνες αντιπροσωπευτικές για κάθε τύπο αλληλεπίδρασης.



Εικόνα 4.22 Παραδείγματα αλληλεπίδρασης τύπου 1. Οι φωτογραφίες δείχνουν την μπροστινή και πίσω όψη των τρυβλίων. Ο τύπος 1 (πλήρης ένωση) παρατηρείται ύστερα από 20 ημέρες παρατήρησης του μύκητα F.Hil 4.



Εικόνα 4.23 Παραδείγματα αλληλεπίδρασης τύπου 2. Οι φωτογραφίες δείχνουν την μπροστινή και πίσω όψη των τρυβλίων. Ο τύπος 2 (ένωση με τμήματα μη ενωμένα) παρατηρήθηκε ύστερα από παρατήρηση 20 ημερών.



Εικόνα 4.24 Παράδειγμα αλληλεπίδρασης τύπου 3. Οι φωτογραφίες δείχνουν την μπροστινή και πίσω όψη του τρυβλίου. Ο τύπος 3 (μικρή απόσταση) παρατηρήθηκε ύστερα από 20 ημέρες παρατήρησης του μύκητα F.Hir 4.2.

Παρατηρείται πως αρκετοί μύκητες ενώ προέρχονται από την ίδια καλλιέργεια δεν ενώνονται, αλλά διατηρούν μια μικρή απόσταση μεταξύ τους.

5 Συζήτηση

Οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί διαβιούν στο εσωτερικό υγιών φυτικών ιστών και αποτελούν σημαντικό κομμάτι των φυτικών μικρο-οικοσυστημάτων. Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει πως υγιή φαρμακευτικά φυτά αποτελούν ξενιστές πλήθους ενδοφυτικών βακτηρίων και μυκήτων με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά γνωρίσματα, τα οποία προάγουν την ανάπτυξη του φυτικού οργανισμού που τα φιλοξενεί, διευκολύνουν την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών και επάγουν τους μηχανισμούς άμυνας και αντοχής σε συνθήκες βιοτικού και αβιοτικού στρες (Berg et al., 2014; Jia et al., 2017).

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως η ενδοφυτική κοινωνία μυκήτων που απομονώθηκε από το είδος *H. mysorensense* περιλαμβάνει τα γένη *Gliocladium*, *Phomopsis*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Phoma*, *Cylindrotrichum*, *Monodictys*, *Chaetomium*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Xylaria*, *Curvularia*, *Pestalotiopsis*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Alternaria* και *Botryosphaerea* (Samaga et al., 2014). Σε άλλες αναφορές στο γένος *Hypericum* και συγκεκριμένα στο *H.perforatum* τα 21 στελέχη που απομονώθηκαν ταξινομήθηκαν σε 5 γένη, συμπεριλαμβανομένων των *Fusarium* sp., *Mucor* sp., *Aspergillus* sp., *Xylaria* sp. και *Hypocrea* sp. (Zhang et al., 2016). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως μερικοί από τους ενδοφυτικούς μικροοργανισμούς που απομονώθηκαν από το γένος *Hypericum* φαίνεται να παράγουν μεταβολίτες, οι οποίοι συντίθενται και από τον φυτικό οργανισμό (Kusari et al., 2008).

Επιπλέον των ενδοφυτικών μυκήτων, ενδοφυτικά βακτήρια βρέθηκαν να διαβιούν στο εσωτερικό των φυτικών ιστών του *H.perforatum*. Τα ενδοφυτικά αυτά βακτήρια ανήκουν στα γένη *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Serratia* και *Stenotrophomonas* (Egamberdieva et al., 2017). Πολλά από τα βακτήρια που απομονώθηκαν φαίνεται να έχουν ανταγωνιστική δράση έναντι αρκετών φυτοπαθογόνων μυκήτων, καθώς επίσης διαθέτουν και χαρακτηριστικά που προάγουν την ανάπτυξη του φυτικού οργανισμού, όπως η παραγωγή IAA. Τα βακτήρια έδειξαν να έχουν ανταγωνιστική δράση έναντι του φυτοπαθογόνου *Fusarium oxysporum* που προκαλεί σήψη στο ριζικό σύστημα της τομάτας, ενώ βοηθούν στη διέγερση της ανάπτυξής της σε θερμοκηπιακή καλλιέργεια (Egamberdieva et al., 2017).

Τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών είναι ενθαρρυντικά για τη διερεύνηση των ενδοφυτικών μικροοργανισμών και σε άλλα είδη *Hypericum*, όσον αφορά τη δράση τους ως παράγοντες βιολογικού ελέγχου αλλά και προαγωγείς της ανάπτυξης των φυτών. Στην παρούσα μελέτη απομονώθηκαν 100 ενδοφυτικά βακτήρια και 55 μύκητες από υγιείς και επιφανειακά αποστειρωμένους φυτικούς ιστούς που ανήκουν στο *H. hircinum*. Τα 18 βακτήρια που επιλέχθηκαν έδειξαν ανταγωνιστική δράση έναντι όλων των φυτοπαθογόνων μυκήτων που ελέγχθηκαν. Τα αποτελέσματα της παρούσας πτυχιακής μελέτης συμφωνούν με μελέτες σε άλλα είδη φαρμακευτικών φυτών που αποτελούν ξενιστές για ενδοφυτικά βακτήρια, τα οποία φαίνεται να είναι εν δυνάμει παράγοντες βιολογικού ελέγχου (Passari et al., 2015). Οι 17 από τις 18 βακτηριακές απομονώσεις που παρουσιάζουν ανταγωνιστική δράση έναντι των φυτοπαθογόνων μυκήτων, φαίνεται να αποικίζουν τη ρίζα. Ως εκ τούτου, ο ριζικός ιστός συγκριτικά με τον φυλλικό ιστό φαίνεται πως είναι καταλληλότερος ξενιστής μιας ανταγωνιστικής βακτηριακής κοινότητας.

Όλα τα βακτήρια που απομονώθηκαν ανήκουν στο γένος *Bacillus*. Πολλά από τα είδη του γένους *Bacillus*, όπως *Bacillus cereus*, *B. lentus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. insolitus*, *B. brevis*, *B. pumilus*, φαίνεται να αποτελούν παράγοντες ανάπτυξης των φυτών, αλλά και τόνωσης αμυντικών μηχανισμών για την προστασία των φυτών από ασθένειες (Jasim et al., 2015). Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη 8 από τις 18 απομονώσεις φάνηκε να παρουσιάζουν όλα τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα που προάγουν την ανάπτυξη (παραγωγή σιδηροφόρων, διαλυτοποίηση φωσφόρου, ομαδική κίνηση σε επιφάνεια) του φυτικού οργανισμού. Επομένως, προκύπτει πως υπάρχει ένα ευρύ φάσμα ενδοφυτικών βακτηρίων που παρουσιάζουν ωφέλιμα χαρακτηριστικά για τον φυτικό οργανισμό ως προς την ανάπτυξη και την άμυνα του. Ενδιαφέρον θα ήταν να εξεταστεί η επίδραση των ενδοφυτικών βακτηρίων σε άλλον ξενιστή κάτω από ελέγχομενες συνθήκες θερμοκηπίου.

Οι ενδοφυτικοί μύκητες βρίσκονται στο εσωτερικό του φυτικού οργανισμού για μεγάλο μέρος του κύκλου της ζωής τους χωρίς να προκαλούν συμπτώματα παθογενείας στον ξενιστή. Σχεδόν όλοι οι φυτικοί οργανισμοί είναι γνωστό πως είναι ξενιστές ενδοφυτών (Hardoim et al., 2015). Στην παρούσα μελέτη η πλειοψηφία των ενδοφυτικών μυκήτων που απομονώθηκαν από τα φύλλα ανήκει στο είδος *Alternaria*, ενώ ο ριζικός ιστός φάνηκε πως φιλοξενεί ευρύτερο φάσμα ενδοφυτικών μυκήτων (*Alternaria* spp., *Pyrenochaeta* sp., *Acrocalymma vagum* και *Macrophomina phaseolina*). Αρκετοί ερευνητές έχουν αναφέρει πως το γένος *Alternaria* απαντάται και σε άλλα είδη φυτών, όπως στα *Azadirachta indica*, *Pinus tabulaeformis*, *Pongamia pinnata* και γυψόφυλλο, ως το κυρίαρχο είδος σε απομονώσεις από φύλλα και ρίζα (Taware et al., 2013; Porras Alfaro et al., 2014; Guo et al., 2016; Taware et al., 2017).

Οι μύκητες που ανήκουν στο είδος *Alternaria* απαντώνται σε αρκετούς φυτικούς οργανισμούς και ενώ αποτελούν φυτοπαθογόνους οργανισμούς, έχει φανεί πως είναι δυνατόν να διαβιούν στο εσωτερικό του φυτικού οργανισμού χωρίς να του προκαλούν κάποια αρνητική επίδραση (Taware et al., 2013; Guo et al., 2016; Taware et al., 2017). Στην παρούσα μελέτη ταυτοποιήθηκε ο ενδοφυτικός μύκητας *Alternaria* κυρίως στα φύλλα του *H.hircinum* και μάλιστα φαίνεται να έχει ωφέλιμη επίδραση στο φυτό ως παράγοντας βιολογικού ελέγχου έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων. Τα αποτελέσματα αυτά συγκλίνουν και με μελέτες που έγιναν και σε φυτά *Salvia miltiorrhiza*, όπου 3 από τα 28 στελέχη *Alternaria* που απομονώθηκαν φάνηκε να έχουν ευεργετική επίδραση στον φυτικό οργανισμό ως προς τη συσσώρευση βιομάζας και μεταβολιτών (Zhou et al., 2018).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν πως μύκητες του γένους *Alternaria*, καθώς και τα άλλα ενδόφυτα έχουν ανταγωνιστική δράση έναντι των φυτοπαθογόνων που ελέχθησαν. Εργαστηριακές μελέτες έχουν δείξει πως ενδοφυτικά είδη *Alternaria* που απομονώθηκαν από υγιή φυτά της οικογένειας *Cupressaceae* περιορίζουν την ανάπτυξη των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Diplodia seriata*, *Phaeobotryon cupressi* και *Spencermartinsia viticola*. Η απομόνωση του ενδοφυτικού *Alternaria* από *Olea europaea* έδειξε να αναστέλλει εξίσου την ανάπτυξη μεγάλου φασμάτος φυτοπαθογόνων μυκήτων (Malhadas et al., 2016). Επομένως, ενδοφυτικοί μύκητες του γένους *Alternaria* που απομονώθηκαν από το *H. hircinum* μπορούν να αξιοποιηθούν ως παράγοντες βιολογικού ελέγχου και σε άλλα φυτά, ως ρυθμιστές ανάπτυξης, καθώς επίσης και στον κλάδο των αγροχημικών ή αντικαρκινικών φαρμάκων, λόγω της βιολογικής δράσης της υπερφορίνης και της υπερικίνης (Soltani et al., 2014).

6 Βιβλιογραφία

- Afzal, M., Khan, Q. and Sessitsch, A. (2014). Endophytic bacteria: Prospects and applications for the phytoremediation of organic pollutants. *Chemosphere*, 117, 232-242.
- Ahmed, E. and Holmström, S. (2014). Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial Biotechnology*, 7(3), 196-208.
- Akula, R. and Ravishankar, G. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6(11), 1720-1731.
- Ali Ghasemzadeh (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(31).
- Alvin, A., Miller, K. and Neilan, B. (2014). Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. *Microbiological Research*, 169(7-8), 483-495.
- Andreolli, M., Lampis, S., Zapparoli, G., Angelini, E. and 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.
- Antunes, T., Sevinat-Pinto, I., Barroso, J., Cavaleiro, C. and Salgueiro, L. (2004). Micromorphology of trichomes and composition of essential oil of *Teucrium capitatum*. *Flavour and Fragrance Journal*, 19(4), 336-340.
- Bardi, D. and Vivanco, J. (2009). Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell & Environment*, 32(6), 666-681.
- Bashan, Y., Kamnev, A. and de-Bashan, L. (2012). A proposal for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth. *Biology and Fertility of Soils*, 49(1), 1-2.
- Bates, S., Berg-Lyons, D., Caporaso, J., Walters, W., Knight, R. and Fierer, N. (2010). Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *The ISME Journal*, 5(5), 908-917.
- Beerhues, L. (2006). *Hyperforin*. *Phytochemistry*, 67(20), 2201-2207.
- Berg, G. and 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.
- Berg, G., Rybakova, D., Grube, M. and Köberl, M. (2015). The plant microbiome explored: implications for experimental botany. *Journal of Experimental Botany*, 67(4), 995-1002.
- Brader, G., Compant, S., Mitter, B., Trognitz, F. and Sessitsch, A. (2014). Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 30-37.

- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., van Themaat, E. and Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1), 807-838.
- Burges, A., Epelde, L., Blanco, F., Becerril, J. and Garbisu, C. (2017). Ecosystem services and plant physiological status during endophyte-assisted phytoremediation of metal contaminated soil. *Science of The Total Environment*, 584-585, 329-338.
- Coste, A., Vlase, L., Halmagyi, A., Deliu, C. and Coldea, G. (2011). Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 106(2), 279-288.
- Cui, X., Chakrabarty, D., Lee, E. and Paek, K. (2010). Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor. *Bioresource Technology*, 101(12), 4708-4716.
- Darbinian-Sarkissian, N., Darbinyan, A., Otte, J., Radhakrishnan, S., Sawaya, B., Arzumanyan, A., Chipitsyna, G., Popov, Y., Rappaport, J., Amini, S. and Khalili, K. (2005). p27SJ, a novel protein in St John's Wort, that suppresses expression of HIV-1 genome. *Gene Therapy*, 13(4), 288-295.
- Das, K., Tiwari, R.K.S. and Shrivastava, D.K. (2010) Techniques for Evaluation of Medicinal Plant Products as Antimicrobial Agent: Current Methods and Future Trends. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 104-111.
- Delaplace, P., Delory, B., Baudson, C., Mendaluk-Saunier de Cazenave, M., Spaepen, S., Varin, S., Brostaux, Y. and du Jardin, P. (2015). Influence of rhizobacterial volatiles on the root system architecture and the production and allocation of biomass in the model grass *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv. *BMC Plant Biology*, 15(1).
- Doustmorad Zafari, S. and Javad Soleimani, M. (2015). Genetic diversity of *Alternaria alternata* Isolates Causing Potato Brown Leaf Spot, Using ISSR Markers in Iran. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 06(07).
- Eckert, D. and Kim, P. (2001). Mechanisms of Viral Membrane Fusion and Its Inhibition. *Annual Review of Biochemistry*, 70(1), 777-810.
- Edwards, J., Johnson, C., Santos-Medellín, C., Lurie, E., Podishetty, N., Bhatnagar, S., Eisen, J. and Sundaresan, V. (2015). Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(8), 911-920.
- Egamberdieva, D., Wirth, S., Behrendt, U., Ahmad, P. and Berg, G. (2017). Antimicrobial Activity of Medicinal Plants Correlates with the Proportion of Antagonistic Endophytes. *Frontiers in Microbiology*, 8.
- Eljounaidi, K., Lee, S. and Bae, H. (2016). Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases – Review and future prospects. *Biological Control*, 103, 62-68.
- Eljounaidi, K., Lee, S. and Bae, H. (2016). Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases – Review and future prospects. *Biological Control*, 103, 62-68.
- E. López-Fuentes (2012). Bacterial community in the roots and rhizosphere of *Hypericum silenoides* Juss. 1804. *African Journal of Microbiology Research*, 6(11).
- Forni, C., Duca, D. and Glick, B. (2016). Mechanisms of plant response to salt and drought stress and their alteration by rhizobacteria. *Plant and Soil*, 410(1-2), 335-356.

- Gangwar RK, Bhushan G., Singh J, Upadhyay SK and Singh AP: Combined effects of plant growth promoting Rhizobacteria and fungi on *Mung bean* (*Vigna radiata* L.). *Int J Pharm Sci Res* 2013; 4(11): 4422-26.
- Germaine, K., Keogh, E., Garcia-Cabellos, G., Borremans, B., Lelie, D., Barac, T., Oeyen, L., Vangronsveld, J., Moore, F., Moore, E., Campbell, C., Ryan, D. and Dowling, D. (2004). Colonisation of poplar trees by gfp expressing bacterial endophytes. *FEMS Microbiology Ecology*, 48(1), 109-118.
- Glick, B. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169(1), 30-39.
- Hameed, A., Gulzar, S., Aziz, I., Hussain, T., Gul, B. and Khan, M. (2015). Effects of salinity and ascorbic acid on growth, water status and antioxidant system in a perennial halophyte. *AoB PLANTS*, 7.
- Hardoim, P., van Overbeek, L., Berg, G., Pirttilä, A., Compant, S., Campisano, A., Döring, M. and 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.
- Hussain, M., Rahman, M., Fareed, S., Ansari, S., Ahmad, I. and Mohd. Saeed (2012). Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 4(1), 10.
- Ijaz, A., Imran, A., Anwar ul Haq, M., Khan, Q. and Afzal, M. (2015). Phytoremediation: recent advances in plant-endophytic synergistic interactions. *Plant and Soil*, 405(1-2), 179-195.
- Jasim, B., Geethu, P., Mathew, J. and Radhakrishnan, E. (2015). Effect of endophytic *Bacillus* sp. from selected medicinal plants on growth promotion and diosgenin production in *Trigonella foenum-graecum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 122(3), 565-572.
- Jia, M., Chen, L., Xin, H., Zheng, C., Rahman, K., Han, T. and Qin, L. (2016). A Friendly Relationship between Endophytic Fungi and Medicinal Plants: A Systematic Review. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- Johnson, L., Koulman, A., Christensen, M., Lane, G., Fraser, K., Forester, N., Johnson, R., Bryan, G. and Rasmussen, S. (2013). An Extracellular Siderophore Is Required to Maintain the Mutualistic Interaction of *Epichloë festucae* with *Lolium perenne*. *PLoS Pathogens*, 9(5), e1003332.
- Kandel, S., Joubert, P. and Doty, S. (2017). Bacterial Endophyte Colonization and Distribution within Plants. *Microorganisms*, 5(4), 77.
- Kaul, S., Gupta, S., Ahmed, M. and Dhar, M. (2012). Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. *Phytochemistry Reviews*, 11(4), 487-505.
- Kharwar, R., Mishra, A., Gond, S., Stierle, A. and Stierle, D. (2011). Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. *Natural Product Reports*, 28(7), 1208.
- Köberl, M., Schmidt, R., Ramadan, E., Bauer, R. and Berg, G. (2013). The microbiome of medicinal plants: diversity and importance for plant growth, quality and health. *Frontiers in Microbiology*, 4.

- Kubin, A., Wierrani, F., Burner, U., Alth, G. and Grunberger, W. (2005). Hypericin - The Facts About a Controversial Agent. *Current Pharmaceutical Design*, 11(2), 233-253.
- Kusari, P., Kusari, S., Spiteller, M. and 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.
- Kusari, S., Lamshöft, M., Zühlke, S. and Spiteller, M. (2008). An Endophytic Fungus from *Hypericum perforatum* that Produces Hypericin. *Journal of Natural Products*, 71(2), 159-162.
- Lebeis, S. (2014). The potential for give and take in plantâ microbiome relationships. *Frontiers in Plant Science*, 5, 287.
- Lee, B., Farag, M., Park, H., Kloepper, J., Lee, S. and Ryu, C. (2012). Induced Resistance by a Long-Chain Bacterial Volatile: Elicitation of Plant Systemic Defense by a C13 Volatile Produced by *Paenibacillus polymyxa*. *PLoS ONE*, 7(11), e48744.
- Liu, H., Carvalhais, L., Crawford, M., Singh, E., Dennis, P., Pieterse, C. and Schenk, P. (2017). Inner Plant Values: Diversity, Colonization and Benefits from Endophytic Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 8.
- López-Bucio, J., Campos-Cuevas, J., Hernández-Calderón, E., Velásquez-Becerra, C., Farías-Rodríguez, R., Macías-Rodríguez, L. and Valencia-Cantero, E. (2007). *Bacillus megaterium* Rhizobacteria Promote Growth and Alter Root-System Architecture Through an Auxin- and Ethylene-Independent Signaling Mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(2), 207-217.
- Lundberg, D., Lebeis, S., Paredes, S., Yourstone, S., Gehring, J., Malfatti, S., Tremblay, J., Engelbrektson, A., Kunin, V., Rio, T., Edgar, R., Eickhorst, T., Ley, R., Hugenholtz, P., Tringe, S. and Dangl, J. (2012). Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature*, 488(7409), 86-90.
- Ma, Y., Rajkumar, M., Zhang, C. and Freitas, H. (2016). Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *Journal of Environmental Management*, 174, 14-25.
- Malhadas, C., Malheiro, R., Pereira, J., de Pinho, P. and Baptista, P. (2017). Antimicrobial activity of endophytic fungi from olive tree leaves. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(3).
- Mantelin, S. (2003). Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *Journal of Experimental Botany*, 55(394), 27-34.
- Meharg, A. (2012). Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. 3rd edition. Edited by P. Marschner. Amsterdam, Netherlands: Elsevier/Academic Press (2011), 684.
- Experimental Agriculture*, 48(02), 305.
- Miransari, M. (ed.) 2014a. Use of microbes for the alleviation of soil stresses, volume 1. Springer, New York.
- Miliute, I., Buzaitė, O., Baniulis, D. and Stanys, V. (2015). Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance: a review. *Zemdirbyste-Agriculture*, 102(4), 465-478.
- Miller, M. and Bassler, B. (2001). Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55(1), 165-199.

- Neilands, J. (1995). Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *Journal of Biological Chemistry*, 270(45), 26723-26726.
- Niranjan Raj, S., Lavanya, S., Amruthesh, K., Niranjana, S., Reddy, M. and Shetty, H. (2012). Histo-chemical changes induced by PGPR during induction of resistance in pearl millet against downy mildew disease. *Biological Control*, 60(2), 90-102.
- Parsa, S., Ortiz, V., Gómez-Jiménez, M., Kramer, M. and Vega, F. (2018). Root environment is a key determinant of fungal entomopathogen endophytism following seed treatment in the common bean, *Phaseolus vulgaris*. *Biological Control*, 116, 74-81.
- Passari, A., Mishra, V., Saikia, R., Gupta, V. and Singh, B. (2015). Isolation, abundance and phylogenetic affiliation of endophytic actinomycetes associated with medicinal plants and screening for their *in vitro* antimicrobial biosynthetic potential. *Frontiers in Microbiology*, 6.
- Pieterse, C., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A. and Van Wees, S. (2012). Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28(1), 489-521.
- Porras-Alfaro, A., Raghavan, S., Garcia, M., Sinsabaugh, R., Natvig, D. and Lowrey, T. (2014). Endophytic fungal symbionts associated with gypsophilous plants. *Botany*, 92(4), 295-301.
- Qin, Y., Druzhinina, I., Pan, X. and Yuan, Z. (2016). Microbially Mediated Plant Salt Tolerance and Microbiome-based Solutions for Saline Agriculture. *Biotechnology Advances*, 34(7), 1245-1259.
- Mahadevamurthy, M., Channappa, T., Sidappa, M., Raghupathi, M. and Nagaraj, A. (2016). Isolation of phosphate solubilizing fungi from rhizosphere soil and its effect on seed growth parameters of different crop plants. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 022-026.
- Reddy, C. and Saravanan, R. (2013). Polymicrobial Multi-functional Approach for Enhancement of Crop Productivity. *Advances in Applied Microbiology*, 53-113.
- Ríos, J. and Recio, M. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 80-84.
- Roz, N. and Rehavi, M. (2003). Hyperforin inhibits vesicular uptake of monoamines by dissipating pH gradient across synaptic vesicle membrane. *Life Sciences*, 73(4), 461-470.
- Ryan, R., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. and Dowling, D. (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters*, 278(1), 1-9.
- Samaga, P. and Rai, V. (2015). Diversity and bioactive potential of endophytic fungi from *Nothapodytes foetida*, *Hypericum mysorensense* and *Hypericum japonicum* collected from Western Ghats of India. *Annals of Microbiology*, 66(1), 229-244.
- Samaga, P., Rai, V. and Rai, K. (2014). Production of an antimicrobial cytochalasan by an endophytic *Chaetomium globosum* HYML55 from *Hypericum mysorensense* and its RNA secondary structure analysis. *Chemistry and Ecology*, 30(6), 566-578.
- Sánchez-Cañizares, C., Jorrín, B., Poole, P. and Tkacz, A. (2017). Understanding the holobiont: the interdependence of plants and their microbiome. *Current Opinion in Microbiology*, 38, 188-196.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M. and Glick, B. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183, 92-99.

- Schlöter, M., Nannipieri, P., Sørensen, S. and van Elsas, J. (2017). Microbial indicators for soil quality. *Biology and Fertility of Soils*, 54(1), 1-10.
- Shailendra Singh, G. (2015). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 07(02).
- Sharma, S., Sayyed, R., Trivedi, M. and Gobi, T. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springer Plus*, 2(1), 587.
- Smith, S. and De Smet, I. (2012). Root system architecture: insights from *Arabidopsis* and cereal crops. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1595), 1441-1452.
- Soltani, J. and Hosseini Moghaddam, M. (2014). Antiproliferative, Antifungal, and Antibacterial Activities of Endophytic *Alternaria* Species from *Cupressaceae*. *Current Microbiology*, 69(3), 349-356.
- Sharma, S., Kumar, V. and Tripathi, R. (2011). Isolation of Phosphate Solubilizing Microorganism (PSMs) From Soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* 2011, 1 (2):90-95
- Taware A. S. More Y. W. Ghag S. V., Rajurkar S. K., 2017. Screening of endophytic fungi isolated from *Azadirachta indica* A. Juss. for production of enzyme. *Bioscience Discovery*, 8(4): 688-694.
- Jia, M., Chen, L., Xin, H., Zheng, C., Rahman, K., Han, T. and Qin, L. (2016). A Friendly Relationship between Endophytic Fungi and Medicinal Plants: A Systematic Review. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- T. Nikitha, M., B. Sadhana, E. and Vani, S. (2017). Phosphorous and Phosphate Solubilising Bacteria and their Role in Plant Nutrition. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(4), 2133-2144.
- Tiwari, K. and Chittora, M. (2013). Assessment of genetic diversity and distribution of endophytic fungal communities of *Alternaria solani* isolates associated with the dominant *Karanja* plants in Sanganer Region of Rajasthan. *Springer Plus*, 2(1), 313.
- Toumatia, O., Compant, S., Yekkour, A., Goudjal, Y., Sabaou, N., Mathieu, F., Sessitsch, A. and Zitouni, A. (2016). Biocontrol and plant growth promoting properties of *Streptomyces mutabilis* strain IA1 isolated from a Saharan soil on wheat seedlings and visualization of its niches of colonization. *South African Journal of Botany*, 105, 234-239.
- Turner, T., James, E. and Poole, P. (2013). *The plant microbiome*. *Genome Biology*, 14(6).
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M., Touraine, B., Moënné-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dyé, F. and Prigent-Combaret, C. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*, 4.
- Venieraki, A., Dimou, M. and 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), 51-66.
- Venieraki, A., Tsalgatidou, P., Georgakopoulos, D., Dimou, M. and Katinakis, P. (2016). Swarming motility in plant-associated bacteria. *Hellenic Plant Protection Journal*, 9(1), 16-27.

- Verbon, E. and Liberman, L. (2016). Beneficial Microbes Affect Endogenous Mechanisms Controlling Root Development. *Trends in Plant Science*, 21(3), 218-229.
- Vurukonda, S., Vardharajula, S., Shrivastava, M. and SkZ, A. (2016). Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, 184, 13-24.
- Wakelin, S., Chu, G., Broos, K., Clarke, K., Liang, Y. and McLaughlin, M. (2010). Structural and functional response of soil microbiota to addition of plant substrate are moderated by soil Cu levels. *Biology and Fertility of Soils*, 46(4), 333-342.
- Wonnemann, M. (2000). Inhibition of Synaptosomal Uptake of 3H-L-glutamate and 3H-GABA by Hyperforin, a Major Constituent of St. John's Wort The Role of Amiloride Sensitive Sodium Conductive Pathways. *Neuropsychopharmacology*, 23(2), 188-197.
- Zamioudis, C., Mastranesti, P., Dhonukshe, P., Blilou, I. and Pieterse, C. (2013). Unraveling Root Developmental Programs Initiated by Beneficial *Pseudomonas* spp. Bacteria. *PLANT PHYSIOLOGY*, 162(1), 304-318.
- Zeilinger, S., Gupta, V., Dahms, T., Silva, R., Singh, H., Upadhyay, R., Gomes, E., Tsui, C. and Nayak S, C. (2015). Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(2), 182-207.
- Zhou, L., Tang, K. and Guo, S. (2018). The Plant Growth-Promoting Fungus (PGPF) *Alternaria* sp. A13 Markedly Enhances *Salvia miltiorrhiza* Root Growth and Active Ingredient Accumulation under Greenhouse and Field Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 270.
- Zhang H, Ying C and Y Tang Y. (2014). Anti-microbial screening of endophytic fungi from *Hypericum perforatum* Linn. *Pak. J. Pharm. Sci.*, Vol.27, No.5, 1153-1156.
- Zhao, J., Shan, T., Mou, Y. and Zhou, L. (2011). Plant-Derived Bioactive Compounds Produced by Endophytic Fungi. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 11(2), 159-168.