



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

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

**Μελέτη της *in vitro* αλληλεπίδρασης του *Clonostachys rosea*
με ενδοφυτικά βακτήρια και μύκητες**

Μαρία Α. Στογιάννη



ΑΘΗΝΑ

2019

Επιβλέπων καθηγητής: Παναγιώτης Κατινάκης

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Μελέτη της *in vitro* αλληλεπίδρασης του *Clonostachys rosea*
με ενδοφυτικά βακτήρια και μύκητες

Study of the *in vitro* interaction of *Clonostachys rosea* with
endophytic bacteria and fungi

Μαρία Α. Στογιάννη

Επιβλέπων καθηγητής: Παναγιώτης Κατινάκης

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Καθηγητής Παναγιώτης Κατινάκης (Επιβλέπων)

Αναπληρωτής Καθηγητής Γεώργιος Ζερβάκης (Μέλος)

Αναπληρωτής Καθηγητής Ιορδάνης Χατζηπαυλίδης (Μέλος)

Περίληψη

Ο μύκητας *Clonostachys rosea* μπορεί να αποικίσει τους υπέργειους και υπόγειους ιστούς των ζωντανών φυτών, είτε ενδοφυτικά, είτε επιφυτικά. Αναγνωρίζεται ως ωφέλιμος οργανισμός καθώς είναι ένας αποτελεσματικός ανταγωνιστής έναντι πλήθους φυτοπαθογόνων, ενώ συχνά εφαρμόζεται ως παράγοντας βιολογικού ελέγχου (BCA), είτε ως μεμονωμένο στέλεχος, είτε σε συνδυασμό (μείγματα πολλαπλών στελεχών) με άλλους παράγοντες BCA. Η παρασκευή ενός μείγματος που βασίζεται σε πολλαπλά στελέχη του *C. rosea*, απαιτεί προσεκτική μελέτη δεδομένου ότι αυτοί οι μύκητες παρουσιάζουν συνήθως υψηλή ανταγωνιστική δράση κατά τη συνύπαρξή τους με βακτηριακούς και μυκητιακούς παράγοντες βιολογικού ελέγχου εντός του ίδιου είδους ή μεταξύ διαφορετικών ειδών.

Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε τις *in vitro* ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις δύο στελεχών *C. rosea*, Clon.1 και Clon.2, με ωφέλιμους ενδοφυτικούς μύκητες (*Trichoderma* sp., *Beauveria bassiana*, *Metarhizium* sp.) και ενδοφυτικά βακτήρια απομονωμένα από το φαρμακευτικό φυτό *Calendula officinalis*. Παράλληλα, εξετάσαμε τις ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις των στελεχών *C. rosea* με διαφορετικούς φυτοπαθογόνους μύκητες.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι παρ' όλο που υπάρχει μία ανταγωνιστική δράση (overgrowth) στα αρχικά στάδια της συγκαλλιέργειας μεταξύ των δύο στελεχών *C. rosea*, σε μεταγενέστερα στάδια της συγκαλλιέργειας η ανταγωνιστική δράση τους είναι ισορροπημένη και τα δύο στελέχη μυκήτων μπορούν να συνυπάρχουν. Ταυτόχρονα, και τα δύο στελέχη *C. rosea* ήταν πολύ ανταγωνιστικά έναντι των φυτοπαθογόνων μυκήτων που μελετήθηκαν. Σε αλληλεπίδραση με τον μύκητα *Trichoderma* sp. τα δύο στελέχη *C. rosea* συνυπάρχουν μαζί του, ενώ ήταν ιδιαίτερα ανταγωνιστικά έναντι του *Metarhizium* sp.. Τέλος, μελετήθηκε η αλληλεπίδρασή τους με τον *B. bassiana* και βρέθηκε ότι το στέλεχος Clon.1 ήταν εξαιρετικά ανταγωνιστικό εναντίον του, σε σύγκριση με το Clon.2, όπου μπορεί και συνυπάρχει με τον εντομοπαθογόνο μύκητα.

Όλα τα εξεταζόμενα ενδοφυτικά βακτήρια (Cal.r.1, Cal.r.11 και Cal.l.30) ήταν ιδιαίτερα ανταγωνιστικά έναντι του *C. rosea*. Κατά τη διάρκεια της αλληλεπίδρασης του Cal.r.11 ή Cal.l.30 με τα στελέχη *Clonostachys rosea* σχηματίστηκε αρχικά μια μεγάλη ζώνη αναστολής μεταξύ των βακτηρίων και των δύο στελεχών του *Clonostachys* sp.. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια του ανταγωνισμού, το πλάτος της ζώνης αναστολής μειώθηκε σταδιακά. Οι

μύκητες αναπτύχθηκαν και κατέλαβαν την περιοχή που είχε οριστεί προηγουμένως ως ζώνη αναστολής, με πιθανή αποτοξικοποίηση των βακτηριακών αντιβιοτικών ενώσεων. Έτσι, η συνύπαρξη των στελεχών του *Clonostachys rosea* με αυτά τα βακτήρια είναι δυνατή εφ' όσον περιορίζονται χωρικά. Κατά τη διάρκεια της αλληλεπίδρασης του Cal.r.1 με το Clon.2 είχε σχηματιστεί αρχικά μια ζώνη αναστολής, η οποία ωστόσο μειώθηκε σε μεταγενέστερα στάδια της αλληλεπίδρασης. Σε αντίθεση με τον Clon.2, το βακτήριο φαίνεται να εισβάλλει στο αναπτυσσόμενο στέλεχος Clon.1 και να προκαλεί καταστροφή των μυκηλιακών υφών του.

Παρόμοια μελέτη πραγματοποιήθηκε και με το μύκητα *Trichoderma* sp.. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο μυκοπαρασιτικός μύκητας *Trichoderma* sp. είναι εξαιρετικά ανταγωνιστικός έναντι όλων των φυτοπαθογόνων μυκήτων καθώς και έναντι του *Metarhizium* sp.. Ωστόσο, μπορεί να συνυπάρχει με τον μύκητα *B. bassiana*.

Λέξεις κλειδιά: *Clonostachys rosea*, *Bacillus* sp., ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί, αλληλεπίδραση, συμβατότητα, βιολογικός έλεγχος

Abstract

The fungus *Clonostachys rosea* can colonize aboveground and underground tissues of living plants either endophytically or epiphytically. *C. rosea* is recognized as a beneficial organism, because it is an effective antagonist against fungal pathogens of agricultural and horticultural crops, and it is often used as biological control agent (BCA) either singly or in a combination (multi-strain mixtures) with other fungal or bacterial BCA agents. However, construction of a *C. rosea* based multi-strain mixture since these fungi usually show high intra-species or inter-species antagonistic activity with both bacterial and fungi biocontrol agents.

In the present study, we examined the in vitro antagonistic interactions of two *C. rosea* isolates, Clon.1 and Clon.2, with beneficial endophytic fungi (*Trichoderma* sp., *Beauveria bassiana*, *Metarhizium* sp.) and endophytic bacteria isolated from *Calendula officinalis*. In parallel, we also examined the antagonistic interactions of *C. rosea* strains with different fungal pathogens.

The data demonstrated that, although there is an antagonistic activity (overgrowth) at the initial stages of co-culture between two *C. rosea* isolates, at later stages of co-cultivation their antagonistic activity is balanced, and the two fungal strains may co-exist. Both *C. rosea* isolates were highly antagonistic against fungal phytopathogens. Also, both *C. rosea* strains were highly antagonistic against *Metarhizium* sp., but may co-exist with *Trichoderma* sp.. The isolate Clon.1 was highly antagonistic against *B. bassiana*, whereas Clon.2 may coexist with the entomopathogenic fungi *B. bassiana*.

All the examined endophytic bacteria (Cal.r.11, Cal.l.30 and Cal.r.1) were highly antagonistic against *C. rosea*. During the interaction of Cal.r.11 or Cal.l.30 with the *Clonostachys rosea* strains initially a large inhibition zone was formed between the bacteria and both *C. rosea*. However, in the course of competition the width of inhibition zone was gradually reduced. The fungi advanced and occupied the territory previously defines as inhibition zone possibly by detoxifying the secreted bacterial antibiotic compounds. Thus, the co-existence of *Clonostachys* with these bacteria is possible as long as they are spatially separated. During the interaction of Cal.r.1 with the Clon.2 strain initially a large inhibition

zone was formed, which however reduced at later stages of interaction. In contrast, Cal.r.1 appear to invade the developing of Clon.1 strain and causes lysis of the hyphae of the fungi.

A similar study was also carried out with the fungus *Trichoderma* sp.. The results showed that the mycoparasitic fungus *Trichoderma* sp. is highly competitive against all phytopathogenic fungi and against *Metarhizium* sp.. However, it may coexist with *B. bassiana* fungi.

Key words: *Clonostachys rosea*, *Bacillus* sp., endophytic microorganisms, interaction, compatibility, biological control

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη με θέμα «Μελέτη της *in vitro* αλληλεπίδρασης του *Clonostachys rosea* με ενδοφυτικά βακτήρια και μύκητες» εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών «Αγρο-βιοτεχνολογία φυτών και μικροοργανισμών γεωργικής σημασίας».

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέπων καθηγητή μου κ. Κατινάκη, που δέχτηκε να πραγματοποιήσω την μεταπτυχιακή μου διατριβή στο εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας υπό την επίβλεψή του. Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου για την εμπιστοσύνη και την υπομονή που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών, καθώς και για τις συζητήσεις, τις συμβουλές και την καθοδήγηση που μου δόθηκαν, προκειμένου να ολοκληρωθεί επιτυχώς η παρούσα μελέτη.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γεώργιο Ζερβάκη και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ιορδάνη Χατζηπαυλίδη για τον χρόνο που διέθεσαν για την ανάγνωση της μεταπτυχιακής μου διατριβής, ως μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής μου.

Ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω σε όλα τα μέλη του προσωπικού του εργαστηρίου για την αρμονική συνεργασία. Ιδιαίτερα είμαι ευγνώμων στους υποψήφιους διδάκτορες Πωλίνα Τσαλαγιάδου, Ειρήνη – Ευαγγελία Θωμλούδη, Δήμητρα Δούκα και Τάσο – Νεκτάριο Σπαντίδο του εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, για τη βοήθεια, την θερμή συνεργασία, το όμορφο κλίμα καθ' όλη τη διάρκεια πραγματοποίησης της πειραματικής μου μελέτης.

Τέλος, θέλω να εκφράσω την θερμότερη ευγνωμοσύνη στους γονείς μου και τους κοντινούς μου ανθρώπους για την εμπιστοσύνη που μου δείχνουν και τη στήριξη που μου προσφέρουν σε όλες μου τις αποφάσεις.

Περιεχόμενα

	Σελίδες
Περίληψη	4
Abstract	6
Ευχαριστίες	8
Περιεχόμενα	9
1. Εισαγωγή	11
1.1. Η σύγχρονη γεωργία	11
1.2. Η χρήση των μικροοργανισμών ως εναλλακτική λύση	11
1.3. Η χρήση των μυκήτων ως παράγοντες βιολογικού ελέγχου	14
1.4. Οι μηχανισμοί βιολογικού ελέγχου των ενδοφυτικών μυκήτων	14
1.5. Ο μύκητας <i>Clonostachys rosea</i>	18
1.5.1. Τρόποι διαβίωσης του <i>C. rosea</i>	18
1.5.2. Ο <i>C. rosea</i> ως παράγοντας βιολογικού ελέγχου	20
1.5.3. Έλεγχος των φυτοπαθογόνων μυκήτων από τον <i>C. rosea</i>	20
1.5.4. Έλεγχος των φυτοπαρασιτικών νηματωδών από τον <i>C. rosea</i>	23
1.5.5. Έλεγχος των φυτοπαθογόνων εντόμων από τον <i>C. rosea</i>	24
2. Σκοπός Μελέτης	25
3. Υλικά και μέθοδοι	26
3.1. Προέλευση ενδοφυτικών μικροοργανισμών	26
3.2. Προέλευση φυτοπαθογόνων μυκήτων	27
3.3. Αλληλεπίδραση μεταξύ των μικροοργανισμών	28
3.3.1. Αλληλεπίδραση μεταξύ των μυκήτων	28
3.3.2. Αλληλεπίδραση των ενδοφυτικών μυκήτων με τα ενδοφυτικά βακτήρια	29
3.4. Ταυτοποίηση του μύκητα <i>Trichoderma</i> sp.	31
3.4.1. Απομόνωση ολικού γονιδιωματικού υλικού (DNA)	31
3.4.2. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης και καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων (DNA)	32
3.4.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR)	32

3.4.4. Ενίσχυση του τμήματος ITS rRNA του μύκητα	33
3.4.5. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτική αгарόζη	35
3.4.6. Καθαρισμός προϊόντος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης	36
3.4.7. <i>In silico</i> ανάλυση των αλληλουχιών	37
4. Αποτελέσματα	38
4.1. Αλληλεπίδραση του μύκητα <i>Clonostachys rosea</i> με τον εαυτό του	38
4.2. Αλληλεπίδραση του μύκητα <i>Trichoderma</i> sp. με τον εαυτό του	38
4.3. Αλληλεπίδραση των δύο στελεχών του <i>Clonostachys rosea</i> μεταξύ τους	39
4.4. Βιολογικός έλεγχος των φυτοπαθογόνων μυκήτων από τον μύκητα <i>Clonostachys rosea</i> (biocontrol activity)	40
4.5. Βιολογικός έλεγχος των φυτοπαθογόνων μυκήτων από τον μύκητα <i>Trichoderma</i> sp.	45
4.6. Αλληλεπίδραση (interaction) των δύο στελεχών του <i>Clonostachys rosea</i> με άλλους ενδοφυτικούς μύκητες	47
4.7. Αλληλεπίδραση του μύκητα <i>Trichoderma</i> sp. με τους <i>Beauveria bassiana</i> και <i>Metarhizium</i> sp.	51
4.8. Αλληλεπίδραση του μύκητα <i>Clonostachys rosea</i> με τα ενδοφυτικά βακτήρια	53
4.8.1. Αλληλεπίδραση του μύκητα <i>Clonostachys rosea</i> με το βακτήριο Cal.r.11	53
4.8.2. Αλληλεπίδραση του μύκητα <i>Clonostachys rosea</i> με το βακτήριο Cal.l.30	55
4.8.3. Αλληλεπίδραση του μύκητα <i>Clonostachys rosea</i> με το βακτήριο Cal.r.1	57
4.9. Αλληλεπίδραση του μύκητα <i>Trichoderma</i> sp. με τα ενδοφυτικά βακτήρια	59
5. Συζήτηση	61
6. Βιβλιογραφία	64

1. Εισαγωγή

1.1. Η σύγχρονη γεωργία

Παρά τη μεγάλη συνεισφορά της επιστήμης και της τεχνολογίας στον τομέα της φυτικής παραγωγής, το πλήθος του ανθρώπινου πληθυσμού που βρισκόταν σε υποσιτισμό το έτος 2016 έφτανε τα 804,2 εκ. και το 2017 ανήλθε στα 820,8 εκ., τιμές μικρότερες από το έτος 2005 που ανερχόταν στα 945 εκ. (World Health Organization, 2018). Η συνεχής αύξηση του παγκόσμιου ανθρώπινου πληθυσμού απαιτεί αύξηση στην παραγωγή των τροφίμων από τις ήδη καλλιεργούμενες εκτάσεις (Karlsson et al., 2015) με χαμηλό, παράλληλα, κόστος (Kambrekar, 2016).

Στο πέρασμα των τελευταίων 50 ετών, η χρήση των χημικών σκευασμάτων για τον έλεγχο των φυτοπαθογόνων και των χημικών λιπασμάτων έχει οδηγήσει στη σημαντική αύξηση της παγκόσμιας παραγωγής τροφίμων (Karlsson et al., 2015). Ωστόσο, χάνεται και πάλι μεγάλη ποσότητα σοδειάς εξαιτίας των φυτικών εχθρών, με την ανθεκτικότητα των παθογόνων να αποτελεί κύριο μέρος του προβλήματος (Ghorbanpour et al., 2018). Ακόμη, η κατάχρηση και η κακή διαχείριση των συνθετικών μυκητοκτόνων έχουν προκαλέσει σοβαρές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον (Ghorbanpour et al., 2018). Έτσι, δίνεται έμφαση στη προσέγγιση της περιβαλλοντικά φιλικής αντιμετώπισης των καλλιεργητικών εχθρών (Ghorbanpour et al., 2018).

Τα περιβαλλοντικά και οικονομικά μειονεκτήματα που συνδέονται με τη χρήση χημικών μυκητοκτόνων, έχουν ωθήσει στην αύξηση της ζήτησης των εναλλακτικών στρατηγικών για τη μείωση των εφαρμογών τους στη γεωργία και την κηπουρική (Whipps, 2001). Το αγοραστικό κοινό, ευαισθητοποιημένο για την υγεία του αλλά και για την οικολογία ενδιαφέρεται περισσότερο για τα προϊόντα βιολογικής παραγωγής.

1.2. Η χρήση των μικροοργανισμών ως εναλλακτική λύση

Διάφορες μέθοδοι και στρατηγικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν με στόχο την πρόληψη, την βελτίωση ή τον έλεγχο των φυτικών ασθενειών (Ghorbanpour et al., 2018). Η ολοκληρωμένη διαχείριση επιβλαβών οργανισμών (integrated pest management – IPM) είναι μία προσέγγιση της μείωσης της χρήσης των χημικών σκευασμάτων μέσω των

προληπτικών καλλιεργητικών τεχνικών, της χρήσης ανθεκτικών ποικιλιών και της μηχανικής και βιολογικής καταπολέμησης του πληθυσμού των φυτικών παθογόνων (Karlsson et al., 2015). Η βιολογική καταπολέμηση των παθογόνων μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση μικροοργανισμών.

Τα φυτά αλληλεπιδρούν με μικροοργανισμούς που βρίσκονται στη ριζόσφαιρα και τη φυλλόσφαιρα, δηλαδή εξωτερικά των ιστών, αλλά και με αυτούς που βρίσκονται εσωτερικά, δηλαδή την ενδόσφαιρα. Έτσι, υπάρχουν οι μικροοργανισμοί που είναι ελεύθερα διαβιούντες στην περιοχή της ριζόσφαιρας και ονομάζονται ριζοσφαιρικοί (rhizospheric), οι προσδεδεμένοι στην επιφάνεια των φυτών που ονομάζονται επιφυτικοί (epiphytes) και εκείνοι που διαβιούν εσωτερικά στους φυτικούς ιστούς και ονομάζονται ενδοφυτικοί (endophytes). Οι ενδοφυτικοί διαβιούν ολόκληρο ή κάποιο κομμάτι του βιολογικού τους κύκλου ενδοκυτταρικά ή διακυτταρικά στους φυτικούς ιστούς (Selim et al., 2012; Kambreakar, 2016; Santoyo et al., 2016). Το συνολικό γένωμα της μικροβιακής αυτής κοινότητας, είναι μεγαλύτερο από το γένωμα του φυτού και αναφέρεται και ως δεύτερο φυτικό γένωμα (Berendsen et al., 2012). Οι μικροοργανισμοί αυτοί αποτελούν συνολικά το φυτικό μικροβίωμα (plant microbiome) (Kristin & Miranda, 2013; Turner et al., 2013; Hardoim et al., 2015).

Οι σχέσεις του φυτού-ξενιστή με το μικροβίωμά του μπορεί να είναι επιβλαβείς για το φυτό, ουδέτερες αλλά και ωφέλιμες (Turner et al., 2013). Ο ενδοφυτισμός (endophytism) είναι το φαινόμενο της αμοιβαίας σχέσης ενός φυτού και μικροοργανισμού, σύμφωνα με το οποίο το μικρόβιο ζει εντός των ιστών του φυτού χωρίς να προκαλεί συμπτώματα ασθένειας (Wani et al., 2015). Η αμοιβαία σχέση (mutual relationship) ωφελεί τον ενδοφυτικό μικροοργανισμό καθώς προμηθεύεται από το φυτό θρεπτικά στοιχεία, ενέργεια και προστασία από δυσμενείς συνθήκες του περιβάλλοντος, ενώ σε αντάλλαγμα εξυπηρετεί την φυτική ανάπτυξη συνθέτοντας δευτερογενείς μεταβολίτες και ένζυμα, τα οποία ευθύνονται για την επιβίωση του φυτού σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. Η έννοια του «ενδόφυτου» είχε εισαχθεί αρχικά από τον De Bary (1866) και αναφερόταν σε κάθε οργανισμό που βρισκόταν εντός ενός φυτού. Αργότερα, ορίστηκαν όλοι οι μικροοργανισμοί που διαβιούν εντός των φυτών χωρίς συμπτώματα ασθένειας (Wilson, 1995). Οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί έχουν βρεθεί στη πλειοψηφία των φυτών που έχει εξεταστεί

και ποικίλουν ανάλογα με την προέλευση του φυτού, την ηλικία του, τον τύπο του ιστού, την εποχή της δειγματοληψίας και το περιβάλλον (Selim et al., 2012; Kambrekar, 2016).

Καθώς τα φυτά-ξενιστές ελέγχουν αυστηρά την εξάπλωση των ενδόφυτων, αυτά με τη σειρά τους, χρησιμοποιούν ποικίλους μηχανισμούς για την σταδιακή προσαρμογή τους, όπως την παραγωγή βιοδραστικών ουσιών, με σκοπό την εξασφάλιση της συμβίωσης (Kambrekar, 2016). Κάποιες ουσίες χρησιμεύουν στην αντιμετώπιση φυτοπαθολογιών, ενώ άλλες δρουν φυτο-βιοδιεγερτικά αυξάνοντας τη φυτική βιομάζα. Για παράδειγμα, τα ενδόφυτα μπορεί να διεγείρουν την παραγωγή αυξητικών ορμονών του φυτού ή να τις παράγουν κι εκείνα ανεξάρτητα. Κάποιες ουσίες του δευτερογενή μεταβολισμού των μυκήτων έχουν αποδειχθεί χρήσιμες για τη βιομηχανία φαρμάκων (Selim et al., 2012; Kambrekar, 2016).

Οι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί (beneficial microorganisms) μπορούν να προάγουν την ανάπτυξη των φυτών και να ελέγχουν τον πληθυσμό των παθογόνων (Zahir et al., 2004; Kambrekar, 2016), καθώς επίσης, να αποδομούν ξενοβιοτικές ουσίες επιδρώντας συνολικά θετικά στην υγεία του αγρο-οικοσυστήματος (Berg et al., 2017). Στους ωφέλιμους μικροοργανισμούς ανήκουν οι μικροοργανισμοί που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (plant growth promotion microorganisms – PGPMs) και οι παράγοντες βιολογικού ελέγχου (biological control agents ή biocontrol agents – BCAs) (Zahir et al., 2004; Du Jardin, 2012; Kambrekar, 2016). Οι μικροοργανισμοί μπορούν να προάγουν την ανάπτυξη των φυτών με άμεσους μηχανισμούς, στους οποίους συγκαταλέγονται η επαγωγή ή/και η σύνθεση των ενώσεων που προάγουν την φυτική ανάπτυξη, όπως οι ορμόνες αυξίνες και οι κυτοκινίνες, αλλά και η σύνθεση των ενζύμων ή πεπτιδίων που προάγουν την αντοχή σε ποικίλες στρεσογόνες συνθήκες και την θρεπτική διαθεσιμότητα, όπως οι φωσφατάσες και τα σιδηροφόρα (Hanada et al., 2010). Όμως, η προαγωγή της φυτικής αύξησης και ανάπτυξης επιτυγχάνεται και με έμμεσο τρόπο. Στον μηχανισμό αυτό οι μικροοργανισμοί προλαμβάνουν τις επιβλαβείς επιδράσεις των φυτικών εχθρών μέσω του βιολογικού ελέγχου (Hanada et al., 2010).

Στη φυτοπαθολογία, ο όρος «παράγοντας βιολογικού ελέγχου» (biological control agent ή biocontrol agent – BCA) αναφέρεται στη χρήση μικροβιακών ανταγωνιστών για την καταστολή παρασίτων και παθογόνων των φυτών, καθώς και για την επαγωγή της ανθεκτικότητάς τους (Eilenberg et al., 2001; Pal & Gardener, 2006). Ο βιολογικός έλεγχος

(biological control ή biocontrol) περιλαμβάνει την επιλογή και την αξιολόγηση μικροοργανισμών που μπορούν να προωθήσουν την ανάπτυξη φυτών ή να μειώσουν τη μόλυνση από τα φυτοπαθογόνα (Weller et al., 2002). Οι βιολογικοί παράγοντες ελέγχου γενικότερα μειώνουν την παθογενή δραστηριότητα των παθογόνων είτε άμεσα μέσω της ανταγωνιστικής τους δραστηριότητας, είτε έμμεσα μέσω της τροποποιητικής τους επίδρασης στη φυσιολογία και την ανατομία του φυτού (Selim et al., 2012; Ghorbanpoura et al., 2017).

Ο βιολογικός έλεγχος (biocontrol) των φυτικών παθογόνων από μικροοργανισμούς θεωρήθηκε ως μια πιο φυσική και περιβαλλοντικά αποδεκτή εναλλακτική λύση (Whipps, 2001).

1.3. Η χρήση των μυκήτων ως παράγοντες βιολογικού ελέγχου

Οι κύριοι ωφέλιμοι μύκητες με ιδιότητες βιοελέγχου είναι ενδομυκόρριζες, εκτομυκόρριζες και μη παθογόνα στελέχη ορισμένων μυκήτων. Οι μύκητες αυτοί αποικίζουν τους ιστούς της ριζόσφαιρας, της φυλλόσφαιρας και φυτικά όργανα, που είναι εκτεθειμένα σε παθογόνους (Ghorbanpour et al., 2018).

1.4. Οι μηχανισμοί βιολογικού ελέγχου των ενδοφυτικών μυκήτων

Οι ενδοφυτικοί μύκητες για την αναστολή της ανάπτυξης του παθογόνου στο φυτό-ξενιστή και τον πολλαπλασιασμό του, μπορούν να χρησιμοποιήσουν άμεσους μηχανισμούς δράσης, όπως είναι ο ανταγωνισμός για χώρο και θρέψη, η παραγωγή αντιβιοτικών ουσιών και ο μυκοπαρασιτισμός, ή έμμεσους, επάγοντας την ανθεκτικότητα του φυτού (Mejía et al., 2008; Chandrashekara et al., 2012; Daguerre et al., 2014; Ghorbanpour et al., 2018; Latz et al., 2018; De Silva et al., 2019).

Ανταγωνισμός με τα παθογόνα για χώρο και θρέψη

Οι μικροοργανισμοί ανταγωνίζονται μεταξύ τους για να προμηθεύονται από το φυτό κυρίως άνθρακα (Daguerre et al., 2014; Ghorbanpour et al., 2018). Επιπλέον, η προμήθεια σιδήρου από το έδαφος είναι εξίσου σημαντική, καθώς το φυτό και οι ωφέλιμοι

μικροοργανισμοί το χρειάζονται για την ανάπτυξη τους, ενώ στους παθογενείς μύκητες πέρα από την ανάπτυξη, χρησιμεύει στην παθογένεια (Daguerre et al., 2014).

Ο βιολογικός έλεγχος στις ρίζες συμβαίνει με την είσοδο του ενδοφυτικού μύκητα στο πρώτο ή δεύτερο στρώμα των κυττάρων και την ανάπτυξη του στα μεσοκυττάρια διαστήματα (Daguerre et al., 2014), καταλαμβάνοντας αυτές τις θέσεις και καθιστώντας τις μη διαθέσιμες για τους φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς (Latz et al., 2018). Η ταχεία εξάπλωση του ενδοφυτικού μύκητα αποτελεί προτέρημα του και αποσκοπεί στη κυριαρχία του στο φυσικό αυτό θώκο (Latz et al., 2018).

Για να πραγματοποιηθεί ο αποικισμός των ριζών, οι ωφέλιμοι ενδοφυτικοί μύκητες χρειάζεται να είναι αρχικά ανθεκτικοί στις αντιμικροβιακές ουσίες που εκκρίνει το φυτό, όπως είναι οι φυτοαλεξίνες, τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά, και ύστερα να παράγουν τα ίδια πρωτεΐνες και ένζυμα που να τους επιτρέπουν να αποικίσουν τις ρίζες (Ghorbanpour et al., 2018). Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη υδροφοβίνη (hydrophobin) συντελεί στην προσκόλληση των μυκηλιακών υφών στην υδρόφοβη ριζική επιφάνεια. Ενώ, ένζυμα που διασπούν το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα, επιτρέπουν την εισχώριση του ενδοφυτικού μύκητα στον ιστό της ρίζας (Daguerre et al., 2014; Ghorbanpour et al., 2018).

Μυκοπαρασιτισμός

Ο μυκοπαρασιτισμός (mycoparasitism) ορίζεται ως ο παρασιτισμός ενός μύκητα (ξενιστής) από έναν άλλο μύκητα (μυκοπαράσιτο) (Ghorbanpour et al., 2018). Ο μύκητας-παράσιτο μπορεί να είναι βιοτροφικός, παρασιτώντας σε ζωντανό μύκητα-ξενιστή, προσλαμβάνοντας τα θρεπτικά συστατικά από τα ζωντανά κύτταρα ή να είναι νεκροτροφικός, δηλαδή να τρέφεται από τα νεκρά κύτταρά του (Latz et al., 2018).

Ο μυκοπαρασιτισμός μπορεί να πραγματοποιηθεί άμεσα μέσω της φυσικής επαφής των υφών. Σε αυτήν την περίπτωση, ο παρασιτικός μύκητας τυλίγει και διεισδύει στην υφή του ξενιστή μέσω ειδικών κατασκευών που αναπτύσσει, τα haustoria, και εκκρίνει διάφορα ένζυμα ή δευτερογενείς μεταβολίτες. Αυτό συντελεί στην αποδόμηση της μυκηλιακής δομής του μύκητα-ξενιστή και την πρόσληψη των θρεπτικών του από το μυκοπαράσιτο (Daguerre et al., 2014; Latz et al., 2018). Επίσης, υπάρχει και ο έμμεσος μυκοπαρασιτισμός, κατά τον οποίο, ο μυκοπαρασιτικός μύκητας εκκρίνει σε απόσταση ουσίες που συμβάλλουν

στην καταστροφή της μυκηλιακής υφής του ξενιστή και την απελευθέρωση των θρεπτικών ουσιών (Latz et al., 2018).

Σε κάθε περίπτωση, για την επίτευξη της απελευθέρωσης και πρόσληψης των θρεπτικών ουσιών, το μυκοπαράσιτο εκκρίνει ένζυμα που αποδομούν το κυτταρικό τοίχωμα (cell wall degrading enzymes – CWDEs), αντιβιοτικές ουσίες και τοξίνες (Latz et al., 2018). Κάποια ένζυμα που λύνουν το κυτταρικό τοίχωμα είναι οι χιτινάσες (chitinases), γλουκανάσες (glucanases) και πρωτεάσες (proteases) (Daguerre et al., 2014).

Παραγωγή αντιβιοτικών ουσιών

Διάφοροι μύκητες βιολογικού ελέγχου, όπως είδη του γένους *Trichoderma*, εκτομυκορριζικοί μύκητες και ζύμες χρησιμοποιούν τον μηχανισμό παραγωγής ποικίλων αντιβιοτικών ουσιών, με αποτέλεσμα τη μείωση ή καταστολή της ανάπτυξης ή/και του πολλαπλασιασμού των φυτοπαθογόνων (Ghorbanpour et al., 2018).

Ένζυμα που διασπούν την κυτταρική μεμβράνη, δευτερογενής μεταβολίτες και αντιβιοτικές ενώσεις συμβάλλουν συνολικά στην ανταγωνιστική ιδιότητα των παραγόντων βιολογικού ελέγχου. Οι χημικές ενώσεις που έχουν δράση κατά των φυτοπαθογόνων συμπεριλαμβάνουν τις pyrones, peptaibols, gliotoxin, gliovirin, terpenoids, oxidases (Daguerre et al., 2014)

Η τοξικότητα των ουσιών για τους παθογόνους μύκητες εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους, αλλά και τον παθογόνο-στόχο (Daguerre et al., 2014). Ωστόσο, λόγω των διαφορετικών περιβαλλοντικών συνθηκών, τα επίπεδα θρέψης μέσα στο φυτό αλλά και το τρίπτυχο της αλληλεπίδρασης του ενδοφυτικού μύκητα-φυτού-παθογόνου, οι ενδείξεις σε *in vitro* συνθήκες δεν αντιπροσωπεύουν απαραίτητα το αποτέλεσμα σε *in planta* (Latz et al., 2018).

Επαγωγή της διασυστηματικής ανθεκτικότητας του φυτού

Η διασυστηματική ανθεκτικότητα του φυτού μπορεί να πυροδοτηθεί από τους μικροοργανισμούς με δύο τρόπους. Τα φυτά έχουν ορισμένες πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια ανθεκτικότητας (resistance genes) και εντοπίζουν τις πρωτεΐνες που εκκρίνουν τα παθογόνα, επιφέροντας ανθεκτικότητα (De Silva et al., 2019). Η έκθεση του φυτού σε στελέχη των ίδιων ή διαφορετικών παθογόνων (Ghorbanpour et al.,

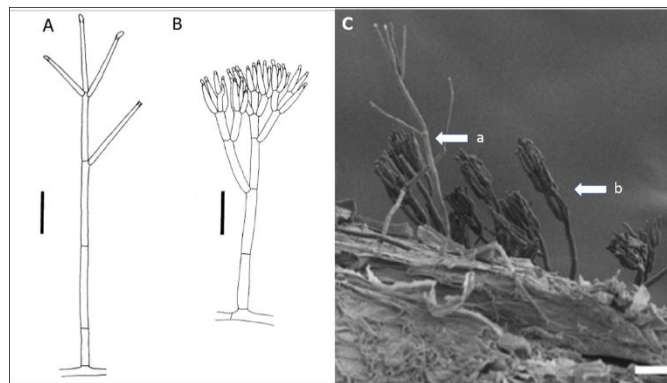
2018), καθώς και σε στελέχη παθογόνων που δεν εκφράζουν παθογένεια στο φυτό (avirulent pathogens) (Daguerre et al., 2014), συμβάλει στη δημιουργία της ανθεκτικότητας του φυτού και κατ' επέκταση την ενεργοποίηση της επίκτητης διασυστηματικής ανθεκτικότητας (systemic acquired resistance – SAR) στις επόμενες μολύνσεις (Daguerre et al., 2014).

Στον δεύτερο τρόπο συμμετέχουν οι παράγοντες βιολογικού ελέγχου. Κατά την επαγόμενη διασυστηματική ανθεκτικότητα (induced systemic resistance – ISR) οι μικροοργανισμοί προκαλούν την ενεργοποίηση του φυτικού αμυντικού συστήματος (Daguerre et al., 2014; Latz et al., 2018; De Silva et al., 2019).

Οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί κατά τη διάρκεια του αποικισμού εκκρίνουν διάφορα ένζυμα, μεταβολίτες και τελεστές (effectors) και από τα κυτταρικά τοιχώματα απελευθερώνουν χιτίνη και β-γλουκάνια, που πυροδοτούν την παραγωγή σήματος στα φυτά. Το σήμα δραστηριοποιεί την αμυντική απόκριση του φυτού στο σημείο της μόλυνσης με αποτέλεσμα την ενίσχυση των δομών παρεμπόδισης της εισόδου του παθογόνου, την παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species – ROS) και των αντιμικροβιακών πρωτεϊνών και μεταβολιτών, καταστέλλοντας την ανάπτυξη του εχθρού (Latz et al., 2018). Έτσι, για την ενεργοποίηση της φυτικής άμυνας μπορούν να χρησιμοποιηθούν εκχυλίσματα των ωφέλιμων μυκήτων (Ghorbanpour et al., 2018).

1.5. Ο μύκητας *Clonostachys rosea*

Ο ασκομύκητας *Clonostachys rosea* ανήκει στην οικογένεια Bionectriaceae της τάξης Hygrocreales, γνωστός άλλοτε και ως *Gliocladium roseum*, είναι η ατελής μορφή (anamorph) του *Bionectria ochroleuca*. Κατά την αναπαραγωγή του τελειόμορφου (teleomorph) μύκητα *B. ochroleuca* σχηματίζονται περιθήκια, τα οποία ανιχνεύονται κυρίως στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές (Schroers et al., 1999). Ο *C. rosea* είναι παγκοσμίως διαδεδομένος και συναντάται σε πολλούς και διαφορετικούς οικοτόπους (Sutton et al., 1997). Αναπαράγεται σχηματίζοντας δύο τύπους κονιδιοφόρων που διαφέρουν στον τύπο διακλάδωσής τους (verticillately branched και penicillately branched) (Sutton et al., 1997; Yu & Sutton, 1997; Schroers et al., 1999) (Εικ. 1.1).



Εικόνα 1.1 Κονιδιοφόροι του *Clonostachys rosea* (A-C). Σχηματική απεικόνιση του *Verticillium*-τύπου (A) κονιδιοφόρου και *Penicillium*-τύπου (B) κονιδιοφόρου, όπου κλίμακα (scale bar) = 20 μm (Schroers et al., 1999), (C) Εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (scanning electron micrographs) ανάπτυξης κονιδιοφόρων πάνω στην επιφάνεια ρίζας αγγουριού, όπου με άσπρο βέλος (a) σημαδεύεται ο *Verticillium*-τύπος και (b) ο *Penicillium*-τύπος, όπου κλίμακα (scale bar) = 100 μm (Chatterton et al., 2008).

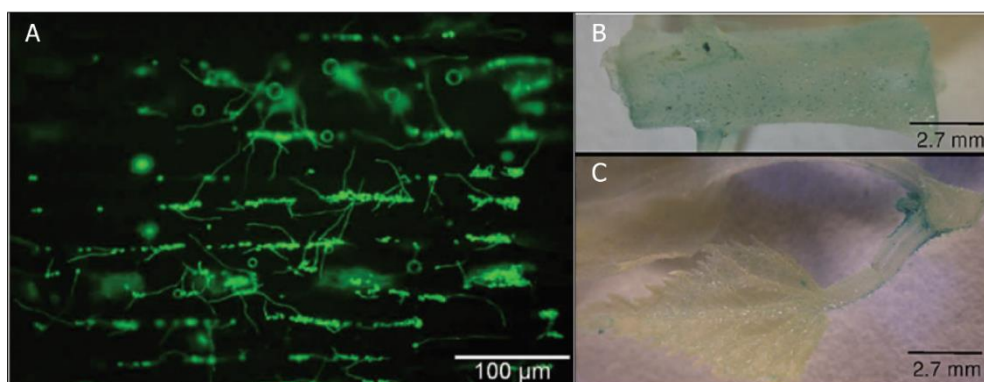
1.5.1. Τρόποι διαβίωσης του *C. rosea*

Ο μύκητας *Clonostachys rosea* εμφανίζεται συχνά στο έδαφος ως σαπροτροφικός αποσυνθέτοντας νεκρά φυτικά τμήματα (Sutton et al., 1997; Schroers et al., 1999) και ευδοκμεί σε εδάφη όξινα (οξύφιλος) με οργανική ύλη και υγρασία (Papavizas, 1985). Επίσης, ο *C. rosea* είναι ενδοφυτικός, καθώς αποικίζει και ζωντανά τμήματα καλλιεργήσιμων φυτών, ζιζανίων και δένδρων χωρίς να προκαλεί συμπτώματα ασθένειας στον ξενιστή (Sutton et al., 1997; Schroers et al., 1999; Jensen et al., 2016; Chatterton et al., 2008). Η ενδοφυτική ανάπτυξη του μύκητα εσωτερικά των ριζών μπορεί να είναι

ενδοκυτταρική ή διακυτταρική (inter- ή intracellular) και να εξελίσσεται διασυστηματικά (systemic) (Schulz & Boyle, 2005). Επίσης, έχει παρατηρηθεί η στενή σύνδεση του *C. rosea* με τα επιδερμικά κύτταρα των ριζικών τριχιδίων, σχηματίζοντας πυκνό δίκτυο πάνω από την ριζική επιδερμίδα (Chatterton et al., 2008; Karlsson et al., 2015).

Κατά την εφαρμογή του *C. rosea* στελέχους ACM941 σε σπόρους μπιζελιού (*Pisum sativum*) και καλλιέργειά τους, διαπιστώθηκε ότι ο μύκητας δεν αποίκισε μόνο το σπερματικό περίβλημα, αλλά επιπλέον την κύρια ρίζα, τις πλευρικές ρίζες και την υποκοτύλη. Η εξάπλωση του μύκητα στο έδαφος επιτυγχανόταν με την ανάπτυξή του στην επιφάνεια και κατά μήκος των αυξανόμενων ριζών του μπιζελιού (Xue, 2003).

Έχει παρατηρηθεί πως ο *C. rosea*, αν και εδαφογενής μύκητας, δεν αναπτύσσεται αποκλειστικά στο ριζικό σύστημα των φυτών. Μπορεί να εξαπλωθεί και διασυστηματικά, καθώς έχει ανιχνευτεί σε βλαστούς, φύλλα, άνθη, καρπούς και σπέρματα (Sutton et al., 1997; Schroers et al., 1999). Για παράδειγμα, έχει απομονωθεί από άνθη, λοβούς και φύλλα κακάο (*Theobroma cacao*) (ten Hoopen et al., 2003). Στην έρευνα του Jensen και συνεργατών (2016), ο μύκητας *C. rosea* στέλεχος IK726 που εξέφραζε το γονίδιο της πρωτεΐνης πράσινου φθορισμού (green fluorescent protein – GFP) εφαρμόστηκε στα πρώτα φύλλα κριθαριού. Η ανάπτυξη του μύκητα βρισκόταν κατά μήκος των επιδερμικών κυττάρων των φύλλων και η δράση του ήταν προστατευτική εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Bipolaris sorokiniana* (Εικ. 1.2). Ακόμη, σε άλλη έρευνα έγινε εφαρμογή του *C. rosea* κατά τη φύτευση σπόρων αγγουριού (*Cucumis sativus* L.) σε πετροβάμβακα και ύστερα από εξήντα ημέρες, ο μύκητας είχε εξαπλωθεί στο υλικό και εμφανιζόταν στις ρίζες και στη κορυφή των βλαστών (Εικ. 1.2) (Chatterton et al., 2008).



Εικόνα 1.2 Φωτογραφίες αποικισμού του *Clonostachys rosea* σε φυτικούς ιστούς (A-C). (A) Εκβλάστηση κωνιδίων και ανάπτυξη των μυκηλιακών υφών (πράσινο) σε φύλλο κριθαριού 24 ώρες μετά την εφαρμογή

του τροποποιημένου με GFP μύκητα στο φυτό (Jensen et al., 2016). Αποικισμός των ριζών (B) και βλαστών (C) αγγουριάς (Chatterton et al., 2008).

1.5.2. Ο *C. rosea* ως παράγοντας βιολογικού ελέγχου

Η σημαντικότητα του *Clonostachys rosea* έγκειται στην ικανότητά του να ανταγωνίζεται πληθώρα φυτικών εχθρών. Έχει αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία η παθογένεια του *C. rosea* σε φυτοπαθογόνους μύκητες, νηματώδεις αλλά και σε έντομα, με αποτέλεσμα την προστασία του φυτού που αποικίζει. Οι μηχανισμοί βιολογικού ελέγχου του *C. rosea* είναι παρόμοιοι με αυτούς των *Trichoderma* spp., δηλαδή ανταγωνισμός θρέψης, μυκοπαρασιτισμός, επαγωγή της ανθεκτικότητας του φυτού, παραγωγή αντιμικροβιακών μεταβολιτών και αποτοξίνωση των μυκοτοξινών και αντιβιοτικών ουσιών (<https://patents.google.com/patent/US9603369>). Γενικότερα, είδη του *Clonostachys* μπορούν να διεγείρουν την ανάπτυξη του φυτού και να επιφέρουν ανθεκτικότητα στα φυτά ώστε να προστατεύονται από μολύνσεις από παθογόνα (Karlsson et al., 2015).

Τα στελέχη του *C. rosea* έχουν καινοτόμα χρήση ως εμβόλια των φυτών, μειώνοντας το ανταγωνιστικό στρες που προκαλείται από άλλους μύκητες, ενώ παράλληλα διεγείρουν την υγεία, την ανάπτυξη και τη παραγωγικότητα του φυτού-ξενιστή τους. Μπορούν αυτά να χρησιμοποιηθούν μόνα τους ή διαδοχικά με μυκητοκτόνα σε ολοκληρωμένη διαχείριση παρασίτων. Αυτά τα χαρακτηριστικά καθώς και η ανθεκτικότητα σε μυκητοκτόνα το καθιστούν ως έναν βιολογικό παράγοντα υψηλού ενδιαφέροντος (Sutton et al., 1997; Xue, 2003; Chatterton et al., 2008; Rodriguez et al., 2011; Karlsson et al., 2015).

1.5.3. Έλεγχος των φυτοπαθογόνων μυκήτων από τον *C. rosea*

Ανταγωνισμός για χώρο

Ο μηχανισμός ανταγωνισμού για χώρο και θρεπτικά συστατικά χρησιμοποιείται από τον *C. rosea* σε τραυματισμένους (Yu & Sutton, 1997) και μη, φυτικούς ιστούς (Chatterton et al, 2008; Borges et al., 2015). Αυτός ο μηχανισμός αποτελεί τον κυριότερο για την καταστολή του παθογόνου *Botrytis cinerea* (Morandi et al., 2000). Η εφαρμογή του *C. rosea* f. *catenulata* σε φυτά αγγουριάς και ο αποικισμός των ριζών από τον βιολογικό παράγοντα είχε ως αποτέλεσμα σημαντικά μειωμένο πλήθος μολύνσεων από τον φυτοπαθογόνο

μύκητα *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*, συγκριτικά με τα φυτά που επιμολύνθηκαν μόνο με τον παθογόνο (Chatterton et al., 2008).

Ο μύκητας *C. rosea* έχει βρεθεί ότι παράγει τις πρωτεΐνες υδροφοβίνες (hydrophobins), οι οποίες γενικά προσδίδουν υδροφοβικότητα, αποτρέπουν την εκβλάστηση των κονιδίων όταν οι συνθήκες είναι αντίξοες, και συμβάλλουν στην διασπορά τους (Dubey et al., 2014). Η μία από τις τρεις υδροφοβίνες που μελετήθηκαν, χρησιμεύει στην πρόσδεση και αποικισμό των ριζών (Dubey et al., 2014).

Καθώς ο *C. rosea* καταφέρνει να μειώνει την μόλυνση του φυτού μέσω της μεγάλης εξάπλωσής του μέσα σε αυτό, ο αριθμός των κονιδίων που εφαρμόζονται κατά τον εμβολιασμό είναι σημαντικός (Borges et al., 2015). Οι Borges και συνεργάτες (2015) υπέδειξαν ότι ο ιδανικός αριθμός εφαρμογής κονιδίων του *C. rosea* είναι 10^6 κονίδια/mL.

Μυκοπαρασιτισμός

Ο μυκοπαρασιτισμός χρησιμοποιείται ευρέως από τον *C. rosea* για την καταστολή της ανάπτυξης άλλων μυκήτων και την κυριαρχία του στο χώρο (Yu & Sutton, 1997). Ο *Clonostachys rosea* παρασιτεί και σκοτώνει τον αντίπαλό του (μυκοπαρασιτισμός) και αξιοποιεί την νεκρή βιομάζα του μυκηλίου (σαπροτροφισμός), όπως και οι μύκητες του γένους *Trichoderma* (Karlsson et al., 2015).

Το στέλεχος ACM941 του *C. rosea* έχει εμφανίσει διέγερση κατά την ανάπτυξή του κοντά σε μυκηλιακές υφές των παθογόνων μυκήτων *Alternaria alternata*, *Aphanomyces euteiches*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*, *F. solani* f. sp. *pisi*, *Mycosphaerella pinodes*, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani* και *Sclerotinia sclerotiorum*, που είχαν εμβολιαστεί μαζί του σε καλλιέργειες *in vitro*. Η διέγερση αυτή προκαλούσε στο μυκήλιο του *C. rosea* πλευρικές διακλαδώσεις που κατευθύνονταν προς το μυκήλιο των παθογόνων (Xue, 2003). Αφού διασταυρώνονταν οι υφές των μυκήτων, το μυκήλιο του βιολογικού παράγοντα τυλιγόταν γύρω από τις υφές των παθογόνων, με αποτέλεσμα την παύση της ανάπτυξης τους. Κατά την αλληλεπίδραση με τον μύκητα *Alternaria alternata* έχει σημειωθεί εισχώρηση (penetration) του *C. rosea* και ανάπτυξή του εσωτερικά του παθογόνου (Xue, 2003). Επίσης, το στέλεχος IK726 του *C. rosea* έχει βρεθεί να μυκοπαρασιτεί τις υφές του *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* σε συνθήκες *in vitro*, καθώς οι υφές του ήταν τυλιγμένες γύρω τους (Karlsson et al., 2015).

Μυκοπαρασιτισμός και δευτερογενής μεταβολισμός

Ο *C. rosea* μπορεί να παράξει πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον μυκοπαρασιτισμό και συμμετέχουν στη λύση του κυτταρικού τοιχώματος φυτοπαθογόνων μυκήτων (Daguerre et al., 2014). Χιτινολυτικό γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο N-acetyl-b-D-glucosaminidase του *C. rosea* IK726, παρατηρήθηκε να εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό κατά την αλληλεπίδραση του βιολογικού παράγοντα ελέγχου με τον παθογόνο μύκητα *Fusarium culmorum* (Mamarabadi et al., 2009). Πέρα από γλουκοσαμιδάση (glucosamidase), ο ωφέλιμος αυτός μύκητας παράγει ενδογλουκανάσες και ενδοχιτινάσες (Mamarabadi et al., 2008a, 2008b, 2009).

Κατά τον μικροβιακό ανταγωνισμό ο *C. rosea* μπορεί να εκκρίνει ουσίες ή ομάδα ουσιών με αντιμυκητιακή δράση που διαχέονται και σχετίζονται με τον δευτερογενή μεταβολισμό (Rodríguez et al., 2011; Daguerre et al., 2014).

Η έκκριση μη πτητικών μεταβολιτών παρατηρήθηκε *in vitro* στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης του *C. rosea*, όπου μετά την αφαίρεση του βιολογικού παράγοντα ελέγχου, τοποθετήθηκε ο μύκητας *Sclerotinia sclerotiorum*. Η ανάπτυξη του παθογόνου είχε κατασταλεί, χάρη στην ομάδα τοξικών πεπτιδίων που εκκρίνονταν από τον *C. rosea* (Rodríguez et al., 2011). Επίσης, κατά την διπλή καλλιέργεια των ίδιων μυκήτων, παρατηρήθηκε στον *S. sclerotiorum* πρωτοπλασματική λύση (collapse), καθώς και αύξηση σε αριθμό και ταυτόχρονα μείωση του μήκους των διακλαδώσεων των υφών που έρχονταν σε επαφή με τη ζώνη παρεμποδισής του *C. rosea* (Rodríguez et al., 2011, 2015).

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιολογία του *C. rosea* για την ανθεκτικότητά του σε τοξίνες που παράγουν άλλοι μύκητες. Ο παθογόνοι μύκητες του γένους *Fusarium*, και κυρίως ο μύκητας *F. graminearum* και *F. culmorum*, καταστέλλουν την ανάπτυξη άλλων μυκήτων παράγοντας την μυκοτοξίνη ζεαραλενόνη (zearalenone – ZEA), την οποία ο *C. rosea* αποτοξινώνει μέσω του ενζύμου λακτονοϋδρολάση ζεαραλενόνης (ZHD101) (zearalenone lactonohydrolase) (Dubey et al., 2014; Kosawang et al., 2014).

Επαγωγή ανθεκτικότητας του φυτού

Ο αποικισμός των ριζών της ελαιοκράμβης από το μύκητα *C. rosea* είχε ως αποτέλεσμα να κατασταλεί η καρκίνωση των ριζών και να αυξηθεί η έκφραση αρκετών γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα του φυτού, τα οποία εντάσσονται στα βιοσυνθετικά

μονοπάτια των φαινυλπροπανοειδών (phenylpropanoid), ιασμονικού οξέος (jasmonic acid) και αιθυλενίου (ethylene) (Lahlali & Peng, 2014). Το αποτέλεσμα αυτό φανερώνει πιθανή επαγωγή διασυστηματικής ανθεκτικότητας (induced systemic resistance – ISR) από τον *C. rosea* στην ασθένεια καρκίνωμα των ριζών της ελαιοκράμβης (Lahlali & Peng, 2014).

Οι μεταχειρίσεις των φυταρίων πεύκου *Pinus radiata* με στελέχη του μύκητα *C. rosea* προκάλεσε την αύξηση της φυτικής μάζας και την επαγωγή διασυστηματικής ανθεκτικότητας εναντίον του μύκητα *Fusarium circinatum* (Moraga-Suazo et al., 2016; Moraga-Suazo & Sanfuentes, 2017). Η αποτελεσματικότητα της προστασίας του φυτού από το παθογόνο φάνηκε να εξαρτάται από τον γενότυπο των στελεχών του μύκητα και των ποικιλιών του *P. radiata* (Moraga-Suazo et al., 2016).

1.5.4. Έλεγχος των φυτοпараσιτικών νηματωδών από τον *C. rosea*

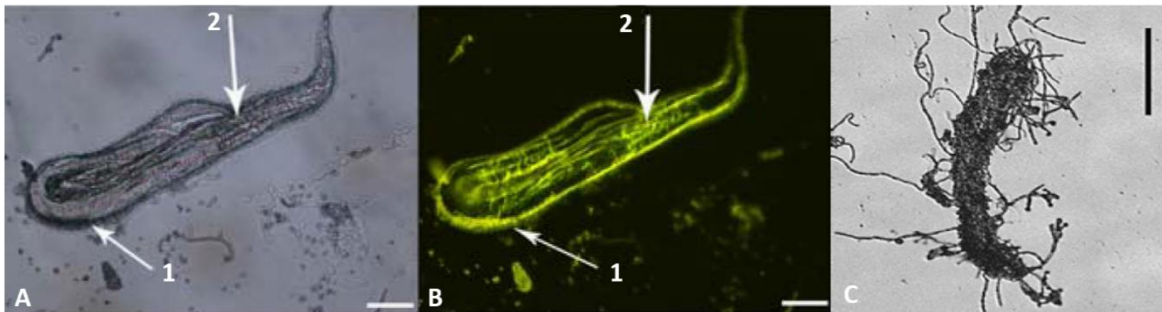
Ο βιολογικός παράγοντας *C. rosea* μπορεί να δράσει φυτοπροστατευτικά κατά των νηματωδών μέσω του μηχανισμού του παρασιτισμού (Zhang et al., 2008) ή μέσω της αντιβίωσης (Iqbal et al., 2017).

Ορισμένα στελέχη του γένους *Clonostachys* επιδρούν σε ένα εύρος διαφορετικών φυτοпараσιτικών νηματωδών μέσω του άμεσου παρασιτισμού σε ορισμένα στάδια του βιολογικού κύκλου των νηματωδών, συμπεριλαμβανομένων των αυγών και κυστών (Zou et al., 2010). Σύμφωνα με έρευνα των Zhang και συνεργατών (2008) η παθογένεια των κονιδίων του *C. rosea* είχε ξεκινήσει με την προσκόλλησή τους στην επιδερμίδα των νηματωδών και εκβλάστησή τους, ακολουθούμενη από την εισχώρησή στα σώματα των νηματωδών, με συνέπεια τη νέκρωση και αποσύνθεση των φυτοπαθολόγων. Επιπλέον, ο *C. rosea* συμπεριφέρεται ως δυνητικό παράσιτο κατά των νηματωδών των προβάτων (Ahmed et al., 2014).

Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι η εφαρμογή του στελέχους *C. rosea* IK726 μείωσε το πλήθος των νηματωδών στο έδαφος και στις ρίζες των φυτών, ενώ τα γένη των μη-παρασιτικών νηματωδών δεν προσβλήθηκαν (Iqbal et al., 2017). Η μικροσκοπική εξέταση της *in vitro* αλληλεπίδρασης του *C. rosea* με νηματώδη δεν φανέρωσε ενδείξεις άμεσου παρασιτισμού. Φιλτραρισμένη καλλιέργεια του *C. rosea*, στείρα μικροοργανισμού,

παρουσίασε τοξικότητα κατά των νηματωδών. Έτσι, ο πιθανότερος μηχανισμός υπεύθυνος για τον ανταγωνισμό είναι η αντιβίωση παρά ο άμεσος παρασιτισμός (Iqbal et al., 2017).

Ο *C. rosea* έχει αναφερθεί ότι παράγει ένζυμα όπως εξωκυτταρικές πρωτεάσες σερίνης (Zhao et al., 2005; Li et al., 2006; Zou et al., 2010) και χιτινάσες (Gan et al., 2007; Tzelepis et al., 2015), τα οποία συμβάλλουν στη διαδικασία της μόλυνσης, και νηματοδοκτόνους μεταβολίτες όπως λεπτοσίνες, χητορακίνη Α, χαιτοκίνη και γλυκολαδίνες Α, Β, C, D και Ε (Dong et al., 2004; Song et al., 2016), τα οποία μπορούν να ενταχθούν στη βιοπροστατευτική δράση εναντίον των φυτοпараσιτικών νηματωδών (Iqbal et al., 2017).



Εικόνα 1.3 Παρασιτισμός του *C. rosea* επί νηματωδών (Α-С). (Α-В) Προσκολλημένα κονίδια του *C. rosea* πάνω στην επιδερμίδα του νηματώδους (βέλος 1) και κονίδια που έχουν βλαστήσει και το μυκήλιο έχει εισχωρήσει εντός του νηματώδους (βέλος 2), όπου κλίμακα (scale bar) = 20 μm. Στη Β εικόνα φαίνεται ο μύκητας *C. rosea* με πράσινο χρώμα καθώς τροποποιήθηκε με την πρωτεΐνη πράσινου φθορισμού (Zhang et al., 2008). (С) Η ανάπτυξη των μυκηλιακών υφών του *C. rosea* έξω από τον μολυσμένο νηματώδη, όπου κλίμακα (scale bar) = 50 μm (Zhao et al., 2005).

1.5.5. Έλεγχος των φυτοπαθογόνων εντόμων από τον *C. rosea*

Έχει αναφερθεί η παθογένεια του *Clonostachys rosea* έναντι φυτοπαθογόνων εντόμων. Ο βιολογικός παράγοντας *C. rosea* έχει απομονωθεί από νεκρά έντομα της οικογένειας Cicadellidae, *Oncometopia tucumana* και *Sonesimia grossa*, τα οποία ήταν καλυμμένα με λευκό μυκήλιο. Ακολούθησε η επιμόλυνση του *C. rosea* σε ζωντανά έντομα των ίδιων γενών εντόμων και προσέβαλε ένα μέρος αυτών (Toledo et al., 2006). Επίσης, έχει βρεθεί να εκφράζει παθογένεια στο έντομο *Hypothenemus hampei*, της οικογένειας Curculionidae (Vega et al., 2008). Ακόμη, ο εμβολιασμός του μύκητα *C. rosea* σε φυτά κρεμμυδιού *Allium cepa* μείωσε το πλήθος των προσβολών και των αυγών του εντόμου *Thrips tabaci* (Muvea et al., 2014).

2. Σκοπός μελέτης

Γενικά, τα μικροβιακά συστατικά ενός μικροβιακού μείγματος μικροοργανισμών που προάγουν την φυτική ανάπτυξη (PGPMs) θεωρούνται συμβατά όταν συγκαλλιεργούνται *in vitro* σε κοινό μέσο ανάπτυξης και έρχονται είτε σε επαφή, είτε σε κοντινή απόσταση, χωρίς να έχουν κατασταλτική δράση (αναστολή της ανάπτυξης). Έτσι, η *in vitro* ανταγωνιστική αλληλεπίδραση μεταξύ των βιολογικών παραγόντων σε ένα στερεό μέσο (διπλή καλλιέργεια) εκτιμήθηκε ως ένα επιτυχημένο εργαλείο για την αξιολόγηση της συμβατότητάς τους με πολλούς μηχανισμούς βιολογικού ελέγχου (Jain et al., 2012, Singh et al., 2013, Varkey et al., 2018). Στην παρούσα μελέτη η πρόθεσή μας ήταν να αποκτήσουμε περισσότερες γνώσεις σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις δύο στελεχών του γένους *Clonostachys rosea* με άλλους βακτηριακούς ή μυκητιακούς εν δυνάμει βιολογικούς παράγοντες ελέγχου (BCAs) και η επιλογή εκείνων των παραγόντων που είναι συμβατοί με τον μύκητα *C. rosea* ύστερα από δοκιμές της διπλής καλλιέργειας *in vitro*.

3. Υλικά και Μέθοδοι

Για την μελέτη της ικανότητας του βιολογικού ελέγχου του *Clonostachys rosea*, επιλέχθηκαν οικονομικά σημαντικοί φυτοπαθογόνοι μύκητες. Επίσης, παρατηρήθηκε η αλληλεπίδραση του *C. rosea* με τον εαυτό του και με άλλους ενδοφυτικούς μύκητες, αλλά και με βακτήρια. Ακόμη, έγινε ταυτοποίηση του γένους του μύκητα *Trichoderma* sp..

3.1. Προέλευση ενδοφυτικών μικροοργανισμών

Οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, είχαν απομονωθεί σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας και παραχωρήθηκαν για την περαιτέρω μελέτη τους. Οι μικροοργανισμοί απομονώθηκαν από διαφορετικά φυτικά είδη τα οποία συλλέχθηκαν από τον πειραματικό αγρό του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στα Σπάτα. Το ένα από τα δύο στελέχη του ενδοφυτικού μύκητα *Clonostachys rosea* (Clon.1) και ο μύκητας *Trichoderma* sp. απομονώθηκαν από το φαρμακευτικό φυτό *Teucrium polium* και παραχωρήθηκαν από την υποψήφια διδάκτορα Ειρήνη-Ευαγγελία Θωμλούδη. Το άλλο στέλεχος του μύκητα *Clonostachys rosea* (Clon.2) απομονώθηκε από το φυτικό είδος *Olea europaea* από τον υποψήφιο διδάκτορα Τάσο-Νεκτάριο Σπαντίδο. Τέλος, οι εντομοπαθογόνοι μύκητες *Beauveria bassiana* και *Metarhizium* sp. καθώς και τα ενδοφυτικά βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, απομονώθηκαν από υγιείς ιστούς φύλλων και ρίζας του φαρμακευτικού φυτού *Calendula officinalis* και παραχωρήθηκαν από την υποψήφια διδάκτορα Πωλίνα Τσαλγατίδου.

Οι μελετώμενοι μύκητες είχαν ταυτοποιηθεί σε επίπεδο γένους με βάση την αλληλούχιση της ενδιάμεσης περιοχής ITS1 (Internal Transcribed Spacer) του ριβοσωμικού DNA (rDNA). Τα μελετώμενα βακτήρια είχαν ταυτοποιηθεί σε επίπεδο γένους από προηγούμενες μελέτες μέσω της αλληλούχισης μονής κατεύθυνσης του ριβοσωμικού τμήματος 16S (16S rDNA) και βρέθηκαν βακτήρια του γένους *Bacillus* spp..

3.2. Προέλευση φυτοπαθογόνων μυκήτων

Οι φυτοπαθογόνοι μύκητες *Colletotrichum acutatum* και *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τη συλλογή του εργαστηρίου Γεωργικής Γενετικής και Βιοτεχνολογίας του ΤΕΙ Πελοποννήσου. Οι μύκητες *Rhizoctonia solani* και *Verticillium dahliae* ανήκουν στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και παραχωρήθηκαν στο εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας. Τέλος, ο μύκητας *Phomopsis* sp. (πιθανά μη παθογόνος σε ληθαργική κατάσταση, latent pathogen) απομονώθηκε από τη ρίζα ασυμπτωματικού φυτού *Olea europaea* από τον πειραματικό αγρό του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα Σπάτα, από τον υποψήφιο διδάκτορα Τάσο- Νεκτάριο Σπαντίδο.

Η μελέτη των συγκεκριμένων μυκήτων έγινε καθώς σύμφωνα με τη βιβλιογραφία εμφανίζουν σημαντική παθογένεια στα φυτά μειώνοντας σε μεγάλο βαθμό την απόδοση και τη ποιότητα της παραγωγής, προκαλώντας έτσι σημαντικές οικονομικές απώλειες στους καλλιεργητές.

Ο μύκητας *Rhizoctonia solani* προκαλεί νέκρωση φυταρίων, σήψη ριζών (root rot), σήψη λαιμού (collar rot), έλκος στο βλαστό (stem canker), σήψη κορυφής (crown rot), σήψη οφθαλμών και καρπών (bud and fruit rot) (Blazier & Conway, 2004). Το γένος *Fusarium* προκαλεί καταστρεπτικές ασθένειες, όπως είναι οι αδρομυκώσεις, οι σηψιρριζίες, οι σήψεις βάσεως και ριζών (crown and root rot), σήψεις του στελέχους, τήξεις σπορείων αλλά και εναέριες προσβολές ανθών (Charif & Bentamon, 1990; Lagorodi et al., 2002; Kamilova et al., 2006; Τζάμος, 2007; Manzo et al., 2016; Punja & Rodriguez, 2018). Ο μύκητας *Verticillium dahliae* προκαλεί αδρομυκώσεις και εκκρίνει τοξίνες, οι δράση των οποίων εμφανίζει χλώρωση στο φυτό που νοσεί (Τζάμος, 2007). Σε μεγάλο εύρος φυτών προκαλεί την ασθένεια ανθράκωση ο *Colletotrichum acutatum* (Marcelino et al., 2008; Jayawardena et al., 2016), ο οποίος έχει χαρακτηριστεί ως οργανισμός καραντίνας στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα από το 1993 (Faedda et al., 2011). Τέλος, είδη μυκήτων που ανήκουν στο γένος *Phomopsis* προκαλούν έλκη και μαρασμό φυτών (Rossman et al., 2007) και σήψη σε καρπούς κατά την αποθήκευση (Lee et al., 2001; Elena, 2009; Luongo et al., 2011).

3.3. Αλληλεπίδραση μεταξύ των μικροοργανισμών

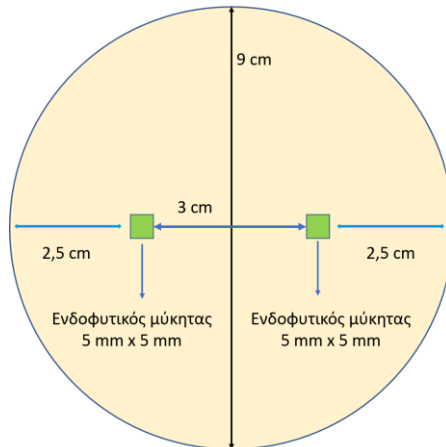
Η αλληλεπίδραση των μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της διπλής καλλιέργειας (dual culture). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή οι μικροοργανισμοί εμβολιάζονται σε συγκεκριμένη απόσταση μεταξύ τους, σε τρυβλία Petri (διαμέτρου 9 cm) που περιέχουν το κατάλληλο στερεό θρεπτικό μέσο (25 ml) και επωάζονται σε σκοτεινό μέρος με σταθερή θερμοκρασία τους 25°C. Για κάθε μικροοργανισμό που μελετήσαμε, υπήρχαν και τα αντίστοιχα τρυβλία μάρτυρες, ενώ για τον κάθε συνδυασμό των μικροοργανισμών καθώς και για τον αντίστοιχο μάρτυρα, πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις. Η παρακολούθηση της ανάπτυξης και των αλληλεπιδράσεων των μικροοργανισμών πραγματοποιούνταν σε καθημερινή βάση.

3.3.1. Αλληλεπίδραση μεταξύ των μυκήτων

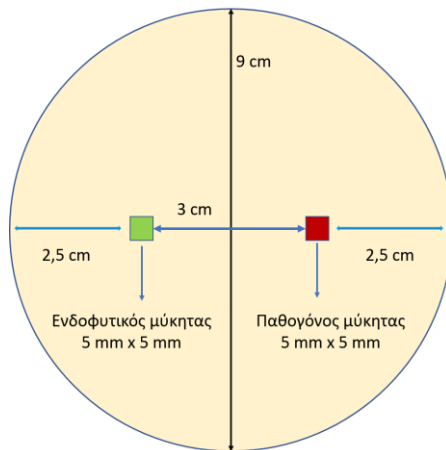
Οι μύκητες εμβολιάστηκαν ανά δύο σε τρυβλία Petri με στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης Potato Dextrose Agar (PDA), στερεοποιημένο με άγαρ 1,5%, σε όλους τους συνδυασμούς μεταξύ τους αλλά και με τον εαυτό τους.

Για κάθε έναν από τους παραπάνω συνδυασμούς ο εμβολιασμός των μυκήτων πραγματοποιήθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες και εμβολιάστηκαν σε δύο σημεία με κομμάτι άγαρ (5 mm x 5 mm). Το κάθε κομμάτι άγαρ είχε υφές μύκητα από καλλιέργεια 7 ημερών και τοποθετήθηκε σε απόσταση 2,5 cm από την άκρη του τρυβλίου Petri, ώστε τα δύο κομμάτια άγαρ να έχουν μεταξύ τους 3 cm απόσταση (Σχεδιάγραμμα 3.1). Οι ενδοφυτικοί μύκητες Clon.1, Clon.2 και *Trichoderma* sp. εμβολιάστηκαν με τον ίδιο τρόπο με τους φυτοπαθογόνους μύκητες, για την μελέτη των ανταγωνιστικών τους ικανοτήτων (Σχεδιάγραμμα 3.2).

Αξίζει να σημειωθεί, ότι οι μύκητες είχαν διαφορετικό ρυθμό ανάπτυξης μεταξύ τους. Με στόχο να συναντηθούν οι μυκηλιακές υφές στο κέντρο της μεταξύ τους απόστασης, για την επιτυχή μελέτη, κάποιοι μύκητες εμβολιάστηκαν μερικές ημέρες νωρίτερα στο θρεπτικό μέσο από το ζευγάρι τους. Οι μύκητες των οποίων ο ρυθμός ανάπτυξης συμβάδιζε, εμβολιάστηκαν ταυτόχρονα στο τρυβλίο Petri.



Σχεδιάγραμμα 3.1 Σχηματική αναπαράσταση των αποστάσεων μεταξύ των ενδοφυτικών μυκήτων κατά τη διπλή καλλιέργειά τους (dual culture) σε τρυβλίο Petri με στερεό θρεπτικό μέσο PDA.



Σχεδιάγραμμα 3.2 Σχηματική αναπαράσταση των αποστάσεων μεταξύ ενδοφυτικών μυκήτων και παθογόνων κατά τη διπλή καλλιέργειά τους (dual culture) σε τρυβλίο Petri με στερεό θρεπτικό μέσο PDA.

3.3.2. Αλληλεπίδραση των ενδοφυτικών μυκήτων με τα ενδοφυτικά βακτήρια

Τα ενδοφυτικά βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της αλληλεπίδρασης των στελεχών του *Clonostachys rosea* και του *Trichoderma* sp., είναι συνολικά τρία. Τα βακτήρια αυτά ανήκουν στο γένος *Bacillus* και είχαν ονομαστεί με βάση το φυτό (γένος *Calendula*) και τον ιστό του φυτού (leave, root) από όπου απομονώθηκαν. Τα βακτήρια που μελετήθηκαν ήταν τα στελέχη με τη συντομογραφία Cal.r.1, Cal.r.11 και Cal.l.30.

Η αλληλεπίδραση των ενδοφυτικών μυκήτων με τα ενδοφυτικά βακτήρια πραγματοποιήθηκε επίσης με τη μέθοδο της διπλής καλλιέργειας (dual culture), σε τρυβλία Petri διαμέτρου 9 cm. Ο κάθε συνδυασμός των μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκε σε

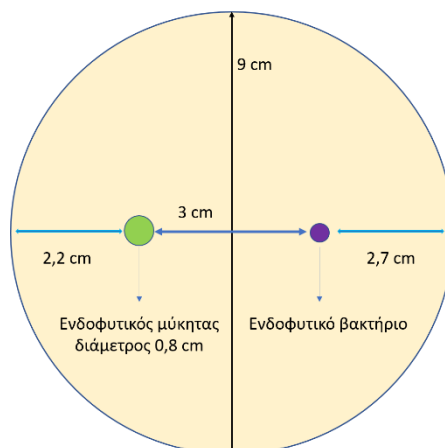
δύο διαφορετικά θρεπτικά μέσα, το ένα ήταν ημι-στερεό θρεπτικό μέσο NA (Nutrient Agar) στερεοποιημένο με άγαρ 0,5% και το άλλο NA στερεοποιημένο με άγαρ 1,5%. (Πίνακας 3.2). Ο εμβολιασμός των τρυβλίων έγινε σε κάθε περίπτωση υπό ασηπτικές συνθήκες. Ο κάθε συνδυασμός επαναλήφθηκε 2 φορές.

Ανάλογα με τον ρυθμό ανάπτυξης των ενδοφυτικών μυκήτων, προηγήθηκε ο εμβολιασμός τους έναντι των βακτηρίων. Συγκεκριμένα, ο μύκητας *Trichoderma* sp. εμβολιάστηκε 1 ημέρα πριν από το εκάστοτε βακτηριακό στέλεχος, το στέλεχος Clon.1 εμβολιάστηκε 2 ημέρες νωρίτερα, ενώ ο μύκητας Clon.2 προηγήθηκε 5 ημέρες των βακτηριακών στελεχών Cal.r.1, Cal.r.11 και Cal.l.30.

Για την κάθε μεταχείριση ο μύκητας εμβολιάστηκε με στρογγυλό κομμάτι άγαρ (0,8 cm) με τις υφές του να προέρχονται ύστερα από καλλιέργεια 7 ημερών σε θρεπτικό μέσο PDA. Το κομμάτι άγαρ τοποθετήθηκε σε απόσταση 2,2 cm από την άκρη του τρυβλίου Petri (Σχεδιάγραμμα 3.3).

Για τον εμβολιασμό των βακτηριακών στελεχών Cal.r.1, Cal.r.11 και Cal.l.30, έγινε αρχικά η ενεργοποίησή τους από τους -80°C. Με χρήση ασηπτικής τεχνικής, μικρή ποσότητα της καλλιέργειας από τους -80 °C εμβολιάστηκε σε αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό μέσο NB (Nutrient Broth). Μετά την επώαση τους στους 30°C για 18-20 ώρες σε ανακινούμενο επωαστή, 4 μl υγρής καλλιέργειας κάθε βακτηρίου εμβολιάστηκε με μορφή κηλίδας (spot) σε απόσταση 3 cm από τον εκάστοτε ενδοφυτικό μύκητα (Σχεδιάγραμμα 3.3). Για τον κάθε συνδυασμό πραγματοποιήθηκαν 2 επαναλήψεις.

Τα τρυβλία σφραγίστηκαν με parafilm και τοποθετήθηκαν για επώαση σε σκοτεινό μέρος στους 25 °C, ενώ η παρακολούθησή τους γινόταν καθημερινά



Σχεδιάγραμμα 3.3 Σχηματική αναπαράσταση των αποστάσεων των ενδοφυτικών μυκήτων και των βακτηρίων, κατά τη διπλή καλλιέργειά τους (dual culture) σε τρυβλίο Petri με θρεπτικό μέσο NA.

3.4. Ταυτοποίηση του μύκητα *Trichoderma sp.*

Καθώς η ταυτοποίηση του γένους του μύκητα *Trichoderma sp.* απαιτούσε επιβεβαίωση, επαναλήφθηκε η ακολουθία των διεργασιών για την απομόνωση του ολικού γονιδιωματικού υλικού του μύκητα, τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης και καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων, την ενίσχυση των τμημάτων DNA με την τεχνική της PCR, την ηλεκτροφόρηση μέρους της ποσότητας του PCR προϊόντος και καθαρισμού του υπόλοιπου προϊόντος προς αποστολή για ταυτοποίηση του μύκητα.

3.4.1. Απομόνωση ολικού γονιδιωματικού υλικού (DNA)

Για την απομόνωση DNA του μύκητα *Trichoderma sp.* τροποποιήθηκαν τα πρωτόκολλα των Izumitsu και συνεργατών (2012) και των Dörnte και Kües (2013).

Ο μύκητας *Trichoderma sp.* ανακαλλιεργήθηκε σε τρυβλίο Petri με στερεό θρεπτικό μέσο PDA μέχρι να αναπτυχθεί σε όλο το μέσο, στη συνέχεια λήφθηκε ασηπτικά με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας μικρή ποσότητα των υφών (1-5mg) με προσοχή ώστε να μην παραληφθεί θρεπτικό μέσο. Το τμήμα των υφών τοποθετήθηκε ασηπτικά εντός δοχείου errendorf που περιείχε 150 μl διπλά απεσταγμένο αποστειρωμένο νερό ddH₂O.

Ύστερα, ακολούθησε η διαδικασία της μηχανικής διάρρηξης και θερμόλυσης των κυτταρικών τοιχωμάτων του μύκητα για την απομόνωση του DNA. Το δοχείο errendorf, που περιείχε τις υφές του μύκητα και 150 μl ddH₂O, τοποθετήθηκε για 5 λεπτά σε ξηρό υδατόλουτρο (heatblock) ρυθμισμένο στους 70°C και στη συνέχεια ανακινήθηκε για 1 λεπτό στο μηχάνημα vortex. Τα δύο αυτά βήματα επαναλήφθηκαν ακόμη μία φορά. Έπειτα, το δοχείο errendorf μεταφέρθηκε για 5 λεπτά στους -80°C και γρήγορα ξανά στους 70°C για 1 λεπτό, κατόπιν ανακινήθηκε στο μηχάνημα vortex για 30 δευτερόλεπτα. Ακολούθως, το δοχείο errendorf φυγοκεντρήθηκε για 15 λεπτά στις 11.000 στροφές για την καθίζηση των κυτταρικών συστατικών. Από το υπερκείμενο που σχηματίστηκε και περιείχε το DNA του μύκητα, λήφθηκε ποσότητα 80 μl και μεταφέρθηκε προσεκτικά σε καινούργιο αποστειρωμένο δοχείο errendorf. Τέλος, καταγράφηκε η συγκέντρωση των νουκλεϊνικών οξέων καθώς και η καθαρότητά τους (βλ. Κεφ. 3.4.2).

3.4.2. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης και καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων (DNA)

Τα νουκλεϊνικά οξέα χάρη στους ετεροκυκλικούς δακτυλίους των νουκλεοτιδίων απορροφούν υπεριώδες φως σε συγκεκριμένο μήκος κύματος με μέγιστο τα 260 nm. Με τη χρήση του UV φασματοφωτόμετρου nanodrop (NanoDrop® ND1000 Spectrophotometer) καταγράφηκε η συγκέντρωση και η οπτική πυκνότητα (optical density, OD) για τον προσδιορισμό της καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων στο υδατικό διάλυμα. Οι τιμές που προκύπτουν από τον λόγο OD_{260nm}/OD_{280nm} και OD_{260nm}/OD_{230nm} σε δείγματα υψηλής καθαρότητας, πρέπει να κυμαίνονται μεταξύ 1,8-2,0. Σε περίπτωση που οι τιμές είναι μικρότερες, τότε το υδατικό διάλυμα με το DNA του μήκητα περιέχει και άλλες προσμίξεις που αλλοιώνουν τη μέτρηση.

Για τη πραγματοποίηση της μέτρησης, ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- Επιλογή στο λογισμικό της συσκευής η ένδειξη DNA
- Μηδενισμός του οργάνου με μεταφορά στην υποδοχή της συσκευής 1 μl ddH₂O
- Τοποθέτηση 1 μl δείγματος DNA στην υποδοχή της συσκευής
- Καταγραφή της αναλογίας OD_{260nm}/OD_{280nm} και OD_{260nm}/OD_{230nm} και αξιολόγηση της καθαρότητας του δείγματος

3.4.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια *in vitro* μέθοδος που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA σε πολλά αντίγραφα σε σύντομο χρόνο.

Για τον πολλαπλασιασμό των επιθυμητών αλληλουχιών νουκλεοτιδίων, είναι απαραίτητη η ανάμειξη των ακόλουθων αντιδραστηρίων: το DNA που περιέχει την αλληλουχία-στόχο, δύο ολιγονουκλεοτίδια που λειτουργούν ως εκκινητές (primers), DNA πολυμεράση, ιόντα Mg²⁺ που αποτελούν σημαντικό συμπράγοντα της DNA πολυμεράσης και τέσσερα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται

σε όργανα που ονομάζονται συσκευές PCR (PCR machines) ή θερμοκυκλοποιητές (thermocyclers). Τα όργανα αυτά προγραμματίζονται και εκτελούν καθορισμένο αριθμό κύκλων των τριών διαδοχικών βημάτων που ακολουθούν με συγκεκριμένη χρονική διάρκεια και θερμοκρασία.

Τα στάδια ενός κύκλου PCR που πραγματοποιείται, είναι:

- 1) Αποδιάταξη (denaturation) – κατά την οποία αποδιατάσσεται το δίκλωνο DNA λόγω υψηλής θερμοκρασίας (92-95°C).
- 2) Πρόσδεση των εκκινητών (primer annealing) – κατά την οποία οι εκκινητές προσδένονται στις αλυσίδες λόγω της μείωσης της θερμοκρασίας στους 45-65 °C και σχηματισμού δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων.
- 3) Επιμήκυνση των εκκινητών (primer extension) – κατά την οποία σε θερμοκρασία 65-75 °C η DNA πολυμεράση προσθέτει νουκλεοτίδια στα ελεύθερα 3' άκρα των εκκινητών, συνθέτοντας το αντίγραφο της συμπληρωματικής αλυσίδας της μήτρας DNA.

3.4.4. Ενίσχυση του τμήματος ITS rRNA του μύκητα

Η αναγνώριση των ειδών μπορεί να πραγματοποιηθεί με την τεχνική του γραμμωτού κώδικα DNA (barcoding DNA) με βάση τις διαφορές σε μικρές περιοχές του DNA (Hebert et al., 2003). Μία αλληλουχία DNA μικρού μήκους, που έχει ουσιαστική γενετική μεταβλητότητα ανά είδος και συντηρημένες πλευρικές περιοχές για τη χρήση καθολικών εκκινητών (Hollingsworth et al., 2009), συγκρίνεται με αντίστοιχες αλληλουχίες άλλων οργανισμών (Hebert et al., 2003).

Με σκοπό την μεγαλύτερη πιθανότητα επιτυχούς ταυτοποίησης των μυκήτων, χρησιμοποιείται η περιοχή ITS rRNA (Schoch et al., 2012). Στο γονιδίωμα των μυκήτων υπάρχουν δύο ενδομεταγραφόμενες περιοχές (internal transcribed spacer, ITS), η ITS1 και η ITS2, οι οποίες μαζί με το γονίδιο 5.8S αναφέρονται γενικά ως ITS.

Με την αντίδραση PCR ενισχύθηκαν οι περιοχές ITS1, 5.8S και ITS2, με το μέγεθος του προϊόντος της αντίδρασης να ανέρχεται στα 600 ζεύγη βάσεων. Με σκοπό να ενισχυθεί η περιοχή ITS rRNA του μύκητα, χρησιμοποιήθηκαν οι καθολικοί εκκινητές (universal primers)

ευθείας κατεύθυνσης (Forward) 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' και αντίστροφης κατεύθυνσης (Reverse) 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (Dörnte & Kües, 2013).

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR χρησιμοποιήθηκε το kit HotStart Taq DNA Polymerase της εταιρείας Applied Biological Materials Inc. (abm®) και η ποσότητα των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκε αναφέρεται στον πίνακα 3.1. Η χρήση μίας αντίδρασης μάρτυρα, στην οποία δεν είχε προστεθεί το DNA του μύκητα, επιβεβαίωσε πως η ύπαρξη προϊόντος δεν είναι αποτέλεσμα επιμόλυνσης.

Ο θερμοκυκλοποιητής προγραμματίστηκε να εκτελεί τα στάδια της PCR σύμφωνα με τον πίνακα 3.2. Ύστερα από την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το δείγμα φυλάχθηκε στους 4°C.

Πίνακας 3.1 Ποσότητες συστατικών αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση (μl)
Γονιδιωματικό DNA	1 μl
Εκκινητής ευθείας κατεύθυνσης (Forward) (10 μM)	1 μl
Εκκινητής αντίστροφης κατεύθυνσης (Reverse) (10 μM)	1 μl
Μείγμα dNTPs (mM)	1 μl
10 x PCR ρυθμιστικό διάλυμα	5 μl
DMSO	2 μl
Taq DNA πολυμεράση (1unit/μl)	0,5 μl
ddH ₂ O	38,5 μl

Πίνακας 3.2 Πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε στη συσκευή PCR.

Στάδιο της PCR	Διάρκεια σταδίου	Θερμοκρασία	Επανάληψη
Αρχική αποδιάταξη του DNA	10 λεπτά	94°C	-
Αποδιάταξη	30 δευτερόλεπτα	94°C	
Υβριδισμός εκκινητών	30 δευτερόλεπτα	55°C	35 κύκλοι
Επιμήκυνση της αλυσίδας DNA	1.5 λεπτό	72°C	
Τελική επιμήκυνση	5 λεπτά	72°C	-

Από την αντίδραση που πραγματοποιήθηκε, ηλεκτροφορήθηκε ποσότητα 8 μl σε πηκτή αγαρόζης (βλ. Κεφ. 3.7) και αφού επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη του προϊόντος, η υπόλοιπη ποσότητα της αντίδρασης υπέστη καθαρισμό (βλ. Κεφ. 3.4.6).

3.4.5. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αγαρόζης

Η πηκτή αγαρόζης παρασκευάστηκε με κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης η οποία διαλύθηκε σε κωνική φιάλη με ορισμένο όγκο διαλύματος ηλεκτροφόρησης 1 x TAE (40 mM Tris, 20 mM οξικό οξύ, 1 mM EDTA).

Για την παρασκευή της πηκτής, λήφθηκε ορισμένη ποσότητα αγαρόζης (0,75gr) και διαλύθηκε σε κωνική φιάλη με 50 ml διαλύματος ηλεκτροφόρησης 1 x TAE (40 mM Tris, 20 mM οξικό οξύ, 1 mM EDTA).

Στη συνέχεια, η φιάλη θερμάνθηκε και το περιεχόμενό της αναδεύτηκε μέχρι τη πλήρη διάλυση της αγαρόζης. Στην ίδια φιάλη προστέθηκε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου τελικής συγκέντρωσης 0,5 μg/ml. Το διάλυμα περιχύθηκε σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης για την πήξη και σταθεροποίησή του. Στο ένα άκρο της ρευστής αγαρόζης τοποθετήθηκε κατάλληλη «χτένα» για τον σχηματισμό «πηγαδιών» η οποία στην συνέχεια αφαιρέθηκε αφού σταθεροποιήθηκε η πηκτή. Τέλος, η συσκευή συμπληρώθηκε με το διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1 x TAE μέχρι να καλυφθεί η πηκτή και να απέχει 1-2 mm από την επιφάνεια.

Το προϊόν της PCR αναμίχθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (0,25% w/v κυανού της βρωμοφαινόλης, 0,25% w/v κυανόλη του ξυλενίου, 30% v/v γλυκερόλη) σε ποσότητα 1/10 όγκου του δείγματος και τοποθετήθηκε σε ένα από τα «πηγάδια» φόρτωσης.

Ηλεκτροφορώντας το DNA σε πηκτή αγαρόζης, τα τμήματά του διαχωρίζονται με βάση το μέγεθος και άρα το μοριακό τους βάρος και τη διαμόρφωση τους στη πηκτή. Αυτό επιτυγχάνεται χάρη στην εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου στα άκρα της πηκτής, με αποτέλεσμα το DNA, ένα μόριο αρνητικά φορτισμένο, να κινηθεί προς το θετικό πόλο. Οι μικρότερου μήκους αλληλουχίες νουκλεοτιδίων κινούνται ταχύτερα δια μέσου της πηκτής, απομακρυνόμενα περισσότερο από το αρχικό σημείο της τοποθέτησης του προϊόντος της PCR, ενώ τα μεγαλύτερα τμήματα γενετικού υλικού κινούνται αργότερα. Το εύρος των μεγεθών που μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτή αγαρόζης βασίζεται στη συγκέντρωση της

αγαρόζης. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της αγαρόζης, τόσο μικρότεροι πόροι σχηματίζονται κατά την πήξη της, ύστερα από την διάλυση της σε κατάλληλο διαλύτη, και άρα τόσο μικρότερα μόρια DNA μπορούν να διαχωριστούν.

Η πηκτή αγαρόζης, περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο και όταν εκτίθεται σε υπεριώδης ακτινοβολία, τα τμήματα DNA που προέκυψαν κατά την αντίδραση PCR εμφανίζονται ως φωτεινή ζώνη.

Η φωτογράφιση των ζωνών DNA της πηκτής πραγματοποιήθηκε σε κατάλληλη συσκευή με σύστημα οπτικοποίησης, όπου δέχτηκε υπεριώδη ακτινοβολία.

3.4.6. Καθαρισμός προϊόντος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Το GeneJET PCR Purification Kit της εταιρείας Thermo Scientific χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό του προϊόντος PCR.

Στο προϊόν της PCR προστέθηκε διάλυμα δέσμευσης (binding buffer, χατροπικό άλας) όγκου 42 μl (1:1) και αναδεύτηκε με την πιπέτα. Το διάλυμα πρέπει να αλλάξει χρώμα σε κίτρινο, ώστε οι συνθήκες pH να είναι κατάλληλες για τη δέσμευση του DNA στη μεμβράνη κολώνας. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε η μεταφορά του διαλύματος στην κολώνα (GeneJet purification column), η οποία βρισκόταν μέσα σε δοχείο συλλογής. Μετά από την φυγοκέντρηση σε 13000 rpm για 1 λεπτό, το δοχείο συλλογής απορρίφθηκε. Στην κολώνα προστέθηκαν 700 μl του διαλύματος πλύσης (wash buffer, αιθανόλη). Ακολούθησε ξανά η φυγοκέντρηση σε 13000 rpm για 1 λεπτό και το περιεχόμενο του δοχείου συλλογής απορρίφθηκε. Για την πλήρη απομάκρυνση της αιθανόλης, η φυγοκέντρηση επαναλήφθηκε. Η κολώνα μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο δοχείο erpendorf και προστέθηκαν στο κέντρο της μεμβράνης 50 μl διαλύματος έκλουσης (elution buffer, Tris-HCl). Επαναλήφθηκε μία ακόμη φορά φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 λεπτό για την έκλουση του DNA.

Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του DNA προϊόντος μετρήθηκε (βλ. Κεφ.3.4.2) και αποθηκεύτηκε στους -20 °C. Το γονιδιακό προϊόν του μήκητα στάλθηκε για αλληλούχιση κατά Sanger στην εταιρεία CeMIA.

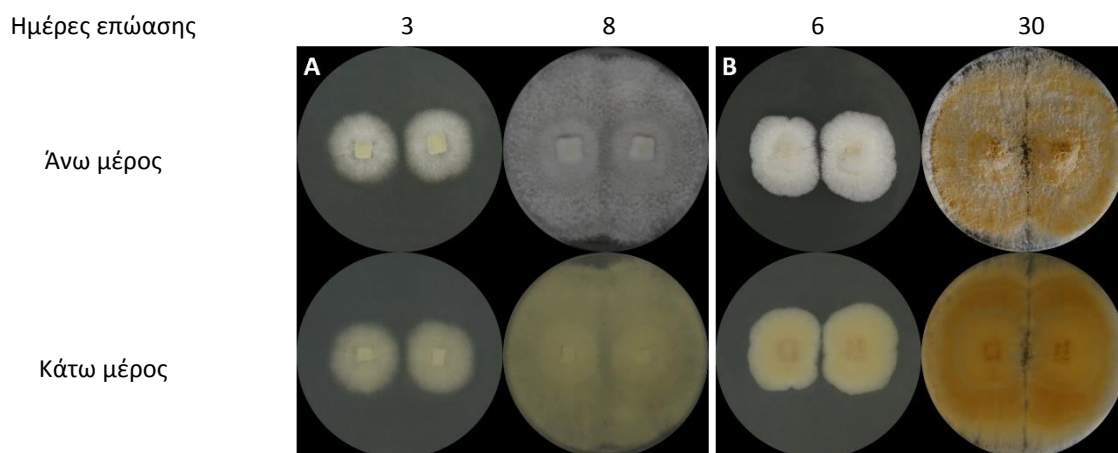
3.4.7. *In silico* ανάλυση των αλληλουχιών

Η αλληλουχίες του μύκητα υποβλήθηκαν στο πρόγραμμα BLAST του NCBI (US National Center for Biotechnological Information) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), ως ερώτημα στο BLASTn, στη βάση δεδομένων όλων των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (nr/nt-nucleotide collection), χωρίς οι προκαθορισμένες ρυθμίσεις του προγράμματος να αλλαχθούν. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από τη βάση δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση του γένους του μύκητα.

4. Αποτελέσματα

4.1. Αλληλεπίδραση του μύκητα *Clonostachys rosea* με τον εαυτό του

Αρχικά εξετάστηκε η *in vitro* αλληλεπίδραση των στελεχών του μύκητα *Clonostachys rosea*, στέλεχος Clon.1 και Clon.2, με τον εαυτό τους με τη μέθοδο της διπλής καλλιέργειας (dual culture) (Εικ. 4.1).



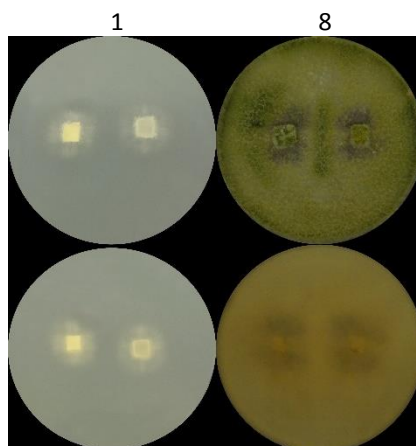
Εικόνα 4.1 Αλληλεπίδραση των δύο στελεχών του *C. rosea* με τον εαυτό τους, ενώ φαίνεται το άνω και κάτω μέρος του τρυβλίου. (Α) Αλληλεπίδραση του στελέχους Clon.1 την 3^η και 8^η ημέρα επώασης. (Β) Αλληλεπίδραση του στελέχους Clon.2 την 6^η και 30^η ημέρα επώασης.

Παρατηρήθηκε πλήρης ένωση (full merge) των μυκηλιακών υφών του στελέχους Clon.1, ενώ κατά την ανάπτυξη του στελέχους Clon.2 σημειώθηκε ένωση με μη ενωμένα τμήματα (merge with patches). Αξιοσημείωτος είναι ο ταχύτερος ρυθμός ανάπτυξης (growth rate) του στελέχους Clon.1 έναντι του Clon.2, εμφανίζοντας σημαντική διαφορά εξάπλωσης κατά τις ίδιες ημέρες επώασης.

4.2. Αλληλεπίδραση του μύκητα *Trichoderma* sp. με τον εαυτό του

Ο μυκοπαρσιτικός μύκητας *Trichoderma* sp. εμβολιάστηκε από την ίδια αρχική καλλιέργεια, με σκοπό την παρατήρηση της αλληλεπίδρασης με τον εαυτό του (Εικ. 4.2). Κατά την αλληλεπίδραση του *Trichoderma* sp. με τον εαυτό του σημειώθηκε πλήρης ένωση των μυκηλιακών υφών μεταξύ των δύο τμημάτων.

Ημέρες επώασης



Εικόνα 4.2 Αλληλεπίδραση του *Trichoderma* sp. με τον εαυτό του, ενώ φαίνεται το άνω και κάτω μέρος του τρυβλίου, κατά τις ημέρες επώασης 1 και 8.

4.3. Αλληλεπίδραση των δύο στελεχών του *Clonostachys rosea* μεταξύ τους

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης των δύο στελεχών του *Clonostachys rosea* πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της διπλής καλλιέργειας (dual culture), με συνολικό χρόνο επώασης 30 ημέρες (Εικ. 4.3).

Ημέρες επώασης



Εικόνα 4.3 Αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο διαφορετικών στελεχών του μύκητα *Clonostachys rosea*, Clon.1 (αριστερά) με τον Clon.2 (δεξιά) στις 2, 4, 7, 11 και 30 ημέρες επώασης, ενώ φαίνεται το πάνω και κάτω μέρος του τρυβλίου. Ο εμβολιασμός του στέλεχους Clon.2 προηγείται 3 ημέρες.

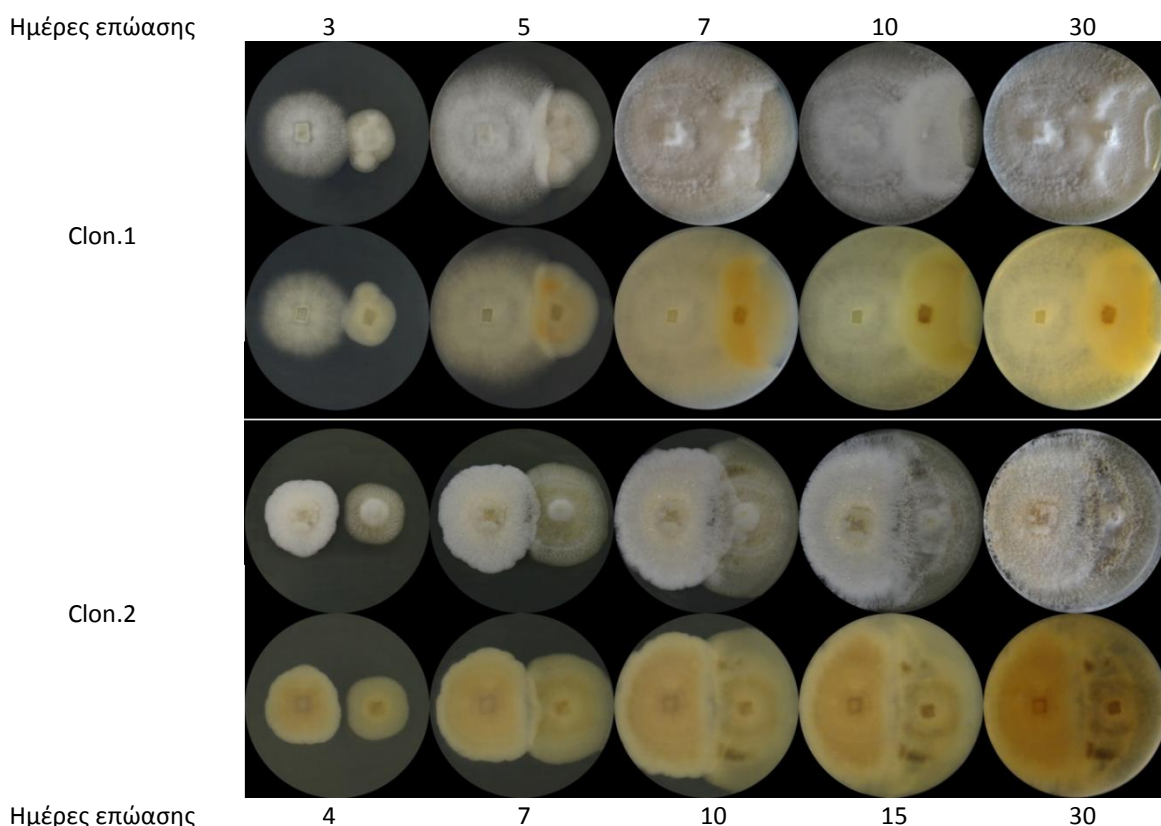
Αρχικά, παρατηρείται αναστολή της ανάπτυξης του Clon.1, με πιθανή αιτία την έκκριση αντιβιοτικών ενώσεων από τον Clon.2. Σε επόμενο στάδιο, ο Clon.1 αναπτύσσεται επί του Clon.2 (overgrowth) και τελικά από την 11^η ημέρα επώασης παρατηρείται η

συνύπαρξη τους στο ίδιο μέσο ανάπτυξης, με αποτέλεσμα η σχέση τους να χαρακτηρίζεται ως συμβατή.

4.4. Βιολογικός έλεγχος των φυτοπαθογόνων μυκήτων από τον μύκητα *Clonostachys rosea* (biocontrol activity)

Ο μύκητας *Clonostachys rosea* έχει χαρακτηριστεί ως παράγοντας βιολογικού ελέγχου έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων που μολύνουν καλλιέργειες οικονομικής σημασίας. Έτσι, μελετήθηκε η *in vitro* αλληλεπίδραση των δύο στελεχών του *C. rosea* με τους τέσσερις φυτοπαθογόνους μύκητες, *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Rhizoctonia solani* και *Verticillium dahliae* και τον πιθανόν εν δυνάμει παθογόνο *Phomopsis* sp..

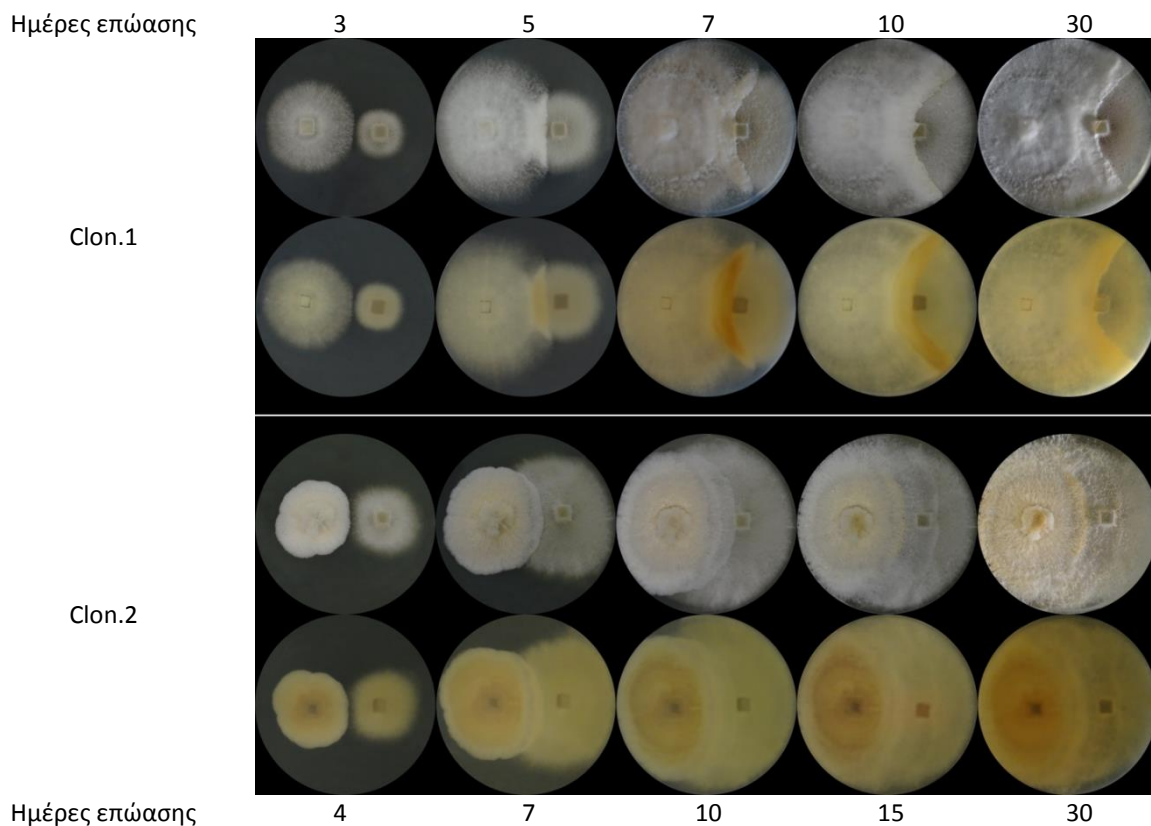
Στην εικόνα 4.4.1 παρατηρείται η αλληλεπίδραση των δύο στελεχών του *Clonostachys rosea* με τον φυτοπαθογόνο μύκητα *C. acutatum*.



Εικόνα 4.4.1 Βιολογικός έλεγχος του *C. acutatum* από τα δύο στελέχη του *C. rosea*. Ο *C. acutatum* (δεξιά) εμβολιάστηκε ταυτόχρονα με το στέλεχος Clon.1 (αριστερά) και δύο ημέρες αργότερα από το στέλεχος Clon.2 (αριστερά).

Και τα δύο στελέχη του *C. rosea* αναπτύσσονται επί του *C. acutatum*, καλύπτοντάς τον πλήρως, πιθανόν μυκοπαρασιτώντας τον (Εικ. 4.4.1). Στο σημείο επαφής και κάλυψης του *C. acutatum* από το στέλεχος Clon.1, παρατηρείται κιτρινωπός μεταχρωματισμός των υφών του μύκητα. Με αυτόν τον τρόπο είναι φανερή η ανταγωνιστική δράση του *C. rosea* εναντίον του *C. acutatum*.

Στην εικόνα 4.4.2 παρατηρείται η αλληλεπίδραση των δύο στελεχών του *Clonostachys rosea* με το *F.oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*.

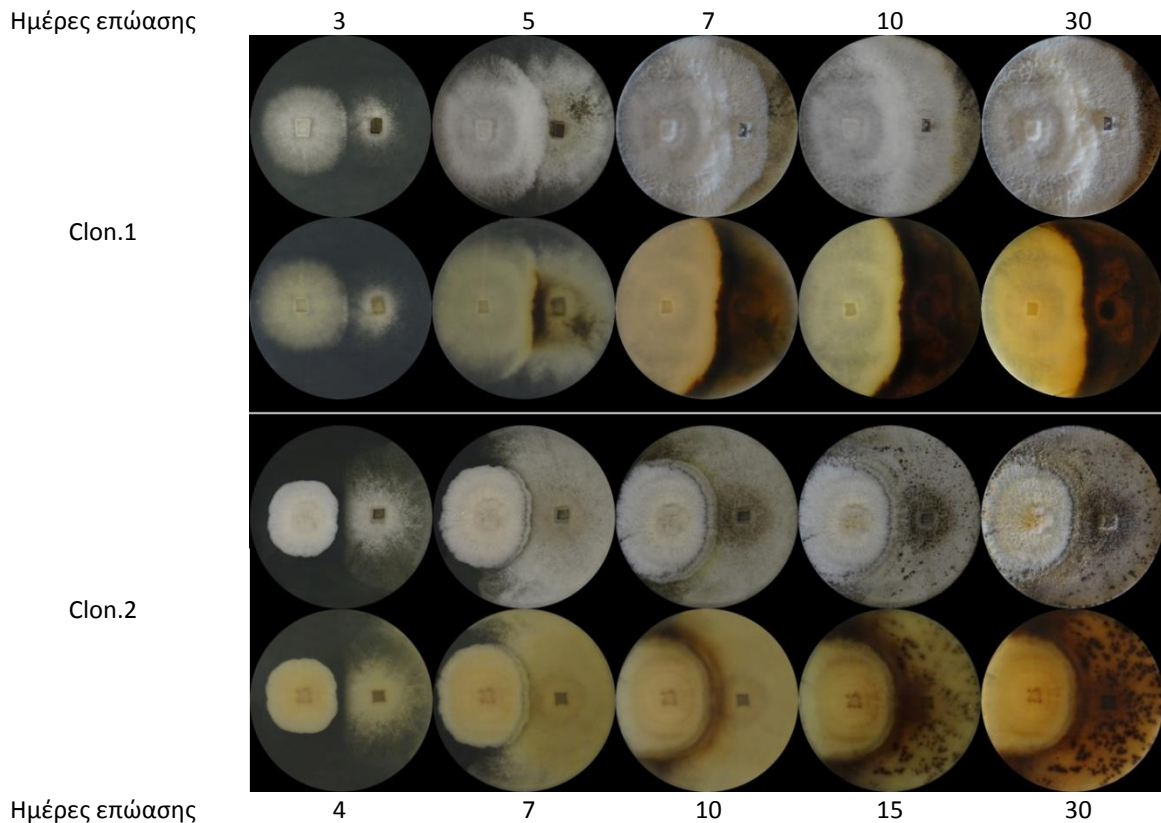


Εικόνα 4.4.2 Βιολογικός έλεγχος του *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* από τα δύο στελέχη του *C. rosea*. Ο *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (δεξιά) εμβολιάστηκε ταυτόχρονα με το στέλεχος Clon.1 (αριστερά) και δύο ημέρες αργότερα από το στέλεχος Clon.2 (αριστερά).

Αρχικά, παρατηρείται μικρή αναστολή της εξάπλωσης των μυκήτων *C. rosea* και *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, όμως ακολουθεί η ανάπτυξη των στελεχών του *C. rosea* επί του μυκηλίου του παθογόνου. Το στέλεχος Clon.1 καλύπτει το μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας του *F. oxysporum* μέχρι την 10^η ημέρα χωρίς να επεκταθεί περαιτέρω. Ακόμη, παρατηρείται κιτρινωπός μεταχρωματισμός στην έκταση του παθογόνου όπου αναπτύσσεται το στέλεχος Clon.1. Το στέλεχος Clon.2 καλύπτει πλήρως τον *F. oxysporum* f.

sp. radialis-lycopersici. Τα δύο στελέχη πιθανόν μυκοπαρασιτούν επί του φυτοπαθογόνου μύκητα *F. oxysporum*, εμφανίζοντας σημαντική ανταγωνιστική δράση εναντίον του.

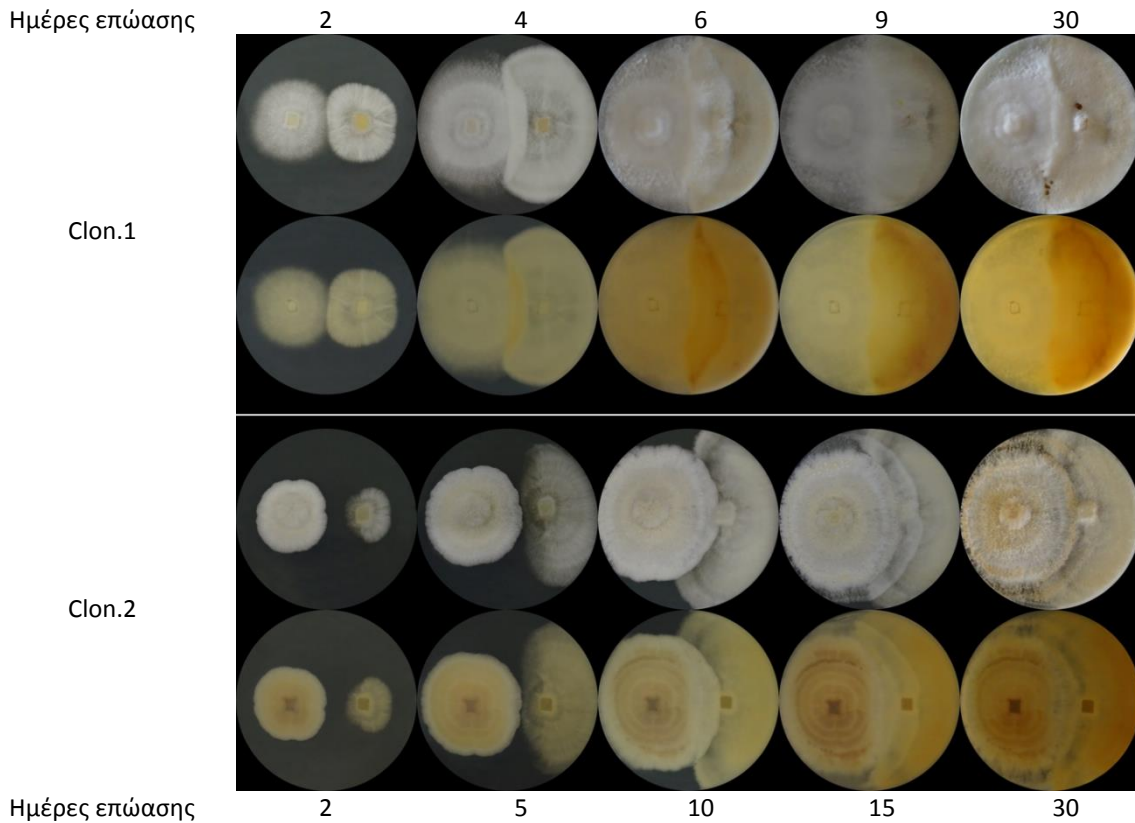
Στην εικόνα 4.4.3 παρατίθεται η αλληλεπίδραση των δύο στελεχών του *Clonostachys rosea* με το *Phomopsis* sp..



Εικόνα 4.4.3 Βιολογικός έλεγχος του *Phomopsis* sp. από τα δύο στελέχη του *C. rosea*. Ο *Phomopsis* sp. (δεξιά) εμβολιάστηκε ταυτόχρονα με το στέλεχος Clon.1 (αριστερά) και δύο ημέρες αργότερα από το στέλεχος Clon.2 (αριστερά).

Το στέλεχος Clon.2 πιθανόν εκκρίνει αντιβιοτικές ενώσεις, καθώς είναι εμφανής ο σχηματισμός ζώνης παρεμπόδισης τις πρώτες μέρες της αλληλεπίδρασης τους, αναχαιτίζοντας την ανάπτυξη του *Phomopsis* sp.. Το στέλεχος Clon.1 ανταγωνίζεται τον *Phomopsis* sp. καταλαμβάνοντας τον χώρο, έχοντας ως πλεονέκτημα τον ταχύ ρυθμό ανάπτυξης του. Τα δύο στελέχη του *C. rosea* αναπτύσσονται πάνω στον «παθογόνο» μύκητα, καλύπτοντας πλήρως την επιφάνειά του, πιθανόν με μυκοπαρασιτισμό. Ο *Phomopsis* sp. εμφανίζει σε όλη την έκταση του μυκηλίου του σκούρο μεταχρωματισμό σε αλληλεπίδραση με τον Clon.1, ενώ με τον Clon.2 εμφανίζει βαθμιαίο μεταχρωματισμό, μικρότερης έντασης.

Στην εικόνα 4.4.4 παρατίθεται η αλληλεπίδραση των δύο στελεχών του *Clonostachys rosea* με το *R. solani*.

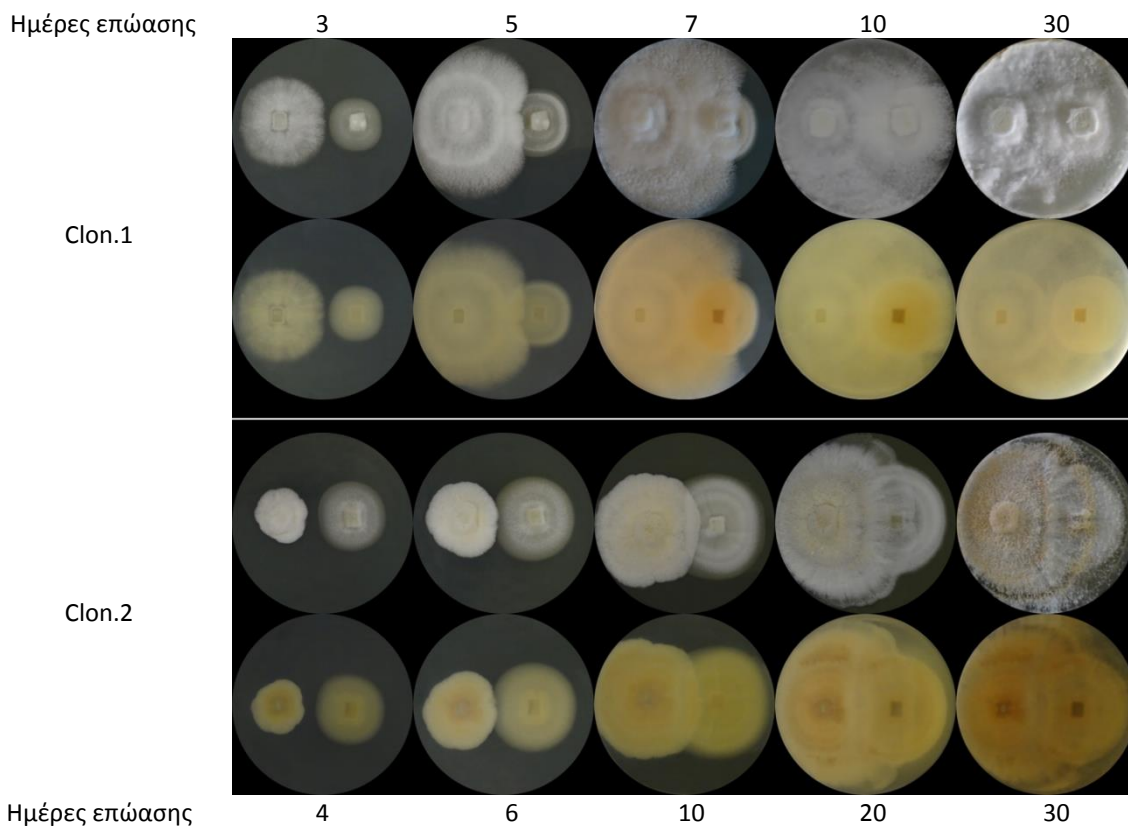


Εικόνα 4.4.4 Βιολογικός έλεγχος του *R. solani* από τα δύο στελέχη του *C. rosea*. Ο *R. solani* (δεξιά) εμβολιάστηκε ταυτόχρονα με το στέλεχος Clon.1 (αριστερά) και τέσσερις ημέρες αργότερα από το στέλεχος Clon.2 (αριστερά).

Τα δύο στελέχη του *C. rosea* αναπτύσσονται επί του παθογόνου μύκητα, καλύπτοντας πλήρως την επιφάνειά του.

Το στέλεχος Clon.2 χρησιμοποιεί δύο μηχανισμούς για την καταστολή της ανάπτυξης του μύκητα *R. solani*. Αρχικά το στέλεχος Clon.2 εκκρίνει αντιβιοτικές ουσίες αναστέλοντας την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα, ενώ από τη 10^η ημέρα και μετά έρχεται σε επαφή με τον *Rhizoctonia solani* και αναπτύσσεται πάνω στις μυκηλιακές υφές του. Το στέλεχος Clon.1 αντιμετωπίζει τον παθογόνο μύκητα πιθανόν μόνο μέσω του μυκοπαρασιτισμού. Ο *R. solani* πιθανόν να αντιδράει, καθώς εμφανίζεται πορτοκαλί μεταχρωματισμός σε όλη την έκτασή του.

Στην εικόνα 4.4.5 παρατίθεται η αλληλεπίδραση των δύο στελεχών του *Clonostachys rosea* με το *V. dahliae*.



Εικόνα 4.4.5 Βιολογικός έλεγχος του *V. dahliae* από τα δύο στελέχη του *C. rosea*. Ο *V. dahliae* (δεξιά) εμβολιάστηκε 3 ημέρες νωρίτερα από τα δύο στελέχη του *C. rosea* (αριστερά).

Η εξάπλωση του παθογόνου μύκητα *V. dahliae* μπορεί να ελεγχθεί επιτυχώς και από τα δύο στελέχη του *C. rosea*, τα οποία πιθανόν με μυκοπαρασιτισμό εξαπλώνονται επί του μύκητα καλύπτοντας πλήρως τις υφές του.

Γενικά, ο *C. rosea* κατά την αλληλεπίδραση με τους πέντε φυτοπαθογόνους μύκητες παρουσίασε κυρίως το φαινόμενο της ανάπτυξης πάνω στις μυκηλιακές υφές τους (overgrowth), πιθανά μυκοπαρασιτώντας τους. Έτσι, αποδείχτηκε ότι ο *C. rosea* είναι ισχυρός βιολογικός παράγοντας εναντίον των πέντε αυτών φυτοπαθογόνων μυκήτων.

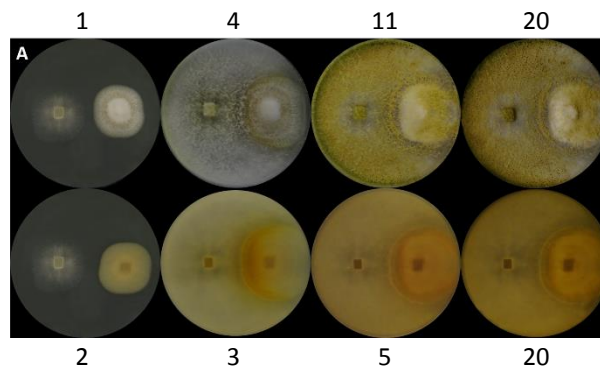
4.5. Βιολογικός έλεγχος των φυτοπαθογόνων μυκήτων από τον μύκητα *Trichoderma* sp.

Το γένος *Trichoderma* εμφανίζει ανταγωνιστική δράση έναντι πλήθους φυτοπαθογόνων μυκήτων, όπως και οι μύκητες του γένους *Clonostachys*. Για το λόγο αυτό μελετήθηκε η ανταγωνιστικότητα του *Trichoderma* sp. εναντίον των ίδιων παθογόνων μυκήτων που ανταγωνίστηκαν και τα δύο στελέχη *C. rosea*, ώστε να συγκριθούν οι μηχανισμοί δράσης και η αποτελεσματικότητά τους.

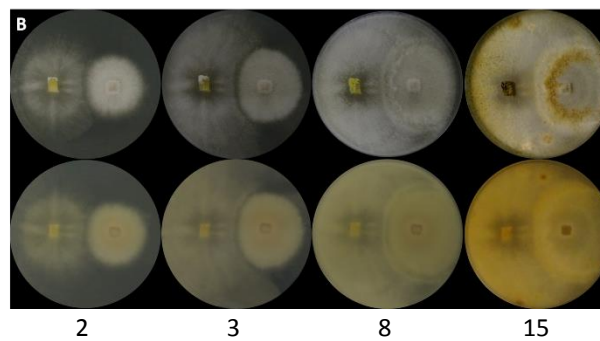
Στην εικόνα 4.5 παρουσιάζονται οι αλληλεπιδράσεις του *Trichoderma* sp. με τους παθογόνους μύκητες *C. acutatum*, *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Phomopsis* sp., *R. solani* και *V. dahliae*.

Ημέρες επώασης

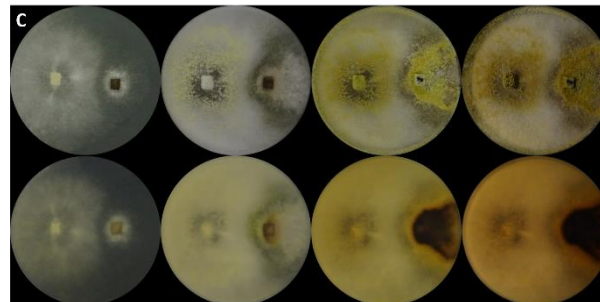
C. acutatum

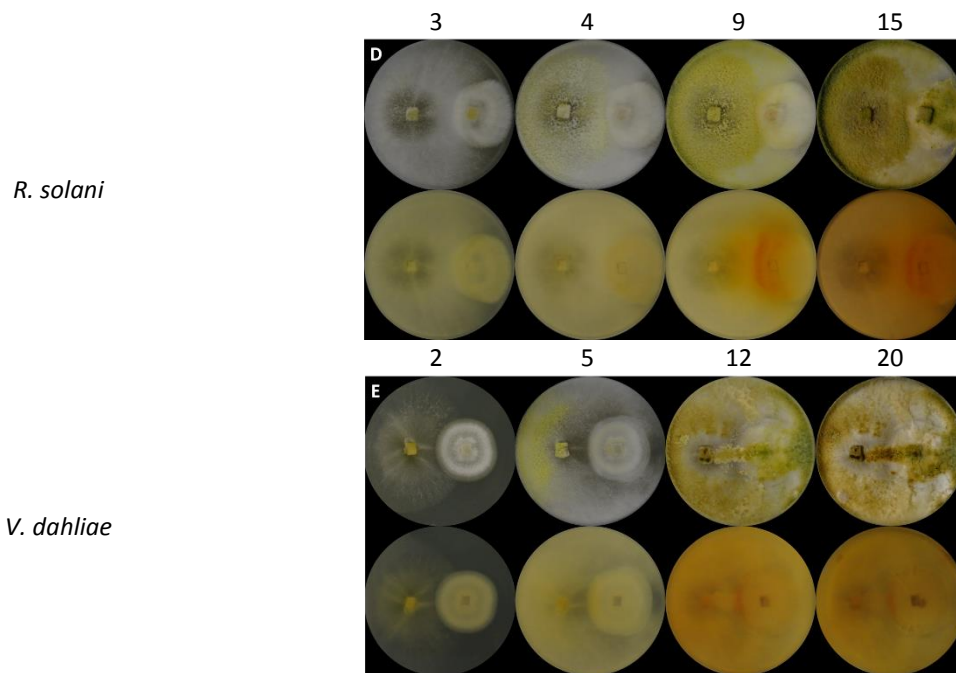


F. oxysporum



Phomopsis sp.





Εικόνα 4.5 Βιολογικός έλεγχος του *Trichoderma* sp. (αριστερά) κατά των φυτοπαθογόνων μυκήτων (Α) *C. acutatum*, (Β) *F. oxysporum*, (C) *Phomopsis* sp., (D) *R. solani*, (E) *V. dahliae* σε θρεπτικό μέσο PDA.

Ο μύκητας *Trichoderma* sp. εμφάνισε ισχυρή ανταγωνιστικότητα κατά των φυτοπαθογόνων μυκήτων, με ταχύ ρυθμό εξάπλωσης στο θρεπτικό μέσο αλλά και πάνω στις υφές των παθογόνων (overgrowth) και παραγωγή σπορίων.

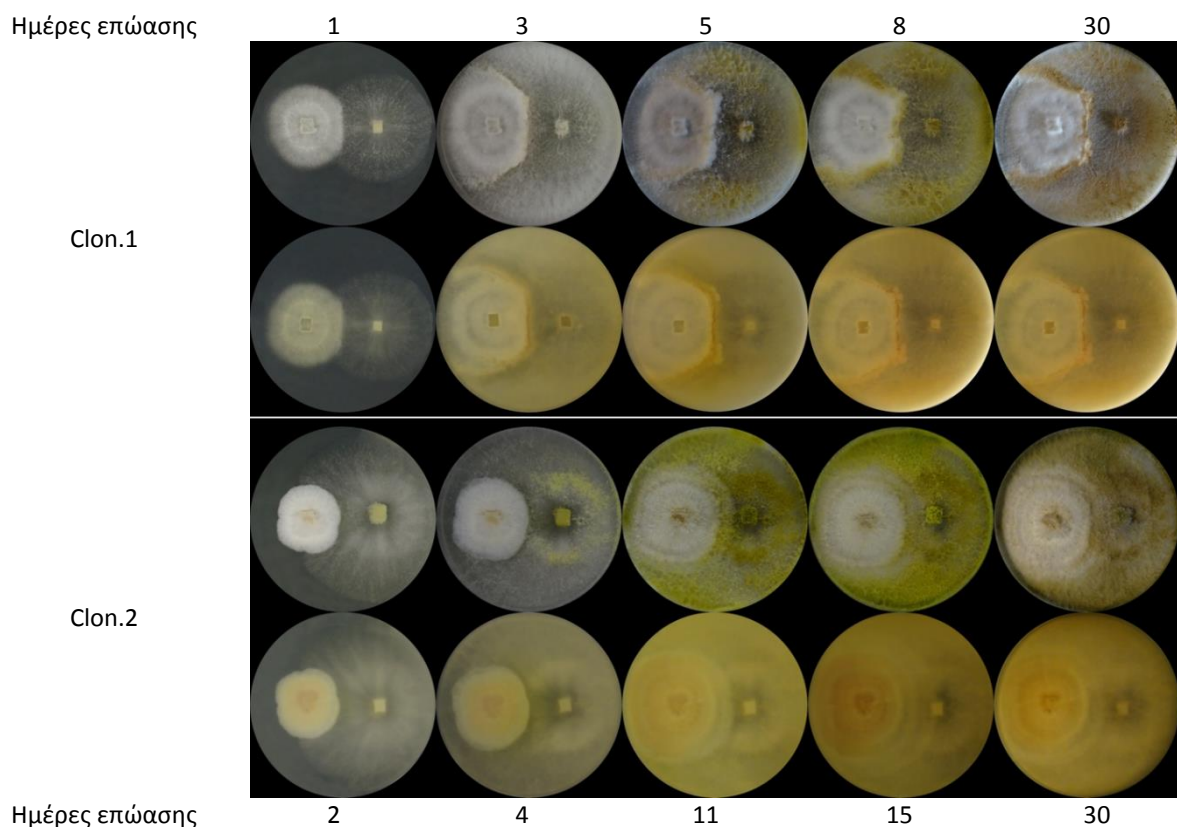
Λόγω του ταχύτερου ρυθμού ανάπτυξης του *Trichoderma* sp. από την πλειοψηφία των παθογόνων, πέρα από τον παθογόνο *R. solani* ο οποίος εμβολιάστηκε στο θρεπτικό μέσο PDA ταυτόχρονα με τον *Trichoderma* sp., οι υπόλοιποι παθογόνοι εμβολιάστηκαν νωρίτερα. Συγκεκριμένα, ο μύκητας *C. acutatum* εμβολιάστηκε 3 ημέρες πριν από τον *Trichoderma* sp., ο *F. oxysporum* 2 ημέρες, ο *Phomopsis* sp. 1 ημέρα και ο *V. dahliae* 7 ημέρες νωρίτερα.

Κατά την αλληλεπίδραση του *Trichoderma* sp. με τον παθογόνο *C. acutatum* και τον *R. solani* παρατηρήθηκε πορτοκαλί μεταχρωματισμός στο θρεπτικό μέσο κατά την 4^η και 9^η ημέρα αντίστοιχα. Μεταχρωματισμός παρατηρήθηκε επίσης στις υφές του *Phomopsis* sp., όπου εμφανίζεται σκούρο καφέ χρώμα κατά την αλληλεπίδρασή του με τον μύκητα *Trichoderma* sp..

4.6. Αλληλεπίδραση (interaction) των δύο στελεχών του *Clonostachys rosea* με άλλους ενδοφυτικούς μύκητες

Εκτός από την ικανότητα εμφάνισης βιολογικού ελέγχου έναντι των φυτοπαθογόνων μυκήτων από τα δύο στελέχη του μύκητα *Clonostachys rosea*, εξετάστηκε επίσης η *in vitro* αλληλεπίδραση τους με άλλους ενδοφυτικούς μύκητες με σκοπό να μελετηθεί η δυνατότητα συνύπαρξής τους. Επιλέχθηκαν ο μυκοπαρσιτικός μύκητας *Trichoderma* sp. και οι εντομοπαθογόνοι μύκητες *Beauveria bassiana* και *Metarhizium* sp.. Οι εικόνες που ακολουθούν παρουσιάζουν την αλληλεπίδραση των στελεχών του μύκητα *Clonostachys rosea* (Clon.1 και Clon.2) με τους ενδοφυτικούς μύκητες με τη μέθοδο της διπλής καλλιέργειας (dual culture).

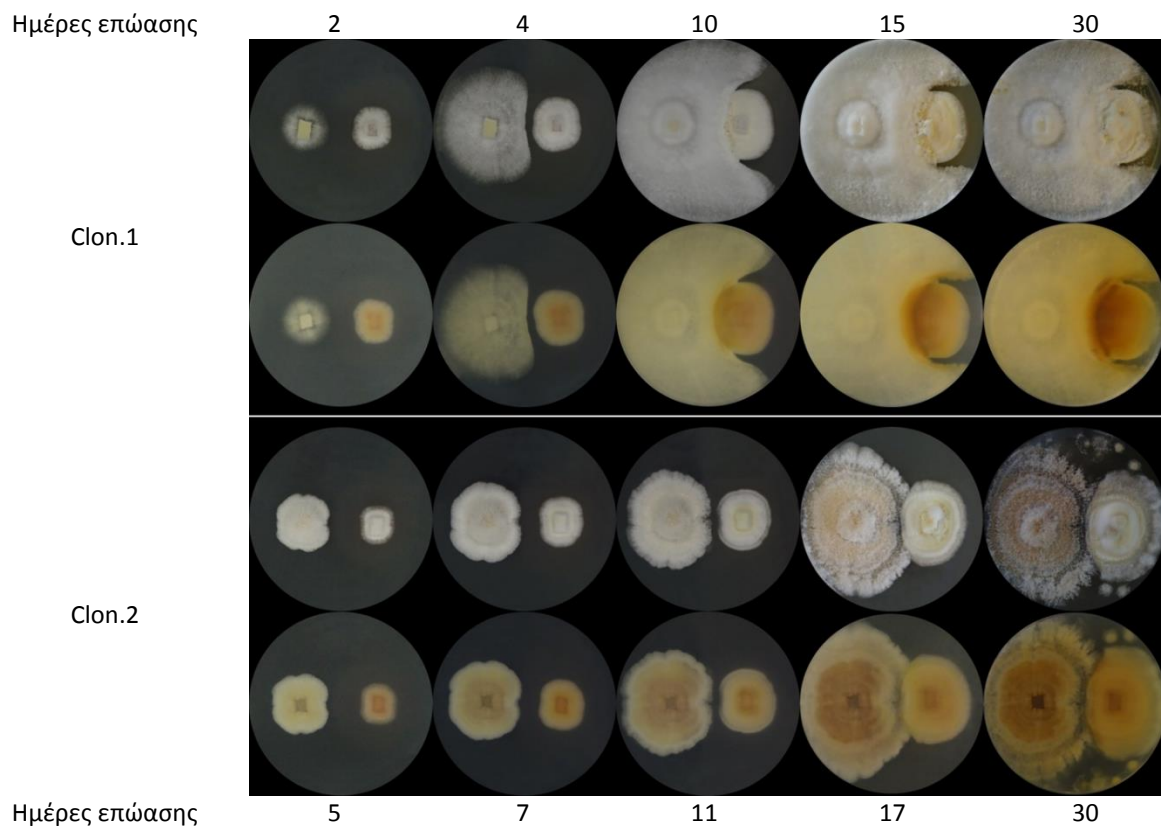
Στην εικόνα 4.6.1 παρατίθεται η αλληλεπίδραση των δύο στελεχών του *Clonostachys rosea* με το *Trichoderma* sp..



Εικόνα 4.6.1 Αλληλεπίδραση του *Trichoderma* sp. με τα δύο στελέχη του *C. rosea*. Ο *Trichoderma* sp. (δεξιά) εμβολιασθηκε 3 ημέρες αργότερα από τα στελέχη Clon.1 (αριστερά) και Clon.2 (αριστερά).

Ο μύκητας *Trichoderma* sp. έρχεται σε επαφή με τα στελέχη του *Clonostachys rosea* από την πρώτη ημέρα επώασης. Η ανάπτυξη των μυκηλιακών υφών των μυκήτων σταματά όταν έρχονται σε επαφή, χωρίς να εμφανίζεται το φαινόμενο της ανάπτυξης του ενός μύκητα πάνω στις υφές του άλλου. Κατά την αλληλεπίδραση αυτή παρατηρείται ο ένας μύκητας να παρεμποδίζει την περαιτέρω ανάπτυξη του άλλου, με αποτέλεσμα να έρχονται σε ισοπαλία (draw). Συμπεραίνουμε έτσι ότι και τα δύο στελέχη του *C. rosea* συνυπάρχουν με τον *Trichoderma* sp. (Εικ. 4.6.1).

Στην εικόνα 4.6.2 παρατίθεται η αλληλεπίδραση των δύο στελεχών του *Clonostachys rosea* με το *B. bassiana*.



Εικόνα 4.6.2 Αλληλεπίδραση του *B. bassiana* με τα δύο στελέχη του *C. rosea*. Ο *B. bassiana* (δεξιά) εμβολιάστηκε 4 ημέρες νωρίτερα από το στέλεχος Clon.1 (αριστερά) και 1 ημέρα νωρίτερα από το Clon.2 (αριστερά).

Στο θρεπτικό υπόστρωμα γύρω από τον *B. bassiana* κατά τις διπλές καλλιέργειες με τα δύο στελέχη του *C. rosea* όσο και στο τρυβλίο με τον μάρτυρα του, είναι εμφανής ο σχηματισμός άλω. Το θρεπτικό υπόστρωμα περιμετρικά του μύκητα μεταχρωματίζεται σε

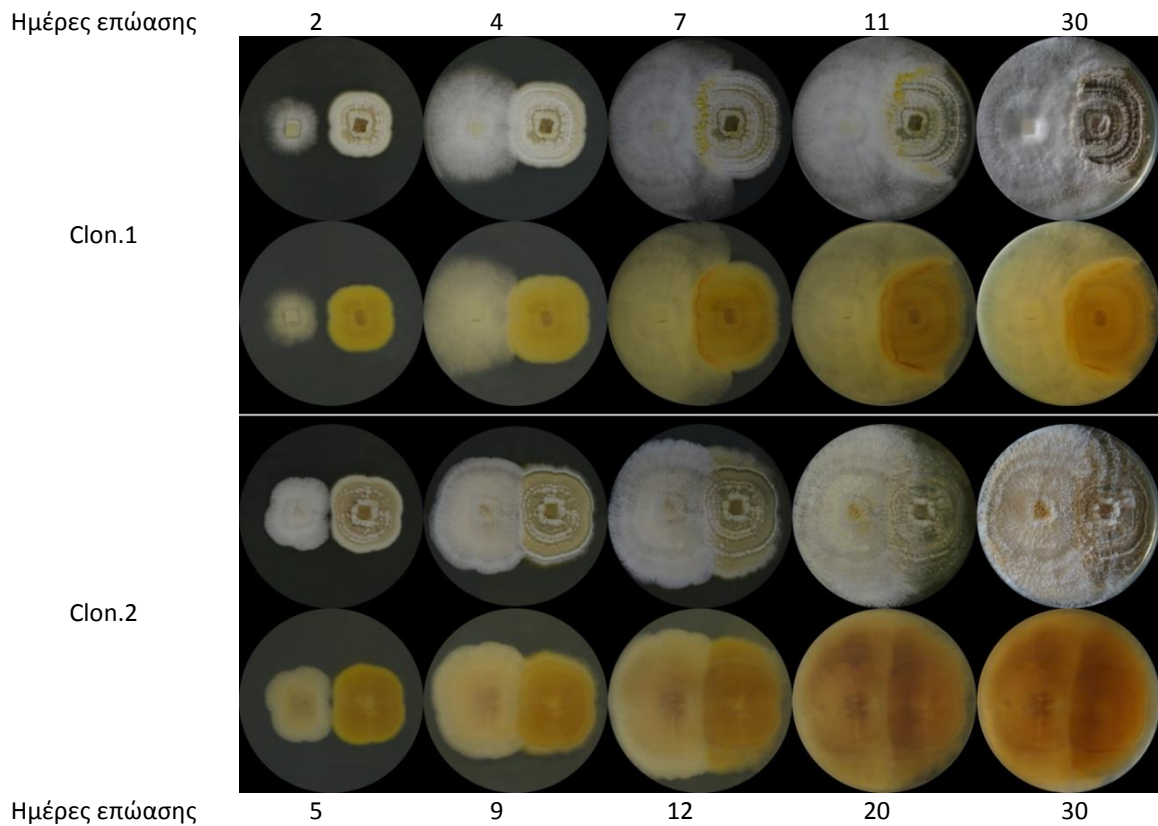
απαλό ροζ χάνοντας έτσι τη διαύγεια του. Συμπεραίνουμε έτσι ότι η παραγωγή της άλω δεν επηρεάζεται αποκλειστικά από την παρουσία άλλου μικροοργανισμού στο ίδιο υπόστρωμα.

Κατά τη 4^η ημέρα η εξάπλωση του Clon.1 περιορίζεται από τον *B. bassiana* πιθανότατα από την παραγωγή των αντιμικροβιακών ενώσεων του *B. bassiana*. Παρά τον περιορισμό, το στέλεχος Clon.1 πλησιάζει τον μύκητα *B. bassiana* πιθανόν με αποτοξικοποίηση των εκκρίσεων του εντομοπαθογόνου μύκητα, με αποτέλεσμα από την 10^η ημέρα και μετά να εξαπλώνεται καλύπτοντας τις υφές του. Ακόμη, παρατηρείται έκκριση ουσιών που συγκεντρώνονται σε σταγόνες πάνω στις μυκηλιακές υφές στο σημείο επαφής των δύο μυκήτων. Η έκκριση αυτή προέρχεται από τον μύκητα Clon.1, καθώς αυτό το φαινόμενο επανεμφανίζεται στη διπλή καλλιέργεια του με τον επίσης εντομοπαθογόνο μύκητα *Metarhizium* sp., καθώς και με το δεύτερο στέλεχος του *C. rosea*, το Clon.2. Την ίδια στιγμή δημιουργείται ζώνη μεταχρωματισμού στα σημεία επαφής των δύο μυκήτων, η οποία γίνεται πιο έντονη ύστερα από έναν μήνα επώασης.

Μεταξύ του στελέχους Clon.2 και του *B. bassiana* σχηματίζεται ζώνη παρεμπόδισης η οποία δημιουργείται από τις εκκρίσεις και των δύο μυκήτων. Όπως το στέλεχος Clon.1 έτσι και το στέλεχος Clon.2 πιθανόν αποτοξικοποιούν τις παρεμποδιστικές ενώσεις του *B. bassiana* με αποτέλεσμα να έρχονται οι μυκηλιακές υφές τους σε επαφή, χωρίς όμως να εμφανίζεται το φαινόμενο της ανάπτυξης του ενός μύκητα πάνω στις υφές του άλλου.

Φτάνοντας στην 30^η ημέρα παρατήρησης, το στέλεχος Clon.1 περιορίζει σημαντικά την ανάπτυξη του *B. bassiana*, ενώ το στέλεχος Clon.2 συνυπάρχει με τον εντομοπαθογόνο μύκητα αφού έχουν έρθει σε επαφή (Εικ. 4.6.2).

Στην εικόνα 4.6.3 παρατίθεται η αλληλεπίδραση των δύο στελεχών του *Clonostachys rosea* με τον *Metarhizium* sp. κατά τη διπλή καλλιέργεια (dual culture) τους σε θρεπτικό μέσο PDA.



Εικόνα 4.6.3 Αλληλεπίδραση του *Metarhizium* sp. με τα δύο στελέχη του *C. rosea*. Ο *Metarhizium* sp. (δεξιά) εμβολιασθηκε 4 ημέρες νωρίτερα από το στέλεχος Clon.1 (αριστερά) και 2 ημέρες νωρίτερα από το Clon.2 (αριστερά).

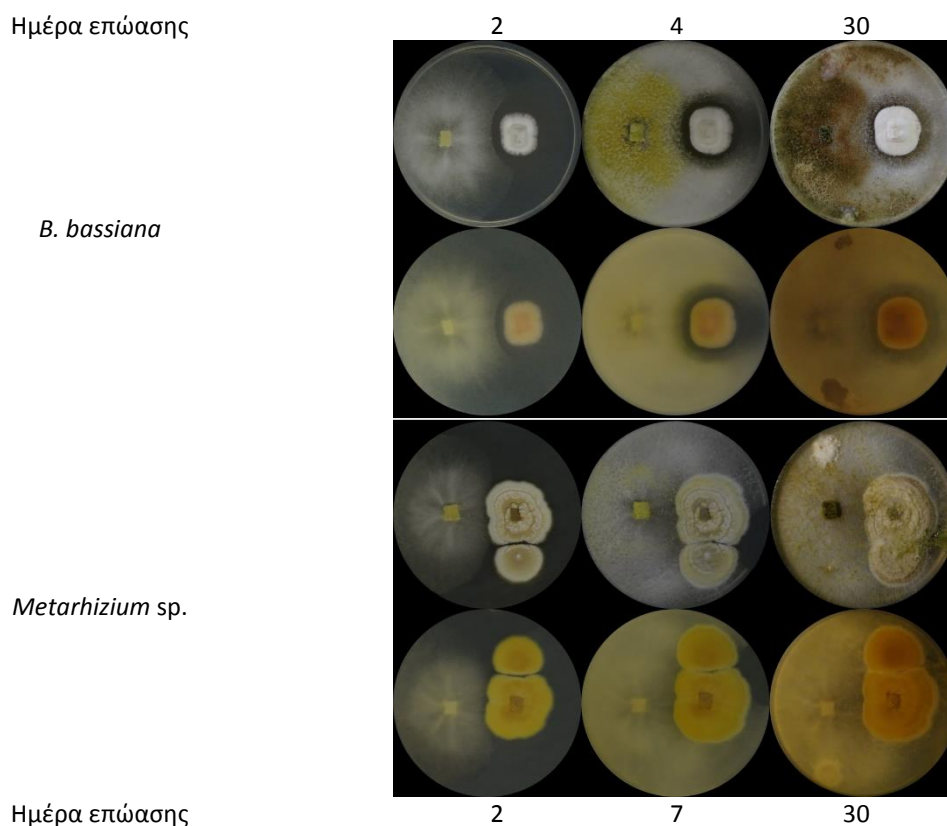
Τα δύο στελέχη *C. rosea* παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του *Metarhizium* sp. πιθανόν με μυκοπαρσιτισμό.

Το στέλεχος Clon.1 καλύπτει τη μεγαλύτερη επιφάνεια του *Metarhizium* sp., παρά την μικρή παρεμπόδιση που εμφάνισε τη 2^η ημέρα επώασης. Στα σημεία επαφής των δύο μυκήτων σχηματίζονται σταγόνες την 7^η ημέρα επώασης πάνω στις μυκηλιακές υφές και μια λεπτή ζώνη μεταχρωματισμού, ορατές στο κάτω μέρος του τρυβλίου, φαινόμενο που δεν παρατηρείται με το Clon.2. Οι ουσίες αυτές που εκκρίνονται τις παράγει ο Clon.1, όπως παρατηρήθηκε και με τον *B. bassiana*, μετά από 10 ημέρες αλληλεπίδρασης.

Οι μυκηλιακές υφές του στελέχους Clon.2 και του *Metarhizium* sp. αρχίζουν να έρχονται σε επαφή κατά τη 5^η ημέρα αλληλεπίδρασης.

4.7. Αλληλεπίδραση του μύκητα *Trichoderma* sp. με τους *Beauveria bassiana* και *Metarhizium* sp.

Οι αλληλεπιδράσεις του *Trichoderma* sp. με τον εαυτό του και με τα στελέχη *Clonostachys rosea* έχουν προαναφερθεί. Παρακάτω παρουσιάζονται οι αλληλεπιδράσεις του *Trichoderma* sp. με τους ενδοφυτικούς εντομοπαθογόνους μύκητες *Beauveria bassiana* και *Metarhizium* sp., όπου επίσης εφαρμόστηκε η μέθοδος της διπλής καλλιέργειας (dual culture) σε θρεπτικό μέσο PDA (Εικ. 4.7).



Εικόνα 4.7 Αλληλεπίδραση του *Trichoderma* sp. (αριστερά) με τους μύκητες *B. bassiana* και *Metarhizium* sp., ενώ φαίνεται η άνω και η κάτω μεριά των τρυβλίων. Ο *B. bassiana* και ο *Metarhizium* sp. εμβολιάστηκαν 4 ημέρες νωρίτερα από τον *Trichoderma* sp..

Οι ενδοφυτικοί εντομοπαθογόνοι μύκητες *B. bassiana* και *Metarhizium* sp., λόγω της βραδείας ανάπτυξης τους συγκριτικά με αυτή του *Trichoderma* sp., εμβολιάστηκαν νωρίτερα στο θρεπτικό υπόστρωμα, ώστε τα μυκήλια των δύο μυκήτων κατά τη διπλή καλλιέργεια να συναντηθούν στο κέντρο του τρυβλίου, παρά τον διαφορετικό ρυθμό ανάπτυξης τους.

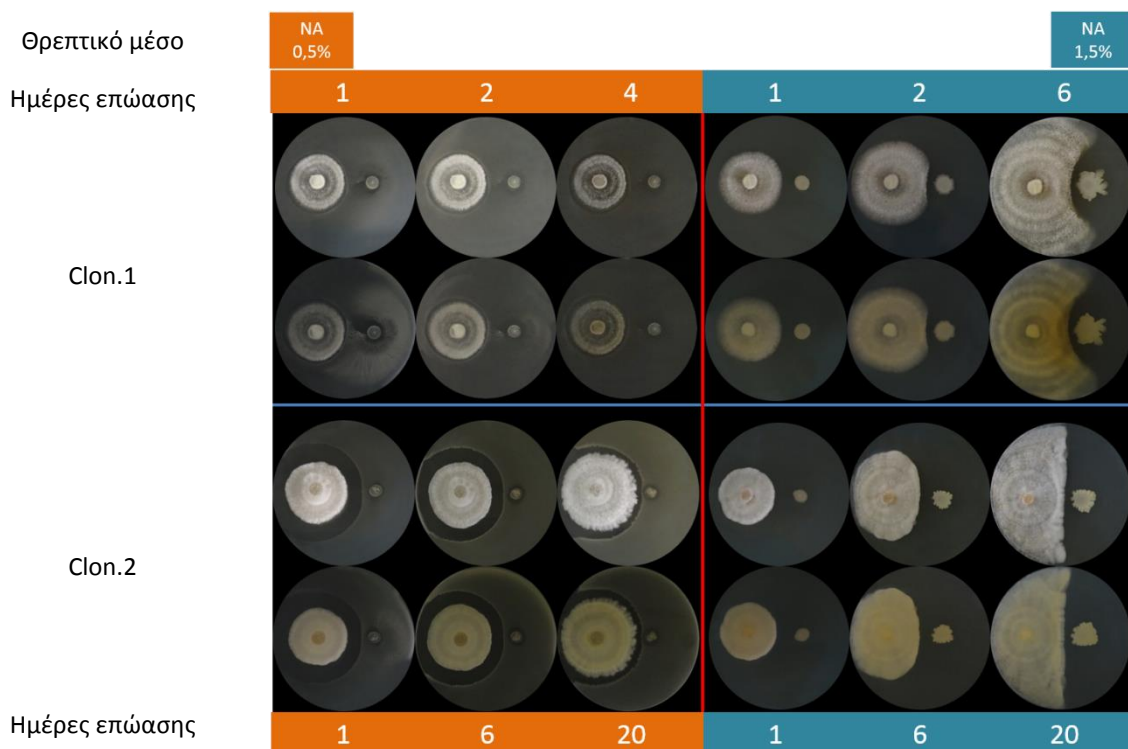
Στην εικόνα 4.7 παρατηρείται η πιθανή συνύπαρξη του *Trichoderma* sp. με τον *B. bassiana*. Παρά την ζώνη παρεμπόδισης που σχηματίζει γύρω του ο εντομοπαθογόνος μύκητας, ο *Trichoderma* sp. πιθανόν μεταβολίζει τις παρεμποδιστικές ουσίες και έρχεται σε επαφή με αυτόν στις 30 ημέρες επώασης. Αντιθέτως, στη διπλή καλλιέργεια του *Trichoderma* sp. με τον *Metarhizium* sp. οι δύο μύκητες δεν μπορούν να συνυπάρξουν, καθώς ο *Trichoderma* sp. αναπτύσσεται πάνω στις υφές (overgrowth) του εντομοπαθογόνου μύκητα, καλύπτοντάς τον πλήρως.

4.8. Αλληλεπίδραση του μύκητα *Clonostachys rosea* με τα ενδοφυτικά βακτήρια

Η αλληλεπίδραση των στελεχών του *C. rosea* με τα τρία βακτήρια μελετήθηκε με τη μέθοδο της διπλής καλλιέργειας (dual culture). Ο κάθε συνδυασμός των μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκε σε δύο διαφορετικά θρεπτικά μέσα. Το ένα ήταν ημιστερέο θρεπτικό μέσο NA (nutrient broth + 0,5% άγαρ) και το άλλο ήταν στερεό θρεπτικό μέσο NA (nutrient broth + 1,5% άγαρ). Είναι γνωστό ότι η χαμηλή συγκέντρωση του agar επιτρέπει την εμφάνιση ομαδικής κίνησης των βακτηρίων και την ταχεία εξάπλωση τους στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης.

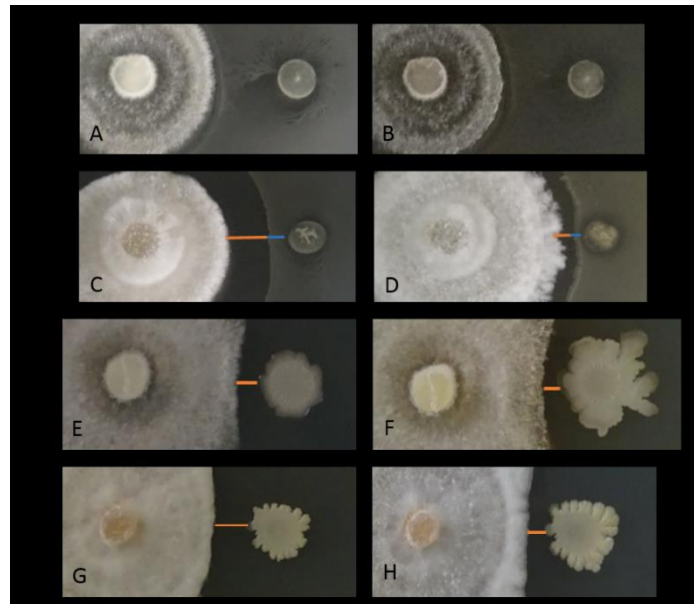
4.8.1. Αλληλεπίδραση του μύκητα *Clonostachys rosea* με το βακτήριο Cal.r.11

Στην εικόνα 4.8.1 παρατίθεται η αλληλεπίδραση των δύο στελεχών του *Clonostachys rosea* με το βακτήριο Cal.r.11.



Εικόνα 4.8.1 Αλληλεπίδραση των στελεχών *C. rosea* με το βακτήριο Cal.r.11 σε θρεπτικό μέσο NA (0,5% και 1,5% άγαρ). Το στέλεχος Clon.1 εμβολιάστηκε 2 ημέρες νωρίτερα από το βακτήριο Cal.r.11 και στα δύο θρεπτικά μέσα. Το στέλεχος Clon.2 εμβολιάστηκε 5 ημέρες νωρίτερα από το βακτήριο Cal.r.11 και στα δύο θρεπτικά μέσα.

Το βακτήριο Cal.r.11 εξαπλώνεται με ομαδική κίνηση στο θρεπτικό μέσο NA (0,5% άγαρ), σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου, περικυκλώνοντας το στέλεχος Clon.1. Συγκεκριμένα, το ενδοφυτικό βακτήριο περιορίζει την περαιτέρω εξάπλωση του μύκητα, ενώ από την 1^η κιόλας ημέρα παρατηρείται ο σχηματισμός μικρής ζώνης παρεμπόδισης <2mm, η οποία παρέμεινε μέχρι και την 4^η ημέρα παρατήρησης (Εικ.4.8.1). Η αλληλεπίδραση του στελέχους Clon.2 με το βακτηριακό στέλεχος Cal.r.11 παρουσιάζει παρόμοιο φαινότυπο με εκείνον του Clon.1 με το Cal.r.11. Ωστόσο πρέπει να σημειωθεί ότι η ζώνη παρεμπόδισης τη 1^η ημέρα είναι > 6mm, ενώ κατά την 6^η και 20^η ημέρα, παρατηρείται μια βαθμιαία μείωσή της. Το στέλεχος Clon.2 συνεχίζει να αναπτύσσεται και να εξαπλώνεται με αποτέλεσμα να πλησιάζει το βακτήριο, ενώ το μέτωπο που σχηματίζεται από τα κύτταρα του Cal.r.11, φαίνεται να μικραίνει με το χρόνο (Εικ.4.8.2). Στο θρεπτικό μέσο NA (1,5% άγαρ), το βακτήριο Cal.r.11 περιορίζει την ανάπτυξη και των δύο στελεχών του *C. rosea*, Clon.1 και Clon.2, με το σχηματισμό ζώνης παρεμπόδισης από τη 2^η και 6^η ημέρα αλληλεπίδρασης αντίστοιχα. (Εικ.4.8.1). Το στέλεχος Clon.1 πλησιάζει το βακτήριο σχηματίζοντας ημικύκλιο γύρω από αυτό, με τις υφές του να μεταχρωματίζονται. Από την άλλη το στέλεχος Clon.2 περιορίζεται γραμμικά χωρίς να εμφανίζεται μεταχρωματισμός, ωστόσο οι υφές του κοντά στη ζώνη παρεμπόδισης είναι πυκνότερες (Εικ. 4.8.3).



Εικόνα 4.8.2 Μεγέθυνση της περιοχής αλληλεπίδρασης κοντά στα σημεία εμβολιασμού των στελεχών του *Clonostachys* με το βακτήριο Cal.r.11 (A-H), (άνω όψεις τρυβλίων). Η πορτοκαλί γραμμή παρουσιάζει το μήκος της ζώνης παρεμπόδισης μεταξύ των δύο μικροοργανισμών. (A-B) Το στέλεχος Clon.1 με το βακτήριο Cal.r.11 σε θρεπτικό μέσο NA με 0,5% άγαρ, τη 1^η και 4^η ημέρα επώασης. (C-D) Το στέλεχος Clon.2 με το βακτήριο Cal.r.11 σε θρεπτικό μέσο NA με 0,5% άγαρ, τη 1^η και 20^η ημέρα επώασης. Η μπλε γραμμή δείχνει

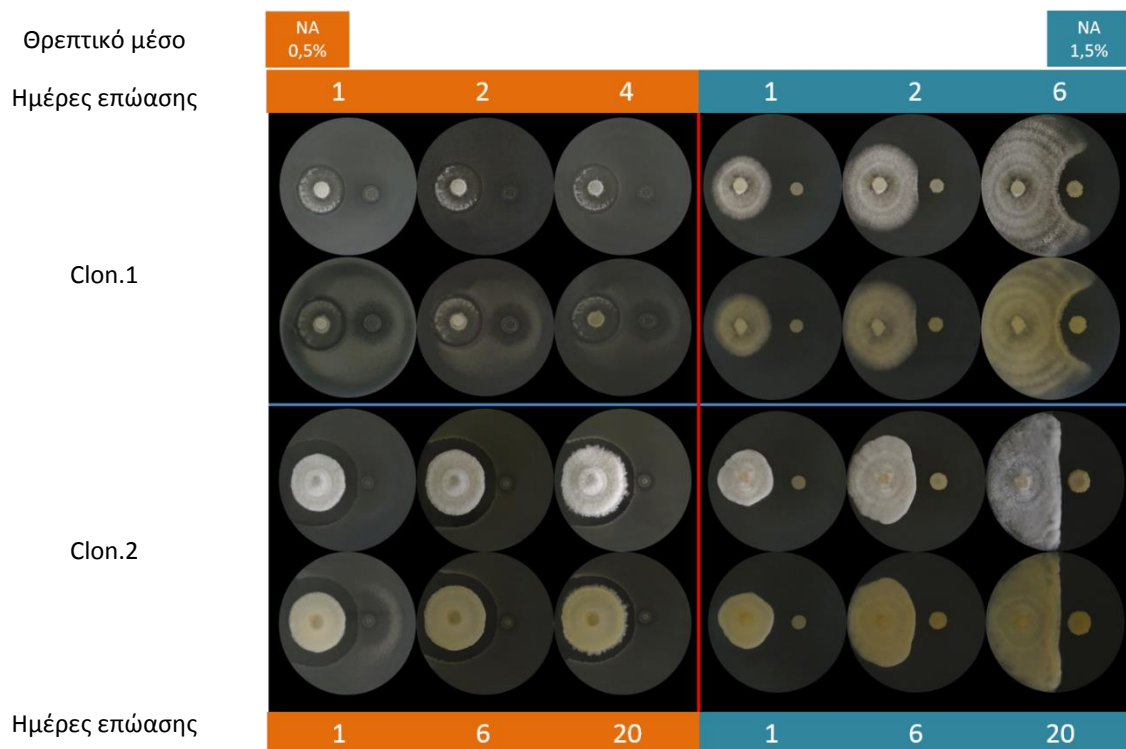
το εύρος μεταξύ του σημείου εμβολιασμού του βακτηρίου και της ζώνης παρεμπόδισης. (E-F) Το στέλεχος Clon.1 με το βακτήριο Cal.r.11 σε θρεπτικό μέσο NA με 1,5% άγαρ, τη 2^η και 6^η ημέρα επώασης. (G-H) Το στέλεχος Clon.2 με το βακτήριο Cal.r.11 σε θρεπτικό μέσο NA με 1,5% άγαρ, την 6^η και 20^η ημέρα επώασης.



Εικόνα 4.8.3 Μεγέθυνση της ζώνης αλληλεπίδρασης κατά την 20^η ημέρα αλληλεπίδρασης του μύκητα Clon.2 με το βακτήριο Cal.r.11 σε θρεπτικό υπόστρωμα NA με 1,5% άγαρ (άνω και κάτω όψη τρυβλίου). Μεταξύ των κόκκινων γραμμών φαίνεται η πυκνότερη ζώνη των μυκηλιακών υφών.

4.8.2. Αλληλεπίδραση του μύκητα *Clonostachys rosea* με το βακτήριο Cal.I.30

Στην εικόνα 4.8.4 παρατίθεται η αλληλεπίδραση των δύο στελεχών του *Clonostachys rosea* με το βακτήριο Cal.I.30.

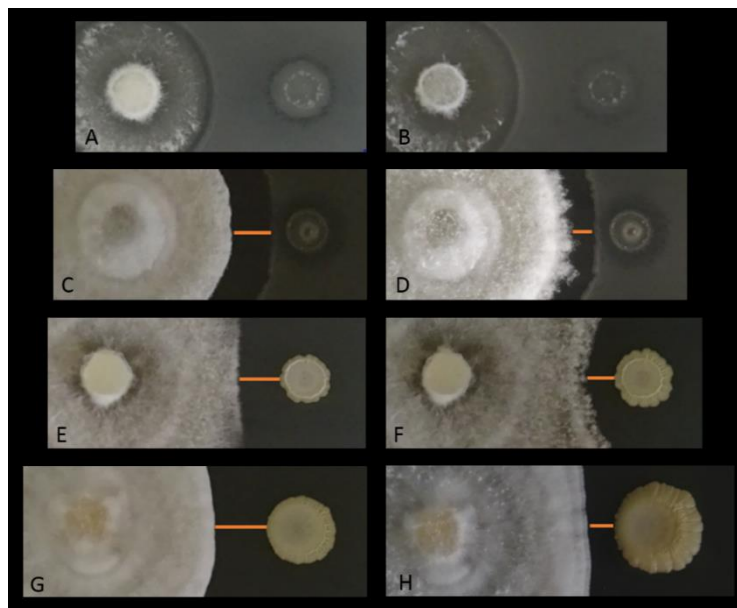


Εικόνα 4.8.4. Αλληλεπίδραση των στελεχών *C. rosea* με το βακτήριο Cal.I.30 σε θρεπτικό μέσο NA (0,5% και 1,5% άγαρ). Το στέλεχος Clon.1 εμβολιάστηκε 2 ημέρες νωρίτερα από το βακτήριο Cal.I.30 και στα δύο θρεπτικά μέσα. Το στέλεχος Clon.2 εμβολιάστηκε 5 ημέρες νωρίτερα από το βακτήριο και στα δύο θρεπτικά μέσα.

Η αλληλεπίδραση του βακτηρίου Cal.I.30 με τα δύο στελέχη του *Clonostachys rosea* είναι όμοια με εκείνη του βακτηρίου Cal.r.11 (Εικ. 4.8.4 και Εικ. 4.8.5).

Το βακτήριο Cal.I.30 εξαπλώνεται με ομαδική κίνηση (swarming) στο θρεπτικό μέσο NA (0,5% άγαρ) έχοντας καταλάβει όλο το τρυβλίο και με τα δύο στελέχη του *C. rosea*. Το στέλεχος Clon.2 πιθανόν εκκρίνει ουσίες που περιορίζουν το βακτήριο Cal.I.30 να τον πλησιάσει, σχηματίζοντας περιμετρικά μια ζώνη παρεμπόδισης, ενώ το στέλεχος Clon.1 δεν παρεμποδίζει το βακτήριο και αυτό αναπτύσσεται πάνω του. Ακόμη, το στέλεχος Clon.2 αναπτύσσεται πάνω στη ζώνη παρεμπόδισης που έχει σχηματίσει και πλησιάζει το βακτήριο. Όμως, οι μυκηλιακές υφές που βρίσκονται πιο κοντά στα βακτηριακά κύτταρα, έχουν διαφορετική ανάπτυξη κατά την 20^η ημέρα, συγκριτικά με τις προηγούμενες ημέρες ή και με τις υφές που δεν αναπτύσσονται τόσο κοντά με το βακτήριο. Άρα, πιθανόν το βακτήριο να εκκρίνει επίσης ουσίες που να επηρεάζουν την ανάπτυξη του στελέχους Clon.2.

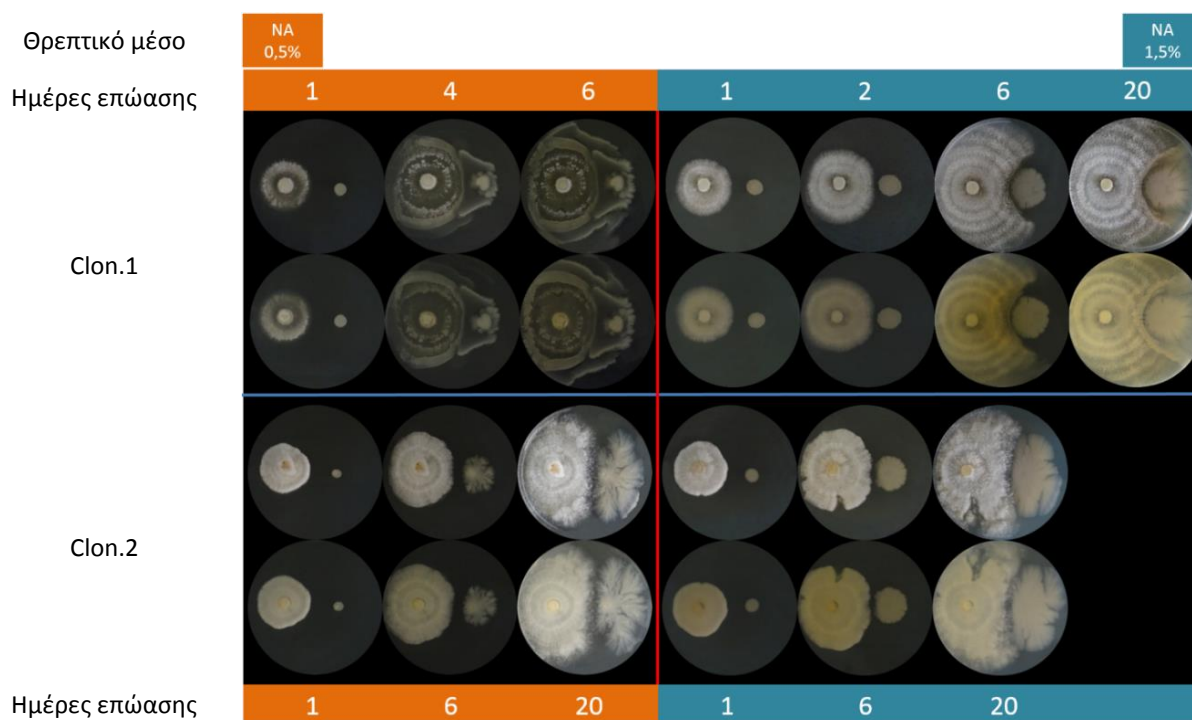
Στο θρεπτικό μέσο NA με 1,5% άγαρ, το βακτήριο Cal.I.30 δεν εμφανίζει ομαδική κίνηση (no-swarming), και φαίνεται να εκκρίνει ουσίες παρεμποδιστικές για την ανάπτυξη και των δύο στελεχών του *C. rosea*. Η ζώνη παρεμπόδισης που σχηματίζεται στα δύο στελέχη με το ίδιο βακτήριο είναι διαφορετική στο σχήμα της.



Εικόνα 4.8.5 Μεγέθυνση της περιοχής αλληλεπίδρασης κοντά στα σημεία εμβολιασμού των στελεχών του *Clonostachys rosea* με το βακτήριο Cal.l.30 (Α-Η), (άνω όψεις τρυβλίων). Η πορτοκαλί γραμμή δίχνει το εύρος της ζώνης παρεμπόδισης μεταξύ των δύο μικροοργανισμών. (Α-Β) Το στέλεχος Clon.1 με το βακτήριο Cal.l.30 σε θρεπτικό μέσο NA με 0,5% άγαρ, τη 1^η και 4^η ημέρα επώασης. (C-D) Το στέλεχος Clon.2 με το βακτήριο Cal.l.30 σε θρεπτικό μέσο NA με 0,5% άγαρ, την 6^η και 20^η ημέρα επώασης. (Ε-Η) Το στέλεχος Clon.1 με το βακτήριο Cal.l.30 σε θρεπτικό μέσο NA με 1,5% άγαρ, την 6^η και 20^η ημέρα επώασης. (Γ-Η) Το στέλεχος Clon.2 με το βακτήριο Cal.l.30 σε θρεπτικό μέσο NA με 1,5% άγαρ, την 6^η και 20^η ημέρα επώασης.

4.8.3. Αλληλεπίδραση του μύκητα *Clonostachys rosea* με το βακτήριο Cal.r.1

Στην εικόνα 4.8.6 παρατίθεται η αλληλεπίδραση των δύο στελεχών του *Clonostachys rosea* με το βακτήριο Cal.r.1.



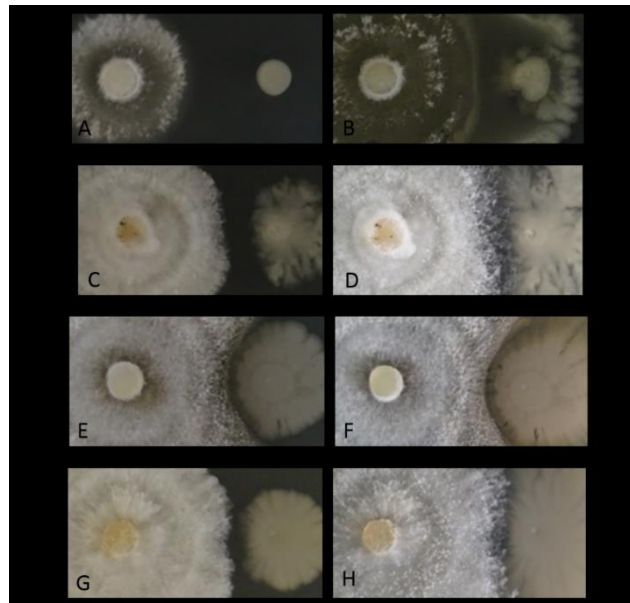
Εικόνα 4.8.6 Αλληλεπίδραση των στελεχών *C. rosea* με το βακτήριο Cal.r.1 σε θρεπτικό μέσο NA (0,5% και 1,5% άγαρ). Το στέλεχος Clon.1 εμβολιάστηκε 2 ημέρες νωρίτερα από το βακτήριο Cal.r.1 και στα δύο θρεπτικά μέσα. Το στέλεχος Clon.2 τοποθετήθηκε 5 ημέρες νωρίτερα από το βακτήριο και στα δύο θρεπτικά μέσα.

Στο θρεπτικό μέσο NA στερεοποιημένο με άγαρ 0,5%, ευνοείται η εμφάνιση ομαδικής κινητικότητας από το βακτηριακό στέλεχος Cal.r.1 με αποτέλεσμα κατά την αλληλεπίδραση του με τον Clon.1, να περιορίζει την εξάπλωση του ενδοφυτικού μύκητα (Εικ. 4.8.6). Την 4^η ημέρα αλληλεπίδρασης, το βακτήριο περικυκλώνει τον μύκητα και αναπτύσσεται πάνω στις

μυκηλιακές υφές. Το φαινόμενο γίνεται εντονότερο την 6^η ημέρα, με το βακτήριο να καλύπτει πλήρως το μύκητα, διαλύοντας τις υφές του.

Στο NA με 1,5% άγαρ, το βακτήριο Cal.r.1 περιορίζει την εξάπλωση του μύκητα Clon.1 την 2^η ημέρα, όμως από την 6^η ημέρα έρχονται σε επαφή και παρατηρείται κιτρινωπός μεταχρωματισμός στις μυκηλιακές υφές, κοντά στη ζώνη αλληλεπίδρασης. Η εισχώρηση και ανάπτυξη του βακτηρίου στην περιοχή των μυκηλιακών υφών φαίνεται καθαρά την 20^η ημέρα.

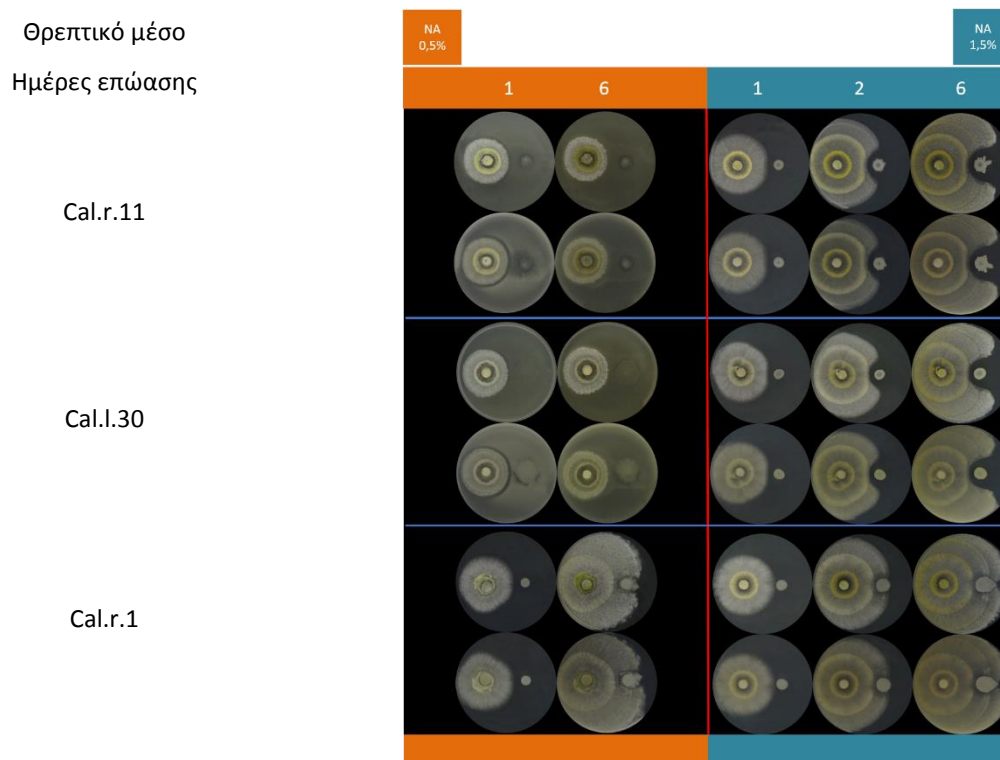
Ενώ, στην αλληλεπίδραση με το στέλεχος Clon.2, την 6^η ημέρα επώασης και στα δύο θρεπτικά μέσα NA, παρατηρείται σχηματισμός ζώνης παρεμπόδισης, που δημιουργείται από πιθανές εκκρίσεις και των δύο μικροοργανισμών, η ανάπτυξη και των δύο μικροοργανισμών συνεχίζει διατηρώντας την ζώνη παρεμπόδισης (Εικ.4.8.7). Πιθανόν αυτή η σχέση θα μπορούσε να δηλώσει τη συνύπαρξη μεταξύ του Clon.2 και του βακτηρίου Cal.r.1.



Εικόνα 4.8.7 Μεγέθυνση της περιοχής αλληλεπίδρασης των στελεχών του *Clonostachys rosea* με το βακτήριο Cal.r.1 (A-H), (άνω όψεις τρυβλίων (A-B) Το στέλεχος Clon.1 με το βακτήριο Cal.r.1 σε θρεπτικό μέσο NA με 0,5% άγαρ, τη 1^η και 6^η ημέρα επώασης. (C-D) Το στέλεχος Clon.2 με το βακτήριο Cal.r.1 σε θρεπτικό μέσο NA με 0,5% άγαρ, τη 2^η και 20^η ημέρα επώασης. (E-F) Το στέλεχος Clon.1 με το βακτήριο Cal.r.1 σε θρεπτικό μέσο NA με 1,5% άγαρ, την 6^η και 20^η ημέρα επώασης. (G-H) Το στέλεχος Clon.2 με το βακτήριο Cal.r.1 σε θρεπτικό μέσο NA με 1,5% άγαρ, την 6^η και 20^η ημέρα επώασης.

4.9. Αλληλεπίδραση του μύκητα *Trichoderma* sp. με τα ενδοφυτικά βακτήρια

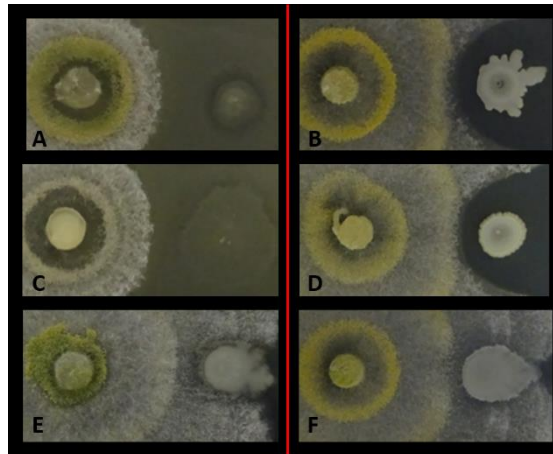
Μελετήθηκε επιπλέον η αλληλεπίδραση του *Trichoderma* sp. με τα ενδοφυτικά βακτήρια Cal.r.11, Cal.l.30 και Cal.r.1, εφαρμόζοντας την ίδια μέθοδο όπως και στα στελέχη του *C. rosea* (Εικ. 4.9.1).



Εικόνα 4.9.1 Αλληλεπίδραση του *Trichoderma* sp. (αριστερά) με τα βακτήρια Cal.r.11, Cal.l.30 και Cal.r.1 σε θρεπτικό μέσο NA (0,5% και 1,5% άγαρ). Ο μύκητας εμβολιάστηκε μία ημέρα νωρίτερα από τα βακτήρια.

Ο ενδοφυτικός μύκητας *Trichoderma* sp. πιθανόν συνυπάρχει με το βακτήριο Cal.r.1, καθώς οι δύο μικροοργανισμοί έρχονται σε επαφή και στα δύο θρεπτικά μέσα NA χωρίς να σημειώνεται παρεμπόδιση της ανάπτυξης τους. Τα βακτήρια Cal.r.11 και Cal.l.30 εμφανίζουν έντονη ομαδική κινητικότητα (swarming) στο θρεπτικό μέσο NA με 0,5% άγαρ, περικυκλώνοντας τον *Trichoderma* sp., χωρίς ωστόσο να εισέρχονται εντός των υφών του. Κατά την 1^η ημέρα αλληλεπίδρασης με τα δύο αυτά βακτήρια παρατηρείται ο σχηματισμός μιας λεπτής ζώνης παρεμπόδισης γύρω από τον μύκητα.

Στο θρεπτικό μέσο NA με 1,5% άγαρ τα βακτήρια Cal.r.11 και Cal.l.30 πιθανόν εκκρίνουν αντιβιοτικές ενώσεις οι οποίες σχηματίζουν έντονη ζώνη παρεμπόδισης και περιορίζουν την εξάπλωση του *Trichoderma* sp. (Εικ. 4.9.2).



Εικόνα 4.9.2 Μεγέθυνση της περιοχής αλληλεπίδρασης κοντά στα σημεία εμβολιασμού του *Trichoderma* sp. με τα ενδοφυτικά βακτήρια την 6^η ημέρα επώασης (A-F), άνω όψεις τρυβλίων. Ο μύκητας *Trichoderma* sp. σε θρεπτικό μέσο NA με 0,5% άγαρ με τα βακτήρια Cal.r.11 (A), Cal.l.30 (C), Cal.r.1 (E) και σε θρεπτικό μέσο NA με 1,5% άγαρ με τα βακτήρια Cal.r.11 (B), Cal.l.30 (D) και Cal.r.1 (F).

5. Συζήτηση

Ο βιολογικός έλεγχος των φυτοπαθογόνων μυκήτων και των βακτηρίων μπορεί να επιτευχθεί με την εφαρμογή παραγόντων βιολογικού ελέγχου, οι οποίοι ανταγωνίζονται το παθογόνο του φυτού άμεσα, μέσω του μυκοπαρασιτισμού, της έκκρισης αντιβιοτικών ενώσεων, του ανταγωνισμού για χώρο και θρεπτικά συστατικά, ή έμμεσα, επάγοντας την ανθεκτικότητα του φυτού-ξενιστή. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ο βιολογικός έλεγχος φυτοπαθογόνων οργανισμών μπορεί να βελτιωθεί με την εφαρμογή πολλαπλών στελεχών αντί ενός, ειδικά όταν εφαρμόζονται βιολογικοί παράγοντες με διαφορετικό τρόπο δράσης (Sarma et al., 2015).

Οι δοκιμές πεδίου που διερευνούν την επίδραση ενός μείγματος στελεχών του γένους *Clonostachys* για τον έλεγχο των ασθενειών του λοβού του κακάου, που προκαλείται από το παθογόνο *Monillia* sp., έδειξαν ωφέλιμα αποτελέσματα με την εφαρμογή του *Clonostachys* είτε σε μείγμα μικροβίων, είτε ως μεμονωμένο στέλεχος (Krauss & Soberanis 2001; Hidalgo et al., 2003). Οι μελέτες συμβατότητας που πραγματοποιήθηκαν στα παραπάνω μείγματα έφεραν σημαντικά αποτελέσματα ως προς την *in vitro* αλληλεπίδρασή τους (dual culture). Συγκεκριμένα, η πλειονότητα των αντίστοιχων ζευγών είχε ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό μίας ζώνης παρεμπόδισης, με ένα υποσύνολο να εμφανίζει πλήρη ένωση των αναπτυσσόμενων αποικιών (ten Hoopen et al., 2010). Αυτές οι μελέτες έδειξαν ότι σε μείγματα διαφορετικών στελεχών μπορεί να εμφανιστούν ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις, με αποτέλεσμα τη μειωμένη αποτελεσματικότητά τους.

Οι δικές μας *in vitro* μελέτες έδειξαν ότι τα στελέχη Clon.1 και Clon.2 εμφανίζουν διαφορετική συμπεριφορά κατά την αλληλεπίδραση με τον εαυτό τους και κατά την αντιπαράθεση μεταξύ τους. Το αποτέλεσμα της αντιπαράθεσης μεταξύ του στελέχους Clon.1 και του στελέχους Clon.2 μπορεί να θεωρηθεί ως ισοπαλία και επομένως είναι πιθανό αυτά τα στελέχη να συνυπάρχουν υπό φυσικές συνθήκες. Έτσι, τα δύο στελέχη του *C. rosea* θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην παρασκευή μείγματος και το μείγμα αυτό αναμένεται να έχει καλύτερη ανταγωνιστικότητα έναντι πλήθους φυτοπαθογόνων μυκήτων, σε σύγκριση με την εφαρμογή του ενός μεμονωμένου στελέχους.

Ο μύκητας *C. rosea* είναι ένας επιθετικός, μυκοπαρασιτικός μύκητας ο οποίος ανταγωνίζεται όχι μόνο τους φυτοπαθογόνους μύκητες αλλά και ωφέλιμα στελέχη. Σε πειράματά τους οι Krauss και συνεργάτες (2004) απέδειξαν ότι τα στελέχη των *M. anisopliae*

και *B. bassiana* ήταν ευαίσθητα (μυκοπαρασιτισμός) κατά την αλληλεπίδρασή τους με τον *C. rosea*. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι σπόροι σιταριού στους οποίους είχαν εφαρμοστεί (bioprimed) οι ωφέλιμοι μύκητες *C. rosea* και *M. flavoviride*, εμφάνισαν υψηλή ανθεκτικότητα στα φυτοπαθογόνα έντομα όσο και πλήρη προστασία από τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Fusarium culmorum* (Keyser et al., 2016). Ένα μείγμα (20: 1) των *B. bassiana* και *C. rosea* που μεταφέρθηκε από τις μέλισσες σε άνθη και φύλλα ντομάτας, μείωσε σημαντικά τόσο τη γκρίζα μούχλα όσο και το έντομο παράσιτο, λευκή μύγα (Karongo et al., 2008). Οι *in vitro* μελέτες μας έδειξαν ότι οι εντομοπαθογόνοι μύκητες *Metarhizium* sp. και *B. bassiana* ήταν ασθενέστεροι εναντίον του στελέχους Clon.1, ενώ το Clon.2 μπορούσε να συνυπάρχει με τον *B. bassiana*. Έτσι, ένα μείγμα με Clon.2 και *B. bassiana* θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί συνδυαστικά για την καταστολή των φυτοπαρασιτικών εντόμων και των φυτοπαθογόνων μυκήτων.

Η αξιολόγηση της *in vitro* αλληλεπίδρασης επιλεγμένων στελεχών των γενών *Clonostachys* και *Trichoderma* έδειξε την κυρίαρχη ανταγωνιστική δράση των στελεχών *Clonostachys* spp. έναντι του *Trichoderma* spp. (Krauss et al., 2013) υποδηλώνοντας ότι αυτοί οι δύο μυκοπαρασιτικοί μύκητες μπορεί να μην είναι δυνατόν να συνυπάρχουν. Τα πειράματα πεδίου ήταν επίσης συναφή με τα *in vitro* πειράματα, κατά τα οποία οι λοβοί κακάου εμβολιάστηκαν με ένα μείγμα των *C. rosea* και *Trichoderma* sp. και ο *Trichoderma* sp. κατέστειλε προσωρινά τον *C. rosea*. Ωστόσο, δύο εβδομάδες μετά την εφαρμογή, ο *C. rosea* παρέμεινε ο κυρίαρχος και συνεχής αποικιστής των λοβών. Αυτή η ασυμβατότητα ξεπεράστηκε μερικώς ρυθμίζοντας την αναλογία εμβολιασμού του μικτού εμβολίου υπέρ του *Trichoderma* sp. (Krauss et al., 2013). Έτσι, απαιτείται η αξιολόγηση της ανταγωνιστικής δράσης πριν από τη συνδυασμένη εφαρμογή των *Clonostachys* και *Trichoderma* ως εμβόλιο για την προστασία των φυτών έναντι των παθογόνων μυκήτων. Μείγματα που περιέχουν το στέλεχος ARB11 του *Clonostachys* sp. και το εμπορεύσιμο *Trichoderma* sp. T-22 προστάτεψαν αποτελεσματικά το δένδρο κακάο από παθογόνα στελέχη του *Rosellinia* spp. που προκαλούν τη μαύρη σήψη της ρίζας, σε σύγκριση με τον εμβολιασμό ενός μεμονωμένου στελέχους (García et al., 2003). Το μικτό εμβόλιο που περιέχει τους *C. rosea* Fv114 και *T. harzianum* Fv178 προστάτεψε το φυτό ελιάς από μολύνσεις του *Verticillium dahliae* (Yaseen et al., 2008). Ωστόσο, οι συντάκτες και των δύο μελετών δεν ανέφεραν κανένα στοιχείο σχετικά με τη συμβατότητα μεταξύ των μυκήτων του γένους *Clonostachys* και *Trichoderma*. Οι μελέτες μας έδειξαν ότι και τα δύο στελέχη του *Clonostachys rosea*

μπορούν να συνυπάρχουν με το *Trichoderma* sp. και έτσι μπορεί να εκπροσωπούν μια βάση για την παρασκευή συμβατών μειγμάτων με διαφορετικά στελέχη του γένους *Thichoderma*.

Μελέτες σχετικά με την *in vitro* αλληλεπίδραση του *C. rosea* με το βακτήριο *P. chlororaphis* PCL1391 (Tzelepis & Lagorodi, 2011) ή το *Pseudomonas chlororaphis* Toza7 που παράγουν φεναζίνη (phenazine) καθώς και με το *Serratia rubidaea* S55 που παράγει προδιγιοσίνη (prodigiosin) (Kamou et al., 2016), έδειξαν πως ο *C. rosea* έχει την ικανότητα να αποτοξικοποιεί τόσο τη φεναζίνη (phenazine) όσο και την προδιγιοσίνη (prodigiosin) (Kamou et al., 2016). Έχει ήδη αποδειχθεί ότι ο *Clonostachys rosea* διαθέτει μηχανισμό αποτοξικοποίησης που μετατρέπει τη ζεαραλενόνη (zearalenone) (ZEN), μία μυκοτοξίνη που παράγεται από τον *Fusarium* sp., σε ένα μη τοξικό προϊόν (Takahashi-Ando et al., 2002, 2004).

Τα δεδομένα μας έδειξαν ότι τα αρχικά στάδια αλληλεπίδρασης του *C. rosea* με το βακτήριο Cal.r.11 χαρακτηρίζονται από αμοιβαία αναστολή. Ενώ σε μεταγενέστερα στάδια οι μύκητες έχουν την ικανότητα προοδευτικής αποτοξικοποίησης των βακτηριακών αντιμυκητιακών μεταβολιτών, εκκρίνοντας ταυτόχρονα τοξικές αντιβακτηριακές ενώσεις. Έτσι, οι μύκητες έχουν την ικανότητα να εισέρχονται σε περιοχή όπου υπήρχε η βακτηριακή μακροαποικία. Ένας παρόμοιος χημικός ανταγωνισμός έχει αναφερθεί κατά τη διάρκεια της αλληλεπίδρασης του ενδοφυτικού μύκητα *Paraconiothyrium variabile* και του ενδοφυτικού βακτηρίου *Bacillus subtilis* (Vallet et al., 2017). Η υψηλή ανοχή του Clon.1 έναντι των αντιβιοτικών ενώσεων που παράγονται από το Cal.r.11 πιθανά επιτρέπει την συνδυασμένη εφαρμογή τους, πιθανόν σε διαδοχικές χρονικές περιόδους. Οι Karlsson και συνεργάτες (2015) έδειξαν ότι η συνδυασμένη εφαρμογή του *C. rosea* IK726 και του *P. chlororaphis* PCL1391 σε σπόρους ντομάτας παρείχε καλύτερη προστασία στα φυτά έναντι του *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* σε σύγκριση με την εφαρμογή των μεμονωμένων βιολογικών παραγόντων.

6. Βιβλιογραφία

- Τζάμος Ε. Κ. (2007). *Φυτοπαθολογία*. Σταμούλη Α.Ε.
- Ahmed, M., Laing, M. D., & Nsahlai, I. V. (2014). Use of *Clonostachys rosea* against sheep nematodes developing in pastures. *Biocontrol science and technology*, 24(4), pp. 389-398.
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., Bakker & P. A. H. M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17, pp. 478-486.
- Berg, G., Köberl, M., Rybakova, D., Müller, H., Grosch, R., & Smalla, K. (2017). Plant microbial diversity is suggested as the key to future biocontrol and health trends. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(5).
- Blazier, S. R. & Conway K. E. (2004). Characterization of *Rhizoctonia solani* isolates associated with patch diseases on turfgrass. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*, 84, pp. 41-51.
- Borges, Á. V., Saraiva, R. M., & Maffia, L. A. (2015). Biocontrol of gray mold in tomato plants by *Clonostachys rosea*. *Tropical Plant Pathology*, 40(2), pp. 71-76.
- Chandrashekara, K. N., Manivannan, S., Chandrashekara, C., & Chakravarthi, M. (2012). Biological Control of Plant Diseases. In Y. S. Vaibhav K. Singh, *Ecofriendly Innovative Approaches in Plant Disease Management* (pp. 147-166). International Book Distributors.
- Charif, M., & Bentamon, N. (1990). Cytochemical aspects of chitin breakdown during parasitic action of *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Phytopathology*, 80, pp. 1466-1474.
- Chatterton, S., Jayaraman, J., & Punja, Z. K. (2008). Colonization of cucumber plants by the biocontrol fungus *Clonostachys rosea* f. *catenulata*. *Biological Control*, 46(2), pp. 267-278.
- Daguerre, Y., Siegel, K., Edel-Hermann, V., & Steinberg, C. (2014). Fungal proteins and genes associated with biocontrol mechanisms of soil-borne pathogens: a review. *Fungal Biology Reviews*, 28, pp. 97–125.
- De Silva, N. I., Brooks, S., Lumyong, S., & Hyde, K. D. (2019). Use of endophytes as biocontrol agents. *Fungal Biology Reviews*.
- Dong, J. Y., Zhao, Z. X., Cai, L., Liu, S. Q., Zhang, H. R., Duan, M., & Zhang, K. Q. (2004). Nematicidal effect of freshwater fungal cultures against the pine-wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Fungal Divers*, 15, pp. 125-135.
- Dörnte, B., & Kües, U. (2013). Fast Microwave-based DNA Extraction from Vegetative Mycelium and Fruiting Body Tissues of Agaricomycetes for PCR Amplification. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 7(4), pp. 825-836.
- du Jardin, P. (2012). The Science of Plant Biostimulants—A bibliographic analysis, Ad hoc study report. *European Commission*.
- Dubey, M. K., Jensen, D. F., & Karlsson, M. (2014). Hydrophobins are required for conidial hydrophobicity and plant root colonization in the fungal biocontrol agent *Clonostachys rosea*. *BMC microbiology*, 14(1), p. 18.

- Eilenberg, J., Hajek, A., & Lomer. (2001). Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*, 46(4), pp. 387-400.
- Elena, K. (2009). Occurrence of *Phomopsis* sp. on kiwi plantations in Northern Greece. *Hellenic Plant Protection Journal*, 2(2), pp. 67-69.
- Faedda, R., Agosteo, G. E., Schena, L., Mosca, S., Frisullo, S., Di San Lio, G. M., & Cacciola, S. O. (2011). *Colletotrichum clavatum* sp. nov. identified as the causal agent of olive anthracnose in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 50(2), pp. 283-302.
- Gan, Z., Yang, J., Tao, N., Yu, Z., & Zhang, K. Q. (2007). Cloning and expression analysis of a chitinase gene *Crchi1* from the mycoparasitic fungus *Clonostachys rosea* (syn. *Gliocladium roseum*). *The Journal of Microbiology*, 45(5), pp. 422-430.
- García, R. A. M., Ten Hoopen, G. M., Kass, D. C., Garita, V. A. S., & Krauss, U. (2003). Evaluation of mycoparasites as biocontrol agents of *Rosellinia* root rot in cocoa. *Biological Control*, 27(2), pp. 210-227.
- Ghorbanpour, M., Omidvari, M., Abbaszadeh-Dahaji, P., Omidvar, R., & Kariman, K. (2018). Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. *Biological Control*(117), pp. 147-157.
- Hanada, R. E., Pomella, A. W. V., Costa, H. S., Bezerra, J. L., Loguercio, L. L., & Pereira, J. O. (2010). Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuaçu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. *Fungal Biology*, 114(11-12), pp. 901-910.
- Hardoim, P. R., Van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., ... & Sessitsch, A. (2015). The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), pp. 293-320.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & Dewaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London. *Series B: Biological Sciences*, 270(1512), pp. 313-321.
- Hidalgo, E., Bateman, R., Krauss, U., Ten Hoopen, M., & Martínez, A. (2003). A field investigation into delivery systems for agents to control *Moniliophthora roreri*. *European Journal of Plant Pathology*, 109(9), pp. 953-961.
- Hollingsworth, M. L., Andra Clark, A. L. E. X., Forrest, L. L., Richardson, J., Pennington, R. T., Long, D. G., ... & Hollingsworth, P. M. (2009). Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants. *Molecular ecology resources*, 9(2), pp. 439-457.
- Iqbal, M., Dubey, M., McEwan, K., Menzel, U., Franko, M. A., Viketoft, M., ... & Karlsson, M. (2017). Evaluation of *Clonostachys rosea* for Control of Plant-Parasitic Nematodes in Soil and in Roots of Carrot and Wheat. *Phytopathology*, 108(1), pp. 52-59.
- Izumitsu, K., Hatoh, K., Sumita, T., Kitade, Y., Morita, A., Tanaka, C., ... & Ota, Y. (2012). Rapid and simple preparation of mushroom DNA directly from colonies and fruiting bodies for PCR. *Mycoscience*, 53(5), pp. 396-401.

- Jain, A., Singh, S., Kumar Sarma, B., & Bahadur Singh, H. (2012). Microbial consortium-mediated reprogramming of defence network in pea to enhance tolerance against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Applied Microbiology*, *112*(3), pp. 537-550.
- Jayawardena, R. S., Huang, J. K., Jin, B. C., Yan, J. Y., Li, X. H., Hyde, K. D., Bahkali, A. H., Yin, S. L., & Zhang, G. Z. (2016). An account of *Colletotrichum* species associated with strawberry anthracnose in China based on morphology and molecular data. *Mycosphere*, *7*, pp. 1177-1191.
- Jensen, B., Lübeck, P. S., & Jørgensen, H. J. (2016). *Clonostachys rosea* reduces spot blotch in barley by inhibiting prepenetration growth and sporulation of *Bipolaris sorokiniana* without inducing resistance. *Pest management science*, *72*(12), pp. 2231-2239.
- Kambrekar, D. N. (2016). New paradigms in exploration of microbial endophytes in insect pest management. *Journal of Farm Science*, *29*(4), pp. 420-435.
- Kamilova, F., Kravchenko, L. V., Shaposhnikov, A. I., Makarova, N., & Lugtenberg, B. (2006). Effects of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and of the biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens* WCS365 on the composition of organic acids and sugars in tomato root exudate. *Molecular plant-microbe interactions*, *19*(10), pp. 1121-1126.
- Kamou, N. N., Dubey, M., Tzelepis, G., Menexes, G., Papadakis, E. N., Karlsson, M., ... & Jensen, D. F. (2016). Investigating the compatibility of the biocontrol agent *Clonostachys rosea* IK726 with prodigiosin-producing *Serratia rubidaea* S55 and phenazine-producing *Pseudomonas chlororaphis* ToZa7. *Archives of microbiology*, *198*(4), pp. 369-377.
- Kapongo, J. P., Shipp, L., Kevan, P., & Sutton, J. C. (2008). Co-vectoring of *Beauveria bassiana* and *Clonostachys rosea* by bumble bees (*Bombus impatiens*) for control of insect pests and suppression of grey mould in greenhouse tomato and sweet pepper. *Biological Control*, *46*(3), pp. 508-514.
- Karlsson, M., Durling, M. B., Choi, J., Kosawang, C., Lackner, G., Tzelepis, G. D., ... Jensen, D. F. (2015). Insights on the evolution of mycoparasitism from the genome of *Clonostachys rosea*. *Genome biology and evolution*, *7*(2), pp. 465-480.
- Keyser, C. A., Jensen, B., & Meyling, N. V. (2016). Dual effects of *Metarhizium* spp. and *Clonostachys rosea* against an insect and a seed-borne pathogen in wheat. *Pest management science*, *72*(3), pp. 517-526.
- Kosawang, C., Karlsson, M., Véléz, H., Rasmussen, P. H., Collinge, D. B., Jensen, B., & Jensen, D. F. (2014). Zearalenone detoxification by zearalenone hydrolase is important for the antagonistic ability of *Clonostachys rosea* against mycotoxigenic *Fusarium graminearum*. *Fungal biology*, *118*(4), pp. 364-373.
- Krauss, U., & Soberanis, W. (2001). Rehabilitation of diseased cacao fields in Peru through shade regulation and timing of biocontrol measures. *Agroforestry Systems*, *53*(2), pp. 179-184.
- Krauss, U., Hidalgo, E., Arroyo, C., & Piper, S. R. (2004). Interaction between the entomopathogens *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* and the mycoparasites *Clonostachys* spp., *Trichoderma harzianum* and *Lecanicillium lecanii*. *Biocontrol science and technology*, *14*(4), pp. 331-346.

- Krauss, U., Ten Hoopen, M., Rees, R., Stirrup, T., Argyle, T., George, A., ... & Casanoves, F. (2013). Mycoparasitism by *Clonostachys byssicola* and *Clonostachys rosea* on *Trichoderma* spp. from cocoa (*Theobroma cacao*) and implication for the design of mixed biocontrol agents. *Biological Control*, *67*(3), pp. 317-327.
- Kristin, A., & Miranda, H. (2013). The root microbiota—a fingerprint in the soil? *Plant and Soil*, *370*(1-2), pp. 671-686.
- Lagopodi, A. L., Ram, A. F., Lamers, G. E., Punt, P. J., Van den Hondel, C. A., Lugtenberg, B. J., & Bloemberg, G. V. (2002). Novel aspects of tomato root colonization and infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* revealed by confocal laser scanning microscopic analysis using the green fluorescent protein as a marker. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *15*(2), pp. 172-179.
- Lahlali, R., & Peng, G. (2014). Suppression of clubroot by *Clonostachys rosea* via antibiosis and induced host resistance. *Plant pathology*, *63*(2), pp. 447-455.
- Latz, M. A., Jensen, B., Collinge, D. B., & Jørgensen, H. J. (2018). Endophytic fungi as biocontrol agents: elucidating mechanisms in disease suppression. *Plant Ecology & Diversity*, *11*, pp. 1-13.
- Lee, J. G., Lee, D. H., Park, S. Y., Hur, J. S., & Koh, Y. J. (2001). First report of *Diaporthe actinidiae*, the causal organism of stem-end rot of kiwifruit in Korea. *The Plant Pathology Journal*, *17*(2), pp. 110-113.
- Luongo, L., Santori, A., Riccioni, L., & Belisario, A. (2011). *Phomopsis* sp. associated with post-harvest fruit rot of kiwifruit in Italy. *Journal of Plant Pathology*, *93*(1), pp. 205-209.
- Mamarabadi, M., Jensen, B., & Lübeck, M. (2008a). Three endochitinase-encoding genes identified in the biocontrol fungus *Clonostachys rosea* are differentially expressed. *Current genetics*, *54*(2), p. 57.
- Mamarabadi, M., Jensen, B., Jensen, D. F., & Lübeck, M. (2008b). Real-time RT-PCR expression analysis of chitinase and endoglucanase genes in the three-way interaction between the biocontrol strain *Clonostachys rosea* IK726, *Botrytis cinerea* and strawberry. *FEMS microbiology letters*, *285*(1), pp. 101-110.
- Mamarabadi, M., Jensen, D. F., & Lübeck, M. (2009). An N-acetyl- β -D-glucosaminidase gene, *cr-nag1*, from the biocontrol agent *Clonostachys rosea* is up-regulated in antagonistic interactions with *Fusarium culmorum*. *Mycological research*, *113*(1), pp. 33-43.
- Manzo, D., Ferriello, F., Puopolo, G., Zoina, A., D'Esposito, D., Tardella, L., ... & Ercolano, M. R. (2016). *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* induces distinct transcriptome reprogramming in resistant and susceptible isogenic tomato lines. *BMC plant biology*, *16*(1), p. 53.
- Marcelino, J., Giordano, R., Gouli, S., Gouli, V., Parker, B. L., Skinner, M., TeBeest, D., & Cesnik, R. (2008). *Colletotrichum acutatum* var. *fioriniae* (teleomorph: *Glomerella acutata* var. *fioriniae* var. nov.) infection of a scale insect. *Mycologia*, *100*(3), pp. 353-374.
- Mejía, L. C., Rojas, E. I., Maynard, Z., Van Bael, S., Arnold, A. E., Hebbar, P., Samuels, G. J., Robbins, N., & Herre, E. A. (2008). Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control*, *46*(1), pp. 4-14.

- Moraga-Suazo, P., & Sanfuentes, E. (2017). Growth promotion of *Pinus radiata* seedlings by soil inoculation and seed pretreatment with the biological control agent *Clonostachys rosea*. *Gayana Botanica*, 74(1).
- Moraga-Suazo, P., Le-Feuvre, R., & Sanfuentes, E. (2016). Induced systemic resistance triggered by *Clonostachys rosea* against *Fusarium circinatum* in *Pinus radiata*. *Forest Research*, 5, p. 174.
- Morandi, M. A., Sutton, J. C., & Maffia, L. A. (2000). Effects of host and microbial factors on development of *Clonostachys rosea* and control of *Botrytis cinerea* in rose. *European Journal of Plant Pathology*, 106(5), pp. 439-448.
- Muvea, A. M., Meyhöfer, R., Subramanian, S., Poehling, H. M., Ekesi, S., & Maniania, N. K. (2014). Colonization of onions by endophytic fungi and their impacts on the biology of *Thrips tabaci*. *PLoS one*, 9(9), p. e108242.
- Pal, K. K., & Gardener, B. M. (2006). Biological control of plant pathogens. *The plant health instructor*, 2, pp. 1117-1142.
- Papavizas, G. C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual review of phytopathology*, 23(1), pp. 23-54.
- Punja, Z. K., & Rodriguez, G. (2018). *Fusarium* and *Pythium* species infecting roots of hydroponically grown marijuana (*Cannabis sativa* L.) plants. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 40(4), pp. 498-513.
- Rodríguez, M. A., Cabrera, G., Gozzo, F. C., Eberlin, M. N., & Godeas, A. (2011). *Clonostachys rosea* BAF3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. *Journal of Applied Microbiology*, 110(5), pp. 1177-1186.
- Rodríguez, M. A., Rothen, C., Lo, T. E., Cabrera, G. M., & Godeas, A. M. (2015). Suppressive soil against *Sclerotinia sclerotiorum* as a source of potential biocontrol agents: selection and evaluation of *Clonostachys rosea* BAF3646. *Biocontrol science and technology*, 25(12), pp. 1388-1409.
- Rossman, A. Y., Farr, D. F., & Castlebury, L. A. (2007). A review of the phylogeny and biology of the Diaporthales. *Mycoscience*, 48(3), pp. 135-144.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Orozco-Mosqueda, M. D., & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183, pp. 92-99.
- Sarma, B. K. (2015). Microbial consortium-mediated plant defense against phytopathogens: readdressing for enhancing efficacy. *Soil Biology and Biochemistry*, 87, pp. 25-33.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., ...& Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), pp. 6241-6246.
- Schroers, H. J., Samuels, G. J., Seifert, K. A., & Gams, W. (1999). Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. *Mycologia*, 91(2), pp. 365-385.
- Schulz, B., & Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological research*, 109(6), pp. 661-686.
- Selim, K. A., El-Beih, A. A., AbdEl-Rahman, T. M., & El-Diwany, A. I. (2012). Biology of endophytic fungi. *Current Research in Environmental and Applied Mycology*, 2(1), pp. 31-82.

- Singh, A., Sarma, B. K., Upadhyay, R. S., & Singh, H. B. (2013). Compatible rhizosphere microbes mediated alleviation of biotic stress in chickpea through enhanced antioxidant and phenylpropanoid activities. *Microbiological Research*, *168*(1), pp. 33-40.
- Song, H. C., Shen, W. Y., & Dong, J. Y. (2016). Nematicidal metabolites from *Gliocladium roseum* YMF1. 00133. *Applied biochemistry and microbiology*, *52*(3), pp. 324-330.
- Sutton, J. C., Li, D. W., Peng, G., Yu, H., Zhang, P., & Valdebenito-Sanhueza, R. M. (1997). *Gliocladium roseum* a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant disease*, *81*(4), pp. 316-328.
- Takahashi-Ando, N., Kimura, M., Kakeya, H., Osada, H., & Yamaguchi, I. (2002). A novel lactonohydrolase responsible for the detoxification of zearalenone: enzyme purification and gene cloning. *Biochemical journal*, *365*(1), pp. 1-6.
- Takahashi-Ando, N., Ohsato, S., Shibata, T., Hamamoto, H., Yamaguchi, I., & Kimura, M. (2004). Metabolism of zearalenone by genetically modified organisms expressing the detoxification gene from *Clonostachys rosea*. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(6), pp. 3239-3245.
- ten Hoopen, G. M., George, A., Martinez, A., Stirrup, T., Flood, J., & Krauss, U. (2010). Compatibility between *Clonostachys* isolates with a view to mixed inocula for biocontrol. *Mycologia*, *102*(5), pp. 1204-1215.
- Toledo, A. V., Virla, E., Humber, R. A., Paradell, S. L., & Lastra, C. L. (2006). First record of *Clonostachys rosea* (Ascomycota: Hypocreales) as an entomopathogenic fungus of *Oncometopia tucumana* and *Sonesimia grossa* (Hemiptera: Cicadellidae) in Argentina. *Journal of invertebrate pathology*, *92*(1), pp. 7-10.
- Turner, T. R., James, E. K., & Poole, P. S. (2013). The plant microbiome. *Genome biology*, *14*(6), p. 209.
- Tzelepis, G., Dubey, M., Jensen, D. F., & Karlsson, M. (2015). Identifying glycoside hydrolase family 18 genes in the mycoparasitic fungal species *Clonostachys rosea*. *Microbiology*, *161*(7), pp. 1407-1419.
- Tzelpis, G. D., & Lagopodi, L. A. (2011). Interaction between *Clonostachys rosea* IK726 and *Pseudomonas chlororaphis* PCL 1391 against tomato foot and root rot caused by *Fusarium oxysporium* f. sp. *radicis lycopersici*. *IOBC/wprs Bull*, *63*, pp. 75-79.
- Vallet, M., Vanbellingen, Q. P., Fu, T., Le Caer, J. P., Della-Negra, S., Touboul, D., ... & Prado, S. (2017). An integrative approach to decipher the chemical antagonism between the competing endophytes *Paraconiothyrium variabile* and *Bacillus subtilis*. *Journal of natural products*, *80*(11), pp. 2863-2873.
- Varkey, S., Anith, K. N., Narayana, R., & Aswini, S. (2018). A consortium of rhizobacteria and fungal endophyte suppress the root-knot nematode parasite in tomato. *Rhizosphere*, *5*, pp. 38-42.
- Vega, F. E., Posada, F., Aime, M. C., Pava-Ripoll, M., Infante, F., & Rehner, S. A. (2008). Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control*, *46*, pp. 72-82.
- Wani, Z. A., Ashraf, N., Mohiuddin, T., & Riyaz-Ul-Hassan, S. (2015). Plant-endophyte symbiosis, an ecological perspective. *Applied microbiology and biotechnology*, *99*(7), pp. 2955-2965.

- Weller, D. M., Raaijmakers, J. M., Gardener, B. B. M., & Thomashow, L. S. (2002). Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 40, pp. 309–348.
- Whipps, J. M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of experimental Botany*, 52, pp. 487-511.
- Wilson, D. (1995). Endophyte- the evolution of a term and clarification of its use and definition. *Oikos*, 72, pp. 274-276.
- World Health Organization. (2018). *The State of Food Security and Nutrition in the World 2018: Building climate resilience for food security and nutrition*. Food & Agriculture Organization.
- Xue, A. G. (2003). Biological control of pathogens causing root rot complex in field pea using *Clonostachys rosea* strain ACM941. *Phytopathology*, 93(3), pp. 329-335.
- Yaseen, T., Dawalibi, V., D'Onghia, A. M., Ippolito, A., & Nigro, F. (2008). Effect of organic media, alone or in combination with bio-products, on olive plantlets growth and *Verticillium dahlia* infection. *VI International Symposium on Olive Growing*, 949, pp. 289-296.
- Yu, H., & Sutton, J. C. (1997). Morphological development and interactions of *Gliocladium roseum* and *Botrytis cinerea* in raspberry. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19(3), pp. 237-246.
- Zahir, Z. A., Arshad, M., & Frankenberger, W. T. . (2004). Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. *Advances in Agronomy*, 81, pp. 98-169.
- Zhang, L., Yang, J., Niu, Q., Zhao, X., Ye, F., Liang, L., & Zhang, K. Q. (2008). Investigation on the infection mechanism of the fungus *Clonostachys rosea* against nematodes using the green fluorescent protein. *Applied microbiology and biotechnology*, 78(6), pp. 983-990.
- Zou, C. G., Tu, H. H., Liu, X. Y., Tao, N., & Zhang, K. Q. (2010). PacC in the nematophagous fungus *Clonostachys rosea* controls virulence to nematodes. *Environmental microbiology*, 12(7), pp. 1868-1877.