



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πτυχιακή Εργασία

*«Διερεύνηση του ρόλου συνοδών μικροοργανισμών στην
ανάπτυξη του φυτού *Hypericum perforatum*».*



Παπαδημητρίου Ναταλία

Λάρισα 2023

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Παπαδοπούλου Καλλιόπη

Τριμελής Επιτροπή Παπαδοπούλου Καλλιόπη (Επιβλέπουσα): Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Βογιατζή-Καμβούκου Ελένη (Μέλος): Καθηγήτρια Αρωματικών και Φαρμακευτικών Φυτών του Τμήματος Γεωπονίας-Αγροτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Καρπούζας Δημήτριος (Μέλος): Πρόεδρος του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας - Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Περιεχόμενα

Περίληψη

Abstract

1. Εισαγωγή

1.1 Το φαρμακευτικό φυτό *Hypericum perforatum*

1.2 Συστηματική κατάταξη του φυτού *Hypericum perforatum*

1.3 Βιολογική Δράση του *Hypericum perforatum*

1.4 Φυτικό μικροβίωμα

1.5 Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί

1.5.1 Ορισμός ενδοφυτικών μικροοργανισμών

1.5.2 Αποικισμός των φυτών από ενδόφυτα

1.8 Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί στο φυτό *Hypericum perforatum*

2. Σκοπός

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Φυτικό υλικό

3.2 Αποστείρωση δειγμάτων

3.3 Απομόνωση μυκήτων

3.4 Επιλογή μυκήτων

3.5 Απομόνωση DNA

4.2.1 Απομόνωση Γέλης – Αλληλούχηση (Gel extraction – Sequencing)

4.2.2 Q PCR

5. Αποτελέσματα - Συζήτηση

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Περίληψη

Τα φαρμακευτικά φυτά αποικίζονται από πλήθος ενδοφυτικών μικροοργανισμών. Η παρούσα προπτυχιακή μελέτη εστίασε στην επίδραση των ενδοφυτικών μυκήτων *Humicola sp.*, *Epicocum nigrum*, *Alternara brasicae* και *Fusarium solani* (Fsk) στην ανάπτυξη του φαρμακευτικού φυτού *Hypericum perforatum*.

Οι ενδοφυτικοί μύκητες που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη, αποτελούν ενδόφυτα του *H.perforatum* (πλην του Fsk) τα οποία απομονώθηκαν από τις ρίζες και τα φύλλα ενδημικών φυτών αγρίου τύπου.

Την μόλυνση φυτών ντομάτας με τους μύκητες ενδιαφέροντος με στόχο να αποκλειστεί το ενδεχόμενο παθογένειας, ακολούθησε η μόλυνση του *H.perforatum* ώστε να εντοπιστούν φαινοτυπικές αλλαγές στα φυτά .

Λέξεις κλειδιά: ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί, φαρμακευτικά φυτά, βιολογικά ενεργές ουσίες, *Hypericum perforatum*

Abstract

Medicinal plants are colonized by a multitude of endophytic microorganisms, The present undergraduate study focuses on the effect of endophytic fungi *Humicola* sp. , *Epicozum nigrum*, *Alternaria brasicae* and FSK on the growth of the medicinal plant *Hypericum perforatum*.The endophytic fungi included in the study are *H.perforatum* endophytes (except FSK) that have been isolated from the roots and leaves of wild-type endemic plants.

The infection of tomato plants with the fungi of interest in order to exclude the possibility of pathogenicity was followed by the infection of *H.perforatum* in order to identify phenotypic changes in the plants

Key words: endophytic microorganisms, medicinal plants, biologically active substances, *Hypericum perforatum*

Ευχαριστίες

Επειδή σε κάθε ταξίδι , ακόμα και όταν φτάνεις στον προορισμό σου , αυτό που εν τέλει σε ωθεί περισσότερο απ' όλα να το ολοκληρώσεις , είναι οι συνοδοιπόροι που έχεις δίπλα σου στις δυσκολίες. Αρχικά, λοιπόν θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη και τον συντονισμό της οποίας υλοποιήθηκε η παρούσα πτυχιακή εργασία.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα μέλη της τριμελούς επιτροπής, στην κα Βογιατζή-Καμβούκου Ελένη, Καθηγήτρια Αρωματικών και Φαρμακευτικών Φυτών του Τμήματος Γεωπονίας-Αγροτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και στον κ. Καρπούζα Δημήτριο, Πρόεδρο του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, για την συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή.

Ιδιαίτερα όμως θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτωρ Φέκα Μαρία για την βοήθεια, την καθοδήγηση και πάνω απ' όλα την υπομονή της καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους φίλους, συναδέλφους και όσους θεωρώ οικογένεια που ήταν δίπλα μου , όχι μόνο κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας, αλλά όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου. Με εσάς δίπλα μου ξέρω ότι τίποτε δεν πάει στράφι και μπορούμε να καταφέρουμε τα πάντα. Σας ευχαριστώ από καρδιάς.

1.Εισαγωγή

1.1 Το φαρμακευτικό φυτό *Hypericum perforatum*

Το *Hypericum perforatum* αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα φαρμακευτικά φυτά. Είναι ανθοφόρο φυτό, του γένους *Hypericum* και ανήκει στην οικογένεια των Υπερικιδών (*Hypericaceae*) ενώ χαρακτηριστικό του είναι τα πυκνά, επίμηκη, λεία φύλλα και τα κίτρινα άνθη με μαύρες κουκίδες. Είναι ένα πολυετές φυτό και αναπτύσσεται κυρίως σε ξηρές περιοχές. Εντοπίζεται σε όλη την Ευρώπη, την Ασία αλλά και στην Βόρεια Αφρική. Η περίοδος την άνθησης του είναι από Ιούνιο έως Σεπτέμβριο, ενώ συλλέγεται από τον Ιούλιο έως και τον Αύγουστο (Galeotti N., 2017, Ferrara M. Et al., 2017).

Η φαρμακευτική δράση του φυτού *H.perforatum* είναι γνωστή πάνω από 2000 χρόνια. Οι Έλληνες γιατροί του πρώτου αιώνα, (ο Γαληνός, ο Διοσκουρίδης, ο Πλίνιος και ο Ιπποκράτης) το συνέστηναν ως διουρητικό, επουλωτικό βότανο, αλλά και ως θεραπεία για διαταραχές της εμμήνου ρύσεως κ.α (Foster 2000; Castleman 2001; Redvers alet 2001).

Οι αποξηραμένες ανθισμένες κορυφές έπειτα από την τοποθέτηση τους σε ελαιόλαδο του προσέδιδαν κόκκινο χρώμα με το πέρας 3 εβδομάδων. Οι αρχαίοι πίστευαν ότι το φυτό είχε μυστικιστικές ιδιότητες και τα φυτά συγκεντρώνονταν για προστασία από τους δαίμονες και τα κακά πνεύματα. Το όνομα *Hypericum* προήλθε από την ελληνική ονομασία του φυτού, υπερικό. Ενώ βρίσκει τη ρίζα του στις λέξεις «υπερ» και «εικόνα», που αναφέρεται στην υποτιθέμενη ικανότητα του φυτού να αποκρούει τα κακά πνεύματα (Foster 2000).

Οι πρώτοι χριστιανοί πίστευαν επίσης στις μυστικιστικές ιδιότητες του φυτού με μύθους να αναφέρουν ότι η αποτελεσματικότητα του φυτού

κορυφώνεται την Ημέρα του Αγίου Ιωάννη (24 Ιουνίου), (που συμπίπτει συχνά με την εποχή της κορύφωσης της ανθοφορίας) (Foster 2000). Ένας άλλος θρύλος υποστηρίζει ότι το φυτό παρήγαγε το κόκκινο έλαιο στις 29 Αυγούστου, (ημέρα του αποκεφαλισμού του Αγίου Ιωάννη) (Castleman 2001).

1.2 Συστηματική κατάταξη του φυτού *Hypericum perforatum*

Βασίλειο: Φυτά (*Plantae*)

Συνομοταξία: Αγγειόσπερμα (*Angiosperms*)

Ομοταξία: Ευδικοτηλίδονα (*Eudicots*)

Υφομοταξία: Ροδίδες (*Rosids*)

Τάξη: Μαλπιγειώδη (*Malpighiales*)

Οικογένεια: Υπερικήδες (*Hypericaceae*)

Γένος: Υπερικόν (*Hypericum*)

Είδος: Υπερικόν το διάτρητον (*Hypericum perforatum*)

(Ferrara M et al., 2017)

1.3 Βιολογική Δράση του *Hypericum perforatum*

Τα είδη του γένους *Hypericum*, συμπεριλαμβανομένου του φυτού *Hypericum perforatum*, έχουν μελετηθεί εκτενώς λόγω των ποικίλων φαρμακευτικών τους ιδιοτήτων. Η σύνθεση των εκχυλισμάτων από το *H. perforatum* έχει μελετηθεί εκτενώς και έχουν αναγνωριστεί πολλοί δευτερογενείς μεταβολίτες όπως η ρουτίνη, η υπερφορίνη, η υπεροσίδη, η κερκιτρίνη, η ισοκερκιτρίνη, η κερκετίνη, η υπερικίνη και το χλωρογενικό οξύ. Ωστόσο, δύο ενώσεις έχουν αναδειχθεί ως οι πιο σημαντικές για τη φαρμακευτική βιομηχανία: η υπερφορίνη και η υπερικίνη. (Genes (Basel). 2020) Η ιατρική αποτελεσματικότητα του βοτάνου οφείλεται στο ευρύ αυτό φάσμα των βιολογικά ενεργών ουσιών που παράγονται από το φυτό.

1) Αντικαταθλιπτική δράση

Ειδικά τα δύο κύρια ενεργά συστατικά του φυτού, η υπερφορίνη και η υπερικίνη, φαίνεται να έχουν ευεργετική δράση σε διαφορετικές ψυχιατρικές διαταραχές αλλά και διαταραχές της διάθεσης, όπως η διαταραχή μετατραυματικού στρες (PTSD), η διαταραχή ελλειμματικής προσοχής-υπερκινητικότητας (ADHD), η ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή (OCD) και αγχώδη διαταραχές. Ενώ εμφανίζει και αντικαταθλιπτική δράση .

Η αναστολή των MAO μπορεί να είναι ένας πιθανός μηχανισμός υπεύθυνος για την αντικαταθλιπτική δράση του *H.perforatum* λόγω της μη αναστρέψιμης αναστολής και των δύο MAO A και B από υπερικίνη. (Thiede and Walper 1994) .

2) Αντιμικροβιακή δράση

Μελέτες έδειξαν, πως η δραστική ουσία υπερφορίνη είναι αποτελεσματική ενάντια στην μόλυνση από παθογόνα βακτήρια, όπως το *Staphylococcus aureus*, το *Streptococcus pyogenes* και το *Corynebacterium diphtheria* (Reichling et al., 2001).

3) Αντιϊική δράση

Μελέτες έδειξαν ότι ένα ποσοτικοποιημένο εκχύλισμα *Hypericum perforatum* δοκιμάστηκε και βρέθηκε ότι διαθέτει ισχυρή αντιική δράση κατά του SARS-CoV-2. Η αντιική ισχύς του εκχυλίσματος θα μπορούσε να αποδοθεί στις ναφθοδιαθρόνες υπερικίνη και ψευδοϋπερικίνη, σε αντίθεση με άλλα ελεγμένα συστατικά του φυτικού υλικού, τα οποία δεν παρουσίασαν καμία αντιική δράση. Το *Hypericum perforatum* και πιο συγκεκριμένα η υπερικίνη ήταν επίσης αποτελεσματικά έναντι διαφόρων παραλλαγών του SARS-CoV-2 (Alpha, Beta, Delta και Omicron). (Fakry F. Mohamed, et al. 2022)

Επίσης η υπερικίνη παρεμποδίζει τον πολλαπλασιασμό του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV), του ιού τους έρπητα, του ιού της ηπατίτιδας C, του ιού των παραμαγουλάδων, καθώς και του κυτταρομεγαλοϊού και του δάγκειου ιού (Darbinian-Sarkissian et al., 2006). Τα φλαβονοειδή και οι κατεχίνες που περιέχονται στο φυτό, έχει βρεθεί ότι δρουν κατά του ιού της γρίπης.

4) Αντινεοπλασματική δράση

Το εκχύλισμα του *H.perforatum* εμφανίζει βιολογικές ιδιότητες οι οποίες το καθιστούν κατάλληλο τόσο για την πρόληψη όσο και για τη θεραπεία πολλών

ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου. Η τακτική χρήση του μειώνει τον κίνδυνο καρκίνου του παχέος εντέρου στους ανθρώπους και αποτρέπει τις γονιδιοτοξικές επιδράσεις των καρκινογόνων ουσιών σε ζωικά μοντέλα. (Marta Menegazzi 2020)

5) Αντιφλεγμονώδης δράση

Στη δημοφιλή και στην επιστημονική βιβλιογραφία αναφέρονται και εξωτερικές εφαρμογές του *H.perforatum* όπως σε : μικρότερα τραύματα, ηλιακά εγκαύματα, αμβλύ τραύμα, έλκη, κισσοί, αιμορροΐδες, μυαλγία, ισχιαλγία, ρευματισμοί, οσφυϊκή μοίρα, κράμπες, κατάκλιση, χηλοειδείς ουλές και εξαγωγή δοντιών. Η σύγχρονη κλινική έρευνα σχετικά με τον ρόλο του φυτού σε αυτόν τον τομέα ήταν σπάνια με την επίσημη μονογραφία HMPC του 2009 του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Φαρμάκων να μην θεωρεί καμία από αυτές τις εφαρμογές ως επιστημονικά τεκμηριωμένες, αλλά δέχεται τη χρήση τοπικών σκευασμάτων του *H.perforatum* για «συμπτωματική θεραπεία μικρών φλεγμονών του δέρματος (όπως ηλιακά εγκαύματα) και ως βοήθημα στην επούλωση μικροτραυμάτων» στο πλαίσιο της παραδοσιακής ιατρικής (Ute Wölfle 2013)

6) Αντιοξειδωτική δράση

Ενώ υπάρχουν πολλές αναφορές για την αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων διαφορετικών ειδών του γένους *Hypericum* έναντι παθογόνων βακτηρίων και μυκήτων που προσβάλλουν τον άνθρωπο αλλά και τα φυτά. Οι Yaman et al.¹³ ανέφεραν ότι το *H.perforatum* παρουσίαζε ισχυρότερες αντιοξειδωτικές δράσεις σε σύγκριση με άλλα δείγματα και ότι το βανιλικό οξύ, το

φερουλικό οξύ και το γαλλικό οξύ θα μπορούσαν να παραχθούν σε in vitro καλλιέργεια του φυτού.

(Mahmonir Rezaei Nazari 2022)

1.5 Φυτικό μικροβίωμα

Τα φυτά επιτρέπουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό μιας μεγάλης ποικιλίας μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων, μυκήτων, πρῶτιστων, νηματώδων και ιών τα οι οποίοι απαρτίζουν το φυτικό μικροβίωμα.

Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορούν να δημιουργήσουν σύνθετες σχέσεις με τα φυτά παίζοντας κατ αυτόν τον τρόπο σημαντικό ρόλο στην προώθηση της παραγωγικότητας και της υγείας των φυτών σε φυσικό περιβάλλον

(Pankaj Trivedi 2020)

Οι μικροοργανισμοί αυτοί, διακρίνονται στις παρακάτω κατηγορίες:

Στους επιφυτικούς, τους ενδοφυτικούς και τους δυνητικά παθογόνους. Ως επιφυτικοί ορίζονται οι μικροοργανισμοί των εξωτερικών ιστών, ενώ όσοι βρίσκονται στην ενδόσφαιρα κατατάσσονται στους ενδοφυτικούς μικροοργανισμούς (Santoyo et al., 2016).

Ως δυνητικά παθογόνοι χαρακτηρίζονται οι μικροοργανισμοί οι οποίοι υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν έχουν κάποια αρνητική επίδραση για το φυτό, όμως σε περίπτωση αύξησης του αριθμού τους ή εάν βρεθούν σε διαφορετικό ιστό πέραν αυτού που παρασιτούν ή υπό τις κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες, μπορούν να δράσουν ως παθογόνοι (Santoyo et al., 2016, Lebeis 2014, Turner et al., 2013)

1.6 Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί

1.6.1 Ορισμός

Ως ενδόφυτα ορίζουμε την ενδοσυμβιωτική ομάδα μικροοργανισμών που αποικίζονται σε φυτά αλλά και μικρόβια που είναι εφικτό να απομονωθούν από οποιοδήποτε μικροβιακό ή φυτικό μέσο ανάπτυξης. Λειτουργούν ως δεξαμενές νέων βιοδραστικών δευτερογενών μεταβολιτών, όπως αλκαλοειδή, φαινολικά οξέα, κινόνες, στεροειδή, σαπωνίνες, τανίνες και τερπενοειδή που χρησιμεύουν ως πιθανοί υποψήφιοι για αντιμικροβιακές, αντιεντοματικές, αντικαρκινικές και πολλές άλλες ιδιότητες. (Sushanto Gouda 2016)

Τα ενδόφυτα μπορούν να χωριστούν στις παρακάτω κατηγορίες

Τα **κοινά**, με άγνωστες ή προς το παρόν άγνωστες, λειτουργίες στα φυτά, τα **αμοιβαία** τα οποία είναι εκείνα που φαίνεται να έχουν θετική επίδραση αναπτύσσοντας αμοιβαία σχέση με τα φυτά αλλά και τα **ανταγωνιστικά**, τα οποία φαίνεται να έχουν αρνητική επίδραση στα φυτά. (Pablo R. Hardoim, 2015)

2.Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η παρατήρηση της ενδεχόμενης επίδρασης της συμβιωτικής σχέσης των ενδοφύτων του φυτού *H. perforatum* στην ανάπτυξη του φυτού έπειτα από τον εμβολιασμό του τελευταίου σε δυο διαφορετικά χρονικά σημεία μόλυνσης. Τα ενδόφυτα ενδιαφέροντος αποτελούν μικροοργανισμούς που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν από φυτά *Hypericum perforatum* αγρίου τύπου της Ελλάδας. Ενώ στη μελέτη επιλέξαμε να συμπεριλάβουμε και το στέλεχος *Fusarium solani* FsK που αποτελεί μη παθογόνο

ριζικό ενδόφυτο το οποίο προστατεύει τα φυτά από παθογόνους μικροοργανισμούς. (Kalliope K. Papadopoulou , Vasiliki Skiada et al 2019)

Πειραματικό μέρος

2.1 Ανακαλλιέργεια Μυκήτων

Για να προετοιμάσουμε τους μύκητες αρχικά πραγματοποιήσαμε ανακαλλιέργεια τους σε νέα τρυβλία που είχαμε επιστρώσει στερεό θρεπτικό υλικό PDA (20g Sucrose, 15g Agar/L) , οι μύκητες παρέμειναν σε επωαστικό θάλαμο για μία εβδομάδα στους 25 °C . Κατόπιν για αρχή επιλέξαμε τους μύκητες :

Alternaria brassicae , *Mucor circinelloides*, *Humicola* sp. , απομονωμένοι από τη ρίζα φυτού *Hypericum perforatum* από τον Παλαιόμυλο, αλλά και τον *Epicoccum nigrum* που απομονώθηκε από τα άνθη του ίδιου φυτού.

Όσον αφορά τους : *Alternaria brassicae* , *Humicola* sp και *Epicoccum nigrum* , πραγματοποιήσαμε ανακαλλιέργεια τους σε φυάλες με υγρό θρεπτικό υλικό PDB. Ενώ για το *Mucor circinelloides* (....)

3.Υλικά και μέθοδοι

Πρωτού προβούμε σε μόλυνση φυτών *H.perforatum* αποφασίσαμε να ελέγξουμε την το ενδεχόμενο παθογένειας των συγκεκριμένων μυκήτων. Συνεπώς επιλέξαμε να εμβολιάσουμε φυτά ντομάτας.

3.1 Αποστείρωση

Αρχικά οι σπόροι αποστειρώθηκαν σε χλωρίνη για 5min υπό ανάδευση και ακολούθησαν πλύσεις με dH_2O .

3.2 Καλλιέργεια

Οι αποστειρωμένοι πλέον σπόροι ντομάτας τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα τρυβλία όπου είχαμε τοποθετήσει αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί ποτισμένο με dH_2O σε απόσταση μεταξύ τους .

Τα τρυβλία σφραγίστηκαν με Parafilm και αλουμινόχαρτο και παρέμειναν στο θερμοκήπιο για 2 ημέρες σε σκοτεινό περιβάλλον ενώ στη συνέχεια τους αφήσαμε σε κάθετη θέση στο φως για ακόμα 2 ημέρες

Έπειτα μεταφύτευσαμε τα νεαρά φυτά σε γλάστρες με αποστειρωμένο υπόστρωμα (αναλογίες αμμου) το οποίο ποτίσαμε με διάλυμα Hoagland (συστατικά) και κλείσαμε την κάθε γλάστρα με μεμβράνη ώστε να διατηρήσουμε την υγρασία σε επιθυμητά επίπεδα . Οι γλάστρες τοποθετήθηκαν σε Gardening Trays κοντά σε παράθυρο για 1 εβδομάδα (Εικόνες 1, 2).



Εικόνα 1: Μεταφύτευση φυτών ντομάτας σε trays Εικόνα 2: Μεταφύτευση φυτών ντομάτας σε trays

3.3 Επιλογή μυκήτων

Οι μύκητες που επιλέξαμε , αποτελούν ενδόφυτα του φυτού *Hypericum perforatum* οι οποίοι απομονώθηκαν από τη ρίζα , τα φύλλα και το άνθος του φυτού. Για την ταυτοποίηση των οποίων χρησιμοποιήθηκε η περιοχή ITS (Internal Transcribed Spacer) η οποία απομονώθηκε μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) με χρήση εκκινητών (ITS1,ITS4) ενώ τα προϊόντα αλληλουχήθηκαν με τη βοήθεια του Blastn (....) του (...) NCBI.

Για να ελέγξουμε το ενδεχόμενο παθογένειας των συγκεκριμένων μυκήτων αποφασίσαμε αρχικά να εμβολιάσουμε φυτά ντομάτας.



Εικόνα 3. Φυτά ντομάτας 1η μέρα εμβολιασμού (Control)



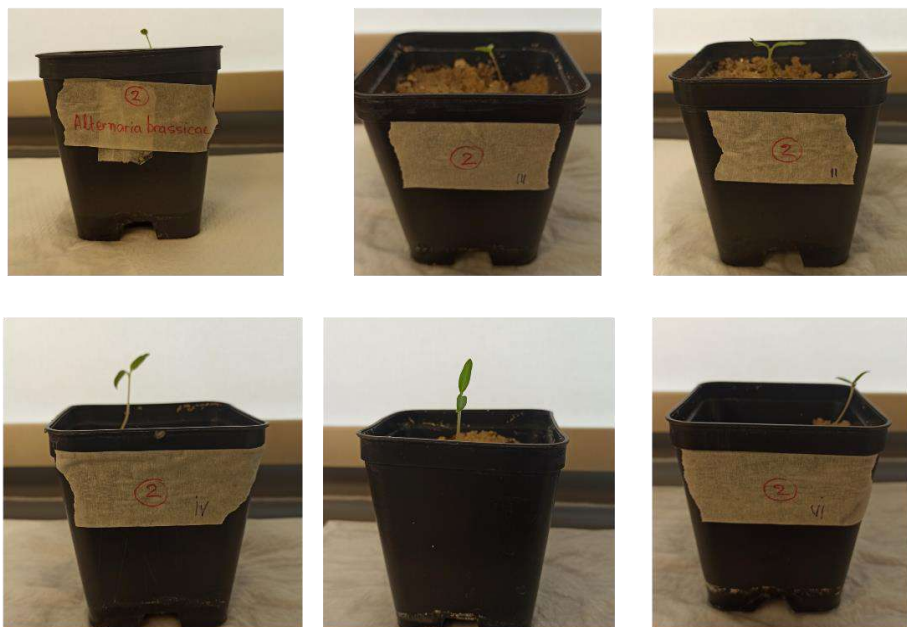
Εικόνα 4. Φυτά ντομάτας 1η μέρα εμβολιασμού (*Humicola* sp.)



Εικόνα 5. Φυτά ντομάτας 1η μέρα εμβολιασμού (*Mucor*)



Εικόνα 6. Φυτά ντομάτας 1η μέρα εμβολιασμού (*E.nigrum*)



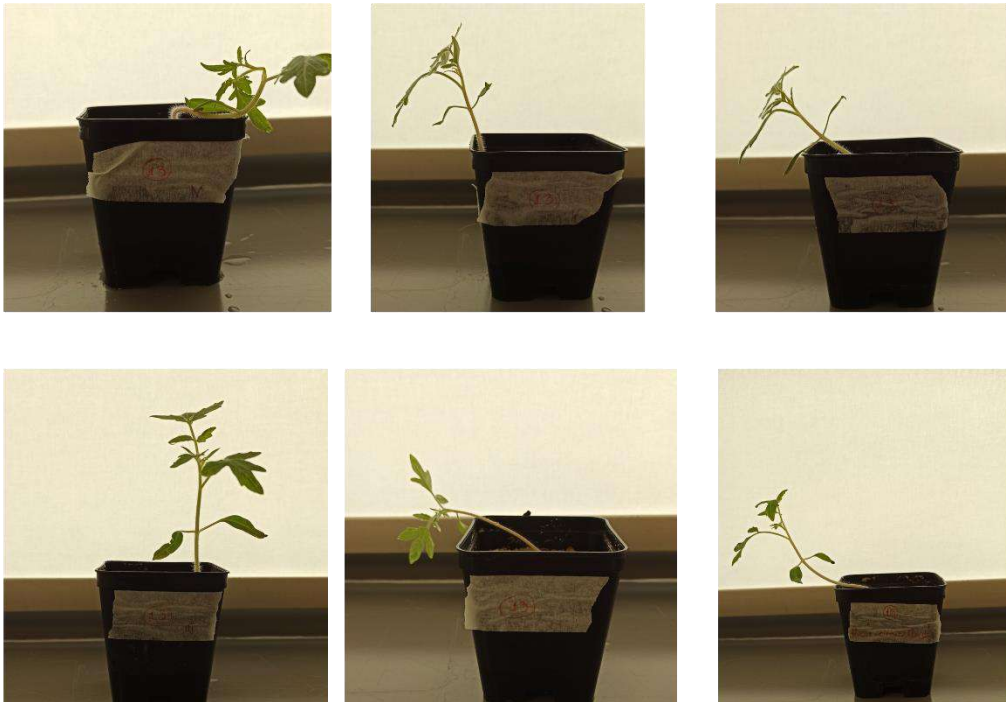
Εικόνα 7. Φυτά ντομάτας 1η μέρα εμβολιασμού (*Alternaria*)



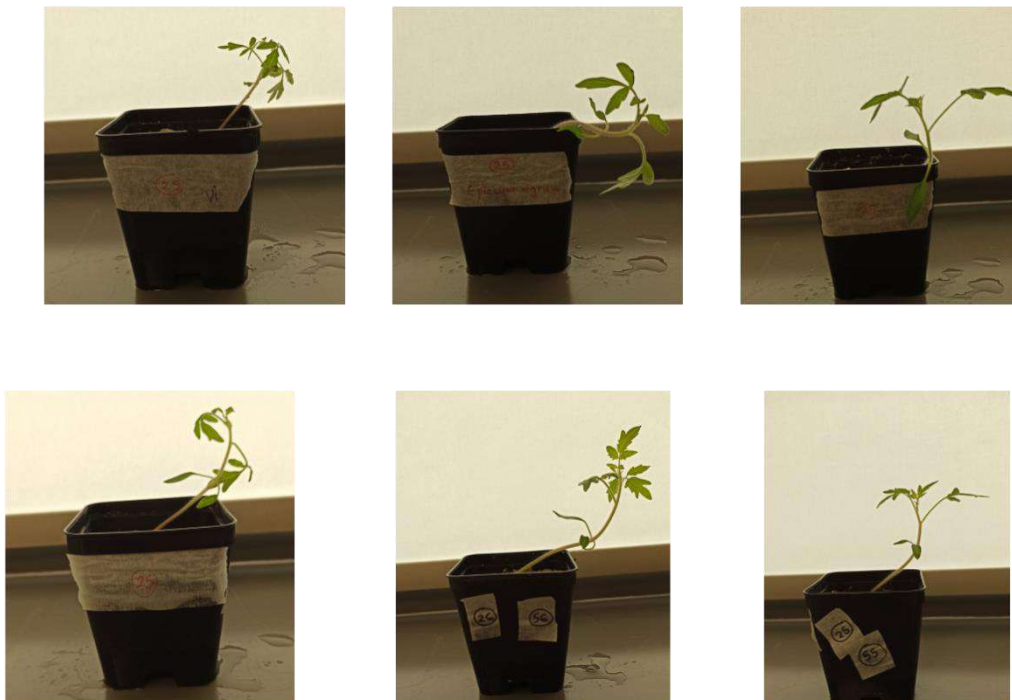
Εικόνα 8 Φυτά ντομάτας 12η μέρα εμβολιασμού (Control)



Εικόνα 9. Φυτά ντομάτας 12η μέρα εμβολιασμού (*Humicola* sp.)



Εικόνα 10. Εικόνα 1 Φυτά ντομάτας 12η μέρα εμβολιασμού (*Mucor*)



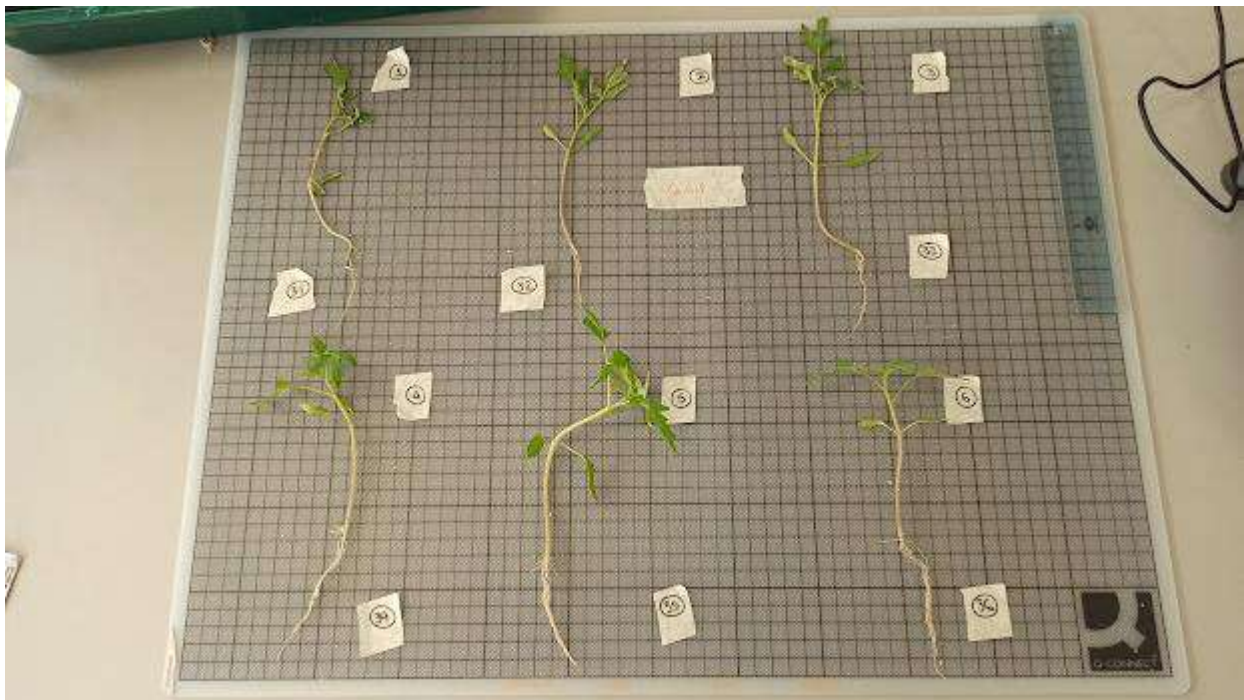
Εικόνα 11. Φυτά ντομάτας 12η μέρα εμβολιασμού (*E.nigrum*)



Εικόνα 12. Φυτά ντομάτας 12η μέρα εμβολιασμού (*Alternaria*)

Δειγματοληψία

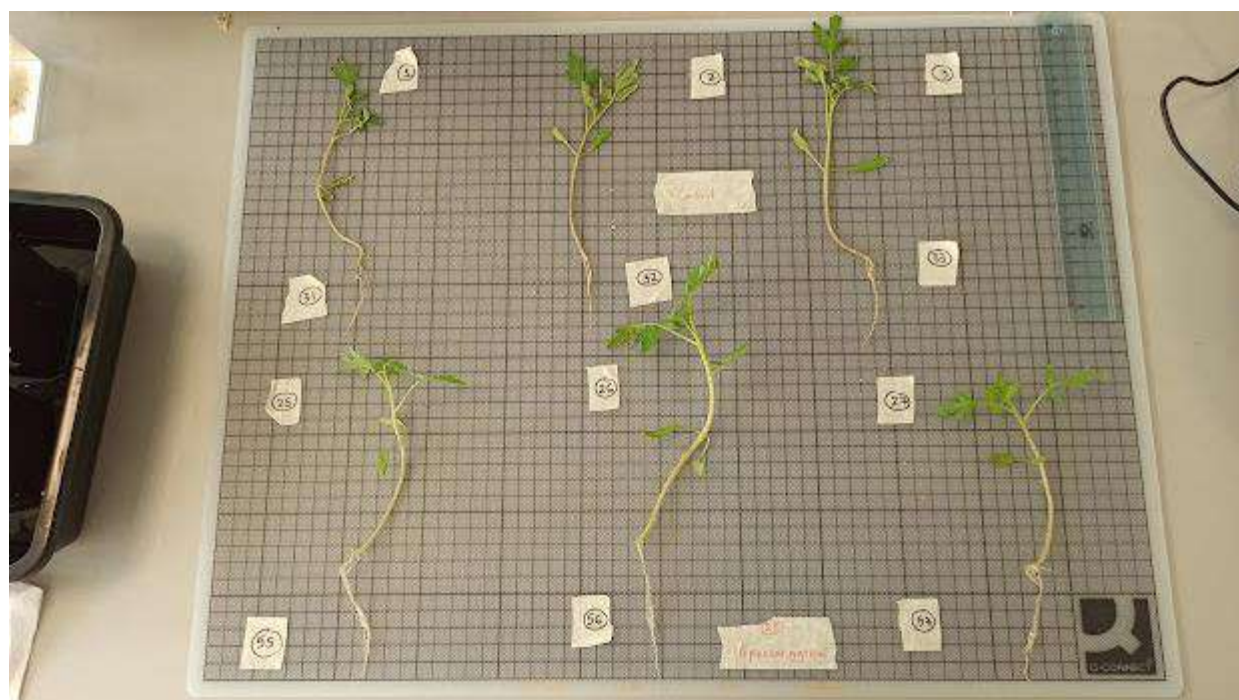
Δύο εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό των φυτών με τους μύκητες, αφαιρέθηκαν από τα υποστρώματα, μαρκάραμε τα φυτά control σε σύγκριση με το εκάστοτε treatment και στη συνέχεια μετρήσαμε το νωπό βάρος της ρίζας και των φύλλων του κάθε φυτού. Τα δείγματα φύλλων και ρίζας τοποθετήθηκαν στον ξηραντήρα για 48h και στη συνέχεια μετρήσαμε και το ξηρό τους βάρος. Ενώ από τις παρακάτω φωτογραφίες υπολογίστηκε το μήκος τους μέσω του προγράμματος Image J.



Εικόνα 13: Δειγματοληψία Φυτών Control



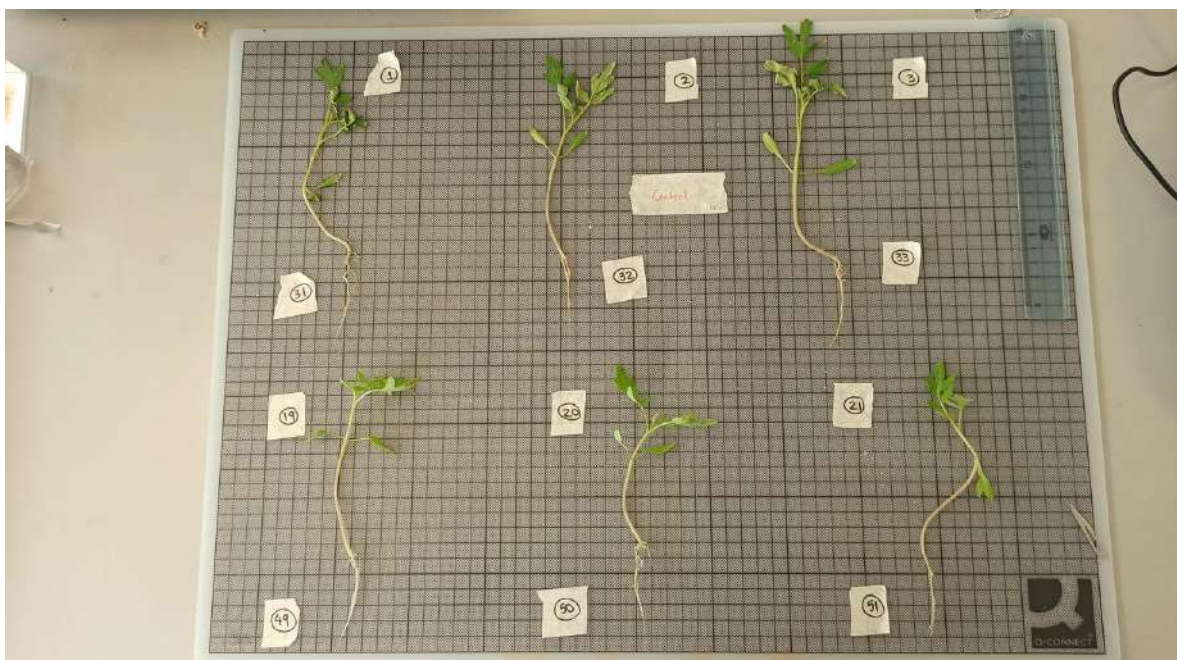
Εικόνα 14: Δειγματοληψία Treatment *Alternaria briscae*



Εικόνα 15: Δειγματοληψία Treatment *E.nigrum*



Εικόνα 16: Δειγματοληψία Treatment Mucor



Εικόνα 17: Δειγματοληψία Treatment Humicola sp.

3.4 Φυτικό Υλικό

Για αυτό το κομμάτι του project χρησιμοποιήσαμε σπόρους από 2 διαφορετικές ποικιλίες του φυτού *H.perforatum* (*Toraz* και *Taubertal*) τους οποίους κρατήσαμε στο ψυγείο για 1 εβδομάδα .

3.5 Αποστείρωση των σπόρων.

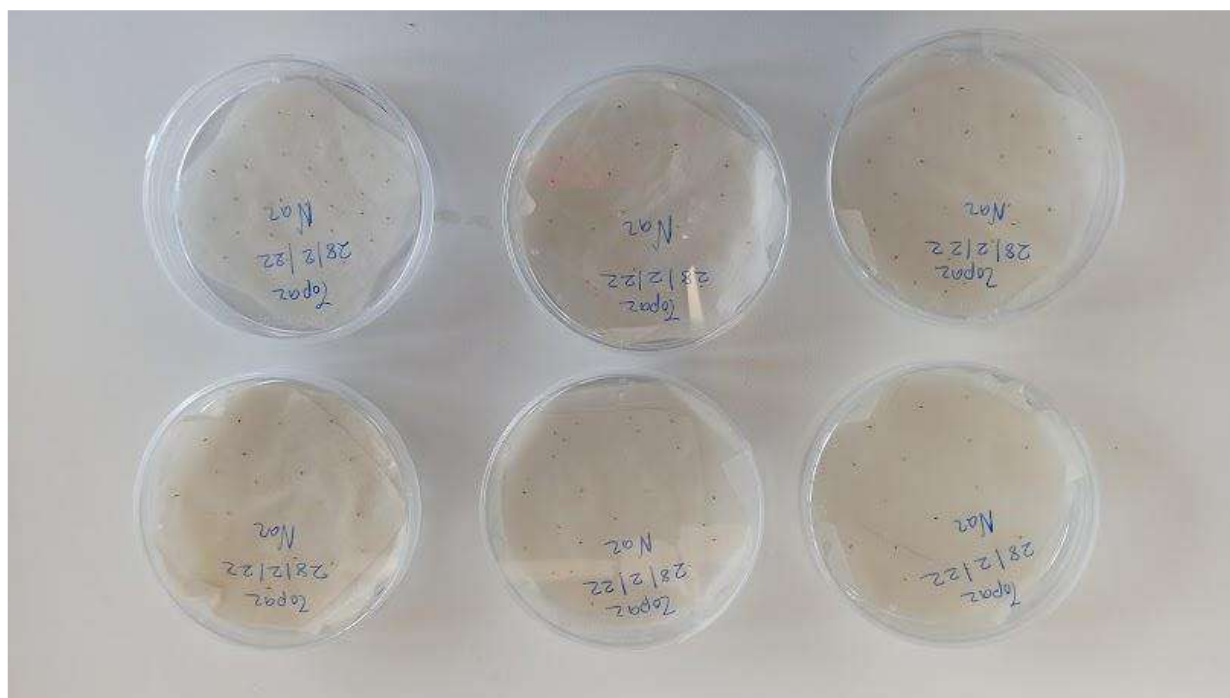
Οι σπόροι αρχικά εμβαπτίστηκαν σε αιθανόλη για 2min ενώ στη συνέχεια σε χλωρίνη για 15min υπό ανάδευση και ακολούθησαν πλύσεις με dH₂O όπου κατά την 6^η πλύση παρέμειναν στο dH₂O για 20min.



Εικόνα 18: Αποστείρωση σπόρων *H.perforatum*

3.6 Καλλιέργεια

Όσον αφορά την καλλιέργεια των σπόρων ακολουθήσαμε 2 διαφορετικές προσεγγίσεις για να δούμε αν θα έχουμε διαφορετικά αποτελέσματα. Οι αποστειρωμένοι πλέον σπόροι τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα τρυβλία με διηθητικό χαρτί ποτισμένο με dH₂O σε απόσταση μεταξύ τους (Εικόνα 12) .



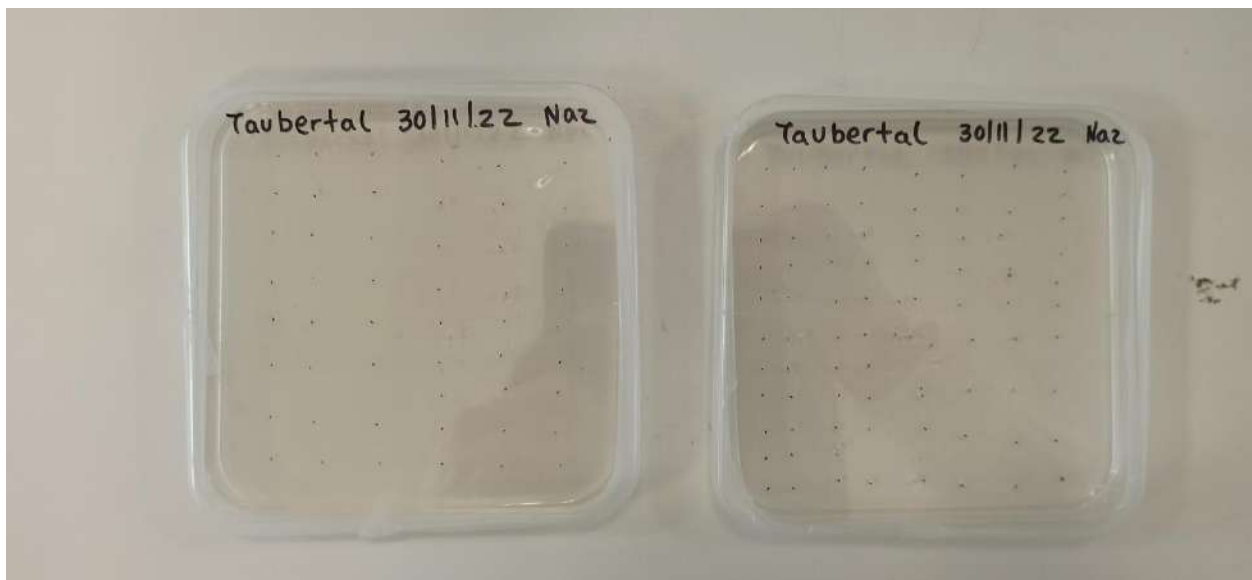
Εικόνα 19: Σπόροι *H.perforatum* σε διηθητικό χαρτί

Τα τρυβλία σφραγίστηκαν με Parafilm και αλουμινόχαρτο και παρέμειναν στο θερμοκήπιο για 5 ημέρες σε σκοτεινό περιβάλλον ενώ στη συνέχεια τους αφήσαμε σε κάθετη θέση στο φώς για ακόμα 4 ημέρες όμως τα ποσοστά σπόρων που βλάστησαν δεν ήταν ικανοποιητικά , από την ποικιλία Toraz βλάστησαν ελάχιστοι σπόροι, ενώ η Taubertal ανταποκρίθηκε καλύτερα στην διαδικασία.

Αλλα και πάλι δεν ήταν αρκετοί για να πραγματοποιηθεί το πείραμα. Στην δεύτερη περίπτωση , χρησιμοποιήσαμε θρεπτικό μέσο MS.



Εικόνα 20: Τρυβλία με θρεπτικό υλικό MS και σπόρους ποικιλίας Toraz



Εικόνα 21: Τρυβλία με θρεπτικό υλικό MS και σπόρους ποικιλίας Taubertal

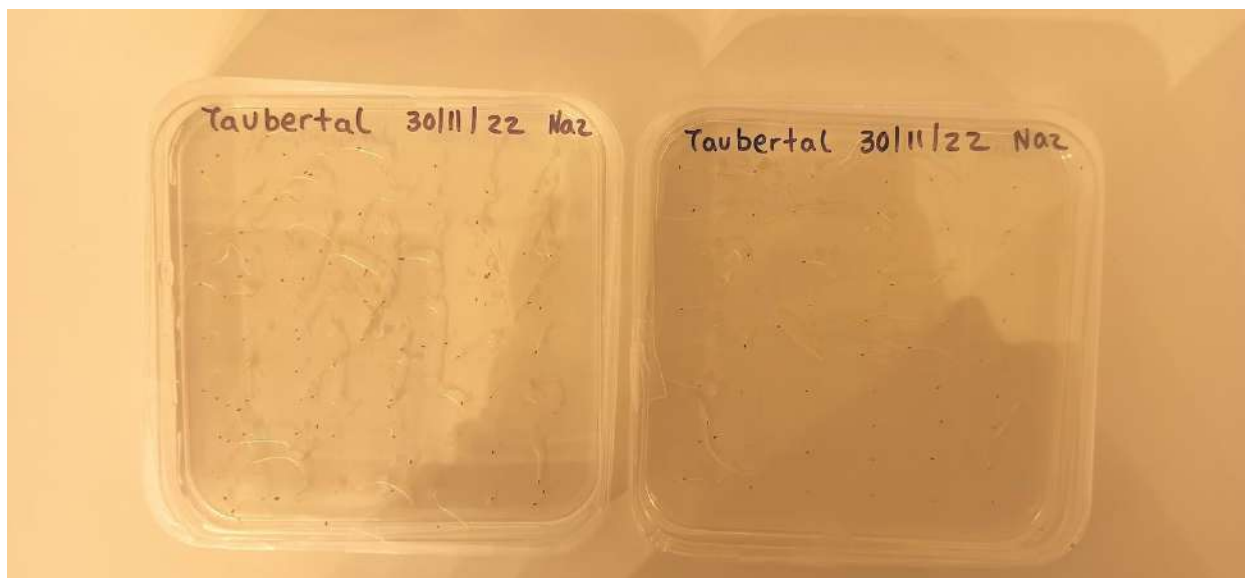
Ο χρόνος παραμονής στο σκοτάδι εως ουτου βλαστήσουν έφτασε τις 12 ημέρες ενώ παρέμειναν στο φώς για ακόμα 7 ημέρες πρωτού μεταφερθούν σε γλάστρες.



Εικόνα 22: Τρυβλία με θρεπτικό υλικό MS και σπόρους ποικιλίας Τοραζ μετά απο 12 ημέρες στο σκοτάδι



Εικόνα 23: Τρυβλία με θρεπτικό υλικό MS και σπόρους ποικιλίας Τοραζ μετά απο 7 ημέρες στο φως



Εικόνα 24: Τρυβλία με θρεπτικό υλικό MS και σπόρους ποικιλίας Taubertal μετά απο 12 ημέρες στο σκοτάδι



Εικόνα 25: Τρυβλία με θρεπτικό υλικό MS και σπόρους ποικιλίας Taubertal μετά απο 7 ημέρες στο φως



Εικόνα 26: Τρυβλία με θρεπτικό υλικό MS και σπόρους ποικιλίας *Taubertal* μετά απο 14 ημέρες στο φως

Σε αυτήν την προσέγγιση τα αποτελέσματα ήταν σημαντικά καλλίτερα όσον αφορά την ποικιλία *Taubertal* ενώ από την *Toraz* δεν υπήρχε διαφορά στα αποτελέσματα. Έπειτα μεταφυτεύσαμε τα νεαρά φυτά σε γλάστρες με αποστειρωμένο υπόστρωμα σε αναλογίες : 1 δόση Λεπτόκοκκης άμμου , 1 δόση Χοντρόκοκκης άμμου και 3 δόσεις Βερμικουλήτη το οποίο ποτίσαμε με διάλυμα Hoagland (συστατικά) και κλείσαμε την κάθε γλάστρα με μεμβράνη ώστε να διατηρήσουμε την υγρασία σε επιθυμητά επίπεδα . Οι γλάστρες τοποθετήθηκαν σε Gardening Trays κοντά σε παράθυρο για 2 εβδομάδες.

3.7 Επιλογή μυκήτων

Λαμβανοντάς υπόψιν μας τα αποτελέσματα της δοκιμής των μυκήτων στα φυτά της ντομάτας, αποφασίστηκε στην τρέχουσα δοκιμή να συμπεριλάβουμε

τους: *Alternaria brassicae* , *Humicola* sp. , και *Epicoccum nigrum*. Πέραν από αυτούς επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε και τον FSK.

Αρχικά πραγματοποιίσαμε ανακαλλιέργεια των μυκήτων σε στερεές καλλιέργειες με PDA και στη συνέχεια σε υγρές οι οποίες παρέμειναν στον επωαστήρα για μία εβδομάδα στους 25 . Στη συνέχεια πήραμε τις αρχικές υγρές καλλιέργειες, πραγματοποιήσαμε αραίωσεις με NaCl 85% , και μετρήσαμε κονίδια στο μικροσκόπιο χρησιμοποιώντας αιματοκυτταρόμετρο για να μπορέσουμε να καταλήξουμε στην επιθυμητή συγκέντρωση και να προχωρήσουμε στον εμβολιασμό.

3.8 Εμβολιασμός φυτών με τους μύκητες

Εξαιτίας της αργής ανάπτυξης των φυτών , περιμέναμε 1 εβδομάδα από την μεταφύτευση τους από τα τρυβλία στις γλάστρες μέχρι να τα μολύνουμε με τους μύκητες.

Για το κάθε Treatment χρησιμοποιήσαμε 6 φυτά, αλλά και ακόμα 6 ως Control τα οποία δεν μολύνθηκαν από κάποιο μύκητα.

Στο πείραμά μας συμπεριλάβαμε 2 διαφορετικές ομάδες φυτών τα οποία είχαν ηλικιακή διαφορά 2 εβδομαδων κατηγοριοποιώντας τα σε Group A και Group B. Ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε και στα 2 γκρουπ την ίδια ημέρα , ακολουθεί φωτογραφικό υλικό των διαφορετικών treatment 12 ημέρες μετά τον εμβολιασμό τους με μήκυτες.



Εικόνα 27 Group A *H.perforatum* Treatment FSK 12^η Ημερα Εμβολιασμού



Εικόνα 28. Group A *H.perforatum* Treatment *E.nigrum* 12^η Ημερα Εμβολιασμού



Εικόνα 29. Group A *H.perforatum* Treatment *Humicola* sp. 12η Ημέρα Εμβολιασμού



Εικόνα 30 Group A *H.perforatum* Treatment *Alternaria* 12η Ημέρα Εμβολιασμού



Εικόνα 31 Group B *H. perforatum* Treatment FsK 12η Ημέρα Εμβολιασμού







Εικόνα 32: Δειγματοληψία φυτών Control Group A

Εικόνα 33: Δειγματοληψία φυτών Control Group B





Δειγματοληψία FSK treatment Group A



Εικόνα 34 Δειγματοληψία FSK treatment Group B







3.6 Απομόνωση DNA (DNA Extraction)

Η απομόνωση του DNA είναι μια διαδικασία εξαγωγής του DNA από τα διάφορα δείγματα. Σκοπός της διαδικασίας είναι να διαχωριστεί το DNA που βρίσκεται στον πυρήνα από λοιπά κυτταρικά συστατικά.

Τα στάδια της διαδικασίας έχουν ως εξής :

- 1) Λύση των κυτταρικών μεμβρανών και της μεμβράνης του πυρήνα για απελευθέρωση του DNA.
- 2) Επίδραση πρωτεολυτικών ενζύμων για αποικοδόμηση κυτταρικών πρωτεϊνών.
- 3) Διαχωρισμός του DNA από τις πρωτεΐνες.
- 4) Επίδραση αιθανόλης για καθαρισμό του DNA από άλατα.
- 5) Ανασύσταση του DNA σε διάλυμα TE (Tris EDTA).

Πειραματική Μέθοδος:

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την απομόνωση του DNA ήταν τα εξής:

1. Μεταφορά μικρών ποσοτήτων κονιορτοποιημένου ιστού από το κάθε δείγμα σε eppendorf 1.5 ml.]
2. Προθέρμανση του CTAB buffer (100mM Tris HCL, 20mM EDTA, 1.4M NaCl, 2% CTAB, 1% PVP) στους 65oC στο υδατόλουτρο.
4. Προσθήκη 100μl CTAB και 1 μl μερκαπτοαιθανόλης σε κάθε δείγμα.

5. Τοποθέτηση δειγμάτων στους 65°C στο υδατόλουτρο για 15 λεπτά.
6. Ανάδευση με vortex.
7. Προσθήκη διαλύματος χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης.
8. Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13000 στροφές.
9. Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο σωλήνα errendorf και προσθήκη ισοπροπανόλης .
10. Επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
11. Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13000 στροφές.
12. Απομάκρυνση υπερκείμενου και ξέπλυμα DNA με 0.5 ml παγωμένης 70% αιθανόλης.
13. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13000 στροφές, απομάκρυνση υπερκείμενου και ξήρανση DNA, τοποθετώντας το για 8 λεπτά στους 25°C.
14. Διάλυση DNA σε 40 µl αποστειρωμένου νερού με RNase και τοποθέτηση για 10 λεπτά στους 60 °C.
15. Τοποθέτηση στο πάγο για 30 λεπτά και μεταφορά στους 4 βαθμούς overnight.

3.7 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας DNA

Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του DNA προσδιορίστηκαν με τη χρήση του φωτομέτρου nanodrop. Τα νουκλεϊκά οξέα απορροφούν υπεριώδες φως σε μήκος κύματος 260nm.

3.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR) είναι μία ενζυμική μέθοδος, η οποία στοχεύει στην ενίσχυση μίας περιοχής του γονιδιώματος in vitro.

Στάδια της PCR

Κάθε κύκλος PCR αποτελείται από τα εξής τρία στάδια:

- 1) Αποδιάταξη: Κατά το στάδιο αυτό, πραγματοποιείται διαχωρισμός των δύο αλυσιδών του DNA σε θερμοκρασία 95°C.
- 2) Υβριδισμός εκκινητών: Σε θερμοκρασία 50-60°C επιτυγχάνεται ο υβριδισμός των εκκινητών στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο DNA εκμαγείο.
- 3) Επιμήκυνση: Στο στάδιο αυτό λαμβάνει χώρα η σύνθεση μίας νέας αλυσίδας DNA στους 72°C, με τη δράση της DNA πολυμεράσης. Η πολυμεράση επιμηκώνει τους εκκινητές προσθέτοντας

τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), χρησιμοποιώντας

ως εκμαγείο τη συμπληρωματική ακολουθία DNA.

Η PCR εκτελείται σε ειδικά μηχανήματα που ονομάζονται θερμικοί κυκλοποιητές και έχουν την ικανότητα να εναλλάσσουν την θερμοκρασία για την επίτευξη κάθε σταδίου. Μέσω των θερμικών κυκλοποιητών, μπορεί να καθοριστεί επίσης, ο χρόνος κάθε σταδίου και ο αριθμός των κύκλων ενίσχυσης, τα οποία εξαρτώνται από τις απαιτήσεις του πειράματος.

Στο συγκεκριμένο πείραμα, μέσω της PCR ενισχύθηκε η ITS

(Internal Transcribed Spacer) DNA περιοχή του μύκητα, η οποία περιλαμβάνει

δύο ενδομεταγραφόμενες περιοχές, την ITS1 και την ITS4,

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι (Forward) ITS1 και (Reverse) ITS4 με αλληλουχίες

5'-CTT-GGT-CAT-TTA-GAG-GAA-GTAA-3' και 5'-TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC-3'

αντίστοιχα.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με τη δράση της KapaTaq πολυμεράσης. Οι ποσότητες των συστατικών της PCR που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε δείγμα DNA αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα

10x ρυθμιστικό διάλυμα με Mg²⁺ 2 37,5 μl

Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια dNTPs) (10mM) 7,5μl

Εκκινητής ευθείας κατεύθυνσης (Forward) (10μM) 15μl

Εκκινητής αντίστροφης κατεύθυνσης (Reverse) (10μM) 15μl

DNA μήτρα 1μl

KapaTaq πολυμεράση 1,5μl

Νερό (ddH₂O) 283,5μl

Το πρόγραμμα που εκτελέστηκε στον θερμικό κυκλοποιητή ήταν το εξής

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική Αποδιάταξη	95C	2min
Αποδιάταξη	95C	30sec
Υβριδισμός Εκκινητών	48C	30sec
Επιμήκυνση Αλυσίδας DNA	72C	40sec
Τελική Επιμήκυνση Αλυσίδων	72C	2min

Επίσης, ορίσαμε να εκτελεστούν 35 κύκλοι ενίσχυσης.

3.9 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι μία τεχνική κατά την οποία πραγματοποιείται διαχωρισμός των νουκλεϊκών οξέων και των πρωτεϊνών ανάλογα με το μέγεθός τους και το φορτίό τους. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, κατά την οποία γίνεται διαχωρισμός μορίων DNA, μεγέθους από 500 bp έως 25 kb. Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης που προέρχεται από φύκη και υπό κατάλληλες συνθήκες σχηματίζει ένα πορώδες πήκτωμα. Όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση της αγαρόζης, τόσο μικρότεροι οι πόροι που σχηματίζονται και συνεπώς τόσο μικρότερα μόρια DNA καθίσταται δυνατό να διαπεράσουν τους πόρους και να διαχωριστούν.

Πειραματική διαδικασία:

Αρχικά, για την παρασκευή του πηκτώματος, προσθέσαμε κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης σε ορισμένο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος 1xTAE (40 mM Tris, 20 mM οξικό οξύ, 1 mM EDTA). Στη συνέχεια, τοποθετήσαμε την κωνική φιάλη που περιείχε το μίγμα στο φούρνο μικροκυμάτων, προκειμένου να διαλυθεί η αγαρόζη με θέρμανση. Έπειτα, προσθέσαμε βρωμιούχο αιθίδιο (0.5 $\mu\text{g/ml}$), το οποίο παρεμβάλλεται στα ζεύγη βάσεων του DNA και φθορίζει υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας.

Εν συνεχεία, μεταφέραμε το μίγμα σε συσκευή ηλεκτροφόρησης, στην οποία προσαρμόστηκε ένα ειδικό εξάρτημα «χτένα», ώστε να δημιουργηθούν τα πηγαδάκια φόρτωσης στο πήκτωμα. Μετά την σταθεροποίηση της αγαρόζης και

τον σχηματισμό του πήκτωματος, αφαιρέσαμε την χτένα και προσθέσαμε διάλυμα 1xTAE, με σκοπό να διατηρήσουμε το πήκτωμα βυθισμένο. Ακολούθως, αναμείξαμε τα δείγματα DNA με την χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης και τα τοποθετήσαμε στα πηγαδάκια φόρτωσης. Τέλος, εφαρμόσαμε ηλεκτρική τάση στα άκρα της συσκευής και μετά από 30 min τοποθετήσαμε το πήκτωμα σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας, μέσω της οποίας οπτικοποιήθηκαν οι ζώνες του DNA. Αξίζει να σημειωθεί, πως στην συσκευή ηλεκτροφόρησης τα μόρια DNA μετακινούνται πάντα προς την κάθοδο, καθώς έχουν αρνητικό φορτίο λόγω των φωσφορικών του ομάδων.

3.10 Εκχύλιση – Απομόνωση Γέλης (Gel Extraction)

Για τον έλεγχο του ενδεχόμενου εποικισμού των φυτών από τους μύκητες *Alternaria*, *Humicola* sp και *E.nigrum* πραγματοποιήθηκε απομόνωση γέλης και στη συνέχεια αλληλούχηση των δειγμάτων. Η Εκχύλιση (απομόνωση) Γέλης αποτελεί μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την απομόνωση ενός επιθυμητού θραύσματος ανέπαφου DNA από ένα πήκτωμα αγαρόζης μετά από ηλεκτροφόρηση γέλης αγαρόζης.

Πειραματική διαδικασία

Αφού τα δείγματα DNA τρέξουν σε ένα πήκτωμα αγαρόζης, η εκχύλιση περιλαμβάνει τέσσερα βασικά στάδια:

1. αναγνώριση των θραυσμάτων ενδιαφέροντος,

2.απομόνωση των αντίστοιχων ζωνών, απομόνωση του DNA από αυτές τις ζώνες και

3. αφαίρεση των συνοδευτικών αλάτων και χρώσης.

Αρχικά, η υπεριώδης ακτινοβολία εκπέμπεται στο πήκτωμα για να φωτίσει όλο το DNA που έχει χρωματιστεί με βρωμιούχο αιθίδιο. Πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφευχθεί η έκθεση του DNA σε μεταλλαξιογόνο ακτινοβολία για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από το απολύτως απαραίτητο. Η επιθυμητή ταινία αναγνωρίζεται και αφαιρείται φυσικά με λεπίδα ξυραφιού. Η αφαιρούμενη φέτα γέλης θα πρέπει να περιέχει το επιθυμητό DNA μέσα.

3.11 In silico ανάλυση των αλληλουχιών

Οι αλληλουχίες DNA των ενδοφυτικών μικροοργανισμών υποβλήθηκαν στο πρόγραμμα BLAST του NCBI. Πιο συγκεκριμένα, υποβλήθηκαν στο Blastn, που αποτελεί τη βάση δεδομένων όλων των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών. Για την ταυτοποίηση επικοισμού του φυτού από τον FsK πραγματοποιήθηκε qPCR.

3.8 Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (qPCR)

Η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Q-PCR) είναι μια μέθοδος με την οποία μπορεί να προσδιοριστεί η ποσότητα του προϊόντος της PCR, σε πραγματικό χρόνο, και είναι πολύ χρήσιμη για τη διερεύνηση της γονιδιακής έκφρασης.

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά η συγκέντρωση και η καθαρότητα του DNA προσδιορίστηκαν με τη χρήση φθορομέτρου Qubit.

Η μέθοδος απορρόφησης UV είναι η πιο κοινή τεχνική για τη μέτρηση της συγκέντρωσης νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών. Ωστόσο, το φθορόμετρο Qubit είναι μια εναλλακτική μέθοδος που χρησιμοποιεί φθορίζουσες βαφές για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης είτε των νουκλεϊκών οξέων είτε των πρωτεϊνών σε ένα δείγμα.

Για την qPCR χρησιμοποιήθηκε KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) Kit

1. Προετοιμασία Master Mix

1.1 Έλεγχος συστατικών της αντίδρασης, απόψυξη και ανάμιξη

1.2 Προετοιμασία κυρίου μείγματος που περιέχει τον κατάλληλο όγκο όλων των συστατικών της αντίδρασης

1.3 Προετοιμασία στοιχείου ελέγχου χωρίς πρότυπο (NTC), για την ανίχνευση μόλυνσης της αντίδρασης.

1.4 Υπολογισμός του απαιτούμενου όγκου κάθε συστατικού με βάση τους παρακάτω πίνακες:

Component			
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) Universal2			

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ανοδικοί (Forward) και καθοδικοί (Reverse) με αλληλουχίες:

F: 5'-GGGTGGTTGAGGACAATGAC-3' R: 5'-CAGCTCACTGAGGGTCTTCC-3'

συνθηκες προγραμματος qPCR

95oC-3 min,

40 cycles of (95oC – 15 sec, 60oC -20 sec), melt curve analysis

4. Αποτελέσματα – Συζήτηση

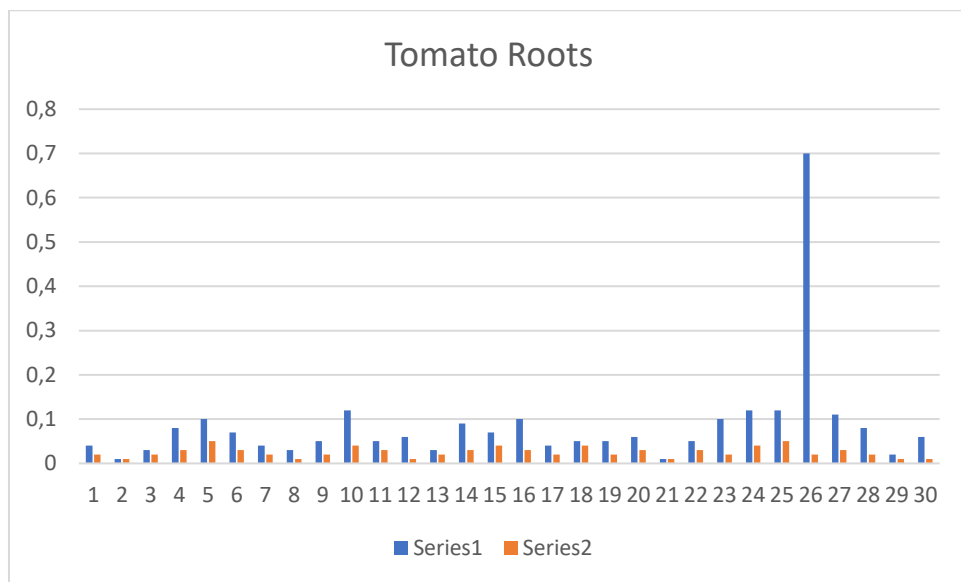
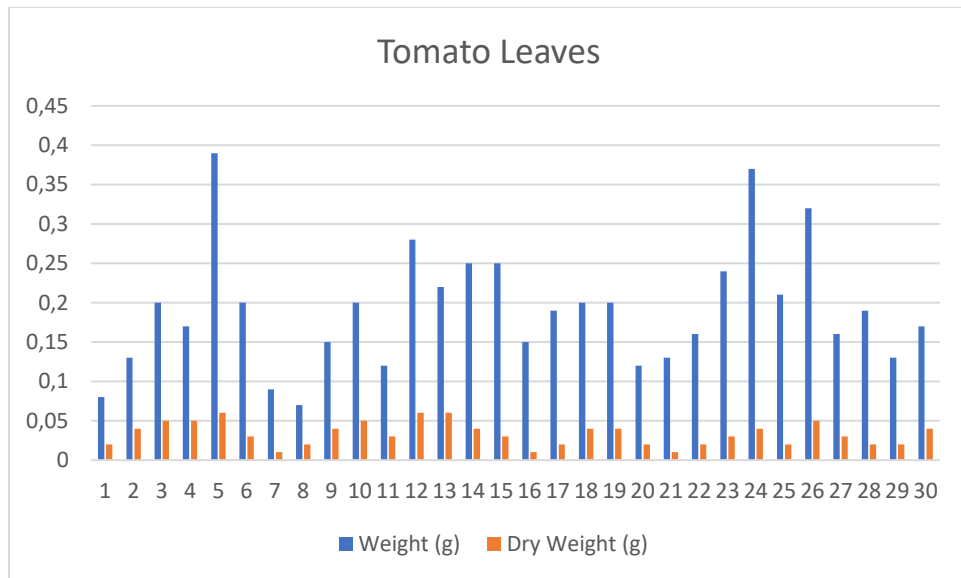
4.1 Εμβολιασμός Φυτών Ντομάτας – Παρατηρήσεις

Με το πέρας της δειγματοληψίας, μετρήθηκε το νωπό και ξηρό βάρος των φυτών του εκάστοτε treatment , χωρίς να παρατηρηθούν ιδιαίτερες διακυμάνσεις μεταξύ των εμβολιασμένων και μη εμβολιασμένων φυτών .

Sample	Microbe	Weight (g)	Dry Weight (g)	Tissue
1	C	0.08	0.02	Leaves
2	C	0.13	0.04	Leaves
3	C	0.2	0.05	Leaves
4	C	0.17	0.05	Leaves
5	C	0.39	0.06	Leaves
6	C	0.2	0.03	Leaves
7	Alternaria	0.09	0.01	Leaves
8	Alternaria	0.07	0.02	Leaves
9	Alternaria	0.15	0.04	Leaves
10	Alternaria	0.2	0.05	Leaves
11	Alternaria	0.12	0.03	Leaves
12	Alternaria	0.28	0.06	Leaves
13	Mucor	0.22	0.06	Leaves
14	Mucor	0.25	0.04	Leaves
15	Mucor	0.25	0.03	Leaves
16	Mucor	0.15	0.01	Leaves
17	Mucor	0.19	0.02	Leaves
18	Mucor	0.2	0.04	Leaves

19	Humicola	0.2	0.04	Leaves
20	Humicola	0.12	0.02	Leaves
21	Humicola	0.13	0.01	Leaves
22	Humicola	0.16	0.02	Leaves
23	Humicola	0.24	0.03	Leaves
24	Humicola	0.37	0.04	Leaves
25	E. nigrum	0.21	0.02	Leaves
26	E. nigrum	0.32	0.05	Leaves
27	E. nigrum	0.16	0.03	Leaves
28	E. nigrum	0.19	0.02	Leaves
29	E. nigrum	0.13	0.02	Leaves
30	E. nigrum	0.17	0.04	Leaves
31	C	0.04	0.02	Leaves
32	C	0.01	0.01	Roots
33	C	0.03	0.02	Roots
34	C	0.08	0.03	Roots
35	C	0.1	0.05	Roots
36	C	0.07	0.03	Roots
37	Alternaria	0.04	0.02	Roots
38	Alternaria	0.03	0.01	Roots
39	Alternaria	0.05	0.02	Roots
40	Alternaria	0.12	0.04	Roots
41	Alternaria	0.05	0.03	Roots
42	Alternaria	0.06	0.01	Roots

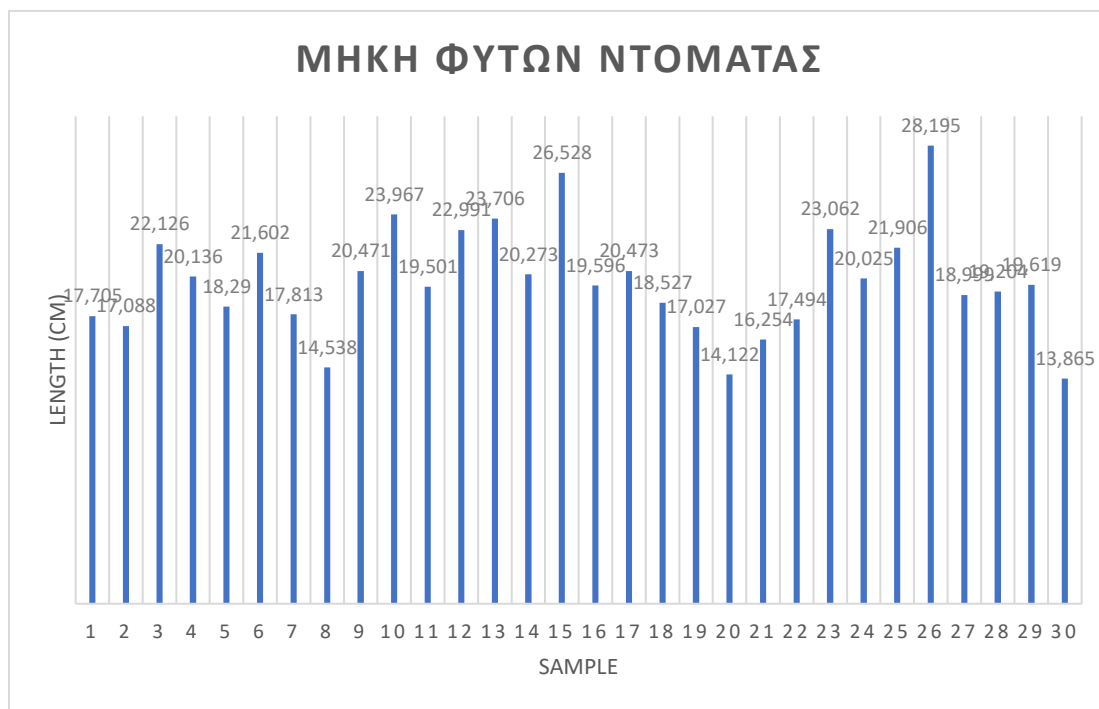
43	Mucor	0.03	0.02	Roots
44	Mucor	0.09	0.03	Roots
45	Mucor	0.07	0.04	Roots
46	Mucor	0.1	0.03	Roots
47	Mucor	0.04	0.02	Roots
48	Mucor	0.05	0.04	Roots
49	Humicola	0.05	0.02	Roots
50	Humicola	0.06	0.03	Roots
51	Humicola	0.01	0.01	Roots
52	Humicola	0.05	0.03	Roots
53	Humicola	0.1	0.02	Roots
54	Humicola	0.12	0.04	Roots
55	E. nigrum	0.12	0.05	Roots
56	E. nigrum	0.7	0.02	Roots
57	E. nigrum	0.11	0.03	Roots
58	E. nigrum	0.08	0.02	Roots
59	E. nigrum	0.02	0.01	Roots
60	E. nigrum	0.06	0.01	Roots



Πέραν του νωπού και ξηρού βάρους ,υπολογίστηκε και το μήκος του κάθε φυτού μέσω του Image J. Οι μετρήσεις δεν έδειξαν κάποια ιδιαίτερη διαφορά ανάμεσα στα δείγματα control και τα εμβολιασμένα δείγματα. Συνεπώς δεν φαίνεται να υπήρξε σημαντική επίδραση των μηκύτων στην ανάπτυξη των φυτών στο διάστημα των 2 εβδομάδων , ενώ παράλληλα δεν παρατηρήθηκε φαινοτυπικά καμία μορφή παθογένειας.

Sample	Area	Mean	Min	Max	Angle	Length
1	0.099	162.131	15.013	231.333	0	17.705
2	0.099	170.478	37.747	236.09	- 177.455	17.088
3	0.147	145.74	14.933	230.627	0	22.126
4	0.134	158.325	18.667	243	0	20.136
5	0.129	167.01	32.667	230.667	0	18.29
6	0.156	184.894	27.667	242.063	0	21.602
7	0.138	184.65	54.333	246.42	0	17.813
8	0.097	162.7	27.522	237.368	0	14.538
9	0.126	180.739	27	244.667	0	20.471
10	0.179	187.425	38	240.913	0	23.967
11	0.146	167.407	32.787	232	0	19.501
12	0.196	164.734	39	232.667	0	22.991
13	0.154	157.024	11.46	237.517	0	23.706
14	0.142	169.636	20.255	241.667	0	20.273
15	0.166	198.676	26.741	245.033	0	26.528
16	0.124	155.597	21.293	223.333	0	19.596
17	0.134	164.774	28.551	233.733	0	20.473
18	0.121	166.287	23.4	235.74	0	18.527
19	0.103	156.835	19.2	231.94	0	17.027
20	0.097	158.917	25	231.333	0	14.122
21	0.096	175.161	40.434	238.907	0	16.254
22	0.121	157.661	16.441	243	0	17.494
23	0.143	174.462	30.373	238	0	23.062
24	0.134	188.691	37.997	244.03	0	20.025
25	0.162	175.646	31.087	239.333	0	21.906
26	0.227	180.336	32.024	239.46	0	28.195
27	0.137	170.523	17.893	237.888	0	18.999

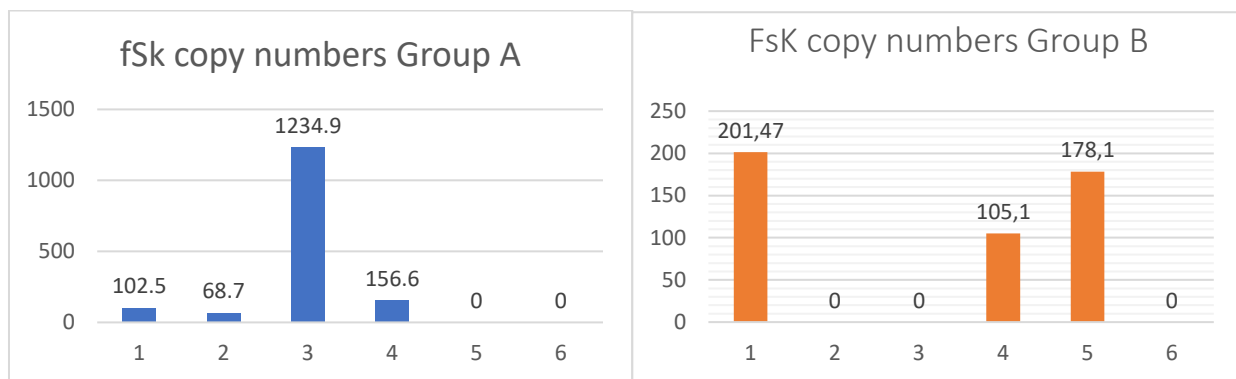
28	0.121	153.925	16	236.327	0	19.204
29	0.122	181.774	18.667	233.1	0	19.619
30	0.089	178.858	51.7	239.187	0	13.865



Η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης επιβεβαίωσε τον εποικισμό των φυτών από τον FsK. Στο πρώτο γκρουπ τέσσερα από τα Έξι φυτά εμφάνισαν εποικισμό στις ρίζες ενώ στο δεύτερο γκρουπ μόνο τρία Παρατηρήσεις Τα εποικισμένα φυτά του πρώτου γκρουπ εμφανίζουν παραπάνω από μία διακλαδώσεις στο υπέργιο, Πυκνή διάταξη στα φύλλα και είναι ψηλότερα σε σύγκριση με τα φυτά τα οποία δεν είναι εποικισμένα

Στο δεύτερο γκρουπ αν και σε μικρότερη κλίμακα τα εποικισμένα φυτά επίσης εμφανίζουν παραπάνω από μία διακλαδώσεις , Το ύψος τους δεν ξεπερνά αυτό των μη εποικισμένων και το φύλλωμά τους δεν είναι και τόσο πυκνό.

Συγκρίνοντας τα φυτά των δύο γκρουπ μεταξύ τους οπτικά τα φυτά του πρώτου γκρουπ φαίνονται πιο υγιή. Ενδεχομένως σε αυτό να συμβάλει το ότι τα φυτά του δεύτερου γκρουπ εμβολιάστηκαν σε νεαρότερη ηλικία σε σύγκριση με τα φυτά του πρώτου γκρουπ για να επιβεβαιωθεί όμως αυτό θα χρειαστεί περαιτέρω μελέτη







Όσον αφορά τους υπόλοιπους μύκητες που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη πραγματοποιήθηκε απομόνωση Γέλης και αλληλούχιση για την ταυτοποίηση τους. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε in silico ανάλυση των αλληλουχιών αυτών μέσω του Blast. Σε αρκετά από τα φυτά δεν υπήρξε εποικισμός από τους μύκητες. Δυστυχώς αν και κάποια από τα φυτά είχαν εποικιστεί από τους μύκητες, δεν υπήρξε ακριβής ταυτοποίηση του γένους. Στην βιβλιοθήκη του blast καταγράφονταν ως μη κατηγοριοποιημένα ενδοφυτα.

5.Βιβλιογραφία

Colonization of legumes by an endophytic *Fusarium solani* strain Fsk reveals common features to symbionts or pathogens

panelVasiliki Skiada ^a, Antonella Faccio ^b, Nektarios Kavroulakis ^c, Andrea Genre ^b, Paola Bonfante ^b, Kalliope K. Papadopoulou ^a

***Hypericum perforatum*: Traditional uses, clinical trials, and drug interactions**

Seyedeh Zahra Nobakht,¹ Maryam Akaberi,² Amir Hooshang Mohammadpour,³ Ali Tafazoli Moghadam,⁴ and Seyed Ahmad Emami^{1,*}

***Hypericum perforatum* L. and the Underlying Molecular Mechanisms for Its Choloretic, Cholagogue, and Regenerative Properties**

Ala Mohagheghzadeh¹, Parmis Badr², Abdolali Mohagheghzadeh^{2,3}, Shiva Hemmati^{1,4,5}

Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. 2nd edition. Chapter 11 Medical Attributes of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*)

Kenneth M. Klemow, Andrew Bartlow, Justin Crawford, Neil Kocher, Jay Shah, and Michael Ritsick.

A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application

Stéphane Compant, Abdul Samad, Hanna Faist, and Angela Sessitsch*

The Biochemical and Genetic Basis for the Biosynthesis of Bioactive Compounds in *Hypericum perforatum* L., One of the Largest Medicinal Crops in Europe

Paride Rizzo, Lothar Altschmied, Beena M. Ravindran, Twan Rutten, and John C. D'Auria*

***Hypericum perforatum* in the treatment of psychiatric and neurodegenerative disorders: Current evidence and potential mechanisms of action**

Nahid Zirak¹ * | Mojtaba Shafiee^{2,3}* | Ghasem Soltani¹ * | Mohammad Mirzaei^{2,3} | Amirhossein Sahebkar^{4,5,6}

Antioxidant potential and essential oil properties of *Hypericum perforatum* L. assessed by application of selenite and nano-selenium

Mahmonir Rezaei Nazari¹, Vahid Abdossi², Fariba Zamani Hargalani³, Kambiz Larijani⁴

Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health

Pankaj Trivedi, Jan E. Leach, Susannah G. Tringe, Tongmin Sa & Brajesh K. Singh

The plant endosphere-hidden treasures: a review of fungal endophytes

Bartholomew Saanu Adeleke & Olubukola Oluranti Babalola

Endophytes: A Treasure House of Bioactive Compounds of Medicinal Importance

Sushanto Gouda,^{1,†} Gitishree Das,^{2,†} Sandeep K. Sen,³ Han-Seung Shin,⁴ and Jayanta Kumar Patra^{2,*}

The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes

Pablo R. Hardoim,^{a,*} Leonard S. van Overbeek,^b Gabriele Berg,^c Anna Maria Pirttilä,^d Stéphane Compant,^e Andrea Campisano,^f Matthias Döring,^g and Angela Sessitsch^e

St John's wort (*Hypericum perforatum*)-induced psychosis: a case report

Maria Ferrara¹, Francesco Mungai^{2,3}, Fabrizio Starace¹