



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Μικροβιακοί πληθυσμοί που σχετίζονται με το
φυτό *Hypericum perforatum*: Επίδραση του
αναπτυξιακού σταδίου της ανθοφορίας.»

«Microbial populations associated with the plant
Hypericum perforatum: Effect of the development
stage of flowering»

Βουζάβαλη Βασιλική



Λάρισα, 2021

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): Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Περιεχόμενα

Περίληψη	5
Abstract	6
1. Εισαγωγή	8
1.1 Φυτικό μικροβίωμα	8
1.2 Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί.....	8
1.2.1 Ορισμός ενδοφυτικών μικροοργανισμών	8
1.2.3 Διαδικασία αποικισμού των φυτών από ενδόφυτα....	9
1.2.4 Θετικές επιδράσεις ενδοφύτων στο φυτό-ξενιστή ...	10
1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν το μικροβίωμα των φυτών	14
1.4 Το φαρμακευτικό φυτό <i>Hypericum perforatum</i>	14
.....	15
1.5 Συστηματική κατάταξη του φυτού <i>Hypericum perforatum</i>	16
1.6 Βιολογική Δράση του <i>Hypericum perforatum</i>	16
1.7 Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί στο φυτό <i>Hypericum perforatum</i>	20
2. Σκοπός.....	20
3. Υλικά και μέθοδοι	21
3.1 Φυτικό υλικό.....	21
3.2 Αποστείρωση δειγμάτων	21
3.3 Απομόνωση μυκήτων	21
3.4 Επιλογή μυκήτων	21
3.5 Απομόνωση DNA	22
3.6 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας DNA	24
3.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	24

3.8 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	26
3.9 PCR Clean-up	27
3.10 In silico ανάλυση των αλληλουχιών.....	28
4. Αποτελέσματα	28
4.1 Απομόνωση ενδοφυτικών μυκήτων του φυτού <i>Hypericum perforatum</i>	28
4.2 Χαρακτηρισμός ενδοφυτικών μυκήτων	31
5. Συμπεράσματα-Συζήτηση	34
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	37

Περίληψη

Ως ενδοφυτικοί χαρακτηρίζονται οι μικροοργανισμοί, οι οποίοι αποικίζουν το εσωτερικό του φυτού, χωρίς να προκαλούν συμπτώματα ασθένειας. Τα φαρμακευτικά φυτά είναι γνωστό ότι αποικίζονται από πλήθος ενδοφυτικών μικροοργανισμών, οι οποίοι συμβάλλουν στην παραγωγή βιολογικά ενεργών ουσιών. Στην παρούσα προπτυχιακή μελέτη ενδοφυτικοί μύκητες απομονώθηκαν από το ριζικό σύστημα, τα άνθη και τα φύλλα του φαρμακευτικού φυτού *Hypericum perforatum*, το οποίο συλλέχθηκε από τρεις διαφορετικές περιοχές.

Οι ενδοφυτικοί μύκητες χαρακτηρίστηκαν με βάση την αλληλουχία ITS του DNA. Τα κυρίαρχα είδη μυκήτων, που απομονώθηκαν από τη ρίζα του φυτού, ανήκουν στα γένη *Alternaria*, *Fusarium* και *Diploceras* και *Mucor*. Στα φύλλα εντοπίστηκε ο μύκητας *Stemphylium sp.*, ενώ στα άνθη οι μύκητες *Phomopsis sp.* και *Ericocccum nigrum*. Μετά την ταυτοποίηση των μυκήτων, εξετάστηκε εάν υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στο είδος των μυκήτων που απομονώθηκαν από κάθε φυτό και τον οικότοπο από τον οποίο συλλέχθηκε το φυτό.

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

Abstract

As endophytic are characterized the microorganisms, which colonize the interior of the plant, without causing symptoms of disease. Medical plants are known to be colonized by numerous endophytic microorganisms, which contribute to the production of bioactive compounds. In the present study, endophytic fungi were isolated from the root, flowers and leaves of the medicinal plant *Hypericum perforatum*, which was collected from three different areas.

Endophytic fungi were characterized based on the ITS DNA region of the fungus. The main species of fungi, isolated from the root of the plant, belong to the genera *Altenaria*, *Fusarium* and *Diploceras* and *Mucor*. In the leaves was found the fungus *Stemphylium* sp., while in the flowers the fungus *Phomopsis* sp. and *Epicoccum nigrum*. After the fungi were identified, it was examined whether there was a correlation between the species of fungi isolated from each plant and the habitat from which the plant was collected.

Key words: endophytic microorganisms, medical plants, bioactive compounds, *Hypericum perforatum*

Ευχαριστίες

Αρχικά, 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 πραγματοποιήθηκε 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, τόσο για την ιδέα της να ασχοληθούμε με το συγκεκριμένο φυτό, όσο και για την εξασφάλιση των δειγμάτων και στον κ. Καρπούζα Δημήτριο, Καθηγητή Περιβαλλοντικής και Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, για την συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτωρ Φέκα Μαρία για την βοήθεια και την στήριξη που μου παρείχε σε όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία που είχαμε.

1. Εισαγωγή

1.1 Φυτικό μικροβίωμα

Το μικροβίωμα των φυτών αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την υγεία και την παραγωγικότητά τους. Πολλές μελέτες έχουν επισημάνει την ικανότητα των μικροβίων να επιδρούν σε σημαντικά χαρακτηριστικά των φυτών, όπως η ανάπτυξη, η αντοχή στις ασθένειες, η ανοχή στο αβιοτικό στρες, η κατακράτηση νερού και η σύνθεση ορμονών που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (Santoyo et al., 2016). Οι μικροοργανισμοί που αποικίζουν το φυτό διακρίνονται στους επιφυτικούς, στους ενδοφυτικούς και στους δυνητικά παθογόνους. Ως επιφυτικοί ορίζονται οι μικροοργανισμοί των εξωτερικών ιστών, ενώ αυτοί που βρίσκονται στην ενδόσφαιρα ανήκουν στην κατηγορία των ενδοφυτικών μικροοργανισμών (Santoyo et al., 2016). Δυνητικά παθογόνοι χαρακτηρίζονται οι μικροοργανισμοί που υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν έχουν αρνητικές επιδράσεις για το φυτό, αλλά σε περίπτωση αύξησης του αριθμού τους ή εάν βρεθούν σε διαφορετικό ιστό από αυτόν που φυσιολογικά παρασιτούν ή υπό τις κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες, τότε προκαλούν διαταραχές στο φυτό-ξενιστή και επομένως δρουν ως παθογόνοι (Santoyo et al., 2016, Lebeis 2014, Turner et al., 2013).

1.2 Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί

1.2.1 Ορισμός ενδοφυτικών μικροοργανισμών

Ως ενδοφυτικοί ορίζονται οι μικροοργανισμοί (βακτήρια και μύκητες), που εντοπίζονται στο εσωτερικό του φυτού και δεν του προκαλούν συμπτώματα παθογένειας (Bacon and White, 2000). Επομένως, ενδοφυτισμός καλείται η μοναδική σχέση μεταξύ του φυτού-ξενιστή και του ενδοσυμβιωτικού μικροοργανισμού, που αποικίζεται μέσα στους ιστούς του φυτού χωρίς να το διαταράσσει (Schulz & Boyle,

2005). Τα οφέλη που αποκομίζουν τα φυτά από τα ενδόφυτα είναι η κυρίως η πρόσληψη θρεπτικών, η μείωση αρνητικών περιβαλλοντικών επιδράσεων στο φυτό, καθώς και η προστασία του από παθογόνους μικροοργανισμούς. Τα ενδόφυτα μπορούν να χαρακτηριστούν με τους εξής τρεις όρους: «κοινοί» (commensals), «αμοιβαίοι» (mutualists) και «ανταγωνιστές» (antagonists). Ως κοινοί ορίζονται εκείνοι που προσλαμβάνουν θρεπτικά συστατικά από το φυτό-ξενιστή και δεν έχουν καμία επίδραση σε αυτό (Brader et al., 2017). Αμοιβαία καλούνται όσα ενδόφυτα αναπτύσσουν αμοιβαία σχέση με τα φυτά, και επωφελούνται τόσο τα ίδια, όσο και οι ξενιστές (Brader et al., 2017). Τέλος, ανταγωνιστικά χαρακτηρίζονται εκείνα, που επιδρούν αρνητικά στο φυτό (Hardoim et al., 2015).

1.2.3 Διαδικασία αποικισμού των φυτών από ενδόφυτα

Οι μικροοργανισμοί εισέρχονται στο φυτό-ξενιστή με διάφορους τρόπους, όπως για παράδειγμα μέσω των πλευρικών ριζών, των στομάτων των φύλλων, καθώς και μέσω πληγών σε ιστούς που έχουν τραυματιστεί από παθογόνα ή εξαιτίας μηχανικής τριβής (Sorensen & Sessits, 2006). Επίσης, μερικοί μικροοργανισμοί, κυρίως ενδοφυτικά βακτήρια, έχουν την ικανότητα να εισβάλλουν στους φυτικούς ιστούς μέσω ενεργητικής εισόδου, κατά την οποία εκφράζουν ένζυμα που συμβάλλουν στην αποικοδόμηση κυτταρικών τοιχωμάτων (Compant et al., 2010). Ακόμη, μπορούν να εισέλθουν στο φυτό από τα άνθη και τους καρπούς, αλλά και από φακίδια, που εντοπίζονται στο περίδερμα των βλαστών και των ιστών (Santoyo et al., 2016, Compant et al., 2010).

Σε μεγαλύτερο ποσοστό παρατηρείται αποικισμός των μικροοργανισμών στην περιοχή της ρίζας και σε μικρότερο βαθμό στα φύλλα και στα άνθη (Santoyo et al., 2016).

1.2.4 Θετικές επιδράσεις ενδοφύτων στο φυτό-ξενιστή

1.2.4.1 Επίδραση στην ανάπτυξη του φυτού

Ορισμένοι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί προάγουν την ανάπτυξη των φυτών μέσω παραγωγής φυτοορμονών. Τα ενδοφυτικά βακτήρια και μύκητες περιέχουν στο γενετικό τους υλικό γονίδια βιοσύνθεσης φυτοορμονών, όπως κυτοκινινών (CKs), ινδολικού οξέος (IAA) και γιββερελινών (GAs) (Santoro et al., 2016).

Για παράδειγμα, επίδραση των βακτηριών *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* και *Bacillus subtilis* στο φυτό *Mentha piperita* είχε ως αποτέλεσμα αύξηση του μήκους της ρίζας του φυτού, λόγω αύξησης των φυτοορμονών αυξίνης και αιθυλενίου (Santoro et al., 2016).

1.2.4.2 Επίδραση των ενδοφύτων στην πρόσληψη θρεπτικών συστατικών

Οι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να παρέχουν στο φυτό πλήθος θρεπτικών συστατικών (Perez-Montano et al., 2014):

1) Πρόσληψη φωσφόρου (P)

Ο φώσφορος αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξη των φυτών και συμβάλλει στην κυτταρική διαίρεση, τη φωτοσύνθεση και την ανάπτυξη της ρίζας των φυτών. Ικανότητα πρόσληψης φωσφόρου διαθέτουν τα γένη μυκήτων *Aspergillus*, *Penicillium*, *Piriformospora* και *Colletotrichum*, τα οποία υδρολύουν μέσω των φωσφατασών τον οργανικό φώσφορο και παρέχουν στο φυτό ανόργανο P (Sharma et al., 2013). Επίσης, μπορούν να μεταφέρουν στο φυτό το P που ελευθερώνεται στη ριζόσφαιρα με τη δράση άλλων μικροοργανισμών. Επίσης, ικανότητα διαλυτοποίησης φωσφόρου διαθέτουν τα βακτηριακά

γένη *Pseudomonas* και *Bacillus*, καθώς και ορισμένα Ακτινοβακτήρια (Hirmuna et al., 2016).

2) Πρόσληψη αζώτου (N)

Εκτός από την πρόσληψη P, ορισμένοι μικροοργανισμοί, όπως είναι οι μυκκοριζικοί μύκητες επιτυγχάνουν την μετατροπή του ανόργανου N σε αμινοξέα και την μεταφορά του στο εσωτερικό της ρίζας. Πρωταρχικό ρόλο στην δέσμευση αζώτου διαδραματίζουν και αζωτοδεσμευτικά βακτηριακά ενδόφυτα, τα οποία αποικίζουν σε ειδικά όργανα στη ρίζα των φυτών, τα φυμάτια και μετατρέπουν το αέριο άζωτο (N_2) σε αμμωνία, νιτρικά, και άλλες αζωτούχες ενώσεις (Figueiredo et al., 2016). Την κυριότερη κατηγορία αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων αποτελούν τα ριζόβια, τα οποία αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις με τα ψυχανθή και προκαλούν το σχηματισμό φυματίου στο φυτό-ξενιστή. Το φυτό παρέχει στον ενδοσυμβιώτη του φωτοσυνθετικά προϊόντα, με αντάλλαγμα άζωτο σε μορφή αμμωνιακών και αμινοξέων (Udvardi & Day, 1997). Παραδείγματα αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων αυτής της κατηγορίας αποτελούν τα *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* (Udvardi & Day, 1997).

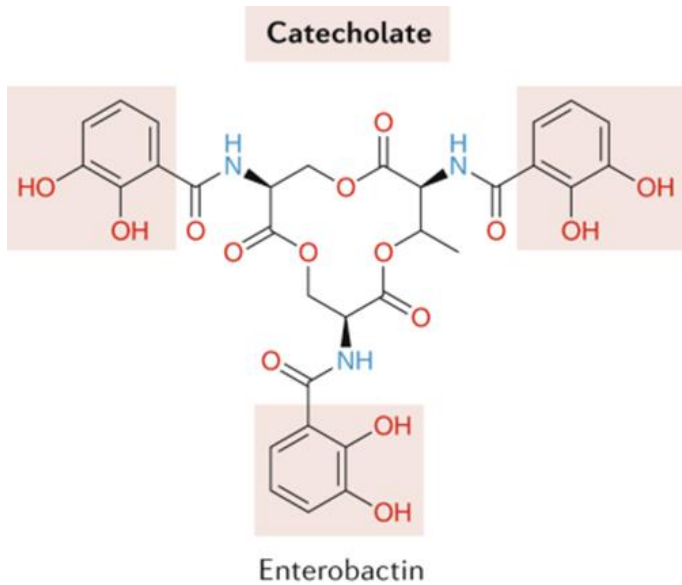
3) Πρόσληψη σιδήρου (Fe)

Οι μικροοργανισμοί διαθέτουν μηχανισμούς για τη μετατροπή του αδιάλυτου τρισθενούς σιδήρου (Fe^{3+}) που υπάρχει στο έδαφος σε διαλυτό (Fe^{2+}). Έναν από τους μηχανισμούς αυτούς αποτελεί η παραγωγή σιδηροφόρων, τα οποία είναι χηλικές ενώσεις με μικρό μοριακό βάρος, που δεσμεύουν μέταλλα και συμβάλλουν στη απορρόφηση τους από τα φυτά.

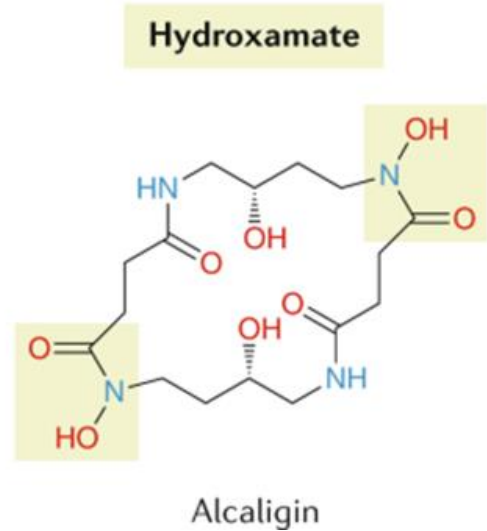
Τα σιδηροφόρα διακρίνονται σε δύο κατηγορίες (Ahmed & Holmstrom, 2014):

- Τα catecholates, που παράγονται από βακτήρια, τα οποία ανήκουν στα γένη *Bacillus*, *Pseudomonas* και *Aeromonas*.

- Τα hydroximates, που παράγονται από βακτήρια και μύκητες που ανήκουν στα γένη *Aspergillus* και *Rhizopus* (Hubertus, 2014).



Εικόνα 1.1 Χημική δομή κατεχολικών σιδηροφόρων (Kramer et al., 2020).



Εικόνα 1.2 Χημική δομή υδροξαμικών σιδηροφόρων (Kramer et al., 2020).

4) Πρόσληψη ιχνοστοιχείων

Εκτός από το P και το N, παρέχουν στο φυτό-ξενιστή και πλήθος μικροστοιχείων, όπως νάτριο (Na), ψευδάργυρο (Zn), σελήνιο (Se), ρουβίδιο (Rb), στρόντιο (Sr) (Sharma, et al., 2013).

1.2.4.3 Αντοχή σε αβιοτικές καταπονήσεις

Ορισμένοι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί καθιστούν τα φυτά ικανά να ανταπεξέλθουν σε περιπτώσεις ακραίων περιβαλλοντικών συνθηκών,

όπως είναι η υψηλή αλατότητα, η ξηρασία και το ψύχος. Κύριος μηχανισμός μέσω του οποίου τα ενδόφυτα εξασφαλίζουν την αντοχή των φυτών στις καταπονήσεις είναι η παραγωγή του ενζύμου απαμινάση του ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate), το οποίο προλαμβάνει τη σηματοδότηση του αιθυλενίου, που παράγουν τα φυτά υπό συνθήκες στρες (Glick, 2014).

Επίσης, οι μικροοργανισμοί διαθέτουν την ικανότητα να αυξάνουν την ριζική επιφάνεια σε συνθήκες ξηρασίας, ώστε να διευκολυνθεί η πρόσληψη νερού και θρεπτικών συστατικών (Timmusk et al., 2014).

Ένα άλλο χαρακτηριστικό των ωφέλιμων ενδοφυτών είναι η ενίσχυση των κυτταρικών μεμβρανών του φυτού, προσδίδοντας του ανθεκτικότητα έναντι ακραίων θερμοκρασιών, οι οποίες θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε θάνατο (Su et al., 2015).

1.2.4.4 Αντοχή σε βιοτικό στρες

Το βιοτικό στρες προκαλεί διαταραχές στο φυτό μέσω παθογόνων μυκήτων, βακτηρίων, εντόμων, ζιζανίων, καθώς και ιών. Οι ωφέλιμοι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί μπορούν να αμυνθούν και να καταπολεμήσουν τις αρνητικές επιδράσεις που επιφέρουν τα συγκεκριμένα φυτοπαθογόνα με δύο τρόπους:

1) Άμεση αναστολή παθογόνων

Η παραγωγή αντιβιοτικών ενώσεων από τους ενδοφυτικούς μικροοργανισμούς αποτελεί κύριο μηχανισμό καταπολέμησης των φυτοπαθογόνων. Παραδείγματα μικροοργανισμών που συνθέτουν αντιβιοτικά αποτελούν τόσο ακτινομύκητες, όσο και βακτήρια του γένους *Bacillus* και *Pseudomonas* (Matsumoto & Takahashi, 2017).

2) Έμμεση αναστολή παθογόνων

Ο μηχανισμός έμμεσης αναστολής περιλαμβάνει την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος του φυτού. Οι κυριότεροι μικροοργανισμοί που εμπλεκονται στην επαγωγή της διασυστηματικής αντοχής του φυτού

είναι τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* και *Bacillus* και μύκητες του γένους *Trichoderma* και *Fusarium* (Gond et al., 2015, Kavroulakis et al, 2007).

1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν το μικροβίωμα των φυτών

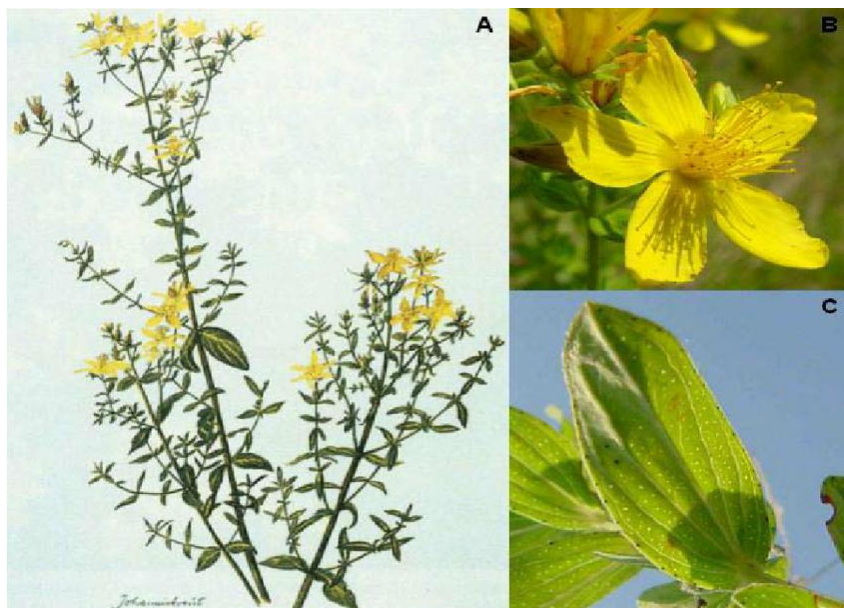
Το φυτικό μικροβίωμα επηρεάζεται από ποικίλους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες (Berg and Smalla, 2009, Andreolli et al., 2016):

- Παράγοντες που σχετίζονται με το έδαφος του φυτού, όπως το pH, ο τύπος του, η δομή του, η αλατότητα, η υγρασία και η οργανική ύλη του.
- Εξωτερικές περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως το κλίμα, οι καλλιεργητικές πρακτικές και η παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών.
- Παράγοντες που σχετίζονται με το φυτό ξενιστή, όπως είναι η ηλικία του, το στάδιο ανάπτυξής του, ο βαθμός προσαρμοστικότητάς του, καθώς και η κατάσταση της υγείας του.

1.4 Το φαρμακευτικό φυτό *Hypericum perforatum*

Το *Hypericum perforatum* είναι ένα από τα πιο σημαντικά φαρμακευτικά φυτά. Είναι ανθοφόρο φυτό, του γένους *Hypericum* και ανήκει στην οικογένεια των Υπερικιδών (Hypericaceae). Χαρακτηρίζεται από πυκνά, επίμηκη, λεία φύλλα και κίτρινα άνθη με μαύρες κουκίδες. Προέρχεται ετυμολογικά από τις ελληνικές λέξεις «υπέρ» και «εικόνα», καθώς σύμφωνα με την παράδοση το τοποθετούσαν πάνω από την εικόνα του Αγίου Ιωάννη για να διώξουν το κακό κατά τη διάρκεια της μέρας που εορτάζεται (24 Ιουνίου κατά την Καθολική Εκκλησία).

Αναφέρεται, επίσης, με τις ονομασίες βάλσαμο, βαλσαμόχορτο, σπαθόχορτο, υπερικό, βότανο του Αγίου Ιωάννη. Στην Αρχαία Ελλάδα ήταν γνωστό για τις ευεργετικές του ιδιότητες και το χρησιμοποιούσαν κυρίως για να αντιμετωπίσουν καταστάσεις, όπως η μελαγχολία και για το λόγο αυτό το αποκαλούσαν «βότανο της λιακάδας». Το βαλσαμόχορτο αποτελεί ένα πολυετές φυτό, που αναπτύσσεται κατά βάση σε ξηρές περιοχές και εντοπίζεται σε όλη την Ευρώπη, Ασία 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).



Εικόνα 1.3 Μέρη του φυτού *Hypericum perforatum* (A). Πιο μεγενθυμένη όψη του άνθους (B) και του φύλλου (C) (Adrian Wirz, 2005).

1.5 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)

1.6 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 ιατρική αποτελεσματικότητα του βοτάνου οφείλεται σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικά ενεργών ουσιών που παράγονται από το φυτό, όπως είναι η υπερικίνη, η υπερφορίνη, η ρουτίνη, τα φλαβονοειδή, η κερκετίνη, το kaempferol (Shi MJ et al., 2018). Η υπερικίνη είναι μία χημική ουσία που χαρακτηρίζεται από έντονο κόκκινο χρώμα και είναι ανάλογο της ναφθοδιανθρόνης. Όσον

αφορά την υπερφορίνη, είναι πρενυλιωμένο παράγωγο της φλωρογλυκινόλης και αποτελεί μέλος της οικογένειας της πολυκυκλικής πολυπρενυλιωμένης ακυλοφλωρογλυκίνης (PPAP) (Danova K. et al., 2010). Οι βιολογικές δράσεις, στις οποίες συμβάλλουν τα παραπάνω συστατικά είναι οι εξής:

1) Αντικαταθλιπτική δράση

Η συγκεκριμένη δράση φαίνεται να οφείλεται στην υπερικίνη, ένα από τα κυριότερα ενεργά συστατικά του φυτού, το οποίο αναστέλλει τα ένζυμα των αμινο-οξειδασών MAO-A και MAO-B, τα οποία αποικοδομούν τις βιοαμίνες σεροτονίνη, αδρεναλίνη, νοραδρεναλίνη και μελατονίνη, οδηγώντας με αυτό τον τρόπο σε κατάθλιψη. Επίσης, παρεμποδίζει την επαναπρόσληψη της ντοπαμίνης, της σεροτονίνης, του GABA και του L- γλουταμινικού οξέος από την συναπτική σχισμή και διεγείρει την πρόσδεση της σεροτονίνης στους υποδοχείς της, αποτρέποντας με αυτό τον τρόπο την εμφάνιση καταθλιπτικών συμπτωμάτων (Ng QX, Venkatanarayanan N., Ho CY, 2017).

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

Τα φλαβονοειδή και οι κατεχίνες που περιέχονται στο φυτό, έχει βρεθεί ότι δρουν κατά του ιού της γρίπης. 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).

4) Αντινεοπλασματική δράση

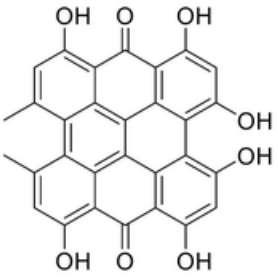
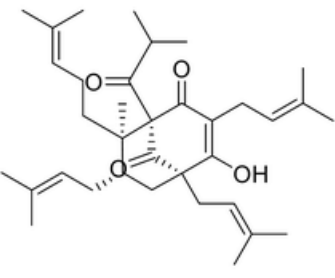
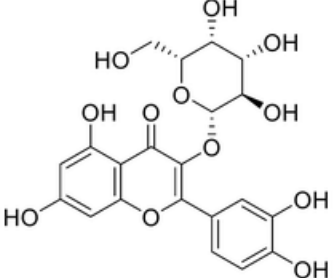
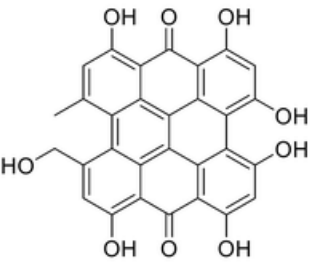
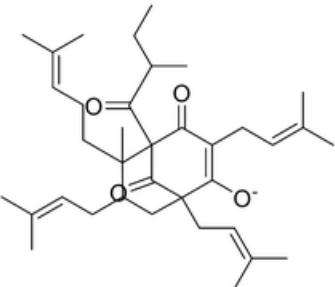
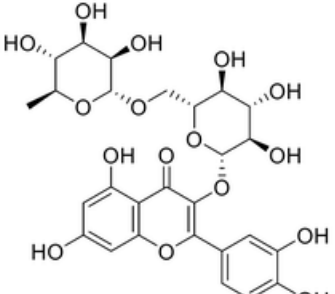
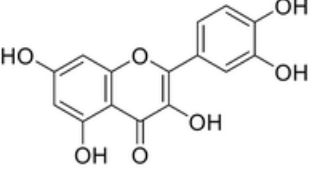
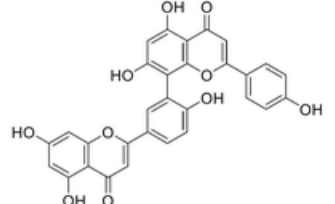
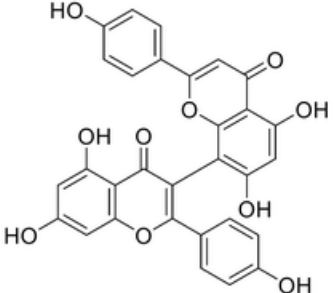
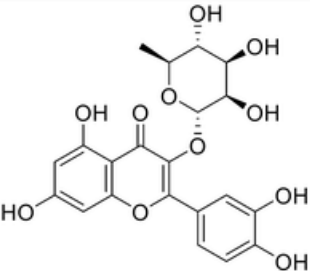
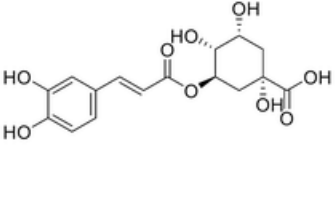
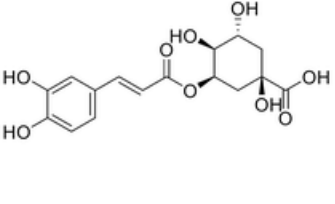
Τόσο η υπερικίνη, όσο και η υπερφορίνη, βρέθηκε ότι δρουν αποτελεσματικά κατά των νεοπλασμάτων και αναστέλλουν τη διασπορά του καρκίνου (Hostanska et al., 2003).

5) Αντιφλεγμονώδης δράση

Το *Hypericum perforatum*, εκτός των άλλων βρέθηκε ότι προλαμβάνει την εμφάνιση οξείας φλεγμονής, αποτρέποντας την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ, ο οποίος είναι ο κύριος χημικός μεσολαβητής της φλεγμονής. Επίσης, η συγκεκριμένη δράση του φυτού οφείλεται στην αναστολή της κυκλοοξυγενάσης-1, της 5-λιποξυγενάσης, της ιντερλευκίνης 6 και της συνθετάσης του νιτρικού οξειδίου, τα οποία είναι γονίδια προ-αντιφλεγμονόδων παραγόντων (Tedeschi et al., 2003).

6) Αντιοξειδωτική δράση

Εργαστηριακές μελέτες έδειξαν ότι οι φαινόλες και τα флаβονοειδή που περιέχονται στο φυτό έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών και την παραγωγή λιπιδικής υπεροξειδάσης και για το λόγο αυτό μπορεί να δράσει ως αντιοξειδωτικός παράγοντας (Trommer et al, 2005).

		
Hypericin	Hyperforin	Hyperoside
		
Pseudohypericin	Adhyperforin	Rutin
		
Quercetin	Amentoflavone	I3,I18-Biapiigenin
		
Quercitrin	Chlorogenic acid	Neochlorogenic acid

Εικόνα 1.4 Βιολογικά ενεργές ουσίες του φυτού *Hypericum Perforatum* (Velingkar et al., 2017).

1.7 Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί στο φυτό *Hypericum perforatum*

Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί έχουν απομονωθεί από τη ρίζα, τα φύλλα και τα άνθη του φυτού *Hypericum perforatum*. Έχει βρεθεί ότι οι πολυάριθμοι ενδοφυτικοί μύκητες και βακτήρια που αποικίζουν το φυτό, συμβάλλουν στην παραγωγή των κύριων δραστικών ουσιών του φυτού, της υπερικίνης και της υπερφορίνης (Vigneshwari et al., 2019, Kusari et al., 2008).

2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός ενδοφυτικών μικροοργανισμών και συγκεκριμένα ενδοφυτικών μυκήτων από το αρωματικό φυτό *Hypericum perforatum*. Μέσω του χαρακτηρισμού και της ταυτοποίησης των ενδοφυτικών μυκήτων θα διερευνήσουμε εάν υπάρχει συσχέτιση του είδους των ενδοφυτικών μυκήτων που αποικίζουν το συγκεκριμένο φυτό με τους τρεις διαφορετικούς οικότοπους.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Φυτικό υλικό

Το φυτό *Hypericum perforatum* παραλήφθηκε από τις εξής περιοχές: Άμμος (Ν. Λάρισας), Παλαιόμυλος (Ν. Λάρισας), Ασμάκι (Ν. Λάρισας). Μετά τη συλλογή του, ακολούθησε η αποκοπή τμημάτων ρίζας, φύλλων και άνθων, τα οποία τοποθετήθηκαν σε πλαστικά σακουλάκια και κατανεμήθηκαν ανά περιοχή.

3.2 Αποστείρωση δειγμάτων

Για την αποστείρωση των δειγμάτων, τα φύλλα, τα άνθη και τα τμήματα του ριζικού συστήματος που συλλέχθηκαν κόπηκαν σε μικρότερα κομμάτια και ακολούθησε ξέπλυμα με αιθανόλη. Στη συνέχεια, εμβαπτίστηκαν σε 5% χλωρίνη για 5 λεπτά και έπειτα ξεπλύθηκαν με νερό. Τέλος, τοποθετήθηκαν σε απορροφητικό χαρτί.

3.3 Απομόνωση μυκήτων

Η διαδικασία της απομόνωσης μυκήτων πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο νηματικής ροής.

3.4 Επιλογή μυκήτων

Τα αποστειρωμένα δείγματα ρίζας, φύλλων και άνθων τοποθετήθηκαν σε τρυβλία Petri (3 κομμάτια ρίζας ή φύλλου/ τρυβλίο), τα οποία είχαν προηγουμένως επιστρωθεί με στερεό θρεπτικό μέσο Potato Dextrose Agar (PDA) (24 g/L PDB, 15 g/L agar), καθώς και σε τρυβλία που είχαν επιστρωθεί με το θρεπτικό Yeast Nitrogen Base (YNB) (6.7 g/L YNB). Και στα δύο θρεπτικά είχαν προστεθεί τα αντιβιοτικά χλωραμφαινικόλη (50 µg/ml) και τετρακυκλίνη (30 µg/ml) για την παρεμπόδιση ανάπτυξης βακτηρίων. Μετά από μία εβδομάδα επώασης,

οι μυκηλιακές υφές ήταν ορατές και μεταφέρθηκαν σε νέα τρυβλία. Ακολούθησε επώαση στους 22°C και στους 26°C και μετά από μία εβδομάδα παρατηρήθηκε η μορφολογία των μυκήτων που αναπτύχθηκαν σε κάθε τρυβλίο. Στην περίπτωση που σε ένα τρυβλίο αναπτύχθηκαν δύο ή και περισσότεροι μύκητες έγινε διαχωρισμός και κάθε μύκητας μεταφέρθηκε σε νέο τρυβλίο. Έπειτα, οι μύκητες κατηγοριοποιήθηκαν βάσει της μορφολογίας τους και επιλέχθηκε ένας μύκητας από κάθε κατηγορία για της περαιτέρω αναλύσεις.

3.5 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA είναι μια διαδικασία εξαγωγής του DNA από τα διάφορα δείγματα. Σκοπός είναι να διαχωριστεί το DNA που βρίσκεται στον πυρήνα από τα άλλα κυτταρικά συστατικά. Τα βασικά στάδια που περιλαμβάνει η απομόνωση του DNA είναι τα 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 μυκηλιακών υφών από κάθε τρυβλίο σε ξεχωριστούς σωλήνες erpendorf 1.5 ml.]
2. Ομογενοποίηση δείγματος, χρησιμοποιώντας πλαστικό γουδοχέρι.
3. Προθέρμανση του CTAB buffer (100mM Tris HCL, 20mM EDTA, 1.4M NaCl, 2% CTAB, 1% PVP) στους 65°C 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 5 λεπτά στις 13000 στροφές.
9. Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο σωλήνα erpendorf 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.

Σημείωση: Το χλωροφόρμιο προκαλεί επιφανειακή αποδιάταξη των πρωτεϊνών, ενώ η ισοαμυλική αλκοόλη μειώνει τη δημιουργία αφρού.

3.6 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.

3.7 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 επιμηκύνει 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, καθώς και το γονίδιο 5.8S, που εντοπίζεται στη μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα του μύκητα μαζί με τα ριβοσωμικά γονίδια 28S και 5S.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι (Forward) ITS1 και (Reverse) ITS4 με αλληλουχίες -TCCGTAGGTGAACCTGCGG- και -TCCTCCGCTTATTGATATGC-, 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 (Πίν. 3.1):

Πίνακας 3.1. Συστατικά PCR

10x ρυθμιστικό διάλυμα με Mg ⁺	2 μl
Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) (10mM)	0.4 μl
Εκκινητής ευθείας κατεύθυνσης (Forward) (10μM)	0.8 μl
Εκκινητής αντίστροφης κατεύθυνσης (Reverse) (10μM)	0.8 μl
DNA μήτρα	1 μl
KapaTaq πολυμεράση	0.08 μl
Νερό	14.92 μl

Το πρόγραμμα που εκτελέστηκε στον θερμικό κυκλοποιητή ήταν το εξής (Πίν. 3.2):

Πίνακας 3.2. Πρόγραμμα θερμικού κυκλοποιητή για εκτέλεση PCR.

Στάδιο	Χρόνος	Θερμοκρασία
Αρχική αποδιάταξη	2 min	95°C
Αποδιάταξη	30 sec	95°C
Υβριδισμός εκκινητών	30 sec	48°C
Επιμήκυνση της αλυσίδας DNA	30 sec	72°C
Τελική επιμήκυνση των αλυσίδων	5 min	72°C

Επίσης, ορίσαμε να εκτελεστούν 35 κύκλοι ενίσχυσης.

3.8 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 φορτίο 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 μg/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 πηκτώματος, 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.

3.9 PCR Clean-up

Ο καθαρισμός των δειγμάτων PCR πραγματοποιήθηκε με το GenElute™ PCR Clean-Up Kit, το οποίο χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση συστατικών, όπως εκκινητών, νουκλεοτιδίων, DNA πολυμεράσης και αλάτων.

Αρχικά, προσθέσαμε διάλυμα δέσμευσης NT1 στον προϊόν PCR και αναδεύσαμε. Έπειτα, μεταφέραμε 700 μL μίγματος στην κολώνα (PCR Clean-up column), η οποία ήταν τοποθετημένη σε δοχείο συλλογής (Collection tube) (2ml) και πραγματοποιήσαμε φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 30 δευτερόλεπτα. Μετά το πέρας την φυγοκέντρησης, το

περιεχόμενο από το δοχείο συλλογής απορρίφθηκε και στη συνέχεια, προστέθηκαν 700μl διαλύματος NT3 στην κολώνα. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 30 δευτερόλεπτα και το περιεχόμενο της στήλης απορρίφθηκε. Έπειτα, επαναλήφθηκε προσθήκη διαλύματος NT3 και φυγοκέντρηση, ώστε να ελαχιστοποιηθούν τα χαοτροπικά άλατα. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11000rpm για 1 λεπτό για να αφαιρεθεί εντελώς το διάλυμα NT3, καθώς περιέχει αιθανόλη, η οποία είναι ανασταλτική για ενζυμικές αντιδράσεις. Στη συνέχεια, μεταφέραμε την κολώνα σε ένα νέο δοχείο συλλογής (1.5 ml) και προσθέσαμε 25 μl ρυθμιστικού διαλύματος NE και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό. Τέλος, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 1 λεπτό.

Τα δείγματα DNA στάλθηκαν για αλληλούχιση κατά Sanger στην εταιρεία Cemla.

3.10 In silico ανάλυση των αλληλουχιών

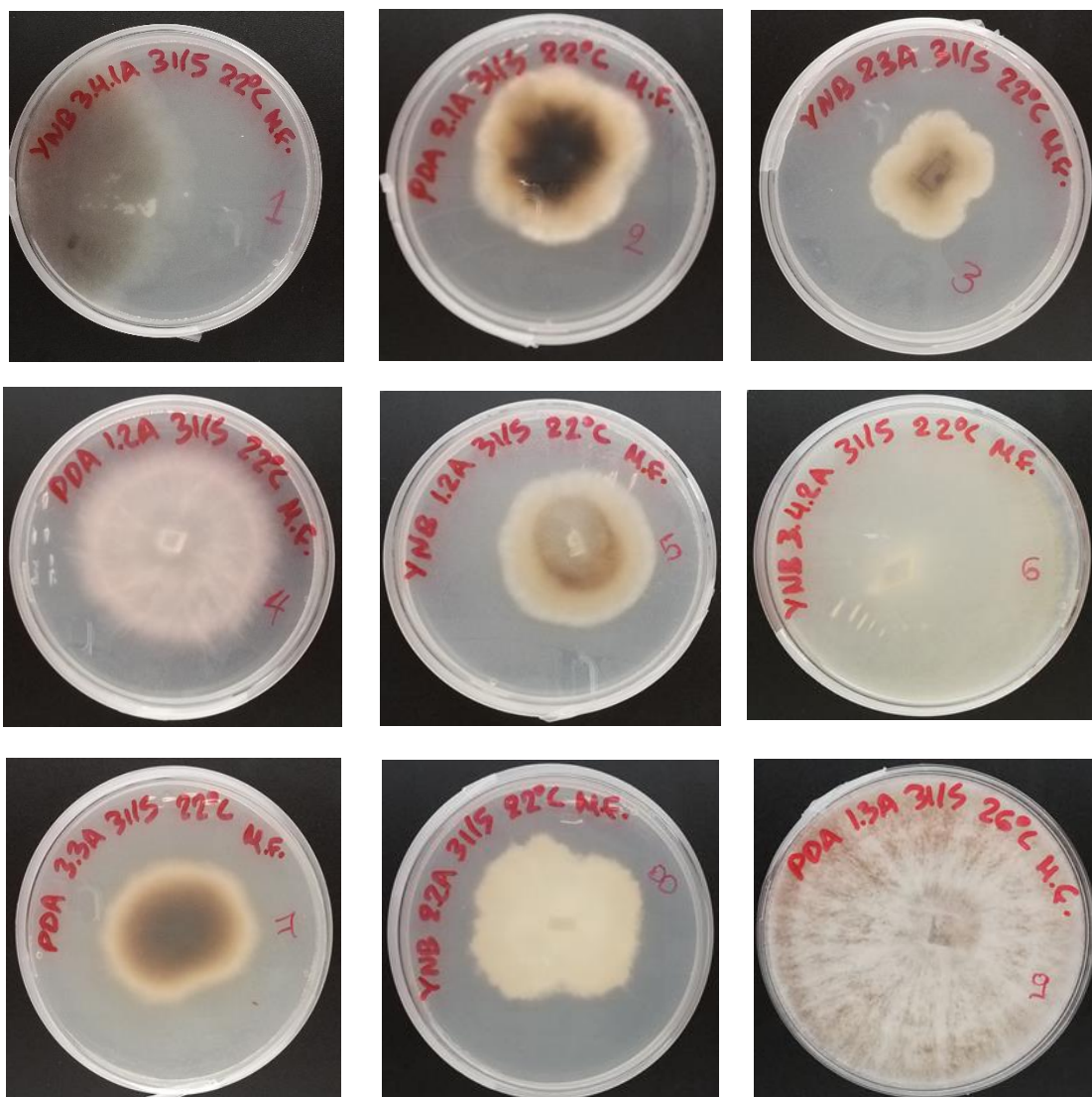
Οι αλληλουχίες DNA των ενδοφυτικών μικροοργανισμών υποβλήθηκαν στο πρόγραμμα BLAST του NCBI. Πιο συγκεκριμένα, υποβλήθηκαν στο Blastn, που αποτελεί τη βάση δεδομένων όλων των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών. Τα αποτελέσματα του Blastn συνέβαλλαν στην ταυτοποίηση του μύκητα υποδεικνύοντας το γένος στο οποίο ανήκει.

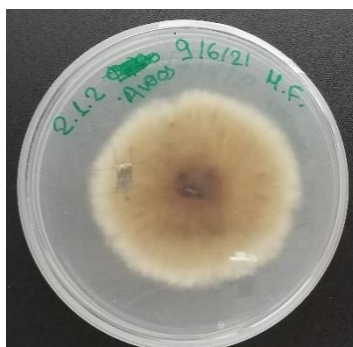
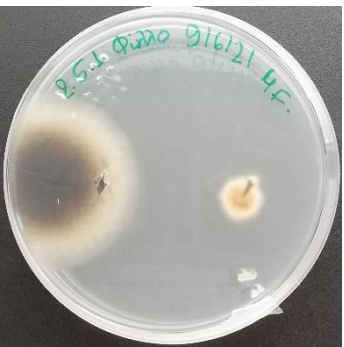
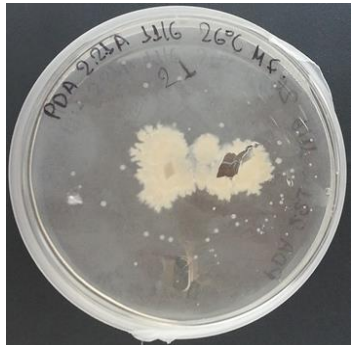
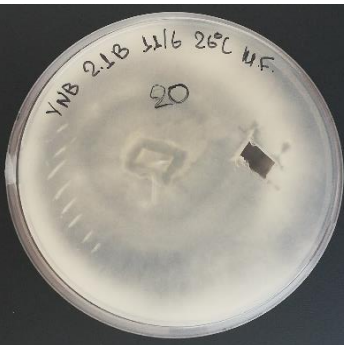
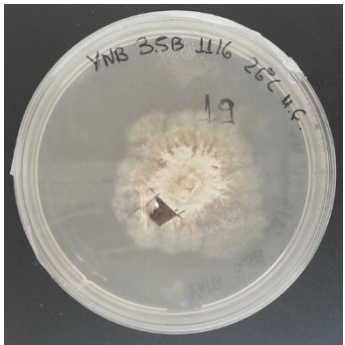
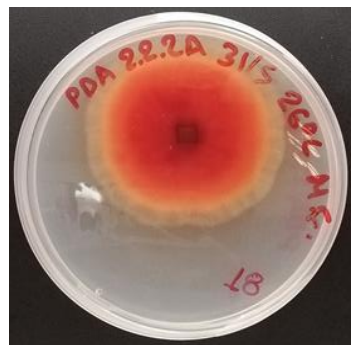
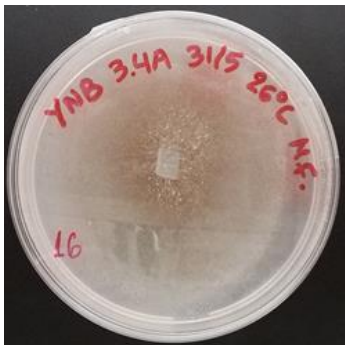
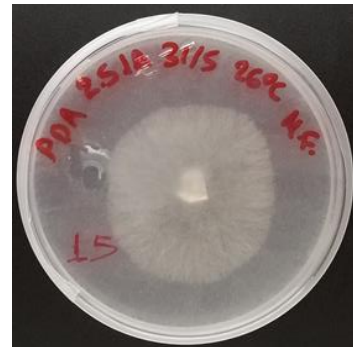
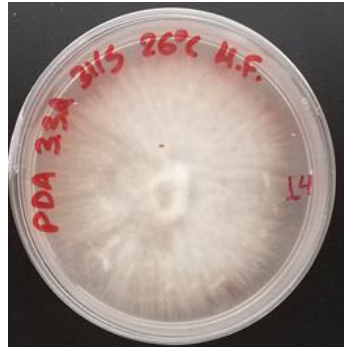
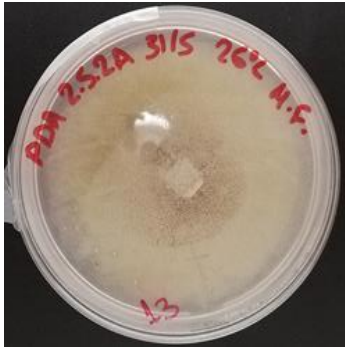
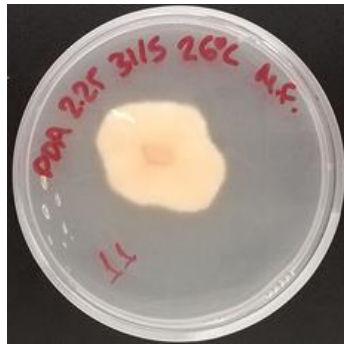
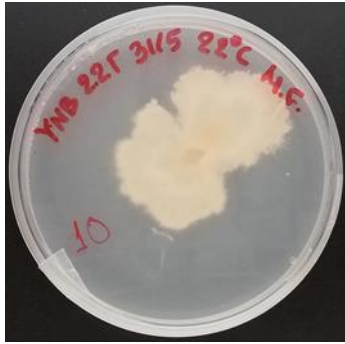
4. Αποτελέσματα

4.1 Απομόνωση ενδοφυτικών μυκήτων του φυτού *Hypericum perforatum*

Για την απομόνωση των ενδοφυτικών μυκήτων τοποθετήσαμε τεμαχισμένα τμήματα ρίζας, φύλλων και άνθων σε τρυβλία που είχαμε προηγουμένως επιστρώσει με στερεό θρεπτικό μέσο PDA, καθώς και σε τρυβλία, τα οποία είχαν επιστρωθεί με το θρεπτικό YNB. Ακολούθησε επώαση στους 22°C και στους 25°C για 1 εβδομάδα, έως ότου έγιναν ορατές οι μυκηλιακές υφές.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήσαμε ανακαλλιέργεια μεταφέροντας τμήμα του μυκηλίου από το αρχικό τρυβλίο σε νέο. Από τη ρίζα, τα φύλλα και τα άνθη απομονώσαμε συνολικά 50 μύκητες, τους οποίους εξετάσαμε μορφολογικά και τους περιορίσαμε στους 25. Από αυτούς οι 22 προέρχονται από τη ρίζα του φυτού, οι 2 από τα άνθη και 1 από τα φύλλα. Στην παρακάτω εικόνα (Εικ. 4.1) παρουσιάζονται οι μορφολογίες των μυκήτων που επιλέχθηκαν:





Εικόνα 4.1. Μορφότυποι ενδοφυτικών μυκήτων του φυτού *Hypericum Perforatum*

4.2 Χαρακτηρισμός ενδοφυτικών μυκήτων

Μετά την απομόνωση των μυκήτων, ακολούθησε η ταυτοποίησή τους με τη βοήθεια της ITS (Internal Transcribed Spacer) DNA περιοχής του μύκητα. Η απομόνωση των ITS περιοχών πραγματοποιήθηκε μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) με εξειδικευμένους προς τις περιοχές ITS εκκινήτες (ITS1, ITS4). Τα προϊόντα της PCR καθαρίστηκαν και στη συνέχεια, αλληλουχήθηκαν. Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος Blastn (βάση δεδομένων όλων των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών) του Εθνικού Κέντρου Βιοτεχνολογικών Πληροφοριών της Αμερικής (NCBI).

Στον παρακάτω πίνακα (Πιν. 4.1) παρουσιάζεται το είδος του κάθε μύκητα, το μέρος του φυτού από το οποίο απομονώθηκε, καθώς και η περιοχή, από την οποία παραλήφθηκε το φυτό, από το οποίο απομονώσαμε κάθε μύκητα.

Πίνακας 4.1. Κατάταξη ενδοφυτικών μυκήτων βάσει του είδους τους, του μέρους του φυτού από το οποίο απομονώθηκε και την περιοχή, από την οποία παραλήφθηκε το φυτό, από το οποίο απομονώσαμε κάθε μύκητα

Αρίθμηση μύκητα	Είδος μύκητα	Μέρος του φυτού	Περιοχή φυτού
1	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Ρίζα	Ασμάκι
2	<i>Alternaria brassicae</i>	Ρίζα	Παλαιόμυλος
3	<i>Alternaria alternata</i>	Ρίζα	Παλαιόμυλος
4	<i>Basidiomycota</i>	Ρίζα	Άμμος
5	<i>Alternaria alternata</i>	Ρίζα	Άμμος
6	<i>Mucor circinelloides</i>	Ρίζα	Ασμάκι
7	<i>Alternaria alternata</i>	Ρίζα	Ασμάκι
8	<i>Fusarium equiseti</i>	Ρίζα	Παλαιόμυλος
9	<i>Ceratobasidium sp.</i>	Ρίζα	Άμμος

10	<i>Fusarium equiseti</i>	Ρίζα	Παλαιόμυλος
11	<i>Fusarium equiseti</i>	Ρίζα	Παλαιόμυλος
12	<i>Fusarium oxysporum</i>	Ρίζα	Άμμος
13	<i>Mucor circinelloides</i>	Ρίζα	Παλαιόμυλος
14	<i>Fusarium brachygibbosum</i>	Ρίζα	Ασμάκι
15	<i>Ceratobasidium sp.</i>	Ρίζα	Παλαιόμυλος
16	<i>Mucor sp.</i>	Ρίζα	Ασμάκι
17	<i>Fusarium longipes</i>	Ρίζα	Παλαιόμυλος
18	<i>No sequencing result</i>	Ρίζα	Παλαιόμυλος
19	<i>Diploceras hypericinum</i>	Ρίζα	Ασμάκι
20	<i>Diploceras hypericinum</i>	Ρίζα	Παλαιόμυλος
21	<i>Humicola sp.</i>	Ρίζα	Παλαιόμυλος
22	<i>Diploceras hypericinum</i>	Ρίζα	Ασμάκι
23	<i>Phomopsis sp.</i>	Άνθη	Παλαιόμυλος
24	<i>Stemphylium sp.</i>	Φύλλα	Παλαιόμυλος
25	<i>Ericocccum nigrum</i>	Άνθη	Παλαιόμυλος

5. Συμπεράσματα-Συζήτηση

Πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην διατήρηση της υγείας του φυτού-ξενιστή, προάγοντας την ανάπτυξη του φυτικού οργανισμού, συμβάλλοντας στην πρόσληψη θρεπτικών, όπως φωσφόρου, αζώτου και σιδήρου και καθιστώντας το φυτό-ξενιστή ικανό να ανταπεξέλθει σε συνθήκες βιοτικού και αβιοτικού καταπόνησης (Jia et al., 2017).

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες το φαρμακευτικό φυτό *Hypericum perforatum* αποικίζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό από μύκητες που ανήκουν στα γένη *Alternaria*, *Fusarium*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Epicoccum*, *Chaetotomium*, *Phomopsis*, *Xylaria* και *Hyrocraea* (Vigneshwari et al., 2019, Deng et al., 2017, Zhang et al., 2016). Οι συγκεκριμένοι μύκητες φαίνεται να εμπλέκονται στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, κυρίως στη σύνθεση υπερίκινης, που αποτελεί την βασικότερη βιοενεργή ουσία του *Hypericum perforatum* (Vigneshwari et al., 2019).

Στην παρούσα μελέτη η πλειοψηφία των ενδοφυτικών μυκήτων που απομονώθηκαν από τη ρίζα του φυτού ανήκει στα γένη *Fusarium*, *Alternaria*, *Mucor* και *Diploceras*, ενώ σε μικρότερο ποσοστό χαρακτηρίστηκαν τα γένη *Macrophomina*, *Ceratobasidium* και *Hymicola*. Στα φύλλα εντοπίστηκε ο μύκητας *Stemphlium sp.*, ενώ από τα άνθη απομονώθηκαν οι μύκητες *Phomopsis sp.* και *Epicoccum nigrum*.

Όσον αφορά το γένος *Alternaria* υπάρχουν περίπου 300 γνωστά είδη *Alternaria*, τα οποία ανήκουν στην οικογένεια Pleosporaceae. Έχει ήδη αποδειχθεί ότι τα είδη *Alternaria* που σχετίζονται με τα φυτά είναι σε θέση να παράγουν τους

μεταβολίτες υπερικίνη και emodin. Η υπερικίνη είναι μία από τις πιο σημαντικές φαρμακευτικές πολυφαινολικές ενώσεις, καθώς έχει αποδειχθεί ότι έχει αντικαταθλιπτικές, αντικαρκινικές και αντικές ιδιότητες. Το emodin είναι ένα, επίσης, γνωστό ενεργό συστατικό των φαρμακευτικών βοτάνων (Vigneshwari et al., 2019). Εκτός από την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, το γένος *Altenaria* φαίνεται να συμβάλλει και στην ενίσχυση της άμυνας του φυτού, δρώντας ως παράγοντας βιολογικού ελέγχου έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων και βακτηρίων (Zhou et al., 2017).

Παρόμοια δράση με τους μύκητες του γένους *Altenaria* φαίνεται να έχει και ο μύκητας *Epicoccum nigrum* που απομονώθηκε από τα άνθη του φυτού. Ο συγκεκριμένος μύκητας αποτελεί μέλος της οικογένειας *Didymellaceae* και κύριος ρόλος του είναι η παραγωγή χρωστικών ουσιών έναντι άλλων παθογόνων μυκήτων (Vigneshwari et al., 2019).

Εκτός από τους μύκητες του γένους *Altenaria*, σε μεγάλο ποσοστό εντοπίστηκαν στη ρίζα και μύκητες του γένους *Mucor*. Οι συγκεκριμένοι μύκητες ανήκουν στην οικογένεια *Mucoraceae* και έχει βρεθεί ότι στο φαρμακευτικό φυτό *Salvia Miltiorrhiza* αποικίζουν τη ρίζα του φυτού και προάγουν την βιοσύνθεση τανσινόνης και την παραγωγή αυξητικής ορμόνης και σιδηροφόρων (Chen H et al., 2021).

Ένα ακόμη γένος μυκήτων που ταυτοποιήθηκε αποτελεί το γένος *Fusarium*, το οποίο ανήκει στην οικογένεια *Nectriaceae*. Οι συγκεκριμένοι μύκητες κατοικούν στο έδαφος για μεγάλο χρονικό διάστημα και διεισδύουν στις ρίζες με τη μορφή χλαμυδοσπορίων. Μελέτες έδειξαν ότι το είδος *Fussarium oxysporium* είναι παθογόνο για φυτά του γένους *Hypericum*, καθώς παράγει τοξίνες, που προκαλούν κιτρίνισμα, μαρασμό και θάνατο στα φυτά-ξενιστές (Fraternale D et al., 2006).

Επίσης, από τη ρίζα του *H. perforatum* απομονώθηκε και ο μύκητας *Diploceras hypericinum*. Μελέτες έδειξαν ότι ο μύκητας αυτό προκαλεί συμπτώματα παθογένειας στα φύλλα και στους βλαστούς του φυτού (Putnam ML. et al., 2000).

Άλλοι μύκητες που εντοπίστηκαν στο φυτό αποτελούν ο *Macrophomina phaseolina* και ο *Ceratobasidium sp.* που απομονώθηκαν από τη ρίζα του φυτού, ο μύκητας *Phomopsis sp.* που απομονώθηκε από τα άνθη του φυτού, καθώς και ο μύκητας *Stemphylium sp.* που εντοπίστηκε στα φύλλα του *H. perforatum*. Οι παραπάνω μύκητες είναι γνωστό ότι είναι παθογόνοι και προκαλούν ασθένειες σε διάφορα μέρη του φυτού (Junaid, M. et al., 2021).

Τέλος, από τα άνθη απομονώθηκε ο μύκητας *Humicola sp.*, ο οποίος σύμφωνα με μελέτες συμβάλλει στην ανάπτυξη της φυτικής βιομάζας (Mahmoud RS et al., 2013).

Όσον αφορά τους οικοτόπους του φυτού, παρατηρούμε πως μύκητες του γένους *Alternaria* αναπτύσσεται και στις τρεις περιοχές (Άμμος, Παλαιόμυλος, Ασμάκι). Επίσης, παρατηρούμε πως μύκητες του γένους *Mucor* αναπτύσσεται σε δύο από τις περιοχές αυτές (Ασμάκι, Παλαιόμυλος). Το ίδιο φαίνεται να συμβαίνει και στη περίπτωση του μύκητα *Diploceras hypericinum*. Επομένως, μπορούμε να εξάγουμε το συμπέρασμα ότι ο αποικισμός των συγκεκριμένων μυκήτων στο φυτό *H. perforatum* είναι ανεξάρτητος του οικοτόπου, στον οποίο αναπτύσσεται το φυτό.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ahmed E, Holmström SJ. Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microb Biotechnol*. 2014 May;7(3):196-208. doi: 10.1111/1751-7915.12117.

Andreolli M, Lampis S, Zapparoli G, Angelini E, Vallini G. Diversity of bacterial endophytes in 3 and 15 year-old grapevines of *Vitis vinifera* cv. Corvina and their potential for plant growth promotion and phytopathogen control. *Microbiol Res*. 2016 Feb;183:42-52. doi: 10.1016/j.micres.2015.11.009.

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

Brader, G., Compant, S., Vescio, K., Mitter, B., Trognitz, F., Ma, L. -, & Sessitsch, A. (2017). Ecology and genomic insights into plant-pathogenic and plant-nonpathogenic endophytes doi:10.1146/annurev-phyto-080516-035641

Chen H, Qi Y, He X, Xu L, Zhang W, Lv X, Zhang H, Yang D, Zhu Y, Liang Z. Endophytic fungus *Mucor circinelloides* DF20 promote tanshinone biosynthesis and accumulation in *Salvia miltiorrhiza* root. *Plant Sci*. 2021 Jun;307:110898. doi: 10.1016/j.plantsci.2021.110898.

Compant, S., Van Der Heijden, M. G. A., & Sessitsch, A. (2010). Climate change effects on beneficial plant-microorganism interactions. *FEMS Microbiology Ecology*, 73(2), 197-214. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.00900.x

Danova, K., Čellárová, E., Macková, A. *et al.* *In vitro* culture of *Hypericum rumeliacum* Boiss. and production of phenolics and flavonoids. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* **46**, 422–429 (2010).

Darbinian-Sarkissian N, Darbinyan A, Otte J, Radhakrishnan S, Sawaya BE, Arzumanyan A, Chipitsyna G, Popov Y, Rappaport J, Amini S, Khalili K. p27(SJ), a novel protein in St John's Wort, that suppresses expression of HIV-1 genome. *Gene Ther.* 2006 Feb;13(4):288-95. doi: 10.1038/sj.gt.3302649.

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

Ferrara M, Mungai F, Starace F. St John's wort (*Hypericum perforatum*)-induced psychosis: a case report. *J Med Case Rep.* 2017 May 15;11(1):137. doi: 10.1186/s13256-017-1302-7.

Figueiredo, M. D. V. B., Bonifacio, A., Rodrigues, A. C., & de Araujo, F. F. (2016). Plant growth-promoting rhizobacteria: Key mechanisms of action. *Microbial-mediated induced systemic resistance in plants* (pp. 23-37) doi:10.1007/978-981-10-0388-2_3.

Fraternale D, Bertoli A, Giamperi L, et al. Antifungal Evaluation of *Hypericum Triquetrifolium* Polar Extracts against *Fusarium* spp. *Natural Product Communications.* December 2006. doi:10.1177/1934578X0600101209

Galeotti N. *Hypericum perforatum* (St John's wort) beyond depression: A therapeutic perspective for pain conditions. *J Ethnopharmacol.* 2017 Mar 22;200:136-146. doi: 10.1016/j.jep.2017.02.016.

Glick BR. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol Res.* 2014 Jan 20;169(1):30-9. doi: 10.1016/j.micres.2013.09.009.

Glick BR. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica (Cairo)*. 2012;2012:963401. doi: 10.6064/2012/963401.

Gond SK, Bergen MS, Torres MS, White JF Jr. Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. *Microbiol Res*. 2015 Mar;172:79-87. doi: 10.1016/j.micres.2014.11.004.

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 entophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 293-320. doi:10.1128/MMBR.00050-14

Hiruma, K., Gerlach, N., Sacristán, S., Nakano, R. T., Hacquard, S., Kracher, B., . . . Schulze-Lefert, P. (2016). Root endophyte *Colletotrichum tofieldiae* confers plant fitness benefits that are phosphate status dependent. *Cell*, 165(2), 464-474. doi:10.1016/j.cell.2016.02.028.

Hostanska K, Reichling J, Bommer S, Weber M, Saller R. Hyperforin a constituent of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) extract induces apoptosis by triggering activation of caspases and with hypericin synergistically exerts cytotoxicity towards human malignant cell lines. *Eur J Pharm Biopharm*. 2003 Jul;56(1):121-32. doi: 10.1016/s0939-6411(03)00046-8.

Huang T, Guo L, Zhang H, Su J, Wen G, Zhang K. Nitrogen-removal efficiency of a novel aerobic denitrifying bacterium, *Pseudomonas stutzeri* strain ZF31, isolated from a drinking-water reservoir. *Bioresour Technol*. 2015 Nov;196:209-16. doi: 10.1016/j.biortech.2015.07.059.

Jia M, Chen L, Xin HL, Zheng CJ, Rahman K, Han T, Qin LP. A Friendly Relationship between Endophytic Fungi and Medicinal Plants: A Systematic Review. *Front Microbiol.* 2016 Jun 9;7:906. doi: 10.3389/fmicb.2016.00906.

Junaid, M., Purwantara, A., & Guest, D. (2021). Fungal basidiomycete *ceratobasidium theobromae* DNA obtained directly from cocoa petioles. *Biodiversitas*, 22(7), 2838-2843. doi:10.13057/biodiv/d220734

Kavroulakis N, Ntougias S, Zervakis GI, Ehaliotis C, Haralampidis K, Papadopoulou KK. Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. *J Exp Bot.* 2007;58(14):3853-64. doi: 10.1093/jxb/erm230.

Klemow KM, Bartlow A, Crawford J, Kocher N, Shah J, Ritsick M. Medical Attributes of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). In: Benzie IFF, Wachtel-Galor S, editors. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. 2nd ed. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2011. Chapter 11.

Kusari S, Lamshöft M, Zühlke S, Spiteller M. An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. *J Nat Prod.* 2008 Feb;71(2):159-62. doi: 10.1021/np070669k.

Lebeis SL. The potential for give and take in plant-microbiome relationships. *Front Plant Sci.* 2014 Jun 20;5:287. doi: 10.3389/fpls.2014.00287.

Matsumoto A, Takahashi Y. Endophytic actinomycetes: promising source of novel bioactive compounds. *J Antibiot (Tokyo)*. 2017 May;70(5):514-519. doi: 10.1038/ja.2017.20.

Mahmoud RS, Narisawa K (2013) A New Fungal Endophyte, *Scolecobasidium humicola*, Promotes Tomato Growth under Organic Nitrogen Conditions. *PLOS ONE* 8(11): e78746.

Ng QX, Venkatanarayanan N, Ho CY. Clinical use of *Hypericum perforatum* (St John's wort) in depression: A meta-analysis. *J Affect Disord.* 2017 Mar 1;210:211-221. doi: 10.1016/j.jad.2016.12.048.

Pérez-Montaña F, Alías-Villegas C, Bellogín RA, del Cerro P, Espuny MR, Jiménez-Guerrero I, López-Baena FJ, Ollero FJ, Cubo T. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiol Res.* 2014 May-Jun;169(5-6):325-36. doi: 10.1016/j.micres.2013.09.011. Epub 2013 Sep 27. PMID: 24144612.

Pham VT, Rediers H, Ghequire MG, Nguyen HH, De Mot R, Vanderleyden J, Spaepen S. The plant growth-promoting effect of the nitrogen-fixing endophyte *Pseudomonas stutzeri* A15. *Arch Microbiol.* 2017 Apr;199(3):513-517. doi: 10.1007/s00203-016-1332-3.

Putnam ML. First Report of Leaf Blight and Stem Dieback of St. John's-Wort Caused by *Diploceras hypericinum* in Oregon. *Plant Dis.* 2000 Nov;84(11):1250. doi: 10.1094/PDIS.2000.84.11.1250B.

Reichling J, Weseler A, Saller R. A current review of the antimicrobial activity of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry.* 2001 Jul;34 Suppl 1:S116-8. doi: 10.1055/s-2001-15514.

Santoro, M. V., Bogino, P. C., Nocelli, N., Del Rosario Cappellari, L., Giordano, W. F., & Banchio, E. (2016). Analysis of plant growth-promoting effects of fluorescent *pseudomonas* strains isolated from *mentha piperita* rhizosphere and effects of their volatile organic compounds on essential oil composition. *Frontiers in Microbiology*, 7(JUL) doi:10.3389/fmicb.2016.01085

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

Schulz, B., & Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological Research*, 109(6), 661-686. doi:10.1017/S095375620500273X

Scherling C, Ulrich K, Ewald D, Weckwerth W. A metabolic signature of the beneficial interaction of the endophyte *paenibacillus* sp. isolate and in vitro-grown poplar plants revealed by metabolomics. *Mol Plant Microbe Interact*. 2009 Aug;22(8):1032-7. doi: 10.1094/MPMI-22-8-1032.

Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H. et al. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus* 2, 587 (2013). <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>

Shi MJ, Hu JW, Wang JJ, Zhen B, Wang X, Ji TF. [Chemical constituents of *Hypericum perforatum*]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2018 Jul;43(13):2726-2731. Chinese. doi: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20180316.001.

Silva-Bailão MG, Bailão EF, Lechner BE, Gauthier GM, Lindner H, Bailão AM, Haas H, de Almeida Soares CM. Hydroxamate production as a high affinity iron acquisition mechanism in *Paracoccidioides* spp. *PLoS One*. 2014 Aug 26;9(8):e105805. doi: 10.1371/journal.pone.0105805.

Sørensen, J., & Sessitsch, A. (2006). Plant-associated bacterial-lifestyle and molecular interactions. *Modern soil microbiology, second edition* (pp. 211-236)

Stone, J.K., Bacon, C.W. and White, J.F. (2000) An Overview of Endophytic Microbes: Endophytism Defined. In: Bacon, C.W. and White, J.F., Eds., *Microbial Endophytes*, Marcel Dekker, New York, 3-29.

Tian J, Fu L, Zhang Z, Dong X, Xu D, Mao Z, Liu Y, Lai D, Zhou L. Dibenzo- α -pyrones from the endophytic fungus *Alternaria* sp. Samif01: isolation, structure elucidation, and their antibacterial and antioxidant activities. *Nat Prod Res.* 2017 Feb;31(4):387-396. doi: 10.1080/14786419.2016.1205052.

Timmusk S, Abd El-Daim IA, Copolovici L, Tanilas T, Kännaste A, et al. (2014) Drought-Tolerance of Wheat Improved by Rhizosphere Bacteria from Harsh Environments: Enhanced Biomass Production and Reduced Emissions of Stress Volatiles. *PLOS ONE* 9(5): e96086.

Trommer H, Neubert RH. Screening for new antioxidative compounds for topical administration using skin lipid model systems. *J Pharm Pharm Sci.* 2005 Sep 15;8(3):494-506.

Turner TR, James EK, Poole PS. The plant microbiome. *Genome Biol.* 2013 Jun 25;14(6):209. doi: 10.1186/gb-2013-14-6-209.

Udvardi MK, Day DA. Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1997 Jun;48:493-523. doi: 10.1146/annurev.arplant.48.1.493.

Velingkar, Vinay & Gupta, Girdharilal & Hegde, Namita. (2017). A current update on phytochemistry, pharmacology and herb–drug interactions of *Hypericum perforatum*. *Phytochemistry Reviews.* 16. 10.1007/s11101-017-9503-7.

Vigneshwari, A., Rakk, D., Németh, A., Kocsubé, S., Kiss, N., Csupor, D., . . . Szekeres, A. (2019). Host metabolite producing

endophytic fungi isolated from hypericum perforatum. *PLoS ONE*, 14(5) doi:10.1371/journal.pone.0217060

Wirz, A.. “"In vitro" study of the mode of action of antidepressants in cell culture models : comparison of the effects of "Hypericum perforatum L." extracts and classical synthetic compounds on the [beta]-adrenergic signal pathway.” (2005).

Zhang, Qinghua & Zhang, Jing & Yang, Long & Zhang, Lei & Jiang, Daohong & Chen, Weidong & Li, Guoqing. (2014). Diversity and biocontrol potential of endophytic fungi in *Brassica napus*. *Biological Control*. 72. 10.1016/j.biocontrol.2014.02.018.