



Πανεπιστήμιο Κρήτης
Σχολή Θετικών Επιστημών
Τμήμα Βιολογίας

Μεταπτυχιακή διατριβή

Αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης φυσικών εκχυλισμάτων και των συστατικών τους ενάντια σε βακτηριακές και μυκητολογικές ασθένειες.

Evaluation of natural extracts and their ingredients against fungal oomycete and bacterial diseases

Εκπόνηση : Χαράλαμπος Ουσταμανωλάκης

Τριμελής επιτροπή :

Δρ. Νικόλαος Πανόπουλος,

Δρ. Νικόλαος Σκανδάλης

Δρ. Κυριάκος Κοτζαμπάσης

Ηράκλειο Ιούνιος 2010

Περιεχόμενα

<i>Ευχαριστίες</i>	4
<i>Περίληψη</i>	6
<i>Abstract</i>	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1. Γενικά	8
1.2. Φυτικά εκχυλίσματα	9
1.2.1. Ελευρωπαίνη	12
1.2.2. Ρεσβερατρόλη	15
1.2.3. Κατσίγαρος	17
1.3. Φυτικό υλικό	19
1.4. Παθογόνα βακτήρια	21
1.4.2. Παθογόνοι μύκητες	23
1.5. Σκοπός της διατριβής	27
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	28
2.1.Καλλιέργεια παθογόνων	28
2.1.1.Καλλιέργεια βακτηρίων	28
2.1.2. Μύκητες	29
2.2.Ακτινοειδής ανάπτυξη μυκήτων	31
2.3. Εκβλάστηση σπορίων μυκήτων	31
2.4.Χειρισμοί εκχυλισμάτων σε φυτά	32
2.5. Τεχνητή μόλυνση φυτών με βακτήρια	34
2.5.1. Πληθυσμιακή ανάλυση	36
2.6.Φυματίωση της ελιάς	37
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	39
3.1. Ακτινοειδής ανάπτυξη παρουσία φυτικών εκχυλισμάτων	39

<i>3.2.Ακτινοειδής ανάπτυξη</i>	42
<i>3.3.Εκβλάστηση σπορίων σε αυξανόμενη συγκέντρωση φυτικών εκχυλισμάτων</i>	44
<i>3.4.Φυτοπροστασία στην ελιά</i>	45
<i>3.5.Φυτοπροστασία σε τομάτα</i>	47
<i>3.6.Φυτοπροστασία σε πιπεριά</i>	51
<i>3.7.Πληθυσμιακή ανάλυση</i>	56
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	58
<i>Βιβλιογραφία</i>	61

*Σήμερα θα μιλήσουμε για Ελευρωπαϊνή,
που η πικρίλα της ελιάς οφείλεται σε κείνη.
Επίσης αναφέρουμε για την Ρεσβερατρόλη
αυτήν που υπάρχει στο κρασί, ας πιούμε λοιπόν όλοι.
Τέλος για τον κατσίγαρο απ' τα ελαιουργεία,
ίσως και να του βρήκαμε καινούρια λειτουργία.*

Ευχαριστίες

Η διατριβή ολοκληρώθηκε τελείωσε αισίως,
όλους σας, σας ευχαριστώ μα ευχαριστώ κυρίως,

τον κύριο Πανόπουλο που είναι ο αφέντης
της έρευνας και του κεφιού και του χορού λεβέντης,
αβίαστα αφιέρωσε πολύτιμο του χρόνο,
γιατί όπως είναι λογικό δεν έχει εμένα μόνο,

και τον Νικόλα τον ψηλό που λέγετε Σκανδάλης
κι είν' άξιος ερευνητής και όχι απλός χαμάλης,
της διατριβής μου οδηγός, χωρίς αδιαλλαξία,
είπε πως πρέπει να κοιτά κανείς πέρα απ' τα βιβλία,

τον τρίτο τον καθηγητή Κυριάκο Κοτζαμπάση
που μελετά πως το φυτό ενέργεια θα φτιάσει
εκεί όπου απέκτησα την τόση εμπειρία
για πρώτη-πρώτη μου φορά εις την βιολογία

τον Χρήστο γιατί νοιάζεται τον κάθε διπλανό του
ακόμα και αν ο διπλανός ... δεν θέλει το καλό του
επίπεδο μου έδειξε στη έννοια φιλία
και ήταν πάντοτε εκεί, ποτέ δεν είχε αργία

τον Μακρογκίκα Στυλιανό φίλο και βιολόγο
τον διαβασμένο, αληθινό με καθαρό τον λόγο,
μου 'πε πως κάποια πράγματα, τα βλέπω ίσως λάθος,
δικέ μου, και αν αντέδρασα τα είπες από βάθος,

την πρόεδρο των φοιτητών Χαρόβα Σπυριδούλα
που ότι και αν την ρώταγες εκάτεχε απ' ούλα
πειράματα και εφαρμογές, παρέα, μουσικούλα
τώρα θα νιώθω δυνατός θα διώχνω τον Μπαμπούλα

τον Issa από το Λίβανο μαζί με τον Mohamed
με γνώσεις για πολιτισμό λες και είναι PubMed
τον Κώστα από τον όροφο, τον πιο μελετημένο
το πείραμα χωρίς αυτόν δεν θα 'ταν τελειωμένο

την Αντιγόνη, Αρετή, Μαρία, και Μιρέλλα,
τον Πάνο και Καράκωστη και όσους μου είπαν έλα,
την οικογένεια ευχαριστώ, χρωστάω ευγνωμοσύνη,
δεν ξέρω που θα ήμουνα, χωρίς να είναι εκείνοι.

Χαράλαμπος Ουσταμανωλάκης

Περίληψη

Πολλές φυτικές ουσίες έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες και είναι φυσικά αντιοξειδωτικά. Τέτοιες ουσίες περιλαμβάνουν την ελευρωπαΐνη, την υδροξυτυροσόλη, που είναι παράγωγο της πρώτης, και την ρεσβερατρόλη. Στην παρούσα διατριβή εξετάστηκαν οι αντιμικροβιακές ιδιότητες, *in vitro* και *in planta*, της ελευρωπαΐνης, ενός εκχυλίσματος στεμφύλων, που περιείχε σημαντική ποσότητα ρεσβερατρόλης, καθώς και αραιωμένα υγρά απόβλητα ελαιουργείου (ΥΑΕ, κατσιγαρος), που είναι παραπροϊόν της παραγωγής ελαιολάδου. Όλα τα σκευάσματα είχαν την ικανότητα να αναστείλλουν την ακτινωτή ανάπτυξη του ασκομύκητα *Colletotrichum higginsianum*, καθώς και του ωόμυκητα *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, όπως και την εκβλάστηση των σπορίων των μυκήτων *Colletotrichum higginsianum* και *Botrytis cinerea*. Η αποτελεσματικότητα των εκχυλισμάτων εξετάστηκε ενάντια σε τεχνητές μολύνσεις φύλλων καπνού με *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, καθώς και φυτών τοματιάς και πιπεριάς με τα παθογόνα βακτήρια *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* και *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* αντίστοιχα, και με το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* σε δενδρύλλια ελιάς. Θετικά αποτελέσματα παρεμπόδισης της ανάπτυξης ασθένειας προέκυψαν με το αραιωμένο ΥΑΕ στις μολύνσεις σε τοματιές και με την ελευρωπαΐνη σε μολύνσεις σε πιπεριά και ελαιοδενδρύλια.

Λέξεις κλειδιά: Φυτικά εκχυλίσματα, Φυτοπροστασία, Ρεσβερατρόλη, Υγρά Απόβλητα Ελαιουργείων (ΥΑΕ, Κατσιγαρος), Ελευρωπαΐνη, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Phytophthora parasitica*, *Botrytis cinerea*

Abstract

A plethora of vegetable compounds have antimicrobial activity and are natural antioxidants. Such compounds include oleuropein, its derivative hydroxytyrosol and resveratrol. In this project oleuropein, a grape pomace extract rich in resveratrol, as well as diluted olive mill waste water (OMWW), (by-product of olive oil extraction) were examined for their *in vitro* and *in planta* antimicrobial activity. All the extracts restrained radial growth of the fungus *Colletotrichum higginsianum*, as well as the oomycete *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, and restrained conidial germination of *Colletotrichum higginsianum* and *Botrytis cinerea*. The activity against artificially inoculated detached tobacco leaves with *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, as well as tomato and pepper plants, inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, and pepper plants inoculated with *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, which were treated with olive mill waste water and oleuropein extract, respectively, was verified. Oleuropein was also evaluated for its efficacy against artificial infection of young olive trees with *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.

Keywords; Natural extracts, Crop protection, Resveratrol, Oleuropein, Olive Mill Waste Water (OMWW), *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, *Phytophthora parasitica*, *Botrytis cinerea*.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Γενικά

Φυτά, βότανα και μπαχαρικά έχουν χρησιμοποιηθεί στην παραδοσιακή ιατρική, στην συντήρηση τροφίμων, στην παρασκευή αρωμάτων και σε πολλές άλλες εφαρμογές από την αρχαιότητα εξαιτίας των αντιμικροβιακών τους ιδιοτήτων. Η ανάπτυξη της συνθετικής χημείας κατά την διάρκεια του 20ού αιώνα εκτόπισε αυτά τα φυσικά σκευάσματα από τις χρήσεις τους στην κοινωνία. Στις μέρες μας υπάρχει μεγάλη ανησυχία για τις συνθετικές χημικές ουσίες, μαζί με ένα ανανεωμένο ενδιαφέρον για τα φυσικά αντιμικροβιακά.(1,6,19).

Αυτό οδήγησε σε μια αναζωπύρωση στην χρήση φυτικών φαρμάκων διεθνώς. Υπολογίζεται ότι το ένα τρίτο των ενηλίκων στον Δυτικό κόσμο χρησιμοποιούν εναλλακτικές θεραπείες, συμπεριλαμβανόμενων και αυτών που βασίζονται σε βότανα. Σε αντίθεση με τα συνθετικά χημικά φάρμακα, τα βότανα μερικές, τουλάχιστον, φορές έχουν αξιωθεί ως μη τοξικά, εξαιτίας της φυσικής τους προέλευσης και της μακροχρόνιας χρήσης τους ως παραδοσιακά φάρμακα. Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες φυτικής προέλευσης μορίων και η δυνατότητα εμπορικής τους αξιοποίησης έχουν συζητηθεί από τους Wilkins και Board (42).

Οι έρευνες αυτές έχουν επικυρώσει τις αντιμικροβιακές ιδιότητες των ουσιών αυτών για χρήση τους έναντι μικροβίων υγειονομικής σημασίας που σχετίζονται άμεσα με την διεθνή δημόσια υγεία. Πολύ λιγότερες, συγκριτικά, είναι οι έρευνες σχετικά με τη αντιμικροβιακή δράση των ουσιών αυτών έναντι βακτηρίων ή μυκήτων που προσβάλουν φυτά γεωργικού ενδιαφέροντος.

1.2. Φυτικά εκχυλίσματα

Πάρα πολλές ουσίες προερχόμενες από φυσικά εκχυλίσματα ή είναι προϊόντα μικροβιακής ζύμωσης έχουν μελετηθεί και κάποια από αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί και στην φυτοπροστασία. Γενικά, ουσίες φυσικής προέλευσης μπορεί να προέρχονται από βακτήρια, μύκητες, φυτά ή ζώα. Η χρήσεις τους ποικίλουν από εντομοκτόνα, ακαρεοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, βακτηριοκτόνα μυκητοκτόνα ή άλλων χρήσεων φυτοπροστατευτικά.

Πολλά φυτικά εκχυλίσματα έχουν μελετηθεί για την δράση τους ενάντια σε παθογόνα βακτήρια και παθογόνους μύκητες. Τα φυτά αυτοπροστατεύονται από μικροβιακές προσβολές μέσω της βιοσύνθεσης αντιμικροβιακών ουσιών, που είτε προϋπάρχουν στους ιστούς/όργανά τους είτε βιοσυντίθενται μετά από την προσβολή από τα παθογόνα (φυτοαλεξίνες). Οι ουσίες αυτές δεν έχουν γίνει αντικείμενο εμπορικής εκμετάλλευσης σε καθαρή μορφή, αλλά τα φυτικά εκχυλίσματα έχουν χρησιμοποιηθεί έμμεσα για την προστασία φυτών από παθογόνα μέσω της επαγωγής της επίκτητης συστηματικής ανθεκτικότητας (Systemic Acquired Resistance, SAR), που συνοδεύεται και από την επαγωγή τη βιοσύνθεσης φυτοαλεξινών. Επαγωγείς της SAR προσφέρουν σημαντικό βαθμό φυτοπροστασίας στις κατάλληλες συνθήκες. Καθότι η δράση τους έναντι του παθογόνου είναι έμμεση, το παθογόνο δεν μπορεί να αναπτύξει αντίσταση άμεσα στην επαγωγό ουσία, κάνοντας τα προϊόντα αυτά ιδανικούς υποψήφιους για την ολοκληρωμένη διαχείριση ασθενειών σε φυτικές καλλιέργειες. Οι επαγωγείς της SAR, σε γενικές γραμμές, δεν είναι τόσο αποτελεσματικοί όσο τα συνθετικά χημικά μυκητοκτόνα εξαιτίας της δυσκολίας επιλογής της κατάλληλης χρονικής στιγμής για την εφαρμογή του επαγωγού ενάντια στο παθογόνο, που είναι καιρία, αλλά δύσκολο να μεγιστοποιηθεί. (19).

Παραδείγματα φυτικών εκχυλισμάτων με αντιβακτηριακές και αντιμυκητολογικές ιδιότητες που έχουν αξιοποιηθεί εμπορικά αναφέρονται

αμέσως παρακάτω. Αξιοσημείωτο είναι πως όλες έχουν πολύ μικρή ή μηδαμινή τοξικότητα σε θηλαστικά (16).

Η ουσία Cinnamaldehyde είναι βασικό συστατικό στο έλαιο που υπάρχει στο φυτό *Cassia tora* L. (ή *Cassia obtusifolia* L.), αλλά συνήθως συντίθεται βιομηχανικά για χρήση στην φυτοπροστασία. Χρησιμοποιείται σε μανιτάρια, φυτά μεγάλης καλλιέργειας, χορτοδοτικές καλλιέργειες, και πευκοδάση για την καταπολέμηση ασθενειών που προκαλούνται από τους μύκητες *Verticillium fungicola* (Preuss) Hassebrauk, *Sclerotinia homeocarpa* Bennett, *Fusarium moniliforme* var *subglutinans* Wollenw. & Reinking, όπως και άλλα είδη του γένους *Verticillium*, της *Rhizoctonia* και του *Pythium*. Χρησιμοποιείται ως ελκυστικό για το κολεόπτερο σκουλήκι εδάφους *Diabrotica* spp. και σαν απωθητικό για γάτες και σκύλους. (16)

Ο συνδιασμός του L-γλουταμικού οξέως και του γ-αμινοβουτυρικού οξέως, με το εμπορικό όνομα AuxiGro, χρησιμοποιείται ως μυκητοκτόνο και ως ρυθμιστής αύξησης. Τα δύο ενεργά συστατικά υπάρχουν σχεδόν σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς και στην καθαρή τους μορφή, είναι σκόνες. Το σκεύασμα χρησιμοποιείται σε συγκεκριμένα φρούτα, λαχανικά, οπωροφόρα, σιτηρά, ζωοτροφές, γρασιδία, χλοοτάπητες και καλλωπιστικά σαν προαγωγός αύξησης ο οποίος αυξάνει την παραγωγή καθώς αποτρέπει την ανάπτυξη ωιδίου σε σταφύλια και καταστέλλει κάποιες συγκεκριμένες ασθένειες άλλων καλλιεργειών. Το σκεύασμα αυτό έχει πάρει έγκριση για όλες σχεδόν τις καλλιέργειες από την USEPA (Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος των Ηνωμένων Πολιτειών τη Αμερικής). Το ένα συστατικό, το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA), υπάρχει σε βακτήρια, φυτά και όλα τα ζώα συμπεριλαμβανόμενου και του ανθρώπου. Το άλλο συστατικό, L-γλουταμικό οξύ, άμεσος πρόδρομος του GABA, είναι ένα από τα βασικά αμινοξέα σε πρωτεΐνες όλων των οργανισμών και υπεισέρχεται σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες. Και τα δύο συστατικά είναι ενεργά σαν νευροδιαβιβαστές του εγκεφάλου στα θηλαστικά. Αυτά τα φυσικής προέλευσης προϊόντα δεν είναι ούτε λιπάσματα, ούτε φυτοφάρμακα, ούτε συμβατικοί ρυθμιστές αύξησης, αλλά αποτελούν μια νέα κατηγορία για την οποία έχει δοθεί ο όρος «εκκινητές

φυτικού μεταβολισμού» (plant metabolic primer) για να περιγράψει καλύτερα την βιολογική τους λειτουργία (16).

Το έλαιο του φυτού Jojoba, *Simmondsia californica*, αποτελείται από ευθείους εστέρες, μήκους 36-46 ατόμων άνθρακα, καθένας από τους οποίους, αποτελείται από ένα λιπαρό οξύ και μια λιπαρή αλκοόλη συνδεδεμένα σε αυτόν. Έχει αποδειχτεί αποτελεσματικό ενάντια στον αλευρώδη (whitefly), και είναι κατοχυρωμένο στην Αμερική το 1994. Το 1998 δείχνεται να καταπολεμά το ωίδιο σε μια σειρά φυτών (16).

Η λαμιναρίνη (Laminarine) είναι πολυσακχαρίτης του καφέ θαλάσσιου άλγους *Laminaria digitata*, και είναι ένα υδρόφιλο γλυκάνιο. Αυτό πρωτοχρησιμοποιήθηκε, μετά από την παρατήρηση ότι, όταν οι καλλιεργητές στην βόρεια Γαλλία άπλωναν φύκια στα χωράφια είχαν πιο εύρωστες καλλιέργειες με και σπανιότερες περιπτώσεις μυκητολογικών προσβολών. Αυτή το σκεύασμα προτείνεται για χρήση ενάντια σε παθογόνους μύκητες δημητριακών ιδιαίτερα της σεπτώριας και του ωιδίου. Η ουσία δεν δρα από μόνη της ενάντια στους μύκητες, αλλά διεγείρει την φυσική άμυνα των φυτών, κάνοντας τα λιγότερο ευπαθή στις μυκητολογικές προσβολές, επάγωντας την συστηματική επίκτητη αντίσταση (SAR). Προτείνεται για δημητριακά και ιδιαίτερα για σιτάρι. Εφαρμόζεται με ψεκασμό, ή μέσω εδάφους και δεν είναι αναγκαίο ο ψεκασμός να καλύψει το φυτό, πρέπει όμως η εφαρμογή να γίνει πριν οι φυλλικές ασθένειες αναπτυχθούν (16).

Το Milsana είναι ένα εξευγενισμένο εκχύλισμα από το φυτό *Reynoutria sachalinensis*. Το εκχύλισμα χρησιμοποιείται ενάντια σε ένα μεγάλο εύρος παθογόνων μυκήτων, συμπεριλαμβανομένων του *Botrytis* spp. και του ωιδίου σε καλλωπιστικές και θερμοκηπιακές καλλιέργειες, σε λαχανικά και φρούτα. Αποτελεσματικότητα ενάντια σε μερικά βακτήρια όπως μέλη του γένους *Xanthomonas*, έχει επίσης δειχτεί και υπάρχουν ενδείξεις, λόγω της υψηλής του περιεκτικότητας σε φαινολικά συστατικά, για τη χρήση του ενάντια σε φυτοφάγα έντομα. Το εκχύλισμα εφαρμόζεται κατά την εκδήλωση της ασθένειας, αποτρέποντας την ανάπτυξη της, προκαλώντας την ενίσχυση της φυσικής άμυνας του φυτού. Όταν εφαρμόζεται σε καλλωπιστικά, λαχανικά ή

οπωροφόρα προκαλεί την αύξηση των ενδογενών φαινολικών στα φυτά. Αυτά δρουν ως φυτοαλεξίνες και έχει αποδειχτεί ότι σταματούν την ανάπτυξη αρκετών, εμπορικά σημαντικών, ασθενειών, όπως το ωίδιο και την γκριζα μούχλα σε καλλωπιστικά όπως τα τριανταφυλλα, και σε λαχανοκομικά όπως αγγούρια, πιπεριές και σταφύλια (16).

Το εκχύλισμα από την μεγάλη ροζ παπαρούνα, *Macleaya cordata*, έχει καταχωρωθεί ως μυκητοκτόνο. Το εκχύλισμα αυτό περιλαμβάνει αρκετά αλκαλοϊδή αλλά κυρίως sanguinarine chloride και chelerythrine chloride. Τα παθογόνα στόχοι είναι αυτά που προκαλούν μυκητολογικές ασθένειες φυλλώματος, όπως το ωίδιο, η αλτερνάρια και η σεπτώρια σε καλλωπιστικά (16).

1.2.1. Ελευρωπαΐνη

Η ελαιοευρωπεΐνη (oleuropein, άλλες ελληνικές αποδόσεις: ελευρωπαΐνη, ελαιοευρωπαΐνη, ολευρωπαΐνη, ολευρωπεΐνη) είναι ένας σεκοϊριδοειδής γλυκοζίτης (secoiridoid glucoside) χαρακτηριστικός των Ολεασών (φυτών της οικογένειας Oleaceae) και αποτελεί το κύριο πολυφαινολικό συστατικό της ελιάς (*Olea europaea*), από την οποία και ονομάστηκε.

Η ελαιοευρωπεΐνη ως ξεχωριστή ουσία ανακαλύφθηκε το 1908 από τους Bourquelot και Vintilesco στο ελαιόλαδο, οι οποίοι και της έδωσαν το χαρακτηριστικό της όνομα. Πολύ αργότερα, το 1960, οι Panizzi, Scarpati και Oriente υπέδειξαν ότι το μόριο της ουσίας αυτής περιέχει γλυκόζη, β-3,4-διυδροξυ-φαινυλαιθανόλη (υδροξυτυροσόλη) και ένα οξύ το οποίο είναι γνωστό ως ελενολικό οξύ (elenolic acid). Το οξύ αυτό ήταν ήδη γνωστό (παρασκευαζόταν με υδρόλυση εκχυλίσματος των ελαιοκάρπων με φωσφορικό οξύ) και είχε προταθεί από το 1962 ως φάρμακο κατά της υπέρτασης (11, 17, 34).

Η ελαιοευρωπεΐνη βρίσκεται στα φύλλα της ελιάς και στον ελαιοκάρπο. Η περιεκτικότητα σε ελαιοευρωπεΐνη είναι μεγαλύτερη στους ανώριμους

ελαιόκαρπους και στην ουσία αυτή οφείλεται κυρίως η έντονα πικρή γεύση τους. Το 1973, οι Walter, Fleming και Etchells σε μια μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των ενώσεων που προκύπτουν με υδρόλυση της ελαιοευρωπεΐνης, επιβεβαίωσαν τον χημικό τύπο της. Στην ίδια εργασία περιγράφουν μια μέθοδο απομόνωσής της από τις ελιές. Χρησιμοποίησαν την τεχνική της εκχύλισης κατ' αντιστροφή (counter-current extraction) και απομόνωσαν 7,2 g σχεδόν καθαρής ουσίας από 500 g καρπών μιας ποικιλίας ελιάς (18).

Τα τελευταία χρόνια, η ελαιοευρωπεΐνη και ορισμένες άλλες πολυφαινόλες όπως και διάφορα παράγωγά τους έχουν μελετηθεί ως προς την φαρμακολογική τους δράση, ιδιαίτερα την αντιοξειδωτική, βακτηριοκτόνο και βακτηριοστατική δράση, καθώς και τη μείωση της "συγκόλλησης" των αιμοπεταλίων (blood platelet aggregation) (23).

Η ελευρωπαΐνη και τα επιμέρους συστατικά της (βλ. εικ.1) παίζουν σημαντικό ρόλο στα φυτά, γιατί με την προστατευτική τους δράση (κυρίως αντιοξειδωτική, αλλά και πιθανώς λόγω της πικρής γεύσης) υπερασπίζονται με διάφορους μηχανισμούς τις ελιές από παθογόνους μύκητες και από τα κεντρίσματα εντόμων (23).

Κατά την κατεργασία του ελαιολάδου μέρος της ελαιοευρωπεΐνης υδρολύεται και έτσι παράγονται αρκετές ενώσεις που προσδίδουν στο ελαιολάδο τις εκλεκτές οργανοληπτικές του ιδιότητες. Επίσης, οι πολυφαινόλες και ο ακόρεστος υδρογονάνθρακας σκουαλένιο παίζουν σημαντικό ρόλο στον περιορισμό της οξειδωσης των λιπαρών οξέων του ελαιολάδου (τάγγισμα) (1, 8, 13).

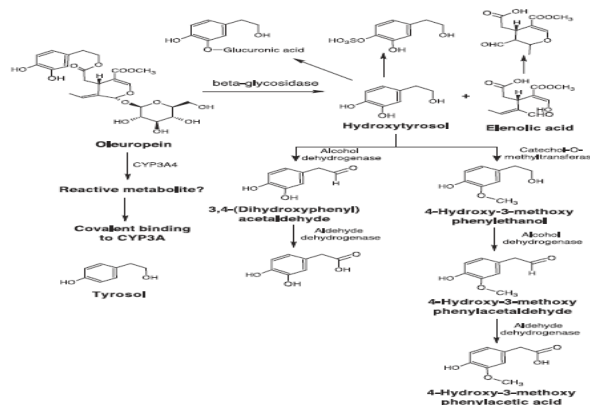
Η ελαιοευρωπεΐνη, η τυροσόλη, η υδροξυτυροσόλη και το σκουαλένιο (ένας υδρογονάνθρακας και τριτερπένιο, πρόδρομη ένωση της χοληστερόλης και άλλων στεροειδών) αποτελούν τις αντιοξειδωτικές ουσίες του ελαιολάδου και με τη συνεισφορά της α-τοκοφερόλης (βιταμίνη E) και το φυτικό λιπαρό οξύ ελαϊκό οξύ εκκαθαρίζουν τις ελεύθερες ρίζες και μειώνουν τις οξειδωτικές βλάβες και την οξειδωτική καταπόνηση των αερόβιων οργανισμών. Η

αντιοξειδωτική και βακτηριοκτόνος δράση έχει εξαιρετικά ευεργετικές στην υγεία του ανθρώπου.

Άλλα φαινορικά συστατικά του ελαιολάδου είναι τα οξέα καφεϊκό, βαννιλικό, συριγγικό και κουμαρικό. Άλλες αντιοξειδωτικές ενώσεις που υπάρχουν στο ελαιόλαδο είναι διάφορα φλαβονοειδή και οι ανθοκυανίνες.

Ανάλογα με το βιολογικό κύκλο της ελιάς και το σύστημα παραλαβής του, η περιεκτικότητα το ελαιολάδου σε πολυφαινόλες ποικίλει. Η περιεκτικότητα εξαρτάται από την ποικιλία των ελαιοδέντρων και την ωριμότητα των ελαιοκάρπων, αφού η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες στον ώριμο ελαιοκάρπο είναι σχεδόν η μισή απ' ότι στον ανώριμο. Αυτός είναι και ο λόγος που χρησιμοποιούνται κυρίως άγουρες ελιές για το καλής ποιότητας παρθένο ελαιόλαδο. Το σύστημα παραλαβής του ελαιολάδου παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην ποιότητά του. Το σύστημα πίεσης εγγυάται ελαιόλαδο με υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, ενώ το σύστημα φυγοκέντρησης της πάστας ολόκληρων καρπών ελιάς δίνει ελαιόλαδο με χαμηλότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες. Η θερμοκρασία, ο χρόνος μάλαξης και η λεπτότητα της άλεσης του ελαιοκάρπου επιδρούν σημαντικά στην ποιότητα και την περιεκτικότητα του σε πολυφαινόλες.

Τα τελευταία χρόνια πραγματοποιούνται αρκετές έρευνες ως προς τη δυνατότητα παραλαβής των παραπάνω αντιοξειδωτικών ουσιών από υδατικά απόβλητα των ελαιοτριβείων, με σκοπό να χρησιμοποιηθούν σε αντιοξειδωτικά συμπληρώματα διατροφής ή και ως φαρμακευτικές ύλες (33, 41).



Εικόνα 1 Ο μεταβολισμός της ελευρωπαΐνης (45)

1.2.2. Ρεσβερατρόλη

Σαν χημική ένωση, η ρεσβερατρόλη είναι γνωστή από την δεκαετία του 40 που απομονώθηκε για πρώτη φορά από τις ρίζες του λευκού ελλέβορου (*Veratrum album*) και αργότερα από το *Polygonum cuspidatum* ένα φαρμακευτικό φυτό (37). Σεβαστή ποσότητα επίσης υπάρχει σε μια ποικιλία εδώδιμων φρούτων, συμπεριλαμβανομένων των καρυδιών και μούρων, και στην επιδερμίδα των στεμφύλων (εξ ου και στο παραγόμενο κρασί). Η ρεσβερατρόλη επίσης υπάρχει και στα φύλλα του ευκαλύπτου και της ελάτης. Από βοτανική σκοπιά, η ρεσβερατρόλη συμπεριφέρεται σαν μια φυτοαλεξίνη, δηλαδή μια αντιμικροβιακή χημική ένωση που παράγεται από το φυτό σε απάντηση στην παρασιτική επίθεση ή κάτω από συνθήκες στρες. Έτσι προστατεύει τα φυτά από μυκητολογικές και εντομολογικές προσβολές, καθώς και επιβλαβείς οξειδώσεις (24).

Η δομή της ρεσβερατρόλης είναι αρκετά απλή. Έχει τρία υδροξύλια σε διαμετρικά αντίθετες θέσεις των δύο βενζολικών δακτυλίων. Οι δακτύλιοι βρίσκονται σε trans- δομή της αιθυλενικής ομάδας που τους ενώνει. Υπάρχει και cis-ρεσβερατρόλη αλλά δεν έχει βρεθεί σε εκχυλίσματα σταφυλιών.

Η εκχύλιση των βιοενεργών ουσιών από το *Polygonum cuspidatum* και άλλων Poligonaceae έδωσε ρεσβερατρόλη (και άλλα συγγενικά στιλβένια-stilbenes) σαν έναν αναστολέα ενζύμων που εμπεριέχεται στον αραχιδονικό μεταβολισμό στα λευκοκύτταρα (29) και μερικών κινασών σε καθαρή μορφή (27). Παρόλο που αυτές οι δύο μελέτες δεν επαλήθευσαν τις θεραπευτικές δυνατότητες από αυτές τις ανασταλτικές επιδράσεις σε ένα μοντέλο *in vivo*, έχουν καθορίσει την βάση για περαιτέρω έρευνα στην ρεσβερατρόλη. Η έρευνα για νέες χημοπροληπτικές ουσίες οδήγησαν στην απομόνωση της ρεσβερατρόλης από περισσότερα είδη φυτών (26).

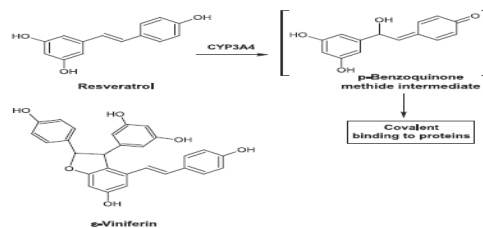
Ακόμα η ρεσβερατρόλη σε άλλη έρευνα φάνηκε να συμμετέχει στον καθορισμό της διάρκειας της ζωής, καθότι είναι ενεργοποιητής των πρωτεϊνών sirtuin (22). Σαν ενεργοποιητής των πρωτεϊνών sirtuin, η χορήγηση ρεσβερατρόλης έχει δείξει να αυξάνει την διάρκεια ζωής του ζυμομύκητα στην τάξη

του 70%, όπως επίσης και να παρατείνει την ζωή στον *Cenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* (24), κατώτερα σπονδυλωτά (40) και ποντίκια (28). Έχειδειχτεί ότι αυξημένη διατροφή, υψηλή κατανάλωση θερμίδων και η παχυσαρκία σε ποντίκια δεν είχαν αρνητικές επιπτώσεις στο μέσο όρο διάρκειας ζωής αν μαζί με την τροφή ελάμβαναν και ποσότητες ρεσβερατρόλης (10, 21)

Υποθέσεις ότι η πρόσληψη της ρεσβερατρόλης από την κατανάλωση του κόκκινου κρασιού μπορεί να κρύβεται πίσω από το αποκαλούμενο γαλλικό παράδοξο - όπου ο γαλλικός πληθυσμός, παρά την σχετικά λιπαρή του διαίτα, έχει λιγότερα περιστατικά καρδιαγγειακών ασθενειών (35) - υποστηρίζεται από το γεγονός ότι η χορήγηση ρεσβερατρόλης έχει καρδιοπροστατευτικές επιδράσεις (44).

Πειράματα με ρεσβερατρόλη σε πειραματόζωα και διάφορες κλινικές έρευνες έδειξαν ότι είναι ισχυρή αντικαρκινική ουσία, με σημαντικό ρόλο στην αναστολή διεργασιών στην πρώτη (οξειδωτικό stress, φλεγμονώδεις καταστάσεις) και δεύτερη φάση (προαγωγή της καρκινογένεσης με συσσώρευση μεταλλάξεων στο DNA), και παρεμβαίνει στην έκφραση γονιδίων (15, 31, 36, 37). Η χημειοπροστατευτική δράση της ρεσβερατρόλης είναι επίσης μία ακόμη πλευρά της πολύπλευρης δράσης της (9,26).

Παρά τα προφανή οφέλη στην υγεία και την μακροζωία, ο μοριακός στόχος/στόχοι μέσα από τα οποία δρα η ρεσβερατρόλη (βλ. εικ.2) δεν έχουν ακόμα καθοριστεί. Στην πραγματικότητα, η ρεσβερατρόλη φαίνεται να εμποδίζει μια πληθώρα ενζύμων που ανήκουν σε διαφορετικές κλάσεις, συμπεριλαμβανομένων (αλλά όχι περιορισμένων σε αυτές): κινάσες, λιπό- και κυκλοοξυγονάσες, siruīn, και άλλες πρωτεΐνες.



Εικόνα 2 Προτεινόμενη βιοενεργοποίηση της ρεσβερατρόλης (45)

1.2.3. Κατσιγάρος

Κατά την κατεργασία του ελαιοκάρπου στα ελαιουργεία, παράλληλα με το ελαιόλαδο παράγεται και μία σειρά παραπροϊόντων. Αυτά είναι ο ελαιοπυρήνας, που αποτελείται από τα αλεσμένα στερεά συστατικά του καρπού (κυρίως του κουκουτσιού), τα ελαιόφυλλα που έχουν μεταφερθεί με τον ελαιόκαρπο και μια σημαντική σε όγκο και οργανικό φορτίο ποσότητα υγρών αποβλήτων (υγρά απόβλητα ελαιουργείων, ΥΑΕ), που είναι γνωστά ως "λιοζούμι", "κατσιγάρος" ή "μούργα".

Ο κατσιγάρος συνίσταται από το υδατικό κλάσμα του χυμού του ελαιοκάρπου και από το νερό που χρησιμοποιείται στις διάφορες φάσεις παραγωγής του λαδιού στο ελαιουργείο. Ουσιαστικά πρόκειται για ένα υδατικό φυτικό εκχύλισμα, που περιέχει μία σειρά από ουσίες όπως σάκχαρα, αζωτούχες ενώσεις, οργανικά οξέα, πολυαλκοόλες, πολυφαινόλες και υπολείμματα ελαίου. Η δυσμενής επίπτωση του κατσιγαρού στο περιβάλλον είναι η αισθητική υποβάθμιση που προκαλεί και η οποία οφείλεται στην έντονη οσμή του και στο σκούρο χρώμα του. Παράλληλα, εξαιτίας του υψηλού οργανικού φορτίου που περιέχει, είναι πιθανόν να δημιουργήσει ευτροφικά φαινόμενα σε περιπτώσεις που καταλήγει σε αποδέκτες με μικρή ανακυκλοφορία νερών (κλειστούς θαλάσσιους κόλπους, λίμνες κ.τ.λ). Από τα συστατικά που περιέχονται στον κατσιγάρο, οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον διότι από τη μία πλευρά προσδίδουν στα απόβλητα τοξικές ιδιότητες έναντι των φυτών και αποδομούνται με βραδύ σχετικά ρυθμό από εξειδικευμένες ομάδες μικροοργανισμών, ενώ από την άλλη είναι υπεύθυνες για τη συντήρηση της ποιότητας του λαδιού στο χρόνο (χαμηλή οξύτητα) ως φυσικό συντηρητικό. Επειδή η παραγωγή του ελαιολάδου είναι μία φυσική διαδικασία, πρέπει να σημειωθεί ότι ο κατσιγάρος δεν περιέχει άλλες ουσίες που είναι ιδιαίτερα τοξικές, όπως π.χ. βαρέα μέταλλα και συνθετικές οργανικές ενώσεις.

Το υψηλό οργανικό φορτίο του κατσιγαρού σε συνάρτηση με την παρουσία των πολυφαινολών δεν επιτρέπει την απευθείας διάθεση του στο

περιβάλλον, αλλά καθιστά αναγκαία την πρότερη επεξεργασία του. Για την επεξεργασία και διάθεση του κατσιγαρου έχουν δοκιμαστεί διάφορες μέθοδοι σε εργαστηριακή και πραγματική κλίμακα. Παρόλα αυτά, μέχρι σήμερα δεν έχει προταθεί μία ολοκληρωμένη λύση, αλλά έχουν εφαρμοστεί διάφορες τεχνικές κατά περίπτωση που παρουσιάζουν ορισμένα μειονεκτήματα τεχνικής ή οικονομικής φύσεως και δεν έχουν επιλύσει ικανοποιητικά το πρόβλημα.

Συγκεκριμένα, έχει εφαρμοστεί η διάθεση του κατσιγαρου σε λίμνες εξάτμισης (Κρήτη), σε λάκκους (Χίος) ή στο έδαφος (Κύπρος), μέθοδοι που απαιτούν μεγάλες εκτάσεις για τη διάθεση των αποβλήτων και συχνά δημιουργούν αισθητικά προβλήματα εξαιτίας της -πολλές φορές- κακής διαστασιολόγησης και κατασκευής των συστημάτων αυτών. Έχει εφαρμοστεί η μετατροπή των ελαιουργείων από τριφασικά σε διφασικά (Ισπανία), διαδικασία που μειώνει σημαντικά τον όγκο του απαιτούμενου νερού στο ελαιουργείο και κατά συνέπεια τον όγκο των παραγόμενων υγρών αποβλήτων, αλλά μεταθέτει την αντιμετώπιση του προβλήματος σε ένα μίγμα ελαιοπυρήνα-κατσιγαρου, που είναι δύσκολο να διαχειριστεί λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε υγρασία. Παράλληλα, σε πιλοτική κλίμακα έχει δοκιμαστεί η παραγωγή υγρού εδαφοβελτιωτικού (Καλαμάτα) ή κομπόστας από τον κατσιγαρο (Κρήτη, Καλαμάτα), διαδικασία που προϋποθέτει την ύπαρξη επαρκούς αγοράς για τη διάθεση του παραγόμενου υλικού. Έχουν εφαρμοστεί η χημική οξειδωση και η αναερόβια χώνευση του κατσιγαρου (Κρήτη), τεχνικές με υψηλό λειτουργικό και κατασκευαστικό κόστος, αντίστοιχα. Έχει δοκιμαστεί επίσης, η συνεπεξεργασία του κατσιγαρου με αστικά λύματα σε τεχνητούς υγρότοπους ή σε μονάδες ενεργού ιλύος (Κρήτη), τεχνική που προαπαιτεί σημαντική αραιώση του κατσιγαρου. Τέλος, έχει δοκιμαστεί ο διαχωρισμός του κατσιγαρου σε κλάσματα με τη βοήθεια φυσικής καθίζησης (Σάμος), τεχνική που απαιτεί τον συνδυασμό της με κάποια από τις προαναφερθείσες μεθόδους για να δώσει ικανοποιητικό βαθμό καθαρισμού των αποβλήτων (25).

1.3. Φυτικό υλικό

Τα φυτά της πιπερίας (*Capsicum annuum*) είναι συνήθως ποώδη (ύψους 50-150 εκ.) και ανήκουν στην οικογένεια Solanaceae. Παράγουν καρπούς, γλυκούς ή καυτερούς, διαφόρων μεγεθών και σχημάτων, τύπου ράγας. Χρησιμοποιείται ως νωπό λαχανικό, ή μετά από επεξεργασία στην βιομηχανία, ενώ σε κάποιες χώρες χρησιμοποιείται ως φάρμακο. Είναι φυτά ευπαθή στο ψύχος και ευδοκιμούν πολύ καλά είτε την θερινή περίοδο στο ύπαιθρο είτε θερμοκήπιο για εκτός εποχής παραγωγή (3).

Για τις ανάγκες των πειραμάτων μας χρησιμοποιήθηκαν φυτά πιπεριάς, της ποικιλίας «ντολμάς» από τα φυτώρια Κρόνος, της εταιρίας Agrosystem A.E. σε αναπτυξιακό στάδιο περίπου 10-12 φύλλων.

Η τομάτα (*Lycopersicon esculentum*) είναι το δεύτερο πιο διαδομένο καλλιεργούμενο λαχανοκομικό είδος μετά την πατάτα. Ανήκει στην οικογένεια Solanaceae και ο καρπός της είναι ράγα. Καλλιεργείται τόσο στο ύπαιθρο όσο και στο θερμοκήπιο. Υπάρχουν πάρα πολλές καλλιεργούμενες ποικιλίες/υβρίδια τομάτας για νωπή κατανάλωση ή για βιομηχανική χρήση. Έχει σημαντική διατροφική αξία και λόγω της ποσότητας κατανάλωσης της αλλά και γιατί περιέχει λυκοπένιο, ένα πολύ ισχυρό φυσικό αντιοξειδωτικό. (3) Στα πλαίσια της εργασίας αυτής χρησιμοποιήθηκαν φυτά της ποικιλίας Money maker ηλικίας περίπου 1 μηνός.

Ο καπνός (*Nicotiana tabacum*) είναι ένα από τα λίγα γεωργικά φυτά, των οποίων το χρήσιμο τμήμα, είναι τα ξηραμένα φύλλα. Είναι ένα κατεξοχήν βιομηχανικό φυτό και τα ξηραμένα φύλλα του χρησιμοποιούνται με το κάπνισμα. Ο καλλιεργούμενος καπνός παρουσιάζει τεράστια ποικιλομορφία τύπων με διαφορές στο μέγεθος και τη μορφολογία των φύλλων και του στελέχους. Είναι ποώδες φυτό και καλλιεργείται ως ετήσιο είδος (4).

Στα πειράματα αυτής της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν φύλλα καπνου μεσαίας ανάπτυξης, αποκομμένα από το μέσο-και προς την κορυφή μέρος του φυτού, από φυτά ηλικίας περίπου 1 μηνός. Οι ποικιλίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι: Χανθι και μπασμάς.

Η ελιά (ελαιόδενδρο ή λιόδεντρο, Ελαιία, *Olea europaea*) είναι καρποφόρο δένδρο της οικογένειας των Ελαιοειδών (*Oleaceae*), το οποίο συναντάται πολύ συχνά και στην Ελλάδα. Ο καρπός του ονομάζεται επίσης ελιά και από αυτόν παράγεται το ελαιόλαδο. Η ελιά είναι γνωστή ως καλλιεργούμενο είδος από την Ελληνική αρχαιότητα και υπήρξε το σύμβολο της θεάς Αθηνάς.

Ο καρπός της ελιάς είναι πολύ βασικός για την Μεσογειακή διατροφή, τόσο ως εδώδιμος όσο και επειδή από αυτόν παράγεται το ελαιόλαδο. Καλλιεργούνταν στην Αρχαία Ελλάδα και οι ελιές και το ελαιόλαδο αποτελούσαν σημαντικά εμπορικά προϊόντα.

Η ελιά ευδοκίμει σε κλίματα εύκρατα χωρίς ακρότητες θερμοκρασίας (με μέση ετήσια θερμοκρασία 16°C) και υγρασίας, για αυτό είναι ευρύτατα διαδεδομένη στη μεσογειακή ζώνη (όπως στην Ελλάδα, στην Ιταλία, στην Ισπανία, στην Τουρκία, και την Αλγερία και αλλού). Είναι δέντρο αειθαλές, έχει φύλλα αντίθετα, λογχοειδή, δερματώδη, σκουροπράσινα στην άνω επιφάνεια και αργυρόχροα στην κάτω (5)

Για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δενδρύλλια ελιάς ύψους από 1- 1,5 μέτρο τα οποία άνηκαν στην ποικιλία «Κωρονέικη».

1. 4. Παθογόνα βακτήρια

Περίπου 1600 «είδη» βακτηρίων είναι γνωστά. Από αυτά τα περισσότερα είναι αυστηρά σαπροφυτικά. Αρκετά προκαλούν ασθένειες στους ανθρώπους και περίπου 100 είδη προκαλούν ασθένειες στα φυτά. Αρκετά από αυτά είναι ευκαιριακά σαπρόφυτα και μπορούν εύκολα να καλλιεργηθούν σε τεχνητά θρεπτικά μέσα. Όμως μερικά είναι ακόμα δύσκολο να καλλιεργηθούν σε θρεπτικά υλικά και για κάποια αυτό δεν έχει επιτευχθεί ακόμη.

Τα βακτήρια ποικίλουν σε σχήμα και μέγεθος, άλλα είναι ευκίνητα (μέσω μαστιγίων) ενώ άλλα δεν μπορούν να μετακινηθούν μόνα τους (στερούνται μαστιγίων). Τα περισσότερα πολλαπλασιάζονται με απλή διαίρεση και μπορούν να αυξήσουν τους πληθυσμούς τους με γεωμετρική κλίμακα. Οι ασθένειες στα φυτά από βακτήρια συμβαίνουν κάτω από ζεστές και υγρές συνθήκες και αν οι συνθήκες το ευνοούν μπορεί να είναι καταστρεπτικές.

Οι ψευδομονάδες (*Pseudomonas* sp.) είναι ευθείες ή καμπυλωμένες ράβδοι, από 0.5-1 μέχρι 1.5-4 μικρόμετρα. Με την χρήση ενός ή περισσότερων μαστιγίων κινούνται. Πολλά είδη είναι κοινά σε γλυκό σε αλμυρό νερό αλλά και στο έδαφος. Τα περισσότερα παθογόνα είδη προσβάλλουν φυτά, ενώ λίγα προσβάλλουν ζώα ή ανθρώπους. Τα είδη που προσβάλλουν φυτά όταν αναπτυχθούν σε ένα μέσο χαμηλής περιεκτικότητας σε σίδηρο, παράγουν κιτρινοπράσινες, διάχυτες φθορίζουσες χρωστικές.

Η *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* προκαλεί βακτηριακή στιγμάτωση (bacterial speck disease). Η ασθένεια αυτή είναι οικονομικά σημαντική σε παγκόσμια κλίμακα. Προσβάλλει φύλλα, μίσχους και καρπούς είναι μικρού μεγέθους. Συχνά όμως συνενώνονται και εμφανίζονται σαν ενιαίες μολυσμένες περιοχές, που στους καρπούς μπορούν να καλύψουν το ¼ ή και περισσότερο μέρος της επιφάνειάς τους. Όπως οι περισσότερες ασθένειες ευνοείται από δροσερό και υγρό καιρό. Προσβάλλει την τομάτα και ορισμένα στελέχη το φυτό-μοντέλο Αραβιδόψη (*Arabidopsis thaliana*) (7).

Η *Pseudomonas savastanoi* είναι το βακτήριο που προκαλεί την φυματίωση (καρκίνωμα, Olive knot) στην ελιά, και ανάλογα συμπτώματα στην πικροδάφνη (*Nerium oleander*) και σε άλλα μέλη της οικογένειας *Oleaceae* (7).

Οι ξανθομονάδες (*Xanthomonas* sp.) είναι ευθείες ράβδοι, από 0.4-1.0 μέχρι 1.2-3 μικρόμετρα και κινείται μέσω ενός πολικού μαστιγίου. Η ανάπτυξη σε ορισμένα θρεπτικά μέσα με άγαρ είναι συνήθως κίτρινη, και τις περισσότερες φορές αργής ανάπτυξης. Όλα τα είδη προσβάλλουν τα φυτά και βρίσκονται μόνο σε σχέση με φυτά ή φυτικό υλικό.

Η *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* προκαλεί την βακτηριακή κηλίδωση (bacterial spot) στην τομάτα και την πιπεριά και είναι εξαπλωμένη παγκοσμίως. Ανάλογα με το στέλεχος μπορούν να προσβάλουν την τομάτα και την πιπεριά, ή μόνο την τομάτα ή μόνο την πιπεριά. Προσβάλλουν φύλλα μίσχους και καρπούς. Στα φύλλα τα συμπτώματα εμφανίζονται ως σαν μικρές (έως περίπου 3 χιλιοστά), ακανόνιστες, μαύρες, λιπαρές, κηλίδες. Φύλλα με έντονη προσβολή μπορεί να κιτρινίσουν, να εμφανίζονται κουρελιασμένα ή μπορεί να προκαλέσει και φυλλόπτωση. Η προσβολή ανθικών μερών έχει ως αποτέλεσμα συνήθως την έντονη ανθόπτωση. Σε πράσινους καρπούς, μικρές υδατώδεις, ελαφρώς ανυψωμένες κηλίδες μπορούν να εμφανιστούν, οι οποίες μερικές φορές περιλαμβάνονται πρασινωπούς-άσπρους δακτυλίου με αποτέλεσμα να μεγαλώνει η διάμετρος της κηλίδας. Αργότερα αυτοί οι δακτύλιοι εξαφανίζονται και οι κηλίδες γίνονται σκούρες καφέ και βυθίζονται στη σάρκα του καρπού. Το βακτηριακό μόλυσμα προέρχεται από σπόρους μολυσμένους κατά την συγκομιδή, από φυτικά υπολείμματα στο έδαφος, καθώς και από ζιζάνια και άλλους ξενιστές. Τα βακτήρια μεταδίδονται με την βροχή, τον αέρα (αεροσόλ), την επαφή και εισέρχονται στα φύλλα και τους καρπούς από μηχανικές βλάβες και από τα στόματα. (7)

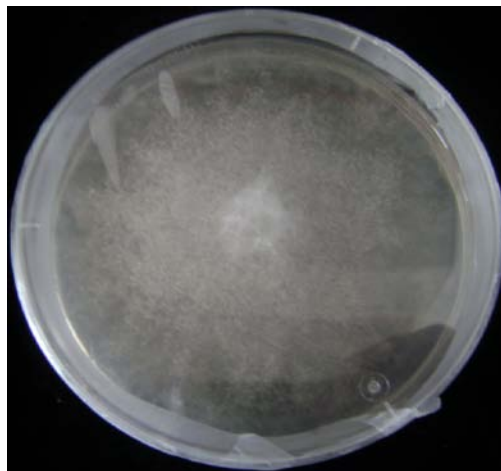
1.4.2. Παθογόνοι μύκητες

Οι μύκητες είναι μικροί, γενικά μικροσκοπικοί, ευκαρυωτικοί, συνήθως ινώδεις, διακλαδισμένοι οργανισμοί που φέρουν σπόρια και δεν φέρουν χλωροφύλλη. Οι μύκητες έχουν κυτταρικά τοιχώματα τα οποία περιέχουν χιτίνη και γλυκάνη (αλλά όχι κελλουλόζη) ως σκελετικά συστατικά. Μία ομάδα οργανισμών που μοιάζουν με τους μύκητες, οι ωμόμυκητες θεωρούνταν μέχρι το 1990 πραγματικοί μύκητες. Με μερικές εξαιρέσεις, η μεγάλη πλειοψηφία των ωμομυκετών έχουν τοιχώματα που αποτελούνται από γλυκάνη και μικρές ποσότητες από κελλουλόζη, αλλά όχι χιτίνη. Οι ωμόμυκητες είναι τώρα μέλη του βασιλείου χρώμιστα (Chromista), και όχι των μυκήτων αλλά τους χειριζόμαστε σαν μύκητες γιατί πολλές ομοιότητες με αυτούς, ειδικά σε ότι αφορά τον τρόπο που προκαλούν ασθένειες στα φυτά. (7)

Οι πιο πολλοί από τους περισσότερους από 100.000 γνωστούς μύκητες είναι αυστηρά σαπροφυτικοί. Περίπου 50 είδη προκαλούν ασθένειες σε ανθρώπους, και περίπου άλλοι τόσσοι προκαλούν ασθένειες σε ζώα. Όμως πάνω από 10.000 μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες σε φυτά. Όλα τα φυτά δέχονται επίθεση από μερικά είδη μυκήτων και κάθε ένας από τους παρασιτικούς μύκητες μπορεί να επιτεθεί σε ένα ή περισσότερα είδη φυτών. Μερικοί μύκητες γνωστοί ως υποχρεωτικά παράσιτα ή βιοτροφικοί, μπορούν να μεγαλώσουν και να πολλαπλασιαστούν μονάχα παραμένοντας σε όλη τους την ζωή, σε επαφή με τα φυτά ξενιστές τους. Άλλοι γνωστοί ως μη υποχρεωτικά παράσιτα, απαιτούν ένα φυτό ξενιστή για ένα μέρος του βιολογικού τους κύκλου, αλλά μπορούν να ολοκληρώσουν τον βιολογικό τους κύκλο σε νεκρή οργανική ύλη, ή μπορούν να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν τόσο σε νεκρή οργανική ύλη όσο και σε ζωντανά φυτά. Οι μύκητες που δεν είναι υποχρεωτικά παράσιτα μπορούν να είναι περιστασιακά σαπροφυτικοί ή περιστασιακά παράσιτα ανάλογα με το αν είναι πρωταρχικά παράσιτα ή πρωταρχικά σαπρόφυτα. (7)

Το όνομα φυτόφθορα σημαίνει την καταστροφή και είναι δικαιολογημένο. Είδη της φυτόφθορας, προκαλούν μια πληθώρα καταστρεπτικών ασθενειών πολλών διαφορετικών τύπων φυτών από φυντάνια ετήσιων λαχανικών ή καλλωπιστικών μέχρι πλήρως αναπτυγμένα οπωροφόρα και δασικά είδη. Τα περισσότερα της είδη προκαλούν σήψεις ριζών, τήξη νεαρών φυτών, και σήψεις σε χαμηλότερους μίσχους, κονδύλους και κορμίδια παρόμοιες με αυτές του μύκητα *Pythium* spp. Άλλα είδη προκαλούν σήψεις οφθαλμών ή καρπών, και μερικά προκαλούν κάψιμο (blight) του φυλλώματος, μικρών κλαδίσκων και καρπών. Μερικά είδη επιτίθενται μόνο σε ένα ή δύο διαφορετικά είδη φυτών, αλλά άλλα μπορούν να προκαλέσουν παρόμοια ή διαφορετικά συμπτώματα σε πολλούς διαφορετικούς ξενιστές. (7)

Η *Phytophthora parasitica* (βλ. εικ.3) προκαλεί σήψη ριζών, μίσχων και καρπών σε πολλά λαχανοκομικά, καλλωπιστικά και φυτά μεγάλης καλλιέργειας, αλλά και σε μερικά ξυλώδη φυτά. Η *Phytophthora parasitica*. Dastur var. *nicotianae* είναι η αιτία της ασθένειας «σήψη του λαιμού» του φυτού του καπνού (7).



Εικόνα 3 Φυτόφθορα σε τρυβλίο

Αρκετά είδη του γένους *Colletotrichum* (βλ. εικ.4) προκαλούν σοβαρές ασθένειες ανθράκωσης σε αρκετές σημαντικές ετήσιες καλλιέργειες και σε καλλωπιστικά φυτά. Αρκετές από αυτές παράγουν την τελειομορφή τους *Glomerella* sp., με σχετική συχνότητα και μερικές φορές αναφέρονται ως οι ασθένειες *Glomerella*. Τέτοια είδη επίσης προκαλούν έλκη και μαρασμό σε ξυλώδη φυτά όπως είναι ή καμέλια και το λιγούστρο, πικρή σήψη στα μήλα, και ώριμη σήψη στα σταφύλια, αχλάδια, ροδάκινα και άλλα φρούτα.

Αρκετές σημαντικές ασθένειες ανθράκωσης επηρεάζουν ετήσια φυτά. Μερικές από τις πιο κοινές είναι του φασολιού, κολοκυνθοειδών, κρεμμυδιού, πιπεριάς, τοματιάς και φράουλας. Σοβαρές ασθένειες ανθράκωσης συχνά συμβαίνουν στο καλαμπόκι σε δημητριακά και σε αγρωστώδη. Οι ασθένειες είναι παρούσες οπουδήποτε είναι παρόντες οι ξενιστές όμως είναι περισσότερο δριμείς σε ζεστά προς δροσερά, και με αυξημένη υγρασία μέρη. Γενικά δεν αποτελούν πρόβλημα κάτω από ξηρές συνθήκες. (7)



Εικόνα 4 *C. higginsianum* σε τρυβλίο

Οι ασθένειες που προκαλούνται από τον βοτρυτή (βλ. εικ.5) είναι πιθανόν οι πιο συνηθισμένες και πιο διαδεδομένες σε λαχανικά, καλλωπιστικά, οπωροφόρα καθώς και σε μερικά φυτά μεγάλης καλλιέργειας. Είναι οι πιο συνηθισμένες ασθένειες σε καλλιέργειες θερμοκηπίου. Εμφανίζονται ως μάρανση φυτών και σήψη καρπών πρωτίστως αλλά και τήξη, έλκη μίσχου ή σήψεις κηλιδώσεις στα φύλλα και τους κονδύλους, τα κορμίδια και σήψεις βολβών. Κάτω από συνθήκες υψηλής υγρασίας, ο μύκητας παράγει μία αξιοπρόσεχτη γκρίζα (σταχτί-τεφρά) μούχλα σε μολυσμένα κύτταρα τα οποία είναι χαρακτηριστικά της ασθένειας. Μερικές από τις πιο σοβαρές ασθένειες που προκαλούνται από τον βοτρυτή περιλαμβάνουν: την γκρίζα μούχλα της φράουλας, σταφυλιών και πολλών λαχανικών το σάπισμα της άκρης του κάλυκα των μήλων, την καταστροφή των κρεμμυδιών και την σήψη του λαιμού, μάρανση ή γκρίζα μούχλα πολλών καλλωπιστικών, σήψη βολβών της αμαρυλλίδας, σήψη του κορμιδίου του γλαδίου και άλλες. Ο βοτρυτής μπορεί επίσης να προκαλέσει δευτερογενής μαλακές σήψεις φρούτων και λαχανικών στην αποθήκευση, μεταποίηση και διακίνηση. (7)



Εικόνα 5 *Botrytis cinerea* σε τρυβλίο

1.5. Σκοπός της διατριβής

Το αντικείμενο αυτής της εργασίας είναι να διερευνήσει την ικανότητα της ελευρωπαίνης (από φύλλα ελιάς) και ενός ακατέργαστου φυσικού αντιοξειδωτικού μείγματος από απόβλητα ελαιουργείων καθώς και ενός εκχυλίσματος από στέμφυλα (παραπροϊόντα οινοποίησης) να δράσουν σαν φυτοπροστατευτικές ουσίες ενάντια σε οικονομικά σημαντικά μυκητολογικά παθογόνα, σε ωομύκητες καθώς και σε βακτήρια. Οι ουσίες αυτές εκχειλίστηκαν από το εργαστήριο «Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων» του τμήματος φαρμακευτικής Αθηνών σε συνεργασία με το εργαστήριο «Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Φυτών» του τμήματος φυτικής παραγωγής του ΑΤΕΙ Κρήτης και διατηρούνται σε απόθεμα με αιθανόλη.

Συγκεκριμένα δοκιμάστηκαν οι αντιμικροβιακές ιδιότητες *in vitro* στο παθογόνο *Colletotrichum higginsianum* IMI 349063A, ενώ στον ωομύκητα *Phytophthora parasitica*. Dastur var *nicotianae* (Breda de Haan) Tucker race 0 μετρήθηκαν και *in vitro* και *in vivo* με την μόλυνση φύλλων καπνού. Επίσης έγιναν και *in vivo* μετρήσεις για την αποτελεσματικότητα της ελευρωπαίνης ενάντια στην *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* με την οποία μολύναμε πιπεριές, καθώς και ενάντια στην *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* όπου μολύναμε δενδρύλλια ελιάς. Τέλος ελέγχτηκε η αποτελεσματικότητα του κατσίγαρου ενάντια στην *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* όπου μολύναμε τοματιές.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Καλλιέργεια παθογόνων

Για τις ανάγκες των πειραμάτων οι μύκητες/ωομύκητας και τα βακτήρια καλλιεργήθηκαν σε κατάλληλα για τον καθένα θρεπτικά υποστρώματα.

2.1.1. Καλλιέργεια βακτηρίων

Τα βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν (βλ. Πίνακα 1), καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα Luria Broth (LB - βλ. τέλος ¶) (εκτός από ότι αναφέρεται σε άλλα εδάφια της διατριβής). Σε κάθε περίπτωση, τα ίδια θρεπτικά υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν είτε σε υγρή μορφή είτε σε στερεά (για τη διατήρηση των καλλιεργειών για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στο ψυγείο). Η διαφορά στην παρασκευή μεταξύ των υγρών και στερεών υποστρωμάτων ήταν η προσθήκη 1.5% άγαρ.

Είδος	Στέλεχος	Φυτό που μολύνθηκε	Εργαστήριο απομόνωσης/προέλευσης
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato	132	Τοματιά	Φυτοπαθολογίας-βακτηριολογίας Φ.Π.-ΑΤΕΙ Ηρακλείου
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. savastanoi	SFP 4530 SFP 2480	Ελιά	Βιοτεχνολογίας Φυτών. Βιολογικό - Π.Κ.
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. vesicatoria	5071	Πιπεριά	Φυτοπαθολογίας-βακτηριολογίας Φ.Π.-ΑΤΕΙ Ηρακλείου

Πίνακας 1. Φυτοπαθογόνα βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν.

Για την καλλιέργεια της *Pseudomonas syringae* pv. tomato χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα Kings B medium (βλ. τέλος ¶) και για την καλλιέργεια και την οπτική αναγνώριση αποικιών της *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria το θρεπτικού υπόστρωμα Tween 20 (βλ. τέλος ¶).

Φυσικά μετά την ανάμειξη των υλικών ακολουθεί ανάδευση και αποστείρωση, ώστε να μην αναπτυχθούν μικροοργανισμοί.

Στα πλαίσια των πειραμάτων μας χρειάστηκε να απομονωθούν στελέχη ανθεκτικά στο αντιβιοτικό ριφαμυκίνη για τα δύο βακτήρια (XCV 5071 και PST 132) για να καταστεί δυνατή η χρήση επιλεκτικών θρεπτικών υποστρωμάτων στη καλλιέργεια των βακτηρίων και την καταμέτρηση των πληθυσμών τους.

Συνταγή LB
NaCl 5 g
Yeast Extract 5 g
Tryptone C 10 g
Άγαρ 12 g
dH ₂ O μέχρι 1L

Kings B
Protease peptone (No 3) 20g
K ₂ HPO ₄ 1,5g
MgSO ₄ 1,5g
Glycerol 15 ml
Άγαρ 12g
dH ₂ O μέχρι 1L

Tween 80 pH= 7,2± 0,2 (25°C)
Peptone 10g
NaCl ₂ 5g
CaCl ₂ *H ₂ O 0,1g
Άγαρ 15g
Tween 80 10 ml
dH ₂ O μέχρι 1L

2.1.2. Μύκητες

Για την καλλιέργεια των μυκήτων(βλ. πιν.2) χρησιμοποιήθηκαν τρία θρεπτικά διαλύματα, τα δύο από αυτά ήταν για το *Colletotrichum higginsianum*. Για το *Colletotrichum* χρησιμοποιήθηκε το Bannerot (βλ. τέλος ¶) που είναι **φτωχό** θρεπτικό διάλυμα για την **ανάπτυξη σπορίων** του μύκητα, ενώ για την ανάπτυξη **μυκηλίου** είναι απαραίτητη η χρήση ενός **πλούσιου** θρεπτικού μέσου το οποίο στην δική μας περίπτωση ήταν το ANM (βλ. τέλος ¶).

Για την ανάπτυξη μυκηλίου του ωομύκητα *Phytophthora parasitica*, χρησιμοποιήθηκε για θρεπτικό μέσο το 5% V8. Για την Παρασκευή του χρησιμοποιείται 50ml χυμός V8 και 900ml dH₂O. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται ίσο 5, με την χρήση NaOH/KOH. Στην συνέχεια το διάλυμα

φιλτράρεται μέσα από "Scryoi" νάιλον μεμβράνη 200μm και στο διήθημα προστίθενται 20g Άγαρ και dH₂O μέχρι 1L. Τέλος το διάλυμα αποστειρώνεται.

Είδος	Στέλεχος	Κατηγορία	Εργαστήριο απομόνωσης/προέλευσης
<i>Phytophthora parasitica</i> . Dastur var <i>nicotianae</i>	Tucker race 0	Ωομύκητας	Arnaud Bottin CNRS- UPS5446 Toulouse
<i>Colletotrichum higginsianum</i>	IMI 349063A	Ασκομύκητας	R. O'Connell, Max-Plank Cologne
<i>Botrytis cinerea</i>		Ασκομύκητας	Φυτοπαθολογίας- βακτηριολογίας Φ.Π.- ΑΤΕΙ Ηρακλείου

Πίνακας 2 Φυτοπαθογόνοι μύκητες που χρησιμοποιήθηκαν

Οι μύκητες αναπτύσσονται σε επωαστήρα θερμοκρασίας 24°C μέσα σε τρυβλία Petri για την ανάπτυξη του μυκηλίου. Για την ανάπτυξη των σπορίων πάλι τοποθετούνται στην ίδια θερμοκρασία αυτή την φορά όμως σε κλειστό δοχείο μικρού μεγέθους (π.χ.Falcon) αν χρειαζόμαστε σύντομα σπόρια και σε ειδικές φλάσκες αν χρειαζόμαστε πολλά σπόρια σε μεγαλύτερο όμως χρονικό διάστημα. Η ανάπτυξη τους γίνεται σε συνθήκες έλλειψης φωτός.

Bannerot
Glucose 2,8g (30% [c])
MgSO ₄ 7H ₂ O 1,3g
KH ₂ PO ₄ 2,7g
Peptone C 2g
Yeast Extract 100 mg
Άγαρ 20g
dH ₂ O μέχρι 1 L

ANM
Glucose (dextrose) 20g
Malt Extract 20g
Peptone 1g
Άγαρ 20g
dH ₂ O μέχρι 1 L

Μετά την ανάδευση όλων των υλικών ακολουθεί αποστείρωση.

Η νέα καλλιέργεια δημιουργείται με την μεταφορά ενός μικρού κομματιού άγαρ από παλαιότερη καλλιέργεια που φέρει το μυκήλιο. Το κομμάτι αυτό τοποθετείται κατά τέτοιο τρόπο έτσι ώστε το μυκήλιο να έρχεται σε άμεση επαφή με το νέο θρεπτικό συστατικό. Αν το θρεπτικό είναι πλούσιο τότε έχουμε ανάπτυξη μυκήλιου ενώ αν είναι φτωχό τότε ευνοείται ή ανάπτυξη σπορίων. Νέα καλλιέργεια για την ανάπτυξη σπορίων μπορούμε να κάνουμε και με την βοήθεια αιωρήματος σπορίων του μύκητα. Όλες οι διαδικασίες επανακαλλιέργειας γίνονται υπό ασηπτικές συνθήκες.

2.2.Ακτινοειδής ανάπτυξη μυκήτων

Για τον έλεγχο των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων των τριών ουσιών πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια του ωόμυκητα *Phytophthora parasitica var. nicotianae* σε θρεπτικό υπόστρωμα V8 στο οποίο προστέθηκαν οι ουσίες αυτές σε τελικές συγκεντρώσεις 0,1% 0,5% και 1% εκχυλίσματος στεμφύλων, κατσιγάρου, ημικάθαρης (καθαρότητας 55%) και καθαρής (καθαρότητας 98%) ελευρωπαϊνης. Αντίστοιχα, για την ακτινοειδή αύξηση του μύκητα *Colletotrichum higginsianum* χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υπόστρωμα ANM με τις ίδιες ποσότητες από κατσιγάρο

Κάθε τρυβλίο παρασκευάστηκε 4 φορές έτσι ώστε να έχουμε 4 επαναλήψεις, εκτός από την περίπτωση του 1% όπου έγιναν μόνο τρεις επαναλήψεις. Για κάθε παθογόνο υπήρχαν και 4 τρυβλία-μάρτυρες μόνο με το θρεπτικό υπόστρωμα. Η καλλιέργεια έγινε με την τοποθέτηση μικρού κυλίνδρου με άγαρ, που περιέχει το μυκήλιο, σταθερής πάντοτε διαμέτρου(0,9 εκ). Σε κάθε τρυβλίο μετρήθηκε ή διάμετρος του θαλού σε 4 ακτίνες, κάθετες μεταξύ τους, 4 και 8 ημέρες μετά τη μόλυνση.

2.3. Εκβλάστηση σπορίων μυκήτων

Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας των ουσιών πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα εκβλάστησης σπορίων. Στο πείραμα αυτό

χρησιμοποιήθηκε ο μύκητας *Colletotrichum higginsianum*, και ο *Botrytis cinerea*. Για τις ανάγκες αυτού του πειράματος, χρειάστηκε να φτιαχτούν τα εξής τρυβλία: αιθανολικό εκχύλισμα στεμφύλων σε τελική συγκέντρωση 0,1% και 0,5%, καθαρή (καθαρότητας 98%) ελευρωπαΐνη σε τελική συγκέντρωση δραστικής ουσίας 0,5% και 1%, και τέλος εκχύλισμα παραπροϊόντων εκχύλισης ελαιολάδου (κατσιγαρος) σε τελική συγκέντρωση 0,1% και 0,5%. Σε κάθε δείγμα έγιναν τρεις επαναλήψεις και σε μία από αυτές τοποθετήθηκε διάφανη μεμβράνη για την παρατήρηση του κάθε δείγματος στο μικροσκόπιο. Το θρεπτικό διάλυμα ήταν ANM και PDA, αντίστοιχα.

Η βλάβηση των σπορίων ποσοτικοποιήθηκε με την χρήση αιωρήματος σπορίων από παλαιότερη καλλιέργεια. Η συγκέντρωση των σπορίων στο αιώρημα μετρήθηκε με την χρήση αιματοκυτταρόμετρου, ώστε να υπολογιστεί η αρχική συγκέντρωση, που ήταν περίπου 10^7 /ml. Στην συνέχεια το αιώρημα αραιώθηκε με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό στις επιθυμητές συγκεντρώσεις (10^4 και 10^3 /ml) ώστε να μπορεί να γίνει σωστά η μέτρηση των εκβλαστημένων σπορίων. Από κάθε αραιώση παραλήφθηκε όγκος 200 μl και επιστρώθηκε σε κάθε τρυβλίο με την βοήθεια υάλινης ράβδου (ξαπλωτήρα, spreader).

Οι μετρήσεις αφορούσαν τον αριθμό των εκβλαστημένων σπορίων, τα όποια φαίνονται σαν αποικίες στο τρυβλίο, και έγιναν τη 2^η και την 3^η μέρα. Η συγκέντρωση 10^3 /ml μετρήθηκε την 5^η μέρα την επίστρωση των τρυβλίων. Παράλληλα εξετάστηκαν και οι μεμβράνες στο μικροσκόπιο.

2.4.Χειρισμοί εκχυλισμάτων σε φυτά

Για να αξιολογηθεί η φυτοπροστατευτική ικανότητα των ουσιών χρησιμοποιήθηκε η *Phytophthora parasitica* με την οποία μολύνθηκαν φύλλα καπνού. Χρησιμοποιήθηκαν και τα τρία εκχυλίσματα: καθαρή (98%) ελευρωπαΐνη, κατσιγαρος, και εκχύλισμα στεμφύλων. Όλες οι ουσίες χρησιμοποιήθηκαν σε 0,1% συγκέντρωση.

Χρησιμοποιήθηκαν φύλλα αποκομμένα από καπνόφυτα και η μόλυνση τους έγινε με την τοποθέτηση ενός κυλίνδρου αγαρ, σταθερής διαμέτρου, ο οποίος είχε αναπτυγμένο μυκήλιο, έτσι ώστε ο ωομύκητας να έρχεται σε άμεση επαφή με την κάτω επιφάνεια του φύλλου. Πάνω από τον κύλινδρο αυτόν τοποθετήθηκε υγραμένο βαμβάκι (σε αποστειρωμένο/αποσταγμένο νερό) για να διατηρηθεί επαρκής υγρασία για την ανάπτυξη του παθογόνου. Τα φύλλα ήταν μεσαίας ανάπτυξης και τοποθετήθηκαν σε κλειστά δοχεία επιστρωμένα με υγραμένο χαρτί για τη διατήρηση υψηλής υγρασίας στο μικροπεριβάλλον του πειράματος. Τα κουτιά τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα, χωρίς φως, θερμοκρασίας 24°C κατάλληλο για την ανάπτυξη του μύκητα και της μόλυνσης.

Σε κάθε κουτί τοποθετήθηκαν τρία φύλλα καπνού, και κάθε κουτί αποτελούσε και ένα διαφορετικό χειρισμό του πειράματος. Πραγματοποιήθηκαν 4 διαφορετικοί χειρισμοί για κάθε ουσία. Η διαφορά των χειρισμών έγκειται στους διαφορετικούς ψεκασμούς, που έγιναν με βάση αναφοράς την ώρα της μόλυνσης. Έτσι έγιναν ένας προληπτικός χειρισμός (Α), ένας στον χρόνο 0 (ταυτόχρονα με τη μόλυνση) (Β), ένας κατασταλτικός (Δ), και ένας ενδιάμεσος των τελευταίων δύο (Γ). Αναλυτικότερα, οι χειρισμοί είχαν ως εξής:

Α: ένας ψεκασμός 2 μέρες πριν και ένας 2 ώρες πριν την μόλυνση

Β: ένας ψεκασμός 2 ώρες πριν την μόλυνση

Γ: ένας ψεκασμός 2 ώρες πριν και ένας 2 μέρες μετά την μόλυνση

Δ: ένας ψεκασμός 2 μέρες μετά και ένας 4 μέρες την μόλυνση

Σε κάθε χειρισμό για την καλύτερη εφαρμογή της ουσίας τοποθετήθηκε διαβρεκτικό, X-77 Spreader Activator (Dow AgroSciences LLC), σε τελική συγκέντρωση 0,05%. Σε κάθε χειρισμό χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες φύλλα ψεκασμένα με νερό ή με διαβρεκτικό.

Μετά το πέρας 7 ημερών έγιναν μετρήσεις της ακτίνας του εμφανώς προσβεβλημένου τμήματος του φύλλου (4 μετρήσεις ανά φύλλο, σε κάθετες μεταξύ τους ακτίνες). Έτσι συνολικά έχουμε 12 επαναλήψεις ανά χειρισμό.

2.5. Τεχνητή μόλυνση φυτών με βακτήρια

Τα εκχυλίσματα/ουσίες αραιώθηκαν με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό στην επιθυμητή συγκέντρωση, που ήταν 0,1%. Για την καλύτερη και ομοιόμορφη του εφαρμογή χρησιμοποιήθηκε το διαβρεκτικό που αναφέρθηκενωρίτερα. Για τις πιπεριές χρησιμοποιήθηκε η ελευρωπαϊνή καθαρότητας 98% ενώ για τις τοματιές χρησιμοποιήθηκε ο κατσιγάρος.

Για την παραγωγή του μολύσματος ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία. Βακτηριακό αιώρημα από υγρή καλλιέργεια στο στάδιο της στατικής φάσης φυγοκεντρήθηκε στις 4000 στροφές ανά λεπτό για 4 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε ίσο όγκο διαλύματος 10 mM MgCl₂. Ακολούθησε φυγοκέντρηση του αιωρήματος, απόρριψη του υπερκείμενου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε ίσο όγκο 10 mM MgCl₂. Κατόπιν το αιώρημα αραιώθηκε μέχρι περίπου 0,12 οπτική πυκνότητα στα 600 nm, μετρούμενη σε φωτόμετρο. Τέλος, προστέθηκε η προβλεπόμενη ποσότητα διαβρεκτικού. Όλη η διαδικασία διήρκεσε λιγότερο από 45 λεπτά, για τη διατήρηση της βιωσιμότητας των βακτηρίων.

Για την καλύτερη προσομοίωση σε πραγματικές συνθήκες, έγινε ένα προκαταρκτικό πείραμα τεχνητής μόλυνσης φυτών πιπεριάς και τοματιάς, με ξανθομονάδα και ψευδομονάδα, αντίστοιχα.

Τα φυτά παρέμειναν στο θερμοκήπιο καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος υπό ελεγχόμενες συνθήκες (θερμοκρασία περίπου 24^ο-26^ο Κελσίου και πολύ υψηλή σχετική υγρασία με σύστημα υδρονέφωσης) που ευνοούν ιδιαίτερα την μόλυνση και την ανάπτυξη των βακτηρίων. Οι συνθήκες φωτοπεριόδου ήταν μακριάς ημέρας καθότι τα πειράματα διεξάχθηκαν κατά την ευρύτερη καλοκαιρινή περίοδο.

Για να διευκολυνθεί η μόλυνση των φυτών προξενήθηκαν πληγές στα φύλλα με μια απλή εργαστηριακή βούρτσα, σε όλους τους χειρισμούς, λίγη ώρα πριν την πρώτη εφαρμογή των εκχυλισμάτων ή του μολύσματος, η οποία έγινε με ψεκασμό. Πριν και μετά τον ψεκασμό είχε διακοπεί το πότισμα με την υδρονέφωση ενώ παράλληλα έγινε χρήση του διαβρεκτικού, X-77 Spreader Activator (Dow AgroSciences LLC), σε τελική συγκέντρωση 0,05%, για την καλλίτερη επαφή των εκχυλισμάτων και του μολύσματος με τα φύλλα των φυτών.

Οι χειρισμοί που έγιναν ήταν 9 συνολικά και είναι οι εξής:

1. Φυτά μόνο με πληγές (αρνητικός μάρτυρας)
2. Φυτά με εφαρμογή της ουσίας (για έλεγχο πιθανής τοξικότητας της ουσίας στα φυτά)
3. Φυτά με εφαρμογή μολύσματος (θετικός μάρτυρας)
4. Φυτά με μόλυνση και εφαρμογή ουσίας 2 ώρες πριν την μόλυνση
5. Φυτά με μόλυνση και εφαρμογή ουσίας 2 ώρες πριν, 24 ώρες και 72 ώρες μετά την μόλυνση
6. Φυτά με μόλυνση και εφαρμογή ουσίας 24 ώρες μετά την μόλυνση
7. Φυτά με μόλυνση και εφαρμογή ουσίας 24, 48 και 72 ώρες μετά την μόλυνση
8. Φυτά με μόλυνση και εφαρμογή ουσίας 72 ώρες μετά την μόλυνση
9. Φυτά με μόλυνση και εφαρμογή ουσίας 2, 48 και 72 ώρες πριν καθώς και 24 και 48 ώρες μετά την μόλυνση.

Σε κάθε χειρισμό χρησιμοποιήθηκαν 3 φυτά για επανάληψη, και σε κάθε φυτό πραγματοποιήθηκαν μολύνσεις σε 4 πλήρως αναπτυγμένα φύλλα. Έτσι, στο τέλος είχαμε 12 επαναλήψεις για κάθε χειρισμό.

Οι μετρήσεις βαθμονομήθηκαν με βάση μια αυτοσχέδια κλίμακα από 0 μέχρι 4, όπου 0 είναι ένα ασυμπτωματικό φύλλο, 1 είναι ένα ελαφρά μολυσμένο φύλλο, 2 είναι ένα μετρίως μολυσμένο φύλλο, 3 είναι ένα έντονα

μολυσμένο φύλλο, ενώ 4 είναι βαρέως μολυσμένο φύλλο που έπεσε από το φυτό. Η ένταση των συμπτωμάτων της μόλυνσης και, κατά συνέπεια και η βαθμονόμηση, έγινε με βάση τα οπτικά συμπτώματα και το μεταχρωματισμό των φύλλων. Οι παρατηρήσεις ξεκίνησαν από την μέρα της μόλυνσης, ενώ τα συμπτώματα αναπτύχθηκαν εμφανώς από την τρίτη μέρα μετά την μόλυνση και οι παρατηρήσεις τελείωσαν 2 εβδομάδες αργότερα.

2.5.1. Πληθυσμιακή ανάλυση

Η πληθυσμιακή ανάλυση είναι μια παράλληλη διαδικασία του παραπάνω πειράματος. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία μέχρι το σημείο της εφαρμογής των εκχυλισμάτων ή του μολύσματος. Η βασική διαφορά είναι στον τρόπο μέτρησης των αποτελεσμάτων. Αυτήν τη φορά έγιναν μετρήσεις βακτηριακών αποικιών σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε κατάλληλα αντιβιοτικά για την παρεμπόδιση σαπρόφυτων και επέτρεπε τη μορφολογική αναγνώριση των αποικιών (χαρακτηριστική κίτρινη μουκοειδής εμφάνιση) στην περίπτωση της Ξανθομονάδας. Για την εκτέλεση αυτού του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν στελέχη των φυτοπαθολογικών βακτηρίων ανθεκτικά στο αντιβιοτικό ριφαμυκίνη (βλέπε ¶2.1.1). Σε κάθε δειγματοληψία παρελήφθησαν 2 φυλλικοί δίσκοι σταθερής διαμέτρου (9 mm) από κάθε φύλλο, συνήθως σε ημερήσια βάση. Κάθε δίσκος πολτοποιήθηκε ξεχωριστά σε 1 ml αποστειρωμένο, απιονισμένο νερό. Από αυτό το διάλυμα στην συνέχεια έγιναν δεκαδικές αραιώσεις (10^{-2} , 10^{-4} κτλ.) Από κάθε αραιώση ελήφθησαν 200 μl και επιστρώθηκαν σε τρυβλία που περιείχαν ριφαμυκίνη. Στην συνέχεια τα τρυβλία επώαστηκαν σε σκοτεινό επωαστήριο στους 28 °C μέχρι να αναπτυχθούν οι βακτηριακές αποικίες.

Οι χειρισμοί που έγιναν στην πληθυσμιακή ανάλυση είναι αυτές που έδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα σε προηγούμενο πείραμα που αξιολογήθηκε μόνο φαινοτυπικά (χειρισμοί: 3 (μάρτυρας) 4, 5 και 6). Πληθυσμιακή ανάλυση έγινε μόνο σε φύλλα πιπεριάς μολυσμένα με την XCV.

2.6. Φυματίωση της ελιάς

Νεαρά δενδρύλλια ελιάς μολύνθηκαν με το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi*. Τα φυτορποστατευτικά σκευάσματα και η διαδικασία εφαρμογής τους ήταν η ίδια με μόνη διαφορά ότι συγκέντρωση της ελευρωπαϊνης (98%) ήταν 0,2 %. Η διαδικασία παραγωγής του μολύσματος είναι επίσης η ίδια με μόνη διαφορά ότι δεν έγινε η τελική επανασειώρηση στο $MgCl_2$ αλλά τα βακτήρια χρησιμοποιήθηκαν ως ίζημα.

Στα δενδρύλλια προξενήθηκαν πληγές με την χρήση αποστειρωμένου εμβολιαστηρίου ώστε να εκτεθεί η εσωτερική πλευρά του φλοιού και το κάμβιο του βλαστού. Στις πληγές έγινε επάλειψη με βακτηριακή πάστα με την χρήση οδοντογλυφίδας που είχε εμβαπτιστεί στη βακτηριακή πάστα. Στην συνέχεια οι πληγές καλύφθηκαν με υγρό βαμβάκι το οποίο αφαιρείτο μόνο κατά την διάρκεια κάποιου χειρισμού. Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε θερμοκήπιο με ελεγχόμενες συνθήκες, θερμοκρασίας 24 °C με 26 °C και αυξημένης υγρασίας.

Οι χειρισμοί που πραγματοποιήθηκαν ήταν οι εξής: ένας προληπτικός (Α), ένας στο χρόνο μηδέν (χρόνος μόλυνσης) (Β), ένας κατασταλτικός (Γ) και ο απαραίτητος μάρτυρας (Control). Αναλυτικότερα οι χειρισμοί ήταν:

- Α: Ένας ψεκασμός 7 μέρες πριν και ένας 2 μέρες πριν την μόλυνση
- Β: Ένας ψεκασμός 2 ώρες πριν την μόλυνση
- Γ: Ένας ψεκασμός 2 μέρες μετά και ένας 7 μέρες μετά την μόλυνση

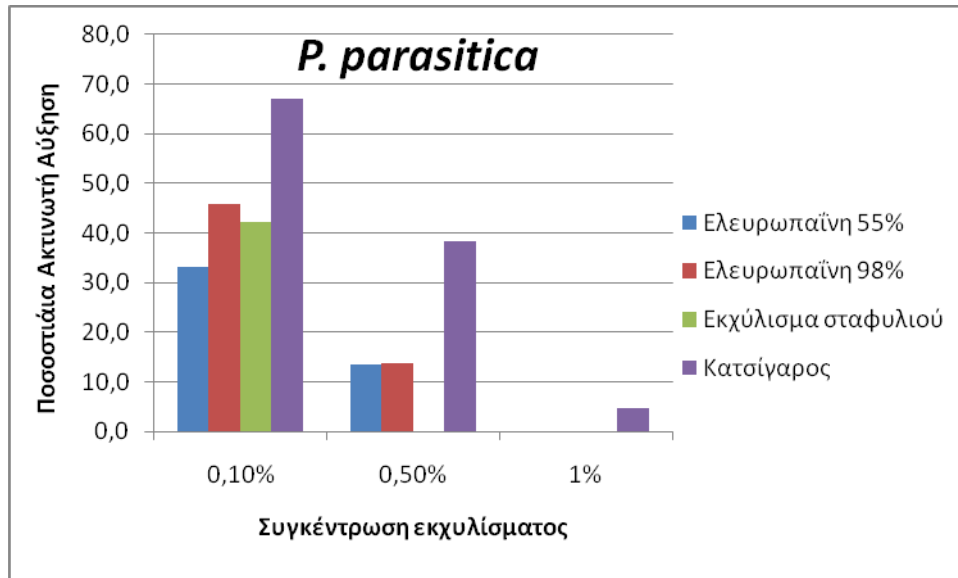
Οι μετρήσεις πάλι βασίστηκαν σε οπτική κλίμακα (βλέπε εικόνα 6). Οι μετρήσεις έγιναν μετά από περίπου 4 μήνες καθότι το αρχικό διάστημα, μέχρι και ενός μηνός παρατηρήσεις, δεν ήταν συμπερασματικές, εξαιτίας της αργής εξέλιξης της ασθένειας.



Εικόνα 6 Ενδεικτικά συμπτώματα όπου φαίνεται η κλίμακα αναφοράς. Από αριστερά προς τα δεξιά έχουμε 0, 1, 2, 3 και 4

3. Αποτελέσματα

3.1. Ακτινοειδής ανάπτυξη παρουσία φυτικών εκχυλισμάτων

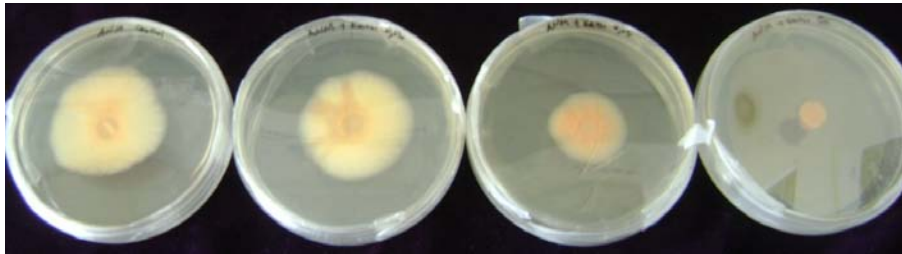


Εικόνα 7. Ανάσχεση της ακτινωτής ανάπτυξης (radial growth) *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* παρουσία και απουσία διαβαθμιζόμενων συγκεντρώσεων εκχυλισμάτων για την ανάσχεση της ανάπτυξης, βασισμένα στις μετρήσεις της έβδομης ημέρας. Παρατηρείται μια ανάσχεση της ανάπτυξης ανάλογη με την αύξηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος.

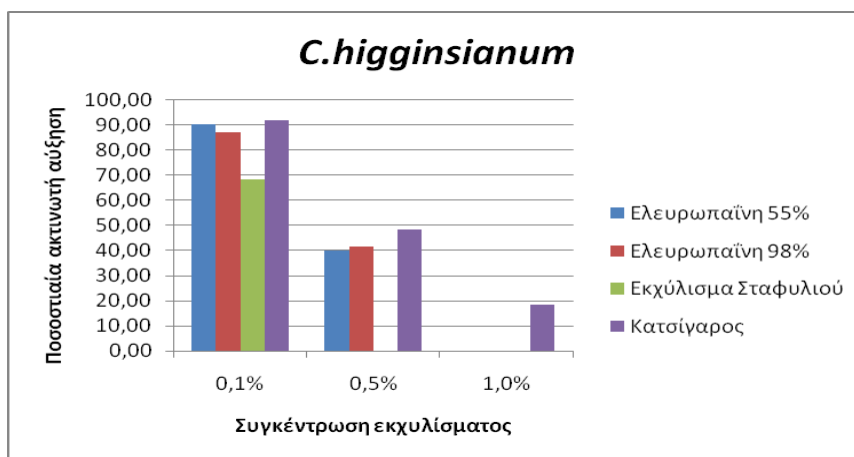
Όπως βλέπουμε στην Εικόνα 7, κατά την ακτινοειδή ανάπτυξη παρατηρήθηκε μειωμένη αύξηση του ωομύκητα *P. parasitica* στα τρυβλία που εμπεριείχαν κάποιο εκχύλισμα. Η ανάπτυξη επιβραδύνεται όσο αυξάνει η συγκέντρωση της εκχυλίσματος (βλέπε και Εικόνα 10) Ακόμα και στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν (0,1%) η ανάπτυξη είναι αισθητά περιορισμένη σε σχέση με τον μάρτυρα. Στην συγκέντρωση 0,5% έχουμε ακόμα μεγαλύτερη ανάσχεση της ανάπτυξης του ωομύκητα ενώ σε αυξημένες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος (1%) ο ωομύκητας δεν αναπτύσσεται καθόλου ή σχεδόν καθόλου (κατσίγαρος). Συγκρίνοντας τα εκχυλίσματα μεταξύ τους βλέπουμε πως την μικρότερη αποτελεσματικότητα έχει ο κατσίγαρος, χωρίς όμως να σημαίνει ότι και αυτό το εκχύλισμα δεν δίνει σημαντικά αποτελέσματα. Η ελευρωπαΐνη είναι πιο αποτελεσματική και φαίνεται πως η αποτελεσματικότητά της δεν επηρεάζεται από την καθαρότητα

του εκχυλίσματος. Έτσι, είτε είναι καθαρότητας 98% είτε 55% έδωσε παρόμοια αποτελέσματα. Στην συγκέντρωση 0,1% ελήφθησαν παρόμοια αποτελέσματα με την ελευρωπαϊνή και το εκχύλισμα σταφυλιών, το οποίο όμως σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σταματά εντελώς την ανάπτυξη της φυτόφθορας, ήδη από το 0,5%.

Συνοπτικά, βλέπουμε πως πιο αποτελεσματικό είναι το εκχύλισμα από τα στέμφυλα στην συνέχεια το εκχύλισμα που είναι πλούσιο σε ελευρωπαϊνή και στην συνέχεια από το εκχύλισμα που προέρχεται από τον κασίγαρο. Όλα όμως τα εκχυλίσματα δίνουν πολύ καλά αποτελέσματα στην πυκνότερη συγκέντρωση 1%.



Εικόνα 8 Ενδεικτικά αποτελέσματα ακτινοειδούς ανάπτυξης *Colletotrichum*

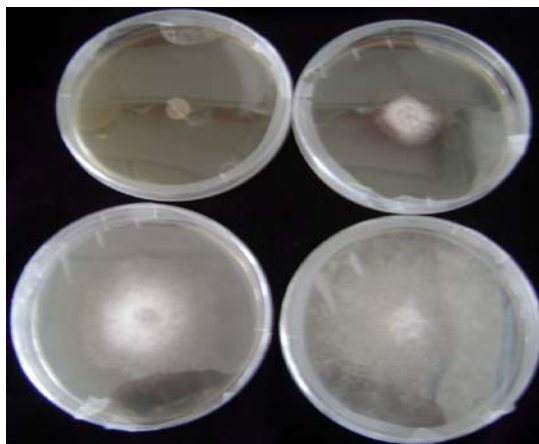


Εικόνα 9 Ακτινωτή ανάπτυξη *C. higginsianum* παρουσία και απουσία διαβαθμιζόμενων συγκεντρώσεων εκχυλισμάτων για την ανάσχεση της ανάπτυξης, βασισμένα στις μετρήσεις της έβδομης ημέρας. Παρατηρείται μια ανάσχεση της ανάπτυξης ανάλογη με την αύξηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος.

Όπως βλέπουμε στην Εικόνα 9, παρόμοια αποτελέσματα είχαμε και στην ανάπτυξη του μύκητα *C. higginsianum* μικρότερης όμως έντασης μάλλον εξαιτίας της αργότερης ανάπτυξης του μυκηλίου σε σχέση με αυτού της

φυτόφθορας. (βλ. εικ.8) Αναλυτικότερα βλέπουμε πώς η ανάπτυξη της ανάπτυξης του μύκητα είναι τόσο πιο έντονη όσο πιο μεγάλη είναι η συγκέντρωση του εκχυλίσματος. Στην μεγαλύτερη συγκέντρωση 1% η ανάπτυξη είναι πλήρης εκτός από την περίπτωση του εκχυλίσματος που προκύπτει από τον κατσίγαρο, όπου έχουμε μικρή ανάπτυξη του μύκητα. Στην χαμηλή συγκέντρωση 0,1% έχουμε ανάπτυξη της ανάπτυξης του μύκητα όχι όμως σε πολύ μεγάλο ποσοστό. Στην συγκέντρωση 0,5% η ανάπτυξη είναι λίγο μεγαλύτερη από το 50% ενώ στην περίπτωση του εκχυλίσματος στεμφύλων είναι πλήρης. Το εκχύλισμα στεμφύλων είναι το πιο αποτελεσματικό και σε αυτήν την σειρά πειραμάτων δίνοντας καλύτερα αποτελέσματα ακόμα και στην πιο χαμηλή συγκέντρωση. Συγκρίνοντας μεταξύ τους τα εκχυλίσματα πάλι έχουμε πιο αποτελεσματικό το εκχύλισμα στεμφύλων μετά την ελευρωπαΐνη που δεν διαφοροποιείται η αποτελεσματικότητα της από την καθαρότητα της, και τέλος το εκχύλισμα που προκύπτει από τον κατσίγαρο.

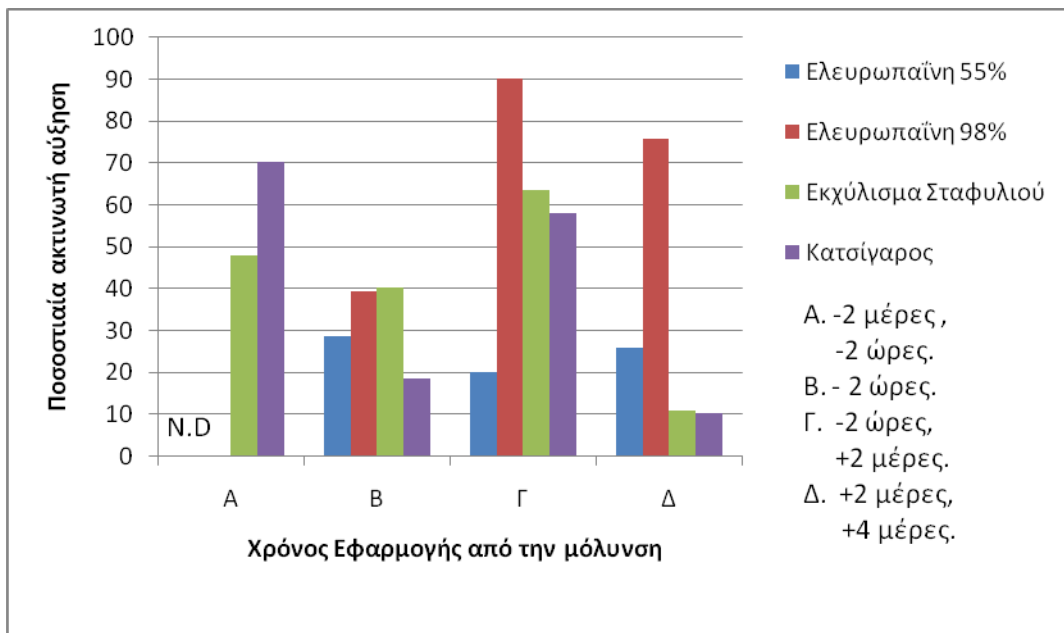
Συνοψίζοντας βλέπουμε πως η αποτελεσματικότητα της ανάπτυξης αυξάνει όσο αυξάνει η συγκέντρωση κάθε εκχυλίσματος. Τα καλύτερα αποτελέσματα τα έχει το εκχύλισμα του στεμφύλων και τα λιγότερο καλύτερα το εκχύλισμα από τον κατσίγαρο. Σημαντική διαφορά μεταξύ της ελευρωπαΐνης 98% καθαρότητας με αυτήν της 55% καθαρότητας δεν υπάρχει. Τα εκχυλίσματα φαίνεται να έχουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα ενάντια στην φυτόφθορα.



Εικόνα 10. Ενδεικτικά αποτελέσματα ακτινοειδούς ανάπτυξης φυτόφθορας

3.2.Ακτινοειδής ανάπτυξη

Η ανάσχεση της ανάπτυξης πραγματοποιήθηκε και σε *in planta* διαδικασία κατά την μόλυνση φύλλων καπνού με φυτόφθορα.(βλ. εικ.12) Όπως βλέπουμε στην Εικόνα 11 από τους χειρισμούς που κάναμε ο Δ (+2 μέρες, +4 μέρες) φαίνεται να έχει τα καλύτερα αποτελέσματα και ακολουθείται από τον ο Β (-2 ώρες). Εξαιρεση σε αυτόν τον γενικό «κανόνα» αποτελεί η περίπτωση της καθαρής ελευρωπαϊνης, η οποία δίνει καλύτερα αποτελέσματα στον χειρισμό Β. Οι χειρισμοί Α (-2 μέρες, -2 ώρες) και Γ (-2 ώρες, +2 μέρες) είχαν λιγότερα καλά αποτελέσματα τα οποία είναι παρόμοια μεταξύ τους.



Εικόνα 11 Ακτινωτή ανάπτυξη φυτόφθορας σε φύλλα καπνού. Αποτελεσματικότητα εκχυλισμάτων σε *in vivo* ακτινωτή αύξηση της φυτόφθορας, βασισμένη στις μετρήσεις της 7ης ημέρας.

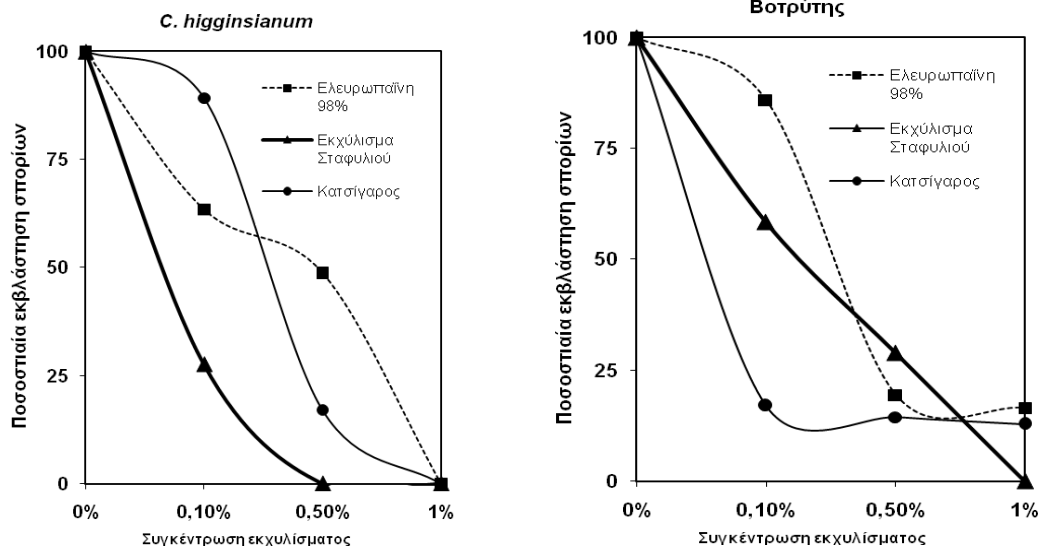
Η καθαρή ελευρωπαϊνή (καθαρότητας 98%) είχε την μικρότερη αποτελεσματικότητα, δίνοντας τα πιο καλά αποτελέσματα στον χειρισμό Β. Τα υπόλοιπα εκχυλίσματα ακολουθούν όλα την ίδια τάση μεταξύ τους. Έτσι τα λιγότερο καλά αποτελέσματα έχουμε στον χειρισμό Γ μετά στον Α μετά Β και τέλος τα καλύτερα στον Δ. Στον χειρισμό Α το εκχύλισμα στεμφύλων μας

δίνει καλύτερα αποτελέσματα από τον κασιγάρο, ενώ στον χειρισμό Β συμβαίνει το αντίθετο. Στους χειρισμούς Γ και Δ έχουν παρόμοια αποτελεσματικότητα. Τέλος η ελευρωπαϊνή 55% καθαρότητας μας δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα σε όλους τους χειρισμούς, εκτός από τον Δ που είναι τρίτο σε αποτελεσματικότητα μετά από το εκχύλισμα στεμφύλων και τον κασιγάρο.



Εικόνα 12 Ενδεικτικό μολυσμένο φύλλο όπου φαίνονται το σημείο τοποθέτησης του μύκητα και τα όρια της προσβολής από αυτόν.

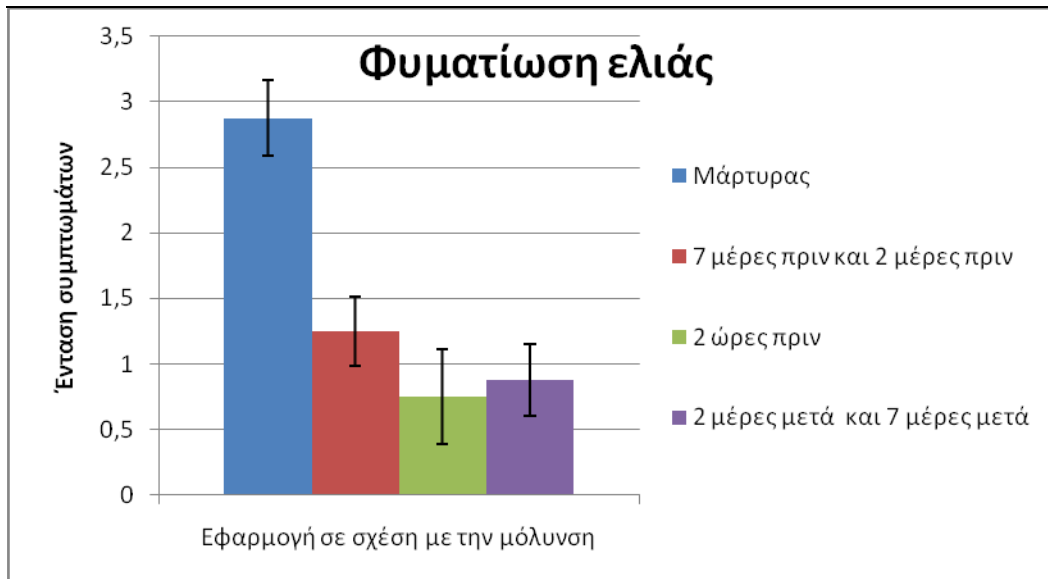
3.3. Εκβλάστηση σπορίων σε αυξανόμενη συγκέντρωση φυτικών εκχυλισμάτων



Εικόνα 13 Αποτελεσματικότητα εκχυλισμάτων σε εκβλάστηση σπορίων των μυκήτων *Colletotrichum* και του βοτρυτή αντίστοιχα. Αποτελέσματα από μετρήσεις τρίτης ημέρας.

Στην εκβλάστηση σπορίων βλέπουμε επαλήθευση της ανάσχεσης, της εκβλάστησης από τα εκχυλίσματα. Όπως βλέπουμε στην Εικόνα 13 όλα τα εκχυλίσματα σε αυξημένη συγκέντρωση προκάλεσαν πλήρη ανάσχεση της εκβλάστησης των σπορίων του *C. higginsianum* ενώ τα σπόρια του βοτρυτή αποδείχτηκαν πιο ανθεκτικά. Και στις δύο περιπτώσεις το εκχύλισμα στεμφύλων προκάλεσε πλήρη ανάσχεση της εκβλάστησης ενώ η ελευρωπαϊνή και ο κατσίγαρος μόνο στην περίπτωση του *C. higginsianum* αφού δείχνουν να παρουσιάζουν κάποια στασιμότητα, επιτρέποντας σε ένα ποσοστό σπορίων (λίγο λιγότερο του 20%) να εκβλαστήσει. Ο κατσίγαρος σε χαμηλές συγκεντρώσεις έδωσε καλύτερα αποτελέσματα ενάντια στη βλάστηση των σπορίων του βοτρυτή σε χαμηλές συγκεντρώσεις, χωρίς όμως να έχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Ακριβώς το αντίθετο συνάβει με την ελευρωπαϊνή, η οποία δίνει καλύτερα αποτελέσματα ενάντια στο *C. higginsianum*.

3.4. Φυτοπροστασία στην ελιά



Εικόνα 14 Φυματίωση της ελιάς. Αποτελεσματικότητα ελευρωπαϊνης καθαρότητας 98% στο καρκίνωμα της ελιάς. Υπάρχει εμφανής ανάσχεση της ανάπτυξης της ασθένειας.

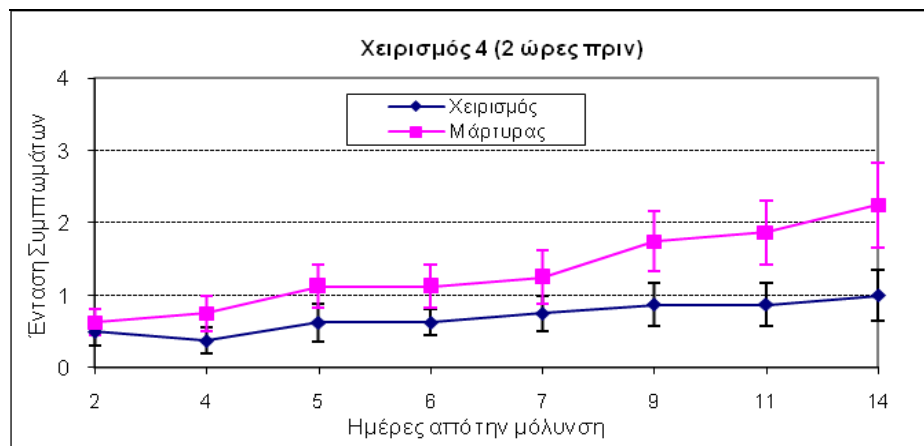
Όπως βλέπουμε στην Εικόνα 14 η εφαρμογή εξωγενούς ελευρωπαϊνης προκαλεί ανάσχεση της Φυματίωσης της ελιάς. Στον προληπτικό χειρισμό (7 μέρες πριν και 2 μέρες πριν) είχαμε μέτριας ανάπτυξης καρκινώματα ανεπτυγμένα, ενώ σε ένα φυτό 2 πληγές ήταν αμόλυντες και 2 εμφάνιζαν έντονα συμπτώματα. (βλ. εικ.15) Στον θεραπευτικό ψεκασμό είχαμε 2 φυτά στα οποία η μόλυνση ήταν ήπιας έντασης ενώ σε δύο φυτά δεν είχαμε μόλυνση. Στον χειρισμό που έγινε ψεκασμός 2 ώρες πριν την μόλυνση είχαμε ένα φυτό με μέτρια προς έντονα συμπτώματα ενώ τρία φυτά ήταν αμόλυντα. Συνοψίζοντας όλοι οι χειρισμοί ήταν αποτελεσματικοί με τον χειρισμό που έγινε ένας ψεκασμός 2 ώρες πριν την μόλυνση να μας δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα. Με μικρή διαφορά ακολουθεί ο χειρισμός με τις «θεραπευτικές» εφαρμογές και τα λιγότερο καλά αποτελέσματα μας δίνει ο προληπτικός χειρισμός. Οι διαφορές μεταξύ των χειρισμών δεν δείχνουν να είναι σημαντικές.



Εικόνα 15 Άποψη μολυσμένων φυτών

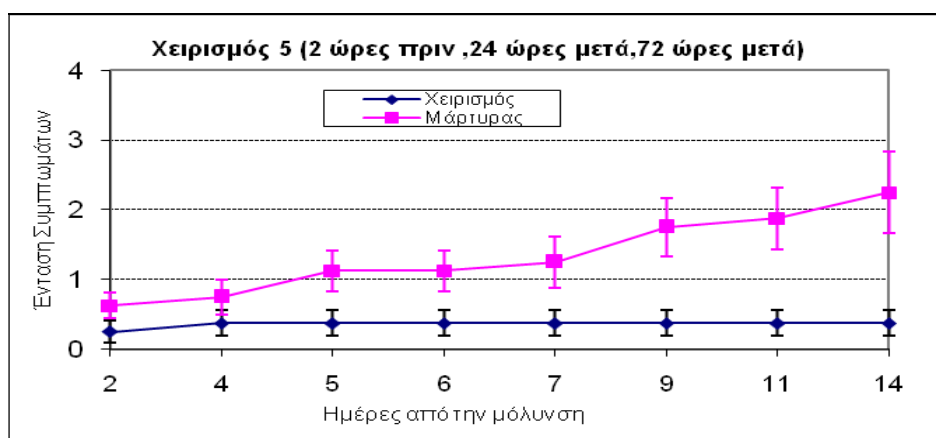
3.5. Φυτοπροστασία σε τομάτα

Στην τεχνητή μόλυνση, των φυτών τοματιάς, που κάναμε με την ψευδομονάδα (*P. syringae* pv. *tomato*, *Pst*) πραγματοποιήσαμε διάφορους χειρισμούς με κατσίγαρο και πήραμε ενδιαφέροντα αποτελέσματα.



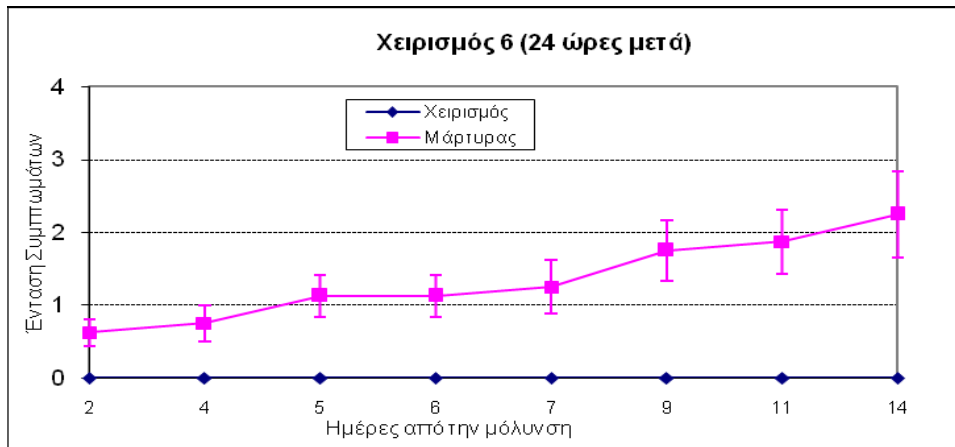
Εικόνα 16 Τεχνητή μόλυνση τοματιάς. Βαθμονόμηση έντασης συμπτωμάτων *Pst* στον χειρισμό 4. Ανάπτυξη συμπτωμάτων μικρότερης όμως έντασης.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 16 στον χειρισμό 4 (εφαρμογή 2 ώρες πριν τη μόλυνση) διαπιστώνουμε πως η χρονική εξέλιξη της έντασης των μακροσκοπικών συμπτωμάτων της ασθένειας είναι συνεχής τόσο στα φυτά-μάρτυρες όσο και σ' αυτά που εφαρμόστηκε ο ψεκασμός καθ' όλη την διάρκεια των παρατηρήσεων (14 μέρες). Ιδιαίτερα, μετά την 7^η - 8^η μέρα έχουμε εμφανώς πιο υγιή φυτά σε σχέση με το χειρισμό-μάρτυρα.



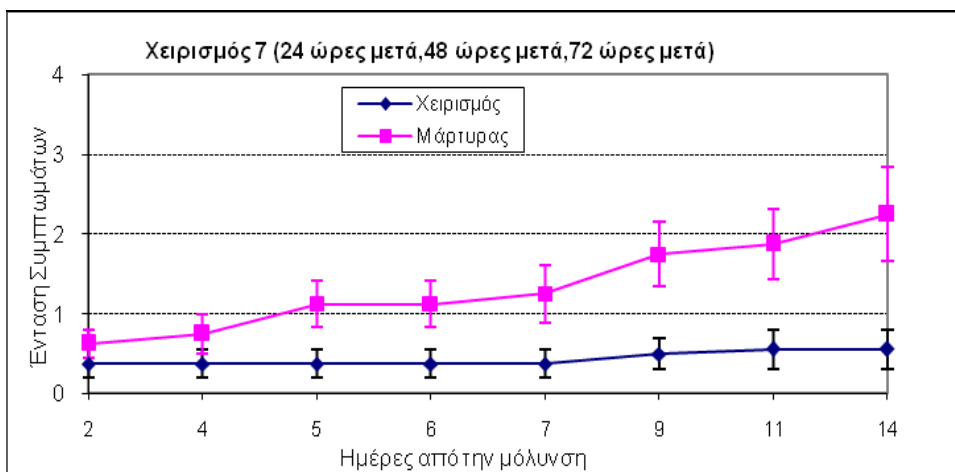
Εικόνα 17 Τεχνητή μόλυνση τοματιάς. Βαθμονόμηση της έντασης συμπτωμάτων *Pst* στον χειρισμό 5. Ανάσχεση της ανάπτυξης των συμπτωμάτων από την 4η μέρα.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 17 στον χειρισμό 5 (τριπλή εφαρμογή, μία 2 ώρες προ και δύο μετά [24 και 72 ώρες] απο τη μόλυνση) διαπιστώνουμε πως τα συμπτώματα της ασθένειας εντείνονται μέχρι την 4 ημέρα μετά την μόλυνση. Η ανάπτυξη τους όμως σταματά στα επίπεδα της 4 μέρας και είναι εμφανώς μικρότερη σε σχέση με το χειρισμό-μάρτυρα.



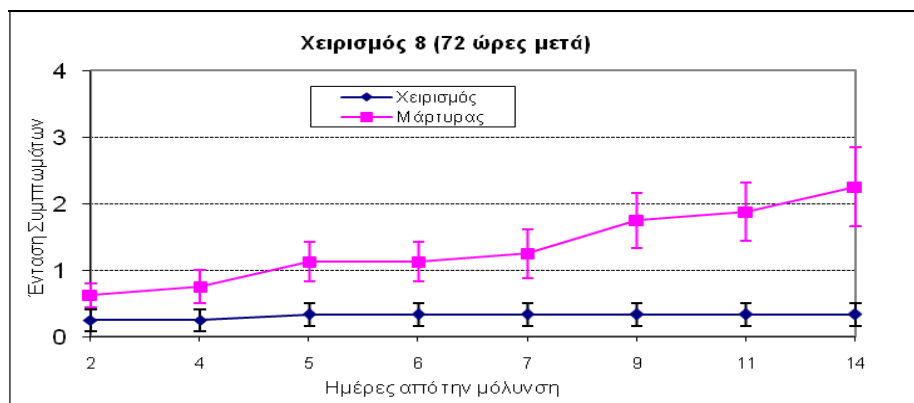
Εικόνα 18 Τεχνητή μόλυνση τοματιάς. Βαθμονόμηση της έντασης συμπτωμάτων Pst στον χειρισμό 6. Πλήρης ανάσχεση ανάπτυξης συμπτωμάτων της ασθένειας.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 18 στον χειρισμό 6 (εφαρμογή 24 ώρες μετά τη μόλυνση) διαπιστώνουμε πως τα συμπτώματα της ασθένειας δεν εξελίσσονται καθόλου. Η εξέλιξη τους έχει σταματήσει πλήρως οπότε στην ουσία τα φυτά παραμένουν υγιή.



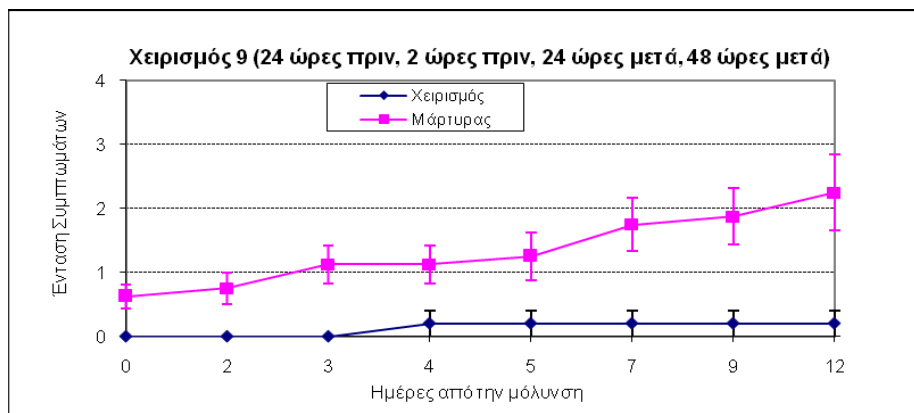
Εικόνα 19 Τεχνητή μόλυνση τοματιάς. Βαθμονόμηση της έντασης συμπτωμάτων Pst στον χειρισμό 7. Ανάσχεση ανάπτυξης των συμπτωμάτων της ασθένειας.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 19 στον χειρισμό 7 (24, 48 και 72 ώρες μετά από τη μόλυνση) διαπιστώνουμε πως τα συμπτώματα της ασθένειας δεν εντείνονται σε συνάρτηση με το χρόνο. Υπάρχει μια μικρή περαιτέρω αύξηση της έντασής τους μετά την έβδομη μέρα, όμως προς το τέλος των παρατηρήσεων τα συμπτώματα σταθεροποιούνται. Η τελική δριμύτητα των συμπτωμάτων είναι σαφώς σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τον μάρτυρα. Έτσι, ήδη από την 4^η μέρα και στο εξής τα φυτά είναι σαφώς πιο υγιή από ότι τα φυτά-μάρτυρες.



Εικόνα 20 Τεχνητή μόλυνση τοματιάς. Βαθμονόμηση της έντασης συμπτωμάτων Pst στον χειρισμό 8. Ανάσχεση ανάπτυξης των συμπτωμάτων της ασθένειας.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 20 διαπιστώνουμε πως τα συμπτώματα της ασθένειας στον μάρτυρα εξελίσσονται συνεχώς. Στον χειρισμό 8 (72 ώρες μετά τη μόλυνση) εξελίσσονται σαφώς λιγότερο, μέχρι την 5 μέρα, όπου η ανάπτυξη σταματά σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τον μάρτυρα.



Εικόνα 21 Τεχνητή μόλυνση τοματιάς. Βαθμονόμηση της έντασης συμπτωμάτων Pst στον χειρισμό 9. Ανάσχεση ανάπτυξης των συμπτωμάτων της ασθένειας.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 21 στον χειρισμό 9 (24 και 2 ώρες πριν, 24 και 48 ώρες μετά τη μόλυνση), που είναι και ο μόνος αποκλειστικά προληπτικός χειρισμός, διαπιστώνουμε πως τα συμπτώματα της ασθένειας εντείνονται από την τρίτη μέχρι την 4^η μέρα και στην συνέχεια σταματούν. Γενικώς παρουσιάζονται σε πολύ λίγα φύλλα οπότε έχουμε σχεδόν υγιή φυτά.

Σε όλους ανεξαρτήτως τους χειρισμούς είχαμε μικρότερη ένταση συμπτωμάτων σε σχέση με τον μάρτυρα. Η κύρια ανεξάρτητη μεταβλητή ήταν ο χρόνος και ο αριθμός εφαρμογών του εκχυλίσματος σε σχέση με την μόλυνση. Τα καλύτερα αποτελέσματα μας τα έδωσαν ο χειρισμοί 6 (+24h), και 9 (-24h, -2h, +48h) στο οποία τα φυτά πρακτικά δεν μολύνθηκαν. Οι υπόλοιποι χειρισμοί 5, 7, 8 έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα, όπου η ανάπτυξη των συμπτωμάτων ανακόπηκε, μετά το πέρασμα λίγων ημερών. Ο χειρισμός 4 (-2h) έδωσε καλά αποτελέσματα, όμως δεν ήταν τόσο αποτελεσματικός συγκρινόμενος με τους υπόλοιπους χειρισμούς. Έτσι, συνολικά είχαμε την ανάσχεση της εξέλιξης της ασθένειας σε όλους τους χειρισμούς, με εξαίρεση ίσως τον χειρισμό 4 (-2h) ο οποίος όμως στο τέλος έδειξε σαφώς μειωμένη ένταση των συμπτωμάτων της ασθένειας σε σχέση με τους μάρτυρες.

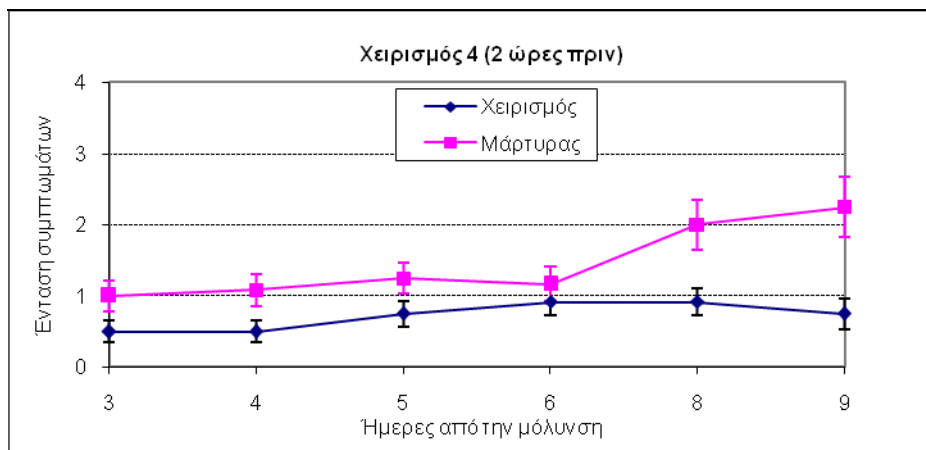
Συμπεραίνουμε πως το επίκαιρο των ψεκασμών έχει μεγάλη σημασία για την φυτοπροστατευτή δράση της ελευρωπαίνης μιας και οι χειρισμοί πέριξ ή/και κατά την διάρκεια την μόλυνσης παρουσιάζουν τα καλύτερα αποτελέσματα.



Εικόνα 22 Μολυσμένο φύλλο τοματιάς που φαίνονται τα συμπτώματα της ασθένειας (κηλίδες) μικρής έντασης

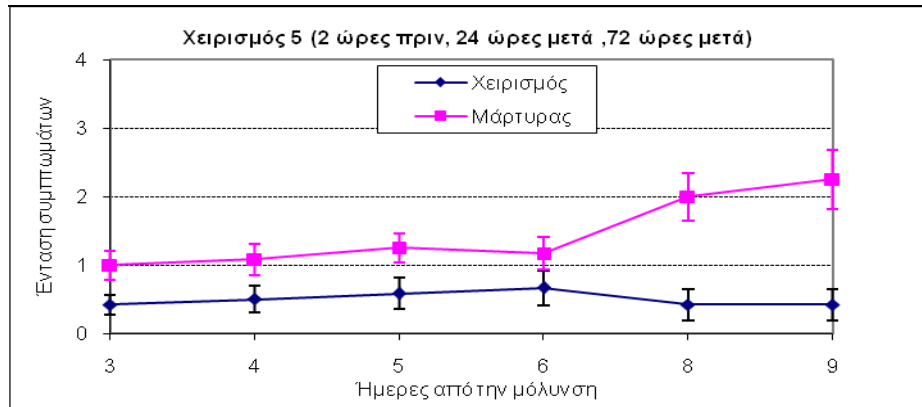
3.6. Φυτοπροστασία σε πιπεριά

Στην τεχνητή μόλυνση των φυτών πιπεριάς με ξάνθομονάδα (*X. campestris* pv. *vesicatoria*, *Xcv*) εφαρμόστηκαν διάφοροι χειρισμοί με εφαρμογή του εκχυλίσματος του καθαρής ελευρωπαΐνης (καθαρότητας 98%). Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω.



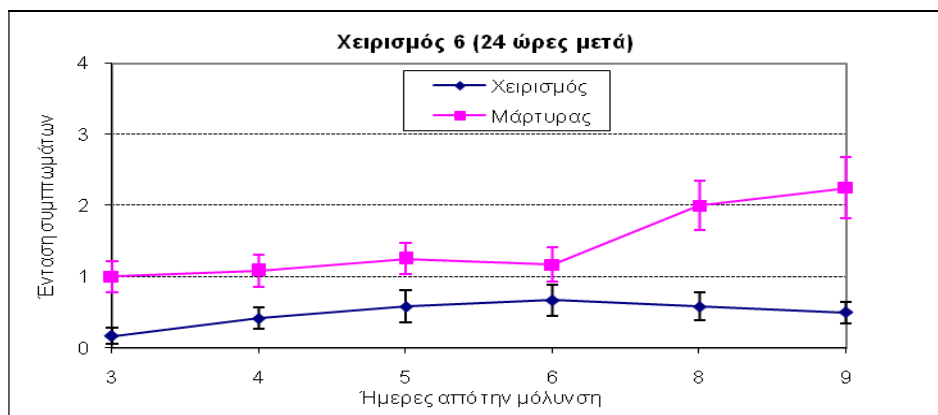
Εικόνα 23. Τεχνητή μόλυνση πιπεριάς. Ημερήσια βαθμονόμηση της έντασης συμπτωμάτων *Xcv* στον χειρισμό 4. Ανάσχεση της ανάπτυξης των συμπτωμάτων της ασθένειας.

Όπως βλέπουμε στην Εικόνα 23 στον χειρισμό 4 (εφαρμογή ελευρωπαΐνης 2 ώρες πριν τη μόλυνση) διαπιστώνουμε πως τα συμπτώματα εξελίσσονται αργά και σε χαμηλά επίπεδα. Η περαιτέρω ανάπτυξη τους σταματά και σταθεροποιείται στα προηγούμενα επίπεδα. Μέχρι και την 5^η μέρα τα συμπτώματα έχουν μικρότερη ένταση σε σχέση με τους μάρτυρες ενώ την 6^η μέρα φαίνονται να ισοσταθμίζονται. Στην συνέχεια όμως βλέπουμε περαιτέρω αύξηση της έντασης των συμπτωμάτων στους μάρτυρες ενώ στον χειρισμό 4 τα συμπτώματα παραμένουν στα ίδια επίπεδα με τα προηγούμενες μέρες και στην συνέχεια φαίνονται να μειώνονται ελαφρώς, με αποτέλεσμα τα φυτά να εμφανίζονται σαφώς πιο υγιή σε σύγκριση με τους μάρτυρες.



Εικόνα 24 Τεχνητή μόλυνση πιπεριάς. Ημερήσια βαθμονόμηση της έντασης συμπτωμάτων X_{cv} στον χειρισμό 5. Ανάσχεση της ανάπτυξης των συμπτωμάτων της ασθένειας.

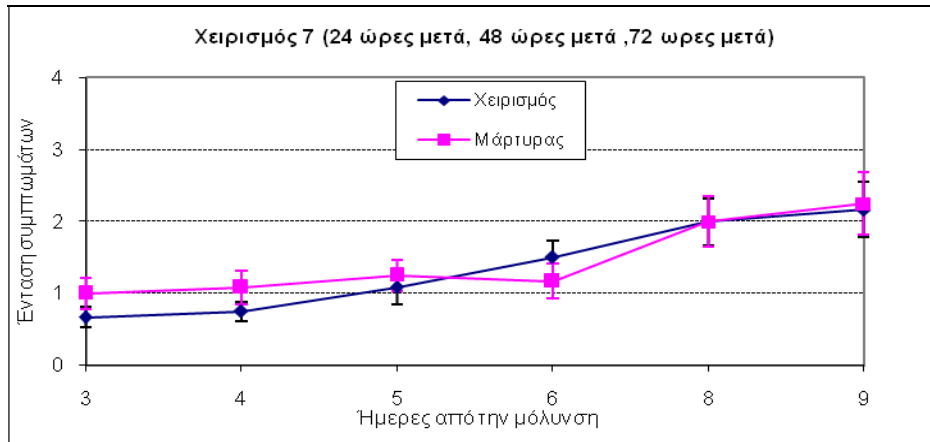
Όπως βλέπουμε στην Εικόνα 24 στον χειρισμό 5 διαπιστώνουμε πως τα συμπτώματα της ασθένειας αναπτύσσονται, μέχρι την 6^η μέρα. Μέχρι και την 5^η μέρα έχουμε συμπτώματα μικρότερης έντασης σε σχέση με τον μάρτυρα ενώ την 6^η μέρα φαίνονται να μην είναι στατιστικώς σημαντικά. Στην συνέχεια όμως του χρόνου βλέπουμε πως ο μάρτυρας συνεχίζει να ασθενεί με αυξανόμενη ένταση συμπτωμάτων ενώ στον χειρισμό 5 μειώνονται, με αποτέλεσμα τα φυτά να είναι πιο υγιή.



Εικόνα 25 Τεχνητή μόλυνση πιπεριάς. Ημερήσια βαθμονόμηση της έντασης συμπτωμάτων X_{cv} στον χειρισμό 6. Ανάσχεση της ανάπτυξης των συμπτωμάτων της ασθένειας.

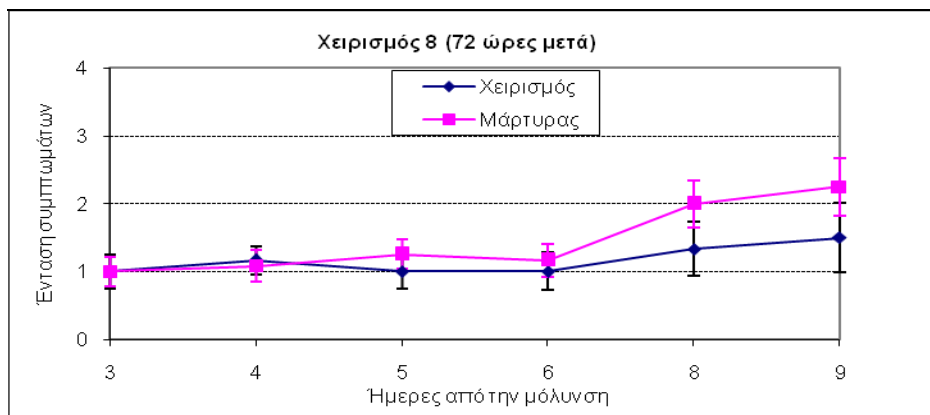
Όπως βλέπουμε στην Εικόνα 25 στον χειρισμό 6 (24 ώρες μετά) διαπιστώνουμε πως τα συμπτώματα της ασθένειας αναπτύσσονται, όμως τα φυτά παρουσιάζουν πολύ μικρή συμπτωματολογία. Τα συμπτώματα είναι μικρότερης έντασης σε σχέση με τους μάρτυρες καθ' όλη την διάρκεια των

παρατηρήσεων. Μετά την 6^η μέρα η ένταση των συμπτωμάτων μειώνεται, με αποτέλεσμα τα φυτά να παραμένουν πιο υγιή σε σύγκριση με τους μάρτυρες.



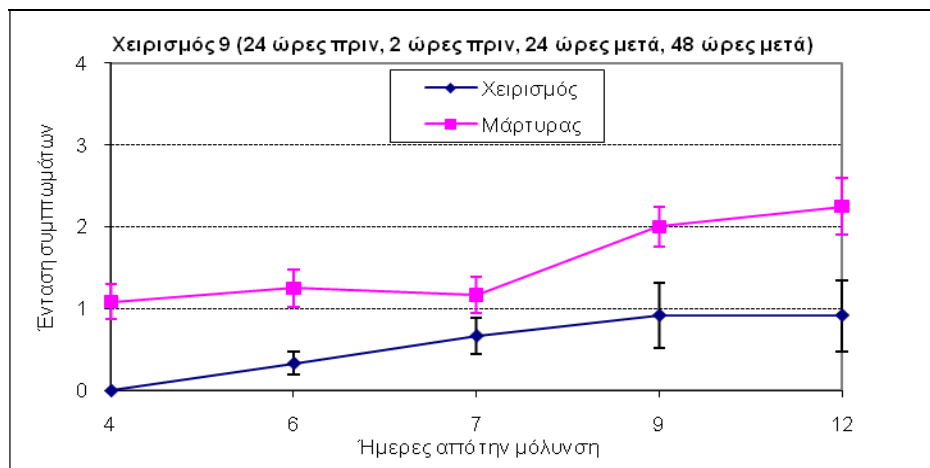
Εικόνα 26 Τεχνητή μόλυνση πιπεριάς. Ημερήσια βαθμονόμηση της έντασης συμπτωμάτων Χcn στον χειρισμό 7. Κανονική ανάπτυξη των συμπτωμάτων της ασθένειας.

Όπως βλέπουμε στην Εικόνα 26 στον χειρισμό 7 (24, 48 και 72 ώρες μετά τη μόλυνση) διαπιστώνουμε πως τα συμπτώματα της ασθένειας αυξάνουν σε ένταση συνεχώς, καθ' όλη την διάρκεια των παρατηρήσεων. Συγκρινόμενη με τον μάρτυρα παραμένει στα ίδια επίπεδα με παρόμοιο ρυθμό ανάπτυξης της ασθένειας. Στο τέλος των παρατηρήσεων η ένταση της ασθένειας είναι στην ίδια κλίμακα και στις δύο περιπτώσεις. Μια πιθανή ερμηνεία είναι ότι ο χειρισμός αυτός ίσως να μην μπορεί να δράσει κατασταλτικά αφού δεν προκάλεσε καθόλου ανάσχεση στην ένταση των συμπτωμάτων της ασθένειας.



Εικόνα 27 Τεχνητή μόλυνση πιπεριάς. Ημερήσια Βαθμονόμηση της έντασης συμπτωμάτων Χcn στον χειρισμό 8. Μικρή ανάσχεση της ανάπτυξης των συμπτωμάτων της ασθένειας.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 27 στον χειρισμό 8 (72 ώρες μετά τη μόλυνση) διαπιστώνουμε πως τα συμπτώματα της ασθένειας αναπτύσσονται κυρίως μετά την 6^η μέρα. Η ανάπτυξη των συμπτωμάτων συνεχίζεται κανονικά και τις επόμενες μέρες παραμένει στους ίδιους ρυθμούς εξέλιξης της ασθένειας σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Προς το τέλος των παρατηρήσεων η ένταση της ασθένειας παραμένει ελαφρώς χαμηλότερη από αυτήν στους μάρτυρες, χωρίς όμως η διαφορά να φαίνεται σημαντική.



Εικόνα 28 Τεχνητή μόλυνση πιπεριάς. Ημερήσια βαθμονόμηση της έντασης συμπτωμάτων X_{cn} στον χειρισμό 9. Ανάσχεση της ανάπτυξης των συμπτωμάτων της ασθένειας.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 28 στον χειρισμό 9 (24 και 2 ώρες πριν, 24 και 48 ώρες μετά τη μόλυνση) διαπιστώνουμε πως τα συμπτώματα της ασθένειας εντείνονται ραγδαία μέχρι και την ένατη μέρα, όποτε φτάνει στα υψηλότερα επίπεδα. Την 9^η μέρα σταμάτα η αύξηση της έντασης των συμπτωμάτων. Συγκρινόμενη με τον μάρτυρα η συμπτωματολογική εικόνα παραμένει σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τους μάρτυρες.

Ο χειρισμός 5 (-2h,+24h,+72h) ήταν αυτός που μας έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα, πολύ παρόμοια με τους χειρισμούς 4 (-2h) και 6 (+24h) που μας έδωσαν επίσης πολύ καλά αποτελέσματα. Τα αμέσως καλύτερα αποτελέσματα έδωσε ο χειρισμός 9, με τους δύο προληπτικούς ψεκασμούς. Τέλος λιγότερο αποτελεσματικός ήταν ο χειρισμός 8 (+72h), ενώ ο χειρισμός 7 (+24,+48,+72) δεν έδωσε θετικό αποτέλεσμα. Στους χειρισμούς 4 (-2h), 5 (-2h,+24h, +72h) και 6 (+24h) παρατηρήθηκε

ανάσχεση της ανάπτυξης της ασθένειας και προς το τέλος των παρατηρήσεων είχαμε ελαφριά μείωση της έντασης των συμπτωμάτων. Στον χειρισμό 9 είχαμε ανάσχεση της ανάπτυξης των συμπτωμάτων, και στασιμότητα της ανάπτυξης τους μετά την 9^η μέρα. Στους χειρισμούς 8 (+72h) και 7 (+24,+48h,+72h) δεν είχαμε θετικά αποτελέσματα καθότι η ανάσχεση ήταν σε επίπεδα τα οποία δεν διαφέρουν σημαντικά από τους μάρτυρες.

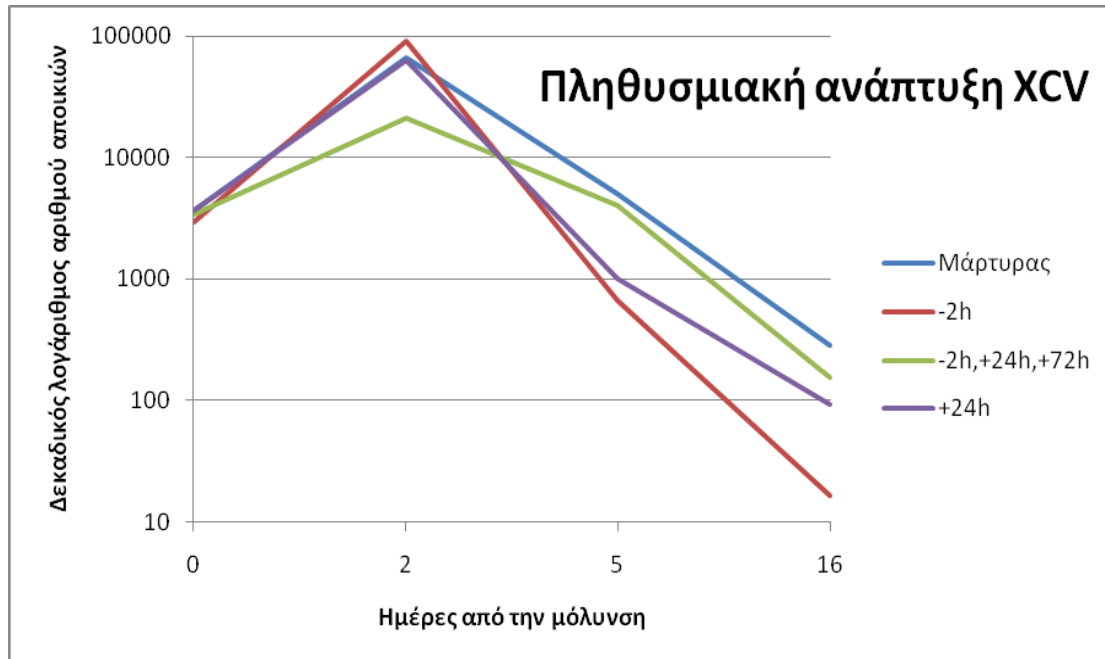
Συμπερασματικά, το επίκαιρο των ψεκασμών φαίνεται πως είναι σημαντικό και στις εφαρμογές στην πιπεριά, και οι κατασταλτικοί ψεκασμοί δεν παρουσιάζουν καλά αποτελέσματα. Πιθανολογούμε πως αυτό οφείλεται στην καλύτερη και ταχύτερη μόλυνση των φυτών της πιπεριάς από το παθογόνο σε σχέση με την αντίστοιχη στην τομάτα.



Εικόνα 29 Μολυσμένο φύλλο πιπεριάς, όπου φαίνονται τα συμπτώματα (μεταχρωματισμοί) που προκάλεσε η ασθένεια.

3.7. Πληθυσμιακή ανάλυση

Από την πληθυσμιακή ανάλυση φαίνεται η επιφυτική προσαρμογή για μόλυνση από το παθογόνο στα συγκεκριμένα φυτά πιπεριάς. Η εφαρμογή του εκχυλίσματος της ελευρωπαΐνης (καθαρότητας 55%) δείχνει να προκαλεί μείωση του μολύσματος τις πρώτες μέρες μετά την εφαρμογή του.



Εικόνα 30 Πληθυσμιακή καμπύλη ανάπτυξης *X. campestris* pv. *vesicartoria* σε φυτά πιπεριάς. Εμφανής μείωση του βακτηριακού πληθυσμού τις πρώτες μέρες μετά το χειρισμό με ημικαθαρή ελευρωπαΐνη, (καθαρότητας 55%) σε τελική συγκέντρωση εκχυλίσματος 0,2%.

Αναλυτικότερα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 30, βλέπουμε πως ο χειρισμός με την εφαρμογή του εκχυλίσματος 2 ώρες πριν από την μόλυνση, παρότι αρχικά ο βακτηριακός πληθυσμός αυξάνεται ταχύτερα και σε φθάνει σημαντικά υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τα φυτά-μάρτυρες, στην συνέχεια επισπεύδει την ραγδαία μείωση του (βιώσιμου) βακτηριακού πληθυσμού με τελικό αποτέλεσμα στις μετέπειτα ημέρες ο πληθυσμός των βακτηρίων να είναι πολύ μικρότερος από αυτόν στους μάρτυρες. Οι τρεις χειρισμοί δείχνουν να επιβραδύνουν την αρχική ανάπτυξη του βακτηρίου, κρατώντας τους πληθυσμούς σε χαμηλότερα επίπεδα από τον μάρτυρα. Στην συνέχεια παρατηρείται μείωση των πληθυσμών αλλά με αργότερο ρυθμό από τα φυτά-

μάρτυρες αρχικά, που στην συνέχεια όμως αυτός εξισώνεται με εκείνον στους μάρτυρες. Οι βακτηριακοί πληθυσμοί καθ' όλη την διάρκεια των παρατηρήσεων είναι σαφώς μικρότεροι σε όλους τους χειρισμούς σε σχέση με τους μάρτυρες. Στην εφαρμογή 24 ώρες μετά την μόλυνση έχουμε ακριβώς τον ίδιο ρυθμό πληθυσμιακής ανάπτυξης, όμως στη συνέχεια παρατηρείται σαφώς πιο ραγδαία μείωση του πληθυσμού σε σχέση με τους μάρτυρες, και ο βακτηριακός πληθυσμός πέφτει σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα από τα αρχικά.

Συμπερασματικά, όλοι οι χειρισμοί έδωσαν καλά ή πολύ καλά αποτελέσματα. Πιο αποτελεσματική προστασία φαίνεται να επιτυγχάνεται με την εφαρμογή των σκευασμάτων 2 ώρες πριν την μόλυνση. Ο χειρισμός αυτός είναι αυτός ο οποίος έχει και τους χαμηλότερους πληθυσμούς. Η μεταχείριση με τις πολλαπλές εφαρμογές του εκχυλίσματος είναι αυτή που περιορίζει τους πληθυσμούς στα χαμηλότερα επίπεδα κατά τα αρχικά στάδια της βακτηριακής ανάπτυξης. Στο ερώτημα ποιος χειρισμός είναι ο πιο αποτελεσματικός, από επιδημιολογικής πλευράς και συνάμα ο απλούστερος η απάντηση είναι ίσως η εφαρμογή του σκευάσματος 2 ώρες πριν την μόλυνση, καθότι αυτή οδηγεί στην πιο ραγδαία μείωση του πληθυσμού μετά τη 2^η μέρα και στους χαμηλότερους πληθυσμούς με την πάροδο του χρόνου (16 μερες).



Εικόνα 31 Μολυσμένο φύλλο πιπεριάς, όπου φαίνονται τα συμπτώματα που προκάλεσε η ασθένεια. Λείπει ο φυλλικός δίσκος που χρησιμοποιήθηκε για την πληθυσμιακή ανάλυση.

4. Συμπεράσματα-Συζήτηση

Τα τέσσερα φυτικά εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία - κατσιγάρος, εκχύλισμα στεμφύλων, καθαρή (καθαρότητας 98%) και ημικάθαρη (καθαρότητας 55%) ελευρωπαΐνη - όλα αποδείχτηκαν ότι έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι των περισσότερων φυτικών παθογόνων που εξετάστηκαν. Το γεγονός αυτό αποδεικνύεται από τη παρεμπόδιση της μυκηλιακής αύξησης (μύκητες, Ωομυκητας) ή αποικιών (βακτήρια) in vitro. Επίσης, στην πλειονότητα των περιπτώσεων που δοκιμάστηκαν, αποδείχτηκαν και οι φυτοπροστατευτικές ιδιότητες προκαλώντας μείωση της δριμύτητας των παθολογικών συμπτωμάτων σε μια σειρά από φυτά γεωργικής σημασίας μετά από πειραματική μόλυνση. Εάν και κατά πόσον η φυτοπροστατευτική ικανότητα των σκευασμάτων έναντι παθογόνων σε συνθήκες αγρού ή θερμοκηπίου υπό συνθήκες φυσικής μόλυνσης παραμένει να καταδειχθεί. Τα εκχυλίσματα μας έδωσαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα και σε αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις, μικρότερες του 1%. Αυτό το γεγονός μπορεί να καταστήσει εφικτή και την πιθανή χρήση τους στη γεωργική πράξη, πιθανόν ακόμα και την εμπορικοποίηση, αφού γίνουν περαιτέρω έρευνες για το σκοπό αυτό σε κλίμακα αγρού/θερμοκηπίου.

Τα θετικά αποτελέσματα στην περίπτωση της φυματίωσης της ελιάς ενθαρρύνουν περαιτέρω μελέτες, καθότι η ασθένεια αποτελεί ένα πολύ μεγάλο και δυσεπίλυτο πρόβλημα για την ελαιοκαλλιέργεια. Ουσιαστική λύση για το πρόβλημα δεν υπάρχει και καλλιεργητικές τεχνικές (κατάλληλο κλάδεμα, κάλυψη πληγών) ή χρήση χαλκούχων φυτοφαρμάκων δεν είναι εμπράκτως αποτελεσματικές ή δύσκολα εφαρμόζονται στην πράξη. Η πιθανή χρήση του σκευάσματος της ελευρωπαΐνης μπορεί να συνδυάσει την ολοκληρωμένη διαχείριση στον ελαιώνα και την εκμετάλλευση των φύλλων που πέφτουν κατά την συγκομιδή και κλάδεμα ως πρώτης ύλης.

Από τα πειράματα τεχνητής μόλυνσης, και το χρονοδιάγραμμα εφαρμογής που εφαρμόστηκαν μπορούμε να συμπεράνουμε πως προϋπόθεση

για την αποτελεσματική χρήση των εκάστοτε εκχυλισμάτων για την προστασία φυτών από βακτηριακές ασθένειες, είναι οι εφαρμογές να γίνουν εγκαίρως. Η επίκαιρη βέβαια εφαρμογή για την προστασία φυτών από βακτηριακές ασθένειες είναι μια πάγια απαίτηση για την αποτελεσματικότητα των προφυλακτικών κυρίως επεμβάσεων. Από την άλλη μεριά η προληπτική χρήση φυτοφαρμάκων για προστασία των φυτών δεν είναι πάντοτε από μόνη της αποτελεσματική. Αντίστοιχα μια προληπτική εφαρμογή του εκχυλίσματος της ελευρωπαΐνης, έχει ενδείξεις αποτελεσματικότητας, αν και στις περιπτώσεις που εξετάστηκαν αυτό χρήζει περισσότερης έρευνας. Οι περισσότερες σε αριθμό επεμβάσεις δεν είναι τόσο μεγάλης σημασίας όσο είναι η έγκαιρη εφαρμογή στα φυτά. Αν η εφαρμογή φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων γίνει καθυστερημένα σε σχέση με την έναρξη της μόλυνσης η αποτελεσματικότητα συνήθως μειώνεται σημαντικά. Ενθαρρυντικά αποτελέσματα, μετά την προσβολή από το παθογόνο, μας δίνει η περίπτωση του εκχυλίσματος στεμφύλων, πάλι όμως χρήζει περαιτέρω έρευνας.

Από τα αποτελέσματα της πληθυσμιακής ανάλυσης μπορούμε να πούμε πως προέκυψαν ενδείξεις διπλής δράσης ενάντια στα παθογόνα: άμεση μείωση του πληθυσμού των βακτηρίων, αλλά και ανάσχεση της αύξησης των βακτηρίων κατά την μετέπειτα εκδήλωση της ασθένειας. Η πρώτη εκδοχή ενισχύεται από τα *in vitro* αποτελέσματα, ενώ η δεύτερη από την εφαρμογή των σκευασμάτων στον καπνό μετά την μόλυνση καθώς και στην ελιά. Και στις δύο περιπτώσεις έχουμε μείωση του δυναμικού του μολύσματος για μελλοντικές προσβολές.

Λαμβάνοντας υπόψη και αποτελέσματα από άλλα πειράματα του εργαστηρίου με τα ίδια εκχυλίσματα (Skandalis *et al.* αδημοσίευτα αποτελέσματα), όπου προέκυψαν ενδείξεις ότι η ελευρωπαΐνη προάγει την παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) (2), με αποτέλεσμα το φυτό να εκφράζει μηχανισμούς επαγόμενης βιοχημικής άμυνας που ενισχύουν την αποτελεσματικότητα της και διαφοροποιούν τον τρόπο δράσης τους ενάντια στα παθογόνα.

Βασιζόμενοι στην βιβλιογραφία για τα φυτικά εκχυλίσματα που είναι σήμερα διαθέσιμα εμπορικά για άλλους σκοπούς, θα ήταν άξια λόγου η περαιτέρω μελέτη τους ιδιαίτερα αν αναλογιστούμε ότι δύο από αυτά, η ελευρωπαΐνη και η ρεσβερατρόλη, συμπεριλαμβάνονται στην διατροφή του ανθρώπου.

Το γεγονός ότι περισσότερα από τα εκχυλίσματα αυτά έχουν προέλευση ή περιέχουν ουσίες που υπάρχουν σε δευτερογενή απόβλητα παραγωγής δείχνουν έναν διαφορετικό τρόπο αξιοποίησης τους. Αυτή η αξιοποίηση μπορεί να έχει διπλό όφελος καθότι καταρχάς είναι φυσικής προέλευσης, οπότε μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φυτοπροστατευτικά προϊόντα σε βιολογικές καλλιέργειες, και διότι είναι παραπροϊόντα τα οποία, ως απόβλητα, ρυπαίνουν το περιβάλλον. Έτσι μια εναλλακτική πρακτική χρήση τους εκ πρώιμιου είναι ωφέλιμη και από την σκοπιά της περιβαλλοντικής προστασίας, ιδιαίτερα στο σημερινό κλίμα περιβαλλοντικής συνείδησης.

Βιβλιογραφία

1. *Βεκιάρη ΣΑ* (2001) "Οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου και η σημασία τους στην ποιότητά του", *Χημικά Χρονικά*, Φεβρ. (2): 45-48
2. Γεωργούλη Μιρέλλα (2010) "Μελέτη της επαγωγής μηχανισμών άμυνας φυτών σε μικροβιακά παθοσυστήματα και απομόνωση γονιδίων που κωδικεύουν συνθετάσες της χυτίνης σε μύκητες και ωομύκητες." Πτυχιακή εργασία
3. *Ντογρα Κ.* (2005) "Ειδική λαχανοκομία Ι", Εκδόσεις Α.Π.Θ.
4. *Παπακώστα-Τασοπούλου Δ.* (2002) "Βιομηχανικά Φυτά", Εκδόσεις σύγχρονη παιδεία
5. *Σφακιωτάκης Ε.* (1993) "Μαθήματα Ελαιοκομίας", Εκδόσεις τυρο ΜΑΝ
6. *Aggarwal, B. B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R. S., Seeram, N. P., Shishodia, S., and Takada, Y.* (2004) Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 24, 2783–2840
7. *Agrios George N.* (2005) *Plant Phytopathology*, Fifth Edition, Elsevier Academic Press.
8. *Amiot M-J, Fleuriet A, Macheix J-J* (1989) "Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation", *Phytochemistry* 28:67-69
9. *Asensi M, Medina I, Ortega A, Carretero J, Baño MC, Obrador E, Estrela JM.* (2002) "Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability", *Free Radic. Biol. Med.* 33:387-398
10. *Baur, J. A., Pearson, K. J., Price, N. L., Jamieson, H. A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V. V., Allard, J. S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., Pistell, P. J., Poosala, S., Becker, K. G., Boss, O., Gwinn, D., Wang, M., Ramaswamy, S., Fishbein, K. W., Spencer, R. G., Lakatta, E. G., Le Couteur, D., Shaw, R. J., Navas, P., Puigserver, P., Ingram, D. K., de Cabo, R., and Sinclair, D. A.* (2006) "Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet", *Nature* 444, 337–342
11. *Baur, J. A. and Sinclair, D. A.* (2006) "Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence", *Nat. Rev. Drug. Discov.* 5, 493–506

12. *Bourquelot E, Vintilesco JCR* (1908) "Sur l'oleuropein, nouveau principe de nature glucosidique retri de l'olivier (*Olea europaea* L.)", *Cmpt. Rend. Herbd. Acad. Sci.* 147:533-535
13. *Brenes M, Rejano L, Garcia P, Sanchez AH, Garrido A* (1995) "Biochemical changes in phenolic compounds during Spanish style green olive processing", *J. Agric. Food Chem.* 43:2702-2706
14. *Burt, S.* (2004) "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review", *Int. J. Food Microbiol.*, 94, 223–253
15. *Carbó N, Costelli P, Baccino FM, López-Soriano FJ, Argilés JM.* (1999) "Resveratrol, a natural product present in wine, decreases tumour growth in a rat tumour model", *Biochem. Biophys. Res. Commun* 254:739-743
16. *Leonard G Copping and Stephen O Duke* (2007) "Natural products that have been used commercially as crop protection agents" *Pest Manag Sci* 63:524–554
17. *Draughon, F. A.* (2004) "Use of botanicals as biopreservatives in foods" *Food Technol.*, 58, 20–28
18. *Fleming HP, Walter WM, Etchells JL* (1973) "Preparation of antimicrobial compounds by hydrolysis of oleuropein from green olives", *Appl. Microbiol* 26:773-776
19. *Franck E. Dayan, Charles L. Cantrell, Stephen O. Duke* (2009) "Natural products in crop protection", *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17, 4022–4034
20. *Guiso M, Marra C* (2005) "Highlights in oleuropein aglycone structure", *Natural Product Res.* 19(2):105-109
21. *Hall S* (2003) "Longevity research. In vino vitalis? Compounds activate life-extending genes", *Science* 301:11-12
22. *Howitz, K. T., Bitterman, K. J., Cohen, H. Y., Lamming, D. W., Lavu, S., Wood, J. G., Zipkin, R. E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L. L., Scherer, B., and Sinclair, D. A.* (2003) Small molecule activators of

sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425, 191–196

23. http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_oleuropein.htm

24. http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_resveratrol.htm

25. http://www.aegean.gr/environment/eda/naias/apovlita_gr.htm

26. Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W., Fong, H. H., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. G., Moon, R. C., and Pezzuto, J. M. (1997) Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275, 218–220

27. Jayatilake, G. S., Jayasuriya, H., Lee, E. S., Koonchanok, N. M., Geahlen, R. L., Ashendel, C. L., McLaughlin, J. L., and Chang, C. J. (1993) Kinase inhibitors from *Polygonum cuspidatum*. *J. Nat. Prod.* 56, 1805–1810

28. Kaeberlein M, Rabinovitch PS (2006) "Grapes versus gluttony. A compound found in red grapes called resveratrol improves the health and lifespan of mice on a high-calorie diet", *Nature* 444:280-281

29. Kimura, Y., Okuda, H., and Arichi, S. (1985) Effects of stilbenes on arachidonate metabolism in leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 834, 275–278

30. Kopp, P. (1998) Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the "French paradox"? *Eur. J. Endocrinol.* 138, 619–620

31. Mollerup S, Ovrebo S, Haugen A (2001) "Lung carcinogenesis: resveratrol modulates the expression of genes involved in the metabolism of PAHs in human bronchial epithelial cells", *Int. J. Cancer* 92, 18-25

32. Mizutani, K., Ikeda, K., Kawai, Y., and Yamori, Y. (2000) Resveratrol attenuates ovariectomy-induced hypertension and bone loss in

- strokeprone spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* (Tokyo) 46, 78–83.
33. *Niaounakis M, Halvadakis CP* (2006) "Olive Processing Waste Management. Literature Review and Patent Survey, 2nd edition. Waste Management", Vol. 5), Pergamon-Elsevier, Amsterdam
34. *Panizzi LM, Scarpati JM, Oriente EG* (?) "Constituzione della oleuropeina, glucoside, glicoside amaro e ad azione ipotensiva dell'olivo", *Org. Prep. Proc. Int.* 4:97-104
35. *Renaud S, De Lorgeril M* (1992) "Wine, alcohol, and the French paradox for coronary heart disease", *Lancet* 339:1523-1525
36. *Schultz J* (2004) "Resveratrol may be a powerful cancer-fighting ally", *J. Natl. Cancer Inst.* 96:1497-1498
37. *Soleas GJ, Grass L, Josephy PD, Goldberg DM, Diamandis EP* (2002) "A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols", *Clin Biochem.* 35:119-124
38. *Stivala LA, Savio M, Carafoli F, Perucca P, Bianchi L, Maga G, Forti L, Pagnoni UM, Albini A, Prosperi E, Vannini V* (2001) "Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol", *J Biol Chem* 276: 22586-22594
39. *Ungvari, Z., Orosz, Z., Rivera, A., Labinskyy, N., Xiangmin, Z., Olson, S., Podlutzky, A., and Csiszar, A.* (2007) Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 292, H2417–H2424.
40. *Valenzano, D. R., Terzibasij, E., Genade, T., Cattaneo, A., Domenici, L., and Cellerino, A.* (2006) Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Curr. Biol.* 16, 296–300
41. *Visioli F, Vinceri FF, Galli C* (1995) "Waste waters from olive oil production are rich in natural antioxidants", *Experientia* 51:32-34

42. *Wilkins KM, Board RG* (1989) Natural antimicrobial systems. In: Gould GW, editor. Mechanisms of action of food preservation procedures. London: Elsevier Applied Sciences
43. *Wood, J. G., Rogina, B., Lavu, S., Howitz, K., Helfand, S. L., Tatar, M., and Sinclair, D.* (2004) Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* 430, 686–689
44. *Wu JM, Wang ZR, Hsieh TC, Bruder JL, Zou JG, Huang YZ* (2001) "Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine", *Int. J. Mol. Med.* 8:3-17
45. *Shufeng Zhou, Hwee-Ling Koh, Yihuai Gao, Zhi-yuan Gong, Edmund Jon Deoon Lee* (2004) "Herbal bioactivation: The good, the bad and the ugly" *Life Sciences* 74, 935–968