

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ



ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΔΟΜΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**Αποτελεσματικότητα φυσικών προϊόντων στην
αντιμετώπιση ευαίσθητων και ανθεκτικών σε
μυκητοκτόνα στελεχών του μύκητα *Alternaria*
alternata.**



ΤΣΙΟΥΡΗ ΜΑΡΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2015

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ



ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΔΟΜΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Της Τσιούρη Μαρίας

με θέμα:

**Αποτελεσματικότητα φυσικών προϊόντων στην
αντιμετώπιση ευαίσθητων και ανθεκτικών σε
μυκητοκτόνα στελεχών του μύκητα *Alternaria
alternata*.**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Επιβλέπουσα: Φλουρή Φωτεινή, Λέκτορας της Γεωργικής Φαρμακολογίας, ΓΠΑ

Μέλη: Αντωνίου Πολύμνια, Επίκουρος Καθηγήτρια Φυτοπαθολογίας, ΓΠΑ

Τζάμος Σωτήριος, Επίκουρος Καθηγητή Φυτοπαθολογίας, ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ

2015

Ευχαριστίες

Η γνώση και η εμπειρία που αποκομίζει κανείς από την εκπόνηση μιας διπλωματικής εργασίας εξαρτώνται, όχι μόνο από την ατομική προσπάθεια αλλά και από τη συμβολή των καθηγητών.

Πρώτα από όλους θέλω να ευχαριστήσω την επιβλέπουσά μου, Λέκτορα της Γεωργικής Φαρμακολογίας, ΓΠΑ, Φλουρή Φωτεινή, για την τιμή που μου έκανε να επιβλέψει τη διπλωματική μου εργασία, καθώς και για την καθοδήγηση, την αμέριστη συμπαράσταση και εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρο Καθηγήτρια Φυτοπαθολογίας, ΓΠΑ, Αντωνίου Πολύμνια και τον Επίκουρο Καθηγητή Φυτοπαθολογίας, ΓΠΑ, Τζάμο Σωτήριο, για την τιμή που μου έκαναν να αποτελέσουν μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Εργαστηριακό και Διδακτικό Συνεργάτη της Γεωργικής Φαρμακολογίας, Μαλανδράκη Αναστάσιο, για την πολύτιμη βοήθεια του καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας μου.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 Φυτικά εκχυλίσματα και αιθέρια έλαια (EOs)	7
1.1.1 Εκχύλισμα σπερμάτων του φυτού Πομπελομοσία η βοτρυόκαρπος (Grapefruit Seed Extract, GSE)	11
1.1.2 Αιθέριο έλαιο του Τειοδένδρου Αυστραλίας (Tea tree oil)	14
1.1.3 Θυμόλη (Thymol).....	17
1.2 Ο μύκητας <i>Alternaria alternata</i>	20
1.3 Ανθεκτικότητα	23
1.4 Χημειοευαισθητοποίηση (Chemosensitization)	25
2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	27
2.1 Υλικά και Μέθοδοι	27
2.1.1 Υλικά	27
2.1.2 Μέθοδοι	33
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	42
3.1 Διερεύνηση της αποτελεσματικότητας εκχυλίσματος σπόρων (Grapefruit seed extract, GSE) στη παρεμπόδιση του μύκητα <i>Alternaria alternata</i> σε στερεό υπόστρωμα.	42
3.2 Διερεύνηση της αποτελεσματικότητας Tea tree oil στη παρεμπόδιση του μύκητα <i>Alternaria alternata</i> σε στερεό υπόστρωμα.....	48
3.3 Διερεύνηση της αποτελεσματικότητας Thymol στη παρεμπόδιση του μύκητα <i>Alternaria alternata</i> σε στερεό υπόστρωμα.....	54
3.4 Ανάπτυξη μικρομεθόδου σε υγρό θρεπτικό υλικό για τη χρήση της στον έλεγχο αποτελεσματικότητας μυκητοκτόνων ουσιών στο στέλεχος AS9	60
3.5 Διερεύνηση της αποτελεσματικότητας της θυμόλης στο στέλεχος AS9 με τη χρήση της μικρομεθόδου που αναπτύχθηκε	62
3.6 Μικροσκοπική παρατήρηση σπορίων του μύκητα από καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό με θυμόλη.....	65
3.7 Διερεύνηση ύπαρξης συνεργιστικής δράσης θυμόλης-μυκητοκτόνων.....	68
3.7.1 Διερεύνηση ύπαρξης συνεργιστικής δράσης θυμόλης-fludioxonil	68
3.7.2 Διερεύνηση ύπαρξης συνεργιστικής δράσης θυμόλης-iprodione.....	71
3.7.3 Διερεύνηση ύπαρξης συνεργιστικής δράσης θυμόλης-pyraclostrobin	73
3.7.4 Διερεύνηση ύπαρξης συνεργιστικής δράσης θυμόλης-boscalid	76
4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	79
5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	87

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα μελέτη είχε ως αντικείμενο τη διερεύνηση της αποτελεσματικότητας τριών προϊόντων φυσικής προέλευσης για την αντιμετώπιση ευαίσθητων και ανθεκτικών, σε μυκητοκτόνα, στελεχών του μύκητα *Alternaria alternata*, τα οποία είχαν απομονωθεί από ελληνικές καλλιέργειες τομάτας.

Αρκετά έλαια και εκχυλίσματα έχουν τεκμηριωμένη *in vitro* αντιμικροβιακή δράση. Τα προϊόντα φυσικής προέλευσης που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής: thymol, tea tree oil (TTO) και grapefruit seed extract (GSE), και μελετήθηκαν για την παρεμποδιστική τους δράση ενάντια στο μύκητα *Alternaria alternata*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και τα τρία προϊόντα, ασκούν παρεμποδιστική δράση στην μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα, με αποτελεσματικότερη την ουσία thymol. Οι τιμές EC_{50} για τη thymol κυμάνθηκαν στο εύρος συγκεντρώσεων 23,1-68,1 ppm, με το 65 % των στελεχών να κυμαίνονται στα 40-50 ppm. Το GSE και το TTO παρουσίασαν χαμηλότερη αποτελεσματικότητα. Στο GSE οι τιμές EC_{50} βρίσκονταν στο εύρος 214-2104,7 ppm, με το 54% των στελεχών να έχουν EC_{50} =250-500 ppm. Ενώ, για το tea tree oil, οι τιμές του EC_{50} , κυμάνθηκαν στο εύρος 233,3-1313,4 ppm.

Η θυμόλη εκτός από μυκηλιακή παρεμπόδιση έδειξε ότι επηρεάζει και τη σποριοποίηση. Σε μικροσκοπική παρατήρηση που έγινε φάνηκε ότι η θυμόλη είχε επίδραση στη μορφολογία, στον αριθμό και χρώμα των κωνιδίων του μύκητα.

Στην συνέχεια αναπτύχθηκε μικρομέθοδος για την μέτρηση της ανάπτυξης του μύκητα σε υγρό θρεπτικό υλικό και μέτρηση της βλάστησης/ανάπτυξης του με το όργανο microplate reader (MRX). Με τη χρήση της μικρομεθόδου που αναπτύχθηκε, έγινε μέτρηση της βλαστικότητας/ανάπτυξης του ανθεκτικότερου σε μυκητοκτόνα στελέχους (AS9) του μύκητα υπό την επίδραση θυμόλης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η θυμόλη ενσωματωμένη στο υγρό θρεπτικό υλικό, παρεμποδίζει την βλάστηση/ανάπτυξη του ανθεκτικού στελέχους του μύκητα.

Η ουσία thymol, ως η αποτελεσματικότερη, επιλέχθηκε για διερεύνηση της συνεργιστικής δράσης με τις ουσίες fludioxonil, iprodione, pyraclostrobin και boscalid. Για το συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν ανθεκτικά και ευαίσθητα στελέχη στα τέσσερα μυκητοκτόνα.

ABSTRACT

The aim of this study was to examine the effectiveness of tree natural products on sensitive and resistant on fungicides strains of plant pathogen *Alternaria alternata*. The stains were isolated from Greek tomato's crop.

Many essential oils and extracts have documented *in vitro* antimicrobial activity. Thymol, Tea Tree oil (TTO) and Grapefruit Seed Extract (GSE) were tested for their inhibitory activity against *Alternaria alternata*. The results showed that all three products inhibit the mycelia growth of the fungus. The most effective was thymol. EC₅₀ for thymol varied between 23,1 and 68,1 ppm, with 65% of strains in the range 40-50 ppm. GSE EC₅₀ values were 214-2104,7 ppm, with 54% of the strains ranged in 250-500 ppm, while TTO values of EC₅₀, varied in the range 233,3-1313,4 ppm.

Thymol showed that affects not only mycelial inhibition but sporulation too. Microscopic observation showed that thymol had effect on the morphology, the number and the color of the fungal conidia.

A microbioassay was developed to measure the fungus germination-growth in a liquid medium by using a microplate reader (MRX). This microbioassay was used to examine the germination-growth inhibitory activity of thymol against a resistant *A. alternata* stain. The results showed that thymol inhibits the fungus germination-growth in the liquid medium.

Thymol as the most effective of the three natural products was chosen to investigate the synergistic interaction of thymol-fungicide. For this part of study four fungicides are used: fludioxonil, iprodione, pyraclostrobin and boscalid.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η εμφάνιση και η εξάπλωση της ανθεκτικότητας φυτοπαρασίτων σε φυτοφάρμακα αποτελεί ένα αυξανόμενο πρόβλημα που καλείται να αντιμετωπίσει η σύγχρονη γεωργία. Ως εκ τούτου οι φαρμακοβιομηχανίες αποζητούν νέες στρατηγικές που θα μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν για την αντιμετώπιση του φαινομένου της ανθεκτικότητας.

Η αντιμικροβιακή δραστηριότητα των φυτικών εκχυλισμάτων και ελαίων έχει αναγνωρισθεί από την αρχαιότητα για πολλά φυτικά είδη. Τα φυτικά εκχυλίσματα και έλαια, έχουν χρησιμοποιηθεί για πολλούς σκοπούς χιλιάδες χρόνια πριν (Jones, 1996). Η χρήση τους είναι ευρεία και ποικίλει από την αρωματοποιία, και τη συντήρηση αποθηκευμένων ειδών διατροφής, μέχρι φαρμακευτική και εναλλακτική ιατρική (Mishra and Dubey, 1994; Lawless, 1995; Reynolds, 1996; Lis-Balchin and Deans 1997).

Τα τελευταία χρόνια οι βιομηχανίες φυτοφαρμάκων και πολλοί επιστήμονες, βασιζόμενοι στη γνώση για τις αντιμικροβιακές ιδιότητες των φυσικών προϊόντων, έχουν στραφεί σε αυτά, αναζητώντας εναλλακτικούς τρόπους, για την αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων καθώς και του προβλήματος της ανθεκτικότητας.

1.1 Φυτικά εκχυλίσματα και αιθέρια έλαια (EOs)

Τα φυσικά προϊόντα περιλαμβάνουν προϊόντα που προέρχονται από τη φύση και είναι κυρίως φυτικής προέλευσης. Τα σημαντικότερα φυσικά προϊόντα είναι φυτικά εκχυλίσματα και έλαια αιθέρια.

Τα φυτικά εκχυλίσματα είναι εκχυλίσματα που παραλαμβάνουμε από δρόγες φυτών με τη χρήση κάποιου διαλύτη. Από την άλλη, τα αιθέρια ή πτητικά έλαια είναι πολυσύνθετα, αρωματικής οσμής, πτητικά μίγματα φυσικής προέλευσης. Αποτελούνται από πτητικές ουσίες, πιο συγκεκριμένα δευτερογενείς μεταβολίτες, που απομονώνονται από αρωματικά φυτά συγκεκριμένων φυτικών ειδών με απόσταξη. Συγκεντρώνονται κατά κύριο λόγο στους ελαιογόνους αδένες των φυτών αυτών. Πολλά αιθέρια έλαια είναι γνωστά για τις αντιμικροβιακές και εντομοαπωθητικές τους ιδιότητες (Wallace 2004).

Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των φυτικών εκχυλισμάτων και των αιθέριων ελαίων οφείλονται στους δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών από τα οποία απομονώνονται. Από τη φύση τους τα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού χρησιμοποιούνται από τα φυτά για την προστασία τους από παθογόνους μικροοργανισμούς και επιβλαβή έντομα. Δευτερογενείς μεταβολίτες φυτών με αντιμικροβιακή δράση είναι οι φαινολικές ενώσεις, οι ταννίνες, τα αλκαλοειδή, τα τερπένια και τα τερπενοειδή (Isman 2000; Wallace 2004; Bakkali *et al.* 2008).

Τα αιθέρια έλαια, καθώς και ενώσεις που προέρχονται από αυτά, διαθέτουν ευρύ φάσμα δράσεων με την αντιμικροβιακή δράση τους ως την πιο μελετημένη (Hammer *et al.*, 2003). Οι ισχυρές αντιμικροβιακές ενώσεις που απομονώνονται από τα αιθέρια έλαια είναι δευτερογενείς μεταβολίτες, που ανήκουν στην κατηγορία των τερπενίων, όπως τα λιπόφιλα μονοτερπένια: θυμόλη, καρβακρόλη, λιναλοόλη, κιτράλη, γερανιόλη και 1,8-κινεόλη. Αποτελούν το 90% των αιθέριων ελαίων και εμφανίζουν μια μεγάλη ποικιλία δομών. Έχουν ευρέως μελετηθεί οι εφαρμογές των τερπενίων ως συντηρητικά σε τρόφιμα ή αντισηπτικά και απολυμαντικά (Pauli, 2001; Burt, 2004).

Σύμφωνα με τους Kurita και Koike (1983), η αντιμυκητιακή δράση βασικών συστατικών EOs ακολουθεί τον κανόνα:

phenols > alcohols > aldehyde > ketones > ethers > hydrocarbons

(Morcia *et al.*, 2012)

Η αντιμικροβιακή δράση των φυτικών ελαίων και εκχυλισμάτων αποτέλεσε τη βάση για τις πολλές εφαρμογές τους, συμπεριλαμβανομένων της χρήσης τους στη συντήρηση των τροφίμων, ως φαρμακευτικά προϊόντα της εναλλακτικής ιατρικής και των φυσικών θεραπειών για διάφορες ασθένειες (Reynolds, 1996; Lis-Balchin and Deans, 1997). Η αντιμικροβιακή δραστηριότητα πολλών εκχυλισμάτων και αιθέριων ελαίων έχει ήδη τεκμηριωθεί *in vitro*, αλλά και *in vivo* σε πολλές περιπτώσεις.

Σε μελέτες που έχουν γίνει, έχει αποδειχτεί ότι τα αιθέρια έλαια και τα συστατικά τους παρεμποδίζουν την ανάπτυξη μυκήτων και βακτηρίων, την αναπνοή τους, τη σποριοποίηση των μυκήτων και επηρεάζουν την παραγωγή μυκοτοξινών. Για παράδειγμα, έχει αποδειχθεί ότι το αιθέριο έλαιο του φυτού *Thymus serpyllum* L. και η θυμόλη, παρεμποδίζουν εκτός από την ανάπτυξη της μυκηλιακής ανάπτυξης και τη παραγωγή ωχρατοξινών μυκήτων του γένους *Aspergillus*, ενώ τα συστατικά αιθέριων ελαίων carvone, 1,8-cineole, eugenol, terpinen-4-ol, thymol έδειξαν ότι παρεμποδίζουν την παραγωγή της deoxynivalenol (DON) (τριχοθηκίνη τύπου B) των μυκήτων *Fusarium culmorum* και *F. graminearum*. Ως προς την παρεμπόδιση της αναπνοής, η προ-επώαση του μύκητα *C. albicans* και των βακτηρίων *E. coli* και *Staph. aureus*, σε θρεπτικό υλικό με Tea tree oil, έδειξε σημαντική μείωση της αναπνευστικής τους δραστηριότητα. (Cox *et al.*, 2000; Morcia C. *et al.*, 2012; Sokolić-Mihalak D, *et al.*, 2012).

Παρατηρήσεις με μικροσκόπιο (Scanning and transmission electron microscopy) αποκαλύπτουν ότι τα αιθέρια έλαια μπορούν να προκαλέσουν αλλοιώσεις στη δομή των κυττάρων, όπως στη μεμβράνη (διόγκωση, αφυδάτωση, διαρροή, εκκένωση) και στον πυρήνα (Soylu *et al.*, 2006; Santoro *et al.*, 2007a,b).

Τα αιθέρια έλαια (EOs) και τα συστατικά τους λειτουργούν παρεμποδιστικά και όταν ενσωματωθούν στο θρεπτικό υλικό (μέσω άμεσης επαφής), αλλά και με την πτητική τους μορφή μέσω του αέρα. Μια μελέτη που έγινε το 1998 από τους Inouye

et al., έδειξε ότι η πτητική φάση του αιθέριου ελαίου λεβάντας (lavender oil) στα 50mg/l προκάλεσε αξιοσημείωτη μείωση αριθμού σπορίων, χωρίς ταυτόχρονη μείωση της μυκηλιακής ανάπτυξης, στους μύκητες *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium expansum* και *Fusarium solani*. Επίσης, στο μύκητα *Rhizopus oryzae* τα αιθέρια έλαια lavender oil και perilla oil στα 50 mg/l, στην πτητική τους φάση, προκαλούν κατσάρωμα και μπέρδεμα υφών αντίστοιχα, ενώ στα 400 mg/l, τα αιθέρια έλαια λεβάντας και Tea tree προκαλούν αλλοίωση και σύντηξη υφών. Αξιοσημείωτο είναι ότι όταν το ΕΟ προστέθηκε στο θρεπτικό μέσο δεν παρατηρήθηκε μείωση της σποριοποίησης (Inouye *et al.*, 1998).

Η σύνθεση των κύριων συστατικών των αιθέριων ελαίων και των εκχυλισμάτων μεταβάλλεται από βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες, όπως: η γενετική μεταβλητότητα εντός φυτικών ειδών, η γεωγραφική περιοχή της καλλιέργειας, η καλλιεργητική τεχνική, το φαινολογικό στάδιο και ο χημειότυπος του φυτού, η μέθοδος ξήρανσης, εκχύλισης ή απόσταξης.

Οι αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες των αιθερίων ελαίων έχουν μέχρι σήμερα αξιολογηθεί εκτενώς. Επειδή τα αιθέρια έλαια περιέχουν ένα μεγάλο αριθμό συστατικών, φαίνεται να μην έχουν ένα συγκεκριμένο κυτταρικό στόχο (Carson *et al.*, 2002).

Οι επιστήμονες υποστηρίζουν ότι τα αιθέρια έλαια έχουν τοξική επίδραση στη λειτουργικότητα και δομή της κυτταρικής μεμβράνης, η οποία είναι υπεύθυνη για την μυκηλιακή ανάπτυξη (Knobloch *et al.*, 1989; Sikkema *et al.*, 1995). Οι Uribe, Ramirez, and Peña (1985), συσχέτισαν χαμηλές συγκεντρώσεις αιθέριων ελαίων με αλλαγές στην κυτταρική δομή, που μπορούν να αναστείλουν την αναπνοή και να μεταβάλλουν την διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης μικροοργανισμών, ενώ υψηλές συγκεντρώσεις μπορούν να προκαλέσουν σοβαρή βλάβη της μεμβράνης και απώλεια της ομοιόστασης, γεγονός που οδηγεί στο θάνατο των κυττάρων (Carson *et al.*, 2002).

Οι μηχανισμοί δράσης τους δεν έχουν ξεκάθαρα αναγνωριστεί αλλά φαίνεται να σχετίζονται με την υδροφοβική τους φύση. (Sanchez-Gonzalez L. *et al.*, 2010). Ως λιπόφιλες ενώσεις, τα συστατικά τους, περνούν διαμέσου του κυτταρικού τοιχώματος και της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, διαταράσσουν τη δομή των διαφορετικών στρωμάτων τους από πολυσακχαρίτες, λιπαρά οξέα και φωσφολιπίδια και τα καθιστούν διαπερατά. Φαίνεται λοιπόν, ότι η κυτταροτοξικότητα των αιθέριων ελαίων σχετίζεται με τη βλάβη στις μεμβράνες. Η διαπερατότητα των μεμβρανών στα βακτήρια σχετίζεται με την απώλεια ιόντων και τη μείωση του δυναμικού της μεμβράνης, βλάβη της αντλίας πρωτονίων και την εξάντληση της δεξαμενής ATP (pool ATP). Βλάβη στο κυτταρικό τοίχωμα και τη μεμβράνη μπορεί να οδηγήσει στη διαρροή των μακρομορίων και σε λύση του κυττάρου. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, τα αιθέρια έλαια μπορεί να προκαλέσουν εκπόλωση των μιτοχονδριακών μεμβρανών μειώνοντας το δυναμικό της μεμβράνης, να επηρεάσουν τον κύκλο των ιόντων Ca ++ και άλλων ιοντικών καναλιών και να μειώσουν το pH, επηρεάζοντας (όπως στα βακτήρια) την αντλία πρωτονίων και την δεξαμενή ATP. Τα αιθέρια έλαια αλλάζουν

τη ρευστότητα των μεμβρανών, οι οποίες γίνονται υπερβολικά διαπερατές με αποτέλεσμα τη διαρροή των ριζών, κυτοχρώματος C, ιόντων ασβεστίου και πρωτεϊνών, φαινόμενα που εμφανίζονται στο οξειδωτικό στρες και τη βιοενεργητική ανεπάρκεια. Διαπερατότητα εξωτερικών και εσωτερικών μιτοχονδριακών μεμβρανών οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο με απόπτωση και νέκρωση. Φαίνεται ότι αλυσιδωτές αντιδράσεις από το κυτταρικό τοίχωμα ή την εξωτερική μεμβράνη των κυττάρων επηρεάζουν ολόκληρο το κύτταρο, μέσω των μεμβρανών των διαφόρων οργανιδίων, όπως τα μιτοχόνδρια και τα υπεροξυσώματα. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν μία δραστηριότητα που μοιάζει με φαινολική προοξειδωτική δράση (Bakkali *et al.*, 2008).

Αρκετά φυτικά προϊόντα έχουν ήδη εγκριθεί από τον οργανισμό EU Pesticides database. Μερικά από αυτά είναι τα εκχυλίσματα: Tea tree extract, Garlic extract, Sea-algae extract, και τα αιθέρια έλαια: Spear mint oil, Citronella oil, Clove oil (http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/?event=homepage&language=EN).

1.1.1 Εκχύλισμα σπερμάτων του φυτού Πομπελομοσία η βοτρυόκαρπος (Grapefruit Seed Extract, GSE)



Εικόνα 1: Καρποί του φυτού Πομπελομοσία η βοτρυόκαρπος
(Πηγή: <http://www.alexandersmkt.com/grapefruit-great/>)

Ένα φυσικό προϊόν που πρόσφατα έχει αρχίσει να προσελκύει το ενδιαφέρον είναι το εκχύλισμα από τους σπόρους και τον πολτό του καρπού του φυτού Πομπελομοσία η βοτρυόκαρπος (grapefruit), με επιστημονική ονομασία *Citrus paradise* Macf. Rutaceae. σπυροφόρο δέντρο της τάξης των σαπινωδών (Sapindales), του γένους κίτρος και της οικογένειας των ρυτοειδών (= εσπεριδοειδών) (Rutaceae). Το *Citrus×paradisi* είναι υβρίδιο που προέρχεται από φυσική διασταύρωση του *Citrus sinensis* και του *Citrus grandis*. ένα υποτροπικό δένδρο εσπεριδοειδών, γνωστό για τους ξινούς-ημίγλυκους καρπούς του.

Το εκχύλισμα από σπόρους βοτρυόκαρπου (γκρέιφρουτ) (Grapefruit Seed Extract, GSE), είναι φυσικό εκχύλισμα με ευρέως φάσματος βακτηριοκτόνο (Coombe, 1989; Reagor *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005), μυκητοκτόνο (Heggors *et al.*, 2002), αντι-ιική και αντιπαρασιτική δράση (Ionescu *et al.*, 1990; Tirillini, 2000). Έχει αποδειχθεί ότι το GSE έχει ανασταλτική δράση με διαφορετική αποτελεσματικότητα σε διάφορα στελέχη ζυμών, βακτηρίων και μυκήτων. Οι απόψεις των ερευνητών δίστανται ως προς την ένταση της δραστηριότητας σε διάφορους μικροοργανισμούς που προσβάλλουν τον άνθρωπο. Μερικοί υποστηρίζουν ότι έχει ασθενέστερη δράση στις ζύμες απ' ότι τα βακτήρια και τους μύκητες (Ionescu *et al.*, 1990). Ενώ άλλοι, όπως σε μια πρόσφατη μελέτη που έγινε το 2003 *in vitro*, βρήκαν ότι το εμπορικό σκεύασμα με 33% grapefruit-water glycerol solution ασκεί ικανοποιητική

αντιμυκητιακή δραστηριότητα ενάντια σε στελέχη ζυμών και χαμηλότερη δραστικότητα ενάντια σε δερματόφυτα και μύκητες (Krajewska-Kulak *et al.*, 2003).

Το GSE, είναι ασφαλές για το περιβάλλον και δεν είναι τοξικό για τον άνθρωπο και τα ζώα, σε υψηλές συγκεντρώσεις. Οι Hegggers *et al.*, το 2002, έδειξαν, ότι το GSE δεν είναι επιζήμιο για τα ανθρώπινα ινοβλαστικά κύτταρα του δέρματος *in vitro*, ενώ παράλληλα εξακολουθεί να διατηρεί την υψηλή αντιμικροβιακή του δράση. Το σημαντικότερο είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την καταπολέμηση πολλών ασθενειών του ανθρώπου, όπως: διάφορες λοιμώξεις, δερματίτιδες και μυκητιάσεις. Επίσης, συμβάλλει στη μείωση των τριγλυκεριδίων και την αντιμετώπιση της αθηροσκλήρωσης (Gorinstein *et al.*, 2006), χάρη στις βιοδραστικές ενώσεις (bioactive compounds) που περιέχει. Πολλά από τα συστατικά του GSE έχει αποδειχτεί ότι συμβάλλουν στην καταπολέμηση πολλών ασθενειών του ανθρώπου. Για παράδειγμα, η naringin και η limonin, έχει αποδειχθεί ότι καταστέλλουν την καρκινογένεση (Vanamala *et al.*, 2006). Οι αντιμικροβιακές (αντιβακτηριακές, αντιμυκητιακές, αντι-ιικές) ιδιότητες του GSE οφείλονται στα συστατικά του, όπως αιθέρια έλαια, φαινόλες κ.α. Χημικές έρευνες, έχουν αποκαλύψει την παρουσία φλαβονοειδών, ασκορβικού οξέως, τοκοφερολών, κιτρικού οξέως, λιμονοειδών, στερολών και μετάλλων σε σπόρους και πολύ γκρέιπφρουτ. Περιέχει επίσης μεγάλες ποσότητες πολυφαινολικών συστατικών, όπως: catechins, epicatechin, epicatechin-3-O-gallate, dimeric, trimeric και tetrameric procyanidins. Οι ωφέλιμες ιδιότητες του GSE οφείλονται στην αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών που περιέχει όπως: naringenin, hesperidin και limonin (Saito *et al.*, 1998; Braddock and Bryan, 2001; Drewnowski and Gomez-Carneors, 2000; Tirillini, 2000; Armando *et al.*, 1998; Bennett *et al.*, 1989; Tushiswili *et al.*, 1983).

Τα αποτελέσματά των Zdenka *et al.*, το 2004, έδειξαν διαφορές μεταξύ της αντιμικροβιακής δράσης του φυσικού GSE και μερικών εμπορικών διαθέσιμων σκευασμάτων που αναφέρονται στη βιβλιογραφία.. Παρά το γεγονός ότι ορισμένα εμπορικά εκχυλίσματα, βρέθηκαν να είναι ανώτερα από το φυσικό αιθανολικό εκχύλισμα, το τελευταίο είχε σταθερή και εντυπωσιακή δραστικότητα ενάντια σε όλα τα εξετασθέντα βακτηρία και ζύμες. Αυτές οι διαφορές μπορεί να προκαλούνται εν μέρει από τις διαφορές στο περιεχόμενο των πολυφαινολών, ειδικά των φλαβονοειδών. Έτσι, οι Zdenka *et al.* συμπέραναν, ότι οι αντιβακτηριακές και αντιμυκητιακές ιδιότητες των εμπορικών διαθέσιμων προϊόντων, δεν είναι η συνέπεια μόνον της παρουσίας συνθετικών συντηρητικών παραγόντων, όπως ισχυρίζονται ορισμένοι συγγραφείς. Δεδομένου ότι δεν υπήρχαν μέχρι τότε αρκετά επιστημονικά στοιχεία, θεώρησαν ότι απαιτούνται περαιτέρω φυτοχημικές και βιολογικές έρευνες για υπάρξουν ακριβέστερα συμπεράσματα (Zdenka *et al.*, 2004).

Έγιναν ακόμα μελέτες που αποδεικνύουν την αποτελεσματικότητά του GSE, όχι μόνο σε παθογόνους μικροοργανισμούς του ανθρώπου αλλά και σε φυτοπαθογόνους. Προϊόντα που περιέχουν εκχύλισμα σπόρων γκρέιπφρούτ, έχουν δείξει προστατευτική δράση ενάντια διαφόρων παθογόνων των φυτών, όπως είναι μύκητες των γενών: *Botrytis*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Podosphaera* και

Alternaria κ.α. (Angioni *et al.*, 1998; Orlikowski, 2001; Orlikowski *et al.*, 2002; Saniewska, 2002; Wojdyla, 2001). Ορισμένα από τα εμπορικά διαθέσιμα GSEs έχουν δείξει επίσης, την ανασταλτική δραστηριότητα κατά βακτηρίων, όπως: το *Bacillus subtilis*, *Micrococcus flavus* και *Escherichia coli* (Woedtke *et al.*, 1999).

Οι αντιβακτηριακές ιδιότητες του GSE έχουν μελετηθεί για ένα ευρύ φάσμα βακτηριακών βιοτύπων και πειραματικά δεδομένα έδειξαν, ότι η ανασταλτική επίδραση στα θετικά κατά Gram βακτήρια είναι μεγαλύτερη από ότι στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Είναι σημαντικό ότι, η αντιβακτηριακή αποτελεσματικότητά του είναι εξίσου καλή με εκείνη των εγκεκριμένων αντιβακτηριακών σκευασμάτων που κυκλοφορούν στην αγορά (Reagor L. *et al.*, 2002). Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ο μηχανισμός αντιβακτηριακής δράσης και η *in vitro* τοξικότητα του GSE. Βρέθηκε δηλαδή, ότι το GSE διαταράσσει τη βακτηριακή μεμβράνη και απελευθερώνει τα συστατικά του κυτταροπλάσματος μέσα σε 15 λεπτά, ακόμη και σε αραιές συγκεντρώσεις (Heggors J.P. *et al.*, 2002; Reagor L. *et al.*, 2002). Ως προς τις αντιμυκητιακές ιδιότητες του GSE, μπορεί να προκαλέσει μερική ή πλήρη αναστολή της μυκηλιακής ανάπτυξης.

1.1.2 Αιθέριο έλαιο του Τειϊοδένδρου Αυστραλίας (Tea tree oil)

Το tea tree oil (TTO), είναι αιθέριο έλαιο που απομονώνεται αποκλειστικά από το ενδημικό φυτό της Αυστραλίας, *Melaleuca alternifolia* (Τειϊόδεντρο) της οικογένειας Myrtaceae.



Εικόνα 2: Άνθη του φυτού *Melaleuca alternifolia*.
(Πηγή: <https://australianseed.com/shop/item/melaleuca-alternifolia>)

Και άλλα είδη του γένους *Melaleuca* παράγουν αιθέρια έλαια όπως τα: cajerut oil, niaouli oil, kanuka oil και manuka oil. Αυτά τα αιθέρια έλαια περιέχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις κινεόλης (cineole), ένα ερεθιστικό δέρματος, που μπορεί να μειώσει την αντισηπτική δράση του την terpinen-4-ol, κύριου δραστικού συστατικού του TTO.

Η χημική σύνθεση του TTO έχει χαρακτηριστεί από το Διεθνές Πρότυπο (International Standard) ISO 4730, το οποίο περιέχει ένα χρωματογραφικό προφίλ που ορίζει ελάχιστες και μέγιστες τιμές της ποσοστιαίας σύνθεσης των 14 κύριων συστατικών (International Organisation for Standardisation 1996). Το TTO περιέχει περίπου 100 συστατικά, που είναι κυρίως υδρογονάνθρακες τερπενίων (terpene hydrocarbons), κυκλικά μονοτερπένια (monoterpenes), σεσκιτερπένια (sesquiterpenes) και τις συναφείς αλκοόλες τους. Τα τρία κύρια συστατικά του TTO,

terpinen-4-ol, c-terpinene και a-terpinene, περιλαμβάνουν περίπου το 70% του συνολικού ελαίου, ενώ τα συστατικά: p-cymene, terpinolene, a-terpineol και arinene αντιπροσωπεύουν περίπου το 15% του ελαίου. Οι αντιμικροβιακές του ιδιότητες αποδίδονται στα συστατικά: terpinen- 4-ol και α-terpineol. (Carson *et al.*, 2006; Hammer *et al.*, 2003).

Composition of *M. alternifolia* (tea tree) oil

Composition (%)	
Component	ISO 4730 range ^a
Terpinen-4-ol	≥30 ^c
γ-Terpinene	10–28
α-Terpinene	5–13
1,8-Cineole	≤15 ^d
Terpinolene	1.5–5
p-Cymene	0.5–12
α-Pinene	1–6
α-Terpineol	1.5–8
Aromadendrene	Trace–7
δ-Cadinene	Trace–8
Limonene	0.5–4
Sabinene	Trace–3.5
Globulol	Trace–3
Viridiflorol	Trace–1.5

^a ISO 4730, International Organization for Standardization standard no. 4730

Εικόνα 3: Η χημική σύνθεση του ΤΤΟ όπως έχει χαρακτηριστεί από το Διεθνές Πρότυπο (International Standard), ISO 4730 (Carson *et al.*, 2006).

Το ΤΤΟ είναι αδιάλυτο στο νερό και διαλυτό σε ethanol 85%, στους 20 °C. Η σύνθεσή του αλλάζει κυρίως με την παρουσία ατμοσφαιρικού οξυγόνου αλλά κυρίως όταν το έλαιο εκτεθεί στο φως και σε υψηλή θερμοκρασία. Τα επίπεδα του α-terpinene, του γ-terpinene και του terpinolene μειώνονται, ενώ τα επίπεδα του p-cymene υπερδεκαπλασιάζονται. Οι διεργασίες οξείδωσης οδηγούν στον σχηματισμό υπεροξειδίων, ενδοϋπεροξειδίων/endoperoxides και εποξειδίων.

Το αιθέριο έλαιο του *Melaleuca alternifolia* παρουσιάζει ευρέος φάσματος αντιμικροβιακή δραστηριότητα. Το ΤΤΟ έχει αντιβακτηριακή, αντιμυκητιακή, αντι-ική και αντιπρωτοζωϊκή δραστηριότητα. Ως επί το πλείστον είναι βακτηριοκτόνο στη

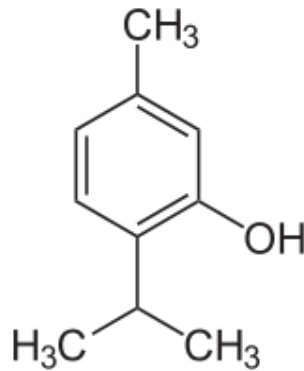
φύση και τα περισσότερα βακτήρια είναι ευαίσθητα σε συγκεντρώσεις έως και 1% vol/vol όπως είναι τα: *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* *Lactobacillus spp.* Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις μπορεί να έχει βακτηριοστατική δράση. Έχουν αναφερθεί όμως και βακτήρια όπου η MIC τους υπερβαίνουν τη συγκέντρωση 2% vol/vol όπως, σταφυλόκοκκοι και μικρόκοκκοι συμβιωτικοί του δέρματος, *Enterococcus faecalis* και *Pseudomonas aeruginosa*. Ως προς τους μύκητες, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός ζυμών, δερματόφυτων και άλλων μυκήτων που είναι ευαίσθητοι στο ΤΤΟ. Γενικά οι τιμές MIC κυμαίνονται στο εύρος 0,03-0,5% vol/vol. Αξιοσημείωτη εξαίρεση αποτελεί ο μύκητας *Aspergillus niger* όπου η μυκητοκτόνα συγκέντρωση φτάνει σε επίπεδα του 8% vol/vol επίσης μελέτες έδειξαν ότι η πτητική φάση του ΤΤΟ έχει την δυνατότητα να αναστείλει την ανάπτυξη των μυκήτων και να επηρεάσει την σποριοποίηση. Ως προς τη αντιπρωτοζωϊκή του δράση το ΤΤΟ προκαλεί μείωση και αναστολή της ανάπτυξης των πρωτόζωων *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* και *Trichomonas vaginalis* (Carson *et al.*, 2006).

Διαφορές στην ευαισθησία των οργανισμών δοκιμής σε έλαιο τειόδεντρου που έχουν παρατηρηθεί, οφείλονται στις διακυμάνσεις του ποσοστού διείσδυσης μονοτερπενίων μέσω του κυτταρικού τοιχώματος και της κυτταρικής μεμβράνης, λόγω των διαφορετικών δομών. Η ικανότητα του ΤΤΟ να διαταράσσει τον φραγμό διαπερατότητας των δομών της κυτταρικής μεμβράνης και να συμβάλλει στην απώλεια του χημειοοσμωτικού ελέγχου είναι η πιο πιθανή πηγή μυκητοκτόνου και βακτηριοκτόνου δράσης του (S.D. Cox.*et al.*, 2000).

Από το 2009, το εκχύλισμα του Tea tree προστέθηκε στη λίστα των μυκητοκτόνων ουσιών του οργανισμού EU Pesticides database με ημερομηνία έγκρισης 01/09/2009. Συγκεκριμένα, εγκρίθηκε για τις χώρες της βόρειας και νότιας Ευρώπης για την αντιμετώπιση του ωιδίου, σε καλλιέργειες αγγουριού και τομάτας, υπό τη μορφή γαλακτωματοποιήσιμου υγρού (EC), με τη μέθοδο Foliar sprayer (http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/?event=homepage&language=EN).

1.1.3 Θυμόλη (Thymol)

Η θυμόλη, thymol (5-methyl-2-isopropylphenol), είναι ένα λιπόφιλο μονοτερπένιο και συγκεκριμένα μία φαινόλη.



Εικόνα 4: Η χημική δομή της θυμόλης.

Αποτελεί κοινό συστατικό των αιθέριων ελαίων που προέρχονται από φυτά κυρίως των γενών *Thymus* και *Origanum*. Η θυμόλη, αποτελεί ένα από τα δύο βασικά συστατικά του αιθερίου ελαίου του φυτού *Origanum compactum* σε ποσοστό 27% (το άλλο είναι η καρβακρόλη, 30%) και βασικό συστατικό του *Thymus vulgaris L.*, στο οποίο βρίσκεται σε ποσοστό ~ 33 %. Όμως αποτελεί συστατικό κι άλλων αιθερίων ελαίων των φυτών: *Origanum compactum*, *Origanum dictamnus*, *Origanum onites*, *Origanum vulgare*, *Thymus glandulosus*, *Thymus hyemalis*, *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis*, *Thymus glandulosus*, *Thymus vulgaris*, *Thymus serpyllum*, *Rosmarinus officinalis*, *Calamintha officinalis*, *Lavandula dentata*, *Mentha pulegium*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia aegyptiaca*, *Lippia sidoides*, *Myrtus communis*, *Pelargonium graveolens*, *Salvia officinalis*, *Monarda didyma*, *Monarda fistulosa* (Zamureenko), *Trachyspermum ammi*.

Το ποσοστό της θυμόλης στα αιθέρια έλαια των φυτών εξαρτάται από διάφορες παραμέτρους, όπως ισχύει και σε όλα τα συστατικά όλων των αιθερίων ελαίων και εκχυλισμάτων, οι οποίες προαναφέρθηκαν στο κεφάλαιο 1.1.



Εικόνα 5: Αντιπροσωπευτικά φυτά των γενών *Thymus* και *Origanum*.

Η θυμόλη είναι γνωστή για τις αντιμικροβιακές της ιδιότητες. Έχει αποδειχτεί ότι η θυμόλη έχει την ικανότητα να παρεμποδίζει την ανάπτυξη μικροοργανισμών σε τριπλασιο βαθμό από το αιθέριο έλαιο θυμαριού (*Thymus vulgaris* L.), στο οποίο βρίσκεται σε ποσοστό ~ 33 % (το ποσοστό εξαρτάται από διάφορες παραμέτρους). Έχει αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή ικανότητα. Συγκεκριμένα, η θυμόλη έχει δείξει έντονη αντιμυκητιακή δραστηριότητα έναντι των ζυμών *Cryptococcus neoformans* και *Candida spp.*, όπως και δερματόφυτων μυκήτων. Επίσης, έχει δείξει εξαιρετικά δυνατή παρεμπόδιση έναντι μυκήτων των γενών *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Rhizopus* και *Mucor*. Σ' ένα αριθμό μυκήτων που έχουν μελετηθεί, οι τιμές MIC που έχουν βρεθεί κυμαίνονται σε εύρος 1,60-6,72 µg/ml. Η θυμόλη εκτός από την μυκηλιακή παρεμπόδιση, έχει παρεμποδιστική δράση, στη σποριοποίηση, την μορφολογία, την αναπνοή και παραγωγή μυκοτοξινών. Για παράδειγμα, έχει αποδειχθεί ότι το αιθέριο έλαιο του φυτού *Thymus serpyllum* L. και η θυμόλη, παρεμποδίζουν εκτός από την μυκηλιακή ανάπτυξη και τη παραγωγή ωχρατοξινών από μύκητες του γένους *Aspergillus*, ενώ τα συστατικά αιθέριων ελαίων carvone, 1,8-cineole, eugenol, terpinen-4-ol, thymol έδειξαν ότι παρεμποδίζουν την παραγωγή της deoxynivalenol (DON) (τριχοθηκίνη τύπου Β) των μυκήτων *Fusarium culmorum* και *F. graminearum* (Segvic' Klaric M. *et al.*, 2007; Morcia C. *et al.*, 2012 ; Sokolić-Mihalak D, *et al.*, 2012).

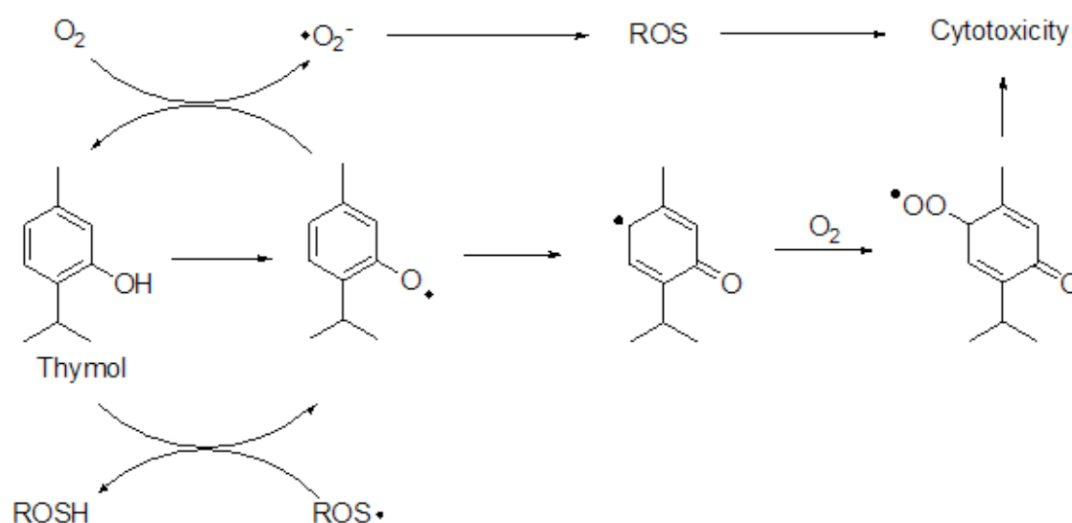
Πρόσφατα η θυμόλη προστέθηκε στη λίστα των μυκητοκτόνων ουσιών του Pesticides database με ημερομηνία έγκρισης 01/12/2013. Συγκεκριμένα, εγκρίθηκε για τη χώρα μας για την αντιμετώπιση των παθογόνων μυκήτων του γένους *Botrytis*,

σε επιτραπέζια και σταφύλια οινοποίησης, υπό την μορφή πυκνού εναιωρήματος (SC), με τη μέθοδο High volume spraying (http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/?event=homepage&language=EN).

Έχει αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματική και για την αντιμετώπιση κι άλλων οργανισμών όπως το πρωτόζωο *Trypanosoma cruzi* (Santoro *et al.*, 2007) και έντομα όπως το κουνούπι *Ochlerotatus caspius* (larvae) (Kniio *et al.*, 2007).

Ο μηχανισμός δράσης της φαίνεται ότι σχετίζεται με την αύξηση της διαπερατότητας των μεμβρανών. Οι Evans & Martin το 2000, υποστήριξαν ότι η θυμόλη μειώνει δραστικά την ενζυμική δραστηριότητα και/ή διαταράσσει την ακεραιότητα της μεμβράνης μεταβάλλοντας τις πρωτεϊνικές αντιδράσεις (Evans J.D. and Martin S.A., 2000). Σύμφωνα με αναφορές για τη αντιβακτηριακή δράση της θυμόλης, αυτή όπως και η καρβακρόλη, αποσυνθέτουν/διαλύουν την εξωτερική μεμβράνη και έτσι αυξάνουν τη διαπερατότητά της (Abreu *et al.*, 2011).

Σύμφωνα με τους Yanishlieva *et al.* (1999), ο μηχανισμός κυτταροτοξικότητας της θυμόλης οφείλεται στην ενδοκυτταρική μετατροπή σε φαινόξυ ρίζα και κινόνη. Λόγω της λιποφιλικότητας και του μικρού μοριακού βάρους, η θυμόλη περνά με παθητική διάχυση εντός του κυττάρου, διαμέσου της λιπιδικής διπλοστιβάδας. Μόλις βρεθεί μέσα στο κύτταρο, η θυμόλη ενεργεί πρώτα σαν ένα αντιοξειδωτικό που δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες (ROS) από το περιβάλλον (Yanishlieva, N. V. *et al.*, 1999). Ο Satooka, το 2011 πρότεινε τον μηχανισμό κυτταροτοξικής δράσης της θυμόλης (εικόνα 6). Λόγω του συντονισμού που οφείλεται στην αρωματικότητα της θυμόλης, δημιουργείται η φαινόξυ ρίζα. Η φαινόξυ ρίζα οξειδώνεται περαιτέρω προς τον σχηματισμό οξειδίου της κινόνης. Η περίσσεια ελεύθερων ριζών και των ενώσεων κινόνης οδηγούν τα κύτταρα σε οξειδωτικό στρες, το οποίο προκαλεί σοβαρή βλάβη στα κύτταρα. Μπορεί η θυμόλη σε μικρές ποσότητες να δρα ως αντιοξειδωτικό, σε υψηλές συγκεντρώσεις όμως δρα ως προ-οξειδωτικό (Satooka, 2011).



Εικόνα 6: Μηχανισμός κυτταροτοξικότητας της θυμόλης (Satooka, 2011).

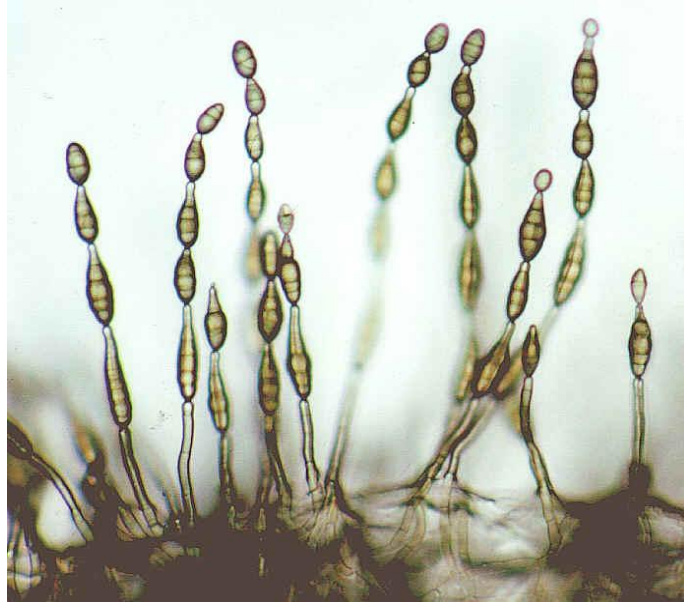
1.2 Ο μύκητας *Alternaria alternata*

Ο μύκητας *Alternaria alternata* είναι ένα από τα είδη τα οποία χαρακτηρίζονται ως κοσμοπολίτικα καθώς επιβιώνουν τόσο σε εύκρατα όσο και σε τροπικά κλίματα (Chelkowski and Visconti, 1992). Προκαλεί μεγάλες καταστροφές σε καλλιέργειες τομάτας. Έχουν αναφερθεί προσβολές στο στέλεχος, αλλά και στα φύλλα και καρπούς φυτών τομάτας. Η ασθένεια εκδηλώνεται με το σχηματισμό ελκών στη βάση και το στέλεχος των φυτών, και είναι γνωστή με διάφορα κοινά ονόματα, αλλά κυρίως με το όνομα: έλκος του στελέχους (αγγλ. *Alternaria stem canker, blackmold, freckle*) (Παναγόπουλος, 2000).

Τα συμπτώματα της ασθένειας είναι κυρίως έλκη που σχηματίζονται στη βάση και το στέλεχος των φυτών, αλλά και στους ποδίσκους των καρπών και στους μίσχους των φύλλων. Τα έλκη είναι επιμήκη έχουν σκούρο καστανό έως μαύρο χρώμα και μερικές φορές σχηματίζουν συγκεντρικές ζώνες. Οι ιστοί κάτω από τα έλκη είναι καστανοί και παρουσιάζουν ξηρή σήψη, ιδιαίτερα στην περιοχή της εντεριώνης. Επίσης, παρατηρείται καστανός μεταχρωματισμός του ξύλου στη περιοχή των ελκών. Η προσβολή οδηγεί σε καχεξία και τελικά στην ξήρανση των φυτών. Οι προσβολές των καρπών εκδηλώνονται με το σχηματισμό μεγάλων καστανών, κυκλικών ή ακανόνιστων, βυθισμένων περιοχών οι οποίες καλύπτονται από πυκνές μαύρες εξανθήσεις που έχουν βελούδινη όψη. Στα φύλλα παρατηρούνται ενίοτε πολλές μικρές, καστανές έως μαύρες νεκρωτικές κηλίδες ακανόνιστου σχήματος που εντοπίζονται μεταξύ των νευρών του ελάσματος (Παναγόπουλος, 2000).

Το παθογόνο αίτιο της ασθένειας έλκος ή αλτερναρίωση του στελέχους είναι ο μύκητας *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*, (συν. *Alternaria alternata, Alternaria tenuis, Alternaria fasciculate*), (Deuteromycotina, Hyphomycetes, Moniliales). Παράγει σπόρια (δικτυοσπόρια) σε αλυσίδες (3 ή 4 κονίδια σε κάθε αλυσίδα) που έτσι διαφοροποιείται από τον *Alternaria solani*. Τα σπόρια έχουν χρώμα ανοιχτό λαδί καστανό μέχρι σκούρο καστανό και διαστάσεις 20-63 x 9-18 μm και στερούνται ράμφους ή έχουν πολύ βραχύ ράμφος. Το χρώμα των σπορίων οφείλεται στη μελανίνη η οποία βιοσυντίθεται από τον μύκητα και παίζει ρόλο στην επιβίωση των σπορίων. Ο μύκητας έχει εξειδικευμένους παθότυπους που προσβάλλουν διάφορα καλλιεργούμενα φυτά.

Ο μύκητας επιβιώνει στα υπολείμματα της καλλιέργειας. Τα σπόριά του διασπείρονται με τον άνεμο και για να βλαστήσουν είναι απαραίτητη η παρουσία σταγόνas νερού στις φυτικές επιφάνειες. Η είσοδος του μύκητα εντός των ιστών γίνεται από πληγές ή με διάτρηση της εφυμενίδας. Η ασθένεια ευνοείται από υγρό και βροχερό καιρό και σε θερμοκρασίες 20-25 °C (Παναγόπουλος, 2000).



Εικόνα 7: Κονιδιοφόροι του μύκητα *Alternaria alternata*

Ο μύκητας *Alternaria alternata* είναι σημαντικός όχι μόνο για τις προσβολές των καλλιεργειών και τη ζημία που μπορεί να επιφέρει στην παραγωγή, αλλά γιατί είναι ένας από τους μυκοτοξικογενείς μύκητες. Οι μύκητες αυτοί παράγουν τις μυκοτοξίνες, ιδιαίτερα τοξικοί και καρκινογόνοι δευτερογενείς μεταβολίτες χαμηλού μοριακού βάρους. Οι μυκοτοξίνες είναι μία από τις μεγαλύτερες απειλές για την ασφάλεια και την ποιότητα τροφίμων.

Ο μύκητας *Alternaria alternata* παράγει μυκοτοξίνες μέσα στα έλκη του στελέχους, οι οποίες είναι “διασυστηματικές”, δηλαδή μεταφέρονται μέσω των αγγείων του ξύλου σε ολόκληρο το φυτό, και είναι υπεύθυνες για την παρατηρούμενη νεκρωτική κηλίδωση στα φύλλα καθώς επίσης για την ανασχεση της ανάπτυξης των προσβεβλημένων φυτών (Παναγόπουλος, 2000). Οι κυριότερες μυκοτοξίνες που παράγονται από μύκητες του γένους *Alternaria* ανήκουν σε τρεις δομικές κατηγορίες:

- το παράγωγο tetramic acid: tenuazonic acid (TA)
- τα παράγωγα της dibenzopyrone: alternariol (AOH), alternariol methylether (AME) και altenuene
- τα παράγωγα της perylene: altertoxins

(Andersen *et al.*, 2002)

Η ανάπτυξη των ειδών *Alternaria* στα φυτά και τους καρπούς τους είναι ιδιαίτερα προβληματική, δεδομένου ότι θα μπορούσε να οδηγήσει σε συσσώρευση των μυκοτοξινών. Η τοξικότητα της TA έχει αναφερθεί σε φυτά, σε έμβρυα κοτόπουλου και διάφορα άλλα είδη ζώων, συμπεριλαμβανομένων ινδικά χοιρίδια, ποντίκια, κουνέλια, σκύλους και πιθήκους. Τόσο AOH όσο και η AME έχουν ασθενώς οξεία

τοξικότητα, αλλά δείχνουν συνεργιστικά αποτελέσματα. Η ΑΟΗ και η ΑΜΕ είναι μεταλλαξιόγones και κυτταροτοξικές σε βακτηριακά κύτταρα και κύτταρα θηλαστικών. Σύμφωνα με έρευνες οι δύο μυκοτοξίνες είναι υπεύθυνες για μεταλλαξιόγηση και καρκινογένηση. Ένα παράδειγμα καρκινογένησης που προκαλούν οι δύο μυκοτοξίνες του μύκητα *Alternaria alternata*, είναι ο ανθρώπινος καρκίνος του οισοφάγου Liu GT et al., 1992; Greco et al., 2012).

Η καταπολέμηση του μύκητα *Alternaria alternata* γίνεται με τη χημική καταπολέμηση με τη χρήση μυκητοκτόνων ουσιών. Επίσης σημαντικές για την καταπολέμησή του, είναι οι καλλιεργητικές τεχνικές, όπως: η εναλλαγή των καλλιεργειών, έλεγχος και καταστροφή ζιζανίων και υπολειμμάτων της προηγούμενης καλλιέργειας, τοποθέτηση φυτών σε σωστές αποστάσεις, ισορροπημένη λίπανση και μείωση της υγρασίας, εφαρμογή κλαδέματος και αφαίρεση μολυσμένων καρπών. Τα τελευταία χρόνια η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών είναι ο κύριος τρόπος καταπολέμησης της ασθένειας, καθώς η χημική καταπολέμηση (ψεκασμοί με μυκητοκτόνα και χημική απολύμανση του εδάφους) δεν είναι πλέον αποτελεσματική στις ευαίσθητες ποικιλίες.

Γίνονται προσπάθειες ώστε η χημική καταπολέμηση να αντικατασταθεί από άλλες μεθόδους πιο φιλικές για το περιβάλλον και τον άνθρωπο. Τέτοιες είναι η βιολογική αντιμετώπιση που έχει ανοδική πορεία και χρησιμοποιεί ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς κυρίως των γενών *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Nectria* και *Gomatosbotrys* ή προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού μικροοργανισμών. Επίσης, φυτικά προϊόντα (εκχυλίσματα, αιθέρια έλαια, δευτερογενείς μεταβολίτες φυτών) από διάφορα φυτικά είδη φαίνεται ότι έχουν αρχίσει να κερδίζουν σημαντική θέση στο μέλλον της παγκόσμιας φαρμακοβιομηχανίας, η οποία έχει επικεντρώσει το ενδιαφέρον της για την εύρεση νέων ουσιών και μεθόδων.

1.3 Ανθεκτικότητα

Οι ασθένειες των φυτών μπορούν να αντιμετωπιστούν με διάφορες μεθόδους, όπως με την εφαρμογή καλλιεργητικών μέτρων, τη χρήση ανθεκτικών ποικιλιών και με την εφαρμογή βιολογικών μέσων και χημικών ενώσεων. Η χρησιμοποίηση χημικών ενώσεων αποτελεί την κατά κύριο λόγο μέθοδο που εφαρμόζεται στην παγκόσμια γεωργία. Από το τέλος της δεκαετίας του 1960, υπήρχαν όλο και περισσότερες αποτυχίες της χημικής καταπολέμησης λόγω εμφάνισης και επικράτησης στελεχών των παθογόνων με μειωμένη ή και έλλειψη ευαισθησίας, στα χημικά μυκητοκτόνα.

Με τον όρο ανθεκτικότητα ονομάζουμε τη σταθερή και κληρονομούμενη στους απογόνους προσαρμογή ενός μικροοργανισμού, στην παρουσία μιας αντιμικροβιακής ένωσης, που έχει ως αποτέλεσμα, την σημαντική μείωση της ευαισθησίας του πληθυσμού του παθογόνου, στον συγκεκριμένο παρεμποδιστή (Delp & Dekker, 1985). Εφόσον οι οργανισμοί που αλληλεπιδρούν για την εκδήλωση της ασθένειας είναι δύο (φυτό και μικροοργανισμός), η σοβαρότητα της ανθεκτικότητας εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά τόσο του ξενιστή όσο και του παθογόνου τα οποία όμως επηρεάζονται και από το περιβάλλον, στο οποίο αναπτύσσονται (Γεωργόπουλος και Ζιώγας, 1992).

Η δημιουργία ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα μπορεί να είναι γενετικών ή μη μεταλλαγών στο κυτταρικό επίπεδο του μύκητα. Η ανθεκτικότητα που προκύπτει λόγω μεταλλαγών στο DNA του μύκητα, διακρίνεται σε χρωματοσωματική και εξωχρωματοσωματική. Στην πρώτη περίπτωση, η ανθεκτικότητα κληρονομείται στους απογόνους κατά Μεντελικό τρόπο και ελέγχεται από χρωματοσωματικό DNA, ενώ στη δεύτερη κατά μη Μεντελικό τρόπο και ελέγχεται από γόνους που βρίσκονται στα πλασμίδια.

Τα προβλήματα ανθεκτικότητας του μύκητα *Alternaria alternata* άρχισαν να δημιουργούνται κατά κύριο λόγο εξαιτίας της εντατικής χρήσης των μυκητοκτόνων μέσα στην πάροδο των χρόνων για την αντιμετώπιση του μύκητα. η πρώτη περίπτωση ανθεκτικότητας του μύκητα που παρατηρήθηκε ήταν στον αγρό και συγκεκριμένα στα εσπεριδοειδή σε έναν από τους MBC (Methyl Benzimidazole Carbamates), στο benomyl. Έκτοτε έχουν αναφερθεί πολλές περιπτώσεις ανθεκτικότητας του *A. alternata* σε διάφορες καλλιέργειες και κατηγορίες μυκητοκτόνων.

Μειωμένη αποτελεσματικότητα των δικαρβοξυμιδικών εμφανίστηκε σε εργαστηριακές καλλιέργειες μανιταριών, κερασιών και μήλων, όπου αναπτύχθηκε ανθεκτικότητα στο iprodione, και εντοπίστηκαν σημειακές μεταλλαγές στο γονίδιο ιστιδινικής κινάσης μεταξύ του 1^{ου} και του 5^{ου} αμινοξέος της συσπειρωτής έλικας του DNA (Dry *et al*, 2004; Biggs, 1994; McPhee, 1980; Solel *et al*, 1996). Σε καλλιέργειες φιστικιάς στον αγρό εμφανίστηκε ανθεκτικότητα του *A. alternata* *pv. citri* στο iprodione, ύστερα από ένα τρίχρονο πρόγραμμα ψεκασμών (Ma and Michailides, 2004; Hutton, 1988).

Όσον αφορά την ομάδα των QoIs, παρατηρήθηκαν ανθεκτικοί πληθυσμοί του παθογόνου σε φυτικές και αμυγδαλιές στο azoxystrobin, έπειτα από τη χρήση του για 3-4 χρόνια. Η ανθεκτικότητα αυτή συνδέθηκε με μια σημειακή μεταλλαγή στο κυτόχρωμα b με αλλαγή του αμινοξέος γλυκίνη σε αλανίνη στη θέση 143 (G143A). Παράλληλα, βρέθηκε διασταυρωτή ανθεκτικότητα με το pyraclostrobin, κι αυτό από την ομάδα των QoIs (Ma *et al*, 2003; Ma *et al*, 2004,b,c; Luo *et al*, 2007).

Στο boscalid εμφανίστηκαν ανθεκτικοί βιότυποι, και σε μίγμα του με το pyraclostrobin. Η ανθεκτικότητα στο boscalid βρέθηκε ότι στηρίζεται σε αλλαγή ενός αμινοξέος στα γονίδια που κωδικοποιούν τις υπομονάδες B, C και D. Επίσης, παρατηρήθηκαν φαινόμενα διασταυρωτής ανθεκτικότητας. Διασταυρωτή θετική ανθεκτικότητα παρατηρήθηκε με το carboxin, ενώ αρνητική ανθεκτικότητα με το fluopyram και το pemthiopyrad (Avenot and Michailides,2007; Avenot *et al*, 2008; Avenot *et al*, 2009; FRAC, 2013).

1.4 Χημειοευαισθητοποίηση (Chemosensitization)

Η ανάπτυξη και εξάπλωση της ανθεκτικότητας, οδηγεί τους επιστήμονες και τις φαρμακοβιομηχανίες στην αναζήτηση νέων στρατηγικών για την αντιμετώπιση του προβλήματος. Μια νέα στρατηγική για την αντιμετώπιση και ελαχιστοποίηση του προβλήματος της ανθεκτικότητας είναι η χημειοευαισθητοποίηση.

Μια συνέπεια της χρήσης των γεωργικών μυκητοκτόνων είναι η ανάπτυξη της ανθεκτικότητας από παθογόνους μικροοργανισμούς. Μια νέα στρατηγική για να βοηθήσει στην αντιμετώπιση ή την ελαχιστοποίηση αυτού του προβλήματος είναι η αύξηση της ευαισθησίας του παθογόνου σε αντιμικροβιακά φάρμακα, ή αλλιώς “χημειοευαισθητοποίηση”. Για παράδειγμα όσον αφορά τους μύκητες, η χημειοευαισθητοποίηση μπορεί να επιτευχθεί με συνδυασμό ενός εμπορικού μυκητοκτόνου με μία μη ή οριακά μυκητοκτόνα ουσία, σε επίπεδα που μόνα τους δεν είναι αποτελεσματικά. Η χημειοευαισθητοποίηση μειώνει την πιθανότητα ανάπτυξης της ανθεκτικότητας, βελτιώνει την αποτελεσματικότητα των αντιμικροβιακών παραγόντων και μειώνει την τοξική επίδραση στο περιβάλλον, μειώνοντας αποτελεσματικά τα επίπεδα δοσολογίας των τοξικών μυκητοκτόνων (Dzhavakhiya *et al*, 2012).

Η μυκητοκτόνος ουσία που συνδυάζεται με το εμπορικό μυκητοκτόνο μπορεί να είναι ένα αιθέριο έλαιο ή συστατικό του, καθώς έχουν βρεθεί αντίστοιχες συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις σε μελέτες που έχουν γίνει. Ένα τέτοιο παράδειγμα χημειοευαισθητοποίησης είναι η μελέτη των Dzhavakhiya *et al.*, το 2012. Έδειξαν ότι η αντιμυκητιακή δράση μιας αζόλης και μιας στροβιλουρίνης μπορεί να ενισχυθεί σημαντικά μέσω συνεφαρμογής τους (co-application) με ορισμένα φυσικά ή συνθετικά προϊόντα εναντίον σημαντικών φυτοπαθογόνων μυκήτων. Συγκεκριμένα, το Quadris (azoxystrobin) σε συνδυασμό με θυμόλη σε μία μη μυκητοτοξική συγκέντρωση, έδειξε ότι προκαλεί πολύ υψηλότερη αναστολή της ανάπτυξης των *Bipolaris sorokiniana*, *Phoma glomerata*, *Alternaria sp.* και *Stagonospora nodorum* από ότι το μυκητοκτόνο μόνο του. Επίσης, όταν η διφenoκoναζόλη εφαρμόστηκε μαζί με θυμόλη, είχε σημαντικά ενισχυμένη αντιμυκητιακή δράση έναντι των μυκήτων *B.sorokiniana* και *S.nodorum*, ενώ, το μυκητοκτόνο Folicur (tebuconazole) σε συνδυασμό με 4-υδροξυ βενζαλδεύδη (4-HBA), 2,3-διυδροξυ βενζαλδεύδη ή θυμόλη, έδειξε ότι αναστέλλει την ανάπτυξη του *Alternaria alternata*, σε πολύ μεγαλύτερο επίπεδο από ό, τι το μυκητοκτόνο μόνο.

Οι Kim *et al*, το 2010, προσπάθησαν να αντιμετωπίσουν ανθεκτικά στελέχη του *Penicillium expansum* στο fludioxonil, χρησιμοποιώντας διαφορετικούς οξειδωτικούς και φυσικούς φαινολικούς παράγοντες. Μετά το πέρας της μελέτης τους, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι δραστικές ενώσεις που επιδρούν σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και στοχεύουν στο οξειδωτικό στρες και την απόκριση, μπορούν να λειτουργήσουν ως ισχυροί παράγοντες χημειοευαισθητοποίησης και να συμβάλουν στην καταπολέμηση ανθεκτικών στελεχών με μικρότερη δόση μυκητοκτόνων. Τα ανθεκτικά αυτά στελέχη φαίνεται ότι έχουν προκύψει από μια μετάλλαξη στο

oxidative stress signalling system. Μεταξύ άλλων η συνεφαρμογή θυμόλης και fludioxonil είχε ως αποτέλεσμα την χημειοευσθητοποίηση (Kim *et al.*, 2010).

Σύμφωνα με άλλες αναφορές για τη αντιβακτηριακή δράση της θυμόλης, αυτή όπως και η καρβακρόλη, αποσυνθέτουν/διαλύουν την εξωτερική μεμβράνη και έτσι αυξάνουν τη διαπερατότητά της και διευκολύνουν την διείσδυση των αντιβιοτικών στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια (Abreu *et al.*, 2011).

2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Υλικά και Μέθοδοι

2.1.1 Υλικά

Φυσικά προϊόντα

Στο πείραμα μελετήθηκε η παρεμποδιστική δράση προϊόντων φυσικής προέλευσης σε στελέχη του μύκητα *Alternaria alternata*, σε διάφορες συγκεντρώσεις. Τα προϊόντα φυσικής προέλευσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ένα εκχύλισμα σπόρων γκρέιπφρουτ ως εμπορικό σκεύασμα με το όνομα Citricidal, ένα αιθέριο έλαιο (Tea tree oil, ΤΤΟ) και ένας δευτερογενής μεταβολίτης (Thymol).

Ο πίνακας που ακολουθεί απεικονίζει τα φυσικά προϊόντα που χρησιμοποιήθηκαν, τον διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε και τον παρασκευαστή του προϊόντος.

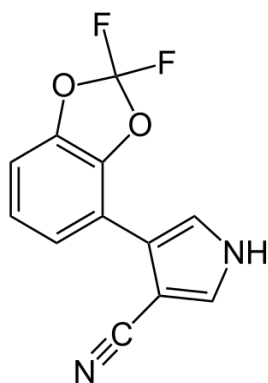
Πίνακας 1: Φυσικά προϊόντα που χρησιμοποιήθηκαν

Φυσικό Προϊόν	Διαλύτης	Παρασκευαστής
Grapefruit Seed Extract	Νερό	Higher Nature
Tea tree oil	Αιθανόλη	Sigma
Thymol	Αιθανόλη	Sigma

Μυκητοκτόνα

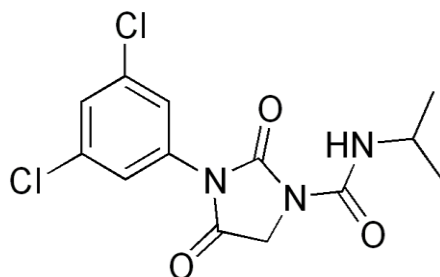
Για τη μελέτη της συνεργιστικής δράσης της θυμόλης χρησιμοποιήθηκαν οι εξής τέσσερις δραστικές ουσίες: fludioxonil, iprodione, pyraclostrobin, boscalid.

Το **fludioxonil** (4-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-4-yl)-1H-pyrrole-3-carbonitrile) (Εικ. 14) ανήκει στην ομάδα των φαινυλοπυρρολικών (phenylpyrroles). Είναι μη διασυστηματικό μυκητοκτόνο, με καλή υπολειμματική δράση και παρουσιάζει καλή σταθερότητα στο φως και είναι αποτελεσματικό για την αντιμετώπιση και παθογόνων φυλλώματος, όπως είναι τα γένη *Botrytis*, *Monilinia* και *Alternaria*. Η δραστική ουσία fludioxonil έχει εγκριθεί στην Ελλάδα από το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων για ορισμένες καλλιέργειες λαχανικών και καλλωπιστικών φυτών.



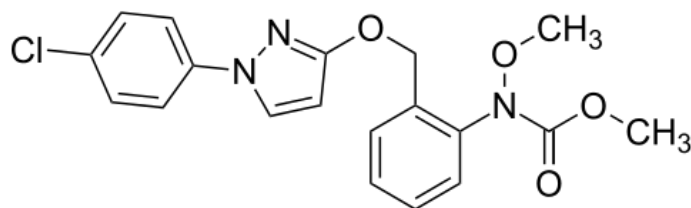
Εικόνα 8: Χημική δομή του fludioxonil

Το **iprodione** (3-(3,5-dichlorophenyl)-*N*-isopropyl-2,4-dioxoimidazolidine-1-carboxamide) ανήκει στα δικαρβοξιμιδικά (dicarboximides). Είναι μυκητοκτόνο με προληπτική και θεραπευτική δράση. Παρεμποδίζει τη μυκηλιακή αύξηση και τη βλάστηση κονιδίων και είναι κατάλληλο για την καταπολέμηση μυκήτων των γενών *Alternaria*, *Botrytis*, *Monilinia*, *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Corticium*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Phoma*, *Rhizoctonia*, *Typhula* σε πολλές καλλιέργειες.



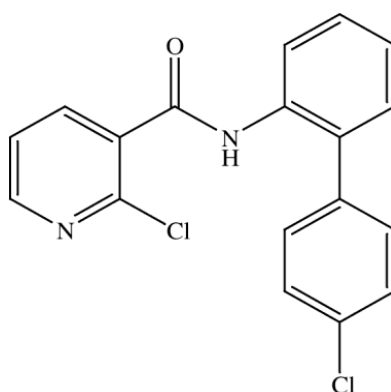
Εικόνα 9: Χημική δομή του iprodione

Το **pyraclostrobin** (methyl 2-[1-(4-chlorophenyl)pyrazol-3-yloxymethyl]-*N*-methoxycarbanilate) (Εικ. 17) ανήκει στα μεθοξυκαρβαμιδικά και είναι ένας από τους παρεμποδιστές Qo (Quinone “outside” inhibitors). Είναι αποτελεσματικό για την καταπολέμηση διαφόρων παθογόνων, όπως *Plasmopara viticola*, *Phytophthora infenstans*, *Puccinia sp.*, *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani* και *Botrytis cinerea*.



Εικόνα 10: Χημική δομή του pyraclostrobin

Το **boscalid** (2-chloro-*N*-(4'-chlorobiphenyl-2-yl) nicotinamide) (Εικ. 16) ανήκει στα “νεώτερα” καρβοξαμιδικά μυκητοκτόνα. Είναι διασυστηματικό μυκητοκτόνο με προληπτική και θεραπευτική δράση και είναι αποτελεσματικό για την καταπολέμηση σοβαρών παθογόνων, όπως *Botrytis*, *Sclerotinia*, *Monilinia* κ.α.



Εικόνα 11: Χημική δομή του boscalid

Ο πίνακας που ακολουθεί απεικονίζει τα μυκητοκτόνα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα μυκητοτοξικότητας *in vitro*, την ομάδα στην οποία ανήκουν, την καθαρότητα, τον διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε και τον παρασκευαστή τους. Η συγκέντρωση του διαλύτη στο υλικό καλλιέργειας ήταν μέχρι 1%.

Πίνακας 2: Δραστικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμές συνεργισμού της θυμόλης.

Δραστική ουσία	Χημική ομάδα	Καθαρότητα	Διαλύτης	Παρασκευαστής
fludioxonil	Φαινυλοπυρρολικά	Analytical	Αιθανόλη	Syngenta Crop protection
iprodione	Δικαρβοξιμιδικά	Analytical	Αιθανόλη	BASF
pyraclostrobin	Μεθοξυκαρβαμιδικά	Analytical	Ακετόνη	BASF
boscalid	Καρβοξαμιδικά	Technical	Μεθανόλη	BASF

Θρεπτικό υλικό P.D.A.

Για τη παρασκευή 1L θρεπτικού υλικού P.D.A. (potato dextrose agar) 1L, γεμίζουμε δύο κωνικές φιάλες του ενός λίτρου (1L) με 500 ml απεσταγμένο νερό στη κάθε μία. Στην πρώτη προσθέτουμε 200 gr πατάτας, καθαρισμένης και τεμαχισμένης σε μικρά κομμάτια και βράζουμε για 45 min. Παράλληλα, προσθέτουμε 20 gr agar στη δεύτερη φιάλη και ζεσταίνουμε μέχρι να λιώσει. Στη συνέχεια εκχυλίζουμε την πατάτα και το εκχύλισμα το ρίχνουμε στη φιάλη με το νερό και το άγαρ. Προσθέτουμε 20 gr δεξτρόζη και συνεχίζουμε το ζέσταμα μέχρι να ομογενοποιηθεί το μίγμα. Τέλος, το υλικό διαμοιράστηκε και τοποθετήθηκε στον κλίβανο για 20 λεπτά αποστείρωσης.

Το υλικό αυτό χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια και ανάπτυξη του μύκητα *Alternaria alternata*.

Υγρό Θρεπτικό υλικό P.D. Broth

Για τη παρασκευή 1L θρεπτικού υλικού P.D.Broth. (potato dextrose broth) προσθέτουμε σε 1l απεσταγμένο νερό 24 gr P.D. σε σκόνη. Το υλικό αποστειρώθηκε σε κλίβανο για 20 min. Χρησιμοποιήθηκε για την υγρή καλλιέργεια του μύκητα *Alternaria alternata*.

Θρεπτικό υλικό V8 για σποριοποίηση

Για την παρασκευή θρεπτικού υλικού για σποριοποίηση χρησιμοποιήθηκε εμπορικός ζωμός λαχανικών (V8), ο οποίος φυγοκεντρήθηκε στις 8.000 στροφές για 10 min. 200 ml φυγοκεντρίμενο V8 και 3gr CaCO₃ (ανθρακικό ασβέστιο) προστέθηκαν σε 20gr λιωμένο agar και συμπληρώθηκε με απεσταγμένο νερό μέχρι να συμπληρωθεί 1l (agar 2%). Το υλικό αποστειρώθηκε σε κλίβανο για 20 min. Χρησιμοποιήθηκε για την σποριοποίηση του μύκητα *Alternaria alternata*.

Βιολογικό υλικό

Το βιολογικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη αποτελείται από 35 στελέχη αγρού του μύκητα *Alternaria alternata*, τα οποία είχαν απομονωθεί από την περιοχή της Πελοποννήσου και η προέλευση των οποίων παρουσιάζονται στον πίνακα 3. Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται και τα μυκητοκτόνα στα οποία έχουν ανθεκτικότητα τα στελέχη, έτσι όπως βρέθηκε από μελέτη είχε προηγηθεί.

Πίνακας 3: Τα στελέχη του μύκητα *Alternaria alternata* που χρησιμοποιήθηκαν

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	ΕΙΔΟΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ
AAK1	Τομάτα	Συμβατική	azoxystrobin
AAK2	Τομάτα	Συμβατική	-
AAKK1	Τομάτα	Συμβατική	boscalid, azoxystrobin
AATK1	Τομάτα	Βιολογική	-
AAMLK2	Τομάτα	Συμβατική	cyprodinil, azoxystrobin, tebuconazole, mancozeb
AAMLNS2	Τομάτα	Συμβατική	azoxystrobin
AS1	Τομάτα	Συμβατική	-
AS5	Τομάτα	Συμβατική	boscalid, isopyrazam, azoxystrobin, mancozeb
AS6	Τομάτα	Συμβατική	azoxystrobin
AS7	Τομάτα	Συμβατική	tebuconazole
AS8	Τομάτα	Συμβατική	azoxystrobin
AS9	Τομάτα	Συμβατική	azoxystrobin, fludioxonil, iprodione
AS10	Τομάτα	Συμβατική	cyprodinil, azoxystrobin, pyraclostrobin, tebuconazole, mancozeb
AS11	Τομάτα	Συμβατική	boscalid, azoxystrobin, fludioxonil iprodione, mancozeb
AS13	Τομάτα	Συμβατική	-
AS23	Τομάτα	Συμβατική	isopyrazam
AAP3	Τομάτα	Συμβατική	boscalid, azoxystrobin
AAP4	Τομάτα	Συμβατική	fludioxonil, iprodione
AAP5	Τομάτα	Συμβατική	-
AAP6	Τομάτα	Συμβατική	fludioxonil, iprodione
AAP10	Τομάτα	Συμβατική	isopyrazam, azoxystrobin
AAP11	Τομάτα	Συμβατική	fluopyram, isopyrazam
AAP12	Τομάτα	Συμβατική	isopyrazam, azoxystrobin
AAP15	Τομάτα	Συμβατική	isopyrazam
AAP16	Τομάτα	Συμβατική	boscalid
ALBO1	Τομάτα	Συμβατική	azoxystrobin
ALBO2	Τομάτα	Συμβατική	azoxystrobin, fludioxonil, iprodione
ALBO3	Τομάτα	Συμβατική	iprodione
AATM3BIO	Τομάτα	Βιολογική	isopyrazam, fludioxonil
AATM8BIO	Τομάτα	Βιολογική	isopyrazam
AATM9BIO	Τομάτα	Βιολογική	-
AATM10BIO	Τομάτα	Βιολογική	isopyrazam
AAPoBIO2	Τομάτα Pomodoro	Βιολογική	isopyrazam, azoxystrobin, tebuconazole
AAPoBIO6	Τομάτα Pomodoro	Βιολογική	isopyrazam
AAMLSKED2	Τομάτα	Συμβατική	boscalid, isopyrazam, azoxystrobin

Άλλα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν:

Μικροσκόπιο (OLYMPUS): Χρησιμοποιήθηκε για τη μικροσκοπική παρατήρηση.

Αιματοκυτόμετρο: Χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση των κονιδίων του μύκητα.

Microplate reader (MRX)

Κλίβανος αποστείρωσης (Autoclave-steam sterilizer TUTTNAUER 2340)

Θάλαμος επώασης 25 °C

2.1.2 Μέθοδοι

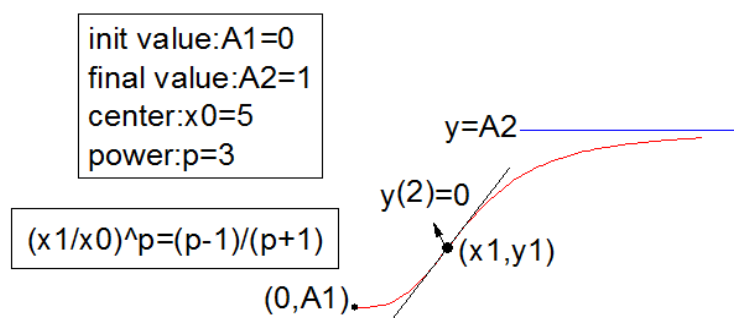
2.1.2.1 Διερεύνηση της αποτελεσματικότητας φυσικών προϊόντων στη παρεμπόδιση του μύκητα *Alternaria alternata* σε στερεό υπόστρωμα.

Η διερεύνηση της αποτελεσματικότητας των τριών φυσικών προϊόντων, που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα, στη παρεμπόδιση του μύκητα *Alternaria alternata*, έγινε με βάση τη μυκηλιακή παρεμπόδιση του μύκητα σε στερεό υπόστρωμα P.D.A.. Αρχικά, ο μύκητας καλλιεργήθηκε σε στερεό υπόστρωμα P.D.A. και την τέταρτη ημέρα ανάπτυξης του μύκητα κόπηκαν δίσκοι για τη χρήση τους ως εμβόλια διαμέτρου 5 mm. Τα εμβόλια τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με στερεό υπόστρωμα P.D.A., στο οποίο είχε ενσωματωθεί το φυσικό προϊόν και επώαστηκαν σε θάλαμο επώασης θερμοκρασίας 25 °C. Η επώαση έγινε για 5 ημέρες. Την 3η έως και την 5η ημέρα ανάπτυξης του μύκητα μετρήθηκαν οι δύο διάμετροι της κάθε αποικίας και υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους. Η μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα μετρήθηκε με τον τρόπο που προαναφέρθηκε, σε τρυβλία με επτά διαφορετικές συγκεντρώσεις φυσικού προϊόντος. Υπήρχαν τρεις επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση. Υπολογίστηκε η επί τοις εκατό (%) μυκηλιακής παρεμπόδισης σε σύγκριση με το μάρτυρα (0 ppm φυσικού προϊόντος) και στη συνέχεια υπολογίστηκαν οι τιμές EC₅₀ για την 3η ημέρα ανάπτυξης.

Για τον υπολογισμό της τιμής του EC₅₀ χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο της λογιστικής συνάρτησης (logistic function) το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως βάση για την ανάλυση σιγμοειδών καμπυλών δόσης-απόκρισης (dose-response curves), όπως π.χ. στην περίπτωση των βιοδοκιμών (De lean *et al.*, 1978).

Για τον υπολογισμό του EC₅₀ από το πρότυπο της λογιστικής εξίσωσης έγινε χρήση του λογισμικού Origin Pro. 8. Και της ενσωματωμένης σε αυτό λογιστικής εξίσωσης logistic function, η οποία έχει την παρακάτω μορφή:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x / x_0)^p} + A_2$$



Όπου:

y : η απόκριση του οργανισμού (εκφραζόμενη ως παρεμπόδιση % μάρτυρα)

A1 : η απόκριση του οργανισμού για $x=0$ (όπου x , η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας)

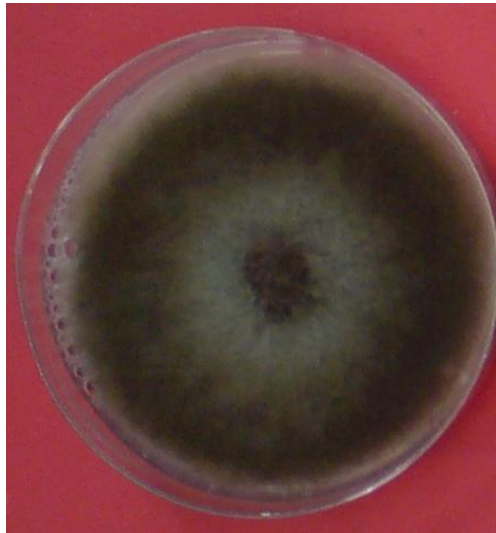
A2 : η απόκριση του οργανισμού για $x=\infty$ (όπου x , η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας)

x : η τιμή της συγκέντρωσης της εφαρμοζόμενης δραστικής ουσίας

x₀ : η τιμή EC_{50} ως υπολογιζόταν από το πρόγραμμα

p : παράμετρος που χαρακτηρίζει την κλίση (*slope factor*) του ευθύγραμμου τμήματος

Η διαδικασία που περιγράφηκε έγινε για όλα τα στελέχη του μύκητα που μελετήθηκαν.



Εικόνα 12: Αποικία του μύκητα σε στερεό υπόστρωμα P.D.A.

Ο πίνακας που ακολουθεί δείχνει τις συγκεντρώσεις του κάθε φυσικού προϊόντος που εφαρμόστηκαν.

Πίνακας 4: Συγκεντρώσεις των φυσικών προϊόντων που χρησιμοποιήθηκαν

Συγκεντρώσεις (ppm)		
Grapefruit seed extract	Tea tree oil	Thymol
0	0	0
50	50	5
100	100	10
200	200	20
400	400	40
800	800	80
1600	1600	160

Για να περιοριστεί η πτητικότητα των φυσικών προϊόντων, thymol και ΤΤΟ και για να μην υπάρξει αλληλεπίδραση μεταξύ των συγκεντρώσεων, τα τρυβλία τοποθετήθηκαν ανά συγκέντρωση σε διαφορετικές πλαστικές συσκευασίες.

2.1.2.2 Ανάπτυξη μικρομεθόδου σε υγρό θρεπτικό υλικό για τη χρήση της στον έλεγχο αποτελεσματικότητας μυκητοκτόνων ουσιών στο στέλεχος AS9

Για το πείραμα ανάπτυξης μικρομεθόδου στο MRX, αρχικά, καλλιεργήθηκε το στέλεχος AS9 σε στερεό υπόστρωμα V8. Έπειτα από δέκα μέρες επώασης σε θερμοκρασία 25 °C, κόπηκαν 10 δίσκοι με το μύκητα διαμέτρου 8,5 mm και τοποθετήθηκαν σε 10 ml αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια αναδεύτηκαν ώστε να αποκολληθούν τα σπόρια του μύκητα από τους δίσκους, και μετρήθηκαν τρεις φορές τα σπόρια στο κυτταρόμετρο. Η πυκνότητα των σπορίων βρέθηκε $\sim 4,5 \times 10^5$ σπόρια/ml νερού. Στη συνέχεια, έγιναν διαδοχικές αραιώσεις στο μισό της προηγούμενης και προέκυψαν αιωρήματα σπορίων με τις ακόλουθες συγκεντρώσεις:

- $4,5 \times 10^5$ (σπόρια/ml)
- $2,25 \times 10^5$ (σπόρια/ml)
- $1,125 \times 10^5$ (σπόρια/ml)
- $0,563 \times 10^5$ (σπόρια/ml)
- $0,281 \times 10^5$ (σπόρια/ml)
- $0,141 \times 10^5$ (σπόρια/ml)
- $0,070 \times 10^5$ (σπόρια/ml)
- $0,035 \times 10^5$ (σπόρια/ml)
- $0,0178 \times 10^5$ (σπόρια/ml)
- $0,0089 \times 10^5$ (σπόρια/ml)

Το micropate που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από 8x12 θέσεις των 200 μl. Σε όλες τις θέσεις τοποθετήθηκαν 100 μl υγρό θρεπτικό υλικό P.D.B. Στις περιφερικές θέσεις προστέθηκαν 100 μl νερού αποστειρωμένου. Στις θέσεις που έμειναν, 6 για κάθε μία από τις 9 στήλες (2^1 - 10^1 στήλη), τοποθετήθηκαν 100 μl από κάθε αιώρημα (6 επαναλήψεις για κάθε ένα από τα 10 αιωρήματα).

Το microplate τοποθετήθηκε σε πλαστικό δοχείο με ατμόσφαιρα υγρασίας και στη συνέχεια στον κλίβανο επώασης για 5 ημέρες. Κάθε ημέρα γινόταν μέτρηση στο MRX στα 405, 450 και 650 nm.

Στον πίνακα που ακολουθεί απεικονίζεται η διάταξη των χειρισμών όπως τοποθετήθηκαν στο microplate.

Πίνακας 6: Οι χειρισμοί του πειράματος ανάπτυξης της μικρομεθόδου, όπως τοποθετήθηκαν στο microplate.

H	G	F	E	D	C	B	A	
M	M	M	M	M	M	M	M	1
M	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	M	2
M	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	M	3
M	1,125	1,125	1,125	1,125	1,125	1,125	M	4
M	0,563	0,563	0,563	0,563	0,563	0,563	M	5
M	0,281	0,281	0,281	0,281	0,281	0,281	M	6
M	0,141	0,141	0,141	0,141	0,141	0,141	M	7
M	0,070	0,070	0,070	0,070	0,070	0,070	M	8
M	0,035	0,035	0,035	0,035	0,035	0,035	M	9
M	0,0178	0,0178	0,0178	0,0178	0,0178	0,0178	M	10
M	0,0089	0,0089	0,0089	0,0089	0,0089	0,0089	M	11
M	M	M	M	M	M	M	M	12

* Όπου M, το μέσο (υπόστρωμα χωρίς αιώρημα κονιδίων).

** Οι συγκεντρώσεις των αιωρημάτων που αναγράφονται στον πίνακα είναι εκφρασμένες ως 10^5 σπόρια/ml.

2.1.2.3 Διερεύνηση της αποτελεσματικότητας της θυμόλης στο στέλεχος AS9 με τη χρήση μικρομεθόδου

Αρχικά, παρασκευάστηκαν 7 διαλύματα thymol σε P.D. Broth (τουλάχιστον 2 ml), με συγκεντρώσεις: 0, 10, 20, 40, 80, 160, 320 ppm αντίστοιχα. Τα διαλύματα αυτά προστέθηκαν στις θέσεις του microplate σε ποσότητα 100 μl, ώστε η τελική συγκέντρωση της thymol να είναι 0, 5, 10, 20, 40, 80 και 160 ppm αντίστοιχα.

Έπειτα, επιλέχθηκαν και παρασκευάστηκαν 3 επίπεδα αιωρημάτων κονιδίων, που επιλέχθηκαν από το προηγούμενο πείραμα, με πυκνότητες $2,25 \times 10^5$, $0,281 \times 10^5$ και $0,035 \times 10^5$ σπόρια/ml αντίστοιχα.

Στην συνέχεια, τοποθετήθηκε στις θέσεις τις πρώτης (A) σειράς του microplate 100 μl υγρό υπόστρωμα P.D. Broth και 100 μl αποστειρωμένο νερό. Σε κάθε μία από τις υπόλοιπες 7 σειρές (B, C, D, E, F, G, H) του microplate, τοποθετήθηκαν 100 μl P.D. Broth με thymol σε συγκεντρώσεις 0, 10, 20, 40, 80, 160, 320 ppm αντίστοιχα.

Οι δώδεκα στήλες του microplate χωρίστηκαν σε τρεις τετράδες, μία τετράδα για κάθε ένα από τα τρία αιωρήματα κονιδίων. 100 μl από κάθε αιώρημα προστέθηκαν στις θέσεις, τεσσάρων από τις δώδεκα στήλες (με εξαίρεση την πρώτη σειρά). Με αυτόν τον τρόπο για κάθε χειρισμό έγιναν τέσσερις επαναλήψεις.

Το microplate τοποθετήθηκε σε πλαστικό κουτί το οποίο είχε υγρασία και στη συνέχεια στον κλίβανο επώασης για 5 ημέρες. Κάθε ημέρα γινόταν μέτρηση στο MRX στα 405, 450 και 650 nm.

Στον πίνακα που ακολουθεί, απεικονίζεται η διάταξη της τοποθέτησης των υγρών υποστρωμάτων με thymol και των αιωρημάτων στο microplate.

Πίνακας 7: Οι χειρισμοί του πειράματος διερεύνησης της αποτελεσματικότητας της θυμόλης με τη χρήση μικρομεθόδου, όπως τοποθετήθηκαν στο microplate.

H	G	F	E	D	C	B	A	
160 ppm thy / 2,25	80 ppm thy / 2,25	40 ppm thy / 2,25	20 ppm thy / 2,25	10 ppm thy / 2,25	5 ppm thy / 2,25	0 ppm thy / 2,25	M	1
160 ppm thy / 2,25	80 ppm thy / 2,25	40 ppm thy / 2,25	20 ppm thy / 2,25	10 ppm thy / 2,25	5 ppm thy / 2,25	0 ppm thy / 2,25	M	2
160 ppm thy / 2,25	80 ppm thy / 2,25	40 ppm thy / 2,25	20 ppm thy / 2,25	10 ppm thy / 2,25	5 ppm thy / 2,25	0 ppm thy / 2,25	M	3
160 ppm thy / 2,25	80 ppm thy / 2,25	40 ppm thy / 2,25	20 ppm thy / 2,25	10 ppm thy / 2,25	5 ppm thy / 2,25	0 ppm thy / 2,25	M	4
160 ppm thy / 0,281	80 ppm thy / 0,281	40 ppm thy / 0,281	20 ppm thy / 0,281	10 ppm thy / 0,281	5 ppm thy / 0,281	0 ppm thy / 0,281	M	5
160 ppm thy / 0,281	80 ppm thy / 0,281	40 ppm thy / 0,281	20 ppm thy / 0,281	10 ppm thy / 0,281	5 ppm thy / 0,281	0 ppm thy / 0,281	M	6
160 ppm thy / 0,281	80 ppm thy / 0,281	40 ppm thy / 0,281	20 ppm thy / 0,281	10 ppm thy / 0,281	5 ppm thy / 0,281	0 ppm thy / 0,281	M	7
160 ppm thy / 0,281	80 ppm thy / 0,281	40 ppm thy / 0,281	20 ppm thy / 0,281	10 ppm thy / 0,281	5 ppm thy / 0,281	0 ppm thy / 0,281	M	8
160 ppm thy / 0,035	80 ppm thy / 0,035	40 ppm thy / 0,035	20 ppm thy / 0,035	10 ppm thy / 0,035	5 ppm thy / 0,035	0 ppm thy / 0,035	M	9
160 ppm thy / 0,035	80 ppm thy / 0,035	40 ppm thy / 0,035	20 ppm thy / 0,035	10 ppm thy / 0,035	5 ppm thy / 0,035	0 ppm thy / 0,035	M	10
160 ppm thy / 0,035	80 ppm thy / 0,035	40 ppm thy / 0,035	20 ppm thy / 0,035	10 ppm thy / 0,035	5 ppm thy / 0,035	0 ppm thy / 0,035	M	11
160 ppm thy / 0,035	80 ppm thy / 0,035	40 ppm thy / 0,035	20 ppm thy / 0,035	10 ppm thy / 0,035	5 ppm thy / 0,035	0 ppm thy / 0,035	M	12

* Όπου M, το μέσο (υπόστρωμα χωρίς αιώρημα κονιδίων). ** Οι συγκεντρώσεις των αιωρημάτων των κονιδίων που αναγράφονται στον πίνακα είναι εκφρασμένες ως 10^5 σπόρια/ml.

2.1.2.4 Μικροσκοπική παρατήρηση σπορίων του μύκητα από καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό με θυμόλη

Από καλλιέργεια του μύκητα *Alternaria alternata* (στελέχη: AS5, AS6) σε στερεό υπόστρωμα potato dextrose agar (P.D.A.) χωρίς θυμόλη και από καλλιέργεια του μύκητα σε στερεό υπόστρωμα (P.D.A) με θυμόλη 60 ppm, την 5^η ημέρα ανάπτυξης, έγιναν παρασκευάσματα στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Ακολούθησε μικροσκοπική παρατήρηση και έγινε σύγκριση των σπορίων που προέρχονταν από το μάρτυρα με αυτά που προέρχονταν από την καλλιέργεια στο θρεπτικό υλικό με θυμόλη.

2.1.2.5 Διερεύνηση ύπαρξης συνεργιστικής δράσης θυμόλης-μυκητοκτόνων

Για τα πειράματα συνεργισμού χρησιμοποιήθηκαν στελέχη, που επιλέχθηκαν με βάση τις τιμές EC_{50} πειράματος διερεύνησης ανθεκτικότητάς σε μυκητοκτόνα που είχε προηγηθεί της παρούσας μελέτης. Επιλέχθηκαν ανθεκτικά και ευαίσθητα στελέχη.

Για το πείραμα του συνεργισμού επιλέχθηκαν τρεις συγκεντρώσεις για τη θυμόλη (15, 30 και 60 ppm). Μεταξύ αυτών των συγκεντρώσεων βρίσκονται και οι τιμές EC_{50} των στελεχών στη θυμόλη. Στη συνέχεια,, επιλέχθηκε μια συγκέντρωση για κάθε ένα από τα τέσσερα μυκητοκτόνα, η οποία υπολογίστηκε με βάση τη συνιστώμενη δόση από το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων. Η συγκέντρωση που επιλέχθηκε ήταν 1,5 ppm.

Οι χειρισμοί που έγιναν για κάθε μυκητοκτόνο ουσία, ήταν:

- Μάρτυρας (Control), μόνο θρεπτικό υλικό
- Μυκητοκτόνος ουσία 1,5 ppm
- Θυμόλη 15 ppm
- Θυμόλη 30 ppm
- Θυμόλη 60 ppm
- Θυμόλη 15 ppm + Μυκητοκτόνος ουσία 1,5 ppm
- Θυμόλη 30 ppm + Μυκητοκτόνος ουσία 1,5 ppm
- Θυμόλη 60 ppm + Μυκητοκτόνος ουσία 1,5 ppm

Ο πίνακας 5 περιλαμβάνει τα στελέχη που δοκιμάστηκαν σε κάθε μυκητοκτόνο ουσία σε συνδυασμό με θυμόλη:

Πίνακας 5: Στελέχη που δοκιμάστηκαν στις μυκητοκτόνες ουσίες σε συνδυασμό με θυμόλη.

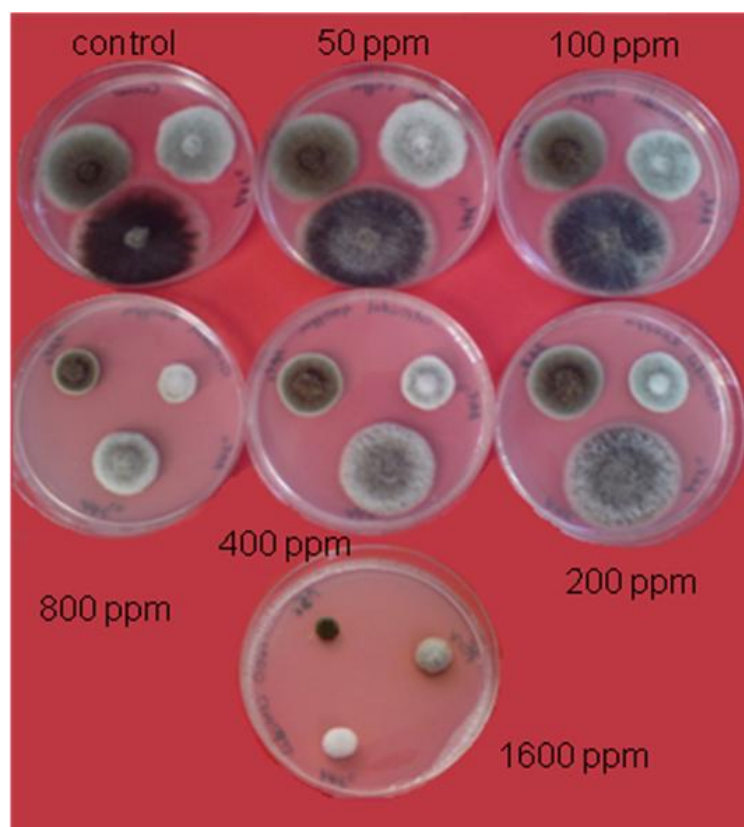
fludioxonil	iprodione	pyraclostrobin	boscalid
AAP16	AAP16		AAP16
AAP4	AAP4	AAP16	AAP3
AAP6	AAP6	AS5	AS5
AATM3BIO	ALBO2	AS10	AS10
AS11	AS11	AAMLK2	AS11
AS9	AS9		

Η επώαση έγινε για 5 ημέρες σε θάλαμο 25 °C. Οι μετρήσεις έγιναν την 3η έως και την 5η ημέρα και υπολογίσθηκε για την 5^η ημέρα μέτρησης το ποσοστό μυκηλιακής παρεμπόδισης. Για να ελεγχθεί η ύπαρξη συνεργισμού συγκρίθηκε η παρεμπόδιση μυκηλιακής ανάπτυξης του μύκητα της συνεφαρμογής, με το άθροισμα των επιμέρους παρεμποδίσεων των δύο ουσιών, thymol και μυκητοκτόνο. Όταν παρεμπόδιση της συνεφαρμογής > άθροισμα επιμέρους παρεμποδίσεων υπάρχει συνεργιστική δράση, όταν παρεμπόδιση της συνεφαρμογής = άθροισμα επιμέρους παρεμποδίσεων υπάρχει αθροιστική δράση, όταν παρεμπόδιση της συνεφαρμογής < άθροισμα επιμέρους παρεμποδίσεων, ανταγωνιστική δράση. Για κάθε εφαρμογή έγιναν τρεις επαναλήψεις.

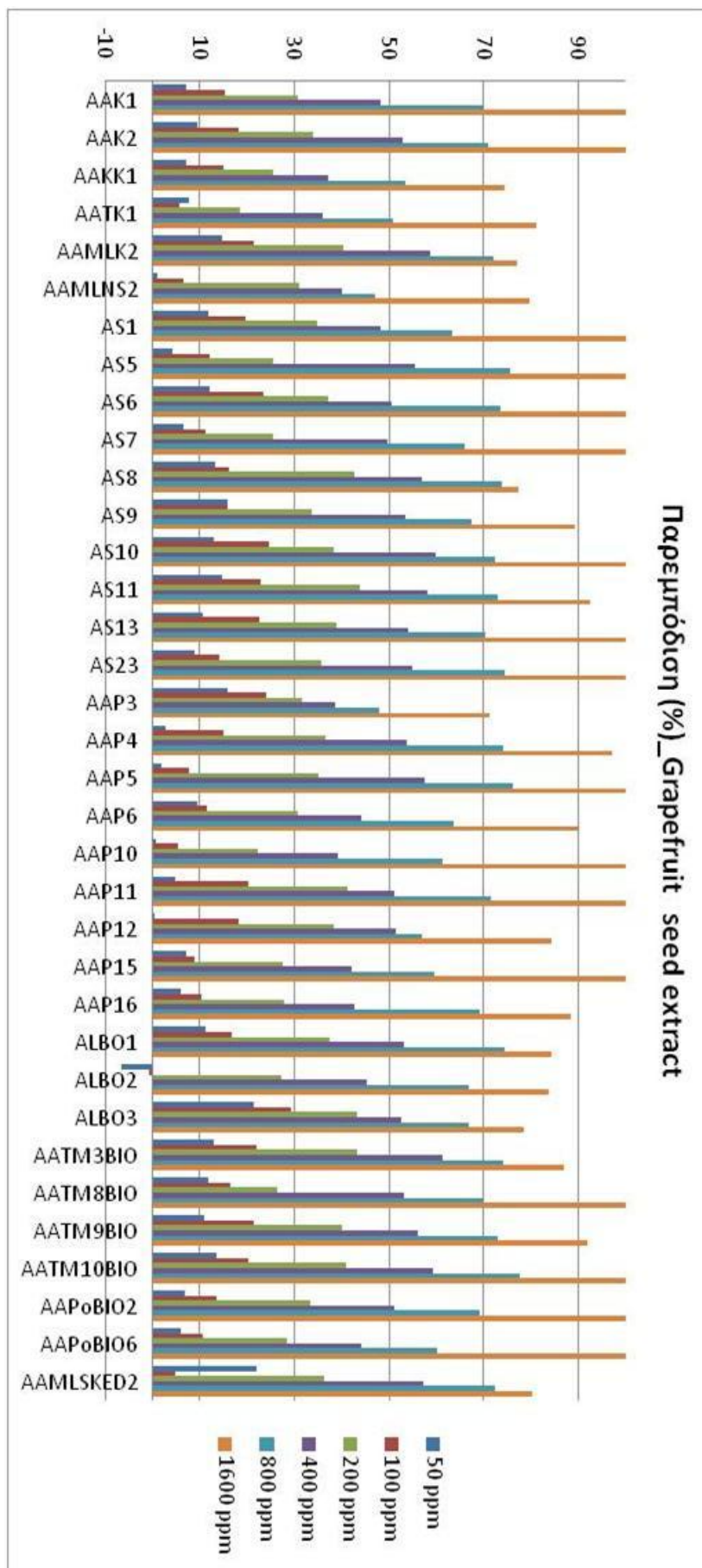
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Διερεύνηση της αποτελεσματικότητας εκχυλίσματος σπόρων (Grapefruit seed extract, GSE) στη παρεμπόδιση του μύκητα *Alternaria alternata* σε στερεό υπόστρωμα.

Το Grapefruit Seed Extract (GSE) έδειξε ότι παρεμποδίζει την μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα. Στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (1600 ppm) που εφαρμόστηκε στα 35 στελέχη του μύκητα, τα ποσοστά παρεμπόδισης κυμάνθηκαν από 71,4 έως 100%. Ένα στέλεχος, το ALBO2, στις συγκεντρώσεις 50 και 100 ppm παρουσίασε αύξηση σε σύγκριση με το μάρτυρα δηλαδή, εμφάνισε αρνητική παρεμπόδιση, το οποίο φαίνεται και στην εικόνα 14. Στην εικόνα 13 φαίνεται η μυκηλιακή ανάπτυξη τριών στελεχών την 5^η ημέρα ανάπτυξης, υπό την επίδραση του GSE στις 7 διαφορετικές συγκεντρώσεις που εφαρμόστηκαν. Η εικόνα 14 απεικονίζει τα ποσοστά της μυκηλιακής παρεμπόδισης των 35 στελεχών του μύκητα στις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν (50-1600 ppm), την 3^η ημέρα ανάπτυξης.

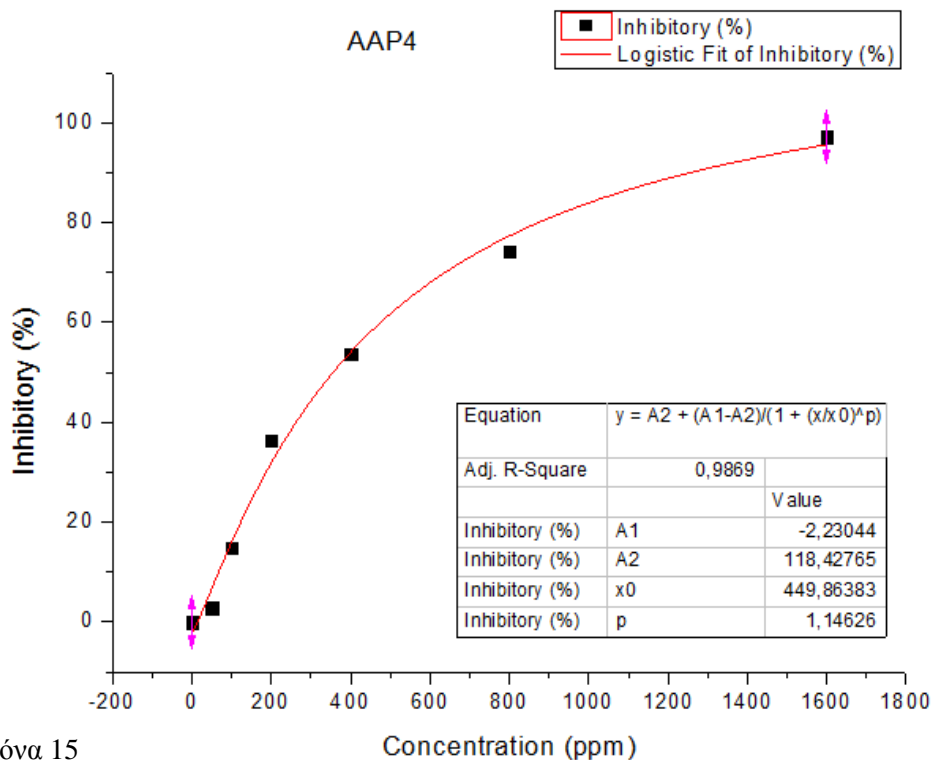


Εικόνα 13: τριών στελεχών του μύκητα *A. alternata* στις διάφορες συγκεντρώσεις GSE που εφαρμόστηκαν, την 5^η ημέρα ανάπτυξης.

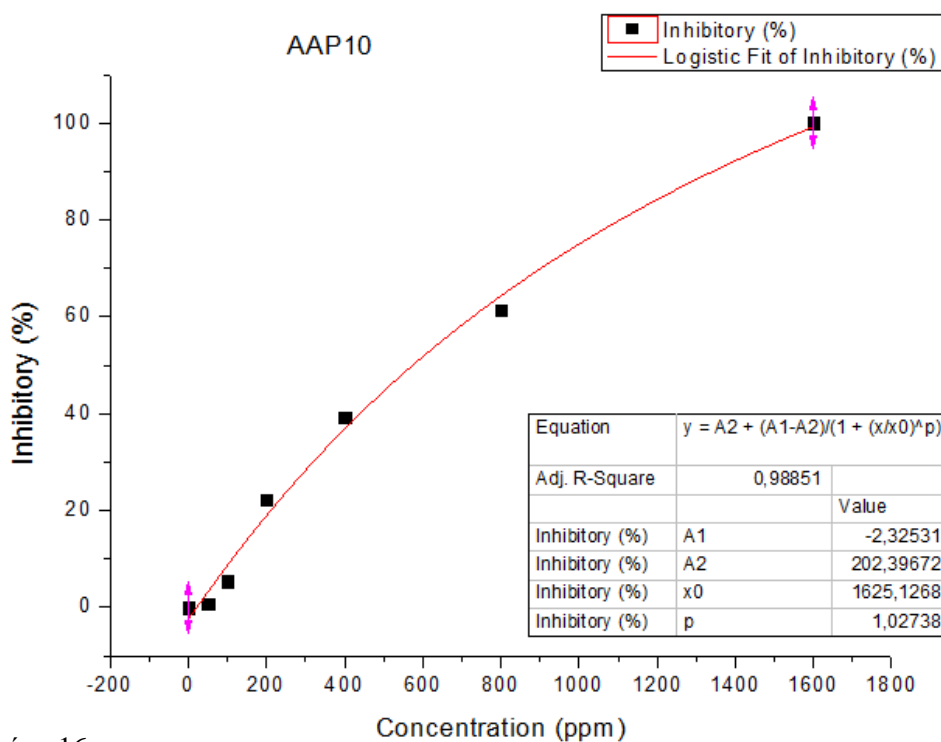


Εικόνα 14

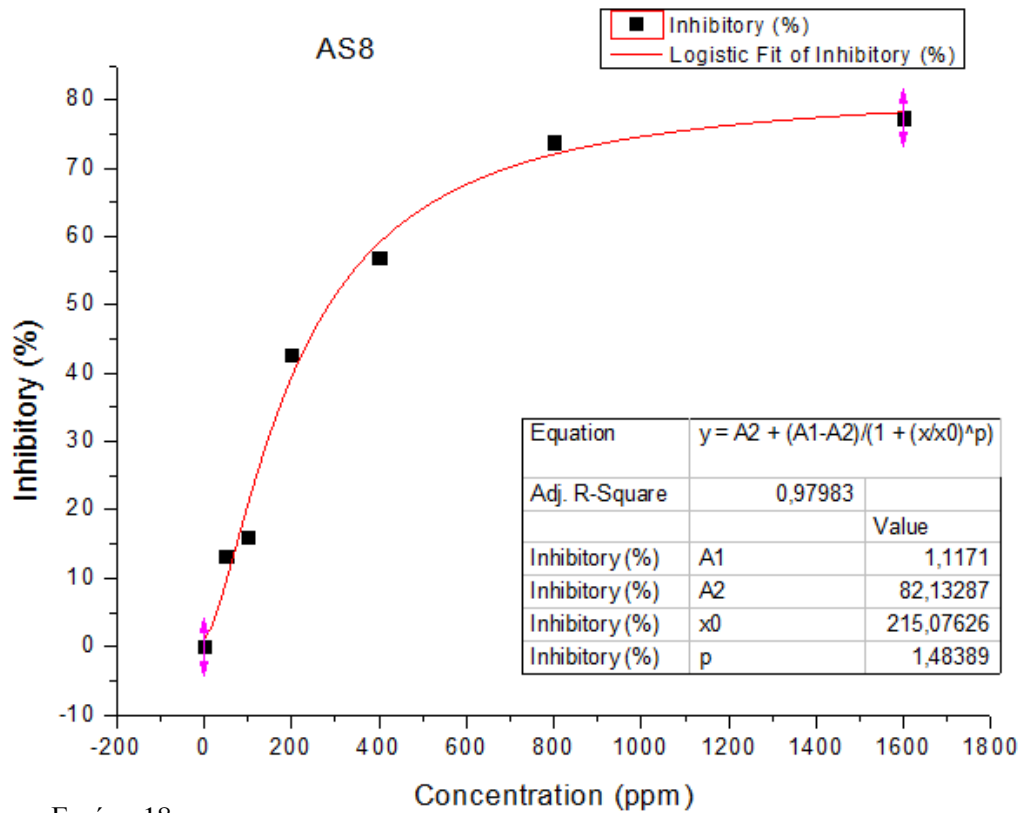
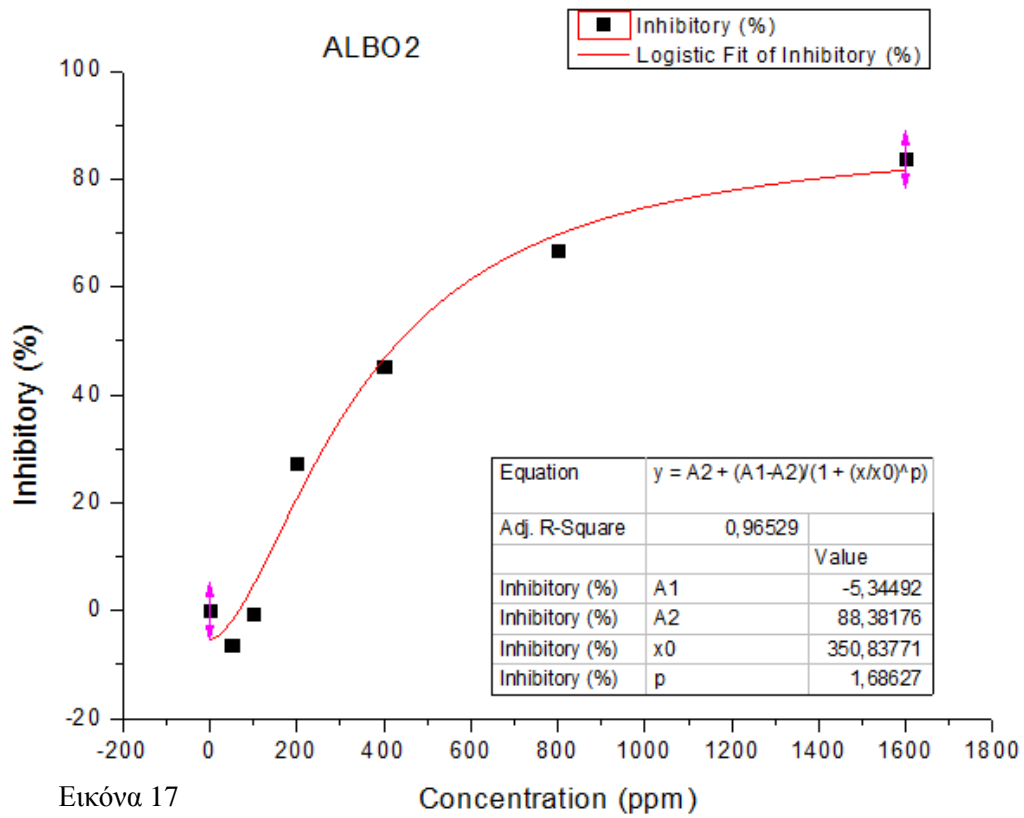
Για τον υπολογισμό του EC₅₀ από το πρότυπο της λογιστικής εξίσωσης έγινε χρήση του λογισμικού Origin Pro.8. και της ενσωματωμένης σε αυτό λογιστικής εξίσωσης logistic function, όπως προαναφέρεται στο κεφάλαιο 1.2.1 (Μέθοδοι). Με βάση τα ποσοστά παρεμπόδισης την 3^η ημέρα ανάπτυξης, έγιναν οι τυπικές καμπύλες παρεμπόδισης στο στατιστικό πρόγραμμα Origin Pro 8, για τον υπολογισμό των τιμών EC₅₀, ακολουθούν οι εικόνες με τις τυπικές καμπύλες παρεμπόδισης τεσσάρων στελεχών:



Εικόνα 15



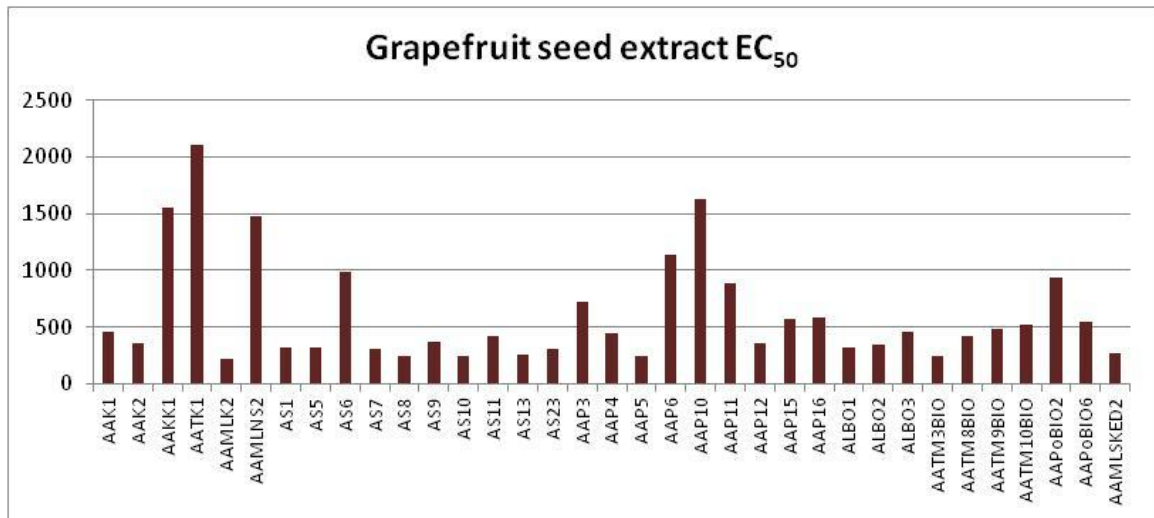
Εικόνα 16



Πίνακας 8: Οι τιμές EC₅₀ των στελεχών του μύκητα *A. alternata* στο GSE.

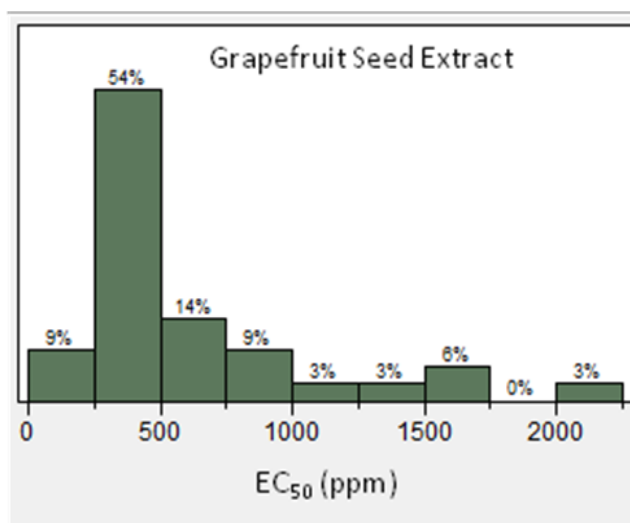
Grapefruit Seed Extract		
Στέλεχος	EC ₅₀ (ppm)	R ²
AAK1	458,43	0,99802
AAK2	352,13	0,99987
AAKK1	1556,25	0,99716
AATK1	2104,7	0,98224
AAMLK2	213,97	0,99441
AAMLNS2	1478,19	0,9102
AS1	317,17	0,99756
AS5	323,11	0,99529
AS6	990,36	0,99284
AS7	313,34	0,99504
AS8	251,08	0,97983
AS9	373,78	0,96436
AS10	250,87	0,99533
AS11	420,83	0,99063
AS13	262,38	0,99718
AS23	302,79	0,99224
AAP3	727,39	0,98053
AAP4	449,86	0,9869
AAP5	242,50	0,98774
AAP6	1143,40	0,98913
AAP10	1625,13	0,98851
AAP11	892,21	0,9706
AAP12	363,96	0,92257
AAP15	569,29	0,98251
AAP16	588,70	0,99489
ALBO1	320,65	0,99366
ALBO2	350,84	0,96529
ALBO3	458,99	0,99697
AATM3BIO	248,75	0,99589
AATM8BIO	422,22	0,99511
AATM9BIO	478,79	0,97227
AATM10BIO	526,41	0,99418
AAPoBIO2	934,76	0,98707
AAPoBIO6	544,15	0,99225
AAMLSKED2	273,02	0,98115

Η εικόνα 19 και ο πίνακας 8 παρουσιάζουν τις τιμές EC₅₀ των στελεχών του μύκητα *Alternaria alternata* υπολογισμένες με βάση την 3^η ημέρα ανάπτυξης του μύκητα.



Εικόνα 19: Οι τιμές EC₅₀ των στελεχών του μύκητα *Alternaria alternata* για το GSE, την 3^η ημέρα ανάπτυξης του μύκητα.

Οι τιμές EC₅₀ στο σύνολο των στελεχών κυμάνθηκαν από 213,97 έως 2104,7 ppm. Η μικρότερη τιμή EC₅₀ = 213,97 ppm ανήκει στο στέλεχος AAMLK2, ενώ η μεγαλύτερη τιμή ανήκει στο στέλεχος AATK1. Όπως φαίνεται στον πίνακα 8 ο μέσος όρος των EC₅₀ των στελεχών του μύκητα για το GSE, είναι: M.O. EC₅₀ = 603,726 ppm, ενώ, ο διάμεσος, που αντιστοιχεί στο 50% του πληθυσμού, είναι δ= 422,2 ppm. Το EC₅₀ για το 54% του πληθυσμού (εικόνα 20) είναι βρίσκεται μεταξύ 250-500 ppm.



Εικόνα 20

Quantiles		
100,0%	maximum	2104,7
99,5%		2104,7
97,5%		2104,7
90,0%		1509,4
75,0%	quartile	727,4
50,0%	median	422,2
25,0%	quartile	313,3
10,0%		250,0
2,5%		214,0
0,5%		214,0
0,0%	minimum	214,0
	Mean	603,72576

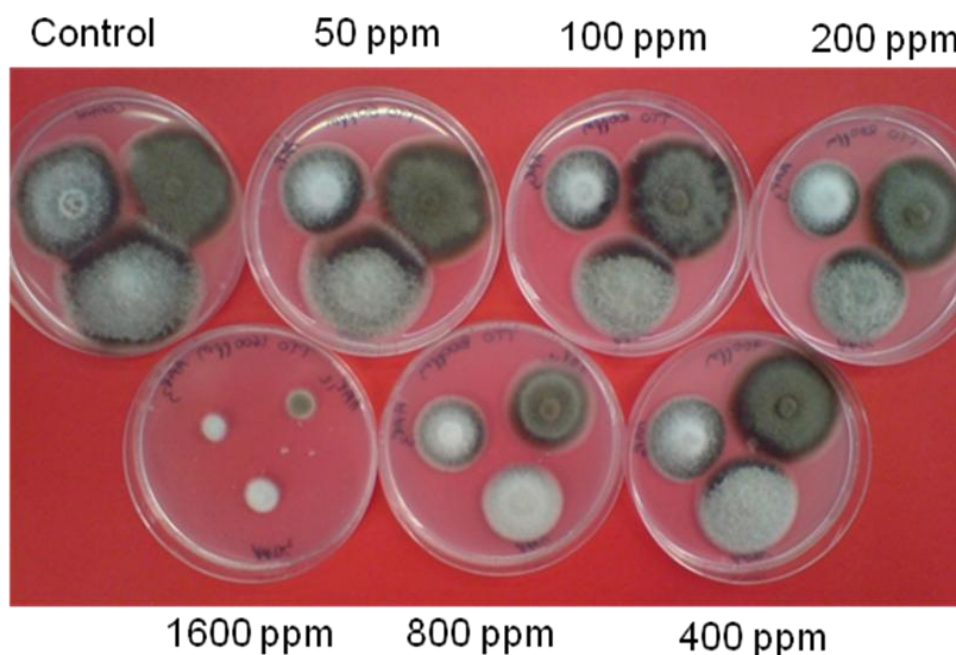
Πίνακας 8

Ο πίνακας 8 δείχνει την τιμή EC₅₀ για κάθε στέλεχος του πληθυσμού του μύκητα *Alternaria alternata*.

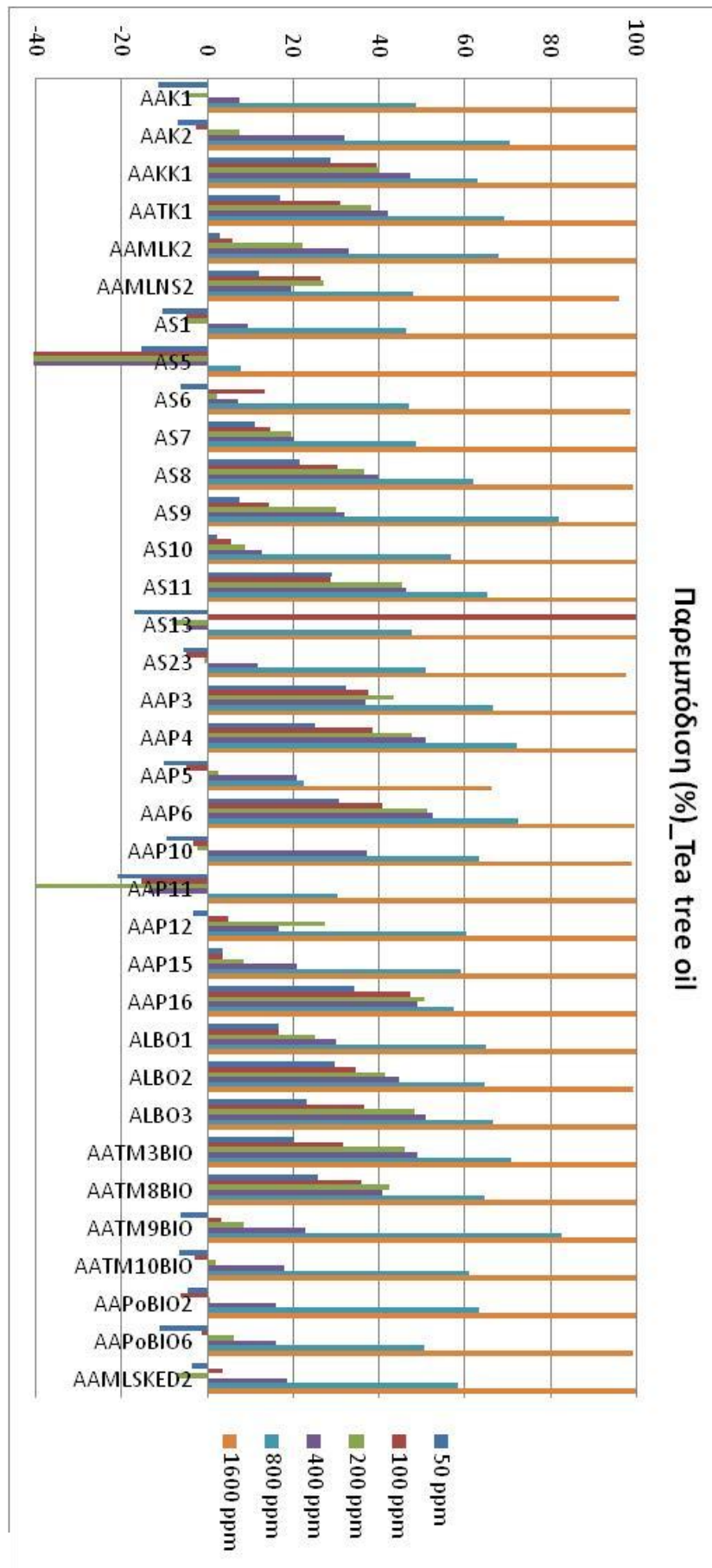
3.2 Διερεύνηση της αποτελεσματικότητας Tea tree oil στη παρεμπόδιση του μύκητα *Alternaria alternata* σε στερεό υπόστρωμα.

Το Tea tree oil (TTO) έδειξε ότι παρεμποδίζει την μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα. Η μυκηλιακή ανάπτυξη των στελεχών του μύκητα παρεμποδίστηκε πλήρως στη συγκέντρωση 1600 ppm, την 3^η ημέρα ανάπτυξης, με εξαίρεση ένα στέλεχος που είχε παρεμπόδιση 66,3% και 8 στελέχη που παρεμποδίστηκαν από 96 έως 99,7%. Σε μερικά στελέχη, παρατηρήθηκε αύξηση του μύκητα στις συγκεντρώσεις 50-200 ppm με αποτέλεσμα αρνητική παρεμπόδιση στις συγκεντρώσεις αυτές.

Στην εικόνα βλέπουμε την ανάπτυξη τριών στελεχών την 5^η ημέρα ανάπτυξης στις 7 συγκεντρώσεις TTO που εφαρμόστηκαν, ενώ, στην εικόνα 22 απεικονίζονται τα ποσοστά της μυκηλιακής παρεμπόδισης των 35 στελεχών του μύκητα την 3^η ημέρα ανάπτυξης.

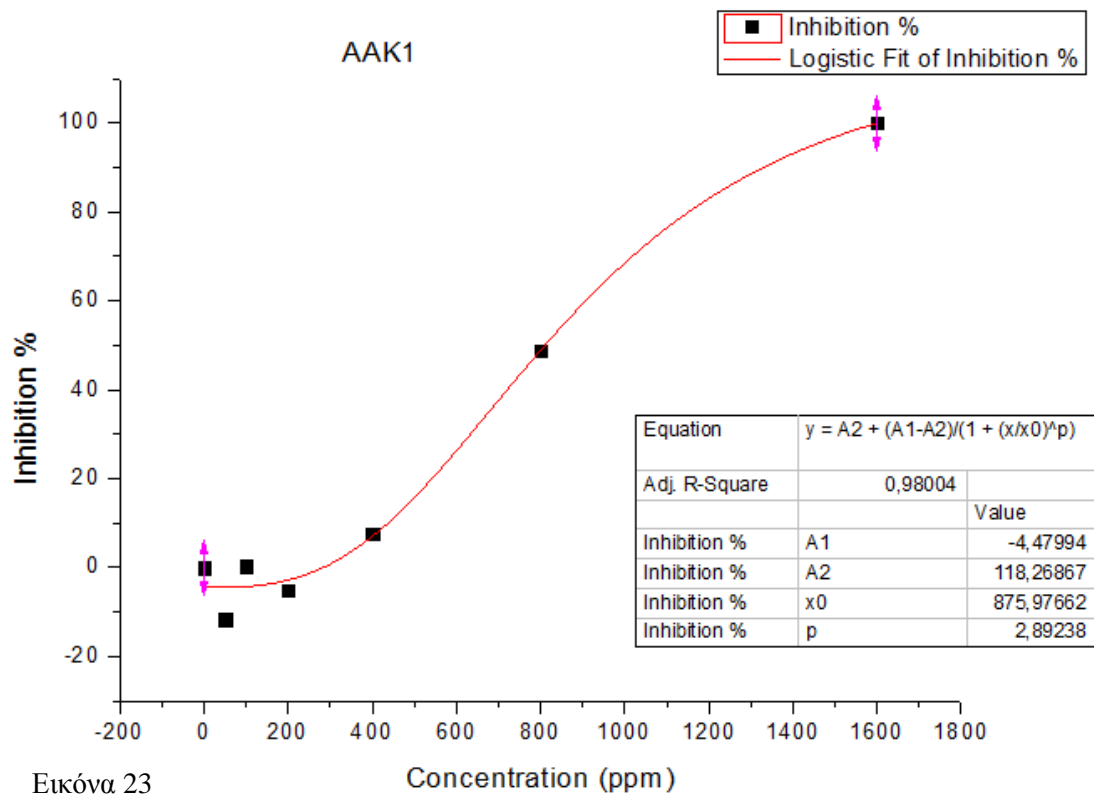


Εικόνα 21: Τρία στελέχη του μύκητα *A. alternata* στις διάφορες συγκεντρώσεις TTO που εφαρμόστηκαν, την 5η ημέρα ανάπτυξης.

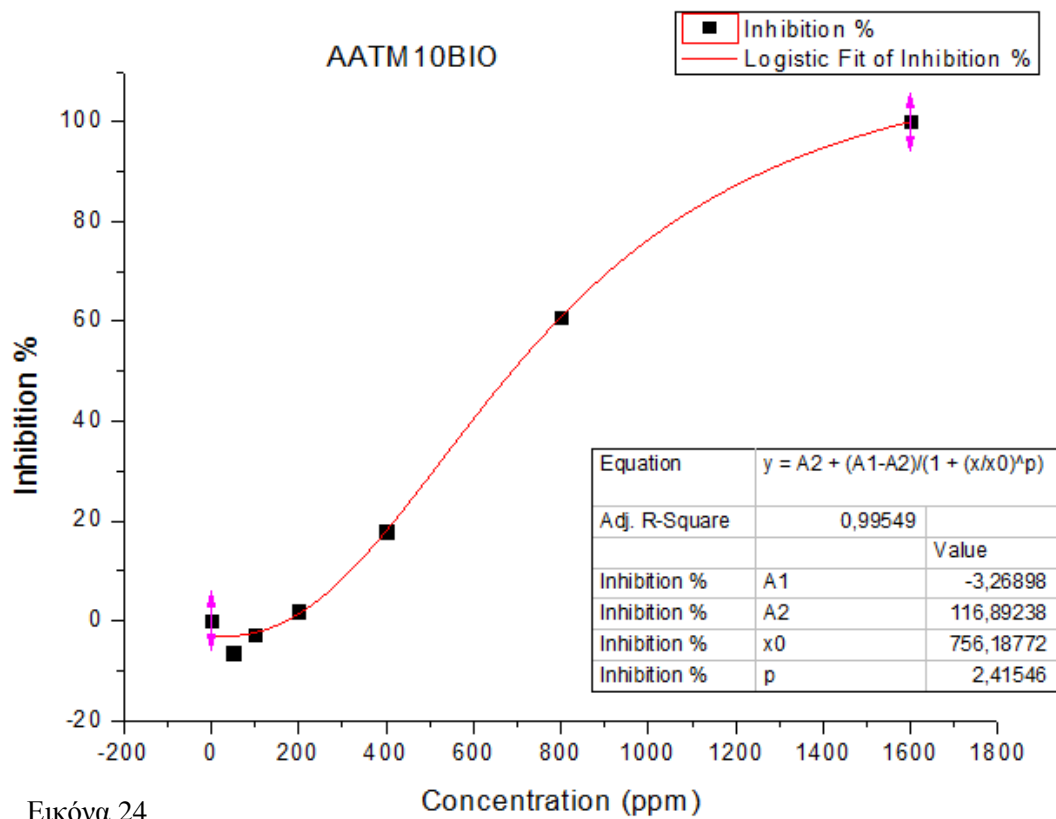


Εικόνα 22

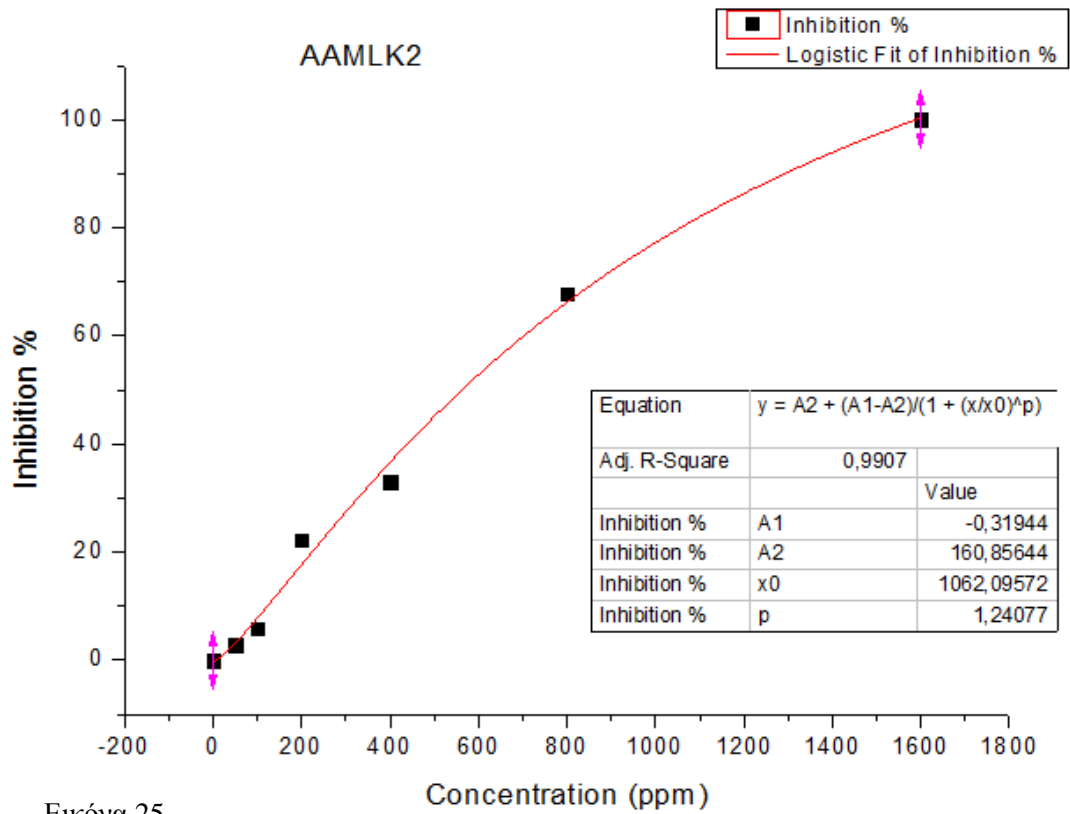
Με βάση τα ποσοστά παρεμποδίσεως της 3^η ημέρας ανάπτυξης, έγιναν οι τυπικές καμπύλες παρεμπόδισης στο στατιστικό πρόγραμμα Origin Pro 8, για τον υπολογισμό των τιμών EC₅₀ ακολουθούν οι τυπικές καμπύλες παρεμπόδισης τεσσάρων στελεχών:



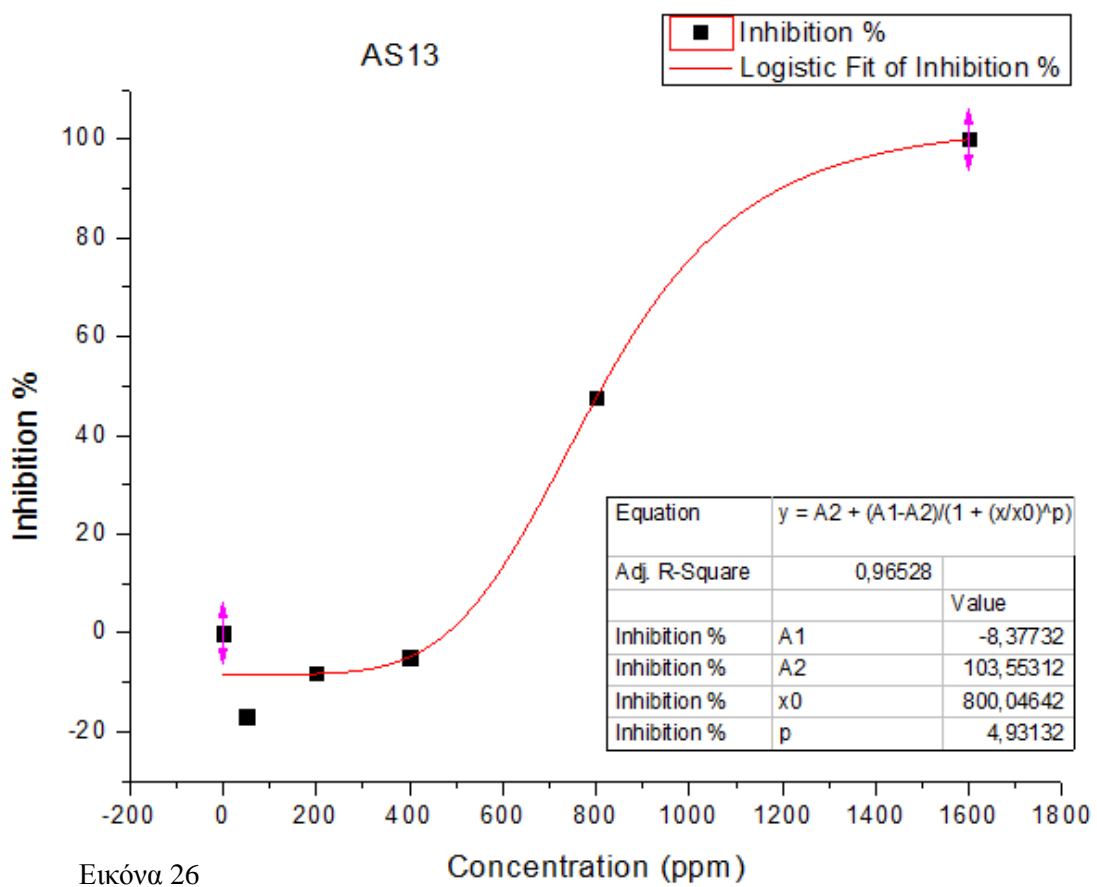
Εικόνα 23



Εικόνα 24



Εικόνα 25

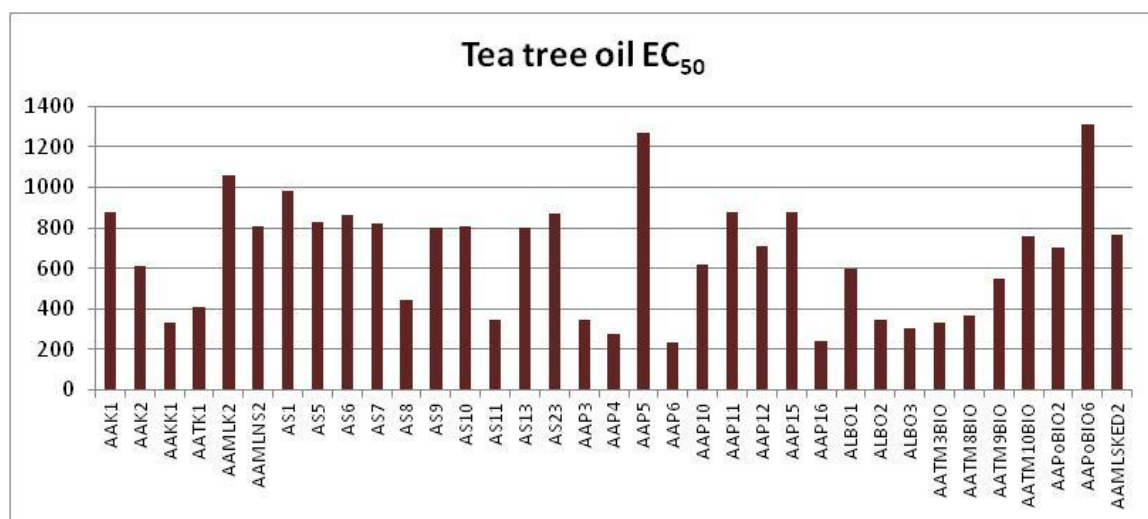


Εικόνα 26

Πίνακας 9: Οι τιμές EC₅₀ των στελεχών του μύκητα *A. alternata* στο ΤΤΟ.

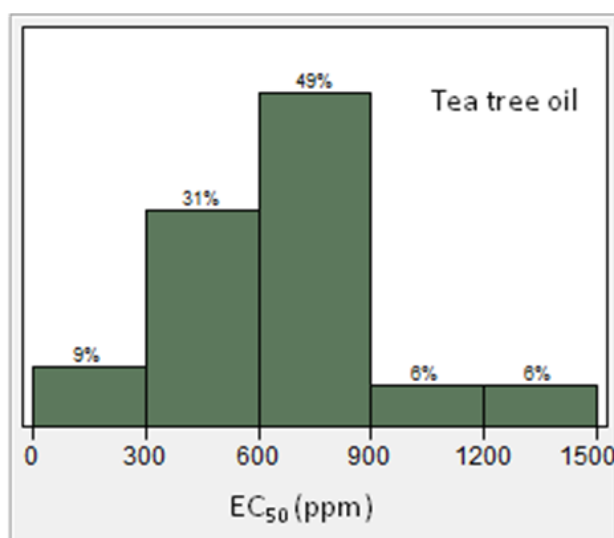
Tea tree oil		
Στέλεχος	EC ₅₀ (ppm)	R ²
AAK1	875,98	0,98004
AAK2	610,29	0,99388
AAKK1	328,98	0,9162
AATK1	409,15	0,96907
AAMLK2	1062,10	0,9907
AAMLNS2	809,01	0,86311
AS1	982,22	0,98768
AS5	825,59	0,67494
AS6	865,25	0,95211
AS7	822,56	0,96625
AS8	445,88	0,94734
AS9	797,48	0,93689
AS10	808,05	0,99202
AS11	346,34	0,93991
AS13	800,05	0,96528
AS23	873,46	0,99559
AAP3	345,41	0,8438
AAP4	278,35	0,97085
AAP5	1270,05	0,89143
AAP6	233,33	0,96325
AAP10	618,12	0,96031
AAP11	879,58	0,87469
AAP12	708,3	0,91126
AAP15	878,60	0,9981
AAP16	237,46	0,80025
ALBO1	599,89	0,96554
ALBO2	346,67	0,92985
ALBO3	302,87	0,95601
AATM3BIO	333,57	0,97663
AATM8BIO	366,23	0,91041
AATM9BIO	551,46	0,9838
AATM10BIO	756,19	0,99549
AAPoBIO2	704,63	0,99515
AAPoBIO6	1313,41	0,98071
AAMLSKED2	765,55	0,97678

Η εικόνα 27 παρουσιάζει τις τιμές EC_{50} των στελεχών του μύκητα *Alternaria alternata* υπολογισμένες με βάση την 3^η ημέρα ανάπτυξης του μύκητα.



Εικόνα 27: Οι τιμές EC_{50} των στελεχών του μύκητα *Alternaria alternata* για το ΤΤΟ, την 3^η ημέρα ανάπτυξης του μύκητα.

Οι τιμές EC_{50} κυμάνθηκαν από 233,3 έως 1313,4 ppm. Η μικρότερη τιμή EC_{50} ανήκει στο στέλεχος AAP6, ενώ η μεγαλύτερη τιμή EC_{50} = 1313,4 ppm ανήκει στο στέλεχος AAPoBIO6. Ο μέσος όρος των EC_{50} των στελεχών του μύκητα για το ΤΤΟ, είναι: M.O. EC_{50} = 661,49 ppm., ενώ, ο διάμεσος, που αντιστοιχεί στο 50% του πληθυσμού, είναι δ = 708,3 ppm. Ακολουθεί εικόνα με την κατανομή του πληθυσμού και τα ποσοστά για τις τιμές EC_{50} και πίνακας με τα ποσοστημόρια και τον μέσο όρο.



Εικόνα 28

Quantiles		
100,0%	maximum	1313,4
99,5%		1313,4
97,5%		1313,4
90,0%		1014,2
75,0%	quartile	865,2
50,0%	median	708,3
25,0%	quartile	346,7
10,0%		293,1
2,5%		233,3
0,5%		233,3
0,0%	minimum	233,3
	Mean	661,4869

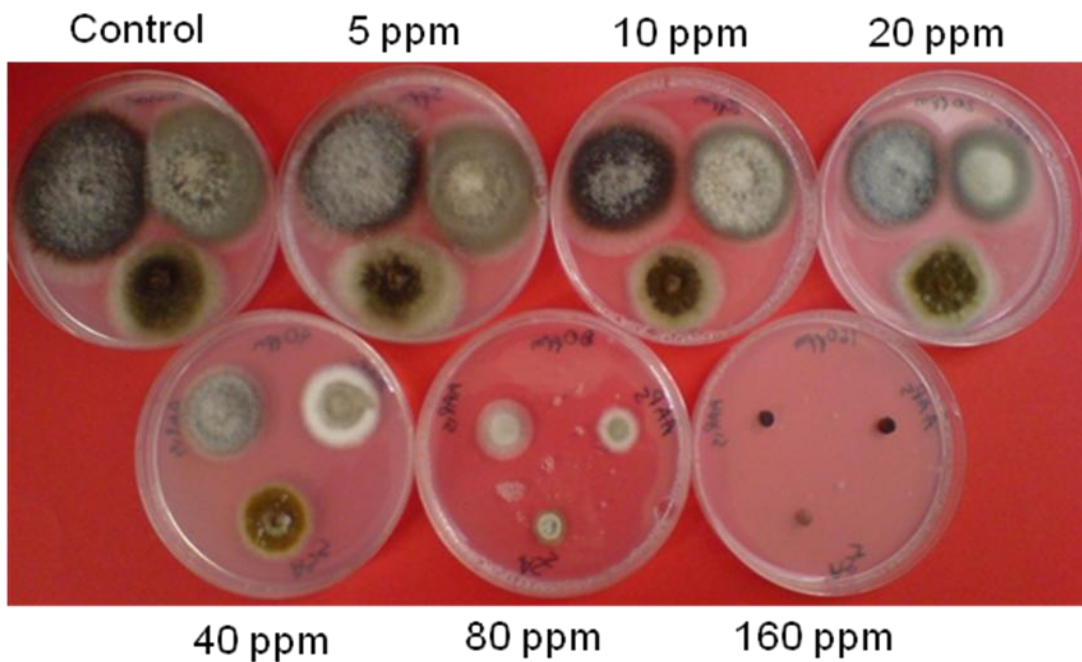
Πίνακας 9

Ο πίνακας 9 δείχνει την τιμή EC_{50} για κάθε στέλεχος του πληθυσμού του μύκητα *Alternaria alternata*.

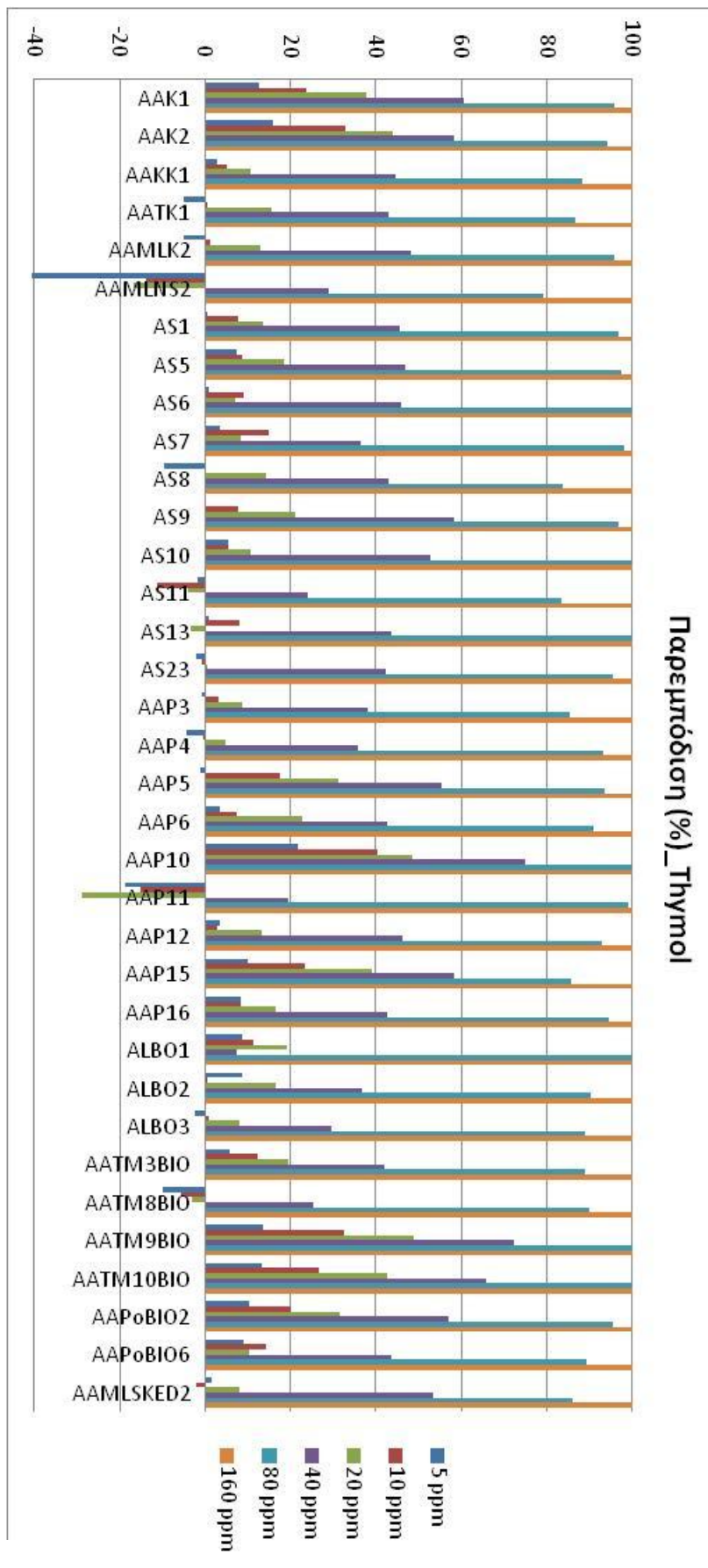
3.3 Διερεύνηση της αποτελεσματικότητας Thymol στη παρεμπόδιση του μύκητα *Alternaria alternata* σε στερεό υπόστρωμα.

Το Thymol έδειξε ότι παρεμποδίζει αποτελεσματικά την μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα. Στη συγκέντρωση 160 ppm την 3^η ημέρα ανάπτυξης, υπήρχε πλήρης μυκηλιακή παρεμπόδιση όλων των στελεχών, ενώ ήδη από τη συγκέντρωση 80 ppm υπήρχε παρεμπόδιση πάνω από 80% και για 7 στελέχη παρεμπόδιση 100%. Σε αρκετά στελέχη του μύκητα παρατηρήθηκε μυκηλιακή αύξηση στις συγκεντρώσεις 5-20 ppm που εμφανίζεται στην εικόνα 30 ως αρνητική παρεμπόδιση στις συγκεντρώσεις αυτές.

Στην εικόνα 29 βλέπουμε την ανάπτυξη τριών στελεχών την 5^η ημέρα ανάπτυξης στις 7 συγκεντρώσεις Thymol που εφαρμόστηκαν, ενώ, στην εικόνα 30 απεικονίζονται τα ποσοστά της μυκηλιακής παρεμπόδισης των 35 στελεχών του μύκητα την 3^η ημέρα ανάπτυξης.

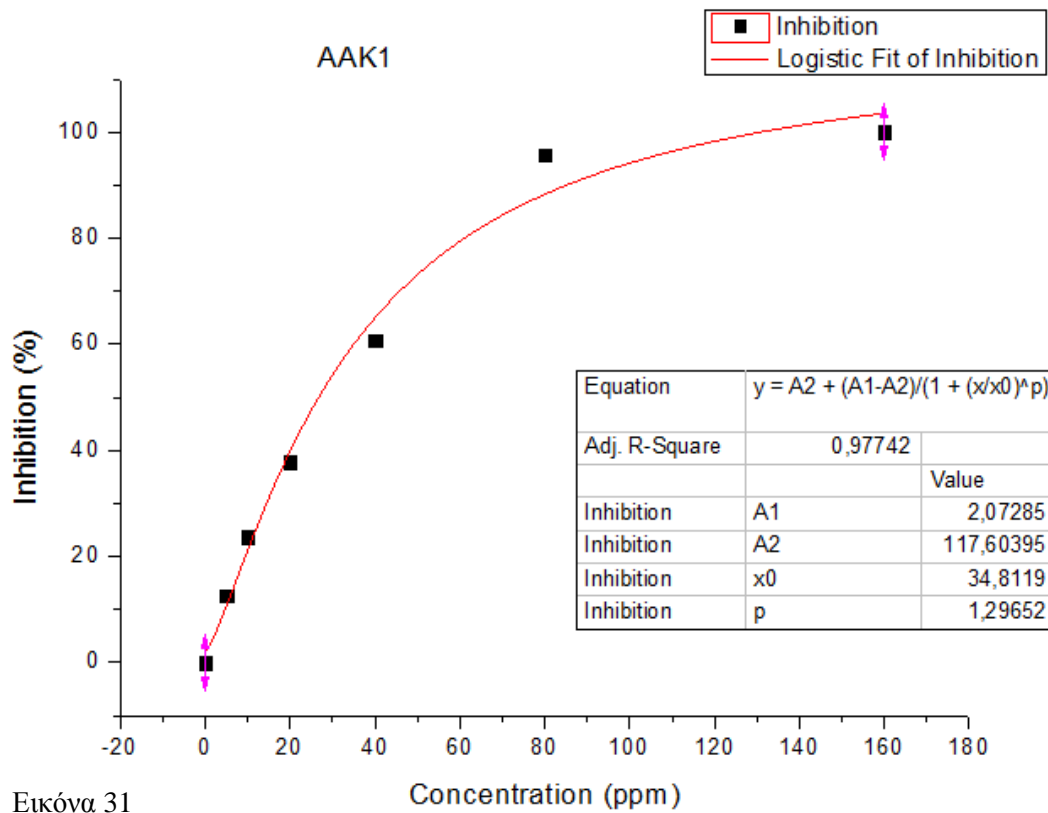


Εικόνα 29: Τρία στελέχη του μύκητα *A. alternata* στις διάφορες συγκεντρώσεις Thymol που εφαρμόστηκαν, την 5η ημέρα ανάπτυξης.

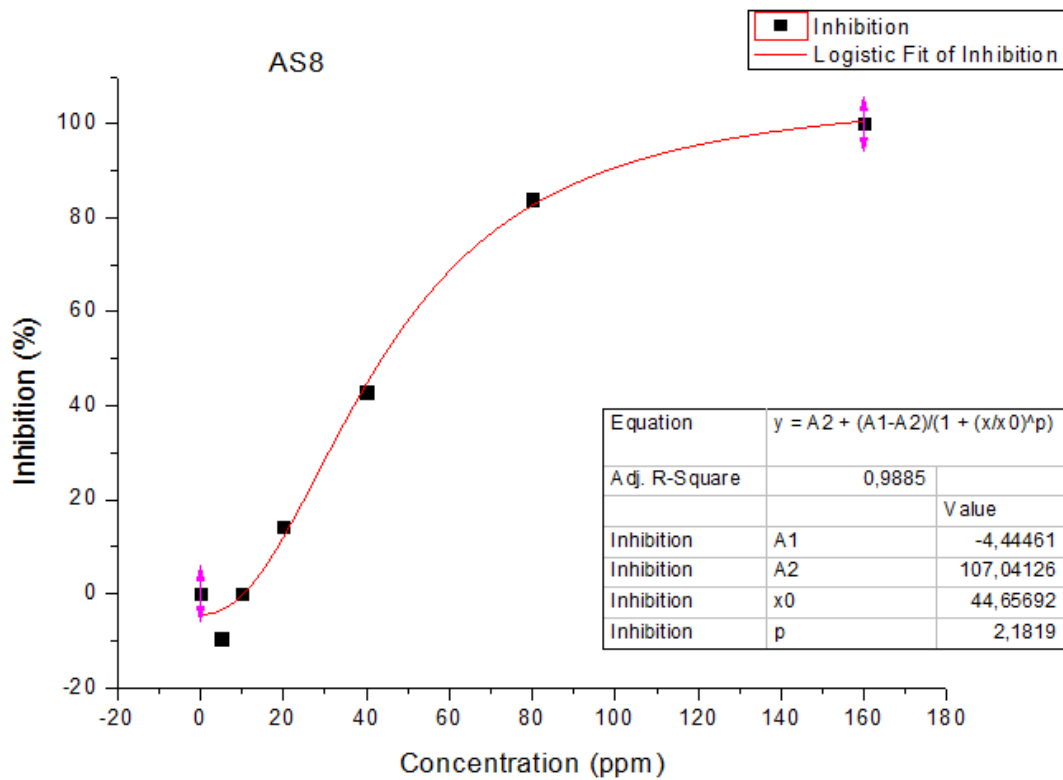


Εικόνα 30

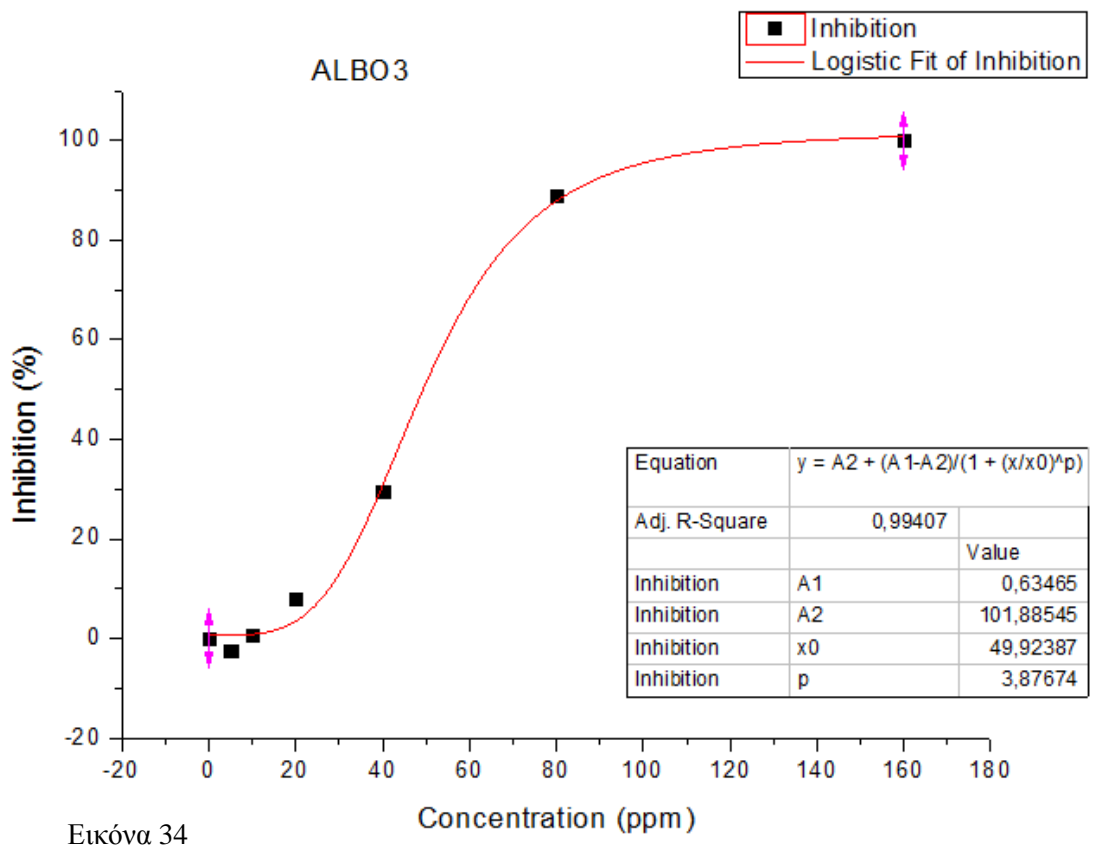
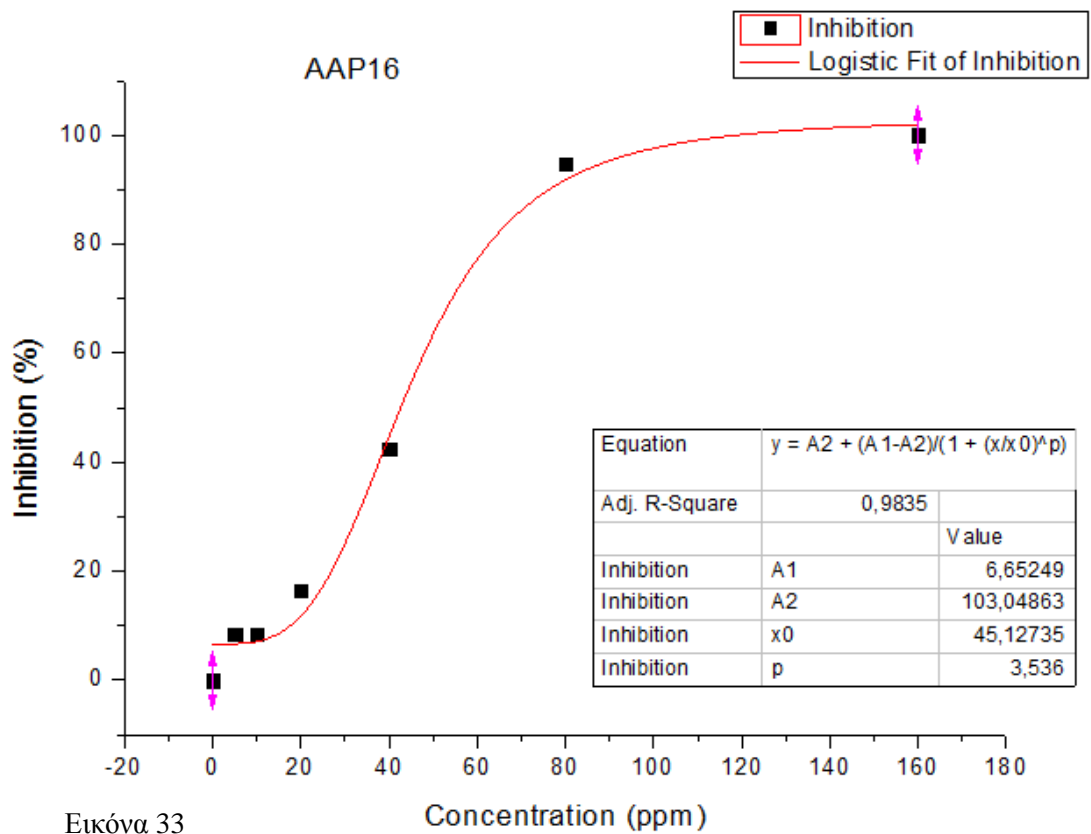
Με βάση τα ποσοστά παρεμποδίσεως της 3^η ημέρας ανάπτυξης, έγιναν οι τυπικές καμπύλες παρεμπόδισης στο στατιστικό πρόγραμμα Origin Pro 8, για τον υπολογισμό των τιμών EC₅₀ ακολουθούν οι τυπικές καμπύλες παρεμπόδισης τεσσάρων στελεχών:



Εικόνα 31



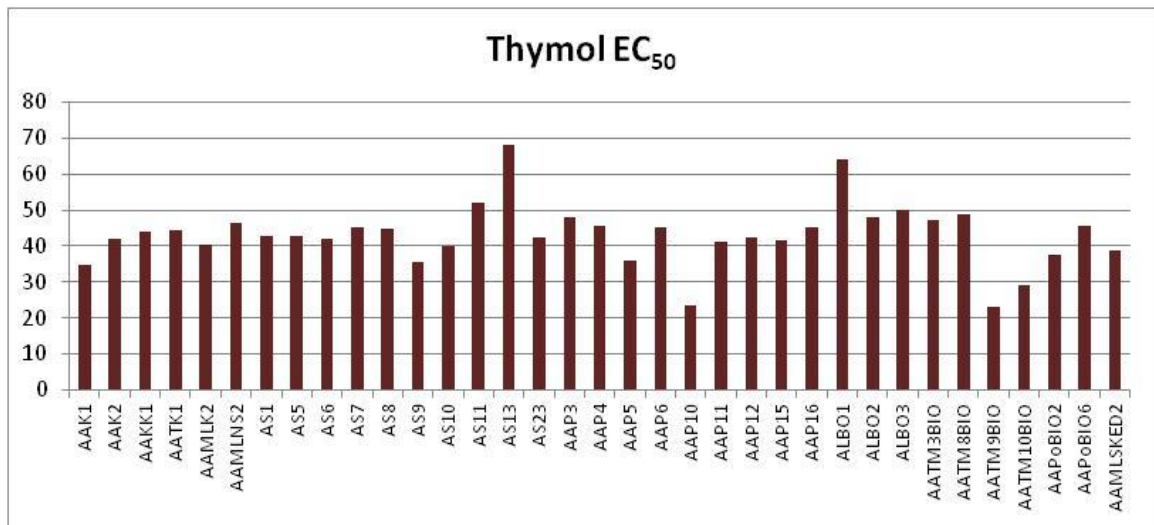
Εικόνα 32



Πίνακας 10: Οι τιμές EC₅₀ των στελεχών του μύκητα *A. alternata* στο Thymol.

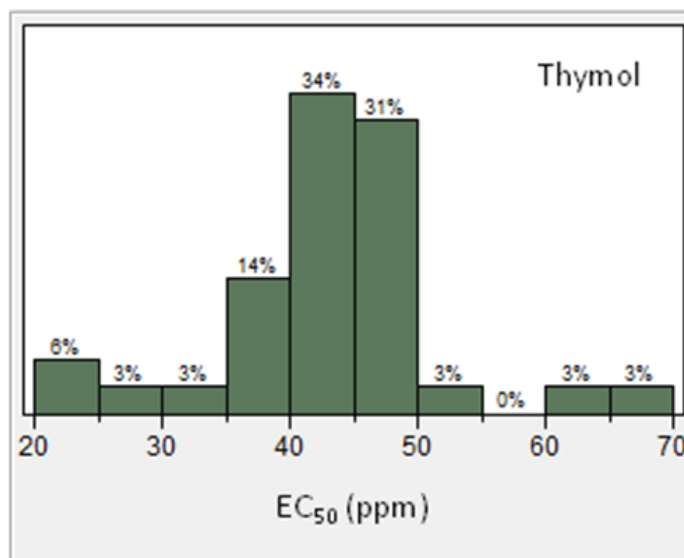
Thymol		
Στέλεχος	EC ₅₀ (ppm)	R ²
AAK1	34,81	0,97742
AAK2	42,08	0,96562
AAKK1	44,12	0,99851
AATK1	44,28	0,99319
AAMLK2	40,33	0,99141
AAMLNS2	46,50	0,88093
AS1	42,75	0,988
AS5	42,71	0,98135
AS6	41,94	0,99054
AS7	45,12	0,97811
AS8	44,67	0,9885
AS9	35,62	0,99352
AS10	39,87	0,99447
AS11	51,99	0,98702
AS13	68,13	0,9896
AS23	42,32	0,99958
AAP3	47,86	0,99889
AAP4	45,69	0,99647
AAP5	36,07	0,97682
AAP6	45,27	0,97965
AAP10	23,34	0,96873
AAP11	41,31	0,95275
AAP12	42,43	0,99619
AAP15	41,56	0,99594
AAP16	45,13	0,9835
ALBO1	64,21	0,96801
ALBO2	48,20	0,97743
ALBO3	49,92	0,99407
AATM3BIO	47,22	0,9804
AATM8BIO	48,91	0,99271
AATM9BIO	23,10	0,98175
AATM10BIO	29,00	0,97417
AAPoBIO2	37,60	0,9742
AAPoBIO6	45,65	0,97947
AAMLSKED2	38,57	0,99329

Με βάση την μυκηλιακή παρεμπόδιση υπολογίστηκαν οι τιμές EC_{50} , την τρίτη ημέρα επώασης του μύκητα. Ακολουθεί εικόνα με τις τιμές EC_{50} των στελεχών του μύκητα *Alternaria alternata*.



Εικόνα 35: Οι τιμές EC_{50} των στελεχών του μύκητα *Alternaria alternata* για την Thymol, την 3^η ημέρα ανάπτυξης του μύκητα.

Οι τιμές EC_{50} κυμάνθηκαν από 23,1 έως 68,126 ppm. Ο μέσος όρος των EC_{50} των στελεχών του μύκητα για τη Thymol, είναι: Μ.Ο. EC_{50} = 43,09 ppm. Ενώ ο διάμεσος, που αντιστοιχεί στο 50% του πληθυσμού, είναι $\delta = 42,745$ ppm (εικόνα 36). Ακολουθεί εικόνα με την κατανομή του πληθυσμού για τις τιμές EC_{50} και πίνακας με τα ποσοστημόρια και τον μέσο όρο.



Εικόνα 36

Quantiles		
100,0%	maximum	68,126
99,5%		68,126
97,5%		68,126
90,0%		50,749
75,0%	quartile	46,496
50,0%	median	42,745
25,0%	quartile	39,868
10,0%		32,488
2,5%		23,100
0,5%		23,100
0,0%	minimum	23,100
	Mean	43,093087

Πίνακας 10

Ο παρακάτω πίνακας δείχνει την τιμή EC_{50} για κάθε στέλεχος του πληθυσμού του μύκητα *Alternaria alternata*.

3.4 Ανάπτυξη μικρομεθόδου σε υγρό θρεπτικό υλικό για τη χρήση της στον έλεγχο αποτελεσματικότητας μυκητοκτόνων ουσιών στο στέλεχος AS9

Τα τελευταία χρόνια διερευνάται η ανάπτυξη και η χρήση μικρομεθόδων προς αντικατάσταση των κλασικών μεθόδων σε πειράματα που αφορούν τη μελέτη μικροοργανισμών, με σκοπό να παρέχονται αποτελέσματα πιο γρήγορα για μεγαλύτερο αριθμό χειρισμών και επαναλήψεων και σε μικρότερες ποσότητες δειγμάτων και αντιδραστηρίων. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η χρήση των microplates που χρησιμοποιήθηκε και στη παρούσα μελέτη για την ανάπτυξη μικρομεθόδου.

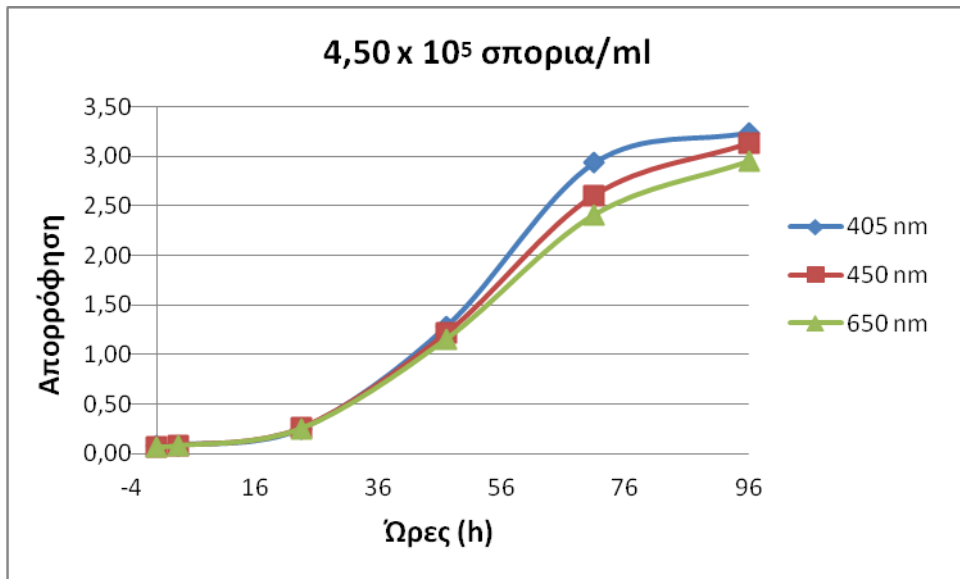
Για την ανάπτυξη της συγκεκριμένης μικρομεθόδου για τον έλεγχο αποτελεσματικότητας μυκητοκτόνων ουσιών στο μύκητα *Alternaria alternata*, χρησιμοποιήθηκαν microplates. Δοκιμάστηκαν 10 συγκεντρώσεις σπορίων του μύκητα, έτσι ώστε να επιλεγεί η καταλληλότερη. Οι μετρήσεις γίνονταν στο MRX σε 3 μήκη κύματος (405, 450 και 650 nm) κάθε μέρα για διάστημα 5 ημερών.

Σκοπός μας ήταν να βρούμε την καταλληλότερη συγκέντρωση, το μήκος κύματος και το χρόνο τελικής μέτρησης. Από τις μετρήσεις αφαιρέθηκε η απορρόφηση που οφείλεται στο υπόστρωμα έτσι ώστε οι απορροφήσεις που παρουσιάζονται στη συνέχεια να οφείλονται μόνο στην απορρόφηση του μύκητα. Θεωρούμε ότι η αύξηση της απορρόφησης αντιπροσωπεύει την βλάστηση των σπορίων και την ανάπτυξη του μύκητα.

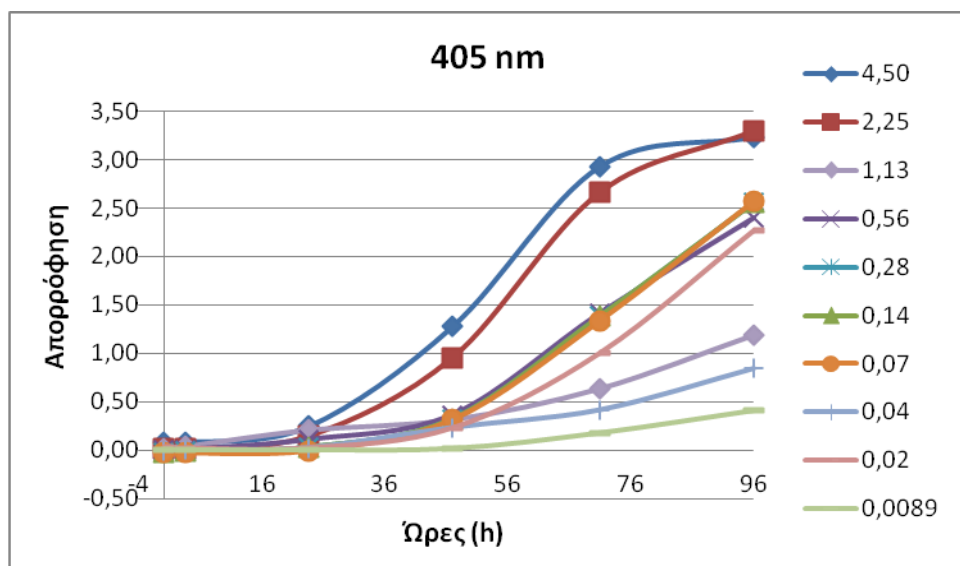
Η εικόνα 37 δείχνει την απορρόφηση βλάστησης - ανάπτυξης του στελέχους AS9 στα 405, 450 και 650 nm στην μεγαλύτερη συγκέντρωση σπορίων $4,5 \times 10^5$ (σπόρια/ml). Φαίνεται από το διάγραμμα ότι το μήκος κύματος στο οποίο γίνεται καλύτερη απεικόνιση της απορρόφησης είναι τα 405 nm.

Η εικόνα 38 δείχνει την απορρόφηση βλάστησης - ανάπτυξης του στελέχους AS9 στα 405 nm στις 10 διαφορετικές συγκεντρώσεις σπορίων που δοκιμάστηκαν. Παρατηρήθηκε ότι οι συγκεντρώσεις ομαδοποιούνται με βάση τις απορροφήσεις σε τρία επίπεδα των 10^5 , 10^4 και 10^3 (σπόρια/ml).

- $4,5 \times 10^5$ και $2,25 \times 10^5$ (σπόρια/ml)
→ 10^5 (4,5, 2,25) σπόρια/ml
- $1,125 \times 10^5$, $0,563 \times 10^5$, $0,281 \times 10^5$ και $0,141 \times 10^5$ (σπόρια/ml)
→ 10^4 (11,25, 5,63, 2,81, 1,41) σπόρια/ml
- $0,070 \times 10^5$, $0,035 \times 10^5$, $0,0178 \times 10^5$ και $0,0089 \times 10^5$ (σπόρια/ml)
→ 10^3 (7,0, 3,5, 1,78, 0,89) σπόρια/ml



Εικόνα 37: Διάγραμμα απορρόφησης βλάστησης-ανάπτυξης του στελέχους AS9 στο αρχικό αιώρημα συγκέντρωσης $4,50 \times 10^5$ σπόρια/ml στα 405, 450 και 650 nm.



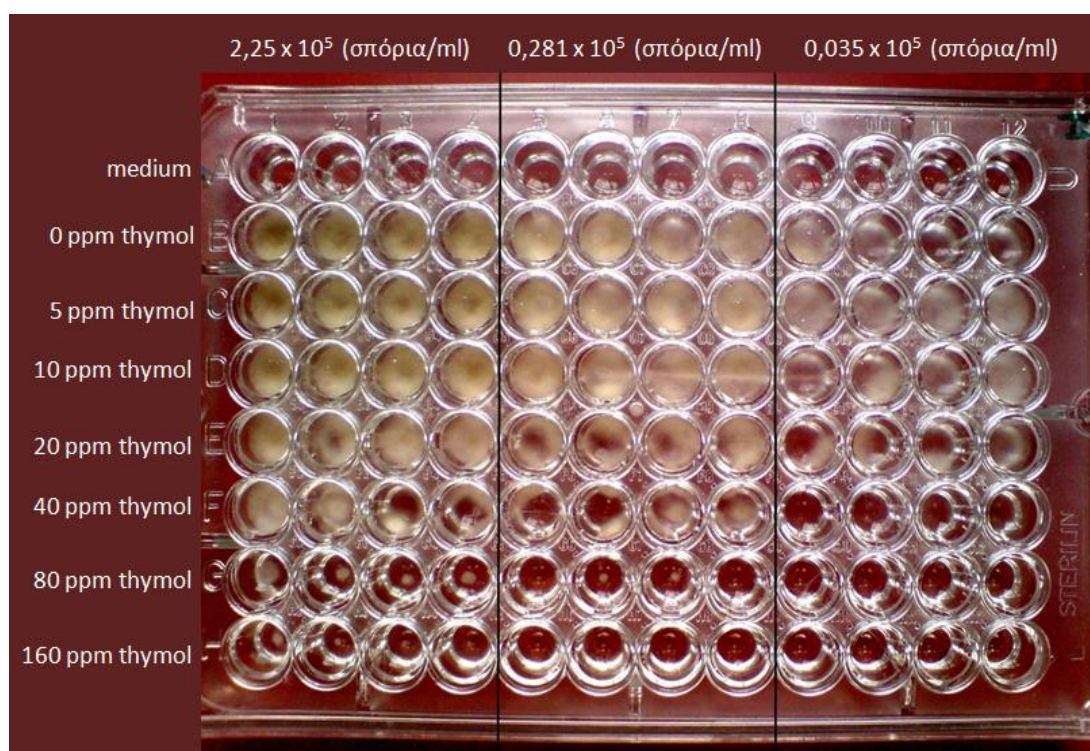
Εικόνα 38: Διάγραμμα απορρόφησης βλάστησης-ανάπτυξης του στελέχους AS9 στα 405 nm στα 10 αιώρηματα διαφορετικών συγκεντρώσεων κονιδίων. Το κάθε αιώρημα αντιπροσωπεύεται από διαφορετικό χρώμα γραμμής.

* Οι συγκεντρώσεις των αιωρημάτων είναι εκφρασμένες ως 10^5 σπόρια/ml.

3.5 Διερεύνηση της αποτελεσματικότητας της θυμόλης στο στέλεχος AS9 με τη χρήση της μικρομεθόδου που αναπτύχθηκε

Από τις τρεις ομάδες συγκεντρώσεων των σπορίων που διακρίθηκαν στο πείραμα ανάπτυξης της μικρομεθόδου, επιλέχθηκε μία συγκέντρωση από κάθε ένα από τα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων των 10^5 , 10^4 και 10^3 που διακρίθηκαν στο προηγούμενο πείραμα. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν οι συγκεντρώσεις $2,25 \times 10^5$ σπόρια/ml, $0,281 \times 10^5$ σπόρια/ml και $0,035 \times 10^5$ σπόρια/ml και το μήκος κύματος 405 nm, ώστε να εφαρμοστούν στο πείραμα διερεύνησης της αποτελεσματικότητας της θυμόλης στο στέλεχος AS9 με τη χρήση της μικρομεθόδου που αναπτύχθηκε.

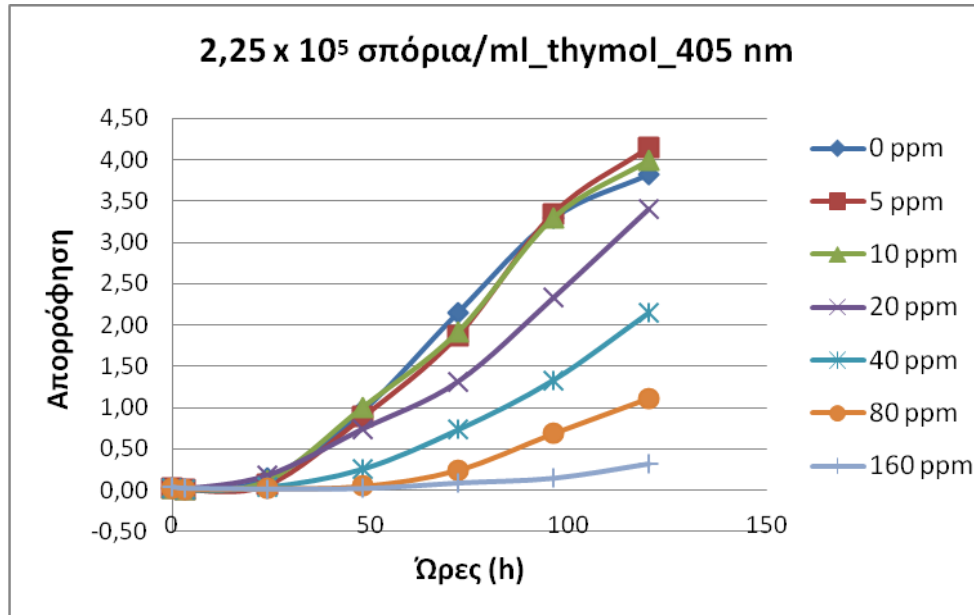
Παρατηρήθηκε βαθμιαία μείωση της βλάστησης/ανάπτυξης με την αύξηση της συγκέντρωσης θυμόλης καθώς και με την μείωση της συγκέντρωσης σπορίων, όπως φαίνεται και στην εικόνα 39.



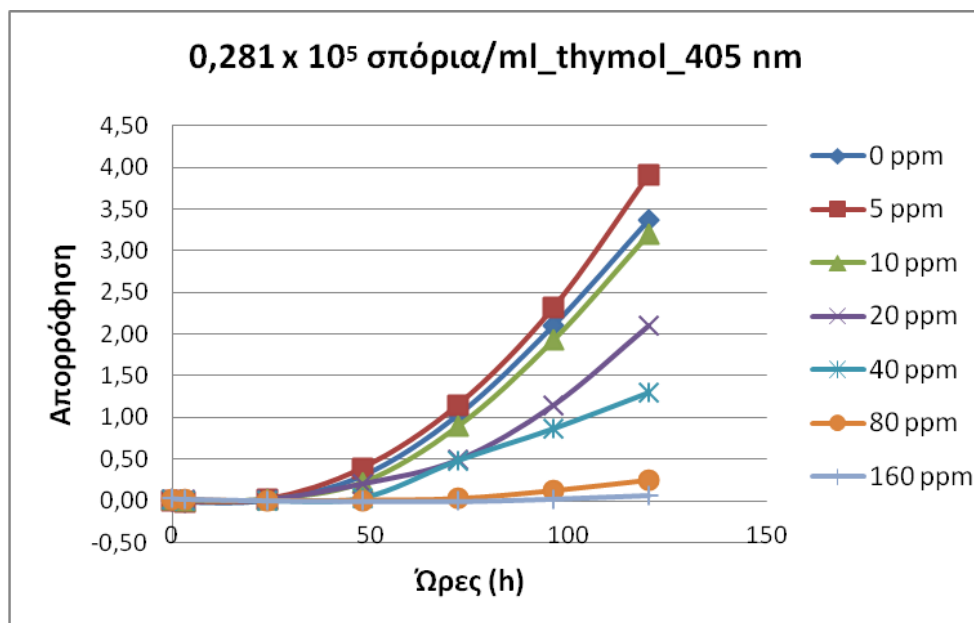
Εικόνα 39: Η ανάπτυξη του στελέχους AS9 στις τρεις αραιώσεις, υπό την επίδραση 7 διαφορετικών συγκεντρώσεων thymol, στο microplate την 4^η ημέρα ανάπτυξης.

Οι εικόνες 40, 41 και 42 δείχνουν την απορρόφηση βλάστησης-ανάπτυξης του στελέχους AS9 στα 405 nm στις 7 διαφορετικές συγκεντρώσεις θυμόλης στις συγκεντρώσεις $2,25 \times 10^5$ σπόρια/ml, $0,281 \times 10^5$ σπόρια/ml και $0,035 \times 10^5$

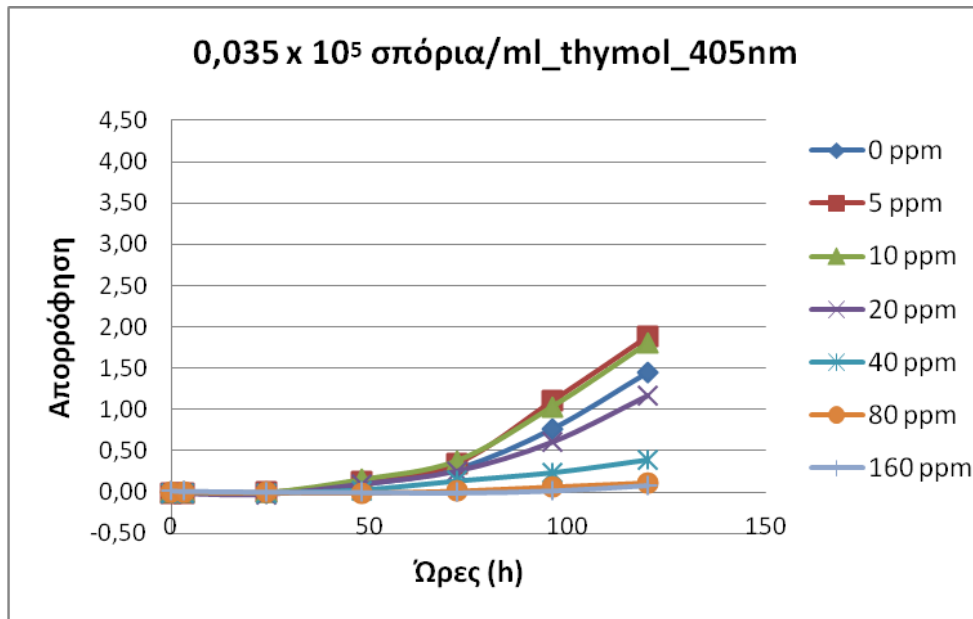
σπόρια/ml. Στη συγκέντρωση $2,25 \times 10^5$ σπόρια/ml οι απορροφήσεις που αντιστοιχούν στις 7 διαφορετικές συγκεντρώσεις θυμόλης διαχωρίζονται ήδη από τις 48 ώρες, ενώ στις συγκεντρώσεις $0,281 \times 10^5$ και $0,035 \times 10^5$ σπόρια/ml, απαιτούνται περισσότερες ώρες, όπως παρατηρούμε και στις αντίστοιχες εικόνες.



Εικόνα 40: Διάγραμμα απορρόφησης βλάστησης-ανάπτυξης του στελέχους AS9 στο αιώρημα συγκέντρωσης $2,25 \times 10^5$ σπόρια/ml στα 405 nm στις 7 διαφορετικές συγκεντρώσεις θυμόλης.



Εικόνα 41: Διάγραμμα απορρόφησης βλάστησης-ανάπτυξης του στελέχους AS9 στο αιώρημα συγκέντρωσης $0,281 \times 10^5$ σπόρια/ml στα 405 nm στις 7 διαφορετικές συγκεντρώσεις θυμόλης.

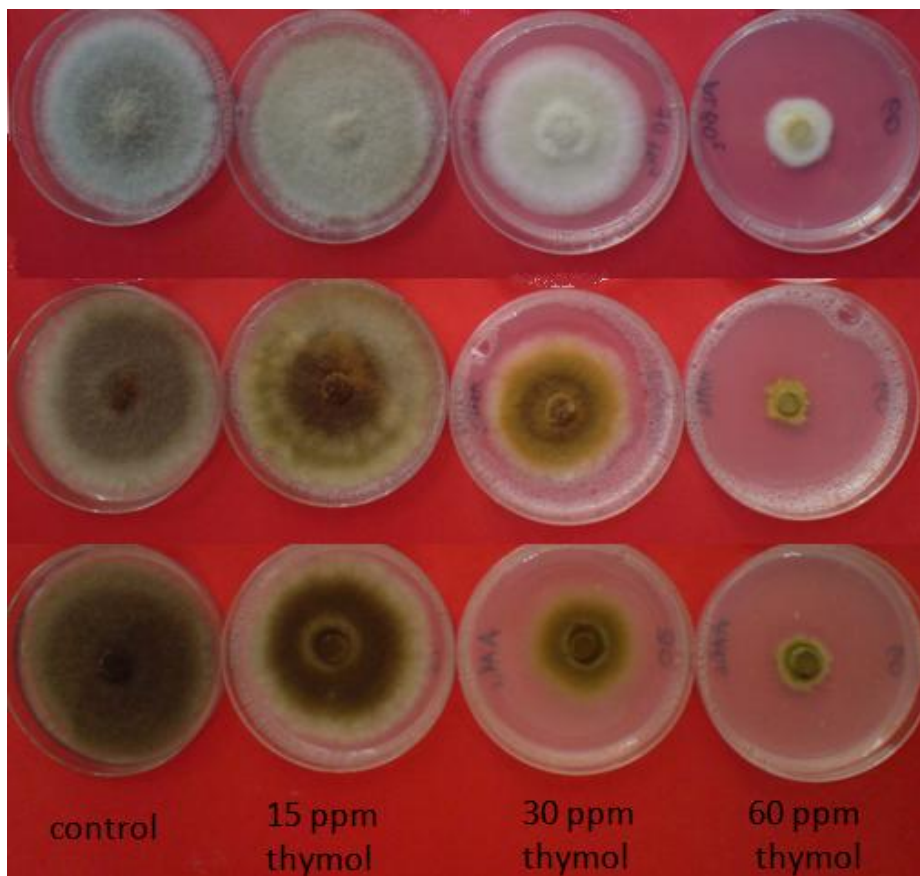


Εικόνα 42: Διάγραμμα απορρόφησης βλάστησης-ανάπτυξης του στελέχους AS9 στο αιώρημα συγκέντρωσης $0,035 \times 10^5$ σπόρια/ml στα 405 nm στις 7 διαφορετικές συγκεντρώσεις θυμόλης.

3.6 Μικροσκοπική παρατήρηση σπορίων του μύκητα από καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό με θυμόλη

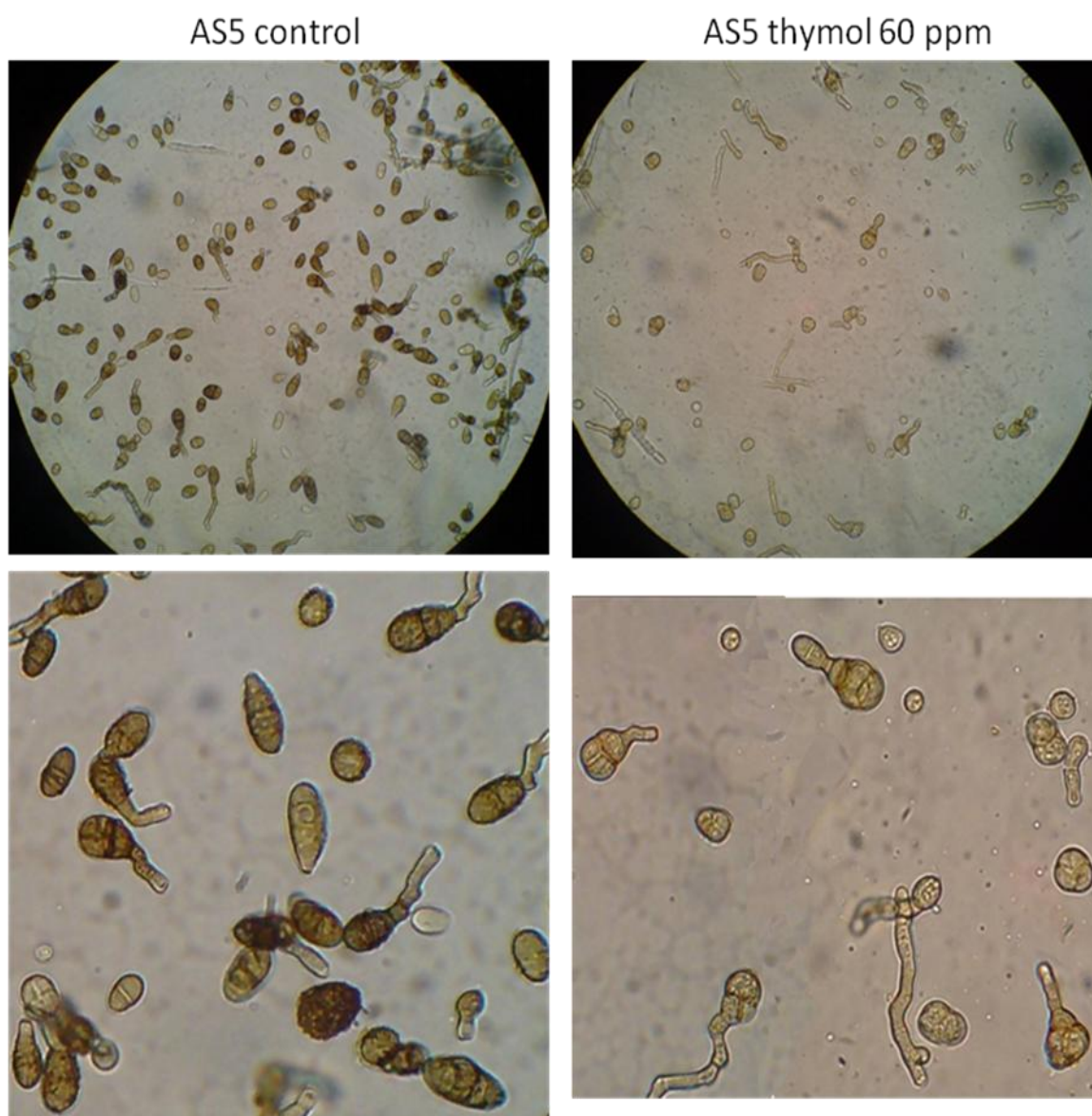
Εκτός από την παρεμπόδιση της μυκηλιακής ανάπτυξης, φάνηκε η επίδραση της θυμόλης και στο χρώμα της αποικίας και στη μορφολογία και το χρώμα των κονιδίων. Από την μακροσκοπική παρατήρηση, έχουμε μια πρώτη εικόνα, όπου φαίνεται, ότι η θυμόλη επηρεάζει την σποριοποίηση. Στην εικόνα 43 παρατηρούμε την αλλαγή στο χρώμα της αποικίας τριών στελεχών, καθώς αλλάζει η συγκέντρωση της θυμόλης.

Στη συνέχεια κρίθηκε σκόπιμο να γίνουν λεπτομερέστερες μικροσκοπικές παρατηρήσεις των κονιδίων. Για το λόγο αυτό, παρατηρήθηκαν τα κονίδια στο μικροσκόπιο και έγινε φωτογράφιση των εικόνων που προέκυψαν από τις μικρότερες παρατηρήσεις σε καλλιέργεια δύο στελεχών παρουσία και απουσία θυμόλης.



Εικόνα 43: Τρία στελέχη (ALBO2, AAP6 και AAP16, από πάνω προς τα κάτω) σε τρυβλία με PDA σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις θυμόλης (0,15,30,60 ppm).

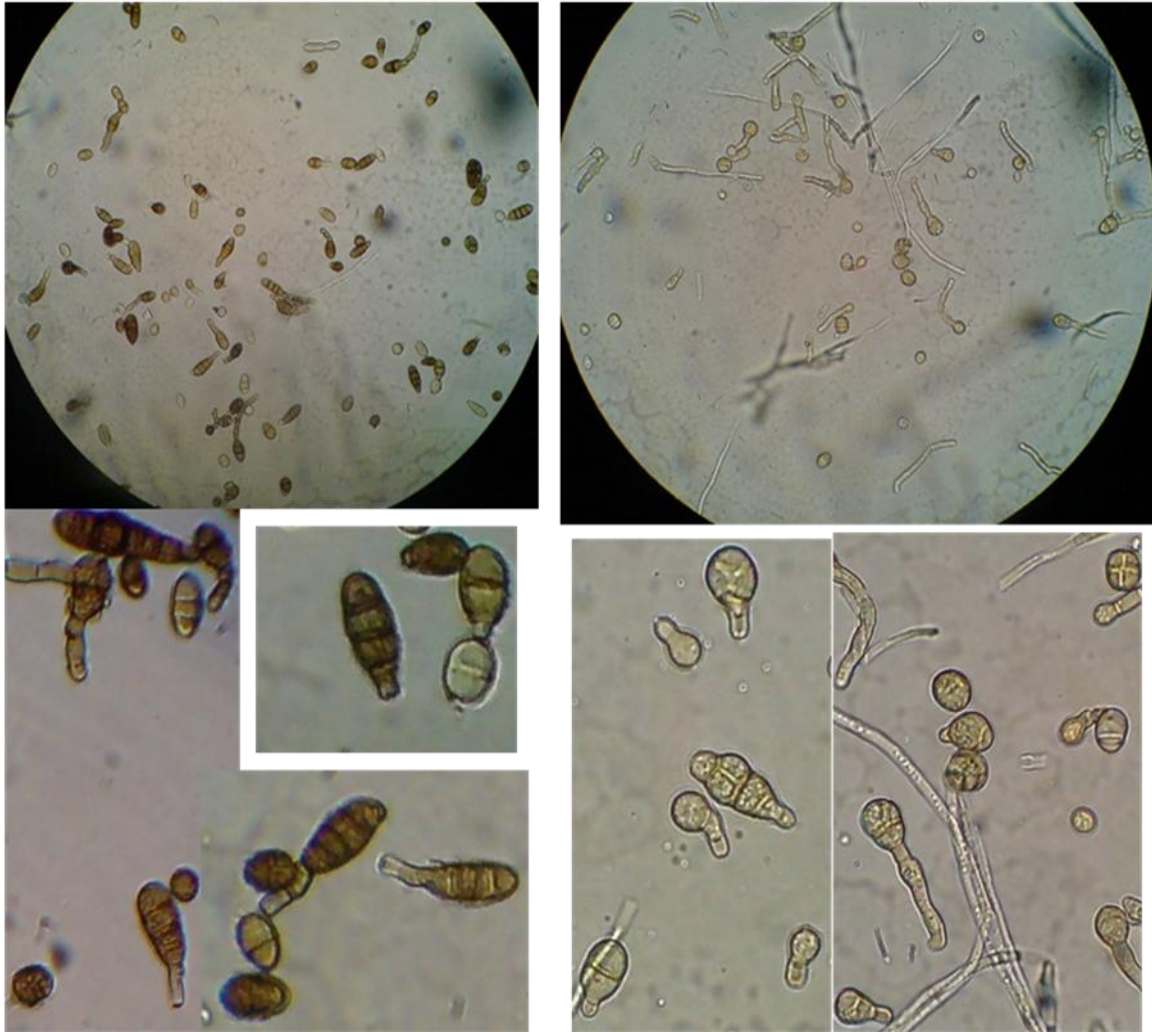
Στις εικόνες 44 και 45, παρουσιάζονται οι φωτογραφίες των κονιδίων αυτών των δύο στελεχών (AS5, AS10) στο μικροσκόπιο σε δύο μεγεθύνσεις, από καλλιέργεια σε στερεό υπόστρωμα χωρίς θυμόλη (control) και σε στερεό υπόστρωμα με θυμόλη την 5^η ημέρα ανάπτυξης. Στην πρώτη μεγέθυνση παρατηρούμε ότι και στα δύο στελέχη το δείγμα από την καλλιέργεια σε θυμόλη 60 ppm έχει κονίδια πιο λίγα και πιο ανοιχτόχρωμα. Στην δεύτερη μεγέθυνση, παρατηρούμε ότι εκτός από το χρώμα τα κονίδια στη θυμόλη, διαφοροποιούνται από τον μάρτυρα και στο σχήμα. Τα κονίδια από την καλλιέργεια με τη θυμόλη 60 ppm, είναι πιο διογκωμένα και η συχνότητα της παρουσίας των πολυκύτταρων κονιδίων είναι πιο μικρή.



Εικόνα 44: Μικροσκοπική παρατήρηση των κονιδίων του στελέχους AS5 από καλλιέργεια με (δεξιά) και χωρίς (αριστερά) θυμόλη.

AS10 control

AS10 thymol 60 ppm



Εικόνα 45: Μικροσκοπική παρατήρηση των κονιδίων του στελέχους AS10 από καλλιέργεια με (δεξιά) και χωρίς (αριστερά) θυμόλη.

3.7 Διερεύνηση ύπαρξης συνεργιστικής δράσης θυμόλης-μυκητοκτόνων

Η θυμόλη, ως η πιο αποτελεσματική από τα τρία φυσικά προϊόντα που εφαρμόστηκαν, χρησιμοποιήθηκε για τη διερεύνηση συνεργιστικής δράσης της παρουσίας των μυκητοκτόνων fludioxonil, iprodione, pyraclostrobin και boscalid.

3.7.1 Διερεύνηση ύπαρξης συνεργιστικής δράσης θυμόλης-fludioxonil

Από τη συλλογή στελεχών στελέχη του μύκητα *Alternaria alternata* του εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας επιλέχθηκαν ανθεκτικά και ευαίσθητα στο fludioxonil, με βάση τις τιμές EC₅₀ που είχαν προκύψει από προηγούμενη μελέτη. Συγκεκριμένα, τα στελέχη που επιλέχθηκαν είναι τα: AAP16, AAP4, AAP6, AATM3BIO, AS11, AS9. Το AAP16 είναι το πιο ευαίσθητο στο fludioxonil, ενώ το AS9 το πιο ανθεκτικό από το σύνολο των στελεχών. Το fludioxonil εφαρμόστηκε στη συνιστώμενη δόση (15 ppm) και η θυμόλη σε τρεις συγκεντρώσεις (15,30 και 60 ppm).

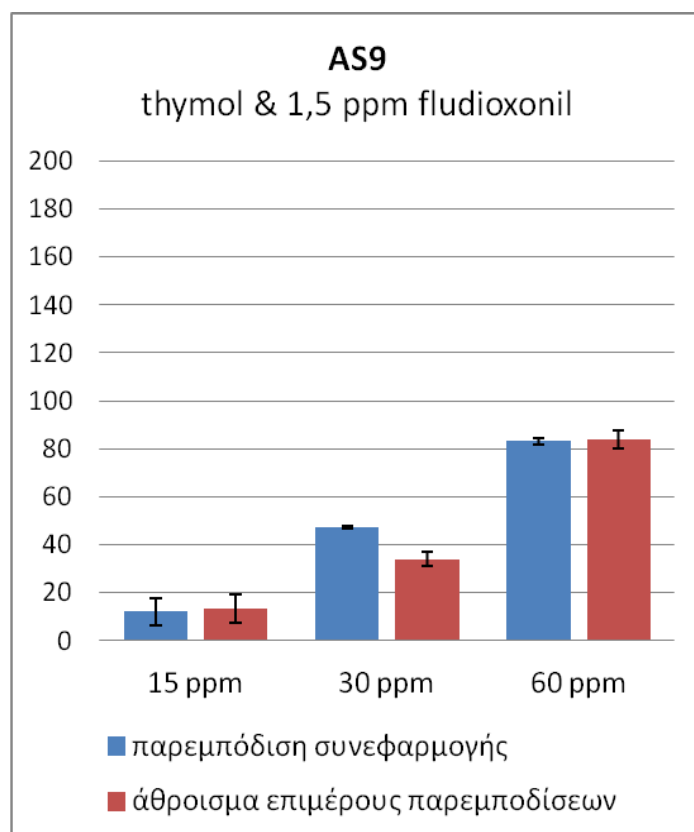
Ο πίνακας 11 παρουσιάζει τα ποσοστά της μυκηλιακής παρεμπόδισης με την τυπική απόκλιση τη 5^η ημέρα ανάπτυξης των στελεχών που επιλέχθηκαν στους 8 χειρισμούς που έγιναν.

Πίνακας 11: Επίδραση της επέμβασης/χειρισμού fludioxonil-thymol στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μυκηλίου των στελεχών την 5^η ημέρα.

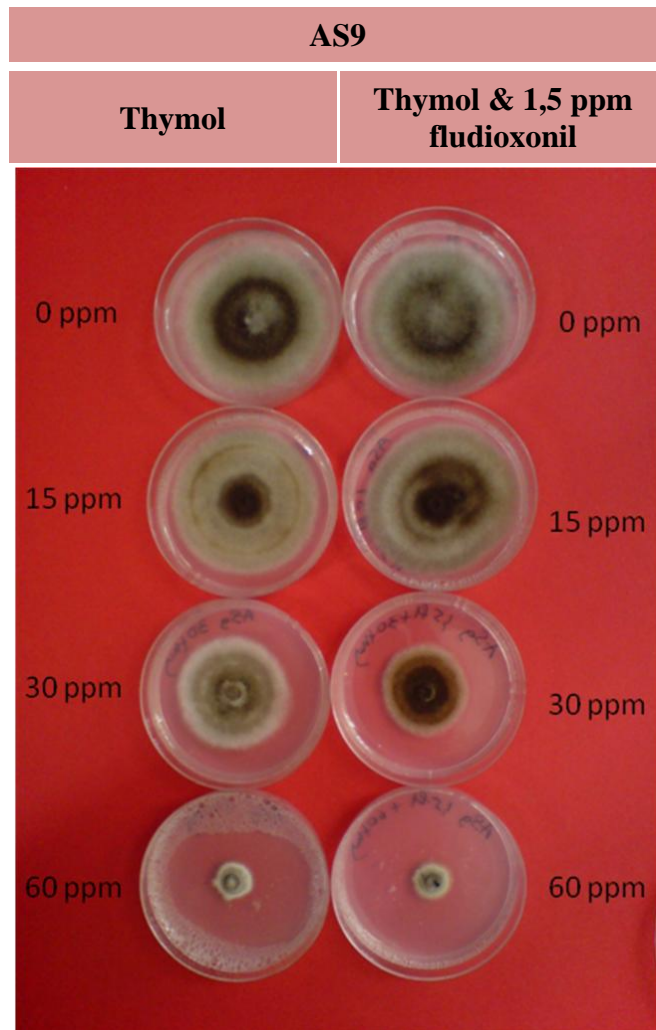
fludioxonil	AAP16	AAP4	AAP6	AATM3BIO	AS11	AS9
% παρεμπόδιση	μ.ο. ± σ	μ.ο. ± σ	μ.ο. ± σ	μ.ο. ± σ	μ.ο. ± σ	μ.ο. ± σ
control	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
1,5 ppm fludioxonil	100 ± 0	92,37 ± 4,86	89,12 ± 3,15	82,59 ± 6,12	85,49 ± 1,12	1,89 ± 1,75
15 ppm thymol	9,23 ± 0,12	-7,13 ± 23,35	12,06 ± 11,85	2,22 ± 2,22	6,37 ± 4,39	11,55 ± 6,03
30 ppm thymol	32,28 ± 3,54	44,05 ± 16,73	22,18 ± 1,48	17,78 ± 2,22	19,55 ± 9,57	32,20 ± 1,95
60 ppm thymol	77,68 ± 2,83	91,18 ± 3,91	79,43 ± 4,26	61,85 ± 0,64	77,72 ± 3,94	81,97 ± 4,43
15 ppm thymol + 1,5 ppm fludioxonil	100 ± 0	93,44 ± 3,17	89,93 ± 1,33	87,04 ± 1,70	91,97 ± 0,44	12,29 ± 5,66
30 ppm thymol + 1,5 ppm fludioxonil	100 ± 0	96,11 ± 3,47	91,94 ± 1,80	91,85 ± 2,57	95,75 ± 1,60	47,19 ± 0,56
60 ppm thymol + 1,5 ppm fludioxonil	100 ± 0	97,78 ± 1,92	92,74 ± 0,05	94,44 ± 1,11	95,78 ± 0,80	83,14 ± 1,16

Από τον πίνακα φαίνεται ότι τα στελέχη: AAP16, AAP4, AAP6, AATM3BIO, AS11, παρεμποδίστηκαν σε σημαντικό βαθμό (> 82%) από τη δόση του fludioxonil που εφαρμόστηκε (15 ppm).

Μόνο το στέλεχος AS9 εμφάνισε μικρή παρεμπόδιση στα 1,5 ppm fludioxonil (1,89 %), καθώς είναι και το πιο ανθεκτικό, οπότε μόνο για αυτό μπορούμε να μιλάμε για πιθανή συνεργιστική δράση ή χημειοευαισθητοποίηση. Συγκρίνοντας το ποσοστό παρεμπόδισης της συνεφαρμογής thymol + fludioxonil με το άθροισμα των επιμέρους παρεμποδίσεων των αντίστοιχων συγκεντρώσεων για τη thymol και το fludioxonil (εικόνα). Διαπιστώνουμε ότι υπάρχει μια μικρή συνεργιστική δράση στα 30 ppm thymol (παρεμπόδιση συνεφαρμογής > άθροισμα επιμέρους παρεμποδίσεων), ενώ στις άλλες δύο συγκεντρώσεις (15 και 60 ppm) παρατηρήθηκε αθροιστική δράση (παρεμπόδιση συνεφαρμογής = άθροισμα επιμέρους παρεμποδίσεων). Στην εικόνα 46 βλέπουμε το στέλεχος AS9 στους 8 διαφορετικούς χειρισμούς την 5^η ημέρα ανάπτυξης.



Εικόνα 46: Στέλεχος μύκητα AS9, thymol + 1,5 ppm fludioxonil. Συνεργιστική δράση στα 30 ppm thymol, αθροιστική δράση στα 15 και 60 ppm thymol.



Εικόνα 47: Στέλεχος AS9 την 5^η ημέρα ανάπτυξης στους 8 διαφορετικούς χειρισμούς.

3.7.2 Διερεύνηση ύπαρξης συνεργιστικής δράσης θυμόλης- iprodione

Τα στελέχη που επιλέχθηκαν για το iprodione είναι τα: AAP16, AAP4, AAP6, ALBO2, AS11, AS9. Το AAP16 είναι το πιο ευαίσθητο στο iprodione, ενώ το AS9 το πιο ανθεκτικό από το σύνολο των στελεχών. Το iprodione εφαρμόστηκε στη συνιστώμενη δόση (15 ppm) και η θυμόλη σε τρεις συγκεντρώσεις (15,30 και 60 ppm).

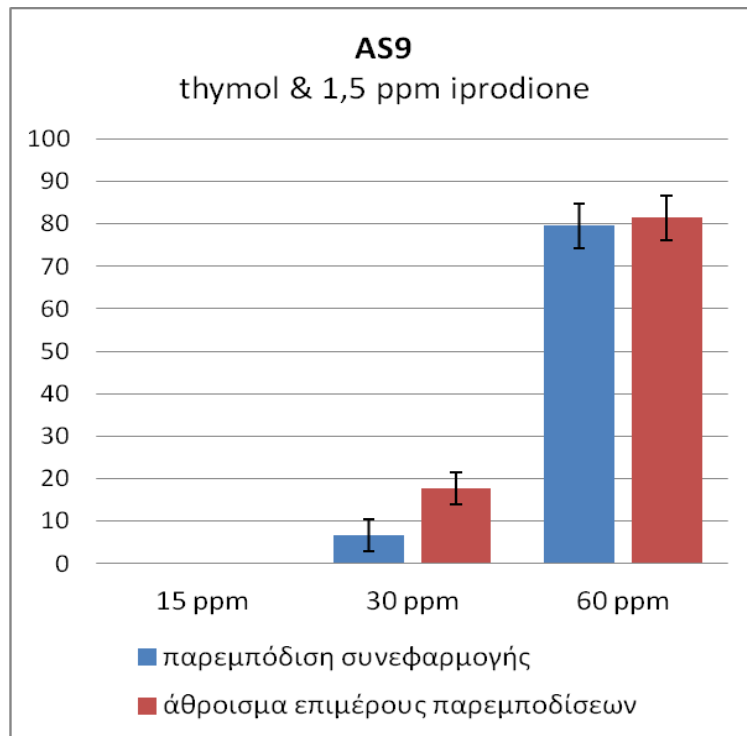
Ο πίνακας 12 παρουσιάζει τα ποσοστά της μυκηλιακής παρεμπόδισης με την τυπική απόκλιση της 5^η ημέρας ανάπτυξης των στελεχών που επιλέχθηκαν στους 8 χειρισμούς που έγιναν.

Πίνακας 12: Επίδραση της επέμβασης/χειρισμού iprodione-thymol στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μυκηλίου των στελεχών την 5^η ημέρα.

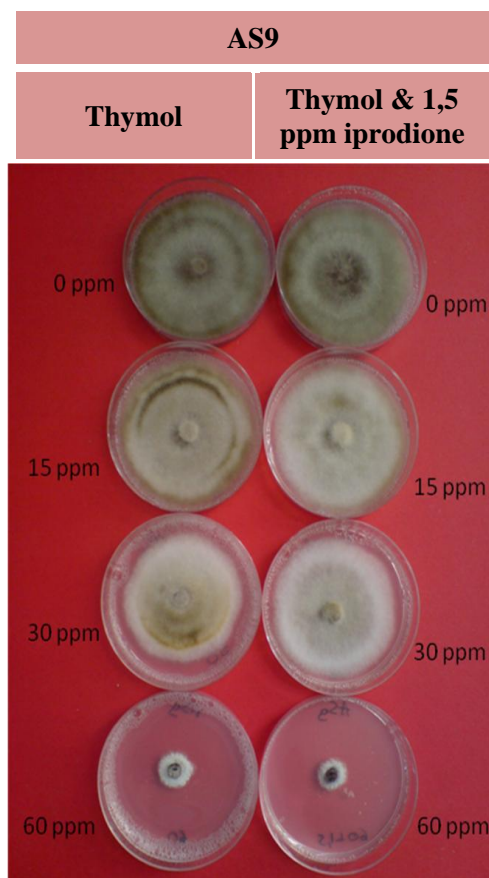
iprodione	AAP16	AAP4	AAP6	ALBO2	AS11	AS9
% παρεμπόδιση	μ.ο. ± σ	μ.ο. ± σ	μ.ο. ± σ	μ.ο. ± σ	μ.ο. ± σ	μ.ο. ± σ
control	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
1,5 ppm iprodione	53,60 ± 5,85	66,63 ± 8,05	69,86 ± 5,06	76,44 ± 1,71	67,04 ± 0,64	0 ± 0
15 ppm thymol	-18,21 ± 14,00	-11,39 ± 13,26	-4,01 ± 5,10	-3,95 ± 5,01	1,48 ± 1,28	0 ± 0
30 ppm thymol	26,69 ± 4,27	4,52 ± 23,77	25,47 ± 9,48	15,06 ± 17,82	28,89 ± 3,33	17,78 ± 4,44
60 ppm thymol	80,78 ± 4,22	80,90 ± 4,75	83,89 ± 1,58	75,31 ± 7,10	77,78 ± 2,22	81,48 ± 6,79
15 ppm thymol+ 1,5 ppm iprodione	52,74 ± 5,40	64,20 ± 5,89	70,03 ± 0,99	68,28 ± 3,38	68,15 ± 1,28	0 ± 0
30 ppm thymol+ 1,5 ppm iprodione	44,98 ± 6,60	59,62 ± 8,86	59,60 ± 2,71	62,00 ± 7,44	60,00 ± 0	6,67 ± 3,85
60 ppm thymol+ 1,5 ppm iprodione	81,13 ± 5,58	74,55 ± 5,24	85,49 ± 3,41	77,35 ± 6,26	75,56 ± 0	79,63 ± 5,25

Από τον πίνακα φαίνεται ότι τα στελέχη: AAP16, AAP4, AAP6, ALBO2, AS11, παρεμποδίστηκαν σε βαθμό (> 53,6%) από τη δόση του iprodione που εφαρμόστηκε (15 ppm).

Μόνο το στέλεχος AS9 εμφάνισε πλήρη ανάπτυξη, χωρίς να παρεμποδιστεί καθόλου στα 1,5 ppm iprodione, καθώς είναι και το πιο ανθεκτικό, οπότε μόνο για αυτό μπορούμε να μιλάμε για πιθανή συνεργιστική δράση ή χημειοευαισθητοποίηση. Συγκρίνοντας το ποσοστό παρεμπόδισης της συνεφαρμογής thymol + iprodione με το άθροισμα των επιμέρους παρεμποδίσεων των αντίστοιχων συγκεντρώσεων για τη thymol και το iprodione. Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 48, στο στέλεχος AS9, υπάρχει μια μικρή ανταγωνιστική δράση στα 30 ppm thymol (παρεμπόδιση συνεφαρμογής < άθροισμα επιμέρους παρεμποδίσεων) και αθροιστική δράση στα 60 ppm thymol (παρεμπόδιση συνεφαρμογής = άθροισμα επιμέρους παρεμποδίσεων).



Εικόνα 48: Στέλεχος μύκητα AS9, thymol + 1,5 ppm iprodione.



Εικόνα 49: Στέλεχος AS9 την 5^η ημέρα ανάπτυξης στους 8 διαφορετικούς χειρισμούς.

3.7.3 Διερεύνηση ύπαρξης συνεργιστικής δράσης θυμόλης- pyraclostrobin

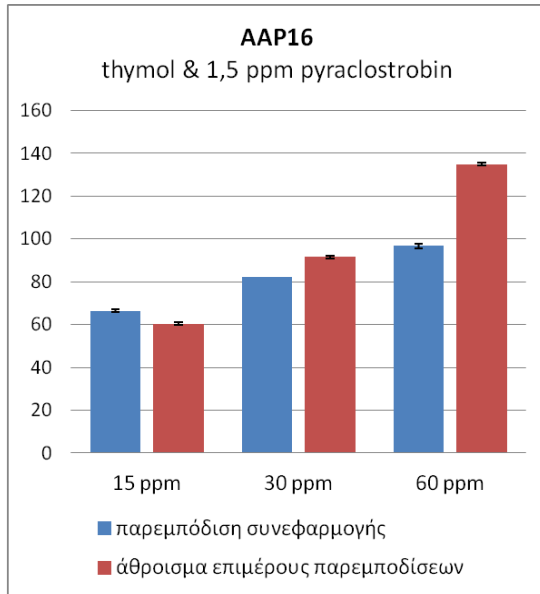
Από τα στελέχη του μύκητα *Alternaria alternata* επιλέχθηκαν τα λιγότερο ευαίσθητα στο pyraclostrobin και το πιο ευαίσθητο, με βάση τις τιμές EC₅₀ που προϋπήρχαν. Συγκεκριμένα, τα στελέχη που επιλέχθηκαν είναι τα: AAP16, AS5, AS10, AAMLK2. Το πιο ευαίσθητο στο pyraclostrobin είναι το AAP16.

Ακολουθούν οι πίνακες με τα ποσοστά της μυκηλιακής παρεμπόδισης την 5^η ημέρα ανάπτυξης των στελεχών που επιλέχθηκαν στους διάφορους χειρισμούς που έγιναν καθώς και οι αντίστοιχες εικόνες.

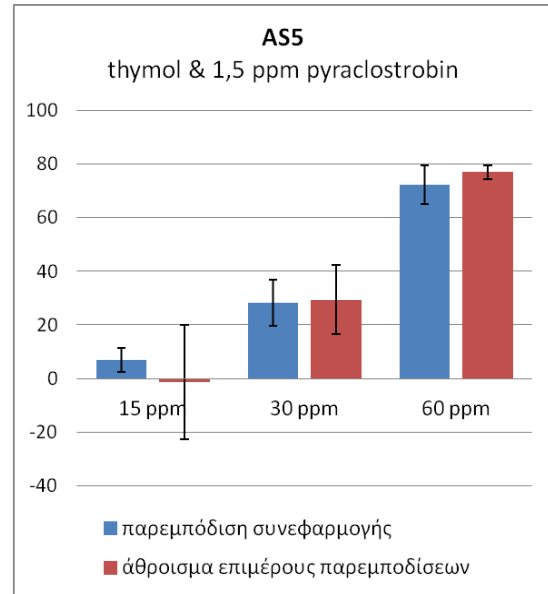
Πίνακας 13: Επίδραση της επέμβασης/χειρισμού pyraclostrobin-thymol στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μυκηλίου των στελεχών την 5^η ημέρα.

pyraclostrobin	AAP16	AS5	AS10	AAMLK2
% παρεμπόδιση	μ.ο. ± σ	μ.ο. ± σ	μ.ο. ± σ	μ.ο. ± σ
control	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
1,5 ppm pyraclostrobin	55,56 ± 0	21,47 ± 9,05	20,74 ± 1,28	18,97 ± 5,10
15 ppm thymol	4,81 ± 0,64	-22,88 ± 12,47	3,56 ± 1,18	3,74 ± 3,41
30 ppm thymol	35,93 ± 0,64	7,88 ± 3,92	27,85 ± 1,12	31,24 ± 2,43
60 ppm thymol	79,26 ± 0,64	55,44 ± 6,57	71,22 ± 4,95	76,99 ± 4,82
15 ppm thymol + 1,5 ppm pyraclostrobin	66,30 ± 0,64	6,83 ± 4,40	32,41 ± 10,92	24,74 ± 2,88
30 ppm thymol + 1,5 ppm pyraclostrobin	82,22 ± 0	28,38 ± 8,61	42,59 ± 2,80	22,83 ± 3,29
60 ppm thymol + 1,5 ppm pyraclostrobin	96,67 ± 1,11	72,27 ± 7,30	76,15 ± 10,75	80,17 ± 0,72

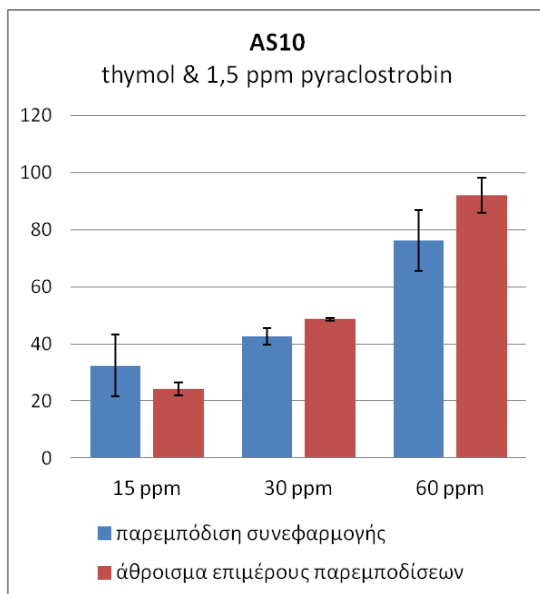
Όλα τα στελέχη εμφάνισαν χαμηλή παρεμπόδιση στη συγκέντρωση 1,5 ppm pyraclostrobin. Το στέλεχος AAP16 ως το πιο ευαίσθητο στο pyraclostrobin είχε τη μεγαλύτερη παρεμπόδιση (55,56%). Συγκρίναμε το ποσοστό παρεμπόδισης της συνεφαρμογής thymol+pyraclostrobin με το άθροισμα των επιμέρους παρεμποδίσεων των αντίστοιχων συγκεντρώσεων για τη thymol και το pyraclostrobin. Όπως φαίνεται και στα ακόλουθα διαγράμματα 50,51,52 και 53, υπήρξε ανταγωνιστική και αθροιστική δράση στα 5 στελέχη. Στο στέλεχος AS10 και το AAP16 φαίνεται μια συνεργιστική δράση στα 15 ppm thymol, ενώ είναι ξεκάθαρη η ανταγωνιστική δράση στα 30 ppm thymol στο στέλεχος AAMLK2.



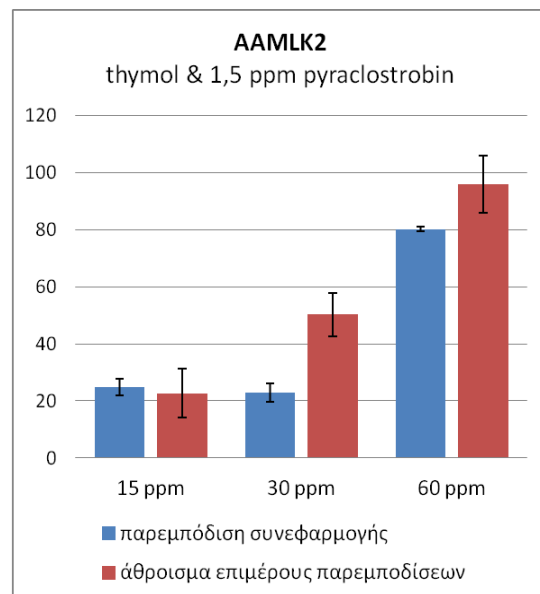
Εικόνα 50: Στέλεχος μύκητα AAP16, thymol+1,5 ppm pyraclostrobin.



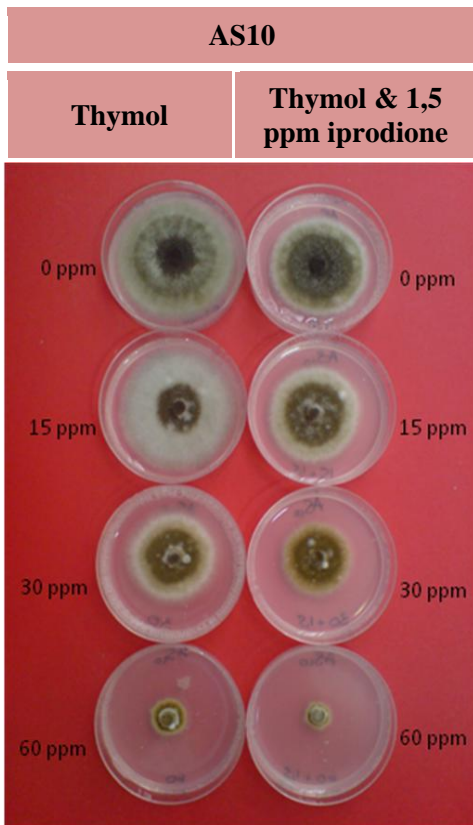
Εικόνα 51: Στέλεχος μύκητα AS5, thymol+1,5 ppm pyraclostrobin.



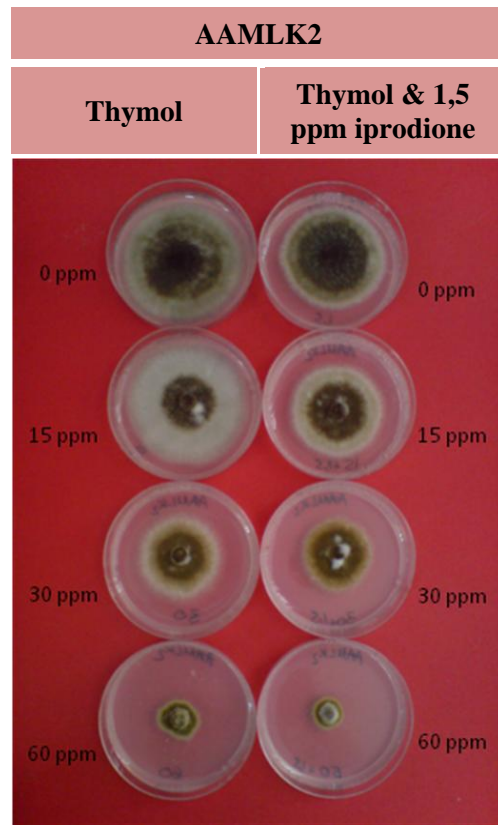
Εικόνα 52: Στέλεχος μύκητα AS10, thymol+1,5 ppm pyraclostrobin.



Εικόνα 53: Στέλεχος μύκητα AAMLK2, thymol+ 1,5 ppm pyraclostrobin.



Εικόνα 54: Στέλεχος AS10 την 5^η ημέρα ανάπτυξης στους 8 διαφορετικούς χειρισμούς.



Εικόνα 55: Στέλεχος AAMLK2 την 5^η ημέρα ανάπτυξης στους 8 διαφορετικούς χειρισμούς.

3.7.4 Διερεύνηση ύπαρξης συνεργιστικής δράσης θυμόλης-boscalid

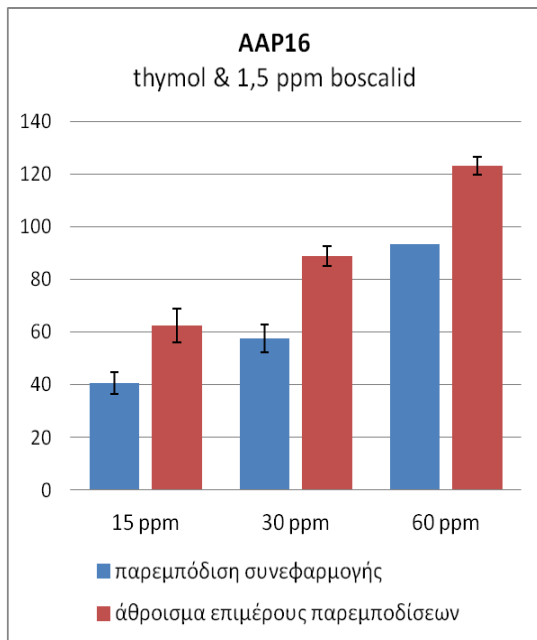
Από τα στελέχη του μύκητα *Alternaria alternata* επιλέχθηκαν τα λιγότερο ευαίσθητα στο boscalid και το πιο ευαίσθητο, με βάση τις τιμές EC_{50} που προϋπήρχαν. Συγκεκριμένα, τα στελέχη που επιλέχθηκαν είναι τα: AAP16, AS5, AS10, AS11, AAP3. Το πιο ευαίσθητο στο boscalid είναι το AAP16.

Ακολουθούν οι πίνακες με τα ποσοστά της μυκηλιακής παρεμπόδισης την 5^η ημέρα ανάπτυξης των στελεχών που επιλέχθηκαν στους διάφορους χειρισμούς που έγιναν.

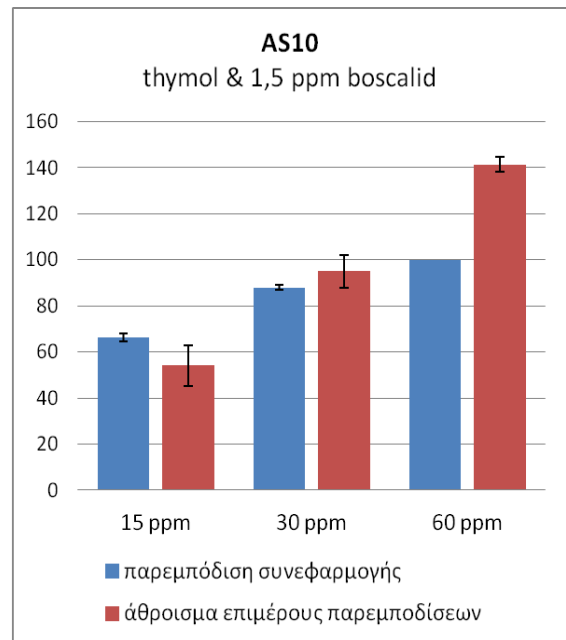
Πίνακας 14: Επίδραση της επέμβασης/χειρισμού boscalid-thymol στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μυκηλίου των στελεχών την 5^η ημέρα.

boscalid	AAP16	AS5	AS10	AS11	AAP3
% παρεμπόδιση	μ.ο. ± σ	μ.ο. ± σ	μ.ο. ± σ	μ.ο. ± σ	μ.ο. ± σ
control	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
1,5 ppm boscalid	39,57 ± 3,42	8,39 ± 4,07	48,01 ± 3,15	35,91 ± 3,51	56,39 ± 1,50
15 ppm thymol	23,12 ± 3,66	39,97 ± 7,74	5,99 ± 6,7	13,34 ± 4,69	13,98 ± 1,19
30 ppm thymol	49,46 ± 0,93	55,43 ± 3,71	46,90 ± 4,26	45,79 ± 5,01	29,68 ± 3,41
60 ppm thymol	83,51 ± 0,31	91,70 ± 5,10	93,37 ± 0,17	81,97 ± 0,51	74,23 ± 3,38
15 ppm thymol + 1,5 ppm boscalid	40,61 ± 4,28	22,86 ± 3,87	66,33 ± 1,67	33,68 ± 3,21	66,45 ± 1,15
30 ppm thymol + 1,5 ppm boscalid	57,65 ± 5,22	62,58 ± 3,15	87,84 ± 1,05	51,35 ± 4,68	74,18 ± 5,78
60 ppm thymol + 1,5 ppm boscalid	93,41 ± 0,12	93,25 ± 4,73	100 ± 0	85,13 ± 1,19	92,79 ± 2,28

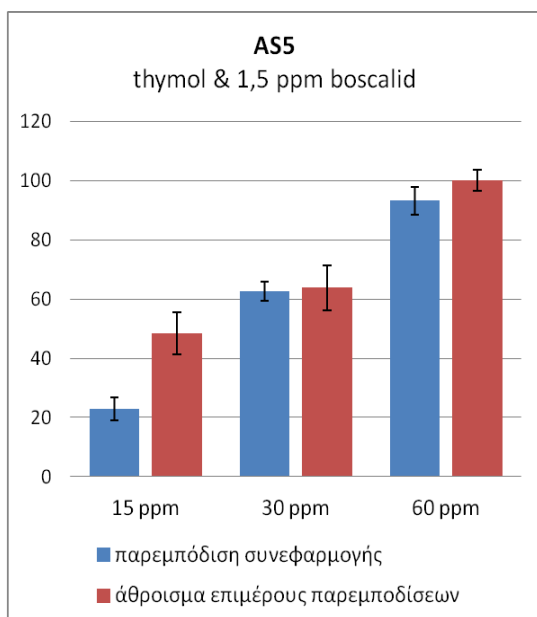
Το στέλεχος AAP3 ως το πιο ευαίσθητο εμφάνισε τη μεγαλύτερη παρεμπόδιση (56,39 %) στα 1,5 ppm boscalid. Τα υπόλοιπα στελέχη εμφάνισαν ποσοστό παρεμπόδισης <50% στα 1,5 ppm boscalid, οπότε, η σύγκριση αφορούσε το ποσοστό παρεμπόδισης της συνεφαρμογής thymol + boscalid με το άθροισμα των επιμέρους παρεμποδίσεων των αντίστοιχων συγκεντρώσεων για τη thymol και το boscalid. Όπως φαίνεται και στα ακόλουθα διαγράμματα 56,57,58 και 59, κυριαρχεί η ανταγωνιστική δράση με εξαίρεση το στέλεχος AS5 στα 30 ppm thymol όπου υπάρχει αθροιστική δράση και το στέλεχος AS10 στα 15 ppm thymol όπου η δράση είναι συνεργιστική.



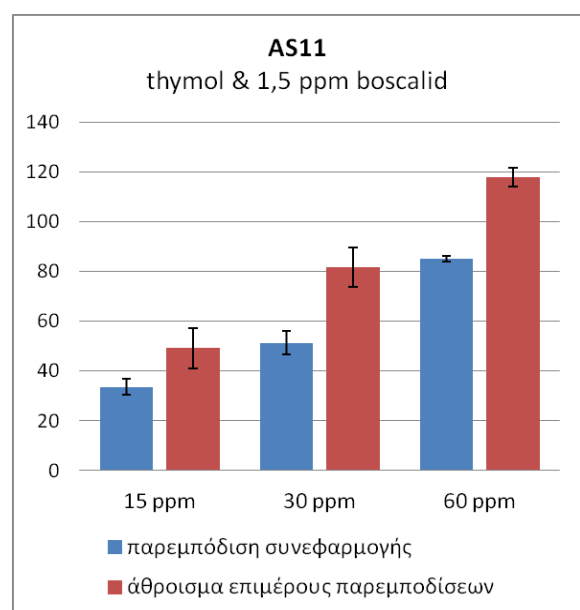
Εικόνα 56: Στέλεχος μύκητα AAP16, thymol + 1,5 ppm boscalid. Ανταγωνιστική δράση.



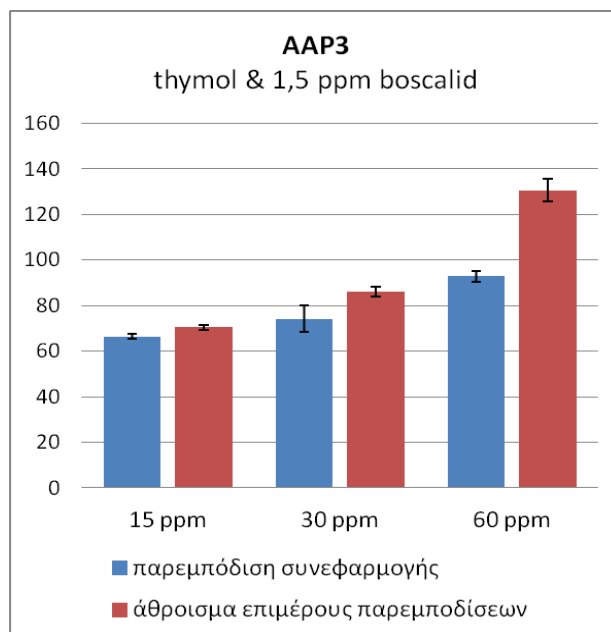
Εικόνα 57: Στέλεχος μύκητα AS10, thymol + 1,5 ppm boscalid. Ανταγωνιστική δράση στα 30 και 60 ppm thymol. Συνεργιστική δράση στα 15 ppm thymol.



Εικόνα 58: Στέλεχος μύκητα AS5, thymol + 1,5 ppm boscalid. Ανταγωνιστική δράση στα 15 και 60 ppm thymol. Αθροιστική στα 30 ppm thymol.



Εικόνα 59: Στέλεχος μύκητα AS11, thymol + 1,5 ppm boscalid. Ανταγωνιστική δράση.

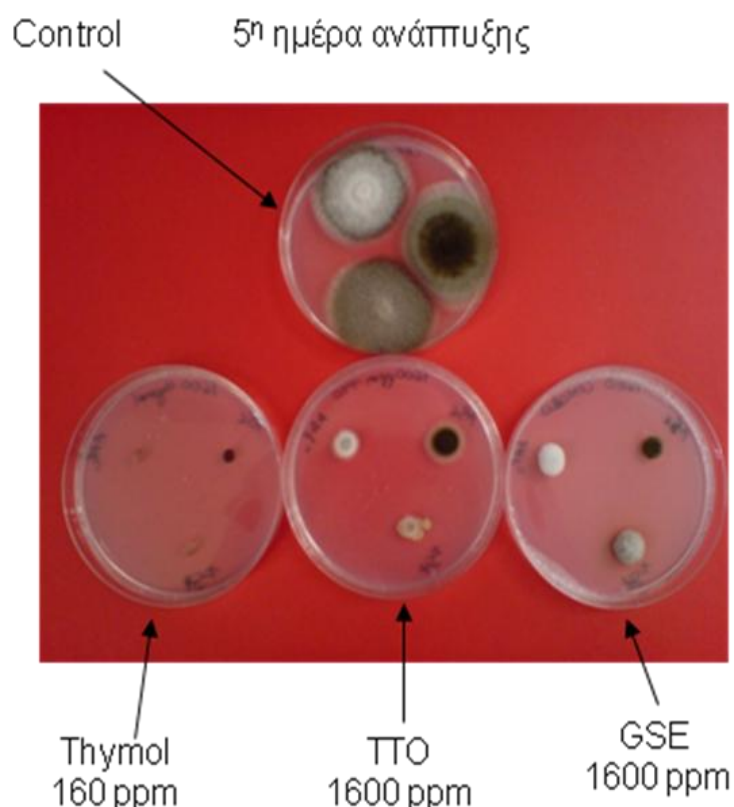


Εικόνα 60: Στέλεχος μύκητα AAP3, thymol + 1,5 ppm boscalid.
Ανταγωνιστική δράση.

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η χρήση ουσιών που προέρχονται από φυτά (φυσικά προϊόντα) έχει προσελκύσει κατά τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον των ερευνητών για την αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών (μυκήτων και βακτηρίων) και τελικώς της αντιμετώπιση των ασθενειών των φυτών. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκαν τρία φυσικά προϊόντα, η θυμόλη (thymol), το εκχύλισμα σπερμάτων του φυτού Πομπέλμοσια η βοτρυόκαρπος (Grapefruit Seed Extract, GSE) και το αιθέριο έλαιο του Τειοδένδρου *Melaleuca alternifolia* (TTO).

Για να γίνει η σύγκριση των τριών φυσικών προϊόντων που χρησιμοποιήθηκαν, ως προς την αποτελεσματικότητα, έπρεπε εκτός από το μέσο όρο (M.O.) των τιμών EC_{50} , να ληφθεί υπόψη και το εύρος των τιμών, αλλά και η τιμή EC_{50} που περιλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού.



Εικόνα 61: Τρία στελέχη του μύκητα *A.alternata* στον μάρτυρα (control) και στη μεγαλύτερη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε για κάθε ένα από τα τρία φυσικά προϊόντα (Thymol, TTO, GSE).

Από τα τρία φυσικά προϊόντα που χρησιμοποιήθηκαν η θυμόλη βρέθηκε η πιο αποτελεσματική στην παρεμπόδιση του μύκητα. Αυτό φαίνεται ξεκάθαρα από τη σύγκριση των μέσων όρων των τιμών EC₅₀, όπου για τη θυμόλη ο Μ.Ο. EC₅₀ (43,09 ppm) ήταν πολύ χαμηλός, περισσότερο από υποδεκαπλάσιος του αντίστοιχου GSE (603,73 ppm) και του ΤΤΟ (661,49 ppm). Επίσης, το εύρος των EC₅₀ στη θυμόλη ήταν 23,1-68,1 ppm και το 90 % του πληθυσμού των στελεχών είχε EC₅₀ κάτω από 50,75 ppm. Αντιθέτως, το 90 % του πληθυσμού παρεμποδίστηκε αποτελεσματικά από το GSE και ΤΤΟ σε συγκεντρώσεις 1509,4 και 1014,2 ppm αντίστοιχα. Συγκρίνοντας το GSE και ΤΤΟ, παρατηρούμε ότι το εύρος των τιμών EC₅₀ του ΤΤΟ (233,3-1313,4 ppm) και του GSE (214-2104,7 ppm) αλληλεπικαλύπτονται στο μεγαλύτερο μέρος τους, συγκρίνοντας όμως το EC₅₀ που παρεμποδίζει το 90% του πληθυσμού, πιο αποτελεσματικό είναι το ΤΤΟ (1014,2 ppm) έναντι του GSE (1509,4 ppm).

Πίνακας 15

	Thymol	GSE	TTO
Range	23,1- 68,1 ppm	214- 2104,7 ppm	233,3 -1313,4 ppm
90%	50,75 ppm	1509,4 ppm	1014,2 ppm
Mean	43,09 ppm	603,73 ppm	661,49 ppm

Για το grapefruit seed extract (GSE) δεν έχουν γίνει πολλές μελέτες για την αντιμυκητιακή του δράση. Μια μελέτη που έγινε για την αντιμικροβιακή δράση του εκχύλισματος σπόρων και πολτού του γκρέιπφρουτ (grapefruit seed and pulp extract, GSP) (αιθανολικό εκχύλισμα) σε ένα αριθμό βακτηρίων και ζυμών παθογόνων για τον άνθρωπο, οι τιμές MIC για τις ζύμες κυμάνθηκαν σε εύρος 8,25-16,50 % m/V και για τα βακτήρια από 2,06 % m/V έως 16,50 % m/V (Cvetnic and Vladimir-Knezevic, 2004).

Εκτός από το εκχύλισμα σπόρων και πολτού του γκρέιπφρουτ, έχει μελετηθεί και το εκχύλισμα φλοιού του γκρέιπφρουτ (grapefruit peel extract, GPE) για την επίδρασή του σε διάφορους οργανισμούς. Μελέτη που έγινε για τη δράση του σε βακτήρια, έδειξε ότι για τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια οι τιμές MIC κυμάνθηκαν σε εύρος 250-3000 µg/ml, ενώ για τα θετικά κατά Gram κυμάνθηκε από 400 μέχρι 5000 µg/ml. Οι τιμές εκτός από τα διάφορα βακτήρια, έδειξε ότι εξαρτάται σε ένα βαθμό και από τον διαλύτη του εκχυλίσματος. Τα εκχυλίσματα ακετόνης και μεθανόλης είχαν τιμές

από 2000 έως 5000, ενώ τα εκχυλίσματα αιθανόλης, χλωροφορμίου και εξανίου οι τιμές βρισκόνταν σε εύρος 250-900 (Negi and Jayaprakasha, 2001).

Σε μελέτη που έγινε από τους Hammer *et al.*, 2002 με τη χρήση του ΤΤΟ έναντι των μυκήτων του γένους *Alternaria* που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό PDA, έχουν δείξει ότι η Minimum inhibitory concentration (MIC) κυμαίνεται στο εύρος 0,016-0,12 % vol/vol, δηλαδή 160-1200 ppm, και η minimal fungicidal concentration (MFC) 0,06-2% vol/vol (600-20000 ppm) (Hammer *et al.*, 2002).

Σε μια άλλη μελέτη για την αποτελεσματικότητα του ΤΤΟ σε μύκητες (*Ascochyta rabiei*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *Drechslera avenae*, *Alternaria radicina* και *A. dauci*) που είχαν αναπτυχθεί σε PDA, βρέθηκε ότι η MIC κυμάνθηκε από 0,08% έως 0,40%. Συγκεκριμένα για τους μύκητες του γένους *Alternaria*, *A. radicina* και *A. dauci* ήταν 0,40% και 0,20% (4000 και 2000 ppm αντίστοιχα) (Riccioni & Orzali, 2011).

Όσον αφορά τη θυμόλη, σε μια μελέτη που έγινε, ο μέσος όρος των τιμών EC₉₀ για ένα πλήθος διαφορετικών μυκήτων βρέθηκε 0,0305% ± 0,002 (305 ± 2 ppm). Επίσης, βρέθηκε ότι η θυμόλη επηρεάζει τη μορφολογία του μυκηλίου καθώς παρατηρήθηκαν αλλαγές στον εντοπισμό (localization) χιτίνης μέσα στις υφές (Morcia *et al.*, 2012).

Σε μια άλλη μελέτη που έγινε από τους Segvic' Klaric' *et al.* (2006), για τη θυμόλη και τον μύκητα *Alternaria alternata* καλλιεργημένο σε θρεπτικό υλικό Sabouraud 2% (w/v) glucose agar (SGA), η τιμή της Minimum inhibitory concentration (MIC) βρέθηκε 2,40 ± 1,13 µg/ml, ενώ γενικά για μύκητες του γένους *Alternaria* 3,5 ± 0,42 µg/ml. Ενώ, η Minimum fungicidal concentration (MFC) ήταν 4,75 ± 2,80 και 5 ± 4,2 αντίστοιχα.

Στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκε ακόμα, ότι στις χαμηλές συγκεντρώσεις κυρίως του ΤΤΟ και της θυμόλης, την 3^η ημέρα ανάπτυξης, αρκετά στελέχη αναπτύχθηκαν περισσότερο από τον μάρτυρα, υπήρχε δηλαδή αρνητική παρεμπόδιση. Σε άλλες μελέτες για την διερεύνηση της αντιμικροβιακής δράσης φαινολικών ενώσεων, οι ερευνητές έχουν παρατηρήσει ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσουν μια αύξηση στην μυκηλιακή ανάπτυξη κατά την φάση υστέρησης (Morcia *et al.*, 2013). Οι φαινολικές λιπόφιλες ενώσεις, όπως η θυμόλη, έχουν δείξει ότι σε μικρές συγκεντρώσεις μεταβάλλουν την μικροβιακή κυτταρική διαπερατότητα που επιτρέπει την απώλεια μακρομορίων (Segvic' Klaric' *et al.*, 2006). Επίσης, σε χαμηλές συγκεντρώσεις η θυμόλη έχει αντιοξειδωτική δράση αλλά σε μεγάλες συγκεντρώσεις δρα ως προ-οξειδωτικό και οδηγεί σε οξειδωτικό στρες (Satooka, 2011).

Από τα δεδομένα της παρούσας μελέτης, παρατηρήθηκε ότι η παρουσία της θυμόλης επιδρά στη μορφολογία του μύκητα. Στη μικροσκοπική παρατήρηση και των δύο στελεχών, το δείγμα από την καλλιέργεια σε θυμόλη 60 ppm είχε κονίδια πιο λίγα, διογκωμένα και πιο ανοιχτόχρωμα, και η συχνότητα της παρουσίας των πολυκύτταρων κονιδίων ήταν πιο μικρή. Συμπεραίνουμε, ότι η θυμόλη επιδρά αρνητικά στην φυσιολογική ανάπτυξη των κονιδίων του μύκητα. Όσον αφορά την επίδραση στο

χρώμα των κονιδίων, αυτό υποδεικνύει ότι η θυμόλη εμπλέκεται αρνητικά στη σύνθεση μελανίνης των σπορίων του μύκητα. Φαίνεται δηλαδή, ότι η θυμόλη έχει ανασταλτική δράση στη βιοσύνθεση μελανίνης, γεγονός το οποίο μπορεί να συνδεθεί με την επιβίωση και διαίωσιση του μύκητα.

Το 2011, ο Satooka, είχε μελετήσει την επίδραση του αιθέριου ελαίου θυμαριού και των συστατικών του στην σύνθεση μελανίνης σε μανιτάρια και κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η θυμόλη και η καρβακρόλη, τα κύρια συστατικά του ελαίου θυμαριού, αναστέλλουν την μελανογένεση σε μανιτάρια. Υποστηρίζει, ότι η θυμόλη επιδρά στη βιοχημική οδό σύνθεσης της μελανίνης (L-Tyrosine → L-Dopa → Dopariquone → LeucoDOPAchrome → DOPAchrome → Melanin), όχι όμως ως αναστολέας ενζύμου, αλλά ως αναστολέας σύνθεσης μελανίνης και συγκεκριμένα του σχηματισμού της DOPAchrome. Το κλειδί για την αναστολή του σχηματισμού της DOPAchrome έδειξε ότι είναι η αντιοξειδωτική δράση της θυμόλης. Βάση των δεδομένων του, ο Satooka υποθέτει ότι η θυμόλη αναστέλλει την αντίδραση οξειδοαναγωγής στην συνθετική οδό της μελανίνης λόγω του ότι δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες και τις εξουδετερώνει (due to the radical scavenging activity of thymol). Ο Satooka εμπόδισε τη δράση του φαινολικού OH της θυμόλης με αντικαθιστώντας το υδρογόνο (H) με μία μεθυλομάδα Me, και παρατήρησε ότι η ανασταλτική δράση που παρατηρήθηκε με τη θυμόλη ελαττώθηκε. Αυτό έδειξε ότι η παρουσία του φαινολικού υδροξυλίου της θυμόλης είναι απαραίτητη για την αναστολή. Επίσης, υπέθεσε, ότι η ανασταλτική δράση της θυμόλης στο σχηματισμό DOPAchrome οφείλεται στην καταστολή οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων, και συγκεκριμένα στην καταστολή της αντίδρασης μετατροπής της leukodopachrome σε DOPAchrome (Satooka, 2011).

Εφόσον, η θυμόλη δρα παρεμποδιστικά στο σχηματισμό μελανίνης μανιταριών, θα μπορούσε να παρεμποδίζει με τον ίδιο τρόπο και τον σχηματισμό της στα σπόρια του μύκητα *A. alternata*.

Η μελανίνη είναι σημαντική για την επιβίωση και διαίωσιση των μυκήτων. Ο μύκητας *A. alternata* παράγει την μελανίνη DHN (1,8-dihydroxynaphthalene), η οποία συσσωρεύεται στα κυτταρικά τοιχώματα των κονιδίων και υφών. Ο χρωματισμός (melanization) των κονιδίων έχει θεωρηθεί ότι είναι ένας σημαντικός παράγοντας για τις σαπροφυτικές ιδιότητες αυτού του μύκητα στον αγρό (Wheeler, 1983; Tanabe *et al.*, 1988; Tanabe, 1989). Στον μύκητα *A. alternata*, η εναπόθεση μελανίνης συμμετέχει στην ανάπτυξη των σπορίων και παίζει ρόλο στην επιβίωσή τους (Kawamura *et al.* 1999).

Η παρεμπόδιση της θυμόλης στο σχηματισμό μελανίνης στα σπόρια του μύκητα *A. alternata*, ή/και ανασταλτική δράση της στην ανάπτυξη των σπορίων, θα μπορούσαμε να πούμε ότι είναι πολύ πιθανό να επιδρά στην ικανότητα επιβίωσης των σπορίων του μύκητα και συνεπώς μπορεί να παίζει ρόλο στην μολυσματικότητα και επιδημιολογία του μύκητα.

Παρατηρήσεις με μικροσκόπιο (Scanning and transmission electron microscopy) έχουν αποκαλύψει ότι τα αιθέρια έλαια και τα συστατικά τους (όπως η θυμόλη)

μπορούν να προκαλέσουν αλλοιώσεις στη δομή των κυττάρων, όπως διόγκωση, αφυδάτωση, διαρροή και εκκένωση (Soylu *et al.*, 2006; Santoro *et al.*, 2007a,b). Η κυτταροτοξική δράση της θυμόλης οφείλεται στο οξειδωτικό στρες και προκαλεί σοβαρή βλάβη στα κύτταρα (Satooka, 2011). Η κυτταροτοξική δράση της θυμόλης, και η επίδρασή της στις μεμβράνες, φαίνεται να είναι υπεύθυνες για την αλλοίωση του σχήματος των κονιδίων του μύκητα, όπως παρατηρήθηκε μικροσκοπικά στην παρούσα μελέτη.

Όσον αφορά το πείραμα με την μικρομέθοδο που αναπτύχθηκε για τη διερεύνηση της επίδρασης της θυμόλης στο ανθεκτικότερο στέλεχος του μύκητα *Alternaria alternata* (AS9), παρατηρήθηκε βαθμιαία μείωση της βλάστησης/ανάπτυξης με την αύξηση της συγκέντρωσης των σπορίων καθώς και με την αύξηση συγκέντρωσης της θυμόλης. Από τα τρία μήκη κύματος που δοκιμάστηκαν, αυτό στο οποίο ήταν καλύτερη η απεικόνιση της απορρόφησης είναι τα 405 nm.

Οι μετρήσεις απορρόφησης βλάστησης-ανάπτυξης του στελέχους AS9 στα 405 nm, στις 10 διαφορετικές συγκεντρώσεις σπορίων που δοκιμάστηκαν, οδήγησε σε ομαδοποίηση των συγκεντρώσεων σε τρία επίπεδα των 10^5 , 10^4 και 10^3 (σπόρια/ml), με βάση την απορρόφηση. Το καλύτερο επίπεδο συγκέντρωσης κονιδίων του στελέχους AS9 του μύκητα *A. alternata* είναι το 10^5 σπόρια/ml, και συγκεκριμένα $4,5 \times 10^5$ και $2,25 \times 10^5$ σπόρια/ml, όπου σε αυτό το επίπεδο αποτυπώνεται καλύτερα η καμπύλη της ανάπτυξης του μύκητα και έχουμε μια πιο πλήρη εικόνα για την επίδραση της θυμόλης μέσα σε διάστημα πέντε ημερών. Η υψηλή συγκέντρωση κονιδίων βοηθάει ώστε, οι καμπύλες των διαφορετικών συγκεντρώσεων της θυμόλης να διαχωρίζονται καλύτερα και πιο γρήγορα και να έχουμε μια πρώτη εκτίμηση των αποτελεσμάτων από τη δεύτερη κιόλας ημέρα σε αντίθεση με τις μικρότερες συγκεντρώσεις κονιδίων.

Από το πείραμα της μικρομεθόδου είδαμε ότι η θυμόλη παρεμποδίζει σε σημαντικό βαθμό τη βλάστηση/ανάπτυξη του μύκητα. Από την 2^η ακόμη ημέρα (48 h) έχουμε ξεκάθαρη εικόνα για την παρεμποδιστική δράση της θυμόλης. Ενδεικτικά, τη 2^η ημέρα, η παρεμπόδιση που ασκεί η θυμόλη στην βλάστηση/ανάπτυξη του μύκητα (405 nm, συγκέντρωση $2,25 \times 10^5$ σπόρια/ml), ανέρχεται σε ποσοστό 72, 92% στα 40 ppm θυμόλης και σε ποσοστό 99,99 % στα 160 ppm σε σχέση με το μάρτυρα. Την 5^η ημέρα ανάπτυξης τα ποσοστά στις ίδιες συγκεντρώσεις είναι 43,7 % και 91,62 %, αντίστοιχα. Παρατηρούμε ότι τα ποσοστά έχουν μια μικρή πτώση μέσα στη διάρκεια του χρόνου. Παρόλα αυτά, τα ποσοστά παρεμπόδισης παραμένουν σημαντικά την 5^η ημέρα (120 h) ανάπτυξης του μύκητα, αν λάβουμε υπόψη μας το γεγονός, ότι η θυμόλη ως πτητική ένωση χάνει την ένταση της δράσης της με τον χρόνο.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μικρομέθοδος που αναπτύχθηκε μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διερεύνηση της αντιμυκητιακής δραστηριότητας προϊόντων φυσικής προέλευσης. Επίσης, συγκρίνοντάς την με την κλασσική μέθοδο των τρυβλίων, είδαμε ότι δίνει γρηγορότερα αποτελέσματα, έχει τη δυνατότητα για μεγαλύτερο αριθμό χειρισμών, παρέχει περισσότερα και πιο αξιόπιστα δεδομένα πιο γρήγορα μέσα στο χρόνο, ενώ παράλληλα είναι λιγότερη δαπανηρή.

Οι Cox D. *et al* το 2009, χρησιμοποίησαν microtiter-plates των 96 θέσεων, και μελέτησαν την ανάπτυξη του παθογόνου *Monilinia fructicola*, σε υγρό θρεπτικό υλικό (potato dextrose broth, PDB), υπό την επίδραση του febuconazole, σε μήκη κύματος 600 nm και 570 nm, χρησιμοποιώντας μια ροζ χρωστική. Χρησιμοποίησαν συγκεντρώσεις σπορίων διαφορετικών επιπέδων από 10^2 έως 10^6 κονίδια/ml. Χρησιμοποιώντας τη συγκέντρωση 10^5 κονίδια/ml, είχαν το βέλτιστο οπτικό αποτέλεσμα (το καλύτερο χρωματομετρικό σήμα), σε σχέση με τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις. Αυτή η συγκέντρωση, έδωσε τα πρώτα ορατά αποτελέσματα στις 24 ώρες. Σε συγκέντρωση 10^6 κονίδια/ml, τα αποτελέσματα που πήραν ήταν ασυνεπή και αναξιόπιστα που δεν ταίριαζαν με την ευαισθησία ή ανθεκτικότητα των στελεχών στο febuconazole. Για παράδειγμα στα ανθεκτικά στελέχη σημείωσαν μειωμένη αναπνοή στη συγκέντρωση αυτή απ' ό,τι στα 10^5 κονίδια/ml. Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σπορίων απαιτούνται περισσότερες από 24 h επώασης. Το τελευταίο διαπιστώθηκε και σε μια παρόμοια μελέτη που έκαναν οι ίδιοι με τον μύκητα *Botrytis*. Φάνηκε, ότι η κυτταρική ανάπτυξη εξαρτάται από το είδος του μύκητα αλλά και από την πυκνότητα των σπορίων. Αν για παράδειγμα η πυκνότητα των σπορίων είναι πολύ υψηλή, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων είναι πιθανόν να μειωθεί.

Το 2012, οι Kouassi *et al*, έκανα μια παρόμοια μελέτη που έγινε με τη χρήση μικρομεθόδου και συγκεκριμένα 96-well ELISA plates. Μελέτησαν τη δράση 30 αιθέριων ελαίων ενάντια στους μύκητες *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum* και *Colletotrichum musea*. Αξιολόγησαν την ανάπτυξη κάθε παθογόνου για τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις σπορίων και τρεις συγκεντρώσεις αιθέριων ελαίων. Ο μύκητας *Colletotrichum musea* έδειξε χαμηλότερο ρυθμό ανάπτυξης από τους άλλους δύο μύκητες και δοκιμάστηκε μόνο στις συγκεντρώσεις 10^4 και 10^5 σπόρια/ml, επειδή δεν παράγει αρκετά σπόρια για την παρασκευή συγκέντρωσης επιπέδου 10^6 σπόρια/ml. Από τις 168 έως τις 196 ώρες (10^4 και 10^5 σπόρια/ml) δεν υπήρχε ιδιαίτερα σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη των μυκήτων *P. italicum* και *P. digitatum*, αλλά υπήρχε πολύ σημαντική δράση στην ανάπτυξη του μύκητα *C. musea*. Η χρονική περίοδος που παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη αύξηση της παρεμπόδισης ήταν 72-96 h, ενώ για την περίοδο 168-196 h, δεν υπήρχε περαιτέρω παρεμπόδιση με εξαίρεση το *C. musea* στις υψηλότερες συγκεντρώσεις.

Συμπερασματικά, η μικρομέθοδος με τη χρήση micro-plates έδειξε στους ερευνητές ότι πλεονεκτεί των συνηθισμένων μεθόδων που χρησιμοποιούνται σε πειράματα μυκητοτοξικότητας. Είναι ταχύτερη και λιγότερο δαπανηρή. Επίσης, παρέχει τη δυνατότητα περισσότερων και πιο γρήγορων μετρήσεων και επαναλήψεων μέσα στο χρόνο, και συνεπώς περισσότερων δεδομένων. Επιπλέον, το γεγονός ότι χρησιμοποιεί σπόρια αντί μυκηλίων, συμβάλλει στο ότι μπορεί να είναι πιο αξιόπιστη για την μέτρηση της ανθεκτικότητας σε μυκητοκτόνες ουσίες, παρέχοντας πιο γρήγορα συμπεράσματα (Cox D. *et al*, 2009).

Τα αποτελέσματα του πειράματος για διερεύνηση της ύπαρξης συνεργιστικής δράσης-χημειοευσθητοποίησης θυμόλης-μυκητοκτόνων έδειξαν, αθροιστική, ανταγωνιστική και συνεργιστική δράση στους χειρισμούς που έγιναν. Συγκεκριμένα, συνεργιστική δράση σημειώθηκε στον χειρισμό θυμόλης-fludioxonil στα 30 ppm θυμόλης στο στέλεχος AS9 και στον χειρισμό θυμόλης-boscalid στα 15 ppm θυμόλης στο στέλεχος AS10. Η συνεργιστική και η αθροιστική δράση που παρατηρήθηκαν, δείχνουν ότι η συνεφαρμογή της θυμόλης με το εκάστοτε μυκητοκτόνο αυξάνει την αντιμυκητιακή αποτελεσματικότητα του μυκητοκτόνου, έναντι των ανθεκτικών στελεχών. Αυτή η αύξηση είναι σημαντική γιατί οδηγεί σε μείωση της αποτελεσματικής δόσης του μυκητοκτόνου και κατά συνέπεια του κόστους, και των αρνητικών επιπτώσεων στο περιβάλλον και τον άνθρωπο. Η συνεφαρμογή θυμόλης-μυκητοκτόνου, έδειξε ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση της ανθεκτικών στελεχών του μύκητα *Alternaria alternata*. Το γεγονός ότι, η θυμόλη σε μικρές συγκεντρώσεις δρα ως αντιοξειδωτικό, ενώ σε μεγάλες ως οξειδωτικό (Satooka, 2011) μπορεί να είναι σημαντικός παράγοντας για την επιλογή των συγκεντρώσεων θυμόλης στη διερεύνηση της ύπαρξης της συνεργιστικής δράσης της με άλλα μυκητοκτόνα. Επίσης, ο διαφορετικός τρόπος δράσης των μυκητοκτόνων ουσιών στον μύκητα μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην συνεφαρμογή τους με τη θυμόλη, με τελικό σκοπό τη μείωση της δόσης του χημικού σκευάσματος καθώς και στον κίνδυνο εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών του μύκητα.

Παρά τις ποικίλες δράσεις των αιθέριων ελαίων και των συστατικών τους, δεν έχουν γίνει αρκετές μελέτες από τους ερευνητές, για τον συνδυασμό τους με μυκητοκτόνες ουσίες. Υπάρχουν όμως μελέτες που έχουν γίνει και αποκαλύπτουν συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις, όπως αυτή του ketoconazole με το *Euphorbia characias* latex ενάντια στο *Candida albicans* (Gioredani *et al.* 2001).

Η θυμόλη πάντως έχει δείξει ότι μπορεί σε συνδυασμό με μυκητοκτόνα να προκαλέσει μεγαλύτερη παρεμπόδιση των μυκήτων. Συγκεκριμένα, το azoxystrobin σε συνδυασμό με θυμόλη σε μία μη μυκητοτοξική συγκέντρωση, έδειξε ότι προκαλεί πολύ υψηλότερη αναστολή της ανάπτυξης μυκήτων μεταξύ αυτών και του *Alternaria sp.*, από ότι το μυκητοκτόνο μόνο του. Επίσης, το μυκητοκτόνο Folicur (tebuconazole) σε συνδυασμό με τη θυμόλη, έδειξε ότι αναστέλλει την ανάπτυξη του *Alternaria alternata*, σε πολύ μεγαλύτερο επίπεδο από ό, τι το μυκητοκτόνο μόνο (Dzhavakhiya *et al.*, 2012).

Οι Kim *et al.*, το 2010, προσπάθησαν να αντιμετωπίσουν ανθεκτικά στελέχη του *Penicillium expansum* στο fludioxonil, χρησιμοποιώντας διαφορετικούς οξειδωτικούς και φυσικούς φαινολικούς παράγοντες. Και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι δραστικές ενώσεις που επιδρούν σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και στοχεύουν στο οξειδωτικό στρες και την απόκριση, μπορούν να λειτουργήσουν ως ισχυροί παράγοντες χημειοευαισθητοποίησης και να συμβάλουν στην καταπολέμηση ανθεκτικών στελεχών (τα οποία έχουν προκύψει από μια μετάλλαξη στο oxidative stress signalling

system) με μικρότερη δόση μυκητοκτόνων. Μεταξύ άλλων η συνεφαρμογή θυμόλης και fludioxonil είχε ως αποτέλεσμα την χημειοευσθητοποίηση (Kim *et al*, 2010).

Σε μια άλλη μελέτη που έγινε το 2011, βρέθηκε συνεργιστική αλληλεπίδραση ορισμένων αιθέριων ελαίων και συστατικών τους με fluconazole, έναντι ανθεκτικών στελεχών *Aspergillus fumigatus* MTCC2550 και *Trichophyton rubrum* IOA-9. Χαρακτηριστικά, η cinnamaldehyde βρέθηκε η πιο αποτελεσματική έναντι των δύο ανθεκτικών στελεχών. Μείωσε τη MIC της fluconazole έως 8 φορές και το δικό της MIC 16-32 φορές. Η συνεργιστική δράση των αιθέριων ελαίων ή των συστατικών τους με τη fluconazole μπορεί να συσχετίζεται με την ταυτόχρονη αναστολή διαφορετικών θέσεων στόχων (Sajjad *et al*, 2011).

Σύμφωνα με άλλες αναφορές η αντιμικροβιακή δράση της θυμόλης στις μεμβράνες και η αύξηση της διαπερατότητά τους, είναι πιθανό να διευκολύνουν την διείσδυση των αντιμικροβιακών ουσιών.

Πολλά από τα αιθέρια έλαια και τα συστατικά τους έχουν αποδείξει την αντιμυκητιακή τους δράση, ωστόσο ο τρόπος δράσης τους είναι λιγότερο κατανοητός από αυτόν των διαθέσιμων μυκητοκτόνων. Ο συνδυασμός τους, μπορεί να οδηγήσει σε συνεργιστική δράση και να συμβάλουν σε καλύτερο συστηματικό έλεγχο των ασθενειών που οφείλονται σε μύκητες και της αποτελεσματικότερης αντιμετώπισης ανθεκτικών στελεχών.

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abreu A. C., McBain A. J. and Simoes M., (2011). Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Natural Product Reports*, 2012, 29, 1007–1021.
- Armando C., Maythe S. and Beatriz N. P. (1998). Antioxidant activity of grapefruit seed extract on vegetable oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, 463-467.
- Angioni, A., Cabras, P., Hallewin, G.O., Pirisi, F.M., Reniero, F., Schirra, M. (1998). Synthesis and inhibitory activation of 7-geranoxycoumarin against *Penicillium* species in citrus fruit. *Phytochemistry*, 47, 1521-1525.
- Avenot H.F. and Michailides T.J. (2007). Resistance to boscalid fungicide in *Alternaria alternata* isolates from pistachio in California. *Plant Disease*, 91: 1345-1350.
- Avenot H.F., Morgan D.P. and Michailides T.J. (2008). Resistance to pyraclostrobin, boscalid and multiple resistance to Pristine (pyraclostrobin+boscalid) fungicide in *Alternaria alternata* causing alternata late blight of pistachios in California. *Plant Pathology*, 57:135-140.
- Avenot H.F., Sellam A., Karaoglanidis G. and Michailides T.J. (2008). Characterization of mutations in the iron-sulphur subunit of succinate dehydrogenase correlating with boscalid resistance in *Alternaria alternata* from California pistachio. Disease Control and Pest Management. *Phytopathology*, 98: 736-742.
- Avenot H.F., Sellam A., and Michailides T.J. (2009). Characterization of mutations in the membrane-anchored subunits AaSDHC and AaSDHD of succinate dehydrogenase from *Alternaria alternata* isolates conferring field resistance to the fungicide boscalid. *Plant Pathology*, 58: 1134-1143.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils-A review. *Food and Chemical Toxicology* 46, 446–475.
- Bennett R. D., Hasegava S. and Herman Z. (1989). Glucosides of acidic limonoids in citrus, *Phytochemistry*, 28, 2777–2781.
- Biggs A.R. (1994). Mycelia growth, sporulation and virulence to apple fruit of *Alternaria alternata* isolates resistance to iprodione. *Plant Disease*, 78: 732-735.
- Bouchra, Chebli, Achouri, Mohamed; Idrissi Hassani, L.M; Hmamouchi, Mohamed (2003). "Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven

Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr". *Journal of Ethnopharmacology* 89 (1):165–169.

Braddock R. J. and Bryan C. R. (2001). Extraction parameters and capillary electrophoresis analysis of limonin glucoside and phlorin in citrus by products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5982–5988.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int J Food Microbiol* 94, 223–253.

Carson, C.F., Mee, B.J., Riley, T.V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 1914–1920.

Carson C. F., Hammer K. A., and Riley T. V. (2006). *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1), 50–62.

Chelkowski J. and Visconti A. (1992). *Alternaria* Biology, Plant Diseases and Metabolites (Vol III). Elsevier-Amsterdam-London-New York-Tokyo.

Cvetnic Z. and Vladimir-Knezevic S. (2004). Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract. *Acta Pharm.* 54: 243–250.

Coombe, B.G. (1989). The grape berry as a sink. *Acta horticulturae*, 239, 149–158.

Cox K.D., Quello K., Deford R.J. and Beckerman J.L. (2009). A Rapid Method to Quantify Fungicide Sensitivity in the Brown Rot Pathogen *Monilinia fructicola*. *Plant Dis.* 93:328-331.

Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., H.C. Bell, Gustafson J.E., Warmington J.R. and Wyllie S.G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* 88, 170–175.

De Lean A., Munson P. J., Rodbard (1978). *Am J. Physiology*, 750, 369-390.

Delp C.J. and Dekker J. (1985). Fungicide resistance: Definitions and use of terms, *EPPO Bull.* 15:333-335.

Dorman HJ, Deans SG. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol.* 88:308–16.

Drewnowski A. and Gomez-Carneors C. (2000). Bitter taste, phytonutrients, and consumer: a review. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 1424–1435.

Dry I.B., Yuan K.H. and Hutton D.G. (2004). Dircaboximide resistance in field isolates of *Alternaria alternata* is mediated by a mutation in two-component histidine kinase gene. *Fungal Genetics and Biology*, 41: 102-108.

Dzhavakhiya V., Shcherbakova L., Semina Y., Zhemchuzhina N. and Campbell B. (2012). Chemosensitization of plant pathogenic fungi to agricultural fungicides. *Frontiers in Microbiology | Fungi and Their Interactions* 3:(87), 1-9.

Evans J.D. and Martin S.A., (2000). Effects of Thymol on Ruminant Microorganisms. *Current Microbiology* Vol. 41 (2000), pp. 336–340.

Figiel Adam, Szumny Antoni, Gutiérrez-Ortiz Antonio, Carbonell-Barrachina Ángela. (2010). "Composition of oregano essential oil (*Origanum vulgare*) as affected by drying method". *Journal of Food Engineering* 98 (2): 240–247.

Gioredani R., Trebaux J., Masi M., Regli P., (2001). Enhanced antifungal activity of ketoconazole by *Euphorbia characias* latex against *Candida albicans*. *J Ethnopharmacol* 78:1–5.

Goodner K.L., Mahattanatawee K, Plotto A, Sotomayor J, Jordan M, (2006). Aromatic profiles of *Thymus hyemalis* and Spanish *T. vulgaris* essential oils by GC–MS/GC–O. *Industrial Crops and Products* 24 (3): 264–268.

Gorinstein S., Caspi A., Libman I., Lerner H. T., Huang D., Leontowicz H., Leontowich M., Tashma Z., Katrich E., Feng S., Trakhtenberg S. (2006). Red Grapefruit Positively Influences Serum Triglyceride Level in Patients Suffering from Coronary Atherosclerosis: Studies in Vitro and in Humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1887-1892.

Greco M., Patriarca A., Terminiello L., Fernández Pinto V., Pose G. (2012). Toxigenic *Alternaria* species from Argentinean blueberries. *International Journal of Food Microbiology* 154, 187–191.

Γεωργόπουλος Σ. Γ. και Ζιώγας Β. Ν., (1992). Αρχές και μέθοδος καταπολέμησης των ασθενειών των φυτών. Επιμέλεια εκδόσεως Δρ. Β. Ν. ΖΙΩΓΑΣ, Αθήνα 1992.

Hammer K.A., Carson C.F. and Riley T.V. (2002). In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 50, 195-199.

Hammer K.A., Carson C.F. and Riley T.V. (2003). Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 853–860.

Heggers J.P., Cottingham J., Gusman J., Reagor L., McCoy L., Carino E., Cox R., Zhao J.G. (2002). The effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an

antibacterial agent: II. Mechanism of action and in vitro toxicity. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* 8/3, 333–340.

Hutton D.G. (1988). The appearance of dircaoximide resistance in *Alternaria alternata* in passion fruit in south-east Queens l and. *Plant pathology*, 117: 34-38.

Inouyel S., Watanabe M., Nishiyama Y., Takeo K., Akao M. and Yamaguchi H. (1998). Antisporulating and respiration-inhibitory effects of essential oils on filamentous fungi. *MYCOSES* 41, 403-410.

Ionescu, G., Kiehl, R., Wichmann-Kunz, F., Williams, C.H., Bauml, L.M., Levine, S. (1990). Oral citrus seed extract. *Journal of Orthomolecular Medicine*, 5, 230–238.

Isman MB. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot.* 19:603–608. Jones, F.A. (1996). Herbs–useful plants. Their role in history and today. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 8, 1227–1231.

Kanias, G. D. et al.; Souleles, C.; Loukis, A.; Philotheou-Panou, E. (1998). "Trace elements and essential oil composition in chemotypes of the aromatic plant *Origanum vulgare*". *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 227 (1 – 2): 23–31.

Kawamura, C.; Tsujimoto, T. and Tsuge, T. (1999). Targeted disruption of a melanin biosynthesis gene affects conidial development and UV tolerance in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12:59–63.

Kim J.H., Campbell B.C., Mahoney N., Chan K.L., Molyneux R.J. and Xiao C.L. (2010). Use of chemosensitization to overcome fludioxonil resistance in *Penicillium expansum*. *Applied Microbiology* 51: 177–183.

Knobloch K., Pauli A., Iberl B., Wigand H., Weis N. (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*, 1, 119–128.

Kouassi H. S., Bajji M., Brostaux Y., Zhiri A., Samb A., Lepoivre P., Jijakli H. M. (2012). Development and application of a microplate method to evaluate the efficacy of essential oils against *Penicillium italicum* Wehmer, *Penicillium digitatum* Sacc. and *Colletotrichum musea* (Berk. & M.A. Curtis) Arx, three postharvest fungal pathogens of fruits. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 16(3), 325-336

Krajewska-Kulak E., Lukaszuk C. and Niczyporuk W. (2003). Antifungal activity of 33% grapefruitwater glycerol solution. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 17, 486–487.

Lagouri, Vasiliki et al.; Blekas, George; Tsimidou, Maria; Kokkini, Stella; Boskou, Dimitrios (1993). "Composition and antioxidant activity of essential oils from *Oregano*

plants grown wild in Greece". *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* 197 (1): 1431–4630.

Lawless, J. (1995). *The Illustrated Encyclopedia of Essential Oils*. Shaftesbury, UK: Element Books Ltd.

Lee, H.J., Kimb, T.C., Kima, S.J., Park, S.J. (2005). Bruising injury of persimmon (*Diospyros kaki* cv. Fuyu) fruits. *Scientia Horticulturae*, 103, 179–185.

Lee, Seung-Joo, Umamo, K; Shibamoto, T; Lee, K (2005). "Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties". *Food Chemistry* 91 (1): 131–137.

Liolios, C.C. et al.; Gortzi, O; Lalas, S; Tsaknis, J; Chinou, I (2009). "Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity". *Food Chemistry (Elsevier)* 112 (1): 77–83.

Lis-Balchin, M. and Deans, S.G. (1997). Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology* 82, 759–762.

Liu GT, Qian YZ, Zhang P, Dong WH, Qi YM, Guo HT (1992). Etiological role of *Alternaria alternata* in human esophageal cancer. *Chinese Medical Journal*, 105(5), 394-400.

Luo Y., Reyes H.C., Morgan D.P. and Michailidis T.J. (2007). Using real-time PCR to survey frequency of azoxystrobin-resistant allele G143A in *Alternaria* populations from almond and pistachio orchards in California. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88:328-336.

Ma Z. Felts D. and Michailidis T.J. (2003). Resistance to azoxystrobin in *Alternaria* isolates from pistachio in California. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 77: 66-74.

Ma Z., Michailidis T.J. (2004). An allele-specific PCR assay for detecting azoxystrobin-resistant *Alternaria* isolates from pistachio in California. *Journal of Phytopathology*, 152: 118-121.

Ma Z., Michailidis T.J. (2004). Characterization of iprodione-resistant *Alternaria* isolates from pistachio in California. *Pesticide Biochemistry and Pathology*, 80: 75-84.

Ma Z., Michailidis T.J. (2004). A real-time PCR assay for the detection of azoxystrobin-resistant *Alternaria* populations from pistachio orchards in California. *Crop Protection*, 23: 1259-1263.

McPhee W.J. (1980). Some characteristics of *Alternaria alternata* strains resistance to iprodione. *Plant Disease*, 64: 847-849.

- Mishra, A.K. and Dubey, N.K. (1994). Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 1101–1105.
- Moldão-Martins, M. *et al.*; Palavra, A; Beiraodacosta, M; Bernardogil, M (2000). "Supercritical CO₂ extraction of *Thymus zygis* L. subsp. *sylvestris* aroma". The Journal of Supercritical Fluids 18 (1): 25–34.
- Morcia C., Malnati M., Terzi V. (2012). In vitro antifungal activity of terpinen-4 ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. *Food Additives and Contaminants*, 29(3), 415–422.
- Negi P. S. and Jayaprakasha G. K. (2001). Antibacterial activity of grapefruit (*Citrus paradisi*) peel extracts. *Eur Food Res Technol*, 213:484–487.
- Orlikowski, L.B. (2001). Plant extracts in the control of *Phytophthora cryptogea*. *Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en toegepaste Biologische Wetenschappen Universiteit Gent*, 66/ 2a, 83-89.
- Ozkan, Gulcan *et al.*; Baydar, H; Erbas, S (2009). "The influence of harvest time on essential oil composition, phenolic constituents and antioxidant properties of Turkish oregano (*Origanum onites* L.)". *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90 (2): 205–209.
- Παναγόπουλος Χ.Γ. (2000). Ασθένειες Κηπευτικών Καλλιεργειών, β' εκδοση. Εκδόσεις ΑΘ. Σταμούλης.
- Pauli, A. (2001). Antimicrobial properties of essential oil constituents. *Int J Aromatherapy* 11, 126–133.
- Reagor L., Gusman J., McCoy L., Carino E., Hegggers J.P. (2002). The effectiveness of Processed Grapefruit-Seed Extract as An Antibacterial Agent: I. An *In Vitro* Agar Assay. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 8/3, 325–332.
- Riccioni L., Orzali L. (2011). Activity of Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*, Cheel) and thyme (*Thymus vulgaris*, Linnaeus.) Essential Oils against Some Pathogenic Seed Borne Fungi. *Journal of Essential Oil Research*, 23 43-47.
- Sajjad M., Khan A. and Ahmad I. (2011). Antifungal activity of essential oils and their synergy with fluconazole against drug-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 90:1083-1094.
- Sanchez-Gozalez L., Vargas M., Gonzalez-Matinez C, Chiralt A., Chafer M. (2010). Use of Essential Oils in Bioactive Edible Coatings. Springer Science + Business Media, LLC.

- Saniewska, A. (2002). Influence of biopreparation Biosept 33 SL on *Phoma narcissi*. *Poland Ochrony Roslin*, 46, 18-20.
- Santoro, G.F., Cardoso, M.G., Guimaraes, L.G., Mendonca, L.Z., Soares, M.J., 2007a. *Trypanosoma cruzi*: Activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. *Exp. Parasitol.* 116, 283–290.
- Santoro, G.F., das Gracas Cardoso, M., Guimaraes, L.G., Salgado, A.P., Menna-Barreto, R.F., Soares, M.J., 2007b. Effect of Oregano (*Origanum vulgare* L.) and Thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitol. Res.* 100, 783–790.
- Satooka, Hiroki, (2011). Naturally Occurring Melanin Synthesis Regulators and Their Modes of Action. (http://www.escholarship.org/help_copyright.html#reuse), eScholarship University of California.
- Segvic´ Klaric´ M., Kosalec I., Mastelic J., Pieckova E. and Pepeljnak S. (2006). Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. *Applied Microbiology*, 44: 36–42.
- Sikkema J., De Bont J.A.M., Poolman B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, 59, 201–222.
- Sokolić-Mihalak D, Frece J., Slavica A., Delas F., Pavlovic H., Markov K. (2012). The effects of wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) essential oil components against ochratoxin-producing *Aspergillus*. *Arh Hig Rada Toksikol* ,63:457-462.
- Solel Z., Timmer L.W. and Kimmchi M. (1996). Iprodione resistance of *Alternaria alternata* pv. *citri* from Minneota Tangelo in Israel and Florida. *Plant Disease*, 80:291-293.
- Soylu, E.M., Soylu, S., Kurt, S., (2006). Antimicrobial activity of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia* 161, 119–128.
- Reagor, L., Gusman, J., McCoy, L., Carino, E., Hegggers, J.P. (2002). The effectiveness of treated grapefruit-seed extract as an antibacterial agent. I. An in vitro agar assay. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 8, 325–332.
- Reynolds, J.E.F. (1996). *Martindale–the Extra Pharmacopoeia* 31stedn. London: Royal Pharmaceutical Society of Great Britain.
- Tanabe, K. 1989. Ph.D. thesis. Nagoya University, Nagoya, Japan.

- Tanabe, K., S. Nishimura, and K. Kohmoto. 1988. Pathogenicity of melanin-deficient mutants of *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 54:54. (In Japanese.)
- Tirillini, B. (2000). Grapefruit: the last decade acquisitions. *Fitoterapia* 71, 29–37.
- Tushiswili L. Sh., Durmishidze S. V. and Sulaberidze K. V. (1983). Sterols of grapefruit, orange, mandarin pulps (*Citrus paradisi*, *Citrus sinensis*, *Citrus unshiu*). *Chemistry of Natural Compounds*, 18, 445–447.
- Vanamala J., Leonardi T., Patil B.S., Taddeo S.S., Murphy M.E., Pike L.M., Chapkin R.S., Lupton J.R., Turner N.D. (2006). Suppression of colon carcinogenesis by bioactive compounds in grapefruit. *Carcinogenesis*, 27(6), 1257-65.
- Wallace John R. (2004). Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proceedings of the Nutrition Society*, 63, 621–629.
- Wheeler, M. H. 1983. Comparisons of fungal melanin biosynthesis in ascomycetous, imperfect and basidiomycetous fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 81:29-36.
- Woedtke, Th. von, Schlueter, B., Pflugel, P., Lindequist, U., & Julich, W.D. (1999). Aspects of the antimicrobial efficacy of grapefruit seed extract and its relations to preservative substances contained. *Pharmazie*, 54, 452-456.
- Wojdyla, A.T. (2001). Grapefruit extract activity in the control of rose powdery mildew and black spot. *Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en toegepaste Biologische Wetenschappen Universiteit Gent*, 66/2a, 167-177.
- Yanishlieva, N. V.; Marinova, E. M.; Gordon, M. H.; Raneva, V. G. (1999). Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chem.* 64, (1), 59-66.
- Zdenka C., Sanda V.K. (2004). Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract. *Acta Pharmaceutica*, 54, 243–250.
- Zamurenko V. A., Klyuev N. A., Bocharov B. V., Kabanov V. S. and Zakharov A. M. (1989). An investigation of the component composition of the essential oil of *Monarda fistulosa*. *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 25, No. 5, Sep. 1989.

