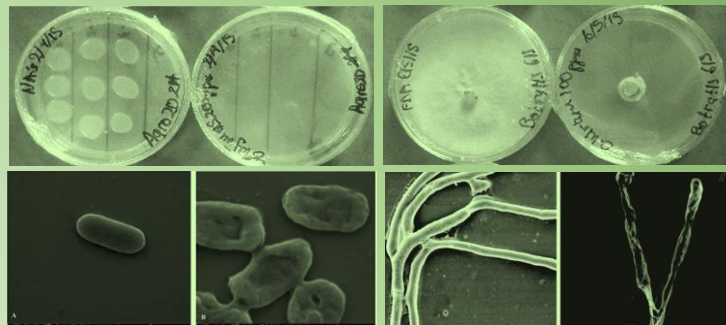




ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΔΟΜΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ
ΜΕΛΕΤΗ



ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΘΕΡΙΩΝ
ΕΛΑΙΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ
ΜΥΚΗΤΩΝ ΚΑΙ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ
ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΟΥ

ΚΟΥΜΕΡΤΑ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ
ΑΘΗΝΑ 2017

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΔΟΜΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΣΤΗΝ
ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΚΑΙ
ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΟΥ

ΚΟΥΜΕΡΤΑ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Επιβλέπουσα: Αντωνίου Πολύμνια, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυτοπαθολογίας ΓΠΑ

Μέλη: Τσιτσιγιάννης Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Φυτοπαθολογίας ΓΠΑ

Τζάμος Σωτήριος, Επίκουρος Καθηγητής Φυτοπαθολογίας ΓΠΑ

Στην οικογένειά μου.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Καταρχήν θέλω να ευχαριστήσω τον Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Παπλωματά Επαμεινώνδα για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο εργαστήριο και να εκπονήσω την μελέτη μου. Ακολούθως ευχαριστώ θερμά την τριμελή εξεταστική επιτροπή και ιδιαίτερα την κ. Αντωνίου Πολύμνια Αναπληρώτρια Καθηγήτρια για την εμπιστοσύνη, συνεχή στήριξη και καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης και την διόρθωση της μελέτης. Τον κ. Τζάμο Σωτήριο Επίκουρο Καθηγητή για τις πολύτιμες συμβουλές του ιδίως στο κομμάτι του πειράματος που αφορά τις δοκιμές στο θερμοκήπιο και τον κ. Τσιτσιγιάννη Δημήτριο Αναπληρωτή Καθηγητή για την τιμή που μου κάνει να είναι μέλος της εξεταστικής επιτροπής και για την βοήθειά που μου προσέφερε στην πορεία διεξαγωγής της μελέτης μου. Επίσης ευχαριστώ και την κ. Τζίμα Αλίκη Λέκτορα του εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας για τις χρήσιμες συμβουλές της την κατάλληλη στιγμή.

Θερμές ευχαριστίες εκφράζω προς τον κ. Πολυσίου Μόσχο Καθηγητή του εργαστηρίου Χημείας και τον κ. Κυμπάρη Αθανάσιο Επίκουρο Καθηγητή ΑΠΘ για την παραγωγή και διάθεση των αιθερίων ελαίων που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα καθώς και για την πολύτιμη καθοδήγηση και τις συμβουλές τους.

Θα ήταν μεγάλη παράλειψη αν δεν εξέφραζα τις ευχαριστίες μου στους υποψήφιους διδάκτορες και μεταπτυχιακούς φοιτητές, ιδιαίτερα στην Γκίζη Δανάη, τον Παλαβούζη Σταύρο, την Τριανταφυλλοπούλου Αλεξάνδρα και την Βαρυμπόπη Αδαμαντία για τις συμβουλές, τις γνώσεις και την βοήθεια που μου προσέφεραν απλόχερα. Επιπλέον όλα τα μέλη του εργαστηρίου και τους συμφοιτητές μου για το άριστο κλίμα και συνεργασία που υπήρξε στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γ.Π.Α.

Φυσικά ευχαριστώ με όλη μου την καρδιά την οικογένειά μου για την υπομονή τους και την ηθική υποστήριξή τους και ξεχωριστά ευχαριστώ την μητέρα μου για την συνεργασία στο θερμοκήπιο και σε ότι χρειάστηκα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	10
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1 Ασθένεια υπέργειου μέρους.....	10
1.1.1 Βακτηριακή στιγματώση (<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>)	10
1.2 Ασθένειες εδαφογενών παθογόνων	13
1.2.1 Βερτισιλλίωση (<i>Verticillium dahliae</i>).....	13
1.2.2 Βακτηριακό έλκος της τομάτας (<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>)	18
1.3 Αιθέρια έλαια	21
1.3.1 Τρόπος δράσης των αιθέρων ελαίων έναντι των βακτηρίων και των μυκήτων.	23
1.3.2 Χρήσεις.....	27
1.3.3 Οικογένεια Lamiaceae.....	32
1.3.3.1 Το αιθέριο έλαιο της ρίγανης (<i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i>).....	33
1.3.3.2 Το αιθέριο έλαιο του θυμαριού (<i>Coridothymus capitatus</i>).....	36
1.3.3.3 Το αιθέριο έλαιο της μαντζουράνας (<i>Origanum majorana</i>).....	38
1.3.3.4 Το αιθέριο έλαιο του θρουμπιού (<i>Satureja thymbra</i>).....	40
1.4 Η άμυνα των φυτών	43
1.4.1 Συστήματα άμυνας των φυτών: προϋπάρχουσα άμυνα	43
1.4.2 Σήματα άμυνας μετά από την αναγνώριση παθογόνων και παρασίτων.....	46
1.5 Σκοπός της μεταπτυχιακής μελέτης.....	52
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	53
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	53
2.1 Υλικά.....	53
2.1.1 Αιθέρια έλαια.....	53
2.1.2 Βιολογικό υλικό.....	54
2.1.3 Θρεπτικά υλικά.....	55
2.1.3.1 Παρασκευή θρεπτικού υλικού P.D.A.....	55
2.1.3.2 Παρασκευή θρεπτικού υλικού N.A.G.	56
2.1.3.3 Παρασκευή θρεπτικού υλικού K's B.....	56
2.1.3.4 Παρασκευή θρεπτικού υλικού S.S.N.....	57
2.1.3.5 Παρασκευή θρεπτικού υλικού N.G.....	57
2.1.3.6 Παρασκευή φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος	57
2.1.4 Φυτικό υλικό.....	58
2.1.5 Προετοιμασία αιθερίων ελαίων για εφαρμογή στο θερμοκήπιο.....	58
2.1.6 Προετοιμασία του μύκητα <i>Verticillium dahliae</i> πριν την εφαρμογή του στα φυτάρια τομάτας.	58
2.1.7 Προετοιμασία του βακτηρίου <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> πριν την εφαρμογή του στα φυτάρια τομάτας.....	59

2.1.8 Προετοιμασία του βακτηρίου <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> πριν την εφαρμογή του στα φυτάρια τομάτας.	60
2.2 Μέθοδοι	60
2.2.1 Αξιολόγηση της επίδρασης των αιθερίων ελαίων στην ανάπτυξη του μύκητα <i>Verticillium dahliae</i> στο εργαστήριο (<i>in vitro</i>).	60
2.2.2 Αξιολόγηση της επίδρασης των αιθερίων ελαίων στην ανάπτυξη των βακτηρίων <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> και <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> στο εργαστήριο (<i>in vitro</i>).	61
2.2.3 Αξιολόγηση της επίδρασης των αιθερίων ελαίων στην αντιμετώπιση των ασθενειών και στην ανάπτυξη των φυτών στο θερμοκήπιο (<i>in vivo</i>).	62
2.2.4 Ταυτοποίηση της παρουσίας του βακτηρίου <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> στα φυτά με την εφαρμογή της μεθόδου PCR.....	63
2.2.5 Αξιολόγηση της επίδρασης της εφαρμογής με ριζοπότισμα του αιθερίου ελαίου του φυτού <i>Thymus vulgaris</i> στην άμυνα των φυταρίων τομάτας εναντίον μυκήτων και βακτηρίων στο θερμοκήπιο (<i>in vivo</i>).	67
2.2.6 Στατιστική ανάλυση.....	69
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	71
3.1 Αξιολόγηση της επίδρασης των αιθερίων ελαίων στην ανάπτυξη του βακτηρίου <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> σε συνθήκες εργαστηρίου (<i>in vitro</i>) και θερμοκηπίου (<i>in vivo</i>)	71
3.1.1 Επίδραση των αιθερίων ελαίων (<i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i> , <i>Coridothymus capitatus</i> , <i>Origanum majorana</i> , <i>Satureja thymbra</i>) στην ανάπτυξη του βακτηρίου <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> στο εργαστήριο (<i>in vitro</i>).....	71
3.1.2 Επίδραση των αιθερίων ελαίων (<i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i> , <i>Coridothymus capitatus</i>) στην αντιμετώπιση της βακτηριακής στιγματώσης από το βακτήριο <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> και στην ανάπτυξη των φυτών τομάτας στο θερμοκήπιο (<i>in vivo</i>).....	73
3.2 Αξιολόγηση της επίδρασης των αιθερίων ελαίων στην ανάπτυξη του μύκητα <i>Verticillium dahliae</i> σε συνθήκες εργαστηρίου (<i>in vitro</i>) και θερμοκηπίου (<i>in vivo</i>)	83
3.2.1 Επίδραση των αιθερίων ελαίων (<i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i> , <i>Coridothymus capitatus</i> , <i>Origanum majorana</i> , <i>Satureja thymbra</i>) στην ανάπτυξη του μύκητα <i>Verticillium dahliae</i> στο εργαστήριο (<i>in vitro</i>).....	84
3.2.2 Επίδραση των αιθερίων ελαίων (<i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i> , <i>Coridothymus capitatus</i> ή <i>Thymus vulgaris</i>) στην αντιμετώπιση της αδρομύκωσης – βερτισιλλίωσης από τον μύκητα <i>Verticillium dahliae</i> και στην ανάπτυξη των φυτών μελιτζάνας στο θερμοκήπιο (<i>in vivo</i>).....	86
3.2.3 Σύγκριση της επίδρασης των διαφορετικών δοκιμών των αιθερίων ελαίων στην εξέλιξη της ασθένειας της αδρομύκωσης – βερτισιλλίωσης.	102
3.3 Αξιολόγηση της επίδρασης των αιθερίων ελαίων στην ανάπτυξη του βακτηρίου <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> σε συνθήκες εργαστηρίου (<i>in vitro</i>) και θερμοκηπίου (<i>in vivo</i>)	107
3.3.1 Επίδραση των αιθερίων ελαίων (<i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i> , <i>Coridothymus capitatus</i> , <i>Satureja thymbra</i> , <i>Origanum majorana</i>) στην ανάπτυξη του βακτηρίου <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	107

3.3.2 Επίδραση των αιθερίων ελαίων (<i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i> , <i>Coridothymus capitatus</i> ή <i>Thymus vulgaris</i>) στην αντιμετώπιση του βακτηριακού έλκους της τομάτας από το βακτήριο <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> και στην ανάπτυξη των φυτών τομάτας στο θερμοκήπιο (<i>in vivo</i>).109	
3.3.3 Σύγκριση της επίδρασης των διαφορετικών δοκιμών των αιθερίων ελαίων στην εξέλιξη της ασθένειας του βακτηριακού έλκους της τομάτας.	129
3.4 Συγκεντρωτική εικόνα της επίδρασης των αιθερίων ελαίων της ρίγανης και του θυμαριού στην ανάπτυξη των ασθενειών.	134
3.5 Αξιολόγηση της επίδρασης της εφαρμογής με ριζοπότισμα του αιθερίου ελαίου του φυτού <i>Thymus vulgaris</i> στην άμυνα των φυταρίων τομάτας εναντίον μυκήτων και βακτηρίων στο θερμοκήπιο (<i>in vivo</i>).	138
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	141
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	151
5.1 ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	151
5.2 ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	170
5.3 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ	171

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη διερευνήθηκε η αντιμικροβιακή δράση των αιθερίων ελαίων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών εναντίον φυτοπαθογόνου μύκητα και βακτηρίων. Αξιολογήθηκαν τα αιθέρια έλαια των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Coridothymus capitatus*, *Origanum majorana* και *Satureja thymbra* ως προς την παρεμποδιστική τους δράση στην ανάπτυξη, *in vitro*, του μύκητα *Verticillium dahliae* και των βακτηρίων *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* και *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Όλα τα αιθέρια έλαια παρεμπόδισαν πλήρως την ανάπτυξη και του μύκητα και των βακτηρίων με τις μικρότερες συγκεντρώσεις να παρατηρούνται από τα έλαια των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* και *Coridothymus capitatus*. Επίσης, παρουσιάστηκε ευαισθησία στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών από τα ίδια έλαια, όπως παρουσιάζεται και από τις συγκεντρώσεις EC50.

Ακολούθως έγινε αξιολόγηση *in vivo* της επίδρασης των πλέον αποτελεσματικών αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* και *Coridothymus capitatus/Thymus vulgaris* στην αντιμετώπιση των ασθενειών της βακτηριακής στιγμάτωσης της τομάτας, της αδρομύκωσης-βερτισιλλίωσης της μελιτζάνας και του βακτηριακού έλκους της τομάτας, που προκαλούνται από το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, τον μύκητα *Verticillium dahliae* και το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* αντίστοιχα και στην εξέλιξη της ανάπτυξης των φυτών. Παρουσιάστηκε μείωση των συμπτωμάτων, έως μηδενική ανάπτυξή τους, με την αύξηση των δόσεων και των συγκεντρώσεων των αιθερίων ελαίων. Ταυτοποιήθηκε η παρουσία του μύκητα και των βακτηρίων στα φυτά καθώς επίσης ταυτοποιήθηκε με επιτυχία μοριακά η παρουσία του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* με την μέθοδο PCR στα φύλλα και το στέλεχος φυταρίων τομάτας στις 15 και 26 ημέρες μετά την μόλυνση με το βακτήριο. Επίσης διερευνήθηκε η επαγωγή της άμυνας των φυτών από την εφαρμογή του αιθερίου ελαίου του φυτού *Thymus vulgaris* στις συγκεντρώσεις 1000ppm, 2000ppm και 3000ppm σε φυτάρια τομάτας με την μέθοδο Real Time PCR, όπου παρουσιάστηκε υπερέκφραση του γονιδίου *Pin2* στις 12 ώρες σε όλες τις συγκεντρώσεις και του γονιδίου *PR-1a* στις 12 ώρες στα 1000ppm και 3000ppm και στις 24 ώρες σε όλες τις συγκεντρώσεις.

ABSTRACT

In the present study was investigated the antimicrobial activity of the essential oils of aromatic and medicinal plants against phytopathogenic fungi and bacteria. There were evaluated the essential oils of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Coridothymus capitatus*, *Origanum majorana* and *Satureja thymbra* as for their inhibitory effect in the growth *in vitro* of *Verticillium dahliae* and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. All essential oils completely inhibited the growth of the fungus and the bacteria with the lowest concentrations observed by *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* and *Coridothymus capitatus*. Also, sensitivity was observed by the growth of microorganisms from the same oils to EC50 concentrations.

It was also analyzed the *in vivo* effect of the most effective essential oils of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* and *Coridothymus capitatus* / *Thymus vulgaris* in controlling tomato bacterial speck, verticillium wilt of the eggplant and bacterial canker of tomato caused by the bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, the fungus *Verticillium dahliae* and the bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* respectively and in the progress of plant growth. There was a reduction in symptoms until no growth by increasing the doses and concentrations of essential oils. The presence of fungus and bacteria in plants was identified as well as the presence of the bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by the PCR method on the leaves and stem of the tomato seedlings at 15 and 26 days after infection with the bacterium. There was also investigated the induction of plant defense by applying the essential oil of *Thymus vulgaris* at the concentrations of 1000ppm, 2000ppm, and 3000ppm to tomato seedlings by the Real Time PCR method, where the overexpression of the *Pin2* gene was observed at 12 hours at all concentrations and *PR-1a* gene at 12 hours at 1000ppm and 3000ppm and at 24 hours at all concentrations.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ασθένεια υπέργειου μέρους

1.1.1 Βακτηριακή στιγμάτωση (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*)

Η ασθένεια εξαπλώνεται ταχύτατα και η καλλιέργεια της τομάτας που είναι και ο κύριος ξενιστής αυτού του παθογόνου προσβάλλεται και προκαλούνται σοβαρά προβλήματα, έως και ολική καταστροφή της παραγωγής, τόσο στις καλλιέργειες υπαίθρου όσο και στις θερμοκηπίου. Η βακτηριακή στιγμάτωση αποτελεί σημαντική

πηγή οικονομικής απώλειας στη βιομηχανία της τομάτας. [1] Οι βλάβες μπορεί να κάνουν τα φρούτα ακατάλληλα για αγορά.[1] Στις τομάτες που προορίζονται για μεταποίηση, οι ζημιές μπορεί να είναι αρκετά έντονες ώστε να προκαλούν σημαντική μείωση ή απώλεια της ποιότητας (Goode & Sasser, 1980). Στον αγρό, οι απώλειες απόδοσης κυμαίνονταν από 75% σε φυτά μολυσμένα σε πρώιμο στάδιο ανάπτυξης έως 5% σε φυτά που μολύνθηκαν αργότερα στην εποχή (Yunis *et al.*, 1980). Άλλοι ξενιστές του παθογόνου είναι τα φυτά *Arabidopsis thaliana*, *Brassica oleracea* var. *botrytis* (κουνουπίδι), *Brassica oleracea* var. *viridis* (λαχανίδα, άγριο λάχανο) [1], *Capsicum annuum* var. *annuum* L. (πιπεριά) και σε τεχνητές μολύνσεις η μελιτζάνα (*Solanum melongena*) (Tsitsigiannis *et al.*, 2008). Το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 είναι ένα στέλεχος αναφοράς για την διερεύνηση της αλληλεπίδρασης παθογόνου-φυτού λόγω της ευκολίας στο χειρισμό του γενετικά και της παθογένειάς του στην τομάτα και στα γένη *Arabidopsis* και *Brassica* spp. (Cuppels 1986, Elizabeth & Bender 2007, Whalen *et al.*, 1991). Κατατάσσεται στο φύλο Proteobacteria, την κλάση γ- Proteobacteria, την τάξη Pseudomonadales και την οικογένεια Pseudomonadaceae.[3] Το βακτήριο είναι αερόβιο, αρνητικό κατά Gram, ραβδοειδές, κινούμενο με την βοήθεια πολικών μαστιγίων. Παράγει κυανοπράσινη φθορίζουσα χρωστική. Επί θρεπτικού ζωμού κρέατος με 5% σακχαρόζη και άγαρ σχηματίζει αποικίες κυκλικές, κυρτές, ακτινωτής διατάξεως, γυαλιστερές και χρώματος υπόλευκου. Μπορεί να αναπτυχθεί άριστα σε θερμοκρασίες 20-25°C και το μεγαλύτερο εύρος θερμοκρασιών που επιβιώνει είναι 5-35°C. (Παναγόπουλος, 2000)

Η ταυτοποίηση του βακτηρίου μπορεί να επιβεβαιωθεί με κλασσικές και μοριακές διαγνωστικές μεθόδους (Schaad *et al.*, 2001, Zaccardelli *et al.*, 2005, Jansey, 2006, Fanelli *et al.*, 2007).

Συμπτώματα

Το φυτό μπορεί να παρουσιάσει συμπτώματα σε όλο το υπέργειο μέρος, όπως τα φύλλα, οι μίσχοι, οι ποδίσκοι, τα στελέχη, τα σέπαλα και οι καρποί. Το κοινό σύμπτωμα σε όλα τα σημεία του φυτού είναι οι κυκλικές κηλίδες με χρώμα από ανοικτό καστανό έως βαθύ καστανό ή μαύρο. Στα φύλλα είναι νεκρωτικές και έως γωνιώδεις και σχηματίζεται χλωρωτική ζώνη (άλω). Στους βλαστούς και τους μίσχους των σύνθετων φύλλων μπορούν να γίνουν και ελλειψοειδείς και να καταλήξουν σε νεκρωτικές περιοχές. Στους καρπούς είναι επίπεδες ή ελαφρά βυθισμένες και καταλήγουν να σχίζονται στο κέντρο και να έχουν σπογγώδη σύσταση. Άλλο ένα κύριο στοιχείο είναι

η συνένωση των κηλίδων και η δημιουργία μεγαλύτερων νεκρωτικών περιοχών στα φύλλα και στους βλαστούς όντας στην αρχή επιφανειακές με χρώμα βαθύ πράσινο ελαιώδες και διεισδύοντας αργότερα η προσβολή βαθύτερα στα αγγεία. Η προσβολή στο βλαστό μπορεί να γίνει περιμετρικά και η επάνω πλευρά του βλαστού να αποξηραθεί. Στα φύλλα το παθογόνο προσβάλλει περισσότερο την περιφέρεια και την κορυφή του ελάσματος και προκαλείται φυλλόπτωση. Όταν η υγρασία είναι υψηλή εξέρχεται βλενώδης βακτηριακή έκκριση από τους προσβεβλημένους ιστούς και οι κηλίδες γίνονται γυαλιστερές. (Παναγόπουλος, 2000)

Βιολογικός κύκλος-Επιδημιολογία-Συνθήκες ανάπτυξης

Το παθογόνο βακτήριο μεταδίδεται με τον σπόρο και τα υπολείμματα της καλλιέργειας που έχουν προσβληθεί. Μπορεί να επιβιώσει επιφυτικά και στην ριζόσφαιρα φυτών που δεν είναι ξενιστές του. Ο υγρός καιρός με υψηλή σχετική υγρασία πάνω από 80% και οι θερμοκρασίες 18-24°C ευνοούν την ασθένεια. Επίσης είναι εφικτό να αναπτυχθεί η ασθένεια και σε θερμοκρασίες 15-32°C. (Παναγόπουλος, 2000)

Το βακτήριο διαδίδεται επίσης με τις σταγόνες της βροχής και με τα εργαλεία που χρησιμοποιούνται για την αποκοπή των μοσχευμάτων. Έχει αναφερθεί ότι το *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* μπορεί να επιβιώσει σε υπολείμματα καλλιέργειας για έως και 30 εβδομάδες.[2]

Η μόλυνση του καρπού μπορεί να οδηγήσει στη μόλυνση των σπόρων της τομάτας και το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* μπορεί να επιβιώσει στους σπόρους, ειδικά μέσα στις κοιλότητες που υπάρχουν στην επιφάνεια του σπόρου (Devash *et al.*, 1980). Τα σπορόφυτα από μολυσμένους σπόρους είτε αναπτύσσουν εμφανή συμπτώματα ασθένειας είτε παραμένουν χωρίς συμπτώματα. Στην τελευταία περίπτωση, τα ασυμπτωματικά φυτά που αναπτύσσονται υπό υψηλή σχετική υγρασία περιέχουν μαζικούς πληθυσμούς του παθογόνου, εξυπηρετώντας έτσι ως δεξαμενή για μελλοντικές μολύνσεις (McCarter *et al.*, 1983).

Η κίτρινη χλωρωτική άλως που περιβάλλονται οι κηλίδες οφείλεται στην παραγωγή της φυτοτοξίνης κορονατίνης (COR) (Bender *et al.*, 1987,1999). Δείχτηκε ότι τα συστατικά της κορονατίνης συμβάλλουν στην ανάπτυξη συμπτωμάτων στο φύλλωμα τομάτας (Uppalapati *et al.*, 2007). Η κορονατίνη παίζει αρκετά σημαντικό ρόλο κατά

τη διάρκεια της παθογένεσης του *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. (Uppalapati *et al.*, 2008)

Αντιμετώπιση

Επειδή το παθογόνο είναι σπορομεταδιδόμενο είναι σημαντικό ο σπόρος που θα χρησιμοποιηθεί να είναι υγιής. Κι αν ο σπόρος είναι ύποπτος υπάρχουν διάφοροι τρόποι για να απολυμανθεί (με θερμό νερό ή χημικοθερμικά). Επίσης είναι σημαντικό να εντοπίζονται τα φυτά που είναι ασθενή σε αρχικά στάδια και αν ο αριθμός τους είναι μικρός να εκριζώνονται και να καταστρέφονται με φωτιά. Θα πρέπει να καταστραφούν τα υπολείμματα της καλλιέργειας ώστε να μην διαιωνίζεται η ασθένεια. Να μειώνεται η υπερβολική υγρασία με κάθε μέσο ιδίως στα θερμοκήπια. Τα φυτά μπορούν να ψεκάζονται ανά εβδομάδα με βορδιγάλιο πολτό κατά 1% ή με οξυγλωριούχο χαλκό 0,5% ή με υδροξείδιο του χαλκού 0,5%. Η εφαρμογή με ψεκάσμο του χαλκού συν το mancozeb μπορεί να καταστείλει την ανάπτυξη της ασθένειας και την εξάπλωση.[2] Εκτός του χαλκού τα Actigard, Agri-mycin 17, mancozeb, Serenade Max και Tanos μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διαχείριση αυτής της ασθένειας.[2] Σε κάποιες περιοχές έχουν βρεθεί ανθεκτικά στελέχη του βακτηρίου στον χαλκό. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν ανθεκτικές ποικιλίες. Επίσης έχουν δημιουργηθεί γενετικώς τροποποιημένα φυτά τομάτας της ποικιλίας Rio Grande με υψηλή ανθεκτικότητα στο βακτήριο. Τέλος μπορεί να πραγματοποιηθεί και βιολογική αντιμετώπιση με ένα επιφυτικό, ανταγωνιστικό, μη παθογόνο βακτήριο. Είναι ανθεκτικό στο χαλκό κι έτσι μπορεί να συνδυαστεί με χαλκούχα στην εφαρμογή του. (Cooksey, 1988) (Παναγόπουλος, 2000)

1.2 Ασθένειες εδαφογενών παθογόνων

1.2.1 Βερτισιλλίωση (*Verticillium dahliae*).

Η ασθένεια επηρεάζει πολλές σημαντικές καλλιέργειες σε όλο τον κόσμο και προκαλεί οικονομικά σημαντικές απώλειες σε πολλές χώρες.[6] Η ιστορία δείχνει ότι ο μύκητας που την προκαλεί έχει τη δυνατότητα να αναπτύξει νέα στελέχη που μπορούν να ξεπεράσουν την αντοχή στις εμπορικές καλλιέργειες, ιδιαίτερα στο βαμβάκι.[6] Έχει επίσης δείξει ότι το παθογόνο μπορεί να μεταφερθεί σε νέες περιοχές και να προκαλέσει σοβαρές απώλειες (Nachmias & Krikun, 1985). Έτσι, για πολλές ευπαθείς καλλιέργειες, η επιλογή για αντοχή στον μαρασμό παραμένει ένα σημαντικό κριτήριο στα προγράμματα γενετικής βελτίωσης.[6] Οι ξενιστές αυτής της ασθένειας είναι πολλοί, από καλλωπιστικά, κηπευτικά, δένδρα έως και φυτά μεγάλης καλλιέργειας όπως είναι το βαμβάκι και η πατάτα. Το παθογόνο που προκαλεί αδρομύκωση είναι ο αδηλομύκητας (Deuteromycotina) *Verticillium dahliae* που ανήκει στην κλάση Hyphomycetes. Σχηματίζει μικροσκληρώτια χρώματος καστανού μέχρι μαύρου (σε διαστάσεις 80-120x15-50μm). Το μυκήλιο είναι πολυκύτταρο αρχικά υαλώδες και αργότερα καστανό με διάμετρο 2-4,5μm. Δημιουργεί ελεύθερους, ανορθωμένους, υαλώδεις, πολυκύτταρους κονιδιοφόρους που έχουν χαρακτηριστική διακλάδωση κατά σπονδύλους. Στα εγκάρσια χωρίσματα του κονιδιοφόρου σχηματίζονται 3-4 πλάγια, μονοκύτταρα φιαλίδια, που δημιουργούν τα φυαλιδοσπόρια. Στην κορυφή κάθε φυαλιδίου παράγονται διαδοχικά πολλά κονίδια που συγκρατούνται μεταξύ τους με μια κολλώδη ουσία και έτσι σχηματίζονται μικρές κεφαλές κονιδίων. Τα κονίδια αυτά ελευθερώνονται με το νερό. (Παναγόπουλος, 2007)

Ο μύκητας μπορεί να ταυτοποιηθεί με κλασσικές και μοριακές διαγνωστικές μεθόδους (Harris *et al.*, 1993, Termorshuizen, 1998, EPPO, 2007, Keykhasaber *et al.*, 2017).

Συμπτώματα

Τα προσβεβλημένα φυτά εμφανίζουν το σύνδρομο του βραδέος μαρασμού ή της ημιπληγίας. Στα πρώτα στάδια προκύπτει μαρανση μεμονωμένων φυλλιδίων ή φύλλων, χλώρωση μεταξύ των νευρώσεων και στη συνέχεια νέκρωση των χλωρωτικών ιστών, μαρασμός και πτώση των φύλλων. Σιγά σιγά τα συμπτώματα εκδηλώνονται και στα ανώτερα φύλλα, τα φυτά γίνονται καχεκτικά και μπορεί να ξηρανθούν. Υπάρχει η περίπτωση εμφάνισης νανισμού. (Παναγόπουλος, 2000)

Στις αδρομυκώσεις εμφανίζεται ως χαρακτηριστικό σύμπτωμα ένας καστανός ή βαθύς καστανός μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου που εμφανίζεται σε επιμήκη ή εγκάρσια τομή του στελέχους. Ο μεταχρωματισμός είναι εμφανής στις ρίζες, αλλά

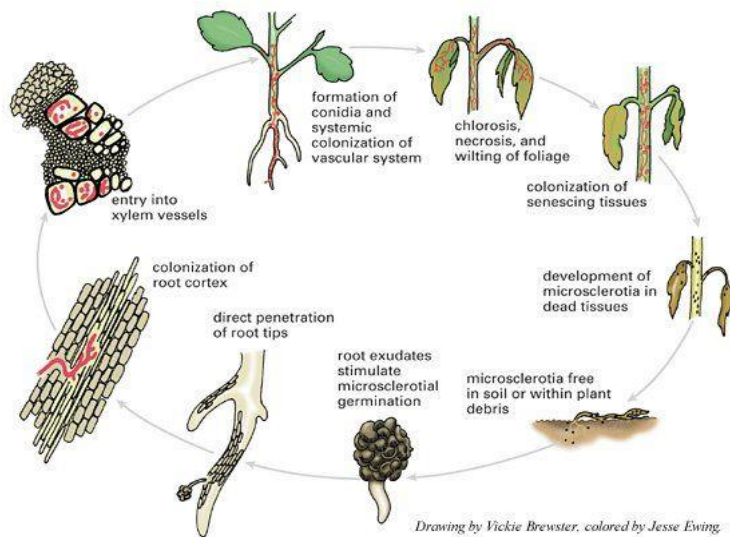
μπορεί να επεκτείνεται και σ' όλο το μήκος των στελεχών ακόμη και μέχρι τα αγγεία των καρπών της τομάτας και των κονδύλων της πατάτας. Υπάρχει η περίπτωση να εμφανίζεται μόνο στη μια πλευρά του στελέχους ή σε όλη την έκταση των αγγείων. Σε μικροσκοπική εξέταση εγκάρσιων τομών του στελέχους από προσβεβλημένα φυτά παρατηρούνται άφθονες μυκηλιακές υφές μέσα στα αγγεία του ξύλου. (Παναγόπουλος, 2000) Μικρές, μαύρες, δομές που στηρίζονται με παχιά τοιχώματα, που ονομάζονται μικροσκληρώτια, σχηματίζονται σε νεκρό ή ζωντανό ιστό, και είναι συχνά ορατά με έναν φακό χειρός. Ακόμα κι αν τα μικροσκληρώτια σχηματίζονται επί γηρασμένων ιστών στους περισσότερους ξενιστές, είναι εύκολα εμφανή ακόμα και σε ορισμένους ξενιστές ζώντων ιστών. [7]

Βιολογικός κύκλος

Ο μύκητας μπορεί να διαχειμάζει ως μυκήλιο σε πολυετείς ξενιστές, φυτικά υπολείμματα, και αγενές φυτικό πολλαπλασιαστικό υλικό. Έπειτα, μπορεί να επιβιώσει για πολλά χρόνια (10 ετών ή περισσότερο) στο έδαφος με τη μορφή μικροσκοπικών, μαύρων, μορφής σπόρου δομών που ονομάζονται μικροσκληρώτια. Μικροσκληρώτια μπορεί ακόμη να σχηματιστούν και στις λεπτές ρίζες πολλών ειδών ανθεκτικών φυτών χωρίς να προκαλούν συμπτώματα. Τα μικροσκληρώτια διεγείρονται να βλαστήσουν από την ριζικές εκκρίσεις ξενιστών και μη φυτών ξενιστών. Ο μύκητας εισχωρεί σε μία ρίζα ενός ευπαθούς φυτού στην περιοχή που επιμηκύνεται και ο φλοιός αποικίζεται. Από το φλοιό, ο υφές διεισδύουν εντός της ενδοδερμίδας και εισβάλλουν στα αγγεία του ξύλου όπου σχηματίζονται κονίδια. Ο αγγειακός αποικισμός συμβαίνει καθώς τα κονίδια συντάσσονται εντός του φυτού μαζί με το νερό. Καθώς το μολυσμένο φυτό γηράσκει, ο μύκητας διακλαδώνεται σε όλο τον φλοιώδη ιστό και παράγει τότε μικροσκληρώτια, τα οποία απελευθερώνονται στο έδαφος με την αποσύνθεση του φυτικού υλικού. [9]

Η διάδοση του παθογόνου σε μεγάλη απόσταση συμβαίνει μέσω μολυσμένων σπόρων- κονδύλων, και του μητρικού υλικού. Σε γυμνή ρίζα ή αγενή πολλαπλασιασμό καλλωπιστικών φυτών, όπως γίνεται σε ένα φυτώριο μπορεί να εξαπλωθεί ο μύκητας με την πώληση μη-συμπτωματικού, αλλά μολυσμένου, μητρικού υλικού. [9]

Μόλις εγκατασταθεί σε ένα πεδίο ή σε κάποιο σημείο, η εξάπλωση του παθογόνου λαμβάνει χώρα κυρίως με την καλλιέργεια και την κίνηση του εδάφους από τον άνεμο ή το νερό. Η πυκνότητα του μολύσματος και η βαρύτητα της νόσου τείνουν να αυξάνονται από χρόνο σε χρόνο, όταν φυτεύονται οι ευαίσθητες καλλιέργειες. [9]



Εικόνα 1.2.1: Ο βιολογικός κύκλος του παθογόνου μύκητα *Verticillium dahliae* [8].

Επιδημιολογία–Εξάπλωση–Συνθήκες ανάπτυξης

Είναι παθογόνο θερμότερων περιοχών, διότι ευνοείται από θερμοκρασίες γύρω στους 21-27°C. Οι υψηλότερες θερμοκρασίες πάνω από 28°C μειώνουν την ανάπτυξη του μύκητα.

Το παθογόνο έχει ευρύ κύκλο ξενιστών και δεν παρουσιάζει συνήθως παθογόνο εξειδίκευση. Δηλαδή τα μολύσματα από ένα φυτό μπορούν να προσβάλλουν και πολλές άλλες καλλιέργειες. Υπάρχουν όμως και απομονώσεις του μύκητα με παθογόνο εξειδίκευση και φυλές με διαφορετική παθογόνο δύναμη.

Το παθογόνο διατηρείται στο έδαφος και επιβιώνει για πάρα πολλά χρόνια (μέχρι 8-14 χρόνια) ακόμη και χωρίς την παρουσία ευπαθών ξενιστών. Επιβιώνει κυρίως με τα μικροσκληρώτια αλλά και ως μυκήλιο και κονίδια στα προσβεβλημένα υπολείμματα της καλλιέργειας (κυρίως των ετήσιων φυτών). Το παθογόνο της ασθένειας μπορεί να διαιωνίζεται και το μόλυσμα να αυξάνεται στο έδαφος με τα ζιζάνια που είναι ξενιστές της ασθένειας. Κάποια απ' αυτά κατά την μόλυνση εμφανίζουν συμπτώματα και κάποια φέρουν τον μύκητα στα αγγεία τους. Έτσι, όταν ενσωματωθούν στο έδαφος θα γεμίσει με το μόλυσμα που περιέχουν. Στη χώρα μας υπάρχουν πολλά κοινά στους ελληνικούς αγρούς είδη ζιζανίων που συμβάλλουν σημαντικά στην εμφάνιση και σοβαρότητα της ασθένειας σε πολλές πολυετείς καλλιέργειες.

Η διασπορά του μύκητα σε κοντινές αποστάσεις γίνεται με το νερό, τα υπολείμματα της καλλιέργειας, τα ζιζάνια και το έδαφος, δηλαδή με τις καλλιεργητικές εργασίες που πραγματοποιούνται με τα μηχανήματα. Το νερό του ποτίσματος αποτελεί πολύ σοβαρό

παράγοντα διασποράς των μολυσμάτων του μύκητα σε αμόλυντα δενδροκομεία, όταν έχει περάσει από ασθενή λαχανοκομικά φυτά σε μολυσμένο έδαφος.

Σε μακρινές αποστάσεις η μεταφορά γίνεται με το μολυσμένο πολλαπλασιαστικό υλικό (φυτάρια ετήσιων φυτών, μοσχεύματα, εμβόλια, κόνδυλοι πατάτας, σπόρος).

Το παθογόνο εισάγεται απευθείας από τις ρίζες και είναι πιο εύκολη η είσοδος του όταν υπάρχουν πληγές από νηματώδεις ή έντομα.

Η ανάπτυξη και ένταση της ασθένειας εξαρτάται από την επιβίωση του μολύσματος, την φυλή του παθογόνου, την ποικιλία του φυτού, το έδαφος, την θερμοκρασία του εδάφους και του αέρα, τα ζιζάνια, τις βροχοπτώσεις, τις αρδεύσεις, τη συγκαλλιέργεια και τις καλλιεργητικές επεμβάσεις. (Παναγόπουλος, 2007)

Αντιμετώπιση

Για την αντιμετώπιση τα μέτρα που λαμβάνονται είναι κυρίως καλλιεργητικά και προληπτικά. Ξεκινώντας το βασικότερο είναι η χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού σε αγρό αμόλυντο και επιλογή ανθεκτικών ποικιλιών, υποκειμένων και υβριδίων και ηλιοαπολύμανση, εμβολιασμός σε ανθεκτικά υποκείμενα. Εάν ο παραγωγός φυτεύει για πρώτη φορά πρέπει να γνωρίζει ποια ήταν η προηγούμενη καλλιέργεια για να ξέρει εάν φυτεύτηκαν για μεγάλο χρονικό διάστημα φυτά ευπαθή στην ασθένεια. Είναι σωστό να γίνεται απολύμανση, εάν επιβάλλεται να χρησιμοποιηθούν εδάφη που είναι μολυσμένα, καλύτερη μέθοδος αποδεικνύεται όμως η ηλιοαπολύμανση με κάλυψη του εδάφους με πλαστικά φύλλα πολυαιθυλενίου κατά τους καλοκαιρινούς μήνες. (Παναγόπουλος, 2007)

Να μην εφαρμόζεται συγκαλλιέργεια με ευπαθή φυτά, τα καλλιεργητικά εργαλεία να εφαρμόζονται με προσοχή για αποφυγή πληγών στις ρίζες και τους λαιμούς των φυτών. Να προτιμάται η στάγδην άρδευση, γιατί με τα αυλάκια μεταδίδεται πιο εύκολα το παθογόνο. Πρέπει να καταπολεμώνται τα ζιζάνια. Τα κλαδιά που εμφανίζουν συμπτώματα πρέπει να αφαιρούνται σε μια απόσταση από το ξερό σημείο και να καίγονται. Εκρίζωση των αποξηραμένων φυτών ή δένδρων με τη ρίζα και απολύμανση του εδάφους. Υπάρχουν πλέον και μικροοργανισμοί που μπορούν να ανταγωνιστούν το παθογόνο, δηλαδή μπορεί να εφαρμοστεί βιολογική αντιμετώπιση. (Παναγόπουλος, 2007)

1.2.2 Βακτηριακό έλκος της τομάτας (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)

Η ασθένεια προκαλεί σοβαρές απώλειες στις καλλιέργειες τομάτας τόσο στο θερμοκήπιο όσο και στον αγρό, είτε με την μάρανση των νεαρών φυτών, είτε με τη μείωση των εμπορεύσιμων αποδόσεων.[4] Η μείωση της απόδοσης της παραγωγής μπορεί να σχετίζεται με την άμεση απώλεια φυτών, τον μειωμένο αριθμό καρπών ή το μέγεθος των καρπών.[4] Σε πειράματα αγρού οι απώλειες έχουν φτάσει έως και το 46%.[4] Ξενιστές της ασθένειας είναι τόσο οι υπό κάλυψη όσο και οι υπαίθριες καλλιέργειες τομάτας, αλλά και πολλά είδη των γενών *Solanum*. Το βακτήριο που προκαλεί την ασθένεια είναι το *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Ανοίκει στο φύλο Actinobacteria, στην υποκλάση Actinobacteridae, στην τάξη Actinomycetales και στην οικογένεια Microbacteriaceae.[5] Είναι ένα Gram θετικό βακτήριο με σχήμα κορύνης, χωρίς αυτόνομη κίνηση, με βραδεία ανάπτυξη και οι αποικίες που σχηματίζει είναι ανοικτού κίτρινου χρωματισμού. Αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες 1-35°C με άριστο 24-28°C. (Παναγόπουλος, 2000)

Η ταυτοποίηση του βακτηρίου πραγματοποιείται με κλασσικές και μοριακές διαγνωστικές μεθόδους (Schaad *et al.*, 2001, EPPO, 2016)

Συμπτώματα

Αρχίζοντας από το σπορείο τα φυτάρια εμφανίζουν μαρασμό και αποξήρανση, αλλά εάν επιζήσουν θα παρουσιάζουν νανισμό σε έντονο βαθμό με τα συμπτώματα να εκδηλώνονται στα μεταφυτευμένα φυτά. Έπειτα στα μεγαλύτερα φυτά παρουσιάζεται το σύνδρομο του βραδέως μαρασμού με τη βαθμιαία μάρανση των κατώτερων φύλλων. Ο μαρασμός ξεκινά μονόπλευρα (ημιπληγία), με την περιφέρεια του ελάσματος να ξηραίνεται και να συστρέφεται προς τα πάνω. (Παναγόπουλος, 2000)

Τα αγγεία του ξύλου μεταχρωματίζονται κίτρινα έως καστανά σε όλο το μήκος των βλαστών και των μίσχων φύλλων που έχουν προσβληθεί. Η μορφή που δίνει ο καστανός μεταχρωματισμός στη βάση των μίσχων των φύλλων και στους κόμβους των στελεχών στα αγγεία των φυτών είναι ημισελινοειδής ή πετάλου ίππου. Επέρχεται η μαλακή σήψη των ιστών που έχουν προσβληθεί, η καταστροφή της αγγειακής μοίρας

και η αποκόλληση του κεντρικού κυλίνδρου από την εντεριώνη. Έπειτα καταστρέφεται ο φλοιός των βλαστών και σχίζεται η επιδερμίδα που έχει ως συνέπεια τον σχηματισμό επιμήκων ανοικτών ελκών επιφανειακά του στελέχους που αποτελούν χαρακτηριστικό της ασθένειας. (Παναγόπουλος, 2000)

Εκτός των διασυστηματικών υπάρχουν και οι τοπικές μολύνσεις που γίνονται όταν οι συνθήκες είναι υγρές και βρέχει. Το παθογόνο μπαίνει από διάφορα σημεία εισόδου όπως είναι τα στομάτια, τα φακίδια, τα τριχίδια και δημιουργεί κηλιδώσεις στους παρεγχυματικούς ιστούς. Οι κηλίδες σχηματίζονται στους μίσχους, στα φύλλα, στα στελέχη, στους κάλυκες των ανθέων και είναι υπερυψωμένες, φλυκταινώδεις, κυκλικές με χρώμα ανοικτό καστανό ή αχρωδές, ανώμαλη επιφάνεια και φελλώδη υφή. Στους καρπούς οι κηλίδες είναι κυκλικές, με χρώμα υπόλευκο και μετά καστανό και γύρω τους άλω υπόλευκη, σχίζονται στο κέντρο οι κηλίδες και αποκτούν τη μορφή ‘ματιού πτηνού’. Το βακτήριο στους καρπούς φθάνει και διασυστηματικά, κάνοντάς τους μικρούς παραμορφωμένους και με αλλοιωμένη απόχρωση. (Παναγόπουλος, 2000)

Βιολογικός κύκλος-Επιδημιολογία-Συνθήκες ανάπτυξης

Το παθογόνο εισέρχεται στο φυτό από τις πληγές των ριζών και του λαιμού που προκαλούνται από έντομα, νηματώδεις, από τα καλλιεργητικά εργαλεία και κατά τη μεταφύτευση. Εγκαθίσταται στο ξύλο και εν συνεχεία στο φλοιό και στην εντεριώνη και προκαλεί την διασυστηματική προσβολή. (Παναγόπουλος, 2000)

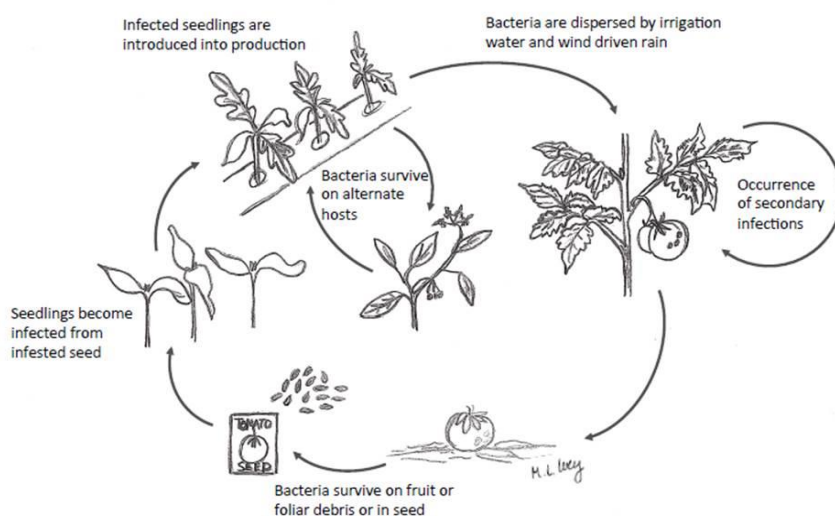
Μεταδίδεται στον αγρό με τα μαχαιρίδια ή ψαλίδια κλαδεύματος δημιουργώντας τομές κλαδεύματος. Η υγρασία από τη βροχή μαζί με τον άνεμο ή ποτίζοντας τα φυτά με τεχνητή βροχή ευνοείται η είσοδος στο φυτό από φυσικά ανοίγματα, το τρίχωμα στα φύλλα και πληγές στο υπέργειο μέρος ή τομές για συγκομιδή ή αποφύλλωση για την δημιουργία κηλίδων και σπάνια την μόλυνση διασυστηματικά. Τα καλλιεργητικά εργαλεία και το νερό ποτίσματος διασπείρουν το παθογόνο στον αγρό. (Παναγόπουλος, 2000)

Η διασπορά σε μεγάλη απόσταση γίνεται με τον σπόρο, όπου το παθογόνο επιβιώνει και μεταδίδεται σε αμόλυντες περιοχές. Μπορεί επίσης να επιβιώσει στα υπολείμματα της καλλιέργειας, στα πλαίσια και σε άλλα μέρη στο εσωτερικό του θερμοκηπίου, στα εργαλεία, στα υλικά που προσδένονται και υποστύλωνονται τα φυτά και στα ζιζάνια ειδικά του γένους *Solanum*. Εάν υπάρχει μολυσμένος σπόρος μπορεί να προκαλέσει

επιδημική εξάπλωση της ασθένειας στο χωράφι, όπως και τα μολυσμένα φυτάρια μπορούν να μεταδώσουν την ασθένεια. (Παναγόπουλος, 2000)

Ανάλογα με τις συνθήκες αναπτύσσονται και τα συμπτώματα, δηλαδή συνθήκες που ευνοούν τα συμπτώματα να αναπτύσσονται με γοργό ρυθμό, αυξάνουν και τη σοβαρότητά τους. Τα διασυστηματικά συμπτώματα δεν εμφανίζονται άμεσα, αλλά το βακτήριο επωάζεται από μια βδομάδα έως και τρεις μήνες περίπου (Chang *et al.*, 1992). Έχει διαπιστωθεί επίσης ότι γύρω στους 25°C, εάν οι ποικιλίες είναι μετρίως ανθεκτικές και οι συγκεντρώσεις του μολύσματος μικρότερες, ο χρόνος για να επωαστεί η ασθένεια είναι μεγαλύτερος και τα συμπτώματα αναπτύσσονται ήπια σε φυτά πιο μεγάλα σε ηλικία (Chang *et al.*, 1992).

Οι θερμοκρασίες 24-28°C ευνοούν την ασθένεια και γίνεται σοβαρότερη σε ελαφρότερα αμμώδη εδάφη, όταν ευνοείται η ανάπτυξη σαρκώδους βλάστησης και με ελλιπή φωτισμό. (Παναγόπουλος, 2000)



Εικόνα 1.2.2: Ο βιολογικός κύκλος του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* [10].

Αντιμετώπιση

Το σημαντικότερο μέτρο είναι η χρησιμοποίηση υγιούς σπόρου, να προέρχεται από υγιείς καλλιέργειες. Σπόρος που θα χρησιμοποιηθεί και είναι ύποπτος πρέπει να απολυμαίνεται με φυσικά μέσα, εμβαπτίζοντας τον σε νερό θερμοκρασίας 52° C για 20 λεπτά ή σε 56° C για 30 λεπτά και με χημικά μέσα. Επίσης, είναι καλό για το έδαφος να εφαρμόζεται αμειψισπορά για 2 έως 3 έτη, αν όχι τότε συστήνεται η

ηλιοαπολύμανση του εδάφους ως ένα πολύ αποτελεσματικό μέσον για τον καθαρισμό του εδάφους από το παθογόνο. (Παναγόπουλος, 2000)

Τα φυτά που είναι προσβεβλημένα να εντοπίζονται έγκαιρα, να αφαιρούνται μαζί με το ριζικό τους σύστημα και να καταστρέφονται με φωτιά. Τα υπολείμματα των φυτών να καταστρέφονται με φωτιά μαζί με τη ρίζα στο τέλος της καλλιέργειας. Να καταπολεμώνται και τα σολανώδη ζιζάνια. Τα εργαλεία κλαδεύματος όταν χρησιμοποιούνται να απολυμαίνονται συνέχεια ή να προτιμάται η αφαίρεση των βλαστών με το χέρι και μετά το κλάδεμα να γίνεται ψεκασμός με κάποιο χαλκούχο σκεύασμα (βορδιγάλειο πολτό, οξυχλωριούχο χαλκό, υδροξείδιο του χαλκού) για προστασία από μολύνσεις. Να γίνεται προσεκτικό πότισμα ώστε να μην διέρχεται το νερό από μολυσμένα χωράφια. Τέλος, είναι καλό να χρησιμοποιούνται ανθεκτικές ποικιλίες. (Παναγόπουλος, 2000)

1.3 Αιθέρια έλαια

Σύμφωνα με την 8^η έκδοση του European Pharmacopoeia τα αιθέρια έλαια είναι εύοσμα προϊόντα, συνήθως με σύνθετη σύνθεση, που λαμβάνονται από βοτανικά καθορισμένη φυτική πρώτη ύλη με απόσταξη με ατμό, ξηρή απόσταξη ή κατάλληλη μηχανική διεργασία χωρίς θέρμανση. Συνήθως διαχωρίζονται από την υδατική φάση με μια φυσική διαδικασία που δεν επηρεάζει σημαντικά τη σύνθεσή τους. Τα αιθέρια έλαια μπορούν να υποβληθούν σε κατάλληλη μεταγενέστερη επεξεργασία. Η φυτική πρώτη ύλη μπορεί να είναι φρέσκια, μαρασμένη, αποξηραμένη, ολόκληρη, σπασμένη ή αλεσμένη.

Τα αιθέρια έλαια είναι ελαιώδη αρωματικά υγρά εκχυλισμένα από αρωματικά φυτικά υλικά. Θα μπορούσαν να βιοσυντεθούν σε διάφορα φυτικά όργανα ως δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως, άνθη, φυτά, μπουμπούκια, φύλλα, φρούτα, βλαστοί, φλοιός, ξύσμα, σπόροι, ξύλο, ρίζωμα και ρίζες. Θα μπορούσαν να εκχυλιστούν με διαφορετικές μεθόδους. Λόγω της υδρόφοβης φύσης τους και της πυκνότητάς τους συχνά χαμηλότερης από εκείνη του ύδατος, είναι γενικά λιπόφιλα, διαλυτά σε οργανικούς διαλύτες, μη αναμίξιμα με νερό. Θα μπορούσαν να διαχωριστούν από την υδατική

φάση με απόχυση. Ωστόσο, οι αποδόσεις εκχύλισης τους ποικίλουν ανάλογα με τα είδη και τα όργανα. Παραμένουν, ωστόσο, πολύ χαμηλά (περίπου 1%), γεγονός που τις καθιστά εξαιρετικά πολύτιμες σπάνιες ουσίες. (El Asbahani *et al.*, 2015)

Μεταξύ των φυτικών ειδών, μόνο 10% περιέχουν αιθέρια έλαια και ονομάζονται αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά (πάνω από 17.000 φυτικά είδη, διανεμημένα σε όλο τον κόσμο (Svoboda & Greenaway, 2003). Τα είδη στα οποία θα μπορούσαν να βρεθούν είναι ταξινομημένα σε ένα μικρό αριθμό οικογενειών: Lamiaceae, Lauraceae, Asteraceae, Rutaceae, Myrtaceae, Poaceae, Cupressaceae και Piperaceae (Bruneton, 1999). Περίπου 3000 αιθέρια έλαια έχουν παραχθεί χρησιμοποιώντας τουλάχιστον 2000 είδη φυτών, από τα οποία τα 300 είναι σημαντικά από εμπορική άποψη. Οι 40.000-60.000 τόνοι ετησίως με εκτιμώμενη αγοραία αξία 700 εκατομμυρίων δολαρίων, δείχνουν ότι η παραγωγή και η κατανάλωση αιθέριων ελαίων αυξάνονται σε όλο τον κόσμο (Djilani & Dicko, 2012).

Πολλοί παράγοντες, όπως η γενετική ποικιλότητα, ο οικοτύπος ή η ποικιλία των φυτών, η θρέψη των φυτών, η εφαρμογή των λιπασμάτων, η γεωγραφική θέση των φυτών, το περιβάλλον κλίμα, οι εποχιακές διακυμάνσεις, η καταπόνηση κατά την ανάπτυξη ή την ωρίμανση, καθώς και η ξήρανση και αποθήκευση μετά τη συγκομιδή, επηρεάζουν τη χημεία των αιθέριων ελαίων. Επιπλέον, ο τύπος του φυτικού υλικού που χρησιμοποιείται και η μέθοδος εκχύλισης προσδιορίζουν την απόδοση και τη σύνθεση (συστατικά) ενός αιθερίου ελαίου, και έτσι καθορίζουν τις χαρακτηριστικές βιολογικές ιδιότητες του (Croteau, 1986, Alvarez-Castellanos & Pascual-Villalobos, 2003, Hussain *et al.*, 2008). Πολλές φορές είναι δύσκολο να διαφοροποιηθεί και να αναλυθεί η επίδραση αυτών των παραγόντων επειδή αλληλεπιδρούν μεταξύ τους (Terblanche & Kornelius, 2000).

Τα αιθέρια έλαια είναι σύνθετα μίγματα χαμηλού μοριακού βάρους (συνήθως λιγότερο από 500 dalton) (Nakatsu *et al.*, 2000). Μπορεί να συγκροτούν 20-100 διαφορετικούς δευτερογενείς μεταβολίτες φυτών που ανήκουν σε μια ποικιλία χημικών κλάσεων (Carson & Hammer, 2011). Τα τερπενοειδή και τα φαινυλοπροπανοειδή αποτελούν τα κυριότερα συστατικά των αιθέριων ελαίων. Επιπλέον, υπάρχουν επίσης λίγα αρωματικά και αλειφατικά συστατικά. Τα μονοτερπένια, τα σεσκιτερπένια και τα οξυγονούχα παράγωγα αυτών των δύο είναι η μεγαλύτερη ομάδα χημικών ουσιών σε αιθέρια έλαια (Carson *et al.*, 2006). Τις περισσότερες φορές οι βιοδραστικές ιδιότητες ενός συγκεκριμένου αιθερίου ελαίου καθορίζονται από ένα ή δύο από τα κύρια συστατικά του (Bakkali *et al.*, 2008). Ωστόσο, μερικές φορές η συνολική

δραστηριότητα δεν μπορεί να αποδοθεί σε κανένα από τα κύρια συστατικά και η παρουσία ενός συνδυασμού μορίων τροποποιεί τη δραστηριότητα για να ασκήσει σημαντική επίδραση. Παραδείγματος χάριν, αναφέρθηκε ότι η ανασταλτική δραστηριότητα του ελαίου δεντρολίβανου ενάντια στις προνύμφες των εντόμων (προνύμφες λεπιδόπτερον) είναι συνέπεια συνεργιστικών αποτελεσμάτων αρκετών χημικών συστατικών, ενώ καμία μεμονωμένη ένωση δεν δείχνει τη δραστηριότητα (Isman *et al.*, 2008).

1.3.1 Τρόπος δράσης των αιθέριων ελαίων έναντι των βακτηρίων και των μυκήτων.

Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των αιθέριων ελαίων εξαρτώνται κυρίως από τα χημικά τους συστατικά και την ποσότητα των κυριότερων μεμονωμένων ενώσεων (Nazzaro *et al.*, 2013). Αυτές οι χημικές ενώσεις εκκρίνονται μέσω μίας σειράς μοριακών αλληλεπιδράσεων υπό συγκεκριμένες συνθήκες βιοτικής / αβιοτικής καταπόνησης (Nazzaro *et al.*, 2013, Holley & Patel, 2005). Κάθε ένωση μπορεί να παρουσιάζει διαφορετικό μηχανισμό δράσης κατά των μικροβίων. Γενικά, ο μηχανισμός αντιβακτηριακής δράσης προκαλείται από μια σειρά βιοχημικών αντιδράσεων στο βακτηριακό κύτταρο, οι οποίες εξαρτώνται από τον τύπο των χημικών συστατικών που υπάρχουν στο αιθέριο έλαιο (Nazzaro *et al.*, 2013, Burt, 2004). Επιπλέον, η αντιβακτηριακή δράση των αιθέριων ελαίων διαφέρει επίσης λόγω της διαφορετικής αρχιτεκτονικής των βακτηρίων, όπως τα Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτήρια, τα οποία διαφέρουν στις συνθέσεις της κυτταρικής τους μεμβράνης (Hammer & Carson, 2011, Raut & Karuppayil, 2014).

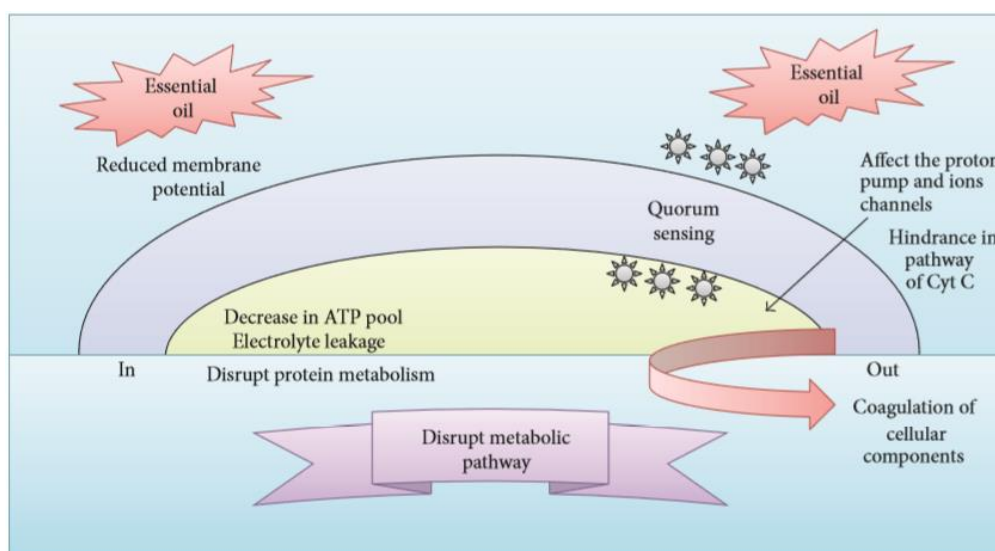
Διάφοροι μηχανισμοί αντιβακτηριδιακής δράσης των αιθέριων ελαίων έχουν προταθεί. Τα αιθέρια έλαια αποσταθεροποιούν κυρίως την κυτταρική αρχιτεκτονική, οδηγώντας στην διάσπαση της ακεραιότητας της μεμβράνης και της αυξημένης διαπερατότητας, η οποία διαταράσσει πολλές κυτταρικές δραστηριότητες, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής ενέργειας (συζευγμένη με μεμβράνη), της μεμβρανικής μεταφοράς και άλλων μεταβολικών ρυθμιστικών λειτουργιών. Η διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης από τα αιθέρια έλαια μπορεί να βοηθήσει διάφορες ζωτικές διαδικασίες όπως είναι οι διαδικασίες μετατροπής της ενέργειας, η επεξεργασία θρεπτικών ουσιών, η σύνθεση δομικών μακρομορίων και η δημιουργία

των ρυθμιστών ανάπτυξης (Oussalah *et al.*, 2006) Τα αιθέρια έλαια μπορούν να επηρεάσουν τόσο το εξωτερικό περίβλημα του κυττάρου όσο και το κυτταρόπλασμα (Nazzaro *et al.*, 2013, Raut & Karuppayil, 2014). Λόγω της λιπόφιλης φύσης τους, τα αιθέρια έλαια διαπερνούν εύκολα μέσω των βακτηριακών κυτταρικών μεμβρανών. Τα αιθέρια έλαια διαφόρων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών αναφέρθηκαν ότι προκαλούν αυξημένη διαπερατότητα των βακτηριακών κυτταρικών μεμβρανών που οδηγεί στη διαρροή κυτταρικών συστατικών και την απώλεια ιόντων (Oussalah *et al.*, 2006, Raut & Karuppayil, 2014, Saad *et al.*, 2013). Η αντιβακτηριδιακή δράση των αιθερίων ελαίων συνδέεται επίσης με τα μειωμένα δυναμικά μεμβράνης, τη διακοπή των αντλιών πρωτονίων και την εξάντληση του ATP (Tugina *et al.*, 2006). Αυτή η αλλοίωση της κυτταρικής οργάνωσης μπορεί να προκαλέσει μια επίδραση καταρράκτη, με αποτέλεσμα να επηρεαστούν άλλα οργανικά κύτταρα (Carson *et al.*, 2002). Ομοίως, οι Cox *et al.*, 1998, 2000 κατέδειξαν ότι το έλαιο δέντρων τσαγιού αναστέλλει την ανάπτυξη του *Streptococcus aureus* και του *Escherichia coli* με μεταβολή της κυτταρικής διαπερατότητας, αυξάνοντας τη διαρροή ενδοκυτταρικών ιόντων K^+ και διαταράσσοντας την κυτταρική αναπνοή. Τα αιθέρια έλαια περνούν διαμέσου του κυτταρικού τοιχώματος και της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, τα οποία μπορεί να διαταράζουν τη διάταξη των ανόμοιων λιπαρών οξέων, των διπλοστιβιάδων φωσφολιπιδίων και των μορίων πολυσακχαριτών (Raut & Karuppayil, 2014, Saad *et al.*, 2013, Longbottom *et al.*, 2004). Όλα αυτά τα γεγονότα μπορεί να είναι υπεύθυνα για την πήξη των εσωτερικών κυτταρικών συστατικών στο κυτταρόπλασμα και να διασπάσουν τους δεσμούς μεταξύ των στιβιάδων λιπιδίων και πρωτεϊνών (Burt, 2004).

Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι καθαρές ενώσεις αιθερίων ελαίων παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιβακτηριακή δράση σε σύγκριση με το αιθέριο έλαιο. Η αντιβακτηριδιακή επίδραση συστατικών αιθερίου ελαίου όπως η θυμόλη, η μενθόλη και ο οξικός λιναλλυλεστέρας είναι λόγω της διατάραξης των λιπιδικών θραυσμάτων των βακτηριακών πλασματικών μεμβρανών (Trombetta *et al.*, 2005). Αυτό μπορεί να επηρεάσει τη διαπερατότητα της μεμβράνης και να προκαλέσει διαρροή ενδοκυτταρικών υλικών. Η καρβακρόλη είναι μια υδρόφοβη ένωση που επηρεάζει τις κυτταρικές μεμβράνες μεταβάλλοντας τη σύνθεση των λιπαρών οξέων, η οποία στη συνέχεια επηρεάζει τη ρευστότητα και τη διαπερατότητα της μεμβράνης (Rudramurthy *et al.*, 2016). Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός δράσης της είναι ακόμη ασαφής. Αναφέρθηκε ότι η καρβακρόλη κατέστρεψε σημαντικά την εσωτερική δεξαμενή ATP των βακτηριακών κυττάρων (Rudramurthy *et al.*, 2016, Ultee *et al.*, 1999). Σε άλλη

μελέτη, η καρβακρόλη προκάλεσε τη διαρροή και την απώλεια του ATP από βακτηριακά κύτταρα (Ultee *et al.*, 2002). Ομοίως, οι ενώσεις μεθυλ-καρβακρόλη, μενθόλη, κιτρονελλόλη και θυμόλη προκαλούν επίσης μια μεγέθυνση της κυτταρικής μεμβράνης η οποία οδηγεί σε παθητική διάχυση ιόντων μεταξύ των διογκωμένων φωσφολιπιδίων (Rudramurthy *et al.*, 2016, Saad *et al.*, 2013, Ultee *et al.*, 1999, 2002). Μια άλλη επίδραση των αιθέριων ελαίων στις κυτταρικές μεμβράνες είναι η αναστολή της έκκρισης τοξινών. Οι Ultee & Smid, 2001 ανέφεραν ότι η έκθεση του *Bacillus cereus* στην καρβακρόλη είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της παραγωγής τοξινών και η εφαρμογή αιθέριου ελαίου ρίγανης εξάλειψε πλήρως την παραγωγή εντεροτοξινών του *Streptococcus aureus*. Έτσι, η έκκριση των τοξινών μπορεί να προληφθεί με τροποποιήσεις της βακτηριακής μεμβράνης λόγω της επίδρασης των ενώσεων των αιθέριων ελαίων στη διαδικασία της διαμεμβρανικής μεταφοράς της πλασματικής μεμβράνης, γεγονός που περιορίζει την απελευθέρωση των τοξινών στο εξωτερικό περιβάλλον (De Souza *et al.*, 2010). Ένας άλλος μηχανισμός δράσης είναι από την τρανς-κινναμαλδεΰδη, η οποία εισέρχεται στο περίπλασμα του κυττάρου και διαταράσσει τις κυτταρικές λειτουργίες (Rudramurthy *et al.*, 2016, Helander *et al.*, 1998). Επιπλέον, το p-κυμένιο έχει μεγαλύτερη προτίμηση προς τις βακτηριακές κυτταρικές μεμβράνες και έτσι μπορεί να διαταράξει την ακεραιότητα της μεμβράνης (Rudramurthy *et al.*, 2016, Cristani *et al.*, 2007). Οι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης επηρεάζονται επίσης από συστατικά αιθέριων ελαίων. Για παράδειγμα, η καρβακρόλη μπορεί να διαταράξει την εισαγωγή και αναδίπλωση πρωτεϊνών όπως DnaK και GroEL (Rudramurthy *et al.*, 2016, Burt, 2004). Η καρβακρόλη μπορεί επίσης να αναστέλλει τη σύνθεση της φλαγκελλίνης, μιας μικροβιακής πρωτεΐνης που απαιτείται για την βακτηριακή κινητικότητα (Rudramurthy *et al.*, 2016). Το φαινυλοπροπένιο, η ευγενόλη, επίσης επιδεικνύει δραστηριότητα τροποποιώντας το περίγραμμα λιπαρών οξέων για να μεταβάλλει την κυτταροπλασματική μεμβράνη διαφόρων βακτηρίων. Επιπλέον, μπορεί να καταστρέψει διάφορα βακτηριακά ένζυμα όπως η ATPάση, η αμυλάση, η καρβοξυλάση ιστιδίνης και οι πρωτεάσες (Thoroski, 1989, Devi *et al.*, 2010). Ομοίως, αναφέρθηκε ότι η κινναμαλδεΰδη αναστέλλει τα ένζυμα της ATPάσης και διαρρηγνύει την εξωτερική κυτταρική μεμβράνη (Wendakoon & Sakaguchi, 1995). Σε άλλες μελέτες έχουν βρει ότι η βανιλίνη επέδειξε αντιμικροβιακή δράση παρεμποδίζοντας τις βιοχημικές οδούς της βακτηριακής αναπνοής και διαταράσσοντας τη ροή των ιόντων K^+ και τη βαθμίδα του pH (Fitzgerald *et al.*, 2004). Παρομοίως, τα αιθέρια έλαια καρβεόλης, κιτρονελλάλης και καρβόνης έχουν δείχθει ότι τροποποιούν την υδροφοβικότητα και διαταράσσουν την ακεραιότητα

της μεμβράνης, οδηγώντας στη διαρροή ιόντων K^+ (Lopez-Romero *et al.*, 2015). Ορισμένα αιθέρια έλαια μπορούν να εμποδίσουν το δίκτυο επικοινωνίας κυττάρου-κυττάρου quorum sensing που προκαλείται από διάφορα μόρια βακτηριακού σήματος (Szabó *et al.*, 2010). Η αποτελεσματικότητα της αντιβακτηριακής δράσης των αιθέρων ελαίων ή των μεμονωμένων τους ενώσεων μπορεί να διαφέρει από το ένα μικρόβιο στο άλλο. Ως εκ τούτου, απαιτείται διευκρίνιση σχετικά με τους ακριβείς μηχανισμούς δράσης κάθε αιθέριου ελαίου και των συστατικών του, συμπεριλαμβανομένης της περαιτέρω μελέτης για τα πολυάριθμα μικροβιακά στελέχη / είδη. Επιπλέον, η λεπτομερής μελέτη των συστατικών των αιθέρων ελαίων θα ήταν χρήσιμη για τη βελτίωση της κατανόησης του μηχανισμού αντιμικροβιακής δράσης τους.



Εικόνα 1.3.1: Αντιμικροβιακοί μηχανισμοί δράσης των αιθέρων ελαίων. (Swamy *et al.*, 2016)

Οι αντιμικροβιακές δράσεις των αιθέρων ελαίων είναι παρόμοιες με εκείνες των προηγουμένως εξηγούμενων αντιβακτηριακών μηχανισμών. Γενικά, η έκθεση των αιθέρων ελαίων οδηγεί στην πήξη των κυτταρικών συστατικών λόγω της μη αναστρέψιμης βλάβης της κυτταρικής μεμβράνης. Σε κύτταρα ζυμομύκητα, τα αιθέρια έλαια δημιουργούν ένα μεμβρανικό δυναμικό στη μεμβράνη των κυττάρων και διαταράσσουν την παραγωγή του ATP, γεγονός που οδηγεί σε βλάβη κυτταρικής μεμβράνης (Aleksic & Knezevic, 2014). Τα αιθέρια έλαια έχουν τη δυνατότητα να διεισδύσουν και να διαταράξουν το κυτταρικό τοίχωμα των μυκήτων και τις κυτταροπλασματικές μεμβράνες μέσω μιας διαδικασίας διαπερατότητας, η οποία οδηγεί στην αποσύνθεση των μιτοχονδριακών μεμβρανών. Αυτό προκαλείται από

αλλοιώσεις της ροής των ηλεκτρονίων στο εσωτερικό της βιοχημικής οδού του συστήματος μεταφοράς ηλεκτρονίων (Electron Transport System, ETS). Αυτό μπορεί επίσης να βλάψει τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και τα περιεχόμενα νουκλεϊνικού οξέος των κυττάρων που έχουν μολυνθεί από τα μυκητιακά παθογόνα (Arnal-Schnebelen *et al.*, 2004). Τα αιθέρια έλαια θα μπορούσαν επίσης να διαταράξουν την αποπόλωση των μιτοχονδριακών μεμβρανών επηρεάζοντας τους διαύλους ιόντων, ειδικά τα ιόντα Ca^{2+} , τις αντλίες πρωτονίων και τις δεξαμενές ATP και συνεπώς μειώνουν το δυναμικό της μεμβράνης. Αυτή η αλλαγή στη ρευστότητα των μεμβρανών μπορεί να προκαλέσει διαρροή ηλεκτρολυτών και να παρεμποδίσει τις βιοχημικές οδούς του κυτοχρώματος C, τον μεταβολισμό των πρωτεϊνών και τις συγκεντρώσεις ιόντων ασβεστίου. Επομένως, η διαπερατότητα των εσωτερικών και εξωτερικών μιτοχονδριακών μεμβρανών μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση κυττάρων ή νέκρωση που οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο (Yoon *et al.*, 2000). (Swamy *et al.*, 2016)

1.3.2 Χρήσεις

Τα φυτικά προϊόντα ήταν οι κυριότερες πηγές φαρμακευτικών παραγόντων που χρησιμοποιήθηκαν στην παραδοσιακή ιατρική. Μελέτες αποκάλυψαν επίσης ότι η παρουσία αυτών των βιοδραστικών συστατικών στα αιθέρια έλαια στην πραγματικότητα είναι υπεύθυνη για διάφορες δραστηριότητες όπως αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις, αναλγητικές και άλλες φαρμακολογικές ιδιότητες (Alexander, 2001, Baylac & Racine, 2003, Bhusita *et al.*, 2005, Kamdem *et al.*, 2015). Ορισμένα φαρμακευτικά φυτά είναι πλούσια σε αντιμικροβιακά αντιδραστήρια (Mahesh & Satish, 2008). Παρομοίως, διάφορα αιθέρια έλαια που προέρχονται από ποικιλίες των φαρμακευτικών φυτών είναι γνωστό ότι διαθέτουν εντομοκτόνες, αντιμυκητικές, αντι-φλεγμονώδεις, και αντιοξειδωτικές δραστηριότητες (Lin *et al.*, 2016). Διαπιστώθηκε ότι τα αιθέρια έλαια του *Apium graveolens* και του *Thymus vulgaris* αποτελούν πηγή φυσικής αντιοξειδωτικής, αντιφλεγμονώδους και αντιμυκητιακής ύλης (Kamdem *et al.*, 2015). Η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης του αιθέριου ελαίου από την *Blumea eriantha* παρέχει μια γέφυρα για την περαιτέρω εφαρμογή αυτού του φυτού τόσο στα καλλυντικά όσο και στα παραδοσιακά φάρμακα (Pednekar *et al.*, 2013). Παρόμοια μελέτη των αντιβακτηριδιακών και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων αιθερίων ελαίων του *Jatropha gossypifolia* υποδηλώνει ότι εκτός από τις

παραδοσιακές χρήσεις των φυτικών εκχυλισμάτων, τα αιθέρια έλαια μπορεί να είναι καλοί υποψήφιοι στην αναζήτηση ενώσεων οδηγών για τη σύνθεση νέων δραστικών αντιβιοτικών (Okoh *et al.* , 2016). Οι σημαντικές αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές δράσεις των αιθέριων ελαίων κανέλλας και τζίντζερ υποδηλώνουν ότι θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως πηγή ενώσεων με συντηρητικό φαινόμενο (El-Baroty *et al.*, 2010). Το έλαιο από το *Zanthoxylum alatum* θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως πόρος αντιοξειδωτικών και αντιμικροβιακών ενώσεων οι οποίες μπορούν να βρουν εφαρμογές σε βιομηχανίες τροφίμων και φυτοφαρμάκων (Guleria *et al.*, 2013).

Απεδείχθη ότι τα έλαια που κυριαρχούνταν από τις αλκοόλες σεσκιτερπενίων προϋπέθεταν την μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δραστικότητα ενάντια σε ένα εύρος οργανισμών, πιο έντονη έναντι μερικών θετικών κατά Gram ειδών. Τα μεμονωμένα συστατικά που βρέθηκαν σε σημαντικές ποσότητες στα αιθέρια έλαια σχετίζονταν με αυτή την ενισχυμένη αντιμικροβιακή δράση, ιδιαίτερα η προστανθερόλη. Σε μια άλλη μελέτη του *Prostanthera centralis*, ένα αιθέριο έλαιο πλούσιο σε προστανθερόλη έδειξε σημαντικά χαμηλή αντιμικροβιακή δράση έναντι Gram θετικών βακτηρίων και της ζύμης *Candida albicans* (Collins *et al.*, 2014). Ομοίως, τα αιθέρια έλαια των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών (*Citrus aurantium*, *C. limon*, *Lavandula angustifolia*, *Matricaria Chamomilla*, *Mentha piperita*, *M. spicata*, *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* και *Salvia officinalis*) ερευνήθηκαν για την δραστική τους ικανότητα έναντι παθογόνων βακτηρίων και η υψηλότερη και η ευρύτερη δραστικότητα δείχθηκε από το έλαιο *Origanum vulgare* (Sokoniæ *et al.*, 2010).

Σε μία μελέτη το αιθέριο έλαιο του *Thymus vulgaris* και το κύριο συστατικό του η θυμόλη έδειξαν ισχυρή βακτηριοστατική και βακτηριοκτόνο δράση έναντι στελεχών του *Escherichia coli* σε πειράματα *in vitro*. Εν τούτοις, η δραστικότητα του αιθέριου ελαίου ήταν ανώτερη από την ένωση μόνη της η οποία αποδεικνύει ότι η υψηλή αντιμικροβιακή δραστικότητα που εμφανίζουν ορισμένα αιθέρια έλαια προκύπτει από τη συνέργεια των κύριων συστατικών τους (Santurio *et al.*, 2014).

Τα έλαια των *Ziziphora persicae*, *Mentha piperita*, *Mentha spicata* και *Achillea vermiculatus* έδειξαν την υψηλότερη αντιβακτηριακή δράση επί του βακτηρίου *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* της βακτηρίωσης της καρυδιάς. (Soltani & Aliabadi, 2013) Επιπλέον, εκχυλίσματα φύλλων των φυτών *Schinus molle* και *Pistacia atlantica* παρουσίασαν υψηλού επιπέδου αντιμικροβιακή δράση έναντι του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens*. (Rhouma *et al.*, 2009) Επίσης, τα αιθέρια έλαια των

φυτών *Thymus vulgaris* και *Origanum vulgare* ανέστειλαν την ανάπτυξη των στελεχών του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* που απομονώθηκε από φυτά σόγιας. (Oliva Mde *et al.*, 2015)

Μια άλλη μελέτη συγκρίνει την ανασταλτική ιδιότητα των ελαίων του *Artemisia* sp. στην ανάπτυξη βακτηρίων, ζυμών, δερματοφυτών, του *Fonsecaea pedrosoi* και του *Aspergillus niger*. Ανακαλύφθηκε ότι το έλαιο του *Artemisia biennis* ήταν το πιο δραστικό έναντι των δερματοφύτων, τον *Cryptococcus neoformans*, τον *Fonsecaea pedrosoi* και τον *Aspergillus niger* και το έλαιο του *Artemisia absinthium* ήταν περισσότερο δραστικό έναντι των στελεχών *Staphylococcus* (Lopes-Lutz *et al.*, 2004). Ομοίως, τα ευρήματα των μυκητοκτόνων ιδιοτήτων των αιθέριων ελαίων του *Eucalyptus camaldulensis* επιβεβαιώνουν τη δυνητική χρήση τους στη διαχείριση των οικονομικά σημαντικών ειδών *Fusarium* spp. και ως πιθανές εναλλακτικές λύσεις έναντι των συνθετικών μυκητοκτόνων (Gakuubi *et al.*, 2017).

Οι δραστικές αντιμικροβιακές ενώσεις των αιθέριων ελαίων είναι γενικά τερπένια, τα οποία είναι φαινολικά στη φύση, προσβάλλουν τα παθογόνα με τρόπο δράσης επί του κυτταρικού τοιχώματος και της κυτταρικής μεμβράνης. Έτσι, οι ενεργές φαινολικές ενώσεις μπορεί να έχουν αρκετούς επεμβατικούς στόχους που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην αναστολή των παθογόνων μυκήτων. (Tabassum & Vidyasagar, 2013)

Η αντιμυκητική δραστηριότητα μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία ορισμένων συστατικών όπως η καρβακρόλη, ο οξικός α-τερπινυλεστέρας, το κυμένιο, η θυμόλη, το πινένιο, η λιναλοόλη, που είναι ήδη γνωστές ότι παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δραστηριότητα. Διάφορες επιστημονικές έρευνες έχουν τονίσει τη σημασία και τη συμβολή πολλών οικογενειών των φυτών (μεταξύ των οποίων είναι η οικογένεια *Lamiaceae*), που χρησιμοποιούνται ως φαρμακευτικά φυτά. Αρκετές *in vitro* μελέτες έχουν δημοσιευθεί επιβεβαιώνοντας την επίδραση των αιθερίων ελαίων και των μεγαλομοριακών τους ενώσεων στα φυτά και τους παθογόνους μύκητες. (Tabassum & Vidyasagar, 2013)

Το αιθέριο έλαιο του περγαμόντου (*Citrus hystrix* D.C.) έδειξε ανταγωνιστική δράση εναντίον επτά ειδών των οικονομικά σημαντικών παθογόνων μυκήτων του ρυζιού που είναι οι *Alternaria brassicicola*, *Aspergillus flavus*, *Bipolaris oryzae*, *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, *Pyricularia grisea* και *Rhizoctonia solani* και διαπιστώθηκε ότι τόσο η συγκέντρωση όσο και ο τύπος της δραστικής ουσίας είναι σημαντικοί παράγοντες που καθορίζουν τη δυναμική της αντιμυκητιασικής δράσης

του. Η αντιμυκητιακή αποτελεσματικότητα του αιθέριου ελαίου του περγαμόντου πιθανώς επηρεάζεται από τη μέθοδο της εξαγωγής του ελαίου και την ευαισθησία των στελεχών. (Tabassum & Vidyasagar, 2013)

Το αιθέριο έλαιο του *Tagetes patula* L. έδειξε καλή αντιμυκητιακή δραστηριότητα έναντι δύο φυτοπαθογόνων μυκήτων, του *Botrytis cinerea* και του *Penicillium digitatum*, εξασφαλίζοντας πλήρη αναστολή της ανάπτυξης. Το έλαιο του φυτού *O. vulgare* και μόνο παρεμποδίζει όλους τους φυτοπαθογόνους μύκητες. (Tabassum & Vidyasagar, 2013) Επιπροσθέτως, τα αιθέρια έλαια των φυτών *Origanum compactum* και *Thymus glandulosus* όπως και τα συστατικά τους θυμόλη και καρβακρόλη παρεμποδίζουν πλήρως την ανάπτυξη του μύκητα *Botrytis cinerea*. (Bouchra *et al.*, 2003) Επιπλέον, η ανάμειξη ελαίου γαριφαλόδενδρου και ελαίου κανέλας σε κατάλληλες αναλογίες είχε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας κατά των μυκήτων που προκαλούν μετασυλλεκτικές ασθένειες των σταφυλιών όπως οι *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Phomopsis viticola* και *Rhizopus stolonifer*. (Tabassum & Vidyasagar, 2013)

Υπάρχουν εμπορικά σκευάσματα στην αγορά με δραστικές ουσίες από τα φυτά, όπως το σκευάσμα BC 1000TM με δραστικές ουσίες βιοφλαβονοειδή, εκχυλίσματα σπόρων και πολτό πορτοκαλιού και εφαρμόζεται ενάντια στον μύκητα *Botrytis cinerea*, το σκευάσμα Bio saveTM από εκχυλίσματα σπόρων και πολτό πορτοκαλιού κατά των μυκήτων: *Ascochyta*, *Pullularia*, *Fusarium*, *Cercospora*, *Botrytis*, *Septoria*, *Alternaria*, *Stemphylium*, *Rhizoctonia*, *Peronospora*, *Pythium*, *Penicillium*, *Sigatoka* και *Aspergillus*, τα σκευάσματα AgrisponTM από φυτικά και ανόργανα εκχυλίσματα και SincocinTM από φυτικά εκχυλίσματα εφαρμόζονται κατά του μύκητα *Cercospora beticola*. Επίσης το σκευάσμα Gloves OffTM με κύρια συστατικά τη θυμόλη και την καρβακρόλη εφαρμόζεται ενάντια στον μύκητα *Trichophyton mentagrophytes*, αλλά και από έρευνες έχει διαπιστωθεί ότι το Gloves Off ανέστειλε τη βλάστηση των σπορίων και την ανάπτυξη του μυκηλίου του *B. cinerea* (Adebayo *et al.*, 2013). Έπειτα, το GlossTM από φυσικά αλκαλοειδή χρησιμοποιείται κατά των μυκητολογικών ασθενειών σε όλες τις καλλιέργειες στον αγρό, σε λαχανοκομικές και κηπευτικές. (Castillo *et al.*, 2012)

Τα φυτά παράγουν μια τεράστια ποικιλία από δευτερογενείς ενώσεις ως φυσική προστασία κατά των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών και επιθέσεων από έντομα. Ορισμένες από αυτές τις ενώσεις είναι επίσης τοξικές για τα ζώα, αλλά άλλες μπορεί

να μην είναι τοξικές. Πράγματι, πολλές από αυτές τις ενώσεις έχουν χρησιμοποιηθεί με τη μορφή ολόκληρων φυτών ή φυτικών εκχυλισμάτων για τρόφιμα ή ιατρικές εφαρμογές στον άνθρωπο. (Wallace, 2004)

Τα αιθέρια έλαια είναι πτητικά με ατμό ή εκχυλίσματα με οργανικό διαλύτη των φυτών που χρησιμοποιούνται κατά παράδοση από τον άνθρωπο για πολλούς αιώνες για την ευχάριστη οσμή των ουσιών, τη γεύση τους ή ως αντισηπτικό ή/και με τις ιδιότητές τους στη συντήρηση. Αν και συνήθως μπορούν να θεωρηθούν ότι προέρχονται από βότανα και μπαχαρικά, είναι παρόντα σε κάποιο βαθμό σε πολλά φυτά για τον προστατευτικό τους ρόλο έναντι βακτηριακών, μυκητολογικών ή/και προσβολών εντόμων. (Wallace, 2004)

Η ανάγκη για την αντικατάσταση συνθετικών φυτοφαρμάκων, όπως τα εντομοκτόνα της ομάδας των οργανοφωσφορικών, αντανακλάται στην εκτεταμένη μόλυνση που υφίσταται στο περιβάλλον. Οι διάφορες συνθέσεις φυτικών εκχυλισμάτων, συμπεριλαμβανομένων των αιθερίων ελαίων, έχουν δείξει πως υπόσχονται την αντικατάσταση των επίμονων αγροχημικών. Για παράδειγμα, το αιθέριο έλαιο του *Hyptis verticillata* έχει αποδειχθεί ότι έχει ακαρεοκτόνο δράση για το *Boophilus microplus* και εντομοκτόνο δράση για το *Cylas formicarius elegantulus*, δύο οικονομικά σημαντικά είδη επιβλαβών οργανισμών. (Williams *et al.*, 2007)

Τα αιθέρια έλαια επίσης εφαρμόζονται στη διαδικασία υποκαπνισμού των παρασίτων των αποθηκευμένων προϊόντων. Για παράδειγμα, το έλαιο του *Ocimum basilicum* στο 12,5% (w/w) προκάλεσε 99% θνησιμότητα μετά από 24 ώρες, σε σχέση με μία τιμή αναφοράς του 0,0%. (Williams *et al.*, 2007)

Οι νυμφοκτόνες δραστηριότητες κουνουπιών ορισμένων αιθερίων ελαίων έχουν τεκμηριωθεί. Για παράδειγμα, εκείνες του *Ocimum gratissimum*, *O. americanum*, *Lippia sidoides* και *Citrus citratus* έδωσαν τιμές LC50 (συγκεντρώσεις των αιθερίων ελαίων που απαιτούνται για τη θανάτωση του 50% του πληθυσμού δοκιμής) 60ppm, 67ppm, 63ppm και 69ppm, αντίστοιχα, σχετικά με την προνύμφες *Aedes aegypti*. (Williams *et al.*, 2007)

Τα αιθέρια έλαια, που λαμβάνονται με απόσταξη ατμού από το φύλλωμα του φυτού, και ακόμη και το φύλλωμα το ίδιο ορισμένων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών (κυρίως στις οικογένειες Myrtaceae και Lamiaceae, αλλά και σε άλλες οικογένειες φυτών επίσης) έχουν παραδοσιακά χρησιμοποιηθεί για την προστασία αποθηκευμένων σπόρων και οσπρίων, καθώς και να απωθούν τα ιπτάμενα έντομα στο σπίτι. Έτσι

φυσικά φυτοφάρμακα με βάση τα φυτικά αιθέρια έλαια μπορούν να αποτελέσουν εναλλακτική λύση ως προστατευτικά καλλιεργειών. (Isman, 2000)

Αν και ορισμένοι από τους ισχυρισμούς που διατυπώνονται για αυτά τα ακατέργαστα παρασκευάσματα έχουν ακόμη να τεκμηριωθούν μέσω των ελεγχόμενων πειραμάτων, η επιστημονική έρευνα στις βιολογικές δραστηριότητες αυτών των υλικών πολλαπλασιάστηκε κατά την τελευταία δεκαετία. Η εικόνα που προκύπτει είναι ότι ορισμένα, ειδικά έλαια και χημικά συστατικά τους, έχουν αποδεδειγμένη επαφή και τοξικότητα καπνισμού σε ορισμένα οικονομικής σημασίας έντομα και ακάρεα. (Isman, 2000)

Έτσι διαπιστώνεται τώρα ότι τα αιθέρια έλαια δεν έχουν μόνο χρήση σε αρώματα και καλλυντικά για το εκστατικό τους άρωμα και την ευωδία, αλλά έχουν επίσης ευρεία χρήση για θεραπευτικούς σκοπούς λόγω των πολλών φαρμακευτικών αξιών τους. Η ανάλυση GC-MS (Gas Chromatography–Mass Spectrometry) αποκάλυψε τα χημικά συστατικά που υπάρχουν στο έλαιο, η ισχυρή αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση δείχνει το δυναμικό του στην ανάπτυξη αντιβακτηριακών και αντιμυκητιασικών φαρμάκων και τη χρησιμότητα ως φυσικό πρόσθετο συστατικό για τη διατήρηση της βιομηχανίας τροφίμων και φαρμάκων. (Rana *et al.*, 2017)

1.3.3 Οικογένεια Lamiaceae

Η οικογένεια Lamiaceae αποτελείται από φυτά που στην ελληνική γλώσσα ονομάζονται χειλανθή ή χειλοστέφανα γιατί τα άνθη είναι δίχειλα και σε πιο εξελιγμένες μορφές φυτών ο κάλυκας γίνεται προοδευτικά δίχειλος. Άλλο ένα χαρακτηριστικό της οικογένειας αυτής είναι τα φύλλα των ποωδών, θαμνωδών ή ημιθαμνωδών που είναι αρωματικά. (Στεφανάκη, 1999)

Αποτελείται από περίπου 252 γένη και περισσότερα από 6700 είδη, που εμφανίζονται στις εύκρατες περιοχές, αλλά κυρίως στη Μεσόγειο. Έχει κοσμοπολίτικη κατανομή. Πολλά από αυτά τα είδη έχουν οικονομική σημασία για τα φάρμακα, τη μαγειρική, τη διακόσμηση, τα καλλυντικά, τα τρόφιμα, τα προϊόντα υγιεινής και αρωματοποιίας. (Kumar *et al.*, 2014)

Τα αιθέρια έλαια των ειδών Lamiaceae έχουν αναγνωριστεί για τις αντιοξειδωτικές, αντισηπτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές και μυκητοκτόνες ιδιότητες. Τα

φυτά *Nepeta leucophylla* και *Nepeta clarkei* των Ιμαλαΐων είναι γνωστό ότι διαθέτουν ιριδοειδή και ακτινιδίνη (ένα πτητικό αλκαλοειδές τερπένιο), εκτός των μονο- και σεσκιτερπενοειδών. (Kumar *et al.*, 2014)

Προηγούμενες μελέτες επί των αιθέριων ελαίων πολλών Lamiaceae δείχνουν ότι, αυτά τα φυτά έχουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων, όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, ιδίως την αντιμικροβιακή δραστηριότητα τους, και αυτή η δραστηριότητα εν γένει συσχετίζεται με τη χημική σύνθεση του ελαίου. Έτσι, αυτή η βιολογική διαφορά μπορεί να εξηγηθεί εν μέρει από τη μεταβολή στη χημική τους σύνθεση. (Tabassum & Vidyasagar, 2013)

1.3.3.1 Το αιθέριο έλαιο της ρίγανης (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*).

Τρόπος απόσταξης-Απόδοση

Το αιθέριο έλαιο της ρίγανης (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, Lamiaceae) παραδοσιακά εξάγεται είτε από τα φύλλα ή τα βλαστάρια με απόσταξη με ατμό, αν και άλλες μέθοδοι εκχύλισης όπως η υδροαπόσταξη, ο διαχωρισμός του CO₂ και η εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό έχουν αναφερθεί. Επειδή η βασική σύνθεση του ελαίου επηρεάζει τη βιολογική δράση του, η απόδοση του αιθέριου ελαίου (περιεκτικότητα) είναι σημαντική σε σχέση με την οικονομία της παραγωγής. (Zheljazkov *et al.*, 2012) Η απόδοση κυμαίνεται από 4-6 kg αιθέριου ελαίου ανά 100 kg ξηρής μάζας. [11]

Περιεκτικότητα

Η ποιότητα της ρίγανης προσδιορίζεται σε μεγάλο βαθμό από την περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο αλλά και από την σύσταση αυτού. Οι δυο παράμετροι μπορεί να διαφέρουν σημαντικά και εξαρτώνται από τις κλιματικές συνθήκες, το γονότυπο και τη θρεπτική κατάσταση των φυτών κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας.

Το αιθέριο έλαιο της ρίγανης έχει χαρακτηριστική οσμή και καυστική γεύση, έντονο κίτρινο χρωματισμό και ελαιώδη σύσταση. Το ειδικό βάρος του είναι 0,950-0,960 και είναι πρακτικά αδιάλυτο στο νερό, ενώ είναι πολύ ευδιάλυτο στην αλκοόλη, τον αιθέρα και τα έλαια.

Η περιεκτικότητα και η ποσότητα του αιθερίου ελαίου της ρίγανης μπορεί να διαφέρει σημαντικά ακόμα και σε φυτά του ίδιου είδους που φύονται σε διαφορετικό ή και τον ίδιο οικότυπο. Η ποσότητα του αιθερίου ελαίου της ρίγανης ποικίλει ανάλογα με τα τμήματα του φυτού που υποβάλλονται σε απόσταξη. Έτσι, διαπιστώθηκε ότι τα φύλλα και τα άνθη δίνουν αιθέριο έλαιο σε ποσοστό από 4-6%, ενώ συνολικά τα υπέργεια τμήματα του φυτού από 2-4%.

Παράγοντες που επηρεάζουν την περιεκτικότητα είναι ο γεωγραφικός τόπος, το περιβάλλον, οι συνθήκες και το έτος καλλιέργειας, η γονιμότητα του εδάφους και το υψόμετρο, η θερμοκρασία, η άρδευση, η συχνότητα και η εποχή των βροχοπτώσεων, η αζωτούχος λίπανση και η εποχή συγκομιδής.

(Δόρδας, 2012)

Σύσταση

Κύριο συστατικό της ρίγανης είναι το αιθέριο έλαιο, με κύρια συστατικά, όπως προαναφέρθηκε, τις μονοτερπενικές φαινολικές ουσίες καρβακρόλη και θυμόλη. Άλλα συστατικά του αιθερίου ελαίου είναι το p-κυμένιο και το γ-τερπινένιο, που θεωρούνται πρόδρομες ενώσεις της θυμόλης και καρβακρόλης αντίστοιχα, στα οποία επίσης αποδίδεται βιολογική δραστηριότητα, τα σεσκιτερπένια καρυοφυλένιο και β-βισαβολένιο κ.α. (Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010)

Άλλα συστατικά της ρίγανης περιλαμβάνουν: φλαβόνες, φλαβονογλυκοσίδες και κατεχίνη: ναριγκίνη, λουτεολίνη, απιγενίνη. Φαινολικά οξέα: ροσμαρινικό, καφεϊκό, υδροξυβενζοϊκό κ.α. (Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010)

Στο υποείδος *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* ανιχνεύθηκαν περίπου 36 διαφορετικά συστατικά, τα κύρια είναι η καρβακρόλη και η θυμόλη οι οποίες είναι φαινολικές ενώσεις, ακολουθούν το γ-τερπένιο, το p-κυμένιο, που είναι υδρογονάνθρακες και οι αλκοόλες, λιναλόλη και τερπινεόλη. Η περιεκτικότητα σε καρβακρόλη μπορεί να φτάσει το 95% του αιθερίου ελαίου. (Δόρδας 2012)

Χρήσεις

Το αιθέριο έλαιο και η ξηρή δρόγη ρίγανης έχει πολλές χρήσεις, σε διάφορους τομείς της αγοράς, όπως τα τρόφιμα (ως αρωματικό, ενισχυτικό της γεύσης και ως φυσικό συντηρητικό), στην αρωματοποιία και σε διάφορα φαρμακευτικά σκευάσματα (ως

συστατικό και ως βελτιωτικό γεύσης, οσμής). Η πιο συνηθισμένη χρήση είναι στα τρόφιμα που χρησιμοποιείται σαν άρτυμα αλλά και ως αιθέριο έλαιο. Προσδίδει ιδιαίτερη γεύση και άρωμα αλλά συμβάλλει και στην επί μακρότερο χρονικό διάστημα συντήρησή τους λόγω των μυκοστατικών και αντιμικροβιακών ιδιοτήτων του. Εκτός από αυτό μετά από έρευνες αποδείχθηκε ότι το ριγανέλαιο έχει ευρεία βιολογική δράση εναντίον διαφόρων παθογόνων που προσβάλλουν τα φυτά, τα ζώα, ακόμα και τον άνθρωπο. Από τα συστατικά που απαρτίζουν το αιθέριο έλαιο, η καρβακρόλη και η θυμόλη έχουν ισχυρότερη δράση έναντι πολλών παθογόνων (βακτηρίων, μυκήτων, πρωτόζωων κ.α.). (Δόρδας, 2012)

Το αιθέριο έλαιο της ρίγανης εμφανίζει αξιόλογη δραστηριότητα εναντίον αρνητικών και κυρίως θετικών κατά Gram βακτηρίων. Συγκριτική μελέτη της αντιβακτηριδιακής δράσης των αιθερίων ελαίων διαφόρων φυτών και της ρίγανης (*Origanum vulgare*) έναντι των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Yersinia enterocolitica*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas fluorescens* και *Pseudomonas putida*), καθώς και έναντι των θετικών κατά Gram βακτηρίων (*Micrococcus* spp., *Sarcina flava*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thuringiensis* και *Listeria innocua*), έδειξε ότι η ρίγανη παρουσιάζει την ισχυρότερη αντιβακτηριακή δράση. Στη μελέτη αυτή βρέθηκε ότι το αιθέριο έλαιο της ρίγανης είχε βακτηριοκτόνο δράση σε ποσότητα 400 ppm, ενώ βακτηριοστατική σε μικρότερη ποσότητα. Τα αιθέρια έλαια των υπόλοιπων φυτών παρουσίασαν μόνο βακτηριοστατική δράση. (Δόρδας, 2012)

Μεταξύ των κύριων συστατικών του αιθέριου ελαίου της ρίγανης, η καρβακρόλη και η θυμόλη παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη αντιβακτηριακή δράση *in vitro*. Η καρβακρόλη παρουσιάζει αντιβακτηριακή δράση έναντι του παθογόνου *Bacillus aureus*, ενώ η θυμόλη έντονη ανασταλτική δράση έναντι των μικροοργανισμών *Selenomonas ruminantium* και *Streptococcus bovis*, της μεγάλης κοιλίας των μηρυκαστικών. Η αντιβακτηριακή δράση των υπόλοιπων συστατικών του αιθέριου ελαίου της ρίγανης, όπως είναι το γ-τερπινένιο και το p-κυμένιο, είναι δεδομένη, όμως είναι άγνωστο ακόμη το αποτέλεσμα όλων μαζί αυτών των συστατικών σε συνέργεια. (Δόρδας, 2012)

Η καρβακρόλη και η θυμόλη έχουν σχεδόν ίδιους μοριακούς τύπους με μόνη διαφορά ότι η ομάδα του υδροξυλίου βρίσκεται σε διαφορετική θέση στο φαινολικό δακτύλιο. Και οι δυο ουσίες εμφανίζονται να καθιστούν την κυτταρική μεμβράνη διαπερατή και μέσω της διάχυσης διεισδύουν στο βακτηριακό κύτταρο όπου επιδρούν αρνητικά στις βιοχημικές λειτουργίες του μεταβολισμού του. (Δόρδας, 2012)

Όσον αναφορά τη δράση του ριγανέλαιου σε διάφορα παθογόνα που προσβάλλουν τα ζώα και τον άνθρωπο έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες μελέτες. Τα τελευταία χρόνια διάφορα συστατικά φαρμάκων, όπως τα αντιβιοτικά από τα σιτηρέσια πουλερικών και χοίρων, έχουν αντικατασταθεί από το ριγανέλαιο. Το ριγανέλαιο χρησιμοποιείται επίσης σε πολλά φαρμακευτικά σκευάσματα φυτικής προέλευσης για τον άνθρωπο. (Δόρδας, 2012)

1.3.3.2 Το αιθέριο έλαιο του θυμαριού (*Coridothymus capitatus*).

Τρόπος απόσταξης-Απόδοση

Η παραλαβή του αιθερίου ελαίου του θυμαριού (*Coridothymus capitatus*, Lamiaceae) γίνεται με τη μέθοδο της απόσταξης. Η απόσταξη διενεργείται σε καλά στοιβαγμένους άμβυκες, με ατμό, λαμβάνοντας υπόψη ότι το φυτικό υλικό περιέχει μεγάλο ποσοστό από βλαστούς. Οι αποδόσεις κυμαίνονται συνήθως μεταξύ 0,5 και 1,0% στο νωπό υλικό που έχει πρόσφατα συγκομιστεί. Οι ποσοστιαίες αποδόσεις σε αιθέριο έλαιο των ξηρών φύλλων κυμαίνονται μεταξύ 1 και 3 όσον αφορά το *Coridothymus capitatus*, ενώ μπορούν να φτάσουν μέχρι και 6% για ορισμένα υβρίδια. (Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010)

Περιεκτικότητα

Η περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο ποικίλλει δραματικά ανάλογα με το γενότυπο, τις οικολογικές και εδαφοκλιματικές συνθήκες, το χρόνο της συγκομιδής, την ηλικία του φυτού, τις καλλιεργητικές τεχνικές και τις συνθήκες αποθήκευσης. Οι ακραίες τιμές μεταξύ των οποίων μπορεί να κυμαίνεται είναι 0,75% και 6,5%. (Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010) Όμως σε κανονικά επίπεδα η περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο κυμαίνεται από 1-3%. (Δόρδας, 2012)

Σύσταση

Τα κύρια συστατικά είναι οι φαινόλες θυμόλη και καρβακρόλη (20-80%). Το χειμώνα, η περιεκτικότητα σε φαινόλες είναι χαμηλότερη (κυρίως λόγω της θυμόλης), ενώ το καλοκαίρι είναι μεγαλύτερη. Άλλα συστατικά του αιθερίου ελαίου είναι ο

μεθυλικός αιθέρας της θυμόλης (2%), η κινεόλη, το ο-κιμένιο, το α-πινένιο, η βορνεόλη και ο εστέρας της. (Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010)

Πιο ειδικά, χημική ανάλυση του αιθερίου ελαίου θυμαριού έδειξε ότι η θυμόλη, παρα-κυμένιο, ζ-τερπινένιο, ο-κιμένιο και καρβακρόλη ήταν παρόντες σε υψηλότερα επίπεδα. Σε χαμηλότερες ποσότητες οι ακόλουθες ενώσεις βρέθηκαν: ευκαλυπτόλη, ένυδρο σαβινένιο, μυρκένιο, α-τερπινολένιο, καρυοφυλλένιο, 1-οκτεν-3-όλη, καμφορά, θυμόλη μεθυλαιθέρα, καρβακρόλη μεθυλαιθέρα, λιμονένιο, α-φελλανδρένιο και α-πινένιο. (Anzlovar *et al.*, 2014)

Χρήσεις

Σε ότι αφορά τις χρήσεις του θυμαριού, είναι αρχικά πολύ καλό μελισσοτροφικό φυτό. Στη βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιείται τόσο η ξηρή δρόγη του, όσο και το αιθέριο έλαιο για καλύτερο άρωμα, γεύση κι εμφάνιση. Χρησιμοποιείται επίσης ως ισχυρό αντιοξειδωτικό στα τρόφιμα και στη φαρμακευτική. Το αιθέριο έλαιο του έχει κυρίως αντιμικροβιακή, αντιμυκητιακή καθώς και καρδιοτονωτική δράση. Παραδοσιακά χρησιμοποιείται σε αναπνευστικά προβλήματα, γαστρίτιδα, βρογχίτιδα, άσθμα και λαρυγγίτιδα. Επίσης χρησιμοποιείται στην αρωματοποιία, στην παρασκευή οδοντόπαστας (θεωρείται το καλύτερο για την υγιεινή του στόματος), στην ομοιοπαθητική, στην αρωματοθεραπεία και φυσικά ως ρόφημα. (Δόρδας, 2012)

Τα υπέργεια μέρη των ειδών του γένους *Thymus* γενικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αφεψήματα, καρκεύματα και μπαχαρικά, για διάφορους ιατρικούς σκοπούς. Πολλές φαρμακευτικές ιδιότητες αποδίδονται στις εγχύσεις, τα αφεψήματα και τα αιθέρια έλαια των εναέριων μερών των ειδών του γένους *Thymus*, λόγω τονωτικών, διάλυσης των αερίων του στομάχου, αντισπασμωδικών, αντιμικροβιακών, αντιοξειδωτικών, αντιϊικών και αποχρεμπτικών δραστηριοτήτων. Το γένος *Thymus* περιλαμβάνει περίπου 300 είδη πολυετών, αρωματικών βοτάνων και ημιξυλωδών θάμνων, που ανευρίσκονται κυρίως στην περιοχή της Μεσογείου, την Ασία, τη Νότια Ευρώπη και τη Βόρεια Αφρική. Τα είδη του γένους *Thymus* θεωρούνται ως φαρμακευτικά φυτά λόγω των φαρμακολογικών και βιολογικών ιδιοτήτων τους. Οι ιδιότητες τους οφείλονται στα κύρια συστατικά τους, τη θυμόλη και την καρβακρόλη. (Agili, 2014)

Το γένος *Thymus* έχει πολλά είδη και ποικιλίες και τα αιθέρια έλαια του έχουν ήδη μελετηθεί. Ωστόσο, υπάρχουν σημαντικά ερευνητικά ενδιαφέροντα για να συνεχιστεί

η μελέτη, που οφείλονται σε πολλές άλλες βιολογικές ιδιότητες που τα αιθέρια έλαια του *Thymus* μπορούν να κατέχουν. Το *Thymus vulgaris* L. είναι σημαντικό αρωματικό φυτό με περίπου 100 είδη στον κόσμο και χρησιμοποιείται ευρέως για ιατρικούς σκοπούς, καθώς και σε γαστρονομικές γεύσεις. Τα περισσότερα από τα είδη αυτά αναπτύσσονται στην άγρια φύση και συλλέγονται από την ύπαιθρο, με μόνο το πέντε τοις εκατό να καλλιεργείται για εμπορικούς σκοπούς. Το *Thymus vulgaris* L. είναι ένα πολυετές φυτό, που είναι αυτόχθον στην Ασία, την Ευρώπη, την Αμερική και την Αφρική. Χρησιμοποιείται ευρέως στη λαϊκή ιατρική σε θεραπείες ποικίλων ασθενειών όπως γαστρεντερικές διαταραχές και βρογχοπνευμονικές παθήσεις. (Agili, 2014)

Παλαιότερα στα είδη του γένους *Thymus* συμπεριλαμβανόταν και το *T. capitatus*, θυμάρι το κεφαλωτό, το οποίο σε πολλές περιοχές της Ελλάδας αναφέρεται με το όνομα θυμάρι. Σήμερα όμως, το γενικά αποδεκτό λατινικό του όνομα είναι *Coridothymus capitatus* και διακινείται εμπορικά ως “ρίγανη” μια και έχουν κοινό χαρακτηριστικό γνώρισμα την παρόμοια οσμή τους, που οφείλεται στην παρουσία της καρβακρόλης στα αιθέρια έλαιά τους. (Karousou *et al.*, 2005)

Το έλαιο του θυμαριού έχει φυσικές αντιβιοτικές ιδιότητες ως συνέπεια της παρουσίας της θυμόλης που αποτελεί περίπου το 50% του συνόλου του αιθέριου ελαίου. Η καρβακρόλη είναι επίσης σημαντική από την άποψη αυτή. Το έλαιο θυμαριού είναι μεταξύ των δέκα κορυφαίων αιθέριων ελαίων στον κόσμο, όσον αφορά τη χρήση του ως πρόσθετο τροφίμων. Έχει αναφερθεί ότι τα αιθέρια έλαια του θυμαριού κατέχουν πολλές βιολογικές δραστηριότητες, συμπεριλαμβανομένων των αντισηπτικών, αντισπασμωδικών, αντιμικροβιακών και αντιοξειδωτικών. (Agili, 2014)

1.3.3.3 Το αιθέριο έλαιο της μαντζουράνας (*Origanum majorana*).

Τρόπος απόσταξης -Απόδοση

Τα φρέσκα φύλλα της μαντζουράνας (*Origanum majorana*, Lamiaceae) εναποτίθενται για εξαγωγή του αιθέριου ελαίου με υδροαπόσταξη στη συσκευή τύπου Cleverger. Ένα ελαιώδες στρώμα πάνω από το νερό εμφανίζεται στον δέκτη. Το νερό στον δέκτη ανακινείται με διαιθυλαιθέρα για να εξαγάγει τυχόν διαλυμένες φαινόλες. Η αιθερική στιβάδα εξατμίζεται και το εναπομείναν περιεχόμενο αναμιγνύεται στο πτητικό έλαιο. Το έλαιο συλλέγεται και αποθηκεύεται σε αεροστεγή περιέκτη σε

ψυγείο. Αναλύεται για διάφορες φυσικοχημικές ιδιότητες. Είναι ελαφρώς κίτρινο με χαρακτηριστική οσμή αρωματική και ελεύθερη ροή. Η απόδοση φτάνει τα 1,72% ενώ το ειδικό βάρος και το RI (δείκτης διάθλασης), όταν καταγράφονται στους 200°C, είναι 0.893 και 1.477 αντίστοιχα. Το έλαιο είναι ελευθέρως διαλυτό σε αιθανόλη και οξικό αιθυλεστέρα, ενώ είναι αδιάλυτο στο νερό. (Pimple *et al.*, 2012)

Περιεκτικότητα

Μια οικοφυσιολογική μελέτη έδειξε ότι η περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο του *O. majorana* ποικίλλει ανάλογα με τη συγκομιδή σε διάφορα φαινολογικά στάδια. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε μεταγενέστερο βλαστικό στάδιο χαρακτηρίζεται από υψηλότερο περιεχόμενο του αιθέριου ελαίου και ως εκ τούτου θα μπορούσε να θεωρηθεί ως το καλύτερο στάδιο για συγκομιδή των φυτών μαντζουράνας. Επιπλέον, μοντέλα *in silico* καλλιεργειών με περιορισμένη αλατότητα μπορεί να αλλάξουν σημαντικά την απαραίτητη απόδοση και τη σύνθεση σε έλαιο. Τέλος, οι αποδόσεις του αιθέριου ελαίου από το *O. majorana* αλλάζουν σημαντικά ανάλογα με την τεχνική παραγωγής που χρησιμοποιείται, όντας η υπερκρίσιμη εκχύλιση με διοξείδιο του άνθρακα η πιο αποτελεσματική διαδικασία που έχει αναφερθεί. (Beltrame *et al.*, 2013)

Σύσταση

Το αιθέριο έλαιο που λαμβάνεται από την απόσταξη με ατμό περιέχει κυρίως τερπινεν-4-όλη (> 20%) η οποία με το κατιόν του ένυδρο *cis*-σαβινενίου (3-18%) είναι υπεύθυνες για τη χαρακτηριστική γεύση και το άρωμα του ελαίου μαντζουράνας. Εκτός από αυτές τις ενώσεις, τα α - και γ -τερπινένιο και τερπινολένιο ήταν τα άλλα βασικά συστατικά, η θυμόλη και η καρβακρόλη προσδιορίστηκαν σε μικρότερες ποσότητες. (Vagi *et al.*, 2005)

Μια ευρεία ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με ντόπια μαντζουράνα από την Κύπρο αποκάλυψε την παρουσία *trans*-σαβινενίου ένυδρου / τερπινεν-4-όλης ή ένυδρο α -τερπινεόλης / *trans*-σαβινενίου ως τα κύρια χημικά συστατικά που βρέθηκαν και παράγονται στο αιθέριο έλαιο από αυτό το είδος. (Beltrame *et al.*, 2013)

Σε μια προηγούμενη μελέτη, παρατηρήθηκε ότι ποικιλίες *O. majorana* έχουν τερπινεν-4-όλη, γ -τερπινένιο, *p*-κυμένιο και α -τερπινένιο ως τα κύρια συστατικά του αιθέριου ελαίου, το οποίο με τη σειρά του έδειξε μια ενδιαφέρουσα αντιβακτηριακή δραστηριότητα έναντι του *Escherichia coli*, μέτρια δράση κατά του *Salmonella enterica*

και *Enterobacter sakazakii*, και δεν ήταν δραστικό έναντι του *Listeria monocytogenes*. (Beltrame *et al.*, 2013)

Χρήσεις

Η μαντζουράνα είναι ένα σημαντικό αρωματικό φυτό το οποίο χρησιμοποιείται συνήθως στην μαγειρική ως μπαχαρικό και καρύκευμα. Το πτητικό έλαιο χρησιμοποιείται ως αρωματικό των τροφίμων, καλλυντικών και στην παραγωγή βερμούτ και πικρών ποτών. Ως φαρμακευτικό φυτό, η μαντζουράνα έχει παραδοσιακά χρησιμοποιηθεί ως διεγερτικό και τονωτικό. Η μαντζουράνα ως πτητικό έλαιο έχει προηγουμένως αποδειχθεί ότι εμφανίζει αντιμυκητιακή δράση. (Deans *et al.*, 1990)

Χρησιμοποιείται στην ποτοποιία, για αρωματισμό χώρου σε pot pourris κ.α. Χρησιμοποιείται παραδοσιακά σαν τονωτικό, ενώ στη λαϊκή θεραπευτική σε ρευματισμούς, πονοκεφάλους, πόνους δοντιών, δυσπεψία κ.λπ. Περιέχει αιθέριο έλαιο με κύρια συστατικά *cis-sabinen-hydrate* και *terpinen-4-ol*, που χρησιμοποιείται κυρίως στην αρωματοποιία και την κοσμητολογία. (Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010)

1.3.3.4 Το αιθέριο έλαιο του θρουμπιού (*Satureja thymbra*).

Τρόπος απόσταξης-Απόδοση

Για την απομόνωση του ελαίου του φυτού *Satureja thymbra* (Lamiaceae) τα εναέρια τμήματα του φυτού ξηραίνονται στον αέρα και στο σκοτάδι και υποβάλλονται σε υδροαπόσταξη για 3 ώρες χρησιμοποιώντας συσκευή τύπου Cleverger. Το έλαιο ξηραίνεται μετά σε άνυδρο θειικό μαγνήσιο και μετά από διήθηση αποθηκεύεται στους 4 ° C μέχρι την ανάλυση. Η απόδοση φτάνει τα 0,84% (w/w). (El Beyrouthy *et al.*, 2013)

Περιεκτικότητα

Έχει αποδειχθεί ότι το ουσιαστικό περιεχόμενο του ελαίου και η σύνθεση σχετίζεται με γενετικούς, εδαφικούς, κλιματικούς παράγοντες, την τοπογραφία, το υψόμετρο, τον γονότυπο και τις συνθήκες καλλιέργειας. Διάφοροι χημειότυποι έχουν περιγραφεί για έναν αριθμό φαρμακευτικών φυτών. Επίσης, αρκετά πρόσφατα αποτελέσματα έδειξαν

ότι ορισμένα φαρμακευτικά χαρακτηριστικά φυτά μπορεί να επηρεαστούν από οικολογικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία, ο ανταγωνισμός των φυτών, το περιεχόμενο του εδάφους σε άζωτο και η καθίζηση. (Giweli *et al.*, 2012)

Σύσταση

Μέχρι στιγμής, πολλά άρθρα έχουν δημοσιευθεί και ασχολούνται με το αιθέριο έλαιο του *S. thymbra*, το οποίο έχει ένα πρασινωπό κίτρινο χρώμα. (Öztürk, 2012) Τα συστατικά του προσδιορίστηκαν ότι είναι κυρίως η καρβακρόλη, η θυμόλη, το ρ -κυμένιο, και το γ -τερπινένιο. Ωστόσο, σημαντικές διαφορές αναφέρθηκαν στην βασική σύνθεση του ελαίου σε δείγματα από διαφορετικές περιοχές. Επιπλέον, σύμφωνα με τα πρόσφατα αποτελέσματα για τη σύνθεση του αιθερίου ελαίου του είδους αυτού που συλλέγεται από δύο τοποθεσίες στην Ελλάδα, οι συγγραφείς διαπίστωσαν διαφορετικούς χημειοτύπους. (Giweli *et al.*, 2012)

Πιο συγκεκριμένα για τη σύσταση του, στο αιθέριο έλαιο προσδιορίστηκαν είκοσι πέντε συστατικά. Τα κύρια συστατικά του ελαίου είναι η καρβακρόλη, το γ -τερπινένιο, το ρ -κυμένιο, η θυμόλη, ο β -θυμυλ-μεθυλαιθέρας, το β -καρνοφυλλένιο, το α -τερπινένιο και η λιναλοόλη. Επίσης μονοτερπενοειδή και μονοτερπένια, σεσκιτερπένια καθώς και σεσκιτερπενοειδή. Πιθανώς, η παρουσία των αντιοξειδωτικών τερπενίων στο αιθέριο έλαιο πρέπει να οδηγεί στην προστασία των συστατικών του ελαίου. Με άλλα λόγια, οι εύκολα αποσυντιθέμενες πτητικές ενώσεις ενδέχεται να προστατεύονται από τα αντιοξειδωτικά μονοτερπένια και μονοτερπενοειδή. (Öztürk, 2012)

Χρήσεις

Ένας αριθμός από μελέτες έχουν επικεντρωθεί στα χημικά χαρακτηριστικά της φυσικής χλωρίδας σε μια συγκεκριμένη περιοχή ή χώρα. Το κριτήριο αυτό μπορεί να είναι χρήσιμο για την κατανόηση της δραστηριότητας των φυτών που χρησιμοποιούνται στη λαϊκή ιατρική σε διάφορα μέρη του κόσμου, και αυτό αποτελεί πολύτιμο ενδοφαρμακευτικό κριτήριο, το οποίο είναι σημαντικό για τον χαρακτηρισμό ορισμένων χημειοτύπων ελαίου. Το αιθέριο έλαιο αυτού του είδους χρησιμοποιείται στη λαϊκή ιατρική ως αντισηπτικό, τονωτικό, γαστρικό, ηρεμιστικό και διουρητικό. Επίσης, τα εναέρια μέρη ορισμένων φυτών του γένους *Satureja* έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στη λαϊκή και παραδοσιακή ιατρική, για τη θεραπεία πολλών παθήσεων, για παράδειγμα μυϊκούς πόνους, δυσπεψία, κράμπες, ναυτία, διάρροια και μολυσματικές

ασθένειες. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται παραδοσιακά ως αντιβακτηριακά για την αντιμετώπιση του κρύου και της βρογχίτιδας. (Giweli *et al.*, 2012)

Το έλαιο του *S. thymbra* έχει βρεθεί να έχει καλή αντιμικροβιακή δράση έναντι διαφόρων βακτηρίων και μυκήτων. Έχει επίσης αξιολογηθεί για ανασταλτική δραστηριότητα έναντι των SARS-CoV και HSV-1 αντιγραφή *in vitro* με οπτική βαθμολόγηση του ιού-επαγωγέα κυτταροπαθογόνων επιδράσεων μετά τη μόλυνση. Το αιθέριο έλαιο του *S. thymbra* (1%), καθώς και κλάσμα του υδρολύματος (100%) έχουν επίσης αναφερθεί να παρουσιάζουν ισχυρή βακτηριοκτόνο δράση κατά βακτηριακών βιοϋμενίων (biofilms) που σχηματίζονται σε ανοξειδωτο χάλυβα με μερικά χρήσιμα, τεχνολογικά και παθογόνα βακτήρια. Πρόσφατα, η ακαρεοκτόνος δράση του αιθερίου ελαίου του *S. thymbra* και των κύριων συστατικών καρβακρόλης και γ-τερπινενίου ελέγχθηκαν έναντι των ενηλίκων *Hyalomma marginatum* (Acari: Ixodidae). Επιπλέον, η εντομοκτόνος δράση των αιθέριων ελαίων από αυτό και τα σχετιζόμενα είδη φυτών αξιολογήθηκε έναντι τριών εντόμων αποθηκευμένου προϊόντος. (Giweli *et al.*, 2012)

Κάποια είδη του γένους *Satureja* έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στη λαϊκή φαρμακευτική. Σε γενικές γραμμές, τα είδη του γένους *Satureja* καλλιεργούνται ευρέως στις μεσογειακές περιοχές του πλανήτη. Τα *Satureja thymbra*, *Satureja cuneifolia*, *Satureja wiedemanniana*, *Satureja spicigera*, *Satureja hortensis* και *Satureja cilicica* έχουν εμπορική σημασία λόγω της χρήσης τους ως μπαχαρικά. Τα αιθέρια έλαια των ειδών αυτών του γένους *Satureja* χρησιμοποιούνται επίσης σε βιομηχανίες φαρμάκων και καλλυντικών. (Öztürk, 2012)

Μεταξύ αυτών, τα *S. thymbra*, *S. spicigera*, *S. cuneifolia*, *S. boissieri*, *S. coerulea*, *S. pilosa*, *S. icarica*, *S. wiedemanniana*, *S. hortensis* και *S. cilicica* καταναλώνονται ως μπαχαρικά ή βότανα από τους κατοίκους. Βιβλιογραφική έρευνα δείχνει ότι τα είδη του γένους *Satureja* έχουν αντιβακτηριακές, αντιμυκητιασικές, αντικές και αναλγητικές ιδιότητες. (Öztürk, 2012)

Το αιθέριο έλαιο του *S. thymbra* δείχνει πολύτιμο νυμφοκτόνο δραστηριότητα έναντι *Culex pipiens* βιότυπου *molestus*. Έχει σημαντική αντιμυκητιακή και αντιβακτηριακή δραστηριότητα και δείχνει επίσης δραστηριότητα έναντι παθογόνων μικροοργανισμών τροφίμων. Η αντιϊκή δράση του ελαίου δοκιμάστηκε επίσης και χρήσιμα αποτελέσματα έχουν βρεθεί κατά του HSV-1. Η εντομοκτόνος και γονιδιοτοξική δράση του αιθερίου ελαίου του ελληνικού και του τούρκικου *S. thymbra* έχουν αναφερθεί. (Öztürk, 2012)

Τα φαινολικά συστατικά του *S. thymbra*, ιδίως τα φλαβονοειδή τους και οι φλαβονοειδείς γλυκοζίτες, μπορεί να παρέχουν μια πιθανή πηγή αντιοξειδωτικών. Τα

συνθετικά αντιοξειδωτικά, όπως η βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (BHA), το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT), και η τριτ-βουτυλυδροκινόνη (TBHQ) έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων για να εμποδίζουν την οξειδωτική φθορά. Ωστόσο, τα BHA και BHT υπάρχει υποψία ότι θεωρούνται υπεύθυνα για βλάβη του ήπατος και καρκινογένεση. (Öztürk, 2012)

Ορισμένες χημικές ουσίες που εμφανίζονται φυσικά σε φυτά έχουν αρχίσει να λαμβάνουν μεγάλη προσοχή ως ασφαλή αντιοξειδωτικά, δεδομένου ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την προστασία του ανθρώπου από την βλάβη της οξειδωτικής καταπόνησης. (Öztürk, 2012)

1.4 Η άμυνα των φυτών

1.4.1 Συστήματα άμυνας των φυτών: προϋπάρχουσα άμυνα

Τα φυτά πρέπει να υπερασπιστούν τον εαυτό τους από ένα πλήθος παθογόνων και παρασίτων κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Τα παθογόνα μπορεί να είναι ιοί, βακτήρια, ωομύκητες ή μύκητες και μπορούν να υιοθετήσουν έναν βιοτροφικό, ημιβιοτροφικό ή νεκροτροφικό τρόπο ζωής. Οι βιότροφοι οργανισμοί τρέφονται με ζωντανά κύτταρα, διατηρώντας τη βιωσιμότητα των κυττάρων του ξενιστή, ενώ οι νεκρότροφοι βασίζονται σε νεκρούς ιστούς ως πηγή θρεπτικών συστατικών. Οι ημιβιότροφοι έχουν μια πρόωμη, παροδική βιοτροφική φάση ακολουθούμενη από μια νεκροτροφική φάση. Τα παράσιτα μπορεί να είναι ειδικά (μικρό εύρος ξενιστών) ή γενικά (μεγάλο εύρος ξενιστών), και περιλαμβάνουν έντομα μασητικού και μυζητικού τύπου (Wylie & Spreight, 2012). Εκτός από τους καθοριστικούς παράγοντες της μολυσματικής δράσης του παράγοντα εισβολής και των περιβαλλοντικών παραγόντων, η έκβαση της αλληλεπίδρασης ξενιστή-παρασίτου ή -παθογόνου εξαρτάται επίσης από την βασική και την επαγόμενη άμυνα του φυτού.

Η πρώτη γραμμή άμυνας κατά των βιοτικών εισβολέων στα φυτά είναι η προϋπάρχουσα. Τα φυτά μπορούν να έχουν ανατομικές παραλλαγές συσχετισμένες με επίπεδα ανθεκτικότητας στις ασθένειες (Fahn, 1988). Ορισμένα από αυτά τα ανατομικά χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν μηχανικούς φραγμούς στην εισβολή παρασίτων ή παθογόνων, όπως ο φλοιός, τα συστατικά πηκτίνης και λιγνίνης των κυτταρικών

τοιχωμάτων των φυτών και η επιδερμίδα των φύλλων. Άλλα ανατομικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την άμυνα περιλαμβάνουν εκκριτικά κύτταρα, αδένες και αγωγούς που παράγουν και μεταφέρουν αμυντικές ουσίες. Αυτά τα ανατομικά χαρακτηριστικά μπορεί να είναι βασικά ή επαγόμενα από τραυματισμό ή έκθεση σε παράγοντες εισβολής (Fahn 1988, Eyles *et al.*, 2004, Franceschi *et al.*, 2005, Kovalchuk *et al.*, 2013). Άλλες προϋπάρχουσες άμυνες περιλαμβάνουν την παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων και τοξικών δευτερογενών μεταβολιτών που απελευθερώνονται κατά την επίθεση εντόμων ή παθογόνων (πρόσφατη ανασκόπηση από τους Kovalchuk *et al.*, 2013).

Πέραν του ότι είναι ένα παθητικό εμπόδιο στην εισβολή των παθογόνων, τα τοιχώματα των φυτικών κυττάρων τροποποιούνται ενεργά στις θέσεις αλληλεπίδρασης με μύκητες και βακτήρια και ενισχύονται από την εναπόθεση παραθέσεων κυτταρικών τοιχωμάτων που αναφέρονται ως θηλώματα. Στην περίπτωση επιτυχούς διεξόδου των μυκήτων, σχηματίζονται δομές σχετιζόμενες με το κυτταρικό τοίχωμα, όπως οι πλάκες συγκράτησης για να σταματήσουν την εξάπλωση των παθογόνων (αναθεώρηση από τους Micali *et al.*, 2011, Underwood, 2012). Στην περίπτωση της φωτοκίας από έντομα, μερικά φυτά-ξενιστές είναι ικανά να παράγουν νεοπλάσματα (όγκους τύπου αδιαφοροποίητων κυττάρων) κάτω από το ωό, που σταματούν την είσοδο της προνύμφης (Doss *et al.*, 2000). Άλλες προϋπάρχουσες άμυνες μπορεί να περιλαμβάνουν αποθηκευμένες χημικές ουσίες που απελευθερώνονται κατά την επίθεση.

Τα αγγειόσπερμα φυτά μπορούν να έχουν μεμονωμένα κύτταρα, κοιλότητες, αγωγούς ή αδενικά τριχίδια που εκκρίνουν ουσίες όπως τερπένια, κηρούς και φλαβονοειδή. Στους αγωγούς και τις κοιλότητες, η εσωτερική στιβάδα των επιδερμικών κυττάρων εκκρίνει τις περισσότερες από αυτές τις ουσίες, αλλά μπορούν επίσης να εμπλακούν και οι άλλες στοιβάδες. Το στρώμα των εξώτατων κυττάρων μπορεί να παχυνθεί και να λειτουργήσει ως προστατευτικό περίβλημα που περιβάλλει την κοιλότητα (Fahn, 1988). Στα φύλλα ευκάλυπτου για παράδειγμα, τα αιθέρια έλαια παράγονται και αποθηκεύονται σε υποδερμικές εκκριτικές κοιλότητες. Αυτοί οι αδένες ελαίου μπορεί επίσης να εμφανιστούν στο φλοιό, την εντεριώνη, το φλοιόωμα, τις ρίζες, τους μίσχους και τις νευρώσεις του φύλλου, και τον αριθμό και τη θέση των εκκριτικών κοιλοτήτων και αγωγών, καθώς και η ηλικία κατά την οποία αυτά είναι πιο άφθονα, διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των ειδών ευκάλυπτου (Carr & Carr, 1970). Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι οι εκκριτικές κοιλότητες αρκετών ειδών ευκάλυπτου

περιέχουν όχι μόνο αιθέρια έλαια, αλλά και ρητινώδη ουσία άγνωστης λειτουργίας (Goodger *et al.*, 2009).

Εάν διαρρηχθούν οι προϋπάρχοντες μηχανισμοί άμυνας, το παθογόνο ή παράσιτο θα αντιμετώπιζε επαγόμενες αμυντικές αποκρίσεις. Οι επαγόμενες αποκρίσεις βασίζονται στην ικανότητα του φυτού να διακρίνει τον εαυτό του από κάτι ξένο, η οποία είναι ανάλογη με εκείνη που παρατηρείται στην ανοσία των ζώων (Jones & Dangl 2006). Ωστόσο, σε αντίθεση με τα ζώα, τα φυτά δεν διαθέτουν προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα που περιλαμβάνει σωματικό ανασυνδυασμό γονιδίων και δεν έχουν κυκλοφορούντα ανοσοκύτταρα. Επομένως, βασίζονται στις εγγενείς άμυνες κάθε κυττάρου για να ανταποκριθούν σε μικροβιακές ή παρασιτικές επιθέσεις. Αυτό απαιτεί αναγνώριση, επακόλουθη σηματοδότηση και παραγωγή αμυντικών προϊόντων. Η Εικόνα 1.4 απεικονίζει την αναγνώριση και τους επαγόμενους μηχανισμούς άμυνας που ακολουθούν την πρόκληση παρασίτων ή παθογόνων.

Η αναγνώριση του ξένου προς το φυτό παράγοντα εξαρτάται από την αντίληψη των γενικών παραγόντων που ονομάζονται σχετιζόμενα με παθογόνα ή μικρόβια μοριακά πρότυπα (Pathogen/Microbe-Associated Molecular Patterns, P/MAMPs, Εικόνα 1.4) ή στην περίπτωση παρασίτων εντόμων, μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με ζημιές (Damage-Associated Molecular Patterns, DAMPs, Heil, 2009) ή σχετιζόμενα με φυτοφάγα ζώα μοριακά πρότυπα (Herbivore-Associated Molecular Pattern, HAMPs, Mithöfer & Boland, 2008). Αυτά τα μοριακά πρότυπα γίνονται αντιληπτά από τους υποδοχείς αναγνώρισης (Pattern Recognition Receptors, PRRs, Εικόνα 1.4, Dardick & Ronald, 2006) και η αναγνώριση οδηγεί στη σχετικά ασθενή, μη ειδική ανοσοαπόκριση που ονομάζεται ανοσία που προκαλείται από πρότυπα (Pattern-Triggered Immunity PTI). Αυτοί οι γενικοί διεγέρτες (elicitors) είναι συνήθως μόρια που είναι απαραίτητα για τον κύκλο ζωής του εισβολέα (ανασκόπηση από Nurnberger & Lipka 2005, van Loon, 2009). Είναι ενδιαφέρον ότι η έκφραση του PRR του *Arabidopsis* γνωστού ως EF-Tu υποδοχέα που αναγνωρίζει τον βακτηριακό παράγοντα επιμήκυνσης Tu ή EF-Tu στον *Nicotiana benthamiana* Domin (καπνό) και *Solanum lycopersicum* L. (ντομάτα) αύξησε την ευρέως φάσματος αντοχή σε διάφορα φυτοπαθογόνα (Lacombe *et al.*, 2010). Υπάρχουν ενδείξεις ότι τα PRRs μεταξύ ειδών θα μπορούσαν δυνητικά να χρησιμοποιηθούν για να βελτιωθεί η αντοχή.

Μερικά παθογόνα είναι ικανά να καταστέλλουν το PTI χορηγώντας ειδικές πρωτεΐνες τελεστές στα φυτικά κύτταρα. Αυτό είναι γνωστό ως ευαισθησία που ενεργοποιείται από τον τελεστή (Jones & Dangl, 2006). Πρόσφατα στοιχεία υποδηλώνουν ότι

διάφοροι παθογόνοι παράγοντες έχουν μοιράσει παρόμοιους στόχους τελεστών εντός του ξενιστή (Dou & Zhou, 2012). Τα διάφορα επίπεδα φυτικής άμυνας στοχεύουν οι τελεστές, συμπεριλαμβανομένης της αντοχής στη διείσδυση, της αναγνώρισης από PRRs, των επιπέδων φυτορμόνης και των σημασμένων μονοπατιών, των εκκριτικών μονοπατιών του ξενιστή, του θανάτου των φυτικών κυττάρων (Dou & Zhou, 2012) και της καταστολής των τροποποιήσεων των κυτταρικών τοιχωμάτων (Truman *et al.*, 2006). Κατάκτη του PTI, οι τελεστές μπορούν να στοχεύσουν κατευθείαν τις πτυχές του ενεργοποιημένου με μιτογόνο πρωτεϊνική κινάση (MAPK) καταρράκτη (Zhang *et al.*, 2007, 2010, Wang *et al.*, 2010).

Ο δεύτερος τύπος αντίληψης του παρασίτου ή παθογόνου περιλαμβάνει την αναγνώριση των τελεστών από τις πρωτεΐνες αντοχής των φυτών (R) (Jones & Dangl, 2006, Dodds & Rathjen, 2010, Εικόνα 1.4). Έχουν ταυτοποιηθεί αρκετές κατηγορίες γονιδίων R και η πλειονότητα περιέχει περιοχή δέσμευσης νουκλεοτιδίων και επαναλαμβανόμενες περιοχές πλούσιες σε λευκίνη (Dodds and Rathjen, 2010). Η αναγνώριση με μεσολάβηση της πρωτεΐνης R οδηγεί σε μια πιο συγκεκριμένη, ταχεία και συνήθως αποτελεσματική αντίδραση άμυνας που ονομάζεται ανοσία που προκαλείται από τον τελεστή. Αυτή η απόκριση περιλαμβάνει μηχανισμούς όπως η οξειδωτική έκρηξη και η αντίδραση υπερευαισθησίας (HR, ένας τύπος προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που χρησιμεύει για τον περιορισμό της εξάπλωσης του παθογόνου παράγοντα) και σχετίζεται με εκτεταμένες αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση (Jones & Dangl, 2006, Dodds & Rathjen, 2010). Τα R γονίδια έχουν χρησιμοποιηθεί σε διάφορα είδη καλλιεργειών ως προφανώς αποτελεσματικό μέρος των στρατηγικών για τον έλεγχο διαφόρων παρασίτων και παθογόνων (Dodds & Rathjen, 2010, Stuart *et al.*, 2012) κυρίως μέσω της παρεκτροπής των γονιδίων R από τις πηγές αντοχής.

1.4.2 Σήματα άμυνας μετά από την αναγνώριση παθογόνων και παρασίτων.

Η οξειδωτική έκρηξη είναι μια από τις πιο άμεσες επαγόμενες από παθογόνο αποκρίσεις άμυνας και χαρακτηρίζεται από την ταχεία και παροδική παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ενεργών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) στη θέση της απόπειρας εισβολής παθογόνου (Wojtaszek, 1997, Εικόνα 1.4). Οι ενεργές μορφές οξυγόνου δρουν ως σήματα για την ενεργοποίηση της απόκρισης της φυτικής άμυνας και είναι ικανά να διαχέονται διαμέσου των μεμβρανών, φθάνοντας σε θέσεις

μακριά από το αρχικό σημείο παραγωγής τους (Wojtaszek, 1997). Η δημιουργία των ROS προάγει τη συσσώρευση σαλικυλικού οξέος (SA) και μεταγραφικών γονιδίων σχετιζόμενων με παθογένεση (Pathogenesis-Related PR) (Chen *et al.*, 1995, Maleck & Dietrich, 1999). Η οξειδωτική έκρηξη είναι άμεσα επιβλαβής για τα εισβάλλοντα παθογόνα και συμβάλλει επίσης στον κυτταρικό θάνατο, καθώς οι ROS που παράγονται μέσω της οξειδωτικής έκρηξης διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη μιας αντίδρασης υπερευαισθησίας HR (Lamb & Dixon 1997, Grant & Loake 2000, Lecourieux *et al.*, 2002). Το οξείδιο του αζώτου (NO) είναι επίσης ένας βασικός παράγοντας στην ανάπτυξη της HR (Εικόνα 1, Delledonne *et al.*, 2001). Ενώ η HR είναι αποτελεσματική στην καταπολέμηση της εξάπλωσης των βιοτροφικών παθογόνων, συμβάλλει στη μολυσματικότητα των νεκροτροφικών παθογόνων επειδή εμπλέκει τον κυτταρικό θάνατο (Mengiste, 2012). Ως εκ τούτου, είναι πολύ σημαντικό για τον ξενιστή να είναι σε θέση να προσαρμόσει τις αποκρίσεις του στο είδος του εισβάλλοντος παθογόνου.

Το ασβέστιο (Ca^{2+}) είναι ένας άλλος σημαντικός δευτερεύων αγγελιοφόρος στην άμυνα των φυτών. Οι συγκεκριμένες αλλαγές στις χωρικές και χρονικές συγκεντρώσεις κυτοσολικού ασβεστίου που προκύπτει από διάφορα μονοπάτια σηματοδότησης που αναφέρονται ως «υπογραφές ασβεστίου» οι οποίες πιστεύεται ότι κωδικοποιούν ειδικές πληροφορίες ως ερέθισμα (έχει αναθεωρηθεί από τους Lecourieux *et al.*, 2006). Ωστόσο, οι διεγέρτες (ουσίες που διεγείρουν την άμυνα των φυτών) είναι σε θέση να επάγουν αυξήσεις στις συγκεντρώσεις των δύο μορφών του κυτοσολικού και του πυρηνικού Ca^{2+} , γεγονός που υποδηλώνει ότι τα επίπεδα του πυρηνικού Ca^{2+} είναι επίσης σημαντικά κατά τη διάρκεια της άμυνας (Lecourieux *et al.*, 2006). Με ενδιαφέρον ότι έχει προταθεί ότι αυτές οι παρατεταμένες αυξήσεις στην κυτοσολική συγκέντρωση του Ca^{2+} επάγουν παρόμοιες αποκρίσεις άμυνας ανεξάρτητα από τον διεγέρτη (Ma & Berkowitz, 2007, Εικόνα 1.4). Αν και δεν είναι ακόμη σαφές με ποιό τρόπο οι αλλαγές στη συγκέντρωση του ασβεστίου αυξάνουν τις αμυντικές αποκρίσεις, έχουν προταθεί ορισμένοι πιθανοί μηχανισμοί. Για παράδειγμα, αλλαγές στα επίπεδα κυτοσολικού ασβεστίου επηρεάζουν επίσης την έκφραση των γονιδίων PR, συσσώρευση φυτοαλεξινών (Mithöfer *et al.*, 1999, Blume *et al.*, 2000) και αντίδραση υπερευαισθησίας που σχετίζονται με τον κυτταρικό θάνατο (Grant & Loake 2000, Lecourieux *et al.*, 2002).

Μόλις ανιχνευθεί παθογόνο, τα MAPKs μεταφράζουν το εξωκυτταρικό σήμα, το οποίο γίνεται αντιληπτό από έναν υποδοχέα μεμβράνης πλάσματος μέσω ενός φωσφο-

αναμεταδότη τριών τύπων αναστρέψιμα φωσφορυλιωμένων κινασών: MAPK, MAPK κινάση (MAPKK) και MAPKK κινάση (MAPKKK). Αυτό οδηγεί στη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών του υποστρώματος, προκαλώντας μια σειρά αποκρίσεων που εμπλέκουν την υποκυτταρική αναδιαμόρφωση, η οποία συμβαίνει λίγο μετά τη μεταγωγή σήματος, και η γονιδιακή έκφραση, η οποία εμφανίζεται σε μεταγενέστερα στάδια της αμυντικής αντίδρασης (ανασκόπηση στους Rodriguez *et al.*, 2010, Samajova *et al.*, 2013), Εικόνα 1.4). Τα MAPKs μπορούν να στοχεύσουν διάφορες πρωτεΐνες τελεστές στο κυτταρόπλασμα ή στον πυρήνα, όπως άλλες κινάσες, ένζυμα και παράγοντες μεταγραφής (Transcription Factors, TFs, Rodriguez *et al.*, 2010).

Διάφορες φυτορμόνες εμπλέκονται στην ενίσχυση του αρχικού αμυντικού σήματος, συμπεριλαμβανομένου του ιασμονικού οξέος (JA), του αιθυλενίου (ET) και του σαλικιλικού οξέος (SA) (Εικόνα 1.4). Ένας μεγάλος αριθμός μελετών που διεξήχθησαν σε διάφορους ξενιστές έχει δείξει ότι υπάρχει μια ανταγωνιστική σχέση μεταξύ SA και JA (Pieterse *et al.*, 2012). Στο φυτό *Arabidopsis*, ο ανταγωνισμός αυτός ελέγχεται εν μέρει από το ET και εξαρτάται από τη συγκέντρωση κάθε ορμόνης (Pre *et al.*, 2008, Leon-Reyes *et al.*, 2010).

Στο *Arabidopsis*, το SA απαιτείται για αντοχή στις ασθένειες των ημι- και βιοτροφικών, ενώ τα JA και ET είναι απαραίτητα για την άμυνα εναντίον νεκροτροφικών (Glazebrook 2005, Mengiste 2012, Pieterse *et al.*, 2012). Παρόλο που αυτό ισχύει για την πλειονότητα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ φυτών και παθογόνων, εντοπίστηκαν ορισμένες εξαιρέσεις στα είδη δένδρων. Στο *Populus* (λεύκα), JA και ET απαιτούνται για την άμυνα κατά των βιοτροφικών μυκήτων σκωρίασης στο γένος *Melampsora* (Azaiez *et al.*, 2009). Ομοίως, SA απαιτείται για την άμυνα ενάντια στο ύποπτο μυκητιακό νεκροτροφικό παθογόνο *C. austroafricana* στον ευκάλυπτο (Naidoo *et al.* 2013). Είναι πιθανό ότι οι σχέσεις μεταξύ των φυτοορμονών και της ισορροπίας που απαιτούνται για τη διατήρηση μιας αποτελεσματικής αμυντικής απόκρισης μπορεί να είναι πιο σύνθετες στα ξυλώδη είδη δέντρων απ' ό,τι στο μη ξυλώδες μοντέλο φυτό *Arabidopsis*. Επιπλέον, προκύπτουν ενδείξεις που υποδηλώνουν την εμπλοκή άλλων φυτοορμονογόνων, όπως τα μπρασισινοστεροειδή, οι αυξίνες, οι κυτοκινίνες, οι γιββερελίνες (GAs) και το αμπισικό οξύ, στη διατήρηση της ομοιόστασης μεταξύ των σημασμένων βιοχημικών οδών κατά τη διάρκεια της αναφαινόμενης άμυνας. Θα απαιτηθεί περαιτέρω διερεύνηση για τον ακριβέστερο προσδιορισμό των λειτουργιών αυτών των ορμονών που σχετίζονται με την άμυνα (Bari & Jones 2009, Denancé *et al.*,

2013). Τα παθογόνα είναι επίσης ικανά να στοχεύουν τα συστατικά των σημασμένων βιοχημικών οδών του ξενιστή προκειμένου να αποφεύγουν την άμυνα του ξενιστή.

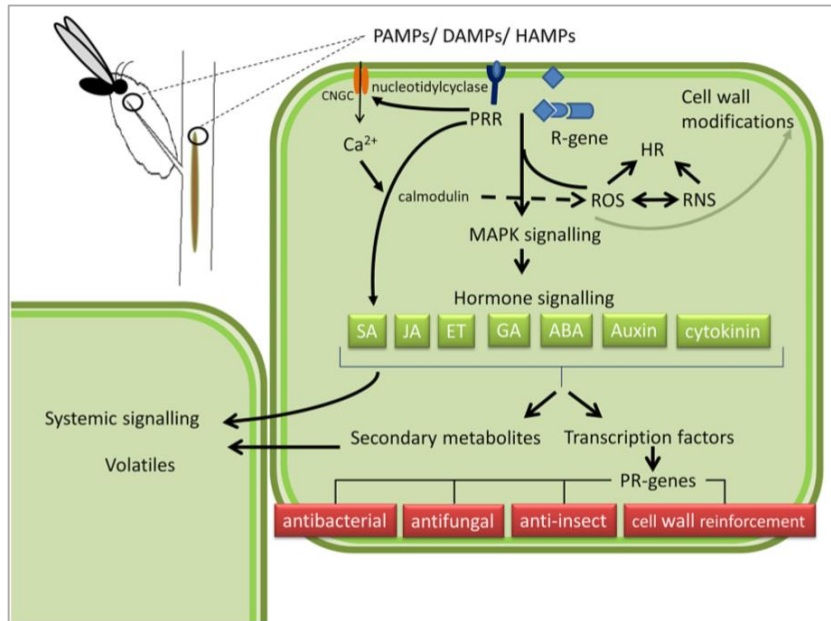
Εκτός από τις τοπικές αντιδράσεις στις απειλές και στα παθογόνα, τα φυτά είναι ικανά να ενεργοποιήσουν τρεις κύριες σημασμένες βιοχημικές οδοί που επάγουν την αντοχή σε ιστούς απομακρυσμένους προς την αρχική θέση της επίθεσης (Eyles *et al.*, 2010, Spoel & Dong, 2012). Οι βιοχημικές οδοί που οδηγούν σε επαγόμενη αντοχή στα φυτά είναι η διασυστηματική επίκτητη αντοχή (Systemic Acquired Resistance, SAR), επαγόμενη διασυστηματική αντοχή (Induced Systemic Resistance, ISR) και διασυστηματική επαγόμενη αντοχή (Systemic Induced Resistance, SIR. Eyles *et al.*, 2010). Η διασυστηματική επίκτητη ανθεκτικότητα προκύπτει κυρίως από τις σημασμένες βιοχημικές οδούς του SA κατά τη διάρκεια της αντίδρασης υπερευαισθησίας (Ryals *et al.*, 1996, Mishina & Zeier, 2007). Η διασυστηματική επίκτητη αντοχή και οι συναφείς με την SA αμυντικές αποκρίσεις συνδέονται παραδοσιακά με την άμυνα κατά των βιοτροφικών παθογόνων. Η επαγόμενη διασυστηματική αντοχή καθιερώνεται και διατηρείται μέσω σημασμένων βιοχημικών οδών των JA / ET που επάγονται από μη παθογόνα ριζοβακτήρια και μύκητες που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών ή ορισμένα νεκρωτικά παθογόνα (Thatcher *et al.*, 2005, van Loon, 2007, van Wees *et al.*, 2008). Η διασυστηματική επαγόμενη αντοχή διαφέρει από την ISR, κυρίως επειδή επάγεται από βιοτικές πληγές (π.χ. από φυτοφάγα ζώα) και αβιοτικές (μηχανικές) πληγές, ενώ η ISR δεν επάγεται από αβιοτικές πληγές (Gurr & Rushton, 2005, van Loon, 2007). Η διασυστηματική επίκτητη αντοχή, η ISR και η SIR και οι τρεις καταλήγουν στο έναυσμα, το φαινόμενο κατά το οποίο τα κατάλληλα ερεθίσματα επάγουν κυτταρικές αποκρίσεις άμυνας σε ιστούς μακριά από το σημείο της διέγερσης καθώς και σε γειτονικά φυτά (Poza *et al.*, 2008). Δεδομένου ότι αυτό το φαινόμενο του έναυσματος θα μπορούσε να αξιοποιηθεί για την προστασία των ασθενειών, οι επιδράσεις διαφόρων βιοτικών και αβιοτικών επαγογέων έχουν διερευνηθεί σε ένα ευρύ φάσμα ειδών καλλιέργειας (ανασκόπηση από τους Walters *et al.*, 2013).

Οι πρωτεΐνες παθογένεσης είναι ένα άλλο σημαντικό μέρος του φυτικού ανοσοποιητικού συστήματος (Εικόνα 1.4). Υπάρχουν 17 επί του παρόντος γνωστές οικογένειες PR πρωτεϊνών (PR-1 έως -17) σε φυτά (ανασκοπείται από τον van Loon, 2009) και μια πιθανή PR-18 οικογένεια στο *Helianthus annuus* L. (ηλίανθος) και στο *Amaranthus caudatus* L. (αμάρανθος αλωπέκουρου) (Custers *et al.*, 2004, van Loon *et al.*, 2006). Το γονίδιο PR-1 χρησιμοποιείται συχνά ως διαγνωστικός δείκτης της

έναρξης της σήμανσης του SA. Στο φυτό *Arabidopsis*, η όξινη ισομορφή επάγεται με εφαρμογή με SA ενώ η βασική ισομορφή καταστέλλεται (Selitrennikoff, 2001). Οι PR-5 πρωτεΐνες, οι οποίες είναι μέρος της μεγάλης οικογένειας πρωτεϊνών που ομοιάζουν με θαυματίνη, έχουν αποδειχθεί προηγουμένως ότι έχουν δραστηριότητα εναντίον παθογόνων μυκήτων και ωομυκήτων. Για παράδειγμα, η υπερεκφράση μιας πρωτεΐνης ομοιάζουσας με θαυματίνη από το φυτό *Camellia sinensis* (Linnaeus) O. Kuntze (φυτό τσαγιού) παρείχε αυξημένη ανοχή στον *P. infestans* στην πατάτα (Acharya *et al.*, 2013) και η έκφραση του PdPR5 στο *Prunus domestica* L (Ευρωπαϊκό δαμάσκηνο) διευκόλυνε την αντοχή στην καστανή σήψη που προκλήθηκε από τον νεκροτροφικό μύκητα *Monilinia fructicola* (El-kereamy *et al.*, 2011). Οι πρωτεΐνες PR-9 είναι υπεροξειδάσες, οι οποίες εμπλέκονται στη διασταυρούμενη σύνδεση των πολυσακχαριτών και την επέκταση των μονομερών φαινυλοπροπανοειδούς κατά την ενίσχυση του κυτταρικού τοιχώματος (Passardi *et al.*, 2004). Ορισμένα μέλη αυτής της ομάδας, όπως το AtPRX33, συμμετέχουν επίσης στο PTI. Οι πρωτεΐνες PR-7 είναι παρόμοιες με αυτές της οικογένειας PR-6 και θεωρούνται αναστολείς πρωτεΐνάσης, οι οποίες είναι σημαντικές για την άμυνα ενάντια στα έντομα (Ryan, 1990). Οι πρωτεΐνες PR-8 (όπως οι PR-3, PR-4 και PR-11 πρωτεΐνες) είναι χιτινάσες που υδρολύουν την β-1,4 σύνδεση μεταξύ υπολειμμάτων N-ακετυλογλυκοζαμίνης της μυκητιακής χιτίνης (van Loon 2009). Οι πρωτεΐνες PR-15 εμπλέκονται στην παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂), το οποίο είναι τοξικό για τα παράσιτα και τα παθογόνα (van Loon, 2009). Οι πρωτεΐνες PR-17 από το *Hordeum vulgare* L. (κριθάρι) έχουν αντιμυκητική δράση έναντι του παθογόνου *Blumeria graminis* (Christensen *et al.*, 2002). Ομοίως, η PR-17 πρωτεΐνη NtPRp27 από τον καπνό συσσωρεύεται στην απόκριση προς ική μόλυνση (Okushima *et al.* 2000), ενώ η πρωτεΐνη WCI-5 από το σιτάρι συσσωρεύεται στην απόκριση σε μυκητιασική μόλυνση (Göflach *et al.*, 1996).

Η φυτική άμυνα είναι δαπανηρή για τον ξενιστή και ως εκ τούτου το φυτό επενδύει σε μηχανισμούς για να τελειοποιήσει τις αποκρίσεις του για τον αποτελεσματικό έλεγχο της εξάπλωσης παρασίτων και παθογόνων, διατηρώντας παράλληλα τους κυτταρικούς του πόρους. Οι μεταγραφικοί παράγοντες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε αυτούς τους μηχανισμούς, συντονίζοντας την έκφραση των σχετιζόμενων με την άμυνα γονιδίων στην απόκριση της εισβολής (Εικόνα 1.4). Οι επιγενετικές τροποποιήσεις προσθέτουν ένα άλλο επίπεδο πολυπλοκότητας στη ρύθμιση της άμυνας του ξενιστή (Beir *et al.*, 2012). Ωστόσο, η πλειονότητα των μελετών που σχετίζονται με την επιγενετική γονιδιακή ρύθμιση στα φυτά έχουν επικεντρωθεί σε οργανισμούς

μοντέλα, πούδη φυτά (Holeski *et al.*, 2012) ή σε αποκρίσεις αβιοτικής καταπόνησης (Bräutigam *et al.*, 2013). (Naidoo *et al.*, 2014)



Εικόνα 1.4: Απλοποιημένη σχηματική απεικόνιση επαγόμενων αποκρίσεων των κυττάρων του ξενιστή στα παράσιτα και παθογόνα. (Naidoo *et al.*, 2014)

1.5 Σκοπός της μεταπτυχιακής μελέτης.

Το αντικείμενο της παρούσας μελέτης είναι η αξιολόγηση *in vitro* της επίδρασης που έχουν τα αιθέρια έλαια των αρωματικών φυτών της οικογένειας Lamiaceae (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Origanum majorana*, *Coridothymus capitatus*, *Satureja thymbra*) στην ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα *Verticillium dahliae* και των βακτηρίων *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* και *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, μικροοργανισμών οι οποίοι προκαλούν σημαντικές ασθένειες των φυτών. Επίσης, έγινε αξιολόγηση *in vivo* της επίδρασης δύο αιθερίων ελαίων (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Coridothymus capitatus/Thymus vulgaris*) στην αντιμετώπιση των ασθενειών της βακτηριακής στιγμάτωσης της τομάτας, της αδρομύκωσης-βερτισιλλίωσης της μελιτζάνας και του βακτηριακού έλκους της τομάτας, που προκαλούνται από το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, τον μύκητα *Verticillium dahliae* και το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* αντίστοιχα και στην εξέλιξη της ανάπτυξης των φυτών. Η ταυτοποίηση της παρουσίας του μύκητα και των βακτηρίων στα φυτά καθώς και η μοριακή ταυτοποίηση του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* με την μέθοδο PCR. Τέλος κρίθηκε σημαντικό να γίνει διερεύνηση της επαγωγής της άμυνας των φυτών από την εφαρμογή του αιθερίου ελαίου του φυτού *Thymus vulgaris* στις συγκεντρώσεις 1000ppm, 2000ppm και 3000ppm σε φυτάρια τομάτας με την μέθοδο Real Time PCR.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά

2.1.1 Αιθέρια έλαια

Στο πείραμα μελετήθηκε η αποτελεσματικότητα που έχουν τα αιθέρια έλαια στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης των μυκήτων και των βακτηρίων *in vitro* αλλά και *in vivo* στο θερμοκήπιο. Τα αιθέρια έλαια για τις ανάγκες του πειράματος παραχωρήθηκαν από το Εργαστήριο Χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και το φυτικό υλικό για να γίνει η εκχύλιση είναι ελληνικής προελεύσεως. Έτσι τα αιθέρια έλαια που χρησιμοποιήθηκαν είναι καθαρά (pure) εκχυλίσματα ρίγανης (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*), θυμαριού (*Coridothymus capitatus*, *Thymus vulgaris*), θρουμπιού (*Satureja thymbra*) και μαντζουράνας (*Origanum majorana*). Για την καλύτερη διεξαγωγή του πειράματος στις δοκιμές *in vitro* δημιουργήθηκαν διαλύματα αναφοράς (stock solutions) και ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν αιθυλική αλκοόλη >99%. Η αναλογία που εφαρμόστηκε στο κάθε διάλυμα αναφοράς ήταν 500mg αιθερίου ελαίου σε 5ml αιθυλικής αλκοόλης. Οι συγκεντρώσεις των αιθερίων ελαίων μετρούνται σε ppm (parts per milliom).

Όσον αφορά τα αιθέρια έλαια που χρησιμοποιήθηκαν η μέθοδος παραλαβής τους ήταν η υδροαπόσταξη ξηρής δρόγης σε συσκευή Clevenger συνολικής διάρκειας 3 ωρών. Πιο συγκεκριμένα το αιθέριο έλαιο της ρίγανης προέρχεται από φυτά του είδους *Origanum vulgare* (άγριο-αυτοφύες) με περιοχή καλλιέργειας την Αρχαία Ολυμπία, απόδοση 8,8 ml/100g ξηρό βάρος και κύρια συστατικά τη θυμόλη σε ποσοστό 50,7% και την καρβακρόλη σε ποσοστό 33,3%. Το αιθέριο έλαιο του θυμαριού προέρχεται από φυτά του είδους *Coridothymus capitatus* (άγριο-αυτοφύες) με περιοχή καλλιέργειας την Ηγουμενίτσα, απόδοση 3,1 ml/100g ξηρό βάρος και κύριο συστατικό την καρβακρόλη σε ποσοστό 94,7%. Το αιθέριο έλαιο του θρουμπιού προέρχεται από φυτά του είδους *Satureja thymbra* (καλλιεργούμενο) με περιοχή καλλιέργειας την Καρδίτσα, απόδοση 2,8 ml/100g ξηρό βάρος και κύρια συστατικά το π -κυμένιο σε ποσοστό 13,2%, το γ -τερπινένιο σε ποσοστό 30,0% και την καρβακρόλη σε ποσοστό 34,3%. Το αιθέριο έλαιο της μαντζουράνας προέρχεται από φυτά του είδους *Origanum majorana* (καλλιεργούμενο) με περιοχή καλλιέργειας την Αττική, απόδοση 4,7 ml/100g ξηρό βάρος και κύρια συστατικά το γ -τερπινένιο σε ποσοστό 15,1%, την λιναλοόλη σε ποσοστό 8,0%, την τερπινεν-4-όλη 11,5% και την καρβακρόλη σε ποσοστό 42,5 %.

Για τις εφαρμογές στο θερμοκήπιο χρησιμοποιήθηκαν τα αιθέρια έλαια της ρίγανης και του θυμαριού. Εκτός από αυτά τα δύο αιθέρια έλαια που αναφέρθηκαν αναλυτικά ανωτέρω εφαρμόστηκαν επίσης το αιθέριο έλαιο της ρίγανης που προέρχεται από φυτά του είδους *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* με περιοχή καλλιέργειας τα Φιλιατρά της Πελοποννήσου, απόδοση 7,7 ml/100g ξηρό βάρος και κύρια συστατικά την καρβακρόλη σε ποσοστό 72,2%, το π -κυμένιο σε ποσοστό 16,9% και το γ -τερπινένιο σε ποσοστό 6,9% και το αιθέριο έλαιο του θυμαριού που προέρχεται από φυτά του είδους *Thymus vulgaris* με περιοχή καλλιέργειας την Ορεστιάδα του Έβρου, απόδοση 2,2 ml ελαίου/100g ξηρό βάρος του φυτικού υλικού και κύρια συστατικά τη θυμόλη σε ποσοστό 50%, το π -κυμένιο σε ποσοστό 28,5%, το γ -τερπινένιο σε ποσοστό 6,5% και την καρβακρόλη στο 3,3%.

2.1.2 Βιολογικό υλικό

Για την υλοποίηση του πειράματος της *in vitro* αξιολόγησης στο εργαστήριο χρησιμοποιήθηκαν στελέχη φυτοπαθογόνου μύκητα και βακτηρίων. Ο μύκητας που

χρησιμοποιήθηκε είναι ο *Verticillium dahliae* και τα βακτήρια είναι το *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* το στέλεχος N28 και το *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Ο μύκητας και τα βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη διατέθηκαν από τη συλλογή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Επίσης, έγινε η εφαρμογή αυτών των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών στο θερμοκήπιο (*in vivo*). Όμως το στέλεχος του μύκητα *Verticillium dahliae* που εφαρμόστηκε *in vivo* είναι το 70V, ανήκει στην φυλή 1 και απομονώθηκε από βαμβάκι. Το στέλεχος του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* είναι το 4257 το οποίο απομονώθηκε από τομάτα και στάλθηκε από το Τ.Ε.Ι. Κρήτης. Ενώ χρησιμοποιήθηκε το ίδιο στέλεχος του *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* και για την *in vivo* εφαρμογή.

2.1.3 Θρεπτικά υλικά

Για την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα και των βακτηρίων σε συνθήκες εργαστηρίου απαιτήθηκε η παρασκευή τεχνητών θρεπτικών υλικών σε στερεή μορφή. Για την ανάπτυξη και καλλιέργεια του μύκητα *Verticillium dahliae* χρησιμοποιήθηκε το τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα από εκχύλισμα πατάτας Potato Dextrose Agar (P.D.A.). Για την ανάπτυξη και καλλιέργεια των βακτηρίων *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* και *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* το Nutrient Agar Glucose (N.A.G.). Για την ανάπτυξη του φυτοπαθογόνου μύκητα και των βακτηρίων σε συνθήκες θερμοκηπίου απαιτήθηκε η παρασκευή τεχνητών θρεπτικών υλικών σε υγρή μορφή. Για την εφαρμογή του μύκητα στα φυτά τομάτας χρησιμοποιήθηκε το υγρό τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα Sucrose Sodium Nitrate (S.S.N.). Για την εφαρμογή του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* χρησιμοποιήθηκε το Nutrient Glucose (N.G.) και του *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* το King's Medium B (KsB). Για να διατηρηθούν τα βακτήρια μέχρι την μόλυνση στα φυτάρια χρειάστηκε να παρασκευασθεί φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα.

2.1.3.1 Παρασκευή θρεπτικού υλικού P.D.A.

Για να παρασκευαστεί 1 λίτρο θρεπτικού υλικού Potato Dextrose Agar (P.D.A.), απαιτήθηκε να γεμίσει μια κωνική φιάλη του ενός λίτρου (1l) με 500ml απεσταγμένο νερό, όπου προστέθηκαν 200g πατάτα καθαρισμένη και τεμαχισμένη σε μικρά κομμάτια και ακολούθησε βρασμός για 45'. Μετά έγινε διήθηση του περιεχομένου της κωνικής χρησιμοποιώντας υφασμάτινο πλέγμα για να διαχωριστεί το υγρό εκχύλισμα από τα κομμάτια πατάτας. Προστέθηκε 20g δεξτρόζη, αναδεύτηκε το διάλυμα για ομογενοποίηση και συμπληρώθηκε με νερό σε ογκομετρικό κύλινδρο μέχρι να φτάσει τα 1000ml. Μετά προστέθηκαν και 20g Άγαρ και μοιράστηκε το διάλυμα στις κωνικές που χρειάστηκε να χωριστεί και τοποθετήθηκε σε κλίβανο αποστείρωσης στους 121°C υπό πίεση 1,2 atm για 20'. Ακολούθως στο θρεπτικό υλικό P.D.A., όντας λιωμένο πριν διανεμηθεί στα τρυβλία, σε θερμοκρασία 50°C, προστέθηκε συγκεκριμένη ποσότητα από το διάλυμα αναφοράς (stock solution) που περιείχε αιθέριο έλαιο στην απαιτούμενη συγκέντρωση και διαλύτη αιθυλική αλκοόλη.

2.1.3.2 Παρασκευή θρεπτικού υλικού N.A.G.

Για την παρασκευή 1 λίτρου Nutrient Agar Glucose (N.A.G.) χρησιμοποιήθηκαν: 8g Nutrient Broth, 20g γλυκερόλης (Glycerol) και 20g Άγαρ. Σε μια κωνική φιάλη προστέθηκε το απεσταγμένο νερό και στη συνέχεια τα συστατικά αναδεύοντας μέχρι πλήρους διάλυσης, μοιράστηκε το διάλυμα στις κωνικές που χρειάστηκε να χωριστεί και τοποθετήθηκε σε κλίβανο αποστείρωσης στους 121°C, υπό πίεση 1,2 atm για 20'. Ακολούθως στο θρεπτικό υλικό N.A.G., όντας λιωμένο πριν διανεμηθεί στα τρυβλία, σε θερμοκρασία 50°C, προστέθηκε συγκεκριμένη ποσότητα από το διάλυμα αναφοράς (stock solution) που περιείχε αιθέριο έλαιο στην απαιτούμενη συγκέντρωση και διαλύτη αιθυλική αλκοόλη.

2.1.3.3 Παρασκευή θρεπτικού υλικού K's B

Για την παρασκευή 1 λίτρου στερεού θρεπτικού υποστρώματος King's Medium B απαιτήθηκαν: 20g πρωτεΐνη πεπτόνης, 10g γλυκερόλη, 1,5g μονόξινο φωσφορικό κάλιο (K_2HPO_4), 1,5g επταένυδρο θειικό μαγνήσιο ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) και 20g Άγαρ. Ρυθμίστηκε σε pH 7,2, τοποθετήθηκε σε κλίβανο αποστείρωσης σε θερμοκρασία 121°C και πίεση 1,2 Atm για 20'. Για την παρασκευή του υγρού θρεπτικού

υποστρώματος χρησιμοποιούνται τα ίδια υλικά εκτός από Άγαρ και ακολουθήται ίδια διαδικασία.

2.1.3.4 Παρασκευή θρεπτικού υλικού S.S.N.

Για την παρασκευή 850ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος SSN (Sucrose Sodium Nitrate), σε κωνική φιάλη 2 λίτρων προστέθηκαν 850 ml απεσταγμένου νερού, 12,75g σουκρόζης ($C_{12}H_{22}O_{11}$) (Serva), 0,85g δισόξινου φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4) (Ferak Berlin), 1,7g νιτρικού νατρίου ($NaNO_3$) (Merck), 0,43g χλωριούχου καλίου (KCL) (Merck) και 0,85ml διαλύματος ιχνοστοιχείων (Trace element solution). Για την παρασκευή του διαλύματος ιχνοστοιχείων (Trace element solution), σε 100ml απεσταγμένου νερού προστέθηκαν 249mg ένυδρου θειικού σιδήρου ($FeSO_4 \times 7H_2O$) (Merck), 40mg ένυδρου θειικού χαλκού ($CuSO_4 \times 5H_2O$) (Mallinckrodt), 44mg ένυδρου θειικού ψευδαργύρου ($ZnSO_4 \times 7H_2O$) (B.D L.T.D), 41mg ένυδρου θειικού μαγγανίου ($MgSO_4 \times 4H_2O$) (Merck) και 51mg ένυδρου μολυβδαινικού νατρίου ($NaMoO_4 \times 2H_2O$) (Merck). Το διάλυμα ιχνοστοιχείων (Trace element solution) διατηρήθηκε στους 4°C. Το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα S.S.N. τοποθετήθηκε σε κλίβανο αποστείρωσης σε θερμοκρασία 121°C και πίεση 1,2 Atm για 20'.

2.1.3.5 Παρασκευή θρεπτικού υλικού N.G.

Για την παρασκευή 1 λίτρου υγρού θρεπτικού υλικού Nutrient Glucose (N.G.) χρησιμοποιήθηκαν: 8g Nutrient Broth και 20g γλυκερόλης (Glycerol). Σε μια κωνική φιάλη προστέθηκε το απεσταγμένο νερό και στη συνέχεια τα συστατικά αναδεύοντας μέχρι πλήρους διάλυσης, μοιράστηκε στις κωνικές που απαιτούνταν να χωριστεί το διάλυμα και τοποθετήθηκε σε κλίβανο αποστείρωσης στους 121°C, υπό πίεση 1,2 atm για 20'.

2.1.3.6 Παρασκευή φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος

Για την παρασκευή φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος 1 λίτρου απαιτήθηκαν: 4,96g φωσφορικό νάτριο (Na_2HPO_4) και 2,72g φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4).

Ρυθμίστηκε σε pH 7,02, τοποθετήθηκε σε κλίβανο αποστείρωσης σε θερμοκρασία 121°C και πίεση 1,2 Atm για 20΄.

2.1.4 Φυτικό υλικό

Για την πραγματοποίηση των εφαρμογών αιθερίων ελαίων στο θερμοκήπιο το φυτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν φυτάρια μελιτζάνας *Solanum melongena* ποικιλίας Black Beauty και φυτάρια τομάτας *Solanum lycopersicum* L. ποικιλίας Alisa Craig που παραγγέλθηκαν από την Thomson and Morgan Ltd. (U.K.) με τις επεμβάσεις να πραγματοποιούνται όταν τα φυτάρια βρισκόντουσαν στο 2^ο πραγματικό φύλλο. Οι σπόροι μέχρι να χρησιμοποιηθούν αποθηκεύτηκαν σε ψυγείο στους 4°C και φυτεύτηκαν κατευθείαν σε γλαστράκια των 9cm. Στο θερμοκήπιο η θερμοκρασία που αναπτύχθηκαν τα φυτά ήταν $25 \pm 1^\circ \text{C}$.

2.1.5 Προετοιμασία αιθερίων ελαίων για εφαρμογή στο θερμοκήπιο.

Για να εφαρμοσθούν τα αιθέρια έλαια της ρίγανης (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*) και του θυμαριού (*Coridothymus capitatus* ή *Thymus vulgaris*) σε φυτά στο θερμοκήπιο χρειάστηκε να ετοιμαστεί πρώτα το διάλυμα που περιέχει την απαιτούμενη ποσότητα νερού αναλογικά για 10ml ανά φυτάριο και 0,5% DMSO διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethylsulfoxide) και 0,5% Tween 20. Οι συγκεντρώσεις των αιθερίων ελαίων που εξετάστηκαν για εφαρμογή σε φυτάρια στο θερμοκήπιο ήταν 500ppm (μg/ml), 1000ppm, 2000ppm και 3000ppm.

2.1.6 Προετοιμασία του μύκητα *Verticillium dahliae* πριν την εφαρμογή του στα φυτάρια τομάτας.

Αφού αποστειρώθηκε το θρεπτικό υλικό S.S.N. μεταφέρθηκαν ασηπτικά τμήματα από καλλιέργεια του μύκητα *Verticillium dahliae* λίγων ημερών σε τρυβλίο με P.D.A.

Μετά η κωνική που περιείχε το υλικό με τον μύκητα επώαστηκε σε περιστρεφόμενο επωαστικό θάλαμο στις 152 στροφές/λεπτό, σε θερμοκρασία 25°C και σε συνθήκες σκότους για 5 ημέρες. Αφού πέρασαν οι πέντε ημέρες έγινε η απομάκρυνση του μυκηλίου με διήθηση της καλλιέργειας μέσω ηθμού (υφασμάτινο πλέγμα) με κατάλληλη διάμετρο πόρων. Η συγκέντρωση των κονιδίων προσδιορίστηκε με τη χρήση αιματοκυτταρόμετρου και μικροσκοπίου. Η τελική συγκέντρωση των σπορίων του *Verticillium dahliae* που χρησιμοποιήθηκε στο υπόστρωμα ανάπτυξης για την μόλυνση των φυτών ήταν 10^6 σπόρια/ml.

2.1.7 Προετοιμασία του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* πριν την εφαρμογή του στα φυτάρια τομάτας.

Το βακτήριο καλλιεργήθηκε σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό King's medium B και με τα αντιβιοτικά rifampicin (10mg/ml) και kanamycin (50mg/ml) σε ποσότητες 1000μl και 100μl αντίστοιχα για 100ml θρεπτικού υλικού. Έπειτα μεταφέρθηκε με οδοντογλυφίδες σε φιαλίδια (falcons) των 10ml παρουσία των αντιβιοτικών σε ποσότητες 40μl και 4μl αντίστοιχα σε 4ml υγρού θρεπτικού υλικού King's medium B. Τα φιαλίδια (falcons) τοποθετήθηκαν στον περιστρεφόμενο επωαστικό θάλαμο στους 28°C, στις 165 στροφές/λεπτό για μια ημέρα. Ύστερα μεταφέρθηκε μικρή ποσότητα σε κωνικές με 100ml υγρού θρεπτικού διαλύματος King's medium B η κάθε μια και 1000μl rifampicin και 100μl kanamycin, όπου τοποθετούνται στον περιστρεφόμενο επωαστικό θάλαμο στις ίδιες συνθήκες για 24 ώρες. Την επόμενη ημέρα φυγοκεντρήθηκε για 10', στους 20-30°C, στις 5000 στροφές και επαναιωρήθηκε σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα. Έγινε φωτομέτρηση και η τελική συγκέντρωση του αιωρήματος βακτηριακών κυττάρων σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα του *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* που χρησιμοποιήθηκε στο υπόστρωμα ανάπτυξης για την μόλυνση των φυτών ήταν 10^8 cfu/ml.

2.1.8 Προετοιμασία του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* πριν την εφαρμογή του στα φυτάρια τομάτας.

Αφού αποστειρώθηκε το υγρό θρεπτικό υλικό N.G. έγινε μεταφορά από καλλιέργεια του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* δύο ημερών σε τρυβλίο με N.A.G. Μετά η κωνική που περιείχε το υλικό με το βακτήριο επώαστηκε σε περιστρεφόμενο επωαστικό θάλαμο στις 165στροφές/λεπτό, σε θερμοκρασία 28°C και σε συνθήκες σκότους για 1 ημέρα. Το εναιώρημα του βακτηρίου φυγοκεντρήθηκε στις 5000 στροφές/λεπτό σε θερμοκρασία 20-30°C για 10' σε φιαλίδια (falcons) των 50ml και επαναιωρήθηκε με το φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα. Η τελική συγκέντρωση του υδατικού αιωρήματος βακτηριακών κυττάρων του *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* που χρησιμοποιήθηκε στο υπόστρωμα ανάπτυξης για την μόλυνση των φυτών ήταν 10⁸cfu/ml.

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Αξιολόγηση της επίδρασης των αιθερίων ελαίων στην ανάπτυξη του μύκητα *Verticillium dahliae* στο εργαστήριο (*in vitro*).

Για να αξιολογηθεί η επίδραση που έχουν τα αιθέρια έλαια στην ανάπτυξη του μύκητα *Verticillium dahliae* σε συνθήκες εργαστηρίου *in vitro*, ακολουθήθηκε η διαδικασία ανάπτυξης του μύκητα σε τρυβλία. Δηλαδή, στο θρεπτικό υλικό PDA, όντας λιωμένο πριν διανεμηθεί στα τρυβλία σε θερμοκρασία 50°C, προστέθηκε μέσα συγκεκριμένη ποσότητα από το διάλυμα αναφοράς (stock solution) που περιείχε αιθέριο έλαιο στις συγκεντρώσεις 35ppm, 50ppm, 80ppm, 100ppm, 150ppm, 200ppm και 250ppm και διαλύτη αιθυλικής αλκοόλης. Διαμοιράστηκαν περίπου 10ml ανά τρυβλίο διαμέτρου 5cm και αφέθηκαν κλειστά για να στερεοποιηθεί το υλικό και να μην εξατμιστεί το αιθέριο έλαιο. Έπειτα, μεταφέρθηκε στο κάθε τρυβλίο ένας δίσκος με μυκήλιο που έχει κοπεί με φελλοτρυπητήρα (Cork Borer) διαμέτρου 5mm. Τα

τρυβλία καλύφθηκαν με πλαστική μεμβράνη και επώαστηκαν στο σκοτάδι στους 25°C και επί επτά ημέρες παρακολουθείτο και καταγράφετο η ανάπτυξή τους. Ελέγχθηκε και μετρήθηκε η ανάπτυξή τους μέχρι την πλήρη κάλυψη του μυκηλίου στο τρυβλίο με τον μάρτυρα. Σε κάθε εφαρμογή έγιναν 3 επαναλήψεις. Η καταγραφή της ανάπτυξης έγινε μετρώντας τη διάμετρο (cm) της ακτινωτής διάταξης του μυκηλίου. Επίσης, υπολογίστηκε η επί τοις εκατό (%) παρεμπόδιση της ανάπτυξης των μυκήτων σε σύγκριση με τον μάρτυρα και το EC50 που αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση των αιθερίων ελαίων (ppm) που προκαλεί 50% μείωση στη γραμμική αύξηση των μυκήτων σε PDA.

Σε αρχικές δοκιμές μελετήθηκε εάν επηρεάζει ο διαλύτης την αναστολή της ανάπτυξης των μυκήτων, αφού δοκιμάστηκε κατά ποσοστιαία αναλογία (επί τοις εκατό %) και ουδεμία παρεμπόδιση δεν προκάλεσε, όταν προστέθηκε μόνο ο διαλύτης στο υλικό, στην διαδικασία ανάπτυξης των μυκήτων αυτού του πειράματος.

2.2.2 Αξιολόγηση της επίδρασης των αιθερίων ελαίων στην ανάπτυξη των βακτηρίων *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* και *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* στο εργαστήριο (*in vitro*).

Για να ερευνηθεί η επίδραση που έχουν τα αιθέρια έλαια στην ανάπτυξη των βακτηρίων *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* και *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* σε συνθήκες εργαστηρίου *in vitro*, ακολουθήθηκε η διαδικασία ανάπτυξης των βακτηρίων σε τρυβλία. Δηλαδή, στο θρεπτικό υλικό N.A.G., όντας λιωμένο πριν διανεμηθεί στα τρυβλία σε θερμοκρασία 50°C, προστέθηκε μέσα συγκεκριμένη ποσότητα από το διάλυμα αναφοράς (stock solution) που περιείχε αιθέριο έλαιο στις συγκεντρώσεις: 50ppm, 80ppm, 100ppm, 200ppm, 250ppm, 300ppm, 350ppm, 450ppm, 500ppm, 1000ppm και 3250ppm και διαλύτη αιθυλικής αλκοόλης. Διανεμήθηκαν περίπου 10ml ανά τρυβλίο διαμέτρου 5cm και τα τρυβλία αφέθηκαν ανοιχτά για αρκετή ώρα (έως μια ώρα) για να στερεοποιηθεί το υλικό και να μην υπάρχει υγρασία στην επιφάνειά του.

Η ανάπτυξη των βακτηρίων έλαβε χώρα με την τοποθέτηση βακτηριακού αιωρήματος, με σειρά δεκαδικών αραιώσεων και μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των αιωρημάτων στο φασματοφωτόμετρο, στα τρυβλία με το υπόστρωμα. Το αρχικό

βακτηριακό αιώρημα παρασκευάστηκε με την προσθήκη σε φιαλίδιο που περιείχε απεσταγμένο – αποστειρωμένο νερό και έντονη ανάδευση, βακτηριακής αποικίας δύο ημερών. Μετά σταδιακά μεταφέρθηκε 1ml από το αρχικό-πυκνό αυτό αιώρημα σε άλλο φιαλίδιο που περιείχε αποστειρωμένο νερό 9ml και έτσι αποτελεί την πρώτη αραιώση 10^{-1} . Αυτή η διαδικασία επαναλήφθηκε άλλες τέσσερις φορές για τις αραιώσεις 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . Πριν την μεταφορά του 1ml πρέπει να αναδεύεται πολύ καλά το βακτηριακό αιώρημα για να κατανεμηθεί ομοιόμορφα το βακτήριο στο νερό ώστε να είναι επιτυχής η μεταφορά και η αραιώση. Στη συνέχεια το κάθε τρυβλίο χωρίστηκε σε 4 οριζόντιους τομείς και μεταφέρθηκαν (υπό συνεχή ανάδευση) τρεις σταγόνες των 10μl η μια, από τις αραιώσεις 0, -2, -3, -5 στους 4 τομείς του τρυβλίου αντίστοιχα. Ακολούθως τα τρυβλία αφήθηκαν να στεγνώσουν καλά ώστε να απομακρυνθεί η υγρασία από την επιφάνειά τους για να μην ενωθούν οι σταγόνες. Τα τρυβλία καλύφθηκαν με πλαστική μεμβράνη και επωάστηκαν στο σκοτάδι στους 25°C και επί δύο έως πέντε ημέρες παρακολουθείτο και καταγράφετο η ανάπτυξή τους.

Ελέγχθηκε και μετρήθηκε ο αριθμός των αποικιών στην αραιώση που είναι μετρήσιμες στις 3 έως 5 ημέρες. Σε κάθε εφαρμογή έγιναν 3 επαναλήψεις. Επίσης, υπολογίστηκε η επί τοις εκατό (%) παρεμπόδιση της ανάπτυξης των βακτηρίων σε σύγκριση με τον μάρτυρα και το EC50 που αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση των αιθερίων ελαίων (ppm) που προκαλεί 50% μείωση στην ικανότητα σχηματισμού αποικιών του βακτηρίου σε N.A.G..

Σε αρχικές δοκιμές μελετήθηκε εάν επηρεάζει ο διαλύτης την αναστολή της ανάπτυξης των βακτηρίων, αφού δοκιμάστηκε κατά ποσοστιαία αναλογία (επί τοις εκατό %) και ουδεμία παρεμπόδιση δεν προκάλεσε, όταν προστέθηκε μόνο ο διαλύτης στο υλικό, στην διαδικασία ανάπτυξης των βακτηρίων αυτού του πειράματος.

2.2.3 Αξιολόγηση της επίδρασης των αιθερίων ελαίων στην αντιμετώπιση των ασθενειών και στην ανάπτυξη των φυτών στο θερμοκήπιο (*in vivo*).

Για να εκτιμηθεί η επίδραση που έχουν τα αιθέρια έλαια στην ανάπτυξη των φυτών και στην αντιμετώπιση των ασθενειών, εφαρμόστηκαν με ριζοπότισμα ή ψεκάσμο στα φυτά τα διαλύματα των αιθερίων ελαίων με 10ml ανά φυτάριο και 0,5% DMSO διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethylsulfoxide), 0,5% Tween 20 και νερό. Έγινε εφαρμογή

του ελαίου θυμαριού (*Coridothymus capitatus* ή *Thymus vulgaris*) σε συγκεντρώσεις 500ppm και 1000ppm ή 2000ppm και 3000ppm σε φυτά που θα γινόταν μόλυνση με κάποιο από τα παθογόνα και σε φυτά χωρίς κάποιο από τα παθογόνα και εφαρμογή του ελαίου ρίγανης (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*) στα 500ppm και 1000ppm ή 2000ppm και 3000ppm σε φυτά που θα γινόταν μόλυνση με κάποιο από τα παθογόνα και σε φυτά χωρίς παθογόνο. Μετά από 72 ή 24 ώρες έγινε μόλυνση και πιο συγκεκριμένα με σύριγγα ριζοποτίστηκε ή με ψεκαστικό μέσο ψεκάστηκε το παθογόνο ανάλογα με την περίπτωση σε ποσότητα 10ml ή 20ml ανά φυτό με τον μύκητα ή κάποιο από τα βακτήρια στο αντίστοιχο υγρό μέσο (νερό δις απεσταγμένο ή ρυθμιστικό διάλυμα). Έτσι εφαρμόστηκε ριζοπότισμα στην περίπτωση του μύκητα *Verticillium dahliae* και του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* και ψεκασμός στην περίπτωση του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Οι επεμβάσεις με τα αιθέρια έλαια έγιναν (ριζοποτίζοντας στη ρίζα των φυταρίων ή ψεκάζοντας διαφυλλικά) κατά τον ίδιο τρόπο με τον οποίο θα εφαρμοζόταν και το εκάστοτε παθογόνο. Οι μάρτυρες είναι τα φυτάρια που μολύνθηκαν μόνο με το παθογόνο και τα φυτάρια που εφαρμόστηκε μόνο νερό με DMSO και Tween 20 σε ποσοστό 0,5%. Έγιναν τρεις επαναλήψεις από 5 φυτάρια τομάτας ή μελιτζάνας για κάθε μια επέμβαση. Ελέγχθηκε, μετρήθηκε και καταγράφηκε η ανάπτυξη των φυτών και η εξέλιξη της ασθένειας ανά τις εφαρμογές των αιθερίων ελαίων στα φυτά. Πιο συγκεκριμένα καταγράφηκε το ύψος των φυτών, το νωπό βάρος των στελεχών και ο αριθμός φύλλων. Υπολογίστηκε η εξέλιξη και η σοβαρότητα της ασθένειας (disease severity) ανά τις εφαρμογές των αιθερίων ελαίων σε σχέση με τον μάρτυρα. Καταγράφηκε επίσης το εμβαδόν ασθένειας (AUDPC), το σχετικό εμβαδόν ασθένειας (relative AUDPC), ο δείκτης της ασθένειας (disease index) και σε κάποιες περιπτώσεις η ένταση της ασθένειας (disease incidence).

2.2.4 Ταυτοποίηση της παρουσίας του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* στα φυτά με την εφαρμογή της μεθόδου PCR.

Η παρουσία του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* του στελέχους 4257 στα φυτάρια τομάτας ταυτοποιήθηκε με την μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (**P**olymerase **C**hain **R**eaction). Έτσι πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες φυταρίων 2^{ου}-3^{ου} σταδίου από στελέχη, φύλλα και από ολόκληρα

φυτάρια χωρίς τη ρίζα στις 15 και 26 ημέρες όπου αποθηκεύτηκαν στους -4°C . Τα δείγματα υπέστησαν ξήρανση με λυοφυλίωση για 18 ώρες και λειοτρίβηση για την ομογενοποίηση του ξηρού φυτικού ιστού και την τοποθέτηση σε μικροσωληνίσκους ποσότητας 100 μg ανά δείγμα. Ακολούθησε η εξαγωγή του DNA με την προσθήκη 0,5ml διαλύματος εξαγωγής DNA (για 10ml απαιτούνται 0,2423g Tris HCl 200mM, 0,1461g NaCl 250mM, 0,0731g EDTA 25mM, 0,25ml SDS 0,5%), vortex και φυγοκέντρηση για 10' στην πλήρη ταχύτητα της φυγοκέντρου σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο μικροσωληνίσκο και στα δείγματα προστέθηκε 0,5ml φαινόλη-χλωροφόρμιο-ισοαμυλαλκοόλη όντας στην απαγωγό εστία, έγινε έντονη ανάμειξη για 10'' και φυγοκέντρηση για 10' στην πλήρη ταχύτητα της φυγοκέντρου σε θερμοκρασία δωματίου. Μεταφέρθηκε το υπερκείμενο σε νέο μικροσωληνίσκο αποφεύγοντας την ενδιάμεση φάση, προστέθηκε ίσος όγκος ισοπροπανόλης με σκοπό την κατακρήμνιση του DNA, τα δείγματα αναδεύτηκαν ελαφρά για μισό λεπτό και επώαστηκαν για 5-10' σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, έγινε φυγοκέντρηση για 10' στην πλήρη ταχύτητα της φυγοκέντρου σε θερμοκρασία δωματίου, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και στο ίζημα προστέθηκε αιθανόλη 70%, όπου φυγοκεντρήθηκαν τα δείγματα για 2', αφαιρέθηκε το υπερκείμενο ως και οι σταγόνες και αφέθηκαν τα δείγματα να στεγνώσουν έως 10'. Το ίζημα διαλύθηκε σε 25 μl νερό αποστειρωμένο και δις απεσταγμένο.

Εν συνεχεία εφαρμόστηκε καθαρισμός των δειγμάτων ξεκινώντας από την συμπλήρωσή τους με νερό έως τα 100 μl , την προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης-χλωροφόρμιου-ισοαμυλαλκοόλης, την έντονη ανακίνηση (vortex) για 2' και την φυγοκέντρηση για 3'. Έπειτα μεταφέρθηκε το υπερκείμενο σε νέο μικροσωληνίσκο αποφεύγοντας την ενδιάμεση φάση και προστέθηκε 2,5 φορές του όγκου που προϋπήρχε μείγμα απόλυτης αιθανόλης και οξικού νατρίου (75mM). Τα δείγματα φυλάχθηκαν για 30' στους -20°C και έπειτα φυγοκεντρήθηκαν για 10' στις 13000rpm, όπου αμέσως μετά αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 300 μl αιθυλικής αλκοόλης 70%. Έγινε φυγοκέντρηση για 5' στις 13000rpm, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει ώστε μετά να επαναδιαλυθεί σε 25 μl αποστειρωμένο δις-απεσταγμένο νερό όπου αναμείχθηκε υπό ομαλή ανάδευση.

Εκτός των φυτικών δειγμάτων από τα οποία έγινε εξαγωγή DNA, λήφθηκαν δείγματα φυτών και για απομόνωση του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* σε τρυβλίο όπου μετά από 2 ημέρες ανάπτυξης και με επώαση για ακόμα μια ημέρα σε υγρή καλλιέργεια με θρεπτικό υλικό NG έγινε μεταφορά μικρής

ποσότητας του αιωρήματος σε μικροσωληνίσκο και φυγοκέντρισή τους για 2'. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, αφέθηκαν να στεγνώσουν οι μικροσωληνίσκοι και έγινε επαναιώρηση του ιζήματος με 460μl TE ανακινώντας με την πιπέττα, προσθήκη 15μl SDS (20x) και 6μl proteinase K (10mg/ml). Οι μικροσωληνίσκοι αφέθηκαν για 1 ώρα στους 37°C. Προστέθηκαν 500μl φαινόλη-χλωροφόρμιο-ισοαμυλαλκοόλη, έγινε ανάμειξη με αναστροφή και ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 12000rpm για 10'. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε άλλον μικροσωληνίσκο, προστέθηκε ίσος όγκος φαινόλης-χλωροφόρμιου-ισοαμυλαλκοόλης, έγινε ανάμειξη με αναστροφή και φυγοκέντρωση για 10'. Μεταφέρθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε sodium acetate (3M σε pH 5,2) 0,1 φορές του όγκου, έγινε ανάμειξη, προστέθηκε και ισοπροπανόλη 0,6 φορές του όγκου, όπου ακολούθησε ανάμειξη με αναστροφή. Αφέθηκαν στους -20°C για 2 ώρες και ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 13000rpm, στους 10-15°C, για 30'. Έπειτα αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 500μl αιθανόλης 70%, όπου έγινε φυγοκέντρωση στις 10000rpm για 15'. Αφέθηκε το ίζημα να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου και επαναιωρήθηκε σε 25μl αποστειρωμένο δις-απεσταγμένο νερό υπό ομαλή ανάδευση.

Σε όλα τα δείγματα όντας καλά διαλυμένο το ίζημα στο νερό εφαρμόστηκαν 2μl RNase και επώαστηκαν για 2 ώρες στους 37°C για να είναι καθαρισμένα από RNA, αφού η παρουσία του δεν διευκολύνει την ανίχνευση του DNA.

Κατόπιν μετρήθηκε η συγκέντρωση του DNA του κάθε δείγματος σε φασματοφωτόμετρο Nanodrop όντας συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η αναλογία απορρόφησης στα 260 nm και 280 nm χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της καθαρότητας του RNA και του DNA. Η αναλογία απορρόφησης του δείγματος στα 260 και 230 nm είναι μια δευτερεύουσα μέτρηση της καθαρότητας του νουκλεϊκού οξέος. Τα νουκλεϊκά οξέα και οι πρωτεΐνες έχουν μέγιστα απορρόφησης στα 260 και 280 nm, αντίστοιχα. Η απορρόφηση στα 230 nm είναι αποδεκτή ως αποτέλεσμα άλλης μόλυνσης (το EDTA, οι υδατάνθρακες, η φαινόλη, το αντιδραστήριο TRIzol κ.α.). Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων αποτυπώθηκαν σε ng/μl, με το πρώτο δείγμα να είναι 1μl υπερκάθαρου νερού HPLC. Ακολούθησε η αραίωση με νερό στα δείγματα με το DNA έως την συγκέντρωση των 50ng/μl και μέχρι το διάλυμα να φτάσει τα 50μl.

Τέλος πραγματοποιήθηκε η αντίδραση PCR και η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. Για την αντίδραση PCR απαιτήθηκαν τα ακόλουθα συστατικά:

- 4 μl ρυθμιστικό διάλυμα 5X
- 2 μl dNTP's (διάλυμα νουκλεοτιδίων) 2mM

- 2,4 µl MgCl₂ 25mM
- 0,5 µl forward εκκινητής 0,2µM
- 0,5 µl reverse εκκινητής 0,2µM
- 0,12 µl taq DNA πολυμεράση
- 9,48 µl νερό αποστειρωμένο και δις-απεσταγμένο
- 1 µl DNA δείγματος

Ο συνολικός όγκος για μια αντίδραση και ανά δείγμα ήταν 20µl. Χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια της KAPA Biosystems σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα 2 ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* είναι της Invitrogen, της Thermo Fisher Scientific και είναι τα εξής:

Όνομασία εκκινητή	Αλληλουχία	Μέγεθος (bp)	Παραπομπή
PSA-8 (forward)	5'-TTG GTC AAT TCT GTC TCC CTT C-3'	268	Pastrik & Rainey, 1999
PSA-R (reverse)	5'-TAC TGA GAT GTT TCA CTT CCC C-3'	268	Pastrik & Rainey, 1999
CMM-5 (forward)	5'-GCG AAT AAG CCC ATA TCA A-3'	614	Dreier <i>et al.</i> , 1995
CMM-6 (reverse)	5'-CGT CAG GAG GTC GCT AAT A-3'	614	Dreier <i>et al.</i> , 1995

Να σημειωθεί εδώ ότι οι εκκινητές PSA-8/R βρίσκονται στην εσωτερική μεταγραφόμενη περιοχή (Internal Transcribed Spacer, ITS) των γονιδίων 16S και 23S rRNA του βακτηρίου (EPPO, 2016). Στα βακτήρια απαντώνται τρία είδη rRNAs, το 16S rRNA, το 23S rRNA και το 5S rRNA. Τα rRNAs είναι βασικά συστατικά των ριβοσωμάτων. Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, τα ριβοσώματα αποτελούνται από δύο υπομονάδες, μια μεγάλη υπομονάδα (50S) και μια μικρή υπομονάδα (30S). Η υπομονάδα 50S αποτελείται από 23S rRNA και 5S rRNA και 30 διαφορετικές πρωτεΐνες. Η υπομονάδα 30S αποτελείται από 16S rRNA και περισσότερες από 30 πρωτεΐνες. (Κατινάκη, 2012) Οι εκκινητές CMM-5/-6 προέρχονται από πληροφορία μερικής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της περιοχής *pat-1* (Dreier *et al.*, 1995).

Η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμοκυκλοποιητή Veriti 96-Well Thermal Cycler της Applied Biosystems. Κατά τη διαδικασία της PCR στον πρώτο κύκλο έγινε η αρχική αποδιάταξη (Initial denaturation) σε θερμοκρασία 94°C για 3'. Ακολούθησαν 35 κύκλοι με την αποδιάταξη (denaturation) του DNA σε θερμοκρασία 95°C για 30'', την αναδιάταξη (Annealing) στους 63°C για 30'' για τους εκκινητές

PSA-8/R και στους 55°C για 30'' για τους εκκινητές CMM-5/6 και την επιμήκυνση (Elongation) για 45'' στους 72°C ανά κύκλο. Τέλος η τελική επιμήκυνση (Final Elongation) έγινε σε θερμοκρασία 72°C για 5' και η θερμοκρασία των 8°C ήταν επ' αόριστον.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε πηκτή με αгарόζη 1% σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X TAE (Tris/Acetate/EDTA) με τάση 100volt. Προστέθηκε στα δείγματα 1X DNA loading dye και στο πρώτο πηγαδάκι DNA ladder σε ποσότητα 10μl όπως και το κάθε δείγμα στα πηγαδάκια. Με το τέλος της ηλεκτροφόρησης η κάθε πηκτή αгарόζης αφέθηκε σε υδατικό διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) (1μg/ml) για 20' και μεταφέρθηκε σε συσκευή οπτικοποίησης προϊόντων PCR για την παρατήρηση του σε τράπεζα UV ακτινοβολίας Bio Imaging Systems Gel documentation DNR.

2.2.5 Αξιολόγηση της επίδρασης της εφαρμογής με ριζοπότισμα του αιθερίου ελαίου του φυτού *Thymus vulgaris* στην άμυνα των φυταρίων τομάτας εναντίον μυκήτων και βακτηρίων στο θερμοκήπιο (*in vivo*).

Για τη διερεύνηση της επίδρασης που έχουν τα αιθέρια έλαια στα φυτάρια τομάτας, πραγματοποιήθηκε εφαρμογή του αιθερίου ελαίου του φυτού *Thymus vulgaris* σε συγκεντρώσεις 1000ppm, 2000ppm και 3000ppm και του μάρτυρα που ήταν νερό με DMSO 0,5% και Tween 20 0,5% σε φυτάρια τομάτας 2^{ου} - 3^{ου} φύλλου. Λήφθηκαν δείγματα από την κορυφή και τα ανώτερα φύλλα με υγρό άζωτο στις 0h, 6h, 12h και 24h, όπου αποθηκεύτηκαν στους -80°C. Ακολούθησε η λειοτρίβηση των δειγμάτων με υγρό άζωτο και η εξαγωγή του RNA με την άμεση τοποθέτηση 1ml TRIzol Reagent σε 100μg δείγματος που ήταν τοποθετημένο σε μικροσωληνίσκο του 1,5ml. Η απομόνωση ολικού RNA από τα φυτά τομάτας πραγματοποιήθηκε με χρήση TRI Reagent (Molecular Research Center, Inc) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ακολούθησε ανάδευση (vortex) για 15'' και αφέθηκαν τα δείγματα για 5' στον πάγο. Έπειτα έγινε προσθήκη 200μl χλωροφορμίου (CHCl₃) και αφέθηκαν τα δείγματα για 3' σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 13000rpm, στους 4°C για 15'. Μεταφέρθηκε το υπερκείμενο σε νέο μικροσωληνίσκο και έγινε εκχύλιση με ίσου όγκου φαινόλη-χλωροφόρμιο, ανάδευση και φυγοκέντρωση στις 12000rpm, στους 4°C για 5'. Εκ νέου μεταφέρθηκε το υπερκείμενο σε νέο μικροσωληνίσκο, προστέθηκαν 500μl ισοπροπανόλης, αναμείχθηκαν τα δείγματα και

παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 10'. Φυγοκεντρήθηκαν τα δείγματα στις 12000rpm, στους 4°C, για 15' και αφαιρέθηκε το υπερκείμενο. Προστέθηκε αιθανόλη 70%, ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10', στους 4°C, στις 12000rpm, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, αφέθηκαν τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου και προστέθηκαν 25μl νερού αποστειρωμένου και δις απεσταγμένου. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν και διατηρήθηκαν στους -80°C.

Ακολούθησε η μέτρηση της συγκέντρωσης του RNA του κάθε δείγματος στο φασματοφωτόμετρο Nanodrop όπως στην περίπτωση του DNA. Και σε αυτή την περίπτωση οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων αποτυπώθηκαν σε ng/μl, με το πρώτο δείγμα να είναι 1μl υπερκάθαρου νερού HPLC. Ακολούθησε η αραιώση με νερό στα δείγματα με το RNA έως την συγκέντρωση των 500ng/7μl και μέχρι το διάλυμα να φτάσει τα 7μl.

Για τον καθαρισμό των δειγμάτων που περιέχουν RNA από οποιαδήποτε συστατικά που μπορεί να περιέχουν DNA απαιτήθηκε η προσθήκη 1μl ενζύμου DNase I (Amp Grade, Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και τα δείγματα επώαστηκαν σε υδατόλουτρο στους 37°C για 15'. Έπειτα προστέθηκε 1μl EDTA και επώαστηκαν στους 65°C για 10' για να σταματήσει η δράση της DNase I.

Στην συνέχεια ακολουθήθηκε η διαδικασία για την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής, όπου συνδέεται συμπληρωματική προς το RNA αλυσίδα (**Complementary DNA**), σε συνθήκες *in vitro* χρησιμοποιώντας το ένζυμο PrimeScript RT Reagent Kit (TAKARA BIO INC) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για αυτή την αντίδραση απαιτήθηκαν τα εξής συστατικά (όντας στον πάγο) για συνολικό όγκο 10μl ανά δείγμα:

- 2μl 5x PrimeScript Buffer
- 0,5μl PrimeScript RT enzyme Mix 1
- 0,5μl Oligo dT Primer 50μM
- 7μl ολικό RNA

Η διαδικασία δημιουργίας του cDNA έλαβε χώρα στον θερμοκυκλοποιητή Veriti 96-Well Thermal Cycler της Applied Biosystems, όπου τα δείγματα τοποθετήθηκαν εκεί και υπέστησαν τις θερμοκρασίες των 37°C για 15' για την ενεργοποίηση του ενζύμου και της αντίστροφης μεταγραφής, των 85°C για 5'' για την απενεργοποίηση της δράσης του ενζύμου και της διαδικασίας της αντίστροφης μεταγραφής και των 4°C έως την λήξη της διαδικασίας. Έπειτα τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε κατάψυξη στους -20°C.

Τελικά διεξήχθη η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) στον θερμοκυκλοποιητή Step One Plus Real Time PCR System Thermal Cycling Block της Applied Biosystems για την μελέτη έκφρασης των γονιδίων *PR1a* και *Pin2* με την χρησιμοποίηση του λογισμικού Step One Software. Για την διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκε το Fast Gene ICGreen kit της Nippon Genetics και ως γονίδιο αναφοράς η Ακτίνη (Actin). Με συνολικό όγκο ανά δείγμα τα 10μl εφαρμόστηκαν τα εξής συστατικά:

- 5μl χρωστική 2X FastGene IC Green
- 0,16μl forward εκκινητής (400nM)
- 0,16μl reverse εκκινητής (400nM)
- 3,68μl H₂O
- 1μl cDNA (~100mg cDNA)

Γονίδιο	GenBank Accession	Εκκινητές	Παραπομπή
<i>PR1a</i>	M69247	forward 5'-GAGGGCAGCCGTGCAA-3' reverse 5'-CACATTTTCCACCAACACATTG-3'	Block <i>et al.</i> , 2005
<i>Pin2</i>	JN091682	forward 5'-TGATGCCAAGGCTT GTACTAGAGA-3' reverse 5'-AGCGGACTTCCTT CTGAACGT-3'	Herman <i>et al.</i> , 2008
Actin	XM004249818	forward 5'-TTGCCGCATGCCATTCT-3' reverse 5'-TC GGTGAGGATATTCATCAGGTT-3'	Herman <i>et al.</i> , 2008

Κατά τη διαδικασία της Real Time PCR πρώτο βήμα ήταν η αρχική αποδιάταξη (Initial denaturation) σε θερμοκρασία 95°C για 2' στον πρώτο κύκλο. Ακολούθησε αποδιάταξη (denaturation) του cDNA σε θερμοκρασία 95°C για 5'' και η αναδιάταξη και επιμήκυνση (Annealing and Elongation) για 30'' στους 60°C ανά κύκλο σε 40 κύκλους σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας Nippon Genetics.

2.2.6 Στατιστική ανάλυση

Η γενική πειραματική διάταξη περιλάμβανε τρεις επαναλήψεις για τον μύκητα και τα βακτήρια και κάθε επέμβαση στα φυτάρια τομάτας ή μελιτζάνας και επίπεδο της μελετώμενης παραμέτρου, σε πλήρως τυχαιοποιημένο σχέδιο.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα STATGRAPHICS plus 2,1 (έκδοση 2010) με τη δοκιμασία απλής ανάλυσης της

διακύμανσης (ANOVA). Η συγκριτική μελέτη των μέσων τιμών έγινε με τη μέθοδο της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς (Fisher's least significance difference-LSD), σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αξιολόγηση της επίδρασης των αιθερίων ελαίων στην ανάπτυξη του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* σε συνθήκες εργαστηρίου (*in vitro*) και θερμοκηπίου (*in vivo*).

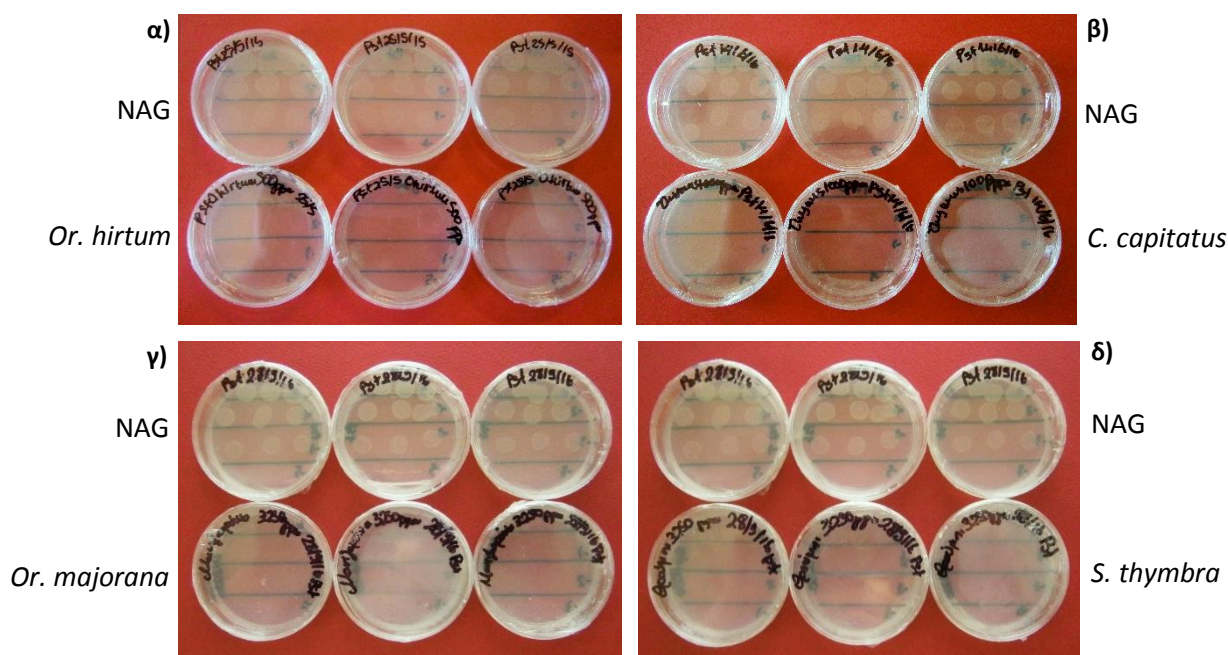
3.1.1 Επίδραση των αιθερίων ελαίων (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Coridothymus capitatus*, *Origanum majorana*, *Satureja thymbra*) στην ανάπτυξη του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* στο εργαστήριο (*in vitro*).

Για την διερεύνηση της αποτελεσματικότητας των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Coridothymus capitatus*, *Origanum majorana* και *Satureja thymbra* ενάντια στο φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* εφαρμόστηκαν διάφορες συγκεντρώσεις που κυμάνθηκαν από τα 100ppm, 200ppm, 300ppm, 400ppm, 500ppm, 600ppm, 800ppm, 1000ppm, 1200ppm, 1500ppm, 1800ppm, 2300ppm, 2700ppm, 3000ppm, 3250ppm έως και τα 3500ppm σε κάποια αιθέρια έλαια που αντιστοιχούν σε 10μl, 20μl, 30μl, 40μl, 50μl, 60μl, 80μl, 100μl, 120μl, 150μl, 180 μl, 230μl, 270μl, 300μl, 325μl και 350μl ανά τρυβλίο. Οι μετρήσεις έγιναν στις 2 ημέρες επώασης όπου στα τρυβλία του μάρτυρα (NA) οι αποικίες του βακτηρίου είχαν αναπτυχθεί σε βαθμό που να είναι μετρήσιμες.

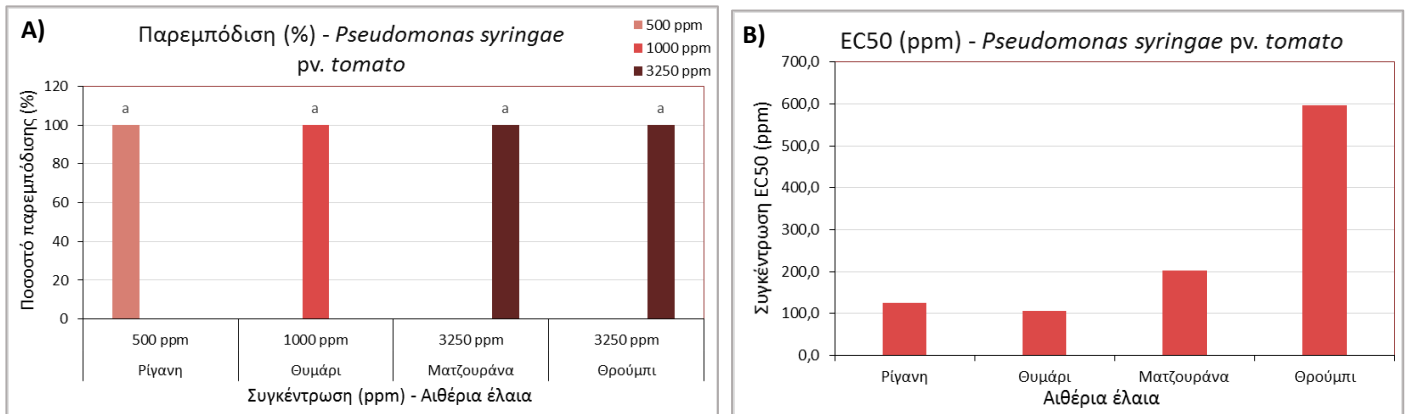
Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.1.1 και το Διάγραμμα 3.1.1 Α η ανάπτυξη του βακτηρίου παρεμποδίστηκε πλήρως σε ποσοστό 100% σε όλες τις αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν ανά τρυβλίο για τις εφαρμογές των αιθερίων ελαίων και του μάρτυρα σε διαφορετικές όμως συγκεντρώσεις στο κάθε αιθέριο έλαιο. Πιο συγκεκριμένα το αιθέριο έλαιο του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* παρεμπόδισε πλήρως την ανάπτυξη του βακτηρίου σε συγκέντρωση 500ppm, ενώ το αιθέριο έλαιο του φυτού *Coridothymus capitatus* σε συγκέντρωση 1000ppm. Επίσης

τα αιθέρια έλαια των φυτών *Origanum majorana* και *Satureja thymbra* παρεμπόδισαν πλήρως την ανάπτυξη του βακτηρίου σε συγκέντρωση 3250ppm. Με βάση αυτά τα δεδομένα καθίσταται εμφανές ότι τα αιθέρια έλαια των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* και *Coridothymus capitatus* είναι πιο αποτελεσματικά και σε μικρότερες συγκεντρώσεις από τα άλλα αιθέρια έλαια.

Ως προς το Διάγραμμα 3.1.1 Β με τις συγκεντρώσεις EC50 η ανάπτυξη του βακτηρίου παρουσιάζει ευαισθησία στο αιθέριο έλαιο του φυτού *Coridothymus capitatus* και ακολούθως στο αιθέριο έλαιο του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* με τις συγκεντρώσεις τους να είναι πολύ χαμηλές. Έπεται το βακτήριο παρουσίασε ισχυρή ανθεκτικότητα στο αιθέριο έλαιο του φυτού *Origanum majorana* και στο αιθέριο έλαιο του φυτού *Satureja thymbra*, με μεγάλη διαφορά στη συγκέντρωσή του τελευταίου σε σχέση με τα υπόλοιπα αιθέρια έλαια.



Εικόνα 3.1.1: Επίδραση της εφαρμογής των τεσσάρων αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* σε συγκέντρωση 500ppm (α), *Coridothymus capitatus* σε συγκέντρωση 1000ppm (β), *Origanum majorana* σε συγκέντρωση 3250ppm (γ) και *Satureja thymbra* σε συγκέντρωση 3250ppm (δ) (κατά σειρά όπως φαίνονται) στην ανάπτυξη των αποικιών του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* σε σύγκριση με τον μάρτυρα (NA), στις 2 ημέρες επώασης.



Διαγράμματα 3.1.1 A-B: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Ρίγανη), *Coridothymus capitatus* (Θυμάρι), *Origanum majorana* (Μαντζουράνα) και *Satureja thymbra* (Θρούμπι) επί της ανάπτυξης του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* εκπεφρασμένη ως ποσοστό παρεμπόδισης της ανάπτυξης επί τοις εκατό (%) του μάρτυρα (A) και ως συγκέντρωση EC50 (ppm) (B).

3.1.2 Επίδραση των αιθερίων ελαίων (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Coridothymus capitatus*) στην αντιμετώπιση της βακτηριακής στιγματώσης από το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* και στην ανάπτυξη των φυτών τομάτας στο θερμοκήπιο (*in vivo*).

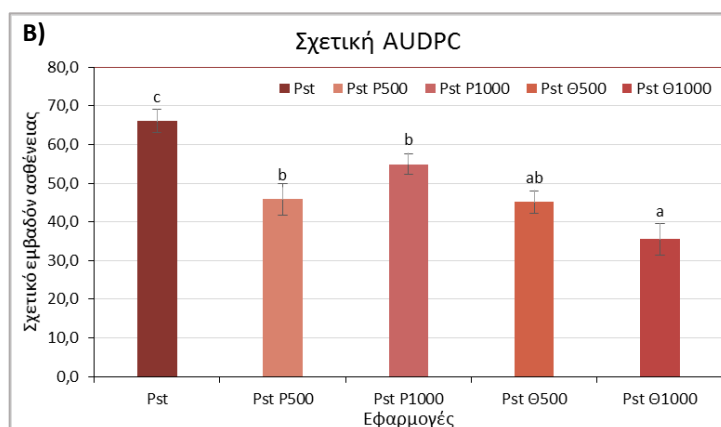
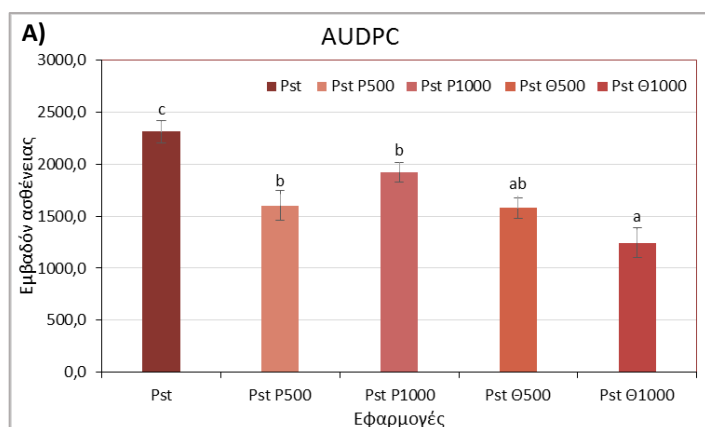
Λαμβάνοντας υπόψη την αποτελεσματικότητα των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* και *Coridothymus capitatus* στα πειράματα *in vitro* και με βάση την μελέτη των Ben-Jabeur *et al.*, 2015, όπου διαπιστώσανε ότι το έλαιο του θυμαριού προκάλεσε τη συσσώρευση υπεροξειδασών στα φύλλα και τις ρίζες στις τρεις ημέρες μετά την εφαρμογή του, έγινε εφαρμογή των ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (με περιοχή καλλιέργειάς του την Αρχαία Ολυμπία) και *Coridothymus capitatus* σε συγκεντρώσεις 500ppm και 1000ppm με ψεκασμό σε φυτά τομάτας 72 ώρες πριν από την μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* και σε φυτά που δεν έγινε μόλυνση με το βακτήριο (μάρτυρες). Έπειτα πραγματοποιήθηκε η μόλυνση του παθογόνου με ψεκασμό και μετρήθηκαν τα συμπτώματα από την εμφάνισή τους στις 9 ημέρες μετά την μόλυνση, το ύψος και τα φύλλα από τις 7 ημέρες μετά την μόλυνση ανά δύο έως τρεις ημέρες έως και τις 35.

Τα αποτελέσματα που αφορούν την εξέλιξη της ασθένειας αποτυπώνονται στα παρακάτω διαγράμματα του εμβαδού ασθένειας (AUDPC, Area Under Disease

Progress Curve), του σχετικού εμβαδού ασθένειας (Relative AUDPC), της σοβαρότητας της ασθένειας (Disease Severity) που είναι το ποσοστό των ασθενών φύλλων ανά τις ημέρες που καταγράφηκαν συμπτώματα μετά την μόλυνση και του δείκτη της ασθένειας (Disease Index) που είναι η σοβαρότητα της ασθένειας σε κλίμακα από το 0 έως το 5 και πιο συγκεκριμένα:

Δείκτης ασθένειας	Ποσοστό ασθένειας (%)
0	Υγιές φυτό
1	5-25
2	25,1-45
3	45,1-65
4	65,1-85
5	85,1-100

Από τα Διαγράμματα 3.1.2 A-B που απεικονίζεται το εμβαδόν ασθένειας και το σχετικό εμβαδόν ασθένειας φαίνεται ότι οι εφαρμογές των αιθερίων ελαίων διαφέρουν στατιστικά από τον μάρτυρα, δηλαδή την εφαρμογή μόνο του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, όπου παρουσιάζεται και στα δυο διαγράμματα σε υψηλότερες τιμές σε σχέση με τις εφαρμογές των ελαίων. Οι εφαρμογές του ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* στις συγκεντρώσεις των 500ppm και 1000ppm δεν διαφέρουν στατιστικά και στα δυο διαγράμματα και σχετίζονται με τις τιμές της εφαρμογής του ελαίου του φυτού *Coridothymus capitatus* στα 500ppm, όπου σχετίζεται με τις μειωμένες τιμές της εφαρμογής του ίδιου ελαίου στη συγκέντρωση των 1000ppm. Έτσι την καλύτερη αποτελεσματικότητα έδειξαν οι εφαρμογές των ελαίων του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* στα 500ppm και του φυτού *Coridothymus capitatus* στα 1000ppm.



Διαγράμματα 3.1.2 A-B: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Ρίγανη) και *Coridothymus capitatus* (Θυμάρι) στην ανάπτυξη της ασθένειας του φυτοπαθογόνου

βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* που εκφράζεται από το εμβαδόν ασθένειας (AUDPC) (A) και το σχετικό εμβαδόν ασθένειας (Relative AUDPC) (B) ανά τις εφαρμογές των αιθερίων ελαίων στα φυτά σε συγκεντρώσεις 500ppm και 1000ppm σε σχέση με τον μάρτυρα, όπου:

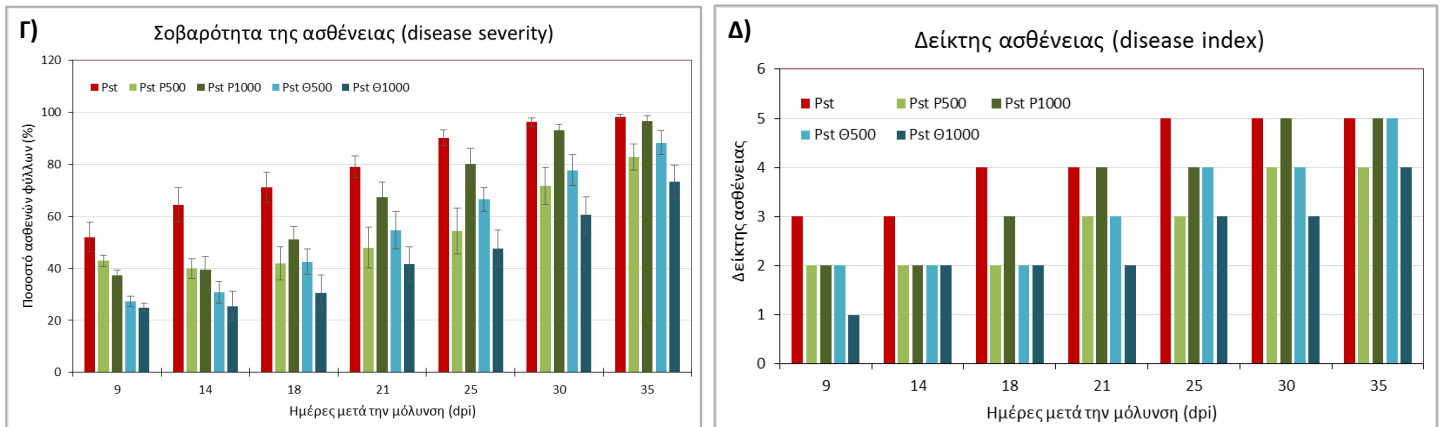
- Pst: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Μάρτυρας)
Pst P500: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
Pst P1000: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
Pst Θ500: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
Pst Θ1000: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm

Στην Εικόνα 3.1.2 α και στα Διαγράμματα 3.1.2 Γ-Δ της σοβαρότητας και του δείκτη της ασθένειας καταγράφεται η εξέλιξη της ασθένειας ως ποσοστό των ασθενών φύλλων κατά τις ημέρες μετά την μόλυνση με το παθογόνο βακτήριο και η κλιμάκωση της ασθένειας. Όλες οι εφαρμογές σε σχέση με τον μάρτυρα έχουν μειωμένα συμπτώματα ενώ η ανάπτυξη της ασθένειας στις εφαρμογές του ελαίου του θυμαριού από την συγκέντρωση των 500ppm στην συγκέντρωση των 1000ppm είναι μειωμένη. Η μεγαλύτερη ανάπτυξη της ασθένειας καταγράφεται στην εφαρμογή του ελαίου της ρίγανης στα 1000ppm.



Εικόνα 3.1.2 α: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Ρίγανη) και *Coridothymus capitatus* (Θυμαρί) στην εξέλιξη της ασθένειας του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, ανά τις ημέρες μετά την μόλυνση όπου καταγράφηκαν τα συμπτώματα από την προσβολή του βακτηρίου και τις εφαρμογές των αιθερίων ελαίων στα φυτά σε συγκεντρώσεις 500ppm και 1000ppm σε σχέση με τον μάρτυρα, όπου:

- PST: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Μάρτυρας)
- Pst P500: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
- Pst P1000: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
- Pst Θ500: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
- Pst Θ1000: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm



Διαγράμματα 3.1.2 Γ-Δ: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Ρίγανη) και *Coridothymus capitatus* (Θυμαρί) στην εξέλιξη της ασθένειας του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* που εκφράζεται από την σοβαρότητα της ασθένειας (Γ) και τον δείκτη της ασθένειας (Δ) με κλίμακα 0-5* ανά τις ημέρες μετά την μόλυνση (days post inoculation, dpi) όπου καταγράφηκαν τα συμπτώματα από την προσβολή του βακτηρίου και τις εφαρμογές των αιθερίων ελαίων στα φυτά σε συγκεντρώσεις 500ppm και 1000ppm σε σχέση με τον μάρτυρα, όπου:

- Pst: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Μάρτυρας)
- Pst P500: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
- Pst P1000: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
- Pst Θ500: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
- Pst Θ1000: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm

* Δείκτης ασθένειας: 0: Υγιές φυτό, 1: 5-25%, 2: 25,1-45%, 3: 45,1-65%, 4: 65,1-85%, 5: 85,1-100%.

Στις μετρήσεις που έγιναν για την πορεία της ανάπτυξης των φυτών όπως φαίνεται από την Εικόνα 3.1.2 β και την 3.1.2 γ όπου φαίνονται οι εφαρμογές συνολικά και συγκριτικά την 35^η ημέρα αντίστοιχα, υπάρχουν διαφοροποιήσεις σε σχέση με τους μάρτυρες αλλά και σε σχέση με τα μολυσμένα φυτά όλων των επεμβάσεων ως προς το ύψος, τον αριθμό φύλλων και το βάρος των στελεχών των φυτών. Πιο συγκεκριμένα το μέσο ύψος των φυτών όπως καταγράφεται στο Διάγραμμα 3.1.2 Ε είναι χαμηλότερο στον θετικό μάρτυρα δηλαδή στα φυτά που μολύνθηκαν με το παθογόνο βακτήριο μόνο, ενώ αρχίζει και αυξάνεται στα φυτά που μολύνθηκαν με το παθογόνο και έγινε και εφαρμογή των ελαίων, με χαρακτηριστική αύξηση στις εφαρμογές του ελαίου του φυτού *Coridothymus capitatus* από την συγκέντρωση των 500ppm στα 1000ppm κάτι που δεν συμβαίνει στις εφαρμογές του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*. Τα φυτά με τις εφαρμογές χωρίς την παρουσία παθογόνου, έχουν μεγαλύτερο μέσο ύψος σε σχέση με τα φυτά που μολύνθηκαν με το παθογόνο βακτήριο. Ο αρνητικός μάρτυρας, όπου εφαρμόστηκε μόνο νερό, DMSO και Tween 20 παρουσιάζει μείωση στο μέσο ύψος σε σχέση με τις εφαρμογές των αιθερίων ελαίων στα φυτά. Οι

εφαρμογές των αιθερίων ελαίων μόνο κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα με μια μικρή αύξηση σε αυτές του φυτού *Coridothymus capitatus*.

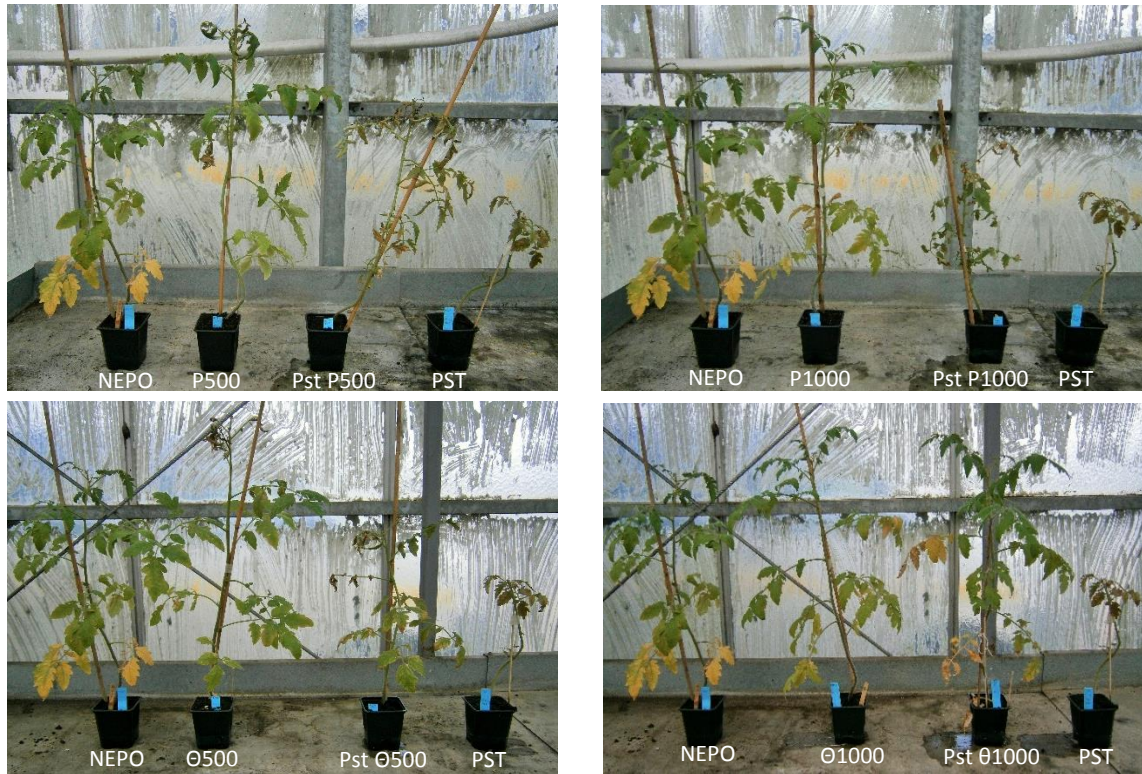
Ο μέσος αριθμός φύλλων στα φυτά τομάτας ανά τις εφαρμογές παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 3.1.2 Z, με τον μικρότερο μέσο αριθμό φύλλων να έχει ο θετικός μάρτυρας, δηλαδή τα φυτά που εφαρμόστηκε μόνο το παθογόνο βακτήριο και στις εφαρμογές των αιθερίων ελαίων με το παθογόνο βακτήριο να παρουσιάζεται αύξηση σε σχέση με τον μάρτυρα. Η μεγαλύτερη αύξηση καταγράφεται στην εφαρμογή του αιθερίου ελαίου του φυτού *Coridothymus capitatus* με συγκέντρωση 1000ppm στα 9 φύλλα ανά φυτό από τις 18 ημέρες μετά την μόλυνση και μετά, ενώ την μικρότερη αύξηση παρουσιάζει η εφαρμογή του αιθερίου ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* στην αντίστοιχη συγκέντρωση στα 7 φύλλα ανά φυτό από τις 14 ημέρες μετά την μόλυνση και μετά. Στις αντίστοιχες εφαρμογές χωρίς την παρουσία του βακτηρίου παρατηρείται μια συνολική αύξηση του μέσου αριθμού φύλλων σε σχέση με τα φυτά που μολύνθηκαν με το παθογόνο βακτήριο. Ο αρνητικός μάρτυρας, δηλαδή τα φυτά που εφαρμόστηκε μόνο νερό, DMSO και Tween 20 έχουν μειωμένο αριθμό φύλλων σε σχέση με τα φυτά που εφαρμόστηκαν τα έλαια με την εφαρμογή του ελαίου του φυτού *Coridothymus capitatus* στα 500ppm να παρουσιάζει μικρή αύξηση σε σχέση με τις υπόλοιπες εφαρμογές όπου κυμαίνονται στα ίδια περίπου επίπεδα.



Εικόνα 3.1.2 β: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (ρίγανη) και *Coridothymus capitatus* (θυμάρι) ανά εφαρμογή και ανά τις ημέρες μετά την μόλυνση του παθογόνου στα φυτά όπου:

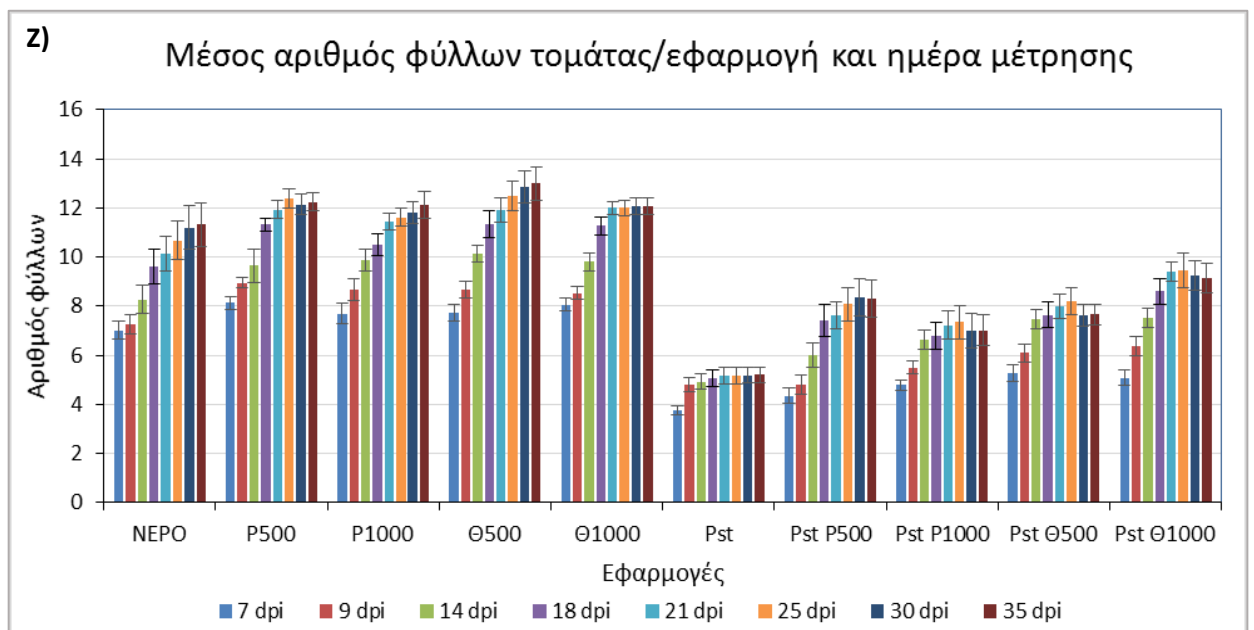
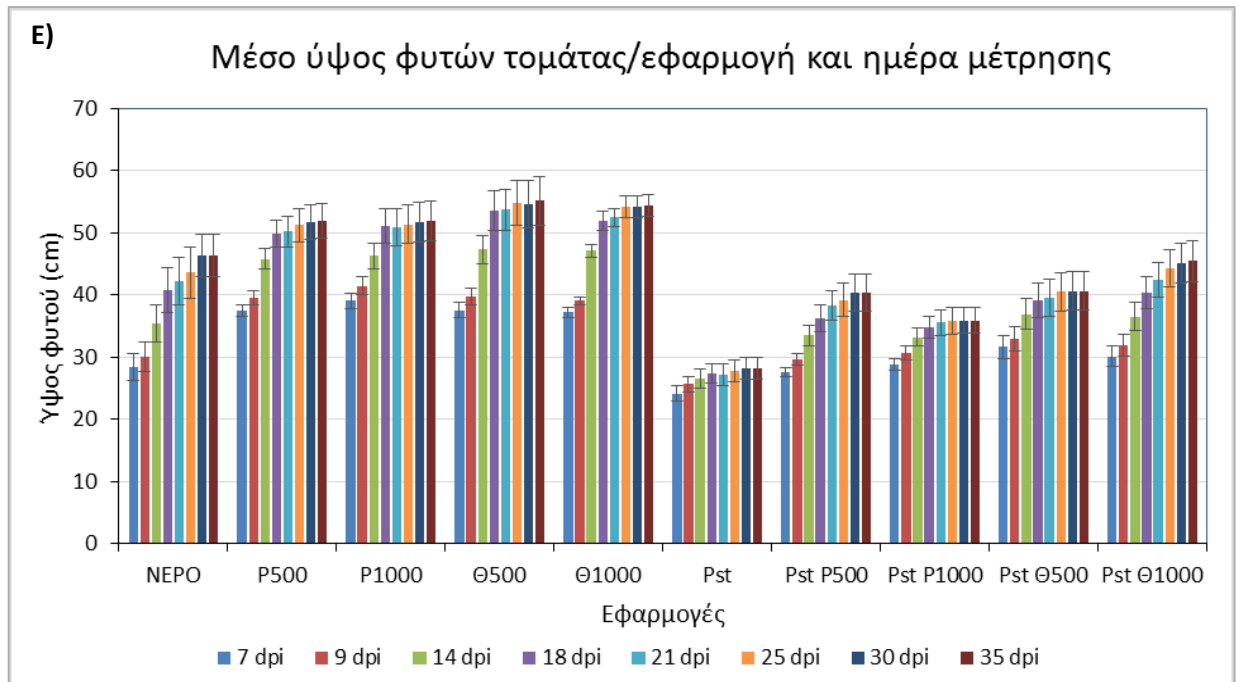
NEPO	Νερό+DMSO+Tween 20 (αρνητικός μάρτυρας)
P500	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
P1000	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
Θ500	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
Θ1000	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm
PST	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (θετικός μάρτυρας)
Pst P500	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
Pst P1000	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
Pst Θ500	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
Pst Θ1000	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm

35η ημέρα



Εικόνα 3.1.2 γ: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (ρίγανη) και *Coridothymus capitatus* (θυμάρι) ανά τις εφαρμογές την 35η ημέρα μετά την μόλυνση του παθογόνου στα φυτά όπου:

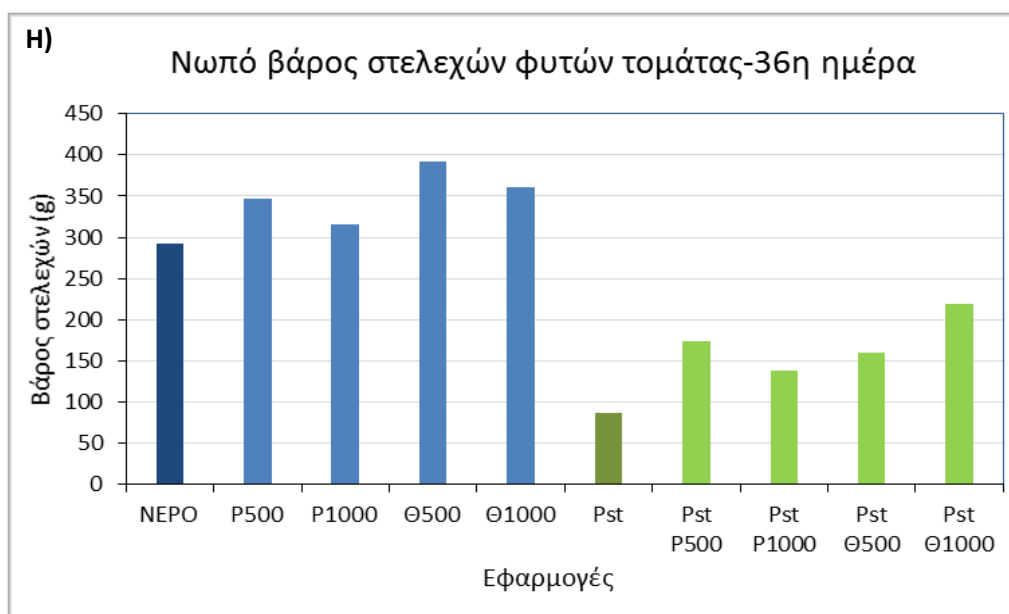
NEPO	Νερό+DMSO+Tween 20 (αρνητικός μάρτυρας)
P500	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
P1000	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
Θ500	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
Θ1000	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm
PST	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (θετικός μάρτυρας)
Pst P500	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
Pst P1000	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
Pst Θ500	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
Pst Θ1000	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm



Διαγράμματα 3.1.2 Ε-Ζ: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (ρίγανη) και *Coridothymus capitatus* (θυμάρι) στο ύψος των φυτών τομάτας (Ε) και στον αριθμό φύλλων (Ζ) ανά εφαρμογή και ανά τις ημέρες μετά την μόλυνση του παθογόνου στα φυτά όπου:

NEPO	Νερό+DMSO+Tween 20 (αρνητικός μάρτυρας)
P500	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
P1000	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
Θ500	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
Θ1000	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm
Pst	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (θετικός μάρτυρας)
Pst P500	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
Pst P1000	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
Pst Θ500	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
Pst Θ1000	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm

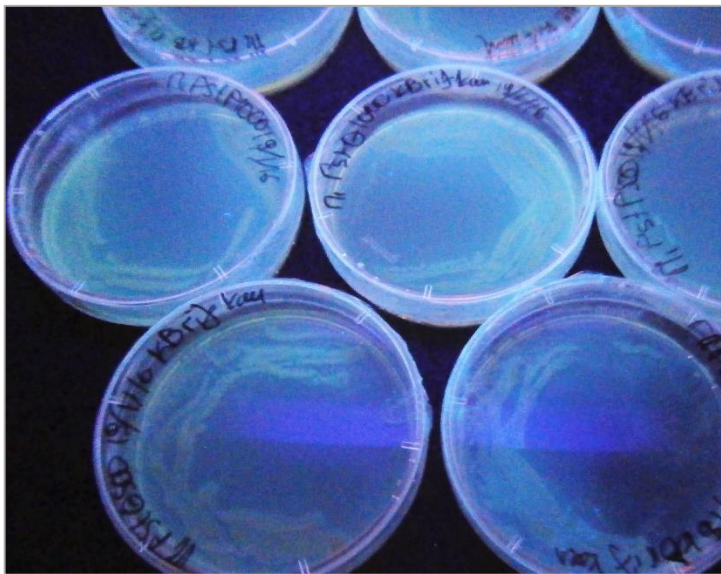
Την 36η ημέρα μετά την μόλυνση αποκόπηκε το υπέργειο μέρος των φυτών και μετρήθηκε το νωπό βάρος των στελεχών των φυτών τομάτας. Όπως παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 3.1.2 Η στα φυτά που μολύνθηκαν με το παθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ο θετικός μάρτυρας έχει μειωμένο βάρος κατά πολύ σε σχέση με τις εφαρμογές των ελαίων με το βακτήριο, ενώ παρατηρείται κλιμακωτή αύξηση στις εφαρμογές του ελαίου του φυτού *Coridothymus capitatus* από την συγκέντρωση των 500ppm στη συγκέντρωση των 1000ppm με το παθογόνο βακτήριο, με την τελευταία να έχει την μεγαλύτερη τιμή νωπού βάρους. Τα φυτά στις εφαρμογές χωρίς την παρουσία βακτηρίου παρουσιάζουν μεγαλύτερο νωπό βάρος σε σχέση με τα αντίστοιχα φυτά που μολύνθηκαν με το βακτήριο. Ο αρνητικός μάρτυρας παρουσιάζει μείωση σε σχέση με τις εφαρμογές των αιθερίων ελαίων, ενώ στις εφαρμογές και των δύο ελαίων παρατηρείται μικρότερο βάρος στις εφαρμογές με αυξημένη συγκέντρωση αιθερίου ελαίου (1000ppm) και το έλαιο του φυτού *Coridothymus capitatus* χωρίς το παθογόνο βακτήριο να έχει τις μεγαλύτερες τιμές νωπού βάρους των φυτών τομάτας.



Διάγραμμα 3.1.2 Η: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (ρίγανη) και *Coridothymus capitatus* (θυμάρι) στο βάρος στελεχών των φυτών τομάτας ανά εφαρμογή την 36^η ημέρα μετά την μόλυνση του παθογόνου στα φυτά, όπου:

NEPO	Νερό+DMSO+Tween 20 (αρνητικός μάρτυρας)
P500	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
P1000	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
Θ500	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
Θ1000	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm
Pst	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (θετικός μάρτυρας)
Pst P500	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
Pst P1000	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
Pst Θ500	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
Pst Θ1000	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm

Μετά την μέτρηση του νεπού βάρους των στελεχών των φυτών τομάτας ακολούθησε η απομόνωση του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* από τα ασθενή φυτά από κηλίδες που είχαν τα φύλλα. Ταυτοποιήθηκε επιτυχώς όπως διακρίνεται και στην Εικόνα 3.1.2 δ, όπου το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* με την παρουσία ειδικής λάμπας UV σε θρεπτικό υλικό King's B φθορίζει.



Εικόνα 3.1.2 δ: Απομόνωση του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* από φυτά με τα συμπτώματα της ασθένειας της βακτηριακής στιγμάτωσης που προκαλεί το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, όπου διακρίνεται ο χαρακτηριστικός φθορισμός του σε λάμπα UV.

3.2 Αξιολόγηση της επίδρασης των αιθερίων ελαίων στην ανάπτυξη του μύκητα *Verticillium dahliae* σε συνθήκες εργαστηρίου (*in vitro*) και θερμοκηπίου (*in vivo*).

3.2.1 Επίδραση των αιθερίων ελαίων (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Coridothymus capitatus*, *Origanum majorana*, *Satureja thymbra*) στην ανάπτυξη του μύκητα *Verticillium dahliae* στο εργαστήριο (*in vitro*).

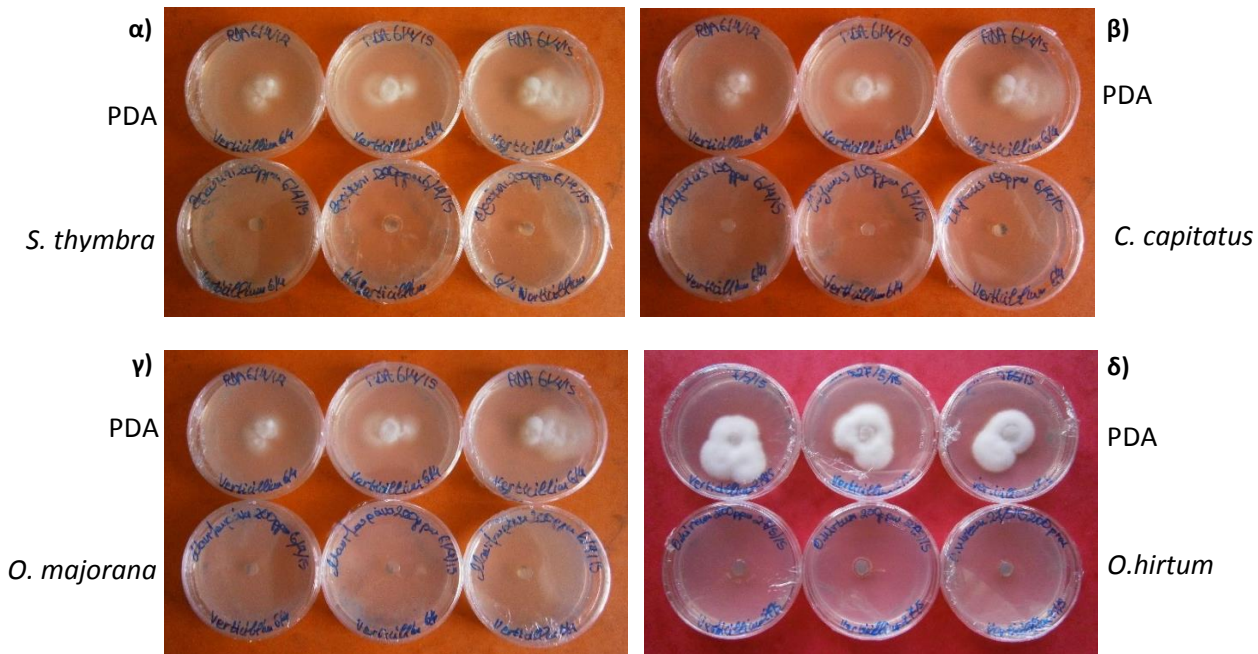
Για την διερεύνηση της αποτελεσματικότητας των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Coridothymus capitatus*, *Origanum majorana* και *Satureja thymbra* έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Verticillium dahliae* εφαρμόστηκαν διάφορες συγκεντρώσεις που κυμάνθηκαν από τα 35ppm, 50ppm, 80ppm, 150ppm έως και τα 200ppm σε κάποια αιθέρια έλαια που αντιστοιχούν σε 3,5μl, 5μl, 8μl, 15μl και 20μl ανά τρυβλίο. Οι μετρήσεις έγιναν στις 7 ημέρες επώασης όπου στα τρυβλία του μάρτυρα (PDA) ο μύκητας αναπτύχθηκε σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου.

Στην Εικόνα 3.2.1 είναι έκδηλη η παρεμπόδιση που προκαλούν οι εφαρμογές των αιθερίων ελαίων στον μύκητα *Verticillium dahliae*. Πιο συγκεκριμένα γίνεται αντιληπτή η πλήρης αναστολή της ανάπτυξης του μύκητα στις εφαρμογές όλων των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Satureja thymbra*, *Origanum majorana* και *Coridothymus capitatus* εφόσον δεν έχουν αναπτυχθεί καθόλου υφές.

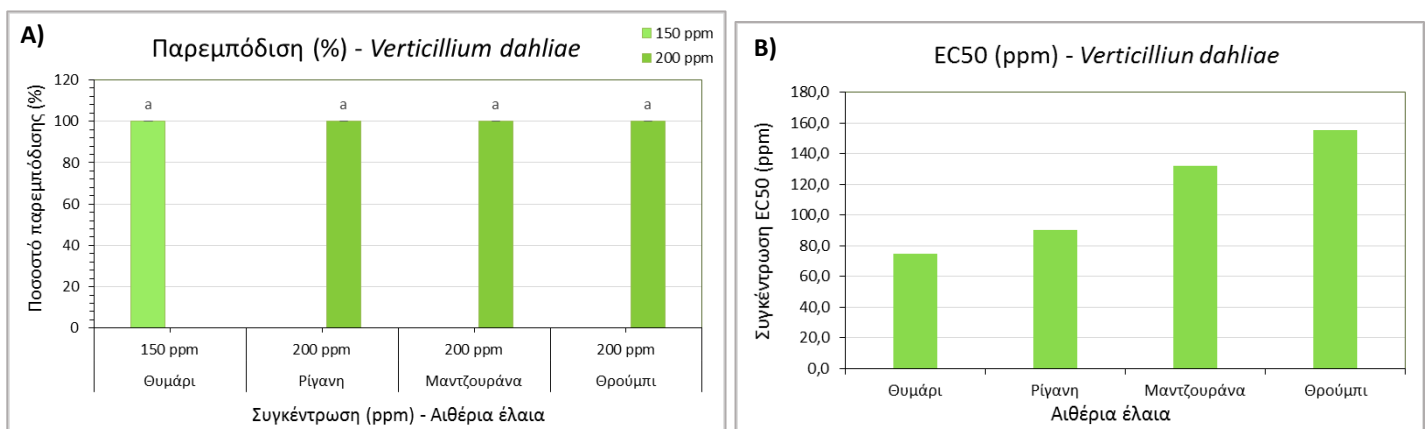
Στο Διάγραμμα 3.2.1 Α έχει καταγραφεί πλήρης παρεμπόδιση 100% για όλες τις εφαρμογές που έγιναν με τα αιθέρια έλαια των φυτών *Coridothymus capitatus*, *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Satureja thymbra* και *Origanum majorana*, με συγκεντρώσεις 200ppm και για το αιθέριο έλαιο του φυτού *Coridothymus capitatus* 150ppm. Από αυτά τα ποσοστά παρεμποδίσεων καθίσταται σαφές ότι το έλαιο του φυτού *Coridothymus capitatus* αποδείχθηκε λίγο πιο αποτελεσματικό στην παρεμπόδιση του μύκητα.

Στο Διάγραμμα 3.2.1 Β παρατηρείται ότι η ανάπτυξη του μύκητα παρουσιάζει ευαισθησία στα αιθέρια έλαια των φυτών *Coridothymus capitatus* και *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, αφού παρουσιάζουν χαμηλές συγκεντρώσεις EC50, με το αιθέριο έλαιο του φυτού *Coridothymus capitatus* να έχει τη χαμηλότερη συγκέντρωση όπως φαίνεται. Το αιθέριο έλαιο του φυτού *Origanum majorana* τοποθετείται αμέσως μετά και το αιθέριο έλαιο του φυτού *Satureja thymbra* εμφανίζει την υψηλότερη συγκέντρωση. Οι υψηλές συγκεντρώσεις που παρουσίασαν τα δυο τελευταία έλαια αποτυπώνουν την ανθεκτικότητα που παρουσιάζει η ανάπτυξη του μύκητα προς αυτά.

Άρα από το Διάγραμμα αυτό γίνεται σαφές ότι τα αιθέρια έλαια των φυτών *Coridothymus capitatus* και *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* είναι αποτελεσματικότερα έναντι του μύκητα *Verticillium dahliae*.



Εικόνα 3.2.1: Επίδραση της εφαρμογής των τεσσάρων αιθερίων ελαίων των φυτών *Satureja thymbra* σε συγκέντρωση 200ppm (α), *Coridothymus capitatus* σε συγκέντρωση 150ppm (β), *Origanum majorana* σε συγκέντρωση 200ppm (γ) και *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* σε συγκέντρωση 200ppm (δ) (κατά σειρά όπως φαίνονται) στην ανάπτυξη του μύκητα *Verticillium dahliae* σε σύγκριση με τον μάρτυρα (PDA), στις 7 ημέρες επώασης.



Διαγράμματα 3.2.1 A-B: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Coridothymus capitatus* (Θυμάρι), *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Ρίγανη), *Origanum majorana* (Μαντζουράνα) και *Satureja thymbra* (Θρούμπι) επί της ανάπτυξης του μύκητα *Verticillium dahliae* εκπεφρασμένη ως ποσοστό παρεμπόδισης της ανάπτυξης επί τοις εκατό (%) του μάρτυρα (A) και ως συγκέντρωση EC50 (ppm) (B).

3.2.2 Επίδραση των αιθερίων ελαίων (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Coridothymus capitatus* ή *Thymus vulgaris*) στην αντιμετώπιση της αδρομύκωσης – βερτισιλλίωσης από τον μύκητα *Verticillium dahliae* και στην ανάπτυξη των φυτών μελιτζάνας στο θερμοκήπιο (*in vivo*).

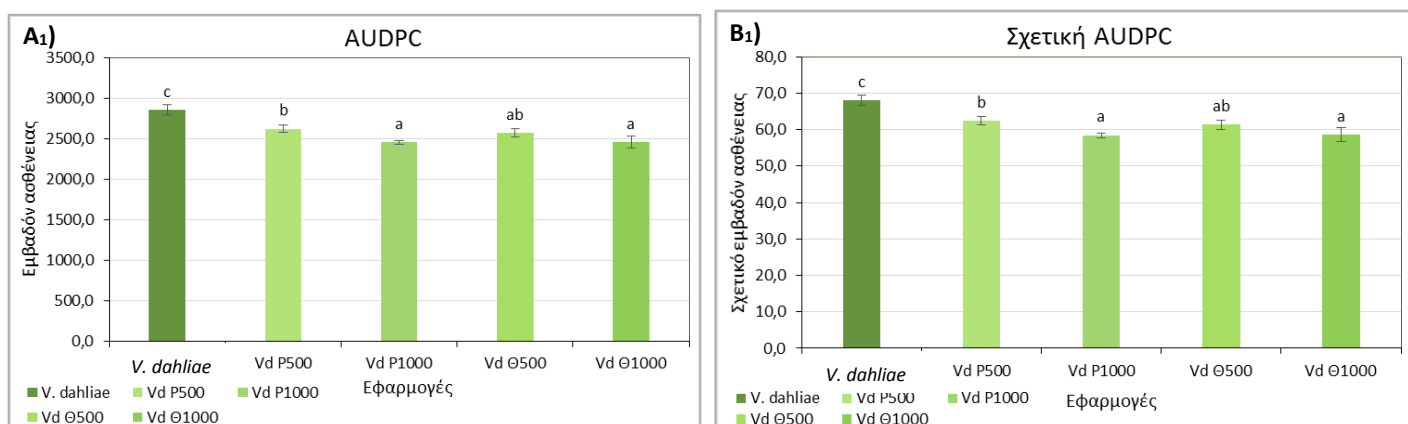
Από τα δεδομένα που προέκυψαν από τις *in vitro* δοκιμές με τα αιθέρια έλαια των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* και *Coridothymus capitatus* να είναι αποτελεσματικότερα στην αντιμετώπιση του μύκητα *Verticillium dahliae* και με βάση την μελέτη των Ben-Jabeur *et al.*, 2015 και σε αυτή την περίπτωση, έγινε δοκιμή στην οποία τα αιθέρια έλαια των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (με περιοχή καλλιέργειας τα Φιλιατρά Πελοποννήσου) και *Coridothymus capitatus* εφαρμόστηκαν με ριζοπότισμα σε φυτάρια μελιτζάνας και σε 72 ώρες πραγματοποιήθηκε μόλυνση με ριζοπότισμα του παθογόνου μύκητα *Verticillium dahliae*. Οι πρώτες μετρήσεις λήφθηκαν στις 13 ημέρες μετά την μόλυνση και ανά 2-3 ημέρες λαμβάνονταν μετρήσεις έως τις 37. Μετρήθηκε το ύψος των φυτών, η εξέλιξη των συμπτωμάτων, ο αριθμός φύλλων και αφού αποκόπηκε το υπέργειο μέρος των φυταρίων μελιτζάνας μετρήθηκε το νωπό βάρος των στελεχών των φυτών.

Η εξέλιξη της ασθένειας καταγράφεται στα παρακάτω διαγράμματα του εμβαδού ασθένειας (AUDPC, Area Under Disease Progress Curve), του σχετικού εμβαδού ασθένειας (Relative AUDPC), της σοβαρότητας της ασθένειας (Disease Severity) που είναι το ποσοστό των ασθενών φύλλων ανά τις ημέρες που καταγράφηκαν συμπτώματα μετά την μόλυνση και του δείκτη της ασθένειας (Disease Index) που είναι η σοβαρότητα της ασθένειας σε κλίμακα από το 0 έως το 4 (Tjamos *et al.*, 1991) και πιο συγκεκριμένα:

Δείκτης ασθένειας	Ποσοστό ασθένειας (%)
0	Υγιές φυτό
1	≤25
2	≤50
3	≤75
4	>80-100

Στα Διαγράμματα 3.2.2 Α₁-Β₁ με το εμβαδόν και το σχετικό εμβαδόν ασθένειας διακρίνεται ο μάρτυρας, δηλαδή τα φυτά που μολύνθηκαν μόνο με τον μύκητα και στις δυο περιπτώσεις να διαφέρει στατιστικά με μεγαλύτερες τιμές σε σχέση με τις εφαρμογές των αιθερίων ελαίων. Οι εφαρμογές των αιθερίων ελαίων των φυτών

Origanum vulgare subsp. *hirtum* και *Coridothymus capitatus* στα 1000ppm ταυτίζονται στατιστικά έχοντας τις μικρότερες τιμές. Οι εφαρμογές των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* και *Coridothymus capitatus* στα 500ppm έχουν μεγαλύτερες τιμές με το έλαιο του φυτού *Coridothymus capitatus* στα 500ppm να σχετίζεται στατιστικά και με τις τιμές των ελαίων στα 1000ppm.



Διαγράμματα 3.2.2 A₁-B₁: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Ρίγανη) και *Coridothymus capitatus* (Θυμάρι) στην ανάπτυξη της ασθνεύας του φυτοπαθογόνου μύκητα *Verticillium dahliae* που εκφράζεται από το εμβασδόν ασθνεύας (AUDPC) (A₁) και το σχετικό εμβασδόν ασθνεύας (Relative AUDPC) (B₁) ανά τις εφαρμογές των αιθερίων ελαίων στα φυτά σε συγκεντρώσεις 500ppm και 1000ppm σε σχέση με τον μάρτυρα, όπου:

- V. dahliae *Verticillium dahliae* (Μάρτυρας)
- Vd P500: *Verticillium dahliae* + έλαιο ρίγανης σε συγκεντρωση 500ppm
- Vd P1000: *Verticillium dahliae* + έλαιο ρίγανης σε συγκεντρωση 1000ppm
- Vd Θ500: *Verticillium dahliae* + έλαιο θυμαριού σε συγκεντρωση 500ppm
- Vd Θ1000: *Verticillium dahliae* + έλαιο θυμαριού σε συγκεντρωση 1000ppm

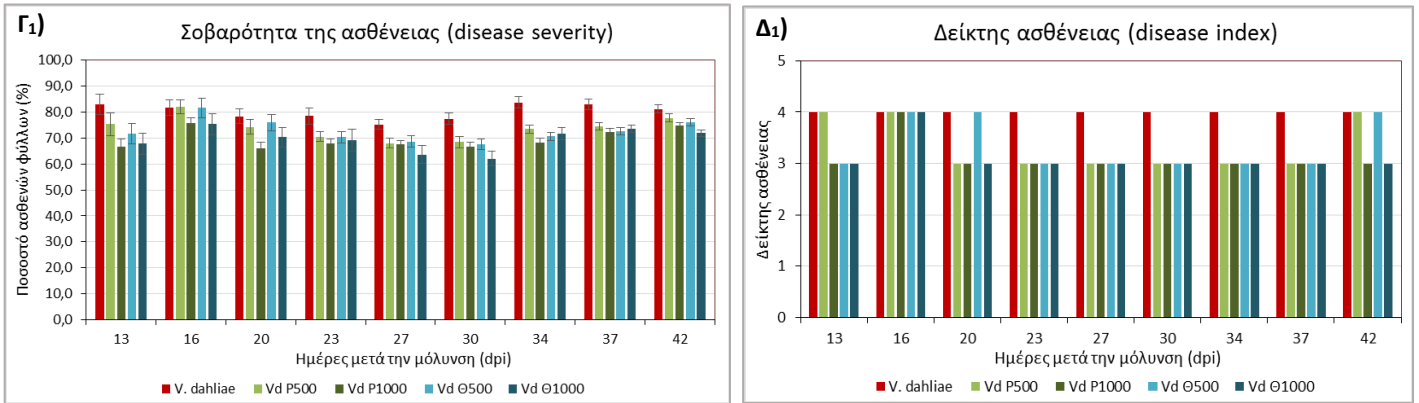
Από την Εικόνα 3.2.2 α και τα Διαγράμματα 3.2.2 Γ₁-Δ₁ της σοβαρότητας και του δείκτη ασθνεύας διακρίνεται η διαφορά στις τιμές του μάρτυρα σε σχέση με τις τιμές των εφαρμογών των αιθερίων ελαίων. Υπάρχουν όμως και οι περιπτώσεις όπου οι τιμές των εφαρμογών είναι σε κοντινά ή και στα ίδια επίπεδα με τις τιμές του μάρτυρα όπως στις 16 ημέρες μετά την μόλυνση όπου οι εφαρμογές και των δυο ελαίων στη συγκεντρωση των 500ppm είναι στα ίδια επίπεδα με τον μάρτυρα και οι αντίστοιχες εφαρμογές των 1000ppm είναι σε κοντινά επίπεδα, στις 13 ημέρες μετά την μόλυνση η εφαρμογή του ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* στα 500ppm, στις 20 ημέρες μετά την μόλυνση η εφαρμογή του αιθερίου ελαίου του φυτού *Coridothymus capitatus* στα 500ppm και στις 42 ημέρες μετά την μόλυνση οι εφαρμογές των ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* και *Coridothymus capitatus* στα 500ppm είναι πιο κοντά με την τιμή του μάρτυρα. Σε γενικές γραμμές όμως όπως μπορεί να

διακριθεί από τα Διαγράμματα 3.2.2 Α₁-Β₁ και 3.2.2 Γ₁-Δ₁ υπάρχει μια μικρή μείωση των συμπτωμάτων από τη δράση των αιθερίων ελαίων.



Εικόνα 3.2.2 α: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Ρίγανη) και *Coridothymus capitatus* (Θυμάρι) στην εξέλιξη της ασθένειας του φυτοπαθογόνου μύκητα *Verticillium dahliae* ανά τις ημέρες μετά την μόλυνση, όπου καταγράφηκαν τα συμπτώματα από την προσβολή του παθογόνου μύκητα και τις εφαρμογές των αιθερίων ελαίων στα φυτά σε συγκεντρώσεις 500ppm και 1000ppm σε σχέση με τον μάρτυρα, όπου:

VD: *Verticillium dahliae* (Μάρτυρας)
 Vd P500: *Verticillium dahliae* + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
 Vd P1000: *Verticillium dahliae* + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
 Vd Θ500: *Verticillium dahliae* + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
 Vd Θ1000: *Verticillium dahliae* + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm



Διαγράμματα 3.2.2 Γ₁-Δ₁: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Ρίγανη) και *Coridothymus capitatus* (Θυμαρί) στην εξέλιξη της ασθένειας του φυτοπαθογόνου μύκητα *Verticillium dahliae* που εκφράζεται από την σοβαρότητα της ασθένειας (Γ₁) και τον δείκτη της ασθένειας (Δ₁) με κλίμακα 0-4* ανά τις ημέρες μετά την μόλυνση (days post inoculation, dpi) όπου καταγράφηκαν τα συμπτώματα από την προσβολή του παθογόνου μύκητα και τις εφαρμογές των αιθερίων ελαίων στα φυτά σε συγκεντρώσεις 500ppm και 1000ppm σε σχέση με τον μάρτυρα, όπου:

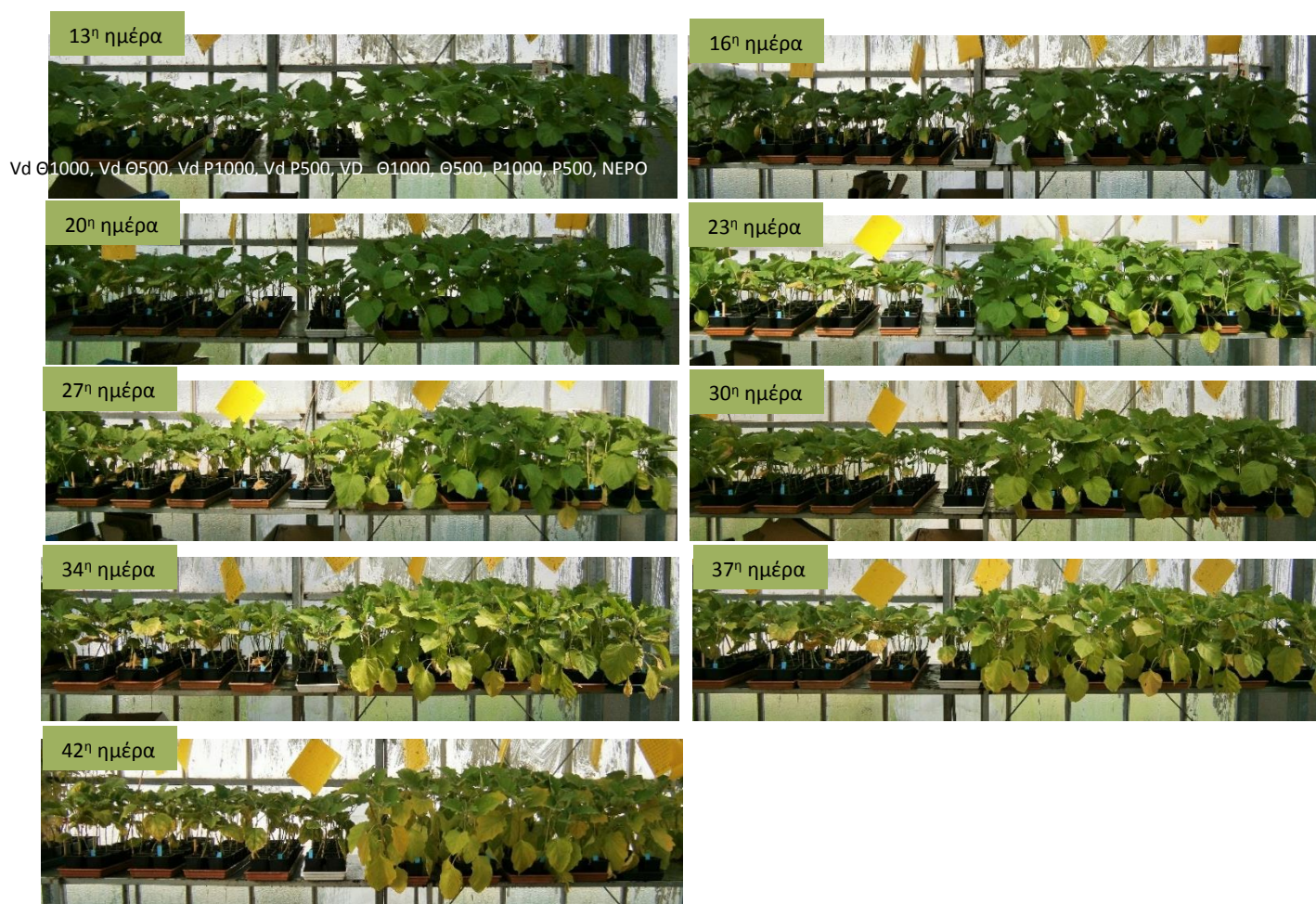
V. dahliae: *Verticillium dahliae* (Μάρτυρας)
 Vd P500: *Verticillium dahliae* + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
 Vd P1000: *Verticillium dahliae* + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
 Vd Θ500: *Verticillium dahliae* + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
 Vd Θ1000: *Verticillium dahliae* + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm

* Δείκτης ασθένειας: 0: Υγιές φυτό, 1: ≤25%, 2: ≤50%, 3: ≤75%, 4: >80-100%.

Σε ότι αφορά την ανάπτυξη των φυτών από τις Εικόνες 3.2.2 β και γ όπου αποτυπώνεται συγκεντρωτικά η εξέλιξη των φυτών μελιτζάνας και συγκριτικά οι εφαρμογές την 42^η ημέρα αντίστοιχα και το Διάγραμμα 3.2.2 Ε₁ του μέσου ύψους των φυτών μελιτζάνας ο θετικός μάρτυρας έχει χαμηλό μέσο ύψος. Τα φυτά μελιτζάνας που υπέστησαν μόλυνση και εφαρμόστηκαν τα αιθέρια έλαια εμφανίζουν μια μικρή αύξηση στο μέσο ύψος τους με την εφαρμογή του αιθερίου ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* στα 1000ppm να εμφανίζει λίγο μεγαλύτερη διαφοροποίηση από τον μάρτυρα και τις άλλες εφαρμογές να κυμαίνονται στα ίδια περίπου επίπεδα. Στις εφαρμογές των αιθερίων ελαίων χωρίς την μόλυνση σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα η μικρότερη αύξηση παρατηρείται στην εφαρμογή του ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* στα 500ppm, ενώ η εφαρμογή του ίδιου ελαίου στα 1000ppm παρουσίασε την μεγαλύτερη αύξηση μέσου ύψους σε σχέση με τον μάρτυρα. Οι

εφαρμογές του ελαίου του φυτού *Coridothymus capitatus* στα 500ppm και στα 1000ppm αυξήθηκαν περίπου το ίδιο σε σχέση με τον μάρτυρα.

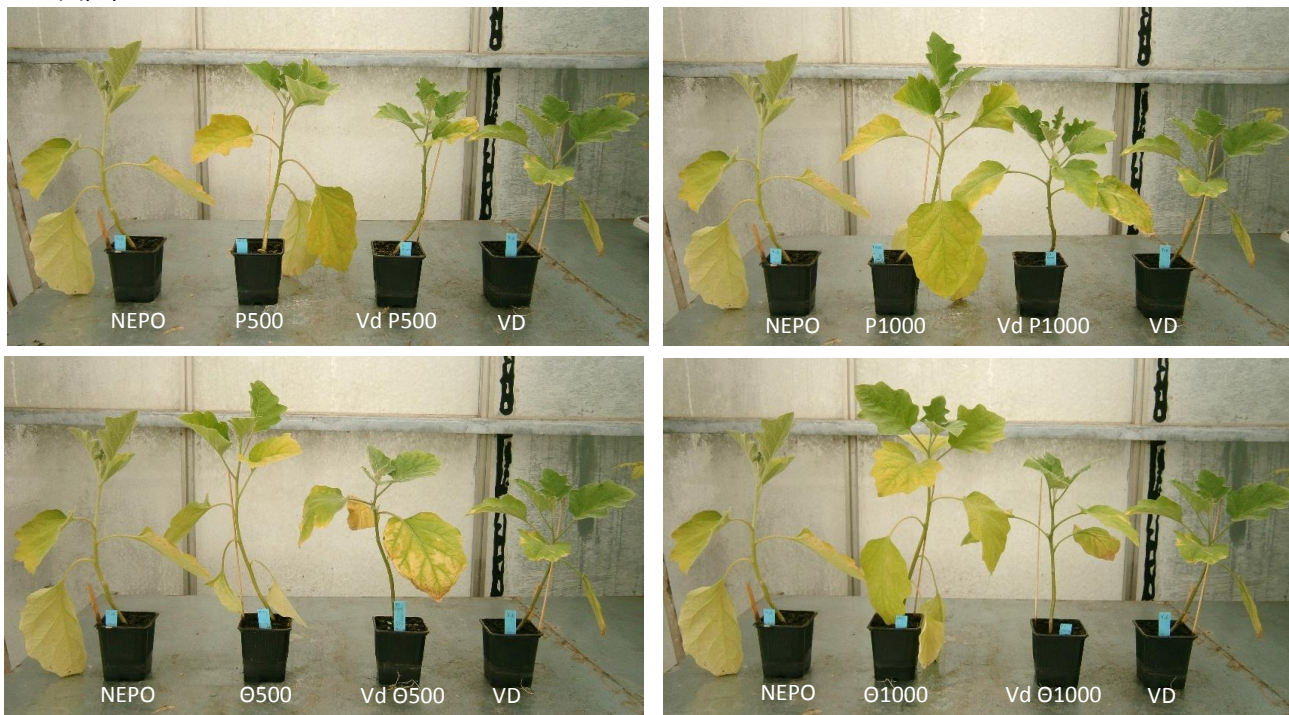
Ο μέσος αριθμός φύλλων όπως καταγράφεται και στο Διάγραμμα 3.2.2 Ζ₁ στις εφαρμογές των αιθερίων ελαίων χωρίς την μόλυνση του παθογόνου μύκητα δεν διέφερε σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Όμως στα φυτά που μολύνθηκαν με τον παθογόνο μύκητα υπήρξε μια μικρή αύξηση σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα και ιδιαίτερα στην εφαρμογή του ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* στα 1000ppm.



Εικόνα 3.2.2 β: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (ρίγανη) και *Coridothymus capitatus* (θυμάρι) ανά τις εφαρμογές και τις ημέρες μετά την μόλυνση του παθογόνου στα φυτά όπου:

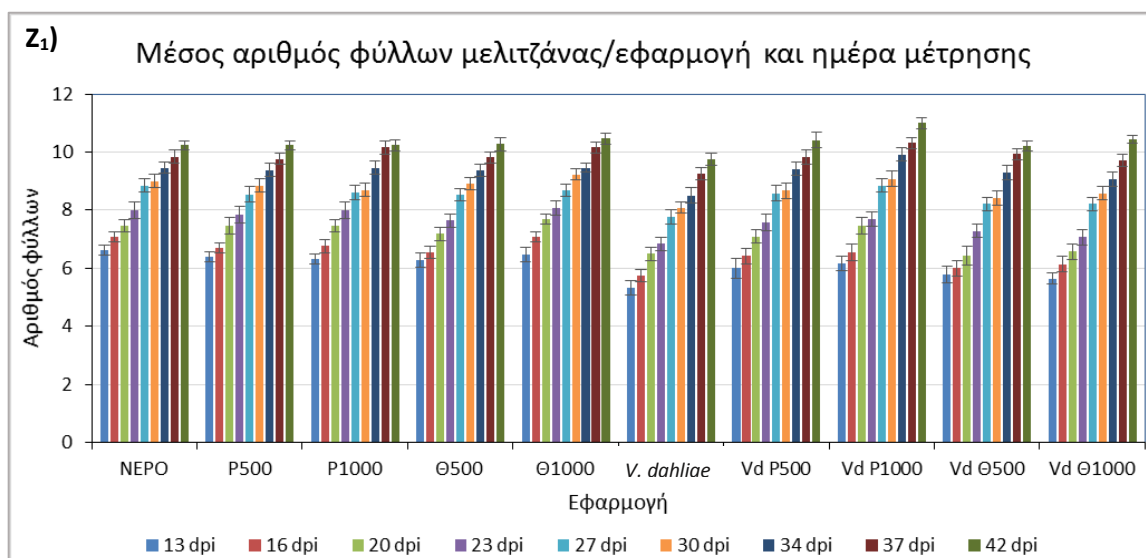
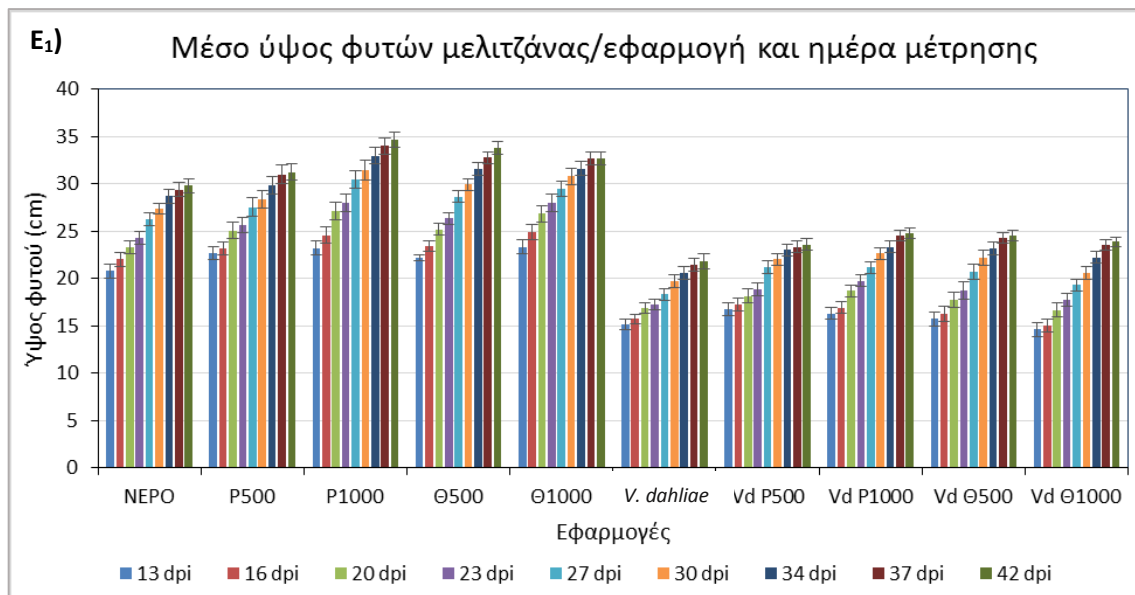
NEPO	Νερό+DMSO+Tween 20 (αρνητικός μάρτυρας)
P500	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
P1000	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
Θ500	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
Θ1000	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm
VD	<i>Verticillium dahliae</i> (θετικός μάρτυρας)
Vd P500	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
Vd P1000	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
Vd Θ500	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
Vd Θ1000	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm

41η ημέρα



Εικόνα 3.2.2 γ: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (ρίγανη) και *Coridothymus capitatus* (θυμάρι) ανά τις εφαρμογές την 41η ημέρα μετά την μόλυνση του παθογόνου στα φυτά όπου:

NEPO	Νερό+DMSO+Tween 20 (αρνητικός μάρτυρας)
P500	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
P1000	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
Θ500	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
Θ1000	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm
VD	<i>Verticillium dahliae</i> (θετικός μάρτυρας)
Vd P500	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
Vd P1000	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
Vd Θ500	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
Vd Θ1000	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm

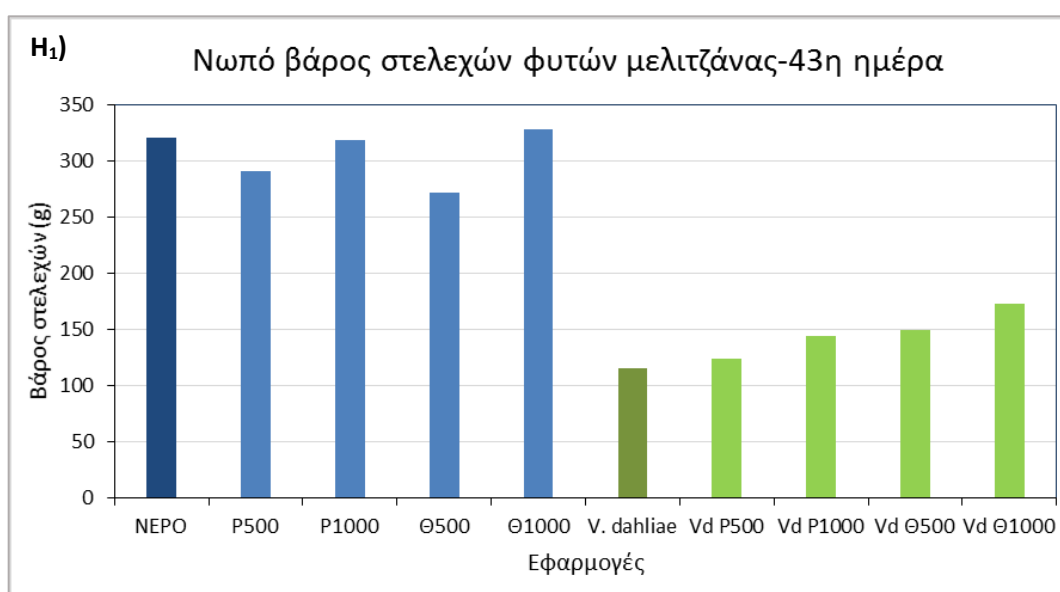


Διαγράμματα 3.2.2 Ε₁-Z₁: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (ρίγανη) και *Coridothymus capitatus* (θυμάρι) στο ύψος των φυτών μελιτζάνας (Ε₁) και στον αριθμό φύλλων (Z₁) ανά εφαρμογή και ανά τις ημέρες μετά την μόλυνση του παθογόνου στα φυτά όπου:

NEPO	Νερό+DMSO+Tween 20 (αρνητικός μάρτυρας)
P500	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
P1000	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
Θ500	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
Θ1000	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm
<i>V. dahliae</i>	<i>Verticillium dahliae</i> (θετικός μάρτυρας)
Vd P500	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
Vd P1000	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
Vd Θ500	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
Vd Θ1000	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm

Μετά την αποκοπή του υπέργειου μέρους των φυτών μελιτζάνας μετρήθηκε το νωπό βάρος ανά εφαρμογή όπου οι τιμές του αποτυπώνονται στο Διάγραμμα 3.2.2 Η₁. Στις εφαρμογές με την μόλυνση του μύκητα *Verticillium dahliae* ο θετικός μάρτυρας είχε την μικρότερη τιμή. Οι εφαρμογές και των δυο αιθερίων ελαίων στην συγκέντρωση

των 1000ppm είχαν μεγαλύτερο νωπό βάρος σε σχέση με αυτές των 500ppm, με την μεγαλύτερη τιμή να καταγράφεται από την εφαρμογή του ελαίου του φυτού *Coridothymus capitatus* στα 1000ppm. Υπάρχει μια σαφής διαφορά στο νωπό βάρος των φυτών χωρίς την μόλυνση σε σχέση με αυτά που μολύνθηκαν με τον μύκητα. Στα φυτά που δεν υπέστησαν μόλυνση οι εφαρμογές των δυο ελαίων στα 500ppm εμφανίζουν μικρότερο βάρος ακόμα και σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Η εφαρμογή του ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* στα 1000ppm είχε περίπου ίδιο νωπό βάρος σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα και η εφαρμογή του ελαίου του φυτού *Coridothymus capitatus* στα 1000ppm λίγο μεγαλύτερο νωπό βάρος σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα.



Διάγραμμα 3.2.2 Η1: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (ρίγανη) και *Coridothymus capitatus* (θυμάρι) στο βάρος στελεχών των φυτών μελιτζάνας ανά εφαρμογή την 43^η ημέρα μετά την μόλυνση του παθογόνου στα φυτά όπου:

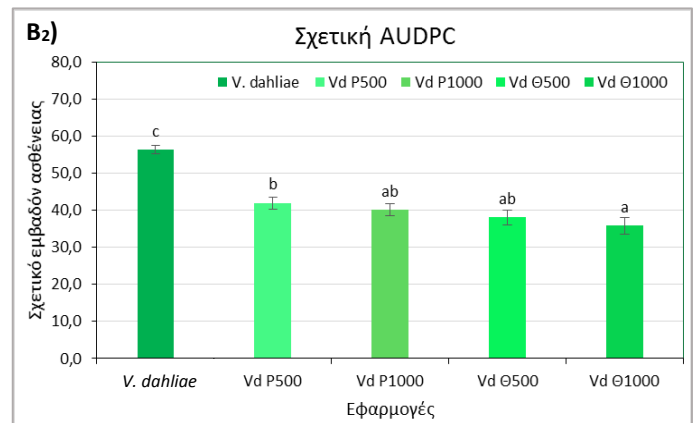
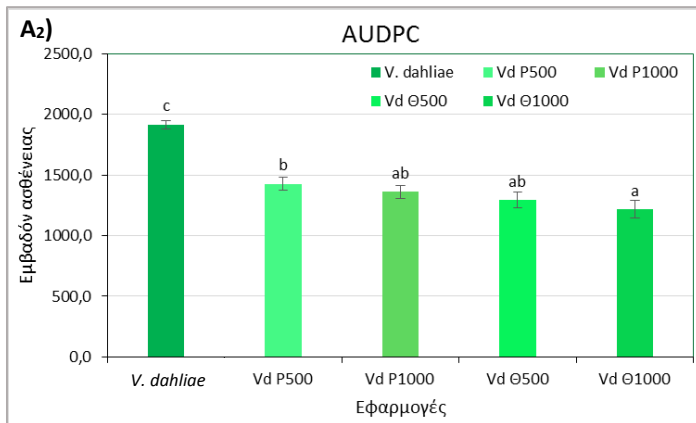
NEPO	Νερό+DMSO+Tween 20 (αρνητικός μάρτυρας)
P500	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
P1000	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
Θ500	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
Θ1000	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm
<i>V. dahliae</i>	<i>Verticillium dahliae</i> (θετικός μάρτυρας)
Vd P500	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
Vd P1000	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
Vd Θ500	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
Vd Θ1000	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm

Από τα δεδομένα που προέκυψαν από την προηγούμενη δοκιμή των αιθερίων ελαίων με τον μύκητα *Verticillium dahliae*, με την διεξαγωγή πειραμάτων μικρής κλίμακας, όπου διαπιστώθηκε ότι η εφαρμογή των ελαίων στις 24 ώρες πριν την μόλυνση με το

παθογόνο παρουσιάζει λιγότερα συμπτώματα, αλλά και από τις μελέτες των Hu & Coats, 2008 και Liu *et al.*, 2016 (στην πρώτη μελέτη αναφέρεται ότι ο χρόνος ημιζωής ($t_{0.5}$) για την διάλυση της θυμόλης είναι 5 ημέρες και στην δεύτερη μελέτη ο χρόνος ημιζωής της αποδόμησης της θυμόλης αλλάζει ανάλογα τα είδη των εδαφών και την συνεκτικότητα τους), θεωρήθηκε σημαντικό να γίνει και μια δεύτερη δοκιμή στην οποία τα αιθέρια έλαια των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (με περιοχή καλλιέργειας τα Φιλιατρά Πελοποννήσου) και *Thymus vulgaris* στις συγκεντρώσεις των 500ppm και 1000ppm εφαρμόστηκαν με ριζοπότισμα σε φυτάρια μελιτζάνας 24 ώρες πριν την πραγματοποίηση μόλυνσης με ριζοπότισμα του παθογόνου μύκητα *Verticillium dahliae* και 6 ημέρες μετά από την πρώτη εφαρμογή των ελαίων εφαρμόστηκε και δεύτερη δόση των αιθερίων ελαίων στις ίδιες συγκεντρώσεις. Οι πρώτες μετρήσεις λήφθηκαν στις 9 ημέρες μετά την μόλυνση και ανά 2-3 ημέρες λαμβάνονταν μετρήσεις έως τις 34. Μετρήθηκε το ύψος των φυτών, η εξέλιξη των συμπτωμάτων, ο αριθμός φύλλων και αφού αποκόπηκε το υπέργειο μέρος των φυταρίων μελιτζάνας μετρήθηκε το νωπό βάρος των στελεχών των φυτών.

Η εξέλιξη της ασθένειας καταγράφεται στα παρακάτω διαγράμματα ως εμβαδόν ασθένειας (AUDPC, Area Under Disease Progress Curve), του σχετικού εμβαδού ασθένειας (Relative AUDPC), της σοβαρότητας της ασθένειας (Disease Severity) και του δείκτη της ασθένειας (Disease Index) σε κλίμακα από το 0 έως το 4 (Tjamos *et al.*, 1991) όπως και στην πρώτη δοκιμή.

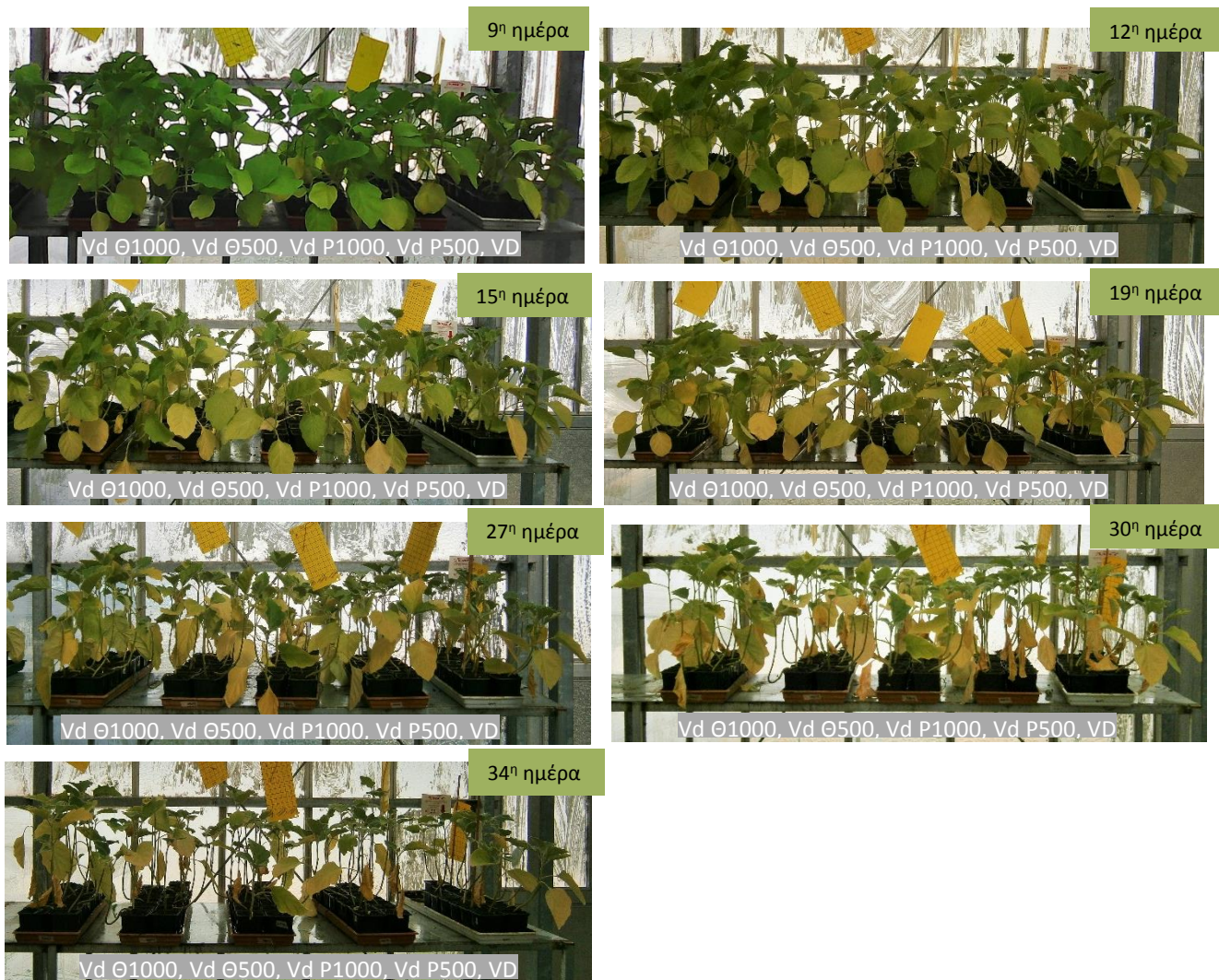
Στα Διαγράμματα 3.2.2 A₂-B₂ του εμβαδού ασθένειας και του σχετικού εμβαδού ασθένειας ο μάρτυρας, δηλαδή τα φυτά που μολύνθηκαν μόνο με το παθογόνο, παρουσίασε τις υψηλότερες τιμές και στατιστικά διαφορετικές από τις εφαρμογές. Η εφαρμογή με τις χαμηλότερες τιμές είναι αυτή του ελαίου του φυτού *Thymus vulgaris* στα 1000ppm, ενώ στα 500ppm είναι λίγο υψηλότερες οι τιμές. Η εφαρμογή με τις υψηλότερες τιμές είναι αυτή του ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* στα 500ppm και η αμέσως μικρότερη, αλλά κοντινή, η εφαρμογή του ίδιου ελαίου στα 1000ppm, όπου δεν διαφέρει στατιστικά από την εφαρμογή του ελαίου του φυτού *Thymus vulgaris* στα 500ppm.



Διαγράμματα 3.2.2 A₂-B₂: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Ρίγανη) και *Thymus vulgaris* (Θυμαρί) στην ανάπτυξη της ασθένειας του φυτοπαθογόνου μύκητα *Verticillium dahliae* που εκφράζεται από το εμβασδόν ασθένειας (AUDPC) (A₂) και το σχετικό εμβασδόν ασθένειας (Relative AUDPC) (B₂) ανά τις εφαρμογές των αιθερίων ελαίων στα φυτά σε συγκεντρώσεις 500ppm και 1000ppm σε σχέση με τον μάρτυρα, όπου:

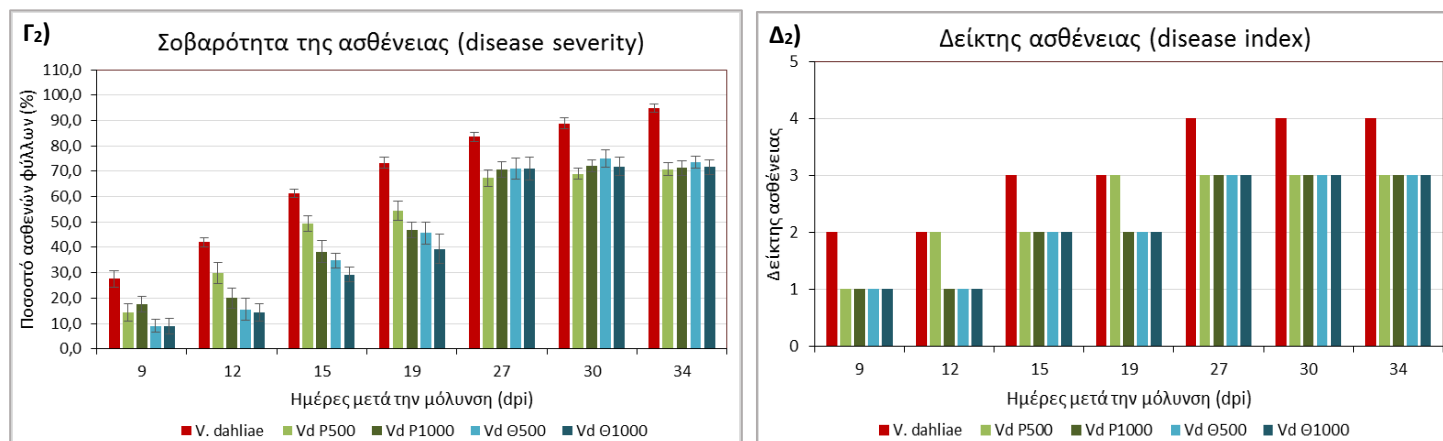
- V. dahliae: *Verticillium dahliae* (Μάρτυρας)
- Vd P500: *Verticillium dahliae* + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
- Vd P1000: *Verticillium dahliae* + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
- Vd Θ500: *Verticillium dahliae* + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
- Vd Θ1000: *Verticillium dahliae* + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm

Η σοβαρότητα και ο δείκτης ασθένειας που αποτυπώνονται στα Διαγράμματα 3.2.2 Γ₂-Δ₂ δείχνουν την ξεκάθαρη διαφοροποίηση στην εξέλιξη των συμπτωμάτων του μάρτυρα σε σχέση με τις εφαρμογές. Μόνο η εφαρμογή του ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* στα 500ppm είναι λίγο πιο κοντά στο μάρτυρα στις 13, 15 και 19 ημέρες μετά την μόλυνση. Από τις 12 έως και τις 19 ημέρες μετά την μόλυνση υπάρχει μια κλιμάκωση ανά τις εφαρμογές με τις μικρότερες τιμές να παρουσιάζει η εφαρμογή του ελαίου του φυτού *Thymus vulgaris* στα 1000ppm, ενώ από τις 27 έως και τις 34 ημέρες μετά την μόλυνση οι τιμές ανά τις εφαρμογές κυμαίνονται στα ίδια περίπου επίπεδα και υπάρχει μια διαφορά σε σχέση με τον μάρτυρα. Η εξέλιξη της ασθένειας ανά τις εφαρμογές και τις ημέρες μετά την μόλυνση φαίνεται και από την Εικόνα 3.2.2 δ.



Εικόνα 3.2.2 δ: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Ρίγανη) και *Thymus vulgaris* (Θυμαρί) στην εξέλιξη της ασθένειας του φυτοπαθογόνου μύκητα *Verticillium dahliae* ανά τις ημέρες μετά την μόλυνση όπου καταγράφηκαν τα συμπτώματα από την προσβολή του παθογόνου μύκητα και τις εφαρμογές των αιθερίων ελαίων στα φυτά σε συγκεντρώσεις 500ppm και 1000ppm σε σχέση με τον μάρτυρα, όπου:

- VD: *Verticillium dahliae* (Μάρτυρας)
- Vd P500: *Verticillium dahliae* + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
- Vd P1000: *Verticillium dahliae* + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
- Vd Θ500: *Verticillium dahliae* + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
- Vd Θ1000: *Verticillium dahliae* + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm



Διαγράμματα 3.2.2 Γ₂-Δ₂: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Ρίγανη) και *Thymus vulgaris* (Θυμαρί) στην εξέλιξη της ασθένειας του φυτοπαθογόνου μύκητα *Verticillium dahliae* που εκφράζεται από την σοβαρότητα της ασθένειας (Γ₂) και τον δείκτη της ασθένειας (Δ₂) με κλίμακα 0-4* ανά τις ημέρες μετά την μόλυνση (days post inoculation, dpi) όπου καταγράφηκαν τα συμπτώματα από την προσβολή του παθογόνου μύκητα και τις εφαρμογές των αιθερίων ελαίων στα φυτά σε συγκεντρώσεις 500ppm και 1000ppm σε σχέση με τον μάρτυρα, όπου:

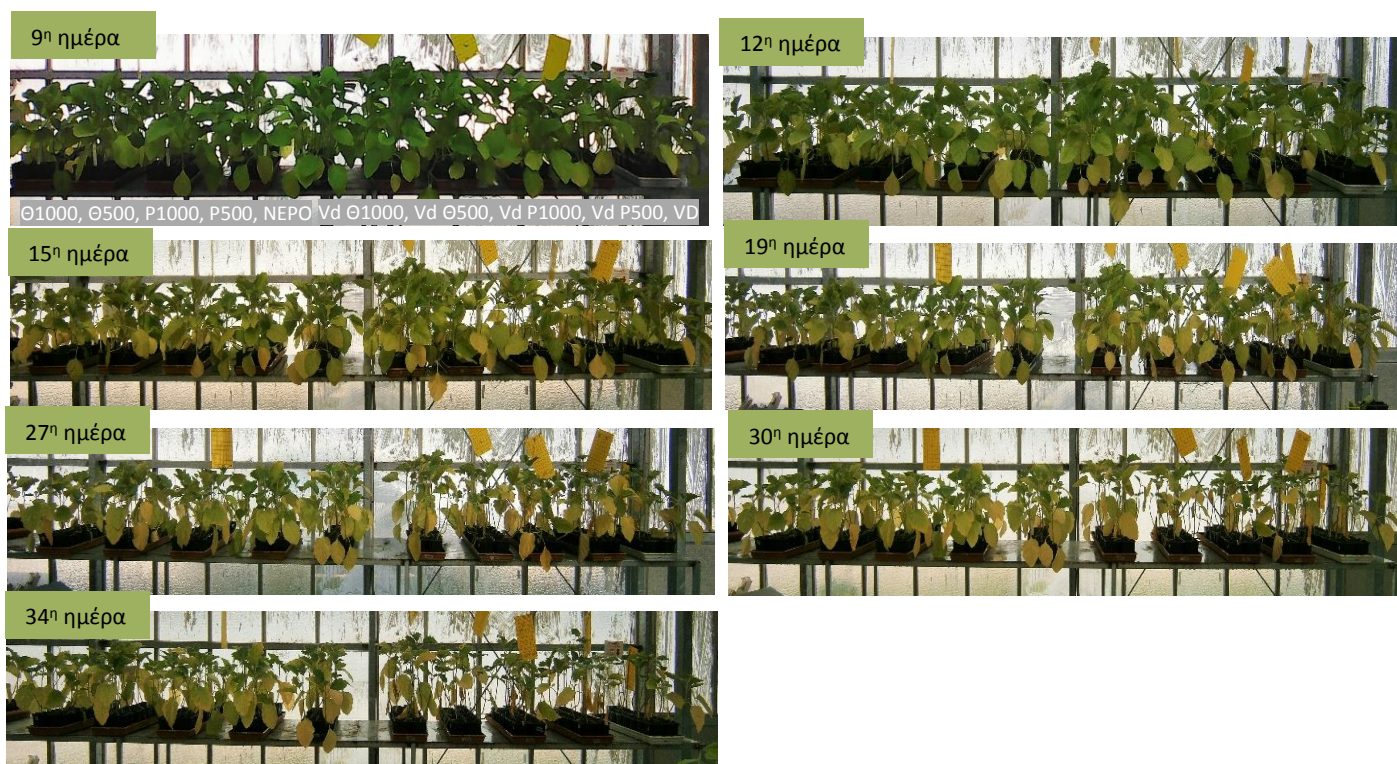
- V. dahliae: *Verticillium dahliae* (Μάρτυρας)
- Vd P500: *Verticillium dahliae* + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
- Vd P1000: *Verticillium dahliae* + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
- Vd Θ500: *Verticillium dahliae* + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
- Vd Θ1000: *Verticillium dahliae* + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm

* Δείκτης ασθένειας: 0: Υγιές φυτό, 1: ≤25%, 2: ≤50%, 3: ≤75%, 4: >80-100%.

Η ανάπτυξη των φυτών μελιτζάνας καταδεικνύεται στις Εικόνες 3.2.2 ε και ζ στα Διαγράμματα 3.2.2 E₂-Z₂ του μέσου ύψους και του μέσου αριθμού φύλλων. Στο Διάγραμμα 3.2.2 E₂ ο θετικός μάρτυρας έχει χαμηλότερο μέσο ύψος σε σχέση με τα φυτά που εφαρμόστηκαν αιθέρια έλαια και μολύνθηκαν με τον μύκητα. Οι εφαρμογές κυμάνθηκαν στα ίδια επίπεδα εκτός της εφαρμογής του ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* στα 1000ppm που είχαν τα φυτά λίγο μικρότερο ύψος, αλλά γενικά οι εφαρμογές των ελαίων με τον παθογόνο μύκητα εμφάνισαν μεγαλύτερα μέσα ύψη από τις εφαρμογές χωρίς την μόλυνση του παθογόνου. Σε αυτές τις εφαρμογές ο αρνητικός μάρτυρας σε γενικές γραμμές παρουσίασε μεγαλύτερα μέσα ύψη από τις εφαρμογές και τα μικρότερα μέσα ύψη είχε η εφαρμογή του ελαίου του φυτού *Thymus vulgaris* στα 1000ppm.

Στο Διάγραμμα 3.2.2 Z₂ όπου φαίνεται ο μέσος αριθμός φύλλων να μην αλλάζει σημαντικά ανά τις εφαρμογές σε σχέση με τους μάρτυρες, με τις εφαρμογές που αφορούν τα φυτά που μολύνθηκαν με το παθογόνο να είναι υψηλότερες σε σχέση με αυτές που δεν μολύνθηκαν τα φυτά και ο μάρτυρας. Πιο συγκεκριμένα στις εφαρμογές

με την μόλυνση ο θετικός μάρτυρας είναι στα ίδια περίπου επίπεδα με τα φυτά που εφαρμόστηκαν τα έλαια εκτός από μία πολύ μικρή αύξηση που εμφανίζει η εφαρμογή του ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* στα 500ppm σε κάποιες από τις ημέρες μέτρησης. Στις εφαρμογές χωρίς την μόλυνση με το παθογόνο ο μέσος αριθμός φύλλων κινήθηκε στα ίδια επίπεδα ανά τις εφαρμογές και σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, εκτός της εφαρμογής του ελαίου του φυτού *Thymus vulgaris* στα 500ppm που είχε λίγο υψηλότερες τιμές έως τις 30 ημέρες μετά την μόλυνση σε σχέση με τις άλλες εφαρμογές και τον αρνητικό μάρτυρα.



Εικόνα 3.2.2 ε: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (ρίγανη) και *Thymus vulgaris* (θυμάρι) ανά τις εφαρμογές και τις ημέρες μετά την μόλυνση του παθογόνου στα φυτά όπου:

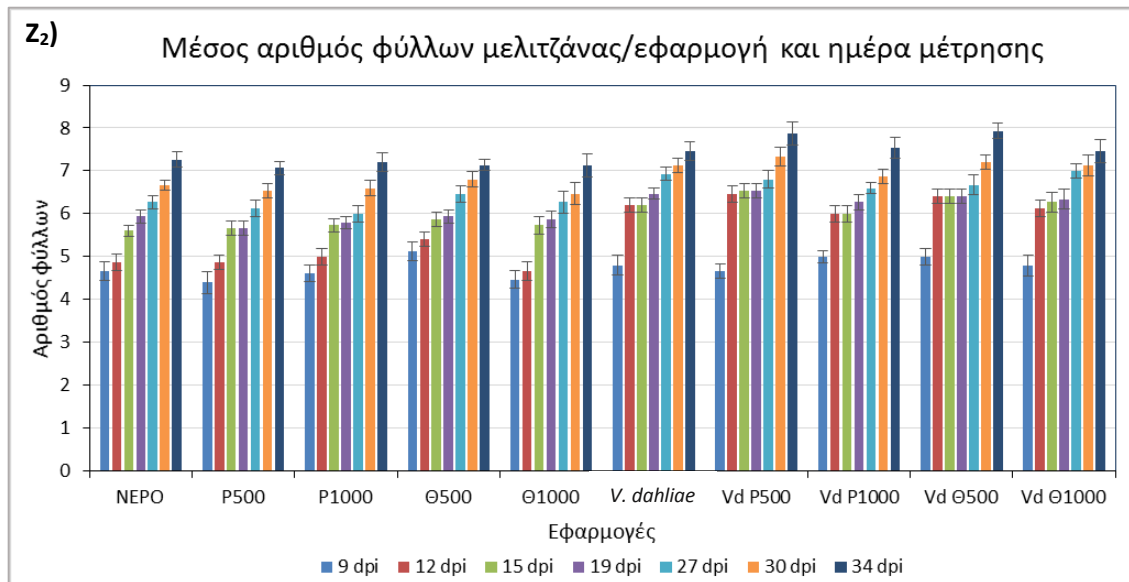
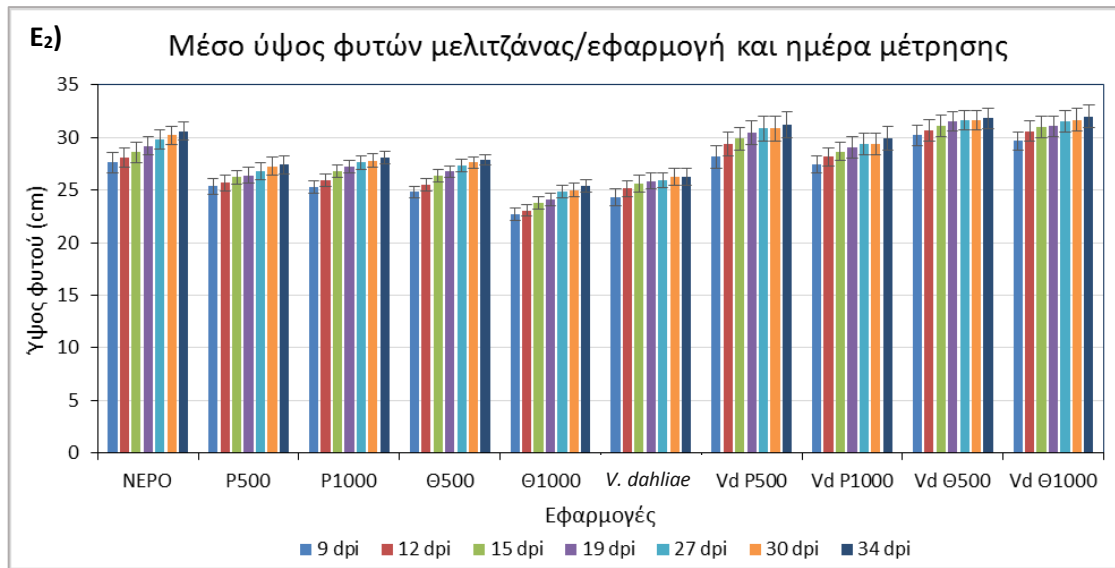
NEPO	Νερό+DMSO+Tween 20 (αρνητικός μάρτυρας)
P500	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
P1000	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
Θ500	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
Θ1000	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm
VD	<i>Verticillium dahliae</i> (θετικός μάρτυρας)
Vd P500	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
Vd P1000	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
Vd Θ500	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
Vd Θ1000	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm

34η ημέρα



Εικόνα 3.2.2 ζ: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (ρίγανη) και *Thymus vulgaris* (θυμάρι) ανά τις εφαρμογές την 34^η ημέρα μετά την μόλυνση του παθογόνου στα φυτά όπου:

NEPO	Νερό+DMSO+Tween 20 (αρνητικός μάρτυρας)
P500	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
P1000	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
Θ500	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
Θ1000	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm
VD	<i>Verticillium dahliae</i> (θετικός μάρτυρας)
Vd P500	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
Vd P1000	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
Vd Θ500	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
Vd Θ1000	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm

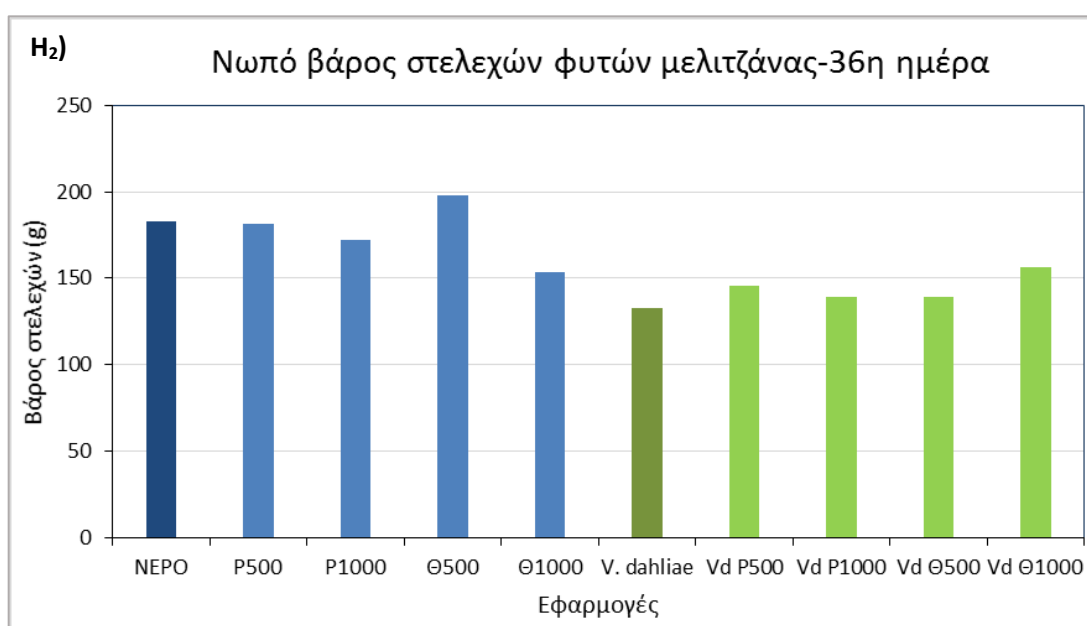


Διαγράμματα 3.2.2 E₂-Z₂: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (ρίγανη) και *Thymus vulgaris* (θυμάρι) στο ύψος των φυτών μελιτζάνας (E₂) και στον αριθμό φύλλων (Z₂) ανά εφαρμογή και ανά τις ημέρες μετά την μόλυνση του παθογόνου στα φυτά όπου:

NEPO	Νερό+DMSO+Tween 20 (αρνητικός μάρτυρας)
P500	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
P1000	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
Θ500	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
Θ1000	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm
<i>V. dahliae</i>	<i>Verticillium dahliae</i> (θετικός μάρτυρας)
Vd P500	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
Vd P1000	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
Vd Θ500	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
Vd Θ1000	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm

Την τελευταία ημέρα κόπηκε το υπέργειο μέρος των φυτών και ακολούθησε η ζύγιση των στελεχών. Το Διάγραμμα 3.2.2 H₂ δείχνει τη διαφοροποίηση του νεπού βάρους των στελεχών ανά τις εφαρμογές. Στα φυτά που μολύνθηκαν με το παθογόνο ο θετικός

μάρτυρας είχε την χαμηλότερη τιμή. Οι εφαρμογές του ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* εμφανίζουν μείωση από τα 500ppm στα 1000ppm, ενώ οι εφαρμογές του ελαίου του φυτού *Thymus vulgaris* από τα 500ppm στα 1000ppm παρουσιάζουν αύξηση. Στα φυτά που δεν μολύνθηκαν με τον παθογόνο μύκητα *Verticillium dahliae* οι εφαρμογές και των δύο αιθερίων ελαίων παρουσίασαν μείωση από τα 500ppm στα 1000ppm. Μόνο το νωπό βάρος των φυτών της εφαρμογής του ελαίου του φυτού *Thymus vulgaris* στα 500ppm ήταν μεγαλύτερο από τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ το νωπό βάρος των φυτών της εφαρμογής στην ίδια συγκέντρωση του ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* είναι στα ίδια επίπεδα με τον αρνητικό μάρτυρα.



Διάγραμμα 3.2.2 Η₂: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (ρίγανη) και *Thymus vulgaris* (θυμάρι) στο βάρος στελεχών των φυτών μελιτζάνας ανά εφαρμογή την 36^η ημέρα μετά την μόλυνση του παθογόνου στα φυτά όπου:

NEPO	Νερό+DMSO+Tween 20 (αρνητικός μάρτυρας)
P500	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
P1000	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
Θ500	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
Θ1000	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm
<i>V. dahliae</i>	<i>Verticillium dahliae</i> (θετικός μάρτυρας)
Vd P500	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
Vd P1000	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
Vd Θ500	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
Vd Θ1000	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm

Αφού μετρήθηκε το νωπό βάρος των στελεχών των φυτών τομάτας ακολούθησε η απομόνωση του παθογόνου μύκητα *Verticillium dahliae* από τα ασθενή φυτά από τον μεταχρωματισμό των αγγείων του στελέχους, όπου ταυτοποιήθηκε η παρουσία του μύκητα όπως διακρίνεται και στις Εικόνες 3.2.2 η, θ, ι από την ανάπτυξή του στα

τρυβλία και παρατήρηση των χαρακτηριστικών κονιδιοφόρων του μύκητα στο μικροσκόπιο.



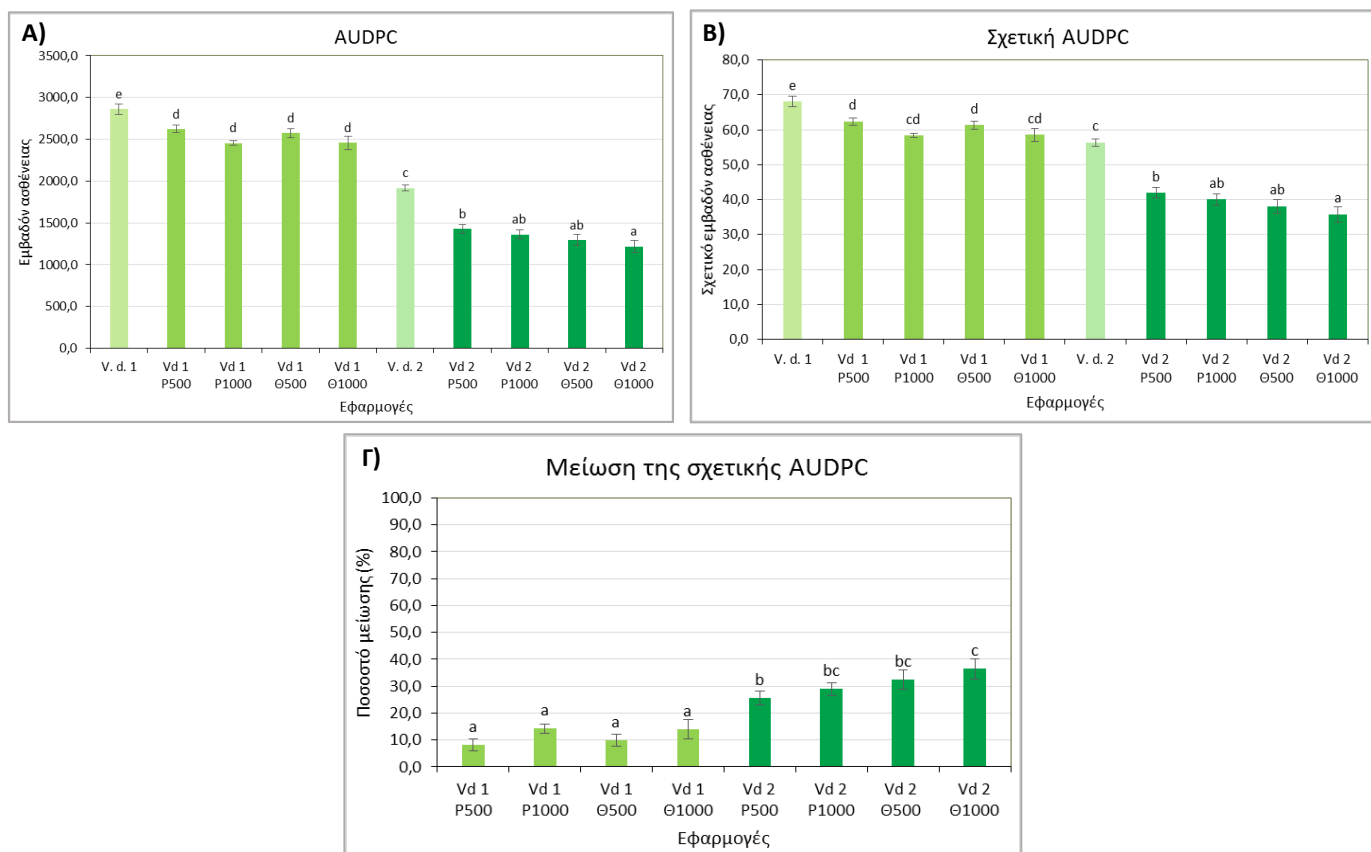
Εικόνες 3.2.2 η, θ, ι: Απομόνωση του παθογόνου μύκητα *Verticillium dahliae* από φυτά με τα συμπτώματα της ασθένειας της αδρομύκωσης – βερτισιλλίωσης που προκαλεί ο μύκητας *Verticillium dahliae*, όπου διακρίνονται τα τρυβλία με τις εφαρμογές και τον μάρτυρα και η εικόνα από την μικροσκοπική παρατήρηση.

3.2.3 Σύγκριση της επίδρασης των διαφορετικών δοκιμών των αιθερίων ελαίων στην εξέλιξη της ασθένειας της αδρομύκωσης – βερτισιλλίωσης.

Αφού εφαρμόστηκαν τα αιθέρια έλαια με δύο διαφορετικούς τρόπους είναι σημαντικό να συγκριθούν τα δεδομένα των αποτελεσμάτων για να διερευνηθεί η επίδρασή της εφαρμογής τους στην ασθένεια της βερτισιλλίωσης. Σε αυτό το σημείο κρίνεται αναγκαίο να γίνει ανάκληση στον τρόπο που εφαρμόστηκαν τα αιθέρια έλαια. Έτσι στην πρώτη δοκιμή τα αιθέρια έλαια των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* και *Coridothymus capitatus* εφαρμόστηκαν 3 ημέρες πριν την μόλυνση με τον παθογόνο μύκητα. Στην δεύτερη δοκιμή τα αιθέρια έλαια των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* και *Thymus vulgaris* εφαρμόστηκαν 1 ημέρα πριν την μόλυνση με τον παθογόνο μύκητα και 6 ημέρες μετά από την πρώτη εφαρμογή έγινε και δεύτερη. Σε όλες τις περιπτώσεις εφαρμόστηκαν οι ίδιες συγκεντρώσεις 500ppm και 1000ppm και για τα δυο έλαια και έγινε ριζοπότισμα των ελαίων στα φυτά.

Εάν δούμε συγκριτικά για τις δύο δοκιμές τα Διαγράμματα του εμβαδού της ασθένειας, του σχετικού εμβαδού της ασθένειας και της μείωσης του σχετικού εμβαδού της ασθένειας (Διαγράμματα 3.2.3 Α-Β-Γ), μπορούμε να διακρίνουμε στα δύο πρώτα Διαγράμματα μια μείωση στις εφαρμογές της δεύτερης δοκιμής σε σχέση με την πρώτη και δεν υπάρχει στατιστική συσχέτιση στις εφαρμογές της πρώτης δοκιμής σε σχέση

με τις εφαρμογές της δεύτερης δοκιμής. Και στις δυο δοκιμές οι εφαρμογές διαφέρουν στατιστικά από τους αντίστοιχους μάρτυρες. Στο Διάγραμμα 3.2.3 Α διακρίνεται ότι οι εφαρμογές τη πρώτης δοκιμής σχετίζονται στατιστικά και διαφέρουν από τον μάρτυρα, όπως και οι εφαρμογές της δεύτερης δοκιμής διαφέρουν στατιστικά από τον μάρτυρα. Στην δεύτερη δοκιμή διαφέρουν στατιστικά οι εφαρμογές των ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* στα 500ppm που έχει την μεγαλύτερη τιμή και *Thymus vulgaris* στα 1000ppm που έχει την μικρότερη τιμή, αλλά αυτές οι δύο εφαρμογές συσχετίζονται με τις εφαρμογές των ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* στα 1000ppm και *Thymus vulgaris* στα 500ppm. Στο Διάγραμμα 3.2.3 Β η μόνη διαφορά που παρατηρείται είναι ότι στην πρώτη δοκιμή οι εφαρμογές με τις μικρότερες τιμές, δηλαδή των ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* και *Coridothymus capitatus* στα 1000ppm σχετίζονται στατιστικά και με την τιμή του μάρτυρα της δεύτερης δοκιμής εκτός από τις τιμές των αντίστοιχων ελαίων στα 500ppm. Σε ότι αφορά το Διάγραμμα 3.2.3 Γ οι μειώσεις της πρώτης δοκιμής δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους με την μεγαλύτερη μείωση να παρουσιάζεται στα αιθέρια έλαια των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* και *Coridothymus capitatus* στα 1000ppm με ποσοστά 14,2% και 14% αντίστοιχα. Ακολούθως στην δεύτερη δοκιμή υπάρχει στατιστική διαφορά με την πρώτη και η μεγαλύτερη μείωση παρατηρείται στο έλαιο του φυτού *Thymus vulgaris* στα 1000ppm με ποσοστό 36,5%.

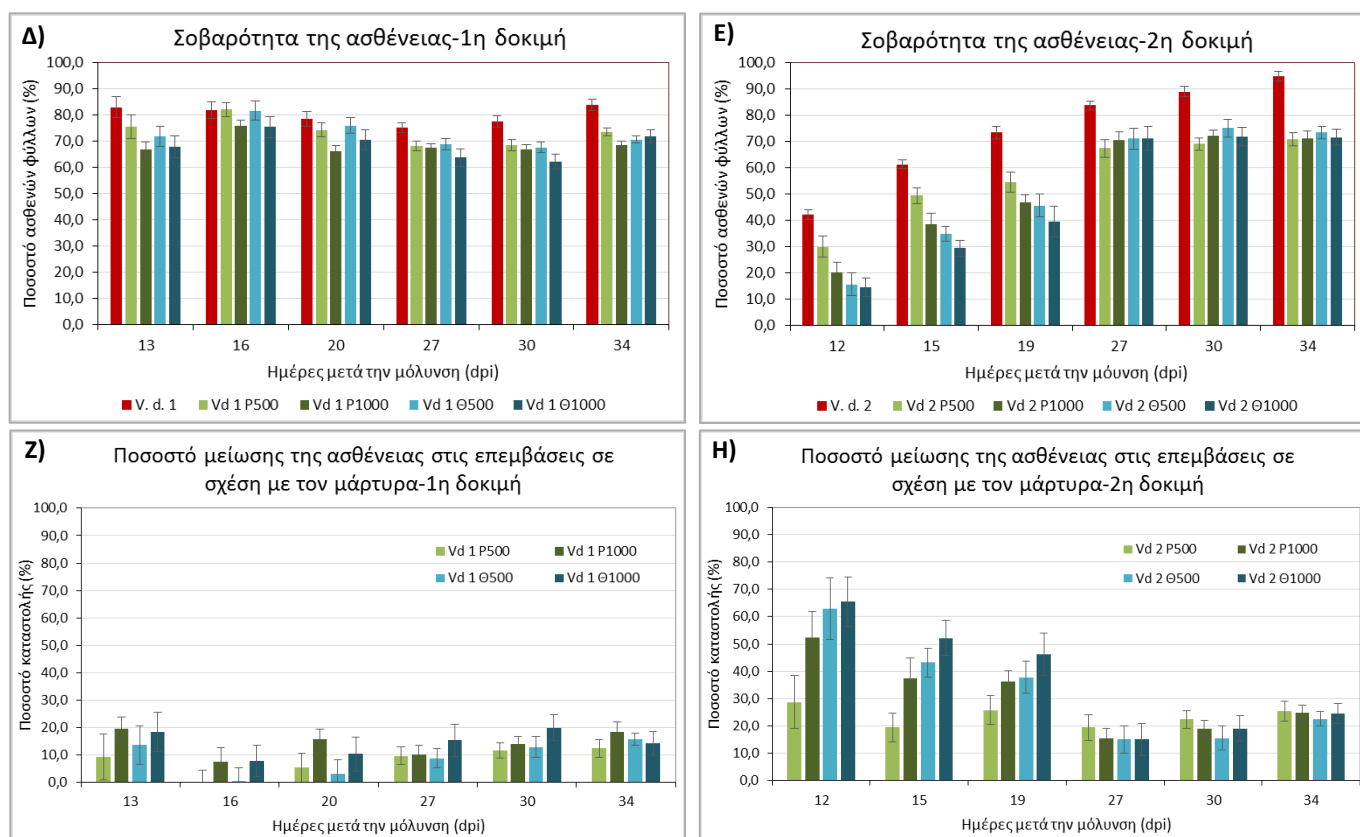


Διαγράμματα 3.2.3 Α-Β-Γ: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Ρίγανη) και *Coridothymus capitatus* για την πρώτη δοκιμή, *Thymus vulgaris* για την δεύτερη δοκιμή (Θυμαρί) στην ανάπτυξη της ασθένειας του φυτοπαθογόνου μύκητα *Verticillium dahliae* που εκφράζεται από το εμβαδόν της ασθένειας (AUDPC) (Α), το σχετικό εμβαδόν της ασθένειας (Relative AUDPC) (Β) και την μείωση του σχετικού εμβαδού της ασθένειας (%) (Γ) ανά τις εφαρμογές των αιθερίων ελαίων στα φυτά σε συγκεντρώσεις 500ppm και 1000ppm σε σχέση με τον μάρτυρα, όπου:

- V. d. 1/2 *Verticillium dahliae* (Μάρτυρας)
- Vd 1/2 P500: *Verticillium dahliae* + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
- Vd 1/2 P1000: *Verticillium dahliae* + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
- Vd 1/2 Θ500: *Verticillium dahliae* + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
- Vd 1/2 Θ1000: *Verticillium dahliae* + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm

Επιλέχθηκαν κάποιες ημέρες από τις μετρήσεις των συμπτωμάτων που έγιναν μετά την μόλυνση και είναι κοντινές στις δύο δοκιμές για να συγκριθεί η σοβαρότητα της ασθένειας (Διαγράμματα 3.2.3 Δ-Ε) και το ποσοστό μείωσης της ασθένειας (Διαγράμματα 3.2.3 Ζ-Η) μεταξύ των δύο δοκιμών που είναι το ποσοστό μείωσης της ασθένειας των εφαρμογών σε σχέση με τον μάρτυρα. Στην πρώτη δοκιμή υπάρχουν περιπτώσεις που τα φυτά στις εφαρμογές εμφανίζουν συμπτώματα πολύ κοντά στα φυτά του μάρτυρα και σε κάποιες ημέρες υπάρχει μια διαφορά στα συμπτώματα του μάρτυρα και των εφαρμογών. Όμως δεν είναι τόσο μεγάλες οι διαφορές στην πρώτη δοκιμή όσο στη δεύτερη δοκιμή, όπως εμφανίζονται στο Διάγραμμα 3.2.3 Ε, όπου και σταθεροποιούνται από τις 27 ημέρες και μετά. Στα Διαγράμματα 3.2.3 Ζ-Η

διατυπώνεται ξεκάθαρα αυτή η μείωση στις τιμές των εφαρμογών σε σχέση με τον μάρτυρα, όπου στην πρώτη δοκιμή η μεγαλύτερη μείωση φτάνει το ποσοστό των 19,9% στις 30 ημέρες μετά την μόλυνση στην εφαρμογή του ελαίου του φυτού *Coridothymus capitatus* στα 1000ppm. Έτσι μπορούμε να συμπεράνουμε ότι δεν ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματικός ο τρόπος που εφαρμόστηκαν τα έλαια. Στην πρώτη δοκιμή γενικότερα φαίνεται ότι τα μεγαλύτερα ποσοστά καταγράφονται στις 13, 30 και 34 ημέρες μετά την μόλυνση, ενώ τα μικρότερα στις 16 και 20 ημέρες μετά την μόλυνση. Αντιθέτως στην δεύτερη δοκιμή τα μικρότερα ποσοστά μείωσης της ασθένειας καταγράφονται στις 27 και 30 ημέρες μετά την μόλυνση. Να σημειωθεί σε αυτό το σημείο ότι αρχικά τα ποσοστά καταστολής της ασθένειας στις εφαρμογές ήταν μεγάλα και φαίνεται και αύξηση από τα 500ppm στα 1000ppm των δύο ελαίων, έως κι 65,5% για την εφαρμογή του ελαίου του φυτού *Thymus vulgaris* στα 1000ppm. Στις 15 και 19 ημέρες μετά την μόλυνση αρχίζουν να μειώνονται και στις 34 ημέρες μετά την μόλυνση είναι σε κοντινά επίπεδα σε όλες τις εφαρμογές με το μεγαλύτερο ποσοστό να φτάνει τα 25,4% στο έλαιο του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* στα 500ppm.

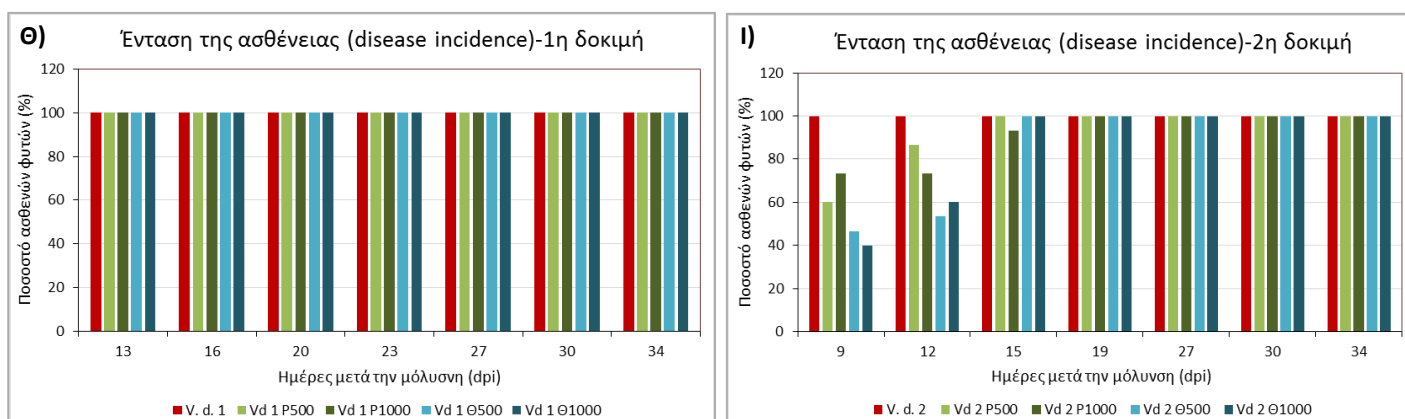


Διαγράμματα 3.2.3 Δ-Ε-Ζ-Η: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Ρίγανη) και *Coridothymus capitatus* για την πρώτη δοκιμή, *Thymus vulgaris* για την δεύτερη δοκιμή (Θυμάρι) στην ανάπτυξη της ασθένειας του φυτοπαθογόνου μύκητα *Verticillium dahliae* που εκφράζεται από την σοβαρότητα της ασθένειας (Δ, Ε) και το ποσοστό μείωσης της ασθένειας (Ζ, Η) ανά τις ημέρες μετά την μόλυνση (days post inoculation, dpi) όπου καταγράφηκαν τα συμπτώματα από την

προσβολή του παθογόνου μύκητα και τις εφαρμογές των αιθερίων ελαίων στα φυτά σε συγκεντρώσεις 500ppm και 1000ppm σε σχέση με τον μάρτυρα, όπου:

<i>V. d.</i> 1/2	<i>Verticillium dahliae</i> (Μάρτυρας)
Vd 1/2 P500:	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
Vd 1/2 P1000:	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
Vd 1/2 Θ500:	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
Vd 1/2 Θ1000:	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm

Μετρήθηκε και η ένταση της ασθένειας (disease incidence) που είναι το ποσοστό των φυτών που ασθένησαν ανά τις ημέρες μετά την μόλυνση και τις εφαρμογές για τις δύο δοκιμές που έγιναν. Ενώ όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 3.2.3 Θ ασθένησαν όλα τα φυτά στην πρώτη δοκιμή από την 13^η ημέρα, στην δεύτερη δοκιμή στον μάρτυρα ασθένησαν όλα τα φυτά από την 9^η ημέρα μετά την μόλυνση, αντιθέτως στις εφαρμογές ασθένησαν λιγότερα φυτά στις 9 και 12 ημέρες μετά την μόλυνση. Στις 9 ημέρες μετά την μόλυνση η μικρότερη τιμή καταγράφεται από την εφαρμογή του ελαίου του φυτού *Thymus vulgaris* στα 1000ppm με ποσοστό 40% και η μεγαλύτερη τιμή από την εφαρμογή του ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* στα 1000ppm με ποσοστό 73%. Στις 12 ημέρες μετά την μόλυνση η μικρότερη τιμή είναι αυτή του ελαίου του φυτού *Thymus vulgaris* στα 500ppm με ποσοστό 53% και η μεγαλύτερη τιμή αυτή του ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* στα 500ppm με ποσοστό 87%. Στις 15 ημέρες είχαν ασθενήσει όλα τα φυτά πλην ενός στην εφαρμογή του ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* στα 1000ppm.



Διαγράμματα 3.2.3 Θ-Ι: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Ρίγανη) και *Coridothymus capitatus* για την πρώτη δοκιμή, *Thymus vulgaris* για την δεύτερη δοκιμή (Θυμαρί) στην ανάπτυξη της ασθένειας του φυτοπαθογόνου μύκητα *Verticillium dahliae* που εκφράζεται από την ένταση της ασθένειας (disease incidence) (Θ, Ι) ανά τις ημέρες μετά την μόλυνση (days post inoculation, dpi) όπου καταγράφηκαν τα συμπτώματα από την προσβολή του παθογόνου μύκητα και τις εφαρμογές των αιθερίων ελαίων στα φυτά σε συγκεντρώσεις 500ppm και 1000ppm σε σχέση με τον μάρτυρα στις δύο δοκιμές, όπου:

<i>V. d.</i> 1/2	<i>Verticillium dahliae</i> (Μάρτυρας)
Vd 1/2 P500:	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
Vd 1/2 P1000:	<i>Verticillium dahliae</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm

Vd 1/2 @500: *Verticillium dahliae* + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
Vd 1/2 @1000: *Verticillium dahliae* + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm

3.3 Αξιολόγηση της επίδρασης των αιθερίων ελαίων στην ανάπτυξη του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* σε συνθηκες εργαστηρίου (*in vitro*) και θερμοκηπίου (*in vivo*).

3.3.1 Επίδραση των αιθερίων ελαίων (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Coridothymus capitatus*, *Satureja thymbra*, *Origanum majorana*) στην ανάπτυξη του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

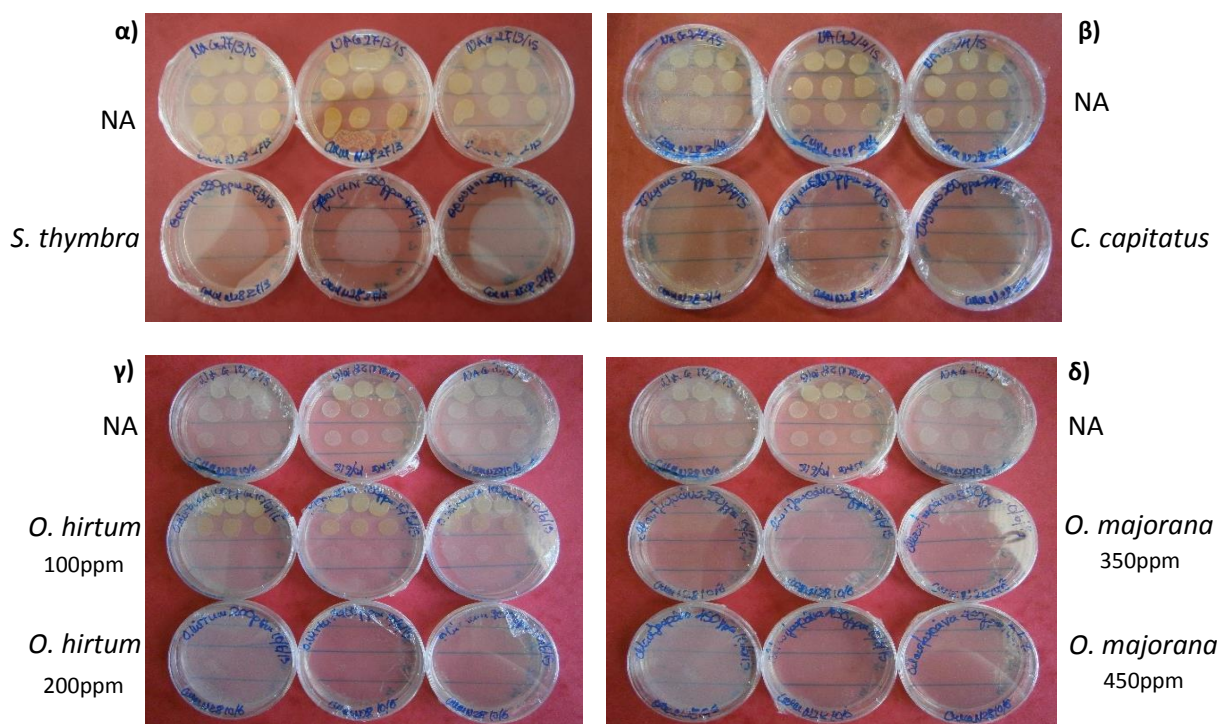
Για την διερεύνηση της αποτελεσματικότητας των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Coridothymus capitatus*, *Satureja thymbra* και *Origanum majorana* έναντι του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* εφαρμόστηκαν διάφορες συγκεντρώσεις που κυμάνθηκαν από τα 50ppm, 80ppm, 100ppm, 200ppm, 250ppm έως και τα 300ppm, 350ppm, 450ppm σε κάποια από τα αιθέρια έλαια που αντιστοιχούν σε 5μl, 8μl, 10μl, 20μl, 25μl και 30μl, 35μl και 45μl ανά τρυβλίο. Οι μετρήσεις έγιναν στις 3 ημέρες επώασης, όπου οι αποικίες του μάρτυρα είχαν αναπτυχθεί σε βαθμό που να είναι μετρήσιμες. Χρησιμοποιήθηκε και αρνητικός μάρτυρας με προσθήκη μόνο του διαλύτη του αιθερίου ελαίου (αιθανόλη) χωρίς να παρουσιαστεί παρεμπόδιση στην ανάπτυξη από αυτόν.

Στην Εικόνα 3.3.1 διακρίνεται εμφανώς η καθολική αναστολή της ανάπτυξης του βακτηρίου σε όλες τις επεμβάσεις που έγιναν με αιθέρια έλαια σε σχέση με τα τρυβλία που δεν είχαν αιθέριο έλαιο (NA), δηλαδή τους μάρτυρες.

Στο Διάγραμμα 3.3.1 Α αποτυπώνονται οι παρεμποδίσεις των εφαρμογών των αιθερίων ελαίων. Έτσι λοιπόν γίνεται σαφές ότι και οι τέσσερεις εφαρμογές

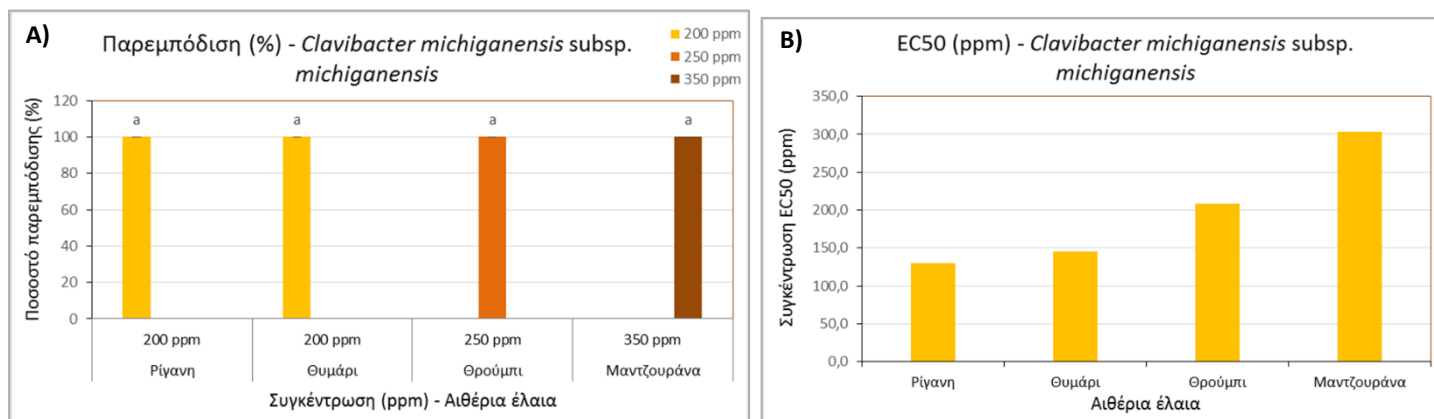
παρουσίασαν πλήρη παρεμπόδιση ποσοστού 100%, αλλά με διαφορετικές συγκεντρώσεις. Τα αιθέρια έλαια των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* και *Coridothymus capitatus* εμφάνισαν πλήρη παρεμπόδιση της ανάπτυξης εφαρμοζόμενα στη συγκέντρωση 200ppm ενώ το αιθέριο έλαιο του φυτού *Satureja thymbra* στη συγκέντρωση 250ppm. Τέλος το αιθέριο έλαιο του φυτού *Origanum majorana* εμφάνισε πλήρη παρεμπόδιση εφαρμοζόμενο στη συγκέντρωση των 350ppm. Με βάση αυτά τα δεδομένα καθίσταται εμφανές ότι τα αιθέρια έλαια των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* και *Coridothymus capitatus* είναι πιο αποτελεσματικά σε μικρότερες συγκεντρώσεις από τα άλλα αιθέρια έλαια.

Όσον αφορά τις συγκεντρώσεις EC50 (Διάγραμμα 3.3.1 Β) τη μικρότερη συγκέντρωση έχει το αιθέριο έλαιο του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* και ακολουθεί το αιθέριο έλαιο του φυτού *Coridothymus capitatus*. Έτσι προκύπτει ότι το βακτήριο εμφανίζει ευαισθησία σε αυτά τα δύο αιθέρια έλαια. Το αιθέριο έλαιο του φυτού *Satureja thymbra* είναι αποτελεσματικό σε υψηλότερη συγκέντρωση και τέλος το αιθέριο έλαιο του φυτού *Origanum majorana* στην πιο υψηλή συγκέντρωση από όλα τα υπόλοιπα έλαια. Άρα σε αυτά τα δύο αιθέρια έλαια το βακτήριο παρουσιάζει ανθεκτικότητα και θα χρειαστεί να χρησιμοποιηθεί μεγαλύτερη ποσότητα για να παρεμποδιστεί η ανάπτυξη του βακτηρίου.



Εικόνα 3.3.1: Επίδραση της εφαρμογής των τεσσάρων αιθερίων ελαίων των φυτών *Satureja thymbra* σε συγκέντρωση 250ppm (α), *Coridothymus capitatus* σε συγκέντρωση 200ppm (β), *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* σε συγκεντρώσεις 100ppm και 200ppm (γ) και *Origanum majorana* σε συγκεντρώσεις

350ppm και 450ppm (δ) (κατά σειρά όπως φαίνονται) στην ανάπτυξη των αποικιών του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* σε σύγκριση με τον μάρτυρα (NA), στις 3 ημέρες επώασης.



Διάγραμμα 3.3.1: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Coridothymus capitatus* (Θυμάρι), *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Ρίγανη), *Satureja thymbra* (Θρούμπι) και *Origanum majorana* (Μαντζουράνα) επί της ανάπτυξης του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* εκπεφρασμένη ως ποσοστό παρεμπόδισης της ανάπτυξης επί τοις εκατό (%) του μάρτυρα (A) και ως συγκέντρωση EC50 (ppm) (B).

3.3.2 Επίδραση των αιθερίων ελαίων (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Coridothymus capitatus* ή *Thymus vulgaris*) στην αντιμετώπιση του βακτηριακού έλκους της τομάτας από το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* και στην ανάπτυξη των φυτών τομάτας στο θερμοκήπιο (*in vivo*).

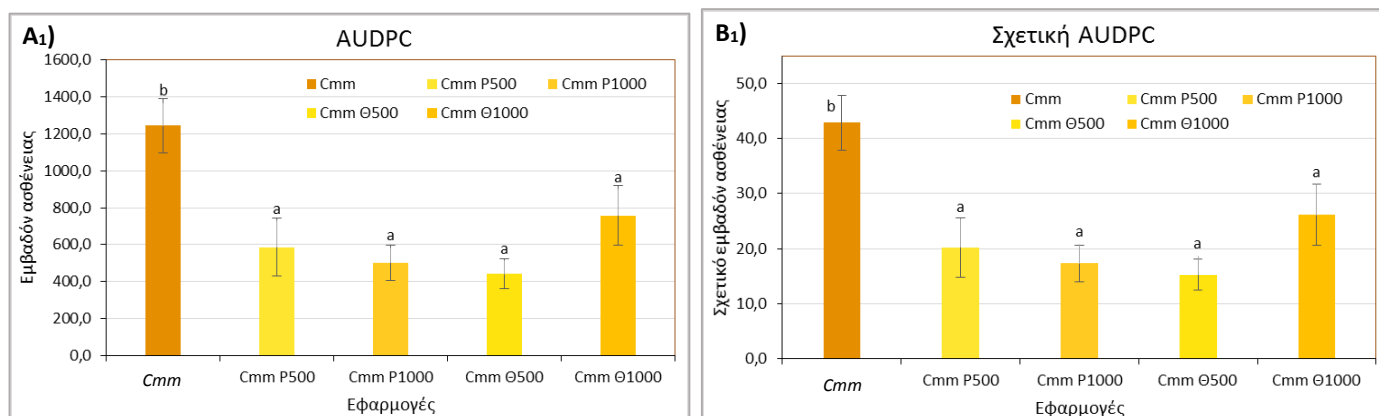
Εκτός από την δοκιμή με τον παθογόνο μύκητα *Verticillium dahliae* και στην περίπτωση του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* πραγματοποιήθηκαν δοκιμές μικρής κλίμακας και διαπιστώθηκε ότι η εφαρμογή των αιθερίων ελαίων στις ίδιες συγκεντρώσεις 24 ώρες πριν την μόλυνση με το βακτήριο επέφερε καλύτερα αποτελέσματα. Έτσι με βάση τα συμπεράσματα από τις δοκιμές *in vitro* και από τα πειράματα μικρής κλίμακας, σε αυτή την δοκιμή εφαρμόστηκαν με ριζοπότισμα τα αιθέρια έλαια των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (με περιοχή καλλιέργειας τα Φιλιατρά Πελοποννήσου) και *Coridothymus capitatus* στις συγκεντρώσεις των 500ppm και 1000ppm και σε 24 ώρες έγινε μόλυνση των φυταρίων τομάτας με το παθογόνο βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Λήφθηκαν μετρήσεις από τις 19 ημέρες μετά την μόλυνση έως και τις 29 ημέρες μετά την μόλυνση. Μετρήθηκε το ύψος των φυτών, ο αριθμός φύλλων, τα συμπτώματα της ασθένειας και αφού αποκόπηκε το υπέργειο μέρος των φυταρίων τομάτας μετρήθηκε το νωπό βάρος των στελεχών των φυτών.

Η εξέλιξη της ασθένειας καταγράφεται στα παρακάτω διαγράμματα του εμβαδού ασθένειας (AUDPC, Area Under Disease Progress Curve), του σχετικού εμβαδού ασθένειας (Relative AUDPC), της σοβαρότητας της ασθένειας (Disease Severity) και του δείκτη της ασθένειας (Disease Index) σε κλίμακα από το 0 έως το 5 και πιο ειδικά:

Δείκτης ασθένειας	Ποσοστό ασθένειας (%)
0	Υγιές φυτό
1	5-20
2	20,1-40
3	40,1-60
4	60,1-80
5	80,1-100

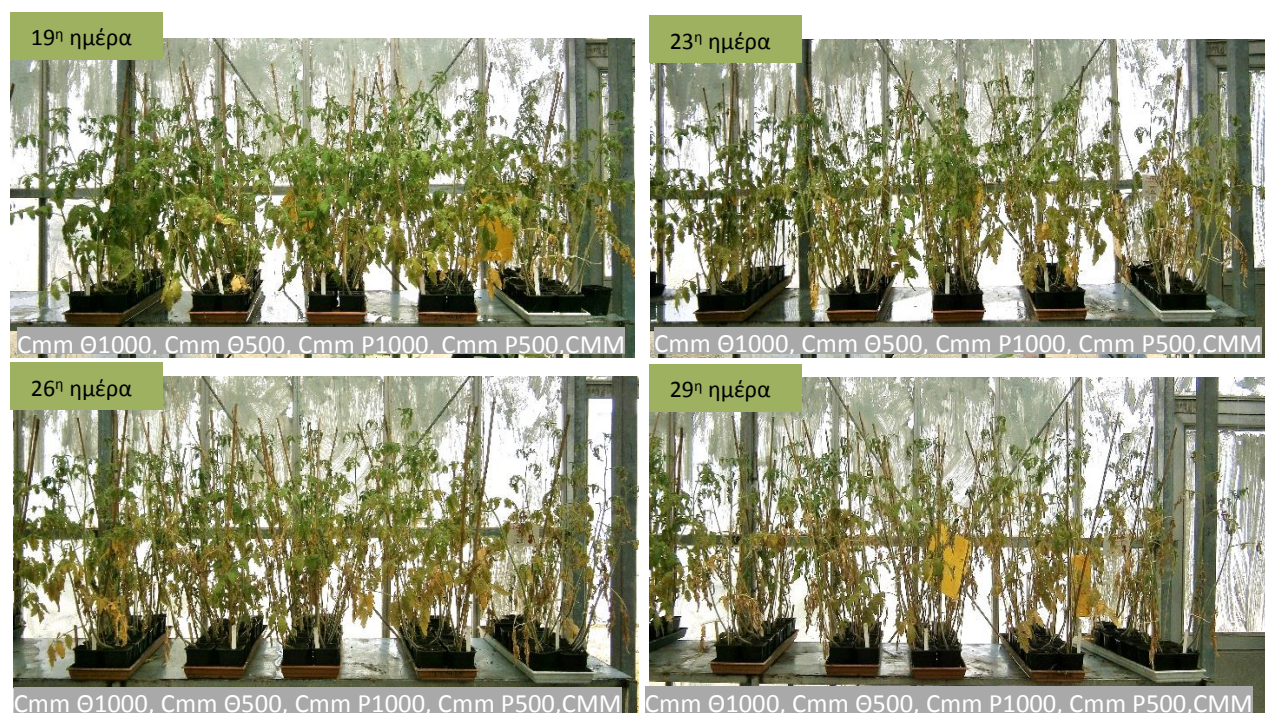
Πιο συγκεκριμένα, από τα Διαγράμματα 3.3.2 A₁-B₁ του εμβαδού ασθένειας και του σχετικού εμβαδού ασθένειας είναι ευδιάκριτη η διαφορά στις τιμές του μάρτυρα σε σχέση με τις τιμές των επεμβάσεων και υπάρχει και στατιστική διαφορά μεταξύ τους. Οι τιμές ανά τις εφαρμογές δεν διαφέρουν στατιστικά, όμως οι μικρότερες τιμές παρουσιάζονται στην εφαρμογή του ελαίου του φυτού *Coridothymus capitatus* στα 500ppm και οι μεγαλύτερες στην εφαρμογή του ίδιου ελαίου στα 1000ppm. Για το έλαιο του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* οι τιμές παρουσιάζουν μείωση από τα 500ppm στα 1000ppm.



Διαγράμματα 3.3.2 A₁-B₁: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Ρίγανη) και *Coridothymus capitatus* (Θυμάρι) στην ανάπτυξη της ασθένειας του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* που εκφράζεται από το εμβαδόν ασθένειας (AUDPC) (A₁) και το σχετικό εμβαδόν ασθένειας (Relative AUDPC) (B₁) ανά τις εφαρμογές των αιθερίων ελαίων στα φυτά σε συγκεντρώσεις 500ppm και 1000ppm σε σχέση με τον μάρτυρα, όπου:

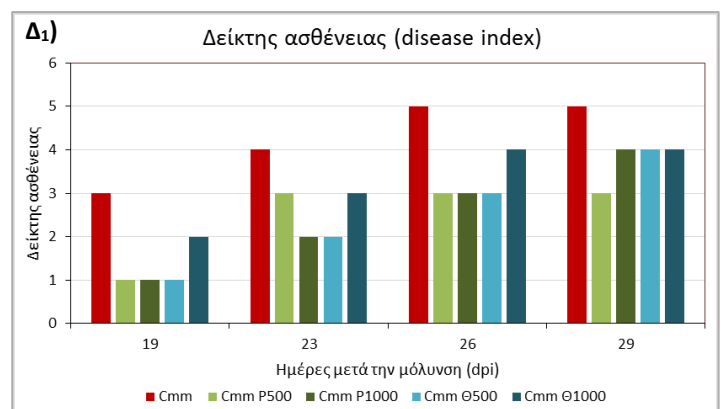
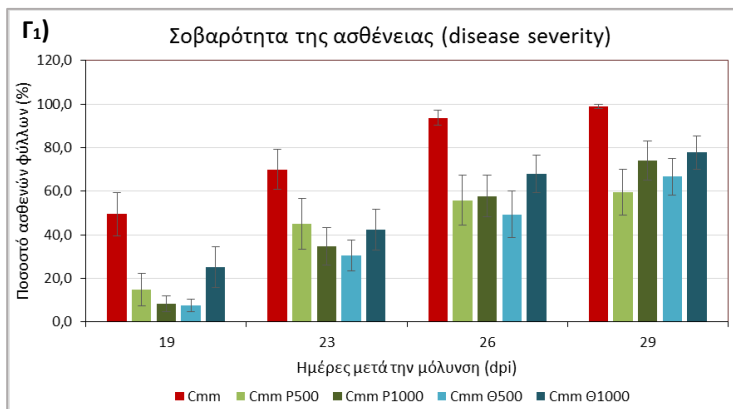
<i>Cmm</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Μάρτυρας)
<i>Cmm P500</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
<i>Cmm P1000</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
<i>Cmm Θ500</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
<i>Cmm Θ1000</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm

Η εξέλιξη της ασθένειας αποτυπώνεται στην Εικόνα 3.3.2 α και στα Διαγράμματα 3.3.2 Γ₁-Δ₁ με τον μάρτυρα, δηλαδή τα φυτά που μολύνθηκαν μόνο με το παθογόνο βακτήριο, να έχει μεγάλη διαφορά σε σχέση με τις επεμβάσεις ανά τις ημέρες μετά την μόλυνση. Οι εφαρμογές του ελαίου του φυτού *Coridothymus capitatus* είναι αυξημένες από τα 500ppm στα 1000ppm σε όλες τις ημέρες μετά την μόλυνση. Αντιθέτως, στις εφαρμογές του ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* στις 19 και 23 ημέρες μετά την μόλυνση αυξάνονται τα ποσοστά στην συγκέντρωση των 500ppm, ενώ στις 26 και 29 ημέρες μετά την μόλυνση αυξάνονται τα ποσοστά στην συγκέντρωση των 1000ppm.



Εικόνα 3.3.2 α: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Ρίγανη) και *Coridothymus capitatus* (Θυμαρί) στην εξέλιξη της ασθένειας του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ανά τις ημέρες μετά την μόλυνση όπου καταγράφηκαν τα συμπτώματα από την προσβολή του παθογόνου βακτηρίου και τις εφαρμογές των αιθερίων ελαίων στα φυτά σε συγκεντρώσεις 500ppm και 1000ppm σε σχέση με τον μάρτυρα, όπου:

<i>Cmm</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Μάρτυρας)
<i>Cmm P500</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
<i>Cmm P1000</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
<i>Cmm Θ500</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
<i>Cmm Θ1000</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm



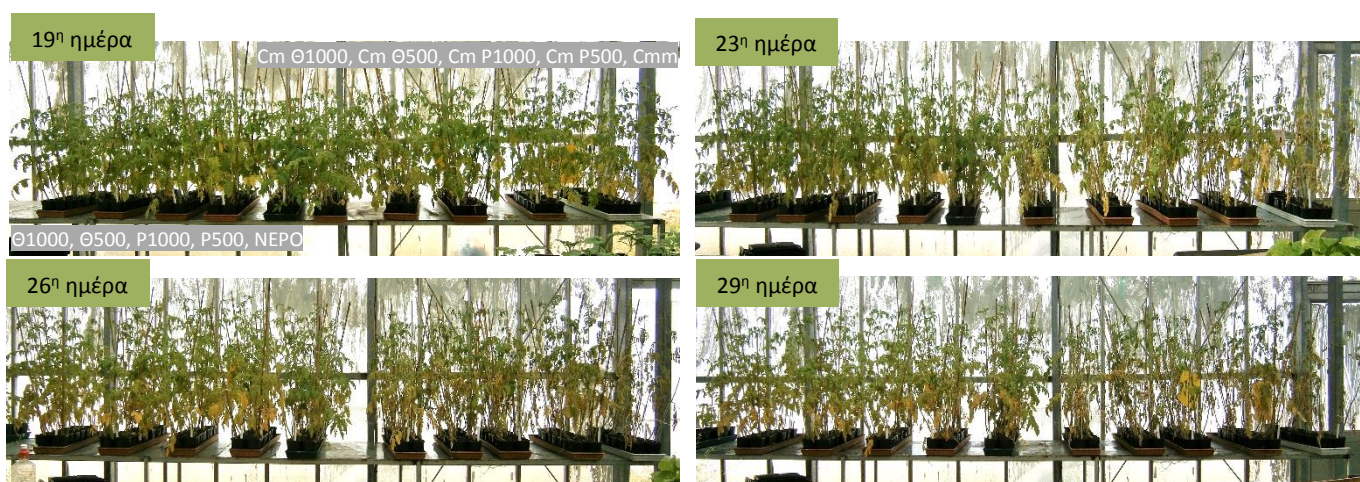
Διαγράμματα 3.3.2 Γ₁-Δ₁: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Ρίγανη) και *Coridothymus capitatus* (Θυμαρί) στην εξέλιξη της ασθένειας του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* που εκφράζεται από την σοβαρότητα της ασθένειας (Γ₁) και τον δείκτη της ασθένειας (Δ₁) με κλίμακα 0-5* ανά τις ημέρες μετά την μόλυνση (days post inoculation, dpi) όπου καταγράφηκαν τα συμπτώματα από την προσβολή του παθογόνου βακτηρίου και τις εφαρμογές των αιθερίων ελαίων στα φυτά σε συγκεντρώσεις 500ppm και 1000ppm σε σχέση με τον μάρτυρα, όπου:

<i>Cmm</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Μάρτυρας)
<i>Cmm</i> P500	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο ρίγανης σε συκέντρωση 500ppm
<i>Cmm</i> P1000	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο ρίγανης σε συκέντρωση 1000ppm
<i>Cmm</i> Θ500	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο θυμαριού σε συκέντρωση 500ppm
<i>Cmm</i> Θ1000	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο θυμαριού σε συκέντρωση 1000ppm

* Δείκτης ασθένειας: 0: Υγιές φυτό, 1: 5-20%, 2: 20,1-40%, 3: 40,1-60%, 4: 60,1-80%, 5: 80,1-100%.

Η ανάπτυξη των φυτών τομάτας αποτυπώνεται στην Εικόνα 3.3.2 β με την συγκριτική εικόνα της ανάπτυξης συνολικά των φυτών, στην Εικόνα 3.3.2 γ με την συγκριτική εικόνα των εφαρμογών την 29^η ημέρα και στα Διαγράμματα 3.3.2 Ε₁-Ζ₁ του μέσου ύψους των φυτών και του μέσου αριθμού φύλλων των φυτών. Στις επεμβάσεις με τα μολυσμένα φυτά, χαμηλότερο μέσο ύψος παρουσίασαν τα φυτά της εφαρμογής του αιθερίου ελαίου του φυτού *Coridothymus capitatus* στα 1000ppm ακόμα και σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα, σε αντίθεση με την εφαρμογή του ίδιου ελαίου στα 500ppm όπου τα φυτά παρουσιάζουν αύξηση του ύψους τους. Στην εφαρμογή του αιθερίου ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* στα 500ppm τα φυτά παρουσιάζουν μικρή αύξηση στο ύψος τους, ενώ στο ίδιο αιθέριο έλαιο στα 1000ppm η αύξηση είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τον μάρτυρα. Στις επεμβάσεις χωρίς την μόλυνση των φυτών με το παθογόνο βακτήριο, τα φυτά στις εφαρμογές του αιθερίου ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* στα 500ppm και στα 1000ppm παρουσιάζουν αυξημένο ύψος σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Αντιθέτως τα φυτά που εφαρμόστηκε το αιθέριο έλαιο του φυτού *Coridothymus capitatus* στα

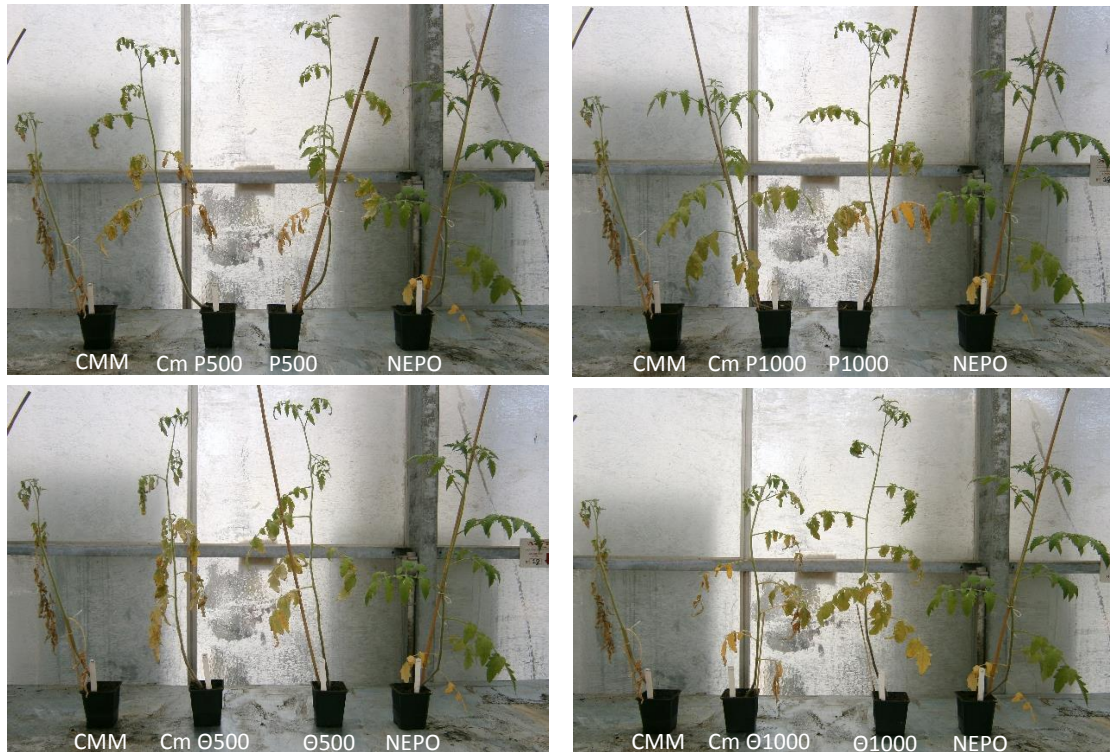
500ppm και στα 1000ppm κυμάνθηκαν στα ίδια επίπεδα σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα στις 26 και 29 ημέρες μετά την μόλυνση, ενώ στις 19 και 23 ημέρες μετά την μόλυνση το μέσο ύψος τους αυξήθηκε. Στα ίδια επίπεδα κυμάνθηκε και ο μέσος αριθμός φύλλων τομάτας ανά τις εφαρμογές, που φαίνεται στο Διάγραμμα 3.3.2 Ζ1, εκτός της εφαρμογής του ελαίου του φυτού *Coridothymus capitatus* στα 500ppm που είναι μειωμένες οι τιμές στις 26 και 29 ημέρες μετά την μόλυνση σε σχέση με τις υπόλοιπες εφαρμογές και τον αρνητικό μάρτυρα.



Εικόνα 3.3.2 β: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (ρίγανη) και *Coridothymus capitatus* (θυμάρι) ανά τις εφαρμογές και τις ημέρες μετά την μόλυνση του παθογόνου στα φυτά όπου:

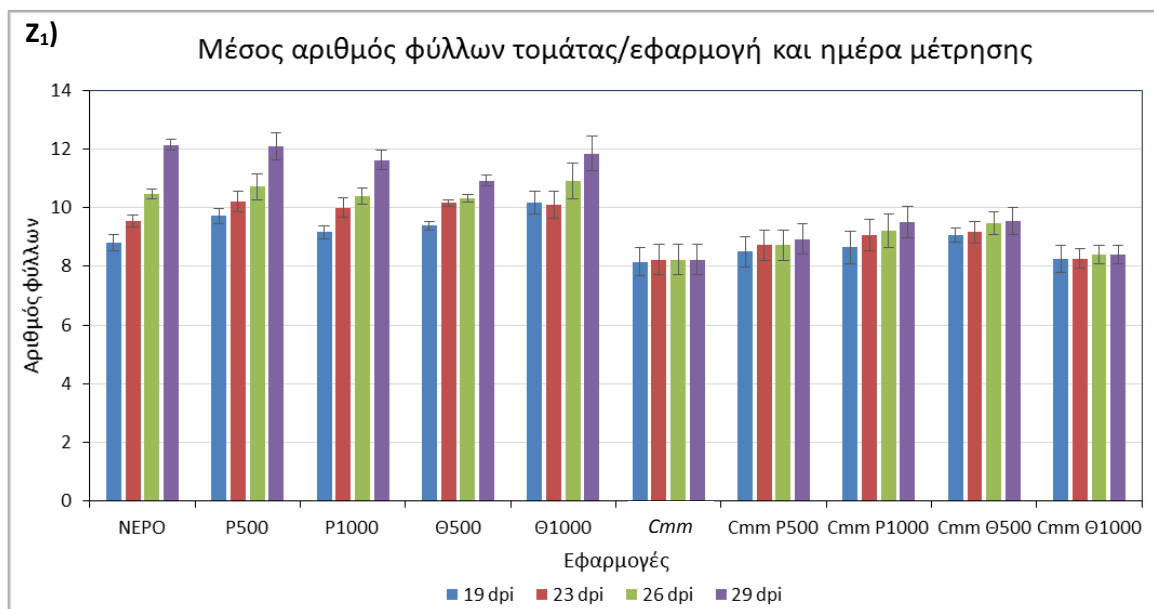
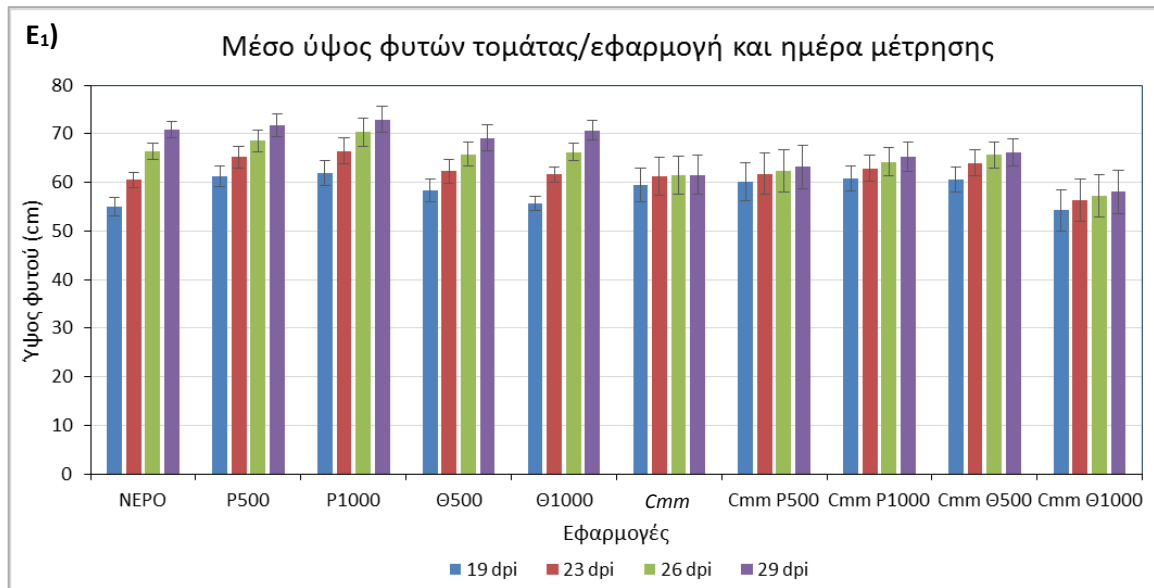
NEPO	Νερό+DMSO+Tween 20 (αρνητικός μάρτυρας)
P500	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
P1000	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
Θ500	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
Θ1000	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm
Cmm	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (θετικός μάρτυρας)
Cmm P500	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
Cmm P1000	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
Cmm Θ500	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
Cmm Θ1000	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm

29η ημέρα



Εικόνα 3.3.2 γ: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (ρίγανη) και *Coridothymus capitatus* (θυμάρι) την 29^η ημέρα ανά τις εφαρμογές μετά την μόλυνση του παθογόνου στα φυτά όπου:

NEPO	Νερό+DMSO+Tween 20 (αρνητικός μάρτυρας)
P500	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
P1000	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
Θ500	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
Θ1000	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm
Cmm	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (θετικός μάρτυρας)
Cmm P500	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
Cmm P1000	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
Cmm Θ500	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
Cmm Θ1000	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm

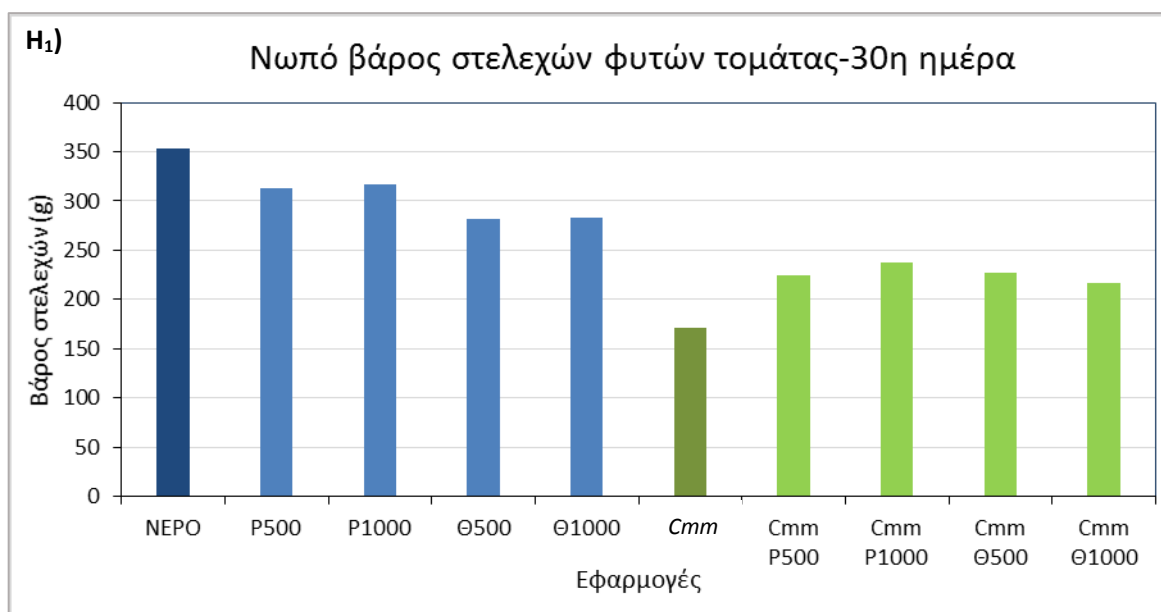


Διαγράμματα 3.3.2 Ε₁-Z₁: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (ρίγανη) και *Coridothymus capitatus* (θυμάρι) στο ύψος των φυτών τομάτας (E₁) και στον αριθμό φύλλων (Z₁) ανά εφαρμογή και ανά τις ημέρες μετά την μόλυνση του παθογόνου στα φυτά όπου:

NEPO	Νερό+DMSO+Tween 20 (αρνητικός μάρτυρας)
P500	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
P1000	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
Θ500	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
Θ1000	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm
Cmm	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (θετικός μάρτυρας)
Cmm P500	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
Cmm P1000	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
Cmm Θ500	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
Cmm Θ1000	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm

Την 30^η ημέρα αποκόπηκε το υπέργειο μέρος των φυτών και μετρήθηκε το νωπό βάρος των στελεχών το οποίο και φαίνεται στο Διάγραμμα 3.3.2 Η₁. Τα φυτά που μολύνθηκαν με το παθογόνο βακτήριο έχουν μικρότερο νωπό βάρος από τα φυτά που

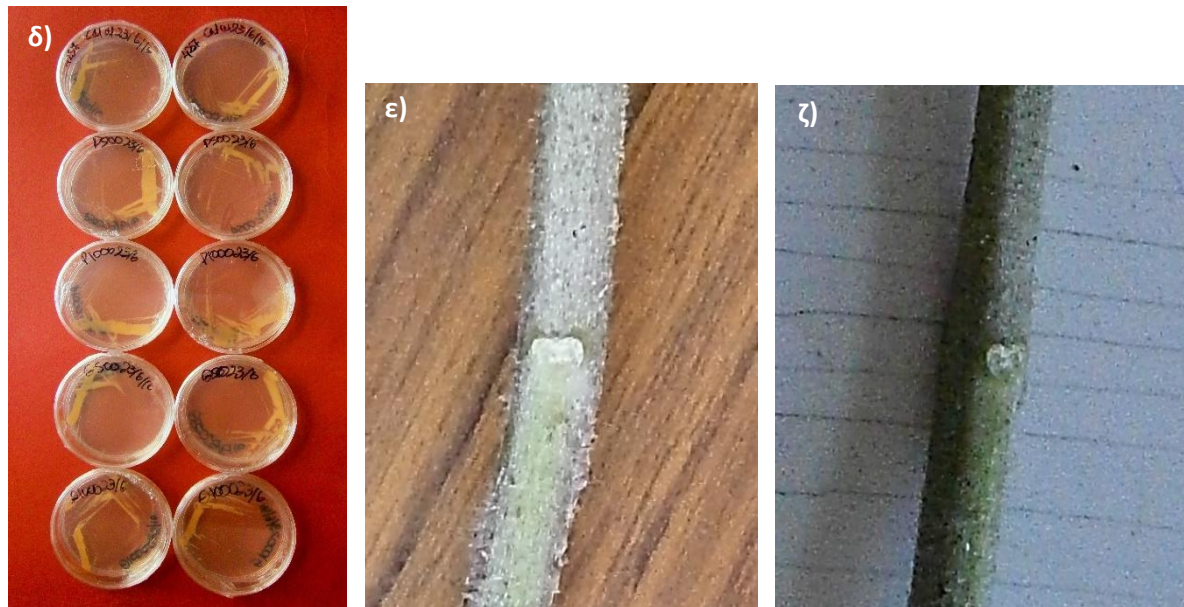
δεν μολύνθηκαν. Τα φυτά του θετικού μάρτυρα παρουσιάζουν μικρότερο νωπό βάρος από όλες τις εφαρμογές. Το νωπό βάρος των φυτών στις εφαρμογές του ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* αυξάνεται από τα 500ppm στα 1000ppm που είναι και η μεγαλύτερη τιμή για τα μολυσμένα με το παθογόνο φυτά, ενώ μειώνεται στις εφαρμογές του ελαίου του φυτού *Coridothymus capitatus* από τα 500ppm στα 1000ppm. Στις επεμβάσεις με τα φυτά που δεν μολύνθηκαν με το παθογόνο βακτήριο ο αρνητικός μάρτυρας, δηλαδή τα φυτά που εφαρμόστηκε νερό, DMSO και Tween 20, είχαν το μεγαλύτερο νωπό βάρος από όλες τις εφαρμογές. Τα φυτά στις εφαρμογές του ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* από τα 500ppm στα 1000ppm είχαν μια μικρή αύξηση στο νωπό βάρος τους, ενώ στα φυτά με τις εφαρμογές του ελαίου του φυτού *Coridothymus capitatus* από τα 500ppm στα 1000ppm η αύξηση ήταν ελάχιστη και οι τιμές τους είναι μικρότερες από το προηγούμενο έλαιο.



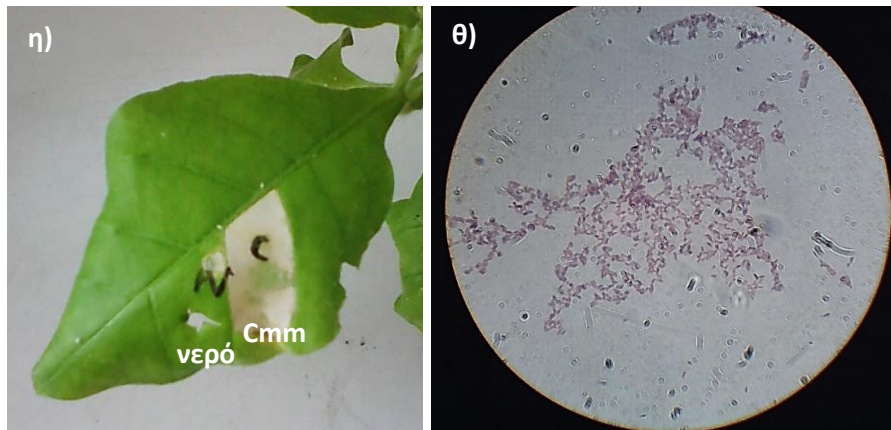
Διάγραμμα 3.3.2 H₁: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (ρίγανη) και *Coridothymus capitatus* (θυμάρι) στο βάρος στελεχών των φυτών τομάτας ανά εφαρμογή την 30^η ημέρα μετά την μόλυνση του παθογόνου στα φυτά όπου:

NEPO	Νερό+DMSO+Tween 20 (αρνητικός μάρτυρας)
P500	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
P1000	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
Θ500	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
Θ1000	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm
Cmm	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Θετικός μάρτυρας)
Cmm P500	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
Cmm P1000	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
Cmm Θ500	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
Cmm Θ1000	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm

Μετά την μέτρηση του νωπού βάρους ακολούθησε η απομόνωση του παθογόνου βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* από το σημείο του λαιμού των φυτών τομάτας και η ανάπτυξη του βακτηρίου σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο N.A.G.. Στην Εικόνα 3.3.2 δ φαίνεται η ανάπτυξη του βακτηρίου στα τρυβλία με το χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα 2 ημέρες μετά την απομόνωσή του από τα φυτά, με δύο επαναλήψεις ανά εφαρμογή και έτσι διαπιστώνεται η παρουσία του βακτηρίου σε όλες τις εφαρμογές. Στις Εικόνες 3.3.2 ε και ζ διακρίνονται οι βάσεις μίσχων φύλλων από τα φυτά τομάτας με τον χαρακτηριστικό καστανό μεταχρωματισμό των αγγείων σε μορφή πετάλου ίππου. Επίσης πραγματοποιήθηκε αντίδραση υπερευαισθησίας και χρώση Gram για την καλύτερη ταυτοποίηση της φυτοπαθογόνου ικανότητας του βακτηρίου, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.3.2 η, θ.



Εικόνα 3.3.2 δ, ε, ζ: Απομόνωση του παθογόνου βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* από φυτά με τα συμπτώματα της ασθένειας του βακτηριακού έλκους της τομάτας, όπου διακρίνονται τα τρυβλία με τον μάρτυρα και τις εφαρμογές (δ) και οι εικόνες με τον χαρακτηριστικό καστανό μεταχρωματισμό των αγγείων στις βάσεις μίσχων φύλλων (ε), (ζ).

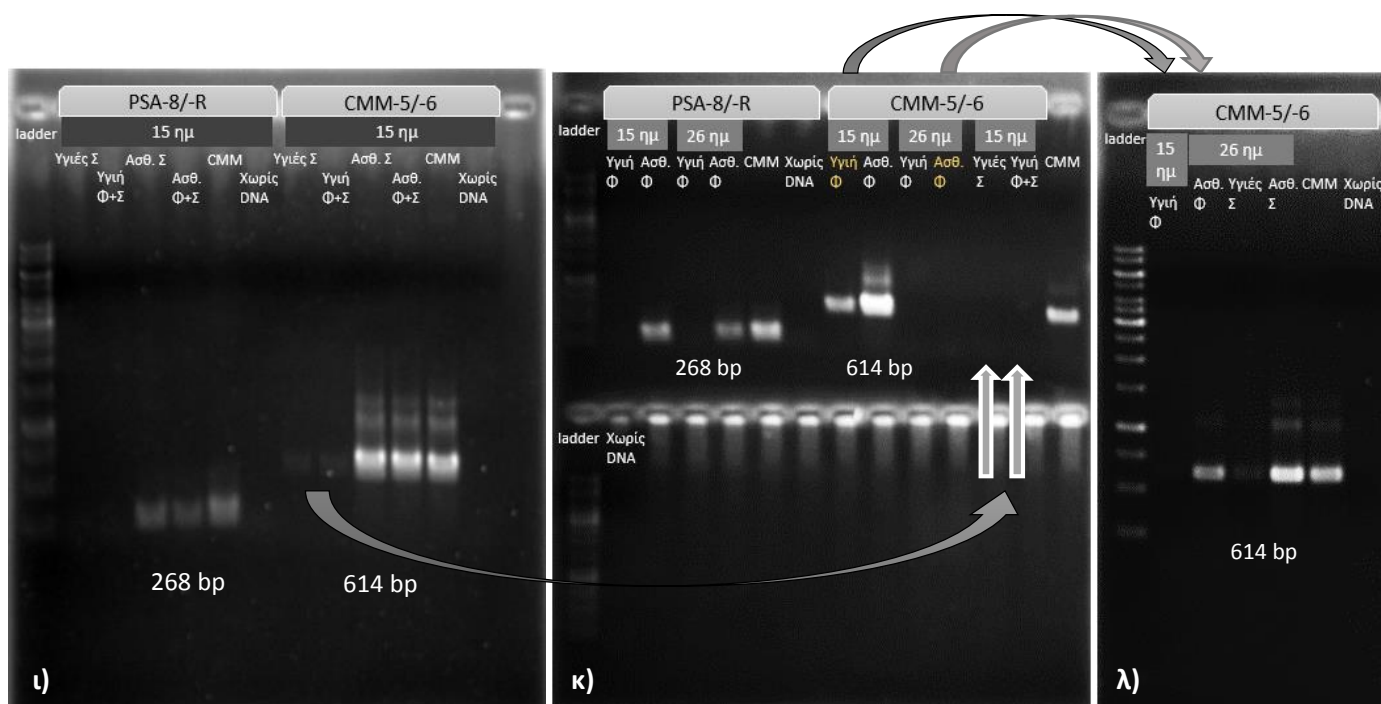


Εικόνα 3.3.2 η, θ: Αντίδραση υπερευαισθησίας (η) και χρώση Gram (θ) για την ταυτοποίηση του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* που απομονώθηκε από τα φυτά.

Εκτός από τις διαδικασίες της απομόνωσης του βακτηρίου σε θρεπτικό μέσο στα τρυβλία, της αντίδρασης υπερευαισθησίας και της χρώσης Gram, ακολουθήθηκε και η διαδικασία μοριακής ταυτοποίησης του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* στα φυτά με PCR έχοντας ως εξειδικευμένους εκκινητές τους CMM-5/CMM-6 και PSA-8/PSA-R. Τα αποτελέσματα αφορούν σε δείγματα φύλλων, στελέχους και φύλλων και στελέχους μαζί, που λήφθηκαν στις 15 και 26 ημέρες μετά την μόλυνση.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.3.2 ι, στις 15 ημέρες το ασθενές στέλεχος, τα ασθενή φύλλα και στέλεχος και ο θετικός μάρτυρας παρουσίασαν ζώνη και για τα δύο ζεύγη εκκινητών στο αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος, τα 268 bp και 614 bp αντίστοιχα, σε αντίθεση με τα υγιή που δεν εμφανίσανε ζώνη αφού δεν υπήρχε εκεί το βακτήριο. Στο ζεύγος εκκινητών CMM-5/-6 στα υγιή παρουσιάστηκε μια αχνή ζώνη, αλλά μετά από επανάληψη της PCR για αυτά τα δείγματα οι διαδρομές ήταν καθαρές (Εικόνα 3.3.2 κ). Ακολούθως εξετάστηκαν και τα φύλλα, όπου σύμφωνα με την Εικόνα 3.3.2 κ για το ζεύγος εκκινητών PSA-8/-R εμφανίστηκε κανονικά ζώνη στις 268 bp στα ασθενή φύλλα και στις 15 και 26 ημέρες μετά την μόλυνση και φυσιολογικά απουσίαζε στα υγιή φύλλα. Όταν εφαρμόστηκε το ζεύγος εκκινητών CMM-5/-6 παρουσιάστηκε ζώνη στα 614 bp στα ασθενή φύλλα στις 15 ημέρες μετά την μόλυνση και στον θετικό μάρτυρα και απουσίαζε στα ασθενή φύλλα στις 26 ημέρες μετά την μόλυνση, ενώ παρουσιάστηκε ζώνη στα υγιή φύλλα στις 15 ημέρες και απουσίαζε όπως έπρεπε στα υγιή φύλλα στις 26 ημέρες μετά την μόλυνση. Έτσι έγινε επανάληψη των δειγμάτων των υγιών φύλλων στις 15 ημέρες μετά την μόλυνση και των ασθενών φύλλων στις 26 ημέρες μετά την μόλυνση (Εικόνα 3.3.2 λ) με το ζεύγος εκκινητών CMM-5/-6 και τα

δείγματα παρουσίασαν το μεν πρώτο απουσία ζώνης και το δεύτερο ζώνη στα 614 bp. Με το ίδιο ζεύγος εκκινητών εφαρμόστηκε PCR και για τα στελέχη στις 26 ημέρες μετά την μόλυνση, όπου υπήρξε παρουσία ζώνης στα 614 bp για τα ασθενή στελέχη και τον θετικό μάρτυρα και απουσία ζώνης για τα υγιή στελέχη. Σε όλες τις περιπτώσεις ο αρνητικός μάρτυρας δεν εμφάνισε ζώνη.



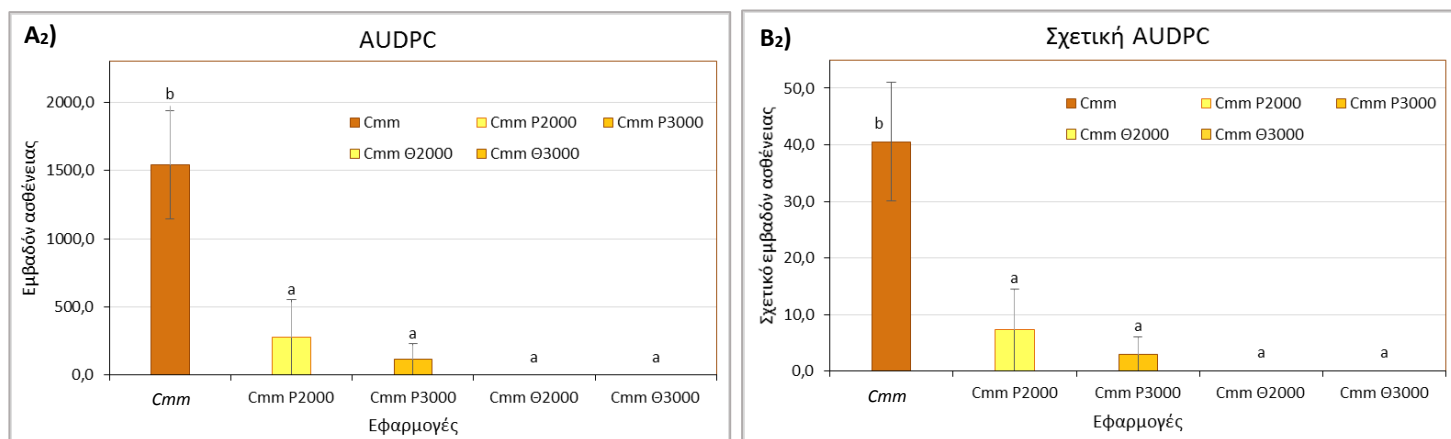
Εικόνα 3.3.2 ι, κ, λ: Ταυτοποίηση της παρουσίας του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* στα φυτάρια τομάτας στις 15 και 26 ημέρες μετά την μόλυνση με το παθογόνο βακτήριο, εφαρμόζοντας PCR με εξειδικευμένους εκκινητές τους CMM-5/CMM-6 και PSA-8/PSA-R για την ανίχνευση του DNA του βακτηρίου σε φύλλα, σε στελέχη και σε φύλλα και στελέχη μαζί, όπου: **PSA-8/-R, CMM-5/-6:** Ζεύγος εκκινητών που δοκιμάστηκε, **15 ημ/26 ημ:** Ημέρες δειγματοληψίας μετά την μόλυνση, **Υγιή/Ασθ.:** Υγιή και ασθενή μέρη φυτού, **Φ, Σ, Φ+Σ:** Φύλλα, Στέλεχος, Φύλλα και Στέλεχος, **CMM:** DNA από αποικίες του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* από απομόνωση από τα φυτά σε τρυβλίο (θετικός μάρτυρας), **Χωρίς DNA:** Δείγμα με το Mastermix χωρίς DNA (αρνητικός μάρτυρας). Τα βελάκια δείχνουν το αποτέλεσμα των δειγμάτων που χρειάστηκε να επαναληφθούν.

Από τα αποτελέσματα της προηγούμενης δοκιμής αλλά και από τις μελέτες των Hu & Coats, 2008 και Liu *et al.*, 2016, κρίθηκε αναγκαίο να γίνει και μια δεύτερη δοκιμή. Σε αυτή την δοκιμή έγιναν οι εφαρμογές των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (με περιοχή καλλιέργειας τα Φυλιατρά Πελοποννήσου) και *Thymus vulgaris* σε συγκεντρώσεις 2000ppm και 3000ppm και σε 24 ώρες έγινε η μόλυνση με το παθογόνο βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* σε δοσολογία 10ml ανά φυτό αντί για 20ml που ήταν σε όλες τις προηγούμενες δοκιμές. Σε 8 ημέρες από την πρώτη δοκιμή έγινε και δεύτερη με τα ίδια αιθέρια έλαια στο 1/2

της αρχικής συγκέντρωσης, δηλαδή στα 1000ppm και στα 1500ppm και την ποσότητα να παραμένει στα 10ml ανά φυτό. Οι μετρήσεις ξεκίνησαν από τις 15 ημέρες μετά την μόλυνση και συνεχίστηκαν ανά τακτά χρονικά διαστήματα έως και τις 38 ημέρες μετά την μόλυνση. Λήφθηκαν μετρήσεις του ύψους των φυτών, του αριθμού φύλλων και της εξέλιξης των συμπτωμάτων. Στο τέλος αποκόπηκε το υπέργειο μέρος και μετρήθηκε και το νωπό βάρος των στελεχών των φυτών.

Και σε αυτή την δοκιμή η ανάπτυξη της ασθένειας καταγράφεται στα παρακάτω διαγράμματα του εμβαδού ασθένειας (AUDPC, Area Under Disease Progress Curve), του σχετικού εμβαδού ασθένειας (Relative AUDPC), της σοβαρότητας της ασθένειας (Disease Severity) και του δείκτη της ασθένειας (Disease Index) σε κλίμακα από το 0 έως το 5 όπως και στην πρώτη δοκιμή.

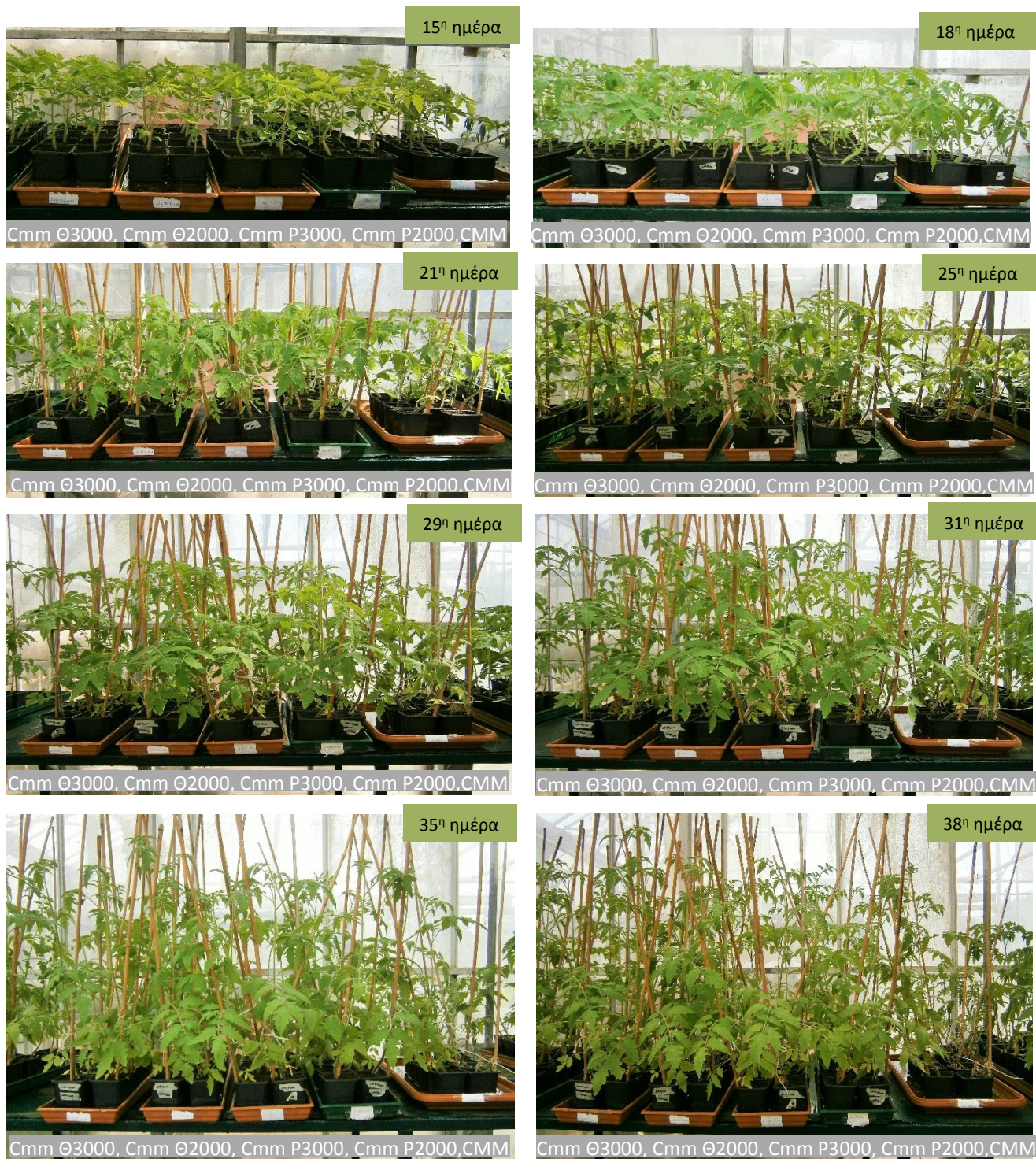
Στα Διαγράμματα 3.3.2 A₂-B₂ του εμβαδού ασθένειας και του σχετικού εμβαδού ασθένειας φαίνεται η μεγάλη διαφορά στις τιμές του μάρτυρα σε σχέση με τις εφαρμογές, όπου διαφέρουν και στατιστικά. Επίσης παρόλο που οι εφαρμογές μεταξύ τους δεν διαφέρουν στατιστικά, η εφαρμογή του αιθερίου ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* παρουσιάζει μείωση από τα 2000ppm στα 3000ppm με τις τιμές της τελευταίας εφαρμογής να είναι πολύ μικρές σε σχέση με τον μάρτυρα. Σε ότι αφορά τις εφαρμογές του ελαίου του φυτού *Thymus vulgaris* και στις δυο συγκεντρώσεις οι τιμές είναι μηδενικές.



Διαγράμματα 3.3.2 A₂-B₂: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Ρίγανη) και *Thymus vulgaris* (Θυμαρί) στην ανάπτυξη της ασθένειας του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* που εκφράζεται από το εμβαδόν ασθένειας (AUDPC) (A₂) και το σχετικό εμβαδόν ασθένειας (Relative AUDPC) (B₂) ανά τις εφαρμογές των αιθερίων ελαίων στα φυτά σε συγκεντρώσεις 2000ppm και 3000ppm σε σχέση με τον μάρτυρα, όπου:

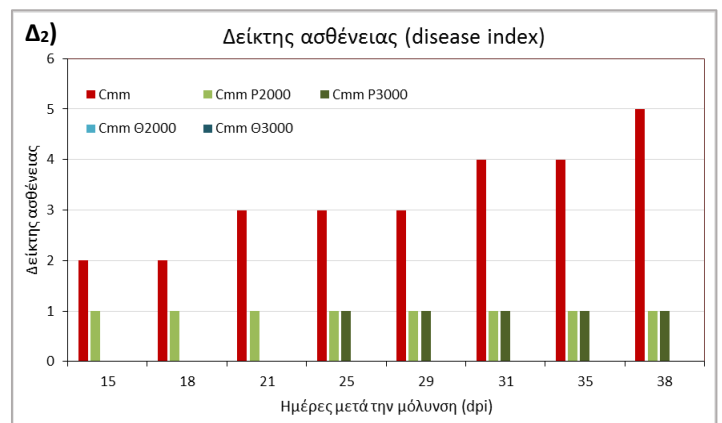
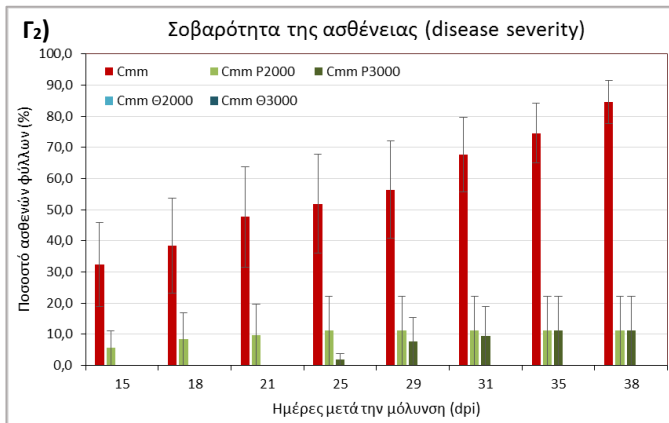
Cmm	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Μάρτυρας)
Cmm P2000	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 2000ppm
Cmm P3000	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 3000ppm
Cmm Θ2000	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 2000ppm

Στην Εικόνα 3.3.2 μ των φυτών και στα Διαγράμματα 3.3.2 Γ₂-Δ₂ της σοβαρότητας και του δείκτη ασθένειας διακρίνεται η κλιμακωτή αύξηση στα συμπτώματα άρα και στις τιμές του μάρτυρα ανά τις ημέρες μετά την μόλυνση, ενώ από τις εφαρμογές των αιθερίων ελαίων τα φυτά που εφαρμόστηκε το έλαιο του φυτού *Thymus vulgaris* και στις δύο συγκεντρώσεις δεν παρουσίασαν συμπτώματα και έτσι δεν φαίνονται σε κανένα από τα Διαγράμματα. Στις εφαρμογές του ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* παρουσιάστηκε ένα πολύ μικρό ποσοστό ασθενών φύλλων με την εμφάνιση του εξαρχής από τις 15 ημέρες μετά την μόλυνση στη συγκέντρωση των 2000ppm και από τις 25 ημέρες μετά την μόλυνση στη συγκέντρωση των 3000ppm. Πιο συγκεκριμένα, να διευκρινιστεί ότι για τις εφαρμογές του ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* και στις δύο συγκεντρώσεις εμφανίστηκαν συμπτώματα σε ένα φυτό από τα 9 που είχε η κάθε εφαρμογή και στην συγκέντρωση των 2000ppm τα συμπτώματα αυτού του φυτού αγγίζαν το 50% και έως τις 25 ημέρες προσβλήθηκε όλο το φυτό από το βακτήριο. Επίσης στη συγκέντρωση των 3000ppm το φυτό εμφάνισε συμπτώματα από τις 25 ημέρες μετά την μόλυνση έχοντας μολυνθεί μόλις τα δύο από τα επτά φύλλα που είχε και χωρίς να υπάρχει κάποια ένδειξη στις προηγούμενες μετρήσεις, ενώ έως τις 35 ημέρες μετά την μόλυνση τα συμπτώματα εξαπλώθηκαν σε όλο το φυτό.



Εικόνα 3.3.2 μ: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Ρίγανη) και *Thymus vulgaris* (Θυμάρι) στην εξέλιξη της ασθένειας του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ανά τις ημέρες μετά την μόλυνση όπου καταγράφηκαν τα συμπτώματα από την προσβολή του παθογόνου βακτηρίου και τις εφαρμογές των αιθερίων ελαίων στα φυτά σε συγκεντρώσεις 2000ppm και 3000ppm σε σχέση με τον μάρτυρα, όπου:

CMM	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Μάρτυρας)
Cmm P2000	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 2000ppm
Cmm P3000	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 3000ppm
Cmm Θ2000	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 2000ppm
Cmm Θ3000	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 3000ppm



Διαγράμματα 3.3.2 Γ₂-Δ₂: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Ρίγανη) και *Thymus vulgaris* (Θυμαρί) στην εξέλιξη της ασθένειας του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* που εκφράζεται από την σοβαρότητα της ασθένειας (Γ₂) και τον δείκτη της ασθένειας (Δ₂) με κλίμακα 0-5* ανά τις ημέρες μετά την μόλυνση (days post inoculation, dpi) όπου καταγράφηκαν τα συμπτώματα από την προσβολή του παθογόνου βακτηρίου και τις εφαρμογές των αιθερίων ελαίων στα φυτά σε συγκεντρώσεις 2000ppm και 3000ppm σε σχέση με τον μάρτυρα, όπου:

Cmm	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Μάρτυρας)
Cmm P2000	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 2000ppm
Cmm P3000	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 3000ppm
Cmm Θ2000	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 2000ppm
Cmm Θ3000	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 3000ppm

* Δείκτης ασθένειας: 0: Υγιές φυτό, 1: 5-20%, 2: 20,1-40%, 3: 40,1-60%, 4: 60,1-80%, 5: 80,1-100%.

Η εξέλιξη της ανάπτυξης των φυτών καταγράφεται στα Διαγράμματα 3.3.2 E₂-Z₂ που αφορούν το μέσο ύψος των φυτών και τον μέσο αριθμό φύλλων τομάτας ανά εφαρμογή και ανά ημέρα μέτρησης, όπως και στην Εικόνα 3.3.2 ν μπορούμε να δούμε συγκριτικά τις εφαρμογές την 38^η ημέρα. Στο Διάγραμμα 3.3.2 E₂ με το ύψος μπορούν να διακριθούν οι τιμές του θετικού μάρτυρα που είναι χαμηλότερες σε σχέση με όλες τις επεμβάσεις. Επίσης για τα φυτά που μολύνθηκαν με το παθογόνο βακτήριο στις εφαρμογές του ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* από τα 2000ppm στα 3000ppm το μέσο ύψος μειώνεται, ενώ στις εφαρμογές του ελαίου του φυτού *Thymus vulgaris* και στις δύο συγκεντρώσεις το μέσο ύψος βρίσκεται στα ίδια επίπεδα. Για τα φυτά που δεν μολύνθηκαν με το παθογόνο βακτήριο, παρατηρείται μια αύξηση στο ύψος των φυτών στις εφαρμογές του ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* από τα 2000ppm στα 3000ppm με το μέσο ύψος στην τελευταία συγκέντρωση να είναι στα ίδια επίπεδα με τις τιμές του αρνητικού μάρτυρα. Αντιθέτως, παρατηρείται μείωση στις τιμές μέσου ύψους στις εφαρμογές του ελαίου του φυτού *Thymus vulgaris* από τα 2000ppm στα 3000ppm και πιο συγκεκριμένα οι τιμές του μέσου ύψους στα

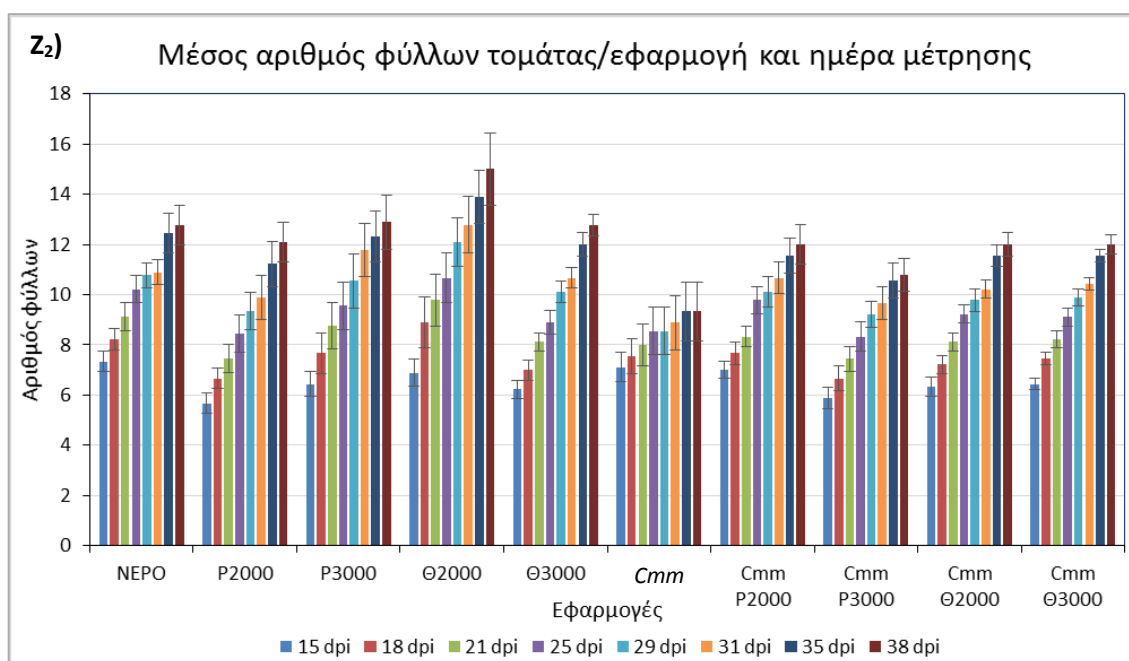
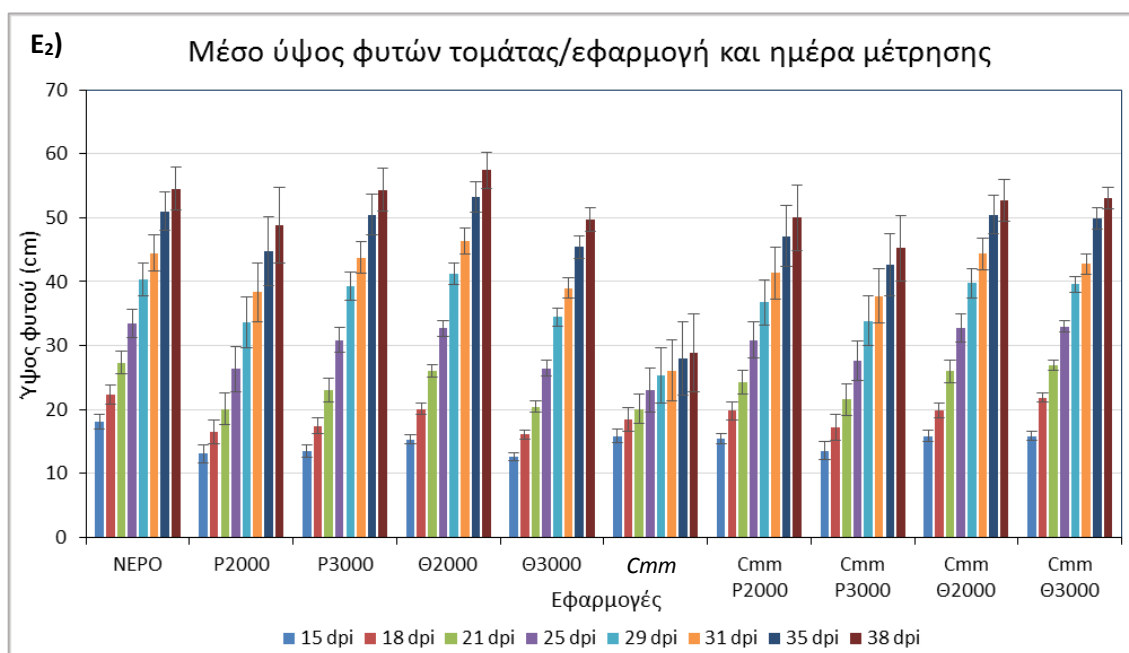
2000ppm είναι υψηλότερες από αυτές του αρνητικού μάρτυρα, ενώ στα 3000ppm είναι χαμηλότερες από αυτές του μάρτυρα. Στο Διάγραμμα με τον μέσο αριθμό φύλλων 3.3.2 Z₂ και σε αυτή την περίπτωση ο θετικός μάρτυρας έχει τις χαμηλότερες τιμές από τις υπόλοιπες εφαρμογές από τις 29 ημέρες μετά την μόλυνση και μετά. Στις εφαρμογές του ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* από τα 2000ppm στα 3000ppm υπάρχει μια μείωση στις τιμές του μέσου αριθμού φύλλων. Στις εφαρμογές του ελαίου του φυτού *Thymus vulgaris* οι τιμές είναι στα ίδια επίπεδα και στις δύο συγκεντρώσεις. Για τα φυτά που δεν μολύνθηκαν παρουσιάστηκε αύξηση στις εφαρμογές του ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* από τα 2000ppm στα 3000ppm με τις τιμές στα 3000ppm να είναι στα ίδια επίπεδα με αυτές του αρνητικού μάρτυρα. Στις εφαρμογές του ελαίου του φυτού *Thymus vulgaris* από τα 2000ppm στα 3000ppm παρουσιάζεται μείωση, με τις τιμές στα 2000ppm να είναι μεγαλύτερες από τον αρνητικό μάρτυρα και τις τιμές στα 3000ppm να είναι στα ίδια περίπου επίπεδα με τον αρνητικό μάρτυρα.

38η ημέρα



Εικόνα 3.3.2 ν: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (ρίγανη) και *Thymus vulgaris* (θυμάρι) ανά τις εφαρμογές την 38^η ημέρα μετά την μόλυνση του παθογόνου στα φυτά όπου:

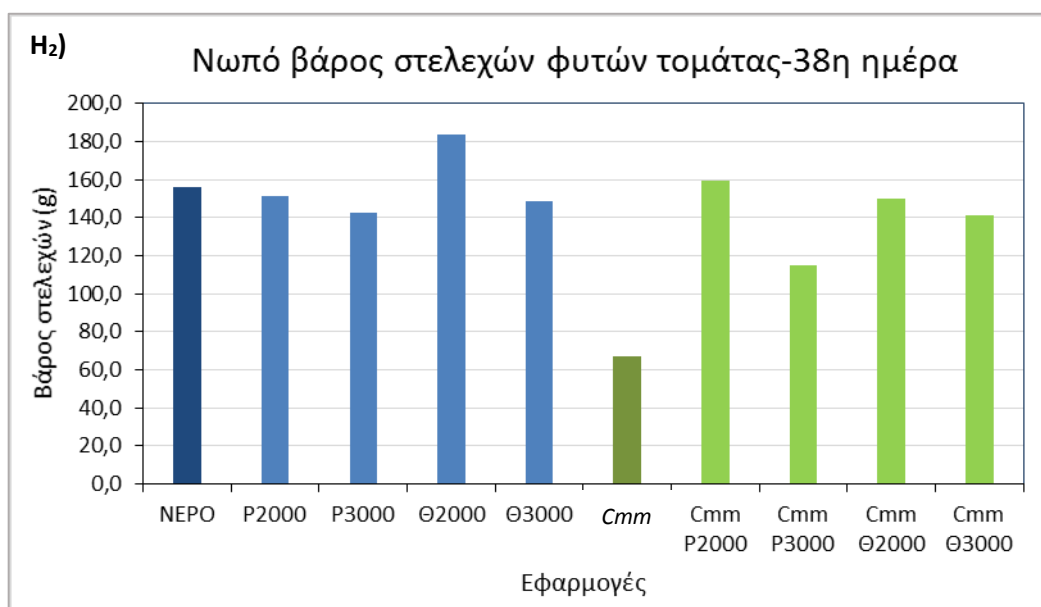
NEPO	Νερό+DMSO+Tween 20 (αρνητικός μάρτυρας)
P2000	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 2000ppm
P3000	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 3000ppm
Θ2000	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 2000ppm
Θ3000	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 3000ppm
CMM	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (θετικός μάρτυρας)
Cm P2000	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 2000ppm
Cm P3000	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 3000ppm
Cm Θ2000	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 2000ppm
Cm Θ3000	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 3000ppm



Διαγράμματα 3.3.2 E₂-Z₂: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (ρίγανη) και *Thymus vulgaris* (θυμάρι) στο ύψος των φυτών τομάτας (E₁) και στον αριθμό φύλλων (Z₁) ανά εφαρμογή και ανά τις ημέρες μετά την μόλυνση του παθογόνου στα φυτά όπου:

NEPO	Νερό+DMSO+Tween 20 (αρνητικός μάρτυρας)
P2000	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 2000ppm
P3000	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 3000ppm
Θ2000	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 2000ppm
Θ3000	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 3000ppm
Cmm	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (θετικός μάρτυρας)
Cmm P2000	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 2000ppm
Cmm P3000	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 3000ppm
Cmm Θ2000	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 2000ppm
Cmm Θ3000	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 3000ppm

Την 38^η ημέρα μετά την τελευταία μέτρηση αποκόπηκε το υπέργειο μέρος των φυτών και ζυγίστηκαν τα στελέχη. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Διάγραμμα 3.3.2 H₂, όπου αρχικά παρατηρείται ότι τα φυτά του θετικού μάρτυρα παρουσίασαν μικρότερο νωπό βάρος από όλες τις επεμβάσεις. Τα φυτά που μολύνθηκαν με το παθογόνο βακτήριο στις εφαρμογές και των δύο ελαίων παρουσίασαν μείωση στο νωπό βάρος από τα 2000ppm στα 3000ppm, με την διαφορά στις δυο εφαρμογές του ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* να είναι μεγάλη. Επίσης τα φυτά που δεν μολύνθηκαν με το παθογόνο βακτήριο στις εφαρμογές και των δύο ελαίων παρουσίασαν μείωση, με την διαφορά στις εφαρμογές του ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* από τα 2000ppm στα 3000ppm να είναι μικρή. Στις εφαρμογές του ελαίου του φυτού *Thymus vulgaris* η διαφορά είναι μεγάλη και στα 2000ppm το νωπό βάρος των φυτών είναι το μόνο που ξεπερνά αυτό του αρνητικού μάρτυρα.

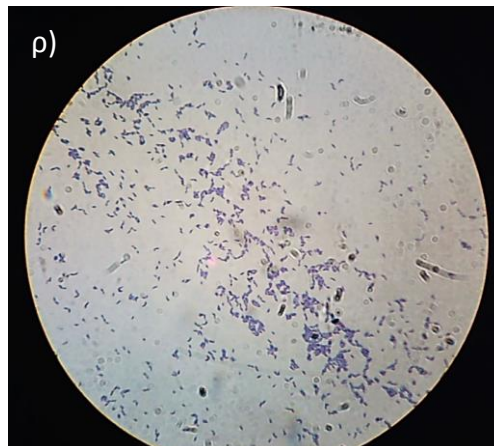
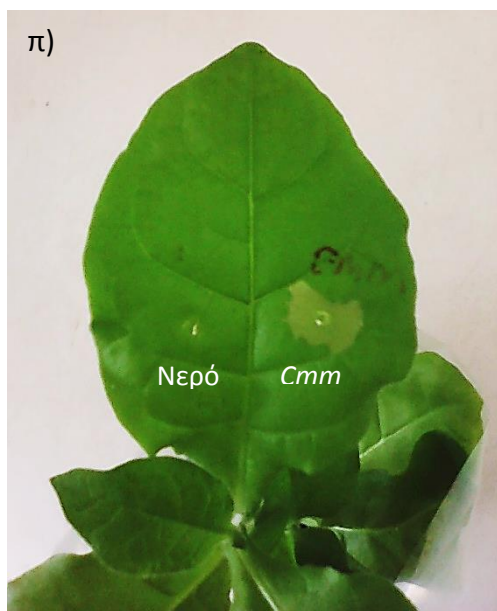
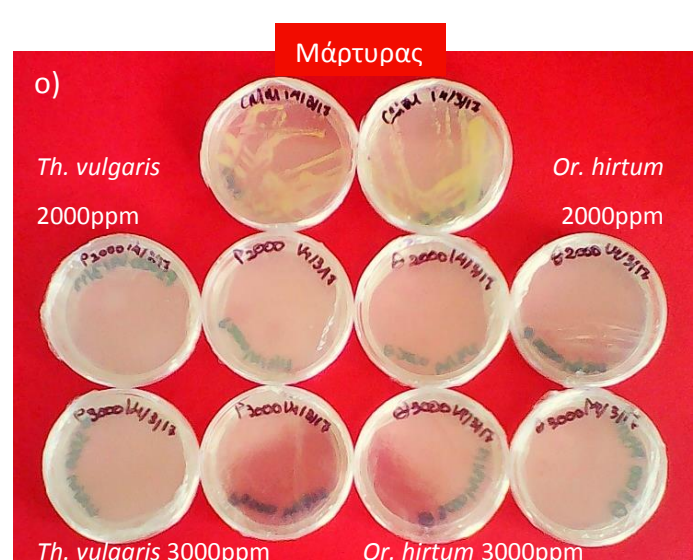
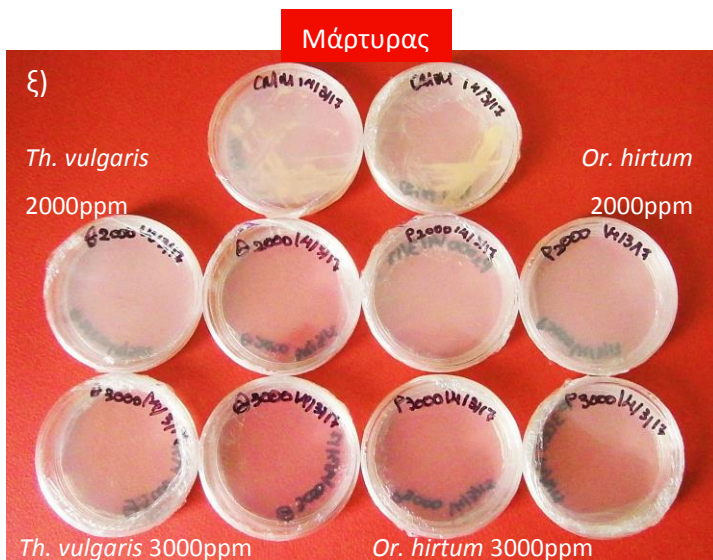


Διάγραμμα 3.3.2 H₂: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (ρίγανη) και *Thymus vulgaris* (θυμάρι) στο βάρος στελεχών των φυτών τομάτας ανά εφαρμογή την 38^η ημέρα μετά την μόλυνση του παθογόνου στα φυτά όπου:

NEPO	Νερό+DMSO+Tween 20 (αρνητικός μάρτυρας)
P2000	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 2000ppm
P3000	Έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 3000ppm
Θ2000	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 2000ppm
Θ3000	Έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 3000ppm
Cmm	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (θετικός μάρτυρας)
Cmm P2000	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 2000ppm
Cmm P3000	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 3000ppm
Cmm Θ2000	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 2000ppm
Cmm Θ3000	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 3000ppm

Μετά την ζύγιση των στελεχών των φυτών τομάτας ακολούθησε η απομόνωση του παθογόνου βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* από τα φυτά

και η ταυτοποίησή του. Όπως φαίνεται από τις Εικόνες 3.3.2 ξ και ο, έγινε απομόνωση του βακτηρίου σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό N.A.G. από φυτά από όλες τις εφαρμογές σε δύο επαναλήψεις ανά εφαρμογή και είναι ευδιάκριτο ότι το βακτήριο αναπτύχθηκε μόνο στον μάρτυρα ενώ σε καμία εφαρμογή δεν αναπτύχθηκε ούτε την δεύτερη ούτε την τρίτη ημέρα μετά την απομόνωση. Αυτό σημαίνει ότι το βακτήριο απουσίαζε όντως από τα φυτά που δεν εμφάνισαν συμπτώματα στις εφαρμογές των αιθερίων ελαίων. Επίσης το βακτήριο ταυτοποιήθηκε και με αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά καπνού όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.3.2 π, όπου επιβεβαιώνει ότι πρόκειται για φυτοπαθογόνο βακτήριο και με χρώση Gram όπως είναι ενδεικτική η φωτογραφία από το μικροσκόπιο στην Εικόνα 3.3.2 ρ, όπου δείχνει το μπλε χρώμα των βακτηρίων και επιβεβαιώνει ότι πρόκειται για Gram θετικό βακτήριο.



Εικόνα 3.3.2 ξ, ο, π, ρ: Απομόνωση του παθογόνου βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* από φυτά με τα συμπτώματα της ασθένειας του βακτηριακού έλκους της τομάτας, όπου διακρίνονται τα τρυβλία με τον μάρτυρα και τις εφαρμογές την δεύτερη (ξ) και τρίτη ημέρα (ο) από την απομόνωση και οι εικόνες με την αντίδραση υπερευαισθησίας (π) και την χρώση Gram (ρ) για την ταυτοποίηση του βακτηρίου.

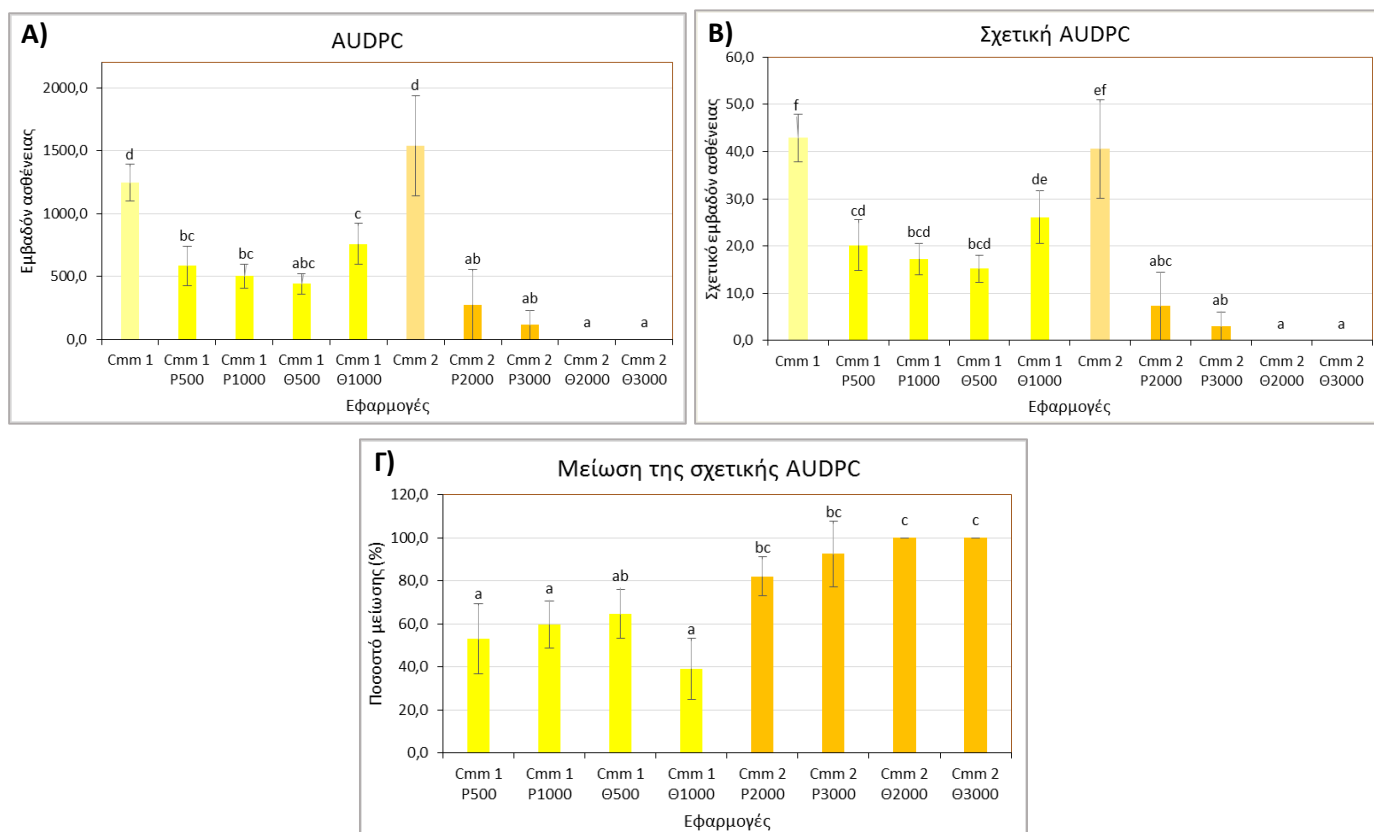
3.3.3 Σύγκριση της επίδρασης των διαφορετικών δοκιμών των αιθερίων ελαίων στην εξέλιξη της ασθένειας του βακτηριακού έλκους της τομάτας.

Μετά την παράθεση των αποτελεσμάτων των δοκιμών που έγιναν για την αξιολόγηση της επίδρασης των αιθερίων ελαίων στην αντιμετώπιση της ασθένειας του βακτηριακού έλκους της τομάτας, είναι σημαντικό να συγκριθούν οι δύο διαφορετικοί τρόποι με τους οποίους εφαρμόστηκαν τα αιθέρια έλαια στα φυτάρια τομάτας για να διαπιστωθεί σε ποιες περιπτώσεις ήταν πιο αποτελεσματικά.

Πριν συγκριθούν τα αποτελέσματα των δύο δοκιμών κρίνεται αναγκαίο να ξαναειπωθούν οι τρόποι που εφαρμόστηκαν τα αιθέρια έλαια στα φυτάρια τομάτας. Έτσι στην πρώτη δοκιμή τα αιθέρια έλαια των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* και *Coridothymus capitatus* εφαρμόστηκαν 1 ημέρα πριν την μόλυνση σε συγκεντρώσεις 500ppm και 1000ppm, ενώ στη δεύτερη δοκιμή τα αιθέρια έλαια των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* και *Thymus vulgaris* εφαρμόστηκαν 1 ημέρα πριν σε συγκεντρώσεις 2000ppm και 3000ppm και εφαρμόστηκε και δεύτερη δόση 8 ημέρες μετά την πρώτη σε συγκεντρώσεις 1000ppm και 1500ppm. Σε όλες τις εφαρμογές έγινε ριζοπότισμα των ελαίων στα φυτά.

Αρχικά παρουσιάζονται τα Διαγράμματα 3.3.3 A-B-Γ του εμβαδού της ασθένειας, του σχετικού εμβαδού της ασθένειας και της μείωσης του σχετικού εμβαδού της ασθένειας και για τις δύο δοκιμές μαζί. Ξεκινώντας από το Διάγραμμα 3.3.3 A του εμβαδού της ασθένειας, παρατηρείται η στατιστική διαφορά των τιμών των εφαρμογών με τους μάρτυρες και για τις δύο δοκιμές και η στατιστική ομοιότητα στους δύο μάρτυρες. Επίσης οι τιμές των εφαρμογών της πρώτης δοκιμής σχετίζονται μεταξύ τους στατιστικά, αλλά και με τις τιμές των εφαρμογών του ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* της δεύτερης δοκιμής παρότι είναι μικρότερες, εκτός της τιμής της εφαρμογής του ελαίου του φυτού *Coridothymus capitatus* στα 1000ppm που είναι και η μεγαλύτερη τιμή. Στο Διάγραμμα 3.3.3 B η διαφορά που υπάρχει είναι ότι η τιμή

του ελαίου του φυτού *Coridothymus capitatus* στα 1000ppm σχετίζεται στατιστικά με την τιμή του σχετικού εμβαδού του μάρτυρα της δεύτερης εφαρμογής. Να σημειωθεί ότι και στα δύο αυτά Διαγράμματα οι τιμές του ελαίου του φυτού *Thymus vulgaris* στα 2000ppm και 3000ppm είναι μηδενικές. Στο Διάγραμμα 3.3.3 Γ τα ποσοστά μείωσης της πρώτης δοκιμής σχετίζονται στατιστικά μεταξύ τους, με το μικρότερο ποσοστό να φτάνει τα 39,1% και είναι του ελαίου του φυτού *Coridothymus capitatus* στα 1000ppm και με το μεγαλύτερο ποσοστό να είναι αυτό του ελαίου του φυτού *Coridothymus capitatus* στα 500ppm που φτάνει τα 64,6% και σχετίζεται στατιστικά με τα ποσοστά μείωσης του ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* της δεύτερης εφαρμογής. Τα ποσοστά μείωσης για το έλαιο του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* έφτασαν τα 53% και 59,7% για τα 500ppm και 1000ppm αντίστοιχα. Στη δεύτερη εφαρμογή τα ποσοστά μείωσης του ελαίου του φυτού *Thymus vulgaris* αγγίζουν το 100% και για τις δύο συγκεντρώσεις, ενώ του ελαίου *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* είναι αρκετά υψηλά στα 82,1% και 92,6% για τις συγκεντρώσεις των 2000ppm και 3000ppm αντίστοιχα.

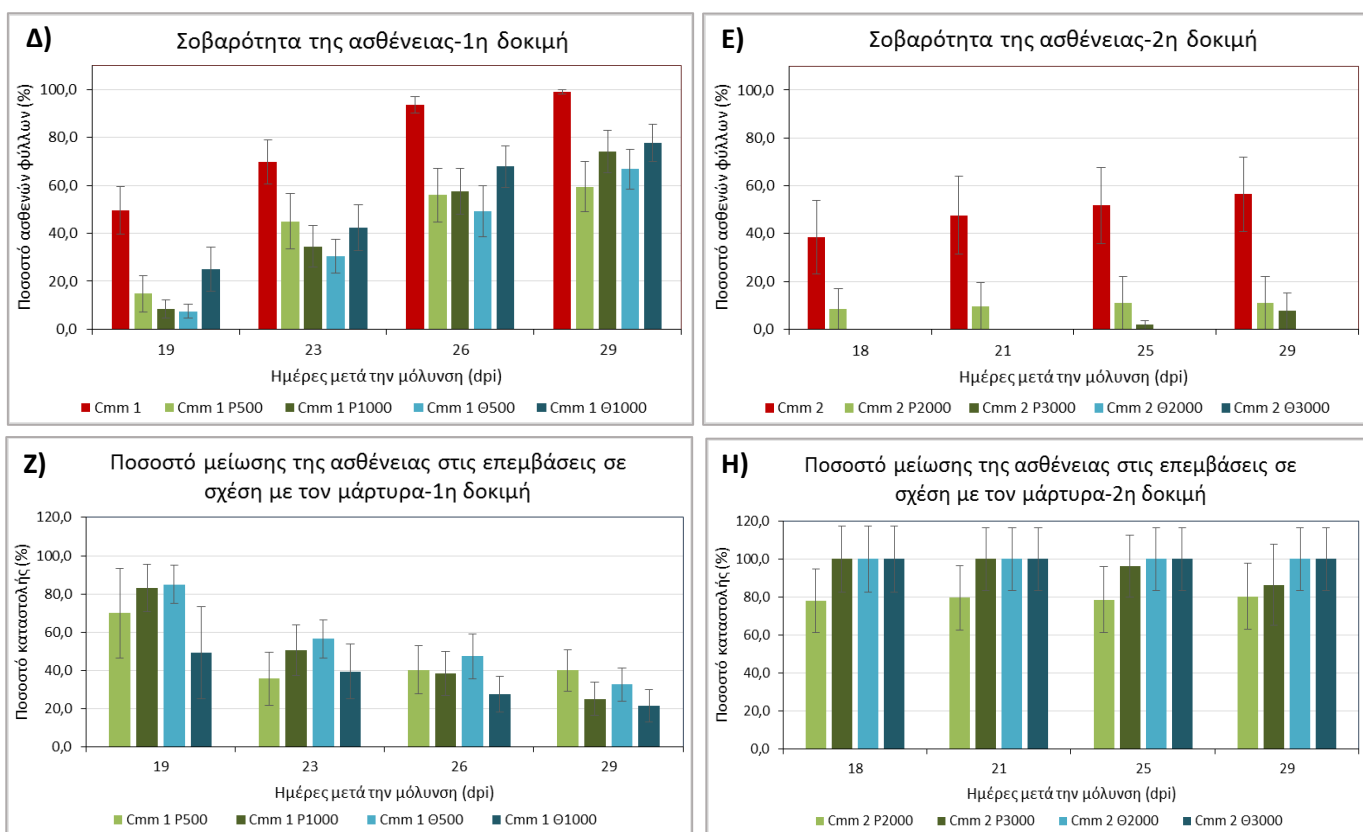


Διαγράμματα 3.3.3 Α-Β-Γ: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Ρίγανη) και *Coridothymus capitatus* για την πρώτη δοκιμή, *Thymus vulgaris* για την δεύτερη δοκιμή (Θυμάρι) στην ανάπτυξη της ασθένειας του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* που εκφράζεται από το εμβαδόν της ασθένειας (AUDPC) (Α), το σχετικό εμβαδόν της ασθένειας (Relative AUDPC) (Β) και την μείωση του σχετικού εμβαδού της ασθένειας (%) (Γ) ανά

τις εφαρμογές των αιθερίων ελαίων στα φυτά σε συγκεντρώσεις 500ppm και 1000ppm για την πρώτη δοκιμή, 2000ppm και 3000ppm για την δεύτερη δοκιμή σε σχέση με τον μάρτυρα, όπου:

<i>Cmm 1/2</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Μάρτυρας)
<i>Cmm 1 P500:</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
<i>Cmm 1 P1000:</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
<i>Cmm 1 Θ500:</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
<i>Cmm 1 Θ1000:</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm
<i>Cmm 2 P2000:</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 2000ppm
<i>Cmm 2 P3000:</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 3000ppm
<i>Cmm 2 Θ2000:</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 2000ppm
<i>Cmm 2 Θ3000:</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 3000ppm

Επίσης οι δύο δοκιμές μπορούν να συγκριθούν και με βάση την σοβαρότητα της ασθένειας (Διαγράμματα 3.3.3 Δ-Ε) και το ποσοστό μείωσης της ασθένειας (Διαγράμματα 3.3.3 Ζ-Η) των εφαρμογών σε σχέση με τον μάρτυρα. Στα Διαγράμματα 3.3.3 Δ-Ε στην πρώτη δοκιμή παρότι παρατηρούνται αυξημένα ποσοστά ασθενών φύλλων στον μάρτυρα σε σχέση με τις επεμβάσεις όλες τις ημέρες μετά την μόλυνση, διακρίνεται ότι σταδιακά αναπτύσσονται και τα ποσοστά στις εφαρμογές των ελαίων καταλήγοντας σε μια μικρή αύξηση στις συγκεντρώσεις των 1000ppm και στα δύο έλαια σε σχέση με των 500ppm αντίστοιχα. Αντιθέτως, στην δεύτερη δοκιμή ενώ τα συμπτώματα του μάρτυρα αναπτύσσονται κανονικά, μόνο στην εφαρμογή του ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* στα 500ppm υπάρχει μια μικρή αύξηση και στα 1000ppm ξεκινά από τις 25 ημέρες μετά την μόλυνση. Στα Διαγράμματα 3.3.3 Ζ-Η παρατηρείται μια σταδιακή μείωση στα ποσοστά καταστολής της ασθένειας. Στις 19 ημέρες μετά την μόλυνση η μείωση φαίνεται σημαντική και τα ποσοστά είναι υψηλά με τα υψηλότερα να φτάνουν τα 84,9% στο έλαιο του φυτού *Coridothymus capitatus* στα 500ppm και τα 83,1% στο έλαιο του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* στα 1000ppm. Ενώ στις 29 ημέρες μετά την μόλυνση τα μικρότερα ποσοστά είναι και των δύο ελαίων στη συγκέντρωση των 1000ppm. Αντίθετα στη δεύτερη δοκιμή υπήρξε αποτελεσματική καταστολή της ασθένειας στο έλαιο του φυτού *Thymus vulgaris* και στις δύο συγκεντρώσεις με το ποσοστό να φτάνει το 100%. Για το έλαιο του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* στα 2000ppm η καταστολή φτάνει τα 80,3% στις 29 ημέρες μετά την μόλυνση, ενώ στα 3000ppm είναι 100% στις 18 και 21 ημέρες μετά την μόλυνση, 96,4% και 86,4% στις 25 και 29 ημέρες μετά την μόλυνση.

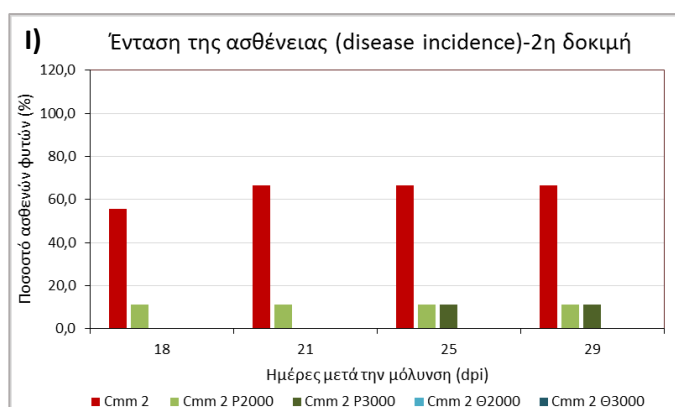
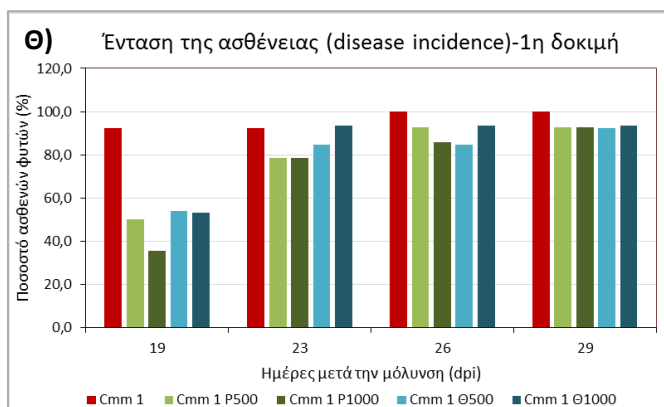


Διαγράμματα 3.3.3 Δ-Ε-Ζ-Η: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Ρίγανη) και *Coridothymus capitatus* για την πρώτη δοκιμή, *Thymus vulgaris* για την δεύτερη δοκιμή (Θυμαρί) στην ανάπτυξη της ασθένειας του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* που εκφράζεται από την σοβαρότητα της ασθένειας (Δ, Ε) και την αποτελεσματικότητα καταστολής της ασθένειας (Ζ, Η) ανά τις ημέρες μετά την μόλυνση (days post inoculation, dpi) όπου καταγράφηκαν τα συμπτώματα από την προσβολή του παθογόνου μύκητα και τις εφαρμογές των αιθερίων ελαίων στα φυτά σε συγκεντρώσεις 500ppm και 1000ppm για την πρώτη δοκιμή, 2000ppm και 3000ppm για την δεύτερη δοκιμή σε σχέση με τον μάρτυρα, όπου:

- Cmm 1/2: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Μάρτυρας)
 Cmm 1 P500: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
 Cmm 1 P1000: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
 Cmm 1 Θ500: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
 Cmm 1 Θ1000: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm
 Cmm 2 P2000: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 2000ppm
 Cmm 2 P3000: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 3000ppm
 Cmm 2 Θ2000: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 2000ppm
 Cmm 2 Θ3000: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 3000ppm

Από τις μετρήσεις που έγιναν στα φυτά μπορεί να διαπιστωθεί και η ένταση της ασθένειας (disease incidence), δηλαδή το ποσοστό των φυτών που μολύνθηκαν ανά τις ημέρες μετά την μόλυνση και ανά τις εφαρμογές και να συγκριθούν έτσι οι δύο δοκιμές. Όπως φαίνεται στα Διαγράμματα 3.3.3 Θ-Ι της έντασης της ασθένειας για τις δύο δοκιμές, στην πρώτη δοκιμή ο μάρτυρας έχει τα υψηλότερα ποσοστά 92,3% στις 19 και 23 ημέρες μετά την μόλυνση και 100% στις 26 και 29 ημέρες μετά την μόλυνση. Στις εφαρμογές υπάρχει σταδιακή αύξηση στα ποσοστά ασθενών φυτών. Στις 19

ημέρες μετά την μόλυνση το μικρότερο ποσοστό ασθενών φυτών παρουσίασε η εφαρμογή του ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* στα 1000ppm στα 35,7%. Την τελευταία ημέρα μέτρησης στις 29 ημέρες μετά την μόλυνση η ένταση της ασθένειας στις εφαρμογές έφτασε έως και τα 93,3% στη εφαρμογή του ελαίου του φυτού *Coridothymus capitatus* στα 1000ppm και οι άλλες εφαρμογές έχουν πολύ κοντινά ποσοστά. Στην δεύτερη δοκιμή η ένταση της ασθένειας στα φυτά του μάρτυρα είναι αυξημένη και φτάνει έως και τα 66,7%, ενώ από τις εφαρμογές μόνο εκείνες του ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* στα 2000ppm και στα 3000ppm παρουσιάζουν ποσοστό έως και 11,1% αφού μόνο ένα φυτό στα 9 παρουσίασε συμπτώματα στην κάθε εφαρμογή. Στις εφαρμογές του ελαίου του φυτού *Thymus vulgaris* κανένα φυτό δεν παρουσίασε συμπτώματα.



Διαγράμματα 3.3.3 Θ-Ι: Επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Ρίγανη) και *Coridothymus capitatus* για την πρώτη δοκιμή, *Thymus vulgaris* για την δεύτερη δοκιμή (Θυμαρί) στην ανάπτυξη της ασθένειας του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* που εκφράζεται από την ένταση της ασθένειας (disease incidence) (Θ, Ι) ανά τις ημέρες μετά την μόλυνση (days post inoculation, dpi) όπου καταγράφηκαν τα συμπτώματα από την προσβολή του παθογόνου βακτηρίου και τις εφαρμογές των αιθερίων ελαίων στα φυτά σε συγκεντρώσεις 500ppm και 1000ppm για την πρώτη δοκιμή, 2000ppm και 3000ppm για την δεύτερη δοκιμή σε σχέση με τον μάρτυρα στις δύο δοκιμές, όπου:

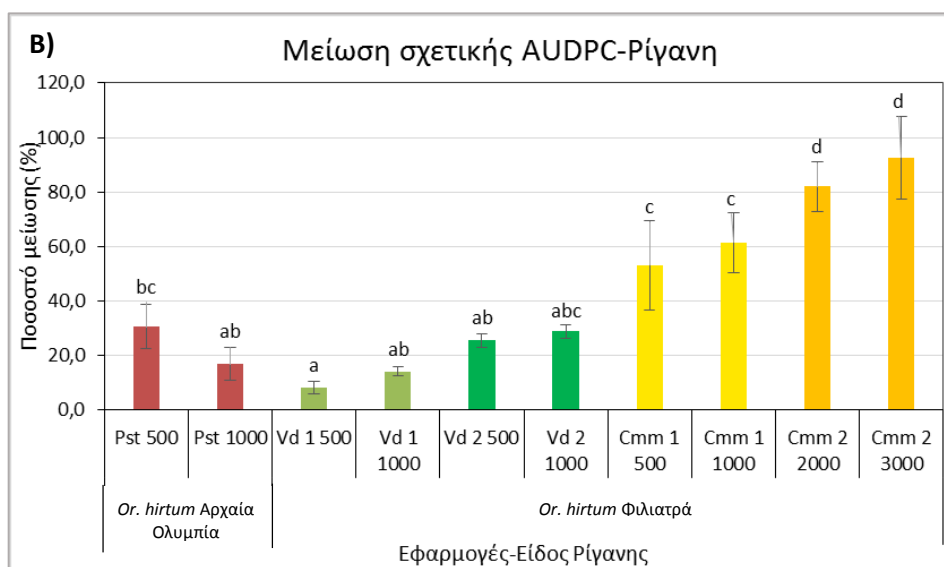
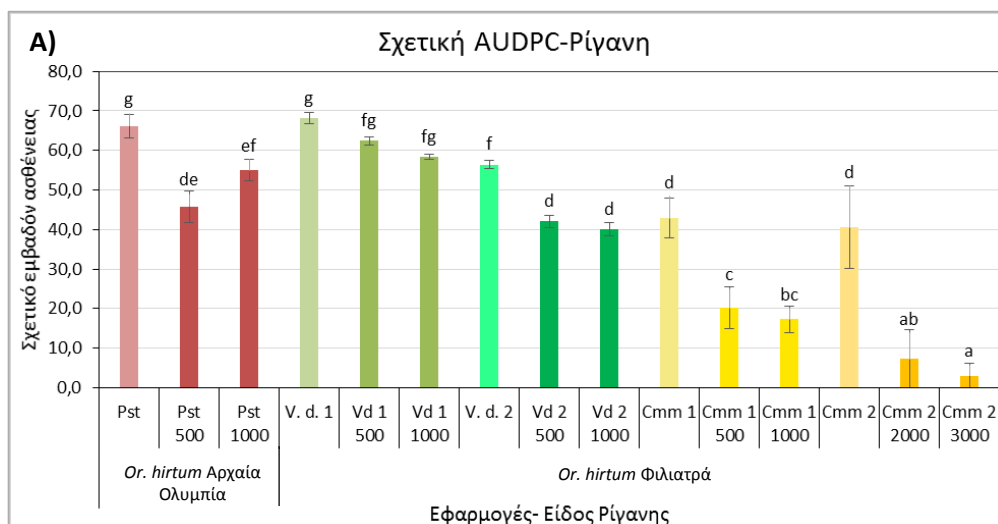
<i>Cmm 1/2</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Μάρτυρας)
<i>Cmm 1 P500</i> :	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 500ppm
<i>Cmm 1 P1000</i> :	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1000ppm
<i>Cmm 1 Θ500</i> :	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 500ppm
<i>Cmm 1 Θ1000</i> :	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 1000ppm
<i>Cmm 2 P2000</i> :	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 2000ppm
<i>Cmm 2 P3000</i> :	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 3000ppm
<i>Cmm 2 Θ2000</i> :	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 2000ppm
<i>Cmm 2 Θ3000</i> :	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> + έλαιο θυμαριού σε συγκέντρωση 3000ppm

3.4 Συγκεντρωτική εικόνα της επίδρασης των αιθερίων ελαίων της ρίγανης και του θυμαριού στην ανάπτυξη των ασθενειών.

Για να αξιολογηθεί η επίδραση των αιθερίων ελαίων στην ανάπτυξη των φυτοπαθογόνων μυκήτων και βακτηρίων σε φυτάρια θερμοκηπίου εφαρμόστηκαν τα αιθέρια έλαια που παρουσίασαν στα *in vitro* πειράματα μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών. Έτσι για τους φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Verticillium dahliae* και *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* τα πιο αποτελεσματικά αιθέρια έλαια από τα *in vitro* πειράματα αποδείχθηκαν τα έλαια της ρίγανης και του θυμαριού. Όμως στις δοκιμές που έγιναν εφαρμόστηκαν διαφορετικά είδη θυμαριού και διαφορετικής προέλευσης έλαια ρίγανης.

Μια συγκεντρωτική εικόνα του σχετικού εμβαδού ασθένειας για τους μικροοργανισμούς και τις συγκεντρώσεις που εφαρμόστηκε το αιθέριο έλαιο της ρίγανης παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 3.4 Α. Αρχικά διακρίνεται ότι οι τιμές των εφαρμογών διαφέρουν στατιστικά από τους αντίστοιχους μάρτυρες εκτός της πρώτης δοκιμής στον μύκητα *Verticillium dahliae* που παρατηρείται οι τιμές να είναι κοντά με τον μάρτυρα και να σχετίζονται στατιστικά. Γενικά παρατηρείται μια μείωση στις τιμές των εφαρμογών από την μικρότερη συγκέντρωση του ελαίου στη μεγαλύτερη που σημαίνει ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του ελαίου επιδρά θετικά στην μείωση των ασθενειών, εκτός από τις εφαρμογές στο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* με την εφαρμογή στα 500ppm να είναι μικρότερη από εκείνη στα 1000ppm. Να σημειωθεί εδώ ότι για τα δύο παθογόνα το *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* και το *Verticillium dahliae* που εφαρμόστηκε το έλαιο στις 3 ημέρες πριν την μόλυνση και στις ίδιες συγκεντρώσεις αλλά το έλαιο είναι από διαφορετική περιοχή καλλιέργειας φαίνεται ότι οι τιμές δεν σχετίζονται στατιστικά και είναι αυξημένες στον μύκητα, άρα είχε καλύτερη δράση το έλαιο που εφαρμόστηκε για την αντιμετώπιση του βακτηρίου. Επίσης και η εφαρμογή δεύτερης δόσης δείχνει να επιδρά θετικά στην μείωση των ασθενειών όπως φαίνεται στις δύο δοκιμές που έγιναν στον μύκητα *Verticillium dahliae* και το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* που εκεί αυξήθηκε και η συγκέντρωση του ελαίου. Στο Διάγραμμα 3.4 Β φαίνονται οι αντίστοιχες μειώσεις του σχετικού εμβαδού των ασθενειών σε σχέση με τους μάρτυρες για το αιθέριο έλαιο της ρίγανης. Μπορούν να διακριθούν τα αυξανόμενα ποσοστά

μείωσης με εξαίρεση την δοκιμή με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* όπου το ποσοστό μείωσης είναι αυξημένο στα 500ppm στα υπόλοιπα υπάρχει μια διαβαθμισμένη αύξηση όσο αυξάνονται οι συγκεντρώσεις και οι δόσεις του ελαίου. Να σημειωθεί εδώ ότι τα ποσοστά μείωσης στο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* και στον μύκητα *Verticillium dahliae* συσχετίζονται στατιστικά. Επίσης η αλλαγή της εφαρμογής του ελαίου από τις 3 ημέρες πριν στην 1 ημέρα πριν και η αύξηση των δόσεων βελτίωσε την αποτελεσματικότητα του ελαίου όπως φαίνεται να αυξάνονται τα ποσοστά μείωσης στις δοκιμές για τον μύκητα *Verticillium dahliae* και ακόμα καλύτερα στις δοκιμές για το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* που εκεί όπως προειπώθηκε αυξήθηκε και η συγκέντρωση του ελαίου και το ποσοστό μείωσης έφτασε τα 92,6% στα 3000ppm.

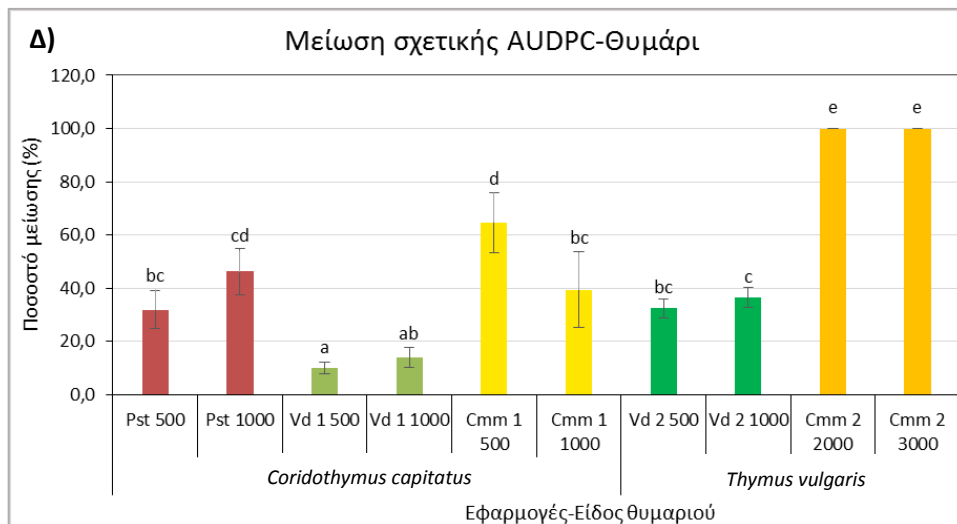
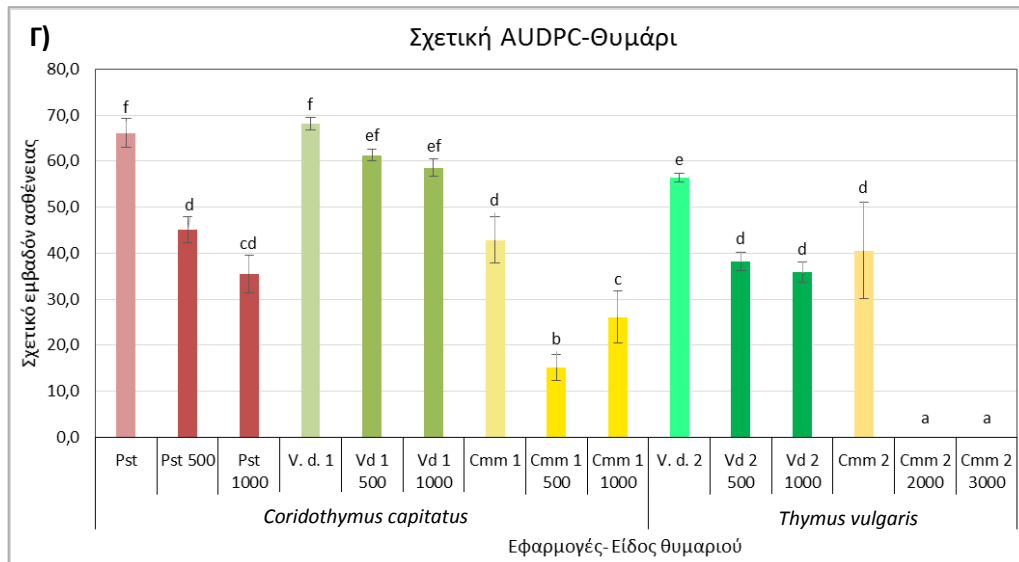


Διαγράμματα 3.4 A-B: Επίδραση του αιθερίου ελαίου της ρίγανης του είδους *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* με προέλευση καλλιέργειας από την Αρχαία Ολυμπία και τα Φιλιάτρα στην ανάπτυξη των

ασθενειών του φυτοπαθογόνου μύκητα και βακτηρίων που δοκιμάστηκαν (*Verticillium dahliae*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) και εκφράζεται από το σχετικό εμβαδόν της ασθένειας (Relative AUDPC) (A) σε σχέση με τους μάρτυρες και την μείωση του σχετικού εμβαδού της ασθένειας (%) (B) ανά τους μικροοργανισμούς με τους οποίους μολύνθηκαν τα φυτά και τις συγκεντρώσεις με τις οποίες εφαρμόστηκε το έλαιο στα 500ppm, 1000ppm, 2000ppm και 3000ppm, όπου:

<i>Pst</i> :	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (Μάρτυρας)
<i>Vd</i> 1/2:	<i>Verticillium dahliae</i> (Μάρτυρας) + 1η/2η δοκιμή
<i>Cmm</i> 1/2:	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Μάρτυρας) + 1η/2η δοκιμή
500/1000/2000/3000:	Οι συγκεντρώσεις του αιθερίου ελαίου που εφαρμόστηκαν (ppm)

Αντίστοιχα στο θυμάρι χρησιμοποιήθηκαν τα είδη *Coridothymus capitatus* στην δοκιμή για το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* και τις πρώτες δοκιμές των *Verticillium dahliae* και *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* και *Thymus vulgaris* στις δεύτερες δοκιμές των *Verticillium dahliae* και *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Στο Διάγραμμα 3.4 Γ παρατηρείται μείωση του σχετικού εμβαδού από τα 500ppm στα 1000ppm στη δοκιμή του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* και στις δοκιμές του *Verticillium dahliae* εκτός από τις δοκιμές για το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* που εξαιρώντας ότι είναι οι μικρότερες τιμές, στην μεν πρώτη το σχετικό εμβαδόν είναι μειωμένο στα 500ppm και στην δεύτερη είναι μηδενικό και στις δύο συγκεντρώσεις. Και σε αυτό το Διάγραμμα οι μάρτυρες δεν σχετίζονται στατιστικά με τις αντίστοιχες εφαρμογές εκτός της πρώτης δοκιμής του *Verticillium dahliae* που και οι δύο εφαρμογές σχετίζονται στατιστικά με τον μάρτυρα και έχουν τις υψηλότερες τιμές. Επίσης διακρίνεται μια διαβαθμισμένη μείωση στις δύο δοκιμές του μύκητα *Verticillium dahliae* και στη δεύτερη δοκιμή του είναι στατιστικά κοντά με τις τιμές του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Στο Διάγραμμα 3.4 Δ με τα ποσοστά μείωσης της σχετικής AUDPC διακρίνονται τα αυξημένα ποσοστά στο βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* που στην πρώτη δοκιμή στα 500ppm φτάνει τα 64,6% και στην δεύτερη δοκιμή τα 100% και για τις δύο συγκεντρώσεις. Επίσης διακρίνεται η διαβάθμιση της αύξησης στα ποσοστά μείωσης στις συγκεντρώσεις που εφαρμόστηκαν στο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* από τα 500ppm στα 1000ppm με το ποσοστό να φτάνει τα 46,3% στα 1000ppm. Τέλος παρατηρείται η διαβαθμισμένη αύξηση στα ποσοστά μείωσης στις δύο δοκιμές του μύκητα *Verticillium dahliae* φτάνοντας το ποσοστό των 36,5% στα 1000ppm στη δεύτερη δοκιμή.



Διαγράμματα 3.4 Γ-Δ: Επίδραση του αιθερίου ελαίου του θυμαριού των ειδών *Coridothymus capitatus* και *Thymus vulgaris* στην ανάπτυξη των ασθνεϊών του φυτοπαθογόνου μύκητα και βακτηρίων που δοκιμάστηκαν (*Verticillium dahliae*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) και εκφράζεται από το σχετικό εμβαδόν της ασθνεϊας (Relative AUDPC) (Γ) σε σχέση με τους μάρτυρες και την μείωση του σχετικού εμβαδού της ασθνεϊας (%) (Δ) ανά τους μικροοργανισμούς με τους οποίους μολύνθηκαν τα φυτά και τις συγκεντρώσεις με τις οποίες εφαρμόστηκε το έλαιο στα 500ppm, 1000ppm, 2000ppm και 3000ppm, όπου:

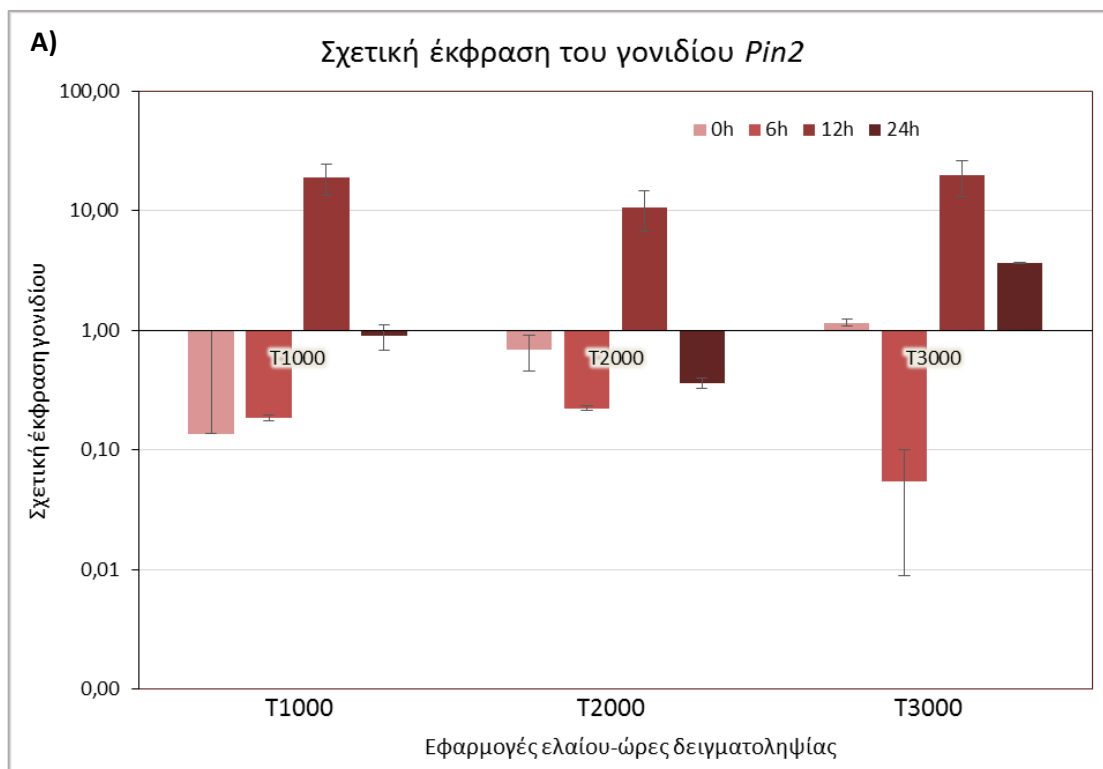
Pst: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Μάρτυρας)
Vd 1/2: *Verticillium dahliae* (Μάρτυρας)+1η/2η δοκιμή
Cmm 1/2: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Μάρτυρας) +1η/2η δοκιμή
 500/1000/2000/3000: Οι συγκεντρώσεις του αιθερίου ελαίου που εφαρμόστηκαν (ppm)

3.5 Αξιολόγηση της επίδρασης της εφαρμογής με ριζοπότισμα του αιθερίου ελαίου του φυτού *Thymus vulgaris* στην άμυνα των φυταρίων τομάτας εναντίον μυκήτων και βακτηρίων στο θερμοκήπιο (*in vivo*).

Εφόσον από τα προηγούμενα αποτελέσματα η αύξηση της συγκέντρωσης του ελαίου του φυτού *Thymus vulgaris* έδειξε αποτελεσματική και καθολική αντιμετώπιση της ανάπτυξης του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, κρίθηκε αναγκαίο να διερευνηθεί εάν τα αιθέρια έλαια επάγουν την άμυνα του φυτού ώστε να αντιμετωπιστεί η εισβολή παθογόνων μικροοργανισμών στο φυτό. Έτσι πραγματοποιήθηκε εφαρμογή του ελαίου στις συγκεντρώσεις των 1000ppm, 2000ppm και 3000ppm και του νερού με DMSO 0,5% και Tween 20 0,5% (μάρτυρας) σε φυτάρια τομάτας και λήφθηκαν δείγματα στις 0, 6, 12 και 24 ώρες. Ακολούθησε εξαγωγή του ολικού RNA, δημιουργία του cDNA και εφαρμογή της Real Time PCR για την μελέτη της έκφρασης γονιδίων που επάγουν την άμυνα του φυτού. Χρησιμοποιήθηκαν τα γονίδια *PR-1a* και *Pin2* όπου ενεργοποιείται η έκφρασή τους μέσω ρυθμιστών στα μονοπάτια του σαλικυλικού οξέος (Maleck & Lawton, 1998) και του ιασμονικού (Boter *et al.*, 2004) ως αποκρίσεις στην φυτική άμυνα. Επίσης χρησιμοποιήθηκε και το γονίδιο αναφοράς της Ακτίνης για την κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στόχων σε σχέση με την έκφραση του γονιδίου αναφοράς και εκφράστηκαν συγκρινόμενα με την κανονικοποιημένη έκφραση των ίδιων γονιδίων του μάρτυρα (φυτά με νερό, DMSO 0,5% και Tween 20 0,5%).

Στο Διάγραμμα 3.5 Α αποτυπώνεται η σχετική έκφραση του γονιδίου *Pin2* στα φυτά με τις εφαρμογές του αιθερίου ελαίου σε σχέση με τα φυτά του μάρτυρα. Στα φυτά με την εφαρμογή των 1000ppm παρουσιάστηκε μειωμένη έκφραση του γονιδίου σε σχέση με τα φυτά του μάρτυρα στις 0 ώρες λίγο πιο πολύ και στις 6 ώρες. Στις 12 ώρες παρουσιάστηκε αυξημένη έκφραση του γονιδίου έως και πάνω από 10 φορές και στις 24 ώρες ελάχιστη υποέκφραση του γονιδίου σε σχέση με τα φυτά του μάρτυρα. Στα φυτά με την εφαρμογή των 2000ppm στις 0 ώρες παρουσιάστηκε μικρή υποέκφραση του γονιδίου και στις 6 ώρες μεγαλύτερη υποέκφραση. Αντιθέτως στις 12 ώρες η έκφραση του γονιδίου ήταν αυξημένη σε σχέση με τα φυτά του μάρτυρα έως και 10 φορές, άλλα στις 24 ώρες υποεκφράστηκε πάλι. Στα φυτά με την εφαρμογή των 3000ppm στις 0 ώρες παρουσιάστηκε μια ελάχιστη υπερέκφραση, ενώ στις 6 ώρες το γονίδιο *Pin2* υποεκφράστηκε πάνω από 10 φορές σε σχέση με τα φυτά του μάρτυρα.

Αντίθετα στις 12 ώρες παρουσιάστηκε έως και πάνω από 10 φορές υπερέκφραση του γονιδίου και στις 24 ώρες η υπερέκφραση ήταν μειωμένη.

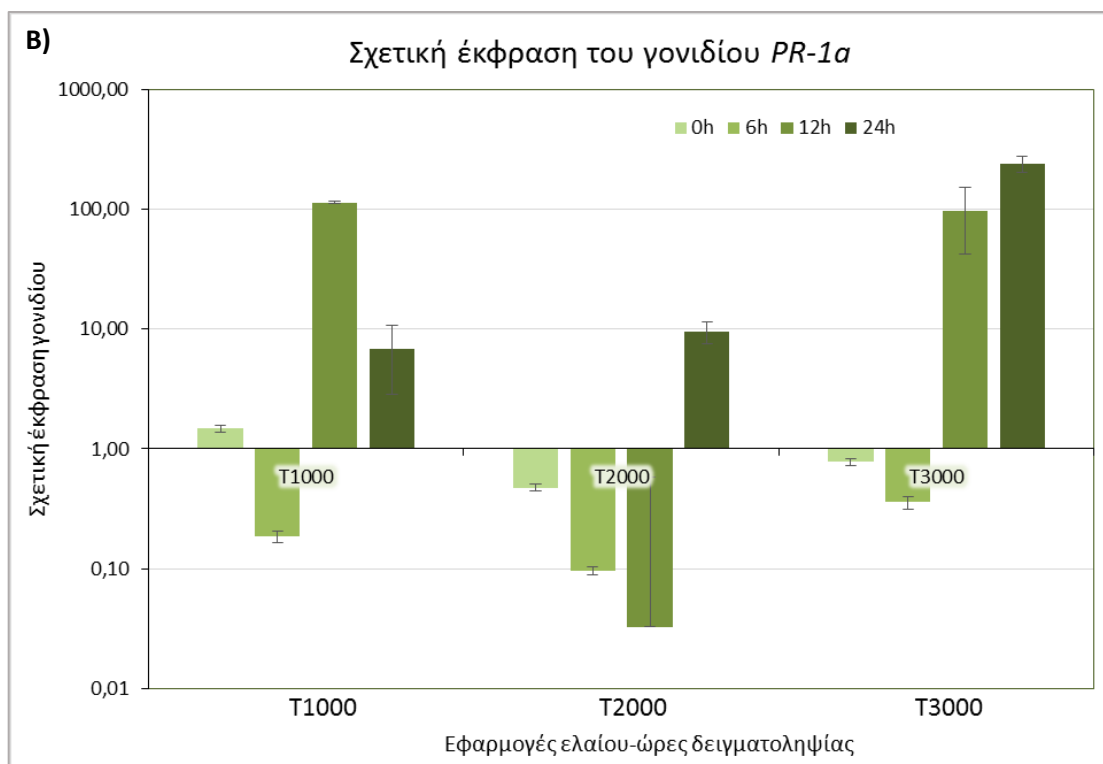


Διάγραμμα 3.5 A: Σχετική έκφραση του γονιδίου *Pin2* στην κορυφή των φυταρίων τομάτας, που εφαρμόστηκε με ριζοπότισμα το αιθέριο έλαιο του φυτού *Thymus vulgaris* στις συγκεντρώσεις 1000ppm, 2000ppm, 3000ppm σε σχέση με τον μάρτυρα, δηλαδή τα φυτά που εφαρμόστηκε το νερό με DMSO 0,5% και Tween 20 0,5% στις 0, 6, 12 και 24 ώρες μετά την εφαρμογή τους. Κάθε στήλη αποτυπώνει την κανονικοποιημένη αναλογία έκφρασης του γονιδίου *Pin2* ανά τις εφαρμογές και τις ώρες δειγματοληψίας με το αντίστοιχο τυπικό σφάλμα για δύο τεχνικές επαναλήψεις, όπου:

T1000, T2000, T3000: Οι συγκεντρώσεις που εφαρμόστηκε το έλαιο του *Thymus vulgaris* στα φυτά τομάτας
 0h, 6h, 12h, 24h: Οι ώρες δειγματοληψίας

Για το γονίδιο *PR-1a* η σχετική έκφραση παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 3.5 B. Στα φυτά με την εφαρμογή των 1000ppm στις 0 ώρες το γονίδιο παρουσίασε μια μικρή υπερέκφραση ενώ στις 6 ώρες υποεκφράστηκε σε σχέση με τα φυτά του μάρτυρα. Στις 12 ώρες παρουσιάστηκε 100 φορές αυξημένη έκφραση του γονιδίου σε σχέση με τον μάρτυρα ενώ στις 24 η αύξηση ήταν λίγο κάτω από τις 10 φορές. Στην εφαρμογή των 2000ppm στις 0, 6 και 12 ώρες το γονίδιο υποεκφράστηκε, στις 0 ώρες ήταν μικρή η μείωση της έκφρασης, στις 6 ώρες η μείωση έφτασε τις 10 φορές και στις 12 ώρες η υποέκφραση ήταν πάνω από 10 φορές σε σχέση με τα φυτά του μάρτυρα. Στις 24 ώρες η έκφραση του γονιδίου ήταν αυξημένη 10 φορές σε σχέση με τον μάρτυρα. Τέλος στα φυτά με την εφαρμογή των 3000ppm στις 0 ώρες παρουσιάζεται μικρή μείωση της

έκφρασης του γονιδίου και στις 6 ώρες λίγο μεγαλύτερη μείωση. Αντιθέτως στις 12 ώρες το γονίδιο παρουσίασε αυξημένη έκφραση κατά 100 φορές και στις 24 ώρες πάνω από 100 φορές σε σχέση με τα φυτά του μάρτυρα.



Διάγραμμα 3.5 B: Σχετική έκφραση του γονιδίου *PR-1a* στην κορυφή των φυταρίων τομάτας που εφαρμόστηκε με ριζοπότισμα το αιθέριο έλαιο του φυτού *Thymus vulgaris* στις συγκεντρώσεις 1000ppm, 2000ppm, 3000ppm σε σχέση με τον μάρτυρα, δηλαδή τα φυτά που εφαρμόστηκε το νερό με DMSO 0,5% και Tween 20 0,5% στις 0, 6, 12 και 24 ώρες μετά την εφαρμογή τους. Κάθε στήλη αποτυπώνει την κανονικοποιημένη αναλογία έκφρασης του γονιδίου *PR-1a* ανά τις εφαρμογές και τις ώρες δειγματοληψίας με το αντίστοιχο τυπικό σφάλμα για δύο τεχνικές επαναλήψεις, όπου:

T1000, T2000, T3000: Οι συγκεντρώσεις που εφαρμόστηκε το έλαιο του *Thymus vulgaris* στα φυτά τομάτας
 0h, 6h, 12h, 24h: Οι ώρες δειγματοληψίας

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η χρήση συνθετικών φυτοφαρμάκων σε προγράμματα προστασίας από τις ασθένειες των φυτών σε όλο τον κόσμο οδήγησε στη διαταραχή του περιβάλλοντος, την επανεμφάνιση των επιβλαβών οργανισμών, την ανθεκτικότητα στα φυτοφάρμακα και την θανατηφόρο επίδραση σε μη στοχευμένους οργανισμούς στα αγροοικοσυστήματα, πέραν της άμεσης τοξικότητας στους χρήστες (Prakash *et al.*, 2008, Asogwa *et al.*, 2010, Bajrai *et al.*, 2010). Είναι επίσης γνωστό ότι πολλά φυτικά παθογόνα βακτήρια και μύκητες έχουν αποκτήσει αντοχή στα συνθετικά φυτοφάρμακα (White *et al.*, 2002, Hahn, 2014). Συνεπώς, λαμβάνοντας υπόψη τις επιβλαβείς επιδράσεις των συνθετικών φυτοφαρμάκων στα οικοσυστήματα, υπάρχει επείγουσα ανάγκη να αναζητηθούν εναλλακτικές προσεγγίσεις για τη διαχείριση φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών. Μία από τις εναλλακτικές μεθόδους ελέγχου των ασθενειών είναι η χρήση αποτελεσματικών φυτικών ελαίων και εκχυλισμάτων στη συμβατική και βιολογική γεωργία. (Kotan *et al.*, 2014)

Πολλά φυτικά αιθέρια έλαια, τα εκχυλίσματα και οι καθαρές ενώσεις τους θεωρούνται ότι παίζουν ρόλο στους αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή έναντι φυτοπαθογόνων. Αναφέρεται ότι οι βιολογικά δραστικές ενώσεις που υπάρχουν σε φυτικά προϊόντα δρουν ως διεγέρτες και προκαλούν αντοχή στα φυτά ξενιστές με αποτέλεσμα τη μείωση της ανάπτυξης της ασθένειας (Mihaliak *et al.*, 1991, Vidhyasekaran, 1992, Pradhanang *et al.*, 2003, Nguetack *et al.*, 2005, Cavalcanti *et al.*, 2006, Vasinauskiene *et al.*, 2006, Lo Cantore *et al.*, 2009, Karami-Osboo *et al.*, 2010).

Για την διερεύνηση των δυνατοτήτων των αιθερίων ελαίων ενάντια σε φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς τόσο εργαστηριακά (*in vitro*) όσο και στο φυτό (*in vivo*) πραγματοποιήθηκε αυτή η μελέτη. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα αιθέρια έλαια των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Coridothymus capitatus*, *Origanum majorana* και *Satureja thymbra* για να διερευνηθεί η παρεμπόδιση του μύκητα *Verticillium dahliae* και των βακτηρίων *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* στην ανάπτυξή τους εργαστηριακά (*in vitro*). Επίσης αξιολογήθηκε *in vivo* η επίδραση των δύο αιθερίων ελαίων *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Coridothymus capitatus/Thymus vulgaris* στην αντιμετώπιση των ασθενειών της βακτηριακής στιγμάτωσης της τομάτας, της αδρομύκωσης-βερτισιλλίωσης της μελιτζάνας και του βακτηριακού έλκους της τομάτας, που προκαλούνται από το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, τον μύκητα

Verticillium dahliae και το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* αντίστοιχα και η εξέλιξη της ανάπτυξης των φυτών. Ακολούθησε η ταυτοποίηση της παρουσίας του μύκητα και των βακτηρίων στα φυτά καθώς και η μοριακή ταυτοποίηση του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* με την μέθοδο PCR. Τέλος έγινε διερεύνηση της επαγωγής της άμυνας των φυτών από την εφαρμογή του αιθερίου ελαίου του φυτού *Thymus vulgaris* στις συγκεντρώσεις 1000ppm, 2000ppm και 3000ppm σε φυτάρια τομάτας με την μέθοδο Real Time PCR.

Από τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού για την επίδραση των αιθερίων ελαίων στον μύκητα και στα βακτήρια *in vitro* γίνεται σαφές ότι τα αιθέρια έλαια των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* και *Coridothymus capitatus* έδειξαν καλύτερη αποτελεσματικότητα και σε μικρότερες συγκεντρώσεις. Πιο αναλυτικά η ανάπτυξη του μύκητα *Verticillium dahliae* παρεμποδίστηκε πλήρως από το έλαιο του φυτού *Coridothymus capitatus* στα 150ppm και από τα άλλα τρία έλαια στα 200ppm, επιπρόσθετα παρουσίασε ευαισθησία στο έλαιο του θυμαριού και ακολούθως στο έλαιο της ρίγανης με τα έλαια να παρουσιάζουν τις μικρότερες συγκεντρώσεις EC50. Η ανάπτυξη του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* παρεμποδίστηκε πλήρως από όλα τα αιθέρια έλαια με την μικρότερη συγκέντρωση να παρουσιάζεται από τα έλαια της ρίγανης και του θυμαριού στα 200ppm και παρουσίασε ευαισθησία σε αυτά τα δύο έλαια. Η ανάπτυξη του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* παρεμποδίστηκε πλήρως από όλα τα αιθέρια έλαια με τις μικρότερες συγκεντρώσεις να παρουσιάζουν το έλαιο της ρίγανης στα 500ppm και του θυμαριού στα 1000ppm, ενώ παρουσίασε ευαισθησία στο έλαιο του θυμαριού και ακολούθως της ρίγανης και της μαντζουράνας.

Εκτός από τα αποτελέσματα που προηγήθηκαν σε αυτή την μελέτη, έχουν γίνει και άλλες προσπάθειες για την διερεύνηση της αποτελεσματικότητας των αιθερίων ελαίων. Μια από αυτές είναι και των Kadoglidou *et al.*, 2011 όπου διερευνήθηκε η επίδραση των αιθερίων ελαίων στην ανάπτυξη και σποριοποίηση φυτοπαθογόνων μυκήτων και μέσα σε αυτά και του αιθερίου ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* στον μύκητα *Verticillium dahliae*. Στην μελέτη αυτή ο μύκητας δεν αναπτύχθηκε στην εφαρμογή των 5μl και των 10μl ελαίου ανά τρυβλίο ενώ στην παρούσα μελέτη η ανάπτυξη του μύκητα παρεμποδίστηκε πλήρως στα 20μl ανά τρυβλίο για το ίδιο έλαιο που αντιστοιχεί στα 200ppm. Σε μια άλλη μελέτη των Arslan & Dervis, 2010 όπου εφαρμόστηκαν αιθέρια έλαια για την διερεύνηση της παρεμπόδισης της ανάπτυξης του μύκητα *Verticillium dahliae*, μέσα σε αυτά και τα αιθέρια έλαια των φυτών *Origanum*

vulgare, *Thymus vulgaris* και *Origanum marjorana*, όπου η εφαρμογή του ελαίου του φυτού *Origanum vulgare* παρεμπόδισε πλήρως την ανάπτυξη του μύκητα ακόμα και στην χαμηλότερη συγκέντρωση των 2μl, ενώ η εφαρμογή του ελαίου του φυτού *Thymus vulgaris* παρεμπόδισε πλήρως την ανάπτυξη του μύκητα από τα 4μl και πάνω και του ελαίου του φυτού *Origanum marjorana* παρεμπόδισε πλήρως την ανάπτυξη του μύκητα στα 64μl και σε πολύ υψηλό ποσοστό στα 32μl. Σε μια μελέτη που δημοσιεύτηκε τελευταία των Vago *et al.*, 2017 παρουσιάζεται η εφαρμογή πολλών αιθερίων ελαίων και εκχυλισμάτων για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας τους έναντι του μύκητα *Verticillium dahliae*. Από αυτά, τα αιθέρια έλαια των φυτών *Satureja* sp. και *Thymus* sp. παρεμπόδισαν πλήρως την ανάπτυξη του μύκητα στην μεγαλύτερη συγκέντρωση των 5000mg/L ενώ το έλαιο του φυτού *Origanum vulgare* δεν παρουσίασε τόσο μεγάλα ποσοστά παρεμπόδισης των στελεχών του μύκητα.

Σε ότι έχει να κάνει με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* σε μια μελέτη των Oliva *et al.*, 2015 δοκιμάστηκε η επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Thymus vulgaris* και *Origanum vulgare* σε διάφορα φυτοπαθογόνα στελέχη του βακτηρίου *Pseudomonas* μέσα σε αυτά και το στέλεχος DC3000, που χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα μελέτη, όπου διαπιστώσανε ότι το αιθέριο έλαιο ρίγανης έδειξε ανασταλτική δραστηριότητα έναντι όλων των δοκιμασμένων στελεχών, συμπεριλαμβανομένων στελεχών αναφοράς, με μεγαλύτερη μεταβλητότητα στις τιμές MIC, η στρεπτομυκίνη δεν ανέστειλε την ανάπτυξη των στελεχών του *Pseudomonas* και το έλαιο του θυμαριού και της ρίγανης δεν ήταν βακτηριοκτόνα για κανένα από τα στελέχη του βακτηρίου *Pseudomonas*. Η τελευταία διαπίστωση είναι αντίθετη με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης όπου η ανάπτυξη του βακτηρίου παρεμποδίστηκε πλήρως από όλα τα αιθέρια έλαια. Ενώ στην μελέτη των Carezzano *et al.*, 2017 αποδείχτηκε ότι το έλαιο ρίγανης ήταν πιο αποτελεσματικό από αυτό του θυμαριού, καθώς χρειάστηκαν μικρότερες συγκεντρώσεις για την επίτευξη βακτηριοκτόνου δράσης κάτι που συμφωνεί με τα δεδομένα της παρούσας μελέτης αφού το αιθέριο έλαιο της ρίγανης παρεμπόδισε πλήρως την ανάπτυξη του βακτηρίου σε μικρότερη συγκέντρωση από αυτό του θυμαριού.

Για το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* η πιο προσεγγιστική μελέτη είναι αυτή των Daferera *et al.*, 2003 όπου δείχνει ότι υπάρχει κοινό συμπέρασμα με την παρούσα μελέτη σε ότι αφορά την αναστολή που προκαλούν τα έλαια της ρίγανης, του θυμαριού και της μαντζουράνας στο βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, αλλά υπάρχει διαφοροποίηση ως προς τις

συγκεντρώσεις που αναστέλλουν την ανάπτυξη και τις συγκεντρώσεις EC50. Συγκεκριμένα τα αιθέρια έλαια της ρίγανης και του θυμαριού ανέστειλαν πλήρως την ικανότητα σχηματισμού αποικιών του βακτηρίου σε συγκεντρώσεις 100 και 85μg/ml, ενώ το έλαιο της μαντζουράνας παρουσίασε μέτρια δραστικότητα με αναστολή της ανάπτυξης κατά 80% που παρατηρήθηκε στα 200μg/ml. Επίσης, οι συγκεντρώσεις EC50 καταγράφονται ως εξής, 67μg/ml για το έλαιο της ρίγανης, 39μg/ml για το έλαιο του θυμαριού και 119μg/ml για το έλαιο της μαντζουράνας κατά του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Οι συγκεντρώσεις που προκαλούν πλήρη παρεμπόδιση στην ανάπτυξη του βακτηρίου είναι μικρότερες στα έλαια της ρίγανης και του θυμαριού της μελέτης των Daferera *et al.*, 2003, ενώ από τα δεδομένα της παρούσας μελέτης το έλαιο της μαντζουράνας παρεμπόδισε κατά 100% την ανάπτυξη του βακτηρίου στα 350ppm. Επίσης οι συγκεντρώσεις EC50 δεν συμπίπτουν, με τις τιμές στην μελέτη των Daferera *et al.*, 2003 να είναι μικρότερες, υπάρχει όμως συμφωνία των δυο μελετών ως προς την ευαισθησία του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* στα έλαια του θυμαριού και της ρίγανης.

Πιο πρόσφατα στη μελέτη των Dadasoglu *et al.*, 2011 όπου μελετήθηκε η αντιβακτηριακή επίδραση των αιθερίων ελαίων των ειδών *Origanum acutidens*, *O. rotundifolium* και *O. vulgare* σε πλήθος βακτηρίων εντός αυτών και τα βακτήρια *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* και *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* φαίνεται η παρεμποδιστική δράση των αιθερίων ελαίων και συγκεκριμένα του ελαίου *Origanum vulgare* στα δύο βακτήρια με την δημιουργία ζώνης παρεμπόδισης στην ανάπτυξη των βακτηρίων από την δράση του ελαίου και ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης στα 125μl/ml και για τα δύο βακτήρια ενώ για το *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* παρατηρήθηκε βακτηριοκτόνος δράση. Κατά τον ίδιο τρόπο και από τους Kotan *et al.*, 2014 ερευνήθηκε η βακτηριοκτόνος δράση του αιθερίου ελαίου του φυτού *Origanum onites* κατά φυτοπαθογόνων βακτηρίων μέσα σε αυτά και τα δύο βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Όπως και στην μελέτη των Kotan *et al.*, 2010 με τις αντιβακτηριακές επιδράσεις των ειδών *Achillea*, *Satureja* και *Thymus* σε πολλά φυτοπαθογόνα βακτήρια και μαζί σε αυτά τα δύο της παρούσας μελέτης.

Αξιολογώντας τα αποτελέσματα της επίδρασης της εφαρμογής *in vivo* των πιο αποτελεσματικών αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* και *Coridothymus capitatus* / *Thymus vulgaris* στην εξέλιξη της ανάπτυξης των φυτών είναι εμφανές ότι στην πρώτη δοκιμή με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* στα διαγράμματα του μέσου ύψους, του μέσου αριθμού φύλλων και του νωπού βάρους των

στελεχών των φυτών τομάτας ο θετικός μάρτυρας έχει τις μικρότερες τιμές από όλες τις εφαρμογές, αλλά και τα μολυσμένα φυτά όλων των επεμβάσεων έχουν μικρότερες τιμές από τους αντίστοιχους μάρτυρες. Ακολούθως στις δοκιμές με τον μύκητα *Verticillium dahliae* ξεκινώντας από την πρώτη δοκιμή εκτός του ότι ο θετικός μάρτυρας είχε τις μικρότερες τιμές από όλες τις εφαρμογές και οι εφαρμογές με τα φυτά που μολύνθηκαν έχουν μικρότερες τιμές από τις αντίστοιχες των φυτών που δεν μολύνθηκαν, δεν υπήρξαν σημαντικές διαφοροποιήσεις στις τιμές ανά τις εφαρμογές. Όπως και στη δεύτερη δοκιμή δεν υπήρξαν σημαντικές διαφοροποιήσεις τονίζοντας σε αυτή την περίπτωση ότι στα διαγράμματα του μέσου ύψους και νωπού βάρους οι τιμές του θετικού μάρτυρα ήταν οι χαμηλότερες σε σχέση με τις υπόλοιπες τιμές. Στις δοκιμές με το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, υπάρχει η διαφοροποίηση των τιμών του θετικού μάρτυρα σε σχέση με τις υπόλοιπες επεμβάσεις αλλά είναι πιο εμφανής στις τιμές του νωπού βάρους στην πρώτη δοκιμή και σε όλα τα διαγράμματα στη δεύτερη δοκιμή. Δεν υπήρξαν μεγάλες διαφοροποιήσεις στις τιμές των υπόλοιπων εφαρμογών αλλά στην πρώτη δοκιμή στα φυτά που μολύνθηκαν οι τιμές ήταν λίγο μικρότερες από τους αντίστοιχους μάρτυρες.

Στη μελέτη των Kotan *et al.*, 2014 εφαρμόζονται εκχυλίσματα και καθαροί μεταβολίτες του ελαίου του φυτού *Origanum onites* L. κατά των βακτηρίων *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas axonopodias* pv. *vesicatoria* σε φυτά τομάτας και *Xanthomonas campestris* pv. *vitiensis* σε φυτά μαρουλιού. Διαπιστώθηκε αύξηση του ύψους των στελεχών στις εφαρμογές αλλά και αύξηση βάρους των στελεχών σε ορισμένες εφαρμογές. Ως προς το βάρος υπάρχει συμφωνία με το παρόν πείραμα και ως προς το ύψος και τις θετικές επιδράσεις στις παραμέτρους της ανάπτυξης των φυτών υπάρχει συμφωνία. Να σημειωθεί όμως ότι στο πείραμα των Kotan *et al.*, 2014 γίνεται σύγκριση ανάμεσα στον μάρτυρα των μη μολυσμένων φυτών και στις εφαρμογές που έχει γίνει μόλυνση με τα βακτήρια. Ωστόσο αυτές τις θετικές επιδράσεις των συστατικών του ελαίου τις απέδωσαν στον ρόλο των υπεροξειδασών και στους μηχανισμούς για την ενεργοποίηση της άμυνας του φυτού έναντι παθογόνων οργανισμών.

Ακολούθως αξιολογήθηκε *in vivo* η επίδραση των αιθερίων ελαίων των φυτών *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* και *Coridothymus capitatus* / *Thymus vulgaris* στην αντιμετώπιση των ασθενειών της βακτηριακής στιγμάτωσης της τομάτας, της αδρομύκωσης-βερτισιλλίωσης της μελιτζάνας και του βακτηριακού έλκους της τομάτας, που προκαλούνται από το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, τον

μύκητα *Verticillium dahliae* και το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* αντίστοιχα. Στην πρώτη δοκιμή του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* η ασθένεια μειώθηκε με την μεγαλύτερη μείωση να παρατηρείται στην εφαρμογή του ελαίου του φυτού *Coridothymus capitatus* στα 1000ppm. Στις δοκιμές με τον μύκητα *Verticillium dahliae* και ιδιαίτερα στην πρώτη δοκιμή μπορεί να υπάρχει στατιστική διαφορά αλλά οι τιμές των εφαρμογών είναι σε παρόμοια επίπεδα με τις τιμές του μάρτυρα, κάτι που όμως δεν ισχύει στην δεύτερη δοκιμή αφού σημειώθηκε διαφορά στις τιμές των εφαρμογών και του μάρτυρα με τις μικρότερες τιμές και πάλι να παρατηρούνται στην εφαρμογή του ελαίου του φυτού *Thymus vulgaris* στα 1000ppm. Τέλος στις δοκιμές με το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* αποτυπώθηκαν πολύ καλύτερα αποτελέσματα ξεκινώντας από την πρώτη δοκιμή που οι τιμές των εφαρμογών διαφέρουν σε σχέση με του μάρτυρα όντας μικρές και τις μικρότερες τιμές να έχει η εφαρμογή του ελαίου του φυτού *Coridothymus capitatus* στα 500ppm. Στη δεύτερη εφαρμογή παρατηρείται μεγάλη μείωση των συμπτωμάτων για το έλαιο του φυτού *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* και έως μηδενική ανάπτυξη τους στις εφαρμογές του ελαίου του φυτού *Thymus vulgaris*.

Με τον έλεγχο της ασθένειας που προκαλεί το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* με αιθέρια έλαια ασχολήθηκαν και οι da Silva *et al.*, 2014 που εφάρμοσαν τα έλαια του θυμαριού (*Thymus vulgaris*), ευκαλύπτου, δέντρου τσαγιού, γαρυφάλλου, κανέλας, σιτρονέλλας, και του λεμονόχορτου με χρήση διαφορετικού στελέχους από αυτό της παρούσας μελέτης, του ufv-1, σε πειράματα *in vitro* και *in vivo*. Στο πείραμα *in vitro* χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις (v/v) 0,1, 1 και 10% (αιθέριο έλαιο / διάλυμα σκόνης γάλακτος στο 1%), όπου στη συγκέντρωση 10% ή υψηλότερη, όλα τα έλαια ανέστειλαν την ανάπτυξη του παθογόνου. Στο πείραμα *in vivo* έγιναν δύο δοκιμές μια στις 7 ημέρες πριν την μόλυνση και μια στις 7 ημέρες μετά την μόλυνση στην μικρότερη συγκέντρωση 0,1% τα έλαια που χρησιμοποιήθηκαν ανέστειλαν την βακτηριακή ανάπτυξη και το καλύτερο χρονικό σημείο εφαρμογής που εντοπίστηκε ήταν πριν από την μόλυνση με το παθογόνο. Επίσης, επιτυγχάνεται καλύτερος έλεγχος της ασθένειας με εφαρμογή των ελαίων πριν από τη μόλυνση παρά μετά, όπως φαίνεται και από το έλαιο του θυμαριού που τα ποσοστά ελέγχου της ασθένειας φτάνουν το 56% στην εφαρμογή πριν την μόλυνση και το 9% μετά την μόλυνση. Έτσι τα αποτελέσματα της μελέτης των da Silva *et al.*, 2014 έδειξαν ότι η επαγωγή της αντοχής των φυτών μπορεί να είναι ο κύριος τρόπος δράσης των αιθερίων ελαίων στο φυτό τομάτας.

Η αντιμετώπιση της ασθένειας της βερτισιλλίωσης, από τον μύκητα *Verticillium dahliae* με την χρήση των αιθέρων ελαίων μελετήθηκε και από τους Varo *et al.*, 2017 όπου παρουσιάζεται και ανωτέρω στα πειράματα *in vitro*, επίσης μελετήθηκε η εφαρμογή των ελαίων *in planta* σε ελαιόδεντρα. Πιο συγκεκριμένα στη μελέτη αυτή καταδεικνύεται η αποτελεσματικότητα του *Thymus* sp. κατά του μύκητα *Verticillium dahliae*, και η πιθανή χρήση των αιθέρων ελαίων για τον έλεγχό του, αφού και τα δύο αιθέρια έλαια του *Thymus* sp. που χρησιμοποιήθηκαν εφαρμοζόμενα με ριζοπότισμα, μείωσαν σημαντικά την ασθένεια της βερτισιλλίωσης, αλλά το εκχύλισμα που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο (*Thymus* sp. 04) έδειξε μεγαλύτερη επίδραση από την εμπορική σύνθεση (*Thymus* sp 01). Και για τις δύο εφαρμογές, η RAUDPC, η τελική σοβαρότητα της νόσου και η θνησιμότητα μειώθηκαν κατά 65% και 42%, 53% και 46%, και 100% και 50% αντίστοιχα, δεδομένα που συμφωνούν με την παρούσα μελέτη αφού οι εφαρμογές του ελαίου του θυμαριού μείωσαν την ασθένεια. Στην μελέτη των Kadoglidou *et al.*, 2011 αξιολογήθηκε επίσης η δράση της καρβόνης (το κύριο συστατικό του δυόσμου) και της καρβακρόλης (το κύριο συστατικό της ρίγανης) έναντι της ανάπτυξης του *Aspergillus terreus*, του *Fusarium oxysporum*, του *Penicillium expansum* και του *Verticillium dahliae* κατά τη διάρκεια περιόδου τριών εβδομάδων, όταν προστίθεται στο έδαφος σε ποσότητα 4,5, 22,5, 45 και 90 μl ανά 100 g εδάφους. Ο μύκητας *Verticillium dahliae* ήταν ο λιγότερο ανταγωνιστικός όσον αφορά την ανάπτυξη σε ένα έδαφος με παρουσία είτε καρβόνης είτε καρβακρόλης.

Στην μελέτη των Kotan *et al.*, 2014, που αναλύθηκε στους παράγοντες ανάπτυξης των φυτών, τα εκχυλίσματα και οι καθαροί μεταβολίτες του ελαίου του φυτού *Origanum onites* L. εφαρμόζονται σε συγκεντρώσεις 5, 10, 15 και 20 mg/ml. Τα αποτελέσματα ως προς την εξέλιξη της ασθένειας του παθογόνου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* έδειξαν ότι οι εφαρμογές των εκχυλισμάτων μείωσαν σημαντικά τα συμπτώματα της ασθένειας, όπως και στην παρούσα μελέτη. Σε μια άλλη μελέτη του Xu, 2010, εφαρμόζοντας *in vitro* θυμόλη όπως και αντιβιοτικά και ωφέλιμα βακτήρια για να δοκιμαστεί εάν θα αναπτυχθεί το βακτήριο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, στη θυμόλη στα 100μg/ml δεν αναπτύχθηκαν αποικίες ενώ στις μικρότερες συγκεντρώσεις (20, 40, 80μg/ml) αναπτύχθηκαν. Στα πειράματα *in vivo* η εφαρμογή της θυμόλης μείωσε τη συχνότητα εμφάνισης συμπτωματικών φυταρίων σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Επίσης, μείωσε τη συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας σε λιγότερο από 1%, μείωσε σημαντικά το ποσοστό εμφάνισης φυταρίων (emergence rate) και αύξησε το ποσοστό των μη φυσιολογικών φυταρίων (abnormal seedlings). Να σημειωθεί ότι η θυμόλη συντίθεται από φαινολικές

ενώσεις που απομονώθηκαν από τα είδη *Origanum* και *Thymus* και για να εφαρμοστεί χρειάστηκε ένας υγρός επεξεργαστής σπόρων (liquid seed treater) και εφαρμόστηκε σε συγκέντρωση 1,5mg/g. Επίσης, σε δοκιμή βιο-εμπλουτισμένης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης τερματικής αραιώσεως, Terminal Dilution PCR η μέση τιμή TDPCR για τον μάρτυρα ήταν υψηλότερη από ότι οι τιμές για όλες τις εφαρμογές, και το βακτήριο δεν ανιχνεύθηκε στην εφαρμογή της θυμόλης.

Σε αυτό το σημείο είναι σημαντικό να τονιστεί ότι εφαρμόζοντας τα έλαια και σε δεύτερη δόση παρουσιάστηκε μείωση στις ασθένειες των παθογόνων *Verticillium dahliae* και *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, έτσι τίθεται θέμα σταθερότητας των αιθέρων ελαίων. Σε καθοριστικό βαθμό, η αποδόμηση των αιθέρων ελαίων εξαρτάται από αρκετούς χημικούς και εδαφικούς παράγοντες που επηρεάζουν τόσο την πιθανότητα οξειδώσεως του αιθέριου ελαίου όσο και την πορεία της αντίδρασης. Επομένως, εξωτερικοί παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το φως και η προσβασιμότητα στο ατμοσφαιρικό οξυγόνο έχουν σημαντική επίδραση. Επιπλέον, η σύνθεση αιθέριου ελαίου, οι σύνθετες δομές και η παρουσία ακαθαρσιών μπορεί επίσης να διέπουν τη σταθερότητα. (Turek & Stintzing, 2013)

Ταυτοποιήθηκε η παρουσία του μύκητα και των βακτηρίων στα φυτά καθώς επίσης ταυτοποιήθηκε με επιτυχία μοριακά η παρουσία του βακτηρίου *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* με την μέθοδο PCR στα φύλλα και το στέλεχος φυταρίων τομάτας στις 15 και 26 ημέρες μετά την μόλυνση με το βακτήριο.

Επίσης, διερευνήθηκε η επαγωγή της άμυνας των φυτών από την εφαρμογή του αιθέριου ελαίου του φυτού *Thymus vulgaris* στις συγκεντρώσεις 1000ppm, 2000ppm και 3000ppm σε φυτάρια τομάτας με την μέθοδο Real Time PCR, όπου παρουσιάστηκε υπερέκφραση του γονιδίου *Pin2* στις 12 ώρες σε όλες τις συγκεντρώσεις και του γονιδίου *PR-1a* στις 12 ώρες στα 1000ppm και 3000ppm και στις 24 ώρες σε όλες τις συγκεντρώσεις. Με αυτό το έλαιο δεν έχει γίνει σχετική έρευνα για την δράση του στην άμυνα των φυτών, εκτός από την μελέτη των Ben-Jabeur *et al.*, 2015, όπου μελετήθηκε η άμυνα με την προσέγγιση των φαινολικών ενώσεων και των υπεροξειδασών, ενώ στην μεταπτυχιακή μελέτη της Ιορδανίδου, 2011, δεν μελετήθηκε το έλαιο αλλά οι ουσίες της καρβακρόλης και της θυμόλης. Πιο συγκεκριμένα εφαρμόστηκαν οι ενώσεις της θυμόλης, της καρβακρόλης και του σαλικυλικού οξέος σε φυτάρια *Arabidopsis thaliana* (Columbia) και 5 ημέρες μετά ακολούθησε η μόλυνση. Το γονίδιο PR1 στον μάρτυρα εκφράζεται τις ημέρες της μόλυνσης στις 0, 1 και 3 ημέρες μετά την μόλυνση, ενώ στις εφαρμογές της θυμόλης και της καρβακρόλης εκφράζεται εκτός από τις

ημέρες αυτές και μία ημέρα μετά τον ψεκασμό με τις ενώσεις, όπως και στο σαλικυλικό οξύ. Η ίδια κατάσταση παρουσιάζεται και στην εφαρμογή των ουσιών σε φυτά *Arabidopsis* του οικότυπου Ws. Έτσι φαίνεται ότι η συμπεριφορά των ενώσεων της θυμόλης και της καρβακρόλης δεν διαφέρει από αυτή του σαλικυλικού οξέος και ότι το γονίδιο PR1 εκφράζεται ακόμα και μετά από τις 5 ημέρες που εφαρμόστηκαν αυτές οι ενώσεις.

Σε μια άλλη μελέτη των Švecová *et al.*, 2013 που εφαρμόστηκε το εκχύλισμα του φυτού *Vitex agnus-castus* σε φυτά τομάτας για την αντιμετώπιση του ωμούκητα *Pythium ultimum* είναι ενδεικτικό ότι τα γονίδια PR1 και PR4 εκφράζονται στις 3, 6, 12 ώρες για τα φυτά που εφαρμόστηκε μόνο το εκχύλισμα του *Vitex agnus-castus* και στις 3, 6, 12, 24, και 48 ώρες στα φυτά που εφαρμόστηκε το εκχύλισμα του *Vitex agnus-castus* και μολύνθηκαν με τον ωμούκητα *Pythium ultimum*, δηλαδή τα PR-1 και PR-4 ενεργοποιούνται απευθείας από το εκχύλισμα *V. agnus-castus* έως και 12 ώρες μετά τη εφαρμογή, αλλά σε 24 ώρες εξαφανίζεται η άμεση ενεργοποίηση και παρατηρείται συνεργιστική επίδραση επαγωγής της εφαρμογής του εκχυλίσματος και του παθογόνου.

Στην μελέτη των Nisha *et al.*, 2012, εκτιμήθηκαν εκχυλίσματα τεσσάρων φυτών (*Azadirachta indica*, *Ages marmelos*, *Cassia auriculata* και *Vitex negundo*) κατά του βακτηρίου *Xanthomonas oryzae* σε φυτά ρυζιού και ταυτοποιήθηκε η παρουσία PR πρωτεϊνών παθογένεσης μέσω SDS PAGE στις εφαρμογές των εκχυλισμάτων νερού και μεθανόλης του φυτού *Vitex negundo* είτε εφαρμόζοντάς τα πριν, είτε μετά την μόλυνση με το παθογόνο.

Συνοψίζοντας, από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης και τα δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας μπορεί να διαπιστωθεί ότι τα αιθέρια έλαια μπορούν να αντιμετωπίσουν φυτοπαθογόνους μύκητες και βακτήρια *in vitro* και *in vivo*, μπορούν να επιδράσουν θετικά στην ανάπτυξη των φυτών και μπορούν να επάγουν την άμυνα του φυτού ώστε να μην επιτραπεί η επικείμενη μόλυνση από φυτοπαθογόνους μύκητες και βακτήρια.

Ως μελλοντικά πειράματα που μπορούν να γίνουν είναι να διερευνηθεί περαιτέρω η *in vivo* εφαρμογή των αιθερίων ελαίων σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις καθώς και αύξηση του αριθμού των αναμνηστικών δόσεων και στα άλλα δύο παθογόνα, τα *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* και *Verticillium dahliae* για να διαπιστωθεί εάν μπορούν να αντιμετωπιστούν πλήρως. Επίσης, θα πρέπει να διερευνηθεί η επαγωγή της άμυνας πέραν των 24 ωρών σε φυτά που έχουν εφαρμοστεί αιθέρια έλαια μόνο και σε

φυτά με τις εφαρμογές των ελαίων και να έχουν μολυνθεί με παθογόνους μικροοργανισμούς. Επιπροσθέτως, θα μπορούσαν να δοκιμαστούν και άλλοι φυτοπαθογόνοι μύκητες και βακτήρια με εφαρμογές των ίδιων ή και άλλων ελαίων. Επίσης, κρίνεται αξιόλογο να διερευνηθεί παραπάνω εάν εφαρμόζοντας σε περισσότερες δόσεις τα έλαια, επηρεάζεται καλύτερα η άμυνα του φυτού. Επιπρόσθετα, θα μπορούσαν να εφαρμοστούν τα αιθέρια έλαια και σε μελέτες πεδίου.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5.1 ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Acharya K., Pal A.K., Gulati A., Kumar S., Singh A.K., Ahuja P.S. (2013) Overexpression of *Camellia sinensis* thaumatin-like protein, CsTLP in potato confers enhanced resistance to *Macrophomina phaseolina* and *Phytophthora infestans* infection. *Molecular Biotechnology*, 54:609–622.

Adebayo O., Dang T., Bélanger A., Khanizadeh S. (2013) Antifungal Studies of Selected Essential Oils and a Commercial Formulation against *Botrytis Cinerea*. *Journal of Food Research*, Vol. 2, No. 1.

Agili F.A. (2014) Chemical Composition, Antioxidant and Antitumor Activity of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 21 (10): 1670-1676.

Akthar M. S., Degaga B., Azam T. (2014) Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research*, Vol.2 (1), pp. 001-007.

Aleksic V., Knezevic P. (2014) Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. *Microbiological Research*, vol.169, no.4, pp.240–254.

Alexander M. (2001) Aromatherapy and Immunity: How the Use of Essential Oil in Aids Immune Potentiality. Part 3: Immune Response to Inflammation and Essential Oils Useful in Inhibiting Them. *International Journal of Aromatherapy*, 11(4), 220-224.

Alvarez-Castellanos P.P., Pascual-Villalobos M.J. (2003) Effect of fertilizer on yield and composition of flowerhead essential oil of *Chrysanthemum coronarium* (Asteraceae) cultivated in Spain. *Ind. Crops Prod.*, pp. 77-81.

Anzlovar S., Baricevic D., Avgustin J. A., Koce J.D. (2014) Essential Oil of Common Thyme as a Natural Antimicrobial Food Additive. *Food Technology and Biotechnology*, 52 (2) 263–268.

- Arnal-Schnebel B., Hadji-Minaglou F., Peroteau J.-F., Ribeyre F., De Billerbeck V. G. (2004) Essential oils in infectious gynaecological disease: a statistical study of 658 cases. *International Journal of Aromatherapy*, vol.14, no.4, pp.192–197.
- Arslan M., Dervis S. (2010) Antifungal activity of essential oils against three vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26:1813–1821.
- Asogwa E.U., Ndubuaku T.C.N., Ugwu J.A., Awe O.O. (2010) Prospects of botanical pesticides from neem, *Azadirachta indica* for routine protection of cocoa farms against the brown cocoa mirid *Sahlbergella singularis* in Nigeria. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 1–6.
- Azaiez A., Boyle B., Levee V., Seguin A. (2009) Transcriptome profiling in hybrid poplar following interactions with *Melampsora* rust fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, 22:190–200.
- Bajpai V.K., Cho M.J., Kang S.C. (2010) Control of plant pathogenic bacteria of *Xanthomonas* spp. by the essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Phytopathology*, 158, 479–486.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008) Biological effects of essential oils – a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, pp. 446-475.
- Bari R, Jones JD (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, 69:473–488.
- Baylac, S. & Racine, P. (2003) Inhibition of 5lipoxygenase by Essential Oil and Other Natural Fragrant Extract. *International Journal of Aromatherapy*, 13(2), 138-142.
- Berr A., Menard R., Heitz T., Shen W.H. (2012) Chromatin modification and remodelling: a regulatory landscape for the control of *Arabidopsis* defence responses upon pathogen attack. *Cellular Microbiology*, 14:829–839.
- Beltrame J. M., Angnes R. A., Chiavelli L. U. R., Costa W F., Rosa M. F., Silva Lobo V., Pomini A. M. (2013) Photodegradation of essential oil from Marjoram (*Origanum majorana* L.) studied by GC-MS and UV-VIS spectroscopy. *Revista Latinoamericana de Química*, 41/2.
- Bender C. L., Stone H. E., Sims J. J., and Cooksey D. A. (1987) Reduced pathogen fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Tn5 insertions defective in coronatine production. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 30:273- 283.

- Bender C. L., Alarcón-Chaidez F., Gross D. C. (1999) *Pseudomonas syringae* phytotoxins: Mode of action, regulation and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63:266- 292.
- Ben-Jabeur M., Ghabri E., Myriam M., Hamada W. (2015) Thyme essential oil as a defense inducer of tomato against gray mold and Fusarium wilt. *Plant Physiology and Biochemistry*, 94, 35-40.
- Bhusita W., Siripen J., Thammathad S., Sirinun T. (2005) Antibacterial Properties of Essential Oils from Thai Medicinal Plants. *Fitoterapia*, 76, 233-236.
- Block A, Schmelz E, O'Donnell P.J, Jones J.B, Klee H.J. (2005) Systemic acquired tolerance to virulent bacterial pathogens in tomato. *Plant Physiology*, 138:1481–1490.
- Blume B., Nürnberger T., Nass N., Scheel D. (2000) Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell*, 12:1425–1440.
- Boter M., Ruiz-Rivero O., Abdeen A., Prat S. (2004) Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and *Arabidopsis*. *Genes Development*, 18: 1577-1591.
- Bouchra C., Achouri M., Idrissi Hassani L.M., Hmamouchi M. (2003) Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. *Journal of Ethnopharmacology*, 89 165–169.
- Bräutigam K, Vining K.J., Lafon-Placette C. et al. (2013) Epigenetic regulation of adaptive responses of forest tree species to the environment. *Ecology*, E vol 3:399–415.
- Bruneton, J. (1999) *Pharmacognosy: Phytochemistry, Medicinal Plants*. Intercept Limited.
- Burt S. (2004) Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, vol.94, no.3, pp.223–253.
- Carezzano M. E., Sotelo J. P., Primo E., Reinoso E. B., Paletti Rovey M. F., Demo M. S., Giordano W. F., de las M. Oliva M. (2017) Inhibitory effect of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* essential oils on virulence factors of phytopathogenic *Pseudomonas syringae* strains. *Plant Biology*, 19:599–607.

- Carr D.J., Carr S.G.M. (1970) Oil glands and ducts in *Eucalyptus* L'Hérit. II. Development and structure of oil glands in the embryo. *Australian Journal of Botany*, 18:191–212.
- Carson C.F., Hammer K.A. (2011) Chemistry and bioactivity of essential oils. H. Thormar (Ed.), *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*, John Wiley & Sons, UK, pp. 203-238.
- Carson C.F., Hammer K.A., Riley T.V. (2006) *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical Microbiology Reviews*, 19, pp. 50-62.
- 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*, vol.46, no.6, pp.1914–1920.
- Castillo F., Hernández D., Gallegos G., Rodríguez R., Aguilar C. N. (2012) Antifungal Properties of Bioactive Compounds from Plants, *Fungicides for Plant and Animal Diseases*, Dr. Dharumadurai Dhanasekaran (Ed.), InTech.
- Cavalcanti F.R., Resende M.L.V., Carvalho C.P.S., Silveira J.A.G., Oliveira J.T.A. (2006) Induced defence responses and protective effects on tomato against *Xanthomonas vesicatoria* by an aqueous extract from *Solanum lycocarpum* infected with *Crinipellis pernicioso*. *Biological Control*, 39, 408–417.
- Chen Z., Malamy J., Henning J., Conrath U., Sanchez-Casas P., Silva H., Ricigliano J., Klessig D.K. (1995) Induction, modification, and transduction of the salicylic acid signal in plant defense responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 92:4134–4137.
- Christensen A.B., Cho B.H., Naesby M., Gregersen P.L., Brandt J., Madriz Ordeñana K., Collinge D.B., Thordal-Christensen H. (2002) The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. *Molecular Plant Pathology*, 3:135–144.
- Collins, T.L., Jones, G.L. and Sadgrove, N. (2014) Volatiles from the rare Australian desert plant *Prostanthera centralis* B.J.Conn (Lamiaceae): Chemical composition and antimicrobial activity. *Agriculture*, 4, 308-316.

- Cooksey D.A. (1988) Reduction of infection by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* using a nonpathogenic, copper resistant strain combined with a copper bactericide. *Phytopathology* **78**:601-603.
- Cox S.D., Gustafson J.E., Mannetal C.M. (1998) Tea tree oil causes K⁺ leakage and inhibits respiration in *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, vol.26, no.5, pp.355–358.
- Cox S. D., Mann C. M., Markham J. L. et al. (2000) The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil), *Journal of Applied Microbiology*, vol.88, no.1, pp. 170–175.
- Cristani M., D'Arrigo M., Mandalari G. et al. (2007) Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol.55, no.15, pp.6300–6308.
- Croteau R. (1986) Biochemistry of monoterpenes and sesquiterpenes of the essential oils. *Herbs, spices and medicinal plants. Recent Advances in Botany, Horticulture, and Pharmacology*, 1, pp. 81-135.
- Cuppels D. (1986) Generation and characterization of Tn5 insertion mutations in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Applied and Environmental Microbiology*, 51:323-327.
- Custers J.H.H.V., Harrison S.J., Sela-Buurlage M.B. et al. (2004) Isolation and characterisation of a class of carbohydrate oxidases from higher plants, with a role in active defence. *The Plant Journal*, 39:147–160.
- Dadasoglu F., Aydin T., Kotan R., Cakir A., Ozer H., Kordali S., Cakmakci R., Dikbas N., Mete E. (2011) Antibacterial activities of extracts and essential oils of three *Origanum* species against plant pathogenic bacteria and their potential use as seed disinfectants. *Journal of Plant Pathology*, 93(2), 271-282.
- Daferera D. J., Ziogas B. N., Polissiou M. G. (2003). The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection*, **22**:39–44.
- Dardick C., Ronald P. (2006) Plant and animal pathogen recognition receptors signal through non-RD kinases. *PLOS Pathogens*, 2:14–28.

da Silva E.O., Martins S.G., Alves E. (2014) Essential oils for the control of bacterial speck in tomato crop. *African Journal of Agricultural Research*. Vol. 9(34), pp. 2624-2629.

Deans S. G., Svoboda K. P. (1990) The Antimicrobial Properties of Marjoram (*Origanum majorana* L.) Volatile Oil. *Flavour and fragrance journal*, VOL. 5, 187-190.

Delledonne M., Zeier J., Marocco A., Lamb C. (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 98:13454–13459.

Denancé N., Sánchez-Vallet A., Goffner D., Molina A. (2013) Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Frontiers in Plant Science*, 4:155.

de Souza E.L., de Barros J.C., de Oliveira C.E.V., da Conceição M.L. (2010) Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, vol.137, no.2-3, pp.308–311.

Devash Y., Okon Y., Henis Y. (1980). Survival of *Pseudomonas tomato* in soil and seeds. *Phytopathologische Zeitschrift*, 99:175-185.

Devi K.P., Nisha S.A., Sakthivel R., Pandian S.K. (2010) Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology*, vol.130, no.1, pp.107–115.

Djilani A., Dicko A. (2012) The therapeutic benefits of essential oils. J. Bouayed, T. Bohn (Eds.), *Nutrition, Well-being and Health*, InTech, Croatia, pp. 155-178.

Dodds P.N., Rathjen J.P. (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11:539–548.

Doss R.P., Oliver J.E., Proebsting W.M., Potter S.W., Kuy S., Clement S.L., Williamson R.T., Carney J.R., DeVilbiss E.D. (2000) Bruchins: insectderived plant regulators that stimulate neoplasm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 97:6218–6223.

Dou D, Zhou J-M (2012) Phytopathogen effectors subverting host immunity: different foes, similar battleground. *Cell Host Microbe*, 12:484–495.

- Dreier J., Bempohl A., Eichenlaub R. (1995) Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology*, 85: 462-468.
- El Asbahani A., Miladi K., Badri W., Sala M., Aït Addi E.H., Casabianca H., El Mousadic A., Hartmann D., Jilale A., Renaud F.N.R., Elaissari A. (2015) Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483:220–243.
- El-Baroty G. S., Abd El-Baky H.H., Farag R.S., Saleh M.A. (2010) Characterization of antioxidant and antimicrobial compounds of cinnamon and ginger essential oils African. *Journal of Biochemistry Research*, Vol. 4(6), 167174.
- El Beyrouthy M., Arnold-Apostolides N., Cazier F., Najm S., Abou Jaoudeh. C., Labaki M., Dhifi W., Abou Kais A. (2013) Chemical Composition of the Essential Oil of Aerial Parts of *Satureja thymbra* L. Growing Wild in Lebanon. *Acta Horticulturae* 997, ISHS.
- Elizabeth S. V., Bender C. L. (2007) The phytotoxin coronatine from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 functions as a virulence factor and influences defense pathways in edible *Brassicac*s. *Molecular Plant Pathology*, 8:83-92.
- El-kereamy A, El-sharkawy I, Ramamoorthy R, Taheri A, Errampalli D, Kumar P, Jayasankar S (2011) *Prunus domestica* pathogenesis-related protein-5 activates the defense response pathway and enhances the resistance to fungal infection. *PLoS ONE* 6:1–11.
- EPPO (2007) PM 7/78 (1): *Verticillium albo-atrum* and *V. dahliae* on hop. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 37 , 528–535.
- EPPO (2016) PM 7/42 (3): *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 46, 202–225.
- European Pharmacopoeia (2013) 8th Edition, Council of Europe, Strasbourg Cedex, France.
- Eyles A, Davies NW, Mohammed CM (2004) Traumatic oil glands induced by pruning in the wound-associated phloem of *Eucalyptus globulus*: chemistry and histology. *Trees* 18:204–210.
- Eyles A, Bonello P, Ganley R, Mohammed C (2010) Induced resistance to pests and pathogens in trees. *New Phytologist*, 185:893–908.
- Fahn A (1988) Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist* 108:229–257.

- Fanelli V., Cariddi C., Finetti-Sialer M. (2007) Selective detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* using dot blot hybridization and real-time PCR. Blackwell Publishing Ltd, Plant Pathology, 56, 683–691.
- Fitzgerald D. J., Stratford M., Gasson M. J. et al. (2004) Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. Journal of Applied Microbiology, vol.97, no.1, pp.104–113.
- Franceschi VR, Krokene P, Christiansen E, Krekling T (2005) Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests. New Phytologist, 167:353–376.
- Gakuubi M.M., Maina A.W. & Wagacha, J.M. (2017) Antifungal Activity of Essential Oil of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. against Selected *Fusarium* spp. International Journal of Microbiology, 1-7.
- Giweli A., Džamić A. M., Soković M., Ristić M. S., Marin P. D. (2012) Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils of *Satureja thymbra* Growing Wild in Libya. Molecules, 17, 4836-4850 Article.
- Glazebrook J. (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annual Review of Phytopathology, 43:205–227.
- Goode M.J., Sasser M., 1980 Prevention—the Key to Controlling Bacterial Spot and Bacterial Speck of Tomato. American Phytopathological Society, Newark. Plant Disease, 64:831.
- Goodger J.Q.D., Cao B., Jayadi I., Williams S.J., Woodrow I.E. (2009) Non-volatile components of the essential oil secretory cavities of Eucalyptus leaves: discovery of two glucose monoterpene esters, cuniloside B and froggattiside A. Phytochemistry 70:1187–1194.
- Görlach J., Volrath S., Knauf-Beiter G. et al. (1996) Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. Plant Cell, 8:629–643.
- Grant J.J., Loake G.J. (2000) Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. Plant Physiology, 124:21–29.
- Guil-Guerrero J.L., Reboloso-Fuentes M.M. (2009) Nutrient composition and antioxidant activity of eight tomato (*Lycopersicon esculentum*) varieties. Journal of Food Composition and Analysis, 22: 123–129.

- Guleria, S., Tiku, A.K., Koul, A., Gupta, S., Singh, G., & Razdan, V.K. (2013) Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Essential Oil and Extracts of *Zanthoxylum alatum* Grown in NorthWestern Himalaya. The Scientific World Journal, 19. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/790580>.
- Gurr S.J., Rushton P.J. (2005) Engineering plants with increased disease resistance: what are we going to express? Trends in Biotechnology, 23:275–282.
- Hahn M. (2014) The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. Review. Journal of Chemical Biology, 7:133–141.
- Hammer K.A., Carson C.F. (2011) Antibacterial and antifungal activities of essential oils, in Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents. Halldor Thormar, Ed., pp.255–306, John Wiley & Sons, London, UK.
- Harris D.C., Yang J.R., Ridout M.S. (1993) The detection and estimation of *Verticillium dahliae* in naturally infested soil. Plant Pathology, 42, 238-250.
- Heil M. (2009) Damaged-self recognition in plant herbivore defence. Trends in Plant Science, 14:356–363.
- Helander I. M., Alakomi H.-L., Latva-Kala K. et al. (1998) Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol.46, no.9, pp.3590–3595.
- Herman M.A.B., Davidson J.K., Smart C.D. (2008) Induction of plant defense gene expression by plant activators and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in greenhouse-grown tomatoes. Phytopathology, 98:1226–1232.
- Holeski L.M., Jander G., Agrawal A.A. (2012) Transgenerational defense induction and epigenetic inheritance in plants. Trends in Ecology & Evolution, 27:618–626.
- Holley R.A., Patel D. (2005) Improvement in shelf – life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials, Food Microbiology, vol.22, no.4, pp.273–292.
- Hu D., Coat J. (2008) Evaluation of the environmental fate of thymol and phenethyl propionate in the laboratory. Pest Management Science, 64:775–779.
- Hussain A.I., Anwar F., Hussain Sherazi S.T., Przybylski R. (2008) Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. Food Chemistry, 108, pp. 986-995.

- Isman M.B. (2000) Plant essential oils for pest and disease management *Crop Protection* 19, 603-608.
- Isman M.B., Wilson J.A., Bradbury R. (2008) Insecticidal activities of commercial rosemary oils (*Rosmarinus officinalis*) against larvae of *Pseudaletia unipuncta* and *Trichoplusia ni* in relation to their chemical compositions. *Pharmaceutical Biology*, 46, pp. 82-87.
- Janse J.D. (2006) *Phytobacteriology: Principles and Practice*. Wallingford, UK: CABI Publishing, 360 pp.
- Jones J.D., Dangl J.L. (2006) The plant immune system. *Nature*, 444:323–329.
- Kadoglidou K., Lagopodi A., Karamanoli K., Vokou D., Bardas G.A., Menexes G., Constantinidou H.A. (2011) Inhibitory and stimulatory effects of essential oils and individual monoterpenoids on growth and sporulation of four soil-borne fungal isolates of *Aspergillus terreus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium expansum*, and *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology*, 130:297–309.
- Kamdem M.S., Sameza M.L., Dongmo P.M.J., Boyom F.F., Bakargna-Vial I., Fokou, J.B.H., Tsague I.F.K., Menkem E.Z., Zollo P.H.A., Menut C. (2015) Antiradical, Anti-inflammatory and Antifungal Activities of Essential Oils of Two Aromatic Plants: *Apium graveolens* (Apiaceae) and *Thymus vulgaris* (Lamiaceae). *Journal of Life Sciences*, 9, 51-64.
- Karami-Osboo R., Khodaverdi M., Ali-Akbari F. (2010) Antibacterial effect of effective compounds of *Satureja hortensis* and *Thymus vulgaris* essential oils against *Erwinia amylovora*. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 12, 35–45.
- Karousou R. Koureas D.N., Kokkini S. (2005) Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 2000 sites of Crete. *Phytochemistry*, 66; 22, 2668-2673.
- Keykhasaber M., Pham K.T.K., Thomma B.P.H.J., Hiemstra J.A. (2017) Reliable detection of unevenly distributed *Verticillium dahliae* in diseased olive trees. *Plant Pathology*, 66, 641–650.
- Kotan R., Cakir A., Dadasoglu F., Aydin T., Cakmakci R., Ozer H., Kordali S., Mete E., Dikbas N. (2010) Antibacterial activities of essential oils and extracts of Turkish *Achillea*, *Satureja* and *Thymus* species against plant pathogenic bacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90:145–160.

- Kotan R., Cakir A., Ozerc H., Kordali S., Cakmakci R., Dadasoglu F., Dikbas N., Aydin T., Kazaz C. (2014) Antibacterial effects of *Origanum onites* against phytopathogenic bacteria: Possible use of the extracts from protection of disease caused by some phytopathogenic bacteria. *Scientia Horticulturae*, 172: 210–220.
- Kovalchuk A., Keriö S., Oghenekaro A.O., Jaber E., Raffaello T., Asiegbu F.O. (2013) Antimicrobial defenses and resistance in forest trees: challenges and perspectives in a genomic era. *Annual Review of Phytopathology*, 51:221–244.
- Kumar V., Mathela C.S., Tewari A.K., Bisht K.S., (2014) *In vitro* inhibition activity of essential oils from some Lamiaceae species against phytopathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 114: 67–71.
- Lacombe S., Rougon-Cardoso A., Sherwood E. et al. (2010) Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nature Biotechnology*, 28:365–369.
- Lamb C., Dixon R.A. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 48:251–275.
- Lecourieux D., Mazars C., Pauly N., Ranjeva R., Pugin A. (2002) Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Plant Cell*, 14:2627–2641.
- Lecourieux D., Ranjeva R., Pugin A. (2006) Calcium in plant defence signalling pathways. *New Phytologist*, 171:249–269.
- Leon-Reyes A., Du Y., Koornneef A., Proietti S., Korbes A.P., Memelink J., Pieterse C.M., Ritsema T. (2010) Ethylene signaling renders the jasmonate response of *Arabidopsis* insensitive to future suppression by salicylic acid. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23:187–197.
- Lin P., Lee J.J., Chang I. (2016) Essential oils from Taiwan: Chemical composition and antibacterial activity against *Escherichia coli*. *Journal of food and drug analysis*, 1-7. (In press).
- Liu B., Chen B., Zhang J., Wang P., Feng G. (2016) The environmental fate of thymol, a novel botanical pesticide, in tropical agricultural soil and water, *Toxicological & Environmental Chemistry*.

- Lo Cantore P., Shanmugaiah V., Iacobellis N.S. (2009) Antibacterial activity of essential oil components and their potential use in seed disinfection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 9454–9461.
- Longbottom C. J., Carson C. F., Hammer K. A., Mee B. J., Riley T.V. (2004) Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil is associated with the outer membrane and energy-dependent cellular processes, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol.54, no.2, pp.386–392.
- Lopes-Lutz D., Alviano D.S., Alviano C.S. Kolodziejczyk P.P. (2008) Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*, 69: 1732–1738.
- Lopez-Romero J. C., Gonz'alez-R'ios H., Borges A., Sim'oes M. (2015) Antibacterial effects and mode of action of selected essential oils components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol.2015, ArticleI D795435, 9 pages.
- Ma W., Berkowitz G.A. (2007) The grateful dead: calcium and cell death in plant innate immunity. *Cellular Microbiology*, 9:2571–2585.
- Mahesh B., Satish S. (2008) Antimicrobial activity of some important medicinal plant against plant and human pathogens. *World Journal of Agricultural Sciences*, 4: 839-843.
- Maleck K., Dietrich R.A. (1999) Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies? *Trends in Plant Science*, 4:215–219.
- Maleck K., Lawton K. (1998) Plant strategies for resistance to pathogens. *Current Opinion in Biotechnology*, 9:208-213.
- McCarter S., Jones J., Gitaitis D., and Smitley D. (1983) Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in association with tomato seed, soil, host tissue, and epiphytic weed hosts in Georgia. *Phytopathology*, 73:1393-1398.
- Mengiste T. (2012) Plant immunity to necrotrophs. *Annual Review of Phytopathology*, 50:267–294.
- Micali C.O., Neumann U., Grunewald D., Panstruga R., O'Connell R. (2011) Biogenesis of a specialized plant–fungal interface during host cell internalization of *Golovinomyces orontii* haustoria. *Cellular Microbiology*, 13:210–226.

- Mihaliak C.A., Gershenzo J., Croteau R. (1991) Lack of rapid monoterpene turnover in rooted plants, implication for theories of plant chemical defense. *Oecologia*, 87:373–376.
- Mishina T.E., Zeier J. (2007) Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 50:500–513.
- Mithöfer A., Boland W. (2008) Recognition of herbivory-associated molecular patterns. *Plant Physiology*, 146:825–831.
- Mithöfer A., Ebel J., Bhagwat A.A., Boller T., Neuhaus-Url G. (1999) Transgenic aequorin monitors cytosolic calcium transients in soybean cells challenged with β -glucan or chitin elicitors. *Planta* 207:566–574.
- Moharam M.H.A., Obiadalla Ali H.A.E. (2012) Preventative and Curative Effects of Several Plant Derived Agents against Powdery Mildew Disease of Okra. *Notulae Scientia Biologicae*, 4(3):76-82.
- Nachmias A., Krikun J. (1985) Verticillium wilt of potato in Israel. *American Potato Journal*, 62:201–205.
- Naidoo R., Ferreira L., Berger D.K., Myburg A.A., Naidoo S. (2013) The identification and differential expression of *Eucalyptus grandis* pathogenesis-related genes in response to salicylic acid and methyl jasmonate. *Frontiers in Plant Science*, 4:43.
- Naidoo S., Külheim C., Zwart L., Mangwanda R., Oates C.N., Visser E.A., Wilken F.E., Mamni T.B., Myburg A.A. (2014) Uncovering the defence responses of *Eucalyptus* to pests and pathogens in the genomics age. *Tree Physiology review*. Oxford University Press. *Tree Physiology* 34, 931–943.
- Nakatsu T., Lupo A.T., Chinn J.W., Kang R.K.L. (2000) Biological activity of essential oils and their constituents. *Studies in Natural Products Chemistry*, 21, pp. 571-631.
- Nazzaro F., Fratianni F., De Martino L., Coppola R., De Feo V. (2013) Effect of essential oils on pathogenic bacteria, *Pharmaceuticals*, vol.6, no.12, pp.1451–1474.
- Nguefack J., Somda I., Mortensen C.N., Zollo P.H.A. (2005) Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling seed-borne bacteria of rice (*Oryza sativa* L.). *Seed Science and Technology*, 33:397–407.
- Nisha S., Revathi K., Chandrasekaran R., Kirubakaran S.A., Narayanan S.S., Stout M.J., Nathan S.S. (2012) Effect of plant compounds on induced activities of defense-

related enzymes and pathogenesis related protein in bacterial blight disease susceptible rice plant. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 80:1-9.

Nurnberger T., Lipka V. (2005) Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular Plant Pathology*, 6:335–345.

Okoh S.O. Iweriebor B.C., Okoh O.O., Nwodo U.U., Okoh A.I. (2016) Antibacterial and Antioxidant Properties of the Leaves and Stem Essential Oils of *Jatropha gossypifolia* L. *BioMed Research International*, 1-9. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9392716>.

Okushima Y., Koizumi N., Kusano T., Sano H. (2000) Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology*, 42:479–488.

Oliva Mde L., Carezzano M.E., Giuliano M., Daghero J., Zygadlo J., Bogino P., Giordano W., Demo M. (2015) Antimicrobial activity of essential oils of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* on phytopathogenic strains isolated from soybean. *Plant Biology (Stuttg)*. (3):758-65.

Oussalah M., Caillet S., Lacroix M. (2006) Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, vol.69, no.5, pp.1046–1055.

Öztürk M. (2012) Anticholinesterase and antioxidant activities of Savoury (*Satureja thymbra* L.) with identified major terpenes of the essential oil. *Food Chemistry*, 134:48–54.

Passardi F., Penel C., Dunand C. (2004) Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science*, 9:534–540.

Pastrik K.H., Rainey F.A. (1999) Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. *Journal of Phytopathology*, 147:687–693.

Pednekar P.P., Vakil B.V., Sane R.T., Datar A.G. (2013) Phytochemical profile and antioxidant activity of essential oil from *Blumea eriantha* DC. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(1):404-413.

- Pieterse C.M., van der Does D., Zamioudis C., Leon-Reyes A., van Wees S.C. (2012) Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28:489–521.
- Pimple B.P., Patel A.N., Kadam P.V., Patil M.J. (2012) Microscopic evaluation and physicochemical analysis of *Origanum majorana* Linn leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, S897-S903.
- Pozo M.J., Van Der Ent S., Van Loon L.C., Pieterse C.M. (2008) Transcription factor MYC2 is involved in priming for enhanced defense during rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 180:511–523.
- Pradhanang P.M., Momol M.T., Olson S.M., Jones J.B. (2003) Effects of plant essential oils on *Ralstonia solanacearum* population density and bacterial wilt incidence in tomato. *Plant Disease*, 87:423-427.
- Prakash A., Rao J., Nandagopal V. (2008) Future of botanical pesticides in rice, wheat, pulses and vegetables pest management. *Journal of Biopesticides*, 1:154–169.
- Pre M., Atallah M., Champion A., De Vos M., Pieterse C.M., Memelink J. (2008) The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiology*, 147:1347–1357.
- Rana M., Bhatt T.D., Upadhyay S. (2017) A Short Review on the Study of Essential Oils. *Journal of Plant Resources*, Vol.15, No.1, pp.66-72.
- Raut J. S., Karuppayil S. M. (2014) A status review on the medicinal properties of essential oils, *Industrial Crops and Products*, vol.62, pp.250–264.
- Rhouma A., Ben Daoud H., Ghanmi S., Ben Salah H., Romdhane M., Demak M. (2009) Antimicrobial activities of leaf extracts of Pistacia and Schinus species against some plant pathogenic fungi and bacteria. *Journal of Plant Pathology*, 91 (2):339-345.
- Rodriguez M.C., Petersen M., Mundy J. (2010) Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 61:621–649.
- Rudramurthy G.R., Swamy M.K., Sinniah U.R., Ghasemzadeh A. (2016) Nanoparticles: alternatives against drug-resistant pathogenic microbes, *Molecules*, vol.21, no.7, p.836.
- Ryals J.A., Neuenschwander U.H., Willits M.G., Molina A., Steiner H.-Y., Hunt M.D. (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 8:1809.

- Ryan C.A. (1990) Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 28:425–449.
- Saad N.Y., Muller C.D., Lobstein A. (2013) Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 28, no. 5, pp. 269– 279.
- Samajova O., Komis G., Samaj J. (2013) Emerging topics in the cell biology of mitogen-activated protein kinases. *Trends in Plant Science*, 18:140–148.
- Santurio D.F., Jesus F.P.K., Zanette R.A., Schlemmer K.B., Fraton A., Fries L.C.M. (2014) Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Thyme and of Thymol against *Escherichia coli* Strains. *Acta Scientiae Veterinariae*, 42:1234.
- Schaad N.W., Jones J.B., Chun W. (2001) Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria. American Phytopathological Society (APS Press), St. Paul, MN. 373 pp.
- Selitrennikoff C.P. (2001) Antifungal proteins. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:2883–2894.
- Sokoviæ M., Glamoèlija J., Marin P.D., Brkiæ D., van Griensven L.J.L.D. (2010) Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly Consumed Medicinal Herbs Using an *In Vitro* Model. *Molecules*, 15, 7532-7546. doi: 10.3390/ molecules15117532.
- Soltani J., Aliabadi A. A. (2013) Antibacterial Effects of Several Plant Extracts and Essential Oils on *Xanthomonas arboricola* pv.*juglandis* *in vitro*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. Volume 16, Issue 4, pages 461-468.
- Spoel SH, Dong X (2012) How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 12:89–100.
- Stuart JJ, Chen MS, Shukle R, Harris MO (2012) Gall midges (Hessian flies) as plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 50:339–357.
- Švecová E., Proietti S., Caruso C., Colla G., Crinò P. (2013) Antifungal activity of *Vitex agnus-castus* extract against *Pythium ultimum* in tomato. *Crop Protection*, Volume 43, Pages 223-230.
- Svoboda K.P., Greenaway R.I. (2003) Investigation of volatile oil glands of *Satureja hortensis* L. (summer savory) and phytochemical comparison of different varieties. *International Journal of Aromatherapy*, 13, 196–202.

- Swamy M.K., Akhtar S.M., Sinniah U.R. (2016) Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. Hindawi Publishing Corporation. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Volume 2016, Article ID 3012462, Review Article, 21 pages.
- Szabó M.A., Varga G.Z., Hohmann J. et al. (2010) Inhibition of quorum-sensing signals by essential oils. *Phytotherapy Research*, vol.24, no.5, pp.782–786.
- Tabbasum N., Vidyasagar G. M. (2013) Antifungal investigations on plant essential oils. A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical*, Vol 5, Suppl 2, 19-28.
- Terblanche F.C., Kornelius G. (2000) A literature survey of the antifungal activity of essential oil constituents. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 3 pp., 139-156.
- Termorshuizen A.J. (1998) Disease diagnosis and identification of the pathogen. In: Hiemstra JA, Harris DC, eds. *A Compendium of Verticillium Wilts in Tree Species*. Wageningen, Netherlands: Centre for Plant Breeding and Reproduction Research (CPRO-DLO), 41–3.
- Thatcher L.F., Anderson J.P., Singh K.B. (2005) Plant defence responses: what have we learnt from *Arabidopsis*? *Functional Plant Biology*, 32:1–19.
- Thoroski J. (1989) Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection*, vol.52, pp.399–403.
- Tjamos EC, Biris DA, Paplomatas EJ (1991). Recovery of olive trees with *Verticillium* wilt after individual application of soil solarization in established olive orchards. *Plant Disease*, 75: 557-562.
- Trombetta D., Castelli F., Sarpietro M. G. et al. (2005) Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol.49, no.6, pp.2474–2478.
- Truman W, de Zabala MT, Grant M (2006) Type III effectors orchestrate a complex interplay between transcriptional networks to modify basal defence responses during pathogenesis and resistance. *Plant Journal*, 46:14–33.
- Tsitsigiannis D.I., Antoniou P.P., Tjamos S.E., Paplomatas E.J. (2008) Major diseases of tomato, pepper, and eggplant in greenhouses. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 2:106-124.

Turek C., Stintzing F.C. (2013) Stability of Essential Oils: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Institute of Food Technologists. Vol.12:40-53.

Turina A. D. V., Nolan M. V., Zygadlo J. A., Perillo M. A. (2006) Natural terpenes: self - assembly and membrane partitioning, *Biophysical Chemistry*, vol.122, no.2, pp.101–113.

Ultee A., Bennik M. H. J., Moezelaar R., (2002) The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, vol.68, no.4, pp.1561–1568.

Ultee A., Kets E.P.W., Smid E.J. (1999) Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, vol.65, no.10, pp.4606–4610.

Ultee A., Smid E.J. (2001) Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, vol.64, no.3, pp.373–378.

Underwood W (2012) The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion. *Frontiers in Plant Science*, 3:85.

Uppalapati S.R., Ishiga Y., Wangdi T., Urbanczyk-Wochniak E., Ishiga T., Mysore K.S., Bender C.L. (2008) Pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on Tomato Seedlings: Phenotypic and Gene Expression Analyses of the Virulence Function of Coronatine. *The American Phytopathological Society. MPMI* Vol. 21, No. 4, 2008, pp. 383–395.

Vagi E., Simandi B., Suhajda A., Hethelyi E. (2005) Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. *Food Research International* 38, 51–57.

van Loon LC (2007) Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*, 119:243–254.

van Loon LC (2009) *Advances in botanical research—plant innate immunity*. Elsevier, Oxford, UK.

van Loon LC, Rep M, Pieterse C (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44:135–162.

van Wees SC, van der Ent S, Pieterse CM (2008) Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology*, 11:443–448.

- Varo A., Mulero-Aparicio A., Adem M., Roca L.F., Raya-Ortega M.C., Lopez-Escudero F.J., Trapero A. (2017) Screening water extracts and essential oils from Mediterranean plants against *Verticillium dahliae* in olive. *Crop Protection*, 92 :168-175.
- Vasinauskiene M., Radusiene J., Zitikaite I., Surviliene E. (2006) Antibacterial activities of essential oils from aromatic and medicinal plants against growth of phytopathogenic bacteria. *Agronomical Research*, 4 (special issue), 437–440.
- Vidhyasekaran, P. (1992) *Principles of Plant Pathology*. CBS Printers and Publishers, New Delhi.
- Wallace R.J. (2004) Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proceedings of the Nutrition Society*. 63, 621–629.
- Walters D.R., Ratsep J., Havis N.D. (2013) Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of Experimental Botany*, 64:1263–1280.
- Wang Y., Li J., Hou S., Wang X., Li Y., Ren D., Chen S., Tang X., Zhou J.M. (2010) A *Pseudomonas syringae* ADP-ribosyltransferase inhibits *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinases. *Plant Cell*, 22:2033–2044.
- Wendakoon C. N., Sakaguchi M. (1995) Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *Journal of Food Protection*, vol. 58, pp. 280–283.
- Whalen M. C., Innes R. W., Bent A. F., and Staskawicz B. J. (1991) Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of *Arabidopsis* and a bacterial locus determining avirulence on both *Arabidopsis* and soybean. *Plant Cell*, 3:49-59.
- White D.G., Zhao S., Simjee S., Wagner D.D., McDermott P.F. (2002) Antimicrobial resistance of food-borne pathogens. *Microbes and Infection*, 4:405–412.
- Williams L.A.D., Porter R.B., Junora G.O. (2007) Biological Activities of Selected Essential Oils. *Natural Product Communications*, Vol. 2 (12) p.1295-1296
- Wojtaszek P. (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal*, 322:681–692.
- Wylie F.R., Speight M.R. (2012) *Insect pests in tropical forestry*. CABI Publishing, Wallingford, UK.

Xu X. (2010) Seed Transmission of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and Development of Strategies to Control the Pathogen in Seed. Dissertation, The Ohio State University.

Yoon H. S., Moon S. C., Kim N. D., Park B. S., Jeong M. H., Yoo Y. H. (2000) Genistein induces apoptosis of RPE-J cells by opening mitochondrial PTP. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol.276, no.1, pp.151–156.

Yunis H., Bashan Y., Okon Y., Hew Y. (1980) Weather dependence, yield losses and control of bacterial speck of tomato caused by *Pseudomonas tomato*. *Plant Disease*, 64: 937-939.

Zaccardelli M., Spasiano A., Bazzi C., Merighi M. (2005) Identification and in planta detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* using PCR amplification of hrpZPst. *European Journal of Plant Pathology*, 111:85–90.

Zhang J, Shao F, Li Y et al. (2007) A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host & Microbe*, 1:175–185.

Zhang J, Li W, Xiang T et al. (2010) Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune receptors and are targeted by a *Pseudomonas syringae* effector. *Cell Host & Microbe*, 7:290–301.

Zheljzakov V. D., Astatkie T., Schlegel V. (2012) Distillation Time Changes Oregano Essential Oil Yields and Composition but Not the Antioxidant or Antimicrobial Activities. *Horticultural Science*, 47(6):777–784.

5.2 ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Δόρδας, Χ. (2012) Αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά. Σύγχρονη παιδεία. Θεσσαλονίκη. σ.175, 279-283.

Ιορδανίδου Σ. (2011) Επίδραση αιθερίων ελαίων στους μηχανισμούς απόκρισης του *Arabidopsis thaliana* σε παθογόνους μικροοργανισμούς. Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, σ. 66.

Κατινάκη Π. Α. (2012) Μοριακή ανάλυση των εσωτερικών μεταγραφόμενων περιοχών των οπερονίων των ριβοσωμικών rRNA (ITS1 και ITS2) από τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια *Pseudomonas stutzeri*. Μεταπτυχιακή εργασία. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, σ.76.

Κατσιώτης Σ., Χατζοπούλου Π. (2010) Αρωματικά φαρμακευτικά φυτά και αιθέρια έλαια. Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη Α.Ε. Θεσσαλονίκη, σ.1008.

Παναγόπουλος Χ. (2007) Ασθενειες καρποφόρων δένδρων και αμπέλου. 4^η Έκδοση. Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης Α.Ε. Αθήνα, σ. 464.

Παναγόπουλος Χ. (2003) Ασθένειες καλλώπιστικών φυτών. Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης Α.Ε. Αθήνα, σ. 429.

Παναγόπουλος Χ. (2000) Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών. Β' Έκδοση. Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης Α.Ε. Αθήνα, σ. 480.

Στεφανάκη-Νικηφοράκη (1999) Συστηματική βοτανική Αγγειόσπερμα Τόμος Α' Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης Α.Ε. Αθήνα, σ.224.

Τζάμος Ε. (2007) Φυτοπαθολογία. Β' Έκδοση. Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης Α.Ε. Αθήνα, σ. 555.

5.3 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

[1] <http://www.plantwise.org/KnowledgeBank/Datasheet.aspx?dsid=45020>

[2] <http://extension.cropsciences.illinois.edu/fruitveg/pdfs/970.pdf>

[3] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=223283>

[4] <http://www.plantwise.org/knowledgebank/datasheet.aspx?dsid=15338>

[5] <http://www.cabi.org/isc/datasheet/15338>

[6] <http://www.plantwise.org/KnowledgeBank/Datasheet.aspx?dsid=56275>

[7] <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/VerticilliumWilt.aspx>

[8] [http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/
Article%20Images/VerticilliumWiltcycle.jpg](http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Article%20Images/VerticilliumWiltcycle.jpg)

[9] <http://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/Verticillium/Vertifin.htm>

[10] [http://u.osu.edu/vegetablediseasefacts/files/2014/05/disease-cycle-seedborne-
bacterial-2itlxwk.jpg](http://u.osu.edu/vegetablediseasefacts/files/2014/05/disease-cycle-seedborne-bacterial-2itlxwk.jpg)

[11] <http://www.e-geoponoi.gr/2012-02-11-12-59-06/5232--origanum-vulgare-.html>