

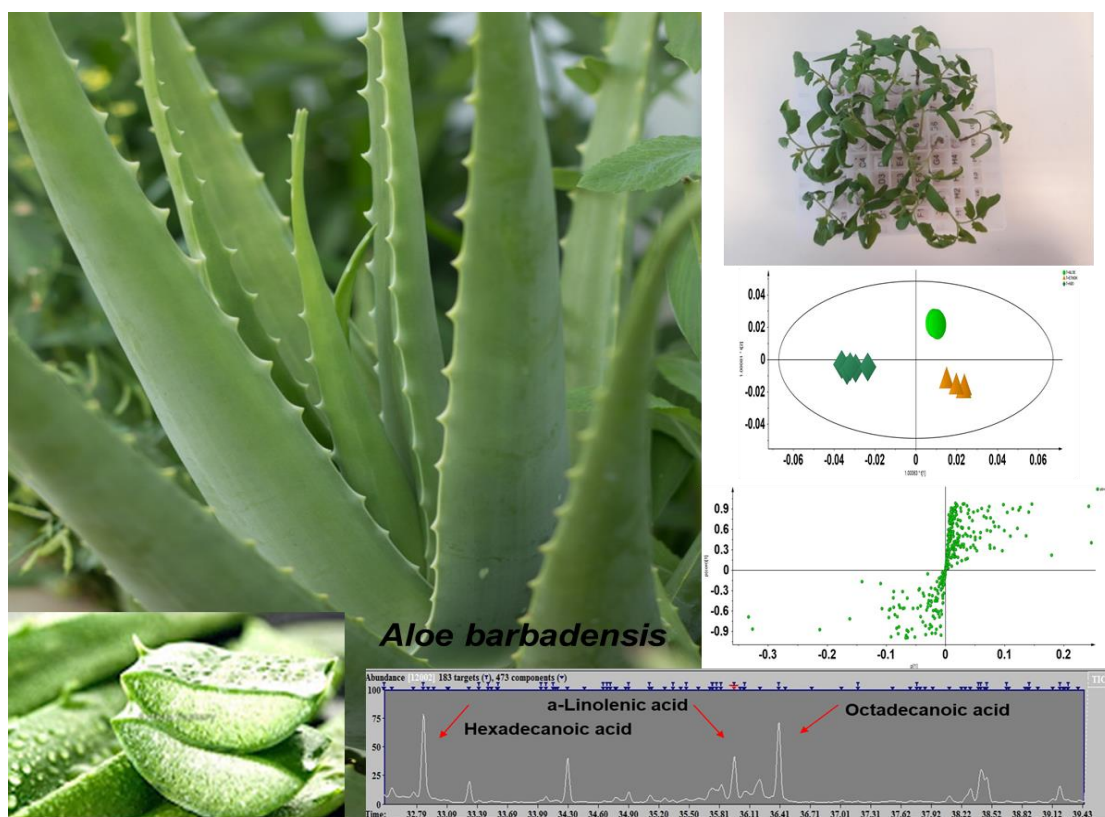
ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΥΠΟΔΟΜΩΝ
ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
Π.Μ.Σ. ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Αξιολόγηση της Χρήσης του Φαρμακευτικού Φυτού
Αλόη (*Aloe barbadensis* Miller) στη Φυτοπροστασία,
με Εφαρμογή Μεταβολομικής



Ελευθερία-Άννα Α. Πανταζή

Αθήνα 2019

Επιβλέπων: Κωνσταντίνος Αλιφέρης



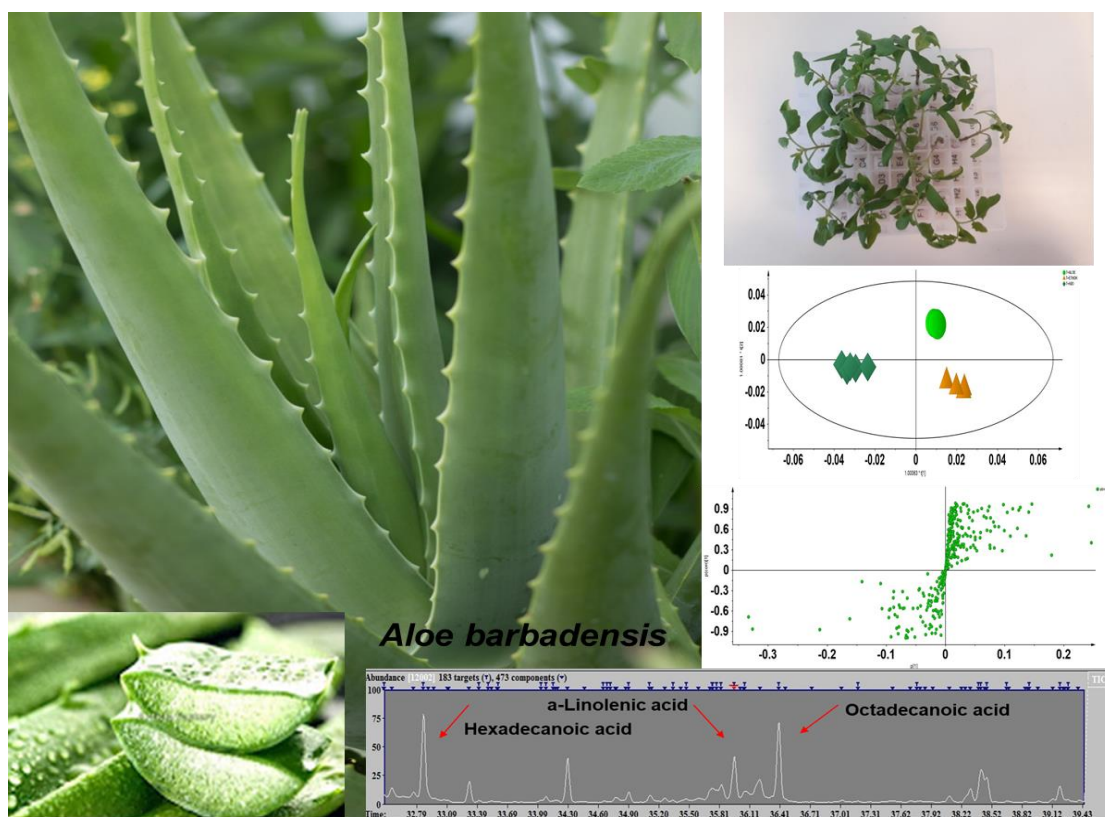
ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΥΠΟΔΟΜΩΝ
ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
Π.Μ.Σ. ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Αξιολόγηση της Χρήσης του Φαρμακευτικού Φυτού
Αλόη (*Aloe barbadensis* Miller) στη Φυτοπροστασία,
με Εφαρμογή Μεταβολομικής



Ελευθερία-Άννα Α. Πανταζή

Αθήνα 2019

Επιβλέπων: Κωνσταντίνος Αλιφέρης



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΥΠΟΔΟΜΩΝ
ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
Π.Μ.Σ. ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**Αξιολόγηση της Χρήσης του Φαρμακευτικού Φυτού
Αλόη (*Aloe barbadensis* Miller) στη Φυτοπροστασία,
με Εφαρμογή Μεταβολομικής**

Ελευθερία-Άννα Α. Πανταζή

Αθήνα 2019

Τριμελής εξεταστική Επιτροπή

Επιβλέπων: Αλιφέρης Κ.Α., Λέκτ. Γ.Π.Α, Καθ. McGill University

Μέλη: Φλουρή Φ., Λέκτορας Γ.Π.Α

Τζάμος Σ., Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α

Περίληψη

Οι τομείς της φυτοπροστασίας και αγροδιατροφής, αντιμετωπίζουν πολλά προβλήματα και προκλήσεις όπως η ανάπτυξη ανθεκτικών φυτοπαθογόνων οργανισμών και εχθρών σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα (Φ.Π.), η ύπαρξη υπολειμμάτων Φ.Π. στα τρόφιμα και το περιβάλλον και η κατάργηση πολλών δραστικών ουσιών (δ.ο.). Στη χώρα μας η καλλιέργεια της ελιάς (*Olea europaea*), αποτελεί μία από τις σημαντικότερες, αποφέροντας σημαντικό εισόδημα με όσους ασχολούνται με την παραγωγή και διάθεση των προϊόντων της. Οι ασθένειες και εχθροί που προσβάλλουν τη ελιά είναι πολυάριθμοι. Όσον αφορά τις μυκητολογικές ασθένειες, προσβολές από παθογόνα όπως το Βερτισίλλιο (*Verticillium dahliae* Kleb.) και το Γλοιοσπόριο (*Colletotrichum* sp.), προκαλούν σημαντικές απώλειες και υποβάθμιση της ποιότητας της παραγωγής. Στο πλαίσιο αυτό, η ανακάλυψη νέων, εναλλακτικών πηγών βιοδραστικότητας και η ανάπτυξη νέων παραγόντων φυτοπροστασίας εμφανίζουν αξιόλογη προοπτική προς αυτή την κατεύθυνση. Ανάμεσα σε αυτά, οι βιοδιεγέρτες, τα φυσικά προϊόντα, οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί και τα φαρμακευτικά φυτά αποτελούν από τα πιο σημαντικά. Στο πλαίσιο αυτό, επιλέχθηκε να μελετηθεί η δυνατότητα αξιοποίησης της βιοδραστικότητας του φαρμακευτικού φυτού Αλόη (*Aloe barbadensis* Miller) στη φυτοπροστασία της ελιάς. Επιπρόσθετα, αξιολογήθηκε *in vitro* η μυκοτοξικότητα αιθανολικών και μεθανολικών εκχυλισμάτων σε φυτοπαθογόνους μύκητες της ελιάς. Από τις βιοδοκιμές διαπιστώθηκε παρεμπόδιση στην ανάπτυξη των παθογόνων, με πιο μυκοτοξικό το εκχύλισμα μεθανόλης (MeOH) στο μύκητα Γλοιοσπόριο (*C. acutatum*). Ειδικότερα, μελετήθηκε η δυνατότητα αξιοποίησης εκχυλισμάτων του φυτού ως βιοδιεγέρτη στη φυτοπροστασία της ελιάς. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ως μοντέλα-οργανισμοί φυτάρια τομάτας (*Lycopersicum esculentum* L.), τα οποία εκτέθηκαν σε υδατικά και αιθανολικά εκχυλίσματα γέλης Αλόης. Ακολούθησε ανάλυσή τους με εφαρμογή GC/EI/MS και μεταβολομική ανάλυση των δεδομένων που ελήφθησαν για τη μελέτη της επίδρασής τους στο μεταβολισμό του φυτού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα που εφαρμόστηκαν προκάλεσαν αλλαγές στο μεταβολισμό του φυτού και στη βιοσύνθεση μεταβολιτών, όπως της α - α -τρεχαλόξης, GABA και

L-προλίνης, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στις αντιδράσεις των φυτών σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. Τα αποτελέσματα εμφανίζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για περαιτέρω έρευνα, καθώς τα εκχυλίσματα Αλόης φαίνεται πως μπορούν να αξιοποιηθούν στη φυτοπροστασία ως εναλλακτική πηγή βιοδραστικότητας και ενεργοποίησης των μηχανισμών άμυνας των φυτών σε συνδυασμό με ήδη εγκεκριμένα σκευάσματα.

Εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Λέξεις κλειδιά: Αλόη, βιοδιεγέρτης, μεταβολομική

Abstract

Plant protection is facing a lot of issues and challenges, such as the development of resistant to plant protection products (PPP) pests and pathogens, the presence of PPPs residues in food and the environment, and the banning of many PPP. In our country, the cultivation of olive (*Olea europaea*) is one of the most important, bringing significant incomes to those who produce and distribute its products. There are numerous diseases and enemies that infest *O. europaea*. Pathogens such as *Verticillium dahliae* and *Colletotrichum* sp. cause significant damage and degradation of the production quality. Within this context, it is very important to discover new, alternative sources of bioactivity and develop new PPPs. To this direction, bio-stimulants, natural products, endophytes and medicinal plants have a great potential. Here, we have evaluated the potential of extracts of the medicinal plant Aloe (*Aloe barbadensis* Miller) as a biostimulant in plant protection of the olive tree. Additionally, the mycotoxicity of ethanolic and methanolic extracts to phytopathogenic fungi of *O. europaea* was evaluated *in vitro*. Extracts exhibited a variable inhibitory effect on the pathogens, with methanol extracts being the most toxic against *Colletotrichum acutatum*. In particular, the possibility of exploiting plant extracts as a biostimulant in the olive plant protection was studied. For this purpose, tomato (*Lycopersicum esculentum* L.) was used as model organism, which was exposed to aqueous and ethanolic Aloe gel extracts, followed by GC/EI/MS analyses. Results revealed that the extracts being applied caused fluctuations of plants' metabolism and the biosynthesis of metabolites, such as, α - α -trehalose, GABA and *L*-proline, which play important roles, among others, to the reactions of plants to biotic and abiotic stresses. The results are of particular interest for further research, as Aloe extracts can be exploited in plant protection as an alternative source of bioactivity and activation of plant defense mechanisms in combination with already approved PPP's.

Laboratory of Pesticide Sciences, Agricultural University of Athens

Key words: *Aloe barbadensis*, bio-stimulant, metabolomics

Περιεχόμενα

Περίληψη	4
Abstract.....	6
Ευχαριστίες	10
Συντομογραφίες	11
1. Εισαγωγή	13
1.1 Φυτοπροστασία: προβλήματα και προκλήσεις	15
1.2 Η καλλιέργεια της ελιάς (<i>Olea europaea</i> L.) στην Ελλάδα	16
1.2.1 Μυκητολογικές ασθένειες της ελιάς	18
1.2.1.1 Βερτισίλλιο (<i>Verticillium dahliae</i> Kleb.)	18
1.2.1.2 Γλοιοσπόριο (<i>Colletotrichum</i> sp.)	20
1.3 Φυτοπροστατευτικά Προϊόντα: κατηγοριοποίηση και μηχανισμοί δράσης μυκητοκτόνων	22
1.3.1 Κατηγορίες μυκητοκτόνων και μηχανισμοί δράσης.....	24
1.3.2 Ανθεκτικότητα μυκήτων σε μυκητοκτόνα	26
1.4 Νέες πηγές βιοδραστικότητας για εφαρμογές στη φυτοπροστασία.....	27
1.4.1 Φαρμακευτικά Φυτά ως πηγές βιοδραστικότητας.....	29
1.4.2 Βιοδιεγέρτες: Ορισμός και διαχωρισμός τους από τα λιπάσματα ...	33
1.5 Αξιοποίηση φυτών και φυτικών προϊόντων στην φυτοπροστασία	35
1.6 Το φυτό της Αλόης (<i>Aloe barbadensis</i>).....	41
1.6.1 Ιστορικά στοιχεία	41
1.6.2 Ταξινόμηση και βοτανική περιγραφή	43
1.6.3 Χημική σύσταση	47
1.6.4 Χρήσεις.....	51
1.6.5 Επεξεργασία φύλλων Αλόης για χρήση στο εμπόριο	53
1.7 Εφαρμογή μεταβολομικής ανάλυσης στη φυτοπροστασία.....	54
2. Σκοπός.....	61
3. Υλικά και μέθοδοι	65

3.1 Χημικά και αντιδραστήρια	67
3.1.1 Χημικά και αντιδραστήρια για την εκχύλιση γέλης και φλοιού Αλόης	67
3.1.2 Χημικά και αντιδραστήρια για τη διεξαγωγή αναλύσεων μεταβολομικής φύλλων Αλόης και φυτών τομάτας	67
3.2 Βιολογικό υλικό	68
3.2.1 Φυτικό υλικό	68
3.2.1.1 Φύλλα Αλόης (<i>Aloe barbadensis</i> Miller)	68
3.2.1.2 Φυτά τομάτας (<i>Lycopersicum esculentum</i> L.)	69
3.2.2 Φυτοπαθογόνοι μύκητες που χρησιμοποιήθηκαν στις βιοδοκιμές αξιολόγησης της βιοδραστικότητας εκχυλισμάτων Αλόης.....	69
3.3 Καλλιέργεια φυτοπαθογόνων μυκήτων.....	69
3.4 Βιοδοκιμή για την <i>in vitro</i> αξιολόγηση της βιοδραστικότητας αιθανολικών και μεθανολικών εκχυλισμάτων Αλόης σε φυτοπαθογόνους μύκητες.....	71
3.5 Καλλιέργεια των φυταρίων τομάτας (<i>Lycopersicum esculentum</i>)	73
3.6 Προετοιμασία φύλλων Αλόης για ανάλυση μεταβολικής σύστασης	73
3.7 Προετοιμασία αιθανολικών και μεθανολικών εκχυλισμάτων Αλόης	75
3.8 Μεταβολομική μελέτη της επίδρασης αιθανολικών εκχυλισμάτων Αλόης στο μεταβολισμό φυταρίων τομάτας και αξιολόγηση της δράσης τους ως βιοδιεγέρτες	77
3.8.1 Πειραματικός σχεδιασμός και ανάπτυξη φυταρίων	77
3.8.2 Δειγματοληψία και προετοιμασία δειγμάτων.....	77
3.9 Ρυθμίσεις GC/MS για μεταβολομική ανάλυση	80
3.10 Βιοπληροφορική-μεταβολομική ανάλυση αποτελεσμάτων	82
4. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	83
4.1 Τα εκχυλίσματα Αλόης παρουσίασαν κυμαινόμενη βιοδραστικότητα στα στελέχη των φυτοπαθογόνων μυκήτων <i>Colletotrichum acutatum</i> και στο <i>Verticillium dahliae</i> Kleb στα οποία εφαρμόστηκαν	85
4.2 Μεταβολική σύσταση γέλης και φλοιού Αλόης.....	88

4.2.1 Μεταβολική σύσταση γέλης.....	88
4.2.2 Μεταβολική σύσταση φλοιού.....	92
4.3 Επίδραση των αιθανολικών εκχυλισμάτων Αλόης στο μεταβολισμό φυτών τομάτας	96
4.3.1 Επισκόπηση της μεταβολομικής ανάλυσης φυτών τομάτας μετά από εφαρμογή αιθανολικών εκχυλισμάτων Αλόης.....	96
4.3.2 Τα αιθανολικά εκχυλίσματα Αλόης επηρέασαν σημαντικά το μεταβολισμό των φυτών τομάτας στα οποία εφαρμόστηκαν	103
4.3.3 Μεταβολίτες-βιοσημαντές της επίδρασης του αιθανολικού εκχυλίσματος γέλης Αλόης σε φυτά τομάτας και ο ρόλος τους στο μεταβολισμό τους	108
4.3.3.1 Υδατάνθρακες	108
4.3.3.2 Αμινοξέα.....	111
4.3.3.4 Λιπαρά οξέα	114
5. Συμπεράσματα.....	115
Βιβλιογραφία.....	119

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας και την ομάδα «Pest Metabolomics Group» υπό την επίβλεψη του Δρ Κωνσταντίνου Αλιφέρη.

Το πρώτο πολύ μεγάλο ευχαριστώ το οφείλω στον Καθηγητή μου κ. Αλιφέρη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και μου ανέθεσε ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα για τη μεταπτυχιακή διατριβή μου. Θα ήθελα επίσης να τον ευχαριστήσω για τη συνεχή καθοδήγησή του και τις συμβουλές που μου έδινε.

Εν συνεχεία, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Φωτεινή Φλουρή Λέκτορα του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας και τον κ. Σωτήριο Τζάμο Επίκουρο Καθηγητή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας για τη συμμετοχή τους στην Τριμελή Εξεταστική Επιτροπή, αλλά και για τις πολύτιμες παρατηρήσεις και συμβουλές τους.

Επιπρόσθετα, θέλω να ευχαριστήσω την εταιρία ΒΟΙΩΝ ΑΛΟΗ ΒΕΡΑ ΙΚΕ, η οποία βρίσκεται στους Αγίους Αποστόλους Λακωνίας, για την συνεργασία τους και την προμήθεια φύλλων από φυτά Αλόης.

Έχω την ανάγκη να ευχαριστήσω ιδιαίτερα όλα τα μέλη του Pesticide Metabolomics Group, προπτυχιακούς, μεταπτυχιακούς και υποψήφιους Διδάκτορες για την άριστη συνεργασία που είχαμε. Κυρίως όμως, τον κ. Ιωάννη Καλαμπόκη και την κ. Μάιρα Λυκογιάννη υποψήφιους Διδάκτορες, για τις αμέτρητες φορές που με καθοδήγησαν και μου εξήγησαν οποιαδήποτε απορία μπορεί να είχα κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, αλλά και τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια κ. Δήμητρα Καραμάνου για όλες εκείνες τις φορές που με βοήθησε στη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Τέλος και ίσως το πιο σημαντικό, είναι η ευγνωμοσύνη που θέλω να εκφράσω σε όλη μου την οικογένεια. Χωρίς τη στήριξή τους, συναισθηματική και ουσιαστική σε κάθε μου βήμα, δε θα μπορούσα να έχω φτάσει ως εδώ.

Ελευθερία – Άννα Πανταζή

Συντομογραφίες

FRAC: Fungicide Resistance Action Committee

GC: Gas Chromatography – Αέρια Χρωματογραφία

HCA: Hierarchical cluster analysis

Kegg: Kyoto encyclopedia of Genes and Genomes

LC: Liquid Chromatography – Υγρή Χρωματογραφία

MS: Mass Spectrometry – Φασματοσκοπία Μάζας

NIST: National Institute of Standards and Technology

NMR: Nuclear Magnetic Resonance - Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού
Συντονισμού

OPLS-DA: Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis

PCA: Principal Component Analysis

PLS: Partial Least Squares

δ.ο.: Δραστική ουσία

Φ.Π.: Φυτοπροστατευτικά Προϊόντα

1. Εισαγωγή

1.1 Φυτοπροστασία: προβλήματα και προκλήσεις

Οι τομείς της φυτοπροστασίας και αγροδιατροφής είναι αντιμέτωποι με πληθώρα προβλημάτων και προκλήσεων. Οι βιομηχανίες αγροχημικών, επιδιώκουν την ανάπτυξη Φ.Π., τα οποία θα είναι πιο αποτελεσματικά, φιλικά τόσο στον άνθρωπο, όσο και στο περιβάλλον, από τα ήδη υπάρχοντα (Vurro et al., 2019). Επιπρόσθετα, τα Φ.Π., θα πρέπει να είναι οικονομικά για τον παραγωγό, αλλά παράλληλα να αποδίδουν κέρδος στις εταιρείες παραγωγής και πώλησής τους. Η ανάγκη των ανθρώπων για τροφή συνεχώς αυξάνονται, όπως αυξάνεται και ο παγκόσμιος πληθυσμός, ωστόσο ο αριθμός των διαθέσιμων Φ.Π. τείνει να μειώνονται (Copping and Hewitt, 2007).

Για να προκύψει ένα νέο σκεύασμα στην αγορά θα πρέπει, σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία, να περάσει από εξονυχιστικούς ελέγχους (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010). Οι έλεγχοι αυτοί αφορούν μελέτες για όλες τις δυσμενείς επιπτώσεις που μπορεί να έχει στον άνθρωπο και το περιβάλλον. Πιο συγκεκριμένα, ελέγχεται η οξεία και χρόνια τοξικότητα, η τύχη και συμπεριφορά του Φ.Π. και των υπολειμμάτων του στο περιβάλλον (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010). Πέρα από την τοξικότητα και αποτελεσματικότητα των υποψήφιων νέων σκευασμάτων, ένας εξίσου σημαντικός παράγοντας προς έλεγχο είναι η εκλεκτικότητα. Ο όρος εκλεκτικότητα αναφέρεται στην *«ελάχιστη ή μικρή τοξικότητα και υψηλή αποτελεσματικότητα ενός γεωργικού φαρμάκου»* (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 2008). Στην περίπτωση που ένα Φ.Π. εμφανίζει μικρή τοξικότητα και μεγάλη αποτελεσματικότητα, θεωρείται προϊόν με μεγάλη εκλεκτικότητα ή εκλεκτικό (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 2008).

Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα της σύγχρονης φυτοπροστασίας έγκειται στην κατάργηση παλαιών δ.ο. Αυτό μπορεί να συμβαίνει είτε επειδή δεν ενδιαφέρουν οικονομικά πλέον τις εταιρείες γιατί έχει σπάσει το πατέντο και δε συντρέχουν οι εμπορικοί λόγοι να συνεχιστεί η διάθεση του σκευάσματος, είτε εξαιτίας αυστηρών ορίων στους ελέγχους τοξικότητας και υπολειμματικότητας (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010). Συνεπώς, η δ.ο. αυτή θα αποσυρθεί από το εμπόριο και θα πάψει η χρήση της, οπότε θα πρέπει να βρεθούν και σε αυτή την περίπτωση άλλες που θα την αντικαταστήσουν.

Ένα άλλο εξίσου σημαντικό πρόβλημα που έχουν να αντιμετωπίσουν οι φαρμακοβιομηχανίες και οι ερευνητές, είναι η **ανθεκτικότητα** που έχουν αναπτύξει φυτοπαθογόνοι οργανισμοί σε δ.ο. που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμησή τους (περισσότερες πληροφορίες παρουσιάζονται στην §1.3.2). Σε αυτή την περίπτωση, θεωρείται αναγκαίο να βρεθεί κάποιο άλλο σκεύασμα, αν δεν υπάρχει ήδη, που θα αντικαταστήσει το προηγούμενο, εξασφαλίζοντας τα ίδια ή και καλύτερα αποτελέσματα.

Τέλος, δε θα πρέπει να παραληφθεί το θέμα των **υπολειμμάτων Φ.Π.** που χρησιμοποιούνται στις καλλιέργειες (Gevao et al., 2000). Όταν ένα σκεύασμα δε χρησιμοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες που αναγράφονται στην ετικέτα και εφαρμόζεται είτε μεγαλύτερη δόση από την επιτρεπόμενη, είτε περισσότερες επεμβάσεις από τις καθορισμένες, τότε στα προϊόντα που θα προκύψουν θα υπάρχουν υπολείμματα από Φ.Π., τα οποία είναι επιβλαβή τόσο για την υγεία των καταναλωτών όσο και για το περιβάλλον (Jäger, 2019).

Με βάση τα παραπάνω, είναι φανερό ότι ο τομέας της φυτοπροστασίας έρχεται αντιμέτωπος καθημερινά με πολλά προβλήματα και προκλήσεις, τα οποία πρέπει να ξεπεραστούν με σκοπό την αύξηση της παραγωγικότητας και συνεπώς του εισοδήματος των παραγωγών. Μία από τις σημαντικότερες καλλιέργειες στην Ελλάδα, η ελιά (*Olea europaea* L.), προσβάλλεται από πληθώρα εχθρών και ασθενειών. Ο τομέας της έρευνας και ανάπτυξης της φυτοπροστασίας της ελιάς καλείται να βρει λύσεις και να αναπτύξει νέα, εναλλακτικά Φ.Π. σύμφωνα με τις σύγχρονες απαιτήσεις.

1.2 Η καλλιέργεια της ελιάς (*Olea europaea* L.) στην Ελλάδα

Η ελιά (*O. europaea*), είναι μία από τις πιο σημαντικές καλλιέργειες στην Ελλάδα. Είναι αειθαλές δέντρο ή θάμνος που μπορεί να φτάσει τα 3 έως 6m ύψος, με άκαμπτα κλαδιά και γκρίζο φλοιό. Τα φύλλα είναι λογχοειδή με σκούρο πράσινο χρώμα στην επάνω πλευρά, ενώ είναι πιο ανοιχτό στην

κάτω, τα άνθη μικρά και λευκά και ο καρπός δρύπη, με πυρήνα στο κέντρο. (Khan et al., 2007).

Ανήκει στην τάξη *Contortae*, το γένος *Olea* και την οικογένεια *Oleaceae*. Στην οικογένεια αυτή ανήκουν πάνω από 35 είδη (Jiménez-Díaz et al., 2012). Το είδος με το μεγαλύτερο οικονομικό ενδιαφέρον είναι η *Olea europaea* (Rugini and Fedeli, 1990). Από το είδος αυτός παράγεται το παρθένο ελαιόλαδο, το οποίο ξεχωρίζει για τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά, αλλά και τις διατροφικές του ιδιότητες (Khan et al., 2007).

Από αρχαιολογικές μελέτες γίνεται φανερό πως η καλλιέργεια της ελιάς ήταν σημαντική από τα αρχαία χρόνια. Λέγεται πως για πρώτη φορά εμφανίστηκε το 4000 π.Χ στην Παλαιστίνη. Στην Ελλάδα βρέθηκε γύρω στο 2500 π.Χ, καθώς μεταφέρθηκε από τη Δύση προς την Ανατολή με τους Φοίνικες, Ετρούσκους, Έλληνες και τους Ρωμαίους (Terral et al., 2004). Ιδιαίτερα για τον ελληνικό πολιτισμό θεωρείται σύμβολο ειρήνης και σοφίας, καθώς ακόμη και στους Ολυμπιακούς αγώνες ήταν το έπαθλο των νικητών. Επιπροσθέτως, τόσο το λάδι όσο και οι ελιές αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφής των Ελλήνων, αλλά και του προτύπου της Μεσογειακής διατροφής.

Η καλλιέργεια της ελιάς είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη όχι μόνο στην Ελλάδα, αλλά και σε πληθώρα χωρών της Μεσογείου και της Μέσης Ανατολής, όπου το κλίμα είναι εύκρατο, με ήπιου χειμώνες και ξηρά καλοκαίρια (Therios, 2009). Εξαιτίας της πολύ μεγάλης σημασίας της ελιάς, δεν είναι λίγες οι έρευνες που έχουν γίνει για τη βελτίωση της φυτοπροστασίας της και την καταπολέμηση των εχθρών και ασθενειών που την προσβάλλουν. Οι ασθένειες που προσβάλλουν τα δέντρα της ελιάς είναι μυκητοκοιολογικές, βακτηριολογικές, αλλά και ιολογικές, με τις πρώτες να εμφανίζουν ιδιαίτερο φυτοπαθολογικό ενδιαφέρον.

1.2.1 Μυκητολογικές ασθένειες της ελιάς

Πολλοί φυτοπαθογόνοι μύκητες, φυλλώματος και εδάφους, προσβάλλουν την ελιά, με σημαντικές περιοδικές εξάρσεις τα τελευταία χρόνια (Baptista et al., 2019). Το ζήτημα αυτό αποτελεί πρόκληση για τη φυτοπροστασία, η αντιμετώπιση του οποίου απαιτεί νέες, καινοτόμες λύσεις (Martí et al., 2019).

Μερικοί από τους πιο σημαντικούς μύκητες που προσβάλλουν την ελιά είναι το Κυκλοκόνιο (*Spilocaea oleaginea*), το Βερτισίλλιο (*Verticillium dahliae* Kleb.), το Γλοιοσπόριο (*Colletotrichum* sp.), η Κερκόσπορα (*Cercospora beticola*) και η Φόμα (*Phoma incompta*). Ως ιδιαίτερα δύσκολες στην αντιμετώπιση και εξαιτίας των πολύ σοβαρών απωλειών που προκαλούν, επιλέχθηκαν να μελετηθούν το *V. dahliae*, για το οποίο μάλιστα δεν υπάρχει εγκεκριμένο χημικό σκεύασμα για την αντιμετώπισή του και το *Colletotrichum* sp.

1.2.1.1 Βερτισίλλιο (*Verticillium dahliae* Kleb.)

Μία από τις πιο σοβαρές και ιδιαίτερα δύσκολες στην αντιμετώπιση ασθένειες της ελιάς είναι η Βερτισιλλίωση. Η ασθένεια αυτή προκαλείται από το φυτοπαθογόνο μύκητα, *Verticillium dahliae* (**Εικόνα 1**), οποίος μπορεί να προκαλέσει σημαντικότερες ζημιές στην καλλιέργεια (Martí et al., 2019). Η ελιά θεωρείται ένας από τους πιο ευάλωτους ξενιστές του συγκεκριμένου παθογόνου (Antonίου et al., 2008).

Το *V. dahliae* επιβιώνει για πολλά χρόνια (8-14 χρόνια) στο έδαφος, μέσω ειδικών μορφών επιβίωσης που δημιουργεί, των μικροσκληρωτίων. Η μόλυνση γίνεται από τις ρίζες με απευθείας είσοδο του μύκητα ή από πληγές που μπορεί να έχουν δημιουργηθεί από νηματώδεις, έντομα ή καλλιεργητικά μηχανήματα. Η ανάπτυξη του παθογόνου μύκητα ευνοείται σε θερμοκρασίες 21-27°C, ωστόσο μπορεί να προσβάλλει το δέντρο όλη τη διάρκεια του χρόνου (Παναγόπουλος, 1997).

Τα συμπτώματα (**Εικόνα 1**) που προκαλεί το *V. dahliae* στα δέντρα της ελιάς είναι τα τυπικά των αδρομυκώσεων και διαφέρουν ανάλογα με την ηλικία

των φυτών. Στα νεαρά δέντρα τα πρώτα συμπτώματα εμφανίζονται νωρίς την άνοιξη με αποχρωματισμό των φύλλων και αποφύλλωση μεγάλης έκτασης του δέντρου. Δέντρα ηλικίας 5-15 ετών είναι πιθανό να νεκρωθούν εντελώς. Σε δέντρα μεγάλης ηλικίας, ακόμη και αυτά που είναι άνω των 100 ετών, η ασθένεια δεν προκαλεί νέκρωση του δέντρου αλλά μερική αποφύλλωση. Ενδέχεται τα προσβεβλημένα δέντρα να καταφέρουν να ανακάμψουν εμφανίζοντας προοδευτικά μείωση των συμπτωμάτων (Colella et al., 2008).

Για την αποτελεσματική αντιμετώπιση του παθογόνου θεωρείται ιδιαίτερα σημαντικό να ληφθούν τα κατάλληλα προληπτικά μέτρα προστασίας, καθώς δεν υπάρχει εγκεκριμένο σκεύασμα που να καταπολεμά τον μύκητα. Μεγάλης σημασίας είναι η χρήση της σωστής μεθόδου άρδευσης, ώστε να περιορίζεται η μετάδοση του παθογόνου με το νερό. Επίσης, ίσως το πιο σημαντικό είναι να χρησιμοποιούνται ποικιλίες ανθεκτικές στο *V. dahliae*. Επιπρόσθετα, ο βιολογικός τρόπος αντιμετώπισης είναι πολλά υποσχόμενος, δίνοντας έμφαση σε βιοδιεγέρτες αλλά και μύκητες ή βακτήρια που θα δουν ως ανταγωνιστές ενάντια στο παθογόνο (Tjamos, 1993). Για το λόγο αυτό, θα πρέπει να γίνουν περαιτέρω έρευνες, ώστε να προκύψει κατάλληλη μέθοδος αντιμετώπισης της ασθένειας.



Εικόνα 1 Καλλιέργεια *Verticillium dahliae* Kleb σε τρυβλίο και συμπτώματα αδρομύκωσης (ημιπληγία) που προκαλεί σε δέντρα ελιάς

1.2.1.2 Γλοιοσπόριο (*Colletotrichum* sp.)

Το Γλοιοσπόριο (*Colletotrichum* sp.) (**Εικόνα 2**) είναι μία ιδιαίτερα καταστροφική ασθένεια, που προσβάλλει την ελιά και βρίσκεται σε έξαρση τα τελευταία χρόνια. Αξίζει να σημειωθεί πως η ασθένεια είναι γνωστή από το 1930 στην Ισπανία, όπου την αποκαλούσαν «σαπούνι φρούτων», ενώ στην Ιταλία εμφανίστηκε λίγο αργότερα, το 1950 και έμεινε στην ιστορία ως «λέπρα» (Cacciola et al., 2012). Στην Ελλάδα εμφανίστηκε το 1920, στην Κέρκυρα, όπου προκλήθηκαν πολύ σοβαρές επιδημιολογικές ζημιές (Petri, 1930).

Τα είδη Γλοιοσπορίου που προσβάλλουν την ελιά ανήκουν στο γένος *Colletotrichum*, ωστόσο το αίτιο της ασθένειας φαίνεται να ανήκει στο μύκητα *Gloeosporium olivarum*, το οποίο οι von Arx and Adolf, 1970 και Sutton, 1992 αποφάσισαν να εισάγουν στο σύμπλοκο ειδών του *Colletotrichum gloeosporioides* (Martín and García-Figueres, 1999). Η ασθένεια επίσης, μπορεί να προκληθεί από το *Colletotrichum acutatum*, το οποίο συχνά συνυπάρχει με το *C. gloeosporioides* (Cacciola et al., 2012).

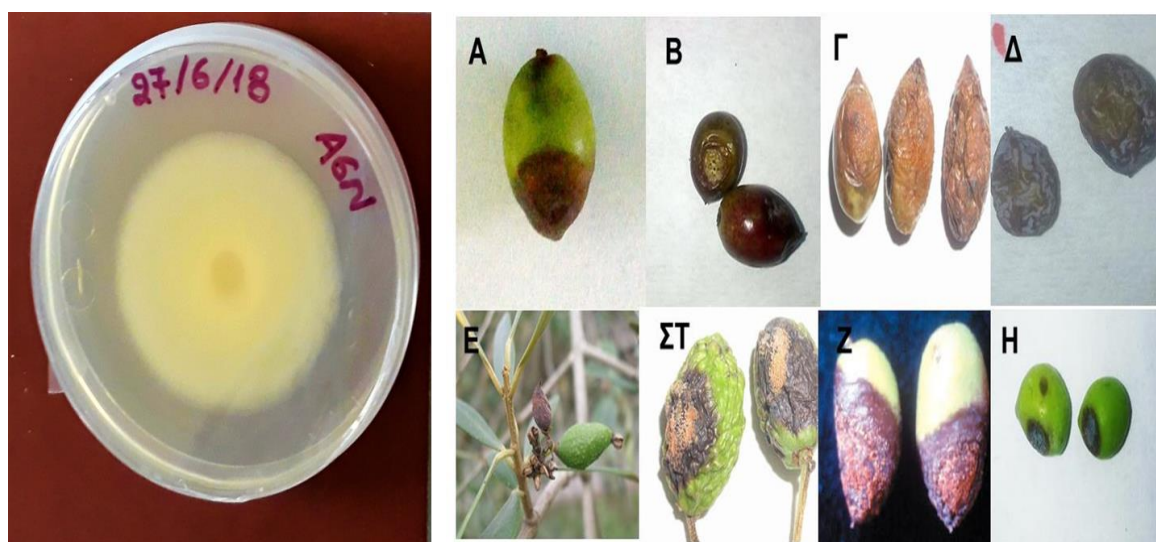
Η ασθένεια που προκαλεί το *Colletotrichum* sp. στην ελιά είναι γνωστή και ως ανθράκωση. Τα κονίδια του μύκητα επιβιώνουν στους μούμιοποιημένους καρπούς της που έχουν παραμείνει πάνω στο δέντρο ή που έχουν πέσει από αυτό. Μάλιστα, καθώς πέφτουν οι καρποί στο έδαφος διασκορπίζονται τα κονίδια και εξαπλώνονται με αποτέλεσμα να μεταδίδεται η ασθένεια και σε άλλα δέντρα (Moral et al., 2009).

Τα συμπτώματα (**Εικόνα 2**) που προκαλεί το παθογόνο είναι κυρίως νεκρώσεις σε καρπούς, άνθη, φύλλα. Η προσβολή στους καρπούς αρχίζει με την εμφάνιση σε ένα σημείο της επιφάνειας καστανέρυθρης κηλίδας, η οποία εξαπλώνεται πολύ γρήγορα στο μεγαλύτερο μέρος ή σε ολόκληρη την επιφάνεια του καρπού (Peres et al., 2005). Η προσβολή των φύλλων και των βλαστών από το *Colletotrichum* sp. δεν εμφανίζει οικονομική σημασία στη χώρα μας (Παναγόπουλος, 1997).

Όσον αφορά την αντιμετώπιση του παθογόνου, αξίζει να αναφερθεί πως η πρώιμη συγκομιδή του καρπού παίζει πολύ σημαντικό ρόλο, καθώς με τον τρόπο αυτό αποφεύγονται οι δευτερογενείς μολύνσεις εξαιτίας τυχόν

νυγμάτων που μπορεί να προκύψουν από προσβολές του δάκου στους καρπούς. Επιπρόσθετα, το κατάλληλο κλάδεμα των δέντρων συμβάλλει στην εξασφάλιση καλού αερισμού και στον περιορισμό της υγρασίας του ελαιόδεντρου. Επίσης, η αφαίρεση και καταστροφή προσβεβλημένων οργάνων όπως βλαστών με ασθενείς ταξιανθίες και μουμιοποιημένων καρπών βοηθάει στην αντιμετώπιση της ασθένειας και στη μείωση του μολύσματος για την επόμενη χρονιά (Cacciola et al., 2012).

Επιπρόσθετα, για την καταπολέμηση του παθογόνου υπάρχουν εγκεκριμένα Φ.Π. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν 7 δ.ο. με έγκριση για την καταπολέμηση του Γλοιοσπορίου στη χώρα μας. Οι δ.ο. αυτές είναι το Bordeaux mixture, Copper hydroxide, Copper oxychloride, Mancozeb και το Tribasic copper sulfate, Pyraclostrobin, Dodine (ΥΠΠΑΤ, 2019).



Εικόνα 2 Καλλιέργεια *Colletotrichum acutatum* σε τρυβλίο και τα συμπτώματα που προκαλεί σε καρπούς ελιάς. Εξάπλωση της προσβολής στο μεγαλύτερο μέρος τους (Α), Βύθιση των προσβεβλημένων ιστών των κηλίδων και κάλυψη από τις καρποφορίες του μύκητα που εμφανίζονται ως μαύρα στίγματα (Β), Εκτεταμένη σήψη (Γ), Μουμιοποίηση (Δ), Εξέλιξη των κηλίδων σε συγκεντρικούς κύκλους, ξεκινώντας από το κέντρο της προσβολής (Ε), Έναρξη της προσβολής από την κορυφή σε καρπούς επιμήκους σχήματος (ΣΤ), Προσβολή σε μικρότερο στάδιο ανάπτυξης (Ζ) και (Η) (Κωλέττη et al., 2018, Κολαϊνής et al., 2018)

Παρόλη την έρευνα και προσπάθεια που έχει για την αντιμετώπιση των παραπάνω δυο ασθενειών και τη μείωση των αντίστοιχων απωλειών που

προκαλούν, σήμερα αυτές αποτελούν δύο από τα πιο σημαντικά προβλήματα της ελαιοκαλλιέργειας προκαλώντας σημαντικές απώλειες. Για το λόγο αυτό, η έρευνα σχετική με την ανακάλυψη, αξιολόγηση και αξιοποίηση νέων πηγών βιοδραστικότητας θα μπορούσε να αποτελέσει λύση στο πρόβλημα αυτό.

1.3 Φυτοπροστατευτικά Προϊόντα: κατηγοριοποίηση και μηχανισμοί δράσης μυκητοκτόνων

Τα Φ.Π. αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της γεωργικής πρακτικής. Χωρίς φυτοφάρμακα υπάρχουν καλλιέργειες που θα είχαν εξαφανιστεί. Ωστόσο, εξαιτίας μιας σειράς παραγόντων που αφορούν κυρίως την ασφάλεια των καταναλωτών αλλά και του περιβάλλοντος, οι αγροβιομηχανίες έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τους σε εναλλακτικούς τρόπους καταπολέμησης εχθρών και παθογόνων που προσβάλλουν τις καλλιέργειες, προς αντικατάσταση των χημικών Φ.Π. (Copping and Hewitt, 2007).

«Φ.Π. (**Plant Protection Products**) είναι κάθε ουσία ή μίγμα ουσιών που έχει ως στόχο την παρεμπόδιση, την καταστροφή ή την απώθηση ενός φυτοπαρασίτου, καθώς και τη ρύθμιση της ανάπτυξης και εξέλιξης των φυτών» (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010) Χωρίζονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τον εχθρό του οποίου τη δράση επηρεάζουν. Συνεπώς υπάρχουν μυκητοκτόνα, βακτηριοκτόνα, εντομοκτόνα, ακαρεοκτόνα κ.α. Στην κατηγορία των Φ.Π. συγκαταλέγονται και οι φυτορυθμιστικές ουσίες (Growth Regulators), οι οποίες σε μικρές συγκεντρώσεις μπορούν να επηρεάσουν την αύξηση και ανάπτυξη των φυτών. Τέλος, στην κατηγορία αυτή ανήκουν και τα βιοφυτοφάρμακα (biopesticides), που έχουν ως δραστικό συστατικό κάποιο μύκητα, βακτήριο ή ιό (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010). Στον **Πίνακα 1**, παρουσιάζονται συνοπτικά οι κατηγορίες των Φ.Π. και οι χρήσεις τους.

Αξιοσημείωτο είναι ότι τα τελευταία 25 χρόνια υπάρχει μία αυξανόμενη τάση αγοράς ζιζανιοκτόνων σε σχέση με άλλα Φ.Π. Από την άλλη, όσον αφορά τα εντομοκτόνα και μυκητοκτόνα, υπάρχει μία έντονη δραστηριότητα των φαρμακοβιομηχανιών να αναζητούν φυσικά προϊόντα, αντί για χημικώς συντιθέμενα (Dayan et al., 2009).

Πίνακας 1 Οι σημαντικότερες κατηγορίες των φυτοπροστατευτικών προϊόντων και η δράση τους (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2010)

Κατηγορίες Φ.Π.	Δράση
Ακαρεοκτόνα (Acaricides / Miticides)	Ακάρεα
Βακτηριοκτόνα (Bactericides)	Βακτήρια
Μυκητοκτόνα (Fungicides)	Μύκητες
Ζιζανιοκτόνα (Herbicides)	Ζιζάνια
Εντομοκτόνα (Insecticides)	Έντομα
Νηματωδοκτόνα (Nematicides)	Νηματώδεις
Κοχλιολειμακοκτόνα (Molluscicides)	Κοχλίες και λείμακες
Τρωκτικοκτόνα (Rodenticides)	Τρωκτικά
Απολυμαντικά (Disinfectants)	Καταπολέμηση μικροοργανισμών
Αποξηραντικά (Desiccants)	Επιτάχυνση ξήρανσης φύλλων
Αποφυλλωτικά (Defoliants)	Πρόκληση πτώσης φύλλων
Απωθητικά (Repellents)	Απώθηση εντόμων, ακάρεων ή σπονδυλωτών
Ελκυστικά (Attractants)	Προσέλκυση εντόμων
Ρυθμιστές αύξησης (Growth Regulators)	Επιρροή ανάπτυξης φυτών
Υποκαπνιστικά (Fumigants)	Πτητικές ενώσεις για καταπολέμηση εντόμων, τρωκτικών και μικροοργανισμών σε αποθήκες συσκευαστήρια, έδαφος και αποθηκευμένα προϊόντα
Φερομόνες (Pheromones)	Προσέλκυση εντόμων

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι αναμένεται να αυξηθεί ο πληθυσμός της γης ως το 2050 και να ξεπεράσει τα 11 δις. Την ίδια στιγμή οι καλλιεργήσιμες εκτάσεις ενδέχεται είτε να παραμείνουν ίδιες είτε να μειωθούν λόγω περιβαλλοντικών αλλαγών. Συνεπώς, θα πρέπει να βρεθεί τρόπος να αυξηθεί η παραγωγή τροφίμων, ώστε να φτάνει για την επιβίωση των κατοίκων της γης. Ο μόνος τρόπος για να γίνει αυτό είναι η βελτίωση της φυτοπροστασίας των καλλιεργειών. Η τεχνολογία και η έρευνα θα πρέπει να συμβάλλουν με το έργο τους, ώστε να επιτευχθεί ο στόχος αυτός (Copping and Hewitt, 2007).

Ανάμεσα στους οργανισμούς που προκαλούν τις πιο σημαντικές ζημιές στην παραγωγή τροφίμων είναι οι μύκητες.

1.3.1 Κατηγορίες μυκητοκτόνων και μηχανισμοί δράσης

Σε σχέση με τους «ορατούς» επιβλαβείς οργανισμούς (έντομα, ζιζάνια) των καλλιεργούμενων φυτών, οι μύκητες πέρα από τα συμπτώματα που προκαλούν δε μπορούν να γίνουν ορατοί με γυμνό οφθαλμό. Μέχρι πριν από 20-30 χρόνια, τα περισσότερα μυκητοκτόνα που κυκλοφορούσαν στο εμπόριο είχαν μη-εξειδικευμένο τρόπο δράσης, ήταν δηλαδή γενικοί αναστολείς ενζύμων (Brent and Hollomon, 1995), συνεπώς δεν ήταν δυνατός ο εντοπισμός των θέσεων δράσης. Ακολούθησε, η ανακάλυψη των μυκητοκτόνων με εξειδικευμένο τρόπο δράσης, δηλαδή βιοδραστικών ουσιών που έχουν ένα μόνο κύριο σημείο δράσης και έτσι άρχισε να γίνεται γνωστός ο τρόπος και μηχανισμός δράσης των διαφόρων μυκητοκτόνων ενάντια στους φυτοπαθογόνους μύκητες (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 2008). Στον **Πίνακα 2**, γίνεται αναφορά στις ομάδες των μυκητοκτόνων ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους και τις χημικές ομάδες που ανήκουν σε κάθε κατηγορία.

Μεγάλος αριθμός δ.ο., που χρησιμοποιούνταν κατά κόρον στο παρελθόν, σήμερα έχουν αποσυρθεί, είτε λόγω των επικίνδυνων επιπτώσεων που προκαλούν στο περιβάλλον και την τροφική αλυσίδα εξαιτίας των υπολειμμάτων που δημιουργούν στα τρόφιμα, είτε επειδή έχουν καταστεί αναποτελεσματικές εξαιτίας της αυξανόμενης ανθεκτικότητας στα Φ.Π. (Vurro et al., 2019). Επίσης, ασθένειες όπως αυτή που προκαλεί το *V. dahliae* δεν μπορούν να αντιμετωπιστούν με κάποιες από τις ήδη εγκεκριμένες δ.ο. και παθογόνα της ελιάς έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα σε Φ.Π. (Κωλέττη et al., 2018, Κολαϊνής et al., 2018).

Πίνακας 2 Κατηγορίες μυκητοκτόνων, ομαδοποιημένες σύμφωνα με τον τρόπο δράσης τους και οι σημαντικότερες χημικές ομάδες που τις αποτελούν (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 2008, Aliferis and Jabaji, 2011, Russell, 2004)

Ομάδες μυκητοκτόνων ανάλογα με τον τρόπο δράσης	Χημικές ομάδες
Προστατευτικά με μη-εκλεκτικό τρόπο δράσης	Θειάφι, χαλκούχα, διμεθυλο-διθειοκαρβαμιδικά, αιθυλενο-δισ-διθειοκαρβαμιδικά, φθαλιμίδια, κινόνες
Μυκητοκτόνα που παρεμβαίνουν στις διαδικασίες παραγωγής ενέργειας των κυττάρων (αλυσίδα αναπνοής)	Οξαθειίνες, στρομπιλουρίνες, οξαζολιδινόνες, κυανιούχα ιμιδαζόλια, νιτροφαινόλες
Μυκητοκτόνα που επηρεάζουν τις μεμβράνες και την εναπόθεση συστατικών κυτταρικών τοιχωμάτων	Δικαρβοξιμίδια, αρωματικά μυκητοκτόνα, αμίδια καρβοξυλικών οξέων
Μυκητοκτόνα που παρεμβαίνουν στις βιοσυνθετικές διεργασίες των μυκήτων	
α) Αναστολείς βιοσύνθεσης νουκλεϊκών οξέων	Φαινυλαμίδια, πυριμιδίνες
β) Αναστολείς βιοσύνθεσης αμινοξέων	Ανιλινο-πυριμιδίνες
γ) Αναστολείς βιοσύνθεσης εργοστερόλης ή γενικά στερολών	Τριαζόλια, ιμιδαζόλια, πυριμιδίνες (με 2 ή 1 άτομο αζώτου), μορφολίνες, πιπεριδίνες, πιπεραζίνες, σπιροκεταλαμίνες, υδροξυ-ανιλίδια
δ) Αναστολείς βιοσύνθεσης μελανίνης, χιτίνης και λεκιθινών	
Αναστολείς βιοσύνθεσης πρωτεϊνών	Αντιβιοτικά
Μυκητοκτόνα που παρεμβαίνουν στη μίτωση	Βενζιμιδαζολικά, αμίδια
Μυκητοκτόνα που παρεμβαίνουν στη μετάδοση μηνυμάτων	Φαινυλοπυρρόλια,
Μυκητοκτόνα που επηρεάζουν τις σχέσεις ξενιστών-παθογόνων και διεγείρουν αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών	Ενεργοί και παθητικοί μηχανισμοί δράσης των φυτών εναντίον παθογόνων (γονίδια ανθεκτικότητας, εκδήλωση υπερευαισθησίας)
Μυκητοκτόνα με άγνωστο τρόπο δράσης	Cymoxanil, fosetyl-aluminium, οργανοφωσφορικά (pyrazophos, ditalimfos), αντιβιοτικά (gilodoxin, aureofungin)

*Αντιβιοτικά: ουσίες που παράγονται από μικροοργανισμούς και δρουν εκλεκτικά ενάντια σε άλλους μικροοργανισμούς. **Γονίδια ανθεκτικότητας: γονίδια, που υπάρχουν στο γένωμα των φυτών και ενεργοποιούνται όταν αναγνωρίσουν την παρουσία κάποιου παθογόνου μικροοργανισμού ή στρεσογόνου παράγοντα. ***Εκδήλωση υπερευαισθησίας (Hypersensitive Response): επαγωγή μηχανισμών άμυνας των φυτών, όπως ταχείας νέκρωση των κυττάρων γύρω από το σημείο προσβολής από κάποιο παθογόνο.

1.3.2 Ανθεκτικότητα μυκήτων σε μυκητοκτόνα

Η ύπαρξη πολλών και διαφορετικών μεθόδων δράσης των μυκητοκτόνων οφείλεται κυρίως στη ανθεκτικότητα που έχουν αναπτύξει οι φυτοπαθογόνοι μύκητες ενάντια σε αυτά. Για τον έλεγχο της ανθεκτικότητας, θεσπίστηκε το 1994 η Επιτροπή δράσης ανθεκτικότητας στα μυκητοκτόνα (Fungicide Resistance Action Committee-FRAC) (Brent and Hollomon, 1995). Σύμφωνα με τη FRAC, ο όρος ανθεκτικότητα σε μυκητοκτόνα αναφέρεται στην επίκτητη, κληρονομική μείωση της ευαισθησίας ενός μύκητα σε ένα συγκεκριμένο αντιμυκητιακό παράγοντα (Russell, 2004).

Η ανθεκτικότητα στα μυκητοκτόνα αποτέλεσε μείζον ζήτημα για τις βιομηχανίες αγροχημικών και σκοπός τους ήταν να ανταποκριθούν όσο το δυνατόν καλύτερα σε απρόβλεπτες εξάρσεις ασθενειών (Brent and Hollomon, 1995). Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στους μύκητες είναι μια εξελικτική διαδικασία, καθώς οι γονότυποι των μυκήτων μεταβάλλονται και ανασυνδυάζονται διαρκώς. Οι αλλαγές αυτές μπορούν να προσφέρουν στο μύκητα είτε πλεονέκτημα, είτε μειονέκτημα όσον αφορά την επιβίωσή του και την προσαρμοστικότητά του. Όταν επικρατούν οι πλεονεκτικές αλλαγές, ο μύκητας μπορεί να επιβιώσει σε αντίξοες συνθήκες, αλλά και να αναπαραχθεί και μάλιστα σε μεγαλύτερους ρυθμούς. Έτσι, οι απόγονοί του επιβιώνουν και αποτελούν μεγαλύτερο ποσοστό του πληθυσμού από ότι πριν. Αυτή είναι μία διαδικασία που μπορεί να γίνει γρήγορα, διότι η αναπαραγωγική συχνότητα στους μύκητες είναι υψηλή. Το μυκητοκτόνο θα ασκήσει πίεση επιλογής στον αρχικό-άγριο πληθυσμό των μυκήτων και θα τους σκοτώσει, αλλά στους μεταβληθέντες-μεταλλαγμένους οργανισμούς δε θα έχει επίδραση (Russell, 2004).

Θεωρείται πολύ σημαντικό το θέμα της παρακολούθησης της ανθεκτικότητας των μυκήτων απέναντι στα διάφορα μυκητοκτόνα. Η ευαισθησία των μυκήτων μπορεί να μελετηθεί σε συνθήκες εργαστηρίου, όπως πραγματοποιήσαμε στη συγκεκριμένη μελέτη, αλλά ακόμη και σε ζωντανό φυτικό υλικό (Russell, 2004).

Ιδιαίτερα σημαντική θεωρείται η ανάπτυξη νέων πηγών βιοδραστικότητας, οι οποίες θα συμβάλλουν ενεργά στην καταπολέμηση του φαινομένου της

ανθεκτικότητας φυτοπαθογόνων σε Φ.Π. και θα βοηθήσουν στην εξέλιξη της φυτοπροστασίας.

1.4 Νέες πηγές βιοδραστικότητας για εφαρμογές στη φυτοπροστασία

Η εξέλιξη της φυτοπροστασίας βασίζεται κατά ένα μεγάλο ποσοστό στις νέες πηγές βιοδραστικότητας που θα βρεθούν μέσα στα επόμενα χρόνια. Σε αυτό το κομμάτι έρχονται να συμβάλλουν ενεργά έννοιες όπως η νανοτεχνολογία, οι ενδοφυτικοί οργανισμοί, αλλά και οι βιοδιεγέρτες.

Δεν είναι λίγοι εκείνοι που πιστεύουν πως οι σύγχρονες τεχνολογίες θα εξασφαλίσουν τις όλο και περισσότερο αυξανόμενες ανάγκες των ανθρώπων σε τροφή και θα προσφέρουν ένα τεράστιο φάσμα περιβαλλοντικών, υγειονομικών και οικονομικών πλεονεκτημάτων (Mousavi and Rezaei, 2011).

Η νανοτεχνολογία είναι ένα πολλά υποσχόμενο επιστημονικό πεδίο, το οποίο μπορεί να φέρει λύσεις σε προβλήματα διαφόρων τομέων, όπως η ιατρική, τα φαρμακευτικά προϊόντα και η γεωργία (Rai and Ingle, 2012).

Νανοτεχνολογία είναι η επιστήμη που ασχολείται με υλικά, συστήματα και διαδικασίες που λειτουργούν σε κλίμακα 100nm ή και μικρότερη. Ένα νανόμετρο είναι το ένα δισεκατομμύριο του μέτρου (Mousavi and Rezaei, 2011).

Μέχρι τώρα η νανοτεχνολογία έχει προταθεί ως λύση σε πολυάριθμα ζητήματα που αφορούν τη φυτοπροστασία, τις επιστήμες των τροφίμων, αλλά και των ζώων (Mousavi and Rezaei, 2011). Μερικά από αυτά τα ζητήματα αφορούν τις κλιματικές αλλαγές, την αειφόρο χρήση των φυσικών πόρων, περιβαλλοντικά προβλήματα όπως η απορροή και συσσώρευση φυτοφαρμάκων και λιπασμάτων στο έδαφος (Ditta, 2012).

Ένα άλλο νέο κομμάτι της επιστήμης που πρόκειται να συμβάλει στην εξέλιξη της φυτοπροστασίας είναι οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί, κυρίως εξαιτίας των αμέτρητων δευτερογενών μεταβολιτών που παράγουν οι οποίοι διαθέτουν δυνατότητα πολλαπλών εφαρμογών (Dasa et al., 2017).

Η διεθνής ορολογία για τους ενδοφυτικούς μικροοργανισμούς είναι **endophytes**. Η λέξη αυτή είναι σύνθετη και προέρχεται από το ελληνικό

endon = μέσα και το phyte = φυτό. Εξ ορισμού λοιπόν, το ενδόφυτο είναι ένας μικροοργανισμός που ζει μέσα στο φυτό (Schulz et al., 2007). Τα ενδόφυτα μπορεί να είναι μύκητες ή βακτήρια που επιβιώνουν μέσα σε υγιείς ιστούς φυτών, έχοντας δημιουργήσει μια συμβιωτική σχέση με το φυτό ξενιστή τους (El-Hawary et al., 2017). Μπορούν λοιπόν, να περνούν όλο το μέρος της ζωής τους μέσα στο φυτό ξενιστή τους χωρίς όμως να του προκαλούν συμπτώματα. Πιστεύεται μάλιστα, πως σχεδόν όλα τα φυτά σε αυτό τον κόσμο έχουν κάποια σχέση με τους ενδοφυτικούς οργανισμούς (Dasa et al., 2017).

Είναι ευρέως γνωστό από ποικίλες έρευνες πως οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί μπορούν να προάγουν την άμυνα του φυτού, να συμβάλλουν στην ανάπτυξή του και να δρουν ως παράγοντες βιολογικού ελέγχου. Επίσης, πιστεύεται ότι μπορεί να είναι επωφελείς για τον ξενιστή τους με την παραγωγή μιας σειράς φυσικών προϊόντων, που θα μπορούσε να αξιοποιηθεί από την ιατρική, τη γεωργία και τη βιομηχανία (Dasa et al., 2017). Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες που παράγονται από ενδόφυτα είναι φιλικοί προς το περιβάλλον, τοξικοί για τους παθογόνους παράγοντες και δεν βλάπτουν τον άνθρωπο (Singh et al., 2017).

Όσον αφορά τη χρήση βιοδιεγερτών για τη βελτίωση της φυτοπροστασίας είναι επίσης αισιόδοξοι οι ερευνητές. Οι βιοδιεγέρτες μπορούν να προσφέρουν σημαντικές λύσεις στους παραγωγούς για τις καλλιέργειές τους. Μερικά από τα οφέλη που μπορούν να παρουσιάσουν οι βιοδιεγέρτες αφορούν την καλύτερη ανάπτυξη των ριζών, αλλά και των βλαστών, αντοχή στο στρες, καθώς και μείωση των επιπέδων αζώτου κατά τη λίπανση (Russo and Berlyn, 1991).

Μία σημαντική πηγή βιοδραστικότητας έχουν αποτελέσει τα φαρμακευτικά φυτά, τόσο για την ανακάλυψη ανθρώπινων φαρμάκων, όσο και Φ.Π. (Petrovska, 2012). Αυτός ήταν ένα από τους βασικούς λόγους που στην παρούσα μελέτη ερευνήθηκαν τα φαρμακευτικά φυτά και συγκεκριμένα η Αλόη και η χρήση της ως βιοδιεγέρτη στη φυτοπροστασία.

1.4.1 Φαρμακευτικά Φυτά ως πηγές βιοδραστικότητας

Τα φαρμακευτικά φυτά θεωρούνται τόσο παλιά μέθοδος αντιμετώπισης ασθενειών, όσο και η ίδια η ανθρωπότητα. Από την αρχαιότητα ακόμη, οι άνθρωποι, στην προσπάθειά τους να γιατρέψουν διάφορες ασθένειες χρησιμοποιούσαν φυτά, με μόνο οδηγό το ένστικτο, αλλά στη συνέχεια και την εμπειρία τους, καθώς δεν ήταν ακόμη γνωστό ούτε η αιτία της ασθένειας, ούτε και ο τρόπος δράσης των φαρμακευτικών φυτών στον ανθρώπινο οργανισμό. Η σύγχρονη επιστήμη έχει εξελιχθεί πολύ και έχει δώσει απαντήσεις σε πολλά από αυτά τα ερωτήματα. Αυτός είναι και ο λόγος που πολλά φυτά έχουν χαρακτηριστεί φαρμακευτικά και έχουν ενταχθεί στη σύγχρονη φαρμακοβιομηχανία (Petrovska, 2012, Δόρδας, 2012).

Στην Ελλάδα έχουν καταγραφεί περισσότερα από 6000 είδη ανώτερων φυτών, ανάμεσα σε αυτά, μεγάλος αριθμός ανήκει στην κατηγορία των φαρμακευτικών φυτών (Petrovska, 2012). Μερικά από τα σημαντικότερα φαρμακευτικά φυτά είναι η Εχινάτσεα (*Echinacea* sp.), το Σκόρδο (*Allium sativum*), το Gingo biloba, το Ginseng (*Panax quinquefolius*) και η Βαλεριάνα (*Valeriana officinalis*). Τα οφέλη αυτών των φυτών για την ανθρώπινη υγεία είναι πολλαπλά (Δόρδας, 2012).

Τα τμήματα των φαρμακευτικών φυτών που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι τα φύλλα, οι βλαστοί, τα άνθη, οι καρποί, οι ρίζες και οι σπόροι. Δεν είναι λίγες και οι φορές που αξιοποιούνται εκχυλίσματα όπως τα αιθέρια έλαια που περιέχουν. Τα διάφορα τμήματα των φυτών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή ροφημάτων, αλλά και για τη λήψη ορισμένων φαρμακευτικών ουσιών, όπως είναι τα αλκαλοειδή και τα φλαβονοειδή, τα οποία έχουν ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση. Τα αιθέρια έλαια χρησιμοποιούνται ευρέως για την παραγωγή σαπουνιών, αρωμάτων, ως πρόσθετα στη ζαχαροπλαστική, τη βιομηχανία τροφίμων αλλά και τη φαρμακοβιομηχανία (Δόρδας, 2012, Petrovska, 2012).

Τα αιθέρια έλαια αποθηκεύονται στα εξωτερικά μέρη των φυτών και κυρίως στην επιδερμίδα και το μεσόφυλλο. Μπορούν να εξαχθούν με απόσταξη. Η σημαντικότερη ομάδα ουσιών που ανήκει στα αιθέρια έλαια είναι τα τερπενοειδή. Τα συστατικά των αιθέριων ελαίων χωρίζονται στα οξυγονούχα και τα μη οξυγονούχα. Στα οξυγονούχα ανήκουν οι αλδεΐδες, οι φαινόλες, οι

αλκοόλες, οι κετόνες, τα οξέα και οι εστέρες, ενώ στα μη οξυγονούχα ανήκουν οι υδρογονάνθρακες (Δόρδας, 2012).

Στον **Πίνακα 3**, αναφέρονται μερικά από τα σημαντικότερα φαρμακευτικά φυτά, οι εφαρμογές τους και οι βιοδραστικοί μεταβολίτες που περιέχουν. Οι τελευταίοι, εμφανίζουν πολύπλοκες και πρωτότυπες χημικές δομές στα οποία οφείλεται και η βιοδραστικότητά τους.

Πίνακας 3 Κοινή και επιστημονική ονομασία και οικογένεια φαρμακευτικών φυτών. Χρήσεις και εφαρμογές αυτών. Σημαντικά θρεπτικά συστατικά

Κοινό όνομα Επιστημονική ονομασία Οικογένεια	Χρήσεις	Συστατικά
Αλόη <i>Aloe barbadensis</i> M. Aloaceae	Αρθρίτιδα, άσθμα, καντιντίαση, σύνδρομο χρόνιας κόπωσης, διαταραχές πεπτικού συστήματος και εντέρου, ερυθηματώδη λύκο, δερματικά προβλήματα, αθλητικά τραύματα, έλκη, αντιφλεγμονώδες, ενυδατικό, αντιμυκητιακό, αντιμικροβιακό, αποτοξινωτικό	Αλοΐνη, βαρβαλοΐνη, αλοϊκό οξύ, εμοδίνη της αλόης, κελουλόζη, γλυκόζη, μαννόζη, λευκίνη, ισολευκίνη, βαλίνη, γλουταμικό οξύ, βιταμίνες, ένζυμα
Ανθεμίδα <i>Anthemis nobilis</i> Asteraceae	Περιποίηση μαλλιών. Επούλωση ελκών και πληγών. Τονωτικό, ευστόμαχο, σπασμολυτικό	Εστέρες του αγγελικού και ισοβουτυρικού οξέος, φλαβονογλυκοζίτες, κουμαρίνες, α-, β-πινένιο, καμφένιο, σαβινένιο, 1,8 κινεόλη
Αχίλλεια <i>Achillea millefolium</i> Asteraceae	Τονωτικό, στυπτικό, ευστόμαχο, αντικαταρροϊκό, διεγερτικό, αντισπασμοδικό, επουλωτικό, αντισηπτικό, αντιβρογχιτικό, ανθελμινθικό, ορεκτικό, αντισηπτικό, χωνευτικό, σπασμολυτικό. Θεραπεία πληγών και αιμορροΐδων	Κινεόλη, χαμαζουλένιο, αχιλεΐνη, ταννίνες
Βαλεριάνα <i>Valeriana officinalis</i> L. Valerianaceae	Καταπραϋντικό του νευρικού συστήματος, ήπιο ηρεμιστικό, αντισπασμωδικό, αντισηπτικό, αντιπυρετικό, ανθελμινθικό, αντιδιαβητικό, ευστόμαχο και τονωτικό	Βαλερενικό οξύ

Βαλσαμόχορτο <i>Hypericum perforatum</i> L. <i>Hypericaceae</i>	Αντιμετώπιση ήπιας μορφής κατάθλιψης, προκαλεί νεκρώσεις όταν χρησιμοποιείται εξωτερικά, θεραπεία όγκων και θηλωμάτων. Αντισηπτικό, στυπτικό, επουλωτικό, αντιδιαρροϊκό και βρογχολιτικό (άσθμα), αντικαρκινικό, αντιοξειδωτικό και διουρητικό	Υπερικίνη, ψευδοϋπερικίνη
Βασιλικός <i>Ocimum basilicum</i> L. <i>Lamiaceae</i>	Αρωματοποιία, αρωματοθεραπεία, απωθητικό εντόμων. Κατά των πονοκεφάλων, διάρροιας, βήχα, δυσλειτουργία νεφρών, καρδιοτονωτικό, διουρητικό, ευστόμαχο, σπασμολυτικό, γαλακτογόνο. Καλλυπτιστικό.	Λιναλόλη, μεθυλοκαρβικόλη, methyl sinname, ευγενόλη
Γλυκάνισος <i>Pimpinella anisum</i> <i>Apiaceae</i>	Παρασκευή ποτών (τσίπουρο, ούζο). Αρωματοποιία και βιομηχανία τροφίμων. Αποχρεμπτικό, αντισπασμωδικό, γαλακτογόνο, ήπιο ηρεμιστικό, εναντίον των ελαφρών μορφών αϋπνίας	Ανιθόλη, λιναλόλη, α-τερπινεόλη, ανισαλδεΐδη
Γλυκόριζα <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. <i>Fabaceae</i>	Υποκατάστατο ζάχαρης για διαβητικούς (x60 πιο γλυκιά από ζάχαρη). Έλκος στομάχου, βρογχίτιδας, αύξηση των βρογχικών εκκρίσεων. Αποχρεμπτική και μαλακτική δράση	Γλυκόζη, σουκρόζη, σαπωνίνες, γλυκοριζίνη,
Δενδρολίβανο <i>Rosmarinus officinalis</i> L. <i>Lamiaceae</i>	Χρήση στη μαγειρική ως αντιοξειδωτικό και την κοσμητολογία (αφρόλουτρα, σαμπουάν). Χρήση εξωτερικά για εντριβές σε μυαλγίες, ρευματισμούς, πρόληψη ή θεραπεία από βρογχικό άσθμα, πεπτικό έλκος, φλεγμονές και αρτηριοσκληρώσεις	Καφεϊκό οξύ, ρασμονικό οξύ, μονοτερπένια, α-πινένιο, β-πινένιο, καμφένιο, λιναλόλη, βορνεόλη, 1,8 κινεόλη
Δίκταμος <i>Origanum dictamnus</i> L. <i>Lamiaceae</i>	Αντισηπτικό, ευστόμαχο, επουλωτικό, τονωτικό, διεγερτικό του νευρικού συστήματος	Καρβακρόλη, κυμένιο
Εστραγκόν <i>Artemisia dracunculus</i> L. <i>Asteraceae</i>	Αντιβακτηριακές, αντιμυκητιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες	
Ευκάλυπτος <i>Eucalyptus</i> sp. <i>Myrtaceae</i>	Αντιβιοτικό, αντισηπτικό των αναπνευστικών οργάνων, δροσιστικό, χρήση στις βρογχίτιδες και το άσθμα, προκαλεί έντονη έκκριση βρόγχων	Ευκαλυπτόλη, κινεόλη

Εχινάτσεια <i>Echinacea</i> sp. <i>Asteraceae</i>	Πρόληψη κοινού κρυολογήματος, γρίπης και μολύνσεων του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος. Ενίσχυση ανοσοποιητικού συστήματος και άμυνας οργανισμού	
Θυμάρι <i>Thymus vulgaris</i> L. <i>Lamiaceae</i>	Αντιμικροβιακό, αντιμυκητιακό, καρδιοτονωτικό. Χρήση σε αναπνευστικά προβλήματα, γαστρίτιδα, βρογχίτιδα, άσθμα και λαρυγγίτιδα. Χρήση στην αρωματοποίηση, ομοιοπαθητική, ρόφημα, παρασκευή οδοντόπαστας	Θυμόλη, καρβακρόλη, κιτράλη
Κρόκος <i>Crocus sativus</i> L. <i>Iridaceae</i>	Αντιοξειδωτικό, αντιφλεγμονώδες, αγγειοδιασταλτικό, αναστέλλει τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων, τη δράση της τοποϊσομεράσης, της τυροσινάσης και βελτιώνει την καρδιακή λειτουργία. Αντικαρκινική δράση	Κροκίνη, κροκετίνη, πικροκροκίνη, σαφρανάλη
Μαστιχόδενδρο <i>Pistacia lentiscus</i> var. <i>Chia</i>	Κατά του ελικοβακτηρίου του πυλωρού, σακχαρώδους διαβήτη, χοληστερίνης, τριγλυκεριδίων, εγκαυμάτων, κρυοπαγημάτων, δερματικών παθήσεων. Δημιουργία εμπλάστρων, χειρουργικών ραμμάτων, επικόλληση επιδερμίδων, σφραγίσματα δοντιών	Ταννίνες, μαστιχίνη
Μέλισσα η φαρμακευτική <i>Melissa officinalis</i> L. <i>Labiatae</i>	Συμβάλλει στη μακροζωία, κατά της υπέρτασης, της αϋπνίας, της ανορεξίας, των νεύρων και του πονοκεφάλου. Δυναμωτικό της μνήμης, τονωτικό του εγκεφάλου, καταπραύντικό των επιπτώσεων της εμμηνόπαυσης, εξάψεων, μελαγχολίας, άγχους, αρρυθμίας. Καλή λειτουργία κυκλοφορικού και καρδιακού συστήματος.	Κιτράλη
Ρίγανη <i>Origanum vulgare</i> spp. <i>hirtum</i>	Βιολογική, αντιβακτηριακή, αντιμυκητιακή δράση ενάντια σε παθογόνα φυτών, ζώων, ανθρώπων.	Καρβακρόλη, θυμόλη
Σιδερίτης <i>Sideritis</i> sp. <i>Lamiaceae</i>	Αντιφλεγμονώδες, αντιυπερτασικό, σπασμολυτικό, αντιμικροβιακό, ηρεμιστικό, αντιοξειδωτικό	Καρβακρόλη, λουτεολίνη, απιγενίνη

Όπως γίνεται φανερό από τον **Πίνακα 3**, στα φαρμακευτικά φυτά συμπεριλαμβάνεται ένας αρκετά μεγάλος αριθμός, με πολλά από αυτά να έχουν ιδιαίτερα σημαντικές επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου. Σε αυτά συγκαταλέγονται και πολλά ακόμη είδη, για τα οποία δεν έχει διεξαχθεί

επιστημονική έρευνα για την ανακάλυψη και εκμετάλλευση των ιδιοτήτων τους.

Ανάμεσα στις ιδιότητές αυτές μπορεί να είναι η ικανότητα των φαρμακευτικών φυτών να λειτουργούν ως βιοδιεγέρτες, δηλαδή να συμβάλλουν στην άμυνα και ανάπτυξη του φυτού, χωρίς απαραίτητα να είναι τοξικά απέναντι σε κάποιο παθογόνο. Η αξιοποίηση αυτή των φαρμακευτικών φυτών μπορεί να φέρει πολύ σημαντικά αποτελέσματα στη φυτοπροστασία.

1.4.2 Βιοδιεγέρτες: Ορισμός και διαχωρισμός τους από τα λιπάσματα

Μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις των τελευταίων χρόνων είναι η ανάπτυξη βιώσιμων και φιλικών προς το περιβάλλον τεχνικών για την κάλυψη των αναγκών τροφοδοσίας σε παγκόσμιο επίπεδο (Povero et al., 2016). Εξαιτίας αυτής της στροφής των καλλιεργητών στις βιολογικές μεθόδους καλλιέργειας, έχουν κάνει έντονη εμφάνιση οι βιοδιεγέρτες. Οι βιοδιεγέρτες αποτελούν πολύ ελπιδοφόρα εναλλακτική στρατηγική ενάντια σε ασθένειες και παθογόνα συμβάλλοντας στην ενίσχυση της άμυνας των φυτών.

Σε αυτές τις ουσίες αναφέρθηκαν για πρώτη φορά ειδικοί σε οπωροκηπευτικές καλλιέργειες, για να μιλήσουν για ουσίες διαφορετικές από τα λιπάσματα, οι οποίες σε ελάχιστες ποσότητες μπορούν να συμβάλλουν στην ανάπτυξη των φυτών. Χρησιμοποιώντας τη φράση «ελάχιστες ποσότητες», επιδιώκεται να διαχωριστεί ο όρος βιοδιεγέρτες από άλλα θρεπτικά συστατικά και τροποποιητές εδάφους, τα οποία είναι αποτελεσματικά για την ανάπτυξη των φυτών αλλά σε μεγαλύτερες ποσότητες (du Jardin, 2015).

Στην επιστημονική βιβλιογραφία ο όρος «**biostimulants**» ή «**βιοδιεγέρτες**» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Kauffman το 2007, όταν αναφέρθηκε σε «υλικά εκτός των λιπασμάτων, που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών, όταν εφαρμοστούν σε μικρές ποσότητες» (du Jardin, 2015). Να τονιστεί μάλιστα, πως οι βιοδιεγέρτες μπορούν να οδηγήσουν στη μείωση της χρήσης λιπασμάτων, ιδιαίτερα σε υδροπονικές καλλιέργειες

(Povero et al., 2016), καθώς ο μηχανισμός δράσης βιοδιεγερτών και λιπασμάτων διαφέρει (Calvo et al., 2014).

Σύμφωνα με τον ορισμό, οι βιοδιεγέρτες είναι: «οποιαδήποτε ουσία ή μικροοργανισμός που εφαρμόζεται σε φυτά ή στη ριζόσφαιρα με στόχο την ενίσχυση της διατροφικής αποτελεσματικότητας, της αντοχής στο αβιοτικό στρες και τη βελτίωση των χαρακτηριστικών ποιότητας των καλλιεργειών» (du Jardin, 2015, Brown and Saa, 2015, Povero et al., 2016, Calvo et al., 2014). Επίσης, οι βιοδιεγέρτες δεν έχουν άμεση δράση ενάντια σε εχθρούς, ωστόσο μέσω της έμμεσης τοξικότητας, δηλαδή στη συμβολή ενίσχυσης της άμυνας και ανάπτυξης των φυτών μπορούν να επιτύχουν το επιθυμητό αποτέλεσμα (Calvo et al., 2014).

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ο τρόπος δράσης των βιοδιεγερτών διαφέρει από αυτό των λιπασμάτων. Για το λόγο αυτό θεωρείται χρήσιμο να γίνει διαχωρισμός των εννοιών και να δοθούν οι αντίστοιχοι ορισμοί.

Ως λίπασμα θεωρείται κάθε ουσία που περιέχει ένα ή περισσότερα απαραίτητα για τη θρέψη των φυτών στοιχεία, τα οποία αποδίδονται στο φυτό είτε μέσω του εδάφους είτε απευθείας σε αυτό. Με μία πιο ευρεία έννοια, στα λιπάσματα συμπεριλαμβάνονται και ουσίες που συμβάλλουν στην ανάπτυξη των φυτών, όπως τα ένζυμα, οι βιταμίνες, τα αμινοξέα και οι πρωτεΐνες, ή όπως οι βοηθητικές ουσίες που αποτελούν ενδιάμεσα προϊόντα της θρέψης των φυτών. Όταν προστίθενται λιπάσματα, αποκαθίσταται η όποια έλλειψη από θρεπτικά συστατικά μπορεί να υπάρχει στο έδαφος και το φυτό (Ασημακόπουλος, 2014).

Όσον αφορά τους βιοδιεγέρτες θα ήταν χρήσιμο να τονίσουμε πως προάγουν την ανάπτυξη των φυτών καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου ζωής τους, από τη βλάστηση του σπόρου έως την ωρίμανση. Συμβάλλουν στη βελτίωση της αποδοτικότητας του μεταβολισμού, στην ενίσχυση της ανθεκτικότητας σε αβιοτικές καταπονήσεις, στη διευκόλυνση της αφομοίωσης των θρεπτικών συστατικών, στη βελτίωση των χαρακτηριστικών ποιότητας των φυτών, στην ευκολότερη απορρόφηση του νερού από τις ρίζες, καθώς επηρεάζουν διάφορες φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους και τέλος προωθούν την ανάπτυξη ωφέλιμων μικροοργανισμών του εδάφους (Calvo et al., 2014).

Οι βιοδιεγέρτες χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες σύμφωνα με την πηγή και το περιεχόμενό τους. Οι κατηγορίες αυτές συνοψίζονται παρακάτω:

1. Βιοδιεγέρτες στους οποίους περιλαμβάνονται οι χουμικές ουσίες,
2. Προϊόντα που περιέχουν ορμόνες και
3. Προϊόντα που περιέχουν αμινοξέα (du Jardin, 2015, Povero et al., 2016).

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, αναμένεται κρίσιμος ο ρόλος των βιοδιεγερτών στην ανάπτυξη των τεχνικών καλλιέργειας και μάλιστα έως το 2019 θεωρείται πως η παγκόσμια αγορά των βιοδιεγερτών θα φτάσει τις 2.524,02 δολάρια, με ετήσιο συντελεστή ανάπτυξης 12,5% (Povero et al., 2016). Το Ευρωπαϊκό Συμβούλιο Βιομηχανιών Βιοδιεγερτών (European Biostimulants Industry Council - EBIC) αναφέρει ότι για το έτος 2012 η Ευρώπη είχε τη μεγαλύτερη κατανάλωση σε βιοδιεγέρτες και ότι εφαρμόστηκαν σε πάνω από 12,2 εκατομμύρια εκτάρια εκτάσεις (Calvo et al., 2014).

Η πρώτη πηγή η οποία χρησιμοποιήθηκε ποτέ ως βιοδιεγέρτης ήταν τα ίδια τα φυτά και τα εκχυλίσματά τους. Για το λόγο αυτό, παρακάτω δίνονται ορισμένα παραδείγματα φυτών που χρησιμοποιήθηκαν για την προστασία άλλων φυτών από παθογόνους εχθρούς.

1.5 Αξιοποίηση φυτών και φυτικών προϊόντων στην φυτοπροστασία

Πριν από χιλιάδες χρόνια όταν οι νομαδικοί πληθυσμοί προσπαθούσαν να εγκατασταθούν σε μία συγκεκριμένη περιοχή, δημιουργήθηκε η ανάγκη παραγωγής περισσότερων τροφίμων. Αρχικά, οι καλλιεργητικές πρακτικές βασιζόταν στις εναλλαγές καλλιέργειας ή τη συγκαλλιέργεια για τη βελτιστοποίηση του φυσικού ελέγχου των παρασίτων. Συνεπώς, η έννοια των φυσικών παρασιτοκτόνων υπήρχε από πολύ νωρίς. Χρησιμοποιούσαν με βάση την παρατήρηση και την εμπειρία τους έλαια που έβγαζαν από τα φυτά, ή ωφέλημα έντομα ενάντια σε φυτοφάγα για να ελέγξουν τον πληθυσμό τους (Dayan et al., 2009).

Ο αριθμός των ενώσεων που προέρχονται από ζωντανούς οργανισμούς, φυτικούς ή ζωικούς και βρίσκουν εφαρμογή στην προστασία των καλλιεργειών από διάφορα παθογόνα, δεν είναι μικρός. Οι ουσίες αυτές στην πραγματικότητα αποτέλεσαν τη βάση για τη δημιουργία φ.π., καθώς χρησιμοποιήθηκαν είτε αυτούσιες ως ένα ακάθαρτο μίγμα ουσιών, είτε με κάποια χημική επεξεργασία, ή αποτελώντας βάση για μίμηση τρόπων δράσης δημιουργώντας με τον τρόπο αυτό ένα νέο προϊόν ενάντια στα παθογόνα (Copping and Duke, 2007). Φ.Π. φυτικής προέλευσης, όπως αυτά από το φυτό της Αλόης, το οποίο μελετάται στη συγκεκριμένη μελέτη μπορεί να αποδειχθούν ασφαλέστερες εναλλακτικές λύσεις και να αντικαταστήσουν τις συνθετικές χημικές ουσίες (Saks and Barkai-Golan, 1995).

Ενώσεις που έχουν προέλθει από φυτά έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο ως εντομοκτόνα, μυκητοκτόνα, βακτηριοκτόνα, αλλά και ζιζανιοκτόνα. Για τη δημιουργία φαρμάκων, χρήσιμα θεωρούνται διάφορα μέρη των φυτών. Ανάμεσα σε αυτά είναι ο μίσχος, ο φλοιός, το άνθος, ο καρπός και τα φύλλα (Deerthi and Kumar, 2018).

Παρακάτω αναφέρονται μερικές ουσίες που απομονώθηκαν από φυτά για κάθε κατηγορία φ.π.

Μία σημαντική ουσία είναι η κινναμαλδεΐδη. Η ουσία αυτή έχει απομονωθεί από το φυτό *Cassia tora* L. ή αλλιώς *Cassia obtusifolia* L. και χρησιμοποιείται ως μυκητοκτόνο ενάντια σε διάφορα είδη *Verticillium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* και *Pythium*, σε διάφορα είδη καλλιεργειών, όπως κηπευτικά, σε χλοοτάπητες και πευκοδάση. Ο τρόπος με τον οποίο δρα δεν έχει γίνει ακόμη γνωστός, ωστόσο πιστεύεται πως εξαιτίας της ειδικότητάς του σε συγκεκριμένα γένη μυκήτων δεν έχει να κάνει μόνο με τη διάσπαση των μεμβρανών στους μύκητες. Η ουσία αυτή εμφανίζει χαμηλή τοξικότητα στα θηλαστικά, αν και έχει συμβεί να προκαλεί ερεθισμό στα μάτια και το δέρμα. Επίσης, δεν αποτελεί κίνδυνο για τους υδρόβιους οργανισμούς, καθώς αποσυντίθεται με ταχείς ρυθμούς μέσα στο νερό. Συνήθως η κινναμαλδεΐδη χρησιμοποιείται σε καλλιέργειες μικρής έκτασης και σε κήπους (Copping and Duke, 2007).

Επιπροσθέτως, θα ήταν ιδιαίτερα χρήσιμο να αναφερθούμε σε δύο ουσίες που υπάρχουν σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς και δρουν τόσο ως μυκητοκτόνα, αλλά και ως ρυθμιστές ανάπτυξης των φυτών. Οι ενώσεις αυτές είναι το *L*-γλουταμικό οξύ και το *γ*-αμινοβουτυρικό οξύ (**GABA**), οι οποίες στην

καθαρή τους μορφή είναι σκόνες. Οι δύο αυτές δ.ο. χρησιμοποιούνται σε διάφορες καλλιέργειες κηπευτικών, δενδρωδών, δημητριακών αλλά και καλλωπιστικών, ως ενισχυτικά της ανάπτυξής τους τόσο όσον αφορά την απόδοση αλλά και την ποιότητα. Επίσης, χρησιμοποιούνται προληπτικά ενάντια στο ωίδιο στο αμπέλι, αλλά και για την καταστολή άλλων σοβαρών ασθενειών (Copping and Duke, 2007).

Το γ-αμινοβουτυρικό οξύ είναι μία ουσία που υπάρχει φυσικά σε βακτήρια, φυτά, αλλά και στους ανθρώπους. Πρόδρομη αυτής της ουσίας είναι το L-γλουταμικό οξύ, το οποίο θεωρείται αμινοξύ που εμπλέκεται σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες των ζώντων οργανισμών. Αμφότερες οι ενώσεις αυτές δρουν ως νευροδιαβιβαστές στον εγκέφαλο. Δε θεωρούνται λιπάσματα, ούτε και φυτοφάρμακα, αλλά ανήκουν σε μία κατηγορία που ονομάζεται «**plant metabolic primers**» (Copping and Duke, 2007). Οι ουσίες αυτές δεν είναι τοξικές για το περιβάλλον, καθώς εμφανίζονται φυσικά και δεν παραμένουν σε αυτό. Ωστόσο, δεν μπορούν σε καμία περίπτωση να θεωρηθούν και τοξικές για τα φυτά, αφού εκτός του ότι συντίθενται μέσα σε αυτά, συμβάλλουν και στην καλύτερη ανάπτυξή τους (Copping and Duke, 2007).

Από το καφέ άλγος *Laminaria digitata*, απομονώθηκε ένας πολυσακχαρίτης που ονομάστηκε Λαμιναρίνη (**Laminarine**). Η ουσία αυτή συνιστάται για χρήση ενάντια στη σεπτόρια και το ωίδιο σε δημητριακά. Στην πραγματικότητα δε διαθέτει μυκητοκτόνο δράση, αλλά διεγείρει το φυσικό μηχανισμό της άμυνας των φυτών απέναντι σε επιθέσεις από μύκητες. Η λαμιναρίνη δεν είναι τοξική για τα θηλαστικά, αλλά ούτε μπορεί να έχει αρνητικές συνέπειες για το περιβάλλον (Copping and Duke, 2007).

Από την αρχή ακόμη της γεωργίας, η διαχείριση των ζιζανίων αποτελούσε πολύ δύσκολη υπόθεση. Στην πραγματικότητα τα ζιζάνια των οποίων δεν μπορούσε να ελεγχθεί ο πληθυσμός, δημιουργούσαν πολύ μεγαλύτερο πρόβλημα στις καλλιέργειες από ότι κάποιο φυτοπαθογόνο ή παράσιτο (Dayan et al., 2009).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον, εμφανίζει το λάδι που προκύπτει από την απόσταξη με ατμό των φύλλων του γαρύφαλλου (**Clove oil**). Το κυριότερο συστατικό του λαδιού αυτού είναι η ευγενόλη - σε συνδυασμό με αρκετά άλλα τερπενοειδή (Dayan et al., 2009) - η οποία εμφανίζει έντονη φυτοτοξικότητα,

συνεπώς θεωρείται πολύ καλό ζιζανιοκτόνο, αλλά και σημαντική εντομοκτόνο δράση. Η συγκεκριμένη ουσία προκαλεί ταχεία απώλεια της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης, ωστόσο στα θηλαστικά εμφανίζει χαμηλή τοξικότητα στο δέρμα και οι πιθανές επιπτώσεις στο περιβάλλον πιστεύεται πως είναι μικρές (Copping and Duke, 2007).

Μία άλλη ευρέως διαδεδομένη ουσία που χρησιμοποιείται ως ζιζανιοκτόνο, είναι το πελαργονικό οξύ. Το πελαργονικό οξύ ή νονανοϊκό οξύ, όπως αλλιώς είναι γνωστό, προέρχεται από φυτά της οικογένειας των *Geraniaceae*. Δρα και αυτό διαταράσσοντας την κυτταρική μεμβράνη των φυτών και έχει ευρύ φάσμα δράσης. Δεν είναι τοξικό ούτε για τα θηλαστικά, αλλά ούτε για το περιβάλλον και δεν εμφανίζει μεγάλη υπολειμματικότητα (Copping and Duke, 2007).

Όσον αφορά τα εντομοκτόνα, η ουσία με το μεγαλύτερο ενδιαφέρον, μιας και χρησιμοποιείται ακόμη και σήμερα με πολύ καλά αποτελέσματα, είναι η πυρεθρίνη. Το πύρεθρο είναι μία ουσία που προέρχεται από το χρυσάνθεμο (*Tanacetum cinerariaefolium*). Στην αρχαιότητα ακόμη χρησιμοποιούσαν το αποξηραμένο άνθος από το χρυσάνθεμο ως εντομοκτόνο. Οι πυρεθρίνες χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση ποικίλων ειδών εντόμων σε καλλιέργειες πεδίου ή θερμοκηπίου διαφόρων ειδών, όπως κηπευτικά, φρούτα ακόμη και καλλωπιστικά. Οι πυρεθρίνες αρχικά προκαλούν την άμεση παράλυση του εντόμου και στη συνέχεια το θάνατό του. Οι φυσικές πυρεθρίνες είναι ουσίες ιδιαίτερα ευαίσθητες στο φως του ήλιου και τον αέρα εξατμίζονται με ταχείς ρυθμούς (Dayan et al., 2009). Για το λόγο αυτό δε χρησιμοποιούνται σε μεγάλες καλλιέργειες, παρά μόνο στις βιολογικές. Οι πλέον χρησιμοποιούμενες είναι οι χημικά συντιθέμενες πυρεθρίνες οι οποίες δρουν κατά τον ίδιο τρόπο με τις φυσικές, απλώς σε αυτές έχουν προστεθεί συνεργιστικές ουσίες που προκαλούν μεγαλύτερη διάρκεια δράσης στο προϊόν. Είτε οι φυσικές, είτε οι συνθετικές πυρεθρίνες εμφανίζουν μέτρια τοξικότητα στα θηλαστικά (Copping and Duke, 2007).

Ένα άλλο σημαντικό βιοδραστικό συστατικό με εντομοκτόνο δράση, προέρχεται από το φυτό του καπνού (*Nicotiana tabacum* L.) και είναι το αλκαλοειδές νικοτίνη (Dayan et al., 2009). Αρχικά, παρασκευαζόταν από εκχυλίσματα του φυτού αλλά σήμερα παραλαμβάνεται από τα απόβλητα των βιομηχανιών καπνού. Χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση πολλών

εντόμων, όπως θριπών, αλευρωδών, αφίδων σε μεγάλες καλλιέργειες αλλά και διακοσμητικά φυτά. Η νικοτίνη δρα δεσμεύοντας τον χολινεργικό νικοτινικό υποδοχέα ακετυλοχολίνης στα νευρικά κύτταρα των εντόμων, οδηγώντας σε συνεχή πυροδότησή του. Θεωρείται μία ιδιαίτερα τοξική ουσία τόσο για τον άνθρωπο, κυρίως μέσω εισπνοής, ή επαφής με το δέρμα του. Τοξικό είναι επίσης για τα πουλιά, τα ψάρια και γενικά τους υδρόβιους οργανισμούς (Copping and Duke, 2007).

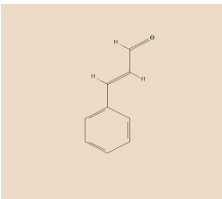
Τέλος, η αζαδιραχτίνη είναι μία ουσία που προέρχεται από τους σπόρους του φυτού neem (*Azadirachta indica*) και εμφανίζει έντονη εντομοκτόνο δράση, ενάντια σε θρίπες, αλευρώδεις, αφίδες, κοκκοειδή και πολλά ακόμη είδη εντόμων, σε ευρύ φάσμα καλλιεργειών (Copping and Duke, 2007).

Στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 4**) παρουσιάζονται συνοπτικά όσα αναφέρθηκαν παραπάνω.

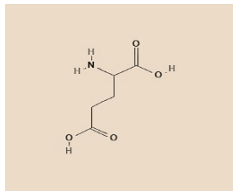
Συμπερασματικά, οι δ.ο. που έχουν απομονωθεί από φυτικούς οργανισμούς είναι πολλές και οι εφαρμογές τους ακόμη περισσότερες. Με τη βοήθεια της επιστήμης, μπορούν να δημιουργηθούν νέα, καινοτόμα σκευάσματα που θα έχουν ως βάση αυτές και καινούργιους μηχανισμούς δράσης και εφαρμογής για μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα ενάντια στα παθογόνα και τους εχθρούς που βλάπτουν τις καλλιέργειες.

Η Αλόη ίσως αποτελέσει ένα από αυτά τα φυτά των οποίων οι δ.ο. θα μπορέσουν να οδηγήσουν στη δημιουργία αυτών των νέων σκευασμάτων.

Πίνακας 4 Ουσίες προερχόμενες από φυτά, οι οποίες εμφανίζουν μυκητοκτόνο, εντομοκτόνο ή ζιζανιοκτόνο δράση και έχουν χρησιμοποιηθεί στη φυτοπροστασία

Όνομα μεταβολίτη	Προέλευση	Εφαρμογή
Κινναμαλδεΐδη		Cassia tora
		Μυκητοκτόνο (<i>Verticillium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i>)

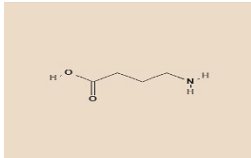
γ-γλουταμικό οξύ



Όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί

Μυκητοκτόνο και ρυθμιστής ανάπτυξης

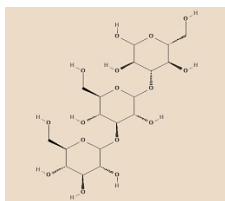
γ-αμινοβουτυρικό οξύ - GABA



Βακτήρια, φυτά και άνθρωποι

Μυκητοκτόνο και ρυθμιστής ανάπτυξης

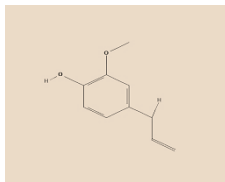
Λαμιναρίνη



Laminaria digitata

Μυκοστατικό (Σεπτόρια και Ωίδιο σε δημητριακά)

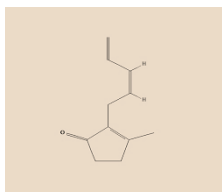
Ευγενόλη



Φύλλα γαρύφαλλου

Ζιζανιοκτόνο και Εντομοκτόνο

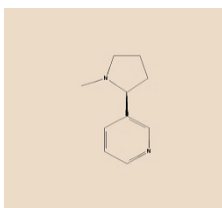
Πύρεθρο



Χρυσάνθεμο
(*Tanacetum cinerariaefolium*)

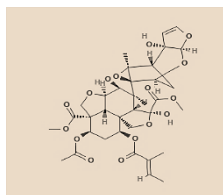
Εντομοκτόνο

Νικοτίνη



Καπνό (*Nicotiana tabacum*) Εντομοκτόνο

Αζαδιραχτίνη



Σπόρους neem (*Azadirachta indica*) Εντομοκτόνο

1.6 Το φυτό της Αλόης (*Aloe barbadensis*)

1.6.1 Ιστορικά στοιχεία

Η ετυμολογία της ονομασίας του φυτού - Αλόη - λέγεται πως προέρχεται από το αρχαίο ελληνικό «άλσος», που σημαίνει πικρό και αναφέρεται στην πικρή γεύση που έχει η γέλη και τα φύλλα της Αλόης. Επίσης, άλλες πηγές μας λένε πως η ονομασία έχει εβραϊκή καταγωγή και προέρχεται από τη λέξη «allal» ή από την ακόμη παλαιότερη αραβική «alloeh» ή από την αραμαϊκή «hatal». Όλες αυτές οι λέξεις στις διάφορες γλώσσες έχουν την ίδια έννοια και σημαίνουν πικρή και γυαλιστερή ουσία (Park and Lee, 2006, Μπαμπίλης, 2011). Είναι επίσης γνωστό και ως το «κρίνο της ερήμου» ή «φυτό της αθανασίας», λόγω της χρήσης του ως φαρμακευτικό προϊόν (Arunkumar and Muthuselvam, 2009).

Η καταγωγή του φυτού, που φαίνεται και λόγω της οικολογίας του, είναι από την Αφρική και η ιστορία της χρήσης του υπολογίζεται στα 6000 χρόνια πριν (Park and Lee, 2006). Η Αλόη έχει χρησιμοποιηθεί για ιατρικούς,

θεραπευτικούς και καλλωπιστικούς σκοπούς σε αρκετούς πολιτισμούς, όπως η Ελλάδα, η Αίγυπτος, η Ινδία, το Μεξικό, η Ιαπωνία και η Κίνα για πολλές χιλιετίες (Vogler and Ernst, 1999). Η παλαιότερη γνωστή καταγραφή της χρήσης Αλόης, έχει βρεθεί σε χάραξη σε αιγυπτιακό ναό και χρονολογείται στο 4000 π.Χ. Γύρω στο 2200 π.Χ σε ένα σουμεριακό πήλινο δισκίο, βρέθηκε το πρώτο έγγραφο που περιλάμβανε την Αλόη μεταξύ των φυτών της μεγάλης θεραπευτικής δύναμης (Park and Lee, 2006). Λέγεται μάλιστα πως το μυστικό της ομορφιάς της Κλεοπάτρας ήταν η χρήση της Αλόης ως καλλυντικό, καθώς συχνά έκανε λουτρό σε χυμό από *Aloe vera* (Crosswhite and Crosswhite, 1984).

Ακόμη, οι αρχαίοι Έλληνες τη χρησιμοποιούσαν για θεραπεία πληγών. Αρχαία αρχεία περιγράφουν τον Ιπποκράτη να εφαρμόζει την Αλόη για θεραπευτικούς σκοπούς. Η πρώτη αναλυτική περιγραφή της φαρμακολογικής χρήσης Αλόης έγινε από το Διοσκουρίδη τον 1^ο μ.Χ αιώνα (41-68 μ.Χ) (Park and Lee, 2006). Ακόμα και στη Βίβλο υπάρχουν αναφορές. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η Αλόη έχει πολλαπλές φαρμακολογικές επιδράσεις στην επούλωση τραυμάτων, εγκαυμάτων και κρυοπαγημάτων, δυσκοιλιότητας, αϋπνίας, ασθένειες του στομάχου, αιμορροΐδες, κνησμό, κεφαλαλγία, τριχόπτωση, ασθένεια των ούλων, νεφρική νόσο, φλύκταινες, ηλιακά εγκαύματα κ.α. Υπάρχουν επίσης αναφορές, πως ο Αριστοτέλης έπεισε το μαθητή του, Μέγα Αλέξανδρο, να κατακτήσει το νησί Socotra, που βρίσκεται στην ανατολική ακτή της Αφρικής, προκειμένου να αποκτήσει καλλιέργειες Αλόης για να μπορεί να θεραπεύει τις πληγές των στρατιωτών του. Η επίδραση του Μεγάλου Αλεξάνδρου ήταν σημαντική στον πολιτισμένο κόσμο και μέσω αυτού η γνώση για τις θεραπευτικές ιδιότητες της Αλόης μεταλαμπαδεύτηκε. (Park and Lee, 2006, Crosswhite and Crosswhite, 1984).

Η διάδοση του φυτού και των ιδιοτήτων του στη Δυτική Ευρώπη και την Αμερική έγινε μέσω των Ισπανών, οι οποίοι φύτευαν στις αποικίες τους Αλόη και τη χρησιμοποιούσαν για την αντιμετώπιση στομαχικών και εντερικών διαταραχών (Μπαμπίλης, 2011). Το 1300-1500 μ.Χ, η επεξεργασμένη αλόη (αποξηραμένος χυμός) εισήχθη στην αγγλική ιατρική και χρησιμοποιήθηκε ως καθαρτικό και ως θεραπεία για εξωτερικές πληγές και ασθένειες. Μέχρι το 1700, τα φυτά Αλόης εξαπλώθηκαν σε όλα τα νησιά της Καραϊβικής, την Κεντρική και Νότια Αμερική. Ειδικά στο νησί Μπαρμπάντος και Κουρασάο

στην Καραϊβική, το φυτό Αλόης αναπτύχθηκε ως εμπορική καλλιέργεια. Το 1720, ο Carl Von Linne ονόμασε την Αλόη επιστημονικά ως *Aloe vera* L., που σημαίνει «Αλόη η αληθινή». Η Αλόη καταχωρήθηκε επισήμως ως προσθετική και προστατευτική του δέρματος από τη Φαρμακοποιία των Ηνωμένων Πολιτειών (USP) το 1820 (Park and Lee, 2006).

1.6.2 Ταξινόμηση και βοτανική περιγραφή

Μέχρι πρόσφατα, οι περισσότερες πηγές ταξινομούσαν την Αλόη στην οικογένεια *Lily* (*Liliaceae*), αλλά σύμφωνα με τον *Reynolds*, έχει πλέον οριστεί η δική της οικογένεια, γνωστή ως *Aloaceae*. Παρ'όλα αυτά, σχετίζεται με την οικογένεια των κρίνων και με φυτά, όπως το σκόρδο, το κρεμμύδι και τα σπαράγγια, τα οποία είναι γνωστό ότι έχουν φαρμακευτικές ιδιότητες (Eshun and He, 2004). Το γένος *Aloe* περιλαμβάνει περισσότερα από 300 είδη, τα οποία είναι αυτοφυή κυρίως στην Αφρική και τη Μεσόγειο.

Κατατάσσονται σε δύο ομάδες ανάλογα με τη χρήση τους:

- 1) Για την παραγωγή εκχυλίσματος ως ακατέργαστων φαρμάκων και
- 2) Για την παραγωγή γέλης που χρησιμοποιείται στα τρόφιμα τα οποία συμβάλλουν στην καλύτερη λειτουργία της υγείας.

Μεταξύ αυτών, μόνο λίγα είδη έχουν χρησιμοποιηθεί εμπορικά, ενώ άλλα έχουν μόνο διακοσμητική αξία.

Τα είδη για την παραγωγή ακατέργαστων φαρμάκων είναι τα *Aloe vera* L. (= *Aloe barbadensis* Mill.), *A. ferox* Mill., *A. perryi* Baker κ.ά. και τα είδη που χρησιμοποιούνται σε τρόφιμα είναι η *Aloe vera* L., *A. arborescens* Mill., *A. saponaria*, κλπ (**Εικόνα 3**). Μόνο δύο είδη καλλιεργούνται σήμερα στο εμπόριο, με το *Aloe barbadensis* Miller και *Aloe arborescens* να είναι τα πιο δημοφιλή.

1. Η ***Aloe vera***, δηλαδή η πραγματική αλόη, εξαπλώθηκε σε όλη την περιοχή της Μεσογείου από τον άνθρωπο, οπότε είναι δύσκολο να διακρίνουμε ποια είναι η αρχική της προέλευση. Ορισμένοι θεωρούν ότι είναι εγγενές στις Κανάριες Νήσους. Οι πλησιέστεροι συγγενείς της, ωστόσο,

εμφανίζονται στην Αραβία, και αυτή είναι η πιο πιθανή περιοχή προέλευσης (Park and Lee, 2006).

Η *Aloe vera* διακρίνεται εύκολα από τα συγγενή είδη λόγω του ότι σχηματίζει απλή ή διακλαδισμένη ταξιανθία, ενώ παράγει και πολλές παραφυάδες. Είναι ένα πολυετές παχύφυτο, βραδείας ανάπτυξης, που φτάνει τα 160 cm ύψος (Μπαμπίλης, 2011). Υπάρχουν, όμως και είδη που μπορεί να γίνουν δέντρα με μεγάλους μίσχους και άλλα που έχουν μικρά φύλλα στο επίπεδο του εδάφους (Grindlay and Reynolds, 1986).

Τα φύλλα είναι 16-20 στον αριθμό, έχουν ελαφρώς όρθια ανάπτυξη και σχηματίζουν πυκνής διάταξης ροζέτα στην βάση τους η οποία ανοίγει προς τα πάνω. Είναι παχιά και σαρκώδη, με πλατύ και λογχοειδές σχήμα, οδοντωτά στην περιφέρεια χάρη στην ύπαρξη λευκών αγκάθων μήκους περίπου 2 mm. Τα παλιότερα στελέχη μπορεί να φτάνουν έως τα 25 cm (Grindlay and Reynolds, 1986). Τα πιο ώριμα φύλλα βρίσκονται στο εξωτερικό μέρος της ροζέτας (Shelton, 1991). Αποτελούνται από τέσσερα στρώματα: το φλοιό, τον υποφλοιώδη χιτώνα (sap), το στρώμα της κόλλας (latex) και το παρέγχυμα (πολφός). Ο εξωτερικός τους φλοιός είναι σκληρός και κηρώδης και στο εσωτερικό του εμπεριέχεται ένα υγρό υπό μορφή γέλης (gel), το οποίο επιτρέπει την αποθήκευση νερού και θρεπτικών συστατικών και συμβάλλει στην επιβίωση του φυτού σε περιόδους ξηρασίας. Σε νεαρή ηλικία έχουν ένα ελαφρύ πράσινο χρώμα το οποίο αλλάζει σε βαθύ πράσινο όταν ωριμάζουν. Φυτρώνουν απευθείας από τη βάση του φυτού, χωρίς μίσχο και μπορεί να ξεπεράσουν τα 50 cm σε μήκος, τα 8-10 cm σε πλάτος, ενώ το πάχος τους είναι περίπου 5 cm.

Τα άνθη έχουν σχήμα απλής ή διακλαδιζόμενης βοτρυώδους ταξιανθίας, αναπτύσσονται από το κέντρο του φυτού και είναι ερμαφρόδιτα, τριμερή με μήκος που μπορεί να φτάσει τα 3 cm. Το χρώμα τους ποικίλει από κίτρινο έως πορτοκαλί ή κόκκινο.

Ο καρπός είναι κάψα και φέρει πολλούς σπόρους. Οι σπόροι έχουν καφέ χρώμα και το μήκος τους μπορεί να φτάσει τα 7 mm.

Το ριζικό σύστημα του φυτού είναι αρκετά επιφανειακό, παρόλα αυτά μπορεί να ανταπεξέλθει πολύ καλά σε συνθήκες έντονης ξηρασίας, με την προϋπόθεση ότι έχει γίνει καλή εγκατάσταση του φυτού.

Είναι φυτό CAM, δηλαδή έχει τη δυνατότητα να φωτοσυνθέτει κατά τη διάρκεια της ημέρα διατηρώντας κλειστά τα στομάτια, περιορίζοντας έτσι τις απώλειες σε νερό μέσω της διαπνοής. Το χαρακτηριστικό αυτό σε συνδυασμό με την παχιά επιδερμίδα και τα σαρκώδη φύλλα, είναι που του δίνουν τη δυνατότητα να μπορεί να αντέχει σε συνθήκες ξηρασίας.

Η *Aloe vera* είναι εντομόφιλο φυτό, ωστόσο η επικονίαση γίνεται με τη βοήθεια των πουλιών.

Το φυτό της Αλόης προσαρμόζεται εύκολα σε διάφορες καιρικές συνθήκες, γι' αυτό και το συναντάμε σε διάφορα μήκη και πλάτη της γης. Είναι ευαίσθητο όμως, στα ισχυρά ρεύματα αέρα, τα οποία μπορούν εύκολα να σπάσουν κάποιο βλαστό ή φύλλο. Επίσης, αντέχει σε υψηλές θερμοκρασίες, αλλά ενδέχεται να μειώσουν την ταχύτητα ανάπτυξης του φυτού αν παραμείνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα (Μπαμπίλης, 2011).

Αναπτύσσεται καλύτερα σε ξηρό και αμμώδες έδαφος. Η αποστράγγιση είναι απαραίτητη, ώστε να αποφευχθεί η πιθανότητα σήψης της ρίζας από υπερβολική υγρασία. Ενώ αντέχει σε υψηλές θερμοκρασίες δε θεωρείται ιδανικό να βρίσκεται σε άμεση έκθεση στον ήλιο. Η σκιά είναι επιθυμητή και για το λόγο αυτό συναντάται συχνά να καλλιεργείται ανάμεσα σε οπωροφόρα δέντρα (Grindlay and Reynolds, 1986).

Σημαντική επίσης θεωρείται η κατάλληλη επέμβαση με λίπασμα αλλά και άρδευση κατά τους θερμούς μήνες. Μεγάλη προσοχή θα πρέπει και πάλι να δοθεί, ώστε να μην υπάρξει υπερχειλίση που μπορεί να προκαλέσει σήψη των βάσεων των φυτών (Grindlay and Reynolds, 1986).

Η αναπαραγωγή των φυτών μπορεί να γίνει είτε με παρακλάδια που αναπτύσσονται γύρω από τη κύρια βάση του στελέχους είτε με σπόρο. Η μεταμόσχευση γίνεται την άνοιξη, οπότε και οι συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας θεωρούνται ιδανικές (Grindlay and Reynolds, 1986).

Φτάνει στο στάδιο της ωρίμανσης μέσα σε 4-5 χρόνια – ο χρόνος ωρίμανσης εξαρτάται από τις συνθήκες ανάπτυξης της καλλιέργειας (Shelton, 1991) - και μπορεί να παραμείνει παραγωγικό για τα επόμενα 3-9 χρόνια. Μπορεί να ζήσει έως και 12 έτη κατά τη διάρκεια των οποίων μπορεί να παράγει περισσότερα από 80 φύλλα (Μπαμπίλης, 2011).

2. *Aloe arborescens* Mill. (= *Aloe mutabilis*, krantz aloe): Η λατινική λέξη *arborescens* σημαίνει δένδρο, και είναι λίγο παραπλανητική επειδή αυτή η

Αλόη δεν είναι πραγματικά δέντρο, αλλά το όνομα αρχικά εφαρμόστηκε σε αυτό το είδος σε σχέση με τη συνήθεια σχηματισμού στελέχους. Το κοινό όνομα *krantz aloe* αναφέρεται στο περιβάλλον του, ένα *krantz* είναι μια βραχώδης κορυφογραμμή ή γκρεμός. Το είδος που ήταν παλαιότερα γνωστό ως *Aloe mutabilis* θεωρείται τώρα ως συνώνυμο της *Aloe arborescens*. Αναπτύσσεται ως ένας θάμνος πολλαπλών κεφαλών ύψους 2-3 μέτρων. Διαθέτει εντυπωσιακά γκριζοπράσινα φύλλα, τα οποία είναι οπλισμένα με αγκάθια. Όπως με όλα τα είδη Αλόης, τα πολύχρωμα άνθη της παράγουν νέκταρ και είναι ελκυστικά για πολλά είδη πουλιών αλλά και εντόμων, ανάμεσα σε αυτά είναι φυσικά και οι μέλισσες. Είναι από τα λίγα είδη Αλόης που μπορεί να βρεθούν από το επίπεδο της θάλασσας μέχρι την ψηλότερη βουνοκορφή. Είναι πιθανώς η πιο ευρέως καλλιεργημένη Αλόη σε όλο τον κόσμο και μπορεί να υπάρχει ακόμη και σε κήπους σε μεγάλες πόλεις.

3. *Aloe saponaria* (Ait.) Haw. (African Aloe, soap aloe): Η *Aloe saponaria* είναι εγγενής στις ξηρές περιοχές στην Νοτιοανατολική Αφρική, τη Μποτσουάνα και τη Ζιμπάμπουε. Αναπτύσσεται σε μια στεφανιαία ροζέτα και η κύρια ροζέτα μπορεί να φτάσει τα 45 cm. Τα φύλλα της έχουν σχήμα λόγχης, είναι παχιά και χυμώδη, έχουν χρώμα πράσινο με λευκές κηλίδες και μπορούν να φτάσουν τα 24,5-30,5 cm μήκος. Τα περιθώρια των φύλλων είναι οπλισμένα με αιχμηρά σκούρα καφέ δόντια. Καλλιεργείται συνήθως για διακοσμητικούς σκοπούς.



Εικόνα 3 Τα δημοφιλέστερα είδη Αλόης. *Aloe barbadensis* (Α), *Aloe arborescens* (Β), *Aloe saponaria* (Γ)

1.6.3 Χημική σύσταση

Έχει αναφερθεί ότι η *Aloe vera* περιέχει 75 δυνητικά δραστικά συστατικά, μεταξύ αυτών: βιταμίνες, ένζυμα, μέταλλα, σάκχαρα, λιγνίνη, σαπωνίνες, σαλικυλικά οξέα και αμινοξέα (Vogler and Ernst, 1999). Ο **Πίνακας 5** συνοψίζει τα σημαντικότερα από αυτά τα συστατικά.

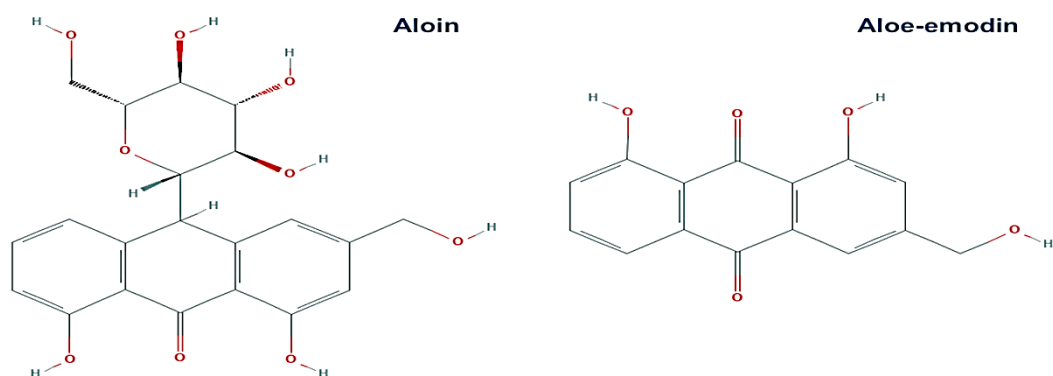
Πίνακας 5 Συστατικά της *Aloe vera* (Vogler and Ernst, 1999)

Ανθρακινόνες	Σάκχαρα	Απαραίτητα αμινοξέα	Μη απαραίτητα αμινοξέα
Αλοΐνη	Ακεμαννάνη	Λυσίνη	Ιστιδίνη
Βαρβαλοΐνη	Γλυκόζη	Θρεονίνη	Αργινίνη
Ισοβαρβαλοΐνη	Μαννόζη	Βαλίνη	Υδροξυπρολίνη
Ανθρανόλη	L-ραμνόζη	Λευκίνη	Ασπαρτικό οξύ
Αλοϊκό οξύ	Αλδοπεντόζη	Ισολευκίνη	Γλουταμικό οξύ
Εστέρας του κινναμωνικού οξέος	Κυτταρίνη	Φαινυλαλανίνη	Προλίνη
Εμοδίνη της Αλόης		Μεθιονίνη	Γλυκίνη
Εμοδίνη			Αλανίνη
Χρυσοφανικό οξύ			Τυροσίνη
Resistannol			
Βιταμίνες	Ανόργανες ενώσεις	Ένζυμα	Διάφορα
B1	Ασβέστιο	Κυκλοοξυγονάση	Χοληστερόλη
B2	Νάτριο	Οξειδάση	Τριγλυκερίδια
B6	Χλώριο	Αμυλάση	Στεροΐδη
Χολίνη	Μαγνήσιο	Καταλάση	β-σιποστερόλη
Φολικό οξύ	Ψευδάργυρος	Λιπάση	Λιγνίνες
C	Χρώμιο	Αλκαλική φωσφατάση	Ουρικό οξύ

α-τοκοφερόλη	Σορβικό κάλιο	Καρβοξυπεπτιδάση	Γιββερελλίνη
β-καροτένιο	Χαλκός		Λεκτίνη
	Μαγγάνιο		Σαλυκιλικό οξύ
	Σίδηρος		Αραχιδονικό οξύ

Το 1851 ανακαλύφθηκε ότι η ισχύς της Αλόης ήταν το αποτέλεσμα της αλοΐνης, μιας ανθρακινόνης που βρέθηκε στον πικρό χυμό, ο οποίος προέκυψε από ξεραμένη κίτρινη σκόνη και λειτούργησε ως καθαρτικό φάρμακο (**Εικόνα 4**).

Μία άλλη πολύ σημαντική ανθρακινόνη που βρέθηκε στη χημική σύσταση της Αλόης είναι η εμοδίνη της Αλόης (aloe-emodin). Η ουσία αυτή απαντάται στα περισσότερα από τα είδη της Αλόης. Η κρυσταλλική aloe-emodin έχει σχήμα βελόνας με πορτοκαλί χρώμα και εμφανίζει αντιφλεγμονώδη δράση, αλλά και τοξικότητα, καθώς εμφανίζει καθαρτικές ιδιότητες (Park and Lee, 2006) (**Εικόνα 4**).



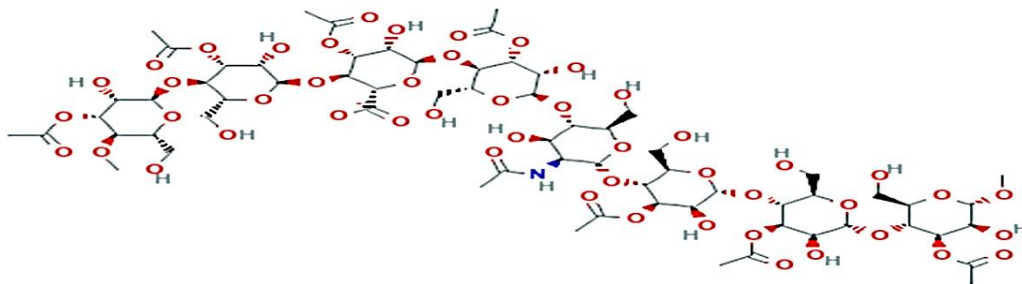
Εικόνα 4 Μοριακές δομές αλοΐνης και εμοδίνης της Αλόης

Διαπιστώθηκε επίσης, ότι τα φύλλα του φυτού της *Aloe vera* περιείχαν 99,5% νερό και 0,013% πρωτεΐνη (Shelton, 1991). Αν και η ποσότητα των συνολικών πρωτεϊνών που υπάρχουν στην Αλόη είναι σχετικά μικρή, οι βιολογικές της δραστηριότητες είναι σημαντικές, όπως αποδεικνύεται από τις

πολλές κλινικές εφαρμογές. Στο επιφανειακό στρώμα των φύλλων της Αλόης, δηλαδή ανάμεσα στο πήκτωμα και την επιδερμίδα, παράγονται οι περισσότερες πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λιπίδια και άλλες ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους που παρέχουν διάφορες φυσιολογικές δραστηριότητες. Μία από αυτές είναι η καρβοξυπεπτιδάση, η οποία είναι γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 28kDa ή 56kDa. Έχει αποδειχθεί ότι αυτή η πρωτεΐνη είναι αποτελεσματική στην ανακούφιση του πόνου που προκαλείται από τη φλεγμονή (Park and Lee, 2006).

Τόσο τα νωπά όσο και τα εμπορικά παρασκευάσματα Αλόης βρέθηκαν να περιέχουν υψηλά επίπεδα με ουσίες παρόμοιες των λεκτινών. Οι λεκτίνες, οι οποίες βρίσκονται σε μερικούς σπόρους φυτών, είναι αιμοσυγκολλητικές πρωτεΐνες που προσδένονται σε γλυκοπρωτεΐνες και μειώνουν τη φλεγμονή. Η λιγνίνη, η οποία είναι παρόμοια με την κυτταρίνη, πιστεύεται ότι παρέχει την ικανότητα στην Αλόη να διεισδύει στο δέρμα. Η γιββερελλίνη δρα ως αυξητική ορμόνη: μειώνει τη φλεγμονή, αλλά, σε αντίθεση με τα στεροειδή, διεγείρει τη σύνθεση πρωτεϊνών (Shelton, 1991).

Λέγεται πως τα σημαντικότερα συστατικά του πηκτώματος (gel), είναι οι λεκτίνες και οι πολυσακχαρίτες. Θεωρούνται μάλιστα υπεύθυνα για την αντιφλεγμονώδη και ανοσοτροποποιητική δράση. Ο κυριότερος και σημαντικότερος πολυσακχαρίτης της Αλόης είναι το ακετυλιωμένο μαννάνιο (**Acemannan**, ACM) (**Εικόνα 5**), το οποίο αποτελείται από ένα πολυδιασκορπισμένο β-1,4-συνδεδεμένο μαννάνιο υποκατεστημένο με ομάδες Ο-ακετυλίου. Έχει διαπιστωθεί ότι η ακεμαννάνη διαθέτει αντι-ιική και αντικαρκινική δράση (Koga et al., 2018, Deepthi and Kumar, 2018, Swami Hulle et al., 2017).



Εικόνα 5 Γενική δομή ακετυλιωμένης μαννάνης της Αλόης

Η ακεμαννάνη, ο κύριος πολυσακχαρίτης της Αλόης, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο για δύο λόγους. Πρώτον, είναι η βιολογική του δράση, ιδιαίτερα όσον αφορά το δέρμα. Φαίνεται να εμφανίζει μαλακτική δράση αλλά και έντονη ενυδατική ικανότητα. Επιπλέον, υπάρχουν επιστημονικά δεδομένα που δείχνουν ότι ο πολυσακχαρίτης αυτός ενισχύει την ικανότητα των θεραπευτικών παραγόντων να διεισδύσουν στο δέρμα, ενισχύοντας έτσι το ευεργετικό τους αποτέλεσμα (Deerthi and Kumar, 2018).

Δεύτερον, το επίπεδο των πολυσακχαριτών είναι ένας εξαιρετικός δείκτης της γενικής ποιότητας της Αλόης. Ένας καταναλωτής, ο οποίος έχει πρώτα μελετήσει για το φυτό της Αλόης και ύστερα προέβη σε αγορά, θα αμφισβητήσει οποιοδήποτε προϊόν που έχει υποστεί υπερβολική επεξεργασία. Τα χαμηλά επίπεδα πολυσακχαρίτη υποδεικνύουν ένα παρασκεύασμα Αλόης που έχει επεξεργαστεί αρκετά. Επομένως, θα πρέπει να είναι προφανές ότι η καλής ποιότητας Αλόη πρέπει να έχει το υψηλότερο δυνατό επίπεδο πολυσακχαριτών (Habtemariam, 2017).

Έπειτα, θα ήταν χρήσιμο να σημειωθεί πως η Αλόη περιέχει, όπως και τα περισσότερα φυτά, κελουλλάση στους ιστούς της. Αυτό το ένζυμο μπορεί να αρχίσει να διασπά τον κύριο πολυσακχαρίτη μόλις γίνει η συγκομιδή και η επεξεργασία. Τα βακτήρια μπορούν επίσης, να παράγουν ένζυμα που διασπούν τον πολυσακχαρίτη. Εάν τα βακτήρια αναπτύσσονται με ανεξέλεγκτο τρόπο, επιταχύνουν την απώλεια του πολυσακχαρίτη. Οι ίδιοι παράγοντες που βοηθούν στον έλεγχο της απώλειας πολυσακχαρίτη από φυτικά ένζυμα - χαμηλή θερμοκρασία και γρήγορη επεξεργασία - συμβάλλουν

στην ελαχιστοποίηση της ανάπτυξης των βακτηρίων (Ramachandra and Rao, 2008).

1.6.4 Χρήσεις

Η Αλόη χρησιμοποιείται εδώ και χιλιάδες χρόνια για ιατρικούς και θεραπευτικούς σκοπούς. Ωστόσο, δε μένουν μόνο σε αυτό τον τομέα οι χρήσεις της. Βιομηχανίες τροφίμων, αλλά και καλλυντικών τη θεωρούν ένα πολύ σημαντικό υλικό για τη δημιουργία καινούργιων ή τη βελτίωση ήδη υπαρχόντων προϊόντων.

Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται από τις φαρμακοβιομηχανίες ως παρασκεύασμα τοπικών προϊόντων, όπως αλοιφές και παρασκευάσματα γέλης, καθώς και στην παραγωγή δισκίων και καψουλών (Hamman, 2008). Το έκκριμα του φυτού, που βρίσκεται στα περικυκλικά κύτταρα των αγγειωδών δεσμίδων του φύλλου χρησιμοποιείται είτε νωπό, είτε αποξηραμένο. Το νωπό έκκριμα εφαρμόζεται κυρίως σε δερματικές παθήσεις, ενώ το αποξηραμένο έχει περισσότερο υπατικές, καθαρτικές και αντιελμινθικές δράσεις. Η γέλη της Αλόης, που προέρχεται από το εσωτερικό του φύλλου, έχει και αυτή πολλαπλές φαρμακευτικές ιδιότητες. Εφαρμόζεται σε διάφορες δερματικές παθήσεις, ερεθισμούς, πληγές, καψίματα ή εκδορές, ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως κατάπλασμα πάνω σε μώλωπες (Μπαμπίλης, 2011).

Σημαντικές φαρμακευτικές ιδιότητες που ανακαλύφθηκαν πρόσφατα τόσο για τη γέλη της *A. vera* όσο και για το εκχύλισμα ολόκληρων φύλλων περιλαμβάνουν την ικανότητα βελτίωσης της βιοδιαθεσιμότητας των συγχωρηγούμενων βιταμινών σε ανθρώπους (Hamman, 2008).

Μερικές από τις ασθένειες στις οποίες εφαρμόζεται η Αλόη με πολύ καλά αποτελέσματα είναι οι παρακάτω:

1. Αρθρίτιδα
2. Άσθμα
3. *Candida albicans* (καντιντίαση)
4. Σύνδρομο χρόνιας κόπωσης

-
5. Διαταραχές του πεπτικού συστήματος και του εντέρου (π.χ., ατονική δυσκοιλιότητα, σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου, ασθένεια Crohn, ελκώδης κολίτιδα)
 6. Ερυθηματώδη λύκο
 7. Δερματικά προβλήματα (π.χ. έκζεμα, ψωρίαση, ακμή, εγκαύματα, κρυοπαγήματα)
 8. Αθλητικά τραύματα
 9. Έλκη (εξωτερικό και εσωτερικό)

Ακόμη μερικές από τις εικαζόμενες φαρμακολογικές ιδιότητες της Αλόης αναφέρονται παρακάτω:

1. Μη τοξική - δεν υπάρχουν γνωστές παρενέργειες
2. Παρέχει τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά
3. Διαλύει και χωνεύει τον νεκρό ιστό
4. Αντιφλεγμονώδης
5. Μειώνει το πρήξιμο
6. Ενυδατώνει
7. Διεισδύει στον ιστό
8. Αντιμυκητιακή
9. Ανακουφίζει από την κνησμό
10. Αντιμικροβιακή - αποτρέπει τις λοιμώξεις
11. Δημιουργεί τοπική αναισθησία και ανακουφίζει από τον πόνο
12. Καθαρίζει και αποτοξινώνει τον οργανισμό
13. Διεγείρει την κυτταρική ανάπτυξη (Vogler and Ernst, 1999)

Η Αλόη χρησιμοποιείται επίσης από τις βιομηχανίες τροφίμων. Αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο συστατικό για υγιεινά τρόφιμα αλλά και ποτά, ιδιαίτερα χρησιμοποιείται στη ζυθοποιία για την πικρή γεύση της (Μπαμπίλης, 2011). Η *Aloe vera* είναι το πιο εμπορεύσιμο είδος Αλόης και η επεξεργασία του πολτού αλλά και των φύλλων έχει οδηγήσει στη δημιουργία μιας παγκόσμιας βιομηχανίας τροφίμων.

Χάρη στις ενυδατικές της ιδιότητες, η Αλόη – και ιδιαίτερα η γέλη της - παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στις βιομηχανίες καλλυντικών. Χρησιμοποιείται ως υλικό βάσης για να παραχθούν κρέμες, λοσιόν, σαμπουάν, σαπούνια, καθαριστικά προσώπου και άλλα προϊόντα (Hamman, 2008).

1.6.5 Επεξεργασία φύλλων Αλόης για χρήση στο εμπόριο

Η γέλη της Αλόης λαμβάνεται από τα παρεγχυματικά κύτταρα του φυτού. Όταν εκτίθεται στον αέρα οξειδώνεται πολύ γρήγορα, αποσυντίθεται και χάνει μεγάλο μέρος της βιολογικής δράσης της. Πολλοί ερευνητές έχουν αναφερθεί στους διάφορους τρόπους επεξεργασίας της, που μπορεί να αφορούν την παστερίωση ή τη σταθεροποίησή της, με θερμική ή ψυχρή επεξεργασία. Ωστόσο, η θεμελιώδης αρχή που διέπει αυτές τις τεχνικές επεξεργασίας παραμένει ίδια. Ανεξάρτητα από το ποια είναι η ποιότητα της εγκατάστασης των φυτών τα καλύτερα αποτελέσματα επιτυγχάνονται όταν η επεξεργασία των φύλλων γίνει αμέσως μετά τη συγκομιδή. Αυτό συμβαίνει επειδή η αποσύνθεση της γέλης αρχίζει λόγω φυσικών ενζυματικών αντιδράσεων, καθώς και της ανάπτυξης βακτηρίων, εξαιτίας της παρουσίας οξυγόνου (Eshun and He, 2004).

Καταρχάς η συγκομιδή της Αλόης γίνεται με το χέρι από εξειδικευμένο προσωπικό, το οποίο είναι προστατευμένο με κατάλληλο εξοπλισμό, ώστε να προστατευθεί από τα αγκάθια των φύλλων. Η κοπή γίνεται με αιχμηρό μαχαίρι από τη βάση του φυτού, έτσι ώστε η επιφάνεια κοπής να σφραγίζεται και να αποφεύγεται η απορροή εξιδρώματος από το φύλλο, καθώς η κηλίδωση προκαλείται πολύ εύκολα. Μετά τη συγκομιδή, τα φύλλα τυλίγονται ξεχωριστά και μεταφέρονται στη μονάδα επεξεργασίας, η οποία θα πρέπει να βρίσκεται σε κοντινή απόσταση (Grindlay and Reynolds, 1986).

Η διαδικασία επεξεργασίας της Αλόης ξεκινάει με πολύ καλό πλύσιμο των φρεσκοκομμένων φύλλων αρχικά με νερό και έπειτα με κάποιο κατάλληλο βακτηριοκτόνο. Στη συνέχεια γίνεται διαχωρισμός της γέλης από τον εξωτερικό φλοιό. Αυτό μπορεί να διευκολυνθεί και με τη χρήση ειδικών ενώσεων διάλυσης κυτταρίνης. Το λαμβανόμενο υγρό επεξεργάζεται με ενεργό άνθρακα για να αποχρωματιστεί και να καθαριστεί από την αλοΐνη και τις ανθρακινόνες οι οποίες είναι υπεύθυνες για καθαρικά αποτελέσματα. Αυτό θα πρέπει να γίνεται οπωσδήποτε ειδικά σε περιπτώσεις που η Αλόη χορηγείται από του στόματος. Το προκύπτον υγρό στη συνέχεια υποβάλλεται σε διάφορα στάδια διήθησης, αποστείρωσης και σταθεροποίησης (Eshun and He, 2004).

Στην τεχνική επεξεργασίας με ψύξη, όλα τα στάδια επιτυγχάνονται χωρίς καθόλου εφαρμογή θερμότητας. Γίνεται χρήση διαφόρων ενζύμων, όπως η οξειδάση της γλυκόζης και η καταλάση, για να εμποδιστεί η ανάπτυξη αερόβιων οργανισμών μέσα στη γέλη της Αλόης και έτσι να αποστειρωθεί (Eshun and He, 2004).

Στην τεχνική επεξεργασίας με θερμότητα, η αποστείρωση επιτυγχάνεται υποβάλλοντας το υγρό της Αλόης, που είχε προηγουμένως επεξεργαστεί με ενεργό άνθρακα, σε παστερίωση με υψηλή θερμοκρασία. Στο σημείο αυτό, θα πρέπει να σημειωθεί πως η βιολογική δράση της Αλόης, ουσιαστικά παραμένει ανέπαφη όταν η γέλη θερμαίνεται σε θερμοκρασία 65°C για λιγότερο από 15 λεπτά. Μεγαλύτερη χρονική διάρκεια ή υψηλότερες θερμοκρασίες έχουν οδηγήσει σε πολύ μειωμένα επίπεδα δράσης. Λέγεται, πως η καλύτερη μέθοδος είναι η HTST (High Temperature Short Time), δηλαδή υψηλή θερμοκρασία για σύντομο χρονικό διάστημα, ακολουθούμενη από ψύξη στους 5°C ή και χαμηλότερα (Eshun and He, 2004).

Η σταθεροποίηση της γέλης Αλόης και στις δύο τεχνικές επεξεργασίας μπορεί να γίνει με την προσθήκη συντηρητικών ή άλλων πρόσθετων, όπως βενζοϊκού νατρίου, σορβικού καλίου, κιτρικού οξέος ή βιταμίνης E (Eshun and He, 2004).

1.7 Εφαρμογή μεταβολομικής ανάλυσης στη φυτοπροστασία

Οι ομικές επιστήμες ανήκουν στα σύγχρονα βιολογικά συστήματα. Ανάμεσα σε αυτές είναι η γονιδιωματική (**genomics**), η μεταγραφική (**transcriptomics**), η πρωτεϊνωματική (**proteomics**) και η μεταβολομική (**metabolomics** ή **metabonomics**) (Spratlin et al., 2009). Η μεταβολομική είναι ο τομέας που ασχολείται με φυσικούς μεταβολίτες χαμηλού μοριακού βάρους εντός ενός οργανισμού, ιστών ή κυττάρων (Bundy et al., 2008, Griffiths, 2007, Lindon et al., 2011). Όλοι αυτοί οι τομείς των ομικών επιστημών, έχουν ανακαλυφθεί εδώ και δεκαετίες, ωστόσο δεν είχαν γίνει πολλές έρευνες με τη βοήθειά τους. Τα τελευταία χρόνια, γίνονται αξιόλογες προσπάθειες για μελέτες

στηριζόμενες σε αυτό το εργαλείο βιολογίας επάνω σε πολλούς τομείς (Spratlin et al., 2009).

Στη σημερινή εποχή, ο ανθρώπινος πληθυσμός αυξάνεται με πολύ γρήγορους ρυθμούς. Από την άλλη πλευρά, η παραγωγή των τροφίμων διατηρεί ένα συγκεκριμένο αριθμό και για το λόγο αυτό υπάρχει η ανησυχία, που αφορά την κάλυψη των αναγκών σε τροφή όλων αυτών των ανθρώπων. Η συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση για περισσότερα τρόφιμα, ενέχει και κάποιους κινδύνους. Ένας από αυτούς είναι η υποβάθμιση της ποιότητας των τροφίμων με στόχο την αύξηση της παραγόμενης ποσότητάς τους. Στο σημείο αυτό, έρχεται να εισβάλλει η μεταβολομική, ως μία νέα μέθοδος που θα μπορούσε να προσφέρει βοήθεια στην έρευνα και ανάπτυξη της αγροβιομηχανίας (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011).

Η αγροβιομηχανία με τη βοήθεια της μεταβολομικής, έρχεται να μελετήσει μεθόδους ανάπτυξης νέων, πρωτοποριακών προϊόντων για την καταπολέμηση ασθενειών, εχθρών αλλά και αυτών που θα συμβάλλουν στην ενίσχυση της άμυνας και ανάπτυξης των φυτών, τα οποία θα είναι ασφαλή και για το περιβάλλον αλλά και για τον ίδιο τον καταναλωτή. Οι έρευνες επικεντρώνονται κυρίως σε φυσικές πηγές βιοδραστικότητας, που προκύπτουν από φυσικά προϊόντα ή τα χημικά τους ανάλογα (Aliferis and Jabaji, 2011).

Η ανάπτυξη της μεταβολομικής αποτελεί σημείο καμπής για την επιστημονική έρευνα και έχει δώσει μια νέα διάσταση στη βιολογική επιστήμη, καθώς επέτρεψε την εις βάθος μελέτη των μεταβολικών παγκοσμίως (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011). Αποτελεί ένα ισχυρό βιοαναλυτικό εργαλείο, με τη βοήθεια του οποίου μπορεί ταχύτερα και πιο άμεσα να οδηγηθούμε στην ανακάλυψη του τρόπου δράσης των βιοδραστικών ενώσεων (Aliferis and Jabaji, 2011).

Σύμφωνα με τον ορισμό της, μεταβολομική είναι η πλήρης ποιοτική και ποσοτική κατατομή ενός μεγάλου αριθμού μεταβολικών ενός βιολογικού συστήματος. Η μεταβολομική αποτελεί σύνδεσμο ανάμεσα στο γονότυπο και το φαινότυπο, καθώς παρέχει τη δυνατότητα ταυτόχρονης παρακολούθησης των μεταβολικών δικτύων και ανίχνευση βιοδεικτών (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011).

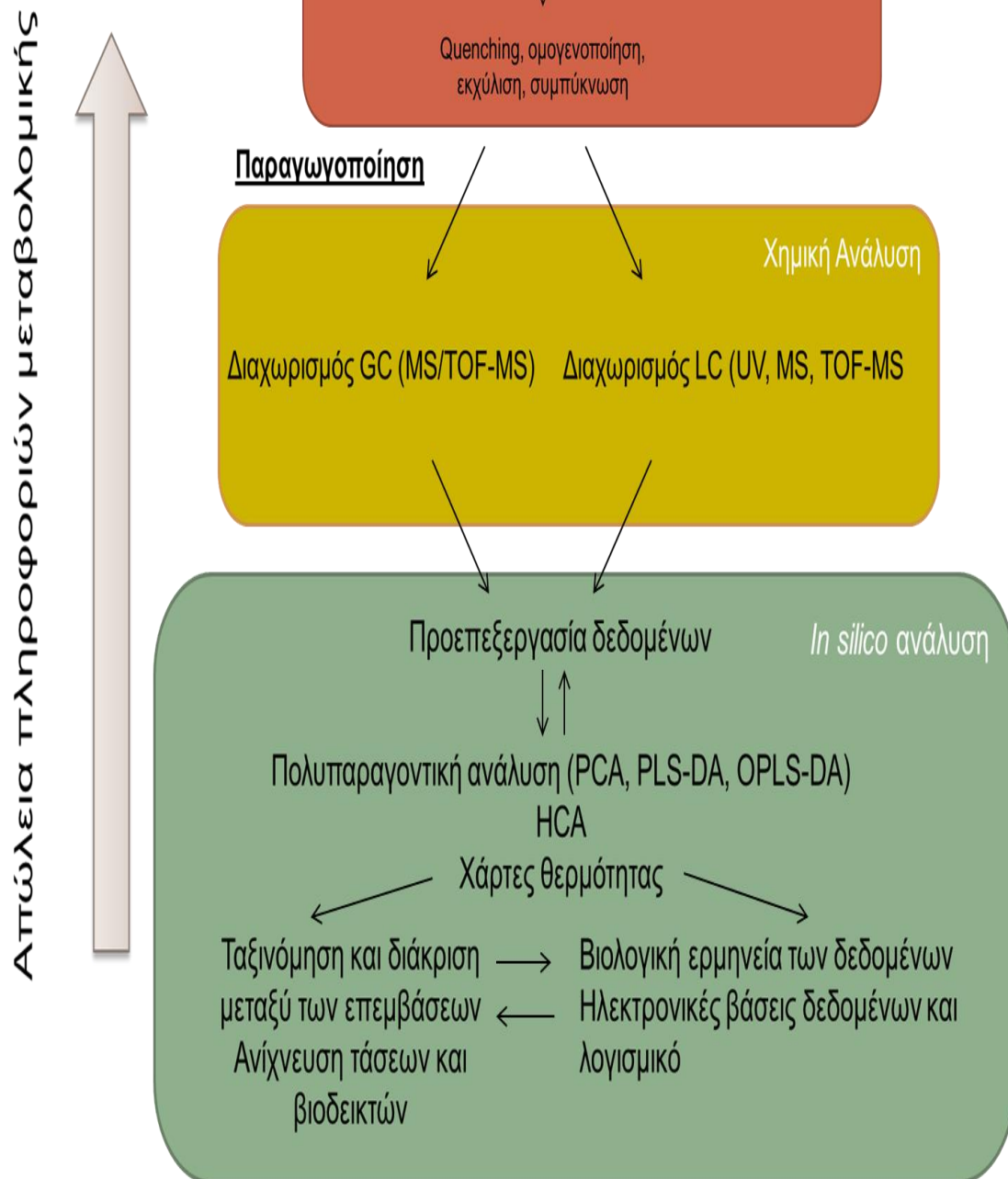
Η μεταβολομική περιλαμβάνει διάφορους τύπους αναλύσεων. Ένας από αυτούς είναι το μεταβολικό «δακτυλικό αποτύπωμα» (**metabolic fingerprinting**). Σε αυτό μετράται ένα υποσύνολο του μεταβολικού προφίλ με μία μικρή διαφοροποίηση ή ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών. Ένας άλλος παράγοντας που μελετάται είναι το μεταβολικό προφίλ (**metabolic profiling**), στο οποίο γίνεται ποσοτική μελέτη του συνόλου των μεταβολιτών, γνωστών και αγνώστων, ενός οργανισμού σε ένα συγκεκριμένο μεταβολικό μονοπάτι (Spratlin et al., 2009).

Στα ανώτερα φυτά εκτιμάται πως υπάρχουν πάνω από 100.000 μεταβολίτες, τόσο πρωτογενείς, οι οποίοι συμμετέχουν άμεσα σε ζωτικής σημασίας λειτουργίες των φυτών, όσο και δευτερογενείς, που εμφανίζουν επίσης σημαντικό ρόλο, καθώς συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτών και περιβάλλοντος. Από αυτούς τους μεταβολίτες έχει βρεθεί μόνο το περίπου 10% και πιστεύεται πως αποτελούν βασικά συστατικά της άμυνας των φυτών, πολύ χρήσιμα για εφαρμογές στις επιστήμες της Γεωπονίας και της Βιοτεχνολογίας (Aliferis and Jabaji, 2012b, Aliferis and Jabaji, 2012a).

Όταν ένας οργανισμός εκτεθεί σε κάποιο βιοδραστικό μόριο προκαλείται διαταραχή στους μεταβολίτες του, η οποία μπορεί να είναι αναστρέψιμη ή μη. Η διαταραχή αυτή, μπορεί να επηρεάσει τις μεταβολικές οδούς και να οδηγήσει ακόμη και στο θάνατο (Aliferis and Jabaji, 2011). Με άλλα λόγια, όταν ένας οργανισμός λειτουργεί φυσιολογικά η σύνθεση των μεταβολιτών του κυμαίνεται σε κάποια συγκεκριμένα επίπεδα. Στην περίπτωση που ο οργανισμός τεθεί σε κάποιο στρες, δημιουργείται μια νέα μεταβολική ισορροπία (Aliferis et al., 2012). Συνεπώς, παρακολουθώντας τις μεταβολές του μεταβολισμού του συγκεκριμένου οργανισμού με τη βοήθεια της μεταβολομικής, μπορούν να παραχθούν πληροφορίες χρήσιμες για τη φυσιολογική του κατάσταση μετά την έκθεση του σε αυτές τις βιοδραστικές ενώσεις (Aliferis and Jabaji, 2011).

Η μεταβολομική ανάλυση αποτελείται από τρεις διακριτές πειραματικές φάσεις. Η πρώτη φάση αφορά την προετοιμασία του δείγματος, η δεύτερη είναι η χημική ανάλυση και στην τρίτη βγαίνουν τα δεδομένα στηριζόμενα στη βιοπληροφορική (Aliferis and Jabaji, 2012a). Το σημαντικότερο βήμα για να επιτευχθεί η διαδικασία της μεταβολομικής είναι η επιλογή της κατάλληλης πλατφόρμας ανάλυσης των δειγμάτων. Οι αναλυτές φασματοσκοπίας

πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Response: NMR) και φασματομετρίας μάζας (Mass Spectrometry: MS) – GC/MS, LC/MS (Liquid Chromatography / Mass Spectrometry), FT-ICR/MS (Fourier Transform - Ion Cyclotron Response / Mass Spectrometry) και Orbitrap MS - είναι τα δύο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι αναλυτικά όργανα, που εφαρμόζονται σε μελέτες μεταβολισμού. Η επιλογή του καταλληλότερου οργάνου εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η χημική σύνθεση των δειγμάτων, τα διαθέσιμα όργανα και ο σκοπός της μελέτης (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011). Στην **Εικόνα 6** φαίνονται τα βασικά βήματα μιας μεταβολομικής μελέτης, καθώς και οι αναλυτές που χρησιμοποιούνται.



Εικόνα 6 Αντιπροσωπευτικά βήματα ενός τυπικού πειράματος μεταβολομικής. FT-ICR/MS: Fourier transform-ion cyclotron resonance–mass spectrometry, GC: gas chromatography, HCA: hierarchical cluster analysis, LC: liquid chromatography, MS: mass spectrometry, NMR: nuclear magnetic resonance spectroscopy, OPLS-DA: orthogonal partial least squares discriminant analysis, PCA: principal components analysis, TOF: time-of-flight

Στο σημείο αυτό θεωρείται χρήσιμο να τονιστεί ότι οι μεταβολίτες διαφέρουν πολύ όχι μόνο από φυτό σε φυτό, αλλά και από όργανο σε όργανο, ή ακόμη και στο ίδιο όργανο. Για το λόγο αυτό, θα πρέπει να γίνεται πολύ προσεκτική και λεπτομερής δειγματοληψία. Στη συνέχεια, το quenching ή αλλιώς σβήσιμο του μεταβολισμού είναι απαραίτητο, καθώς έτσι μπορούν να αποφευχθούν ανεπιθύμητες αλλαγές στο μεταβόλωμα του οργανισμού που θα μπορούσαν να επηρεάσουν σημαντικά τη βιολογική ερμηνεία των δεδομένων. Έπειτα τα δείγματα θα πρέπει να μεταφέρονται κατευθείαν σε κατάψυξη με θερμοκρασία -80°C , ώστε να επιτευχθεί ξήρανση του φυτικού υλικού πριν την εκχύλιση και συμπύκνωση (Aliferis and Jabaji, 2012a).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για μεταβολομική ανάλυση είναι η MS και NMR. Η NMR φασματοσκοπία μπορεί να παρέχει δομικές πληροφορίες για καθαρές ενώσεις και πολύπλοκα μίγματα. Αν και στερείται την ευαισθησία που διαθέτει η MS, εμφανίζει άλλα πλεονεκτήματα, όπως η υψηλή αναπαραγωγικότητα και ελαχιστοποίηση όσον αφορά την προετοιμασία των δειγμάτων (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011).

Ανάμεσα στα πλεονεκτήματα του MS είναι το κόστος αγοράς ενός απλού συστήματος, καθώς και το κόστος λειτουργίας και συντήρησης αυτού οδήγησαν πολλά εργαστήρια να εφοδιαστούν με τα συγκεκριμένα μηχανήματα για τις έρευνές τους (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011).

Θα πρέπει να τονιστεί βέβαια, ότι η χρήση διαφορετικών πλατφορμών ανάλυσης δίνει καλύτερα και με μεγαλύτερη ακρίβεια αποτελέσματα, σε σχέση με τη χρήση μίας μόνο μεθόδου.

Οι αναλύσεις μεταβολομικής καταλήγουν σε μεγάλο όγκο δεδομένων, των οποίων η ερμηνεία απαιτεί χρόνο, αλλά και τα κατάλληλα εργαλεία υψηλής απόδοσης για τη συσχέτισή τους με τις φυσιολογικές διεργασίες και τις μεταβολικές οδούς των υπό εξέταση βιολογικών συστημάτων (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011). Σε περιπτώσεις που εντοπίζεται μεγάλος αριθμός βιολογικών δεικτών, απαιτείται προηγμένη βιοπληροφορική και βάσεις δεδομένων, όπως το λογισμικό Cytoscape, οι βάσεις δεδομένων και τα εργαλεία των BioCyc, PathVisio και Kegg, για τη βιολογική ερμηνεία των αποτελεσμάτων της μεταβολομικής (Aliferis and Jabaji, 2011).

Παρόλα αυτά, η γνώση των οδών μεταβολισμού εξακολουθεί να είναι ελλιπής, το ίδιο και η ύπαρξη βιοαναλυτικών πρωτοκόλλων μεταβολομικής, που θα παρακολουθούν το πλήρες φάσμα των μεταβολιτών που υπάρχουν στους ιστούς των φυτών. Τα εμπόδια αυτά αναμένεται να ξεπεραστούν με τον καιρό και να υπάρξει εξέλιξη στο συγκεκριμένο κομμάτι (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011, Aliferis and Jabaji, 2012b).

2. Σκοπός

Τα προβλήματα και οι προκλήσεις που αντιμετωπίζει ο τομέας της φυτοπροστασίας επιτάσσουν την ανακάλυψη νέων, εναλλακτικών πηγών βιοδραστικότητας. Στο πλαίσιο αυτό, σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης αποτέλεσε η αξιολόγηση της άμεσης μυκοτοξικότητας του φαρμακευτικού φυτού Αλόη σε φυτοπαθογόνους μύκητες της ελιάς και της έμμεσης δράντας ως βιοδιεγέρτης, με εφαρμογή GC/EI/MS μεταβολομικής. Το τελευταίο αξιολογείται με βάση το ρόλο των μεταβολιτών-βιοσημαντών που ανακαλύπτονται στο μεταβολισμό των φυτών.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Χημικά και αντιδραστήρια

3.1.1 Χημικά και αντιδραστήρια για την εκχύλιση γέλης και φλοιού Αλόης

Όλα τα χημικά και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της υψηλότερης διαθέσιμης τεχνικής καθαρότητας.

Για την εκχύλιση γέλης και φλοιού Αλόης χρησιμοποιήθηκαν οι οργανικοί διαλύτες μεθανόλη (MeOH) και αιθανόλη (EtOH) (Sigma-Aldrich Ltd Steinheim, Germany). Όλα τα εργαστηριακά εργαλεία, όπως λαβίδες, λεπίδες και γουδιά που χρησιμοποιούνταν για την επεξεργασία των δειγμάτων κατά τη διαδικασία των εκχυλίσεων ξεπλενόταν με ακετόνη (GC/MS grade, καθαρότητας 99.9%). Για την αποστείρωση του φελλοτρυπητήρα στο πείραμα με τους φυτοπαθογόνους μύκητες χρησιμοποιήθηκε προπανόλη (καθαρότητας 99.9%).

3.1.2 Χημικά και αντιδραστήρια για τη διεξαγωγή αναλύσεων μεταβολομικής φύλλων Αλόης και φυτών τομάτας

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία των δειγμάτων για τη GC/EI/MS μεταβολομική ανάλυση ήταν πυριδίνη (καθαρότητας 99,8%), methoxylamine hydrochloride (καθαρότητας 98%) (MeOX), N-methyl-N-(trimethyl-silyl) trifluoroacetamide (MSTFA) και ριβιτόλη. Τα αναλυτικά πρότυπα ήταν της εταιρείας Sigma-Aldrich Ltd (Steinheim, Germany). Οι εκχυλίσεις πραγματοποιούνταν με MeOH και οξικό αιθυλεστέρα (GC/MS grade, καθαρότητας 99.9%) (Carlo Erba Reagents, val de Reuil, France).

3.2 Βιολογικό υλικό

3.2.1 Φυτικό υλικό

3.2.1.1 Φύλλα Αλόης (*Aloe barbadensis* Miller)

Χρησιμοποιήθηκαν φύλλα Αλόης (**Εικόνα 7**) από καλλιέργειες της περιοχής των Αγίων Αποστόλων, Νεάπολης στη Νότια Λακωνία. Πιο συγκεκριμένα, αποτέλεσαν ευγενική χορηγία της εταιρείας ΒΟΙΩΝ ΑΛΟΗ ΒΕΡΑ ΙΚΕ. Μετά την κοπή τους μεταφέρονταν άμεσα στο Εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, όπου και συντηρούνταν στους 3°C μέχρι τη χρησιμοποίησή τους.



Εικόνα 7 Φυτό *Aloe barbadensis* και εγκάρσιες τομές φύλλων

3.2.1.2 Φυτά τομάτας (*Lycopersicum esculentum* L.)

Στα πειράματα μεταβολομικής ως οργανισμοί-μοντέλα, χρησιμοποιήθηκαν φυτάρια τομάτας (*L. esculentum* L.), των οποίων το ριζικό σύστημα εμβαπτιζόταν σε νερό ή αιθανολικά εκχυλίσματα γέλης Αλόης και έπειτα ακολούθησε η GC/EI/MS μεταβολομική ανάλυσή τους. Τα φυτάρια προέρχονταν από σπόρους της ημι-αναρριχώμενης επιτραπέζιας ποικιλίας Pomodoro Ace 55VF (Gemma). Οι σπόροι διατηρούνταν στους 3°C.

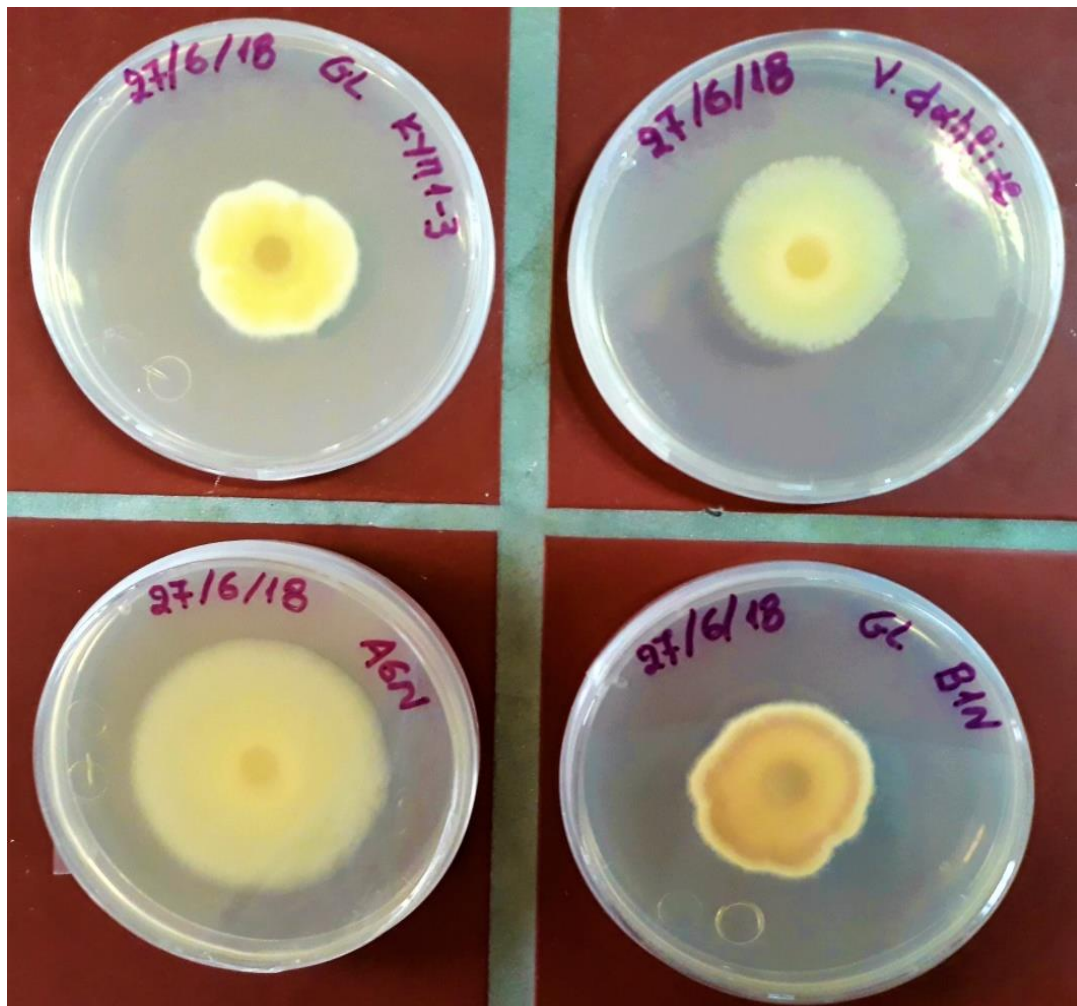
3.2.2 Φυτοπαθογόνοι μύκητες που χρησιμοποιήθηκαν στις βιοδοκιμές αξιολόγησης της βιοδραστικότητας εκχυλισμάτων Αλόης

Επιλεγμένοι φυτοπαθογόνοι μύκητες της ελιάς (**Εικόνα 8**), χρησιμοποιήθηκαν στις βιοδοκιμές. Οι μύκητες εκτίθονταν σε εκχυλίσματα Αλόης για την αξιολόγηση της βιοδραστικότητάς τους. Χρησιμοποιήθηκαν οι μύκητες Βερτισίλιο (*V. dahliae*), και επιλεγμένα στελέχη Γλοιοσπορίου (*C. acutatum*). Τα στελέχη αυτά είναι το ΚΥΠ1-3, B1N και A6N, τα οποία έχουν προκύψει από απομονώσεις μυκήτων από καρπούς ελιάς (Κωλέττη et al., 2018, Κολαϊνής et al., 2018). Τα συγκεκριμένα στελέχη επιλέχθηκαν εξαιτίας ανθεκτικότητας ή μη σε επιλεγμένα Φ.Π. (Dodine, Kresoxim-methyl, Tebuconazole), που χρησιμοποιούνται στη φυτοπροστασία της ελιάς (Κωλέττη et al., 2018, Κολαϊνής et al., 2018). Όλοι οι μύκητες διατηρούνταν σε θάλαμο επώασης σε συνθήκες σκότους στους 22°C.

3.3 Καλλιέργεια φυτοπαθογόνων μυκήτων

Τα στελέχη των φυτοπαθογόνων μυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν για τη συγκεκριμένη βιοδοκιμή (*V. dahliae*, *C. acutatum*) αναπτύσσονταν και διατηρούνταν σε θρεπτικό υλικό Potato Dextrose Agar (PDA). Για την παρασκευή 1000 mL θρεπτικού υλικού χρησιμοποιούνταν 1000 mL

απιονισμένο νερό, 39g PDA και 5g άγαρ. Στη συνέχεια, ακολουθούσε θέρμανση με ανάδευση για 15 λεπτά.



Εικόνα 8 Φυτοπαθογόνοι μύκητες *Verticillium dahliae* Kleb., και επιλεγμένα στελέχη *Colletotrichum acutatum* (ΚΥΠ1-3, A6N, B1N), που χρησιμοποιήθηκαν στις βιοδοκιμές αξιολόγησης της βιοδραστικότητας εκχυλισμάτων Αλόης

σε θερμοκρασία 150°C και τέλος αποστείρωση σε κλίβανο υγρής θερμότητας (Tuttnauer Autoclave-Steam Steril) για 30 λεπτά στους 121°C. Το θρεπτικό υλικό (20 mL) προστιθόταν σε τρυβλία Petri διαμέτρου 9 cm, υπό ασηπτικές συνθήκες. Ο θάλαμος οριζόντιας νηματικής ροής (laminar flow cabinet) είχε μείνει αρχικά κλειστός υπό την επίδραση UV ακτινοβολίας για περίπου 30 λεπτά. Τα τρυβλία παρέμεναν μισάνοιχτα για περίπου 15 λεπτά μέσα στο

θάλαμο με την επίδραση της UV ακτινοβολίας, προκειμένου το θρεπτικό υλικό να στεγνώσει και να στερεοποιηθεί.

Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία προετοιμασίας του θρεπτικού υποστρώματος PDA, σε κάθε τρυβλίο προστιθόταν μόλυσμα των φυτοπαθογόνων μυκήτων στο κέντρο. Η μόλυνση γινόταν με μεταφορά από άλλες καλλιέργειες του μύκητα με τη βοήθεια ενός φελλοτρυπητήρα κυλίνδρου μολύσματος διαμέτρου 5 mm. Ο φελλοτρυπητήρας εμβαπτιζόταν πρώτα σε προπανόλη και περάστηκε από φλόγα 3 φορές, ώστε να αποστειρωθεί. Τέλος, τα τρυβλία σφραγίζονταν με parafilm και τοποθετούνταν σε επωαστικό θάλαμο υπό συνθήκες σκότους στους 22°C.

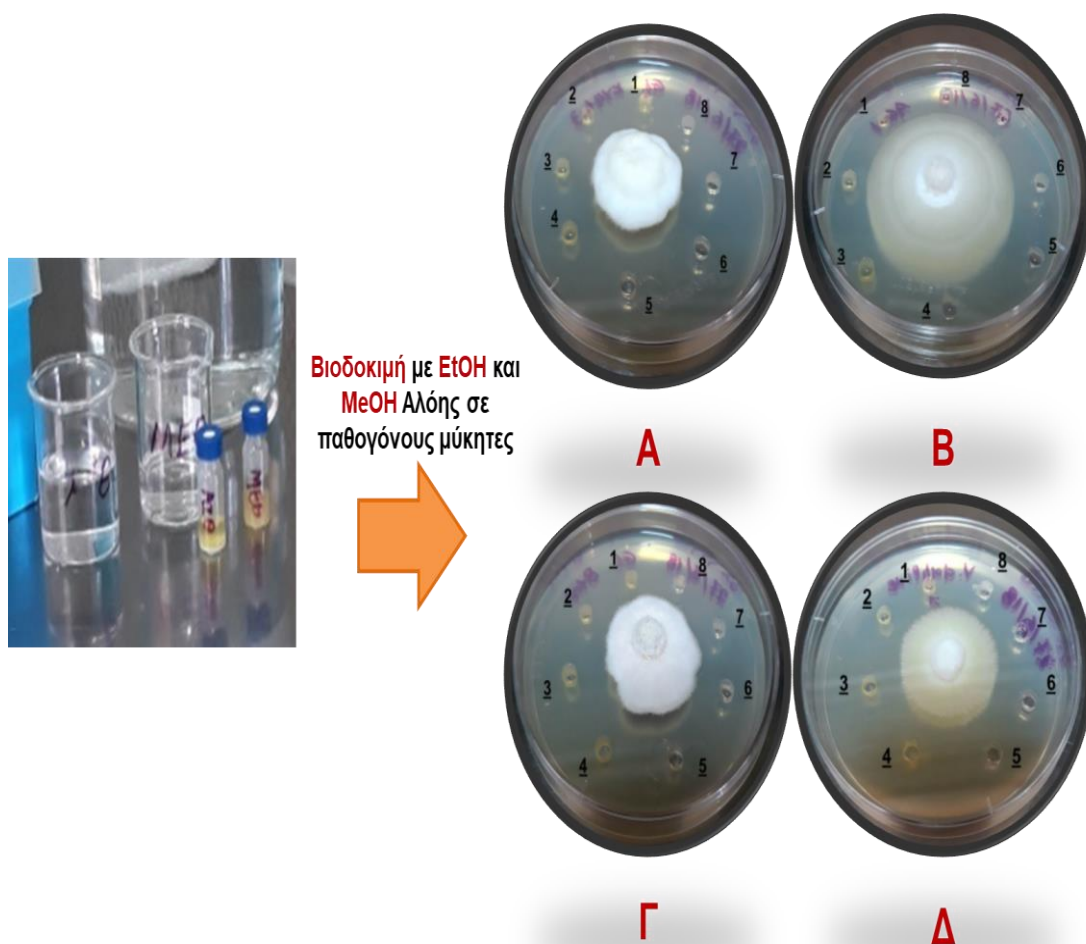
3.4 Βιοδοκιμή για την *in vitro* αξιολόγηση της βιοδραστικότητας αιθανολικών και μεθανολικών εκχυλισμάτων Αλόης σε φυτοπαθογόνους μύκητες

Οι καλλιέργειες των φυτοπαθογόνων μυκήτων επωάζονταν για 2 εβδομάδες μέσα στον επωαστικό θάλαμο. Μετά το πέρας της περιόδου αυτής μέσα και πάλι στο θάλαμο οριζόντιας νηματικής ροής, γινόταν η προσθήκη των αιθανολικών και μεθανολικών εκχυλισμάτων Αλόης. Πιο αναλυτικά, με τη βοήθεια ενός φελλοτρυπητήρα ανοιγόταν πηγαδάκια περιμετρικά των αποικιών του μύκητα σε κάθε τρυβλίο. Τα πηγαδάκια που ανοίχθηκαν ήταν 8:

- Εκχύλισμα Αλόης με MeOH
- Εκχύλισμα Αλόης με MeOH
- Εκχύλισμα Αλόης με EtOH
- Εκχύλισμα Αλόης με EtOH
- Μάρτυρας με αποστειρωμένο H₂O
- Μάρτυρας με αποστειρωμένο H₂O
- Μάρτυρας με MeOH
- Μάρτυρας με EtOH

Η ποσότητα που προστέθηκε σε κάθε πηγαδάκι ήταν 40 μL. Μετά το πέρας 24 ωρών μέσα σε θάλαμο επώασης και αφού έχει απορροφηθεί από το

θρεπτικό υλικό το εκάστοτε διάλυμα, έγινε επαναληπτική προσθήκη επιπλέον 40 μL και μεταφερόταν και πάλι στον επωαστικό θάλαμο για παρατηρήσεις το επόμενο χρονικό διάστημα (**Εικόνα 9**).



Εικόνα 9 Εκχυλίσματα Αλόης με EtOH και MeOH στα φιαλίδια, σκέτη EtOH και MeOH στα ποτήρια ζέσεως και αποστειρωμένο νερό και καλλιέργειες μυκήτων αμέσως μετά την εφαρμογή των εκχυλισμάτων [(**A**): *C. acutatum* (ΚΥΠ1-3), (**B**): *C. acutatum* (A6N), (**Γ**): *C. acutatum* (B1N), (**Δ**): *V. dahliae* Kleb, 1, 2: MeOH + Αλόη, 3, 4: EtOH + Αλόη, 5, 6: H₂O, 7: MeOH, 8: EtOH]

3.5 Καλλιέργεια των φυταρίων τομάτας (*Lycopersicum esculentum*)

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν φυτάρια ημι-αναρριχώμενης τομάτας, ηλικίας 11 ημερών στα οποία ύστερα από κατάλληλη επεξεργασία έγινε μεταβολομική ανάλυση. Αρχικά αναμίχθηκαν τύρφη και περλίτης σε αναλογία 1:1, το οποίο στη συνέχεια αποστειρώθηκε 3 φορές σε κλίβανο αποστείρωσης σε θερμοκρασία 121°C για 1 ώρα, με ενδιάμεσο διάστημα μίας ημέρας ανάμεσα στις αποστειρώσεις.

Για την προβλάστηση των σπόρων μέσα σε θάλαμο οριζόντιας νηματικής ροής, 60 σπόροι τομάτας τοποθετήθηκαν σε 3 αποστειρωμένα γυάλινα τρυβλία (30 σπόροι σε κάθε τρυβλίο), στα οποία είχε τοποθετηθεί διηθητικό χαρτί 12,5 cm (Rundfilter, Mancherey-Nagel, Germany), βρεγμένο με αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης με συνθήκες σκότους και θερμοκρασία 24°C. Μετά από 8 ημέρες, οι σπόροι ήταν έτοιμοι για φύτευση στο αποστειρωμένο υπόστρωμα. Αφού υγράνθηκε το υπόστρωμα, μέσα σε κάθε γλαστράκι τοποθετήθηκαν 4 σπόροι και μπήκαν σε θάλαμο με ελεγχόμενες συνθήκες υγρασίας (70±5%), θερμοκρασίας 22°C και 16/8 ώρες ημέρας/νύχτας. Τα φυτά ποτιζόταν με 20 mL αποστειρωμένο νερό κάθε δύο μέρες.

3.6 Προετοιμασία φύλλων Αλόης για ανάλυση μεταβολικής σύστασης

Μέσα στο χώρο του εργαστηρίου και σε συνθήκες δωματίου, χρησιμοποιήθηκε ένα φύλλο Αλόης, πλύθηκε πολύ καλά στην εξωτερική του επιφάνεια σε νερό βρύσης, απολυμάνθηκε με EtOH και στη συνέχεια με τη βοήθεια μιας λεπίδας αφαιρέθηκαν τα πλαϊνά αγκαθωτά τμήματα.

Από το φύλλο αυτό, κόπηκαν 6 παρόμοιου μεγέθους κομμάτια, για να μελετηθεί η σύσταση καθενός από αυτά. Στη μία περίπτωση κρατήθηκαν δύο κομμάτια όπως είναι, στην άλλη κρατήθηκε μόνο η γέλη και στην τρίτη κρατήθηκε μόνο ο εξωτερικός φλοιός. Σε κάθε περίπτωση, κάθε κομμάτι τοποθετήθηκε σε ποτήρι ζέσεως των 50 mL και ζυγίστηκε.

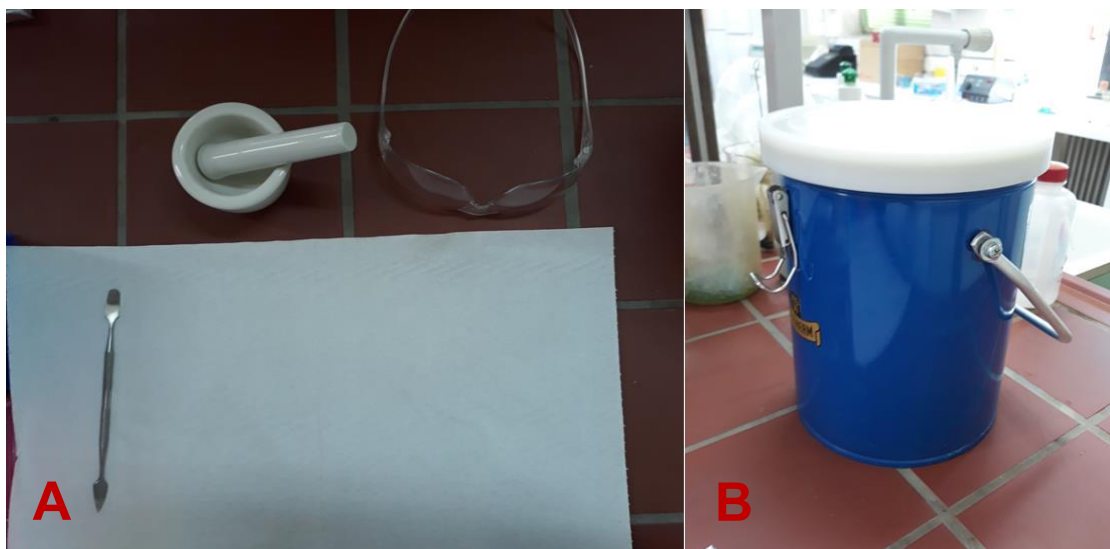
Έπειτα, καθένα από τα ποτήρια ζέσεως με το διαφορετικό τμήμα φύλλου Αλόης μεταφέρθηκε σε μηχανήμα λυοφιλίωσης (**Freeze drier**). Παρέμειναν στο μηχανήμα για 4 ημέρες (96 ώρες), ώστε να απομακρυνθεί κάθε ίχνος υγρασίας. Μετρήθηκε και σε αυτό το σημείο, αμέσως μετά τη λήξη της λυοφιλίωσης, η μάζα.

Στη συνέχεια, κάθε ένα από τα δείγματα λειοτριβήθηκε υπό υγρό άζωτο (N_2) με γουδοχέρι σε γουδί (**Εικόνα 10**), τα οποία είχαν ξεπλυθεί με ακετόνη δύο φορές. Με τη βοήθεια εργαστηριακής λαβίδας πάρθηκαν προσεκτικά καθένα ξεχωριστά από τα τμήματα των φύλλων Αλόης που βρισκόταν στα ποτήρια ζέσεως μέσα στα οποία έγινε η λυοφιλίωσή τους. Τοποθετήθηκαν στο γουδί μέσα στο οποίο έπεφτε σταδιακά μικρή ποσότητα υγρού αζώτου και με το γουδοχέρι πολτοποιούνταν μέχρι να γίνει σκόνη.

Να σημειωθεί πως είναι ιδιαίτερα σημαντικό, όταν χρησιμοποιείται το υγρό άζωτο να λαμβάνονται τα απαραίτητα μέτρα προστασίας: Χρήση εργαστηριακής ποδιάς, γάντια, ειδικά γυαλιά κρίνονται.

Η σκόνη από κάθε τμήμα του φύλλου Αλόης, τοποθετήθηκε σε ξεχωριστά errendorf tubes, έξω από τα οποία υπήρχε η αντίστοιχη ονομασία. Έπειτα, σε καινούρια, καθαρά tubes ζυγίστηκαν 40 mg σκόνης από το καθένα. Στη συνέχεια έγινε προσθήκη 500 μ L extraction buffer σε κάθε tube.

Έπειτα, ακολούθησαν οι διαδικασίες της εκχύλισης και παραγωγοποίησης, οι οποίες περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω (§3.8.2) για τα εκχυλίσματα από τα δείγματα τομάτας.



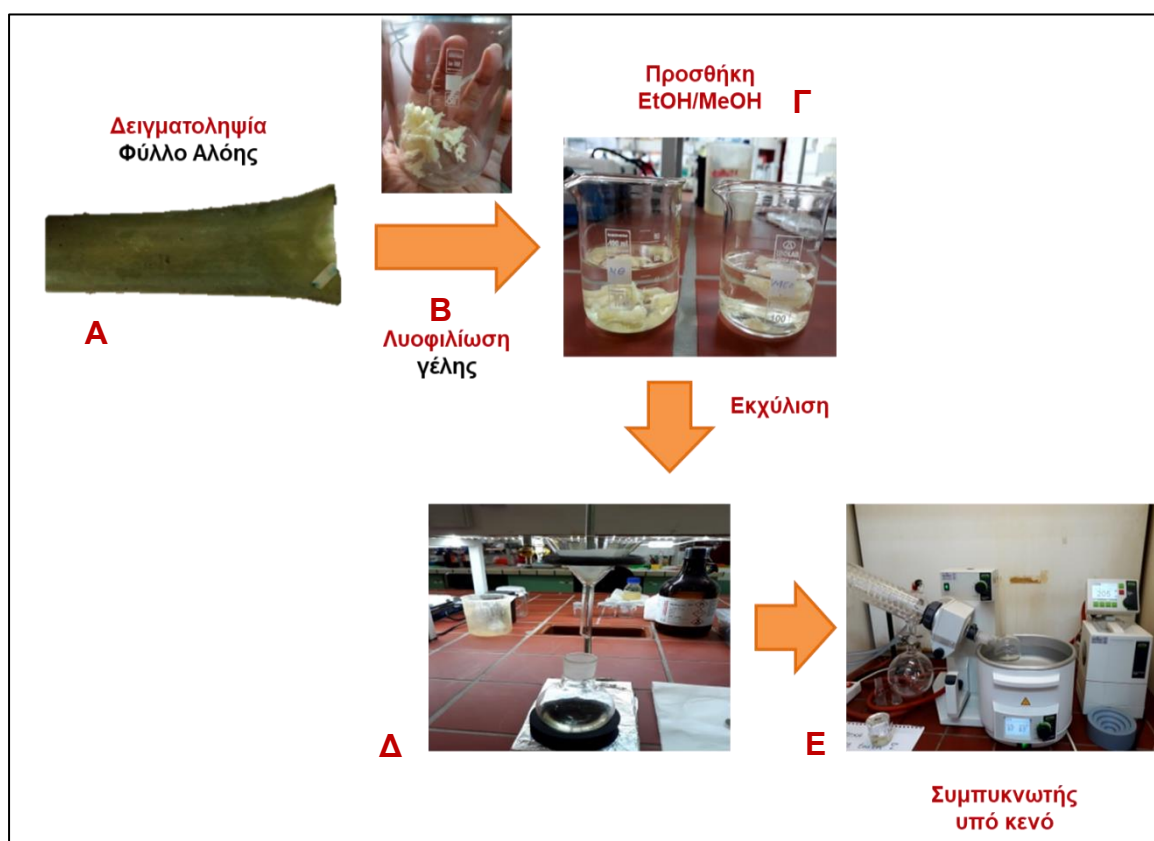
Εικόνα 10 Το γουδί με το γουδοχέρι, ειδικά προστατευτικά γυαλιά και η λαβίδα, που χρησιμοποιήθηκαν για τη λειοτρίβιση των λυοφιλωμένων φύλλων Αλόης (γέλη, φλοιός, γέλη με φλοιό) (Α) με υγρό άζωτο (Β), ώστε να εκχυλιστούν περαιτέρω

3.7 Προετοιμασία αιθανολικών και μεθανολικών εκχυλισμάτων Αλόης

Τα αιθανολικά και μεθανολικά εκχυλίσματα Αλόης, που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα, προέκυψαν μετά την κάτωθι διαδικασία επεξεργασίας των φύλλων (**Εικόνα 11**). Αρχικά, το φύλλο Αλόης πλύθηκε πολύ καλά στην εξωτερική του επιφάνεια και απολυμάνθηκε με EtOH. Έπειτα, με μία λεπίδα αφαιρέθηκαν τόσο τα πλαϊνά αγκαθωτά μέρη όσο και ο εξωτερικός φλοιός, ώσπου έμεινε μόνο η γέλη, το φιλέτο. Η γέλη αυτή τοποθετήθηκε σε μπλέντερ, όπου και ομογενοποιήθηκε. Στη συνέχεια, αφού πρώτα ζυγίστηκε (553.942 g) λυοφιλοποιήθηκε για 144 ώρες (6 ημέρες). Μετά το πέρας της λυοφιλίωσης, η αφυδατωμένη μάζα του gel ήταν 160.131 g. Από αυτή τη μάζα αφαιρέθηκε το εξωτερικό τμήμα (1.112 g) για να χρησιμοποιηθεί για τις βιοδοκιμές. Η διαδικασία της λυοφιλίωσης της γέλης ήταν ιδιαίτερα δύσκολη, εξαιτίας της πηχτής της σύστασης. Για το λόγο αυτό, μετά το πέρας της λυοφιλίωσης δε χρησιμοποιήθηκε όλη η ποσότητα της γέλης, αλλά το εξωτερικό τμήμα, το οποίο αφαιρέθηκε με λεπίδα.

Έπειτα, τα 1.112g χωρίστηκαν ακριβώς στη μέση (0.556 g) και τοποθετήθηκαν σε δύο μικρά γυάλινα ποτήρια ζέσεως. Στο ένα από αυτά προστέθηκαν 50 mL EtOH και στο άλλο 50 mL MeOH. Στη συνέχεια, και τα δύο ποτήρια ζέσεως μπήκαν στους υπέρηχους για 20 λεπτά και διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για περαιτέρω εκχύλιση για 24 ώρες.

Για τον περαιτέρω καθαρισμό του εκχυλίσματος χρησιμοποιήθηκε διηθητικό χαρτί διαμέτρου 110 mm (Filter paper, Mancherey-Nagel, Germany, Switzerland, France, USA) και άνυδρο θειικό νάτριο (Sodium sulfate – Na_2SO_4). Έπειτα, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε περιστροφικό συμπυκνωτή κενού (BUCHI, Switzerland), ώστε να απομακρυνθεί ο διαλύτης. Το συμπυκνωμένο εκχύλισμα που προέκυψε τοποθετήθηκε σε μικρά γυάλινα φιαλίδια των 1.5 mL και αποθηκεύθηκε στους -20°C για χρήση στις βιοδοκιμές.



Εικόνα 11 Φύλλο Αλόης (**A**), γέλη Αλόης μετά τη λυοφιλίωση (**B**) με αιθανόλη και μεθανόλη (**Γ**), εκχύλιση (**Δ**) και συμπύκνωση υπό κενό (**Ε**)

3.8 Μεταβολομική μελέτη της επίδρασης αιθανολικών εκχυλισμάτων Αλόης στο μεταβολισμό φυταρίων τομάτας και αξιολόγηση της δράσης τους ως βιοδιεγέρτες

3.8.1 Πειραματικός σχεδιασμός και ανάπτυξη φυταρίων

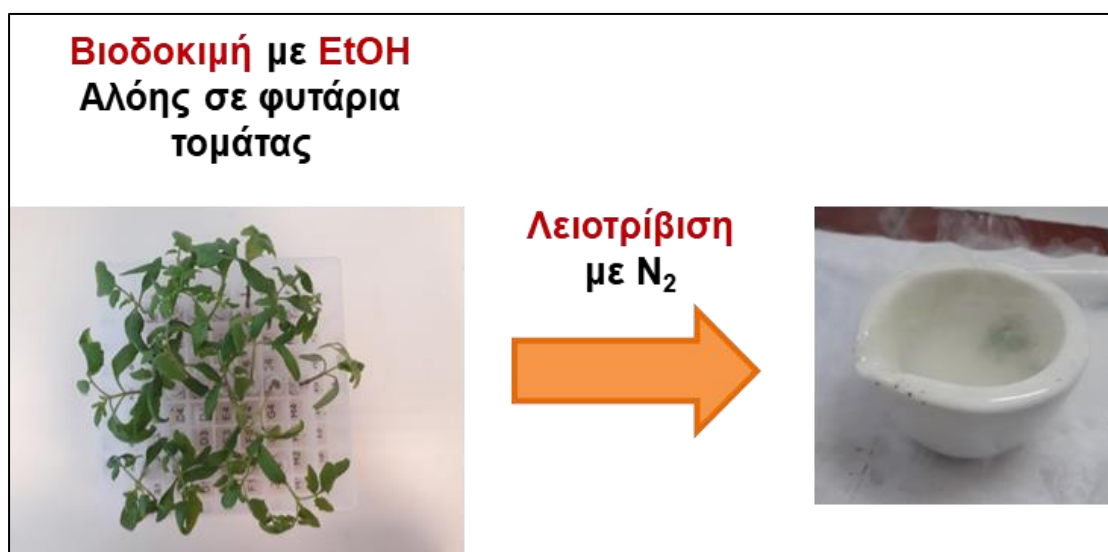
Τα φυτάρια τομάτας αναπτύσσονταν για 11 ημέρες σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (σχετική υγρασία $70 \pm 5\%$, θερμοκρασία 22°C , φωτοπερίοδο 16/8 ώρες ημέρας/νύχτας). Επιλέχθηκαν 18 φυτάρια με όσο το δυνατόν πιο ομοιόμορφη ανάπτυξη, καθώς είναι πολύ σημαντικό να παρουσιάζουν παρόμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά, ώστε τα αποτελέσματα της ανάλυσης να είναι αξιόπιστα. Οι βιοδοκιμές πραγματοποιούνταν σε φυτά ηλικίας 11 ημερών μετά την προσεκτική εκρίζωσή τους, για αποφυγή τραυματισμού των ριζών τους με εμβάπτιση του ριζικού συστήματός τους σε νερό-μάρτυρας (500 μL / φιαλίδιο), σε νερό με EtOH (25 μL EtOH + 475 μL H_2O / φιαλίδιο) ή σε αιθανολικό εκχύλισμα Αλόης (25 μL εκχύλισμα Αλόης + 475 μL H_2O / φιαλίδιο). Είκοσι τέσσερις ώρες μετά τις επεμβάσεις, τα πρώτα σύνθετα φύλλα συλλέγονταν για μεταβολομική ανάλυση. Αρχικά, τοποθετούνταν σε μεγάλο ποτήρι ζέσεως όλα μαζί, με αποστειρωμένο νερό.

Κάθε φυτό τοποθετήθηκε σε μικρό γυάλινο φιαλίδιο των 1.5 mL. Με βάση αποτελέσματα από πιλοτικό πείραμα, σε κάθε φιαλίδιο τοποθετήθηκαν 500 μL νερού ή μειγμάτων. Στα πρώτα 6 φυτά έγινε επέμβαση με αιθανολικό εκχύλισμα Αλόης, τα επόμενα 6 ήταν μάρτυρες με αποστειρωμένο νερό και τα υπόλοιπα ήταν μάρτυρες με EtOH. Μετά τις επεμβάσεις, τα φυτά μεταφέρθηκαν σε θάλαμο με σταθερή φωτοπερίοδο 16/8 ώρες ημέρας/νύχτας και ένταση φωτός 5000 Lux.

3.8.2 Δειγματοληψία και προετοιμασία δειγμάτων

Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε 24 ώρες μετά τις επεμβάσεις. Με αποστειρωμένη λεπίδα αποκόπηκαν από κάθε φυτό δύο πρώτα πλήρως

εκπτυγμένα σύνθετα φύλλα, χωρίς τους μίσχους, τοποθετήθηκαν άμεσα σε αλουμινόχαρτο και εμβαπτίστηκαν σε υγρό άζωτο για το σταμάτημα του μεταβολισμού τους (**Quenching**). Στη συνέχεια, έγινε λειοτρίβηση με υγρό N₂ σε γουδί με γουδοχέρι, τα οποία αρχικά είχαν πλυθεί με ακετόνη, ώσπου να γίνουν σκόνη. Από τον λειοτριβημένο ιστό, 30 mg ζυγίζονταν και εκχυλίζονταν (**Εικόνα 12**).

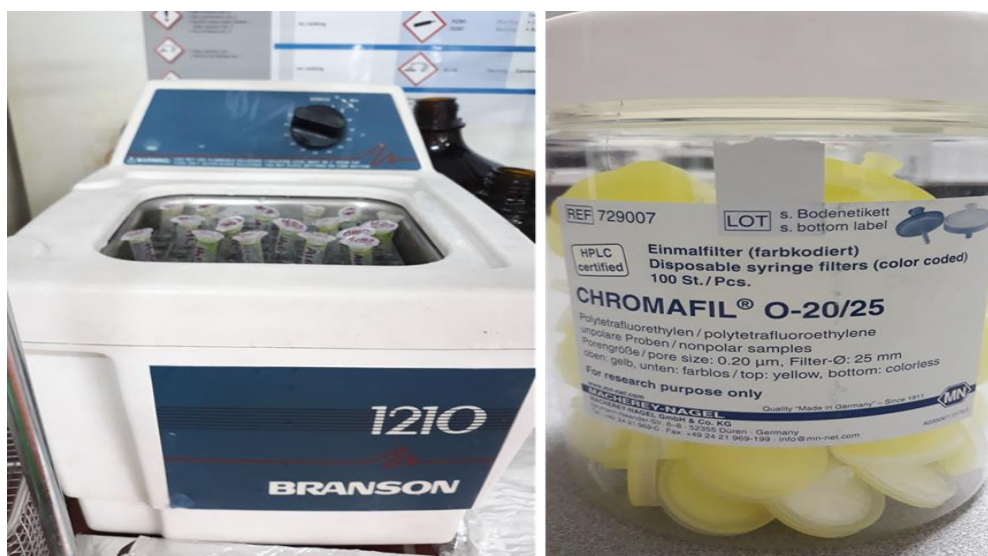


Εικόνα 12 Φυτάρια τομάτας στα οποία έγινε εφαρμογή με αιθανολικό εκχύλισμα Αλόης, ακολούθησε λειοτρίβηση με υγρό άζωτο (N₂), ώσπου να γίνει σκόνη

Σε καθένα από τα erppendorf tubes που περιέχουν λειοτριβημένη σκόνη από φυτά τομάτας με εφαρμογή εκχυλίσματος Αλόης με EtOH, προστέθηκαν 500 μ L μίγματος EtAc-MeOH (50-50, v/v). Μεταφέρθηκαν σε λουτρό υπερήχων (**Εικόνα 13**) (Branson 1210, Danbury, USA) για 20 λεπτά. Έγινε προσθήκη Na₂SO₄, ώστε να απορροφηθεί τμήμα της υγρασίας. Ακολούθησε ανάδευση σε οριζόντιο περιστροφικό αναδευτήρα (GFL 3006, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burfwedel, Germany) για 2 ώρες στις 250 rpm.

Στη συνέχεια, έγινε φιλτράρισμα των δειγμάτων με φίλτρο PTFE (**Εικόνα 13**) διαμέτρου 25 mm και άνοιγμα πόρου 0,2 μ m (Chromafil, Macherey-Nagel, Duren, Germany) και τοποθετήθηκαν σε καθαρά erppendorf tubes. Σε καθένα από αυτά προστέθηκαν 20 μ L ριβιτόλης (0,2 mg/mL MeOH). Έπειτα,

πραγματοποιήθηκε η εξάτμιση μαζί με ανακίνηση των δειγμάτων σε συσκευή εξάτμισης και ακολούθησε η διαδικασία προετοιμασίας παραγωγοποίησης των δειγμάτων.



Εικόνα 13 Λουτρό υπερήχων - Branson 1210, Danbury, USA. και φίλτρα PTFE, διαμέτρου 25 mm και με άνοιγμα πόρου 0,2 µm - Chromafil, Macherey-Nagel, Duren, Germany

Η παραγωγοποίηση θεωρείται πολύ σημαντικό στάδιο για την ανάλυση των μεταβολιτών με GC/EL/MS. Στο σημείο αυτό, προστέθηκαν σε κάθε errendorf tube 80 µL MeOX (methoxylamine hydrochloride-98%), το οποίο συμβάλλει στη σταθεροποίηση των σακχάρων, ώστε να μην αναδιπλώνονται στο χώρο και δημιουργούν δυσκολία στην ανάλυση. Ακολούθησε τοποθέτηση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο (Daihan Labtech, Gyeonggi-do, Korea), για 2 ώρες στους 30°C. Ακολούθησε προσθήκη 80 µL MSTFA (N-methyl-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide) %), το οποίο βοηθάει ώστε οι μεταβολίτες να γίνονται πιο πτητικοί και να σταθεροποιούνται όταν βρίσκονται σε υψηλή θερμοκρασία. Στη συνέχεια έγινε τοποθέτηση στο υδατόλουτρο για 1 ώρα και 30 λεπτά στους 37°C.

Τα παραγωγοποιημένα δείγματα τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια αυτόματου δειγματολήπτη (Macherey-Nagel, Duren, Germany) με microinserters. Στο σημείο αυτό, τα δείγματα ήταν έτοιμα για ανάλυση με GC/MS.

3.9 Ρυθμίσεις GC/MS για μεταβολομική ανάλυση

Για την ανάλυση των μεταβολιτών χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος (**Εικόνα 14**) Agilent 6890 MS (Agilent Technologies Inc.), με ανιχνευτή μάζας 5973 inert mass selective detector (MSD) και αυτόματο δειγματολήπτη (autosampler) 7683. Από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση 1 μL . Η στήλη ήταν HP-5MS (Agilent Technologies Inc.), με μήκος 30 m, διάμετρο 0,25 mm, πάχος υμενίου 0,25 μm , αναλογία έγχυσης 5:1 και θερμοκρασία 230°C. Το φέρων αέριο που χρησιμοποιήθηκε ήταν ήλιο (He) με ροή 1 mL min^{-1} . Η θερμοκρασία του κλιβάνου ήταν αρχικά σταθερή στους 70°C για 5 λεπτά και στη συνέχεια αυξανόταν κάθε λεπτό κατά 5°C, ώσπου να φτάσει τους 295°C, όπου και παρέμεινε σταθερή για 2 λεπτά. Χρησιμοποιήθηκε θετικός ιονισμός ηλεκτρονίων 70 eV. Τα φάσματα μάζας πλήρους σάρωσης αποκτήθηκαν στην περιοχή των μαζών 50-800 Da με ρυθμό 2 σαρώσεις ανά δευτερόλεπτο με αρχική καθυστέρηση 10 λεπτών. Η θερμοκρασία για την πηγή MS ρυθμίστηκε στους 230°C και για το τετράπολο στους 150°C.

Επιπρόσθετα, αναλύονταν κενά δείγματα (blanks), ώστε να ανιχνευθεί πιθανή ρύπανση από το χειρισμό και την προετοιμασία του δείγματος, τα αντιδραστήρια, τη στήλη ή το όργανο.



Εικόνα 14 Επάνω, αέριος χρωματογράφος GC/EI/MS (Agilent 6890 MS (Agilent Technologies Inc.), κάτω τα παραγωγγοποιημένα δείγματα τομάτας με αιθανολικά εκχυλίσματα με Αλόη, αιθανολικά και υδατικά διαλύματα (Μάρτυρες) έτοιμα προς ανάλυση

3.10 Βιοπληροφορική-μεταβολομική ανάλυση αποτελεσμάτων

Τα χρωματογραφήματα που λαμβάνονταν από τις αναλύσεις στο GC/EI/MS, υπόκεινταν σε επεξεργασία για μεταβολομική ανάλυση με το λογισμικό MS DIAL (Tsugawa et al., 2015). Το λογισμικό αυτό επιτρέπει την αυτοματοποίηση της προεπεξεργασίας των χρωματογραφημάτων, όπως οι ευθυγραμμίσεις, η διόρθωση των γραμμών βάσης και τα συμπληρώματα των κενών δεδομένων. Χρησιμοποιήθηκαν οι προτεινόμενες ρυθμίσεις για την ανάλυση των GC/EI/MS δεδομένων.

Η μήτρα που προέκυψε από την ανάλυση με το MS DIAL, εξήχθη στο MS Excel για περαιτέρω ανάλυση και επεξεργασία. Ειδικότερα, με βάση την ανάλυση των χρωματογραφημάτων με το AMDIS, κορυφές που αντιστοιχούσαν σε ουσίες μη σχετικές με το αναλυόμενο βιολογικό υλικό και κορυφές με δεδομένα σε λιγότερο από το 50% των επαναλήψεων για κάθε επέμβαση, αφαιρούνταν από περαιτέρω ανάλυση με σκοπό την ενίσχυση της αξιοπιστίας και ακρίβειας της ανάλυσης.

Στη συνέχεια, η μήτρα εξαγόταν στο λογισμικό SIMCA-P v.13.0.3 (Umetrics, MKS Instruments Inc. Umea, Sweden) για την ανακάλυψη των τάσεων ανάμεσα στα δεδομένα και των αντίστοιχων μεταβολιτών-βιοσημαντών με εφαρμογή πολυπαραγοντικής ανάλυσης (Aliferis and Jabaji, 2010, Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011). Η ανίχνευση πιθανών ακραίων τιμών πραγματοποιήθηκε με Principal Component Analysis (PCA) και ακολούθησε η ανακάλυψη των μεταβολιτών-βιοσημαντών της επίδρασης των εκχυλισμάτων Αλόης στο μεταβολισμό των φυταρίων τομάτας με εφαρμογή Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA) (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011). Επιπλέον, στα δεδομένα εφαρμόστηκε ιεραρχική ανάλυση σε συστάδες (Hierarchical cluster analysis, HCA) (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011).

Η ανακάλυψη των μεταβολιτών-βιοσημαντών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση Coefficient plots για τα κανονικοποιημένα και κεντραρισμένα δεδομένα για τα ζεύγη των επιλεγμένων συγκρίσεων, με διαστήματα εμπιστοσύνης που προέρχονται από jack-knifing (95%) και S-plots (Wiklund et al., 2008).

4. Αποτελέσματα και συζήτηση

4.1 Τα εκχυλίσματα Αλόης παρουσίασαν κυμαινόμενη βιοδραστικότητα στα στελέχη των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Colletotrichum acutatum* και στο *Verticillium dahliae* Kleb στα οποία εφαρμόστηκαν

Ως ένα πρώτο στάδιο της έρευνας μελετήθηκαν τα εκχυλίσματα της Αλόης ως προς την άμεση τοξικότητά τους στους επιλεγμένους φυτοπαθογόνους μύκητες και επιπλέον αξιολογήθηκε η έμμεση τοξικότητά τους σε αυτούς μέσω της επαγωγής μηχανισμών άμυνας των φυτών. Στη βιοδοκιμή που πραγματοποιήθηκε για την αξιολόγηση της βιοδραστικότητας μεθανολικών και αιθανολικών εκχυλισμάτων, παρατηρήθηκε χαμηλή, κυμαινόμενη τοξικότητά τους στους φυτοπαθογόνους μύκητες (**Εικόνα 15**).

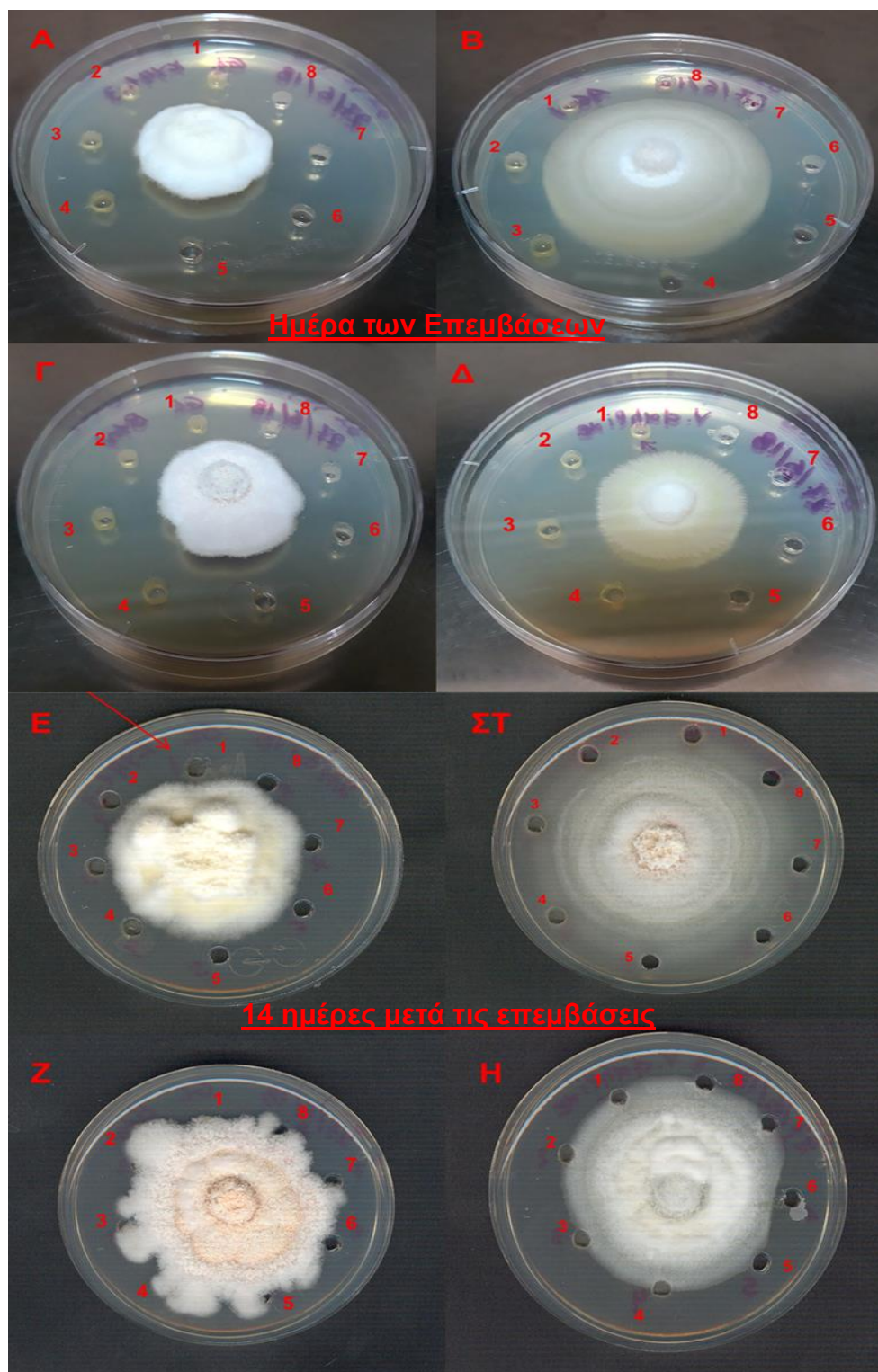
Πιο συγκεκριμένα, μετά το πέρας 14 ημερών από την εφαρμογή των αιθανολικών και μεθανολικών εκχυλισμάτων, τα στελέχη του *C. acutatum* B1N και A6N, καθώς και ο φυτοπαθογόνος μύκητας *V. dahliae*, αποδείχθηκαν σχετικά ανθεκτικά σε αυτά. Αντίθετα, το στέλεχος του *C. acutatum* ΚΥΠ1-3 φάνηκε να παρεμποδίζεται από το μεθανολικό εκχύλισμα. Το χρονικό διάστημα των 14 ημερών μετά το οποίο λαμβάνονταν οι παρατηρήσεις, ήταν απαραίτητο λόγω της αργής ανάπτυξης των δύο ειδών που χρησιμοποιήθηκαν.

Οι φυτοπαθογόνοι μύκητες *C. acutatum* και *V. dahliae* θεωρούνται από τους πιο δύσκολα αντιμετωπίσιμους στην καλλιέργεια της ελιάς. Η Βερτισιλλίωση εκδηλώνεται είτε με το σύνδρομο του βραδέως μαρασμού είτε με ταχεία αποπληξία των δέντρων. Αντίθετα, το *Colletotrichum* sp. προσβάλλει κυρίως τους καρπούς της ελιάς και μπορεί να προκαλέσει μείωση ή έως και εκμηδένιση της παραγωγής των ελαιοδένδρων (Παπλωματάς and Τζάμος, 2015).

Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως τα στελέχη Γλοιοσπορίου ΚΥΠ1-3, A6N και B1N, σύμφωνα με πειράματα που έγιναν στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, εμφάνισαν ανθεκτικότητα στη δ.ο. Dodine, μέτρια ανθεκτικότητα στη Kresoxim-methyl και καθόλου στη Tebuconazole (Κωλέττη et al., 2018, Κολαϊνής et al., 2018). Οι δ.ο. αυτές χρησιμοποιούνται στη φυτοπροστασία για την καταπολέμηση φυτοπαθογόνων της ελιάς. Επιπλέον, για το *V. dahliae* δεν υπάρχει διαθέσιμο εγκεκριμένο σκεύασμα για την καταπολέμησή του και για αυτό το λόγο, είναι

πολύ σημαντική η μελέτη της βιοδραστικότητας των εκχυλισμάτων Αλόης ενάντια σε αυτόν και η αξιολόγησή τους ως εναλλακτικοί παράγοντες φυτοπροστασίας.

Τα αποτελέσματά μας είναι σύμφωνα με άλλες μελέτες που αφορούν την παρεμπόδιση ανάπτυξης τόσο βακτηρίων, αλλά και μυκήτων. Οι περισσότερες έρευνες επικεντρώνονται σε μικροβιακούς παράγοντες που προσβάλλουν τον άνθρωπο (Lawrence et al., 2009, Pandey and Mishra, 2010). Ωστόσο υπάρχουν και λίγες που αφορούν φυτοπαθογόνα (Saks and Barkai-Golan, 1995). Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε αντιβακτηριακή δράση τόσο αιθανολικών όσο και μεθανολικών εκχυλισμάτων σε θετικά αλλά και αρνητικά κατά Gram βακτήρια, ενώ στην ίδια μελέτη εκχυλίσματα με ακετόνη έδειξαν να μην έχουν καμία επιρροή σε αυτά (Lawrence et al., 2009). Σε άλλη μελέτη βρέθηκε επίσης, αντιβακτηριακή δράση αιθανολικών εκχυλισμάτων Αλόης ενάντια σε *Escherichia coli*, αλλά και *Staphylococcus aureus* (Pandey and Mishra, 2010). Όσον αφορά τη δράση εκχυλισμάτων Αλόης ενάντια σε φυτοπαθογόνα έχει βρεθεί ότι εμφανίζουν αντιμυκητιακές ιδιότητες ενάντια σε σπόρια *Botrytis cinerea*, αλλά και σε *in vivo* πειράματα σε εσπεριδοειδή διαπιστώθηκε η μείωση των σπορίων του *Penicillium digitatum* (Saks and Barkai-Golan, 1995).



Εικόνα 15 Βιοδοκιμή αξιολόγησης της μυκοτοξικότητας EtOH και MeOH εκχυλισμάτων Αλόης. Μεγαλύτερη μυκοτοξικότητα εμφανίζει το εκχύλισμα Αλόης με MeOH στο *Colletotrichum acutatum* ΚΥΠ 1-3, 14 ημέρες μετά τις επεμβάσεις. [(**A**, **E**): *C. acutatum* (ΚΥΠ1-3), (**B**, **ΣΤ**): *C. acutatum* (A6N), (**Γ**, **Ζ**): *C. acutatum* (B1N), (**Δ**, **Η**): *V. dahliae* Kleb., **1**, **2**: MeOH + Αλόη, **3**, **4**: EtOH + Αλόη, **5**, **6**: H₂O, **7**: MeOH, **8**: EtOH]

4.2 Μεταβολική σύσταση γέλης και φλοιού Αλόης

Το πρώτο στάδιο επεξεργασίας των δειγμάτων αποτέλεσε η λυοφιλίωσή τους με σκοπό την απομάκρυνση του νερού. Στον **Πίνακα 6** παρουσιάζονται οι μάζες των δειγμάτων Αλόης πριν και μετά τη λυοφιλίωση και η περιεκτικότητα σε νερό του φύλλου.

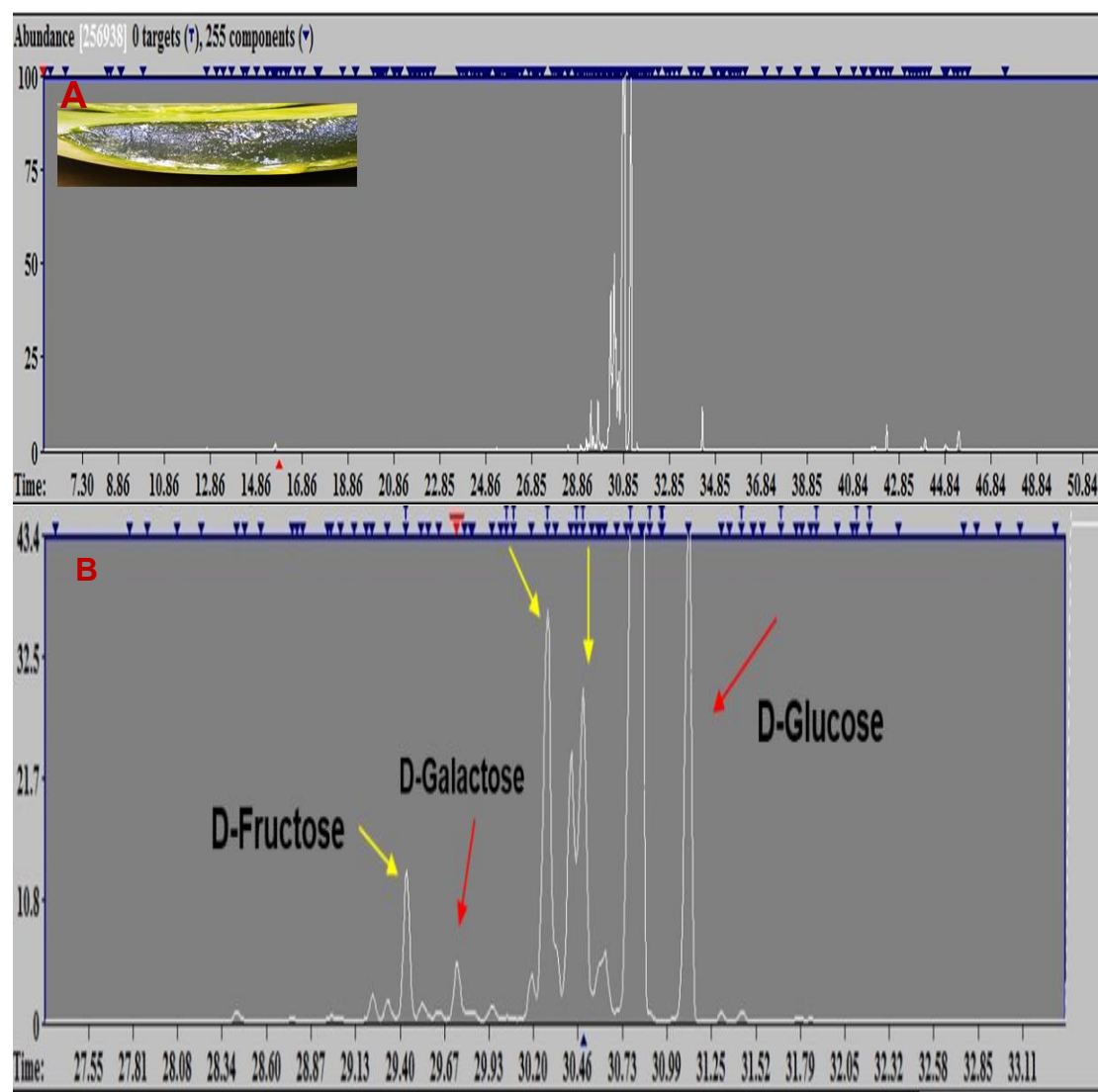
Πίνακας 6 Το νωπό και ξηρό βάρος των δειγμάτων Αλόης που χρησιμοποιήθηκαν. Η περιεκτικότητα σε νερό και το αντίστοιχο ποσοστό

	Πριν τη λυοφιλίωση	Μετά τη λυοφιλίωση		
	Νωπό βάρος Αλόης (g)	Ξηρό βάρος Αλόης (g)	Περιεκτικότητα σε νερό (g)	Περιεκτικότητα σε νερό (%)
1. Γέλη	16.548	0.207	16.34	98,75
2. Φλοιός	7.160	0.748	6.41	89,55
3. Total	18.557	3.256	15.30	82,45
A. Γέλη	12.240	0.126	12.11	98,97
B. Φλοιός	6.280	0.587	5.69	90,65
Γ. Total	21.273	4.601	16.67	78,37

4.2.1 Μεταβολική σύσταση γέλης

Το βιοαναλυτικό πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε αποδείχθηκε ικανοποιητικό στην ανάλυση της γέλης Αλόης, όπως αποδεικνύεται από την ποιότητα των χρωματογραφημάτων GC/EI/MS που προέκυψαν (οξείες κορυφές, καλός διαχωρισμός, μεγάλος αριθμός κορυφών) (**Εικόνα 16**). Ανιχνεύθηκαν συνολικά 255 μεταβολικά χαρακτηριστικά, με τους ταυτοποιημένους μεταβολίτες να αντιστοιχούν σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90% της συνολικής περιεκτικότητας του δείγματος.

Ανάμεσα στους ταυτοποιημένους μεταβολίτες υπάρχουν αρκετοί πρωτογενείς μεταβολίτες, που παίζουν ρόλο στο μεταβολισμό του φυτού, αλλά και άλλοι με γνωστή βιοδραστικότητα (**Εικόνα 16, Πίνακες 7, 8**).

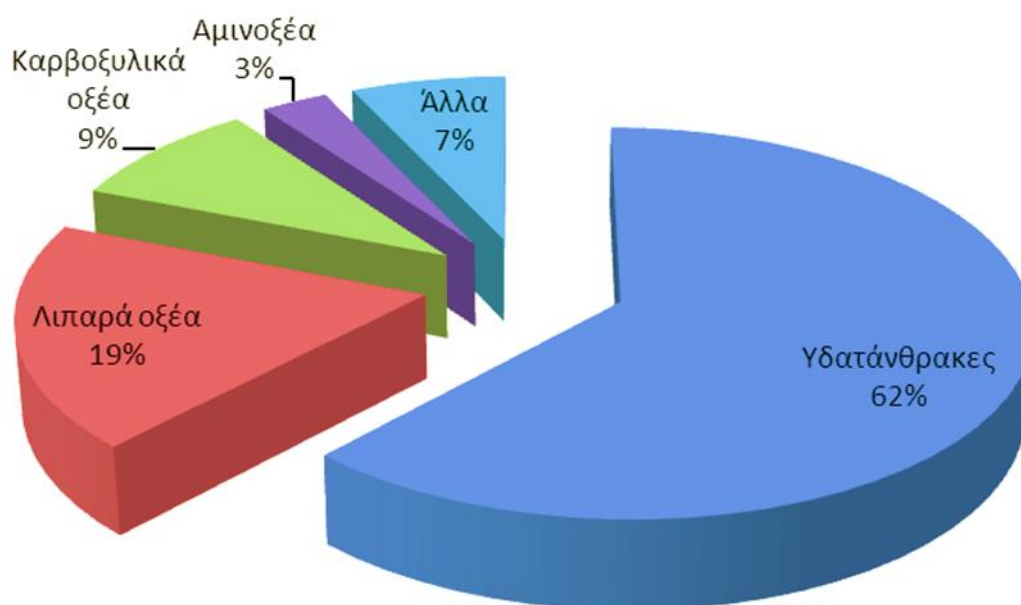


Εικόνα 16 Χρωματογράφημα GC/MS γέλης Αλόης **(A)** και επιλεγμένη περιοχή σε μεγέθυνση **(B)**

Metabolite name (common name)	Metabolite deriv.	Synonym(s)	KEGG ID	PubChem CID	CAS No	Biosynthetic pathway(s)	Abbreviated Biosynthetic pathway(s)	Monoisotopic mass (Da)	Average Molecular Mass (Da)	Molecular Formula	Chemical group
L-Valine	L-Valine (2TMS)	2-Amino-3-methylbutyric acid	C00183	6287	72-18-4	map00280;valine	map00280 map00	117,0790	117,1463	C ₆ H ₁₁ NO ₂	Amino acids
Glycerol	Glycerol (3TMS)	Glycerin; 1,2,3-Trihydroxypropane; 1,2,3-Pro	C00116	763	56-81-5	map00040;Pentose	map0004 map00	92,0473	92,0938	C ₃ H ₈ O ₃	Carbohydrates
Adipic acid	Adipic acid (2TMS)	Adipate; Hexanedioate; Hexan-1,6-dicarbox	C06104	186	124-04-9	map00930;Capro	map00930	146,0579	146,1412	C ₈ H ₁₆ O ₄	Carboxylic acids
D-Fructose	D-Fructose (MEOX 5TMS)	Leulose; Fruit sugar; D-arabino-Hexulose	C00095	439163	57-48-7	map00051;Fructo	map00051 map00	180,0634	180,1559	C ₆ H ₁₂ O ₆	Carbohydrates
D-Glucose	D-Glucose (5 TMS) (1 MEOX)	Glucose-MOX-5TMS;PK1; D-Glucose; Glap	C00031	5793	128705-73-7	bleotide sugar me	map00520 me	180,0634	180,1559	C ₆ H ₁₂ O ₆	Carbohydrates
Myristic acid	Myristic acid (2 TMS)	1-Monomyristin	n/a	79050	1188-73-4	n/a	n/a	302,2457	302,4420	C ₁₇ H ₃₄ O ₄	Fatty acyls; Fatty acids and conjugates
Monopalmitin	1-Monopalmitin (2TMS)	Monopalmitin	C00249	985	57-10-3	map00061;Fatty	emap00061 map00	256,2402	256,4241	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	Fatty acyls; Fatty acids and conjugates
α-D-Trehalose	α-D-Trehalose (6TMS)	alpha, alpha-Trehalose; alpha, alpha-Trehalose	C01083	521102	99-20-7	map00050;Starch	map00050 map00	342,1162	342,2665	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Carbohydrates;

Πίνακας 7 Επιλεγμένοι ταυτοποιημένοι μεταβολίτες της γέλης Αλόςης

Ύστερα από την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων, διαπιστώθηκε πως το μεγαλύτερο ποσοστό μεταβολιτών της γέλης ανήκει στους υδατάνθρακες με 62%. Ακολουθούν τα λιπαρά οξέα με 19% και εν συνεχεία τα καρβοξυλικά οξέα, τα αμινοξέα και άλλα (**Εικόνα 17**).



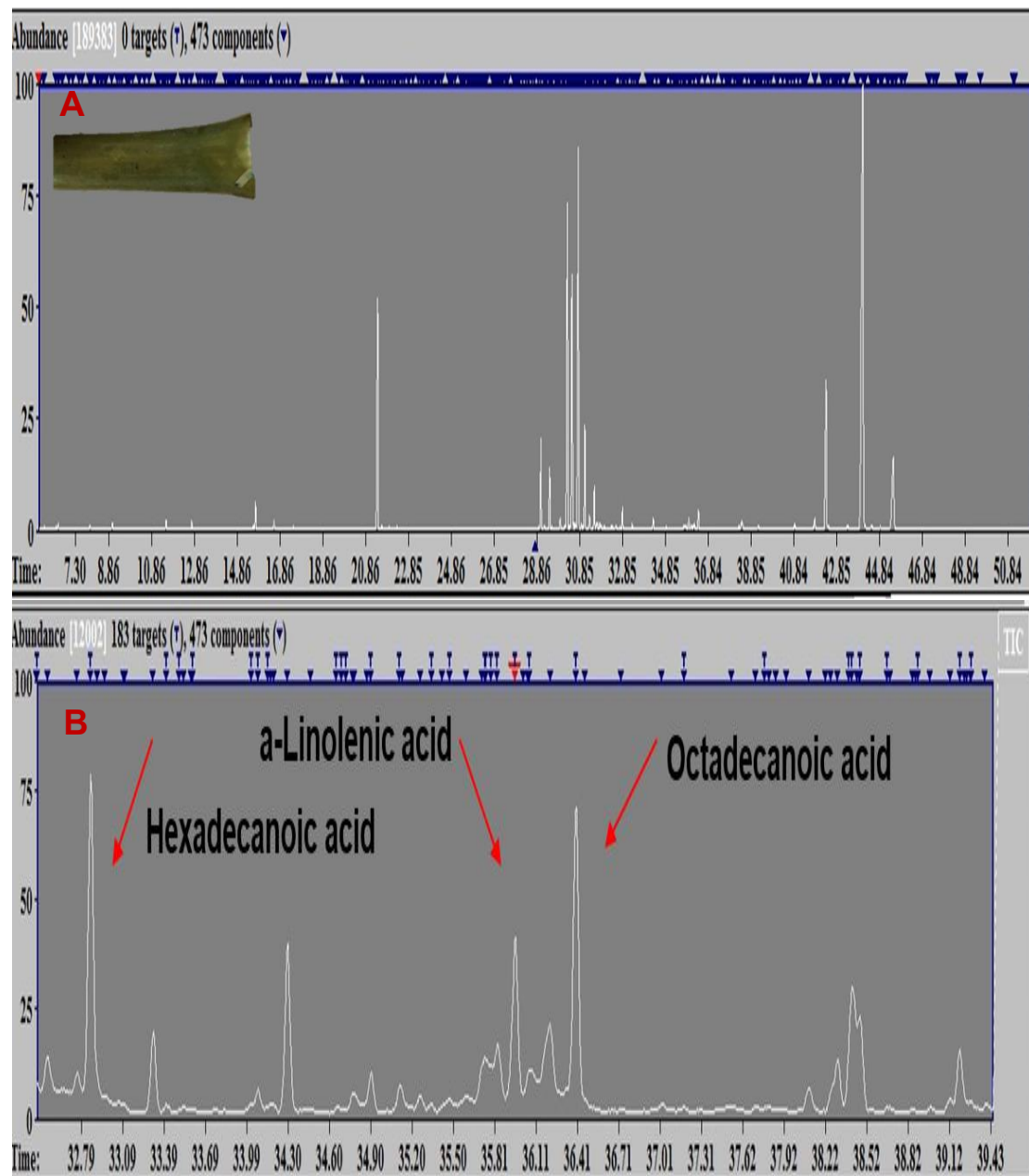
Εικόνα 17 Τα ποσοστά των χημικών ομάδων στις οποίες ανήκουν οι ταυτοποιημένοι μεταβολίτες της γέλης Αλόης

Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με άλλες έρευνες που υπάρχουν στη βιβλιογραφία, όπου καταγράφεται η ύπαρξη πληθώρας συστατικών, όπως βιταμίνες (Α, C, E), ένζυμα (αμυλάση, λιπάση), υδατάνθρακες (γλυκόζης, γαλακτόζης, μανόζης) (Hamman, 2008, Atherton, 1998), τα οποία αποτελούν βιοδραστικά συστατικά και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φυτών.

4.2.2 Μεταβολική σύσταση φλοιού

Στη μεταβολομική ανάλυση του φλοιού, ανιχνεύθηκαν συνολικά 473 μεταβολικά χαρακτηριστικά, με τους ταυτοποιημένους μεταβολίτες να αντιστοιχούν σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80% της συνολικής περιεκτικότητας του δείγματος.

Όσον αφορά την ποσοτική σύσταση, οι ταυτοποιημένοι μεταβολίτες αντιστοιχούν σε ποσοστό μεγαλύτερο από 80% της συνολικής περιεκτικότητας του δείγματος. όπως σχολιάστηκε και στην §4.2.1 τα αποτελέσματα που επιβεβαιώνουν την πολυπλοκότητα της μεταβολικής σύστασης του φλοιού Αλόης συμφωνούν με στοιχεία της βιβλιογραφίας (Hamman, 2008, Atherton, 1998) (**Εικόνα 18, Πίνακες 7, 8**).

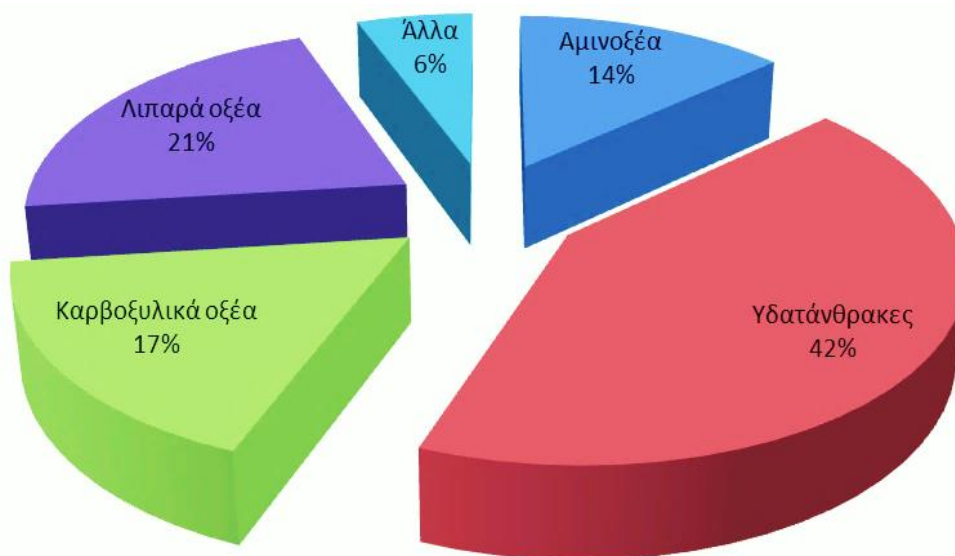


Εικόνα 18 Χρωματογράφημα GC/MS φλοιού Αλόης (**A**) και επιλεγμένες περιοχές σε μεγέθυνση (**B**)

Metabolite name (Common name)	Metabolite derivative	Synonym(s)	KEGG ID	GoldMeta bolomeDa tabaseID	PubCh em CID	CAS Registry Number	Biosynthetic pathway(s)	Abbreviated Biosynthetic pathway(s)	Monoisotopic mass (Da)	Average Molecular Mass (Da)	Molecular Formula	Chemical group
L-Leucine	L-Leucine (1TMS)	L-Leucine, 2,4-Amino-4-methylvaleric	C00123	A118001	6106	61-90-5	map00280Valine, le	map00280 map00	131.0946	131.1729	C6H13NO2	Amino acids
Benzoic acid	Benzoic acid (1TMS)	Benzoate, Benzenecarboxylic acid,	C00180	A128003	243	65-65-0	map00360Phenylalanine	map00360 map00	122.0368	122.1213	C7H6O2	Carboxylic acids
β-Alanine	β-Alanine (3TMS)	beta-Alanine, 3-Aminopropionic acid	C00099	A144001	239	107-95-9	map00240Pyrimidin	map00240 map00	88.0477	88.0932	C3H7NO2	Amino acids
Carbamic acid	Carbamic acid (3TMS)	Carbamate, Aminofornic acid	C01563	A116008	277	63-77-4	map00240Pyrimidin	map00240 map00	61.0164	61.0400	C4H3NO2	Carboxylic acids
L-Serine	L-Serine (2TMS)	L-2-Amino-3-hydroxypropionic acid,	C00065	A138001	5951	56-45-1	map00260Glycine	map00260 map00	105.0426	105.0926	C3H7NO3	Amino acids
Glycerol	Glycerol (3TMS)	Glycerin, 1,2,3-Trihydroxypropane, 1,2	C00116	A129003	753	56-81-5	map00040Pentose	map00040 map00	92.0473	92.0938	C3H8O3	Carbohydrates, Carbohydrate derivatives, Sugar alcohols
Fumaric acid	Fumaric acid (2TMS)	Fumarate, trans-Butenedioic acid	C00122	A137001	444972	110-17-8	map00020Citrate cycle	map00020 map00	116.0110	116.0722	C4H4O4	Carboxylic acids
Nonanoic acid	Nonanoic acid (1TMS)	Nonanoate, Pelargonic acid	C01601	A138003	8158	112-05-0	n/a	n/a	158.1307	158.2380	C9H18O2	Fatty acyls, Fatty acids and conjugates
Hydroquinone	Hydroquinone (2TMS)	p-Benzenediol, 1,4-Benzenediol, 1,4-	C00530	A140012	298121	2117-24-0	map00350Tyrosine	map00350 map00	254.1158	254.4773	C12H22O2S2	Quinones
Malic acid	Malic acid (3TMS)	(S)-Malate, L-Malate, L-Apple acid,	C00149	A149001	222656	97-67-6	map00020Citrate cycle	map00020 map00	134.0215	134.0874	C4H6O5	Carboxylic acids
Pyrogutamic acid	Pyrogutamic acid (2TMS)	Pidolic acid, 5-Oxoproline, Pyroglut	C01679	A153002	7405	98-79-3	map00480 Glutathione	map00480 map00	129.0426	129.1140	C5H7NO3	Amino acids
L-Glutamine	L-Glutamine (3TMS)	L-2-Aminoglutaramic acid	C00064	A178001	5961	56-65-9	map00220Arginine	map00220 map00	146.0891	146.1445	C5H10N2O3	Amino acids
Citric acid	Citric acid (4TMS)	Citrate, 2-Hydroxy-1,2,3-propanetric	C00158	A182004	311	77-92-9	map00020Citrate cycle	map00020 map00	192.0270	192.1235	C6H8O7	Carboxylic acids
Myristic acid	Myristic acid (1TMS)	Tetradecanoic acid, Tetradecanoate	C06424	A204021	11005	544-63-8	map00051Fatty acid	map00051 map00	228.2089	228.3709	C14H28O2	Fatty acyls, Fatty acids and conjugates
2-Ketoglutaric acid	2-Ketoglutaric acid (2TMS)	Oxoglutarate, α-Ketoglutaric acid, 2	C00026	A158004	51	328-50-7	map00020Citrate cycle	map00020 map00	146.0215	146.0881	C5H6O5	Carboxylic acids
D-Fructose	D-Fructose (1MEOX, 5TMS)	Leulucose, Fruit sugar, D-arabino-He	C00095	A188004	439163	57-48-7	map00051Fructose	map00051 map00	180.0634	180.1559	C6H12O6	Carbohydrates
Ascorbic acid	Ascorbic acid (4TMS)	L-Ascorbate, L-Ascorbic acid, Vitan	C00072	A195002	54670067	50-81-7	map00053Ascorbate	map00053 map00	176.0321	176.1241	C6H8O6	Carboxylic acids, Vitamins
Palmitoleic acid	Palmitoleic acid (1TMS)	(9Z)-Hexadecenoic acid, Palmitoleid	C08362	A203002	445638	373-49-9	map00051Fatty acid	map00051 map00	254.2246	254.4082	C16H30O2	Fatty acyls, Fatty Acids and Conjugates
Palmitic acid	Palmitic acid (1TMS)	Hexadecanoic acid, Hexadecanoate	C00249	A205001	965	57-10-3	map00051Fatty acid	map00051 map00	256.2402	256.4241	C16H32O2	Fatty acyls, Fatty acids and conjugates
α-Linolenic acid	α-Linolenic acid (1TMS)	(9Z,12Z,15Z)-Octadecatrienoic acid,	C06427	A222003	5280934	463-40-1	map0052α-linolenic acid	map0052 map00	278.2246	278.4296	C18H30O2	Fatty acyls, Fatty acids and conjugates
Stearic acid	Stearic acid (1TMS)	Octadecanoic acid, Stearate	C01530	A225002	5281	57-11-4	map00051Fatty acid	map00051 map00	284.2715	284.4772	C18H36O2	Fatty acyls, Fatty acids and conjugates
Oleamide	Oleamide (1TMS)	Oleil amide, (Z)-9-Octadecenamide	C19670	A233003	5283387	301-02-0	n/a	n/a	281.2720	281.4840	C18H35NO	Fatty acyls, Fatty acids and conjugates
Monopalmitin	1-Monopalmitin (2TMS)	Monopalmitin	C00249	n/a	965	57-10-3	map00051Fatty acid	map00051 map00	256.2402	256.4241	C16H32O2	Fatty acyls, Fatty acids and conjugates
α-α-Trehalose	α-α-Trehalose	α-α-Trehalose	C01083	A274002	521102	99-20-7	map00500Starch an	map00500 map00	342.1162	342.2965	C12H22O11	Carbohydrates, Disaccharides
γ-Tocopherol	γ-Tocopherol (1TMS)	Gamma-Tocopherol, (+)-gamma-Toc	C02483	n/a	92729	54-28-4	map00130 Ubiquinol	map00130 map00	416.3654	416.6795	C28H48O2	Fatty acyls, Fatty acids and conjugates; Penol lipids; Vitamin E
α-Tocopherol	α-Tocopherol, TMS derivative	α-Tocopherol, trimethylsilyl ether, α	C02477	R100014	14985	59-02-9	map00130 Ubiquinol	map00130 map00	430.3811	430.7061	C29H50O2	Fatty acyls, Fatty acids and conjugates; Penol lipids; Vitamin E

Πίνακας 8 Επιλεγμένοι ταυτοποιημένοι μεταβολίτες του φλοιού Αλόης

Ύστερα από επεξεργασία των χρωματογραφημάτων, διαπιστώθηκε πως η πλειονότητα των μεταβολιτών ανήκει στους υδατάνθρακες με 42%, ακολουθούμενη από λιπαρά οξέα με ποσοστό 21%. Ακολουθούν τα καρβοξυλικά οξέα και τα αμινοξέα με ποσοστά 17 και 14%, αντίστοιχα (**Εικόνα 19**).



Εικόνα 19 Τα ποσοστά των χημικών ομάδων στις οποίες ανήκουν οι μεταβολίτες στο φλοιό της Αλόης

Είναι προφανές ότι η μεταβολική σύσταση του φλοιού είναι πολύ πιο πολύπλοκη από αυτή της γέλης. Με βάση όμως το γεγονός της υψηλής περιεκτικότητάς του στην τοξική ουσία εμοδίνη (Park and Lee, 2006) και της υψηλής περιεκτικότητας της γέλης σε βιοδραστικούς πολυσακχαρίτες, όπως της ακεμαννάνης (Koga et al., 2018, Deepthi and Kumar, 2018, Chang et al., 2011, Swami Hulle et al., 2017), επιλέχθηκε το τελευταίο για περαιτέρω πειραματισμό.

4.3 Επίδραση των αιθανολικών εκχυλισμάτων Αλόης στο μεταβολισμό φυτών τομάτας

4.3.1 Επισκόπηση της μεταβολομικής ανάλυσης φυτών τομάτας μετά από εφαρμογή αιθανολικών εκχυλισμάτων Αλόης

Τα φυτάρια τομάτας αναπτύσσονταν σε θάλαμο ανάπτυξης για 11 ημέρες (**Εικόνα 20**), οπότε πραγματοποιούνταν η δειγματοληψία. Αρχικά, βελτιστοποιήθηκε το πρωτόκολλο μεταβολομικής για την ανάλυση φύλλων τομάτας σε pilot πείραμα, με τα αποτελέσματα να δίνουν άριστο χρωματογραφικό διαχωρισμό (**Εικόνα 21**) και μεγάλο αριθμό ταυτοποιημένων μεταβολιτών, οι οποίοι ανήκουν σε διάφορες χημικές ομάδες (**Εικόνα 22**).

Με εφαρμογή μεταβολομικής η μήτρα (matrix) που δημιουργήθηκε από τη βιοπληροφορική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με το πρόγραμμα MS-Dial, αποτελούνταν από 15 στήλες (επεμβάσεις) και 152 γραμμές (μεταβολικά χαρακτηριστικά).

Για την επισκόπηση των αποτελεσμάτων της μεταβολομικής ανάλυσης πραγματοποιήθηκε πολυπαραγοντική ανάλυση PCA, από τα αποτελέσματα της οποίας διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρχαν outliers και επαναληψιμότητα των βιοαναλυτικών πρωτοκόλλων και πρωτοκόλλων βιοπληροφορικής ανάλυσης. Η ανακάλυψη των τάσεων ανάμεσα στις επεμβάσεις και των αντίστοιχων μεταβολιτών-βιοσημαντών βασίστηκε στην εφαρμογή OPLS-DA (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis).

1^η μέρα



5^η μέρα



6^η μέρα



7^η μέρα



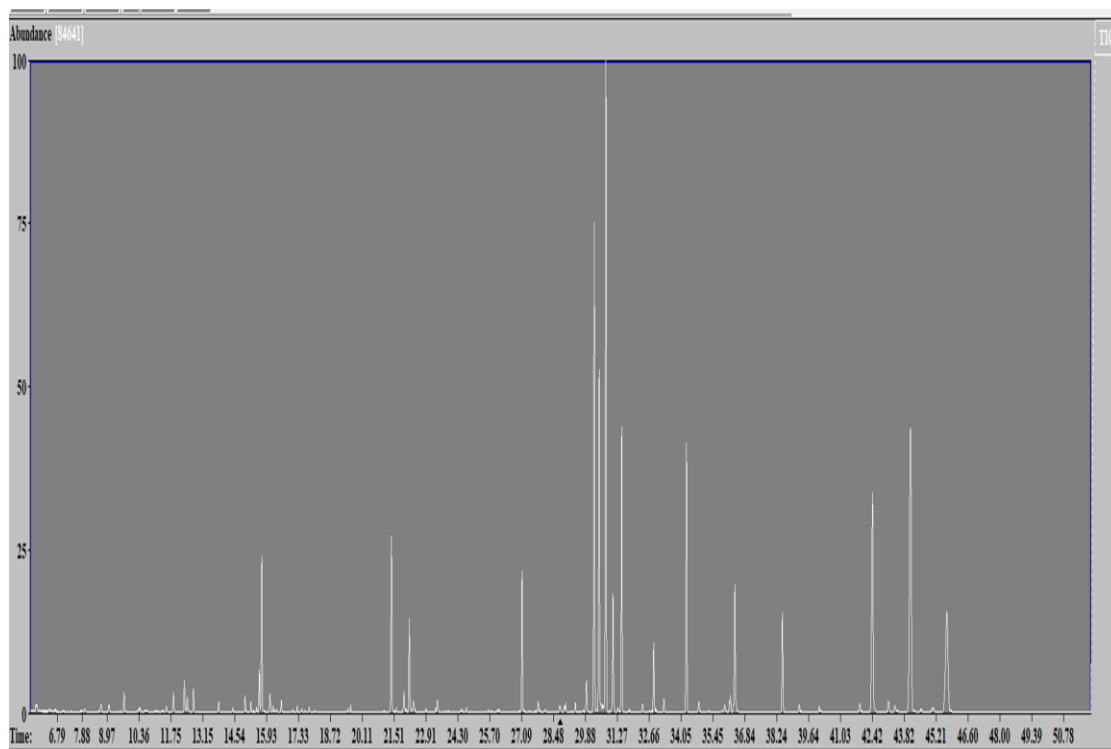
10^η μέρα



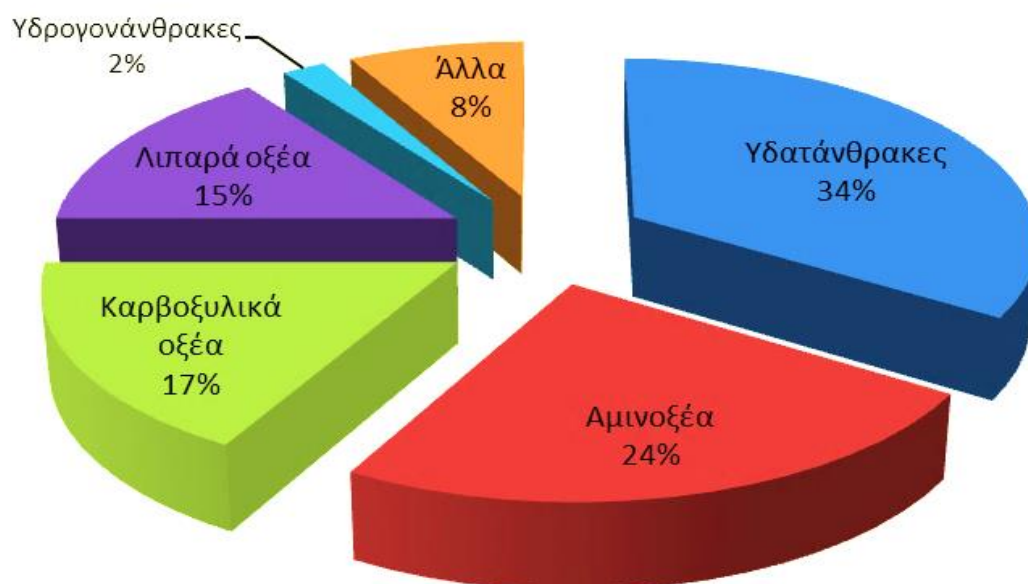
11^η μέρα



Εικόνα 20 Η ανάπτυξη των φυτών τομάτας, από την ημέρα της σποράς στο έδαφος έως την ημέρα που έγινε η επέμβαση με το αιθανολικό εκχύλισμα Αλόης



Εικόνα 21 Χρωματογράφημα GC/ΕΙ/MS μεταβολομικής ανάλυσης φύλλων τομάτας



Εικόνα 22 Τα ποσοστά των χημικών ομάδων στις οποίες ανήκουν οι μεταβολίτες που υπάρχουν στα φυτά τομάτας

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής επιβεβαίωσαν την αποτελεσματικότητα και την επαναληψιμότητα των βιοαναλυτικών πρωτοκόλλων και πρωτοκόλλων βιοπληροφορικής. Με την OPLS-DA (**Εικόνες 23, 24**) έγινε κατάταξη των δεδομένων σε ομάδες και βρέθηκαν οι τιμές των συντελεστών συσχέτισης $R^2X=0,79$ και $R^2Y=0,98$ και η τιμή της προγνωστικής ικανότητας του μοντέλου $Q^2=0,96$. Οι τιμές αυτές επιβεβαιώνουν την επαναληψιμότητα μεταξύ των καταγεγραμμένων μεταβολικών προφίλ των φυτών τομάτας, η οποία οφείλεται στην ομοιομορφία των πειραματικών χειρισμών και της επεξεργασίας των δειγμάτων για GC/EI/MS μεταβολομική ανάλυση.

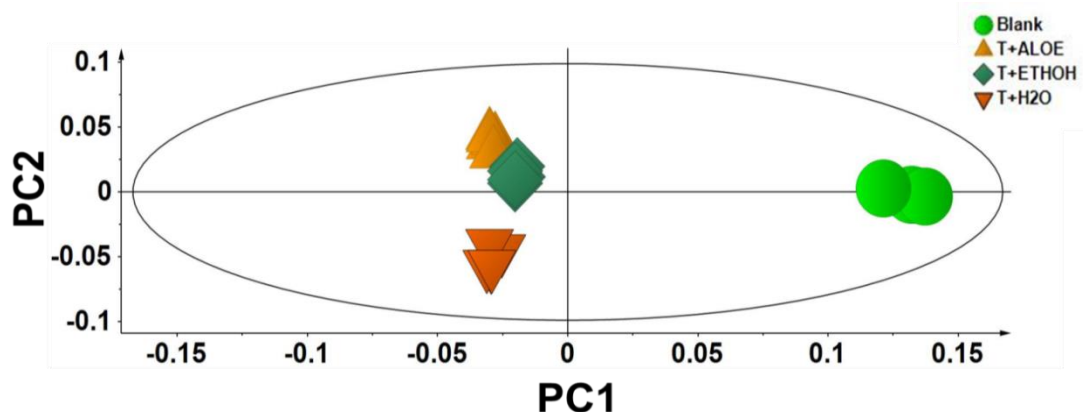
Στα OPLS-DA score plots διακρίνεται η κατηγοριοποίηση των επαναλήψεων σε επεμβάσεις και οι μεταξύ τους αποστάσεις, οι οποίες είναι ανάλογες των διαφορών στα καταγεγραμμένα μεταβολικά προφίλ (Wiklund et al., 2008, Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011). Στη συνέχεια ακολούθησε ιεραρχική ανάλυση κατά συστάδες (Hierarchical Cluster Analysis-HCA) (**Εικόνα 25**), της οποίας τα αποτελέσματα ήταν σύμφωνα με την OPLS-DA. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται πολύ καλός διαχωρισμός μεταξύ των επαναλήψεων, ανάλογα με τις επεμβάσεις, με τις επεμβάσεις με αιθανολικό διάλυμα και αιθανολικό εκχύλισμα Αλόης να είναι πιο κοντά μεταξύ τους σε σχέση με τις επεμβάσεις με υδατικό διάλυμα (μάρτυρας). Αυτό σημαίνει ότι οι δύο πρώτες προκαλούν μικρότερες και παρόμοιες αλλαγές στο μεταβολικό προφίλ των φυταρίων σε σχέση με την επέμβαση με υδατικό διάλυμα.

Στη συνέχεια, ακολούθησε ανάλυση OPLS-DA ανά ζεύγη (Pairwise Analysis) (**Εικόνα 26**) για την επιβεβαίωση επίδρασης των αιθανολικών εκχυλισμάτων Αλόης στα φυτά τομάτας.

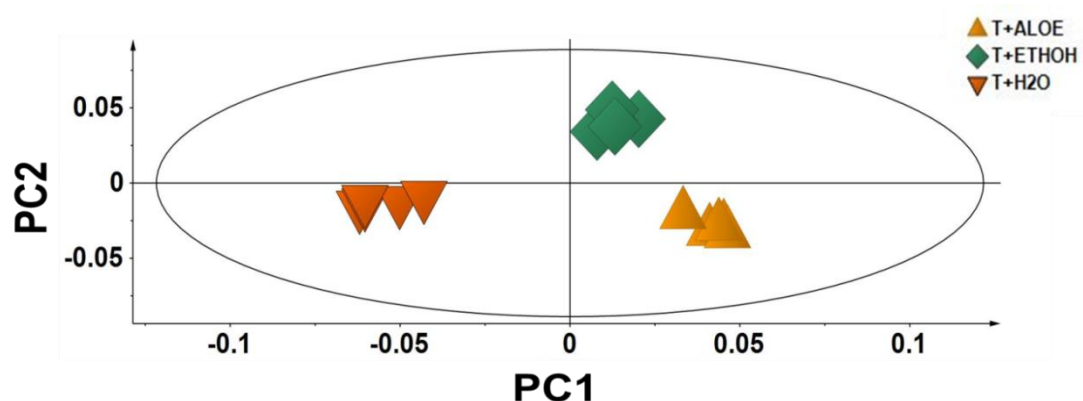
Στις παρακάτω εικόνες (**Εικόνες 23, 24**) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα, όπου γίνεται μία ομαδοποίηση των μεταβολικών προφίλ των δειγμάτων τομάτας σε πλήρως διακριτές ομάδες. Στην **Εικόνα 23** φαίνεται ότι υπάρχει πλήρης διαχωρισμός των μεταβολικών προφίλ σε όλα τα είδη δειγμάτων από τα φυτά τομάτας. Επίσης, είναι πλήρως διαχωρισμένα όλα τα δείγματα τομάτας σε σχέση με το κενό δείγμα που δημιουργήθηκε ως μάρτυρας, το οποίο βρίσκεται πολύ μακριά από τα υπόλοιπα. Παρόμοια, είναι εμφανής ο διαχωρισμός των μεταβολικών προφίλ φυτών τομάτας που έχουν δεχτεί αιθανολικά εκχυλίσματα Αλόης και υδατικά διαλύματα αιθανόλης από τα

υδατικά εκχυλίσματα (**Εικόνα 24**). Παρότι τα δύο αιθανολικά διαχωρίζονται από το υδατικό μεταβολικό προφίλ, διαχωρίζονται και πλήρως μεταξύ τους.

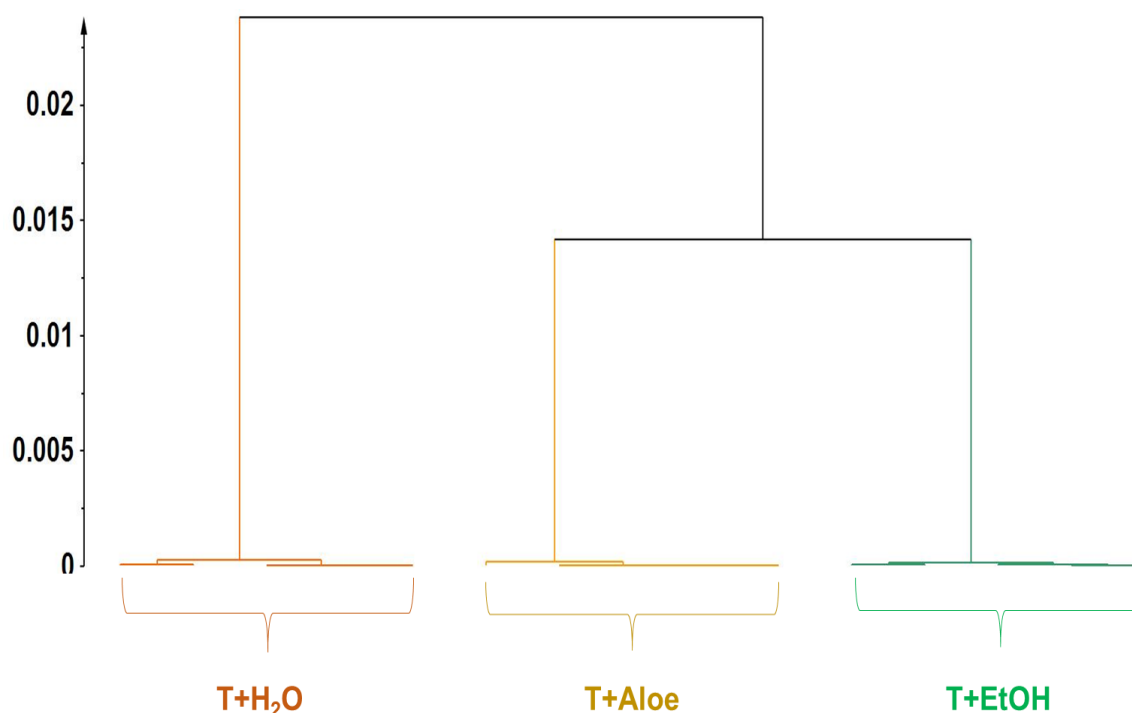
Το ίδιο ακριβώς αποτέλεσμα λαμβάνουμε από το δένδρογραμμα ιεραρχικής ανάλυσης κατά συστάδες (**Εικόνα 25**). Υπάρχει πλήρης διαχωρισμός των αιθανολικών εκχυλισμάτων Αλόης, καθώς και υδατικού διαλύματος με αιθανόλη σε σχέση με το μάρτυρα, δηλαδή το υδατικό διάλυμα.



Εικόνα 23 OPLS-DA score plot για το διαχωρισμό μεταξύ των GC/EI/MS μεταβολικών προφίλ φυτών τομάτας με επεμβάσεις αιθανολικών εκχυλισμάτων Αλόης (T+ALOE), υδατικών διαλυμάτων με αιθανόλη (T+EtOH) ή υδατικών διαλυμάτων (T+H₂O) σε σχέση με κενά δείγματα (Blanks, 24 ώρες μετά τις επεμβάσεις). Η έλλειψη αντιπροσωπεύει το Hotelling's T² σε διάστημα εμπιστοσύνης 95% (PC: Κύριες Συνιστώσες, Principal Component)



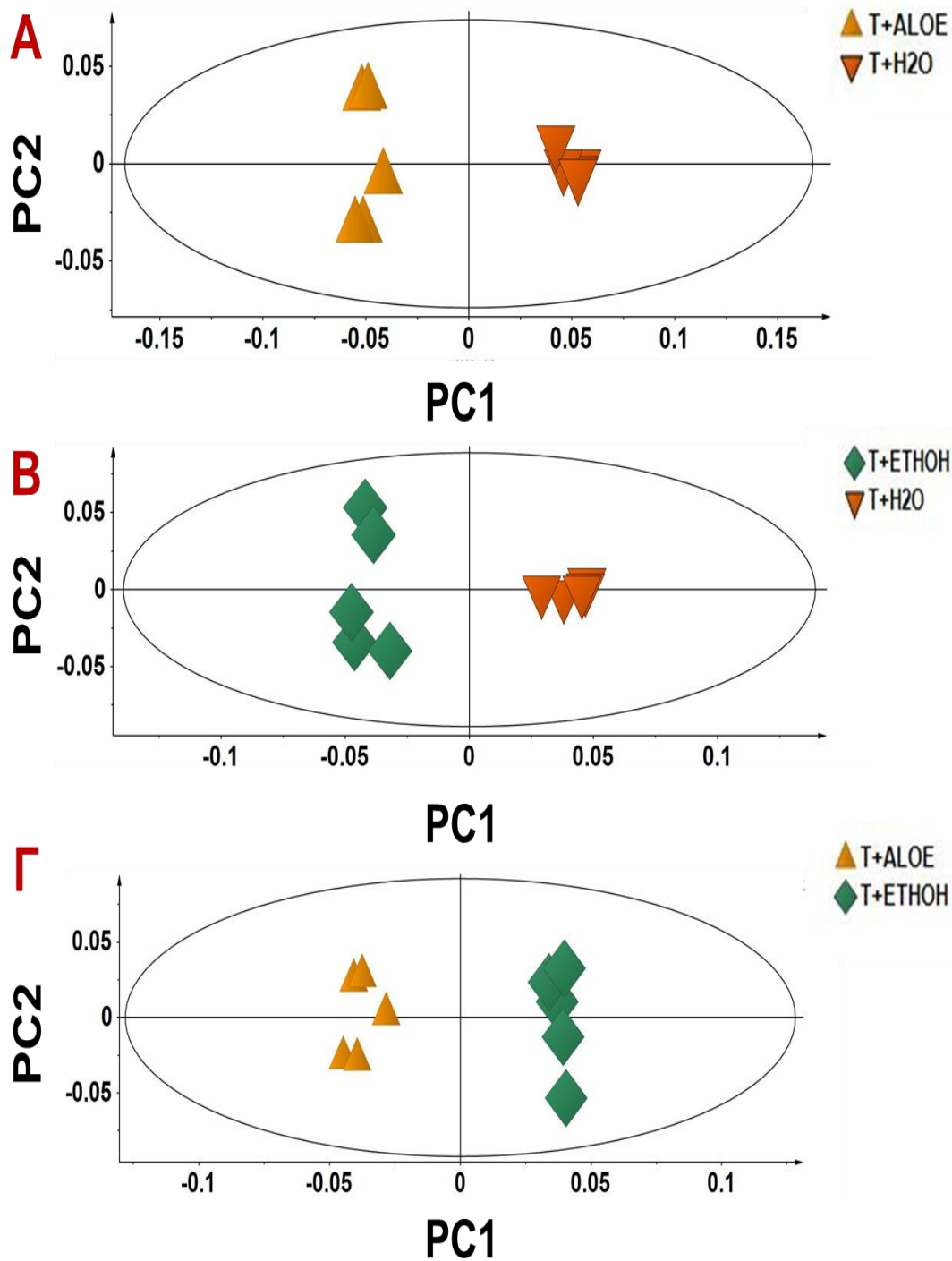
Εικόνα 24 OPLS-DA score plot για τον διαχωρισμό μεταξύ των μεταβολικών προφίλ φυτών τομάτας μετά από επεμβάσεις αιθανολικών εκχυλισμάτων Αλόης (T+ALOE), υδατικών διαλυμάτων με αιθανόλη (T+EtOH) ή υδατικών διαλυμάτων (Μάρτυρας) (T+H₂O), 24 ώρες μετά τις επεμβάσεις



Εικόνα 25 Δενδρόγραμμα ιεραρχικής ανάλυσης κατά συστάδες (Hierarchical cluster analysis dendrogram-HCA) των GC/EI/MS μεταβολικών προφίλ φυτών τομάτας στα οποία έχει γίνει επέμβαση αιθανολικών εκχυλισμάτων με Αλόη (T+ALOE) υδατικών διαλυμάτων με αιθανόλη (T+EtOH) σε σχέση με την επέμβαση με υδατικό διάλυμα (Μάρτυρα) (T+H₂O), 24 ώρες μετά τις επεμβάσεις

Στα επόμενα score plots (**Εικόνα 26**) γίνεται σύγκριση ανά ζεύγη με όλους τους συνδυασμούς των μεταβολικών προφίλ των δειγμάτων φυτών τομάτας. Σε κάθε περίπτωση βλέπουμε πως διαχωρίζονται πλήρως.

Συμπερασματικά μπορούμε να αναφέρουμε ότι ο πλήρης διαχωρισμός των μεταβολικών προφίλ σημαίνει πως τα πρωτόκολλα που εφαρμόστηκαν λειτούργησαν σωστά. Διαπιστώνεται επίσης, πως αυτές οι μεταβολικές αλλαγές που παρατηρούνται οφείλονται στις επεμβάσεις που έγιναν.



Εικόνα 26 OPLS-DA score plots (pairwise analysis) για το διαχωρισμό των GC/EI/MS μεταβολικών προφίλ **A**) φυτών τομάτας με εφαρμογή αιθανολικών εκχυλισμάτων Αλόης (T+ALOE) ή υδατικών διαλυμάτων (T+H₂O), **B**) φυτών τομάτας με εφαρμογή υδατικών διαλυμάτων με αιθανόλη (T+EtOH) ή υδατικών διαλυμάτων (T+H₂O), **Γ**) φυτών τομάτας με εφαρμογή αιθανολικών εκχυλισμάτων με Αλόη (T+ALOE) ή υδατικών διαλυμάτων με αιθανόλη (T+EtOH), 24 ώρες μετά τις επεμβάσεις. Η έλλειψη αντιπροσωπεύει το Hotelling's T² σε διάστημα εμπιστοσύνης 95% (PC: Κύριες Συνιστώσες, Principal Component)

4.3.2 Τα αιθανολικά εκχυλίσματα Αλόης επηρέασαν σημαντικά το μεταβολισμό των φυτών τομάτας στα οποία εφαρμόστηκαν

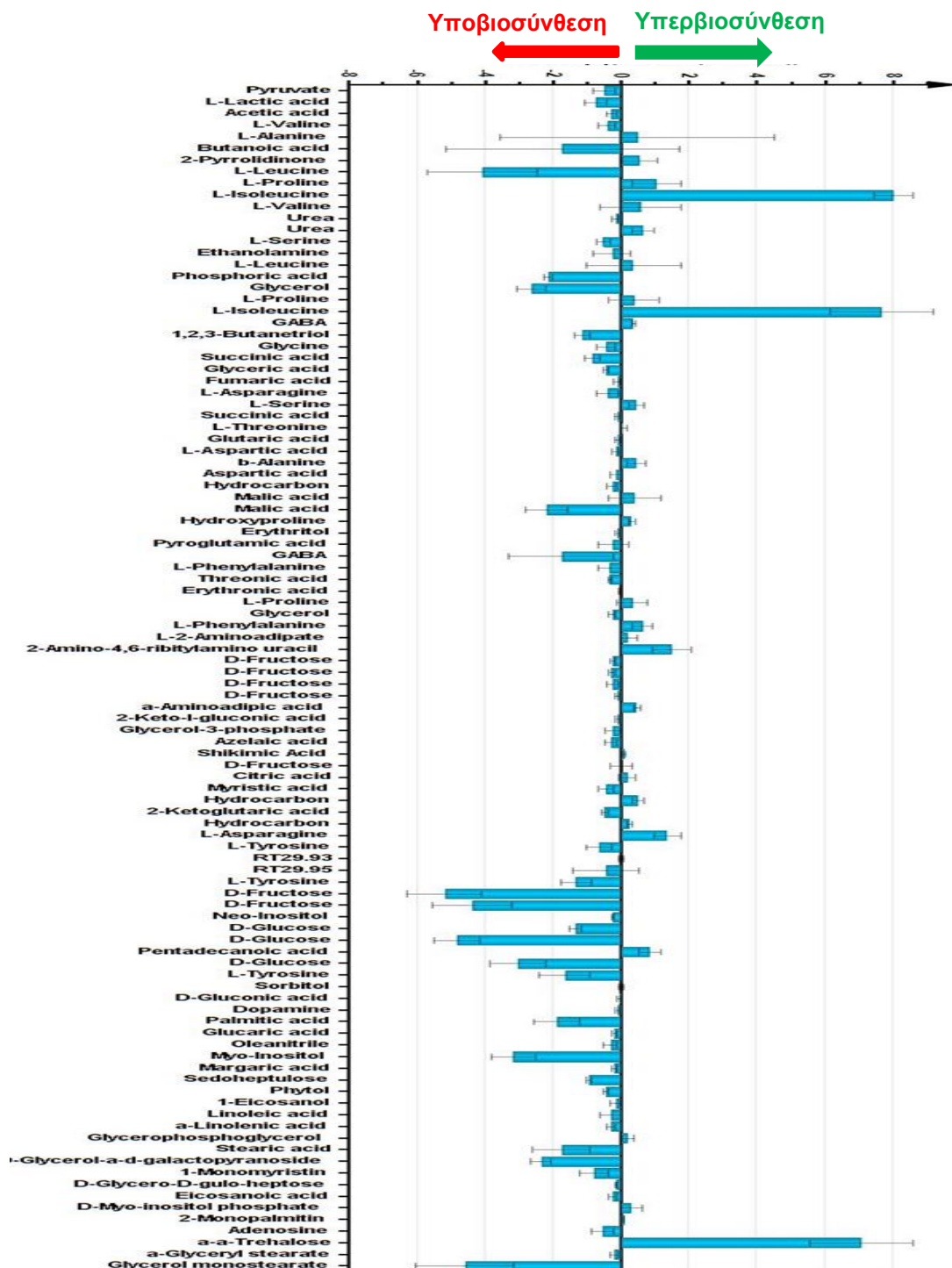
Οι αναλύσεις μεταβολομικής φανέρωσαν σημαντική επίδραση των εκχυλισμάτων στο μεταβολισμό των φυτών τομάτας, περιλαμβάνοντας και μεταβολίτες οι οποίοι ανήκουν σε βιοσυνθετικές οδούς, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο σε αντιδράσεις σε βιοτικές ή αβιοτικές καταπονήσεις. Ανακαλύφθηκε μεγάλος αριθμός μεταβολιτών, οι οποίοι είτε υπερβιοσυντέθηκαν, είτε υποβιοσυντέθηκαν ως αντίδραση στις επεμβάσεις με αιθανόλη ή το αιθανολικό εκχύλισμα Αλόης. Η ανακάλυψη των μεταβολιτών-βιοσημαντών (biomarkers), οι οποίοι επηρεάζουν τη διάταξη και κατηγοριοποίηση των επεμβάσεων στα αντίστοιχα OPLS-DA score plots (**Εικόνες 23, 24, 26**) βασίζεται στη χρήση των Coefficient plots (**Εικόνες 27-29**) (Aliferis et al., 2014, Aliferis and Jabaji, 2011). Στα Coefficient plots, η απόλυτη τιμή των Coeff's είναι ανάλογη της επίδρασής τους στη διαφοροποίηση, δηλαδή μεγαλύτερες τιμές αντιστοιχούν στους σημαντικότερους βιοσημαντές.

Στο Coefficient plot στο οποίο γίνεται σύγκριση μεταξύ του μεταβολισμού των φυτών μετά από επεμβάσεις αιθανολικού εκχυλίσματος με Αλόη και υδατικού διαλύματος (μάρτυρα) (**Εικόνα 27**), παρατηρείται αυξημένη σχετική περιεκτικότητα σε **L-προλίνη**, **L-ισολευκίνη**, **L-ασπαραγίνη** και **α -α-τρεχαλόζη** στα φυτάρια, στα οποία εφαρμόστηκε το εκχύλισμα Αλόης, σε σχέση με το μάρτυρα. Από την άλλη πλευρά, στο μάρτυρα εμφανίζεται αυξημένη σχετική περιεκτικότητα στο **βουτανοϊκό οξύ**, **L-λευκίνη**, **φωσφορικό οξύ**, **GABA**, **D-φρουκτόζη**, **D-γλυκόζη** και **μυο-ινοσιτόλη** σε σχέση με το αιθανολικό εκχύλισμα Αλόης.

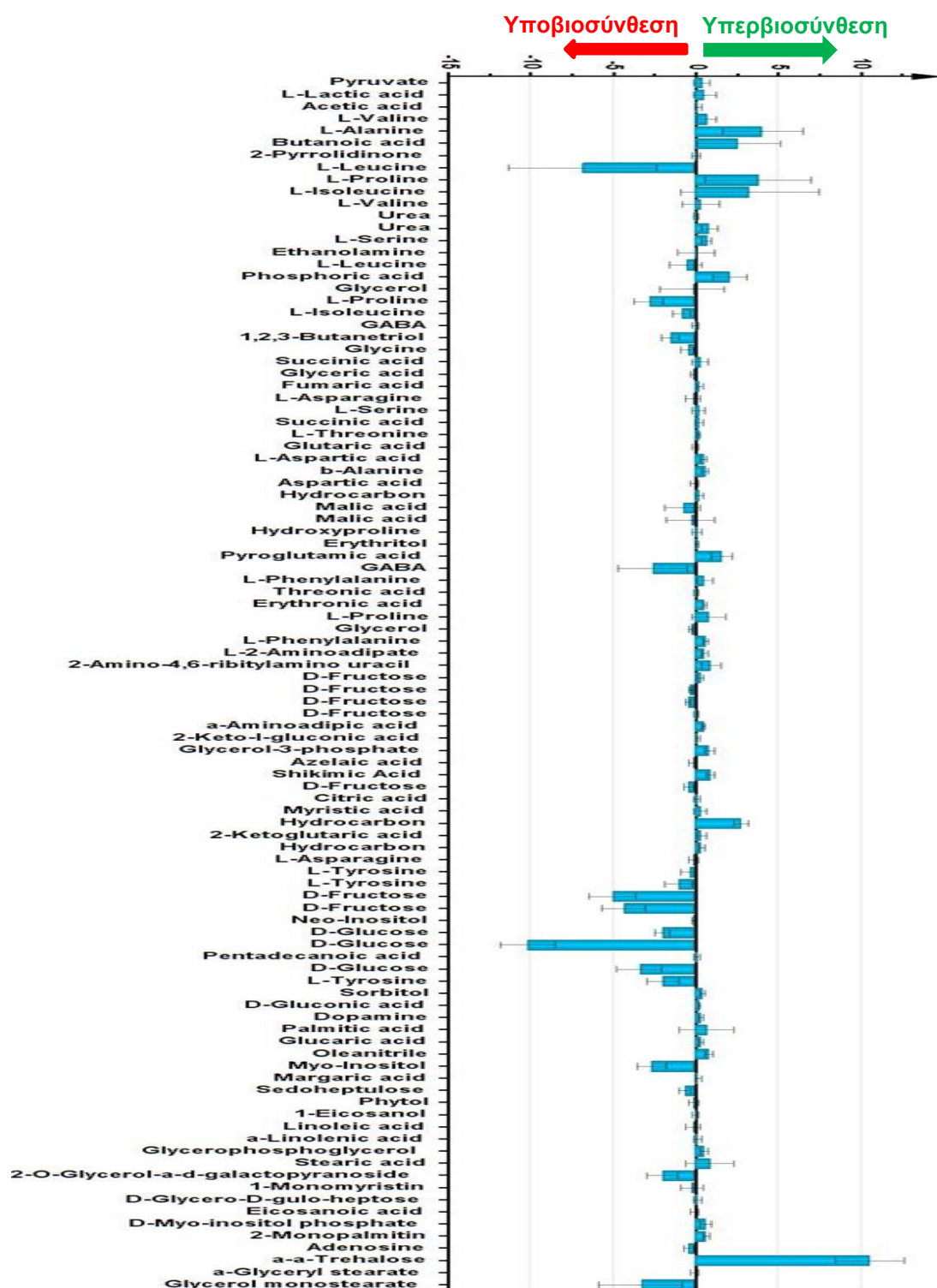
Για τη σύγκριση μεταξύ του μεταβολισμού των φυτών μετά από επεμβάσεις αιθανολικού διαλύματος και υδατικού διαλύματος (μάρτυρα) (**Εικόνα 28**), παρατηρείται αυξημένη σχετική περιεκτικότητα σε **L-αλανίνη**, **L-προλίνη**, **L-ισολευκίνη**, **βουτανοϊκό οξύ**, **φωσφορικό οξύ** και **α -α-τρεχαλόζη** στα δείγματα που δέχτηκαν αιθανολικό διάλυμα σε σχέση με το μάρτυρα. Από την άλλη, στο μάρτυρα εμφανίζεται αυξημένη σχετική περιεκτικότητα σε **L-λευκίνη**, **L-προλίνη**, **GABA**, **D-φρουκτόζη**, **D-γλυκόζη** και **μυο-ινοσιτόλη** σε σχέση με το αιθανολικό διάλυμα.

Τέλος, η σύγκριση μεταξύ του μεταβολισμού φυτών μετά από επεμβάσεις με αιθανολικά εκχυλίσματα Αλόης και υδατικό διάλυμα αιθανόλης (**Εικόνα 29**) αποκάλυψε αυξημένη σχετική συγκέντρωση στους μεταβολίτες **L-ισολευκίνη, L-λευκίνη, L-προλίνη, GABA, D-φρουκτόζη, D-γλυκόζη, L-ασπαραγίνη** στα δείγματα με επέμβαση αιθανολικών εκχυλισμάτων Αλόης σε σχέση με αυτά που είχαν δεχτεί υδατικό διάλυμα αιθανόλης. Από την άλλη, μεγαλύτερη σχετική συγκέντρωση στα δείγματα που δέχτηκαν υδατικό διάλυμα αιθανόλης εμφάνισαν τα **βουτανοϊκό οξύ, φωσφορικό οξύ, παλμιτικό οξύ, μυο-ινοσιτόλη και α-α-τρεχαλόζη** σε σχέση με το αιθανολικό εκχύλισμα Αλόης.

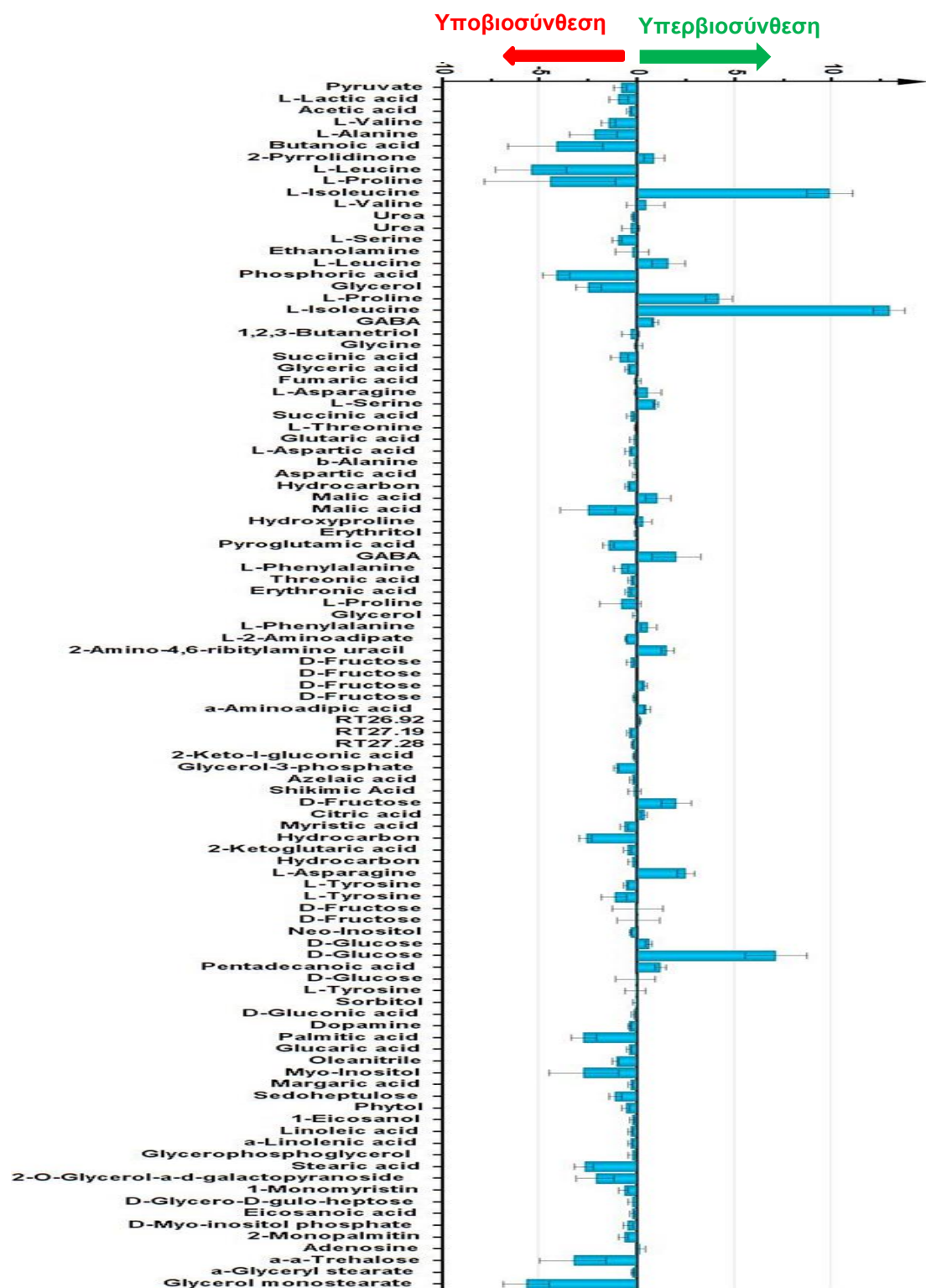
Με σκοπό να κατανοήσουμε την επίδραση του εκχυλίσματος Αλόης στο μεταβολισμό της τομάτας και να εξάγουμε συμπεράσματα για τη δράση του ως βιοδιεγέρτη παρακάτω η ανάλυση και συζήτηση επικεντρώνονται στα αποτελέσματα της τελευταίας σύγκρισης, δηλαδή αιθανολικού διαλύματος και εκχυλίσματος Αλόης με αιθανόλη.



Εικόνα 27 Coefficient plot, στο οποίο διακρίνονται οι τιμές των Coefficients για τα κανονικοποιημένα και κεντραρισμένα δεδομένα (centered and scaled data) για τη σύγκριση μεταξύ των μεταβολικών προφίλ φυτών τομάτας με εφαρμογή αιθανολικού εκχυλίσματος Αλόης και του μάρτυρα (υδατικό διάλυμα), 24 ώρες μετά τις επεμβάσεις. Οι απόλυτες τιμές είναι ανάλογες της βαρύτητας των αντίστοιχων μεταβολιτών στον παρατηρούμενο διαχωρισμό. Τα διαστήματα εμπιστοσύνης προέρχονται από jack-knifing (95%). Θετικές τιμές αντιστοιχούν σε μεταβολίτες που υπερ-βιοσυντέθηκαν (πράσινο) ενώ αρνητικές τιμές σε αυτούς που υπο-βιοσυντέθηκαν (κόκκινο βέλος), ως αντίδραση στην επέμβαση με το αιθανολικό εκχύλισμα Αλόης



Εικόνα 28 Coefficient plot, στο οποίο διακρίνονται οι τιμές των Coefficients για τα κανονικοποιημένα και κεντραρισμένα δεδομένα (centered and scaled data) για τη σύγκριση μεταξύ των μεταβολικών προφίλ φυτών τομάτας, με εφαρμογή υδατικού διαλύματος αιθανόλης και του μάρτυρα (υδατικό διάλυμα), 24 ώρες μετά τις επεμβάσεις. Θετικές τιμές αντιστοιχούν σε μεταβολίτες που υπερ-βιοσυντέθηκαν (πράσινο) ενώ αρνητικές τιμές σε αυτούς που υπο-βιοσυντέθηκαν (κόκκινο βέλος), εξαιτίας της επέμβασης με το υδατικό εκχύλισμα αιθανόλης.



Εικόνα 29 Coefficient plot, στο οποίο διακρίνονται οι τιμές των Coefficients για τα κανονικοποιημένα και κεντραρισμένα δεδομένα (centered and scaled data) για τη σύγκριση μεταξύ των μεταβολικών προφίλ φυτών τομάτας, με εφαρμογή αιθανολικού εκχυλίσματος Αλόης και υδατικού διαλύματος αιθανόλης, 24 ώρες μετά τις επεμβάσεις. Θετικές τιμές αντιστοιχούν σε μεταβολίτες που υπερ-βιοσυντέθηκαν (πράσινο) ενώ αρνητικές τιμές σε αυτούς που υπο-βιοσυντέθηκαν (κόκκινο βέλος), ως αντίδραση στην επέμβαση με το αιθανολικό εκχύλισμα Αλόης

4.3.3 Μεταβολίτες-βιοσημαντές της επίδρασης του αιθανολικού εκχυλίσματος γέλης Αλόης σε φυτά τομάτας και ο ρόλος τους στο μεταβολισμό τους

Οι μεταβολίτες-βιοσημαντές ανακαλύφθηκαν μέσω της GC/EI/MS μεταβολομικής ανάλυσης και έχουν τη μεγαλύτερη διακύμανση στα μεταβολικά προφίλ των φυταρίων τομάτας, τα οποία καταγράφηκαν. Παρακάτω, σχολιάζονται οι σημαντικότεροι από αυτούς, οι οποίοι παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φυτών και στις αντιδράσεις τους σε καταπονήσεις, με σκοπό την αιτιολόγηση του δυνητικού ρόλου του εκχυλίσματος ως βιοδιεγέρτη στη φυτοπροστασία.

4.3.3.1 Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες αποτελούν ένα από τα κυριότερα και πλέον σημαντικά συστατικά που υπάρχουν στα φυτά, τα οποία ποικίλουν ανάλογα με την εποχή και το βλαστικό στάδιο που βρίσκεται το φυτό. Οι βασικότερες κατηγορίες υδατανθράκων είναι οι εξόζες, μονοσακχαρίτες με 6 άτομα άνθρακα, ανάμεσα στις οποίες βρίσκεται η **γλυκόζη** και η **φρουκτόζη**, οι δισακχαρίτες με κυριότερους την **τρεχαλόζη** και **σακχαρόζη**, οι αλκοόλες στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η **ινοσιτόλη** και η **μαννιτόλη** και τέλος, οι σύνθετοι υδατάνθρακες, όπως είναι η **ραφινόζη** (Guignard et al., 2005). Ο εμπειρικός τύπος των υδατανθράκων είναι CH_2O , υπάρχουν όμως και κάποιοι που περιέχουν στο μόριό τους άζωτο, φώσφορο ή θείο (Διαμαντίδης, 2010). Ένας από τους κυριότερους ρόλους των υδατανθράκων μέσα στο φυτό είναι ότι αποτελούν πηγή ενέργειας, ενώ ένας άλλος εξίσου σημαντικός είναι ότι χρησιμεύουν ως δομικά υλικά, είτε άμεσα είτε έμμεσα αφού θα έχουν υποστεί διασπάσεις από διάφορα ένζυμα (Aliferis et al., 2014).

Τα φυτά έχουν τη δυνατότητα να αναπτύσσονται κάτω από ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών, όπως είναι οι ακραίες θερμοκρασίες, η έλλειψη νερού, το ανεπαρκές ή υπερβολικό φως. Για το λόγο αυτό παρουσιάζουν ισχυρή φυσιολογική ομοιόσταση. Για να μπορέσει να παραμείνει σταθερή η ομοιόσταση, ο μεταβολισμός των φυτών θα πρέπει να

είναι ευέλικτος. Σε όλα τα φυτικά κύτταρα ο μεταβολισμός του άνθρακα παρέχει ενέργεια ή δομικά στοιχεία για βιομάζα ή δευτερογενή μεταβολισμό (Rontein et al., 2002).

Ο μεταβολισμός των υδατανθράκων έχει διαιρεθεί παραδοσιακά σε αναβολισμό και καταβολισμό (Rivas et al., 2018). Μεταβολισμός είναι το σύνολο των χημικών αντιδράσεων που συμβαίνει σε έναν οργανισμό (Xaplanteri, 2015b). Ωστόσο δεν είναι λίγες οι περιπτώσεις στις οποίες η γραμμή που διαχωρίζει την αποικοδόμηση ή σύνθεση μίας ουσίας είναι πολύ στενή. Με άλλα λόγια είναι πιθανό μία μεταβολική οδός που χρησιμοποιήθηκε για να διασπάσει ένα μόριο να είναι η ίδια που θα συμβάλλει στην σύνθεσή του (Rivas et al., 2018).

Πιο αναλυτικά, ο καταβολισμός αποτελεί διαδικασία κατά την οποία γίνεται διάσπαση των μακρομορίων, σε μικρότερα και απλούστερα μόρια. Ο καταβολισμός των υδατανθράκων περιλαμβάνει τη γλυκόλυση, κατά την οποία γίνεται διάσπαση της γλυκόζης που προέρχεται από την αποικοδόμηση των υδατανθράκων και παράγεται πυροσταφυλλικό οξύ, ATP (Τριφωσφορική αδενοσίνη) και NADH (Νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο) (Xaplanteri, 2015b). Πιο συγκεκριμένα, κατά τη διαδικασία της γλυκόλυσης, η οποία πραγματοποιείται στο κυτόπλασμα, διασπάται η γλυκόζη σε δύο μόρια πυροσταφυλλικού οξέος και ταυτόχρονα δημιουργούνται δύο μόρια ATP και άλλα δύο NADH+H⁺ (Koolman et al., 2005).

Ο αναβολισμός από την άλλη είναι η ακριβώς αντίθετη πορεία του καταβολισμού. Κατά τον αναβολισμό δηλαδή, γίνεται βιοσύνθεση των μακρομορίων από απλούστερα μόρια. Περιλαμβάνει τη γλυκονεογένεση, που αποτελεί διαδικασία δημιουργίας γλυκόζης (Xaplanteri, 2015b). Η γλυκονεογένεση πραγματοποιείται εκτός από το κυτόπλασμα, στα μιτοχόνδρια και το ενδοπλασματικό δίκτυο (Koolman et al., 2005). Στους φυτικούς οργανισμούς η βασικότερη πορεία σύνθεσης γλυκόζης είναι μέσω της φωτοσύνθεσης από CO₂, μπορεί όμως επίσης να συντεθεί από γλυκερόλη και αμινοξέα (Xaplanteri, 2015b). Ο ρόλος του μεταβολισμού είναι ιδιαίτερα σημαντικός, καθώς μέσω αυτού οι οργανισμοί είναι σε θέση να αξιοποιούν το οργανικό υλικό που τους περιβάλλει και να διατηρούν την ύπαρξή τους (Rivas et al., 2018).

Πιο αναλυτικά, όσον αφορά την **α - α -τρεχαλόζη** είναι ένας δισακχαρίτης, ευρέως διαδεδομένος σε όλο το βιολογικό κόσμο (Elbein et al., 2003), με ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη λειτουργία των φυτών. Εμπλέκεται στη ρύθμιση της αύξησης και ανάπτυξης των φυτών σε σχέση με το διαθέσιμο άνθρακα, καθώς και την ανάπτυξη του εμβρύου, αλλά και το γηρασμό των φύλλων (O'hara et al., 2013). Επιπρόσθετα, δεν είναι λίγες οι φορές που συσχετίζεται η δράση της **α - α -τρεχαλόξης** με την προσαρμογή του φυτού σε κάποιο παράγοντα καταπόνησης (Fernandez et al., 2010). Κάποιοι από τους πιο συνηθισμένους παράγοντες καταπόνησης είναι η ξηρασία, η αλατότητα και οι χαμηλές θερμοκρασίες (Elbein et al., 2003). Έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία πως η **α - α -τρεχαλόζη** προστατεύει τα φυτικά κύτταρα από ακραίες τιμές ωσμωτικού δυναμικού, που μπορεί να προκληθούν από τις παραπάνω αιτίες (Crowe, 1993), καθώς συμβάλλει ώστε να αποφευχθεί η μετουσίωση των πρωτεϊνών, όταν το φυτό βρίσκεται σε κατάσταση στρες (Elbein et al., 2003).

Με βάση τα παραπάνω στοιχεία, μπορούμε να υποστηρίξουμε ότι οι αυξημένες συγκεντρώσεις των μονοσακχαριτών **φρουκτόζη** και **γλυκόζη**, οι οποίες παρατηρήθηκαν μετά την επέμβαση με το αιθανολικό εκχύλισμα Αλόης, αποτελούν ένδειξη καλύτερης μεταβολικής λειτουργίας και φυσιολογικής κατάστασης των φυτών, καθώς αυτά έχουν στη διάθεσή τους μεγάλες ποσότητες δομικών μονάδων για βιοσυνθέσεις μεταβολιτών και πρωτεϊνών.

Επιπρόσθετα, αν και με το GC/EI/MS δεν είναι δυνατή η καταγραφή πολυσακχαριτών, η πολύ πιθανή ύπαρξή τους στα εκχυλίσματα θα μπορούσε να δικαιολογήσει τις παρατηρούμενες αλλαγές στο μεταβολισμό των φυταρίων. Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία για παράδειγμα, ότι πολυσακχαρίτες που έχουν απομονωθεί από τα κυτταρικά τοιχώματα άλγεων, μπορούν να προκαλέσουν αντιδράσεις άμυνας, που ενισχύουν την προστασία από παθογόνους παράγοντες (Vera et al., 2011, Zou et al., 2019). Ειδικότερα, οι περισσότεροι πολυσακχαρίτες φυκιών προκαλούν μια αρχική οξειδωτική έκρηξη σε τοπικό επίπεδο και την ενεργοποίηση μονοπατιών σηματοδότησης σαλικυλικού, γιασμονικού οξέος και αιθυλενίου σε συστημικό επίπεδο. Η ενεργοποίηση αυτών των μονοπατιών σηματοδότησης οδηγεί σε αυξημένη έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες σχετιζόμενες με την παθογένεση (Pathogenesis Related-PR), με αντιμυκητιακές και

αντιβακτηριακές δράσεις, αμυντικά ένζυμα όπως η λιποξυγενάση, τα οποία εμφανίζουν αντι-ιικές και αντιβακτηριακές δράσεις και ένζυμα τα οποία εμπλέκονται στη σύνθεση των τερπενοειδών και έχουν επίσης αντιμικροβιακή δράση (Vera et al., 2011). Υπάρχει πληθώρα πολυσακχαριτών που έχουν απομονωθεί από τη γέλη της Αλόης, με κάποιους από αυτούς να εμφανίζουν ιδιαίτερα μεγάλη βιοδραστικότητα (Reynolds and Dweck, 1999). Ο πολυσακχαρίτης, που απαντάται στη γέλη της Αλόης και εμφανίζει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον είναι ένα ακετυλιωμένο μαννάνιο, η **ακεμαννάνη**, η οποία παρουσιάζει μία σειρά από ενδιαφέρουσες βιοδραστικές λειτουργίες (Chang et al., 2011).

Αντίθετα, η επέμβαση με τα εκχυλίσματα οδήγησε σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις του δισακχαρίτη **α -α-τρεχαλόζη**, γεγονός που υποδεικνύει μειωμένο ωσμωτικό στρες ή γενικότερα επίπεδο καταπόνησης των φυτών σε σχέση με το μάρτυρα. Αυτό, είναι ενθαρρυντικό καθώς αποτελεί απόδειξη ότι το εκχύλισμα στη συγκέντρωση στην οποία εφαρμόστηκε δεν προκαλεί φυτοτοξικότητα.

4.3.3.2 Αμινοξέα

Τα αμινοξέα θεωρούνται πρόδρομες ουσίες και συστατικά των πρωτεϊνών. Πολλά αμινοξέα δρουν επίσης ως πρόδρομοι άλλων ενώσεων που περιέχουν άζωτο, όπως για παράδειγμα τα νουκλεϊκά οξέα. Ο ρόλος τους εκτός από δομικά στοιχεία είναι και να ρυθμίζουν βασικές μεταβολικές οδούς που θεωρούνται απαραίτητες για την επιβίωση την ανάπτυξη και την άμυνα των φυτικών οργανισμών (Wu, 2009, Rai, 2002). Στη φύση υπάρχουν περισσότερα από 300 αμινοξέα, εκ των οποίων μόνο τα 20 θεωρούνται απαραίτητα ως δομικά στοιχεία των πρωτεϊνών (Wu, 2009). Υπάρχουν κάποια αμινοξέα που δεν μπορούν να συντεθούν από τον ανθρώπινο οργανισμό. Ανάμεσα σε αυτά είναι η λυσίνη, η θρεονίνη, η τρυπτοφάνη και η μεθειονίνη. Τα αμινοξέα αυτά χαρακτηρίζονται ως απαραίτητα και πρέπει να λαμβάνονται μέσω της διατροφής και ιδιαίτερος από φυτά (Galili and Höfgen, 2002).

Μία άλλη πολύ σημαντική ιδιότητα των αμινοξέων είναι ότι συμμετέχουν στη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών χωρίς τη χρήση ριβοσωμάτων (Bayram et al., 2016). Οι δευτερογενείς μεταβολίτες συμμετέχουν σε συστήματα φυσικής άμυνας των φυτών ενάντια σε διάφορα παθογόνα που μπορεί να τα προσβάλλουν. Παλαιότερα ίσχυε η λανθασμένη άποψη ότι τα προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού είναι απορρίμματα που προέκυπταν από τον πρωτογενή μεταβολισμό. Κάτι τέτοιο όμως φαίνεται να μην επιβεβαιώνεται (Bennett and Wallsgrove, 1994). Όπως και στην περίπτωση των υδατανθράκων, ο μεταβολισμός των αμινοξέων περιλαμβάνει τις διαδικασίες του καταβολισμού και του αναβολισμού.

Το μεγαλύτερο ποσοστό των αμινοξέων χρησιμοποιείται για την πρωτεϊνοσύνθεση, τη σύνθεση των μη απαραίτητων αμινοξέων και τη σύνθεση μη πρωτεϊνικών αζωτούχων προϊόντων. Κάθε ένα από τα 20 αμινοξέα ακολουθεί διαφορετική πορεία αποικοδόμησης. Τα φυτά ανακυκλώνουν όλα τα προϊόντα του καταβολισμού των αμινοξέων. Σε αντίθεση με τον άνθρωπο που αποβάλλει το ιόν αμμωνίου (NH_4^+), το οποίο προήλθε από κάποιο αμινοξύ, μέσω του κύκλου της ουρίας (Xaplanteri, 2015b).

Οι πρωτεΐνες που δημιουργούνται από τα 20 απαραίτητα αμινοξέα περιλαμβάνουν και ένζυμα, τα οποία δρουν ως βιολογικοί καταλύτες για την επιτάχυνση των χημικών αντιδράσεων του μεταβολισμού (Weselake et al., 2018). Ελάχιστες είναι οι χημικές διεργασίες που συμβαίνουν στα κύτταρα, στις οποίες δεν εμπλέκονται τα ένζυμα (Xaplanteri, 2015a).

Εκτός από τα πρωτεϊνικά αμινοξέα που έχουν αναφερθεί, υπάρχουν και τα μη πρωτεϊνικά αμινοξέα, τα οποία περιέχονται μέσα στα φυτά αλλά δε συμμετέχουν στη σύνθεση πρωτεϊνών. Τα αμινοξέα αυτά υπάρχουν σε ελεύθερες μορφές και συμμετέχουν ως αμυντικές ενώσεις, ωστόσο πολλά έχουν παρόμοια δομή με τα πρωτεϊνικά αμινοξέα. Τα μη πρωτεϊνικά αμινοξέα φαίνεται να είναι τοξικά για διάφορα φυτοφάγα ζώα. Τα φυτά όμως που συνθέτουν μη πρωτεϊνικά αμινοξέα δεν εμφανίζουν ευαισθησία σε αυτά (Taiz and Zeiger, 2012).

Τα σημαντικότερα αμινοξέα που ανακαλύφθηκαν ως βιοσημαντές της επίδρασης αιθανολικού εκχυλίσματος Αλόης σε φυτάρια τομάτας ήταν το **GABA**, η **L-λευκίνη**, **L-ισολευκίνη**, **L-προλίνη** και η **L-ασπαραγίνη**, με το

καθένα από αυτά να έχει ξεχωριστό / ιδιαίτερο ρόλο στο μεταβολισμό των φυτών.

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά το **GABA** είναι ένα μη πρωτεϊνικό αμινοξύ, το οποίο παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στις διάφορες φυσιολογικές και βιοχημικές λειτουργίες του φυτού, όπως τη ρύθμιση του pH, την άμυνα και ανάπτυξη του φυτού, καθώς και το μεταβολισμό των υδατανθράκων (Bown and Shelp, 1997). Σε διάφορες έρευνες υπάρχουν αναφορές που συσχετίζουν την αυξημένη περιεκτικότητα των φυτικών κυττάρων σε **GABA** με την ύπαρξη κάποιου παράγοντα καταπόνησης ενάντια στο φυτό και άρα την προσπάθειά του να προσαρμοστεί σε αυτό. Ιδιαίτερα αυξημένη συσσώρευση σε **GABA** σε φυτικά κύτταρα έχει καταγραφεί σε περιπτώσεις ξηρασίας (Raggi, 1994), αλατότητας (Bolarín et al., 1995) και ανοξίας (Streeter and Thompson, 1972).

Στα πειράματα διαπιστώθηκε αύξηση της περιεκτικότητας των φυταρίων σε **GABA** μετά από έκθεση σε αιθανολικά εκχυλίσματα Αλόης σε σχέση με αυτά που έχουν δεχτεί τα αιθανολικά διαλύματα. Αυτό αποδεικνύει τη θετική επίδραση του εκχυλίσματος στο μεταβολισμό των φυτών και σε συνδυασμό με τα παραπάνω ευρήματα ενισχύει τον πιθανό ρόλο του στη φυτοπροστασία ως βιοδιεγέρτη.

Η **προλίνη** επίσης είναι ένα αμινοξύ με ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο για τα φυτά. Σύμφωνα με έρευνες αποδεικνύεται ότι η **προλίνη** δρα ως ένα αντιοξειδωτικό μόριο που επάγει την άμυνα του φυτού, αλλά και ως ένας σηματοδότης σε συνθήκες στρες (Hayat et al., 2012). Άλλες μελέτες έδειξαν πως συσσώρευση **προλίνης** στα φυτά συνεπάγεται αύξηση της αντοχής τους σε ξηρασία (Stewart and Lee, 1974). Στο πείραμά μας με την Αλόη, γίνεται φανερό πως τα επίπεδα **L-προλίνης** είναι αυξημένα όταν προστίθεται αιθανολικό εκχύλισμα Αλόης στα φυτά τομάτας σε σχέση με το σκέτο αιθανολικό διάλυμα, γεγονός που σημαίνει ότι η Αλόη βοηθάει τα φυτά να αναπτύξουν την άμυνά τους και ενδεχομένως να γίνουν πιο ανθεκτικά σε πιθανές συνθήκες ξηρασίας.

Επιπρόσθετα, η αυξημένη περιεκτικότητα στα αμινοξέα **L-λευκίνη**, **L-ισολευκίνη**, και **L-ασπαραγίνη** αποτελεί ένδειξη πλούσια δεξαμενής αμινοξέων στα φυτά, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί στις βιοσυνθέσεις τους ανάλογα με τις εκάστοτε ανάγκες. Και αυτή η παρατήρηση αποδεικνύει τη θετική επίδραση των εκχυλισμάτων Αλόης στο μεταβολισμό των φυτών.

4.3.3.4 Λιπαρά οξέα

Τα λιπαρά οξέα είναι παρόντα σε όλα τα είδη κυττάρων που απαντώνται στη φύση. Οι κατηγορίες των λιπαρών οξέων είναι τα κορεσμένα, ακόρεστα, με αλυσίδα υδροξυλίου και με διακλαδισμένη (Wakil and Barnes, 1971). Τα λιπαρά οξέα που υπάρχουν στη φύση έχουν μήκος αλυσίδας 16 ή 18 ατόμων άνθρακα και 1 έως 3 διπλούς δεσμούς. Ένα παράδειγμα συντομογραφίας τους είναι το εξής 18:2, όπου ο πρώτος αριθμός αντιπροσωπεύει τον αριθμό των ατόμων άνθρακα και ο δεύτερος τον αριθμό των διπλών δεσμών (Ohlrogge, 1994).

Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα θεωρούνται πολύ σημαντικά, καθώς παίζουν ιδιαίτερο ρόλο στη δομή και λειτουργία των κυτταρικών λιπιδίων (Wakil and Barnes, 1971). Τα σημαντικότερα λιπαρά οξέα που βρίσκονται σε φυτικούς οργανισμούς είναι τα κορεσμένα παλμιτικά οξέα (16:0), κορεσμένα στεατικά οξέα (18:0), μονοακόρεστα ελαϊκά οξέα (18:1) και τα πολυακόρεστα λινολεϊκό (18:2) και α-λινολενικό (18:3) οξέα (Singh et al., 2005).

Το τελευταίο, αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς μεταβολίτες στην άμυνα των φυτών, δρώντας ως πρόδρομη ένωση της βιοσυνθετικής οδού του γιασμονικού οξέος (Vick and Zimmerman, 1983). Το γιασμονικό οξύ αποτελεί ένα ιδιαίτερα σημαντικό συστατικό των φυτών, καθώς συμβάλλει στην προσαρμογή των φυτών σε διάφορες αβιοτικές καταπονήσεις, (Schaller and Ryan, 1996), καθώς και σε άλλες που προκαλούν βλάβες στις κυτταρικές μεμβράνες (Blechert et al., 1995). Η μη ανακάλυψή του ως βιοδείκτη υποδεικνύει και αυτή με τη σειρά της ότι η επέμβαση με εκχύλισμα Αλόης δεν αποτελεί παράγοντα καταπόνησης των φυτών.

Από όσο γνωρίζουμε η παρούσα εργασία αποτελεί την πρώτη μεταβολομική ανάλυση της επίδρασης εκχυλισμάτων Αλόης σε φυτά, και ως εκ τούτου δεν υπάρχουν δεδομένα για σύγκριση των αποτελεσμάτων μας.

5. Συμπεράσματα

Η φυτοπροστασία της ελιάς, η οποία αποτελεί την σημαντικότερη καλλιέργεια για τη χώρα μας, αντιμετωπίζει πληθώρα προβλημάτων και προκλήσεων, τα οποία αποτελούν τροχοπέδη για την περαιτέρω ανάπτυξη του κλάδου. Για το λόγο αυτό, ιδιαίτερα σημαντική θεωρείται η ανακάλυψη νέων, εναλλακτικών πηγών βιοδραστικότητας, οι οποίες θα συντελέσουν στη μείωση των απωλειών της παραγωγής, με σεβασμό στο περιβάλλον και την υγεία των καταναλωτών και με προφανή οφέλη για το εισόδημα των παραγωγών. Οι βιοδιεγέρτες, τα φυσικά προϊόντα, οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί και τα φαρμακευτικά φυτά παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον και δυναμική προς την κατεύθυνση αυτή. Στην παρούσα μελέτη, ερευνήθηκε η δυνατότητα αξιοποίησης του φαρμακευτικού φυτού *A. barbadensis*, ενός από τα πιο ενδιαφέροντα φαρμακευτικά φυτά, στη φυτοπροστασία ως βιοδιεγέρτη, για την ενίσχυση της άμυνας και ανάπτυξης άλλων φυτών, καθώς και η άμεση τοξικότητά του σε επιλεγμένους φυτοπαθογόνους μύκητες της ελιάς. Έχει σημασία να τονιστεί το γεγονός ότι ένα Φ.Π, εκτός από την άμεση τοξικότητά του στους οργανισμούς-στόχους, μπορεί να δρα έμμεσα, μέσω της ενίσχυσης της άμυνας του φυτών, ώστε αυτά να ανταπεξέλθουν της προσβολής από τα φυτοπαθογόνα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν φυτάρια τομάτας ως οργανισμός-μοντέλο, καθώς το χρονικό πλαίσιο του μεταπτυχιακού ήταν περιορισμένο για να γίνει εφαρμογή σε δέντρα ελιάς, κάτι το οποίο θα ήταν εξαιρετικά χρονοβόρο, στα οποία εφαρμόστηκαν κατάλληλα επεξεργασμένα εκχυλίσματα γέλης από φύλλα Αλόης. Ακολούθησε GC/EI/MS μεταβολομική ανάλυση των φυταρίων για τη μελέτη της επίδρασής τους στο μεταβολισμό του φυτού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα που εφαρμόστηκαν προκάλεσαν αλλαγές στο μεταβολισμό του φυτού και στη βιοσύνθεση μεταβολιτών, όπως της α - α -τρεχαλόζης, GABA και *L*-προλίνης, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στις αντιδράσεις των φυτών σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. Για την αξιολόγηση της μυκητοκτόνου δράσης της Αλόης, έγινε *in vitro* εφαρμογή εκχυλισμάτων Αλόης σε τριβλία με παθογόνους μύκητες, που προσβάλλουν την ελιά. Όσον αφορά τη μυκητοτοξικότητα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα, διαπιστώθηκε παρεμπόδιση στην ανάπτυξη των παθογόνων, με πιο μυκητοξικό το εκχύλισμα MeOH στο μύκητα *Colletotrichum sp.* και συγκεκριμένα το στέλεχος ΚΥΠ1-3, το οποίο εμφανίζει αντοχή σε εγκεκριμένα μυκητοκτόνα, σύμφωνα με πειράματα που έχουν διεξαχθεί από την ομάδα

μας. Τα αποτελέσματα είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά για την περαιτέρω έρευνα σχετική με την αξιοποίηση εκχυλισμάτων Αλόης στη φυτοπροστασία της ελιάς, αλλά και σε άλλες καλλιέργειες. Η Αλόη είναι ένα πολλά υποσχόμενο φυτό με πληθώρα πλεονεκτημάτων και δυνατοτήτων, όχι μόνο για την υγεία των ανθρώπων, αλλά και την ενίσχυση της άμυνας και ανάπτυξης των φυτών δρώντας ως βιοδιεγέρτης.

Βιβλιογραφία

-
- ALIFERIS, K. & JABAJI, S. 2010. ¹H NMR and GC-MS Metabolic Fingerprinting of Developmental Stages of *Rhizoctonia solani* Sclerotia. *Metabolomics*, 6, 96-108.
- ALIFERIS, K. A. & CHRYSAYI-TOKOUSBALIDES, M. 2011. Metabolomics in Pesticide Research and Development: Review and Future Perspectives. *Metabolomics*, 7, 35-53.
- ALIFERIS, K. A., COPLEY, T. & JABAJI, S. 2012. Gas Chromatography–Mass Spectrometry Metabolite Profiling of Worker Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Hemolymph for the Study of *Nosema ceranae* Infection. *Journal of Insect Physiology*, 58, 1349-1359.
- ALIFERIS, K. A., FAUBERT, D. & JABAJI, S. 2014. A Metabolic Profiling Strategy for the Dissection of Plant Defense Against Fungal Pathogens. *PLoS One*, 9, e111930.
- ALIFERIS, K. A. & JABAJI, S. 2011. Metabolomics—a Robust Bioanalytical Approach for the Discovery of the Modes-of-Action of Pesticides: a Review. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100, 105-117.
- ALIFERIS, K. A. & JABAJI, S. 2012a. Deciphering Plant–Pathogen Interactions Applying Metabolomics: Principles and Applications. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 34, 29-33.
- ALIFERIS, K. A. & JABAJI, S. 2012b. FT-ICR/MS and GC-ESI/MS Metabolomics Networking Unravels Global Potato Sprout's Responses to *Rhizoctonia solani* Infection. *PLoS One*, 7, e42576.
- ANTONIOU, P. P., MARKAKIS, E. A., TJAMOS, S. E., PAPLOMATAS, E. J. & TJAMOS, E. C. 2008. Novel Methodologies in Screening and Selecting Olive Varieties and Root-Stocks for Resistance to *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology*, 122, 549-560.
- ARUNKUMAR, S. & MUTHUSELVAM, M. 2009. Analysis of Phytochemical Constituents and Antimicrobial Activities of *Aloe vera* L. Against Clinical Pathogens. *World Journal of Agricultural Sciences*, 5, 572-576.
- ATHERTON, P. 1998. *Aloe vera*: Magic or Medicine? *Nursing Standard (through 2013)*, 12, 49.
- BAPTISTA, P., BULAI, I. M., GOMES, T. & VENTURINO, E. 2019. Modeling the Interactions Among Phytopathogens and Phyllosphere Microorganisms for the Biological Disease Control of *Olea europaea* L. *Mathematical Biosciences*, 308, 42-58.
- BAYRAM, Ö., FEUSSNER, K., DUMKOW, M., HERRFURTH, C., FEUSSNER, I. & BRAUS, G. H. 2016. Changes of Global Gene Expression and Secondary Metabolite Accumulation During Light-Dependent *Aspergillus nidulans* Development. *Fungal Genetics and Biology*, 87, 30-53.
- BENNETT, R. N. & WALLSGROVE, R. M. 1994. Secondary Metabolites in Plant Defence Mechanisms. *New Phytologist*, 127, 617-633.
- BLECHERT, S., BRODSCHELM, W., HÖLDER, S., KAMMERER, L., KUTCHAN, T. M., MUELLER, M. J., XIA, Z.-Q. & ZENK, M. H. 1995. The Octadecanoic Pathway: Signal Molecules for the Regulation of Secondary Pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 4099-4105.
- BOLARÍN, M. C., SANTA-CRUZ, A., CAYUELA, E. & PEREZ-ALFOCEA, F. 1995. Short-term Solute Changes in Leaves and Roots of Cultivated and Wild Tomato Seedlings Under Salinity. *Journal of Plant Physiology*, 147, 463-468.
- BOWN, A. W. & SHELP, B. J. 1997. The Metabolism and Functions of [Gamma]-Aminobutyric Acid. *Plant Physiology*, 115, 1.
- BRENT, K. J. & HOLLOMON, D. W. 1995. Fungicide Resistance in Crop Pathogens: How Can it Be Managed?, *GIFAP Brussels*.
- BROWN, P. & SAA, S. 2015. Biostimulants in Agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 6, 671.

-
- BUNDY, J. G., DAVEY, M. P. & VIANT, M. R. 2008. Environmental Metabolomics: a Critical Review and Future Perspectives. *Metabolomics*, 5, 3.
- CACCIOLA, S., FAEDDA, R., SINATRA, F., AGOSTEO, G., SCHENA, L., FRISULLO, S. & DI SAN LIO, G. M. 2012. Olive Anthracnose. *Journal of Plant Pathology*, 94, 29-44.
- CALVO, P., NELSON, L. & KLOEPPER, J. W. 2014. Agricultural Uses of Plant Biostimulants. *Plant and Soil*, 383, 3-41.
- CHANG, X. L., CHEN, B. Y. & FENG, Y. M. 2011. Water-soluble Polysaccharides Isolated from Skin Juice, Gel Juice and Flower of *Aloe vera* Miller. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42, 197-203.
- COLELLA, C., MIACOLA, C., AMENDUNI, M., D'AMICO, M., BUBICI, G. & CIRULLI, M. 2008. Sources of *Verticillium* Wilt Resistance in Wild Olive Germplasm from the Mediterranean Region. *Plant Pathology*, 57, 533-539.
- COPPING, L. G. & DUKE, S. O. 2007. Natural Products that Have Been Used Commercially as Crop Protection Agents. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 63, 524-554.
- COPPING, L. G. & HEWITT, H. G. 2007. Chemistry and Mode of Action of Crop Protection Agents, *Royal Society of Chemistry*.
- CROSSWHITE, F. S. & CROSSWHITE, C. D. 1984. *Aloe vera*, Plant Symbolism and the Threshing Floor. *Desert Plants*.
- CROWE, J. H. 1993. Preservation of Liposomes by Freeze-drying. *Liposome Technology: Liposome Preparation and Related Techniques*, 1, 229-282.
- DASA, I., PANDAA, M. K., RATHB, C. C. & TAYUNGK, K. 2017. Bioactivities of Bacterial Endophytes Isolated from Leaf Tissues of *Hyptis suaveolens* Against Some Clinically Significant Pathogens. *Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol*, 7, 131-136.
- DAYAN, F. E., CANTRELL, C. L. & DUKE, S. O. 2009. Natural Products in Crop Protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 4022-4034.
- DEEPTHI, K. & KUMAR, R. P. 2018. *Aloe vera*-Nature's Healer. *Journal of Pharmacy Research| Vol*, 12, 1.
- DITTA, A. 2012. How Helpful is Nanotechnology in Agriculture? *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 3, 033002.
- DU JARDIN, P. 2015. Plant Biostimulants: Definition, Concept, Main Categories and Regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3-14.
- EL-HAWARY, S. S., SAYED, A. M., RATEB, M. E., BAKEER, W., ABOUZID, S. F. & MOHAMMED, R. 2017. Secondary Metabolites from Fungal Endophytes of *Solanum nigrum*. *Natural Product Research*, 31, 2568-2571.
- ELBEIN, A. D., PAN, Y., PASTUSZAK, I. & CARROLL, D. 2003. New Insights on Trehalose: a Multifunctional Molecule. *Glycobiology*, 13, 17R-27R.
- ESHUN, K. & HE, Q. 2004. *Aloe vera*: a Valuable Ingredient for the Food, Pharmaceutical and Cosmetic Industries—a Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 91-96.
- FERNANDEZ, O., BÉTHENCOURT, L., QUERO, A., SANGWAN, R. S. & CLÉMENT, C. 2010. Trehalose and Plant Stress Responses: Friend or Foe? *Trends in Plant Science*, 15, 409-417.
- GALILI, G. & HÖFGEN, R. 2002. Metabolic Engineering of Amino Acids and Storage Proteins in Plants. *Metabolic Engineering*, 4, 3-11.
- GEVAO, B., SEMPLE, K. T. & JONES, K. C. 2000. Bound Pesticide Residues in Soils: a Review. *Environmental Pollution*, 108, 3-14.
- GRIFFITHS, W. J. 2007. Metabolomics, Metabonomics and Metabolite Profiling, *Royal Society of Chemistry*.
- GRINDLAY, D. & REYNOLDS, T. 1986. The *Aloe vera* Phenomenon: a Review of the Properties and Modern Uses of the Leaf Parenchyma Gel. *Journal of Ethnopharmacology*, 16, 117-151.

-
- GUIGNARD, C., JOUVE, L., BOGÉAT-TRIBOULOT, M. B., DREYER, E., HAUSMAN, J.-F. & HOFFMANN, L. 2005. Analysis of Carbohydrates in Plants by High-performance Anion-exchange Chromatography Coupled With Electrospray Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1085, 137-142.
- HABTEMARIAM, S. 2017. Could we Really Use *Aloe vera* Food Supplements to Treat Diabetes? Quality Control Issues. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017.
- HAMMAN, J. H. 2008. Composition and Applications of *Aloe vera* Leaf Gel. *Molecules*, 13, 1599-1616.
- HAYAT, S., HAYAT, Q., ALYEMENI, M. N., WANI, A. S., PICHTEL, J. & AHMAD, A. 2012. Role of Proline Under Changing Environments: a Review. *Plant Signaling & Behavior*, 7, 1456-1466.
- JÄGER, J. E. 2019. Residues of Pesticides. *Chemical Hazards in Foods of Animal Origin*. Wageningen Academic Publishers.
- JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M., CIRULLI, M., BUBICI, G., DEL MAR JIMÉNEZ-GASCO, M., ANTONIOU, P. P. & TJAMOS, E. C. 2012. *Verticillium* Wilt, a Major Threat to Olive Production: Current Status and Future Prospects for its Management. *Plant Disease*, 96, 304-329.
- KHAN, Y., PANCHAL, S., VYAS, N., BUTANI, A. & KUMAR, V. 2007. *Olea europaea*: a Phyto-pharmacological Review. *Pharmacognosy Reviews*, 1, 114-118.
- KOGA, A. Y., PEREIRA, A. V., LIPINSKI, L. C. & OLIVEIRA, M. R. 2018. Evaluation of Wound Healing Effect of Alginate Films Containing *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) Gel. *Journal of Biomaterials Applications*, 32, 1212-1221.
- KOOLMAN, J., RÖHM, K.-H., WIRTH, J. & ROBERTSON, M. 2005. Color Atlas of Biochemistry, *Thieme Stuttgart*.
- LAWRENCE, R., TRIPATHI, P. & JEYAKUMAR, E. 2009. Isolation, Purification and Evaluation of Antibacterial Agents from *Aloe vera*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 906-915.
- LINDON, J. C., NICHOLSON, J. K. & HOLMES, E. 2011. *The handbook of Metabonomics and Metabolomics*, Elsevier.
- MARTÍ, J. M., ARIAS, L. F., DIAZ-VILLANUEVA, W., ARNAU, V., RODRIGUEZ-FRANCO, A. & GARAY, C. P. 2019. Metagenomic Dynamics in *Olea europaea* After Root Damage and *Verticillium dahliae* Infection. *bioRxiv*, 555185.
- MARTÍN, M. & GARCÍA-FIGUERES, F. 1999. *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* Cause Anthracnose on Olives. *European Journal of Plant Pathology*, 105, 733-741.
- MORAL, J., DE OLIVEIRA, R. & TRAPERO, A. 2009. Elucidation of the Disease Cycle of Olive Anthracnose Caused by *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology*, 99, 548-556.
- MOUSAVI, S. R. & REZAEI, M. 2011. Nanotechnology in Agriculture and Food Production. *J Appl Environ Biol Sci*, 1, 414-419.
- O'HARA, L. E., PAUL, M. J. & WINGLER, A. 2013. How Do Sugars Regulate Plant Growth and Development? New Insight Into the Role of Trehalose-6-phosphate. *Molecular Plant*, 6, 261-274.
- OHLROGGE, J. B. 1994. Design of New Plant Products: Engineering of Fatty Acid Metabolism. *Plant Physiology*, 104, 821.
- PANDEY, R. & MISHRA, A. 2010. Antibacterial Activities of Crude Extract of *Aloe barbadensis* to Clinically Isolated Bacterial Pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160, 1356-1361.
- PARK, Y. I. & LEE, S. K. 2006. *New Perspectives on Aloe*, Springer.
- PERES, N., TIMMER, L., ADASKAVEG, J. & CORRELL, J. 2005. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease*, 89, 784-796.
-

-
- PETROVSKA, B. B. 2012. Historical Review of Medicinal Plants' Usage. *Pharmacognosy Reviews*, 6, 1.
- POVERO, G., MEJIA, J. F., DI TOMMASO, D., PIAGGESI, A. & WARRIOR, P. 2016. A Systematic Approach to Discover and Characterize Natural Plant Biostimulants. *Frontiers in Plant Science*, 7.
- RAGGI, V. 1994. Changes in Free Amino Acids and Osmotic Adjustment in Leaves of Water-stressed Bean. *Physiologia Plantarum*, 91, 427-434.
- RAI, M. & INGLE, A. 2012. Role of Nanotechnology in Agriculture with Special Reference to Management of Insect Pests. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94, 287-293.
- RAI, V. 2002. Role of Amino Acids in Plant Responses to Stresses. *Biologia Plantarum*, 45, 481-487.
- RAMACHANDRA, C. & RAO, P. S. 2008. Processing of *Aloe vera* Leaf Gel: a Review. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 3, 502-510.
- REYNOLDS, T. & DWECK, A. 1999. *Aloe vera* Leaf Gel: a Review Update. *Journal of Ethnopharmacology*, 68, 3-37.
- RIVAS, M., BECERRA, A. & LAZCANO, A. 2018. On the Early Evolution of Catabolic Pathways: a Comparative Genomics Approach. I. The Cases of Glucose, Ribose and the Nucleobases Batabolic Routes. *Journal of Molecular Evolution*, 86, 27-46.
- RONTEIN, D., DIEUAIDE-NOUBHANI, M., DUFOURC, E. J., RAYMOND, P. & ROLIN, D. 2002. The Metabolic Architecture of Plant Cells: Stability of Central Metabolism and Flexibility of Anabolic Pathways During the Growth Cycle of Tomato Cells. *Journal of Biological Chemistry*.
- RUGINI, E. & FEDELI, E. 1990. Olive (*Olea europaea* L.) As an Oilseed Crop. *Legumes and Oilseed Crops I*. Springer.
- RUSSELL, P. 2004. Sensitivity Baselines in Fungicide Resistance Research and Management. *FRAC Monograph No. 3*. Brussels, Belgium.
- RUSSO, R. O. & BERLYN, G. P. 1991. The Use of Organic Biostimulants to Help Low Input Sustainable Agriculture. *Journal of Sustainable Agriculture*, 1, 19-42.
- SAKS, Y. & BARKAI-GOLAN, R. 1995. *Aloe vera* Gel Activity Against Plant Pathogenic Fungi. *Postharvest Biology and Technology*, 6, 159-165.
- SCHALLER, A. & RYAN, C. A. 1996. Systemin—a Polypeptide Defense Signal in Plants. *BioEssays*, 18, 27-33.
- SCHULZ, B. J., BOYLE, C. J. & SIEBER, T. N. 2007. Microbial Root Endophytes, *Springer Science & Business Media*.
- SHELTON, R. M. 1991. *Aloe vera*: its Chemical and Therapeutic Properties. *International Journal of Dermatology*, 30, 679-683.
- SINGH, M., KUMAR, A., SINGH, R. & PANDEY, K. D. 2017. Endophytic Bacteria: a New Source of Bioactive Compounds. *3 Biotech*, 7, 315.
- SINGH, S. P., ZHOU, X.-R., LIU, Q., STYMNE, S. & GREEN, A. G. 2005. Metabolic Engineering of New Fatty Acids in Plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 8, 197-203.
- SPRATLIN, J. L., SERKOVA, N. J. & ECKHARDT, S. G. 2009. Clinical Applications of Metabolomics in Oncology: a Review. *Clinical Cancer Research*, 15, 431-440.
- STEWART, G. & LEE, J. 1974. The Role of Proline Accumulation in Halophytes. *Planta*, 120, 279-289.
- STREETER, J. G. & THOMPSON, J. F. 1972. *In Vivo* and *In Vitro* Studies on γ -Aminobutyric Acid Metabolism With the Radish Plant (*Raphanus sativus*, L.). *Plant Physiology*, 49, 579-584.
- SUTTON, B. 1992. The Genus *Glomerella* and its Anamorph *Colletotrichum*. *The Genus Glomerella and its Anamorph Colletotrichum.*, 1-26.

-
- SWAMI HULLE, N. R., CHAKRABORTY, S. & RAO, P. S. 2017. Effect of High Pressure Thermal Processing on the Quality Attributes of *Aloe vera*-litchi Mixed Beverage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 40, 68-77.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2012. Φυσιολογία Φυτών, *Utopia*.
- TERRAL, J. F., ALONSO, N., CAPDEVILA, R. B. I., CHATTI, N., FABRE, L., FIORENTINO, G., MARINVAL, P., JORDÁ, G. P., PRADAT, B. & ROVIRA, N. 2004. Historical Biogeography of Olive Domestication (*Olea europaea* L.) as Revealed by Geometrical Morphometry Applied to Biological and Archaeological Material. *Journal of Biogeography*, 31, 63-77.
- THERIOS, I. 2009. Olives.
- TJAMOS, E. 1993. Prospects and Strategies in Controlling *Verticillium* Wilt of Olive 1. *EPPO Bulletin*, 23, 505-512.
- TSUGAWA, H., CAJKA, T., KIND, T., MA, Y., HIGGINS, B., IKEDA, K., KANAZAWA, M., VANDERGHEYNST, J., FIEHN, O. & ARITA, M. 2015. MS-DIAL: Data-Independent MS/MS Deconvolution for Comprehensive Metabolome Analysis. *Nature Methods*, 12, 523.
- VERA, J., CASTRO, J., GONZALEZ, A. & MOENNE, A. 2011. Seaweed Polysaccharides and Derived Oligosaccharides Stimulate Defense Responses and Protection Against Pathogens in Plants. *Marine Drugs*, 9, 2514-2525.
- VICK, B. A. & ZIMMERMAN, D. C. 1983. The Biosynthesis of Jasmonic Acid: a Physiological Role for Plant Lipoxygenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 111, 470-477.
- VOGLER, B. & ERNST, E. 1999. *Aloe vera*: a Systematic Review of its Clinical Effectiveness. *Br J Gen Pract*, 49, 823-828.
- VON ARX & ADOLF, J. 1970. A Revision of the Fungi Classified as *Gloeosporium*. *A Revision of the Fungi Classified as Gloeosporium*.
- VURRO, M., MIGUEL-ROJAS, C. & PÉREZ-DE-LUQUE, A. 2019. Safe Nanotechnologies for Increasing Effectiveness of Environmentally Friendly Natural Agrochemicals. *Pest Management Science*.
- WAKIL, S. J. & BARNES, E. M. 1971. Chapter II - Fatty Acid Metabolism. In: FLORKIN, M. & STOTZ, E. H. (eds.) *Comprehensive Biochemistry*. Elsevier.
- WESELAKE, R. J., SINGER, S. D. & CHEN, G. 2018. Introduction to Plant Biomolecules and Cellular Metabolism. *Plant Bioproducts*. Springer.
- WIKLUND, S., JOHANSSON, E., SJÖSTRÖM, L., MELLEROWICZ, E. J., EDLUND, U., SHOCKCOR, J. P., GOTTFRIES, J., MORITZ, T. & TRYGG, J. 2008. Visualization of GC/TOF-MS-Based Metabolomics Data for Identification of Biochemically Interesting Compounds Using OPLS Class Models. *Analytical Chemistry*, 80, 115-122.
- WU, G. 2009. Amino Acids: Metabolism, Functions, and Nutrition. *Amino acids*, 37, 1-17.
- XAPLANTERI, M. 2015a. Ένζυμα.
- XAPLANTERI, M. 2015b. Μεταβολισμός-Παραγωγή ενέργειας.
- ZOU, P., LU, X., ZHAO, H., YUAN, Y., MENG, L., ZHANG, C. & LI, Y. 2019. Polysaccharides Derived from the Brown Algae *Lessonia Nigrescens* Enhance Salt Stress Tolerance to Wheat Seedlings by Enhancing the Antioxidant System, and Modulating Intracellular Ion Concentration. *Frontiers in Plant Science*, 10, 48.
- ΑΣΗΜΑΚΟΠΟΥΛΟΣ, Ι. Η. 2014. Λιπάσματα Λιπάνσεις.
- ΔΙΑΜΑΝΤΙΔΗΣ, Γ. 2010. Εισαγωγή στη βιοχημεία.
- ΔΟΡΔΑΣ, Χ. 2012. Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά, *Σύγχρονη παιδεία*.
- ΖΙΩΓΑΣ, Ν. & ΜΑΡΚΟΓΛΟΥ, Ν. 2010. Γεωργική Φαρμακολογία - Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί Δράσης και Χρήσεις των Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων.
-

-
- ΚΟΛΑΪΝΗΣ, Σ., ΚΩΛΕΤΤΗ, Α., ΛΥΚΟΓΙΑΝΝΗ, Μ., ΠΑΡΑΣΚΕΥΟΠΟΥΛΟΣ, Σ. & ΑΛΙΦΕΡΗΣ, Κ. Α. 2018. Γλοιοσπόριο της Ελιάς: Απομόνωση, Ταυτοποίηση και Αξιολόγηση Αποτελεσματικότητας Επιλεγμένων Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων. 19ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο.
- ΚΩΛΕΤΤΗ, Α., ΚΟΛΑΪΝΗΣ, Σ., ΛΥΚΟΓΙΑΝΝΗ, Μ., ΠΑΡΑΣΚΕΥΟΠΟΥΛΟΣ, Σ. & ΑΛΙΦΕΡΗΣ, Κ. Α. 2018. Μορφότυποι Γλοιοσπορίου Ελιάς (*Colletotrichum acutatum*): Παθογένεια και Ανθεκτικότητα σε Μυκητοκτόνα. 19ο Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο.
- ΜΠΑΜΠΙΛΗΣ, Δ. Β. 2011. ΑΛΟΗ (*Aloe vera* , Οικογένεια: *Aloaceae*). Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων - Γενική Διεύθυνση Φυτικής Παραγωγής - Διεύθυνση Παραγωγής, Αξιοποίησης Προϊόντων Φυτών Μεγάλης Καλλιέργειας - Αρωματικά, Φαρμακευτικά Φυτά - Αλόη, 2, 1-20.
- ΠΑΝΑΓΟΠΟΥΛΟΣ, Χ. Γ. 1997. Ασθένειες Καρποφόρων Δένδρων και Αμπέλου. Εκδόσεις: Α. Σταμούλης. Αθήνα. σελ, 429.
- ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ-ΜΟΥΡΚΙΔΟΥ, Ε. 2008. Γεωργικά Φάρμακα-Χημεία, Φαρμακολογία (Φαρμακοκινητική/Μεταβολισμός/Τρόπος δράσης), Τοξικολογία, Οικοτοξικολογία και Συμπεριφορά και Τύχη στο Περιβάλλον.
- ΠΑΠΛΩΜΑΤΑΣ, Ε. & ΤΖΑΜΟΣ, Ε. 2015. Φυτοπαθολογικά προβλήματα της ελιάς και αντίδραση γηγενών ποικιλιών σε ασθένειες.
- ΥΠΠΑΤ. 2019. Κατάλογος Δραστικών Ουσιών κατά Κατηγορία Παθογόνου και Καλλιέργειας [Online].

ΑΘΗΝΑ 2019