



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ & ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**ΦΥΤΙΑΤΡΙΚΗ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**Ταξινόμηση και διαχείριση παθογόνων φυλλώματος Σταυρανθών**

**Επιβλέπων Καθηγητής: Βαγγέλας Ιωάννης**

**Μεταπτυχιακός φοιτητής: Σταρόγιαννης Γεώργιος**

**ΒΟΛΟΣ, 2021**

## Ταξινόμηση και διαχείριση παθογόνων φυλλώματος Σταυρανθών

Μεταπτυχιακός φοιτητής: Σταρόγιαννης Γεώργιος

### **Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή**

**Βαγγέλας Ιωάννης**, Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας,

Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας (Επιβλέπων)

**Αθανασίου Χρήστος**, Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας,

Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας (Μέλος)

**Βέλλιος Ευάγγελος**, Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας,

Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας (Μέλος)

Copyright © ΓΕΩΡΓΙΟΣ Η. ΣΤΑΡΟΓΙΑΝΝΗΣ, 2021.

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας διατριβής, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης.

Η έγκριση της Μεταπτυχιακής Διατριβής Ειδίκευσης από το Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δε δηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή Δρ. Βαγγέλα Ιωάννη για την καθοδήγηση κατά την διάρκεια της εκπόνησης της μεταπτυχιακής διατριβής μου. Επίσης, τις ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω τόσο στον Καθηγητή Δρ. Αθανασίου Χρήστο, όσο και στον Επίκουρο Καθηγητή Δρ. Βέλλιο Ευάγγελο για τη συνεργασία, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές τους σχετικά με τη συγγραφή της διπλωματικής διατριβής. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης όλους τους καθηγητές του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Φυτιατρική και Περιβάλλον» για τη συνεργασία και τις πολύτιμες γνώσεις που μας προσέφεραν ακούραστα καθ' όλη τη διάρκεια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών.

Νοιώθω την ανάγκη να πω ένα τεράστιο «ευχαριστώ» στους αγαπημένους μου γονείς, Ηλία και Δήμητρα-Μαρία, για την αγάπη και τη φροντίδα που με περιέβαλαν όλη τη ζωή μου και για την υποστήριξή τους σε οποιαδήποτε προσπάθειά μου.

## Περίληψη

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή, με τίτλο «Ταξινόμηση και διαχείριση παθογόνων φυλλώματος Σταυρανθών», έχει ως αντικείμενο την εξοικείωση με τον τρόπο ταξινόμησης των παθογόνων μυκήτων φυλλώματος των Σταυρανθών με τη μέθοδο της μικροσκοπίας, τη μελέτη της διεθνούς βιβλιογραφίας καθώς και των μεθόδων διαχείρισης τους, ενώ γίνεται ειδικότερα αναφορά στα παθογόνα *Alternaria brassicae*, *Plenodomus lingam* και *Sclerotinia sclerotiorum* που απομονώθηκαν από καλλιέργεια λάχανου.

Οι βιοδοκιμές πραγματοποιήθηκαν in-vitro στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και υπό συνθήκες υπαίθρου σε πειραματικό αγροτεμάχιο που σχεδιάστηκε, σε έκταση του Ε.Α.Κ.Κ.Ν Κασσαβετίας. Στο εργαστήριο, εξετάστηκαν οι μυκητοκτόνες ιδιότητες αιθέριων ελαίων (αιθέριου ελαίου ρίγανης, μείγματος αιθέριων ελαίων και μείγματος αιθέριων ελαίων με προσθήκη χαλκού) ενάντια στο παθογόνο *Alternaria brassicae*. Κατά την πειραματική διαδικασία στον αγρού, εξετάστηκαν οι μυκητοκτόνες ιδιότητες ενάντια σε φυσικά εναέρια μολύσματα στην καλλιέργεια λάχανου, δύο χημικών σκευασμάτων (Reflect 125 EC και Embrelia SC) και δύο νανο-γαλακτωμάτων αιθέριων ελαίων (μείγμα αιθέριων ελαίων και αιθέριου ελαίου ρίγανης).

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή αποτελείται από τέσσερα κεφάλαια. Στο πρώτο κεφάλαιο γίνεται αναφορά στον έλεγχο των ασθενειών, στα αιθέρια έλαια, στη νανοτεχνολογία, στις σύγχρονες μεθόδους ανίχνευσης και αναγνώρισης αερομεταφερόμενων παθογόνων και γίνεται μία παρουσίαση των Σταυρανθών, με ειδική αναφορά στην καλλιέργεια του λάχανου, καλλιέργεια η οποία αποτέλεσε βάση της συγκεκριμένης διατριβής. Στο δεύτερο κεφάλαιο, περιγράφονται οι κυριότερες ασθένειες φυλλώματος των σταυρανθών με αναφορά στην ταξινόμισή τους, τη συμπτωματολογία και την διαχείριση τους. Στο τρίτο κεφάλαιο γίνεται αναφορά στα χημικά μυκητοκτόνα και στα αιθέρια έλαια που εφαρμόστηκαν στην πειραματική διαδικασία, καθώς και στις μυκητοκτόνες ιδιότητές τους. Στο τέταρτο κεφάλαιο περιγράφεται η τεχνική απομόνωσης και τεχνητής μόλυνσης του παθογόνου *Plenodomus lingam* σε φύλλα νεαρών φυτών λάχανου, για την εξακρίβωση της παθογένειας σε διαφορετικές δόσεις αιθέριου ελαίου ρίγανης. Στο πέμπτο κεφάλαιο περιγράφονται οι βιοδοκιμές της πειραματικής διαδικασίας και το πείραμα υπαίθρου, με αναφορά στα υλικά και τις μεθόδους που ακολουθήθηκαν κατά τη διάρκεια της, τις μεταχειρίσεις που πραγματοποιήθηκαν και τις μετρήσεις που λήφθηκαν. Στη συνέχεια παρατίθενται τα αποτελέσματα των μετρήσεων των πειραματικών διαδικασιών, ερμηνεύονται

τα αποτελέσματα και παρουσιάζονται τα κυριότερα συμπεράσματα που προκύπτουν από αυτές.

## Summary

The present postgraduate dissertation, entitled "Identification and management of foliar pathogens of Brassicaceae", aims to familiarize the researcher or the reader, with concern to the classification and management of Brassicaceae airborne fungal pathogens, by using optical microscopy and the findings in international literature with special reference to the pathogens *Alternaria brassicae*, *Plenodomus lingam* and *Sclerotinia sclerotiorum*, isolated from cabbage cultivation.

Bioassays were performed in-vitro in the Laboratory of Phytopathology of the University of Thessaly and an experimental plot was also carried out, in a field of EAKKN Kassavetia. In the laboratory, the fungicidal properties of essential oils were tested using nano-emulsions (oregano essential oil, essential oil mixture and essential oil mixture with the addition of copper) against the pathogen *Alternaria brassicae*. In the field experiment, two chemicals (Reflect 125 EC and Embrelia SC) and two nano-emulsions of essential oils (mixture of essential oils and oregano essential oil) were used to test their fungicidal effectiveness against cabbage airborne fungal pathogens.

This postgraduate dissertation consists of four chapters. The first chapter refers to pathogenic fungi and their control, essential oils, nanotechnology and modern methods of detection and identification of airborne pathogens and a presentation of the Brassicaceae family, with special reference to the cultivation of cabbage. In the second chapter, the airborne fungal pathogens of Brassicaceae are described with reference to their classification, symptomatology and management. The third chapter refers to the chemical fungicides and essential oils used in the experimental process, as well as their fungicidal properties. The fourth chapter describes the technique of isolation and artificial inoculation of the pathogen *Plenodomus lingam*, on leaves of young cabbage plants, aiming to verify the pathogenicity in different doses of oregano essential oil. The fifth chapter includes the laboratory bioassays of the experimental processes and the field experiment, with references to the methods and treatments used and performed and the data collected. Subsequently, the results from the experimental procedures are presented and interpreted leading to the main conclusions that emerge from them.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Περίληψη .....	IV
Summary .....	VI
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	3
1.1 Ο έλεγχος των ασθενειών.....	3
1.2 Τα Αιθέρια έλαια.....	4
1.3 Η Νανοτεχνολογία στην υπηρεσία των μυκητοκτόνων .....	7
1.4 Σύγχρονοι μέθοδοι ανίχνευσης και αναγνώρισης αερομεταφερόμενων παθογόνων .....	10
1.5 Τα Σταυρανθή (Brassicaceae - Crusiferae) .....	12
1.6 Το Λάχανο ( <i>Brassica oleracea</i> ) .....	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ, ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΤΩΝ ΣΤΑΥΡΑΝΘΩΝ .....	16
2.1 <i>Plenodomus lingam</i> .....	16
2.1.1 Ταξινόμηση – Περιγραφή .....	16
2.1.2 Συμπτωματολογία .....	21
2.1.3 Αντιμετώπιση .....	22
2.2 <i>Alternaria</i> spp. ( <i>Alternaria brassicae</i> - <i>Alternaria brassicola</i> ).....	23
2.2.1 Ταξινόμηση – <i>A. brassicae</i> .....	24
2.2.2 Ταξινόμηση – <i>A. brassicola</i> .....	24
2.2.3 Περιγραφή.....	25
2.2.4 Συμπτωματολογία .....	28
2.2.5 Αντιμετώπιση .....	30
2.3 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	31
2.3.1 Ταξινόμηση - Περιγραφή.....	31
2.3.2 Συμπτωματολογία .....	33
2.3.3 Αντιμετώπιση .....	36
2.4 <i>Botrytis cinerea</i> .....	38
2.4.1 Ταξινόμηση .....	38
2.4.2 Συμπτωματολογία .....	38
2.4.3 Αντιμετώπιση .....	39
2.5 <i>Pyrenopeziza brassicae</i> .....	39



2.5.1	Ταξινόμηση .....	39
2.5.2	Συμπτωματολογία .....	40
2.5.3	Αντιμετώπιση .....	41
2.6	<i>Hyaloperonospora brassicae</i> .....	41
2.6.1	Ταξινόμηση .....	41
2.6.2	Συμπτωματολογία .....	42
2.6.3	Αντιμετώπιση .....	43
2.6.3.1	Βιολογική καταπολέμηση .....	44
2.7	<i>Albugo candida</i> .....	44
2.7.1	Ταξινόμηση .....	44
2.7.2	Συμπτωματολογία .....	45
2.7.3	Αντιμετώπιση .....	46
2.8	<i>Erysiphe cruciferarum</i> .....	47
2.8.1	Ταξινόμηση .....	47
2.8.2	Συμπτωματολογία .....	47
2.8.3	Αντιμετώπιση .....	48
2.9	<i>Mycosphaerella brassicicola</i> .....	48
2.9.1	Ταξινόμηση .....	48
2.9.2	Συμπτωματολογία .....	49
2.9.3	Αντιμετώπιση .....	49
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΧΗΜΙΚΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ ΚΑΙ ΕΛΑΙΑ .....		51
3.1	Χημικά μυκητοκτόνα .....	51
3.1.1	Reflect 125 EC (Isopyrazam).....	52
3.1.2	Embrelia SC ( isopyrazam + difenoconazole).....	52
3.2	Αιθέρια έλαια .....	53
3.2.1	Οικογένεια Meliaceae .....	56
3.2.1.1	Το Νήμ – Neem ( <i>Azadirachta indica</i> ) .....	56
3.2.2	Οικογένεια Lamiaceae .....	57
3.2.2.1	Το Θυμάρι ( <i>Thymus vulgaris</i> ).....	58
3.2.2.2	Η ρίγανη ( <i>Origanum vulgare</i> ) .....	59
3.2.2.3	Η λεβάντα ( <i>Levandula angustifolia</i> ).....	61
3.2.3	Οικογένεια Poaceae.....	62
3.2.3.1	Το λεμονόχορτο ( <i>Cymbopogon citratus</i> ).....	63

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.	IN-PLANTA ΒΙΟΔΟΚΙΜΕΣ ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΗ ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ ΣΕ β-cyclodextrin.....	66
4.1	Τεχνηκή απομόνωσης και τεχνητής μόλυνσης .....	66
4.2.	Αποτελέσματα – Παρατηρήσεις.....	70
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.	IN-VITRO ΒΙΟΔΟΚΙΜΕΣ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑ ΑΓΡΟΥ ΜΕ ΠΡΟΙΟΝΤΑ NANO-ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ .....	71
5.1	Επίδραση δόσεων μείγματος αιθέριων ελαίων στη μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα <i>Alternaria brassicae</i> .....	72
5.1.1	Υλικά και μέθοδοι.....	72
5.1.2	Στατιστική Ανάλυση .....	73
5.1.3	Αποτελέσματα Βιοδοκιμής .....	73
5.1.4	Συμπεράσματα .....	75
5.2	Επίδραση δράσης δόσεων του νάνο-γαλακτώματος αιθέριων ελαίων (Α) και του νάνο-γαλακτώματος αιθέριων ελαίων με προσθήκη χαλκού (Β), ενάντια στη μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα <i>Alternaria brassicae</i> .....	75
5.2.1	Υλικά και μέθοδοι.....	76
5.2.2	Στατιστική Ανάλυση .....	76
5.2.3	Αποτελέσματα βιοδοκιμών .....	76
5.2.4	Συμπεράσματα .....	78
5.3	Επίδραση δόσεων νάνο-γαλακτώματος αιθέριου ελαίου ρίγανης στη μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα <i>Alternaria brassicae</i> .....	79
5.3.1	Υλικά και μέθοδοι.....	79
5.3.2	Στατιστική Ανάλυση .....	79
5.3.3	Αποτελέσματα βιοδοκιμών .....	79
5.3.4	Συμπεράσματα .....	81
5.4.	Επιλογή δόσης των αιθέριων ελαίων. ....	81
5.4.1	Συμπεράσματα .....	82
5.5	Αξιολόγηση δύο μυκητοκτόνων και νανο-γαλακτωμάτων αιθέριων ελαίων σε συνθήκες υπαίθρου .....	84
5.5.1	Υλικά και μέθοδοι.....	84
5.5.2	Στατιστική Ανάλυση .....	88
5.5.3	Αποτελέσματα.....	88
5.5.4	Συμπεράσματα .....	90
5.6	Συζήτηση.....	91
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	95

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Από τα μέσα του περασμένου αιώνα έως και σήμερα, η συχνότητα προσβολών των μυκητολογικών ασθενειών αυξάνεται συνεχώς και φαίνεται να αποτελούν απειλή για την παγκόσμια ασφάλεια τροφίμων (Fisher et al., 2012; Savary et al., 2019). Σύμφωνα με εκτιμήσεις, το ποσοστό απωλειών προσυλλεκτικά από τις μυκητολογικές προσβολές, κυμαίνεται μεταξύ 10-23%, παρά τις επεμβάσεις που πραγματοποιούνται για την αντιμετώπισή τους ενώ η δράση των μυκήτων συνεχίζεται ακόμα και μετασυλλεκτικά, προκαλώντας επιπλέον απώλειες, της τάξης του 10-20% (Fisher et al., 2012).

Οι Cerda et al., (2017) αναφέρουν ότι κατά την παραγωγή των γεωργικών προϊόντων περιλαμβάνονται πρωτογενείς και δευτερογενείς απώλειες. Οι πρωτογενείς απώλειες είναι αυτές που πραγματοποιούνται στο φυτό όταν υφίσταται μία προσβολή κατά το έτος της καλλιέργειας, ενώ οι δευτερογενείς απώλειες προκύπτουν ως αρνητικές επιπτώσεις από την προσβολή του πρώτου έτους. Σε μονοετείς καλλιέργειες, η συσσώρευση του μολύσματος του παθογόνου στο έδαφος, στον σπόρο και τους κονδύλους, παραμένει ως υπολείμματα στο έδαφος από το προηγούμενο έτος και μπορεί να προκαλέσει δευτερογενείς απώλειες. Οι απώλειες αυτές μπορούν να αποφευχθούν με την τήρηση προγράμματος αμειψισποράς και τη χρήση φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων. Σε πολυετείς καλλιέργειες, η πρόωρη φυλλόπτωση, καθώς και η ξήρανση βλαστών και κλάδων μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια ενέργειας λόγω μειωμένης φωτοσύνθεσης, με δευτερογενή συνέπεια τη μειωμένη παραγωγή για τα επόμενα χρόνια. Στην περίπτωση αυτή, οι απώλειες είναι αδύνατον να περιοριστούν από τη στιγμή που προέρχονται από ήδη προσβεβλημένα φυτά. Τα αποτελέσματα της έρευνας των Cedra et al., (2017) για το χρονικό διάστημα 2013-2015, έδειξαν ότι οι δευτερογενείς απώλειες παραγωγής που προέκυψαν ήταν σημαντικά υψηλότερες από τις πρωτογενείς, με ποσοστά 38% και 26% αντίστοιχα.

Η πρακτική της μονοκαλλιέργειας που ακολουθεί ο άνθρωπος έχει ευνοήσει ιδιαίτερα την εγκατάσταση και τον πολλαπλασιασμό των παθογόνων μυκήτων καθώς και την εμφάνιση νέων στελεχών. Ως εκ τούτου, έχοντας ως δεδομένο το σύντομο βιολογικό κύκλο των μυκήτων, η δυνατότητα παραγωγής αυξημένου αριθμού σπορίων προάγει τους υβριδισμούς καθώς και την πιθανότητα μεταλλάξεων, ακολουθώντας τους νόμους της διαδικασίας της εξέλιξης, αυξάνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο την ποικιλομορφία μεταξύ των στελεχών.

Τα τελευταία χρόνια, η εφαρμογή στρατηγικών αντιμετώπισης των μυκήτων περιλαμβάνει κυρίως τη χρήση χημικών μυκητοκτόνων (Oliver & Hewitt, 2014), καθώς και τη χρήση ανθεκτικών ποικιλιών (Finckh, 2008). Σε αρχικό στάδιο επίσης βρίσκεται η

εισαγωγή γενετικά τροποποιημένων καλλιεργειών με ανθεκτικότητα στους μύκητες, η χρήση RNAi- στρατηγικών ελέγχου (Wang et al., 2016) καθώς και η χρήση μεθόδων βιολογικού ελέγχου με μικροοργανισμούς (MBCAs – Microbial Control Agents) (Kohl et al., 2019).

Σύμφωνα με εκτίμηση των Fones and Gurr (2015), στο Ηνωμένο Βασίλειο, για την αντιμετώπιση της ασθένειας Σεπτορίωση (*Zymoseptoria tritici*) στο σιτάρι, δίχως τη χρήση μυκητοκτόνων, οι απώλειες στην παραγωγή θα ανερχόταν σε ποσοστό 20 % επί της παραγωγής. Η εφαρμογή όμως των μυκητοκτόνων θα μείωνε το ποσοστό αυτό στο 5-10%, γεγονός από το οποίο φανερώνεται η σημασία της χρήσης των μυκητοκτόνων στην αντιμετώπιση των ασθενειών.

Τα μυκητοκτόνα στοχεύουν σε ποικίλες διεργασίες των παθογόνων μικροοργανισμών και κατατάσσονται σε διάφορες κατηγορίες σύμφωνα με τον δείκτη της ανθεκτικότητας FRAC (Fungicide Resistance Action Committee). Μεταξύ των πιο κατανοητών μηχανισμών δράσης είναι οι επιδράσεις στη συνοχή της πλασματικής μεμβράνης, στους μικροσωληνίσκους του κυτταροσκελετού (microtubule cytoskeleton) και στη μιτοχονδριακή αναπνοή. Οι παραπάνω διεργασίες ελέγχονται από μία θέση, αποτελώντας στόχο μυκητοκτόνων τα οποία επιδρούν στην αναστολή ενός ενζύμου, όπως αυτά της ομάδας των αζολών και των στρομπιλουρινών, που καταλαμβάνουν περίπου το 77% του συνόλου της παγκόσμιας αγοράς μυκητοκτόνων. Παρόλο που η χρήση μυκητοκτόνων με μηχανισμό δράσης που επιδρά στην αναστολή μίας λειτουργίας (single target) είναι αποτελεσματική, ελλοχεύει τον κίνδυνο της ανάπτυξης ανθεκτικότητας σε σύντομο χρονικό διάστημα από την εφαρμογή τους (Oliver & Hewitt, 2014).

Σύμφωνα με τον Hewitt (2000) και τον Leadbeater (2015), η επιτυχής αντιμετώπιση του προβλήματος της ανάπτυξης ανθεκτικότητας των παθογόνων προϋποθέτει την ανάπτυξη νέων μυκητοκτόνων, τα οποία σε ιδανικές περιπτώσεις, θα πρέπει να πληρούν τα παρακάτω κριτήρια:

- α. Να είναι αποτελεσματικά σε ένα ευρύ φάσμα παθογόνων.
- β. Να επηρεάζουν βιοτικές λειτουργίες των παθογόνων με πολλαπλούς τρόπους, ώστε να αποφεύγονται φαινόμενα ανάπτυξης ανθεκτικότητας.
- γ. Να παρουσιάζουν χαμηλή τοξικότητα σε οργανισμούς μη στόχους.
- δ. Να ενεργοποιούν τους μηχανισμούς άμυνας των φυτών.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

### 1.1 Ο έλεγχος των ασθενειών

Στη γεωργία σήμερα, ο έλεγχος των ασθενειών, των εντόμων και των ζιζανίων, πραγματοποιείται κυρίως με τη χρήση χημικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Η εισαγωγή των μυκητοκτόνων στη γεωργία έχει αυξήσει τις αποδόσεις των καλλιεργειών και ταυτόχρονα με την εύκολη και γρήγορη εφαρμογή τους, έχει μειωθεί ο χρόνος εργασίας που απαιτείται για την αντιμετώπιση των ανωτέρω (Calvert et al., 2008). Παράλληλα με τα πλεονεκτήματα που προσφέρουν, η πλειονότητα των χημικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων παρουσιάζει εμμόνη, θέτοντας το περιβάλλον και τον άνθρωπο σε μακροχρόνιους κινδύνους. Οι περιβαλλοντικές αυτές επιπτώσεις φέρουν τη φυτοπροστασία μπροστά σε νέες οικονομικές και περιβαλλοντικές προκλήσεις (El-Wakeil, 2013). Για την αντιμετώπιση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων, πολλές χώρες έχουν θέσει σε ισχύ κανονισμούς σχετικά με την προστασία του περιβάλλοντος σε μία προσπάθεια αντικατάστασης των συνθετικών χημικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων με άλλα, φιλικά προς το περιβάλλον προϊόντα, όπως για παράδειγμα τα βιοφυτοπροστατευτικά σκευάσματα. Ωστόσο, το υψηλό κόστος παραγωγής τους, η χαμηλή τους αποτελεσματικότητα και η ασταθής επίδοσή τους στην ύπαιθρο, δεν έχουν ευνοήσει ιδιαίτερα τη διάδοσή τους. Σε πολλές περιπτώσεις επίσης, το κόστος παραγωγής τους είναι συγκριτικά υψηλότερο από αυτό των συνθετικών, όπως και η χρηματοδότηση που απαιτείται για την έρευνα τους (Hossain et al., 2017).

Τα βιοκτόνα παρουσιάζουν εκλεκτική δράση και ως εκ τούτου η αντιμετώπιση πολλαπλών εχθρών απαιτεί τη χρήση περισσότερων του ενός σκευασμάτων. Επιπλέον, παρουσιάζουν το μειονέκτημα της σύντομης χρονικής σταθερότητας και διάσπασής τους με την επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας (Koul, 2011). Η αποτελεσματική τους χρήση απαιτεί εξειδικευμένες γνώσεις σχετικά με τη σωστή χρήση των προϊόντων καθώς και του βιολογικού κύκλου των εχθρών που αντιμετωπίζουν, προκειμένου η επέμβαση να πραγματοποιηθεί με το σωστό τρόπο και τη σωστή χρονική στιγμή. Για την επίτευξη των παραπάνω, κρίνεται απαραίτητη η δημιουργία πρωτοκόλλων χρήσης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων καθώς και η επαρκής εκπαίδευση των παραγωγών (Hossain et al., 2017).

Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα που προέρχονται από εκχυλίσματα φυτών χρησιμοποιούνται ως εναλλακτικές μέθοδοι στη χρήση χημικών, παρουσιάζοντας χαμηλή έως μηδενική τοξικότητα στον άνθρωπο (El-Wakeil, 2013). Επεμβαίνοντας στην αναπαραγωγική

διαδικασία ενός εχθρού ή παθογόνου, υπάρχει η δυνατότητα μείωσης των προσβολών τους (Sharma et al., 1973; Vänninen, 2005). Σήμερα, ο επιτυχημένος έλεγχος των εχθρών και των ασθενειών πραγματοποιείται εφαρμόζοντας πολλαπλές τεχνικές αντιμετώπισης με τη μέθοδο της Ολοκληρωμένης Διαχείρισης Εχθρών (IPM). Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει την αξιολόγηση των απαιτούμενων τεχνικών, καθώς και του χρόνου εφαρμογής που απαιτούνται για την αντιμετώπιση των εχθρών, υπολογίζοντας και προβλέποντας ταυτόχρονα οικονομικές, οικολογικές και κοινωνιολογικές παραμέτρους (Bottrel, 1979). Έτσι, αποκτώντας την κατάλληλη γνώση σχετικά με τις φυσικές ιδιότητες και τους μηχανισμούς δράσης των αιθέριων ελαίων ενάντια σε εχθρούς και παθογόνα, θα μπορούσε να δοθεί η δυνατότητα αξιοποίησης τους σε προγράμματα ολοκληρωμένης αντιμετώπισης εχθρών και ασθενειών, επεμβαίνοντας ανασταλτικά στην αναπαραγωγική διαδικασία, μειώνοντας τη χωρική τους διάδοση, καθώς και το ποσοστό των προσβολών τους (Sharma et al., 1973; Vänninen, 2005).

## 1.2 Τα Αιθέρια έλαια

Στη φύση, τα αιθέρια έλαια συμπεριφέρονται ως προστατευτικές ενώσεις έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών, ως εντομοαπωθητικά, επιδρώντας στον έλεγχο των διατροφικών συνηθειών των εντόμων αλλά και ως εντομοελκυστικά, προκειμένου να συμβάλλουν θετικά στην μεταφορά της γύρης και των σπόρων. Με βάση τα παραπάνω γίνεται κατανοητή η επίδραση των αιθέριων ελαίων στην αλληλεπίδραση των παραγόντων του φυτού και του περιβάλλοντος (Bakkali et al., 2008). Οι κύριες κατηγορίες ενώσεων που συνθέτουν τα αιθέρια έλαια είναι τα τερπένια και τα τερπενοειδή και λιγότερο συχνά οι αζωτούχες και οι θειούχες ενώσεις, οι κουμαρίνες και τα ομόλογα των φαινυλοπροπανοειδών (Niu & Gilbert, 2004; Hyldgaard et al., 2012).

Τα τερπενοειδή αποτελούν μία μεγάλη ομάδα φυσικών προϊόντων με περισσότερες από 30.000 ενώσεις και είναι παράγωγα του βιοσυνθετικού μονοπατιού των ισοπρενοιδών. Η τερπενίνη παράγεται από το πυροφωσφορικό γερανύλιο (geranyl pyrophosphate) κατά τη σύνθεση των μονοτερπενίων. Τα οξειδωμένα μονοτερπένια θυμόλη και καρβακρόλη προέρχονται συνήθως από την οξείδωση του κυκλικού τριτερπενίου. Τα αρώματα και οι γεύσεις των φυτών της οικογένειας Lamiaceae, προέρχονται από τα μονοτερπένια και τα σεσκιτερπένια, τα οποία κατέχουν σημαντική θέση σχεδόν σε όλες τις βασικές διεργασίες των φυτών, συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης, της αναπαραγωγής (πολλαπλασιασμού) και της άμυνας των φυτών (Pulido et al., 2012). Σύμφωνα με πολλές έρευνες τα δύο τερπενοειδή

θυμόλη και καρβακρόλη παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών ιδιοτήτων καθώς επίσης και βακτηριοκτόνο και μυκητοκτόνο δράση (Baser 2008; Suntres et al., 2015).

Σύμφωνα με μια μελέτη των Konuk & Ergüden (2020), οι υδροξυλικές ομάδες των ενώσεων εξυπηρετούν στην επίτευξη της επαρκούς διαλυτότητας των υδροφιλικών τμημάτων. Διατηρούν επίσης τα μόρια στη διπλή στοιβάδα της μεμβράνης προκαλώντας αλλαγές στην ιοντική ομοιόσταση (κατανομή ιόντων μεταξύ αποπλασματικού χώρου, κυτταροπλάσματος και χυμοτοπίου) και την αποστολή χημικών σημάτων (signaling). Η θέση της υδροξυλικής ομάδας κρίνεται επίσης ιδιαίτερα σημαντική και αυτό αποδεικνύεται ύστερα από εργαστηριακή σύγκριση της θυμόλης και της καρβακρόλης με το έλαιο cumic και τη βενζυλική αλκοόλη. Από τη σύγκριση, παρατηρήθηκε ότι η φαινολική υδροξυλική ομάδα ήταν πιο αποτελεσματική στην πρόκληση αλλοιώσεων στην κυτταρική μεμβράνη, προσδίδοντας στα συστατικά θυμόλη και καρβακρόλη μυκητοκτόνες ιδιότητες. Ως εκ τούτου, δημιουργείται η υπόθεση ότι η φαινολική υδροξυλική ομάδα, που συσχετίζεται με ένα σύστημα μετατοπισμένων ηλεκτρονίων, θα μπορούσε να επιτρέψει στο υδροξύλιο να χάσει εύκολα πρωτόνια και να λειτουργήσει ως εναλλάκτης πρωτονίων (Konuk & Ergüden, 2020). Συμπερασματικά, οι Konuk & Ergüden (2020), απέδειξαν ότι ο μηχανισμός δράσης των φαινολικών τερπενοειδών προσβάλλει την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης με αποτέλεσμα τη διαρροή ιόντων, προκαλώντας έτσι τον κυτταρικό θάνατο. Το υδροφοβικό αρωματικό τμήμα των τερπενοειδών επιτρέπει επίσης τη συσσώρευσή τους στην κυτταρική μεμβράνη συμβάλλοντας με τον τρόπο αυτό στην απόκτηση της μικροβιοκτόνου ιδιότητας (Konuk & Ergüden, 2020).

Τα τερπενοειδή ανήκουν σε μία μεγάλη οικογένεια υδρογονανθράκων που προέρχονται από το μόριο του ισοπρενίου (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>), με ποικίλα χημικά χαρακτηριστικά και βιολογικές ιδιότητες, τα οποία συντίθενται στο κυτταρόπλασμα των φυτικών κυττάρων και αποτελούν το 90% των αιθέριων ελαίων, επιτρέποντας τη δημιουργία ποικίλων ενώσεων. Τερπενοειδή θεωρούνται οι ενώσεις που είναι όμοιες με τα τερπένια και έχουν οξυγόνο στο μόριο τους ή κάποια αναδιάταξη αυτών. Τα πιο γνωστά τερπενοειδή είναι η θυμόλη, η καρβακρόλη, ο οξικός λιναλυλεστέρας, η λιναλοόλη, η πιπεριτόνη, η σιτρονέλα, η γερανιόλη και η μενθόλη. Μέσα σε κάθε ομάδα μπορεί να απαντώνται ως απλοί ακόρεστοι υδρογονάνθρακες και να περιέχονται σε λειτουργικές ομάδες συνθέτοντας οξέα, αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες και εστέρες (Hyldgaard et al., 2012; Lopez-Reyes et al., 2013).

Η χημική σύνθεση των αιθέριων ελαίων διαφέρει μεταξύ των ειδών από τα οποία προέρχονται και επηρεάζεται από παράγοντες όπως η γεωγραφική περιοχή, το περιβάλλον, το

στάδιο ωριμότητας των φυτών και η μέθοδος απόσταξης. Οι παραπάνω διαφορές τους προσδίδουν επίσης και διαφορετικές ιδιότητες (de Martino et al., 2009; Nazzaro et al., 2013).

Τα αιθέρια έλαια αποτελούν τα πιο ελπιδοφόρα φυσικά προϊόντα που παρουσιάζουν αναστολή της μυκηλιακής ανάπτυξης (Kalemba & Kunicka, 2003; Hu et al., 2007). Όπως και τα υπόλοιπα φυτοχημικά, τα αιθέρια έλαια θα μπορούσαν εν δυνάμει να μετριάσουν τη μικροβιακή ανάπτυξη και τη δημιουργία των βιομεμβρανών (biofilms) μέσω εξειδικευμένων μηχανισμών (Hyltdgaard et al., 2012). Είναι γνωστό ότι οι μικροοργανισμοί προκαλούν την ενεργοποίηση ενός μηχανισμού για την παραγωγή μορίων, τη χημική επικοινωνία και την ανάπτυξη των παραμέτρων της παθογένειας, όπως η ανάπτυξη των βιομεμβρανών (Nazzaro et al., 2017). Σύμφωνα με νεότερες έρευνες, η δημιουργία βιομεμβρανών δεν περιορίζεται μόνο στα βακτήρια, αλλά δημιουργείται και από μύκητες (Fanning & Mitchell, 2012; Borghi et al., 2015). Η ανακάλυψη ότι πολλοί φυτοπαθογόνοι μύκητες περιλαμβάνουν στον βιολογικό τους κύκλο τη δημιουργία βιομεμβρανών, φέρει μελλοντικά την πιθανότητα ελέγχου τους, υιοθετώντας νέες μεθόδους με στόχο την ανάπτυξη τους (Villa et al., 2017).

Σύμφωνα με τους Villa et al. (2017), η ανάπτυξη της παθογένειας συνδέεται άμεσα με την κατασκευή βιομεμβρανών στον βιολογικό κύκλο των μυκήτων. Ως βιομεμβράνη αναφέρεται μία μικροβιακή αποικία που βρίσκεται προσκολλημένη σε μία επιφάνεια, η οποία παράγει ένα μείγμα σακχάρων και πρωτεϊνών (Villa et al., 2017). Λόγω της κυτταρικής τους πυκνότητας, η σύνθεση αυτή λειτουργεί σαν ένα φράγμα, αποτρέποντας (Aroga & Tunlid, 2001; Doss et al., 2003) ή καθυστερώντας την είσοδο του μυκητοκτόνου (Villa et al., 2017). Κάτω από τη βιομεμβράνη, λόγω της πληθυσμιακής πυκνότητας που απαντάται, αυξάνονται και οι πιθανότητες ανταλλαγής γενετικού υλικού μεταξύ των ατόμων, αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα παρουσίασης φαινομένων ανάπτυξης ανθεκτικότητας (Fanning & Mitchell, 2012; Soanes & Richards, 2014; Balcazar et al., 2015). Άλλος ένας παράγοντας εμφάνισης φαινομένων ανθεκτικότητας είναι και η συμβολή της στην επιβίωση των σπορίων, τα οποία προστατεύονται κάτω από αντίξοες συνθήκες (Nadal et al., 2008; Gauthier, 2015), όπου μειώνοντας παράλληλα το μεταβολικό τους ρυθμό, αυξάνουν κατ' αυτόν τον τρόπο την αντοχή τους. Ο μηχανισμός αυτός αυξάνει τις πιθανότητες επιβίωσης, όπως και στην περίπτωση των βακτηρίων (Jabra-Rizk et al., 2004; van Acker et al., 2014). Σύμφωνα με τα παραπάνω, ένας αναποτελεσματικός έλεγχος μυκήτων μετά από εφαρμογή μυκητοκτόνου, θα μπορούσε να οφείλεται άμεσα και στις ιδιότητες των βιομεμβρανών (Villa et al., 2017).

Τα αιθέρια έλαια, είναι κατηγοριοποιημένα από τον FDA (Food and Drugs Administration) ως ασφαλή προϊόντα λόγω της φυσικής τους προέλευσης (Edris, 2007). Οι



αναγνωρισμένες αντιμικροβιακές ιδιότητές τους θα μπορούσαν να βρουν χρήση ακόμα και σε μετασυλλεκτικές εφαρμογές, συντηρώντας προϊόντα με ασφαλή τρόπο και επιμηκύνοντας το χρόνο διάθεσής τους (Fратиanni et al., 2010). Οι φυτοπροστατευτικές ιδιότητες του μηχανισμού δράσης τους, πιθανόν να οφείλεται σε χαρακτηριστικά των τερπενίων και των τερπενοειδών, λόγω της υψηλής λιποφιλικής τους φύσης και του χαμηλού μοριακού τους βάρους, προκαλώντας με αυτόν τον τρόπο τη διάρρηξη των κυτταρικών μεμβρανών και το θάνατο των κυττάρων ή την αναστολή της σπορίωσης και της βλάστησης των μυκήτων (Alvarez-Castellanos et al., 2001; Inouye et al., 2001a; Inouye et al., 2001b; Inouye et al., 2001c; Sharma & Tripathi, 2006). Μελέτες in-vitro έχουν αποδείξει ότι η αντιμετώπιση ενός παθογόνου οφείλεται στο σύνολο των συστατικών του αιθέριου ελαίου και η εφαρμογή μόνο ενός εκ των κυρίων συστατικών του μπορεί να φανεί αναποτελεσματική (Tian et al., 2011; Bajpai, 2011).

### **1.3 Η Νανοτεχνολογία στην υπηρεσία των μυκητοκτόνων**

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα αιθέρια έλαια θεωρούνται από τα πιο ελπιδοφόρα φυσικά προϊόντα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φυσικά μυκητοκτόνα, προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η επιβάρυνση του περιβάλλοντος από τα αντίστοιχα συνθετικά χημικά. Η φύση όμως των αιθέριων ελαίων είναι και ο βασικός περιοριστικός παράγοντας για την ευρεία εφαρμογή τους. Για τη χρήση τους σε εντατικές καλλιέργειες είναι απαραίτητο να αντιμετωπισθούν προβλήματα που οφείλονται στην πτητικότητα, την υδατοδιαλυτότητα και το σύντομο χρόνο διάσπασης που παρουσιάζουν ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Worrall et al., 2018).

Η κατασκευή νανοσωματιδίων με την επιστήμη της Νανοτεχνολογίας, μπορεί να λειτουργήσει ως φορέας μεταφοράς των ενεργών συστατικών, παγιδεύοντας, απορροφώντας και προσδένοντας τα ενεργά συστατικά, αναπτύσσοντας ειδικές συνθέσεις και αποδίδοντας τους ιδιότητες, που μπορούν να βελτιώσουν την αποτελεσματική τους χρήση. Τα πιο συνηθισμένα νανοσωματίδια που χρησιμοποιούνται στη διαχείριση ασθενειών των φυτών είναι τα νανοσωματίδια σιλικόνης (silica), χιτοσίνης (chitosan), τα στερεά λιπιδικά νανοσωματίδια (Solid lipid nanoparticles-SLNs), τα υδροξείδια διπλής στρώσης (Layered double hydroxides) (Worrall et al., 2018), τα μικρο-γαλακτώματα (Micro-emulsions-MEs) και τα νάνο-γαλακτώματα (Nanoemulsions-NEs) (Pavoni, 2020) των οποίων τα χαρακτηριστικά αναφέρονται παρακάτω.

Στην παρούσα μελέτη, εφαρμόστηκε η χρήση σκευασμάτων αιθέριων ελαίων που παρασκευάστηκαν ως νάνο-γαλακτώματα, με σκοπό τη διαπίστωση της δυνατότητας επιτυχούς εφαρμογής τους, με την απόδοση των μυκητοκτόνων ιδιοτήτων αιθέριων ελαίων ενάντια σε παθογόνα φυλλώματος.

**Νανοσωματίδια σιλικόνης (Silica nanoparticles):** Τα σωματίδια αυτά παράγονται με μεγάλη ευκολία, δημιουργώντας κατασκευές με πορώδη μάζα, οποιουδήποτε σχήματος (Mody et al., 2014). Τα νανοσωματίδια σιλικόνης μπορεί να είναι πορώδη (PHSN –porous hollow silica nanoparticles) και μεσοπορώδη (MSN-mesoporous silica nanoparticles), τα οποία αποθηκεύουν τα ενεργά συστατικά στο εσωτερικό τους προστατεύοντάς τα και επιδρώντας στη σταδιακή αποδέσμευσή τους (Worrall et al., 2018).

**Νανοσωματίδια χιτοσίνης (Chitosan nanoparticles):** Τα σωματίδια αυτά παρουσιάζουν μικρή υδατοδιαλυτότητα λόγω της υδροφοβικής τους φύσης (Li et al., 2011; Kashyap et al., 2015). Για το λόγο αυτό αναμειγνύεται με συμπολυμερή (copolymer) για τη βελτίωση της διαλυτότητάς τους (Kashyap et al., 2015). Η χιτοσίνη παρουσιάζει την ιδιότητα να προσκολλάται στην επιδερμίδα βλαστών και φύλλων, αξιοποιώντας τις ιδιότητες των ενεργών συστατικών από την επιμήκυνση του χρόνου παρουσίας τους σε αυτά.

**Στερεά λιπιδικά νανοσωματίδια (Solid lipid nanoparticles - SLNs):** Σωματίδια σε μορφή γαλακτώματος, τα οποία συντίθενται από λιπίδια που συμπεριφέρονται ως στερεά σε θερμοκρασία δωματίου (Worrall et al., 2018). Τα πλεονεκτήματα των λιπιδίων βρίσκονται στην ιδιότητα που έχουν να δεσμεύουν τα ενεργά συστατικά χωρίς τη χρήση οργανικών διαλυτών (Ekambaram et al., 2012). Παρέχουν επίσης τη δυνατότητα της ελεγχόμενης αποδέσμευσης διαφόρων λιποφιλικών συστατικών, λόγω της μειωμένης κινητικότητας των ενεργών συστατικών από το στερεό μέσο δέσμευσης (Ekambaram et al., 2012; Borel & Sabliou, 2014). Για τη διατήρηση της σταθερότητας τους με παρουσία νερού, χρησιμοποιούνται επιφανειοδραστικές ουσίες (Balaure et al., 2017). Παρουσιάζουν όμως τα μειονεκτήματα της χαμηλής δέσμευσης των ενεργών συστατικών και της απώλειας τους κατά την αποθήκευση (Tamjidi et al., 2013).

**Υδροξείδια διπλής στρώσης (Layered double hydroxides- LDHs):** είναι εξαγωνικές μορφές νανοσωματιδίων αργίλου σε στρώσεις, όπου τα ενεργά συστατικά βρίσκονται δεσμευμένα στους χώρους ανάμεσα στις στρώσεις (Xu et al., 2006). Τα νανοσωματίδια αυτά αποδομούνται κάτω από όξινες συνθήκες, όπως η προσθήκη της υγρασίας και του διοξειδίου του άνθρακα της ατμόσφαιρας, απελευθερώνοντας βαθμιαία τα ενεργά συστατικά (Mitter et al., 2017).

Σε μια μελέτη τους, οι Janatona et al., (2015) πέτυχαν την ενσωμάτωση πέντε αιθέριων ελαίων σε κάψουλες MSN (mesoporous silica nanoparticles) αυξάνοντας την αποτελεσματική μυκητοκτόνο δράση τους ενάντια στον μύκητα *Aspergillus niger* εν αντιθέσει με την απευθείας εφαρμογή τους. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν παρουσιαστεί με τη χρήση SLNs στη σταθεροποίηση του αιθέριου ελαίου του φυτού *Zataria multiflora*, προσδίδοντας ικανοποιητική προστασία έναντι έξι παθογόνων (Nasseri et al., 2016).

**Μίκρο και Νάνο-γαλακτώματα (Micro and Nano-emulsions, MEs και NEs):** Τα μίκρο και νάνο γαλακτώματα θεωρούνται ιδιαίτερα εύκολα στη σύνθεση και χρήση, ενώ η κατασκευή τους θεωρείται οικονομική σε σχέση με άλλες μεθόδους παραγωγής (Pavoni, et al., 2019a). Η εφαρμογή τους θεωρείται κατάλληλη για χρήση λιποφιλικών ή χαμηλής διαλυτότητας στο νερό συστατικών, όπως τα αιθέρια έλαια, που η εφαρμογή τους απαιτεί διάλυση σε νερό (Khater et al., 2017; Donsi & Ferrari, 2016). Η χρήση μεθόδων νανοτεχνολογίας, αυξάνει τη βιοδιαθεσιμότητα και την επίδραση των ενεργών συστατικών, μέσω της διαλυτοποίησής τους σε μικρές σταγόνες (Wang et al., 2007; Pavoni et al., 2019b).

Ως MEs και NEs, ορίζονται τα γαλακτώματα που αποτελούνται από μία υγρή φάση διαλυμένη μέσα σε μία άλλη, οι οποίες μεταξύ τους, δεν είναι διαλυτές. Η σύνθεση τους, αποτελείται γενικά από μία υδάτινη φάση (νερό) και μία λιπαρή φάση (έλαιο), ενώ η ανάμειξη των δύο συστατικών, επιτυγχάνεται από την επιπρόσθετη παρουσία επιφανειοδραστικών ουσιών. Οι επιφανειοδραστικές ουσίες, χαρακτηρίζονται ως αμφιφιλικά μόρια, που επιτρέπουν τη μείωση της επιφανειακής τάσης μεταξύ των δύο φάσεων (Sakamoto et al., 2017), με αποτέλεσμα την προσρόφηση της διαχωριστικής επιφάνειας νερού-ελαίου, αποτρέποντας τη συσσωμάτωση των σταγονιδίων (Kralova & Sjöblom, 2009).

Στη διεθνή βιβλιογραφία συναντώνται πολλές παρερμηνείες σχετικά με τη φύση των δύο νανοτεχνολογιών (Anton & Vandamme, 2011). Τα προθέματα “Μίκρο” και “Νάνο” αναφέρονται στις διαστάσεις των σταγονιδίων που παράγονται, όπου το πρόθεμα “Μίκρο” υποδεικνύει μέγεθος σταγονιδίων της τάξης του  $10^{-6}$ , ενώ το πρόθεμα “Νάνο” της τάξης του  $10^{-9}$ , αν και δεν υπάρχουν σαφή όρια μεταξύ των δύο τύπων (Pavoni et al., 2020). Ο κύριος παράγοντας διάκρισης των MEs και NEs, πραγματοποιείται από την εξέταση της ελεύθερης ενέργειας του συστήματος, που επηρεάζει την παραγωγική διαδικασία και τη σταθερότητα του. Τα MEs, είναι συστήματα θερμοδυναμικά σταθερά, ενώ τα NEs δεν είναι και χαρακτηρίζονται ως κινητικά σταθερά (Danielsson & Lindman, 1981; McClements, 2012). Τα σταγονίδια NEs είναι επίσης ικανά να φορτώσουν μεγαλύτερες ποσότητες της διαλυτής φάσης με παρουσία μικρότερης συγκέντρωσης επιφανειοδραστικών ουσιών σε σχέση με τα MEs (Rao & McClements, 2011).

Η δομή των σωματιδίων των παραπάνω τύπων είναι παρόμοια και αποτελείται από ένα ελαιώδη πυρήνα, που περικλείεται από μονά ή πολλαπλά επίπεδα επιφανειοδραστικής ουσίας, η οποία φέρει μία μη πολική ουρά προς το λιπόφιλο πυρήνα και μία πολική κεφαλή προς το υδατικό μέσο (Pavoni et al., 2020). Το σχήμα των σταγονιδίων των νάνο-γαλακτωμάτων είναι γενικά σφαιρικό και επιτυγχάνεται από τη μείωση της διεπιφανειακής περιοχής ως αποτέλεσμα της μικρής διαμέτρου τους και της υψηλής επιφανειακής τάσης (Pavoni et al., 2020). Οι ιδιότητες του κολλοειδούς συστήματος που δημιουργείται, καθώς και η διαμόρφωση και η σταθερότητα του, επηρεάζονται άμεσα από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των επιλεγμένων ελαίων, το ιξώδες, την επιφανειακή τάση, την πολικότητα και το δείκτη διάθλασής τους (McClements & Rao, 2011).

Η μακροχρόνια σταθερότητα των μικρο και νάνο-γαλακτωμάτων επηρεάζεται από την κατάσταση της ελεύθερης ενέργειας του συστήματος. Τα μικρο-γαλακτώματα, όπως αναφέρθηκε, είναι θερμοδυναμικά σταθερά και παραμένουν σταθερά υπό συγκεκριμένες συνθήκες, όσο αυτές δεν μεταβάλλονται (McClements, 2012). Τα νάνο-γαλακτώματα, επηρεάζονται από το ύψος του ενεργειακού φράγματος (energy barriers) μεταξύ του κολλοειδούς συστήματος και των δύο διαφορετικών φάσεων. Για τη δημιουργία τους, απαιτείται η εισαγωγή ενέργειας από εξωτερικούς παράγοντες, προκειμένου να ξεπεραστεί το ενεργειακό κενό μεταξύ των δύο φάσεων, κάτι που μπορεί να επιτευχθεί μέσω δύο φάσεων, αναδεύοντας αρχικά και ύστερα με τη χρήση ομογενοποιητών υψηλής πίεσης, μικρορευστοποιητών και τη χρήση υπερήχων (Gupta et al., 2016). Όσο πιο χαμηλό είναι το ενεργειακό φράγμα, τόσο πιο γρήγορα εμφανίζονται φαινόμενα αστάθειας (Pavoni et al., 2020).

#### **1.4 Σύγχρονοι μέθοδοι ανίχνευσης και αναγνώρισης αερομεταφερόμενων παθογόνων**

Στο πέρασμα του χρόνου, έχουν καταγραφεί σημαντικά ιστορικά γεγονότα που συνδέονται με την εξάπλωση ασθενειών μέσω αερομεταφερόμενων σωματιδίων, προκαλώντας σοβαρές κοινωνικές και οικονομικές συνέπειες. Τον 19<sup>ο</sup> αιώνα, ο μύκητας *Phytophthora infestans* προκαλεί τον ονομαζόμενο λιμό της πατάτας στην Ιρλανδία, οδηγώντας στη μαζική μετανάστευση Ιρλανδών πολιτών στις Η.Π.Α. και ο μύκητας *Plasmopara viticola* προσβάλλει την αμπελοκαλλιέργεια, δημιουργώντας τεράστια οικονομικά προβλήματα στον αμπελοοινικό τομέα της Ευρώπης. Τον 20<sup>ο</sup> αιώνα, στην Αυστραλία προκαλείται ραγδαία μείωση των καλλιεργούμενων εκτάσεων ελαιοκράμβης από

49.000 εκτάρια το 1972 σε 2.000 εκτάρια το 1974, λόγω των ζημιών που προκλήθηκαν από τον μύκητα *Plenodomus lingam*. Ο μύκητας αυτός είναι υπεύθυνος παγκοσμίως για απώλειες δισεκατομμυρίων αναφορικά με την καλλιέργεια ελαιοκράμβης, όπου σε σοβαρές προσβολές μπορεί να απολέσει ακόμα και το 100% της παραγωγής. Στον 21<sup>ο</sup> αιώνα, και συγκεκριμένα το 2007 στο Ηνωμένο Βασίλειο, προκλήθηκαν επιδημίες στις καλλιέργειες σίτου από τον μύκητα *Puccinia triticina* και ελαιοκράμβης από τον μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum*, προκαλώντας σημαντικές απώλειες στην παραγωγή (West et al., 2009).

Η δημιουργία ενός συστήματος έγκαιρης ανίχνευσης της παρουσίας και της αναγνώρισης αερομεταφερόμενων παθογόνων μπορεί να επιτευχθεί μέσω της λήψης δειγμάτων από τον αέρα, όπου σε συνδυασμό με σύγχρονες μεθόδους αναγνώρισης μπορεί να βελτιώσει σημαντικά τις στρατηγικές που απαιτούνται για τον έλεγχο και την πρόβλεψη επιδημιών (West et al., 2009). Η πρόβλεψη σημαντικών επιδημιών μπορεί να επιφέρει σημαντικά οικονομικά και περιβαλλοντικά οφέλη. Ο τρόπος εκδήλωσης όμως μίας ασθένειας, χωρικά και χρονικά, δεν είναι σταθερός και εξαρτάται από κλιματικούς παράγοντες, καθώς και αλλαγές που μπορεί να συμβούν στους πληθυσμούς των παθογόνων. Για παράδειγμα, τα μοντέλα πρόβλεψης που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των μυκήτων *P. lingam* και *Pyrenopeziza brassicae*, εξετάζουν κλιματικούς παράγοντες για τον υπολογισμό της κατάλληλης εποχής επέμβασης με μυκητοκτόνα (West et al., 2009).

Οι λήψεις δειγμάτων από τον αέρα μπορούν να υπολογίσουν απευθείας την ποσότητα των αερομεταφερόμενων μολυσμάτων και να εκτιμήσουν τον κίνδυνο εμφάνισης επιδημιών (West et al., 2009). Για τη λήψη τέτοιων δειγμάτων έχουν κατασκευαστεί διάφοροι τύποι συσκευών, όπως: Volumetric slit-type, Cyclonic spore sample, Rotorod, Button sampler, Passive Impactor, Cascade Impactor, Liquid Impinger, Microtitre immunospore trap, Air-O-Cell, Ionic samplers, των οποίων τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα παρουσιάζονται από τους Jackson and Bayliss (2011). Σε συνδυασμό με σύγχρονες μεθόδους αναγνώρισης που βασίζονται σε τεχνικές PCR, οι εκτιμήσεις γίνονται πιο γρήγορα, με μεγαλύτερη ακρίβεια και προσφέρουν πλήθος πληροφοριών που δεν ήταν δυνατό να εξεταστούν ακολουθώντας παραδοσιακές μεθόδους μικροσκοπίας, όπως η ποσοτικοποίηση του μολύσματος και η παραγωγή δεδομένων αναφορικά με τα γενετικά χαρακτηριστικά των πληθυσμών τους, όπως την ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε μυκητοκτόνα και τη δυνατότητα παραγωγής τοξινών (West et al., 2009).

## 1.5 Τα Σταυρανθή (Brassicaceae - Crusiferae)

Σύμφωνα με νεότερα δεδομένα, η οικογένεια Brassicaceae αποτελεί μία ομάδα 321 γνωστών γενών, η οποία περιέχει 3660 είδη (Al-Shehbaz, 2012) που βρίσκονται διαδεδομένα σε όλο τον κόσμο εκτός των περιοχών της Ανταρκτικής (Al-Shehbaz et al., 2006). Περιλαμβάνει μονοετή, διετή καθώς και πολυετή φυτά (Franzke et al., 2011). Τα είδη της παρουσιάζουν μεγάλο εύρος οικονομικής σημασίας, καθώς χρησιμοποιούνται για την παραγωγή εδώδιμων και βιομηχανικών ελαιοδοτικών καρπών, λαχανοκομικών ειδών, καρυκευμάτων, ζωοτροφών και ανθοκομικών ειδών, ενώ βρίσκουν επίσης εφαρμογή στη φαρμακοβιομηχανία και την έρευνα (Warwick, 2011).

Τα σταυρανθή είναι μία οικογένεια που ξεχωρίζει εύκολα, λόγω της μορφολογίας των ανθέων και των καρπών της (Samec et al., 2017). Τα περισσότερα είδη σταυρανθών αναπτύσσονται ικανοποιητικά σε θερμοκρασίες μεταξύ 15-20°C και οι ανάγκες τους σε καλλιεργητικές φροντίδες είναι παρόμοιες (Fahey, 2015). Παρουσιάζουν αντοχή σε σύντομες περιόδους χαμηλών θερμοκρασιών έως και -4°C, όπου μικροί παγετοί ευνοούν επίσης την καλλιέργεια του μπρόκολου και του κουνουπιδιού, ενώ όλες οι καλλιέργειες σταυρανθών παρουσιάζουν μειωμένα ποιοτικά χαρακτηριστικά σε θερμοκρασίες που υπερβαίνουν τους 26-27°C (Fahey, 2015). Υψηλές θερμοκρασίες προκαλούν αρνητικές ποιοτικές επιπτώσεις, προωθώντας την άνθηση (Bjorkman & Pearson, 1998), μειώνοντας τη γονιμότητα των σπόρων (Young et al., 2004) και διακόπτοντας την ανάπτυξη του φυτού (Angadi et al., 2000).

Σημαντικά καλλιεργούμενα είδη των σταυρανθών, απαντώνται στο γένος *Brassica*, τα οποία καλλιεργούνται για παραγωγή λαχανοκομικών ειδών, φυτικών ελαίων, καρυκευμάτων και ζωοτροφών με χρήσεις γνωστές από το παρελθόν σε όλο τον κόσμο (Chen et al., 2011; Thakur, 2019). Τα πιο συνηθισμένα καλλιεργούμενα λαχανικά ανήκουν στο είδος *B. oleracea* που περιλαμβάνει διάφορες ποικιλίες με σημαντικό γεωργικό ενδιαφέρον όπως το λάχανο (var. *capitata*), το μπρόκολο (var. *Italica*), το κουνουπίδι (var. *botrytis*), το καλέ (var. *acephala*), η γογγυλοκράμβη (var. *gongyloides*) και τα λαχανάκια Βρυξελλών (var. *gemmifera*) (Samec et al., 2017; Thakur, 2019), καθώς και είδη του *B. rapa* (Samec & Salopek-Sondi, 2019) που περιλαμβάνει τις ποικιλίες κινέζικου λάχανου bokchoy (var. *chinensis*) και napa cabbage (var. *pekinensis*), καθώς και το γογγύλι (var. *rapa*) (Thakur, 2019; Petruzzello, 2020). Ιδιαίτερα σημαντικές θεωρούνται και οι καλλιέργειες ελαιοδοτικών σταυρανθών όπως τα είδη: *B. carinata*, *B. juncea*, *B. nigra*, *B. rapa* και *B. napus*, με παραδοσιακές χρήσεις ως έλαια διατροφής και ζωοτροφής, ως φωτιστικό έλαιο, στη φαρμακευτική και σε θρησκευτικές τελετουργίες (McVetty et al., 2016). Από τα ελαιοδοτικά

σταυρανθή, ιδιαίτερα ανεπτυγμένη είναι η καλλιέργεια ελαιοκράμβης (*B. napus*) βρίσκοντας εφαρμογή ως βιομηχανικό έλαιο με σκοπό την παραγωγή βιοκαυσίμων (biodiesel), ως λιπαντικό μηχανών, καθώς ως λιπαντικό υδραυλικών συστημάτων (McVetty et al., 2016), καθώς επίσης και η καλλιέργεια του *B. carinata* για την παραγωγή βιοκαυσίμων (biodiesel), ενώ μελετάται και η εφαρμογή του ως βιοκαύσιμο αεροσκαφών (Thakur, 2019). Σπόροι των ειδών *B. nigra*, *B. carinata* και *B. junicea* χρησιμοποιούνται επίσης ως καρυκείματα καθώς είναι ασφαλή για κατανάλωση (Nishi, 1980; Samec & Salopek-Sondi, 2019).

Σύμφωνα με στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Τροφίμων (FAOSTAT, 2021), για το έτος 2019, η ετήσια παγκόσμια παραγωγή καλλιέργειας φυτών του γένους *Brassica* ανήλθε σε 70 εκατομμύρια τόνους, καλύπτοντας συνολική έκταση 2 εκατομμυρίων εκταρίων με τις χώρες τις Ασίας να παράγουν το 77,9 % του συνόλου παραγωγής προερχόμενη κυρίως από την Κίνα και την Ινδία, ακολουθούμενη από την Ευρώπη με 13,9% με κύριο παραγωγό τη Πολωνία, την Αφρική 5%, την Αμερική 3% και την Ωκεανία στο 0,2%. Δεδομένα σχετικά με την καλλιέργεια της ελαιοκράμβης για το έτος 2019 (FAOSTAT, 2021) αναφέρουν επίσης ότι η παγκόσμια παραγωγή ανήλθε στους 70 εκατομμύρια τόνους καλύπτοντας συνολική έκταση καλλιέργειας 34 εκατομμυρίων εκταρίων, με την Ευρώπη να καταλαμβάνει την πρώτη θέση με 32,9 %, την Ασία 34,2 %, την Αμερική 29,3 %, την Ωκεανία 3,4 % και την Αφρική στο 0,2 %, ενώ την πρώτη θέση ως χώρα παραγωγής κατέλαβε ο Καναδάς με παραγωγή 18 εκατομμύρια τόνων.

## 1.6 Το Λάχανο (*Brassica oleracea*)

Στην έρευνα που πραγματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής διατριβής, οι παθογόνοι οργανισμοί που απομονώθηκαν, προερχόταν από φυτά λάχανου, που καλλιεργήθηκαν στο αγρόκτημα του Ε.Α.Κ.Κ.Ν Κασσαβετείας κατά την καλλιεργητική περίοδο 2019-2020. Το πείραμα αγρού που θα παρουσιαστεί, πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας φυτά λάχανου *B. oleracea* (*var. capitata*) και για το λόγο αυτόν κρίνεται απαραίτητο να γίνει αναφορά στον βιολογικό κύκλο του φυτού, καθώς και στις χρήσεις του.

Το λάχανο (*Brassica oleracea var. capitata f. alba*) ανήκει στην οικογένεια των σταυρανθών (Brassicaceae) και χρησιμοποιείται από πολύ παλιά ως εδώδιμο προϊόν, καθώς και στην παραδοσιακή ιατρική, όπου είναι γνωστό σαν το “φάρμακο των φτωχών”, με χρήση στην αντιμετώπιση των φλεγμονών, των γαστρεντερικών προβλημάτων και τον καθαρισμό του αίματος. Λέγεται μάλιστα, πως ο φιλόσοφος Αριστοτέλης, κατανάλωνε λάχανο πριν από μία οινοποσία προκειμένου να μην νιώσει τις ανεπιθύμητες ενέργειες της (Hatfield, 2004;

Cavender, 2006; Passalacqua et al., 2007). Είναι φυτό με διετή βιολογικό κύκλο και καλλιεργείται για την κεφαλή του, της οποίας το σχήμα διαμορφώνεται από την πυκνή ανάπτυξη των φύλλων που την συνθέτουν. Η κεφαλή δημιουργείται κατά το πρώτο έτος, ενώ η άνθιση και η σποροπαραγωγή του πραγματοποιούνται κατά το δεύτερο έτος του βιολογικού κύκλου (Samec et al., 2017).

Λόγω της μεγάλης διαθεσιμότητας στην αγορά, την προσιτή του τιμή και την προτίμηση του από τους καταναλωτές, κατέχει σημαντική θέση στο καθημερινό διαιτολόγιο (Samec et al., 2017). Είναι μία τροφή πλούσια σε θρεπτικά και γνωστή ως σημαντική πηγή γλυκοσινολατών, φαινολικών συστατικών, καροτινοειδών και βιταμίνης C με γνωστές αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες (Podsdek, 2007; Park et al., 2014a,b).

Το λάχανο είναι φυτό που απαιτεί δροσερό και υγρό κλίμα. Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης του φυτού κυμαίνεται κατά μέσο όρο στους 17°C, με την ανώτατη να φτάνει στους 24°C και την κατώτατη στους 10°C και η σχετική υγρασία μεταξύ 60 – 90%. Η συνολική περίοδος ανάπτυξης του ποικίλει (90 ημέρες για ανοιξιάτικη και 200 ημέρες για τη φθινοπωρινή σπορά), η οποία εξαρτάται από το κλίμα, την ποικιλία και την ημερομηνία σποράς ή μεταφύτευσης. Για μια καλή παραγωγή, απαιτούνται περίπου 120 – 140 ημέρες ανάπτυξης. Όσον αφορά τη θερμοκρασία, οι περισσότερες ποικιλίες αντέχουν σε μία σύντομη περίοδο παγετού με θερμοκρασίες έως -6°C, ενώ οι πιο ανθεκτικές έως -10°C. Παρατεταμένες όμως περίοδοι χαμηλών θερμοκρασιών για διαστήματα μεταξύ 30 - 60 ημερών στους -5°C, μπορούν να προκαλέσουν σημαντικές βλάβες στο φυτό. Την περίοδο αυτή, φυτά με φύλλα μήκους μικρότερα από 3 cm, παρουσιάζουν αυξημένη αντοχή στον παγετό, ενώ στην περίπτωση που τα φυτά είναι ανεπτυγμένα και έχουν αποκτήσει μήκος φύλλων 5–7 cm, επηρεάζονται άμεσα με αρνητικές συνέπειες στην απόδοση και την ποιότητά τους (FAO, 2021).

Η περίοδος ανάπτυξης του λάχανου χωρίζεται σε τέσσερα στάδια. Τα πρώτα δύο στάδια περιλαμβάνουν την περίοδο εγκατάστασης και τη βλαστική ανάπτυξη. Η βλαστική ανάπτυξη του λάχανου χαρακτηρίζεται από αργό ρυθμό και η περίοδος αυτή κυμαίνεται μεταξύ 50 ημερών (για ποικιλίες πρώιμης ωρίμανσης) και 100 ημερών (για ποικιλίες όψιμης ωρίμανσης). Τα επόμενα δύο στάδια περιλαμβάνουν την ποσοτική ανάπτυξη, η οποία αποκαλείται κοινώς ως γέμισμα και την ωρίμανση. Κατά τις περιόδους αυτές, το φυτό διπλασιάζει συνεχώς το βάρος του κάθε εννέα ημέρες, για συνολικό διάστημα 50 ημερών. Στην περίοδο της ποσοτικής ανάπτυξης, ξεκινά η ανάπτυξη των κεφαλών ακολουθούμενη από μία ξαφνική μείωση του ξεδιπλώματος των εξωτερικών φύλλων έως την πλήρη παύση τους, ενώ παράλληλα συνεχίζεται η αύξησή τους. Το αποτέλεσμα αυτής της λειτουργίας είναι



η δημιουργία μίας προστατευτικής επιδερμίδας, αποτελούμενης από παλαιότερα φύλλα, κάτω από τα οποία αυξάνονται τα νεότερα. Η περίοδος αυτή συνεχίζεται μέχρι τον σχηματισμό μιας σκληρής, συνεκτικής, ώριμης κεφαλής, που περιλαμβάνει το στάδιο ωρίμανσης, το οποίο διαρκεί 10 – 20 ημέρες (FAO, 2021).

Η προμήθεια λάχανου μπορεί να πραγματοποιείται καθ' όλη την διάρκεια του έτους καθώς είναι δυνατή η αποθήκευσή του για μεγάλα χρονικά διαστήματα, 3-6 μήνες, πριν την τελική του διάθεση στην αγορά (FAO, 2021).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ, ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΤΩΝ ΣΤΑΥΡΑΝΘΩΝ

Από την καλλιέργεια λάχανου του αγροκτήματος του Ειδικού Αγροτικού Καταστήματος Κράτησης Νέων Κασσαβετίας, κατά την καλλιεργητική περίοδο 2019-2020 (εικόνα 1), συλλέχθηκαν, απομονώθηκαν και διατηρήθηκαν, τρεις μύκητες που είχαν εμφανή συμπτώματα σε ώριμα φυτά λάχανου. Υστέρα από την εργαστηριακή εξέταση, ακολούθησε η αναγνώριση των μυκήτων με τη βοήθεια της μικροσκοπίας, και προσδιορίστηκε ότι τα παθογόνα που απομονώθηκαν, ανήκαν στα είδη *Plenodomus lingam*, *Alternaria brassica* και *Sclerotinia sclerotiorum*.



**Εικόνα 1.** Καλλιέργεια λάχανου στο αγρόκτημα του Ε.Α.Κ.Κ.Ν Κασσαβέτιας την καλλιεργητική περίοδο 2019-2020. (Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Π.Θ)

Στη συνέχεια γίνεται αναφορά στα παθογόνα και τη βιολογία τους, τα συμπτώματα και την αντιμετώπιση τους.

### 2.1 *Plenodomus lingam*

#### 2.1.1 Ταξινόμηση – Περιγραφή

Ο παθογόνος μύκητας *Plenodomus lingam* (συν. *Sphaeria lingam*, *Sphaeropsis lingam*, *Phoma lingam*, *P. lingam* var. *napobrassicae*, *P. napobrassicae*, *P. brassicae*, *P. densiuscula*, *Plenodomus rabenhorstii*, *Aposphaeria brassicae*, *Sphaeria maculans*, *Leptosphaeria maculans*, *Pleospora maculans*, *Heptameria maculans*, *Phyllosticta turritis*,

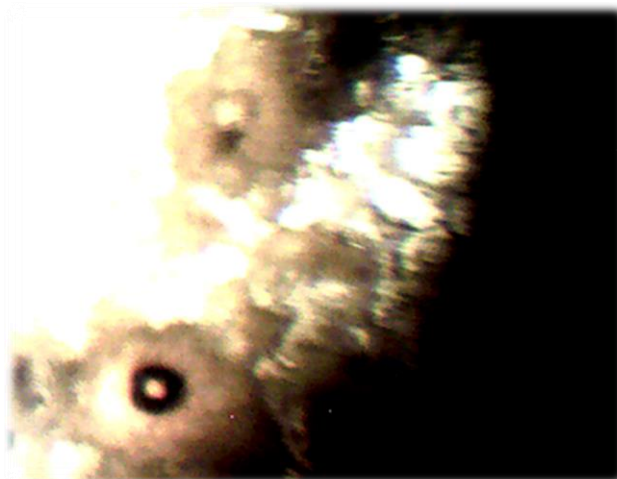
*Depazea brassicicola*, *D. vagans* var. *brassicae*, *Aposphaeria densiuscula*, *Coniothyrium densiusculum*, *Septoria brassicae*, *Phyllosticta brassicae*, *Sphaeria brassicae*, *Depazea brassicae*, *Sclerotium sphaeriiforme* και *S. sphaeriaeforme*), ανήκει στην Οικογένεια: Leptosphaeriaceae, Τάξη: Pleosporales, υποκλάση: Pleosporomycetidae, Κλάση: Dothideomycetes, Υποσυνομοταξία: Pezizomycotina της Συνομοταξίας: Ascomycota (Mycobank, 2021).

Σύμφωνα με τον Williams (1992), ο Tode (1791) περιγράφει τον μύκητα *Sphaeria lingam*, ένα σαπροφυτικό είδος που παρατήρησε σε νεκρό ιστό κόκκινου λάχανου και πενήντα οκτώ χρόνια αργότερα, ο Desmazieres (1849) απομονώνει τον ίδιο μύκητα, αυτή τη φορά όμως από ζωντανό φυτικό ιστό σταυρανθών και ανακατατάσσει το είδος στο γένος *Phoma*. Έκτοτε ο μύκητας *Phoma lingam* έχει αναγνωρισθεί ως σημαντικός μυκητολογικός εχθρός των σταυρανθών (Punithalingham & Holliday, 1972). Ο μύκητας προσβάλλει όλα τα φυτικά όργανα του φυτού, προκαλώντας ποικιλία συμπτωμάτων και για το λόγο αυτόν, η ασθένεια μπορεί να απαντηθεί ακόμα με κοινές ονομασίες που αναφέρονται στη συμπτωματολογία του, όπως: black leg, dry rot, stem and leaf canker, canker disease, scollar rot, stem rot και leaf rot (Williams, 1992; Παναγόπουλος, 1995) ενώ στην ελληνική βιβλιογραφία αναφέρεται ως ο μάυρος λαίμος (Παναγόπουλος, 1995). Στην Ελλάδα, η πρώτη προσβολή του παθογόνου καταγράφηκε το 1971 στο νησί της Ευβοίας (Παναγόπουλος, 1995).

Ο μύκητας *Plenodomus lingam* συναντάται παράλληλα με εγγενή και αγενή μορφή. Ο χαρακτηρισμός της ασθένειας πραγματοποιείται βάση της πηγής του μολύσματος, σε πολυκυκλική ή μονοκυκλική. Σύμφωνα με τα παραπάνω, στην περίπτωση που η μόλυνση πραγματοποιείται από ασκοσπόρια χαρακτηρίζεται ως μονοκυκλική, ενώ στην περίπτωση που πραγματοποιείται από πυκνιδιοσπόρια χαρακτηρίζεται ως πολυκυκλική (Li et al., 2007).

Η ατελής μορφή του μύκητα παράγει ασκοκάρπια στους βλαστούς και τα φύλλα. Το σχήμα τους είναι σφαιροειδές, το χρώμα τους μαύρο και η διάμετρος της οστιόλης τους είναι 300-500 μm, και περιέχουν ασκούς με ασκοσπόρια. Οι ασκοί είναι κυλινδρικοί έως ροπαλοειδείς, άμισχοι ή με κοντό μίσχο, οκτάσποροι και έχουν διαστάσεις 80-125 x 15-22 μm. Τα ασκοσπόρια βρίσκονται διατεταγμένα σε δύο σειρές, το σχήμα τους είναι κυλινδρικό προς ελλειψοειδής με αρκετά στρογγυλεμένες απολήξεις, το χρώμα τους είναι κίτρινο-καφέ και δεν περιορίζονται στο κεντρικό διάφραγμα που παρουσιάζει διαστάσεις 35-70 x 5-8 μm. Οι ψευδοπαραφύσεις τους είναι τριχοειδής, δίχωρες και υαλώδεις (Mycobank, 2021).

Οι κηλίδες της ασθένειας, εμφανίζονται σε φύλλα και βλαστούς και σχηματίζουν δύο τύπους πυκνιδίων. Ο ένας τύπος πυκνιδίου που αποτελεί τη σκληρωτινοειδή μορφή, διαρρηγνύεται όταν βυθίζεται, εμφανίζεται σποραδικά, ποικίλει σε σχήμα, αρχικά είναι κυρτός και στη συνέχεια γίνεται συμπιεσμένος και κοίλος, ενώ μερικές φορές αναπτύσσεται χωρίς να σχηματίζει κάποιο συγκεκριμένο σχήμα. Παρουσιάζουν επίσης στενή οστιόλη και τοιχώματα που αποτελούνται από αρκετά στρώματα, πυκνών



**Εικόνα 2.** Πυκνίδιο του *Plenodomus lingam* στο μικροσκόπιο. Λήψη με οπτικό μικροσκόπιο x 400. (Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Π.Θ)

σκληρεγγυματικών κυττάρων. Ο δεύτερος τύπος σχηματίζει στρογγυλά πυκνίδια σκοτεινού χρώματος, διαστάσεων 200-600  $\mu\text{m}$  σε διάμετρο και αποτελείται από πυκνά στρώματα κυττάρων εξωτερικά. Τα κονίδια που παράγονται είναι υαλώδη, στενά και κάποιες φορές κυρτά, μονοκύτταρα, κυλινδρικά χωρίς διαφράγματα και παρουσιάζουν διαστάσεις 3-5 X 1,5-2  $\mu\text{m}$  (Vagelas, 2009; Mycobank, 2021). Παρόμοιες μετρήσεις και αποτελέσματα έγιναν και στις δικές μας απομονώσεις. Η τέλεια μορφή του παθογόνου σχηματίζει ψευδοθήκια στα υπολείμματα της καλλιέργειας. Το σχήμα τους είναι κυλινδρικό έως ελλειψοειδές, είναι πολυκύτταρα με εγκάρσια χωρίσματα, έχουν χρώμα κίτρινο-καστανό και διαστάσεις 35-70 X 5-8  $\mu\text{m}$  (Παναγόπουλος, 1995; Lo-Pelzer et al., 2009).

Η απελευθέρωση των πυκνιδιοσπορίων γίνεται με την παρουσία νερού και διασπείρονται σε μικρές αποστάσεις μέσα στον αγρό (Παναγόπουλος, 1995). Η διαχείμαση του παθογόνου πραγματοποιείται σε φυτικά υπολείμματα, όπου μπορεί να επιβιώσει για διάστημα τριών ετών, αλλά μπορεί να γίνει και μέσα ή πάνω στην επιφάνεια του σπόρου (Humpherson & Jones, 1985). Καθώς ωριμάζουν τα ψευδοθήκια και ξεκινούν οι βροχοπτώσεις, τα ασκοσπόρια εκτοξεύονται από την οστιόλη και παρασύρονται σε μεγάλες αποστάσεις με τη βοήθεια του ανέμου, προκαλώντας νέες μολύνσεις. Οι ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη της ασθένειας είναι η βροχόπτωση, το υγρό περιβάλλον και θερμοκρασίες μεταξύ 18-24°C (Παναγόπουλος, 1995).

Το παθογόνο έχει αναπτύξει διάφορους μηχανισμούς επιβίωσης κατά τη διάρκεια του βιολογικού του κύκλου. Η κύρια διασπορά πραγματοποιείται μέσω των σπόρων και των υπολειμμάτων της καλλιέργειας. Τα πυκνίδια και τα ψευδοθήκια επιβιώνουν κάτω από

ιδανικές συνθήκες θερμοκρασίας, ακτινοβολίας και υψηλής σχετικής υγρασίας και παράγουν άφθονες ποσότητες κονιδίων και αερομεταφερόμενων ασκοσπορίων. Τα κονίδια και οι βλαστικοί σωλήνες των ασκοσπορίων εισάγονται στους ιστούς μέσω των στοματίων και πληγών που μπορεί να υπάρχουν. Οι υφές αναπτύσσονται ανάμεσα από τα κύτταρα των φυτικών ιστών, δημιουργώντας μία βιοτροφική σχέση με τα κύτταρα των φυτών (Hammond & Lewis, 1987). Ακολουθώντας αυτή την ασυμπτωματική φάση, ο μύκητας προκαλεί το θάνατο των φυτικών κυττάρων, αφαιρώντας θρεπτικά στοιχεία από τα φύλλα και τους βλαστούς στα σημεία της προσβολής, προκειμένου να υποστηρίξει την παραγωγή πυκνιδίων με άφθονα πυκνιδιοσπόρια. Η ζωηρή ανάπτυξη και παραγωγή πυκνιδίων και πυκνιδιοσπορίων, καθώς και η μη εκλεκτικότητα του σε θρεπτικά υποστρώματα, αποδίδεται στον ισχυρό σαπροφυτικό του χαρακτήρα. Στη φύση, το παθογόνο *P. lingam* εμμένει κυρίως ως σαπροφυτικό είδος, προσβάλλοντας ιστούς σταυρανθών που έχουν νεκρωθεί από άλλα αίτια (Punithalingam & Holliday, 1972).

Η εγκατάσταση, η επιβίωση και οι τροφικές σχέσεις του παθογόνου με τον νεκρό ιστό δεν έχει κατανοηθεί πλήρως. Αν και είναι γνωστό ότι τα ασκοκάρπια αναπτύσσονται στα στελέχη της ελαιοκράμβης, δεν είναι γνωστό πώς και γιατί αναπτύσσονται σε αυτά τα υπολείμματα (Gladders & Musa, 1980). Έτσι δημιουργούνται ερωτήματα σχετικά με την αλλαγή που πιθανόν να πραγματοποιείται στα θρεπτικά συστατικά των φυτικών υπολειμμάτων και την επίδραση των φυσικών παραγόντων του περιβάλλοντος, όπως η θερμοκρασία, η ακτινοβολία και η ύπαρξη φυσικών θρεπτικών υποστρωμάτων εντός καλλιεργούμενων εκτάσεων ελαιοκράμβης, στην ικανότητα να υποστηρίξουν ή και να ευνοήσουν την ανάπτυξη και επιβίωση πυκνιδίων και ψευδοθηκίων. Οι απαντήσεις σε αυτά τα ερωτήματα θα είχαν μεγάλη σημασία για την κατανόηση της επιδημιολογίας, καθώς και την εξέλιξη του μύκητα (Williams, 1992).

Κατανοώντας τη μορφή και τις φυσιολογικές συνθήκες πολλαπλασιασμού που ευνοούνται από την σαπροφυτική κατάσταση του, θα μπορούσε κανείς να οδηγηθεί σε συμπεράσματα που θα συμβάλλουν στην καλύτερη κατανόηση των συνθηκών του γενετικού του ανασχεδιασμού (εγγενή αναπαραγωγή). Η παραγωγή ψευδοθηκίων σε θρεπτικά υποστρώματα απαιτούν την παρουσία συζευκτικών τύπων, καθώς και έναν κατάλληλο συνδυασμό θερμοκρασιών, έκθεσης σε ακτινοβολία NUV και των απαραίτητων οργανικών θρεπτικών συστατικών (Hill & Williams, 1988; Petrie & Lewis, 1985). Για να πραγματοποιηθεί αυτό, αναπτύσσονται στο εργαστήριο οι κατάλληλοι συζευκτικοί τύποι σε τρυβλία που περιέχουν θρεπτικό υπόστρωμα V-8 άγαρ για 7 ημέρες στους 24°C. Κατόπιν, γίνεται προσθήκη 2% Water agar και στη συνέχεια επώαση στους 16°C με εναλλαγή

φωτοπεριόδου φως-σκοτάδι κάθε 12 ώρες. Με την τεχνική αυτή πραγματοποιείται άφθονη παραγωγή ψευδοθηκίων και ασκοσπορίων σε διάστημα τεσσάρων εβδομάδων (Williams, 1992).

Ο μύκητας παράγει την Sirodesmin PL φυτοτοξίνη, η οποία χαρακτηρίζεται ως μη εκλεκτική. Ανήκει στην κατηγορία eripolythiodioxoripazine (ETP) των δευτερογενών μεταβολιτών, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από την παρουσία δισουλφιδικού δεσμού (Gardiner et al., 2005). Η σημασία της στην εξέλιξη της ασθένειας όμως παραμένει άγνωστη (Pedras & Séguin-Swartz, 1992). Η παθογένεια αναπτύσσεται κατά την αγνή αναπαραγωγή του παθογόνου, η οποία είναι και η παρασιτική φάση του. Ο μύκητας παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία, όπως έχει αναφερθεί από τον Cunningham (1927), ο οποίος μελέτησε την παθογένεια και τα χαρακτηριστικά των καλλιεργειών 400 απομονώσεων του *P. lingam* σε ελαιοκράμβη, που λήφθηκαν από σπόρους και προσβεβλημένους φυτικούς ιστούς. Στις απομονώσεις του εμφανίστηκε η ύπαρξη δύο στελεχών, τα οποία διαφέρουν ως προς την επιδημιολογία, τη συμπτωματολογία και την παθογόνο δύναμη σε μερικούς ξενιστές, των οποίων η αναγνώριση πραγματοποιείται με τεχνικές όπως η PCR (Παναγόπουλος, 1995). Η άποψη αυτή ενισχύεται από τους Pound (1947), Petrie (1988), Delwiche (1980), Koch et al., (1989) και Hill et al., (1984), οι οποίοι αναφέρουν την ύπαρξη δύο κύριων ομάδων σε απομονώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε καλλιέργειες σταυρανθών στη Νότια Αμερική, την Αυστραλία, τη Νότια Αφρική και την Ευρώπη με διαφορετικά μορφολογικά χαρακτηριστικά και βιοχημικούς φαινοτύπους που διαφοροποιούν τα στελέχη (Williams, 1992).

Η in-vitro σύζευξη στελεχών που εμφανίζουν ισχυρή παθογένεια, γενικά παρήγαγε βιώσιμα ασκοσπόρια, παρόλο που η απομόνωσή τους έχει προέλθει από διαφορετικές απομακρυσμένες περιοχές, ενώ η in-vitro σύζευξη μεταξύ στελεχών που παρουσιάζουν ισχυρή παθογένεια και αυτών που δεν παρουσιάζουν, δεν επιτυγχάνεται (Gabrielson, 1983) και δεν έχει παρατηρηθεί επίσης σύζευξη μεταξύ διαφορετικών στελεχών στη φύση. Η αποτυχία διασταυρώσεων και οι ισχυρές ενδείξεις ύπαρξης διαφορετικών φαινοτύπων αποδεικνύει ότι τα στελέχη που προσβάλουν τα σταυρανθή δεν μπορούν να αναπαραχθούν με άλλα είδη και ότι τα δύο διαφορετικά στελέχη αποτελούν ξεχωριστά είδη (Williams, 1992).

Η μετάδοση γίνεται από μολυσμένο σπόρο, όπου κάτω από το περίβλημα του, υπάρχει αδρανές μυκήλιο. Επίσης μπορεί να γίνει και με αερομεταφερόμενα ασκοσπόρια από τα υπολείμματα των ξενιστών. Μπορεί επίσης να παραμείνει για 3 έτη σε οργανικά υπολείμματα.

## 2.1.2 Συμπτωματολογία

Η ασθένεια του μαύρο λαιμού, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, μπορεί να προσβάλλει όλα τα φυτικά όργανα σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του. Τα πρώτα συμπτώματα της ασθένειας μπορούν να φανούν στα φυτάρια σαν ανοιχτόχρωμες αλλοιώσεις στο βλαστό, στις κοτυληδόνες και στα πρώτα φύλλα. Εάν η προσβολή πραγματοποιηθεί 2-3 εβδομάδες πριν τη μεταφύτευση, μπορεί να προκαλέσει τήξεις των φυταρίων. Στα φύλλα παρατηρούνται χλωρωτικές κηλίδες με διάμετρο 5 - 15 mm, οι οποίες αργότερα αποκτούν σταχτόχρωμο κέντρο όπου εμφανίζονται τα πυκνίδια του παθογόνου

σαν διάσπαρτα πολυάριθμα στίγματα. Στο στέλεχος δεν εμφανίζονται κηλίδες, αλλά επιμήκεις αλλοιώσεις, που μπορεί να περιβάλλονται από ιώδες περίγραμμα. Σε φυτά μεγαλύτερης ηλικίας η προσβολή εντοπίζεται στη βάση του στελέχους ως ξηρό βυθισμένο έλκος. Όσες κηλίδες βρίσκονται χαμηλά στο στέλεχος μπορεί να επεκτείνονται και στη ρίζα, δημιουργώντας έλκη σκούρου χρώματος πάνω στα οποία θα αναπτυχθούν πυκνίδια. Σε περίπτωση που τα έλκη περιβάλλουν το στέλεχος, αυτό μπορεί να σπάσει ως αποτέλεσμα του βάρους της κεφαλής. Η συμπτωματολογία που παρουσιάζεται στα υπόλοιπα μέρη του φυτού (ελάσματα νεύρων ανεπτυγμένων φυτών, ανθοφόρα στελέχη, καρποί) είναι παρόμοια με αυτή που περιγράφηκε παραπάνω. Σε έντονες προσβολές παρουσιάζονται και ξηράνσεις φυτών. Η διάγνωση της ασθένειας μπορεί να γίνει με



**Εικόνα 3.** Χαρακτηριστική εμφάνιση πυκνιδίων του παθογόνου εντός της κηλίδας. (Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Π.Θ)



**Εικόνα 4.** Προσβολή στην κεντρική νεύρωση του φύλλου, όπου κατευθύνεται για να προσβάλει τον λαιμό του φυτού. (Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Π.Θ)

ασφάλεια από την παρουσία των πυκνιδίων στους προσβεβλημένους ιστούς (Παναγόπουλος, 1995; Vagelas, 2009).

### 2.1.3 Αντιμετώπιση

Σύμφωνα με τον Παναγόπουλο (1995), η αντιμετώπιση της ασθένειας πραγματοποιείται μέσω της λήψης μέτρων φυτουγείας, την εφαρμογή καλλιεργητικών τεχνικών, καθώς και με την εφαρμογή χημικής φυτοπροστασίας. Τα μέτρα φυτουγείας που λαμβάνονται, είναι η χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού και η απολύμανση των σπόρων, η οποία πραγματοποιείται με εμβάπτιση τους σε ζεστό νερό θερμοκρασίας 50°C και διάρκεια 25 min για το λάχανο και 20 min για το κουνουπίδι και το μπρόκολο (Παναγόπουλος, 1995).

Η συνεχής αυξανόμενη καλλιεργούμενη έκταση των ελαιούχων φυτών των σταυρανθών σε Αυστραλία, Καναδά και Ευρώπη αύξησε παράλληλα και τον πληθυσμό του *P. lingam*. Η αυξανόμενη διασπορά των αερομεταφερόμενων ασκοσπορίων βοήθησε επίσης στην εξέλιξη του μύκητα και την επιδημιολογία της ασθένειας (McGee & Petrie 1979; Gladders & Musa 1980; Hammond & Lewis 1986). Λαμβάνοντας υπόψη το μεγάλο αριθμό κονιδίων που διασπείρει ο μύκητας στο περιβάλλον, η στρατηγική που αναπτύχθηκε σχετικά με τον έλεγχο του παθογόνου, εστιάστηκε στην παραγωγή υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού (σπόρου και φυταρίων) απαλλαγμένου από το παθογόνο. Η στρατηγική αυτή έχει σκοπό την παρεμπόδιση της διασποράς των πρωτογενών εστιών μόλυνσεων σε μεγάλες αποστάσεις, καθώς και την αποτροπή της διασποράς σε τοπικό επίπεδο, χρησιμοποιώντας τεχνικές όπως η αμειψισπορά, την απομόνωση της καλλιέργειας και η εφαρμογή αυστηρών μέτρων φυτουγείας στο φυτώριο (Walker, 1952). Η εφαρμογή καλλιεργητικών μέτρων, που προτείνεται είναι η αμειψισπορά, η καταστροφή των ζιζανίων για διάστημα 3-4 ετών, καθώς και η απομάκρυνση-καταστροφή των προσβεβλημένων φυτών από τον αγρό, βοηθώντας



Εικόνα 5. Μεταχρωματισμός του λαιμού από την προσβολή του *Plenodomus lingam*. (Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Π.Θ)



σημαντικά στη μείωση των πρωτογενών εστιών μόλυνσης του παθογόνου (Παναγόπουλος, 1995).

Παρόλο που η λήψη των παραπάνω μέτρων μείωσε σημαντικά το ύψος των προσβολών από τον μύκητα σε σταυρανθή που καλλιεργούνται για βρώσιμα λαχανικά και για ζωοτροφές (Williams, 1980), δεν ήταν αρκετά για τον περιορισμό των προσβολών στα ελαιούχα σταυρανθή (Williams, 1992). Οι συνεχείς αυξανόμενοι πληθυσμοί του και η πυκνότητά του, καθώς και η γενετική παραλλακτικότητα (genetic complexity) που παρουσιάζει το παθογόνο έχει οδηγήσει στην ανάγκη περαιτέρω έρευνας, ώστε να προκύψουν νέα δεδομένα σχετικά με την βιολογία του (Williams, 1992).

Η χημική καταπολέμηση πραγματοποιείται με ψεκασμό των φυτών και του εδάφους, με κατάλληλα μυκητοκτόνα (Παναγόπουλος, 1995). Στην Ελλάδα δυστυχώς, για την αντιμετώπιση του παθογόνου σε σταυρανθή που καλλιεργούνται για λαχανικά και στην ελαιοκράμβη, έγκριση υπάρχει μόνο για τη δραστική ουσία Tebuconazole (FRAC, 3) της χημικής ομάδας των τριαζολών (ΥΠΑΑΤ, 2021c).

## **2.2 *Alternaria* spp. (*Alternaria brassicae* - *Alternaria brassicicola*)**

Το γένος των μυκήτων *Alternaria* περιλαμβάνει 299 είδη (Kirk et al., 2008), από τα οποία τα περισσότερα είναι σαπροφυτικά και απαντώνται ιδιαίτερα στο έδαφος και σε φυτικούς ιστούς που βρίσκονται σε αποσύνθεση (Bart & Thomma, 2003) και χαρακτηρίζεται ως μια πολυκυκλική ασθένεια (Meena et al., 2017; Kumar et al., 2014). Οι μύκητες πολλαπλασιάζονται αγενώς μέσω αερομεταφερόμενων κονιδιοσπορίων ενώ η εγγενής αναπαραγωγή πραγματοποιείται σπάνια (Nowiki, 2012). Προσβάλλουν κυρίως, φύλλα, βλαστούς, άνθη και καρπούς μονοετών φυτών, λαχανοκομικά και ανθοκομικά είδη, καθώς και δενδρώδεις καλλιέργειες, όπως τα εσπεριδοειδή και τα μηλοειδή. Οι ασθένειες που προκαλούνται από τους μύκητες του γένους *Alternaria* είναι ιδιαίτερα διαδεδομένες σε όλο τον κόσμο και είναι γνωστές στη διεθνή βιβλιογραφία με ονόματα όπως *Alternaria leaf spot*, *dark leafspot*, *black mold*, *gray leaf mold*, *black spot of cabbage* και *brown rot of cauliflower* ενώ στην ελληνική βιβλιογραφία αναφέρονται ως Αλτερναρίωση (Παναγόπουλος, 1995). Οι συνολικές απώλειες που προκαλούνται από τα είδη του γένους *Alternaria* θεωρούνται οι πιο σημαντικές συγκριτικά με κάθε άλλο παθογόνο (Agrios, 2005).

Παρακάτω, αναλύονται ταυτόχρονα οι μύκητες *A. brassicae* και *A. brassicicola* που προσβάλλουν φυτά της οικογένειας των σταυρανθών για την κατανόηση των ομοιοτήτων και των διαφορών τους.

## 2.2.1 Ταξινόμηση – *A. brassicae*

Ο παθογόνος μύκητας *Alternaria brassicae* (συν. *Macrosporium brassicae*, *M. brassicae* var. *macrosporum*, *M. macrosporum*, *M. herculeum*, *Alternaria brassicae* subsp. *brassicae*, *A. brassicae* var. *macrospora*, *A. saccardoii*, *A. macrospora*, *A. exitiosa*, *A. brassicae* var. *exitiosa*, *A. herculea*, *A. alliariae-officinalis*, *Cercospora bloxamii*, *C. bloxami*, *C. lepidii*, *C. moldavica*, *Sporidesmium exitiosum*, *S. onnii* και *Polydesmus exitiosus*), ανήκει στην Οικογένεια: Pleosporaceae, Τάξη: Pleosporales, υποκλάση: Pleosporomycetidae, Κλάση: Dothideomycetes, Υποσυνομοταξία: Pezizomycotina της Συνομοταξίας: Ascomycota (Mycobank, 2021).

Οι αποικίες του μύκητα αναπτύσσονται αμφιγενώς και διάσπαρτα στο φύλλο. Το χρώμα τους είναι περίπου ελαιώδες και είναι χνουδωτές. Το μυκήλιο του είναι βυθισμένο, η υφή του φέρει διακλαδώσεις και διαφράγματα, η επιφάνεια του είναι λεία, το χρώμα του είναι υαλώδες και το πλάτος του είναι 4-8 μm. Οι κονιδιοφόροι εκτείνονται από την υφή και ξεπροβάλλουν μέσα από τα στομάτια, κατά ομάδες των 2-10 ή και περισσότεροι κονιδιοφόρων. Είναι απλοί, όρθιοι, ευθείς ή με κυρτώσεις, παρουσιάζουν συχνά γόνατα και μοιάζουν περισσότερο κυλινδρικοί, ενώ είναι συχνά διογκωμένοι στη βάση τους. Παρουσιάζουν διαφράγματα με χρώμα από γκρι ως ελαιώδες, η επιφάνεια τους είναι λεία και οι διαστάσεις τους φθάνουν έως τα 170 μm ύψος και 6-11 μm πλάτος. Τα κονίδια παράγονται συνήθως μεμονωμένα, αλλά απαντώνται και σε κοντές αλυσίδες έως τέσσερα σπόρια, των οποίων η έκπτυξη πραγματοποιείται ακροπλευρικά μέσα από μικρούς πόρους στα τοιχώματα των κονιδιοφόρων. Είναι ίσιοι ή κυρτοί με ράμφος, έχουν (16-) 11-15 (-19) εγκάρσια διαφράγματα και 0-3 (-8) επιμήκη ή πλάγια διαφράγματα με αχνό έως πολύ αχνό ελαιώδες ή γκριζο-ελαιώδες χρώμα. Η επιφάνεια τους είναι λεία, παρουσιάζει σπάνια προεξοχές και οι διαστάσεις τους κυμαίνονται μεταξύ 75 -350 μm μήκος με 20-30 (-40) μm πλάτος στο πιο ανοιχτό σημείο. Το ράμφος τους έχει μήκος περίπου το 1/3 του μισού μήκους του κονιδίου και 5-9 μm πλάτος (Mycobank, 2021).

Η θερμοκρασία ανάπτυξης του μύκητα κυμαίνεται μεταξύ 6-37°C, αλλά η μόλυνση πραγματοποιείται σε άριστες θερμοκρασίες μεταξύ 17-24°C (Παναγόπουλος, 1995).

## 2.2.2 Ταξινόμηση – *A. brassicicola*

Ο παθογόνος μύκητας *Alternaria brassicicola* (συν. *Helminthosporium brassicicola*, *H. brassicae*, *Alternaria oleracea*, *A. circinans*, *A. brassicae* \* *minor*, *Macrosporium circinans*, , *M. commune* var. *circinans*, *Sporidesmium exitiosum* f. *alternarioides*,

*Sporidesmium exitiosum f. luxuriosum*, *Polydesmus exitiosus f. alternarioides* και *P. exitiosus f. luxuriosum*), ανήκει στην Οικογένεια: Pleosporaceae, Τάξη: Pleosporales, υποκλάση: Pleosporomycetidae, Κλάση: Dothideomycetes, Υποσυνομοταξία: Pezizomycotina της Συνομοταξίας: Ascomycota (Mycobank, 2021).

Οι αποικίες του μύκητα αναπτύσσονται αμφιγενώς και διάσπαρτα στο φύλλο. Το χρώμα τους είναι σκούρο ελαιώδες καφέ έως σκούρο μαύρο καφέ, με βελούδινη όψη. Το μυκήλιο του είναι βυθισμένο, η υφή του φέρει διακλαδώσεις και διαφράγματα με λεία επιφάνεια. Το χρώμα του είναι υαλώδες στην αρχή και αργότερα γίνεται καφέ ή ελαιώδες καφέ. Είναι εσωκυτταρικό ή εξωκυτταρικό και το πλάτος του είναι 1,5-7,5  $\mu\text{m}$ . Οι κονιδιοφόροι εκτείνονται από την υφή και ξεπροβάλλουν μέσα από τα στομάτια, κατά ομάδες των 2-12 ή και περισσότερων κονιδιοφόρων. Είναι απλοί, όρθιοι, ευθείς ή με κυρτώσεις, παρουσιάζουν συχνά γόνατα και μοιάζουν περισσότερο κυλινδρικοί, ενώ είναι συχνά διογκωμένοι στη βάση τους. Παρουσιάζουν διαφράγματα με χρώμα ωχρό έως ελαφρά καφέ ελαιώδες, η επιφάνεια τους είναι λεία και οι διαστάσεις τους φθάνουν έως τα 70  $\mu\text{m}$  ύψος με 5-8  $\mu\text{m}$  πλάτος. Τα κονίδια απαντώνται συνήθως σε αλυσίδες έως 20 και περισσότερων σπορίων και οι αλυσίδες αυτές συχνά παρουσιάζουν διακλαδώσεις, ενώ η έκπτυξη πραγματοποιείται ακροπλευρικά μέσα από μικρούς πόρους στα τοιχώματα των κονιδιοφόρων. Είναι ίσοι ή περίπου κυλινδρικοί και παρουσιάζουν συρρίκνωση προς την κορυφή ή τη βάση. Το κύτταρο της βάσης είναι στρογγυλεμένο και το ράμφος συνήθως σχεδόν ανύπαρκτο. Το κύτταρο της κορυφής είναι περίπου ορθογώνιο και θυμίζει κομμένο κώνο. Είναι καλά ανεπτυγμένο, κοντό και παχύ, με 1-6 (-11) εγκάρσια διαφράγματα και συνήθως έως 6 επιμήκη διαφράγματα. Παρουσιάζει επίσης ωχρά έως σκούρα ελαιώδη διαφράγματα, όπου η επιφάνεια τους είναι λεία, η οποία αργότερα παρουσιάζει διογκώσεις και οι διαστάσεις τους κυμαίνονται μεταξύ 18-130  $\mu\text{m}$  μήκος και 8-30 πλάτος στο πιο ανοιχτό σημείο. Το ράμφος τους έχει μήκος περίπου το 1/6 του μήκους του κονιδίου και το πλάτος κυμαίνεται μεταξύ 6-8- $\mu\text{m}$ . (Mycobank, 2021). Ο *Alternaria brassicicola* παρουσιάζει υψηλότερες απαιτήσεις ως προς τη θερμοκρασία για τη βλάστηση των κονιδίων, οι οποίες κυμαίνονται μεταξύ 33-35°C. Η ανάπτυξη του μυκηλίου πραγματοποιείται μεταξύ 25-27°C και οι μολύνσεις σε θερμοκρασία μεταξύ 28-31°C (Παναγόπουλος, 1995).

### 2.2.3 Περιγραφή

Τα κονίδια των ειδών του γένους *Alternaria* αποσπώνται εύκολα και διασπείρονται με τον άνεμο (Agrios, 2005). Σε συνθήκες χαμηλής υγρασίας διευκολύνεται η απελευθέρωση

των σπορίων, ενώ αντίθετα περιορίζεται από την υψηλή υγρασία. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η απελευθέρωση των σπορίων παρουσιάζει μία ημερήσια περιοδικότητα με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σπορίων να εμφανίζονται το απόγευμα, ενώ τις μικρότερες νωρίς το πρωί (Παναγόπουλος, 1995). Όταν προσγειωθούν σε γηρασμένο φυτικό ιστό βλασταίνουν και προκαλούν προσβολή. Σχετικά με τον μηχανισμό εισόδου τους, έχουν καταγραφεί τρεις τρόποι:

- με διάτρηση της επιδερμίδας,
- με απευθείας είσοδο μέσω των στοματίων και
- μηχανικά, μέσω εντόμων ή μέσω πληγών που δημιουργούνται κατά τις καλλιεργητικές φροντίδες.

Οι παραπάνω μύκητες παρουσιάζουν επίσης διακριτές διαφορές στο μηχανισμό εισόδου τους στο φυτικό ιστό. Ο *A. brassicae* εισέρχεται μόνο μέσω των στοματίων του φυτού, ενώ ο *A. brassicicola* κυρίως με απευθείας διάτρηση και λιγότερο μέσω στοματίων. Οι μυκηλιακές υφές και των δύο παθογόνων αναπτύσσονται πάρα πολύ καλά στην επιδερμίδα, στην περιοχή ακριβώς κάτω από τους κηρούς, ενώ η συχνότητα εισόδου στα κύτταρα είναι χαμηλή. Μετά από μια επιτυχημένη προσβολή και εγκατάστασή στα φύλλα, εμφανίζονται ομόκεντρες κηλίδες διαφόρων διαμέτρων που εμφανίζουν χλωρωτική ύαλο. Στους ξενιστές, η αντίδραση του φυτού εμφανίζεται άμεσα με καφέ χρωματισμό των κυτταρικών τοιχωμάτων και συγκεκριμένα των παραστομάτων περιοχών. Κάτω από ιδανικές συνθήκες, οι αλλοιώσεις καλύπτονται από καφέ-μαύρο εξάνθημα (Nowicki et al., 2012).

Τα σπόρια των μυκήτων βλασταίνουν σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών και η αποτελεσματικότητα της παθογένειας σχετίζεται με τη θερμοκρασία (Degenhardt et al., 1982). Σύμφωνα με μελέτες in-vitro, η σπορίωση του *A. brassicae* είναι θερμοεξαρτώμενη. Σε θερμοκρασίες μεταξύ 8-24°C η πλήρης ανάπτυξη των σπορίων μπορεί να παρατηρηθεί σε 24-14 ώρες αντίστοιχα, ενώ το εύρος θερμοκρασιών για τη σπορίωση του *A. brassicicola* είναι μεγαλύτερο, μεταξύ 18-30°C, όπου η πλήρης ανάπτυξη των σπορίων παρατηρείται μετά από 43-14 ώρες αντίστοιχα. Απαραίτητη προϋπόθεση για την εκδήλωση προσβολής και των δύο παθογόνων είναι η υψηλή ατμοσφαιρική υγρασία σε τιμές 95-100% σχετικής υγρασίας για διάστημα 9-18 ώρες (Humperson-Jones & Phelps, 1989). Σε συνθήκες περιβάλλοντος, είναι σύνηθες να παρατηρούνται αναφορές εκτεταμένης προσβολής σε θερμοκρασίες μεταξύ 20-27°C, όταν η υγρασία στη φυλλική επιφάνεια παραμένει για τουλάχιστον 5 ώρες και η σχετική υγρασία του περιβάλλοντος υπερβαίνει το 95% για τουλάχιστον 12-20 ώρες (Bart & Thomma, 2003).

Πολλά είδη του γένους *Alternaria* παράγουν τοξίνες, προσβάλλοντας ένα μεγάλο εύρος ξενιστών, ενώ κάποια άλλα είδη είναι εκλεκτικά (Agris, 2005). Τα σπόρια τους απαντώνται σχεδόν παντού στον αέρα και τη σκόνη και θεωρείται ένας από τους κύριους παράγοντες πρόκλησης αλλεργικής ρινίτιδας. Επιμολύνουν καλλιέργειες σε ερευνητικά εργαστήρια και αναπτύσσονται δευτερογενώς σε νεκρούς ιστούς που έχουν προσβληθεί από άλλα παθογόνα ή κάποια άλλη αιτία. Καθώς τα περισσότερα στελέχη του γένους *Alternaria* είναι σαπροφυτικοί οργανισμοί, προσβάλλουν μόνο γηρασμένα φυτικά όργανα και ώριμους καρπούς. Για το λόγο αυτόν είναι δύσκολο να ορίσει κανείς αν αποτελεί κύρια ή δευτερογενή προσβολή (Agris, 2005).

Οι μύκητες *A. brassicae* και *A. brassicicola* παράγουν φυτοτοξίνες που είναι εξειδικευμένες για κάθε ξενιστή (HST Host Specific Toxins) (Parada et al., 2008). Ως παράγωγα, οι τοξίνες λαμβάνουν σημαντική θέση στην εξέλιξη της παθογένειας, καθορίζοντας το εύρος των ξενιστών, καθώς και το επίπεδο τοξικότητας και παθογένειας του στελέχους (Nishimura & Kohmoto, 1983). Μέχρι σήμερα έχουν μελετηθεί και αναλυθεί με λεπτομερή τρόπο δύο τοξίνες τους, η AB τοξίνη του *A. brassicicola* (Otani et al., 1998) και η ABR τοξίνη του *A. brassicae* (Parada et al., 2008). Οι δύο παραπάνω τοξίνες είναι πρωτεΐνες που ευθύνονται για την πρόκληση συμπτωμάτων στα φυτά των σταυρανθών. Επιπροσθέτως, ο μύκητας *A. brassicae* παράγει έναν αριθμό φυτοτοξινών (destruxin B και παράγωγά του, όπως homodestruxin B, desmethyldestruxin B και B2), που είναι υπεύθυνες για τα τυπικά συμπτώματα του “black spot”, όπως οι νεκρωτικές και οι χλωρωτικές αλλοιώσεις. Η φυτοτοξίνη destruxin B, φαίνεται να ευθύνεται κυρίως για την πρόκληση νεκρωτικών αλλοιώσεων στα φύλλα και την πρόκληση παραγωγής των φυτοαλεξινών brassilexin και sinalbin A (Sodelade et al., 2012). Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι πλήθος ερευνητών κατατάσσει την destruxin B σαν μια εξειδικευμένη τοξίνη HST (Sodelade et al., 2012), ενώ άλλοι διαφωνούν υποστηρίζοντας τον μη εκλεκτικό της χαρακτήρα, αμφισβητώντας την απαραίτητη παρουσία της στην αρχική εγκατάσταση του στον ξενιστή (Buchwaldt & Gren, 1992, Parada et al., 2008). Κάποια στελέχη του *A. brassicae* παράγουν destruxin B ως την αποκλειστική τοξίνη τους, ενώ άλλα στελέχη έχουν τη δυνατότητα παραγωγής και παραγώγων της (homodestruxin B, desmethyl-destruxin B και B2) (Parada et al., 2008).

Οι παθογόνοι μύκητες του γένους *Alternaria* είναι επίσης ικανοί για την παραγωγή μη εκλεκτικών τοξινών και σε όλους τους προσβεβλημένους φυτικούς ιστούς, έχουν ανιχνευτεί τα οξέα alternarol και tenuazonic. Η προκαλούμενη κυτταροτοξικότητα από τα οξέα αυτά επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής διαδικασίας της απόπτωσης ενώ

υψηλές συγκεντρώσεις του οξέος tenuazonic, αναστέλλουν την σύνθεση πρωτεϊνών επηρεάζοντας αρνητικά τη βλάστηση (Tylkowska et al., 2003; Bart & Thomma, 2003). Ο *A. brassicae* παράγει επίσης αμψισικό οξύ, προκαλώντας πρόωρη γήρανση των φύλλων, αποφύλλωση, ανθόρροια και πρόωρη ρήξη των καψών (Tewari, 1991).

Η κύρια διασπορά του μολύσματος του παθογόνου πραγματοποιείται μέσω των προσβεβλημένων σπόρων και των φυτικών υπολειμμάτων στα ανώτερα εδαφικά στρώματα, τα οποία δεν έχουν αποσυντεθεί πλήρως, όπου διαχειμάζουν ως υφές ή σπόρια. Άλλη σημαντική πηγή για τη διάδοση του παθογόνου θεωρούνται τα ζιζάνια που ανήκουν στην οικογένεια *Brassicaceae*, λειτουργώντας ως ξενιστές (Humpherson-Jones, 1989), προκαλώντας διασπορά κονιδίων με τη βροχή και τον άνεμο κατά τη βλαστική περίοδο. Μεγάλο μέρος κονιδίων, απελευθερώνεται επίσης κατά τη συγκομιδή και την καταστροφή των υπολειμμάτων της καλλιέργειας από προσβεβλημένα φύλλα. Με την απελευθέρωση των κονιδίων, η διασπορά μπορεί να πραγματοποιηθεί σε μεγάλες αποστάσεις, φθάνοντας και τα 1800 μέτρα από την πηγή αρχικής μόλυνσης (Humpherson-Jones & Marude, 1982).

Η ανάπτυξη των παθογόνων ειδών του *Alternaria* στο εργαστήριο, μπορεί να επιτευχθεί με επιτυχία σε θρεπτικά υποστρώματα PDA (Potato Dextrose Agar) και V8 (V8-Juice Agar). Η in-vitro ανάπτυξη του παθογόνου δημιουργεί ταχύτατα αναπτυσσόμενες, πυκνές αποικίες συνήθως χρώματος πράσινου-μαύρου ή γκριζου-λευκού (Nowicki, 2012).

## 2.2.4 Συμπτωματολογία

Οι μύκητες του γένους *Alternaria* είναι υπεύθυνοι για πολυάριθμες κηλιδώσεις που εμφανίζονται συνήθως με ομόκεντρους κύκλους, νεκρώσεις, σηψιρριζίες και γενικότερα σήψεις (Τζάμος, 2007). Τα συμπτώματα τους παρουσιάζονται σε όλα τα φυτικά όργανα των ξενιστών ακόμα και στη νεαρή ηλικία των φυτών (Nowicki et al., 2012). Η ασθένεια εκδηλώνεται συνήθως με κηλιδώσεις και ξηράνσεις στα φύλλα (Agiros, 2005) και τις κεφαλές (Παναγόπουλος, 1995), αλλά προκαλεί και τήξεις φυταρίων, σήψεις βλαστών, κονδύλων, βολβών και καρπών (Agiros, 2005), καθώς και μετασυλλεκτικές σήψεις των κεφαλών (Παναγόπουλος, 1995).

Όταν η προσβολή πραγματοποιείται νωρίς, εμφανίζεται ένας επιμήκης χρωματισμός στην περιοχή της υποκοτύλης και των κοτυληδόνων, που οδηγεί συχνά σε λέπτυνση και σπάσιμο του στελέχους, προκαλώντας τήξη των φυταρίων. Σε μεγαλύτερα φυτά, η προσβολή πραγματοποιείται κυρίως στα χαμηλότερα και πιο παλιά φύλλα. Στα φυτά μπρόκολο και κουνουπίδι, οι προσβεβλημένες κεφαλές εμφανίζουν ελαφρά βαθουλώματα χρώματος καφέ,

στα οποία εμφανίζονται μαύρες καρποφορίες. Παρόλο που η προσβολή αυτή παραμένει στην επιφάνεια των κεφαλών και δεν αναπτύσσεται στο εσωτερικό τους, το αποτέλεσμα της προσβολής μειώνει την εμπορική αξία των προϊόντων (Nowicki, 2012).

Η έναρξη της προσβολής ξεκινά με την εμφάνιση πολυάριθμων μικρών χλωρωτικών περιοχών. Οι περιοχές αυτές εξελίσσονται σε μελανές, κυκλικές σε ζώνες και ελαφρά βυθισμένες στο κέντρο κηλίδες. Από την προσβολή στα φύλλα του *A. brassicicola* αναπτύσσονται σκούρες καφέ έως μαύρες ζωνώδεις κηλίδες με διάμετρο που κυμαίνεται μεταξύ 1-10 mm και προκαλεί ιδιαίτερες ζημιές σε καλλιέργειες που προορίζονται για σποροπαραγωγή (Mycobank, 2021). Από την προσβολή του *A. brassicae* αναπτύσσονται ζωνώδεις κηλίδες (εικόνα 6) ανοιχτού καφέ έως σκούρου καφέ ή γκρι κηλίδες με διάμετρο μεταξύ 0,5-12 mm, οι οποίες μπορεί να συνενωθούν (Mycobank, 2021).



**Εικόνα 6.** Παρουσία ζωνώδων κηλίδων σε φύλλο λάχανου, από την προσβολή του μύκητα *Alternaria brassicae* (Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Π.Θ)

Η προσβολή πραγματοποιείται συνήθως στα κατώτερα φύλλα, αλλά η ασθένεια εκδηλώνεται προοδευτικά και στα ανώτερα (Agrios, 2005). Όσο προχωρά η εκδήλωση της ασθένειας, οι κηλίδες αυξάνονται σε μέγεθος, οι προσβεβλημένοι ιστοί λεπταίνουν, ξεραίνονται και πολύ συχνά πέφτουν δημιουργώντας κοιλότητες, δίνοντας την όψη τρύπας από σκάγια (Παναγόπουλος, 1995; Nowicki et al., 2012). Στα στελέχη, τους μίσχους και τα νεύρα των φύλλων, εμφανίζονται επιμήκεις κηλίδες. Σε ώριμα φυτά κουνουπιδιού, η προσβολή εξελίσσεται γρήγορα και προκαλείται εκτεταμένη καστανή σήψη της κεφαλής (Παναγόπουλος, 1995). Αλλοιώσεις σε βλαστούς νεαρών φυταρίων μπορεί να προκαλέσουν έλκη που αυξάνονται σε μέγεθος, σφίγγουν το βλαστό και τελικά νεκρώνουν το φυτό (Agrios, 2005).

Το υψηλότερα ποσοστά προσβολών παρατηρούνται στις καλλιέργειες των σταυρανθών που προορίζονται για σποροπαραγωγή. Σε περίπτωση προσβολής των καψών, αυτές καταστρέφονται και μαραίνονται με αποτέλεσμα τη συρρίκνωση, τη διάρρηξη και την πτώση των σπόρων (Magude & Humpherson-Jones, 1980), γεγονός το οποίο εγείρει σημαντικές οικονομικές απώλειες. Σε σοβαρές προσβολές νεαρών καψών, οι σπόροι δεν

εξελίσσονται ή δεν ολοκληρώνουν την ανάπτυξή τους και παρουσιάζουν μειωμένη βλαστική ικανότητα (Chrigo & Harman, 1979). Οι υφές του μύκητα αναπτύσσονται στην επιφάνεια των σπόρων, αλλά και εσωτερικά κάτω από την επιφάνεια τους. Τα σπόρια που βρίσκονται εσωτερικά μπορούν να επιβιώσουν για μεγάλο χρονικό διάστημα, ενώ αυτά που βρίσκονται κάτω από την επιφάνεια θεωρούνται πιο ανθεκτικά (Marude & Humpherson-Jones, 1980). Οι προσβεβλημένοι σπόροι που θα αναπτυχθούν, θα παρουσιάσουν τυπικά συμπτώματα τήξης (μικρά μαύρα στίγματα στην κάτω φυλλική επιφάνεια ή σκούρες επιμήκεις γραμμές στην υποκοτύλη) (Nowiki et al., 2012).

## 2.2.5 Αντιμετώπιση

Η αντιμετώπιση του μύκητα επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της καλλιέργειας ανθεκτικών ποικιλιών, του υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού, της μυκητοκτόνου επικάλυψης σπόρων, καθώς και της εφαρμογής χημικών μυκητοκτόνων με ψεκασμό (Agrios, 2005). Η επάρκεια λίπανσης αζώτου φαίνεται να μειώνει τις προσβολές από το παθογόνο. Η αμειψισπορά, η καταστροφή των φυτικών υπολειμμάτων και η επιμελής ζιζανιοκτονία μειώνουν τις εστίες του μολύσματος, ευνοώντας τις ευαίσθητες καλλιέργειες που μπορεί να ακολουθήσουν. Σε θερμοκήπια, οι προσβολές μπορούν να μειωθούν δραστικά, καλύπτοντας το θερμοκήπιο με ειδικά φύλλα απορρόφησης ακτίνων UV, καθώς με το φιλτράρισμά τους αναστέλλεται η δημιουργία σπορίων (Agrios, 2005).

Η χημική αντιμετώπιση πραγματοποιείται με ψεκασμούς φυλλώματος, όταν οι συνθήκες ευνοούν την ανάπτυξη του παθογόνου με δραστικές ουσίες που ανήκουν στις χημικές ομάδες των καρβοξαμιδικών (fluxapyroxad – FRAC, 7), τριαζολών (difeconazole - FRAC, 3), μορφολινών (dimethomorph – FRAC, 40) και στρομπιλουρινών (azoxystrobin, pyraclostrobin – FRAC, 11) για τα σταυρανθή που καλλιεργούνται ως λαχανικά. Για την καλλιέργεια της ελαιοκράμβης έγκριση υπάρχει για δραστικές ουσίες των χημικών ομάδων των τριαζολών (prothioconazole, tebuconazole, cyproconazole – FRAC 3) και των στρομπιλουρινών (azoxystrobin – FRAC, 11) (ΥΠΑΑΤ, 2021c).

Έχει παρατηρηθεί επίσης η ύπαρξη διάφορων μυκοπαρσιτικών μυκήτων που παρασιτούν είδη του γένους *Alternaria* αλλά έως σήμερα δεν έχει αναπτυχθεί κανένας σε βιολογικό παράγοντα ελέγχου του (Agrios, 2005).



## 2.3 *Sclerotinia sclerotiorum*

### 2.3.1 Ταξινόμηση - Περιγραφή

Ο παθογόνος μύκητας *Sclerotinia sclerotiorum* (συν. *Peziza sclerotiorum*, *Whetzelinia sclerotiorum*, *Hymenoscyphus sclerotiorum*, *Peziza coemansii*, *Phialea sclerotiorum*, *Helotium sclerotiorum*, *Sclerotinia libertiana*, *S. matthiolae*, *S. opuntiarum*, *S. sclerotiorum* var. *opuntiarum*, *S. kauffmanniana*, *S. riograndensis*, *S. galeopsidis*, *S. caudata*, *S. xanthorrhoeae*, *S. wisconsinensis*, *S. moelleriana*, *S. henningsiana*, *S. ficariae*, *Sclerotium varium*, *S. opuntiarum*, *Peziza kauffmanniana* και *Rutstroemia homocarpa*), ανήκει στην Οικογένεια: Sclerotiniaceae, Τάξη: Helotiales, υποκλάση: Leotiomycetidae, Κλάση: Leotiomycetes, Υποσυνομοταξία: Pezizomycotina της Συνομοταξίας: Ascomycota (Mycobank, 2021) και προσβάλλει μεγάλο εύρος ξενιστών (Παναγόπουλος, 1995).

Έχει βρεθεί ότι ο μύκητας προσβάλλει 225 γένη φυτών από 64 οικογένειες. Από την προσβολή, προκαλούνται ιδιαίτερα καταστροφικές συνέπειες τόσο προσυλλεκτικά, όσο και μετασυλλεκτικά (Παναγόπουλος, 1995). Η συμπτωματολογία εξαρτάται από τον ξενιστή, το όργανο το οποίο προσβάλλει, καθώς και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Agrios, 2005). Η προσβολή μπορεί να πραγματοποιηθεί σε όλα τα στάδια ανάπτυξης, με πιο συχνή αυτή στα ανεπτυγμένα φυτά, όπου εμφανίζονται συμπτώματα σε στελέχη και καρπούς. Για την ασθένεια έχει αναπτυχθεί ποικιλία κοινών ονομάτων σε όλον τον κόσμο, μερικές εκ των οποίων είναι *Sclerotinia stem rot*, *watery soft rot*, *white mould*, *cottony soft rot*, *timber rot*, κ.α (Παναγόπουλος, 1995).

Ο μύκητας *S. sclerotiorum*, είναι μονοκυκλικό παθογόνο (Heffer & Johnson, 2007) και διαχειμάζει με μορφή σκληρωτίου επάνω ή μέσα σε προβεβλημένους ιστούς, σε σκληρώτια που βρίσκονται στο έδαφος ή ως μυκήλιο σε ζωντανό ιστό ή σαπροφυτικά στα φυτικά υπολείμματα του ξενιστή (Agrios, 2005; Mycobank, 2021). Ως πιο σημαντικό μέσο εξάπλωσης του *S. sclerotiorum* θεωρούνται τα αερομεταφερόμενα ασκοσπόρια (Mycobank, 2021).

Την άνοιξη και νωρίς το καλοκαίρι, τα σκληρώτια βλαστάνουν και παράγουν λεπτούς μίσχους που καταλήγουν σε μικρές απολήξεις, χοανοειδούς σχήματος μετά στύπου, τα αποθήκια (Παναγόπουλος, 1995; Agrios, 2005). Το μέγεθος τους φτάνει τα 5-15 χιλιοστά σε διάμετρο και μέσα τους παράγονται ασκοί με ασκοσπόρια (Agrios, 2005). Οι ασκοί είναι κυλινδρικοί με διαστάσεις 8-10 x 125-160 μm και περιέχουν 8 μονοκύτταρα ασκοσπόρια, υαλώδη, με σχήμα ωοειδές ή ελλειψοειδές, διαστάσεων 9-13 x 4-6,5 μm (Παναγόπουλος, 1995). Από τα αποθήκια, απελευθερώνεται μεγάλος αριθμός ασκοσπορίων στο περιβάλλον

για μία περίοδο περίπου 2-3 εβδομάδων. Αυτά παρασύρονται από τον άνεμο και εάν προσγειωθούν σε γηρασμένο ιστό, αυτός λειτουργεί ως άμεση πηγή απορρόφησης θρεπτικών, έτσι τα ασκοσπόρια βλασταίνουν και προκαλούν μόλυνση (Agiros, 2005). Η είσοδος του παθογόνου στο φυτικό ιστό πραγματοποιείται συνήθως με διάτρηση της εφυμενίδας και ο χρόνος επώασης της ασθένειας είναι 4 ημέρες (Παναγόπουλος, 1995).

Οι αποικίες σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA (Potato Dextrose Agar) εμφανίζονται λευκές ή ελαφρώς γκρι, συνήθως με μια αρκετά ομοιόμορφη στρώση εναέριου μυκήλιου, που μερικές φορές εμφανίζει θυσσάνους ή κλωστές. Τα σκληρώτια αναπτύσσονται στην επιφάνεια της αποικίας, κυρίως κοντά στην άκρη των δίσκων Petri ύστερα από την παύση της ανάπτυξης της υφής. Τα σκληρώτια που αναπτύσσονται στην αποικία είναι μαύρα, στρογγυλεμένα ή επιμήκη, με μήκος έως 1 εκατοστό, κυρίως νεφροειδή σε κάθετη τομή και η επιφάνεια τους είναι λεία ή παρουσιάζει ρηχές κοιλότητες. Τα κύτταρα των πρωτογενών υφών στην αναπτυσσόμενη αποικία έχουν λεπτά κυτταρικά τοιχώματα, πυκνής κοκκώδους σύστασης με πλάτος 9-14 (-18)  $\mu\text{m}$ . Το κορυφαίο κύτταρο συνήθως είναι πάνω από 300  $\mu\text{m}$ , με μία ή περισσότερες διακλαδώσεις, που ξεκινούν πριν από το πρώτο διάφραγμα, ενώ τα οπίσθια κύτταρά του έχουν μήκος περίπου 30-250  $\mu\text{m}$ . Τα δευτερεύοντα κύτταρα και αυτά της επόμενης διακλάδωσης της υφής είναι στενότερα από αυτά των πρωτογενών υφών (Mycobank, 2021).

Το μυκήλιο αρχικά αναπτύσσεται με συνεχείς επαναλαμβανόμενες διακλαδώσεις, δημιουργώντας μακριές εναέριες πρωτογενείς υφές, οι οποίες συνήθως κάνουν πολλές συγχωνεύσεις, προκειμένου να σχηματίσουν το σκληρώτιο. Τα ώριμα σκληρώτια εμφανίζουν έντονα διαφοροποιημένο φλοιό με ομοιόμορφα πυκνά έντονα χρωματισμένα τοιχώματα (πάχους 2-3 κυττάρων), ο οποίος αποτελείται από λεπτά και σχεδόν ισοδιαμετρικά κύτταρα με λεπτό τοίχωμα, ενώ στο εσωτερικό τους εμφανίζονται συνυφασμένες διακλαδισμένες υφές περίπου της ίδιας διαμέτρου με τις πρωτογενείς υφές, με άχρωμα και άνισα πυκνά τοιχώματα. Τα κύτταρα του φλοιού εξωτερικά και εσωτερικά έχουν σχήμα σφαιρικό. Τα κενά μεταξύ των υφών στο εσωτερικό δεν παρουσιάζουν ζελατινώδες υλικό. Στον ξενιστή, το λευκό μυκήλιο εξαπλώνεται πάνω από τις επιφάνειες και διακλαδίζεται διακυτταρικά και ενδοκυτταρικά. Τα σκληρώτια αναπτύσσονται σε εξωτερικές και εσωτερικές επιφάνειες και μερικές φορές εμφανίζονται πολυάριθμα σε χυμώδεις κοιλότητες, ενώ δεν σχηματίζονται παρά μόνο μετά το θάνατο του ξενιστή (Mycobank, 2021).

Ως πηγές μόλυνσης, θεωρούνται επίσης η ανθρωπογενής μεταφορά προσβεβλημένων σπόρων με μυκήλιο στον αγρό, η μεταφορά σκληρωτίων αναμειγμένα με τον σπόρο (Mycobank, 2021), καθώς και η μεταφορά σκληρωτίων με το αρδευτικό νερό, τα

καλλιεργητικά μέσα και τα ζώα (Παναγόπουλος, 1995). Ο χρόνος επιβίωσης των σκληρωτίων δεν είναι σταθερός και μπορεί να είναι βιώσιμα ακόμα και για διάστημα περισσότερο των 3 ετών στο έδαφος, προκαλώντας νέες προσβολές, ενώ σε υγρό έδαφος η επιβίωσή τους δεν υπερβαίνει τον ένα χρόνο (Παναγόπουλος, 1995; Mycobank, 2021).

Τα σκληρώτια περνούν μια περίοδο αδράνειας μετά την ωρίμανση, έτσι, η παραγωγή αποθηκίων σπάνια φαίνεται να συσχετίζεται με τα προσβεβλημένα φυτά. Τα περισσότερα μέρη των ποωδών φυτών μιας καλλιέργειας (υπέργεια αλλά και κοντά στο επίπεδο του εδάφους) μπορούν να προσβληθούν σε οποιαδήποτε στάδιο ανάπτυξης. Το πρώτο σύμπτωμα, είναι συχνά η κατάρρευση του φυτού, λόγω της μόλυνσης του στελέχους κοντά στο έδαφος. Από την προσβολή εμφανίζεται μαλακή σήψη, ακολουθούμενη από εμφανές, εξωτερικό λευκό μυκήλιο, ενώ τα σκληρώτια που σχηματίζονται, εμφανίζονται συχνά στα υδαρή σηπόμενα μέρη. Μολύνσεις που εμφανίζονται υψηλότερα από το επίπεδο του εδάφους, προέρχονται συχνά από πέταλα προσβεβλημένα με ασκοσπόρια (Mycobank, 2021).

Σχεδόν όλες οι μολύνσεις του *S. sclerotiorum*, προκαλούνται από ασκοσπόρια (Agiros, 2005). Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 23°C αναστέλλουν το σχηματισμό αποθηκίων. Αν και ο μύκητας είναι ιδιαίτερα διαδεδομένος, η ασθένεια ευνοείται από συνθήκες δροσερού καιρού και υγρασίας, έτσι στην περιοχή της μεσογείου, όπου το κλίμα είναι ζεστό και ξηρό, η ασθένεια δεν συναντάται κατά την καλοκαιρινή περίοδο (Mycobank, 2021). Μελέτες, οι οποίες έχουν πραγματοποιηθεί στην Ελλάδα, έδειξαν ότι ο σχηματισμός των αποθηκίων πραγματοποιείται από τον Οκτώβριο μέχρι τον Απρίλιο και κατόπιν αναστέλλεται λόγω έλλειψης επαρκούς υγρασίας (Παναγόπουλος, 1995). Ευνοϊκοί παράγοντες για την ανάπτυξη της ασθένειας θεωρούνται η υψηλή εδαφική υγρασία, οι συχνές βροχές, η ομίχλη, η δρόσος και η τεχνητή βροχή. Απαραίτητη προϋπόθεση για την επίτευξη μόλυνσης είναι η ύπαρξη υγρασίας στις φυτικές επιφάνειες για τουλάχιστον 16 με 24 ώρες. Μολύνσεις μπορεί να πραγματοποιηθούν σε θερμοκρασίες από 0 έως 25°C, αλλά οι άριστες κυμαίνονται μεταξύ 15-20°C (Παναγόπουλος, 1995), ενώ η εκτίμηση της επικινδυνότητας της ασθένειας σε συνάρτηση με τον αριθμό των σκληρωτίων ανά τετραγωνικό έδαφος, δεν είναι εύκολο να υπολογιστεί (Sunita & Mahendra, 2008).

### **2.3.2 Συμπτωματολογία**

Ο μύκητας προσβάλλει όλα τα υπέργεια μέρη των λαχανικών μέχρι και το επίπεδο του εδάφους. Η ασθένεια είναι ιδιαίτερα σοβαρή, προκαλώντας σημαντικές ζημιές σε θερμοκήπια

και υπαίθριες καλλιέργειες των σταυρανθών και άλλων καλλιεργειών (Τζάμος, 2007). Τα συμπτώματά της περιλαμβάνουν έντονη σήψη, η οποία μπορεί να είναι μαλακή και υπό συνθήκες υψηλής σχετικής υγρασίας, υγρή. Σε περίπτωση που η προσβολή εντοπίζεται στο στέλεχος (εικόνα 7), προκαλείται μάρανση και νέκρωση ολόκληρου του φυτού (Τζάμος, 2007). Το πιο εμφανές και συνηθισμένο πρώιμο σύμπτωμα ενός προσβεβλημένου φυτού είναι αυτό της εμφάνισης χαρακτηριστικής βαμβακώδους λευκής υφής, πάνω στο οποίο αναπτύσσονται σύντομα μεγάλες συμπαγείς δομές που ονομάζονται σκληρώτια. Τα σκληρώτια αρχικά είναι λευκά, στη συνέχεια σκληραίνουν εξωτερικά και παίρνουν μαύρο χρωματισμό. Η διάμετρος των σκληρωτίων του *S. sclerotiorum* ποικίλλει από 2 έως 10 χιλιοστά και το σχήμα τους είναι συνήθως περισσότερο πεπλατυσμένο και επίμηκες, παρά σφαιρικό (Agrios, 2005).

Στα στελέχη των φυτών, εμφανίζεται υδατώδης μεταχρωματισμός, που εξαπλώνεται προς την επιφάνεια του εδάφους και τη ρίζα (Παναγόπουλος, 1995). Στα πρώιμα στάδια της προσβολής, η φυλλική επιφάνεια δεν παρουσιάζει αλλοιώσεις και η προσβολή δεν γίνεται εύκολα αντιληπτή (Agrios, 2005). Όταν η προσβολή περιβάλλει το στέλεχος, στο σημείο της προσβολής εμφανίζεται εκτεταμένο μαλακό υπόλευκο έως σταχτόχρωμο έλκος (Παναγόπουλος, 1995). Όταν η αύξηση του μύκητα προσβάλλει πλήρως το στέλεχος και επέλθει σήψη, η πάνω φυλλική επιφάνεια εμφανίζει συμπτώματα χλώρωσης, μαρασμού και



**Εικόνα 7.** Προσβολή *Sclerotinia sclerotiorum* σε νεαρό φυτό στην περιοχή του λαιμού. **1.** Έναρξη προσβολής. **2.** Προσβολή λαιμού και εμφάνιση συμπτωμάτων μάρανσης. **3.** Νέκρωση φυτού (Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Π.Θ)

σε σύντομο χρονικό διάστημα νεκρώνεται (Agrios, 2005). Με υψηλή υγρασία περιβάλλοντος, οι προσβεβλημένες περιοχές καλύπτονται σύντομα από πλούσιο, πυκνό βαμβακώδες λευκό μυκήλιο μέσα στο οποίο σχηματίζονται τα σκληρώτια. Σε κάποιες περιπτώσεις η προσβολή μπορεί να επιτευχθεί μέσω του φύλλου και να μεταφερθεί στο στέλεχος. Στην περίπτωση

αυτή, τα σκληρώτια, τα οποία θα αναπτυχθούν μπορεί να δημιουργηθούν στην εντεριώνη ή στο στέλεχος (Agiros, 2005).

Η εξάπλωση του μύκητα πραγματοποιείται με μεγάλη ταχύτητα διαμέσου του στελέχους σε ολόκληρο το φυτό (Agiros, 2005). Ο DeBary είναι ο πρώτος ερευνητής που απέδειξε ότι τα προϊόντα μεταβολισμού του μύκητα *S. sclerotiorum* διαχέονται μέσα στους φυτικούς ιστούς, προκαλώντας σήψεις στα φυτικά όργανα, πριν από την προσέγγιση του παθογόνου στα σημεία αυτά (Τζάμος, 2007). Όταν ο μύκητας προσβάλλει τη βάση του μίσχου και τα κατώτερα φύλλα, παρατηρείται μια ξαφνική κατάρρευση και νέκρωση αυτών, με αποτέλεσμα την εμφάνιση της κάμψης των φύλλων το ένα επάνω στο άλλο. Τα μυκήλια και τα σκληρώτια εμφανίζονται συνήθως στην κατώτερη επιφάνεια των εξωτερικών φύλλων, αλλά σε ευνοϊκές συνθήκες όπως αυτές της υψηλής υγρασίας ο μύκητας μπορεί να αναπτυχθεί σε όλη την επιφάνεια του φυτού (Agiros, 2005).

Στο λάχανο η προσβολή οδηγεί σε σήψη της κεφαλής. Τα πρώιμα στάδια της ασθένειας εμφανίζονται ως υδαρείς κηλίδες στους ιστούς της πάνω ή της κάτω επιφάνειας των φύλλων, οι οποίες με το χρόνο αυξάνονται σε διάμετρο. Οι ιστοί των φύλλων μαλακώνουν και παρουσιάζουν



**Εικόνα 8.** Προσβολή ολόκληρης της κεφαλής λαχάνου από *Sclerotinia sclerotiorum* και εμφάνιση σκληρωτίων στον νεκρό φυτικό ιστό. (Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Π.Θ)

σήψη στην εξωτερική τους επιφάνεια. Στη συνέχεια, εμφανίζεται λευκό βαμβακώδες μυκήλιο, όπου κατά το τελικό στάδιο της ασθένειας, μπορεί να καλύψει ολόκληρη την

κεφαλή ακολουθούμενη από την ανάπτυξη σκληρωτίων χρώματος μαύρου έως ανθρακί (εικόνα 8) (Agrios, 2005; Kamesh et al., 2017).

Φυτά με σαρκώδη αποθηκευτικά όργανα, όπως το λάχανο, αναπτύσσουν λευκό βαμβακώδες μυκήλιο στην επιφάνεια τόσο προσυλλεκτικά, όσο και μετασυλλεκτικά κατά την αποθήκευσή τους. Η συμπτωματολογία είναι ίδια με την προσυλλεκτική, έτσι στην περίπτωση αυτή, οι προσβεβλημένοι ιστοί εμφανίζονται πιο σκούροι, μαλακοί και υδαρείς σε σχέση με τους υγιείς και εξωτερικά σχηματίζονται σκληρώτια. Εάν η ασθένεια αναπτυχθεί κατά την διάρκεια της αποθήκευσης, μπορεί να μεταδοθεί περαιτέρω και να προσβάλει παρακείμενα προϊόντα, προκαλώντας σοβαρή οικονομική ζημία (Agrios, 2005).

### 2.3.3 Αντιμετώπιση

Ο έλεγχος της ασθένειας πραγματοποιείται ακολουθώντας τις συνήθεις γεωργικές πρακτικές με σκοπό την αποστροφή της ανάπτυξης και τη μηχανική μεταφορά του παθογόνου καθώς και με τη χρήση χημικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων, εφόσον κρίνεται απαραίτητο.

Η εφαρμογή καλλιεργητικών μέτρων στοχεύει κυρίως στην καταστροφή των υπολειμμάτων της καλλιέργειας για τον περιορισμό της εδαφικής υγρασίας και την απομάκρυνση και καταστροφή των προσβεβλημένων φυτών από τον αγρό νωρίς, με την εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων της ασθένειας. Μετά την ολοκλήρωση της καλλιέργειας, προτείνεται βαθιά άρωση για τη μεταφορά των σκληρωτίων σε χαμηλότερα εδαφικά στρώματα (Παναγόπουλος, 1995), όπου ενώ διατηρούν τη βιωσιμότητα τους για μεγαλύτερο διάστημα, το ποσοστό των προσβολών μειώνεται (Duncan et al., 2006). Οι συνεχόμενες επαναλήψεις όμως αυτής της τεχνικής, την καθιστούν αναποτελεσματική, καθώς μέσα στα επόμενα χρόνια τα σκληρώτια θα ξαναβρεθούν στην επιφάνεια του εδάφους (Derbyshire & Denton-Giles, 2016). Επιπροσθέτως, σύμφωνα με τους Moore (1949), Παναγόπουλο (1995) και Wu et al., (2008) προτείνεται και κατάκλιση για μία περίοδο 4 - 5 εβδομάδων για τη μείωση της ζωτικότητας των σκληρωτίων, όπου αυτό είναι εφικτό. Άλλες καλλιεργητικές τεχνικές που προτείνονται, είναι η αμειψισπορά σε εδάφη όπου είχε προηγηθεί η ασθένεια, καθώς τα σκληρώτια δεν νεκρώνονται όλα μαζί και παραμένουν βιώσιμα για μεγάλο χρονικό διάστημα (Agrios, 2005), η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών με αποδεκτό βαθμό αντίστασης στην προσβολή (Agrios, 2005), η καλλιέργεια σε καλά στραγγιζόμενα εδάφη, η τακτική ζιζανιοκτονία και η αραιή φύτευση, καθώς η τεχνική αυτή

αφήνει το έδαφος απαλλαγμένο από ζιζάνια, μειώνοντας ταυτόχρονα την υγρασία (Koch et al., 2007).

Στοιχεία σχετικά με τη βιολογική αντιμετώπιση του παθογόνου μέσω ανταγωνιστικών μικροοργανισμών υποδεικνύουν έναν αριθμό μυκήτων και βακτηρίων που παρασιτούν ή εμποδίζουν την ανάπτυξη ειδών των *Sclerotinia spp.* Η εφαρμογή πραγματοποιείται με ψεκασμό της καλλιέργειας κατά την περίοδο της άνθησης ή με εφαρμογή στο έδαφος προφυτευτικά, μυκοπαρασιτικών ανταγωνιστών, όπως οι μύκητες: *Coniothyrium minitans*, *Gliocladium roseum*, *G. virens*, *Sporodesmium sclerotivorum* και είδη του γένους *Trichoderma* (Agris, 2005; Smolińska & Kowalska, 2018), καθώς και με ψεκασμό κατά την άνθηση, ανταγωνιστικών βακτηρίων όπως τα *Pseudomonas chlororaphis* (Selin et al., 2010), *Pseudomonas fluorescens* (Aeron et al., 2011), *Bacillus amyloliquefaciens* (Fernando et al., 2007), *Bacillus megaterium* (Hu et al., 2013), *Serratia plymuthica* (Kamensky et al., 2003), *Streptomyces platensis* (Wan et al., 2008), *Streptomyces lydicus* (Zeng et al., 2012) και *Bacillus subtilis* (Hu et al., 2005), παρουσιάζοντας ιδιαίτερα ικανοποιητικά αποτελέσματα. Η δράση των μυκοπαρασίτων οφείλεται σε ιδιότητες που παρουσιάζουν σχετικά με την καταστροφή ή την αναστολή της δημιουργίας νέων σκληρωτίων του μύκητα, μειώνοντας κατ'αυτόν τον τρόπο την ποσότητα του μολύσματος στο έδαφος (Agris, 2005).

Ο χημικός έλεγχος του *S. Sclerotiorum* μπορεί να επιτευχθεί κυρίως με την εφαρμογή εγκεκριμένων μυκητοκτόνων που ανήκουν στις χημικές ομάδες των ανιλινοπυριμιδινών (Benigni & Bompeix, 2010), των βενζιμιδαζολικών (Attanayake et al., 2011), των δικαρβοξιμιδικών (Matheron & Matejka, 1989), αναστολέων της C-14 απομεθυλάσης “DMIs” (Li et al., 2015), των στρομπιλουρινουρών (Mueller et al., 2002; Xu et al., 2014) και των αναστολέων της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος “SDHIs” (Ma et al., 2009). Ικανοποιητικά αποτελέσματα επιτυγχάνονται και με την εφαρμογή της τεχνικής της ηλιοαπολύμανσης του εδάφους (Τζάμος, 2007). Οι ψεκασμοί του εδάφους και των φυτών με κατάλληλα χημικά μυκητοκτόνα, εφαρμόζονται πριν και κατά την περίοδο που τα φυτά είναι ευαίσθητα στο παθογόνο με καλά αποτελέσματα στον έλεγχο του παθογόνου σε θερμοκήπια, ενώ η απολύμανση του εδάφους με ατμό έχει δείξει ότι μπορεί ακόμα να εξαλείψει το παθογόνο από αυτά (Agris, 2005). Στην Ελλάδα για την καλλιέργεια σταυρανθών που καλλιεργούνται για λαχανικά, έγκριση έχει μόνο το σκεύασμα με βάση το στέλεχος *Bacillus amyloliquefaciens* (former *subtilis*) QST 713 – (FRAC, BM 02), ενώ για την καλλιέργεια της ελαιοκράμβης εγκρίσεις υπάρχουν για δραστικές ουσίες της χημικής ομάδας των τριαζολών (Prothioconazole, Tebuconazole, Cyproconazole – FRAC, 3) και των στρομπιλουρινουρών

(Azoxystrobin – FRAC, 11) καθώς και για το σκεύασμα με βάση το στέλεχος *Bacillus amyloliquefaciens* (former *subtilis*) QST 713 (FRAC, BM 02) (λήξη 30/4/21) (ΥΠΑΑΤ, 2021c).

## 2.4 *Botrytis cinerea*

### 2.4.1 Ταξινόμηση

Ο μύκητας *Botrytis cinerea* (συν. *Gonatotryum sclerotigenum*, *Botrytis diospyri*, *B. vulgaris*, *B. polyactis*, *B. fuckeliana*, *B. citricola*, *B. gemella*, *Peziza fuckeliana*, *Botryotinia fuckeliana*, *Sclerotinia fuckeliana*, *Polyactis vulgaris*, *Monilia vulgaris* και *Phymatotrichum gemellum*) ανήκει στην Οικογένεια: Sclerotiniaceae, Τάξη: Helotiales, υποκλάση: Leotiomycetidae, Κλάση: Leotiomycetes, Υποσυνομοταξία: Pezizomycotina της Συνομοταξίας: Ascomycota (Mycobank, 2021), γνωστός ως βοτρυτής, μπορεί να προσβάλλει όλα τα υπέργεια μέρη των φυτών προκαλώντας ιδιαίτερες ζημιές στα λαχανάκια Βρυξελών, αλλά και το εσωτερικό των κεφαλών του λάχανου (OEPP/EPPO, 1994a).

Οι κονιδιοφόροι *B. cinerea* είναι όρθιοι, ίσιοι, με χρώμα από υαλώδες έως καφέ και εμφανίζουν διαφράγματα. Διακλαδίζονται πλευρικά προς την κορυφή, με ευρεία γωνία σε σχέση με τον κεντρικό άξονα. Στη συνέχεια διακλαδίζονται ξανά εναλλάξ, σχηματίζοντας σε κάθε άκρο ένα σφαιρικό, διογκωμένο κονιδιογενές κύτταρο, που φέρει κονίδια σε μίσχους, τα οποία γίνονται διαφραγματικά και ελευθερώνονται διαδοχικά κατά την ωρίμανσή τους. Τα κονίδια ποικίλουν σε σχήμα και μέγεθος. Το σχήμα τους είναι σχεδόν σφαιρικό έως οβάλ με μυτερή απόληξη στη βάση. Το χρώμα των τοιχωμάτων τους είναι υαλώδες έως ανοιχτό καφέ και έχουν διαστάσεις 9-15 x 6.5-10 μm (Mycobank, 2021).

### 2.4.2 Συμπτωματολογία

Ο μύκητας εισέρχεται κυρίως μέσω πληγών που μπορούν να προκληθούν στον φυτικό ιστό από οποιαδήποτε αιτία, όπως βλάβες από τον παγετό, έντομα, μηχανικές βλάβες ή και νεκρώσεις ιστών που προκαλούνται από φυσιολογικές ανωμαλίες, όπως για παράδειγμα η τροφопενία ασβεστίου (OEPP/EPPO, 1994a). Στη συνέχεια, το παθογόνο μπορεί να μεταδοθεί προσβάλλοντας υγιείς ιστούς με τους οποίους έρχεται σε επαφή, όπου εμφανίζεται το χαρακτηριστικό γκρίζο μυκήλιο, που είναι το τυπικό σύμπτωμα της ασθένειας αυτής (OEPP/EPPO, 1994a).



Η εκδήλωση της ασθένειας ευνοείται από θερμοκρασίες που κυμαίνονται μεταξύ 10–15 °C σε συνδυασμό με υγρασία και περίσσια ή έλλειψη αζώτου (OEPP/EPPO, 1994α). Ως αρχική πηγή μόλυνσης θεωρούνται τα νεκρωμένα προσβεβλημένα φυτά, τα φυτά σε αποσύνθεση και τα φυτικά υπολείμματα της καλλιέργειας (OEPP/EPPO, 1994α). Στους ιστούς μπορούν να σχηματιστούν σκληρώτια, τα οποία συμβάλλουν στην επιβίωση του μύκητα για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, τη διασπορά και τον πολλαπλασιασμό του (OEPP/EPPO, 1994α).

### 2.4.3 Αντιμετώπιση

Για την αντιμετώπιση του *B. cinerea*, δε συστήνονται κάποιες συγκεκριμένες καλλιεργητικές τεχνικές (OEPP/EPPO, 1994α). Γενικά, θα μπορούσε να δοθεί ως γενική σύσταση, η αποφυγή δημιουργίας συνθηκών που ευνοούν την ανάπτυξη υψηλής υγρασίας στο στάδιο των νεαρών φυταρίων (OEPP/EPPO, 1994α). Στην ελαιοκράμβη, ως συνιστώμενη πυκνότητα σποράς, προτείνονται τα 30-40 φυτά/m<sup>2</sup>, ενώ θα πρέπει να αποφεύγεται η πρόκληση μηχανικών βλαβών στα φυτά της καλλιέργειας (OEPP/EPPO, 1994b). Σε υπαίθριες καλλιέργειες θα πρέπει να αποφεύγεται η υπερβολική αζωτούχος λίπανση και να δίνεται προσοχή στην καταστροφή των φυτικών υπολειμμάτων της προηγούμενης καλλιέργειας (OEPP/EPPO, 1994α).

Η χημική αντιμετώπιση του παθογόνου πραγματοποιείται με ψεκασμό της φυτών, αμέσως με την εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων (OEPP/EPPO, 1994α), με τη χρήση εγκεκριμένων φυτοπροστατευτικών μυκητοκτόνων. Στην Ελλάδα, σύμφωνα με τη βάση δεδομένων του Υπ. Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, έγκριση υπάρχει μόνο για την εφαρμογή σκευάσματος με βάση το στέλεχος *Bacillus amyloliquefaciens* (former subtilis) QST 713 (FRAC, BM 02), σε σταυρανθή που καλλιεργούνται ως λαχανικά (ΥΠΑΑΤ, 2021c).

## 2.5 *Pyrenopeziza brassicae*

### 2.5.1 Ταξινόμηση

Ο μύκητας *Pyrenopeziza brassicae* (συν. *Cylindrosporium concentricum*, *Gloeosporium concentricum*, *Cylindrium cordae*, *Cylindrodochium concentricum* και *Fusidium cylindrospora*), ανήκει στην Οικογένεια: Ploettnerulaceae, Τάξη: Helotiales, υποκλάση: Leotiomycetidae, Κλάση: Leotiomycetes, Υποσυνομοταξία: Pezizomycotina της

Συνομοταξίας: Ascomycota (Mycobank, 2021) και απαντάται κυρίως στη βορειοδυτική Ευρώπη και συνήθως δεν προκαλεί απώλειες παραγωγής (OEPP/EPPO, 1994a), ενώ στην Ελλάδα μέχρι σήμερα, σύμφωνα με τα Χρονικά του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου, δεν έχει καταγραφεί η παρουσία του.

Σε περίπτωση που επικρατήσουν ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη του παθογόνου, προσβάλλονται καλλιέργειες κουνουπιδιού, λαχανάκια Βρυξελών και γογγύλια, ενώ φαίνεται πως προσβάλλει λιγότερο το λάχανο (OEPP/EPPO, 1994a). Το παθογόνο προσβάλλει όλα τα υπέργεια φυτικά όργανα και ως κύρια πηγή μόλυσματος θεωρούνται τα προσβεβλημένα φυτικά υπολείμματα και οι καλλιέργειες, ενώ η διασπορά των κονιδίων πραγματοποιείται με τον άνεμο και τη βροχή (OEPP/EPPO, 1994a).

Ο μύκητας *P. brassicae*, παράγει ασκοσπόρια μέσα σε αποθήκια, σε νεκρό ιστό και παράγει κονίδια σε μορφή ακέρβουλου σε ζωντανό ιστό (Karolewski et al., 2002). Τα ασκοσπόρια και τα κονίδια είναι σχεδόν όμοια μορφολογικά και δύσκολα ξεχωρίζουν (Karolewski et al., 2002). Τα ασκοσπόρια είναι υαλώδη, το σχήμα τους κυλινδρικό, έχουν 0-1 διαφράγματα και το μέγεθός τους κυμαίνεται μεταξύ 8 - 14 x 2,5 - 3,5 μm. Τα κονίδια είναι υαλώδη, το σχήμα τους κυλινδρικό, δεν έχουν διαφράγματα και εμφανίζουν διαστάσεις 10 - 16 x 3 - 4 μm (Karolewski et al., 2002).

Τα ασκοσπόρια, αποτελούν τη βασική αιτία για την έναρξη της επιδημίας το φθινόπωρο, όπου ελευθερώνονται από προβεβλημένα φυτικά υπολείμματα ελαιοκράμβης (Gilles et al., 2001). Η απελευθέρωση τους πραγματοποιείται καθώς μειώνεται η υγρασία της νύχτας ή της βροχής (McCartney & Lacey, 1990) και στη συνέχεια διασπείρονται με τον άνεμο (McCartney et al., 1986). Η διασπορά των κονιδίων πραγματοποιείται σε μικρές αποστάσεις με τη βροχή (Fatemi & Fitt, 1983) και ευθύνεται επίσης για δευτερογενείς προσβολές της ασθένειας κατά το φθινόπωρο και τον χειμώνα (Evans et al., 1999).

## 2.5.2 Συμπτωματολογία

Τα συμπτώματα από τις βλάβες που προκαλεί το παθογόνο, αναπτύσσονται αρχικά στην ανώτερη επιφάνεια των φύλλων, όπου παίρνουν αργυρόχρωμη όψη, από το ανασήκωμα της επιδερμίδας που προκαλείται (OEPP/EPPO, 1994a). Ο μύκητας δημιουργεί επίσης ομόκεντρους κύκλους με λευκά σπόρια σε υγρές και δροσερές συνθήκες (OEPP/EPPO, 1994a). Αναπαραγωγικά στάδια του μύκητα, μπορεί να συναντηθούν σε καλλιέργειες γογγυλιών, ενώ έχει παρατηρηθεί επίσης και η παραγωγή αποθηκίων σε σηπόμενους μίσχους, δίνοντας την δυνατότητα μεταφοράς του παθογόνου σε μεγάλες αποστάσεις (OEPP/EPPO,

1994a). Σε καλλιέργειες ελαιοκράμβης, εάν η προσβολή είναι μεγάλη, τα φύλλα ξηραίνονται και η ασθένεια μεταφέρεται στα άνθη τα οποία παίρνουν καφέ χρωματισμό, ενώ μπορεί να προκαλέσει βλάβες και στους λοβούς, προκαλώντας πρόωρη διάρρηξη τους (OEPP/EPPO, 1994b).

### 2.5.3 Αντιμετώπιση

Για την αντιμετώπιση του μύκητα συστήνεται η τετραετής αμειψισπορά καθώς και η παράχωση των φυτικών υπολειμμάτων της καλλιέργειας (OEPP/EPPO, 1994a; OEPP/EPPO, 1994b). Καθώς η ασθένεια προσβάλλει κυρίως την καλλιέργεια των γογγυλιών, συστήνεται η αποφυγή εγκατάσταση της σε εκτάσεις όπου παρατηρούνται προσβολές ενώ κρίνεται ιδιαίτερης σημασίας και χρήση ανθεκτικών ποικιλιών (OEPP/EPPO, 1994a).

Για την χημική αντιμετώπιση του παθογόνου προτείνεται η χρήση εγκεκριμένων μυκητοκτόνων (OEPP/EPPO, 1994a). Η αποτελεσματικότητά τους όμως δεν φαίνεται να είναι ιδιαίτερα επιτυχής λόγω της δυσκολίας που συναντάται στη έγκυρη και έγκαιρη διάγνωση του μύκητα (OEPP/EPPO, 1994a), αλλά και της εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών, που καταγράφονται ιδιαίτερα στο Ηνωμένο Βασίλειο. Στην ελαιοκράμβη, ως όριο επέμβασης θεωρείται η προσβολή σε ποσοστό 20% (OEPP/EPPO, 1994b). Στην Ελλάδα, εγκρίσεις υπάρχουν μόνο για την καλλιέργεια της ελαιοκράμβης, για δραστικές ουσίες της χημικής ομάδας των τριαζολών (Prothioconazole, Tebuconazole και Prothioconazole – FRAC, 3) (ΥΠΑΑΤ, 2021c).

## 2.6 *Hyaloperonospora brassicae*

### 2.6.1 Ταξινόμηση

Ο μύκητας *Hyaloperonospora brassicae* (συν. *Peronospora brassicae* και *P. parasitica* subsp. *brassicae*), ανήκει στην Οικογένεια: Peronosporaceae, Τάξη: Peronosporales, Κλάση: Oomycetes, της Συνομοταξίας: Oomycota (Mycobank, 2021) και είναι υπεύθυνος για την προσβολή της ασθένειας του περονοσπόρου των σταυρανθών.

Προσβάλλει το υπέργειο μέρος των φυτών (Saharan et al., 2017) και μπορεί να προσβάλλει το φυτό σε όλα τα στάδια ανάπτυξής του (Sherf & Macnab, 1986). Διαχειμάζει κυρίως ως ωοσπόριο σε γηρασμένο φυτικό ιστό, ενώ μπορεί να επιβιώσει και για μικρότερα χρονικά διαστήματα ως κονίδιο, σε φύλλα και ως μυκήλιο σε σπόρους και προσβεβλημένα φυτικά υπολείμματα (Saharan et al., 2017). Σπόροι των σταυρανθών, μπορεί να μολυνθούν κατά τον αλωνισμό καθώς τη στιγμή αυτή, έρχονται σε επαφή και με προσβεβλημένους

φυτικών ιστών (Saharan et al., 2017). Οι μολύνσεις από τον μύκητα, ευνοούνται από θερμοκρασίες που κυμαίνονται μεταξύ 10 – 15 °C και υψηλή ατμοσφαιρική υγρασία (Saharan et al., 2017).

Τα ωοσπόρια του *H. brassicae*, έχουν σχήμα σφαιρικό, παχύ τοίχωμα, το χρώμα τους είναι κίτρινο-καφέ και παρουσιάζουν διάμετρο μεταξύ 30-40 μm. Οι κονιδιοφόροι είναι υαλώδεις, έχουν επίπεδη βάση, παχύ κεντρικό άξονα και ύψος 200-300 μm. Παρουσιάζουν 6–8 μακριές, λεπτές διακλαδώσεις με μυτερή απόληξη και φέρουν ένα κονίδιο (Saharan et al., 2017). Τα κονίδια είναι υαλώδη, το σχήμα τους ελλειπτικό έως σχεδόν σφαιρικό και παρουσιάζουν διαστάσεις 24-27 x 15-20 μm (Saharan et al., 2017). Τα κονίδια, παράγουν βλαστικούς σωλήνες που δημιουργούν τη μυκηλιακή υφή, η είσοδος τους στο φυτικό ιστό πραγματοποιείται στην κάτω επιφάνεια των φύλλων, κυρίως με απευθείας διάτρηση, ενώ έχει παρατηρηθεί και η είσοδος μέσω των στοματίων (Shiraishi et al., 1975). Οι αρχικές μολύνσεις του παθογόνου, πραγματοποιούνται μέσω εδαφογενών ασκοσπορίων (LeBeau, 1945; Chang et al., 1963), ενώ δεν έχει αξιολογηθεί ιδιαίτερα η σημασία της μετάδοσης της ασθένειας μέσω του σπόρου. Τα φύλλα μολύνονται κυρίως μέσω αερομεταφερόμενων κονιδίων ως δευτερογενής προσβολή (Saharan et al., 2017).

Οι Felton and Walker (1946) αναφέρουν ότι η άριστη θερμοκρασία για τη βλάστηση των κονιδίων πραγματοποιείται μεταξύ 8-12 °C, για τη διάτρηση στους 16 °C, ενώ η δημιουργία των μυζητήρων μπορεί να πραγματοποιηθεί μεταξύ 2-24 °C. Η σπορίωση, πραγματοποιείται κυρίως τη νύχτα και η μεταφορά των κονιδίων πραγματοποιείται τις πρωινές ώρες, καθώς ξηραίνονται οι κονιδιοφόροι, οι οποίοι εκτοξεύουν τα κονίδια βίαια στον αέρα (Felton & Walker, 1946; Saharan et al., 2017).

## **2.6.2 Συμπτωματολογία**

Ο μύκητας προσβάλλει τα φυτά σε όλα τα στάδια ανάπτυξής τους (Sherf & Macnab, 1986). Στα νεαρά φυτάρια, προσβάλλονται οι κοτυληδόνες και τα νεαρά φύλλα. Στην πάνω επιφάνεια των φύλλων εμφανίζονται γωνιώδεις κηλίδες, που μπορεί να συνενωθούν και να δημιουργήσουν ακανόνιστες καφέ νεκρώσεις. Στην κάτω επιφάνεια οι περιοχές αυτές καλύπτονται με ανοιχτή γκρι έως λευκή εξάνθηση, που είναι οι κονιδιοφόροι του μύκητα. Τα φύλλα μπορεί να γίνουν χλωρωτικά και να αποκοπούν. Τα σημεία προσβολής σε φύλλα μεγαλύτερης ηλικίας, γίνονται λεπτά και πιο σκούρα και σε περιπτώσεις έντονης προσβολής μπορεί να προκληθεί και νέκρωση ολόκληρων φύλλων (Saharan et al., 2017). Όταν το παθογόνο εισέλθει στο στέλεχος, στη βάση των φύλλων των φυτών που πλησιάζουν στην

ωρίμανση, εμφανίζεται ένας γκριζόμαυρος μεταχρωματισμός (Ramsay & Smith, 1961). Σε αποθηκευμένα προϊόντα, ο μεταχρωματισμός αυτός εισέρχεται στο εσωτερικό της κεφαλής του λάχανου προσβάλλοντας τα εσωτερικά φύλλα. Εξωτερικά της κεφαλής μπορεί να παρουσιαστούν πολυάριθμα βυθισμένα μαύρα στίγματα που ποικίλουν σε μέγεθος, ενώ παρόμοια συμπτώματα εμφανίζονται και στο κουνουπίδι. Στα γογγύλια και τα ραπανάκια εμφανίζονται ακανόνιστοι μεταχρωματισμοί στο εσωτερικό των ριζωμάτων, που εκτείνονται από την κεφαλή προς τα κάτω ή από το πλάι στο ύψος του εδάφους, με αποτέλεσμα η σάρκα να εμφανίζεται από καφέ έως μαύρο ή να εμφανίζει δικτυωτές νεκρώσεις. Σε προχωρημένες προσβολές η επιδερμίδα μπορεί να γίνει σκληρή με μικρές εσχαρώσεις ή και να σχιστεί (Sherf & Macnab, 1986). Στην ελαιοκράμβη τα συμπτώματα εμφανίζονται ως χλωρωτικές περιοχές μεταξύ των κεντρικών νεύρων, με την ανάπτυξη λευκού έως γκριζού μυκηλίου στην κάτω επιφάνεια. Στους λοβούς, εμφανίζονται καφέ έως μαύρες κηλίδες με αραιή μυκηλιακή ανάπτυξη και σε έντονες προσβολές, μπορεί να προκαλέσει πρόωρη γήρανση τους (OEPP/EPPO, 1994b).

### 2.6.3 Αντιμετώπιση

Για την αντιμετώπιση του μύκητα, συστήνονται καλλιεργητικές τεχνικές που αφορούν την αραιή σπορά, με σκοπό την πρόκληση καλού αερισμού για τον περιορισμό της υγρασίας στα σπορεία, τη χρήση υγιούς φυτικού υλικού, τη χρήση ανθεκτικών ποικιλιών, την καταστροφή των υπολειμμάτων της καλλιέργειας για τη μείωση του αρχικού μολύσματος, διετές πρόγραμμα αμειψισποράς, τον έλεγχο των ζιζανίων και την εφαρμογή αυξημένης ποσότητας φωσφόρου έναντι του καλίου σε αναλογία 2-3 : 1 (Παναγόπουλος, 1995; Saharan et al., 2017; OEPP/EPPO, 1994b).

Σχετικά με τον χημικό τρόπο αντιμετώπισης, προτείνεται η επικάλυψη σπόρων με χημικά μυκητοκτόνα όπως Metalaxyl (δεν έχει έγκριση στη Ελλάδα) (0.3-0.6 gr / κιλό σπόρου) και την εφαρμογή μυκητοκτόνων στο έδαφος, προσπαρτικά (Saharan et al., 2017). Έγκριση για τα σταυρανθή που καλλιεργούνται ως λαχανικά έχουν οι δραστικές ουσίες Copper oxychloride και Bordeaux mixture της χημικής ομάδας των ανόργανων ενώσεων χαλκού (FRAC, M 01) (λήξη έγκρισης 31/5/21), Dimethomorph (FRAC, 40), της χημικής ομάδας των μορφολινικών, Pyraclostrobin (FRAC, 11) της χημικής ομάδας των στρομπιλουρίνων, Fluopicolide (FRAC, 43) της χημικής ομάδας των ακυλοπικολιδίων και το Propamocarb (FRAC, 28) της χημικής ομάδας των καρβαμιδικών) ενώ δεν υπάρχει εγκεκριμένο σκεύασμα για την καλλιέργεια της ελαιοκράμβης (ΥΠΑΑΤ, 2021c).

### 2.6.3.1 Βιολογική καταπολέμηση

Σχετικά με τη βιολογική καταπολέμηση του παθογόνου, οι Ark and Thomson (1959) αναφέρουν ότι ο χυμός σκόρδου, καθώς και εκχυλίσματά του, παρουσίασαν τοξικότητα στο μύκητα με εφαρμογή του σε καλλιέργεια ραπανακιού. Σχετικά με την επίδραση ανταγωνιστικών οργανισμών στην αντιμετώπιση του μύκητα, οι Nicolas and Aggery (1940) ανέφεραν την παρατήρηση της παρουσίας βακτηρίων στο μυκήλιο, τα κονίδια και τους κονιδιοφόρους του παθογόνου στο είδος *Lepidium graminifolium*. Ο Bedlan (1987) αναφέρει επιτυχή έλεγχο του παθογόνου με την εφαρμογή στελέχους του *Trichoderma harzianum* σε συνθήκες θερμοκηπίου και οι Saxena and Tewari (2017) αναφέρουν τη χρήση μειγμάτων παραφινικού ελαίου και μύκητες *Trichoderma harzianum* για τη μείωση των προσβολών του παθογόνου, καθώς και της λευκής σκωρίασης (Nicolas & Aggery, 1940; Bedlan, 1987; Saxena & Tewari 2017).

## 2.7 *Albugo candida*

### 2.7.1 Ταξινόμηση

Ο παθογόνος μύκητας *Albugo candida* (συν. *Aecidium candidum*, *Obligate synonyms*, *Cystopus candidus*, *Uredo candida*, *Uredo cruciferarum*, *Uredo candida var. cruciferarum*, *Caeoma candidum* και *Albugo cruciferarum*), ανήκει στην Οικογένεια: Albuginaceae, Τάξη: Albuginales, Κλάση: Peronosporomycetes, της Συνομοταξίας: Oomycota (Mycobank, 2021), και προκαλεί την ασθένεια που είναι γνωστή ως λευκή σκωρίαση των Σταυρανθών (Saharan & Verma, 1992).

Από την προσβολή, διακρίνεται η εμφάνιση φλυκταινών στα φύλλα, τους βλαστούς και τους καρπούς, χρώματος λευκού έως κίτρινου, ενώ από την προσβολή του άνθους παρατηρείται γενική παραμόρφωση, υπερτροφία, υπερπλασία και γενικά στειρότητα τους. Οι απώλειες στην παραγωγή ως συνέπεια της προσβολής, μπορεί να είναι ιδιαίτερα σοβαρές. Στην Ινδία, σε προσβολή του είδους *Brassica juncea* (L.) καταγράφηκαν απώλειες της τάξης του 23–89,8 % (Bains & Jhooty, 1979; Lakara & Saharan, 1989), στην Πολωνία και τον Καναδά σημειώθηκαν απώλειες μεταξύ 1-60 %, σε καλλιέργεια του είδους *Brassica rapa* (L.) και στην Αυστραλία καταγράφηκαν απώλειες μεταξύ 5-10 % στο είδος *Brassica juncea*. Έχει παρατηρηθεί επίσης ότι στον Καναδά και την Ευρώπη, ενώ η ασθένεια δεν αποτελεί σημαντικό εχθρό για την καλλιέργεια του είδους *Brassica napus*, εν τούτοις σε καλλιέργειες του στην Κίνα καταγράφονται σημαντικές απώλειες (Fan et al., 1983).

Το μυκήλιο του *A. candida*, είναι ενδοκυτταρικό με μικρές στρογγυλές προεξοχές (από ένα έως και αρκετά σε κάθε ξενιστή). Το χρώμα των σωρών είναι λευκό και σπάνια

απαλό κίτρινο. Οι σωροί προεξέχουν και είναι δυνατά προσκολλημένοι στον φυτικό ιστό, ενώ ποικίλουν σε μέγεθος και μορφή. Οι σποριαγγειοφόροι του είδους είναι κοντοί, υαλώδεις με ροπαλοειδές σχήμα και παχύ τοίχωμα, ιδίως προς το τμήμα της βάσης τους. Η διάμετρός τους κυμαίνεται μεταξύ 30-45 x 15-18 μm και σχηματίζουν διακλαδώσεις και σποριάγγεια σε αλυσίδες. Το σποριάγγεια είναι κυκλικά, υαλώδη, με λεπτό τοίχωμα και έχουν διάμετρο 12-18 μm. Τα ωοσπόρια είναι στρογγυλά, χρώματος καφέ και παρουσιάζουν διάμετρο 30-55 μm (γενικά 45 μm, με τοιχώματα μέχρι και 60 μm) (Mycobank, 2021).



**Εικόνα 9.** Εμφάνιση λευκών φλυκταινών στα εξωτερικά φύλλα της κεφαλής του λάχανου ως αποτέλεσμα της προσβολής από τον μύκητα *Albugo candida*. (Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Π.Θ)

### 2.7.2 Συμπτωματολογία

Η μόλυνση πραγματοποιείται κυρίως στα νεαρά φυτά. Λευκές, κρητιδώδεις φλύκταινες, όπως φαίνονται στις εικόνες 9 και 10, εμφανίζονται σε όλο το φυτό εκτός από τις ρίζες. Τα προσβαλλόμενα μέρη συχνά παρουσιάζουν μια υπερτροφία και ιδιαίτερα η ταξιανθία, ενώ σπάνια παρατηρούνται και όγκοι στις ρίζες το ρεπανιού, οι οποίοι περιέχουν ωοσπόρια και σφαιρικούς μυζητήρες. Η αρχική μόλυνση πραγματοποιείται από ζωοσπόρια, τα οποία έχουν απομείνει στο έδαφος και έχουν βλαστήσει ή από φυτικά υπολείμματα της προηγούμενης καλλιέργειας (Mycobank, 2021).



**Εικόνα 10.** Εμφάνιση λευκών φλукταινών στα εξωτερικά φύλλα του λάχανου ως σύμπτωμα της προσβολής του μύκητα *Albugo candida*. (Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Π.Θ)

### 2.7.3 Αντιμετώπιση

Η αντιμετώπιση του μύκητα περιλαμβάνει κυρίως την εφαρμογή της ορθής γεωργικής πρακτικής, όπως η σωστή εφαρμογή προγραμμάτων αμειψισποράς, η αποφυγή εγκατάστασης σποροκλινών και καλλιέργειας σε σημεία με υψηλά επίπεδα υγρασίας και την καταστροφή πιθανών πηγών μόλυνσης, όπως φυτικά υπολείμματα και ζιζάνια (OEPP/EPPO, 1994).

Η χημική αντιμετώπιση του μύκητα, πραγματοποιείται κατά τα πρώτα σημάδια της εμφάνισης της ασθένειας με τη χρήση διασυστηματικών μυκητοκτόνων, ενώ ιδιαίτερης σημασίας για την αντιμετώπιση του, θεωρείται η εφαρμογή τους την κατάλληλη χρονική στιγμή προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί ο αριθμός των χημικών εφαρμογών (OEPP/EPPO, 1994).

Για τη χημική αντιμετώπιση του *A. candida*, συνιστάται η χρήση της δραστικής ουσίας Metalaxyl (OEPP/EPPO, 1994), ενώ στην Ελλάδα δεν υπάρχει εγκεκριμένο μυκητοκτόνο σύμφωνα με τη βάση δεδομένων των φυτοπροστατευτικών ουσιών του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων.



## 2.8 *Erysiphe cruciferarum*

### 2.8.1 Ταξινόμηση

Ο μύκητας *Erysiphe cruciferarum* (συν. *Erysiphe pisi* var. *cruciferarum*) ανήκει στην Οικογένεια: Erysiphaceae, Τάξη: Erysiphales, υποκλάση: Leotiomyetidae, Κλάση: Leotiomyetes, Υποσυνομοταξία: Pezizomycotina της Συνομοταξίας: Ascomycota (Mycobank, 2021) και προκαλεί το ωίδιο των σταυρανθών (OEPP/EPPO, 1994b).

Το μυκήλιο του *E. cruciferarum* είναι λευκό με πυκνή εξάπλωση, το οποίο εμφανίζεται και στις δύο πλευρές των φύλλων. Τα κονίδια παρουσιάζονται μεμονωμένα ή σε αλυσίδες, είναι κυλινδρικά και έχουν διαστάσεις 30-40 x 12-16 μm. Τα κλειστοθήκια είναι σφαιρικά, έχουν διάμετρο 95-125 μ, το χρώμα τους στην αρχή είναι κίτρινο και με την ωρίμανση τους γίνεται καφέ-μαύρο. Τα κύτταρα των τοιχωμάτων είναι ακανόνιστα, το χρώμα τους είναι καφέ και έχουν διάμετρο 10-25 μm. Τα κλειστοθήκια, φέρουν πολυάριθμες απολήξεις στην βάση, είναι στενά, το σχήμα τους είναι μυκηλοειδές και παρουσιάζουν υαλώδη έως αχνό χρωματισμό. Διακλαδίζονται σπάνια και είναι άνισα στο μήκος με διάμετρο έως 3x. Οι ασκοί είναι αντωοειδές με διαστάσεις 50-70 x 30-50 μm και έχουν, 2-7 ωοειδή ασκοσπόρια, με διαστάσεις 19-22 x 11-13 μm. Η μετάδοση του παθογόνου πραγματοποιείται μέσω αερομεταφερόμενων κονιδίων. Ο τρόπος διαχείμασης του μύκητα είναι αμφίβολος, αν και το μυκήλιο είναι ικανό να επιβιώσει στα χειμωνιάτικα είδη *Brassica spp.* ως δευτερογενής προσβολή (Mycobank, 2021).

### 2.8.2 Συμπτωματολογία

Τα πρώτα σημάδια της προσβολής του μύκητα περιλαμβάνουν μικρές κηλίδες από λεπτό, λευκό μυκήλιο, το οποίο εκτείνεται σε διάφορα μέρη του φύλλου οι οποίες εμφανίζονται αρχικά στην κάτω επιφάνεια και στη συνέχεια οι κηλίδες συνενώνονται. Τα φύλλα του γογγυλιού ή του *B. napus* παρουσιάζουν μεγάλη αντοχή και μπορούν να υποστούν προσβολή για πολλές εβδομάδες πριν γίνουν χλωρωτικά και νεκρωθούν (Mycobank, 2021).

Η ασθένεια είναι αερομεταφερόμενη. Η διασπορά των κονιδίων, πραγματοποιείται από προσβεβλημένους ιστούς, ενώ έχει παρατηρηθεί και η δημιουργία κλειστοθηκίων. Η ασθένεια ευνοείται από τον ξηρό καιρό, με θερμοκρασίες μεταξύ 15-20 °C, και περιόδους υψηλής υγρασίας. Τα πρώτα σημάδια της ασθένειας μπορεί να εμφανιστούν σε ανοιξιάτικες σπορές κατά τον Ιούλιο μήνα ενώ η γρήγορη εκδήλωσή τους θα παρουσιαστεί τον Αύγουστο και τον Σεπτέμβριο (OEPP/EPPO, 1994α). Από την προσβολή προκαλούνται σημαντικές

απώλειες παραγωγής και μείωση της εμπορευσιμότητας των παραγομένων προϊόντων, ιδίως στα λαχανάκια Βρυξελών, το λάχανο και τα γογγύλια, ενώ σπάνια προκαλεί απώλειες παραγωγής στην ελαιοκράμβη (OEPP/EPPO, 1994b).

### 2.8.3 Αντιμετώπιση

Για την αντιμετώπιση της ασθένειας προτείνονται μία σειρά από καλλιεργητικά μέτρα που περιλαμβάνουν την καλλιέργεια ανθεκτικών ποικιλιών, την αποφυγή πυκνής φύτευσης, την καταστροφή των ζιζανίων, την αποφυγή υπερβολικής αζωτούχου λίπανσης και την αποφυγή πρόκλησης υδατικής καταπόνησης (OEPP/EPPO, 1994a).

Η χημική αντιμετώπιση πραγματοποιείται έγκαιρα με την εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων. Σε ποικιλίες που καλλιεργούνται για το ρίζωμα τους, η προσβολή του παθογόνου σε όψιμο στάδιο δεν ζημιώνει την παραγωγή και προτείνεται η αποφυγή της χημικής αντιμετώπισης (OEPP/EPPO, 1994a). Για την αντιμετώπιση του μύκητα στην Ελλάδα, έγκριση υπάρχει για τα σταυρανή που καλλιεργούνται ως λαχανικά, έχει μόνο για το στοιχειακό Θείο (S) (FRAC, M 02) ενώ για την ελαιοκράμβη, έγκριση υπάρχει για τις δραστικές ουσίες της χημικής ομάδας των τριαζολών (Prothioconazole και Tebuconazole – FRAC, 3) (ΥΠΑΑΤ, 2021c).

## 2.9 *Mycosphaerella brassicicola*

### 2.9.1 Ταξινόμηση

Ο μύκητας *Mycosphaerella brassicicola* (συν. *Sphaeria brassicicola*, *S. brassicaecola* *Dothidea brassicae*, *Sphaerella brassicicola*, *Depazea brassicicola* και *D. brassicicola*), ανήκει στην Οικογένεια Mycosphaerellaceae, Τάξη: Mycosphaerellales, υποκλάση: Dothideomycetidae, Κλάση: Dothideomycetes, Υποσυνομοταξία: Pezizomycotina της Συνομοταξίας: Ascomycota (Mycobank, 2021), και προκαλεί την ασθένεια δακτυλιωτή κηλίδωση (ringspot), στις κεφαλωτές κράμβες (OEPP/EPPO, 1994a).

Τα ψευδοθήκια του *P. brassicae* παράγονται κυρίως σε φύλλα, αλλά μπορεί να παρατηρηθούν επίσης και σε βλαστούς ή και λοβούς σπόρων. Είναι στρογγυλά, σκούρα καφέ, με θηλώδεις οστιόλες και έχουν διάμετρο 100 x 130 μm. Οι ασκοί έχουν διαστάσεις, 30-45 x 12-18 μm και περιέχουν 8 σπόρια που είναι τοποθετημένα ακανόνιστα σε δύο σειρές. Τα ασκοσπόρια έχουν υαλώδη χρωματισμό, το σχήμα τους είναι κυλινδρικό και έχουν

μέγεθος 18-23 x 3-5 μm. Τα άκρα τους είναι στρογγυλεμένα και δεν περιορίζονται στο διάφραγμα. Τα πυκνίδια απαντώνται μεμονωμένα ή σε ομάδες. Το σχήμα τους είναι σφαιρικό, το χρώμα τους είναι σκούρο καφέ και παρουσιάζουν θηλώδεις οστιόλες διαμέτρου 100-200 μm. Το ψευδοπαρέγχυμα του τοιχώματός τους αποτελείται από αρκετά στρώματα κυττάρων. Τα κονίδια είναι υαλώδη, το σχήμα τους είναι κυλινδρικό και παρουσιάζουν διαστάσεις 3-5 x 1 μm (Mycobank, 2021).

Η μετάδοση γίνεται με αερομεταφερόμενα ασκοσπόρια, αλλά δεν υπάρχουν αναφορές για τη μετάδοση του σε μελέτες. Τα πυκνίδια περιέχουν πυκνιδιοσπόρια, που όμως δεν είναι μεταδοτικά (Mycobank, 2021).

Συναντάται κυρίως σε περιοχές, όπως η βορειοδυτική Ευρώπη, όπου ευνοείται η ανάπτυξή του, λόγω των ευνοικών συνθηκών υγρασίας (OEPP/EPPO, 1994α). Ως κύρια πηγή μόλυνσης θεωρούνται τα υπολείμματα των προηγούμενων καλλιεργειών, οι ώριμοι καρποί και οι προσβεβλημένες καλλιέργειες ελαιοκράμβης (OEPP/EPPO, 1994α).

## **2.9.2 Συμπτωματολογία**

Συμπτώματα της ασθένειας παρατηρούνται κυρίως στα εξωτερικά φύλλα. Από την προσβολή εμφανίζονται, μικρές νεκρωτικές κηλίδες, που αυξάνονται σε μέγεθος και φθάνουν σε διάμετρο 0,5-1 (-2) cm κατά μέσο όρο. Οι κηλίδες είναι κυρίως στρόγγυλες και το κέντρο τους έχει χρώμα ανοιχτόχρωμο καφέ ή γκρι. Η περιφέρεια τους οριοθετείται από στενή, υδαρή, βυθισμένη επιφάνεια με χλωρωτική ζώνη. Όταν οι αλλοιώσεις είναι πολυάριθμες, παρουσιάζεται χλώρωση σε ολόκληρο το φύλλο και η άκρη του εμφανίζεται κατασραωμένη, σπασμένη και φθαρμένη. Μέσα στις κηλίδες, δημιουργούνται τα περιθήκια (υποφυλλικά στην αρχή και μετά αμφιγενή), τα οποία εμφανίζονται σε στρώσεις. Όταν ο αριθμός των περιθηκίων είναι μεγάλος, οι κηλίδες αποκτούν μαύρο χρωματισμό (Mycobank, 2021).

## **2.9.3 Αντιμετώπιση**

Οι βασικές αρχές που προτείνονται για την αντιμετώπιση του παθογόνου, περιλαμβάνουν κυρίως καλλιεργητικές τεχνικές που αποσκοπούν στην αποτροπή δημιουργίας συνθηκών που ευνοούν την εξάπλωση και μόλυνση του παθογόνου (OEPP/EPPO, 1994α). Τέτοιες τεχνικές είναι η αμειψισπορά, η απομόνωση των σποροκλινών, η καταστροφή των προσβεβλημένων φύλλων και η αποφυγή της πυκνής φύτευσης, ενώ ιδιαίτερα σημαντική είναι και η καλλιέργεια ανθεκτικών ποικιλιών (OEPP/EPPO, 1994α).

Η χημική αντιμετώπιση στον αγρό πραγματοποιείται μέσω της εφαρμογής φυτοπροστατευτικών μυκητοκτόνων ύστερα από την δημιουργία συνθηκών που ευνοούν την ανάπτυξη του παθογόνου και με την εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων της ασθένειας στην καλλιέργεια (OEPP/EPPO, 1994α).

Οι δραστικές ουσίες που υπάρχουν διαθέσιμες για την αντιμετώπιση της ασθένειας στην Ελλάδα, για τα σταυρανθή που καλλιεργούνται ως λαχανικά, είναι το Copper oxychloride (FRAC, M 01) της χημικής ομάδας των ανόργανων ενώσεων χαλκού (λήξη έγκρισης 31/5/21), το Difenoconazole (FRAC, 3), της χημικής ομάδας των τριαζολών και το Fluxapyroxad (FRAC, 7), της χημικής ομάδας των Καρβοξαμιδικών, ενώ για την καλλιέργεια της ελαιοκράμβης, έγκριση υπάρχει μόνο για τη δραστική ουσία Tebuconazole (FRAC, 3) της χημικής ομάδας των τριαζολών (ΥΠΑΑΤ, 2021c).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΧΗΜΙΚΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ ΚΑΙ ΕΛΑΙΑ

Μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις του 21ου αιώνα θεωρείται η εξασφάλιση μιας διαδικασίας παραγωγής τροφίμων από την οποία θα απουσιάζουν κίνδυνοι για τον άνθρωπο και το περιβάλλον. Η εντατικοποίηση της γεωργίας πραγματοποιείται σε μία περίοδο, όπου κυριαρχούν φαινόμενα ασταθών κλιματικών παραγόντων και υπάρχει ανάγκη απεξάρτησης από τα ορυκτά καύσιμα, ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται συνεχής μείωση των καλλιεργήσιμων εκτάσεων, καθώς και των αποθεμάτων νερού (Alexandratos & Bruinsma, 2012; Popp et al., 2013). Οι παραπάνω παράγοντες προκαλούν ερωτηματικά σχετικά με τη δυνατότητα πραγματικής επίτευξης ενός βιώσιμου συστήματος παραγωγής τροφίμων. Σύμφωνα με μελέτες πολλών ερευνητών εκτιμάται ότι οι ετήσιες απώλειες παραγωγής τροφίμων που πραγματοποιούνται από προσβολές εντόμων και ασθενειών αποτελούν το 20-40% της συνολικής παραγωγής παγκοσμίως (Oerke & Dehne, 2004; Savary et al., 2012; Popp et al., 2013). Ως εκ τούτου, θεωρείται επιβεβλημένη η ανάπτυξη βελτιωμένων μεθόδων φυτοπροστασίας, προκειμένου να εξασφαλισθεί η γεωργική παραγωγή και η διαθεσιμότητα τροφίμων. Για την επίτευξη του παραπάνω αποτελέσματος, υπάρχει ανάγκη εφαρμογής μεθόδων που θα επιτρέπουν τη συνεχόμενη διαχείριση των ασθενειών με τρόπο βιώσιμο, ασφαλή και κοινωνικά αποδεκτό, ελαχιστοποιώντας την εξάρτηση από τα συνθετικά χημικά μυκητοκτόνα (Federica et al., 2017).

Οι συγκριτικές μελέτες μεταξύ φυσικών και χημικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων στην ύπαιθρο και στο εργαστήριο, μπορούν να εξασφαλίσουν πλήθος δεδομένων, αξιολογώντας την αποτελεσματικότητά τους, το περιβαλλοντικό τους προφίλ, αλλά και τη μελλοντική ενσωμάτωση αυτών σε προγράμματα ολοκληρωμένης διαχείρισης ασθενειών και εχθρών.

### 3.1 Χημικά μυκητοκτόνα

Κατά τη διάρκεια του πειράματος υπαίθρου, στις βιοδοκιμές χρησιμοποιήθηκαν τα χημικά με τις εμπορικές ονομασίες Reflect 125 EC και Embrelia SC, των οποίων η προμήθεια έγινε από το εμπόριο. Η επιλογή των χημικών φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων έγινε λαμβάνοντας υπόψη την κοινή δραστική ουσία, προκειμένου να διαπιστωθεί τυχόν διαφορά στην αποτελεσματικότητα έναντι των παθογόνων φυλλώματος, καθώς το Embrelia είναι μείγμα δύο δραστικών.

### 3.1.1 Reflect 125 EC (Isopyrazam)

Το μυκητοκτόνο REFLECT 125 EC, είναι ένα γαλακτωματοποιήσιμο υγρό που περιέχει τη δραστική ουσία isopyrazam (FRAC, 7) σε συγκέντρωση 12.5%, δρα ως μυκητοκτόνο φυλλώματος προστατευτικά, αλλά και θεραπευτικά, παρουσιάζοντας ευρύ φάσμα δράσης ενάντια διαφόρων φυτοπαθογόνων μυκήτων (Haip et al., 2011). Ανήκει στη χημική ομάδα των (SDHI) που λειτουργούν ως παρεμποδιστές της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος στο σύμπλοκο II, στη μιτοχονδριακή αλυσίδα της αναπνοής, εμποδίζοντας την παραγωγή ενέργειας (Dubos et al., 2013; Ajigboye et al., 2014). Έχει χαμηλή λιποδιαλυτότητα στο νερό, αλλά υψηλή λιποφιλική σταθερότητα και μπορεί να μένει σταθερό στο λιποφιλικό κηρώδες στρώμα του φυτού κατά την άρδευση και τη βροχή. Στην Ελλάδα το σκεύασμα Reflect 125 EC εγκρίθηκε για χρήση το 2017 και η έγκρισή του περιλαμβάνει την καταπολέμηση του ωιδίου στις καλλιέργειες αγγούρι, κολοκύθι, κολοκύθα, καρπούζι, καρότο, πεπόνι, τομάτα και μελιτζάνα, καθώς και την αλτερνάρια στο καρότο και στην τομάτα (ΥΠΑΑΤ, 2021b).

### 3.1.2 Embrelia SC ( isopyrazam + difenoconazole)

Η σύνθεση του μυκητοκτόνου Embrelia SC αποτελείται από ένα συμπυκνωμένο εναιώρημα δύο δραστικών ουσιών, του isopyrazam (FRAC, 7) σε συγκέντρωση 10 % και του difenoconazole (FRAC, 3) σε συγκέντρωση 4 %. Η δραστική ουσία Isopyrazam ανήκει στη χημική ομάδα των (SDHI), του οποίου ο τρόπος δράσης αναφέρθηκε παραπάνω και η δραστική ουσία difenoconazole ανήκει στην ομάδα των τριαζολών (DMIs) (ΥΠΑΑΤ, 2021a). Το difenoconazole είναι μυκητοκτόνο ευρέως φάσματος (Wang et al., 2008) που λειτουργεί ως αναστολέας της βιοσύνθεσης των στερολών (IBS), παρουσιάζοντας ιδιαίτερη αποτελεσματικότητα κατά διαφόρων παθογόνων μυκήτων που προσβάλλουν τα σιτηρά (Munkvoid et al., 2009; Hamada, 2011). Χρησιμοποιείται για ψεκασμό φυλλώματος, κινείται διελεσματικά με προστατευτική, αλλά και θεραπευτική δράση. Οι δύο δραστικές ουσίες λειτουργούν με διαφορετικό και συμπληρωματικό τρόπο δράσης, επιτυγχάνοντας υψηλή φυτοπροστασία. Στην Ελλάδα το φυτοπροστατευτικό σκεύασμα Embrelia SC εγκρίθηκε για χρήση το 2018 και η έγκρισή του περιλαμβάνει χρήση ενάντια σε ασθένειες όπως: το φουζικλάδιο και το ωίδιο μηλοειδών, τη μονίλια και το ωίδιο της ροδακινιάς, καθώς και ήσσονος σημασίας χρήσεις ενάντια στην κλαδοσπορίωση και τη σκωρίαση (ΥΠΑΑΤ, 2021a).

### 3.2 Αιθέρια έλαια

Στη φύση υπάρχουν φυτά διαφόρων οικογενειών που παρουσιάζουν την ιδιότητα παραγωγής αιθέριων ελαίων, όπως αυτές των Asteraceae, Rutaceae, Liliaceae, Lamiaceae, Verbenaceae, Lauraceae, Cupressaceae, Apiaceae, Poaceae Moringaceae, Zingiberaceae, Ranunculaceae, Theaceae, Meliaceae, Myrtaceae και Piperaceae (Tabassum & Vidyasagar, 2013).

Τα φυτά παράγουν με φυσικό και χαρακτηριστικό τρόπο για κάθε είδος, ένα ευρύ φάσμα ενώσεων, κυρίως δευτερογενών μεταβολιτών, που είναι γνωστοί για τις φυτοπροστατευτικές τους ιδιότητες (Hancock et al., 2015). Υπάρχουν περισσότερα από 3000 αιθέρια έλαια, η σύνθεση των οποίων αποτελείται κυρίως από πολύπλοκες ενώσεις δευτερογενών μεταβολιτών (Bassole & Juliani, 2012). Οι ιδιότητες των αιθέριων ελαίων είναι γνωστές από παλιά με αναφορές χρήσης στην παραδοσιακή ιατρική (Bakkali et al., 2008; Bassole & Juliani, 2012).

Η ευρεία χρήση των χημικών στον έλεγχο των φυτοπαθογόνων οργανισμών βοήθησε σημαντικά στην αύξηση των στρεμματικών αποδόσεων των καλλιεργειών, αυξάνοντας όμως παράλληλα και το κόστος παραγωγής, αλλά και την ανησυχία των καταναλωτών σχετικά με τους κινδύνους από την υπολειμματικότητα τους στο νερό, στο έδαφος, στα τρόφιμα, τη δημόσια υγεία και το περιβάλλον (Paster & Bullerman, 1988). Θεωρούνται ιδιαίτερα επιβλαβή σε οργανισμούς μη στόχους, διαταράσσουν τη βιοποικιλότητα προκαλώντας περιβαλλοντική ανισορροπία και έχουν συμβάλλει ιδιαίτερα στην ανάπτυξη του φαινομένου της εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών (Gardener & Fravel, 2002; Lokesha & Benagi, 2007).

Τελευταία παρατηρείται ιδιαίτερη ανησυχία από τους καταναλωτές σχετικά με την ασφάλεια τροφίμων, οι οποίοι απαιτούν την ανάπτυξη βιώσιμων συστημάτων φυτοπροστασίας, που δεν προκαλούν μη αναστρέψιμες βλάβες στο περιβάλλον και που μεριμνούν για τη προστασία της βιοποικιλότητας των ειδών (Díáñez et al., 2018). Η σημαντικότερη πρόκληση που συναντάται κατά την παραγωγή γεωργικών προϊόντων, είναι η ελαχιστοποίηση των κινδύνων και των αρνητικών επιπτώσεων από τη χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων και λιπασμάτων στην ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον, διατηρώντας συγχρόνως την παραγωγικότητα και την βιωσιμότητα στη γεωργία (Díáñez et al., 2018). Η εισαγωγή νέων φυτοπροστατευτικών ουσιών στη γεωργία με φιλικό περιβαλλοντικό προφίλ και η ενσωμάτωσή τους σε προγράμματα ολοκληρωμένης διαχείρισης εχθρών και ασθενειών, θα μείωνε σημαντικά τις αρνητικές επιπτώσεις από τη χρήση των συνθετικών χημικών στο περιβάλλον (Díáñez et al., 2018). Η παγκόσμια ανησυχία

για τους κινδύνους αυτούς, έχει αυξήσει το ενδιαφέρον των ερευνητών στην εξεύρεση εναλλακτικών και ασφαλέστερων μεθόδων φυτοπροστασίας, προκειμένου να αντικαταστήσουν τα σημερινά συνθετικά χημικά φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Η χρήση φυσικών φυτικών προϊόντων με φυτοπροστατευτική δράση, όπως τα αιθέρια έλαια, θα μπορούσε να προταθεί ως εναλλακτική λύση, καθώς τείνουν να παρουσιάζουν χαμηλή τοξικότητα, επιφέρουν λιγότερα περιβαλλοντικά προβλήματα και χαίρουν ευρείας κοινωνικής αποδοχής (Paster, et al., 1995; Don-Pedro, 1996; Liu & Ho, 1999; Hamilton-Kemp et al., 2000; Paranagama et al., 2003).

Τα αιθέρια έλαια είναι φυσικά φυτοχημικά, που βρίσκουν διάφορες εφαρμογές και είναι ιδιαίτερα γνωστά για τη χρήση τους στην αντιμετώπιση ασθενειών, παρουσιάζοντας μειωμένο αριθμό παρενεργειών εν αντιθέσει με τα αντίστοιχα συνθετικά φάρμακα (Tabassum & Vidyasagar, 2013). Είναι ενώσεις που μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά, ως βιολογική μέθοδος αντιμετώπισης, λαμβάνοντας ρόλο κύριο ή συμπληρωματικό, λόγω της παρουσίας ιδιοτήτων αναστολής της ανάπτυξης παθογόνων οργανισμών (Abdel-Kader et al., 2011; Nazzaro et al., 2017). Μελέτες in-vitro που έχουν δημοσιευθεί, επιβεβαιώνουν τη δράση των αιθέριων ελαίων και των κύριων συστατικών τους έναντι παθογόνων μυκήτων που προσβάλλουν τα φυτά και τον άνθρωπο (Tabassum & Vidyasagar, 2013). Διάφοροι ερευνητές έχουν αναφερθεί στις μυκητοκτόνες ιδιότητες φυσικών εκδοχών και των αιθέριων ελαίων φυτών, ενάντια σε φυτοπαθογόνους μύκητες, όπως αυτές των *Syzygium aromaticum* έναντι του *Alternaria alternata* (Costa et al., 2011), *Cymbopogon citratus* και *Ocimum basilicum* έναντι ειδών του γένους *Phytophthora* (Amini et al., 2016) και *Mentha piperita* και *Pelargonium roseum* έναντι του *Lecanicilium fungicola* (Mehrparvar et al., 2016) καθώς και πολλά ακόμα.

Τα αιθέρια έλαια είναι πτητικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους με λιπόφιλες ιδιότητες, οι οποίες έχουν την τάση να πτητικοποιούνται σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες (Utama et al., 2002; Pichersky et al., 2006). Σε σύγκριση με τα φυτικά μέρη από τα οποία προέρχονται περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις πτητικών ουσιών (Edris & Farrag, 2003) και συντίθενται από σύνθετα μείγματα συστατικών, που αποτελούνται κυρίως από μονοτερπένια και σεσκιτερπένια (Dorman & Deans, 2000). Τα κύρια συστατικά τους περιλαμβάνουν αλκοόλες, αλδεΐδες, εστέρες, κετόνες, φαινόλες, οξείδια, κουμαρίνες και φαινυλπροπένια (Dorman & Deans, 2000). Τα αιθέρια έλαια παράγονται από τα φυτικά όργανα, επιτελώντας διάφορες λειτουργίες και μπορούν να προσφέρουν προστασία έναντι εντόμων και ασθενειών (Goubran & Holmes, 1993). Είναι φυσικά σύνθετα μείγματα που περιλαμβάνουν 20–60 συστατικά σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Χαρακτηρίζονται από δύο ή τρία κύρια



συστατικά που βρίσκονται σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται μεταξύ 20-70% σε σχέση με τα άλλα συστατικά που αποτελούν τη σύνθεση του μείγματος (Díáñez et al., 2018).

Πλήθος επιστημονικών ερευνών υποδεικνύουν τη σπουδαιότητα των αιθέριων ελαίων στην αντιμετώπιση παθογόνων (Sheetal & Singh, 2008) και οι μυκητοκτόνες ιδιότητές τους αποδίδονται σε συστατικά τα οποία παράγουν, όπως η καρβακρόλη, *α-terpinly acetate*, *cymene*, *θυμόλη*, *pinene*, *λιναλοόλη* κ.α (Knobloch et al., 1985; Cimanga et al., 2002). Η συσχέτιση μεταξύ των μυκητοκτόνων ιδιοτήτων των κύριων συστατικών των αιθέριων ελαίων και ελαίων έχει οδηγήσει στο δίλλημα για το εάν η κατηγοριοποίηση τους θα έπρεπε να πραγματοποιείται βάσει του κύριου συστατικού ή βάσει του φυτικού είδους από όπου προέρχεται (Griffin et al., 1999; Inouye et al., 2006). Σύμφωνα με τους Díáñez et al., (2018), το ποσοστό ανάσχεσης της ανάπτυξης του *Sclerotinia sclerotiorum* ήταν υψηλό για έλαια που προήλθαν από τα είδη *Thymus mastichina*, *Eukalyptus globulus* και *Rosmarinus officinalis*.

Υποθέσεις σχετικά με το μηχανισμό δράσης των αιθέριων ελαίων αναφέρουν την αναστολή της σπορίωσης, αλλοίωση του κυτταρικού τοιχώματος και της κυτταρικής μεμβράνης, καθώς και την καθυστέρηση της βλάστησης και της ανάπτυξης της υφής (Alvarez-Castellanos et al., 2001; Inouye et al., 2001a; Inouye et al., 2001b; Inouye et al., 2001c; Sharma & Tripathi, 2006). Γενικά σύμφωνα με την πλειοψηφία των αναφορών, υπάρχει συμφωνία στο γεγονός ότι από τη δράση τους πραγματοποιούνται σημαντικές μορφολογικές αλλαγές στην υφή, κυρίως στη διάμετρο αυτής και το πάχος των τοιχωμάτων της, πιθανώς από την παρεμβολή των συστατικών των αιθέριων ελαίων στις ενζυματικές αντιδράσεις της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος, οδηγώντας στη λανθασμένη σύνθεση των συστατικών του όπως τη χιτίνη, τις γλυκάνες και τις γλυκοπρωτείνες (Zambonelli et al., 1996; de Billerbeck et al., 2001; Helal, 2006; Sharma & Tripathi, 2006).

Ο τρόπος με τον οποίο δρουν οι πτητικές ενώσεις στο μυκήλιο παραμένει άγνωστος. Ως εκ τούτου, δημιουργούνται υποθέσεις για το εάν η δράση τους ασκείται απευθείας στο μυκήλιο ή μέσω της απορρόφησης τους από το θρεπτικό υπόστρωμα (Inouye et al., 1998; Inouye et al., 2000). Κάποιοι φαίνεται να υποστηρίζουν και τις δύο εκδοχές, ενώ άλλοι υποστηρίζουν ότι ο μηχανισμός δράσης σχετίζεται απευθείας με την απορροφούμενη ποσότητα του κάθε συστατικού σε διάφορα τμήματα της στερεής φάσης, όπως οι μεμβράνες, οι κόκκοι, κ.α., υποθέτοντας έτσι ότι σε χαμηλές δόσεις, η μυκητοκτόνος ιδιότητα σχετίζεται απευθείας με τα χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου συστατικού, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις τα συστατικά των αιθέριων ελαίων δρουν με κοινό μυκητοκτόνο μηχανισμό (Edris & Farrag, 2003; Pauli, 2005).

Τέλος, κρίνεται ιδιαίτερα σημαντικό να πραγματοποιούνται in-vivo μελέτες, ώστε να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα σε διαφορετικά συστήματα παθογένειας (pathosystems), προκειμένου τα αιθέρια έλαια να συμπεριληφθούν σε συστήματα παραγωγής αγροτικών προϊόντων, με σκοπό τη μείωση της χρήσης και εξάρτησης από τα χημικά φυτοπροστατευτικά προϊόντα (Díáñez et al., 2018).

### 3.2.1 Οικογένεια Meliaceae

Η οικογένεια Meliaceae αποτελείται κυρίως από δένδρα και θάμνους με ευρεία διάδοση και μεγάλη οικονομική σημασία. Τα προϊόντα των φυτών της βρίσκουν χρήσεις στη σαπωνοποιεία και χρησιμοποιούνται επίσης ως εντομοκτόνα (Tabassum & Vidyasagar, 2013). Έχει βρεθεί ότι τα αιθέρια έλαια αυτών παρουσιάζουν και μυκητοκτόνες ιδιότητες και έτσι θα μπορούσαν να αποτελέσουν μελλοντικά μία πηγή μυκητοκτόνων (Tabassum & Vidyasagar, 2013).

#### 3.2.1.1 Το Νήμ – Neem (*Azadirachta indica*)

Το δένδρο *Azadirachta indica*, της οικογένειας Meliaceae, είναι ιδιαίτερα διαδεδομένο και καλλιεργείται κυρίως στην Ινδία (Karl, 1997). Το έλαιο που παράγεται από το δένδρο έχει χρησιμοποιηθεί για πάνω από 2000 χρόνια στην παραδοσιακή ιατρική, σε χώρες όπως την Ινδία, τη Σρι Λάνκα, το Μιναμάρ, την Ταϊλάνδη, τη Μαλαισία και την Ινδονησία. Χρησιμοποιήθηκε για την αντιμετώπιση ταινιών και της δυσκοιλιότητας, τους ρευματισμούς, το έλκος, τον κνησμό, καθώς και στη θεραπεία χρόνιων δερματολογικών ασθενειών (Aggarwal & Dhawan, 1995). Σήμερα, βρίσκει ιδιαίτερη εφαρμογή ως φυσικό εντομοκτόνο, παρέχοντας ικανοποιητικά αποτελέσματα ενάντια σε ζωικούς εχθρούς των καλλιεργειών, το οποίο βιοδιασπάται και παρουσιάζει ελάχιστες παρενέργειες (Locke, 1995).

Το δένδρο είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε τερπενοειδή (Salazar et al., 2015). Πάνω από 300 συστατικά έχουν απομονωθεί από διαφορετικά όργανα του δένδρου και κάθε χρόνο ανακαλύπτονται νέα (Gosse et al., 2005). Το κύριο συστατικό του είναι η αζαδιραχτίνη, ενώ περιέχει και άλλα ενεργά συστατικά όπως: nimbolinin, nimbin, nimbidin, nimbidol, sodium nimbinate, gedunin, salannin και quercetin (Alzohairy, 2016). Το έλαιο αζαρακτίνη που προέρχεται από τους σπόρους του δένδρου, παρουσιάζει εντομοκτόνο, ακαρεοκτόνο, βακτηριδιοκτόνο και μυκητοκτόνο δράση (Locke, 1995). Ο μηχανισμός δράσης του ελαίου

ενάντια στους παθογόνους μικροοργανισμούς φαίνεται πως επιτυγχάνεται ελέγχοντας την ανάπτυξή τους μέσω της κατάρρευσης των κυτταρικών τους τοιχωμάτων (Alzohairy, 2016).

Οι Jabeen et al., (2013) μελέτησαν την επίδραση της μυκηλιακής ανάπτυξης του μύκητα *Alternaria solani*, παρουσία ελαίου που προήλθε από διαφορετικά σημεία του δένδρου, συγκρίνοντας το με μείγμα χημικού μυκητοκτόνου, αποτελούμενο από τις δραστικές ουσίες matalaxyl και mancozeb. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η ελάχιστη συγκέντρωση αιθέριου ελαίου που απαιτήθηκε για τη μείωση της μυκηλιακής ανάπτυξης (Minimum Inhibitory Concentration – MIC) ήταν 0.19 mg, συγκέντρωση κατά πολύ μικρότερη από αυτή που απαιτήθηκε κατά την έκθεση στο χημικό μυκητοκτόνο, που ήταν 0.78 mg, προβάλλοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τις σημαντικές μυκητοκτόνες ιδιότητες του αιθέριου ελαίου.

Σύμφωνα με τους Da-Costa et al., (2010), το έλαιο που εκχυλίζεται από τους σπόρους του *Azadirachta indica* παρουσιάζει ιδιότητα αναστολής της μυκηλιακής ανάπτυξης (ξηρό βάρος, διάμετρο αποικίας και ρυθμό ανάπτυξης) του *Aspergillus flavus*. Οι βιοδοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα, στα οποία εισήχθη ελαιο σε συγκεντρώσεις μεταξύ 0.5 – 5.0 v/v. Επίσης, είναι άξιο αναφοράς ότι η μυκηλιακή αναστολή επηρεαζόταν θετικά όσο αυξανόταν η συγκέντρωση του ελαίου και σύμφωνα με τους Locke (1995) και Da-Costa et al., (2010), η μυκηλιακή ανάπτυξη που λήφθηκε από εκχύλισμα σπόρων του δένδρου παρουσίασε αυξημένη αναστολή σε σχέση με αυτό που λήφθηκε από τα φύλλα. Μελέτες σχετικά με τη μυκητοκτόνο ιδιότητα του ελαίου του *Azadirachta indica* (Kazmi et al., 1995; Locke, 1995; Sunita & Mahendra, 2008) απέδειξαν ότι σε συγκεντρώσεις 2-10% αιθέριου ελαίου μπορεί να προκληθεί αναστολή της μυκηλιακής ανάπτυξης των μυκήτων *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* και *Fusarium oxysporum*. Οι Govindachari et al., (1998), αναφέρουν ότι οι μυκητοκτόνες ιδιότητες του ελαίου Neem αποτελούν συνάρτηση του μείγματος των τετρανοτριτερπενοειδών που συνθέτουν. Πολλοί μελετητές έχουν επίσης παρατηρήσει ότι η απομόνωση και η χρήση καθαρής αζαδιραχτίνης παρείχε μειωμένη αποτελεσματικότητα σε σχέση με το έλαιο στην πλήρη σύνθεσή του (Kavitha et al., 2014).

### 3.2.2 Οικογένεια Lamiaceae

Τα φυτά της οικογένειας Lamiaceae, παρουσιάζουν ιδιαίτερη οικονομική σημασία και βρίσκουν χρήσεις στη φαρμακολογία, στη μαγειρική, στην ανθοκομία, καθώς και διάφορες άλλες εμπορικές χρήσεις (Tabassum & Vidyasagar, 2013). Μελέτες, σχετικά με την παραγωγή αιθέριων ελαίων από πολλά και διαφορετικά είδη της οικογένειας Lamiaceae,

έχουν αποδείξει την παρουσία σημαντικών βιολογικών δραστηριοτήτων και κυρίως των αντιμικροβιακών τους ιδιοτήτων (Baratta et al., 1998) που συνδέονται στενά με τη χημική σύνθεση των αιθέριων ελαίων.

Οι επούλωτικές ιδιότητες του αιθέριου ελαίου του *Ocimum basilicum* L, του οποίου το κύριο συστατικό είναι η λιναλοόλη, είναι ιδιαίτερα γνωστές και χρησιμοποιείται για τη θεραπεία των πληγών (Rios & Recio, 2005), ενώ το έλαιο του *O. sanctum* παρουσιάζει αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι παθογόνων μυκήτων (Sunita & Mahendra, 2008). Μελέτες σχετικά με την αντιμικροβιακή δραστηριότητα των αιθέριων ελαίων ειδών θυμαριού έδειξαν ότι τα περισσότερα είδη του περιέχουν μεγάλες συγκεντρώσεις φαινολικών μονοτερπενίων, παρουσιάζοντας αντικές, βακτηριοκτόνες και μυκητοκτόνες ιδιότητες (Tabassum & Vidyasagar, 2013). Η ισχυρή τους δράση ενισχύεται από βιοδοκιμές του αιθέριου ελαίου *Thymus striatus*, το οποίο παρουσίασε ισχυρές ανασταλτικές ιδιότητες σε όλους τους μύκητες στους οποίους υποβλήθηκε (Rasooli et al., 2006). Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από βιοδοκιμές αιθέριου ελαίου ρίγανης *Origanum vulgare*, του οποίου τα κύρια συστατικά είναι η καρβακρόλη, η θυμόλη και το *p*-cymene (Holly & Patel, 2005; Bozin et al., 2006), αναστέλλοντας επίσης την ανάπτυξη όλων των παθογόνων μυκήτων που εξετάστηκαν.

Παρακάτω γίνεται αναφορά στο θυμάρι (*Thymus vulgaris*), τη ρίγανη (*Origanum vulgare*), και τη λεβάντα (*Levandula angustifolia*), φυτών της οικογένειας Lamiaceae των οποίων τα αιθέρια έλαια δρουν αποτελεσματικά στην ανασχεση της μυκηλιακής ανάπτυξης.

### 3.2.2.1 Το Θυμάρι (*Thymus vulgaris*)

Το θυμάρι (*Thymus vulgaris* L.) ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae. Είναι αυτοφυές θαμνώδες πολυετές αρωματικό φυτό με ευχάριστο άρωμα (Davis, 1982). Το αιθέριο έλαιό του και το αρωματικό του νερό χρησιμοποιήθηκαν σε περιοχές της Μεσογείου και της Τουρκίας. Οι αρχαίοι Έλληνες το χρησιμοποιούσαν ως θυμιάμα στους ναούς και οι Ρωμαίοι στη μαγειρική, καθώς και στην παραγωγή μελιού. Το αιθέριο έλαιο που εκλύεται από τους ανθούς, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αρωματικό στη μαγειρική, τη φαρμακευτική και την κοσμητική (Senatore, 1996; Simon et al., 1999). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι το θυμάρι ανακουφίζει από τη δυσφορία του τυμπανισμού του στομάχου και παρέχει αντισηπτικές, αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Baranauskiene et al., 2003). Σύμφωνα με τον Moghtader (2012), το έτος 1725 παρατηρήθηκε ότι το αιθέριο έλαιο θυμόλη, που εκλύεται από το αρωματικό φυτό θυμάρι, παρουσιάζει ισχυρές απολυμαντικές ιδιότητες ενάντια σε μύκητες και βακτήρια. Σε σύντομο χρονικό διάστημα από την παρατήρηση αυτή, η θυμόλη

κατατάχθηκε στην κατηγορία των αποχρεμπτικών και έβρισκε επίσης φαρμακευτική εφαρμογή στην αντιμετώπιση αιτιών που προκαλούν συμπτώματα διάρροιας και πυρετού (Moghtader, 2012).

Κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου του θυμαριού είναι η θυμόλη, ένα φυσικό φαινολικό μονοτερπένιο, το οποίο αποτελεί το 20-50% της σύνθεσης του, ενώ περιέχει και διάφορα ενεργά συστατικά επιπλέον, όπως: τα τερπένια, την καρβακρόλη, τη μπορνερόλη, τη λιναλοόλη και το p-cymene (Moghtader, 2012). Η θυμόλη είναι μία λευκή κρυσταλλική ουσία με ευχάριστο άρωμα που παρουσιάζει ισχυρές αντισηπτικές ιδιότητες. Ανήκει σε μία ομάδα φυσικών συστατικών ουσιών που αποκαλούνται βιοκτόνα και χρησιμοποιείται μόνη της ή σε συνδυασμό με άλλα βιοκτόνα συστατικά, όπως η καρβακρόλη και παρουσιάζει ιδιαίτερη αποτελεσματικότητα ως μυκητοκτόνο (Ahmad et al., 2010). Η μικροβιοκτόνος ιδιότητά της οφείλεται στη φαινολική της δομή (Moghtader, 2012).

Ο μυκητοκτόνος μηχανισμός δράσης της θυμόλης οφείλεται στην ιδιότητά της να αλλοιώνει τη μορφολογία της υφής του μύκητα και να την αδρανοποιεί, με αποτέλεσμα να σταματά η αύξηση της και να προκαλείται η λύση των κυτταρικών τοιχωμάτων των υφών (Numpraque et al., 2011). Η λιποφιλική της ιδιότητα, της επιτρέπει την αλληλεπίδραση με την κυτταρική μεμβράνη των μυκήτων, αλλοιώνοντας τη διαπερατότητά της και επιτρέποντας την απώλεια μακρομορίων (Segvic et al., 2007). Είναι γνωστό πως η θυμόλη δρα ενεργά και κατά βακτηρίων όπως η σαλμονέλα και ο σταφυλόκοκκος (Baytop, 1984; Lueng & Foster, 1996; Jellin et al., 2000).

### **3.2.2.2 Η ρίγανη (*Origanum vulgare*)**

Το φυτό ρίγανη (*Origanum vulgare*) ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae, κατάγεται από την περιοχή της Μεσογείου και είναι γνωστό για τις χρήσεις του στην παραδοσιακή ιατρική. Είναι πολυετές φυτό με ύψος που φτάνει τα 80 cm, σχηματίζει σκουρόχρωμα οβάλ αρωματικά φύλλα και λευκά, ροζ ή μωβ άνθη (Kumar et al., 2016). Τα αρχαία χρόνια η ρίγανη θεωρούνταν το πολύτιμο φυτό της θεάς Αφροδίτης, συμβόλιζε την ευτυχία και χρησιμοποιούνταν ως φυλαχτό για την επίτευξη αυτής. Είναι γνωστό ότι οι Αιγύπτιοι το χρησιμοποιούσαν ως συντηρητικό τροφίμων και αντίδοτο κατά των δηλητηριάσεων, ενώ οι Έλληνες το χρησιμοποιούσαν για την αντιμετώπιση δερματικών μολύνσεων και ερεθισμών, την υδρωπικία, τους σπασμούς και ως αντίδοτο σε δηλητηριάσεις. Σήμερα χρησιμοποιείται κυρίως στην μαγειρική, την αρωματοποιία, ως απορρυπαντικό, την κοσμητική και τη φαρμακευτική (Kumar et al., 2016).

Το αιθέριο έλαιο του φυτού παρουσιάζει βακτηριοκτόνες, μυκητοκτόνες, αντιπαρασιτικές, αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Οι μυκητοκτόνες ιδιότητες του βρίσκουν δράση κατά των μυκήτων *Aspergillus parasiticus*, *A. niger*, *A. flavus*, και *A. ochraceus*, παρεμποδίζοντας την παραγωγή αφλατοξινών, ενώ το έλαιο του θεωρείται ιδιαίτερα αποτελεσματικό στην αντιμετώπιση του μύκητα *Candida albicans* και των βακτηρίων *Staphylococcus aureus*, και *Pseudomonas aeruginosa* (Kumar et al., 2016).

Παρατηρήθηκε ότι αιθέρια έλαια από διαφορετικά είδη θυμαριού δεν παρουσιάζουν τις ίδιες ιδιότητες στις ίδιες συγκεντρώσεις, καθώς η in-vitro σύγκριση μεταξύ δύο ελαίων θυμαριού παρείχε διαφορετικά εργαστηριακά αποτελέσματα, γεγονός που αποδόθηκε στη διαφορετική επί τοις εκατό περιεκτικότητα των συστατικών θυμόλης, καρβακρόλης και λιναρόλης (Shabnum & Wagay, 2011). Διαπιστώθηκε επίσης ότι ακόμα και διαφορετικοί βιότυποι του ίδιου είδους ρίγανης παράγουν διαφορετικά ποσοστά των κύριων συστατικών της (Wogiatzi et al., 2009b). Η ανάλυση των συστατικών και οι μηχανισμοί δράσης απαιτούν περαιτέρω μελέτη προκειμένου να προσδιοριστούν οι άριστες συγκεντρώσεις, καθώς και ο χρόνος έκθεσης που απαιτείται για τον έλεγχο της ανάπτυξης των παθογόνων (Shabnum & Wagay, 2011).

Τα βιοενεργά συστατικά του αιθέριου ελαίου εκχυλίσματος φύλλων ρίγανης είναι το ροσμαρινικό οξύ, η λιναλοόλη, οι ταννίνες, τα φλαβονοειδή, τα τριτερπένια και οι φαινόλες θυμόλη και καρβακρόλη, ενώ περιέχει επίσης βιταμίνες, σίδηρο, ασβέστιο, χαλκό, νιασίνη, μαγνήσιο και θιαμίνη (Kumar et al., 2016). Κύριο συστατικό της σύνθεσης του αιθέριου ελαίου της ρίγανης είναι η καρβακρόλη, το οποίο είναι ένα μικρομόριο που συναντάται σε είδη της οικογένεια *Lamiaceae*, ιδιαίτερα όμως στη ρίγανη και το θυμάρι (Marchese et al., 2018). Η σύνθεση της καρβακρόλης είναι 2-methyl-5-(1-methylethyl)-phenol. Περιέχει μία μονή υδροξυλική ομάδα (-OH), η οποία βρίσκεται δίπλα σε μία μεθυλική στον αρωματικό κύκλο. Η θέση της υδροξυλικής ομάδας έχει ιδιαίτερη σημασία στην εμφάνιση των βιολογικών και χημικών της χαρακτηριστικών (Arfa, 2006; Marchese et al., 2018).

Η ουσία καρβακρόλη παρουσιάζει δράση κατά διαφόρων παραγόντων που προκαλούν προβλήματα υγείας στους ανθρώπους και που προσβάλουν τα φυτά, ενώ θεωρείται ασφαλής για ανθρώπινη κατανάλωση (Marchese, et al., 2018). Σε μελέτη των Liu et al., (2019) βρέθηκε ότι η καρβακρόλη μπορεί να δράσει αποτελεσματικά κατά εδαφογενών παθογόνων και κατά τριών σημαντικών παθογόνων φυλλώματος (*Xanthomonas perforans*, *Alternaria tomatophila* και *Podosphaera xanthi*). Σύγχρονες μελέτες αποδεικνύουν ότι η αποτελεσματικότητα της καρβακρόλης ενάντια σε παθογόνα σχετίζεται με την άμεση βακτηριοκτόνο και μυκητοκτόνο της δράση, η οποία επηρεάζεται αρνητικά λόγω της

πτητικότητα της. Γίνονται προσπάθειες για τη σύνθεση μειγμάτων που παρεμποδίζουν την πτητικότητα, προκειμένου να γίνει πιο αποτελεσματική, επιμηκύνοντας το χρόνο δράσης της, ώστε να γίνει δυνατή η υπαίθρια χρήση της στη γεωργία για τον έλεγχο βακτηρίων, μυκήτων και ιώσεων (Liu et al., 2019).

Πλήθος μελετών (Kalembe & Kunicka, 2003; Marchese et al., 2018; Fortunati, 2019) επιβεβαιώνουν την αντιμικροβιακή δράση της καρβακρόλης και αναφέρονται σε τεχνικές που χρησιμοποιούνται κατά τη χρήση της, το μηχανισμό δράσης καθώς και τις αλληλεπιδράσεις της με άλλες ουσίες για την προστασία από ιούς και των εντομοκτόνων ιδιοτήτων της (Traboulsi, 2002; Cetin, 2007). Μελέτες σχετικά με την αναγνώριση του μηχανισμού δράσης της ενάντια σε μύκητες και βακτήρια (Kalembe & Kunicka, 2003; Marchese et al., 2018), αναφέρουν ότι η υδροφοβική φύση της υδροξυλικής ομάδας της, καθώς και η δυνατότητά της να ανταλλάσει πρωτόνια, παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιμικροβιακή της δράση. Αυτοί οι παράγοντες φαίνεται να επηρεάζουν τη συνοχή των κυττάρων των μικροβίων επηρεάζοντας την κυτταρική μεμβράνη. Επιπροσθέτως, η καρβακρόλη μπορεί να επηρεάσει φυσιολογικές διεργασίες εντός του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένης της σύνδεσής της στο DNA και της παρεμπόδισης της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης (Liu et al., 2019). Η εφαρμογή της σε βακτήρια μπορεί να επηρεάσει επιδημιολογικούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένων της μειωμένης παραγωγής τοξινών και της σύνθεσης βιομεμβρανών. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η καρβακρόλη επηρεάζει την έκφραση γονιδίων (Burt, 2016; Siroli, 2018) μειώνοντας την επιδημιολογική ικανότητα των παθογόνων μικροοργανισμών (Sharifi, 2017; Ghafari, 2018).

### **3.2.2.3 Η λεβάντα (*Levandula angustifolia*)**

Το αρωματικό φυτό λεβάντα (*Levandula angustifolia*) ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae, η οποία περιλαμβάνει περίπου 30 είδη και πολλά υποείδη (Boelens, 1995). Είναι γνωστή επίσης και συναντάται στη βιβλιογραφία ως *L. officinalis*, *L. vera* και ως η γνήσια λεβάντα (Boelens, 1995; Moon et al, 2007). Το αιθέριο έλαιο της χρησιμοποιείται στην παρασκευή αρωμάτων, σαπουνιών και καλλυντικών (Kim & Lee, 2002) και χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα λιναλοόλης και οξικού λιναλιλεστέρα (Shellie et al, 2002). Βρίσκει ιδιαίτερη εφαρμογή στη βιομηχανία αρωμάτων κυρίως λόγω της μικρής περιεκτικότητάς του σε καμφορά (Moon et al, 2007) και στη βιομηχανία τροφίμων ως πρόσθετο αρωματικό (Kim & Lee, 2002). Παρουσιάζει αντιβακτηριδιακές, μυκητοκτόνες, ηρεμιστικές, καταπραϋντικές και αντικαταθλιπτικές ιδιότητες, ενώ θεωρείται επίσης αποτελεσματικό για την εφαρμογή σε

εγκαύματα και τα τσιμπήματα εντόμων (Lis-Balchin & Hart, 1999; Cavanagh & Wilkinson, 2002).

Το κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου λεβάντας είναι η λιναλοόλη, ενώ περιέχει επιπλέον και πλήθος ενεργών συστατικών όπως ο οξικός λιναλιλεστέρας, η γερανιόλη, το β-καρυοφυλλένιο, ο οξικός λαβαντουλυλεστέρας κ.α (Smigielski et al, 2009). Σε in-vitro μελέτη των Moon et al (2007) αναφέρεται ότι το αιθέριο έλαιο του *L. angustifolia* παρουσιάζει τη δυνατότητα ανάσχεσης της μυκηλιακής ανάπτυξης του παθογόνου μύκητα *L. maculans* για διάστημα 4 ημερών, ενώ δεν φάνηκε να υπάρχει κάποια σημαντική επίδραση στον έλεγχο του παθογόνου μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum*, καθώς δεν ήταν ικανό να σταματήσει την ανάπτυξη του μετά από διάστημα 42 ωρών. Μια άλλη in-vitro μελέτη των Antonov et al (1997) απέδειξε επίσης ότι η δόση 1% αιθέριου ελαίου του *L. angustifolia* προκάλεσε την ανάσχεση της βλάστησης των κονιδίων, καθώς και της ανάπτυξης του βλαστικού σωλήνα του μύκητα *Botritis cinerea*, ενώ δεν παρατηρήθηκε να έχει καμία επίδραση στην παραγωγή κονιδίων του *Penicillium digitarium* ακόμα και σε δόσεις 1000 μg/ml. Αναφέρουν επίσης πως το αιθέριο έλαιο του *L. angustifolia* παρουσιάζει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην ανάσχεση της ανάπτυξης του βλαστικού σωλήνα, παρά στην ανάπτυξη της μυκηλικής υφής.

Οι Inouye et al., (2001) αναφέρουν ότι η ελάχιστη συγκέντρωση αιθέριου ελαίου *L. angustifolia*, που απαιτείται για την ανάσχεση της μυκηλιακής ανάπτυξης (Minimum Inhibitory Concentration – MIC), μπορεί να μειωθεί δυο έως τέσσερις φορές σφραγίζοντας τα δισκία δίσκους Petri κατά το διάστημα της επώασης, προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι απώλειες λόγω της πτητικής φύσης των συστατικών του.

### 3.2.3 Οικογένεια Poaceae

Η οικογένεια Poaceae αποτελεί μία ιδιαίτερα μεγάλη οικογένεια μονοκοτυλήδων φυτών, τα οποία σήμερα παγκοσμίως παρουσιάζουν μεγάλη οικονομική σημασία (Tabassum & Vidyasagar, 2013). Τα αιθέρια έλαια αυτών περιέχουν ενώσεις που παρουσιάζουν δράση κατά των μυκήτων και θα μπορούσαν ίσως μελλοντικά να αποτελέσουν μια σημαντική ανανεώσιμη πηγή παραγωγής μυκητοκτόνων φαρμάκων έναντι του *Aspergillus fumigatus* και *A. Niger* (Tabassum & Vidyasagar, 2013). Φυτά της οικογένειας με αιθέρια έλαια, όπως αυτά των *Cymbopogon martini* και *Cymbopogon citratus* (Rios & Recio, 2005), παρουσιάζουν επίσης ιδιαίτερα ισχυρή μυκητοκτόνο δράση (Ewansiha et al., 2012). Σύμφωνα με μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, το αιθέριο έλαιο του *C. citratus* παρουσίασε τη μεγαλύτερη ενεργή



ιδιότητα έναντι στελεχών δερματοφύτων που προσβάλλουν τον άνθρωπο, αναστέλλοντας την ανάπτυξη του 80% των στελεχών αυτών (Singh et al., 2005; Fernanda et al., 2012).

### 3.2.3.1 Το λεμονόχορτο (*Cymbopogon citratus*)

Το φυτό *Cymbopogon citratus* με κοινή ονομασία Lemongrass (λεμονόχορτο), ανήκει στην οικογένεια Poaceae, που περιλαμβάνει περισσότερο από 635 γένη και 9000 είδη. Φύεται κυρίως σε τροπικά και υποτροπικά μέρη του κόσμου και είναι ιδιαίτερα διαδεδομένο, με τα φυτά *Cymbopogon flexuosus* και *C. citratus* να αντιπροσωπεύουν τα κύρια καλλιεργούμενα είδη (Majewska et al., 2019). Το λεμονόχορτο είναι αρωματικό, αιθιαλές, πολυετές φυτό με πολλές παραφυάδες, παράγει άκαμπτους μίσχους σε ένα κοντό ρίζωμα και φτάνει σε ύψος 1,5 m. Σπάνια παράγει άνθη και τα φύλλα του είναι γαλαζοπράσινα, μακριά και λεπτά. Το πρόθεμα υποδεικνύει το χαρακτηριστικό άρωμα του συστατικού citral, που προσδίδει τη χαρακτηριστική οσμή του λεμονιού, όταν τριφτούν τα φύλλα της (Majewska, 2019).

Χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη για την παραγωγή ιονόνης, καθώς και της βιταμίνης A και β -καροτένιου (Paviani et al., 2006). Πιστεύεται ότι κατάγεται από τη Μαλαισία και συναντάται επίσης ως φυτό κηποτεχνίας, ιδίως στη νοτιοανατολική Ασία (Skaria et al., 2012). Χρησιμοποιείται ως αρωματικό στη μαγειρική, αποξηραμένο ή νωπό. Τα έλαια του λεμονόχορτου, χρησιμοποιούνται από τα αρχαία χρόνια στην παραδοσιακή ιατρική ως θεραπεία για τη βελτίωση του κυκλοφορικού, στη σταθεροποίηση των κύκλων της εμμηνόρροιας, στην προαγωγή της πέψης και στην ενδυνάμωση του ανοσοποιητικού συστήματος. Χρησιμοποιείται επίσης στην παραγωγή αρωμάτων, απορρυπαντικών και παραφαρμακευτικών προϊόντων. Έχει αποδειχθεί πως το αφέψημα φύλλων του είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό στην καταπολέμηση διαφόρων στομαχικών διαταραχών, την πρόληψη ελκών, τη διέγερση της πέψης και της απέκκρισης ενώ βοηθά στη αντιμετώπιση της ναυτίας, του κοιλιακού άλγους και της δυσκοιλιότητας (Leite et al., 1986; Carbajal et al., 1989) και για τους παραπάνω λόγους, σε πολλές χώρες χρησιμοποιείται ως θεραπευτικό βότανο (Avoseh et al., 2015). Θεωρείται ασφαλές για κατανάλωση και έρευνες έχουν δείξει ότι διάφορα συστατικά του έχουν αντιμικροβιακή (Bassolé et al., 2011), αντιοξειδωτική (Mansour et al., 2015), αντιπαρασιτική (Kroniesi et al., 2014), εντομοκτόνο δράση και εντομοαπωθητικές ιδιότητες (Brugger et al., 2019). Οι ιδιότητες του αυτές μπορούν να εφαρμοστούν στη συντήρηση τροφίμων ως εναλλακτικό των συνθετικών συντηρητικών. Οι αντιμικροβιακές του ιδιότητες υποστηρίζονται από πλήθος μελετών επιβεβαιώνοντας τη δράση του ακόμα και σε μύκητες που προσβάλλουν τον άνθρωπο (Hammer et al., 1999;

Saikia et al., 2001; Appendini & Hotchkiss, 2002; Daferera et al., 2003; Plotto et al., 2003; Serrano et al., 2005).

Το αιθέριο έλαιο του παρουσιάζει μεγάλο αριθμό ιδιοτήτων (Wijesekara et al., 1997) και η βιολογική του δράση προσδιορίζεται από τα χημική του σύνθεση που αποτελείται από αλδεΰδες, τερπένια υδρογονανθράκων, αλκοόλες, κετόνες και εστέρες (Majewska, 2019). Οι βιολογικές ιδιότητες του οφείλονται στην παρουσία φαινολικών συστατικών συμπεριλαμβανομένου φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών (Olorunnisola et al., 2014; Roriz et al., 2014; Tavares et al., 2015). Το κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου του *C. citratus* είναι το “citral”, το οποίο είναι ένα μείγμα δύο γεωμετρικών ισομερών, του E-ισομερούς που είναι γνωστή ως γερανιάλη ή citral A και του Z-ισομερούς που είναι γνωστή ως neral ή citral B. Το ποσοστό της γερανιάλης (0,99-48.14%) κυριαρχεί έναντι του neral (0-38,32%), ενώ η ποιότητα του αιθέριου ελαίου εκτιμάται ως η συνολική περιεκτικότητα του σε citral (Majewska, 2019). Περιέχει επίσης επιπλέον πλήθος ενεργών συστατικών όπως myrcene, citronellal, limonene, β-καρυοφυλλιο (β-caryophyllene) (Majewska, 2019).

Όπως στα περισσότερα έλαια έτσι και στην περίπτωση του *C. citratus*, η χημική σύσταση του αιθέριου ελαίου ποικίλει και εξαρτάται από τη γεωγραφική περιοχή που φύεται, τις καλλιεργητικές τεχνικές που δέχεται, την ηλικία του φυτού, τη φωτοπερίοδο, την εποχή συγκομιδής, τις γενετικές παραλλαγές και τις μεθόδους εξαγωγής του (Carlson et al., 2001; Verma et al., 2015). Σε μελέτη των Mishra and Dubey (1994), το αιθέριο έλαιο του παρουσίασε μυκητοκτόνο δράση, αναστέλλοντας εντελώς τη μυκηλιακή ανάπτυξη σε 35, 45, και 47 είδη μυκήτων σε δόσεις των 500, 1000 και 1500 ppm αντίστοιχα. Διατήρησε επίσης την ιδιότητά του αναλλοίωτη για διάστημα 210 ημερών κατά την αποθήκευση, παρουσιάζοντας ιδιαίτερο ενδιαφέρον για χρήση του στη συντήρηση τροφίμων (Mishra & Dubey, 1994). Επιπροσθέτως, έχει αποδειχθεί ότι οι ιδιότητες του αιθέριου ελαίου του *C. citratus* παρουσιάζουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα σε σχέση με τα συνθετικά μυκητοκτόνα όπως: το Dithane M-43 (Mancozeb) και τον οξυγλωριούχο χαλκό (Mishra & Dubey, 1994; Adegoke & Odesola, 1996). Έχει αναφερθεί επίσης ότι το αιθέριο έλαιο του λεμονόχορτου, της ρίγανης και της δάφνης ανέστειλαν την ανάπτυξη μικροοργανισμών σε συγκεντρώσεις μικρότερες από 2% v/v (Adegoke & Odesola, 1996; Hammer et al., 1999). Αξίζει να αναφερθεί και το γεγονός της απουσίας πρόκλησης φυτοτοξικότητας και μη αντιστρεπτών επιδράσεων στη βλάστηση και την ανάπτυξη των σπόρων του σιταριού και του ρυζιού (Mishra & Dubey 1994). Ενδιαφέρον έχει να αναφερθεί, ότι και στην περίπτωση αυτή, η δραστηριότητα της πλήρους σύνθεσης του αιθέριου ελαίου του *C. citratus* παρουσίασε

μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα συγκρίνοντας την με τη δραστηριότητα του κυρίως συστατικού του αιθέριου ελαίου (Saikia et al., 2001).

Οι Nuchas and Tassou (2000) αναφέρουν ότι οι απαραίτητες συγκεντρώσεις των αιθέριων ελαίων που απαιτούνται για τον έλεγχο της μικροβιακής δραστηριότητας είναι υψηλότερες για απευθείας χρήση στα τρόφιμα από ότι στα καλλιεργούμενα υποστρώματα. Ο λόγος της σημαντικής αυτής επισήμανσης πιθανόν να οφείλεται στην αλληλεπίδραση των φαινολικών συστατικών και των συστατικών που συνθέτουν την τροφή και χαρακτηρίζονται ως “food matrix” (Nuchas & Tassou, 2000). Επιπρόσθετα, ένας παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψη, είναι η φυτοτοξικότητα του γαλακτώματος του λεμονόχορτου, καθώς προκαλεί περισσότερες αλλοιώσεις στην επιφάνεια των φύλλων από ότι τα αιθέρια έλαια θυμαριού και ρίγανης (Plotto et al., 2003). Ο έλεγχος της παραγωγής σπορίων των μυκήτων με αιθέρια έλαια μπορεί να συμβάλει σημαντικά στην ελαχιστοποίηση της διασποράς του παθογόνου, μειώνοντας το παθολογικό φορτίο που θα κατανεμηθεί στις επιφάνειες και στους χώρους αποθήκευσης (Tzortzakis & Economakis, 2007).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. IN-PLANTA ΒΙΟΔΟΚΙΜΕΣ ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΗ ΕΝΘΥΛΑΚΩΣΗ ΣΕ β-cyclodextrin

Στο κεφάλαιο 4, γίνεται περιγραφή in-planta βιοδοκιμής, που πραγματοποιήθηκε προκειμένου να διαπιστωθεί η παθογένεια του *Plenodomus lingam*, σε φυτικό ιστό λάχανου και λαχανίδας, υπό την παρουσία αιθέριου ελαίου ρίγανης, παρασκευασμένο με την τεχνική της μοριακής ενθυλάκωσης με β-κυκλοδεξτρίνη (β-cyclodextrin) (Εικόνα 11), με περιεκτικότητα θυμόλης και καραβαρκρόλης, 40 και 60 % αντίστοιχα και σε συγκεντρώσεις μείγματος ελαίου 5 και 20 %.

Η β-κυκλοδεξτρίνη, είναι ένα μόριο με σχήμα κυλινδρικό, του οποίου η κεντρική κοιλότητα έχει υδροφοβικό χαρακτήρα, ενώ η εξωτερική επιφάνεια του είναι υδροφιλική. Η ιδιότητα του αυτή, του επιτρέπει να δημιουργεί θύλακες, που μπορούν να ενωθούν με λιποφιλικά συστατικά, όπως τα αιθέρια έλαια, δημιουργώντας σύμπλοκα που συγκρατούνται με τρόπο ισορροπημένο, βελτιώνοντας τη φυσική και χημική τους σταθερότητα.



**Εικόνα 11.** Ενθυλάκωση αιθ. ελαίου ρίγανης σε μόρια β-cyclodextrin. **Αριστερα.** Αιθέριο έλαιο ρίγανης 20% ενθυλακωμένη σε β-cyclodextrin. **Δεξιά.** Μάρτυρας, αιθ. έλαιο ρίγανης απουσία β-cyclodextrin. (Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Π.Θ)

Η μοριακή ενθυλάκωση, μειώνει το ρυθμό πτητικότητας και προωθεί τη βαθμιαία απελευθέρωση των ενθυλακωμένων συστατικών, βελτιώνοντας τη βιοδιαθεσιμότητα τους και προστατεύοντας τα συστατικά του από δυσμενείς επιδράσεις, όπως παράγοντες οξείδωσης, φωτοδιάσπασης και θερμοκρασίας (Capelezzo et al., 2018).

### 4.1 Τεχνική απομόνωσης και τεχνητής μόλυνσης

Η πειραματική διαδικασία της απομόνωσης και τεχνητής μόλυνσης για τη διαπίστωση της παθογένειας του *P. lingam* (Εικόνα 12), πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ανθοκομίας, του Τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αρχικά, αναπτύχθηκαν φυτά λαχανίδας και λάχανου από σπόρο στο εργαστήριο. Η σπορά των φυτών πραγματοποιήθηκε στις 10/1/2020 σε υλικό υποστρώματος υδροπονίας και

ύστερα τοποθετήθηκαν σε θερμοθάλαμο στους 24 °C έως την έκπτυξη των φυταρίων, ενώ παράλληλα γινόταν συμπληρωματική άρδευση όποτε υπήρχε ανάγκη (περίπου κάθε 2-3 ημέρες).

Μετά την έκπτυξη των φυταρίων, τα φυτά αφαιρέθηκαν από τον θερμοθάλαμο και μεταφέρθηκαν σε δωμάτιο με τεχνητό φώς από λάμπες φθορίου για τη συνέχεια της ανάπτυξης τους.

Στη συνέχεια, στις 3/2/2020, συλλέχθηκαν φύλλα με εμφανή συμπτώματα (Εικόνα 12. 1, 2, 3), από προσβεβλημένους φυτικούς ιστούς φυτών λάχανου, που καλλιεργήθηκαν στο αγρόκτημα του Ε.Α.Κ.Κ.Ν Κασσαβετείας κατά την καλλιεργητική περίοδο 2019-2020. Τα φύλλα τοποθετήθηκαν σε χάρτινες σακούλες, αποθηκεύτηκαν στους 6 °C για μία ημέρα και μεταφέρθηκαν την επόμενη ημέρα σε χώρο του εργαστηρίου του Τμήματος Ανθοκομίας, προκειμένου να ακολουθήσει η διαδικασία της απομόνωσης και της τεχνητής μόλυνσης των νερόν φυτών με το παθογόνο *Plenodomus lingam*.

Για την απομόνωση του παθογόνων ακολουθήθηκε η διαδικασία αποστείρωσης όπως αναφέρεται στη μελέτη του Lob (2014), αφαιρώντας προσεκτικά προσβεβλημένα τμήματα ιστών μεγέθους 0.5x1.0 cm και αποστειρώνοντας τα με εμβάπτισή τους σε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 0,2% και για χρόνο 60 δευτερολέπτων. Στη συνέχεια, οι ιστοί ξεπλύθηκαν τρεις φορές με αποστειρωμένο νερό και αφέθηκαν να στεγνώσουν.

Την επόμενη ημέρα, καθώς είχε ολοκληρωθεί η απαιτούμενη ανάπτυξη των φυτών (Εικόνα 12.9) για την πραγματοποίηση της διαδικασίας της τεχνητής μόλυνσης, επιλέχθηκαν τα πιο κατάλληλα φυτά και τοποθετήθηκαν σε αλουμινένιους δίσκους, τοποθετώντας 3 φυτά ανά δίσκο (Εικόνα 12.10) .

Τα προσβεβλημένα τμήματα ιστών τοποθετήθηκαν σε γουδί (Εικόνα 12.6) και αλέσθηκαν με προσθήκη 10 ml αποσταγμένου νερού, του οποίου ο όγκος μετρήθηκε με ογκομετρικό σωλήνα (Εικόνα 12.5). Η άλεση πραγματοποιήθηκε με το χέρι, ήταν συνεχόμενη και είχε διάρκεια 5 λεπτών, προκειμένου να προκληθεί απελευθέρωση των πυκνιδιοσπορίων από την τεχνητή διάρρηξη των πυκνιδίων, ενώ το υπόλοιπο φύλλο διατηρήθηκε για ύστερη χρήση, ώστε να γίνει αξιολόγηση της πίεσης του μολύσματος.

Το υγρό από το γουδί (Εικόνα 12.7) συλλέχθηκε ύστερα από διήθησή του με μεταλλικό ηθμό (Εικόνα 12.8), προκειμένου να μην υπάρχουν φυτικά υπολείμματα. Από το υγρό, λήφθηκαν ίσες ποσότητες των 300 μl, με τη χρήση πιπέτας και τοποθετήθηκαν σε τρία δοχεία, ενώ σε τέταρτο δοχείο, τοποθετήθηκε ίση ποσότητα απεσταγμένου νερού.

Ύστερα λήφθηκαν ποσότητες 1:100 gr/ml αιθέριου ελαίου ρίγανης σε σκόνη, που είχαν παραχθεί με μοριακή ενθυλάκωση σε β-κυκλοδεξτρίνη, συγκεντρώσεων 5 % και 20 %, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως έτοιμα σκευάσματα σε σκόνη και τα διαλύματα παρασκευάστηκαν ως εξής:

- 1ο δοχείο, προσθήκη 300 μικρόλιτρα tween-20 επιφανειοδραστικής ουσίας ως μάρτυρας.
- 2ο δοχείο, προσθήκη 5% αιθέριου ελαίου ρίγανης και 300 μικρόλιτρα tween-20 επιφανειοδραστικής ουσίας
- 3ο δοχείο, προσθήκη 20% αιθέριου ελαίου ρίγανης και 300 μικρόλιτρα tween-20 επιφανειοδραστικής ουσίας
- 4ο δοχείο προσθήκη μόνο απεσταγμένου νερού και 300 μικρόλιτρα tween-20 επιφανειοδραστικής ουσίας, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η επιφανειοδραστική ουσία που χρησιμοποιήθηκε και το απεσταγμένο νερό ήταν απαλλαγμένα από παθογόνα και δεν υπήρξε αλλοίωση της διαδικασίας του μολύσματος από άλλον παθογόνο παράγοντα. (μάρτυρας).

Στη συνέχεια, τα μείγματα αναδεύτηκαν με το χέρι, πραγματοποιώντας κυκλικές κινήσεις, σε κάθε δοχείο για τρία λεπτά και στη συνέχεια, με χρήση νέας πιπέτας σε κάθε μεταχείριση, λήφθηκε ποσότητα από κάθε δοχείο και τοποθετήθηκαν σταγόνες (10 μl με συγκέντρωση πυκνιδοσπορίων  $10^7$  ανα ml) (Fernando & Chen, 2003) στις επιφάνειες των φύλλων, μία ανα φύλλο, όπως φαίνεται στην Εικόνα 12.10 ως εξής:

- 1ος δίσκος: μόνο επιφανειοδραστική ουσία και υλικό μολύσματος από το γουδί
- 2ος δίσκος: επιφανειοδραστική ουσία με 5% αιθέριου ελαίου ρίγανης και υλικό μολύσματος από το γουδί
- 3ος δίσκος: επιφανειοδραστική ουσία με 20% αιθέριου ελαίου ρίγανης υλικό μολύσματος από το γουδί
- 4ος δίσκος: επιφανειοδραστική ουσία με απεσταγμένο νερό χωρίς υλικό μολύσματος

Μετά από διάστημα αναμονής μισής ώρας, τα δοχεία μεταφέρθηκαν ξανά στον χώρο ανάπτυξης (Εικόνα 12.11) και ο έλεγχος της εξέλιξης της ασθένειας (Εικόνα 12.12) προγραμματίστηκε να πραγματοποιείται δύο φορές την εβδομάδα, κάθε Δευτέρα και Παρασκευή.



**Εικόνα 12.** Διαδικασία πραγματοποίησης τεχνητής μόλυνσης στο εργαστήριο. **1-2.** Συλλογή προσβεβλημένων φύλλων και μεταφορά στο εργαστήριο. **3-8.** Προετοιμασία και λήψη μολύσματος. **9-10.** Επιλογή και μόλυνση φυτών. **11-12.** Μεταφορά στον χώρο ανάπτυξης και έλεγχος της εξέλιξης της παθογένειας. (Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Π.Θ)

## 4.2. Αποτελέσματα – Παρατηρήσεις

Λόγω των εκτάκτων περιοριστικών μέτρων που επιβλήθηκαν στις 11/3/20, για τον περιορισμό της διάσδοσης του Covid-19, δεν μπόρεσαν να ολοκληρωθούν οι αξιολογήσεις του πειράματος. Το παθογόνο, μολύνει το έλεσμα του φύλλου, όπως το περιγράφει η βιβλιογραφία (Huang, et al., 2014). Το αιθέριο έλαιο της ρίγανης σε μεγάλη συγκέντρωση είναι φυτοτοξικό, ενώ η μικρότερη συγκέντρωση δείχνει να ελέγχει το παθογόνο.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. IN-VITRO ΒΙΟΔΟΚΙΜΕΣ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑ ΑΓΡΟΥ ΜΕ ΠΡΟΙΟΝΤΑ ΝΑΝΟ-ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στο κεφάλαιο 4, σχετικά με την διαπίστωση της παθογένειας του *Plendomus lingam* σε φυτικό ιστό λάχανου και λαχανίδας, υπό την παρουσία αιθέριου ελαίου ρίγανης, παρασκευασμένη με την τεχνική της μοριακής ενθυλάκωσης με β-κυκλοδεξτρίνη, δεν ολοκληρώθηκε με τις αναμενόμενες επαναλήψεις παρόλο το σχεδιασμό για τον παραπάνω λόγο. Έτσι, προσχωρήσαμε στις βιοδοκιμές με εφαρμογή Νανογαλακτωμάτων, οι οποίες θα έδιναν αποτελέσματα στα παθογόνα φυλλώματος πλέον στον αγρό, όπως αναφέρεται παρακάτω.

Στο κεφάλαιο 5, στις παραγράφους 5.1, 5.2, 5.3, γίνεται αναφορά στις βιοδοκιμές που πραγματοποιήθηκαν, με την εφαρμογή τριών νάνο-γαλακτωμάτων αιθέριων ελαίων, (Α), (Β), και (Γ), η σύνθεση των οποίων, αναφέρεται παρακάτω. Αρχικά, οι βιοδοκιμές πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και είχαν σκοπό τη διαπίστωση των μυκητοκτόνων ιδιοτήτων, τριών νάνο-γαλακτωμάτων αιθέριων ελαίων, ενάντια στη μυκηλιακή ανάπτυξη του παθογόνου μύκητα, *Alternaria brassicae* και στη συνέχεια εφαρμόστηκαν σε πείραμα αγρού.

Το πείραμα αγρού, που περιγράφεται στην παράγραφο 5.4, πραγματοποιήθηκε σε πειραματικό αγροτεμάχιο, σε έκταση του Ε.Α.Κ.Κ.Ν Κασσαβετειάς, εφαρμόζοντας τα νάνο-γαλακτώματα αιθέριων ελαίων (Α) και (Γ), σε ανεπτυγμένα φυτά λάχανου, προκειμένου να διαπιστωθεί η απόδοση των μυκητοκτόνων ιδιοτήτων τους, ενάντια σε παθογόνα φυλλώματος, υπό συνθήκες υπαίθρου.

Η σύνθεση των νάνο-γαλακτωμάτων αιθέριων ελαίων που εφαρμόστηκαν στις βιοδοκιμές καθώς και στο πείραμα αγρού, ήταν:

- (Α). Νάνο-γαλάκτωμα αιθέριων ελαίων (*Origanum vulgare* 35%, *Thymus vulgaris* 25%, *Azadirachta indica* 10%, *Cymbopogon citratus* 10% και *Levandula angustifolia* 20%).
- (Β). Νάνο-γαλάκτωμα αιθέριων ελαίων, ίδιο με το (Α), με επιπλέον προσθήκη χαλκού 20% (μεταλλικός χαλκός).
- (Γ). Νάνο-γαλάκτωμα αιθέριου ελαίου ρίγανης, (*Origanum vulgare* 5%).

## 5.1 Επίδραση δόσεων μείγματος αιθέριων ελαίων στη μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα *Alternaria brassicae*

Σε in-vitro βιοδοκιμή μελετήθηκε η μυκητοκτόνος δράση του νάνο-γαλακτώματος αιθέριων ελαίων (Α), (*Origanum vulgare* 35%, *Thymus vulgaris* 25%, *Azadirachta indica* 10%, *Cymbopogon citratus* 10% και *Levandula angustifolia* 20%), ενάντια στην ανάπτυξη στον παθογόνου μύκητα *Alternaria brassicae*.

### 5.1.1 Υλικά και μέθοδοι

Για την παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος, χρησιμοποιήθηκε έτοιμο σκεύασμα του εμπορίου (PDA, OXOID Limited) σε αναλογία 39gr σκευάσματος ανά 1 lit απεσταγμένου νερού, το οποίο υποβλήθηκε σε βρασμό έως την πλήρη διάλυσή του και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αποστείρωση σε αυτόκαυστο κλίβανο στους 121°C για 15 λεπτά. Αφού ολοκληρώθηκε η προετοιμασία και το προϊόν ήταν έτοιμο για χρήση, προστέθηκε ποσότητα 18 ml θρεπτικού υποστρώματος σε κάθε τριβλίο και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν ποσότητες αιθέριων ελαίων και τρεις μυκηλιακοί δίσκοι ανα τριβλίο, όπως περιγράφεται παρακάτω και φαίνεται στην εικόνα 13. Σε κάθε τριβλίο, πραγματοποιήθηκε βιοδοκιμή διαφορετικών δόσεων του παραπάνω μείγματος, ενώ από το τριβλίο του μάρτυρα, απουσίαζε οποιαδήποτε προσθήκη δόσεων αιθέριου ελαίου. Η βάση κάθε θέσης σημάνθηκε για την κωδική αναγνώριση κάθε μεταχείρισης.

Η βιοδοκιμή περιλάμβανε την εφαρμογή τεσσάρων διαφορετικών δόσεων (συγκεντρώσεων) αιθέριων ελαίων (0, 1, 3 και 9 ml/100ml), τοποθετώντας 20ml μείγματος αιθέριων ελαίων στο κέντρο κάθε θέσης θρεπτικού υποστρώματος με τη χρήση πιπέτας. Ταυτόχρονα, από την περιφέρεια καλλιεργειών του παθογόνου, με διάστημα επώασης επτά (7) ημερών σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA, λήφθηκαν τμήματα μυκηλίου διαμέτρου 5mm με τη χρήση φελλοτρυπητή, και έγινε τοποθέτηση αυτών στο κέντρο κάθε θρεπτικού υποστρώματος (ένα σε κάθε κέντρο). Η βιοδοκιμή περιλάμβανε 12 επαναλήψεις και τα τριβλία Petri, αφού σφραγίστηκαν με Parafilm, τοποθετήθηκαν για επώαση στους 25°C και για διάστημα 96 ωρών. Με τη συμπλήρωση του χρόνου επώασης και με τη βοήθεια χάρακα, λήφθηκαν μετρήσεις που αφορούσαν τη διάμετρο ανάπτυξης των μυκηλίων, προκειμένου να αξιολογηθεί η επίδραση των δόσεων εφαρμογών των παραπάνω μειγμάτων, παρατηρώντας τη μυκηλιακή ανάπτυξη μετά από χρονικό διάστημα 48, 72 και 96 ωρών.

### 5.1.2 Στατιστική Ανάλυση

Όλα τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας την ανάλυση παραλλακτικότητας ANOVA με τη χρήση του στατιστικού πακέτου ανάλυσης GenStar7. Η ανάπτυξη του μυκηλίου αναλύθηκε χρησιμοποιώντας την ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων, με κύρια επίδραση την ανάπτυξη του μυκηλίου του παθογόνου και ως εξαρτημένες μεταβλητές, τη δόση εφαρμογής και το χρόνο.

### 5.1.3 Αποτελέσματα Βιοδοκιμής

Όλες οι κύριες επιδράσεις και οι αλληλεπιδράσεις αυτών ήταν στατιστικώς σημαντικές (Πίνακας 1).

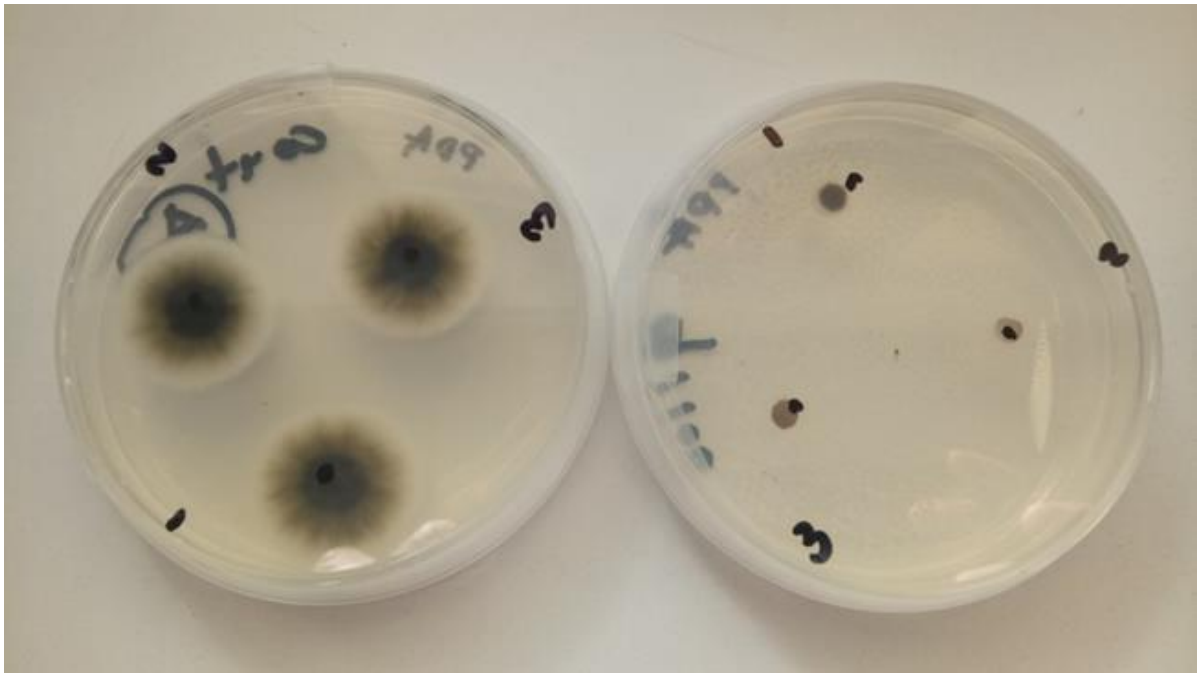
**Πίνακας 1.** Ανάλυση παραλλακτικότητας ANOVA σε συνάρτηση με τη μυκηλιακή ανάπτυξη.

#### ANOVA - Mycelium Growth

Cases	S.S	df	M.S.	F	p
Incubation time	42.575	2	21.288	269.816	< .001
Application Dose	71.709	3	23.903	302.965	< .001
Incubation time * Application Dose	3.143	6	0.524	6.638	< .001
Residuals	4.734	60	0.079		

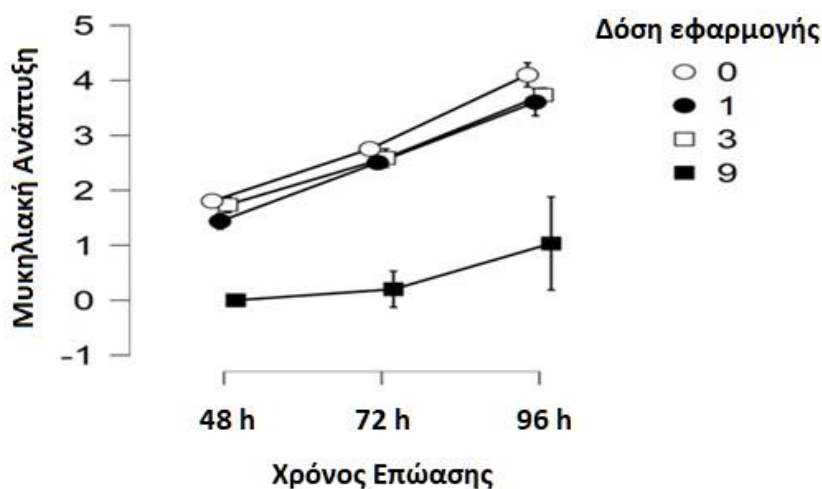
Note. Type III Sum of Squares

Οι δόσεις των 1ml και 3ml παρουσίασαν παρόμοιο αποτέλεσμα με αυτό της εκδήλωσης του παθογόνου στη μεταχείριση του μάρτυρα, αδυνατώντας να προκαλέσουν ανάσχεση της ανάπτυξης του μυκηλίου του *A. brassicae* (Εικόνα 13 και Γράφημα 1). Σημαντική ήταν όμως η επίδραση της δόσης των 9ml, όπου ενώ μετά από την πάροδο 72 ωρών παρατηρήθηκε η έναρξη της αύξησης της διαμέτρου του μυκηλίου, στις 96 ώρες φάνηκε να μην μπορεί να επιτύχει περαιτέρω τον αποτελεσματικό έλεγχο του παθογόνου, ακολουθώντας παρόμοιο ρυθμό εξέλιξης με τις μη αποτελεσματικές δόσεις των 1ml και 3ml καθώς και αυτή του μάρτυρα.



**Εικόνα 13.** Μυκηλιακή ανάπτυξη *A. brassicae*. **Αριστερά:** Μάρτυρας. **Δεξιά:** Μεταχείριση αιθέριου ελαίου (A) (Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Π.Θ)

Παρατηρείται, ότι όσο αυξάνεται το διάστημα του χρόνου επώασης, σημειώνεται αύξηση στην ανάπτυξη του μυκηλίου (Γράφημα 1). Επίσης, οι δόσεις εφαρμογής 1ml και 3ml του νάνο-γαλακτώματος αιθέριων ελαίων (A) δεν προκάλεσαν καμία επίδραση μείωσης στην ανάπτυξη του μυκηλίου του μύκητα, εκτός από την περίπτωση της υψηλότερης δόσης των 9ml, όπου παρατηρήθηκε μείωση στην ανάπτυξη του μυκηλίου για το διάστημα των 72 ωρών, ενώ στο διάστημα των 96 ωρών παρατηρήθηκε μυκηλιακή αύξηση. Ο μάρτυρας και οι δύο χαμηλότερες δόσεις εφαρμογής έδειξαν παρόμοια εξέλιξη.



**Γράφημα 1.** Μυκηλιακή ανάπτυξη του παθογόνου μύκητα *Alternaria brassicae* κάτω από διαφορετικές δόσεις νάνο-γαλακτώματος αιθέριων ελαίων σε σχέση με το χρόνο.

### 5.1.4 Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, δεν προκύπτει από τα ανωτέρω αποτελέσματα ότι το παραπάνω νάνο-γαλάκτωμα αιθέριων ελαίων (Α), μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μυκητοκτόνο για την αντιμετώπιση του εν λόγω μύκητα και ιδιαίτερα στις δύο πρώτες δόσεις εφαρμογής. Επιπλέον ούτε στην υψηλότερη δόση παρουσιάζει την ικανότητα περιορισμού της ανάπτυξης του παθογόνου. Οι βιοδοκιμές, που πραγματοποιήθηκαν με δόσεις 1ml και 3ml, δεν παρουσίασαν καμία επίδραση στην ανάσχεση της ανάπτυξης του παθογόνου, παρουσιάζοντας παρόμοια εξέλιξη με την ανάπτυξη του μάρτυρα και ως εκ τούτου δεν θεωρούνται ικανές να παρέχουν ικανή μυκητοκτόνο φυτοπροστασία. Η αυξημένη δόση εφαρμογής των 9ml παρουσίασε ιδιαίτερα ικανοποιητική ανάσχεση ανάπτυξης του μυκηλίου, για το διάστημα των 72 ωρών, χαρακτηρίζοντας τη δόση αυτή ως μυκοστατική, καθώς στο διάστημα των 96 ωρών, παρατηρήθηκε η συνέχιση την ανάπτυξής του.

### 5.2 Επίδραση δράσης δόσεων του νάνο-γαλακτώματος αιθέριων ελαίων (Α) και του νάνο-γαλακτώματος αιθέριων ελαίων με προσθήκη χαλκού (Β), ενάντια στη μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα *Alternaria brassicae*.

Στη συγκεκριμένη in-vitro βιοδοκιμή μελετήθηκαν οι μυκητοκτόνες ιδιότητες δύο νάνο-γαλακτωμάτων αιθέριων ελαίων ενάντια στον παθογόνο μύκητα *Alternaria brassicae*.



**Εικόνα 14.** Διαχωρισμός συστατικών των Νάνο-γαλακτωμάτων, ως αποτέλεσμα της παρουσίας περίσσειας επιφανειοδραστικής ουσίας. **Αριστερά:** Νάνο-γαλάκτωμα αιθέριων ελαίων με προσθήκη χαλκού. **Δεξιά:** Νάνο-γαλάκτωμα αιθέριων ελαίων. (Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Π.Θ)

### 5.2.1 Υλικά και μέθοδοι

Σε in-vitro βιοδοκιμή μελετήθηκαν οι μυκητοκτόνες ιδιότητες του νάνο-γαλακτώματος (A) και του νάνο-γαλακτώματος (B) ενάντια στον παθογόνο μύκητα *Alternaria brassicae*. Στη συγκεκριμένη βιοδοκιμή χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια υλικά και μέθοδοι που περιγράφονται στην υποπαράγραφο 5.1.1, με τη διαφορά ότι οι δόσεις εφαρμογής και στις δύο μεταχειρίσεις ήταν: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 και 16ml / 100ml νερού, κι ότι οι μετρήσεις καταγράφηκαν μετά από χρόνο επώασης 96 ωρών, σε θερμοκρασία 25°C.

### 5.2.2 Στατιστική Ανάλυση

Όλα τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας την ανάλυση παραλλακτικότητας ANOVA με τη χρήση του στατιστικού πακέτου ανάλυσης GenStat7. Η ανάπτυξη μυκηλίου του μύκητα αναλύθηκε χρησιμοποιώντας την ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων, με κύρια επίδραση, την ανάπτυξη του μυκηλίου του παθογόνου και ως εξαρτημένες μεταβλητές, τις μεταχειρίσεις με τα νανογαλακτώματα (A) και (B), καθώς και τη δόση εφαρμογής τους.

### 5.2.3 Αποτελέσματα βιοδοκιμών

Όλες οι κύριες επιδράσεις και οι αλληλεπιδράσεις αυτών ήταν στατιστικώς σημαντικές (Πίνακας 2).

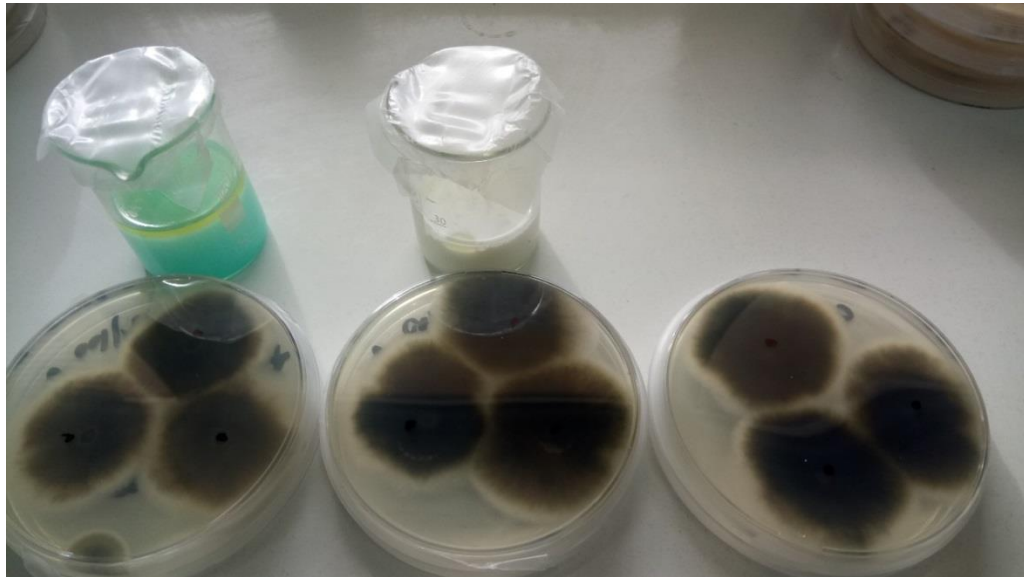
**Πίνακας 2.** Ανάλυση παραλλακτικότητας ANOVA σε συνάρτηση με τη μυκηλιακή ανάπτυξη

#### ANOVA - Mycelium Growth

Cases	S.S	df	M.S	F	p
Treatments	0.164	1	0.164	12.205	< .001
Application Dose	4.143	9	0.460	34.263	< .001
Treatments * Application Dose	0.705	9	0.078	5.830	< .001
Residuals	1.317	98	0.013		

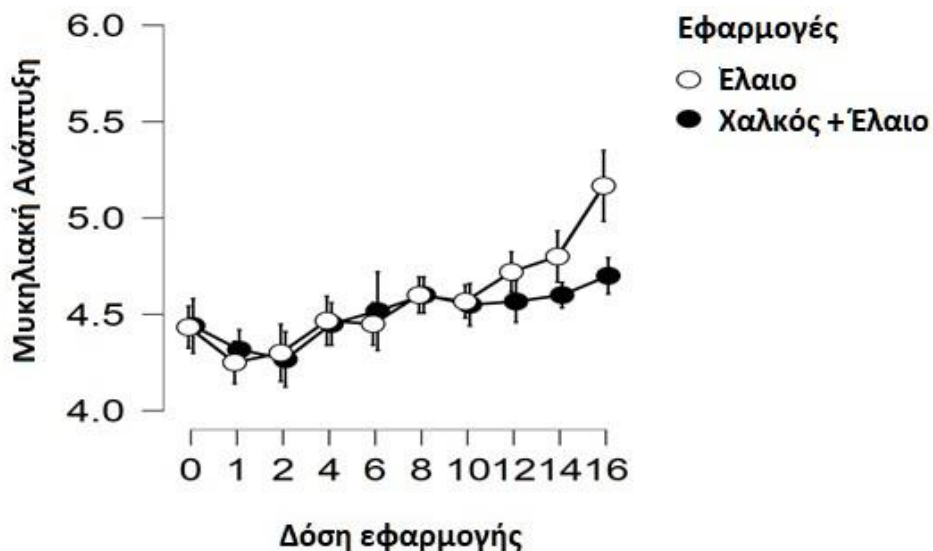
Note. Type III Sum of Squares

Από την παρατήρηση των τρυβλίων της εικόνας 15, με τις μεταχειρίσεις των νάνο-γαλακτωμάτων αιθέριων ελαίων ενάντια στο παθογόνο, φαίνεται ότι δεν υπάρχουν μεγάλες διαφορές στη διάμετρο της μυκηλιακής ανάπτυξης του παθογόνου των δύο μεταχειρίσεων σε σχέση με το μάρτυρα.



**Εικόνα 15.** Μυκηλιακή ανάπτυξη *Alternaria brassicae*. Οι μεταχειρίσεις (από αριστερά προς τα δεξιά): μείγμα αιθέριων ελαίων με την προσθήκη χαλκού, μείγμα αιθέριων ελαίων, μάρτυρας. (Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Π.Θ)

Γενικά παρατηρείται ότι και στις δύο μεταχειρίσεις (Γράφημα 2), κατά την αύξηση της δόσης εφαρμογής, συνεχίζει να αυξάνεται η διάμετρος του μυκηλίου, εκτός των περιπτώσεων των δύο χαμηλών δόσεων 1ml και 2ml, όπου παρατηρείται μείωση στην ανάπτυξη του παθογόνου. Συγκριτικά, υπάρχει μεγαλύτερη αύξηση του *A. brassicae*, στη μεταχείριση με το νάνο-γαλάκτωμα (Α) αιθέριων ελαίων απ' ότι στη μεταχείριση με το νάνο-γαλάκτωμα αιθέριων ελαίων (Β).



**Γράφημα 2.** Μυκηλιακή ανάπτυξη σε συνάρτηση με τη δόση μετά από χρόνο επώασης 96 h σε 25 °C.

## 5.2.4 Συμπεράσματα

Γενικά, παρατηρείται ότι και στις δύο μεταχειρίσεις, κατά την αύξηση της δόσης εφαρμογής, αυξάνεται η ανάπτυξη του μυκηλίου του παθογόνου, εκτός από τις περιπτώσεις των δύο πιο χαμηλών δόσεων, όπου παρατηρείται μείωση στη ανάπτυξη του, χωρίς να μπορεί να αξιολογηθεί θετικά. Συγκριτικά, υπάρχει μια μεγαλύτερη αύξηση του μυκηλίου στη μεταχείριση του νάνο-γαλακτώματος αιθέριων ελαίων (Α), απ' ότι στη μεταχείριση του νάνο-γαλακτώματος αιθέριων ελαίων (Β). Το γεγονός ότι αυξάνοντας τη δόση εφαρμογής, αυξάνεται και η ανάπτυξη του μυκηλίου, σημαίνει ότι τα νάνο-γαλακτώματα και στις δύο μεταχειρίσεις δεν είναι αποτελεσματικά στην αντιμετώπιση του παθογόνου. Τα αποτελέσματα αυτά, μπορεί να οφείλονται σε λανθασμένη προσθήκη της επιφανειοδραστικής ουσίας που χρησιμοποιήθηκε κατά την παρασκευή των παραπάνω νάνο-γαλακτωμάτων αιθέριων ελαίων, όπου μακροσκοπικά είχε παρατηρηθεί ο διαχωρισμός των συστατικών του γαλακτώματος. Το γεγονός ότι το αποτέλεσμα της αύξησης της δόσης εφαρμογής των μειγμάτων στις μεταχειρίσεις δεν ήταν ικανό να προκαλέσει σε καμία από τις δύο περιπτώσεις την ανάσχεση της ανάπτυξης του μύκητα *A. brassicae*, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι και τα δύο νάνο-γαλακτώματα, δεν είναι αποτελεσματικά στην αντιμετώπιση του παθογόνου.

Η περίσσεια ποσότητα της επιφανειοδραστικής ουσίας προκάλεσε επίσης αρνητικές επιπτώσεις στην απόδοση των μυκητοκτόνων ιδιοτήτων των συστατικών τους, υποδεικνύοντας τη σημασία της σωστής αναλογίας της στη διατήρηση της ομοιογένειας του γαλακτώματος. Στα δύο νάνο-γαλακτώματα υπήρξε εσφαλμένη προσθήκη περίσσειας ποσότητας της επιφανειοδραστικής ουσίας, αυξάνοντας το μέγεθος των μικκελίων (micells). Το γεγονός αυτό που προκάλεσε την αστάθεια της ομοιογένειας του γαλακτώματος, φανερώνει επίσης και τις αρνητικές επιπτώσεις που μπορούν να παρουσιαστούν και στην απόδοση των ιδιοτήτων των συστατικών του (Aziz et al., 2019). Το αποτέλεσμα που προκλήθηκε από τη λανθασμένη δόση της επιφανειοδραστικής ουσίας παρατηρήθηκε αμέσως τόσο μακροσκοπικά από τον άμεσο διαχωρισμό των συστατικών, ακόμα και μετά από την ανακίνησή τους, όπως φαίνεται στην εικόνα 14, όσο και από τα αποτελέσματα της βιοδοκιμής, όπως παρουσιάζονται στο Γράφημα 2. Από την περίσσεια της επιφανειοδραστικής ουσίας, οι μυκητοκτόνες ιδιότητες των συστατικών του μείγματος δεν μπόρεσαν να αποδοθούν σωστά σε καμία από τις δόσεις εφαρμογής ακόμα και σε αυτή της υψηλότερης αναλογίας του 16%, παρά τις γνωστές ιδιότητές τους από την διεθνή βιβλιογραφία, όπως αναφέρονται και στο κεφάλαιο 3 της παρούσας μελέτης.



### **5.3 Επίδραση δόσεων νάνο-γαλακτώματος αιθέριου ελαίου ρίγανης στη μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα *Alternaria brassicae***

Σε in-vitro βιοδοκιμή, μελετήθηκε η μυκητοκτόνος δράση του νάνο-γαλακτώματος αιθέριου ελαίου ρίγανης (Γ), (*Origanum vulgare* 5%), ενάντια του παθογόνου μύκητα *Alternaria brassicae*.

#### **5.3.1 Υλικά και μέθοδοι**

Η βιοδοκιμή περιλάμβανε την εφαρμογή 4 διαφορετικών δόσεων (0, 1, 3 και 9ml /100ml, τοποθετώντας 20 μl μείγματος αιθέριων ελαίων στο κέντρο κάθε θρεπτικού υποστρώματος με τη χρήση πιπέτας. Στη συγκεκριμένη βιοδοκιμή, χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια υλικά και μέθοδοι που περιγράφονται ακριβώς στην υποπαράγραφο 5.1.1, τόσο οι διαδικασίες προετοιμασίας του θρεπτικού υποστρώματος, όσο και η μέθοδος εφαρμογής του νάνο-γαλακτώματος για τη διαπίστωση πιθανής μυκητοκτόνου δράσης ενάντια στο παθογόνο.

#### **5.3.2 Στατιστική Ανάλυση**

Όλα τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας την ανάλυση παραλλακτικότητας ANOVA με τη χρήση του στατιστικού πακέτου ανάλυσης GenStar7. Η ανάπτυξη μυκηλίου του μύκητα αναλύθηκε χρησιμοποιώντας την ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων, με κύρια επίδραση την ανάπτυξη του μυκηλίου του παθογόνου και ως εξαρτημένες μεταβλητές, τη δόση εφαρμογής και το χρόνο επώασης.

#### **5.3.3 Αποτελέσματα βιοδοκιμών**

Όλες οι κύριες επιδράσεις και οι αλληλεπιδράσεις αυτών ήταν στατιστικώς σημαντικές (Πίνακας 3).

**Πίνακας 3.** Ανάλυση παραλλακτικότητας ANOVA σε συνάρτηση με τη μυκηλιακή ανάπτυξη

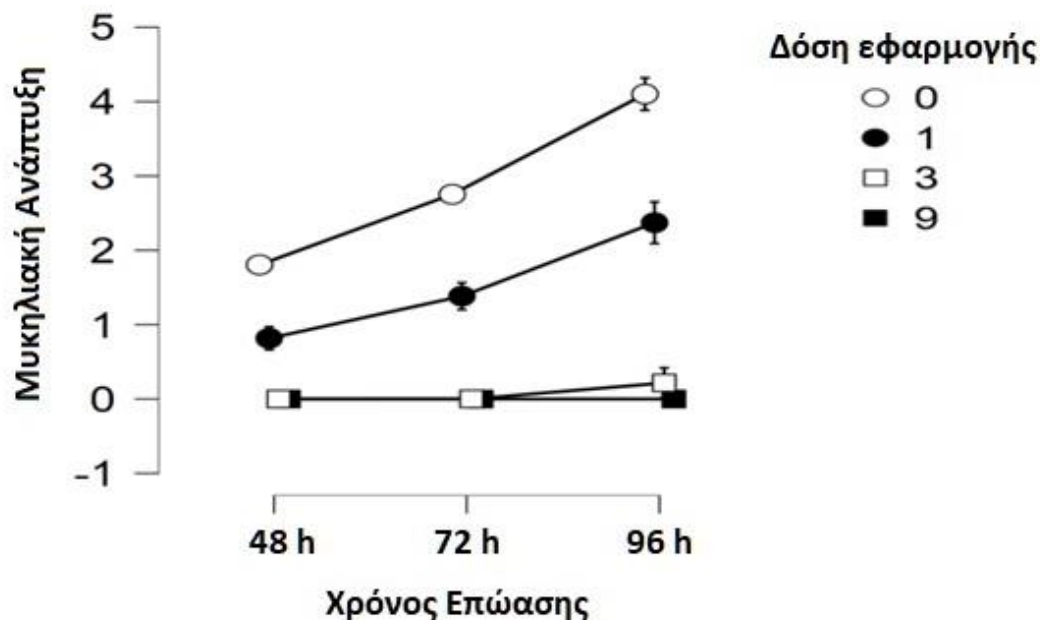
**ANOVA - Mycelium Growth**

Cases	S.S	B.E	M.S	F	p
Incubation time	12.680	2	6.340	349.736	< .001
Application Dose	101.438	3	33.813	1865.209	< .001
Incubation time * Application Dose	10.923	6	1.820	100.421	< .001
Residuals	1.088	60	0.018		

Note. Type III Sum of Squares

Όπως φαίνεται από την επεξεργασία των δεδομένων, παρατηρείται ότι όσο μεγαλύτερος ο χρόνος επώασης, τόσο περισσότερο αυξάνεται η ανάπτυξη του μυκηλίου. Επίσης, κατά την αύξηση της δόσης εφαρμογής του σκευάσματος, παρατηρείται μείωση στην ανάπτυξη του μυκηλίου του παθογόνου, εκτός από την περίπτωση της χαμηλής δόσης (1ml/100ml), όπου παρατηρείται αύξηση στην ανάπτυξη του μυκηλίου. Από την παρατήρηση αυτή, φαίνεται ότι η χαμηλή δόση εφαρμογής αδυνατεί να επιδράσει στον έλεγχο του παθογόνου, παρουσιάζοντας παρόμοια αποτελέσματα με αυτή του μάρτυρα κατά την πάροδο του χρόνου, με μικρότερη ανάπτυξη συγκριτικά, χωρίς να μπορεί να αξιολογηθεί ως θετική η διαφορά. Στις δόσεις εφαρμογής 3ml/100ml και 9ml/100ml, βλέπουμε ότι στις 72 ώρες έκθεσης, δεν αναπτύσσεται καθόλου το μύκηλο, παρουσιάζοντας το ίδιο αποτέλεσμα και για διάστημα 96 ωρών, στην εφαρμογή της μεγαλύτερης δόσης (9ml/1000ml), ενώ στη δόση εφαρμογής 3ml/100ml, μετά από διάστημα 96 ωρών αρχίζει να υπάρχει μια πολύ μικρή αύξηση της ανάπτυξης του μυκηλίου.

Συμπερασματικά, σύμφωνα με το Γράφημα 3, το νάνο-γαλάκτωμα (Γ) δε φάνηκε να έχει μεγάλη επιρροή στον περιορισμό του μύκητα στη δόση του 1ml, καθώς εμφάνισε μια μικρή μείωση στο ρυθμό ανάπτυξης του, χωρίς να παρουσιάζει την ικανότητα ικανοποιητικού ελέγχου του παθογόνου, παρουσιάζοντας παρόμοια αποτελέσματα συγκριτικά με τον μάρτυρα. Οι δόσεις των 3ml και 9ml παρουσίασαν παρόμοια αποτελέσματα μεταξύ τους, κατά την πάροδο του χρόνου, ελέγχοντας πλήρως την ανάπτυξη του μύκητα για 96 ώρες στην περίπτωση των 9ml, ενώ η δόση των 3 ml, φαίνεται ότι λειτουργεί περισσότερο ως μυκοστατική.



**Γράφημα 3.** Μυκηλιακή ανάπτυξη του παθογόνου μύκητα *Alternaria brassicae* στις δόσεις 1, 3 και 9 ml καθώς και του μάρτυρα.

### 5.3.4 Συμπεράσματα

Η μυκητοκτόνος ιδιότητα του νάνο-γαλακτώματος αιθέριου ρίγανης (Γ) ήταν ισχυρή. Ακόμα και στη δόση του 1ml παρουσιάζεται κάποια μυκητοκτόνος δράση τις πρώτες 48 ώρες της εφαρμογής, ενώ πέρα από το διάστημα αυτό, αδυνατεί να ελέγξει την ανάπτυξη, καθώς η εξάτμιση του αιθέριου ελαίου φαίνεται ότι μειώνει σημαντικά την απαραίτητη μυκητοκτόνο συγκέντρωση, που απαιτείται για τον έλεγχο του παθογόνου. Οι δόσεις των 3ml και 9ml, παρουσίασαν ισχυρή μυκητοκτόνο ιδιότητα στο διάστημα των 96 ωρών, ενώ η μεταξύ τους διαφορά δεν θεωρήθηκε σημαντική. Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι η χαμηλή δόση των 3ml θα μπορούσε να ελέγξει την ανάπτυξη του παθογόνου για διάστημα 4–5 ημερών, λειτουργώντας μυκοστατικά, καθώς συγκριτικά με τη μεγαλύτερη δόση των 9ml, η παρουσία του αιθέριου ελαίου ρίγανης, στο διάστημα των 96 ωρών, δεν παρείχε σημαντική διαφορά στην απόδοση των ιδιοτήτων του.

### 5.4. Επιλογή δόσης των αιθέριων ελαίων.

Στις παραπάνω, in-vitro βιοδοκιμές, εφαρμόστηκαν διαφορετικές δόσεις νάνο-γαλακτωμάτων αιθέριων ελαίων, προκειμένου να διαπιστωθεί η απαιτούμενη συγκέντρωσή τους, για πρόκληση ανάσχεσης της μυκηλιακής ανάπτυξης. Σύμφωνα με τους Pinheiro et al. (2015) και Werrie et al. (2020), έχει παρατηρηθεί ότι η αύξηση της συγκέντρωσης των αιθέριων ελαίων πέρα από κάποιο όριο, μπορεί να προκαλέσει δυσμενείς επιπτώσεις στη

φυσιολογική ανάπτυξη του φυτού, προκαλώντας κυτταρικές αλλοιώσεις και δυσλειτουργίες. Έτσι, ενώ από τις in-vitro βιοδοκιμές γίνεται φανερό ότι τα αιθέρια έλαια που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζουν μυκητοκτόνες ιδιότητες, πριν από την εφαρμογή σε πειραματική διαδικασία αγρού, θεωρήθηκε σκόπιμο να εφαρμοστούν διαφορετικές δόσεις των αιθέριων ελαίων σε ζωντανό φυτικό ιστό, πραγματοποιώντας πείραμα σε φυτοδοχεία, ώστε να επιλεγθεί η δόση εφαρμογής προκειμένου να αποφευχθούν τυχόν αρνητικές συνέπειες.

Στην πειραματική διαδικασία των φυτοδοχείων (εικόνα 16), πραγματοποιήθηκαν 6 επαναλήψεις για κάθε δόση εφαρμογής (0, 1, 3, 9 και 12ml / 100ml νερού). Στον μάρτυρα έγινε μόνο εφαρμογή απεσταγμένου νερού, ενώ στις υπόλοιπες επαναλήψεις εφαρμόστηκε καθολικός ψεκασμός νάνο-γαλακτώματων κατά την πρώτη εφαρμογή και στη συνέχεια μόνο σε τρία φυτοδοχεία κάθε δόσης. Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε δύο φορές, εφαρμόζοντας τα νάνο-γαλακτώματα που χρησιμοποιήθηκαν στις παραγράφους 5.1 και 5.3. Οι ψεκασμοί πραγματοποιούνταν ανά 7 ημέρες και παρατηρήθηκε ότι κατά την έκπτυξη των νέων φύλλων στις δόσεις των 9ml και 12ml, παρουσιάστηκε τοξικότητα προκαλώντας την έκπτυξη παραμορφωμένων φύλλων όπως φαίνεται στην εικόνα 17.

#### **5.4.1 Συμπεράσματα**

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την αξιολόγηση των παραπάνω δεδομένων φανερώνουν ότι η χρήση αιθέριων ελαίων σε αυξημένες δόσεις αν και είναι αποτελεσματική σε In-vitro βιοδοκιμές, κατά την εφαρμογή της σε φυτικό ιστό μπορεί να προκαλέσει την εμφάνιση τοξικότητας.

Με βάση την παραπάνω παρατήρηση, στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε η εφαρμογή της δόσης των 3ml των αιθέριων ελαίων στον αγρό, καθώς σε αυτή τη συγκέντρωση δεν παρατηρήθηκαν βλάβες μακροσκοπικά.



**Εικόνα 16.** Πειραματική διαδικασία φυτοδοχείων Από αριστερά προς τα δεξιά: μάρτυρας και δόσεις 1, 3, 9 και 12 ml/100 ml νερό. (Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Π.Θ)



**Εικόνα 17.** Εμφάνιση της δυσμενούς επίδρασης της δόσης των 9 ml αιθέριου ελαίου ρίγανης (Γ) σε φυτό λάχανου, με την έκπτυξη παραμορφωμένων φύλλων. 1. Αριστερά: Ο μάρτυρας. 2. Δεξιά: Η έκπτυξη παραμορφωμένων φύλλων (Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Π.Θ)

## 5.5 Αξιολόγηση δύο μυκητοκτόνων και νανο-γαλακτωμάτων αιθέριων ελαίων σε συνθήκες υπαίθρου

Προκειμένου να αξιολογηθεί η μυκητοκτόνος ιδιότητα δύο χημικών μυκητοκτόνων, με εμπορικές ονομασίες Reflect 125 (isopyrazam 12.5 %) και Embrelia SC (isopyrazam 10 % + difenoconazole 4 %), καθώς και των νανο-γαλακτωμάτων αιθέριων ελαίων (Α) και (Γ), όπως αναφέρονται στην παράγραφο 5.1, σχεδιάστηκε και πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα υπό συνθήκες υπαίθρου και υπό την επίδραση φυσικών μολυσμάτων.

### 5.5.1 Υλικά και μέθοδοι

Για την πραγματοποίηση του πειράματος αγρού, προετοιμάστηκε πειραματικό αγροτεμάχιο σε έκταση του Ε.Α.Κ.Κ.Ν Κασσαβετίας, μεγέθους 24 m<sup>2</sup> όπως φαίνεται στην εικόνα 18 αριστερά.



**Εικόνα 18.** Προετοιμασία και μεταφύτευση φυτών στο πειραματικό αγροτεμάχιο 24 m<sup>2</sup>. (Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Π.Θ)

Πριν τη φύτευση, προηγήθηκε βαθιά άροση και ισοπέδωση με καλλιεργητή, καθώς και προσθήκη λιπάσματος 2 kg, τύπου 15–15–15. Στη συνέχεια, μεταφυτεύθηκαν 140 φυτά λάχανου, ποικιλίας “Grandslam”, των οποίων η προμήθεια έγινε από φυτώριο, χωρίς να έχουν δεχθεί την εφαρμογή μυκητοκτόνων. Σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά της ποικιλίας, επιλέχθηκε η γραμμική φύτευση, με αποστάσεις φύτευσης 40cm x 50cm (επί γραμμής x μεταξύ γραμμών) και φυτεύτηκαν συνολικά 7 γραμμές, ενώ κάθε γραμμή περιείχε 20 επαναλήψεις. Οι τέσσερις γραμμές εξ αυτών, επιλέχθηκαν για την εφαρμογή των δύο

χημικών σκευασμάτων και την εφαρμογή των νάνο-γαλακτωμάτων (Α) και (Γ), (μία γραμμή για την κάθε μεταχείριση), η οποία γινόταν διαφυλλικά κάθε 15 ημέρες (15D). Δύο γραμμές ακόμα, επιλέχθηκαν για την εφαρμογή των ίδιων νάνο-γαλακτωμάτων αιθέριων ελαίων (Α) και (Γ), (μία γραμμή για την κάθε μεταχείριση), η οποία γινόταν διαφυλλικά κάθε 7 ημέρες (7D). Τέλος, μία γραμμή παρέμεινε δίχως εφαρμογή χημικών σκευασμάτων και νάνο-γαλακτωμάτων, η οποία και αποτέλεσε τον μάρτυρα. Η σειρά των μεταχειρίσεων στις γραμμές πραγματοποιήθηκε με την εξής σειρά από δεξιά προς αριστερά όπως παρουσιάζεται στην

Εικόνα : Μάρτυρας, Reflect 125 EC, Embrelia SC, Νάνο-γαλάκτωμα αιθέριου ελαίου ρίγανης (Γ), Νάνο-γαλάκτωμα αιθέριων ελαίων (Α) με εφαρμογή ανά 15 ημέρες και Νάνο-γαλάκτωμα αιθέριου ελαίου ρίγανης (Γ) και Νάνο-γαλάκτωμα αιθέριων ελαίων (Α) με εφαρμογή ανά 7 ημέρες. Η καταστροφή των ζιζανίων, γινόταν καθ'όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, ακολουθώντας τη μέθοδο του ξεβοτανίσματος, όποτε αυτή κρίθηκε αναγκαία.

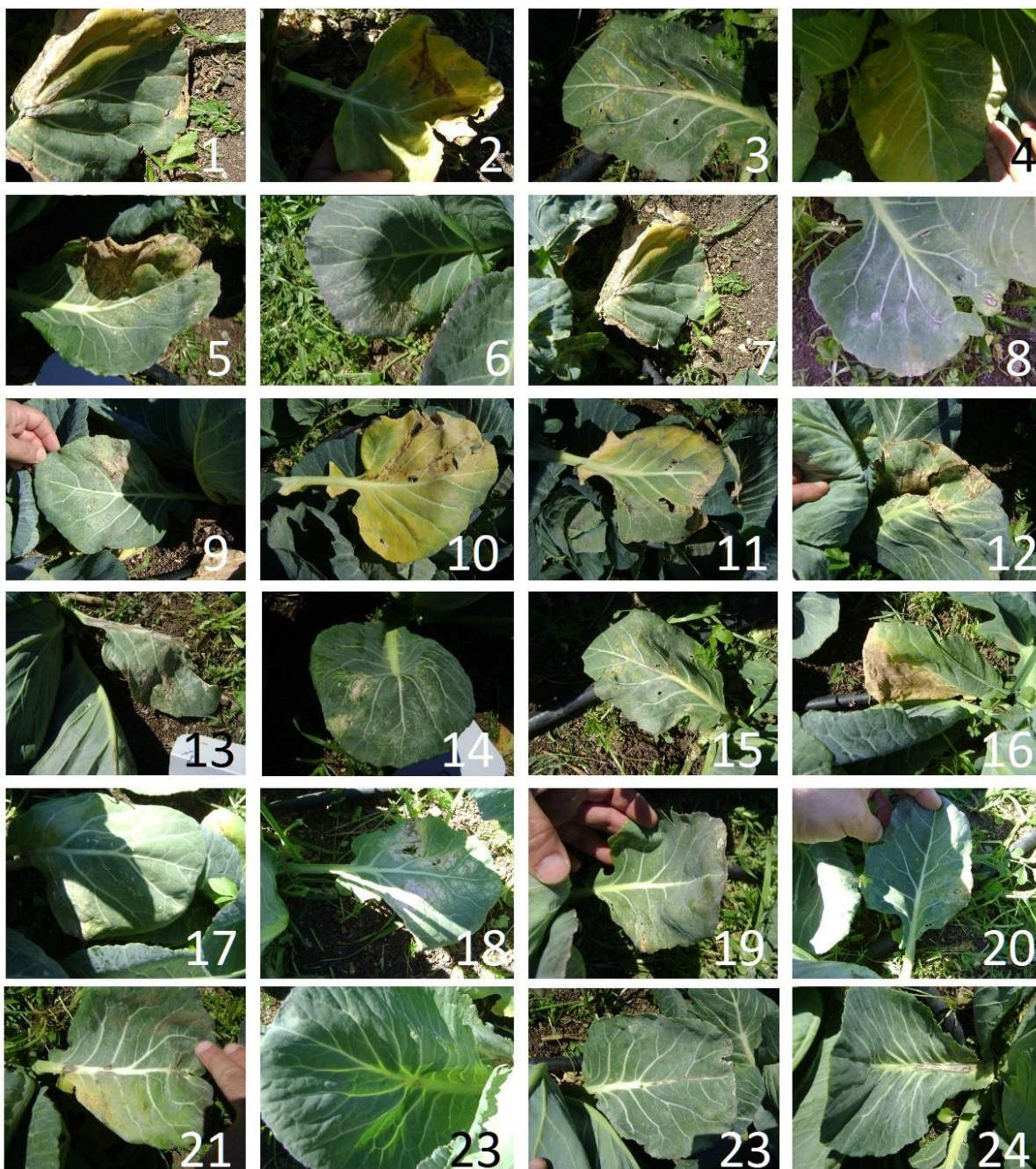
Κατά το προηγούμενο έτος είχαν απομονωθεί από τον αγρό οι μύκητες *A. brassicae* και *P. lingam*, οι οποίοι ταυτοποιήθηκαν στο εργαστήριο και διατηρήθηκαν με καλλιέργεια για την επίτευξη της πειραματικής διαδικασίας. Αρχικά, η μέθοδος, που σχεδιάστηκε για την επίτευξη της επιμόλυνσης των φυτών του λαχάνου, ήταν με την ανάπτυξη των παθογόνων στο εργαστήριο και η εφαρμογή τεχνητής μόλυνσης. Η μέθοδος αυτή απαιτούσε την καλλιέργεια του παθογόνου και την εφαρμογή του με ψεκασμό στον αγρό, προκειμένου να αξιολογηθεί η επίδραση των φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων ενάντια σε συγκεκριμένο παθογόνο. Η τεχνητή μόλυνση των φυτών δυστυχώς δεν μπόρεσε να ολοκληρωθεί και εγκαταλείφθηκε λόγω των εκτάκτων περιοριστικών μέτρων που επιβλήθηκαν στις 7/11/20, για τον περιορισμό της διάσδοσης του Covid-19. Έτσι αποφασίστηκε η πειραματική διαδικασία να αξιολογηθεί με βάση την επίδραση φυσικού μολύσματος στα φυτά σε μεικτές προσβολές.

Για τη εφαρμογή των χημικών μυκητοκτόνων και των νάνο-γαλακτωμάτων αιθέριων ελαίων, έγινε προμήθεια δυο (2) ψεκαστήρων των 2 λίτρων από το εμπόριο και ως δοσομετρητές χρησιμοποιήθηκαν ιατρικές σύριγγες. Για τις εφαρμογές των χημικών και των νάνο-γαλακτωμάτων χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί ψεκαστήρες, οι οποίοι πλένονταν με ζεστό νερό μεταξύ των επεμβάσεων, ενώ για κάθε μεταχείριση χρησιμοποιήθηκε ατομική σύριγγα προκειμένου να μην υπάρχει αλλοίωση του σκευάσματος κατά τη λήψη της δόσης ενώ σε όλους τους ψεκασμούς, τηρήθηκαν σχολαστικά όλα τα μέτρα ατομικής προστασίας. Χρησιμοποιήθηκε επίσης για τον ψεκασμό, απεσταγμένο νερό, του οποίου η προμήθεια

πραγματοποιήθηκε από το εμπόριο. Προκειμένου να μην μεταφερθεί ψεκαστικό υγρό μεταξύ των γραμμών και υπάρξει αλλοίωση των αποτελεσμάτων, κατασκευάστηκαν 4 κουτιά από ξύλο και νάilon φύλλα, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ξεχωριστό για κάθε σκεύασμα, με σκοπό την προστασία των γειτονικών γραμμών από τη διασπορά του ψεκαστικού νέφους.

Η μεταφύτευση των φυτών πραγματοποιήθηκε κατά το προηγούμενο έτος και συγκεκριμένα την 5/11/20, ενώ οι ψεκασμοί πραγματοποιήθηκαν, σύμφωνα με τον προγραμματισμό, από τις 12/11/20 έως τις 11/3/21, συνολικής διάρκειας 120 ημερών. Σε περίπτωση βροχής ή πιθανότητας αυτής, γινόταν αναβολή ψεκασμού, ο οποίος πραγματοποιούνταν αμέσως μόλις επικρατούσαν ευνοϊκές συνθήκες, προκειμένου να προσομοιάσει και στις πραγματικές πρακτικές φυτοπροστασίας. Οι δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τα χημικά μυκητοκτόνα λήφθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κάθε σκευάσματος, που ήταν όμοιες και για τα δύο (σε αναλογία 0,1 %). Για τα νάνο-γαλακτώματα αιθέριων ελαίων (Α) και (Γ), οι δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν σε αναλογία 3%, όπως επιλέχθηκε ύστερα από την πειραματική διαδικασία της παραγράφου 5.4.





**Εικόνα 19.** 1-20. Συμπτωματολογία προσβεβλημένα φυτά ως αποτέλεσμα μεικτής προσβολής από τους μύκητες *Plenodomus lingam* και *Alternaria brassica*.

21-24. Συμπτωματολογία προσβολής από *Plenodomus lingam* στο κεντρικό νεύρο. (Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Π.Θ)

Με την ολοκλήρωση 120 ημερών καλλιέργειας στον αγρό, εξετάστηκαν σχολαστικά οι συμπτωματολογίες, οι οποίες αναπτύχθηκαν στα φυτά, όπως φαίνεται στην εικόνα 19, προκειμένου να γίνει μία αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των χημικών σκευασμάτων και των αιθέρων ελαίων που εφαρμόστηκαν.

Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του «Disease Scoring» (Nowakowska et al., 2018), επιλέγοντας τυχαία δέκα φυτά ανά επέμβαση. Από κάθε φυτό αξιολογήθηκαν τα παλαιότερα 5 φύλλα της βάσης του φυτού και η αξιολόγησή τους έγινε υπολογίζοντας το μέσο όρο του ποσοστού προσβολής ανά φυτό, όπως φαίνεται στη εικόνα 20, με κλίμακα από το 0 έως το 5 ως εξής (Πίνακας 4):

**Πίνακας 4.** Βαθμονόμηση μεικτών προσβολών (Disease Scoring), με βάση του ποσοστού προσβολής του φύλλου, σε αξιολόγηση κλίμακας 0-5, όπου 0 (κανένα σύμπτωμα), 1 (<10 %), 2 (11-25 %), 3 (26-50 %), 4 (51-75 %), 5 (>76 %).

<b>0</b>	<b>0%</b>	Απουσία συμπτωμάτων
<b>1</b>	<b>&lt; 10 %</b>	Έκταση επιφάνειας προσβολής φυλλου
<b>2</b>	<b>11 - 25 %</b>	
<b>3</b>	<b>26 - 50 %</b>	
<b>4</b>	<b>51 - 75 %</b>	
<b>5</b>	<b>&gt; 76 %</b>	



**Εικόνα 20.** Βαθμονόμηση των προσβολών σε φύλλο λάχανου, σε κλίμακα 0-5, όπου 0 (κανένα σύμπτωμα), 1 (<10 %), 2 (11-25 %), 3 (26-50 %), 4 (51-75 %), 5 (>76 %), όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 4. (Πηγή: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, Π.Θ)

## 5.5.2 Στατιστική Ανάλυση

Όλα τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας την ανάλυση παραλλακτικότητας ANOVA με τη χρήση του Microsoft Excel 2010. Η ανάπτυξη μυκηλίου του μύκητα αναλύθηκε χρησιμοποιώντας την ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παραγόντων.

## 5.5.3 Αποτελέσματα

Σύμφωνα με το Γράφημα 4, τα χημικά μυκητοκτόνα παρουσίασαν διαφορές μεταξύ τους, όμως και στις δύο περιπτώσεις οι συγκεντρώσεις τους δεν ήταν ικανές για τον αποτελεσματικό έλεγχο των παθογόνων. Το μυκητοκτόνο σκεύασμα, Reflect 125 EC, δεν φαίνεται να παρουσιάζει κάποια ιδιαίτερη μυκητοκτόνο επίδραση με εφαρμογή ανά 15

ήμερες, ενώ το μυκητοκτόνο σκεύασμα, Embrelia SC, φαίνεται να επιδρά στον έλεγχο των παθογόνων σε σχέση με τον μάρτυρα. Η απαιτούμενη συγκέντρωση του μυκητοκτόνου σκευάσματος, Embrelia SC, σε συνδυασμό με το σωστό χρόνο εφαρμογής του, απαιτούν περαιτέρω έρευνα ώστε να διαπιστωθεί η μυκητοκτόνος ιδιότητα του ενάντια στους παθογόνους μικροοργανισμούς φυλλώματος των σταυρανθών. Από τη συνιστώμενη δόση δεν προκλήθηκε καμία αρνητική επίδραση στα φυτά καθ όλη την διάρκεια του πειράματος.

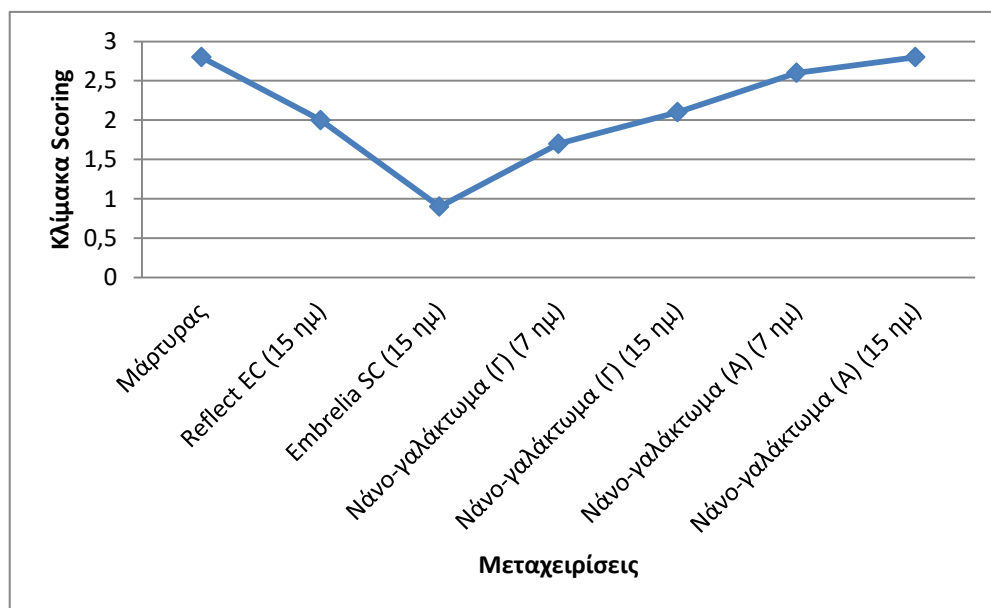
Η εφαρμογή των 7 ημερών του νάνο-γαλακτώματος αιθέριου ελαίου ρίγανης (Γ) στην ύπαιθρο παρουσίασε τη μεγαλύτερη μυκητοκτόνο επίδραση στον έλεγχο των παθογόνων σε σχέση με τις υπόλοιπες εφαρμογές των 7 και 15 ημερών του νάνο-γαλακτώματος (Α) και των 15 ημερών του νάνο-γαλακτώματος (Γ), παρόμοια επίδραση με το χημικό μυκητοκτόνο Reflect 125 EC και μικρότερη επίδραση από το χημικό μυκητοκτόνο Embrelia SC. Οι εφαρμογές των 7 και 15 ημερών του νάνο-γαλακτώματος αιθέριων ελαίων (Α) δεν παρουσίασαν καμία επίδραση στον έλεγχο των παθογόνων στον αγρό, παρουσιάζοντας παρόμοια αποτελέσματα με τον μάρτυρα.

**Πίνακας 5.** Στατιστική ανάλυση μεικτής προσβολής

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ				
<i>Ομάδες</i>	<i>Πλήθος</i>	<i>Άθροισμα</i>	<i>Μέσος όρος</i>	<i>Διακύμανση</i>
Μάρτυρας	10	28	2.8	4.178
Reflect EC (15 ημ)	10	20	2.0	4.889
Embrelia SC (15 ημ)	10	9	0.9	1.433
Νάνο-γαλακτωμα (Γ) (7 ημ)	10	17	1.7	5.122
Νάνο-γαλακτωμα (Γ) (15 ημ)	10	21	2.1	3.433
Νάνο-γαλάκτωμα (Α) (7 ημ)	10	26	2.6	6.489
Νάνο-γαλάκτωμα (Α) (15 ημ)	10	28	2.8	3.733

#### ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ

<i>Προέλευση διακύμανσης</i>	<i>SS</i>	<i>B.E.</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>τιμή-P</i>	<i>κριτήριο F</i>
Μεταξύ ομάδων	28.343	6	4.724	1.129	0.356	3.103
Μέσα στις ομάδες	263.5	63	4.182			
Σύνολο	291.843	69				



**Γράφημα 4.** Παρουσίαση αποτελεσματικότητας των φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων καθώς και των νάνο-γαλακτωμάτων αιθέριων ελαίων (Α) και (Γ) βάσει του προσβολής του φύλλου, σε αξιολογική κλίμακα σ 0-5, όπου 0 (κανένα σύμπτωμα), 1 (<10 %), 2 (11–25 %), 3 (26-50 %), 4 (51-75 %), 5 (>76 %).

#### 5.5.4 Συμπεράσματα

Συγκρίνοντας την επίδραση των δύο μυκητοκτόνων χημικών σκευασμάτων καθώς και των νάνο-γαλακτωμάτων αιθέριων ελαίων (Α) και (Γ), που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα αγρού, το σκεύασμα Embrella SC, που ανήκει στην χημική ομάδα των τριαζολών, παρουσίασε μεγάλη αποτελεσματικότητα σε σχέση με τις άλλες εφαρμογές, καθώς φάνηκε να αναστέλλει την εξέλιξη της παθογένειας προς το μεσόφυλλο. Επίσης, η χρήση νάνο-γαλακτώματος αιθέριου ελαίου ρίγανης (Γ) ανά 7 ημέρες, έδειξε ότι μπορεί να παρουσιάσει μυκητοκτόνο φυτοπροστασία καθώς σε σύγκριση με τον μάρτυρα, οι προσβολές εμφανίστηκαν μειωμένες κατά ποσοστό 39,3%. Η εφαρμογή νάνο-γαλακτώματος αιθέριου ελαίου ρίγανης (Γ), ανά 15 ημέρες, αδυνατεί να επιδράσει στον αποτελεσματικό έλεγχο των παθογόνων, καθώς εμφάνισε μείωση προσβολών μόνο κατά 25%.

Στις δυο περιπτώσεις εφαρμογής του νάνο-γαλακτώματος αιθέριου ελαίου (Α), δεν παρουσιάστηκε καμία μυκητοκτόνος επίδραση καθώς προκύπτουν παρόμοια αποτελέσματα με τον μάρτυρα. Το αποτέλεσμα αυτό φανερώνει την αρνητική επίδραση που μπορεί να εμφανιστεί από το συνδυασμό διαφορετικών αιθέριων ελαίων (Bassolé & Juliani, 2012). Στην περίπτωση του νάνο-γαλακτώματος (Α), δεν φαίνεται να προσφέρει κάποια θετική θροιστική δράση στον έλεγχο των παθογόνων, προσφέροντας ισχυρή μυκητοκτόνο φυτοπροστασία ως άθροισμα των ιδιοτήτων του κάθε συστατικού του ξεχωριστά. Αντιθέτως,

στην ύπαιθρο δεν παρουσίασε μυκητοκτόνο δράση, καθώς δεν υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ της εφαρμογής των 7 και 15 ημερών σε σχέση με τον μάρτυρα.

Η μελέτη της δράσης των αιθέριων ελαίων ενάντια των παθογόνων μικροοργανισμών με την χρήση της νανοτεχνολογίας, θα μπορούσε να αξιολογηθεί εν μέρει θετική καθώς η επίδραση του νάνο-γαλακτώματος αιθέριου ελαίου ρίγανης (Γ), παρουσίασε παρόμοια μυκητοκτόνο δράση σε σχέση με το χημικό μυκητοκτόνο Reflect 125 EC, σε εφαρμογές μεταξύ διαστημάτων 15 ημερών, απαιτείται όμως περαιτέρω μελέτη και γεωργικό πειραματισμό υπό συνθήκες υπαίθρου προκειμένου να αξιολογηθεί η πραγματική δράση του με τη εφαρμογή της νανοτεχνολογίας. Θα πρέπει επίσης να αξιολογηθούν περαιτέρω οι μυκητοκτόνες τους ιδιότητες, καθώς είναι αδύνατο να προβλεφθεί η τύχη των μυκητοκτόνων τους ιδιοτήτων υπό μεταβαλλόμενες συνθήκες περιβάλλοντος.

## 5.6 Συζήτηση

Παρόλο που υπάρχει πλήθος ερευνών (Mishra and Dubey, 1994; Diánez et al., 2018; Liu et al., 2019) που υποστηρίζει την άριστη δράση των αιθέριων ελαίων έναντι διαφόρων φυτοπαθογόνων οργανισμών σε βιοδοκιμές εργαστηρίου, η εφαρμογή τους στον αγρό έχει βρει μικρή εφαρμογή λόγω της ιδιαίτερης πτητικότητάς τους. Γίνονται προσπάθειες, κυρίως μέσω της ανάπτυξης μεθόδων νανοτεχνολογίας για την εφαρμογή μεθόδων αργής αποδέσμευσης και προστασίας των αιθέριων ελαίων, προκειμένου να αυξηθεί ο χρόνος παρουσίας τους, με συνέπεια την αύξηση της αποτελεσματικότητάς τους. Μέχρι σήμερα, είχε δοθεί ιδιαίτερη σημασία στην εύκολη χρήση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων, χωρίς την ανάγκη απόκτησης ιδιαίτερων γνώσεων σχετικά με τη χρήση τους. Το γεγονός αυτό πιθανό να έχει συμβάλει στην ευρεία χρήση των χημικών σε όλους τους τομείς φυτοπροστασίας, αυξάνοντας συνέχεια τις ποσότητες φυτοπροστατευτικών χημικών που απελευθερώνονται καθημερινά στο περιβάλλον, αλλά και τους κινδύνους για χρήστες και καταναλωτές από την έκθεσή τους σε αυτά. Σήμερα, γίνονται προσπάθειες εκπαίδευσης των αγροτών, όλων των ηλικιακών ομάδων, προκειμένου να ευαισθητοποιηθούν μέσω της απόκτησης γνώσεων σχετικά με την ορθή γεωργική πρακτική και τη φυτοπροστασία. Έτσι με την απόκτηση των απαραίτητων γνώσεων και τη συμμετοχή σε προγράμματα ολοκληρωμένης φυτοπροστασίας, εργαλεία που παρέχει η φύση και θεωρούνται ασφαλή για κατανάλωση, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν παρά τις δυσκολίες που παρουσιάζονται σήμερα στην εφαρμογή τους, ελαχιστοποιώντας μελλοντικά τη χρήση των συμβατικών χημικών μυκητοκτόνων. Ο συνεχής γεωργικός πειραματισμός και ο σύγχρονος τρόπος απόκτησης γνώσης σχετικά με τις εφαρμογές και τα αποτελέσματα μελετών, αποτελεί μία σημαντική βάση δεδομένων, μέσα

από την οποία πραγματοποιείται ταχεία μετάδοση πληροφορίας που μπορεί να μελετηθεί, να αξιοποιηθεί και να παράξει νέα δεδομένα στη διαχείριση των ασθενειών ακόμα και σε μία περίοδο κλιματικής αλλαγής, όπως αυτή που ήδη βιώνουμε.

Η σωστή διαχείριση των ασθενειών των σταυρανθών, ξεκινά από τη χρήση ανθεκτικών ποικιλιών σε συνδυασμό με καλλιεργητικές τεχνικές, όπως η αμειψισπορά για τη μείωση των ποσοστών των πρωτογενών μολυσμάτων. Οι εμφανίσεις επιδημιών όμως των ασθενειών και οι αρνητικές επιπτώσεις από την καταστροφή που μπορεί να προκαλέσουν σε μικρές περιοχές αλλά και ολόκληρες περιφέρειες, επιβάλλουν τη συχνή εφαρμογή φυτοπροστατευτικών προϊόντων.

Στο δεύτερο κεφάλαιο της παρούσας μελέτης, όπου γίνεται αναφορά στους τρόπους αντιμετώπισης των παθογόνων φυλλώματος των σταυρανθών, γίνεται εύκολα αντιληπτός ο μικρός αριθμός και η έλλειψη εγκρίσεων δραστικών ουσιών, διαφορετικών χημικών ομάδων και μηχανισμών δράσης, για χρήση στην καταπολέμηση των παθογόνων των σταυρανθών στην Ελλάδα. Από την παρατήρηση αυτή και με βάση τον κώδικα FRAC, καθώς οι περισσότερες κατηγορίες δραστικών ουσιών αξιολογούνται να είναι μέτριου έως υψηλού κινδύνου για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας, δύναται να προβλεφθεί η πιθανή μελλοντική ανάπτυξη φαινομένων ανθεκτικότητας, ιδιαίτερα από την αύξηση που παρατηρείται στην καλλιεργούμενη έκταση ελαιοκράμβης, όπως φαίνεται κατά τα έτη 2013 έως 2015, από 58,7 σε 87,2 χιλιάδες στρέμματα (Ελληνική Στατιστική Αρχή, 2017). Γίνεται επίσης και αναφορά στην αναγνώριση, τον τρόπο ταξινόμησης και τη συμπτωματολογία που προκαλούν τα παθογόνα, για την αναγνώριση των ασθενειών των σταυρανθών. Αν και οι περισσότερες ασθένειες που προσβάλλουν την οικογένεια των σταυρανθών, δεν προσβάλλουν άλλα είδη εκτός από τον μύκητα *Scerotinia sclerotiorum*, που έχει μεγάλο εύρος ξενιστών, είναι σημαντική η διάκριση της συμπτωματολογίας αυτών για την έγκαιρη και επιτυχημένη διαχείρισή τους.

Η διάκριση των συμπτωμάτων μεταξύ αυτών με κοινά χαρακτηριστικά, όπως αυτά που παρουσιάζουν οι μύκητες *Alternaria brassicae* και *Plenodomus lingam* στα φύλλα του λάχανου, δε διαφέρει πολύ και εύκολα μπορεί κάποιος μακροσκοπικά να πραγματοποιήσει λανθασμένη διάγνωση, καθώς και οι δύο μύκητες προκαλούν χλωρωτικές κηλίδες, οι οποίες αργότερα νεκρώνονται και αποσπώνται αφήνοντας κενές κοιλότητες. Η διάγνωση της ασθένειας όμως μπορεί να γίνει με ασφάλεια, αναζητώντας την παρουσία πολυάριθμων πυκνιδίων του *P. lingam* εντός των ομόκεντρων κυκλικών αλλοιώσεων αποκλείοντας έτσι την προσβολή από την απουσία αυτών. Σε κάθε περίπτωση, η απομόνωση και εξέταση του παθογόνου με την μέθοδο της μικροσκοπίας στο εργαστήριο δίνει ασφαλέστερη διάγνωση,

διακρίνοντας στην περίπτωση του *P. lingam* πυκνίδια και στην περίπτωση μυκήτων του γένους *Alternaria*, κονίδια.

Η πειραματική διαδικασία, που αναφέρεται στην παράγραφο 4.1, όπου πραγματοποιήθηκε βιοδοκιμή με β-κυκλοδεξτρίνη, είχε στόχο την πρόκληση τεχνητής μόλυνσης στο εργαστήριο νεαρών φυτών λάχανου και λαχανίδας, με σκοπό την παρακολούθηση και αξιολόγηση της παθογένειας του *P. lingam*. Δυστυχώς δεν μπόρεσε να ολοκληρωθεί και εγκαταλείφτηκε λόγω των εκτάκτων περιοριστικών μέτρων που επιβλήθηκαν λόγω τον covid-19.

Στο πέμπτο κεφάλαιο, παρουσιάστηκε επίσης η δυνατότητα αντικατάστασης των χημικών μυκητοκτόνων με αιθέρια έλαια, ουσίες που χαρακτηρίζονται από τον “FDA”, ως γενικά ασφαλή για κατανάλωση, έχοντας επιπλέον και τη δυνατότητα εφαρμογής τους ακόμα και κατά την διάρκεια της συγκομιδής, με τρόπο ασφαλή για το περιβάλλον και τον άνθρωπο. Η αποτελεσματικότητα που παρέχουν τα χημικά μυκητοκτόνα δεν μπορεί να αμφισβητηθεί, όπως και τα προβλήματα που παρουσιάζονται από την χρήση τους ενώ οι ιδιότητες των συστατικών των αιθέριων ελαίων, φαίνεται ότι μπορούν να παρέχουν μυκητοκτόνο φυτοπροστασία φιλική προς το περιβάλλον. Για τον λόγο αυτό, για τις πειραματικές διαδικασίες, επιλέχθηκαν αιθέρια έλαια κατασκευασμένα με τη μέθοδο της νανοτεχνολογίας, ως νάνο-γαλακτώματα ρίγανης και μείγματος αιθέριων ελαίων.

Από τα αποτελέσματα των παραγράφων 5.1 και 5.3, γίνεται φανερό ότι η εφαρμογή νάνο-γαλακτώματος ρίγανης (Γ) παρουσίασε μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα από ότι η εφαρμογή με την ανάμειξη αιθέριων ελαίων σε νάνο-γαλάκτωμα (Α), ελέγχοντας για μεγαλύτερο διάστημα την εξέλιξη του *A. brassicae*. Η ανάπτυξη της νάνο-τεχνολογίας και η υιοθέτηση της για χρήση στην φυτοπαθολογία, μπορεί μελλοντικά να συμβάλει στη σωστή απόδοση των γνωστών μυκητοκτόνων ιδιοτήτων των αιθέριων ελαίων. Έχει παρατηρηθεί, επίσης, ότι η ανάμειξη αιθέριων ελαίων, μπορεί να μην επιφέρει τα επιθυμητά αποτελέσματα καθώς έχει συνεργατική, αθροιστική ή και ανταγωνιστική δράση (Bassolé & Juliani, 2012). Στις βιοδοκιμές των παραγράφων 5.1 και 5.3 και στο πείραμα αγρού της παραγράφου 5.5, όπου μπορεί να γίνει σύγκριση της απόδοσης των ιδιοτήτων μεταξύ εργαστηριακών και συνθηκών υπαίθρου, παρατηρούμε ότι οι δύο πειραματικές διαδικασίες παρείχαν συγκριτικά σημαντικά διαφορετικά αποτελέσματα, ως αποτέλεσμα της επίδρασης των διαφορετικών συνθηκών εφαρμογής.

Μεταξύ των βιοδοκιμών των παραγράφων 5.1 και 5.3, παρατηρείται ότι δόσεις εφαρμογής που ελέγχουν τη μυκηλιακή ανάπτυξη, μπορεί να δράσουν τοξικά σε φυτικό ιστό,

όπως φαίνεται στην παράγραφο 5.4, προκαλώντας κυτταρικές αλλοιώσεις. Έτσι κρίνεται απαραίτητη η δοκιμή των δόσεων αυτών πριν την εφαρμογή τους στον αγρό.

Η εφαρμογή του νάνο-γαλακτώματος ρίγανης (Γ), στην εφαρμογή του ανά 15 ημέρες, παρουσίασε παρόμοια αποτελέσματα με το χημικό μυκητοκτόνο Reflect 125 EC, φανερώνοντας την αποτελεσματικότητα του σε σύγκριση με την ίδια εφαρμογή χημικού μυκητοκτόνου, ενώ στην εφαρμογή του ανά 7 ημέρες, παρουσίασε μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα ενάντια στα παθογόνα φυλλώματος.

Για την εφαρμογή των αιθέριων ελαίων, πέρα από τις in-vitro βιοδοκιμές, απαιτούνται περισσότερα πειράματα αγρού, για τη διαπίστωση της συμπεριφοράς των αιθέριων ελαίων υπό συνθήκες υπαίθρου, σε συνδυασμό με μεθόδους νανοτεχνολογίας, για τη μελλοντική εύρεση του βέλτιστου τρόπου εφαρμογής τους.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### • Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

1. Abdel-Kader, M.M., El-Mougy, N.S., & Lashin, S.M. (2011). Essential oils and *Trichoderma harzianum* as an integrated control measure against faba bean root rot pathogens. *J Plant Prot Res*, 51, 306–313.
2. Adegoke, G.O., & Odesola, B.A. (1996). Storage of maize and cowpea and inhibition of microbial agents of biodeterioration using the powder and essential oil of lemon grass (*Cymbopogon citratus*). *International Biodeterioration and Biodegradation*, 6, 81–84.
3. Aeron, A., Dubey, R.C., Maheshwari, D.K., Pandey, P., Bajpai, V.K., & Kang S.C. (2011). Multifarious activity of bioformulated *Pseudomonas fluorescens* PS1 and biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* in Indian rapeseed (*Brassica campestris* L.). *European Journal of Plant Pathology*, 131, 81–93.
4. Aggarwal, S., & Dhawan, V. (1995). Some new medicinal properties of neem – a multi-purpose farm forestry tree. *J. India Forester*, 121 (7), 1003–1005.
5. Agrios, G.N. (2005). *Plant Pathology*. 5th Edition, Elsevier Academic Press, Amsterdam. p:453,454,456,546,549
6. Ahmad, A., Khan, A., Yousuf, S., Khan. LA., & Manzoor, N. (2010). Proton translocating ATPase mediated fungicidal activity of eugenol and thymol. *Fitoterapia*, 81(8), 1157-1162.
7. Ajigboye, O. O., Murchie, E., & Ray, R. V. (2014). Foliar application of isopyrazam and epoxiconazole improves photosystem II efficiency, biomass and yield in winter wheat. *PesticBiochem Physiol*, 114, 52-60.
8. Al-Shehbaz, I. (2012). A generic and tribal synopsis of the Brassicaceae (Cruciferae). *Taxon*, 61(5), 931-954
9. Al-Shehbaz, I., Beilstein, M., & Kellogg, E. (2006). Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): An overview. *Plant Systematics and Evolution*, 259(2/4), 89-120.
10. Alvarez-Castellanos, P.P., Bishop, C.D, & Pascual-Villalobos., M.J. (2001). Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. *Phytochemistry*, 57, 99-102.
11. Alzohairy M. A. (2016). Therapeutics Role of *Azadirachta indica* (Neem) and Their Active Constituents in Diseases Prevention and Treatment. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM, 2016, 7382506.
12. Amini, J., Farhang, V., Javadi, T., & Nazemi, J. (2016). Antifungal effect of plant essential oils on controlling *Phytophthora* species. *Plant Pathol J*. 32, 16–24.

13. Angadi, S.V., Cutforth, H.W., Miller, P.R., McConkey, B.G., Entz, M.H., Brandt, S.A. & Volkmar, K.M. (2000). Response of three Brassica species to high temperature stress during reproductive growth. *Can. J. Plant Sci.* 80, 693–701.
14. Anton, N., & Vandamme, T. (2011). Nano-emulsions and micro-emulsions: Clarifications of the critical differences. *Pharm. Res.* 28, 978–985.
15. Apoga, D., Ek, B., & Tunlid, A. (2001). Analysis of proteins in the extracellular matrix of the plant pathogenic fungus *Bipolaris sorokiniana* using 2-D gel electrophoresis and MS / MS. *FEMS Microbiol Lett*, 197(2), 1–6.
16. Appendini, P., & Hotchkiss, J.H. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3, 113–126.
17. Arfa, A.B., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N., & Chalier, P. (2006). Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett. Appl. Microbiol*, 43, 149–154.
18. Attanayake, RN., Jiang, DH., de Rio-Mendoza L., & Chen W. (2011). Genetic diversity and population differentiation of *Sclerotinia sclerotiorum* collected from canola in China and in USA. *Phytopathology*, 101, S10.
19. Avoseh, O., Oyedeji, O., Rungqu, P., Nkeh-Chungag, B., & Oyedeji, A. (2015). *Cymbopogon* species; ethnopharmacology, phytochemistry and the pharmacological importance. *Molecules*, 20(5), 7438-7453.
20. Aziz, Z., Mohd Nasir, H., Ahmad, A., Mohd-Setapar, S., Hafandi, A., Mohd Noor, M., Rafatullah, M., Khatoon, A., Kausar, A., Ahmad, I., Khan, S., Al-shaeri, M., & Ashraf, G. (2019). Enrichment of Eucalyptus oil nanoemulsion by micellar nanotechnology: transdermal analgesic activity using hot plate test in rats' assay. *Scientific Reports*. 9. 13678. 10.1038/s41598-019-50134-y.
21. Bains, S., & Jhooty, J. (1979). Mixed infections by *Albugo candida* and *Peronospora parasitica* on *Brassica juncea* inflorescence and their control. *Indian Phytopathol.* 32: 268-271.
22. Bajpai, V.K., Kang, S., Xu, H., Lee, S.G., Baek, K.H., & Kang, S.C. (2011). Potential roles of essential oils on controlling plant pathogenic bacteria *Xanthomonas* species: A review. *The plant pathol. journal*, 27, 207–224.
23. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—A review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446–475.
24. Balaure, P.C., Gudovan, D., & Gudovan, I. (2017). Nanopesticides: A new paradigm in crop protection. *New Pestic. Soil Sens.* 129–192.
25. Balcázar, J.L., Subirats, J., & Borrego, C.M. (2015). The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. *Front. Microbiol.* 6:1216.

26. Baranauskiene, R., Venskutonis, P.R., Viskelis, P., & Dambrauskiene, E. (2003). Influence of nitrogen fertilizers on the yield and composition of thyme (*Thymus vulgaris*). *Journal of Agricultural and food chemistry*, 51: 7751-58.
27. Baratta, M.T., Dorman, H.J.D., Deans, S.G., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., & Ruberto, G. (1998). Antibacterial and anti-oxidant properties of some commercial essential oils. *Flav Frag J.* 13, 235-244.
28. Bart, P.H., & Thomma, J. (2003). *Alternaria spp.*: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, 4(4), 225-236.
29. Baser, K.H. (2008). Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Curr Pharm Des*, 14, 3106–3119.
30. Bassolé, I.H.N., & Juliani, H.R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17, 3989–4006.
31. Bassolé, I.H.N., Lamien-Meda, A., Bayala, B., Obame, L.C., Ilboudo, A.J., Franz, C., Novak, J., Nebié, R.C., & Dicko, M.H. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. *Phytomedicine*, 18(12), 1070-1074.
32. Baytop, T. (1984). Treatment with plants in Turkey. Istanbul University. Istanbul. Turkey.
33. Bedlan, G. (1987). The most important diseases of radishes. *Pflanzenschutz, Wien*, 3, 9–10.
34. Benigni, M., & Bompeix, G. (2010). Chemical and biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* in witloof chicory culture. *Pest Management Science*, 66, 1332–1336.
35. Bjorkman, T. & Pearson, K.J. (1998). High temperature arrest of inflorescence development in broccoli (*Brassica oleracea var. italica* L.). *J. Exp. Bot.* 49, 101–106.
36. Borel, T., & Sabliov, C. (2014). Nanodelivery of bioactive components for food applications: Types of delivery systems, properties, and their effect on ADME profiles and toxicity of nanoparticles. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 5, 197–213.
37. Borghi, E., Morace, G., Borgo, F., Rajendran, R., Sherry, L., Nile, C., & Ramage, G. (2015). New strategic insights into managing fungal biofilms. *Front. Microbiol.* 6, 1077.
38. Bottrel, D.R. (1979). Integrated pest management (Consortium for International Crop Protection, Berkeley,)
39. Bozin, B., Duckic, N.M., Simin, N., & Anackov, G. (2006). Characterization of the volatile composition of essential oils of some *Lamiaceae* spice and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J Agric Food Chem.* 54, 1822-1828.
40. Brugger, B.P., Martinez, L.C., Plata-Rueda, A., Castro, B.M.D.E., Soares, M.A., Wilcken, C.F., Carvalho, A.G., Serrao, J.E., & Zanuncio, J.C. (2019). Bioactivity of

- the *Cymbopogon citratus* (Poaceae) essential oil and its terpenoid constituents on the predatory bug, *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Scientific Reports*, 9, art. no. 8358.
41. Buchwaldt, L., & Green, H. (1992). Phyto-toxicity of destruxin B and its possible role in the pathogenesis of *Alternaria brassicae*. *Plant Pathology*, 41, 55-63.
  42. Burt, S.A., Adolfse, S.J.M., Ahed, D.S.A., Monique, H.G., Zijderveld, T., Jongerius-Gortemaker, B.G.M., Post, J.A., Brüggemann, H., & Santos, R.R. (2016). Cinnamaldehyde, carvacrol and organic acids affect gene expression of selected oxidative stress and inflammation markers in IPEC-J3 cells exposed to *Salmonella typhimurium*. *Phytother. Res.* 30, 1988–2000.
  43. Calvert, G.M., Karnik, J., Mehler, L., Beckman, J., Morrissey, B., Sievert, J., Barrett, R., Lackovic, M., Mabee, L., Schwartz, A., Mitchell, Y., & Moraga-McHaley, S. (2008). Acute pesticide poisoning among agricultural workers in the United States. *Am. J. Ind. Med.* 51(12), 883–898.
  44. Capelezzo, A. P., Mohr, L. C., Dalcanton, F., Mello, J. M. M. de, & Fiori, M. A. (2018).  $\beta$ -Cyclodextrins as Encapsulating Agents of Essential Oils. *Cyclodextrin - A Versatile Ingredient*. 73568.
  45. Carbajal, D., Casaco, A., Arruzazabala, L., Gonzalez, R., & Tolon, Z. (1989). Pharmacological study of *Cymbopogon citratus* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 25(1), 103-107.
  46. Carlson, L.H.C., Machado, R.A.F., Spricigo, C.B., Pereira, L.K., & Bolzan, A. (2001). Extraction of lemongrass essential oil with dense carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 21(1), 33-39.
  47. Cerda, R., Avelino, J., Gary, C., Tixier, P., Lechevallier, E., & Allinne, C. (2017). Primary and secondary yield losses caused by pests and diseases: assessment and modeling in coffee. *PLoS ONE*, 12(1), e0169133.
  48. Cetin, H., Erier, F., & Yanikoglu, A. (2007). A comparative evaluation of *Origanum onites* essential oil and its four major components as larvicides against the pine processionary moth, *Thaumetopoea wilkinsoni* Tams. *Pest. Manag. Sci.* 63, 830–833.
  49. Chang, I., Xu, R., & Chiu, W. (1963). On the primary sources of infection of the downy mildew of Chinese cabbage caused by *Peronospora parasitica* (Pers.) Fr. and the limited systemic infection of seedlings. *Acta Phytopathol Sin* 6, 153–162.
  50. Chirco, E.M., & Harman, G.E. (1979). The effects of *Alternaria brassicicola* infection on *Brassica* seed vigor and viability. *Journal of Seed Technology*, 3, 12-22.
  51. Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., de Bruyne, T., & Hermans, N. (2002). Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J Ethnopharmacology*, 79, 213-220.

52. Costa, A.R.T., Amaral, M.F.Z.J., Martins, P.M., Paula, J.A.M., Fiuza, T.S., Tresvenzol, L.M.F., Paula, J.R., & Bara, M.T.F. (2011) Action of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry essential oil on the hyphae of some phytopathogenic fungi. *Rev Bras Plantas Med*, 13, 240–245.
53. Cunningham, G.H. (1927). Dry-rot of swedes and turnips: its cause and control. N.Z. Dept. Agric. Bull. 133, 51.
54. Daferera, D. J., Ziogas, B. N., & Polissiou, M. G. (2003). The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. *Crop Protection*, 22, 39–44.
55. Da-Costa, C., Geraldo, M., Arrotéia, C., & Kemmelmeier, C. (2010). In vitro activity of neem oil [*Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae)] on *Aspergillus flavus* growth, sporulation, viability of spores, morphology and aflatoxins B1 and B2 production. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 1, 292-299.
56. Danielsson, I., & Lindman, B. (1981). The definition of microemulsion. *Colloids Surf*, 3, 391–392.
57. Degenhardt, K., Petrie, G., & Morrall, R. (1982). Effects of temperature on spore germination and infection of rapeseed by *Alternaria brassicae*, *A. brassicicola*, and *A. raphani*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 4, 115-118.
58. Delwiche, P. (1980). Aspects of blackleg (*Leptosphaeria maculans*) resistance to rapeseed (*Brassica napus*). Ph.D. Thesis, Univ. of Wisconsin-Madison, pp 144.
59. de Billerbeck, VG, Roques, CG, Bessiere J-M, Fonvieille, J-L, Dargent, R. (2001). Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W Watson essential oils on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Microbiology*, 47, 9-17.
60. de Martino, L., de Feo, V., & Nazzaro, F. (2009). Chemical composition and in-vitro antimicrobial and mutagenic activities of seven *Lamiaceae* essential oils. *Molecules*, 14, 4213–4230.
61. Derbyshire, M.C., & Denton-Giles, M. (2016). The control of *sclerotinia* stem rot on oilseed rape (*Brassica napus*): current practices and future opportunities. *Plant Pathol.* 65, 859-877.
62. Diáñez, F., Santos, M., Parra, C., Navarro, M., Blanco, R., & Gea, F. (2018). Screening of antifungal activity of 12 essential oils against eight pathogenic fungi of vegetables and mushroom. *Lett Appl Microbiol*, 67, 400-410.
63. Don-Pedro, K. (1996). Fumigant toxicity is the major route of insecticidal activity of citrus peel essential oils. *Pesticide Science*, 46, 71–78.
64. Donsi, F., & Ferrari, G. (2016). Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *J. Biotechnol.* 233, 106–120.
65. Dorman, HJD, Deans, SG. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 308-316.

- 66.Doss, R. P., Deisenhofer, J., Von Nidda, H. A. K., Soeldner, A. H., & McGuire, R. P. (2003). Melanin in the extracellular matrix of germlings of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*, 63, 687–691
- 67.Dubos, T., Pasquali, M., Pogoda, F., Casanova, A., Hoffmann, L., & Beyer, M. (2013). Differences between the succinate dehydrogenase sequences of isopyrazam sensitive *Zymoseptoria tritici* and insensitive *Fusarium graminearum* strains. *Pestic. Biochem. Physiol.* 105, 2835.
- 68.Duncan, R., Fernando, W., & Rashid K. (2006). Time and burial depth influencing the viability and bacterial colonization of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Soil Biol Biochem*, 38, 275–284.
- 69.Edris, A.E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytother.Res.* 21, 308–323.
- 70.Edris, A.E., & Farrag, E.S. (2003). Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapour phase. *Food*, 47, 117-121.
- 71.El-Wakeil, E.N. (2013). Botanical pesticides and their mode of action. *Gesunde Pflanzen*, 65(4), 125–149.
- 72.Ekambaram, P., Sathali, A.A.H., Priyanka, K. (2012). Solid lipid nanoparticles: A review. *Sci. Rev. Chem. Commun.* 2, 80–102.
- 73.Ewansiha, J., Garba S., Mawak J., & Oyewole O. (2012). Antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* (Lemon Grass) and its phytochemical properties. *Frontiers in Science*,2(6), 214-220.
- 74.Fahey, J. W. (2015). Brassica: Characteristics and Properties. In *Encyclopedia of Food and Health*. p. 469-477. Elsevier Inc.
- 75.Fan, Z., Rimmer, S., & Stefansson, B. (1983). Inheritance of resistance to *Albugo candida* in rape (*Brassica napus* L.). *Can. J. Genet. Cytol.* 25, 420-424.
- 76.Fanning, S., & Mitchell, A.P. (2012). Fungal biofilms. *PLoS Pathogens*, 8(4), e1002585.
- 77.Felton, M., & Walker, J. (1946). Environmental factors affecting downy mildew of cabbage. *Aust J Agric Res.* 72, 69–81.
- 78.Fernanda, C.S., Sara, M.C., Virginia, M.S., Deila, M.S., Botelho, N.L., & Luis, R.B.(2012). Evaluation of antifungal activity of essential oils against potentially mycotoxigenic *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Brazilian J Pharma.* 22(5), 1002-1010.
- 79.Fernando, W.G.D., Nakkeeran, S., Zhang, Y., & Savchuk, S. (2007). Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* species on canola petals. *Crop Prot.* 26, 100–107.

80. Fernando, W.G.D., & Chen, Y. (2003). First Report on the Presence of *Leptosphaeria maculans* Pathogenicity Group-3, the Causal Agent of Blackleg of Canola in Manitoba. *Plant Dis.* 87(10), 1268.
81. Finckh, M.R., (2008). Integration of breeding and technology into diversification strategies for disease control in modern agriculture. *Eur. J. Plant Pathol.* 121, 399–409.
82. Fisher, M.C., Henk, D.A., Briggs, C.J., Brownstein, J.S., Madoff, L.C., McCraw, S.L., & Gurr, S.J. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, 484, 186–194.
83. Fones, H., & Gurr, S. (2015). The impact of *Septoria tritici* Blotch disease on wheat: an EU perspective. *Fungal Genet Biol.* 79, 3–7.
84. Fortunati, E., Mazzaglia, A., & Balestra, G. (2019). Sustainable control strategies for plant protection and food packing sectors by natural substances and novel nanotechnological approaches. *J. Sci. Food Agric.* 99, 986–1000.
85. Franzke, A., Lysak M.A., Al-Shehbaz, I.A., Koch, M.A, Mummenhoff, K. (2011). Cabbage family affairs: the evolutionary history of Brassicaceae. *Trends Plant Sci.* 16, 108–116.
86. Fratianni, F., de Martino, L., Melone, A., de Feo, V., Coppola, R., & Nazzaro, F. (2010). Preservation of chicken breastmeat treated with thyme and balm essential oils. *J. Food Sci.* 75, M528–M535.
87. Gabrielson, R.L. (1983). Blackleg disease of crucifers caused by *Leptosphaeria maculans* (*Phoma lingam*) and its control. *Seed Sci. Technol.* 11, 749.
88. Gardener, B.B.M., & Fravel, D.R. (2002). Biological control of plant pathogens: Research, Commercialization, and application in the USA. *Plant Health Progress*, 3, 1.
89. Gardiner, D.M., Waring, P., & Howlett, B.J. (2005). The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis. *Microbiology*, 151, 1021–1032.
90. Gauthier, G. M. (2015). Dimorphism in fungal pathogens of mammals, plants, and insects. *PLoS Pathog.* 11, e1004608.
91. Gladders, P., & Musa T.M. (1980). Observations on the epidemiology of *Leptosphaeria maculans* stem canker in winter oilseed rape. *Plant Pathol.* 29, 28-37.
92. Ghafari, O., Sharifi, A., Ahmadi, A., & Fasaei, B.N. (2018). Antibacterial and anti-PmrA activity of plant essential oils against fluoroquinolone resistant *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *Lett. Appl. Microbiol.* 67, 564–569.
93. Gossé, B., Amissa, A., Adjé, F., Niamké, F., Ollivier, D., & Ito., Y. (2005). Analysis of Components of Neem (*Azadirachta indica*) Oil by Diverse Chromatographic Techniques, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28, 2225-2233.

94. Goubran, F. H., & Holmes, R. J. (1993). The development of alternative fungicides from essential oils. Victoria Australia: Institute for Horticultural Development, Knoxfield, Department of Agriculture.
95. Govindachari, TR, Suresh, G, Gopalakrishnan, G, Banumathy, B, & Masilamani, S. (1998). Identification of Antifungal Compounds from the Seed Oil of *Azadirachta indica*. *Phytoparasitica*, 26(2), 109-116.
96. Griffin S.G., Wyllie S.G., Markham J.L., & Leach D.N. (1999). The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal*, 14, 322-332.
97. Gupta, A., Eral, H., Hatton, T., & Doyle, P. (2012). Nanoemulsions: Formation, properties and applications. *Soft Matter*, 12, 2826–2841.
98. Hamada, M.S., Yin, Y., & Ma, Z. (2011). Sensitivity to iprodione, difenoconazole and fludioxonil of *Rhizoctonia cerealis* isolates collected from wheat in China. *Crop Protection*, 30, 1028–1033.
99. Hamilton-Kemp, T. R., Archbold, D. D., Loughrin, J. H., Andersen, R. A., McCracken, C. T., & Collins, R.W. (2000). Stimulation and inhibition of fungal pathogens of plants by natural volatile phytochemicals and their analogs. *Current Topics in Phytochemistry*, 4, 95–104.
100. Hammer, K.A., Carson, C.F., & Riley, T.V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 985–990.
101. Hammond, K.E., & B.G. Lewis. (1986). The timing and sequence of events leading to stem canker disease in populations of *Brassica napus* var. *oleifera* in the field. *Plant Pathol.* 35, 551-564.
102. Hammond, K.E., & B.G. Lewis. (1987). The establishment of systemic infection in leaves of oilseed rape by *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathol.* 36, 135-147.
103. Hancock, R.D. Hogenhout, S., & Foyer, C.H. (2015). Mechanisms of plant-insect interaction. *J. Exp. Bot.* 66, 421–424.
104. Harp, T.L., Godwin, J.R., Scalliet, G., Walter, H., Stalker, A.D., Bartlett, D.W., Ranner, D.J., Orson, J., Bush, M., & Cook, S. (2011). Isopyrazam, a new generation cereal fungicide. *Asp. Appl. Biol.* 106, 113-120.
105. Heffer, V., & Johnson, K. (2007). White Mold. The Plant Health Instructor. <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/fungalasco/pdlessons/Pages/WhiteMold.aspx>
106. Helal, G.A., Sarhan, M.M, Abu Shagla, A.N.K., Abou El-Khair, E.K. (2006). Effects of *Cymbopogon citratus* L. essential oil on the growth, lipid content and morphogenesis of *Aspergillus niger* ML2-strain. *Journal of Basic Microbiology*, 46, 456-469.
107. Hewitt, G. (2000). New modes of action of fungicides. *Pestic. Outlook*, 11, 29–32.



- 108.Hill, C.B., & Williams P.H.(1988).*Leptosphaeria maculans*, cause of black leg of crucifers. *Advances in Plant Pathol.* 6, 169-174.
- 109.Hill, C.B., Xu, X.H., & Williams, P.H. (1984). Correlations of virulence, growth rate, pigment production and allozyme banding patterns which differentiate virulent and avirulent isolates of *Leptosphaeria maculans*.*Eucarpia, Cruciferae News*, 9, 79.
- 110.Hill, D.S. (1983). *Agricultural insect pests of the tropics and their control*. Cambridge University Press, 758.
- 111.Holly, R.A., & Patel, D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiol.* 22, 273-292.
- 112.Hossain, L., Rahman, R., & Khan, M.S. (2017). Alternatives of Pesticides. In: Khan M., Rahman M. (eds) *Pesticide Residue in Foods*. Springer, Cham.
- 113.Hu, X., Roberts. D., Xie L., Maul, J., Yu, C., Li, Y., Zhang, S., & Liao. X. (2013). *Bacillus megaterium* A6 suppresses *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape in the field and promotes oilseed rape growth. *Crop Protection*, 52, 151-158.
- 114.Hu, X., Roberts, D., Jiang, M., & Zhang, Y. (2005). Decreased incidence of disease caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and improved plant vigor of oilseed rape with *Bacillus subtilis* Tu-100. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(6), 802–807.
- 115.Hu, Y., Zhang, J., Kong, W., Zhao, G., & Yang, M. (2007). Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*. *Food Chemistry*, 220, 1–8.
- 116.Huang, Y. J., Qi, A., King, G. J., & Fitt, B. D. (2014). Assessing quantitative resistance against *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in *Brassica napus* (oilseed rape) in young plants. *PloS one*, 9(1), e84924.
- 117.Humpherson-Jones, F.M. (1985). The incidence of *Alternaria spp.* and *Leptosphaeria maculans* in commercial *brassica* seed in the United Kingdom. *Plant Pathology*. 34, 385-390.
- 118.Humpherson-Jones, F.M. (1989). Survival of *Alternaria brassicae* and *Alternaria brassicicola* on crop debris of oilseed rape and cabbage. *Annals of Applied Biology*, 115, 45-50.
- 119.Humpherson-Jones, F.M., & Maude, R.B. (1982). Studies on the epidemiology of *Alternaria brassicicola* in *Brassica oleracea* seed production crops. *Annals of Applied Biology*, 100, 61-71.
- 120.Humpherson-Jones, F.M., & Phelps, K. (1989). Climatic factors influencing spore production in *Alternaria brassicae* and *Alternaria brassicicola*. *Annals of Applied Biology*, 114, 449-458.

121. Hyldgaard, M., Mygind, T., & Rikke, L.M. (2012). Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies and interactions with food matrix components. *Front. Microbiol.* 3, 1–24.
122. Inouye, S., Takizawa, T., & Yamaguchi, H. (2001a). Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47, 565-573.
123. Inouye, S., Uchida, K., & Abe, S. (2006). Vapor activity of 72 essential oils against a *Trichophyton mentagrophytes*. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 12, 210-216.
124. Inouye, S., Uchida, K., & Yamaguchi, H. (2001b). In-vitro and in-vivo anti-*Trichophyton* activity of essential oils by vapour contact. *Mycoses*, 44, 99-107.
125. Inouye, S., Tsuruoka, T., Uchida, K., & Yamaguchi, H. (2001c). Effect of sealing and Tween 80 on the antifungal susceptibility testing of essential oils. *Microbiology and Immunology*, 45, 201-208.
126. Inouye, S., Tsuruoka, T., Watanabe, M., Takeo, M., Akao, M., & Yamaguchi, H. (2000). Inhibitory activity of essential oils against apical growth of *Aspergillus fumigatus* by vapour contact. *Mycoses*, 43, 403-410.
127. Inouye, S., Wantanabe, M., Nishiyama, Y., Takeo, K., Akao, M., & Yamaguchi, H. (1998). Antisporulating and respiration-inhibitory effects of essential oils on filamentous fungi. *Mycoses*, 41, 403-410.
128. Jabeen, K., Hanif, S., Naz, S., & Iqbal, S. (2013). Antifungal activity of *Azadirachta indica* against *Alternaria solani*. *Journal of Life Sciences and Technologies*, 1(1), 89–93.
129. Jabra-Rizk, M.A., Falkler, W.A., & Meiller, T. (2004). Fungal biofilms and drug resistance. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 14–19.
130. Jackson, S.L., & Bayliss, K.L. (2011). Spore traps need improvement to fulfil plant biosecurity requirements. *Plant Pathology*, 60, 801-810.
131. Janatova, A., Bernardos, A., Smid, J., Frankova, A., Lhotka, M., Kourimská, L., Pulkrabek, J., & Kloucek, P. (2015). Long-term antifungal activity of volatile essential oil components released from mesoporous silica materials. *Ind. Crop. Prod.* 67, 216–220.
132. Jellin, J.M., Batz, F., & Hitchens, K. (2000). *Natural Medicines comprehensive database*. Third Edition. California: Therapeutic Research Faculty.
133. Kalembe, D., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 10, 813–829.

- 134.Kamesh, K., Sankaralingam, A., & Nakkeeran, S. (2017). Management of head rot of cabbage caused by *Sclerotinia sclerotiorum* through combined application of fungicides and biocontrol *Bacillus amyloliquefaciens*. 401, 401-404.
- 135.Kamensky, M., Ovadis, M., Chet, I., & Chernin, I. (2003). Soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases. Soil Biol Biochem, 35, 323–331.
- 136.Kashyap, P.L., Xiang, X., & Heiden, P. (2015). Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. Int. J. Boil. Macromol, 77, 36–51.
- 137.Kavitha, G, Karuna, R, Sashidhar, R.B. (2014). Inhibitory Role of Neem Seed Kernel Extracts and Terpenoids on Growth and Aflatoxin Production by *Aspergillus parasiticus* (NRRL 2999). Ind J Nat Prod Resour, 5(1), 20-33.
- 138.Kazmi, S., Shahzad, S., & Niaz, I. (1995). Effect of neem oil on in vitro growth of root infecting fungi. Pak J Bot. 27(1), 217-220.
- 139.Khater, H., Govindarajan, M., & Benelli, G. (2017). Natural Remedies in the Fight Against Parasites; Intech BoD-Books on Demand: London, UK, ISBN 953513289X.
- 140.Kirk, P.M., Cannon P.F., Minter D.W., & Stalpers, J.A. (2008). Dictionary of the Fungi. 10th ed. Wallingford, CABI, 22.
- 141.Knobloch, L., Weigand, H., Weis, N., Schwarn, H.M., & Vogenschow, H. (1985). Action of terpenoids on energy metabolism. In: Progress in Essential Oil Research. USA, Eds.: Ernst-Joachim Brunke Editor, Walter de Gruyter, 429-448.
- 142.Koch, S., Dunker, S., Kleinhenz, B., Rohrig, M., & von Tiedemann, A. (2007). Crop loss-related forecasting model for *Sclerotinia* stem rot in winter oilseed rape. Phytopathology, 97, 1186–1194.
- 143.Koch, E., Badawg, H., & Hoppe, H.(1989). Differences between aggressive and nonaggressive single spore lines of *Leptosphaeria maculans* in cultural characteristics and phytotoxin production. J. Phytopathol. 124, 52-62.
- 144.Kohl, J., Kolnaar, R., & Ravensburg, W.J. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases; relevance beyond efficacy. Front. Plant Sci. 10, 1–19.
- 145.Konuk, H.B., & Ergüden, B. (2020). Phenolic –OH group is crucial for the antifungal activity of terpenoids via disruption of cell membrane integrity. Folia Microbiol 65, 775–783.
- 146.Koul, O. (2011). Microbial biopesticides: opportunities and challenges.CAB Reviews, Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources, 6,126.
- 147.Kpoviessi, S., Bero, J., Agbani, P., Gbaguidi, F., Kpadonou-Kpoviessi, B., Sinsin, B., Accrombessi, G., Frederich, M., Moudachirou, M., & Quetin-Leclercq, J. (2014).

- Chemical composition, cytotoxicity and in vitro antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from Benin. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(1), 652-659.
- 148.Kralova, I., & Sjöblom, J. (2009). Surfactants used in food industry: A review. *J. Dispers. Sci. Technol*, 30, 1363–1383.
- 149.Kumar, D., Maurya, N., Bharati, Y. K., Kumar, A., Kumar, K., Srivastava, K., Chand, G., Kushwaha, C., Singh, S. K., Mishra, R. K., & Kumar, A. (2014). *Alternaria* blight of oilseed *Brassicas*: A comprehensive review. *African Journal of Microbiology Research*, 8(30), 2816-2829.
- 150.Kumar, V., Marković, T., Emerald, M., & Amitabha, D. (2015). Herbs: Composition and dietary Importance. *Encyclopedia of food and health*, 3, 323-337. 10.1016/B978-0-12-384947-2.00376-7
- 151.Lakra, B., & Saharan, G. (1989). Correlation of leaf and staghead infection intensities of white rust with yield and yield components of mustard. *Indian J. Mycol. Plant Patho.* 19, 279-281.
- 152.Leadbeater, A. (2015). Recent Developments and challenges in chemical disease control. *Plant Protect. Sci.* 51, 163–169.
- 153.LeBeau, F. (1945). Systemic invasion of cabbage seedlings by the downy mildew fungus. *Aust J Agric Res.* 71, 453–463.
- 154.Leite, J.R., Delourdes, M., Seabra, V., Maluf, E., Assolant, K., Suchecki, D., Tufik, S., Klepacz, S., Calil, H.M., & Carlini, E.A. (1986). Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). III. Assessment of eventual toxic, hypnotic and anxiolytic effects on humans. *Journal of Ethnopharmacology*, 17(1), 75-83.
- 155.Li, H., Kuo, J., Barbetti, M., & Sivasithamparam, K. (2007). Differences in the responses of stem tissues of spring-type *Brassica napus* cultivars with polygenic resistance and single dominant gene-based resistance to inoculation with *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Journal of Botany*, 85, 191–203.
- 156.Li, J.L., Liu, X.Y., Di, Y.L., Liang, H.J., & Zhu, F.X. (2015). Baseline sensitivity and control efficacy of DMI fungicide epoxiconazole against *Sclerotinia sclerotiorum*. *European Journal of Plant Pathology*, 141, 237–246.
- 157.Li, M., Huang, Q., & Wu, Y. (2011). A novel chitosan-poly (lactide) copolymer and its submicron particles as imidacloprid carriers. *Pest Manag. Sci.* 67, 831–836.
- 158.Liu, Z.L., & Ho, S.H. (1999). Bioactivity of the essential oil extracted from *Evodia rutaecarpa* Hook f. et Thomas against the grain storage insects, *Sitophilus zeamais* Motsch. and *Tribolium castaneum* (Herbst.). *Journal of Stored Product Research*, 35, 317–328.
- 159.Lob, S. (2014). *Leptosphaeria* diseases of oilseed rape and swede: identification and epidemiology (Doctoral dissertation, Lincoln University).

- 160.Locke, J.E. (1995). Fungi. In: The Neem Tree, source of Unique National Products for Integrated pest Management, Medicine, Industry and Other proposes. (Ed.): H. Schmutterer. V.C.H, Weinheim, Germany, 118-125.
161. Loksha, N.M., & Benagi, V.I. (2007). Biological management of pigeonpea dry root rot caused by *Macrophomina phaseolina*. Karnataka Journal Agriculture Science, 20(1), 54-65.
- 162.Lo-Pelzer, E., Aubertot, J.N., David, O., Jeuffroy, M.H., & Bousset, L. (2009). Relationship between the severity of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans* / *L. biglobosa* species complex) and subsequent primary inoculum production on oilseed rape stubble. Plant Pathology, 58, 61-70.
- 163.Lopez-Reyes, J.G., Spadaro, D., Preile, A., Garibaldi, A., & Gullino, M.L. (2013). Efficacy of plant essential oils on postharvest control of rots caused by fungi on different stone fruits in vivo. J. Food Protect. 76, 631–639.
- 164.Lueng, A.Y., & Foster, S. (1996). Encyclopedia of Common Natural Ingredients used in food, Drug, Cosmetics. Second Edition. New York, Wiley & Sons.
- 165.Ma, H.X., Chen, Y., Wang, J.X., Yu, W.Y., Tang, Z.H., Chen, C.J., & Zhou, M/G. (2009). Activity of carbendazim, dimethachlon, iprodione, procymidone and boscalid against *Sclerotinia* stem rot in Jiangsu Province of China. Phytoparasitica, 37, 421–429.
- 166.Mahapatra, S., & Das, S. (2013). Bioefficacy of botanicals against *Alternaria* leaf blight of mustard under field condition. The Bioscan, 8(2), 675-679.
- 167.Majewska, E., Kozłowska, M., Gruczyńska-Sękowska, E., Kowalska, D., & Tarnowska, K. (2019). Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) Essential Oil: Extraction, Composition, Bioactivity and Uses for Food Preservation – a Review. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 69(4), 327-341.
- 168.Mansour, A.F., Fikry, R.M., Saad M.M., & Mohamed, A.M. (2015). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of (*Cymbopogon citratus*) essential oil cultivated in Madinah Monawara, Saudi Arabia and its comparison to the Egyptian chemotype. International Journal of Food and Nutritional Sciences, 4(4), 29-33.
- 169.Marchese, A., Arciola, C.R., Coppo, E., Barbieri, R., Barreca, D., Chebaibi, S., Sobarzo-Sánchez, E., Nabavi, S.F., Nabavi, S.M., & Daglia, M. (2018). The natural plant compound carvacrol as an antimicrobial and anti-biofilm agent: Mechanisms, synergies, and bio-inspired anti-infective materials. Biofouling, 34, 630–656.
- 170.Matheron, M.E., & Matejka, J.C. (1989). In vitro and field comparison of 6 new fungicides with Iprodione and vinclozolin for control of leaf drop of lettuce caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Disease, 73, 727–730.
- 171.Maude, R.B., & Humpherson-Jones, F.M. (1980). Studies on the seed-borne phases of dark leaf spot (*Alternaria brassicicola*) and gray leaf spot (*Alternaria brassicae*) of brassicas. Annals of Applied Biology, 95, 311-319.

172. McClements, D. (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, 8, 1719–1729.
173. McClements, D., & Rao, J. (2011). Food-grade nanoemulsions: Formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, 51, 285–330.
174. McGee, D.C., & Petrie, G.A. (1979). Seasonal patterns of ascospore discharge by *Leptosphaeria maculans* in relation to blackleg of oilseed rape. *Phytopathology*, 69, 586-589.
175. McVetty, P.B.E., Mietkiewska, E., Omonov, T., Curtis, J., Taylor, D.C., & Weselake, R.J. (2016). *Brassica spp.* Oils. *Industrial Oil Crops*, 113–156.
176. Meena, P.D., Gupta, R., Meena, H.S., Sharma, P., & Jambhulkar, S. (2017). Pathogenic Variability within Indian *Alternaria brassicae* Isolates Using Seed, Cotyledon and Leaf of *Brassica* Species. *J. Phytopathol*, 165, 238-248.
177. Mehrparvar, M., Goltapeha, E.M., Safaiea, N., Ashkanib, S., & Hedesh, R.M. (2016). Antifungal activity of essential oils against mycelial growth of *Lecanicillium fungicola* var. *fungicola* and *Agaricus bisporus*. *Ind Crops Prod.* 84, 391–398.
178. Mishra, A. K., & Dubey, N. K. (1994). Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 1101–1105.
179. Mitter, N., Worrall, E.A., Robinson, K.E., Li, P., Jain, R.G., Taochy, C., Fletcher, S.J., Carroll, B.J., Lu, G., & Xu, Z.P. (2017). Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. *Nat. Plants*, 3, 16207.
180. Mody, V.V., Cox, A., Shah, S., Singh, A., Bevins, W., & Parihar, H. (2014). Magnetic nanoparticle drug delivery systems for targeting tumor. *Appl. Nanosci.*4, 385–392.
181. Moghtader, M. (2012). Antifungal effects of the essential oil from *Thymus vulgaris* L. and comparison with synthetic thymol on *Aspergillus niger*. *Journal of yeast and fungal research*, 3(6), 83–88.
182. Moore, W.D. (1949). Flooding as a means of destroying sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, 39, 920–927.
183. Munkvold, G.P. (2009). Seed pathology progress in academia and industry. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 285-311.
184. Nadal, M., García-Pedrajas, M. D., & Gold, S. E. (2008). Dimorphism in fungal plant pathogens. *FEMS Microbiol. Lett.* 284, 127–134.
185. Nasser, M., Golmohammadzadeh, S., Arouiee, H., Jaafari, M.R., & Neamati, H. (2016). Antifungal activity of *Zataria multiflora* essential oil-loaded solid lipid nanoparticles in-vitro condition. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 19, 1231–1237.

186. Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., & de Feo, V. (2017). Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceuticals*, 10, 2–20.
187. Nazzaro, F., Fratianni, F., de Martino, L., Coppola, R., & de Feo, V. (2013). Effects of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6, 1451–1474.
188. Nicolas, G., & Aggery, B. (1940). On some *Peronospora* species parasitized by bacteria. *Rev Mycol NS*. 5, 14–19.
189. Nishi, S. (1980). Differentiation of *Brassica* crops in Asia and the breeding of ‘Hakuran’, a newly synthesized leafy vegetable. (In) C Gomez-Campo (Ed) *Brassica Crops and Wild Allies*. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan, 133–150.
190. Nishimura, S., & Kohmoto, K. (1983). Host-specific toxins and chemical structures from *Alternaria* species. *Annual Review of Phytopathology*, 21, 87–116.
191. Niu, C., & Gilbert, E.S. (2004). Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6951–6956.
192. Nowakowska, M., Wrzesińska, M., Kamiński, P., Szczechura, W., Lichočka, M., Tartanus, M., Kozik, E., & Nowicki, M. (2018). *Alternaria brassicicola*–Brassicaceae pathosystem: insights into the infection process and resistance mechanisms under optimized artificial bio-assay. *European Journal of Plant Pathology*. 153. 131–151.
193. Nowicki, M., Nowakowska, M., Niezgoda, A., & Kozik, E. (2012). *Alternaria* Black Spot of Crucifers: Symptoms, Importance of Disease, and Perspectives of Resistance Breeding. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 76(1), 5–19.
194. Nuchas, G.E., & Tassou, C.C. (2000). Traditional preservatives-oils and spices. In Robinson RK, Batt CA, Patel PD (Eds.), *Encyclopedia of food microbiology*. London, UK, Academic Press, 1717–1722
195. Numpaque, M.A., Oviedo, L.A., Gil, J.H., Garcia, C.M., & Durango, D.L. (2011). Thymol and carvacrol: biotransformation and antifungal activity against the plant pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Botryodiplodia theobromae*. *Trop. Plant Pathol.* 36, 3–13.
196. Oliver, R.P., & Hewitt, H.G. (2014). *Fungicides in crop protection*. CAB International, Oxfordshire, Boston.
197. Olorunnisola, S.K., Asiyanbi, H.T., Hamed, A. M., & Simsek, S. (2014). Biological properties of lemongrass: An overview. *International Food Research Journal*, 21(2), 455–462.
198. Otani, H., Kohnobe, A., Kodama, M., & Kohmoto, K. (1998). Production of a host-specific toxin by germinating spores of *Alternaria brassicicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 52, 285–295.

- 199.Parada, R.Y., Sakuna, E., Mori, N., Oka, K., Egusa, M., Kodoma, M., & Otani, H. (2008). *Alternaria brassicae* produces a host-specific protein toxin from germinating spores on host leaves. *Phytopathology*, 98, 458-463.
- 200.Paranagama, P.A., Abeysekera, K.H.T., Abeywickrama, K., & Nugaliyadd, L. (2003). Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice. *Letters in Applied Microbiology*, 37, 86–90.
- 201.Park, S., Arasu, M.V., Jiang, N., Choi, S.H., Lim, Y.P., Park, J.T., AlDhabi, N.A., & Kim, S.J. (2014a). Metabolite profiling of phenolics, anthocyanins and flavonols in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*). *Ind Crop Prod*, 60, 8–14.
- 202.Park, S., Arasu, M.V., Lee, M.K., Chun, J.H., Seo, J.M., Lee, S.W., Kim, S.J. (2014b). Quantification of glucosinolates, anthocyanins, free amino acids, and vitamin C in inbred lines of cabbage (*Brassica oleracea* L.). *Food Chem*, 145, 77–85.
- 203.Paster, N., & Bullerman, L. B. (1988). Mould spoilage and mycotoxin formation in grains as controlled by physical means. *International Journal of Food Microbiology*, 7, 257–265.
- 204.Paster, N., Menasherov, M., Ravid, U., & Juven, B. (1995). Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. *Journal of Food Protection*, 58, 81–85.
- 205.Pauli, A. (2005). Anticandidal low molecular compounds from higher plants with special reference to compounds from essential oils. *Medicinal Research Reviews*, 26, 223-268.
- 206.Pavoni, L., Pavela, R., Cespi, M., Bonacucina, G., Maggi, F., Zeni, V., Canale, A., Lucchi, A., Bruschi, F., & Benelli, G. (2019a). Green Micro-and Nanoemulsions for Managing Parasites, Vectors and Pests. *Nanomaterials*, 9, 1285.
- 207.Pavoni, L., Perinelli, D. R., Bonacucina, G., Cespi, M., & Palmieri, G. F. (2020). An Overview of Micro- and Nanoemulsions as Vehicles for Essential Oils: Formulation, Preparation and Stability. *Nanomaterials*, 10(1), 135.
- 208.Pavoni, L., Maggi, F., Mancianti, F., Nardoni, S., Ebani, V.V., Cespi, M., Bonacucina, G., & Palmieri, G. (2019b). Microemulsions: An effective encapsulation tool to enhance the antimicrobial activity of selected EOs. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*
209. Paviani, L., Pergher, S.B.C., & Dariva, C. (2006). Application of molecular sieves in the fractionation of lemongrass oil from high-pressure carbon dioxide extraction. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 23, 219–225.
- 210.Pedras, M.S.C., & Séguin-Swartz, G. (1992) The blackleg fungus: phytotoxins and phytoalexins. *Can. J. Plant Pathol.* 14, 67–75.
- 211.Petrie, G.A. (1988). The rapid differentiation of virulent and weakly virulent strains of *Leptosphaeria maculans* (blackleg or stem canker) and related pyrenidial fungi from *brassica* seeds and stems. *Can. J. Plant Pathol.* 10, 188-190.



212. Petrie, G.A., & Lewis P.A. (1985). Sexual compatibility of isolates of the rapeseed blackleg fungus *Leptosphaeria maculans* from Canada, Australia and England. *Can. J. Plant Pathol.* 7, 253-255.
213. Petruzzello, M. (2020). List of plants in the family Brassicaceae. *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/topic/list-of-plants-in-the-family-Brassicaceae-2004620>
214. Plotto, A., Roberts, D.D., & Roberts, R.G. (2003). Evaluation of plant essential oils as natural postharvest disease control of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Acta Horticulturae*, 628, 737–745.
215. Pichersky, E, Noel, J.P., Dudareva, N. (2006). Biosynthesis of plant volatiles: Nature's diversity and ingenuity. *Science*, 311, 808-811.
216. Pinheiro, P., Costa, A., Alves, T., Galter, I., Pinheiro, C., Pereira, A., Oliveira, C., & Praça Fontes, M. (2015). Phytotoxicity and Cytotoxicity of Essential Oil from Leaves of *Plectranthus amboinicus*, Carvacrol, and Thymol in Plant Bioassays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63. 10.1021/acs.jafc.5b03049.
217. Podsedek, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: a review. *LWT Food Sci Technol*, 40, 1–11.
218. Pound, G.S. (1947). Variability in *Phoma lingam*. *J. Agr. Res.* 75, 113-133.
219. Pulido, P., Perello, C., & Rodriguez-Concepcion, M. (2012). New insights into plant isoprenoid metabolism. *Mol Plant*, 5, 964–967.
220. Punithalingam, E., & Holliday, P. (1972). *Leptosphaeria maculans*, I.M.I. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria, 34, 331.
221. Liu, Q., Qiao, K., & Zhang, S. (2019). Potential of a small molecule carvacrol in management of vegetable diseases. *Molecules*, 24(10), 1932.
222. Ramsey, B., & Smith, M. (1961). Downy mildew. in: Market diseases of cabbage, cauliflower, turnips, cucumber, melons and related crops. *USDA Handbook no. 184*, p. 6–7.
223. Rao, J., & McClements, D. (2011). Formation of flavor oil microemulsions, nanoemulsions and emulsions: Influence of composition and preparation method. *J. Agric. Food Chem*, 59, 5026–5035.
224. Rasooli, I., Rezaei, M.B., & Allameh, A. (2006). Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Infectious Disease*, 10, 236-241.
225. Rios, J.L., & Recio, M.C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacology*, 100, 80-84.

- 226.Roriz, C.L., Barros, L., Carvalho, A.M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. (2014). *Pterospartum tridentatum*, *Gomphrena globosa* and *Cymbopogon citratus*: A phytochemical study focused on antioxidant compounds. *Food Research International*, 62, 684-693.
- 227.Saharan, G., Mehta, N., & Meena, P. (2017). Downy Mildew Disease of Crucifers: Biology, Ecology and Disease Management. doi:10.1007/978-981-10-7500-1
- 228.Saharan, G., & Verma, P. (1992). White rust. A review of economically important species. International Development Research Centre, Ottawa, Ontario, Canada, IDRC-MR315e, IV, 65.
- 229.Saikia, D., Khanuja, S., Kahol, A., Gupta, S., & Kumar, S. (2001). Comparative antifungal activity of essential oils and constituents from three distinct genotypes of *Cymbopogon spp.* *Current Science*, 80(10), 1264–1266.
- 230.Sakamoto, K., Lochhead, R.Y., Maibach, H.I., Yamashita, Y., Yamashita, Y., Miyahara, R., Sakamoto, K. (2017). Emulsion and Emulsification Technology. *Cosmet. Sci. Technol.* 489–506.
- 231.Salazar, D., Hoyos, R., Orozco-Sánchez, F., Arango, M., & Gomez Londoño, L. (2015). Antifungal activity of neem (*Azadirachta indica*: Meliaceae) extracts against dermatophytes. *Acta Biológica Colombiana*, 20, 201-207. 10.15446/abc.v20n3.45225.
- 232.Samec, D., & Salopek-Sondi, B. (2019). Cruciferous (Brassicaceae) Vegetables. *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*, 195–202.
- 233.Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S.J., Esker, P., McRoberts, N., & Nelson, A.(2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nat. Ecol. Evol.* 3, 430.
- 234.Saxena, D., & Tewari, A. (2017). Trichoderma formulations for the management of mustard diseases under organic farming. *Proceeding of 3rd National Brassica Conference-2017*, ICAR, IARI, New Delhi, p. 249–250.
- 235.Segvic Klaric, M., Kosalec, I., Mastelic, J., Pieckova, E., & Pepeljnak, S. (2007). Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. *Lett. Appl. Microbiol.* 44(1), 36-42.
- 236.Selin, C., Habibian, R., Poritsanos, N., Athukorala, S.N.P., Fernando, D., & de Kievit, T.R. (2010). Phenazines are not essential for *Pseudomonas chlororaphis* PA23 biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum*, but do play a role in biofilm formation. *FEMS Microbiology Ecology*, 71, 73–83.
- 237.Senatore, F. (1996). Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of thyme (*Thymus pulegioides* L) growing wild in Campania. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 44, 1327–1332.
- 238.Serrano, M., Martinez-Romero, D., Castillo, S., Guillen, F., & Valero, D. (2005). The use of the natural antifungal compounds improves the beneficial effect of MAP in

- sweet cherry storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6, 115–123.
239. Shabnum, S., & Wagay, M.G. (2011). Essential Oil Composition of *Thymus Vulgaris* L. and their Uses. *J.res.Dev.* 11, 83-94.
240. Sharifi, A., Mohammadzadeh, A., Salehi, T.Z., & Mahmoodi, P. (2017). Antibacterial, antibiofilm and anti-quorum sensing effects of *Thymus daenensis* and *Satureja hortensis* essential oils against *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Appl. Microbiol.* 124, 379–388.
241. Sharma, G., Mangat, B., R., & Baker, R. (1973). Alternatives to pesticides in Southeastern United States. *Sci. Total Environ.* 2(1), 21–44.
242. Sharma, N., & Tripathi, A. (2006). Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* on post-harvest pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 587-593.
243. Sheetal, V., & Singh, S.P. (2008). Current and future status of herbal medicines. *Veterinary World*, 1(11), 347-350.
244. Sherf, A., & Macnab, A. (1986). Downy mildew. In: *Vegetable diseases and their control*. Wiley, New York, p. 269–273.
245. Singleton, V.L., & Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
246. Simon, J.E., Morales, M.R., Phippen, W. B., Vieira, R. F., & Hao, Z. (1999). Basil: A source of aroma compounds and a popular culinary and ornamental herb. In: Janick J., editor. *Perspectives on New Crops and New Uses*. ASHS Press, Alexandria, VA, USA, 499–505.
247. Singh, G., Sumitra, M., Catalan, C., & Lampasona, M.P. (2005). Chemical, antifungal, antioxidant and sprout suppressant studies on ginger essential oil and its oleoresin. *Flav. Frag. J.* 20, 1-6.
248. Siropi, L., Braschi, G., de Jong, A., Kok, J., Patrignani, F., & Lanciotti, R. (2018). Transcriptomic approach and membrane fatty acid analysis to study the response mechanisms of *Escherichia coli* to thyme essential oil, carvacrol, 2-(E)-hexanal and citral exposure. *J. Appl. Microbiol.* 125, 1308–1320.
249. Skaria, B.P., Joy, P.P., Mathew, G., Mathew, S., & Joseph, A. (2012). Lemongrass. In K.V. Peter (Ed.), *Handbook of Herbs and Spices*, vol. 2, 2nd edition, Woodhead Publ. LTD, Abington Hall Abington, Cambridge CB1 6AH, Cambs, England, 228,348-370.
250. Smolinska, U., & Kowalska, B. (2018). Biological control of the soil-borne fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* — a review. *J Plant Pathol.* 100, 1–12.
251. Soanes, D., & Richards, T.A. (2014). Horizontal gene transfer in eukaryotic plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52, 583–614.

- 252.Sodelade, M., Pedras, C., & Khallaf, I. (2012). Molecular interactions of the phyto-toxins destruxin B and sirodesmin PL with crucifers and cereals. *Metabolism and elicitation of plant defenses. Phytochemistry*, 77, 129-139.
- 253.Sunita, B., & Mahendra, R. (2008). Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. *World J. of Med. Sci.* 3(2), 81-88.
- 254.Suntres, Z.E., Coccimiglio, J., & Alipour, M. (2015). The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 55, 304–318.
- 255.Tabassum, N., & Vidyasagar, M. (2013). Antifungal investigations on plant essential oils. A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5, 19-28.
- 256.Tamjidi, F., Shahedi, M., Varshosaz, J., & Nasirpour, A. (2013). Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 19, 29–43.
- 257.Tavares, F., Costa, G., Francisco, V., Liberal, J., Figueirinha, A., Lopes, M.C., Cruz, M.T., & Batista, M.T. (2015). *Cymbopogon citratus* industrial waste as a potential source of bioactive compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(13), 2652-2659.
- 258.Tewari, J.P. (1991). Structural and biochemical bases of the black spot diseases of crucifers. *Adv. Struc. Biol.* 1, 25-34.
- 259.Thakur, H. (2019). Origin and Biological Diversity of Horticultural Crops. 250-252.
- 260.Tian, J., Ban, B., Zeng, H., He, J., Bo, H., & Wang, Y. (2011). Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 464–470.
- 261.Traboulsi, A.F., Taoubi, K., EI-Hai, S., Bessiere, J.M., & Rammal, S. (2002). Insecticidal properties of essential plant oils against the mosquito *Culex pipens molestus* (Diptera: Culicidae). *Pest. Manag. Sci.* 58, 491–495.
- 262.Tylkowska, K., Grabarkiewicz-Szczęśna, J., & Iwanowska, H. (2003). Production of toxins by *Alternaria alternata* and *A. radicina* and their effects on germination of carrot seeds. *Seed Science and Technology*, 31(2), 309-316.
- 263.Utama, I.M.S., Wills, R.B.H., Ben-Yehoshua, S., & Kuek, C. (2002). In vitro efficacy of plant volatiles for inhibiting the growth of fruit and vegetable decay microorganisms. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 6371-6377.
- 264.Vagelas, I. (2009). First report of phoma stem canker (blackleg) of oilseed rape caused by the species complex *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* in Greece. *Journal of Plant Pathology*, 91(4), S98-S98.

265. van Acker, H., Van Dijck, P., & Coenye, T. (2014). Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. *Trends Microbiol.* 22, 326–333.
266. Vänninen, I. (2005). Alternatives to pesticides in fruit and vegetable cultivation. Improving the safety of fresh fruit and vegetables. Woodhead Publishing, 293–330.
267. Verma, R.K., Verma, R.S., Chauhan, A., & Bisht, A. (2015). Evaluation of essential oil yield and chemical composition of eight lemongrass (*Cymbopogon spp.*) cultivars under Himalayan region. *Journal of Essential Oil Research*, 27(3), 197-203.
268. Villa, F., Cappitelli, F., Cortesi, P., & Kunova, A. (2017). Fungal Biofilms: Targets for the development of novel strategies in plant disease management. *Front. Microbiol.* 8, 654.
269. Wang, L., Li, X., Zhang, G., & Dong, J. (2007). Eastoe, J. Oil-in-water nanoemulsions for pesticide formulations. *J. Colloid Interface Sci.* 314, 230–235.
270. Wang, M., Weiberg, A., Lin, F.M., Thomma, B.P.H.J., Huang, H.D., & Jin, H.L. (2016). Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nat. Plants* 2, 16151.
271. Wang, Z.H., Yang, T., Qin, D.M., Gong, Y., & Ji, Y. (2008). Determination and dynamics of difenoconazole residues in Chinese cabbage and soil. *Chinese Chemical Letters*, 19(8), 969–972.
272. Warwick S. (2011). Brassicaceae in Agriculture. In: Schmidt R., Bancroft I. (eds) *Genetics and Genomics of the Brassicaceae*. *Plant Genetics and Genomics: Crops and Models*, vol 9. Springer, New York, NY. pp. 33-35.
273. Wan, M.G., Li, G.Q., Zhang, J.B., Jiang, D.H., & Huang, H.C. (2008). Effect of volatile substances of *Streptomyces platensis* F-1 on control of plant fungal diseases. *Biological Control*, 46, 552–559.
274. Walker, J.C. (1952). *Diseases of Vegetable Crops*. McGraw-Hill, New York, 529.
275. Werrie, P., Durenne, B., Delaplace, P., & Fauconnier, M. (2020). Phytotoxicity of Essential Oils: Opportunities and Constraints for the Development of Biopesticides. A Review. *Foods*, 9(9), 1291.
276. West, J. S., Atkins, S. D., & Fitt, B. D. L. (2009). Detection of airborne plant pathogens: halting epidemics before they start. *Outlooks on Pest Management*, 20, 11-14.
277. Wijesekara, R. O. B., Ratnatunga, C. M., & Durbeck, K. (1997). The distillation of essential oils. *Manufacturing and plant construction handbook* eschborn. Federal Republic of Germany: Protrade, Department of Foodstuffs & Agricultural Products.
278. Williams, H.P. (1980). Black rot: a continuing threat to world crucifers. *Plant Dis.* 64, 736-742.

279. Williams, H. P. (1992). Biology of *Leptosphaeria maculans*. Canadian Journal of Plant Pathology, 14(1), 30-35.
280. Wogiatzi, E., Gougoulas, N., Papachatzis, A., Vagelas, I., & Chouliaras, N. (2009a). Chemical composition and antimicrobial effects of Greek Origanum Species essential Oil. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 23(3), 1322-1324.
281. Wogiatzi, E., Gougoulas, N., Papachatzis, A., Vagelas, I., & Chouliaras, N. (2009b). Greek Oregano essential oils production, phytotoxicity and antifungal activity. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 23(1), 1150-1152.
282. Worrall, E.A., Hamid, A., Mody, K.T., Mitter, N., & Pappu, H.R. (2018). Nanotechnology for plant disease management. Agronomy, 8, 285.
283. Wu, B.A., Subbarao, K.V., & Liu, Y.B. (2008). Comparative survival of sclerotia of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum*. Phytopathology, 98, 659–665.
284. Xu, C.Y., Hou, Y.P., Wang, J.X., Yang, G.F., Liang, X.Y., Zhou, M.G. (2014). Activity of a novel strobilurin fungicide benzothiofostrobin against *Sclerotinia sclerotiorum*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 115, 32–38.
285. Xu, Z.P., Stevenson, G.S., Lu, C.Q., Lu, G.Q., Bartlett, P.F., & Gray, P.P. (2006). Stable suspension of layered double hydroxide nanoparticles in aqueous solution. J. Am. Chem. Soc. 128, 36–37.
286. Young, L.W., Wilen, R.W. & Bonham-Smith, P.C. (2004). High temperature stress of *Brassica napus* during flowering reduces micro and megagametophyte fertility, induces fruit abortion, and disrupts seed production J. Exp. Bot. 55, 485–495.
287. Zambonelli, A., Zechini, d'Aulerio, A., Bianchi, A., & Albasini, A. (1996). Effects of essential oils on phytopathogenic fungi. Phytopathology, 144, 491-494.
288. Zeng, W.T., Wang, D.C., Kirk, W., & Hao, J.J. (2012). Use of *Coniothyrium minitans* and other microorganisms for reducing *Sclerotinia sclerotiorum*. Biological Control, 60, 225–232.

• **Ελληνική βιβλιογραφία**

1. Ελληνική Στατιστική Αρχή, 2017. Ετήσια γεωργική στατιστική έρευνα: Έτος 2015. Δελτίο Τύπου.
2. Ξηρακιάς Φ. (2021). Διαχείριση σηψιρριζιών σε βασιλικό. Μεταπτυχιακή Διατριβή. Παναπιστήμιο Θεσσαλίας.

3. Παναγόπουλος, Χ.Γ. (1995). Ασθένειες κηπευτικών καλλιεργειών. Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Αθήνα–Πειραιάς, σελ: 59-62,195-198,205-206.
4. Τζάμος, Ε. (2007). Φυτοπαθολογία. Β' Έκδοση. Εκδόσεις Σταμούλη, σελ: 27,245,506.

- **Ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων**

1. FAO.(2021). FAOSTAT, 2001 Available at: <http://www.fao.org/land-water/databases-and-software/crop-information/cabbage/en/> [Accessed 23/1/21]
2. Mycobank. (2021). Retrieved from:  
<https://www.mycobank.org/page/Simple%20names%20search>
3. ΥΠΑΑΤ, (2021a). Retrieved from:  
[http://www.minagric.gr/syspest/syspest\\_Detail.aspx?kod\\_farmak=60712](http://www.minagric.gr/syspest/syspest_Detail.aspx?kod_farmak=60712) [Accessed 23/1/21]
4. ΥΠΑΑΤ, (2021b) Retrieved from:  
[http://www.minagric.gr/syspest/syspest\\_Detail.aspx?kod\\_farmak=60641](http://www.minagric.gr/syspest/syspest_Detail.aspx?kod_farmak=60641), [Accessed 23/1/21]
5. ΥΠΑΑΤ, (2021c) Retrieved from:  
[http://www.minagric.gr/syspest/syspest\\_bfuncs.aspx](http://www.minagric.gr/syspest/syspest_bfuncs.aspx), [Accessed 3/2/21]