ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΖΙΖΑΝΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Έλεγχος της αντιμυκητιακής δράσης του επιεφυμενιδικού υλικού του φυτού *Dittrichia viscosa in vitro* και *in planta*»

Φέκα Μαρία

Επιβλέπουσα καθηγήτρια**: Λεβίζου Ευθυμία**

Βόλος, 2017

Έλεγχος της αντιμυκητιακής δράσης του επιεφυμενιδικού υλικού του φυτού *Dittrichia viscosa in vitro* και *in planta*

Φέκα Μαρία

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Ευθυμία Λεβίζου

Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας Φυτών, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευάγγελος Βέλλιος

Επίκουρος Καθηγητής Φυτοπαθολογίας και σύγχρονων Μεθόδων Διαγνωστικής, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ανέστης Καρκάνης

Επίκουρος Καθηγητής Ζιζανιολογίας, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ζιζανιολογίας, υπό την επίβλεψη της κας Λεβίζου Ευθυμίας. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω από καρδιάς για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την πολύτιμη καθοδήγηση, τις συμβουλές και το χρόνο που τόσο απλόχερα μου έδωσε τόσο για τη διεξαγωγή των πειραμάτων όσο και για τη μετέπειτα ακαδημαϊκή μου πορεία.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Βέλλιο Ευάγγελο που βοήθησε να έρθει εις πέρας το πείραμα, προτείνοντας και εμπλουτίζοντας το πείραμα με ιδέες και όντας παρών με τις συμβουλές και την εμπειρία του.

Ευχαριστώ τον κ. Καρκάνη Ανέστη που συμμετείχε στη τριμελή επιτροπή και για τις συμβουλές του.

Επίσης, ευχαριστώ τον κ. Κορμά Κωνσταντίνο για την υλικοτεχνική στήριξη και την καλοσύνη του.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον κ. Νάνο Γεώργιο, για τις συμβουλές του όποια στιγμή τις ζήτησα.

Ακόμη, ευχαριστώ τις καρδιακές μου φίλες Νίνα Αλεξανδρή και Μαριάννα Μανουσοπούλου για την υποστήριξή τους.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου, ειδικότερα τον αδερφό μου Κώστα για τη στήριξή του και το σύντροφό μου Παναγιώτη Παπάζογλου που ήταν πάντα δίπλα μου.

Περιεχόμενα

Περίληψη 5
1. Εισαγωγή 8
1.1 *Dittrichia viscosa* 8
1.2 Επιφυμενιδικό υλικό-εκκριτική λειτουργία τριχώματος 9
1.3 Ιδιότητες – Βιολογική δράση 10
1.4 Μετασυλλεκτικές σήψεις και Penicillium 11
1.5 Σκοπός της παρούσας εργασίας 13
2. Υλικά και Μέθοδοι 14
2.1 Βοτανικά χαρακτηριστικά της Dittrichia viscosa 14
2.2 Χαρακτηριστικά του γένους Penicillium 14
2.3 Πορτοκάλια ποικιλίας ''Ομφαλοφόρο της Ουάσιγκτον'' ή ''Μέρλιν'' 15
2.4 Παρασκευή του υδατικού διαλύματος του επιεφυμενιδικού εκκρίματος της D.viscosa 15
2.5 Απομόνωση και καλλιέργεια μυκήτων 16
2.6 Πειραματικός Σχεδιασμός των in vitro πειραμάτων 17
2.7 Πειραματικός Σχεδιασμός των in vivo πειραμάτων 18
2.8 Στατιστική ανάλυση 20
3. Αποτελέσματα 21
3.1 *In vitro* δοκιμές 21
3.1.1 Ρόδι 21
3.1.2 Πορτοκάλι 28
3. 2 *In vivo* δοκιμές 35
3.2.1 Πορτοκάλι 35
4. Συζήτηση 40
5. Συμπεράσματα 45
6. Βιβλιογραφία 46

Περίληψη

Το αυτοφυές φυτό *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter (κν. ακονιζιά) απαντάται σε χέρσους, πετρώδεις τόπους σε όλη την Ελλάδα και αποτελεί είδος ιδιαίτερα επιθετικό στον εποικισμό ανθρωπογενώς διαταραγμένων περιοχών. Το επιεφυμενιδικό υλικό του φυτού είναι ένα υδατοδιαλυτό μείγμα φλαβονοειδών και σεσκιτερπενίων με έντονη αλληλοπαθητική δράση έναντι άλλων φυτικών ειδών. Κατά τη διάρκεια των φθινοπωρινών βροχών, το έκκριμα εκπλένεται από τα φύλλα και, πέφτοντας στο έδαφος, εμποδίζει τη φύτρωση σπερμάτων γειτονικών ειδών, ενώ προκαλεί σημαντικές μορφολογικές αλλοιώσεις στις ρίζες όσων αρτίβλαστων επιτύχουν να φυτρώσουν. Επίσης, το εκχύλισμα και αποξηραμένα φυτικά μέρη της *D. viscosa* έχουν παρουσιάσει παρεμποδιστική δράση έναντι διάφορων μυκήτων και άλλων φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών. Στην παρούσα πτυχιακή διατριβή ελέγχθηκε η αντιμυκητιακή δράση του επιεφυμενιδικού υλικού της *D. viscosa* στο *Penicillium sp.* που απομονώθηκε από ρόδι, στο οποίο προκαλεί ενδοσήψη και στο *Penicillium digitatum* που απομονώθηκε από πορτοκάλι, το οποίο είναι υπεύθυνο για την πράσινη σήψη. Η συλλογή του υδατοδιαλυτού φυτικού εκκρίματος πραγματοποιήθηκε από αυτοφυή φυτά τον Σεπτέμβριο (εποχή αυξημένης συσσώρευσης) και ακολούθησε η λυοφιλίωσή του. Στις *in vitro* δοκιμές, το έκπλυμα εφαρμόστηκε σε 3 συγκεντρώσεις που αντιστοιχούσαν α) στη συγκέντρωση προσομοίωσης, η οποία παραπέμπει στη φυσική συγκέντρωση επί της επιφάνειας του φύλλου, β) σε 3-πλάσια και γ) 6-πλάσια συγκέντρωση της προσομοίωσης. Μετρήθηκε η βλαστικότητα των σπορίων του μύκητα και το μήκος του βλαστικού σωλήνα σε διάφορα χρονικά διαστήματα μετά τον εμβολιασμό. Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν και στις δύο περιπτώσεις μία σημαντική παρεμποδιστική δράση του επιεφυμενιδικού υλικού, η οποία εμφανίζει μία δοσο-εξαρτώμενη κλιμάκωση και έχει τρεις συνιστώσες: i) έντονη μείωση του ποσοστού βλάστησης των σπορίων από τις 8 πρώτες ώρες, σε σχέση με το μάρτυρα ii) συνολική καθυστέρηση της

βλάστησης κατά αρκετές ώρες, ιδιαίτερα από την μέγιστη συγκέντρωση υλικού και iii) πολύ σημαντική μείωση του μήκους του βλαστικού σωλήνα για τα σπόρια που βλάστησαν. Στις *in vivo* δοκιμές με το *Penicillium digitatum* το έκπλυμα εφαρμόστηκε στην μέγιστη συγκέντρωση υλικού (6-πλάσια της προσομοίωσης) και μετρήθηκαν: i) η συχνότητα της ασθένειας όπου στην μεταχείριση με *D. viscosa* άγγιζε μόνο το 3% ii) η σοβαρότητα της ασθένειας, εκφρασμένη ως % ποσοστό του όγκου του καρπού που έχει υποστεί σήψη (μάρτυρας 83,9%, *D. viscosa* 0%) και iii) οι διαστάσεις των κακώσεων, της σήψης και της μυκηλιακής ανάπτυξης επί των καρπών, αποδεικνύοντας ισχυρή αντιμικροβιακή δράση του επιεφυμενιδικού υλικού. Τα προαναφερθέντα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά ως προς τη χρήση του επιεφυμενιδικού εκκρίματος της *D. viscosa* ως παράγοντα φυτοπροστασίας έναντι των συγκεκριμένων παθογόνων.

Summary

The ruderal species *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter grows in abandoned fields and rocky areas allover Greece and it has the ability to thrive and spread aggressively in disturbed habitats. The plant's epicuticular material is a water-soluble mixture of flavonoids and sesquiterpenes with significant allelopathic activity against other plant species. During the autumn rains, the exudate is rinsed from the leaves and, reaching the soil, inhibits the germination of other species seeds, while causes severe root morphological distortion of the seedlings that eventually succeed to germinate. Furthermore, the *D. viscosa* epicuticular material exhibits a significant antimicrobial activity against fungi and other phytopathogenic microorganisms. In the present study, we tested the antifungal potential of the *D. viscosa* epicuticular exudate on *Penicillium sp*. which was isolated from pomegranate and on *Penicillium digitatum* from orange, which causes citrus green mold. The collection of the epicuticular material was conducted from wild plants in September (the period of the highest concentration on the leaves), followed by freeze-drying. Concerning the *in vitro* tests on both microorganisms, the epicuticular material was applied at 3 concentrations corresponding to a) the natural concentration on leaf surface, b) three-fold and c) six-fold the natural concentration. Spore

germination rate and germ tube elongation were recorded at different time intervals after inoculation. The results indicate a considerable dose-dependent inhibitory effect of epicuticular material, consisting of three components: i) a decrease in the percentage of germination compared to the control, appearing in the first 8 hours, ii) a several hours delay of germination, especially apparent in the highest *D. viscosa* concentration and iii) a remarkable decrease of the germ tube length. The in vivo experiments were conducted with artificially wounded oranges, which were infected with *Penicillium digitatum* after their rinsing with the epicuticular material solution (at highest concentration) or sterile water for the control. Disease incidence (%) was recorded, reaching 3% for the *D. viscosa* treatment and 100% for the control after 8 days. Additionally, disease severity, expressed as the % percentage of the total fruit volume that appeared rotten, was assessed (control 83,9%, *D. viscosa* 0%). Finally, measurements of lesion diameter, infected tissue and mycelium growth confirmed the antimicrobial effects of the epicuticular exudate. The results are promising concerning the potent use of the epicuticular material of *D. viscosa* as a protective agent against the particular microorganisms.

1. Εισαγωγή

1.1 *Dittrichia viscosa*

Το αυτοφυές φυτό *Dittrichia viscosa* ανήκει στην οικογένεια των Asteraceae. Στη διεθνή βιβλιογραφία συναντάται και ως *Inula viscosa* (προηγούμενη ονοματολογία), ενώ το κοινό του όνομα είναι ακονιζιά.

Η *D. viscosa* εμφανίζεται σε χέρσους, πετρώδεις τόπους σε όλη την Ελλάδα και εξαπλώνεται στη Μεσογειακή Ευρώπη, Ασία και Αφρική. Η εξάπλωσή της είναι ταχύτατη την λεκάνη της Μεσογείου, καθώς αποτελεί ιδιαίτερα επιθετικό θάμνο καταλαμβάνοντας διαταραγμένες περιοχές λόγω ανθρώπινων δραστηριοτήτων (διάνοιξη δρόμων, εγκατάλειψη αγρών κ.α.) (Καββάδας, 1956).

Πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει ότι η *D. viscosa* εμφανίζει ανθεκτικότητα έναντι κάποιων ρυπαντών σε υποβαθμισμένες περιοχές. Συγκεκριμένα, σε περιοχές όπως αυτοκινητόδρομοι, βιομηχανικές περιοχές και ορυχεία παρουσιάζει ικανότητα συσσώρευσης ρυπαντών. Αποτέλεσμα αυτού είναι η φυτοεξυγίανση των παραπάνω εδαφών, καθώς απομακρύνει ορισμένα βαρέα μέταλλα, ενώ παράλληλα μπορεί να λειτουργήσει ως βιοδείκτης παρέχοντας πληροφορίες για την παρουσία και την συγκέντρωση εδαφικών και αέριων ρυπαντών (Swaileh et al., 2004; Nogales and Benitez, 2006; Murciego et al., 2007; Fernandez et al., 2008). Ακόμα η *D.viscosa* παρουσιάζει ανθεκτικότητα στην αλατότητα σε επίπεδα παρόμοια με αυτά του θαλασσινού νερού, κάτι που της επιτρέπει να εξαπλωθεί και σε αμμώδεις παράκτιες περιοχές (Campos et al., 2004). Σε συνθήκες υδατικής καταπόνησης το φυτό καταφέρνει να επιβιώνει έστω και με μειωμένη ανάπτυξη (Karageorgou et al., 2002).

Η ικανότητα των σπερμάτων του φυτού να φυτρώνουν σε ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι αέρια που εκλύονται από τις φυσικές πυρκαγιές προάγουν την φύτρωση του συμβάλουν στην ταχεία εξάπλωση του στις παραμεσόγειες περιοχές (Perez-Fernandez et

al., 2003, 2006). Η ανάπτυξη του φυτού επηρεάζεται από την συνύπαρξή του με άλλα φυτά (Bonanomi and Mazzoleni, 2005).

Το φυτό φιλοξενεί αρκετά έντομα και ακάρεα (Ward and Lubin, 1992). Θεωρείται μελισσοκομικό φυτό ενώ τα άνθη του είναι επισκέψιμα και από λεπιδόπτερα λόγω του νέκταρ τους (Baydar and Curel, 1998). Αποτελεί ξενιστή για αρκετά αρπακτικά έντομα της περιοχής της Μεσογείου, συμβάλλοντας έτσι στην διατήρηση των πληθυσμών τους (Lykouressis et al., 2000).

Η *D.viscosa* αποτελεί ξενιστή για τους μύκητες *Coleosporium tussilaginis, Phoma inulae-viscosae, Pleospora herbarum* και *Sirococcus inulae* (Παντίδου, 1973) και για τον ιό TYLCV (Tomato Yellow Leaf Curl Virus) (Jorda et al., 2001). Τέλος, μπορεί να αναπτύσσει μυκόριζες (Wang and Qiu, 2006).

1.2 Επιεφυμενιδικό υλικό-εκκριτική λειτουργία τριχώματος

Στα φυτικά όργανα της *D.viscosa* υπάρχουν αδενώδεις και μη αδενώδεις τρίχες. Ο αριθμός των αδενωδών τριχών σταθεροποιείται στα πρώτα στάδια του βιολογικού κύκλου του φυτού και έτσι η πυκνότητα φαίνεται να μην επηρεάζεται από υδατική καταπόνηση ή τροφοπενία βορίου (Karageorgou et al., 2002; Stavrianakou et al., 2006).

Τα φύλλα και οι νεαροί βλαστοί έχουν αδενώδεις τρίχες διαφόρου μήκους. Οι αδενώδεις τρίχες, όσον αφορά την ανατομία τους, διαθέτουν ένα ζεύγος κυττάρων λαιμού και μια αδενώδη κεφαλή (Σταυριανάκου, 2009).

Οι αδενώδεις τρίχες ξεκινούν την εκκριτική τους λειτουργία όταν το φύλλο έχει μήκος 2 mm και συνεχίζεται σε όλη την διάρκεια του βιολογικού κύκλου. Τα κύτταρα της κεφαλής εκκρίνουν διάφορες λιπόφιλες ενώσεις (όπως λιπίδια), πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες (Werker, 2000). Τα λιπίδια εκκρίνονται μέσω των πόρων που υπάρχουν στην εφυμενίδα και οι πολυσακχαρίτες συσσωρεύονται κάτω από την εφυμενίδα. Το υπόλοιπο υλικό της έκκρισης διοχετεύεται απευθείας στο εξωτερικό περιβάλλον. Από την εφαρμογή ιστοχημικών μεθόδων απεδείχθη ότι μεταξύ των λιπόφιλων συστατικών υπάρχουν ενώσεις φαινολών και τερπενίων (Nikolaki and Christodoulakis, 2004). Το λιπόφιλο αυτό έκκριμα ονομάζεται και επιεφυμενιδικό, διότι είναι ενσωματωμένο στην κηρώδη επιφάνεια της εφυμενίδας (Wollenweber and

Dietz, 1981). Επίσης, η κολλώδης υφή της επιφάνειας των φύλλων και των βλαστών οφείλεται στην έκκριση του λιπόφιλου εκκρίματος (Καββάδας, 1956; Grierson, 1975). Υπολογίζεται ότι το επιεφυμενιδικό έκκριμα, βάσει της σχετικής συγκέντρωσης των ενώσεων που απορροφούν στην UV-B περιοχή του φάσματος, είναι υδατοδιαλυτό σε ποσοστό γύρω στο 75% (Stephanou and Manetas, 1997a; Stephanou and Manetas, 1997b). Υπογραμμίζεται ότι η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών επηρεάζεται κυρίως από υδατική καταπόνηση (Karageorgou et al., 2002; Stavrianakou et al., 2006).

1.3 Ιδιότητες – Βιολογική δράση

Η *D. viscosa* χρησιμοποιείται στη μεσογειακή περιοχή για τις φαρμακευτικές της ιδιότητες. Δρα ως τονωτικό, τοπικό αναισθητικό, μαλακτικό δέρματος αλλά και ως παυσίπονο στις περιοχές του κρανίου, των μυών και των οδόντων. Ακόμα συμβάλλει στην επούλωση σπασιμάτων και επιφανειακών τραυμάτων. Σε χώρες της Ασίας, υπάρχουν αναφορές ότι χρησιμοποιείται ως θεραπεία για τον διαβήτη και ενάντια δερματικών παθήσεων (Yaniv et al., 1987; Lev and Amar, 2000). Από πειραματικά δεδομένα τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* προκύπτει ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην θεραπευτική κτηνιατρική αλλά και ως εντομοαπωθητικό.

Από γεωπονικής πλευράς, το ενδιαφέρον στρέφεται ολοένα και περισσότερο στην βιολογική καταπολέμηση και στην παραγωγή προϊόντων απαλλαγμένων από χημικές ουσίες και υπολείμματα αυτών. Αντιμετωπίζονται έτσι τα προβλήματα ανθεκτικότητας των παθογόνων μικροοργανισμών και εξαλείφονται οι παρενέργειες στον άνθρωπο, τα ζώα και το περιβάλλον. Σε πειράματα *in vitro*, το εκχύλισμα και τα αποξηραμένα φυτικά μέρη της D. viscosa έχουν παρουσιάσει μυκητοστατική δράση έναντι διάφορων μυκήτων όπως το *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. Η ιδιότητα αυτή επηρεάζεται από την εφαρμοζόμενη δόση και την ηλικία του φυτού (Qasem et al., 1995). Σειρά πειραμάτων με φυτοπαθογόνους μύκητες και βακτήρια απέδειξε την ισχυρή αντιμικροβιακή δράση του επιεφυμενιδικού υλικού της *D. viscosa in vitro*. Η αποτελεσματικότητα του επηρεάζεται όχι μόνο από την συγκέντρωσή

του αλλά και από την πιθανή ανθεκτικότητα του παθογόνου (Σταυριανάκου 2009).

Έπειτα από σχετικές αναλύσεις διαπιστώθηκε ότι στο επιεφυμενιδικό διάλυμα της *D. viscosa* υπάρχει πληθώρα φλαβονοειδών, ενισχύοντας κυρίως το αμυντικό σύστημα του φυτού αλλά και συμβάλλοντας στην εγκαθίδρυση αρκετών συμβιωτικών ωφέλιμων μικροοργανισμών (Field et al., 2006). Έχει ιδιαίτερη γεωπονική-φυτοπροστατευτική σημασία η αλληλεπίδρασή αυτή του φυτού με διάφορους μικροοργανισμούς.

1.4 Μετασυλλεκτικές σήψεις και *Penicillium*

Στον κλάδο της μετασυλλεκτικής μεταχείρισης των νωπών καρπών οι μύκητες του γένους *Penicillium*, κοινώς γνωστοί ως πενικίλλια, είναι εξαιρετικά σημαντικοί καθώς είναι τα πιο κοινά παθογόνα μετασυλλεκτικών σήψεων των εσπεριδοειδών και των μηλοειδών. Οι σήψεις από *Penicillium* σπανίως λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια παραμονής των καρπών στα δέντρα. Είναι όμως συνήθεις στα συσκευαστήρια, κατά τη μεταφορά τους, στις αποθήκες ακόμα και κατά την παραμονή τους σε οικιακά ψυγεία. Ένας από τα είδη που προκαλεί σήψη στους καρπούς του πορτοκαλιού είναι ο *Penicillium digitatum* (πράσινη σήψη), δημιουργώντας εξάνθηση πράσινου χρώματος ή πράσινου ελαιώδους που οφείλεται στο σχηματισμό των καρποφοριών του (Ασθένειες Καρποφόρων Δέντρων και Αμπέλου, Παναγόπουλος Χ.).

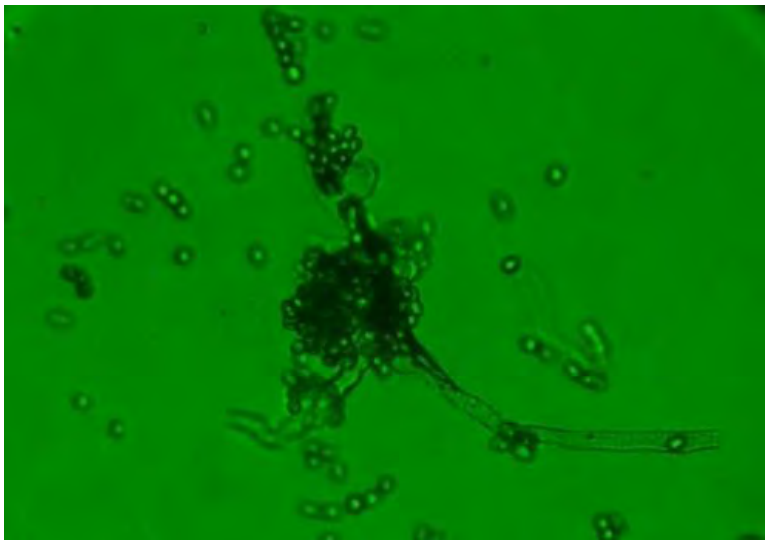
Ταξινόμηση του είδους *Penicillium* sp.

Βασίλειο	MYCOTA (ΜΥΚΗΤΕΣ/ΕΥΜΥΚΗΤΕΣ)
Φύλο	ASCOMYCOTA (ΑΣΚΟΜΥΚΗΤΕΣ)
Κλάση	ΜΗΚΥΛΙΑΚΟΟΙ ΑΣΚΟΜΥΚΗΤΕΣ
Άθροισμα	PLECTOMYCETES (ΠΛΕΚΤΟΜΥΚΗΤΕΣ)
Τάξη	Eurotiales
Γένος	*Penicillium*
Είδος	*Penicillium* sp.

Εικόνα 1.1: *Penicillium* sp.

Ταξινόμηση του είδους *Penicillium digitatum*

Βασίλειο	MYCOTA (ΜΥΚΗΤΕΣ/ΕΥΜΥΚΗΤΕΣ)
Φύλο	ASCOMYCOTA (ΑΣΚΟΜΥΚΗΤΕΣ)
Κλάση	ΜΗΚΥΛΙΑΚΟΟΙ ΑΣΚΟΜΥΚΗΤΕΣ
Άθροισμα	PLECTOMYCETES (ΠΛΕΚΤΟΜΥΚΗΤΕΣ)
Τάξη	Eurotiales
Γένος	*Penicillium*
Είδος	*P.digitatum*



Εικόνα 1.2: *Penicillium digitatum*

1.5 Σκοπός της παρούσας εργασίας

Το αυτοφυές φυτό *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter (κν. ακονιζιά) έχει κερδίσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών λόγω των φαρμακευτικών του ιδιοτήτων αλλά και για της αντιμικροβιακής του δράσης έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να ελεγχθεί η αντιμυκητιακή δράση του επιεφυμενιδικού υλικού της *D. viscosa* προερχόμενου από τα υπέργεια μέρη της στο *Penicillium* sp. που απομονώθηκε από ρόδι και στο *Penicillium digitatum* που απομονώθηκε από πορτοκάλι. Οι επιμέρους στόχοι ήταν οι εξής:

- Η διερεύνηση της *in vitro* αντιμικροβιακής δράσης του επιεφυμενιδικού υλικού έναντι των δύο ειδών *Penicillium*, αλλά και του δοσο-εξαρτώμενου χαρακτήρα αυτής.
- Η *in vivo* δοκιμή της πιθανής φυτοπροστατευτικής δράσης του υδατικού εκπλύματος του φυτού, ώστε τα αποτελέσματα να αποτελέσουν αφετηρία για πρακτική εφαρμογή.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Βοτανικά χαρακτηριστικά της *Dittrichia viscosa*

Είναι φυτό που συναντάται ως όρθιος, πλατύφυλλος, αειθαλής και πολυετής θάμνος. Το ύψος του μπορεί να φτάσει έως και το 1 μέτρο. Τα φύλλα έχουν σχήμα λογχοειδές ή αντιστρόφως λογχοειδές. Τα άνθη σχηματίζουν ταξιανθία κεφαλιού περιβαλλόμενη από βράκτια. Οι ταξιανθίες είναι πολυπληθείς οργανωμένες σε φόβη ή σε ελεύθερο βότρυ. Τα βράκτια έχουν πλάτος 0,75-1cm. Τα άνθη είναι ακτινωτά και οι καρποί είναι αχαίνια, χνουδωτά και αδενώδη. Ο πάπος είναι τραχύς, χρώματος καφέ και οι υπάρχουσες τρίχες είναι ενωμένες στην βάση σχηματίζοντας έτσι κύπελλο.

2.2 Χαρακτηριστικά του γένους *Penicillium*

Οι μύκητες σχηματίζουν χαρακτηριστικούς κονιδιοφόρους με διακλαδώσεις και παρουσιάζουν την εικόνα χρωστήρος. Τα άκρα των διακλαδώσεων καταλήγουν σε φιαλίδια από τα οποία σχηματίζονται μονοκύτταρα, σφαιρικά ή ωοειδή, υαλώδη κονίδια σε αλυσίδες. Οι κονιδιοφόροι σχηματίζονται σε πυκνές μάζες στους προσβεβλημένους καρπούς και σε συνδυασμό με τον τεράστιο αριθμό των κονιδίων, προσδίδουν το χαρακτηριστικό χρώμα για κάθε μύκητα.

Όσον αφορά την συμπτωματολογία των σήψεων (εσωτερικής και πράσινης), αρχικά παρατηρείται μια υδατώδης μαλακή, ελαφρά βυθισμένη κηλίδα με διάμετρο 0.5-1cm, που αυξάνει ταχύτατα και επεκτείνεται σε ολόκληρο τον καρπό. Αν οι συνθήκες (Θερμοκρασία, Σχετική Υγρασία) είναι ευνοϊκές η κηλίδα μπορεί να μεγαλώσει έως και 3cm σε διάμετρο την ημέρα. Επίσης, ιστοί που έχουν προσβληθεί γίνονται μαλακοί και υποχωρούν σε μικρή πίεση. Στην επιφάνεια σχηματίζεται στα πρώτα στάδια της προσβολής χαρακτηριστική εξάνθιση. Στο τελικό στάδιο της ασθένειας ο καρπός καλύπτεται από τις εξανθίσεις των παθογόνων (και εσωτερικά στην περίπτωση της ενδοσήψης). Τέλος, οι καρποί αναδύουν οσμή μούχλας και έχουν πικρή, δυσάρεστη γεύση.

Η ευνοϊκότερη θερμοκρασία για την ανάπτυξη των μυκήτων είναι 22°C-24 ^{o}C. Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες οι σήψεις εξελίσσονται με πολύ αργούς ρυθμούς.(Ασθένειες Καρποφόρων Δέντρων και Αμπέλου, Παναγόπουλος Χ.)

Εικόνα 2.1: *Penicillium digitatum*

2.3 Πορτοκάλια ποικιλίας ‘’Ομφαλοφόρο της Ουάσιγκτον’’ ή ‘’Μέρλιν’’

Εισήχθη από τις Η.Π.Α και αποτελεί την κυριότερη ποικιλία στην Ελλάδα. Το δένδρο είναι ζωηρό και ο καρπός μεγάλου μεγέθους, με λεπτό φλοιό χωρίς σπέρματα και φέρει στον ομφαλό του δεύτερο ή τρίτο μικτό καρπό. Είναι καρπός εύχυμος με λεπτά καρπόφυλλα και πρωταγωνιστεί στην καταναλωτική προτίμηση. Τέλος, ωριμάζει πρώιμα (τέλη Οκτωβρίου αρχές Νοεμβρίου) και είναι το πρώτο πορτοκάλι που εμφανίζεται στην αγορά. (Γενική και Ειδική Δενδροκομία Βασιλακάκης Μ.)

2.4 Παρασκευή του υδατικού διαλύματος του επιεφυμενιδικού εκκρίματος της *D.viscosa*

Η συλλογή του φυτικού υλικού έγινε από την περιοχή της Αγριάς Βόλου στις 22/9/2015. Το υλικό τοποθετήθηκε σε λεκάνες με νερό, όπου και παρέμεινε για 3 ώρες με συχνή ανακίνηση. Η συνολική ποσότητα του διαλύματος πέρασε

από χάρτινο φίλτρο και ακολούθησε η διαδικασία της λυοφιλίωσης (freeze-drying) ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ανά πάσα στιγμή χωρίς να αλλοιωθεί η χημική σύσταση του επιεφυμενιδικού υλικού. Η παρασκευή των διαφορετικών συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν στα *in vitro* πειράματα (και εκείνης του *in vivo*) έγινε με κατάλληλες αραιώσεις της σκόνης, έπειτα πέρασμα από φίλτρο 0.2μm και καταμέτρηση της απορρόφησης στα 290nm (OD_{290}) σε φωτόμετρο.

Εικόνα 2.2: *Παρασκευή του υδατικού διαλύματος*

2.5 Απομόνωση και καλλιέργεια μυκήτων

Για την απομόνωση και την καλλιέργεια των μυκήτων χρησιμοποιήθηκε PSA (Potato Sucrose Agar) ως θρεπτικό υπόστρωμα(200gr τεμαχισμένοι κόνδυλοι πατάτας, 1lt απιονισμένο νερό, 15gr κρυσταλλική σουκρόζη και 15gr Άγαρ), με βασικό συστατικό το ζωμό πατάτας. Επιλέχθηκαν καρποί πορτοκαλιού που παρουσίαζαν την χαρακτηριστική πράσινη σήψη του παθογόνου και καρποί ροδιού που παρουσίαζαν σκουροπράσινη εξάνθιση στο εσωτερικού του καρπού.

Και στις δύο περιπτώσεις η απομόνωση έγινε με τη βοήθεια αποστειρωμένου βακτηριολογικού κρίκου, όπου μετά από επαφή με καρποφορίες του εκάστοτε παθογόνου, ομάδα κονιδίων μεταφέρθηκε σε τρυβλίο Petri με θρεπτικό υπόστρωμα PSA και τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο με μέση θερμοκρασία 25° C.

Τα αιωρήματα σπορίων που χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες ήταν από καλλιέργεια ηλικίας μιας εβδομάδας.

2.6 Πειραματικός Σχεδιασμός των *in vitro* πειραμάτων

Παρασκευάστηκαν διαλύματα τριών συγκεντρώσεων του λυοφιλιωμένου επιεφυμενιδικού υλικού: α) στη συγκέντρωση προσομοίωσης, η οποία παραπέμπει στη φυσική συγκέντρωση επί της επιφάνειας του φύλλου (1η), β) σε 3-πλάσια (2η) και γ) 6-πλάσια συγκέντρωση της προσομοίωσης (3η).

Το υδατικό διάλυμα του επιεφυμενιδικού εκκρίματος της *Dittrichia viscosa*, αφού είχε περάσει από φίλτρο 0.45μm απλώθηκε στην επιφάνεια των τρυβλίων ομοιόμορφα. Κάθε τρυβλίο περιείχε 1ml του υδατικού διαλύματος και 10 ml PSA. Αντίστοιχη διαδικασία έγινε για τον μάρτυρα (control), χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό. Ακολούθησε προσρόφηση και εξάτμιση της περίσσειας του δ/τος στο θάλαμο νηματικής ροής (laminar flow).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ο εμβολιασμός των τρυβλίων με εναιώρημα σπορίων, με την μέθοδο σταγόνας αιωρήματος. Οι σταγόνες τοποθετήθηκαν σε 3 σημεία σε μία πλευρά του τρυβλίου και αφέθηκαν να διατρέξουν την επιφάνεια σε μορφή δακρύου. Ακολούθησε απορρόφηση και εξάτμιση στο θάλαμο νηματικής ροής.

Ταυτοχρόνως, σε κάθε επανάληψη παρασκευάστηκαν δύο τρυβλία με PSA και το υδατικό διάλυμα της *D. viscosa,* καθώς και δύο επιπλέον τρυβλία με PSA και αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό, ως επιπλέον μάρτυρες για την πιθανή αλλοίωση/τροποποίηση του PSA από τα διαλύματα-απουσία μύκητα.

Τέλος, τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο (στους 25°C) και μετά από 8 ώρες καταγράφηκαν οι πρώτες παρατηρήσεις των σπορίων (λήψη φωτογραφιών σε σύνθετο οπτικό μικροσκόπιο στο οποίο ήταν προσαρμοσμένη φωτογραφική μηχανή) με φακούς Ε10 και Ε20.

Η λήψη φωτογραφιών επαναλήφθηκε στις 8, 10, 12 και 24 ώρες.

Για κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκαν 3 τρυβλία (επαναλήψεις) και κάθε πείραμα έγινε 2 φορές.

2.7 Πειραματικός Σχεδιασμός των *in vivo* πειραμάτων

Οι καρποί των πορτοκαλιών πλύθηκαν με σαπούνι ξεπλύθηκαν με νερό βρύσης και εμβαπτίστηκαν σε υποχλωριώδες διάλυμα 0.05% για 2 λεπτά και έπειτα σε αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό. Ακολούθησε στέγνωμα και η δημιουργία τεχνητής πληγής (2mm * 2mm) με την χρήση αποστειρωμένου καρφιού στην πλευρά του ισημερινού. Τα πορτοκάλια εμβαπτίστηκαν στο υδατικό διάλυμα της *D. viscosa* 6-πλάσιας συγκέντρωσης εκείνης της προσομοίωσης (6x) και σε αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό για το μάρτυρα (control). Έπειτα από 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να στεγνώσει το υγρό επάνω στον καρπό, κάθε πληγή ψεκάστηκε με αιώρημα σπορίων συνολικού όγκου 25ml από υδατικό διάλυμα σπορίων συγκέντρωσης 0.86 10^6/ml. Τα πορτοκάλια τοποθετήθηκαν σε δωμάτιο με υψηλή σχετική υγρασία και μέση θερμοκρασία 25°C για τις επόμενες ημέρες.

Η συγκέντρωση των σπορίων μετρήθηκε με την χρήση αιματοκυτταρόμετρου. Μία σταγόνα διαλύματος τοποθετήθηκε σε κάθε σταυρό (επανάληψη). Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των σπορίων μετρήθηκαν ο αριθμός σε κάθε επανάληψη και στη συνέχεια ο μαθηματικός τύπος:

$$\frac{\text{Σύνολο σπορίων 1ης επανάληψης } + \text{2ης επανάληψης } \quad * \ 10\ \mathrm{L}^{-1}}{2}$$

Οι χειρισμοί μετά την δημιουργία πληγής ήταν οι εξής:

- 30 πορτοκάλια εμβαπτίστηκαν στο υδατικό διάλυμα *D. viscosa* και εμβολιάστηκαν με σπόρια *Penicillium digitatum* (3 επαναλήψεις, 10 καρποί/επανάληψη)
- 30 πορτοκάλια εμβαπτίστηκαν σε απεσταγμένο αποστειρωμένο νερό και εμβολιάστηκαν με σπόρια *P. digitatum* (3 επαναλήψεις, 10 καρποί/επανάληψη)
- 10 πορτοκάλια εμβαπτίστηκαν στο υδατικό διάλυμα *D. viscosa*, προκειμένου να ελεγχθεί εάν από μόνο του προκαλούσε κάποια αλλαγή/αλλοίωση

• 10 πορτοκάλια εμβολιάστηκαν μόνο με υδατικό αιώρημα σπορίων *P. digitatum*, προκειμένου να παρακολουθείται η φυσική εξέλιξη της ασθένειας, βάση των συνθηκών στο χώρο του πειράματος.

Μετρήθηκαν τα εξής:

α) Συχνότητα της ασθένειας (%)= (αριθμός προσβεβλημένων τεχνητών τραυμάτων /συνολικό αριθμό τραυμάτων)*100

β) Σοβαρότητα ασθένειας (%) =[(όγκος σήψης / όγκος καρπού)] *100

γ) Η τελική διάμετρος της κάκωσης

δ) Ο όγκος του καρπού που καταλαμβάνει η σήψη

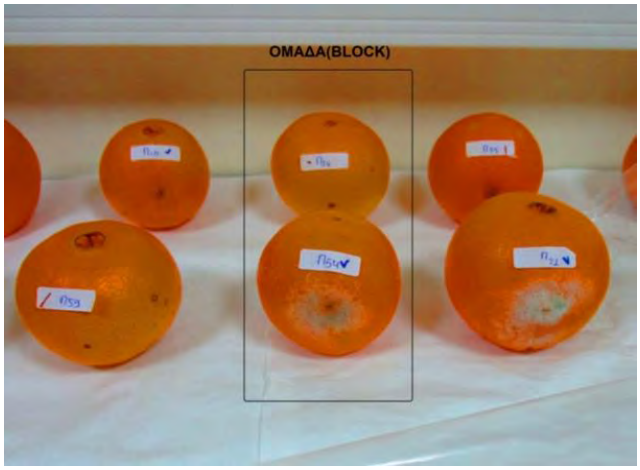
ε) Ο όγκος του καρπού που καταλαμβάνει το μηκύλιο του μύκητα

Η πιθανή φυτοτοξική επίδραση του φυτικού εκχυλίσματος στην εξωτερική επιφάνεια των καρπών ελέγχτηκε οπτικά.

Ποιοτικές παρατηρήσεις καταγράφηκαν από το πρώτο 24ωρο έως και την 10η μέρα.

Οι πρώτες ποσοτικές μετρήσεις καταγράφτηκαν κατά την 3η μέρα του πειράματος.

Ο σχεδιασμός του πειράματος βασίστηκε στο στατιστικό πειραματικό σχέδιο πλήρων τυχαιοποιημένων ομάδων (rcbd).



Εικόνα 2.3: *Σχέδιο πλήρων τυχαιοποιημένων ομάδων (rcbd)*

2.8 Στατιστική ανάλυση

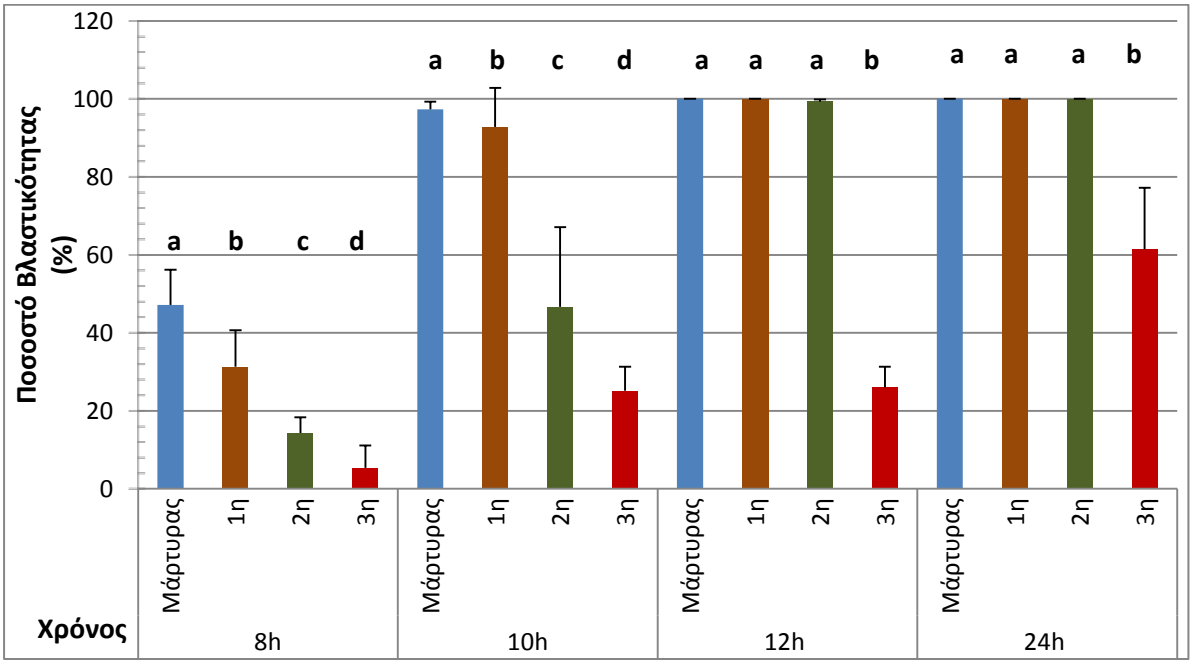
Τα αποτελέσματα των πειραμάτων υπέστησαν στατιστική επεξεργασία με one-way ANOVA, ακολουθούμενη από Tukey HSD Post Hoc test, με τη χρήση του προγράμματος IBM SPSS Statistics v.21.0 (IBM corp.).

3. Αποτελέσματα

3.1 *In vitro* δοκιμές

3.1.1 Ρόδι

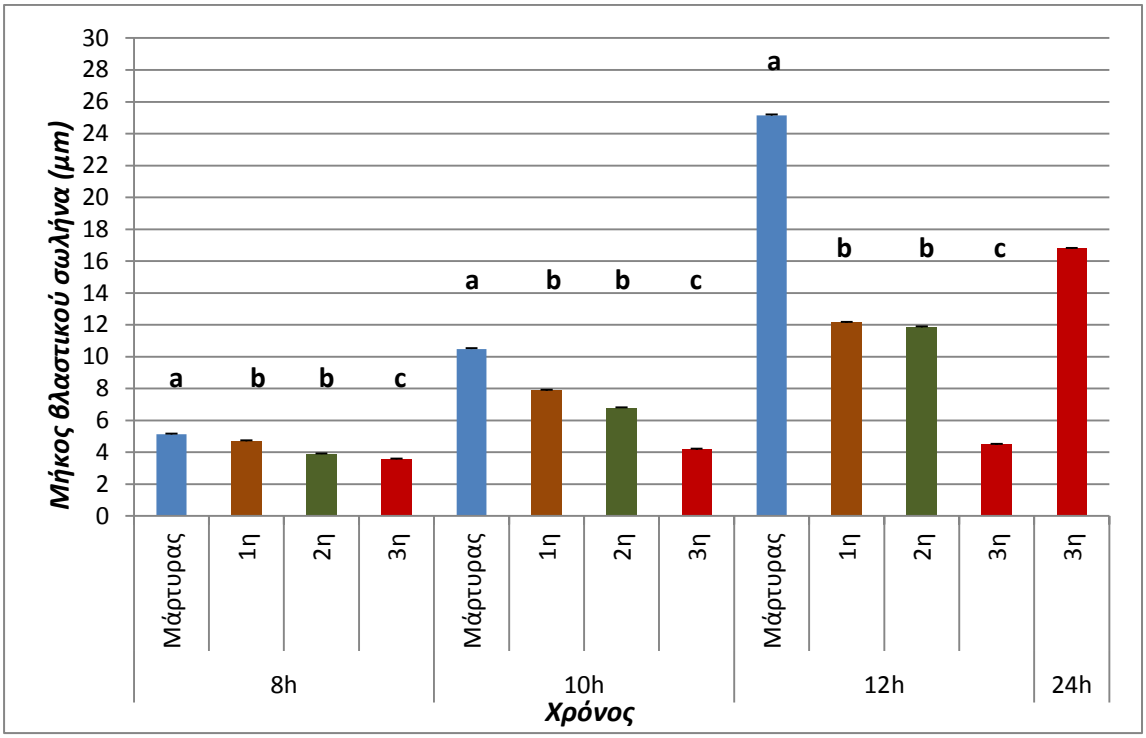
Ακολουθούν τα αποτελέσματα των *in vitro* πειραμάτων για τον μύκητα *Penicillium* sp που απομονώθηκε από ρόδι.



Σχήμα 3.1: *Ποσοστό βλαστικότητας των σπορίων μύκητα Penicillium* sp *στις διαφορετικές συγκεντρώσεις στις 8, 10, 12 και 24 ώρες (Μ.Ο.±SD). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (p<0.05).*

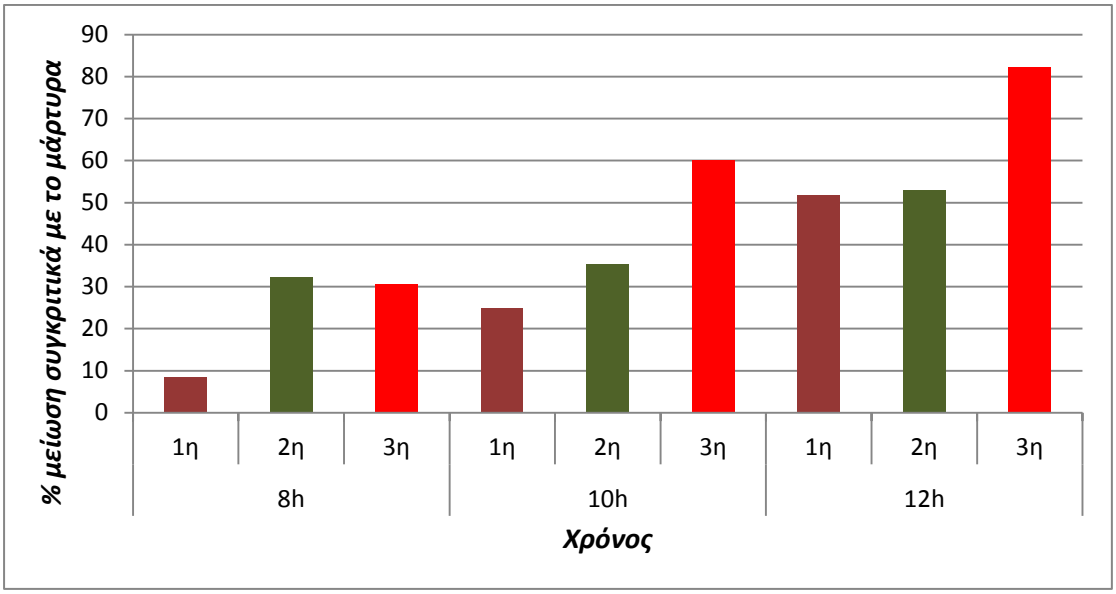
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης, το ποσοστό βλαστικότητας των σπορίων του μάρτυρα διέφερε σημαντικά στις 8 ώρες μετά τον εμβολιασμό από όλες τις συγκεντρώσεις της *D. viscosa*. Δεν εντοπίστηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ της 1ης και της 2ης συγκέντρωσης, όμως και οι δύο διαφέρουν από την 3η. Έτσι, στις 8 ώρες το ποσοστό βλαστικότητας του μάρτυρα αγγίζει το 50%, ακολουθεί η 1η συγκέντρωση με 37%, η 2η συγκέντρωση με 18% και η 3η βρίσκεται στο 8%. Στις 10 ώρες ο μάρτυρας και η 1η συγκέντρωση φτάνουν σχεδόν στο 100%, διαφέρουν όμως σημαντικά από την 2η και την 3η με την τελευταία να περιορίζεται στο 30%. Στις 12 και

24 ώρες ο μάρτυρας και όλες οι συγκεντρώσεις εκτός της 3ης παρουσιάζουν ποσοστό βλαστικότητας 100% με την 3η όμως να φτάνει στο 60%, διαφέροντας και εδώ σημαντικά από τις υπόλοιπες.



Σχήμα 3.2: *Μέτρηση μήκους βλαστικού σωλήνα των σπορίων του μύκητα Penicillium* sp *στις διαφορετικές συγκεντρώσεις στις 8, 10, 12 και 24 ώρες (Μ.Ο.±SD). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (p<0.05).*

Η παρουσία της *D. viscosa* στο υπόστρωμα ανάπτυξης του παθογόνου λειτουργεί επιβραδυντικά για την ανάπτυξη του βλαστικού σωλήνα των σπορίων που βλάστησαν. Το μήκος των βλαστικού σωλήνα του μάρτυρα υπερτερεί των υπόλοιπων μεταχειρίσεων από τις 8 πρώτες ώρες. Δεν εντοπίστηκαν διαφορές μεταξύ της 1ης και της 2ης, όμως η 3η συγκέντρωση εμφανίζει συνεχώς τις χαμηλότερες τιμές στο μήκος του βλαστικού σωλήνα. Οι προαναφερθείσες διαφορές μεγεθύνονται με την πάροδο των ωρών φτάνοντας έτσι στις 12 ώρες όπου το μήκος του βλαστικού σωλήνα στην 1η και 2η συγκέντρωση είναι το μισό και στην 3η το υποπενταπλάσιο αυτού που καταγράφηκε στον μάρτυρα. Τέλος στις 24 ώρες το μήκος του βλαστικού σωλήνα ήταν εφικτό να μετρηθεί μόνο στα σπόρια της 3ης συγκέντρωσης και έφτασε τα 17 μm.

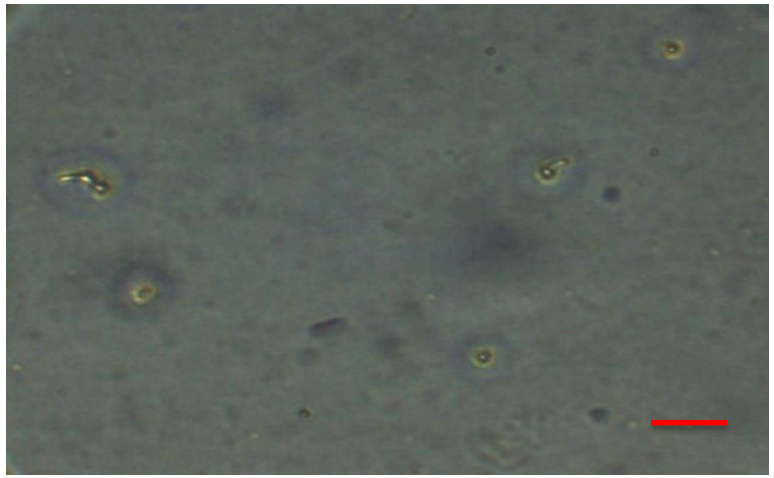


Σχήμα 3.3: *Επί τις εκατό μείωση του μήκους του βλαστικού σωλήνα των σπορίων του μύκητα Penicillium* sp. *στις διαφορετικές συγκεντρώσεις στις 8, 10 και 12 ώρες*

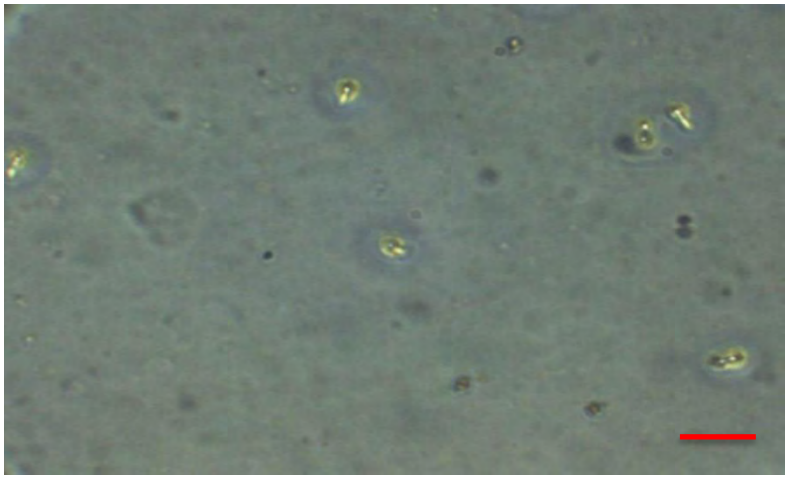
Στο σχήμα 3.3 καταγράφεται η % μείωση του μήκους του βλαστικού σωλήνα προκειμένου να αποτυπωθεί καλύτερα η επίδραση των διαφόρων συγκεντρώσεων της *D. viscosa* στο μέγεθος αυτό. Στις 8ώρες η 2η και 3η συγκέντρωση προκαλούν μείωση της τάξης του 30% ενώ η 1η μόνο 8%. Στις 10 ώρες η 3η αγγίζει το ποσοστό του 60%,η 2η παρουσιάζει μείωση 35% και η 1η μόλις 24%. Τέλος, η 3η συγκέντρωση φτάνει στο 82%, ενώ η 1η και η 2η συμβαδίζουν στο ποσοστό του 52% για τις 12 ώρες.

Ακολουθούν ενδεικτικές φωτογραφίες των σπορίων του μύκητα *Penicillium* sp. στις διάφορες δόσεις στις 8, 10,12 και 24 ώρες. (Οπτικό μικροσκόπιο: Nikon Labophot-2, Μεγέθυνση:200X, Κλίμακα: 20μm)

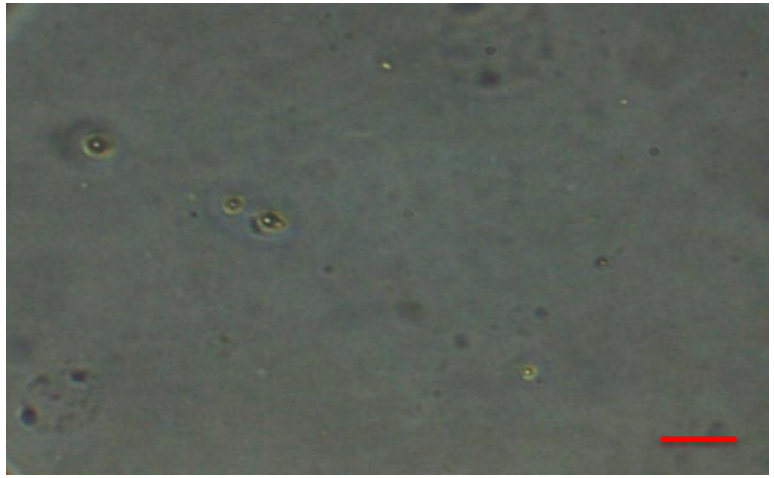
8h



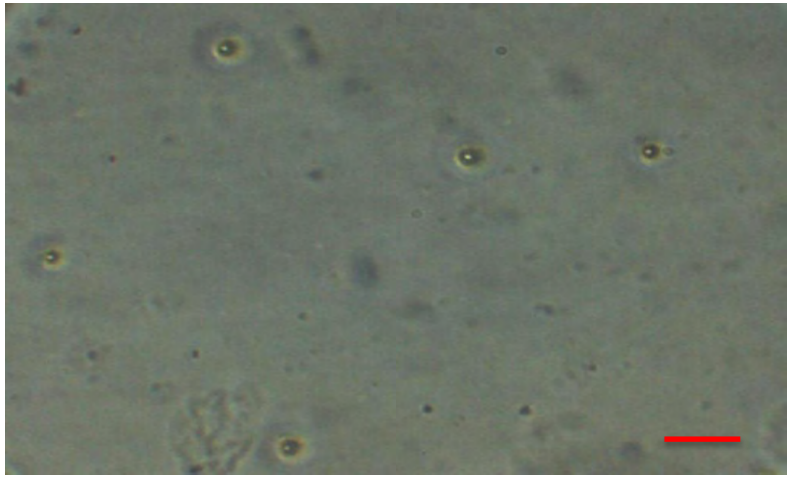
Εικόνα 3.1: *Μάρτυρας*



Εικόνα 3.2: *1η συγκέντρωση*

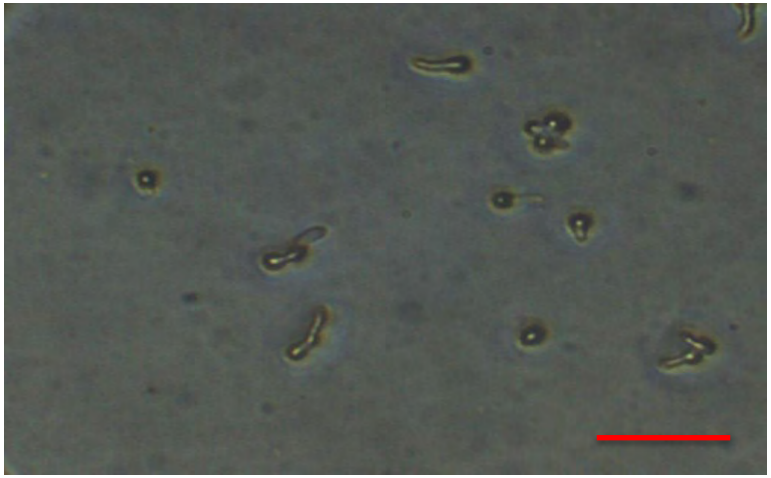


Εικόνα 3.3: *2η συγκέντρωση*

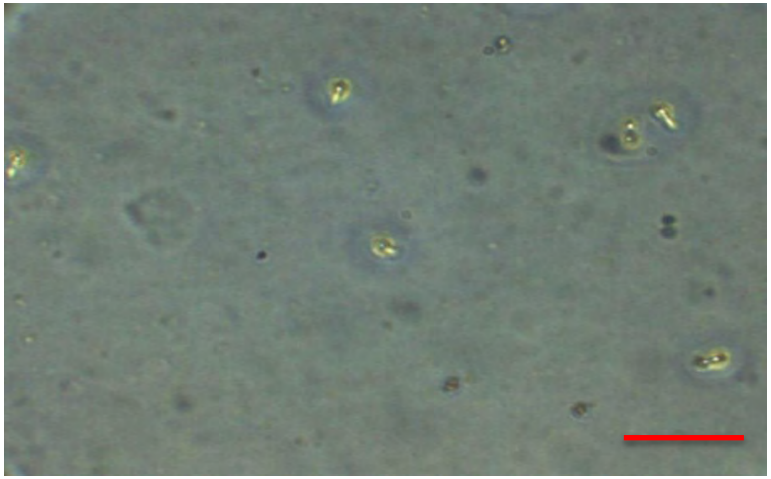


Εικόνα 3.4: *3η συγκέντρωση*

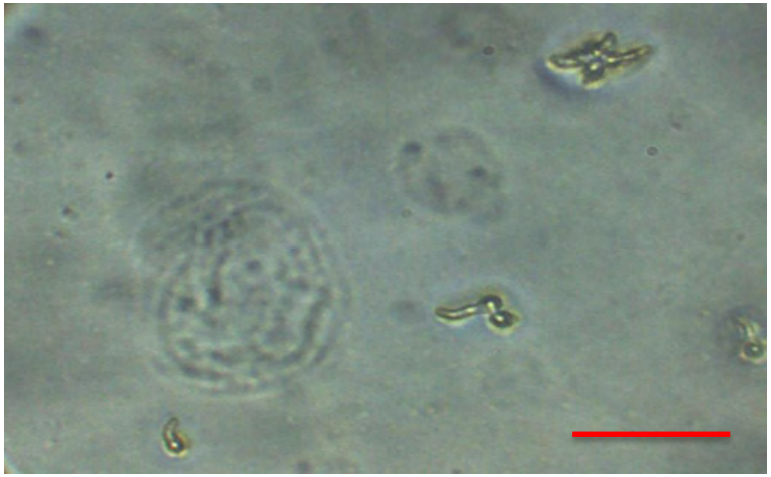
Στις 10h



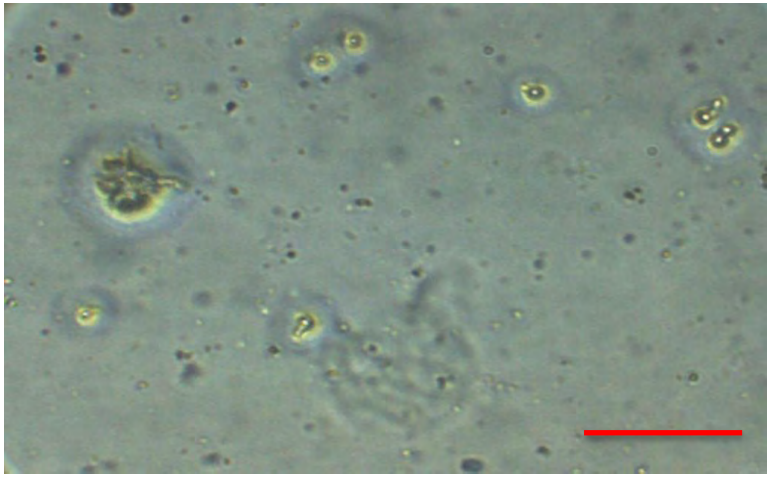
Εικόνα 3.5: *Μάρτυρας*



Εικόνα 3.6: *1η συγκέντρωση*

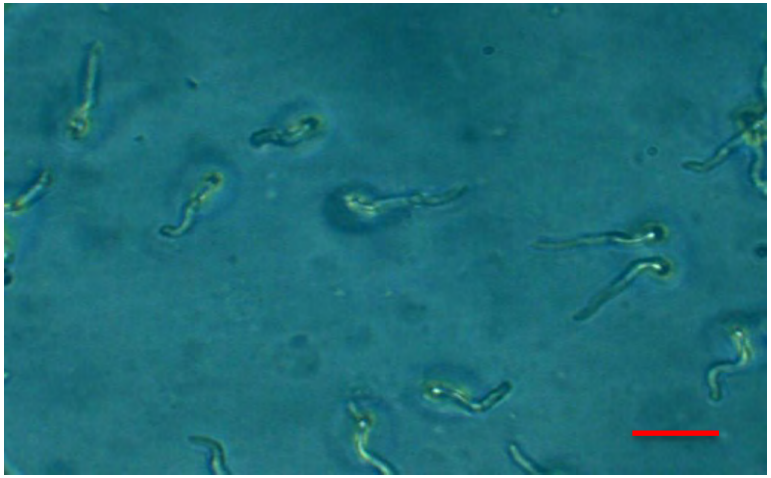


Εικόνα 3.7: *2η συγκέντρωση*

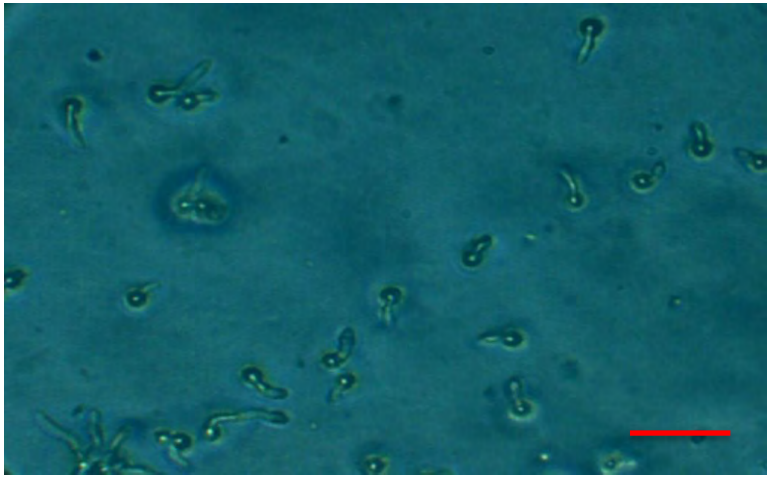


Εικόνα 3.8: *3η συγκέντρωση*

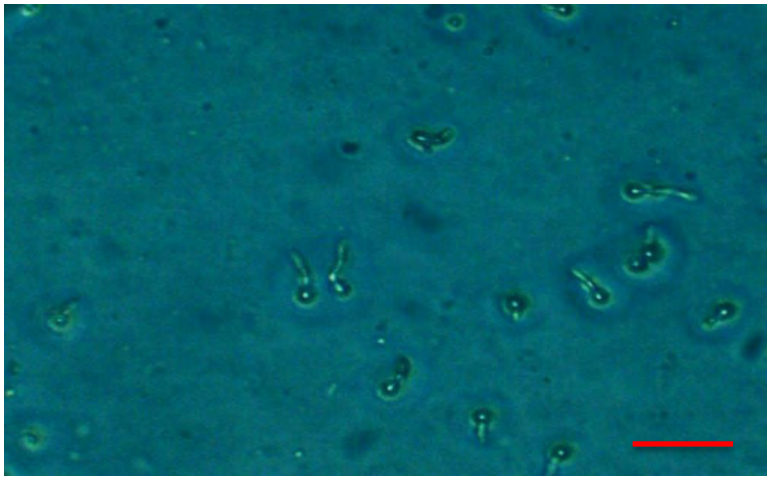
Στις 12h



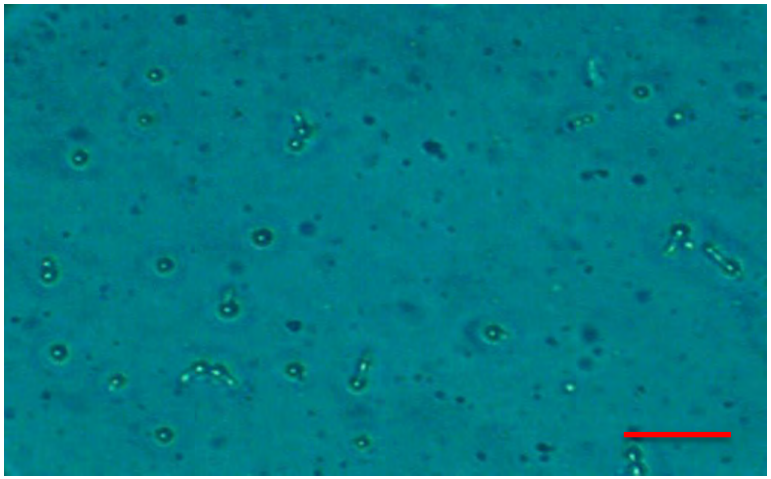
Εικόνα 3.9: *Μάρτυρας*



Εικόνα 3.10: *1η συγκέντρωση*



Εικόνα 3.11: *2η συγκέντρωση*



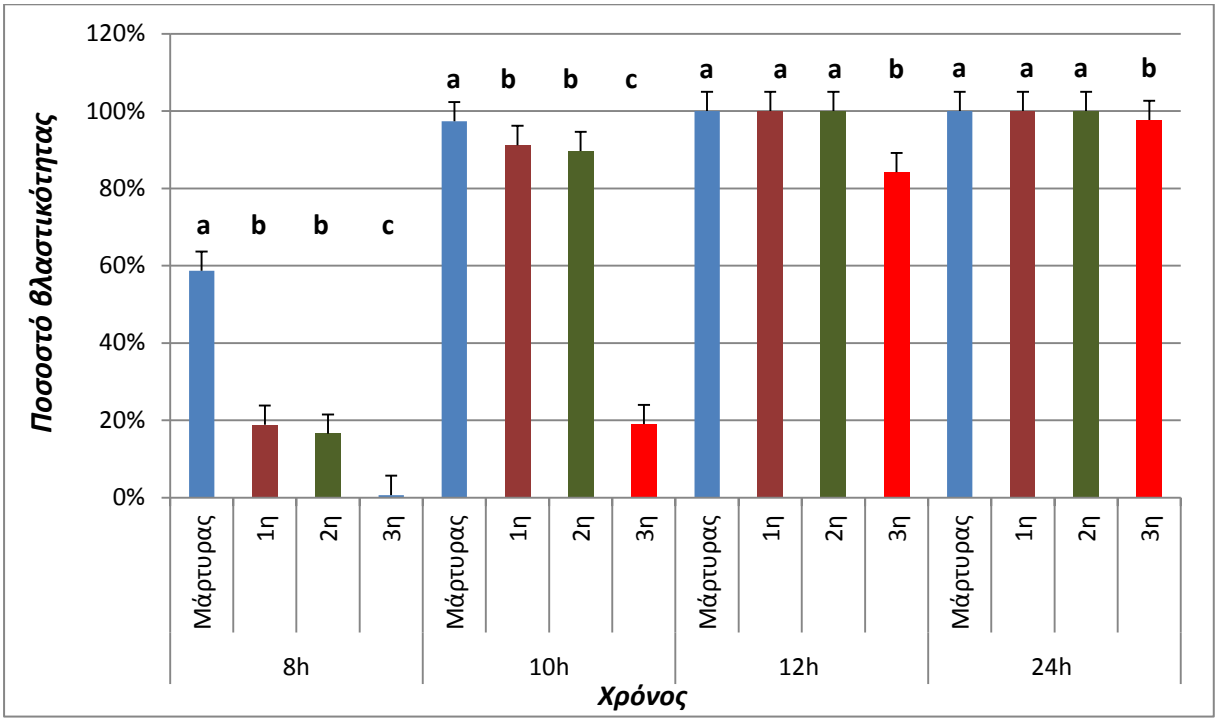
Εικόνα 3.12: *3η συγκέντρωση*

Στις 24h

Εικόνα 3.13*: 3η συγκέντρωση*

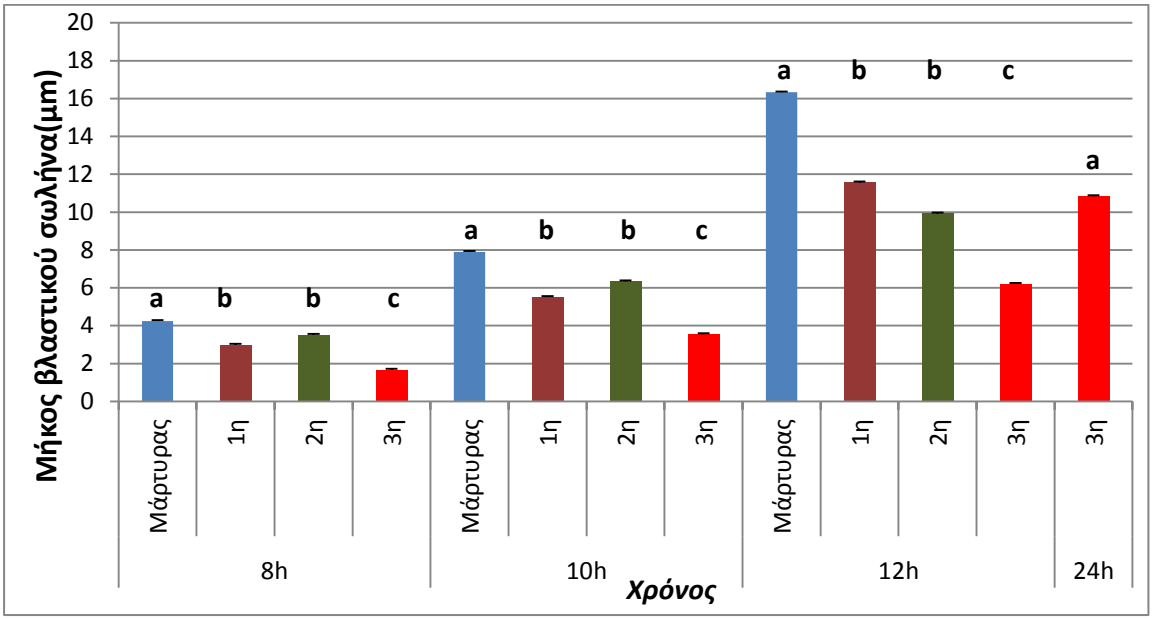
3.1.2 Πορτοκάλι

Ακολουθούν τα αποτελέσματα των *in vitro* πειραμάτων για τον μύκητα *Penicillium digitatum* που απομονώθηκε από πορτοκάλι.



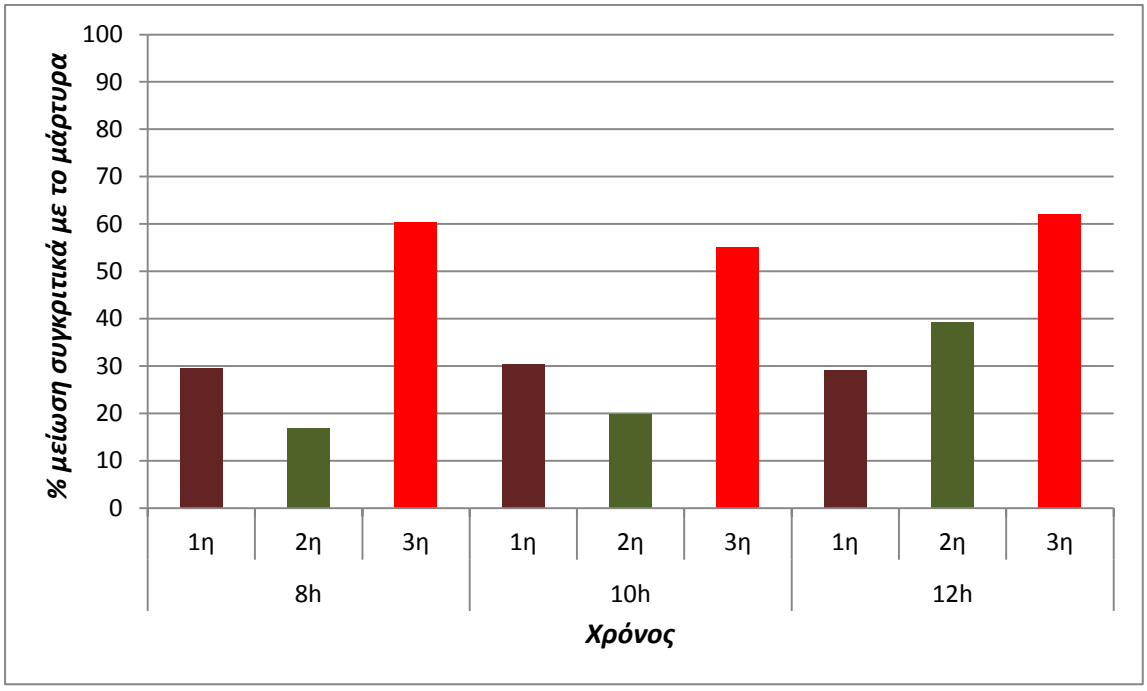
Σχήμα 3.4: *Μέτρηση ποσοστού βλαστικότητας των σπορίων του μύκητα Penicillium digitatum στις διαφορετικές συγκεντρώσεις στις 8, 10, 12 και 24 ώρες (Μ.Ο.±SD). Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (p<0.05).*

Το εκχύλισμα της *D. viscosa* προκαλεί καθυστέρηση στη βλάστηση των σπορίων του *Penicillium digitatum*, όπως προκύπτει από την μέτρηση των ποσοστών βλαστικότητας σε διάφορα χρονικά διαστήματα μετά τον εμβολιασμό. Η καθυστέρηση αυτή είναι πολύ σημαντική στην 3η συγκέντρωση, όπου το 100% βλαστικότητας επιτυγχάνεται μόνο μετά από 24 ώρες, ενώ στο μάρτυρα είχε επιτευχθεί από τις 10 πρώτες ώρες. Η 1η και 2η συγκέντρωση προκαλούν μία σημαντική υστέρηση στη βλάστηση στις 8 ώρες, η οποία συνεχίζει να εμφανίζεται στις 10 ώρες, παύει όμως εντελώς από εκεί και πέρα. Έτσι, στις 24 ώρες παρατηρείται τόσο για τον μάρτυρα όσο και για όλες τις συγκεντρώσεις της *D. viscosa* 100% βλαστικότητα.



Σχήμα 3.5: *Μέτρηση μήκους βλαστικού σωλήνα των σπορίων του μύκητα Penicillium digitatum στις διαφορετικές συγκεντρώσεις στις 8, 10, 12 και 24 ώρες (Μ.Ο.±SD). Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (p<0.005).*

Η επίδραση των διαφόρων συγκεντρώσεων του υλικού της *D. viscosa* ήταν επιβραδυντική της ανάπτυξης του βλαστικού σωλήνα του *Penicillium digitatum.* Η 1η και η 2η συγκέντρωση του υλικού οδήγησαν σε παρόμοιο μήκος βλαστικού σωλήνα μέχρι και τις 12 ώρες, ενώ η 3η συγκέντρωση διέφερε σημαντικά από όλες τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Στις 8 ώρες το μήκος του βλαστικού σωλήνα έφτασε στα 4μm για τον μάρτυρα, στα 3μm για την 1η και στα 3.5μm για τη 2η συγκέντρωση, ενώ για 3η συγκέντρωση στα 1.5 μm. Στις 10 ώρες ο βλαστικός σωλήνας του μάρτυρα ήταν 8μm, για την 1η αντιστοιχούσε σε 5.5μm, για τη 2η συγκέντρωση σε 6μm, και για την τελευταία συγκέντρωση το μήκος ήταν 3.5 μm. Στις 12 ώρες παρατηρούμε ότι το μήκος του σωλήνα του μάρτυρα ήταν 16μm, στην 1η 11 μm, τη 2η συγκέντρωση 10μm και στην 3η μόλις 6μm. Τέλος, στις 24 ώρες το μήκος του βλαστικού σωλήνα ήταν εφικτό να μετρηθεί μόνο στα σπόρια της 3ης συγκέντρωσης και ήταν 11 μm, δεν είχε φτάσει δηλαδή την τιμή που εμφάνισε ο μάρτυρας 12 ώρες πριν.

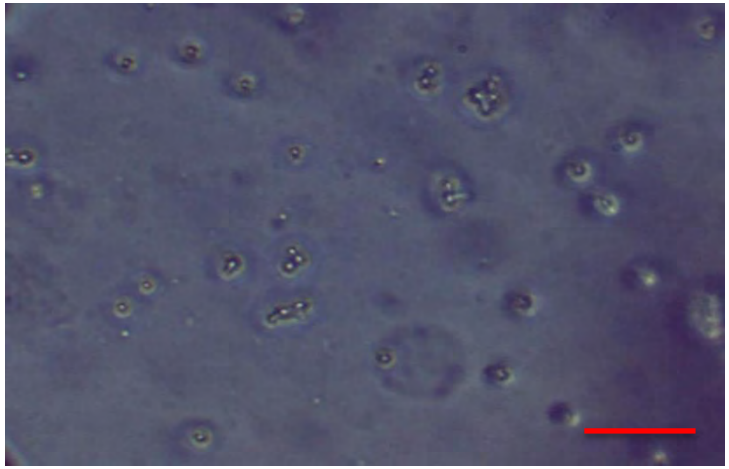


Σχήμα 3.6: *Επί τις εκατό μείωση του μήκους του βλαστικού σωλήνα των σπορίων του μύκητα Penicillium digitatum στις διαφορετικές συγκεντρώσεις στις 8, 10 και 12 ώρες.*

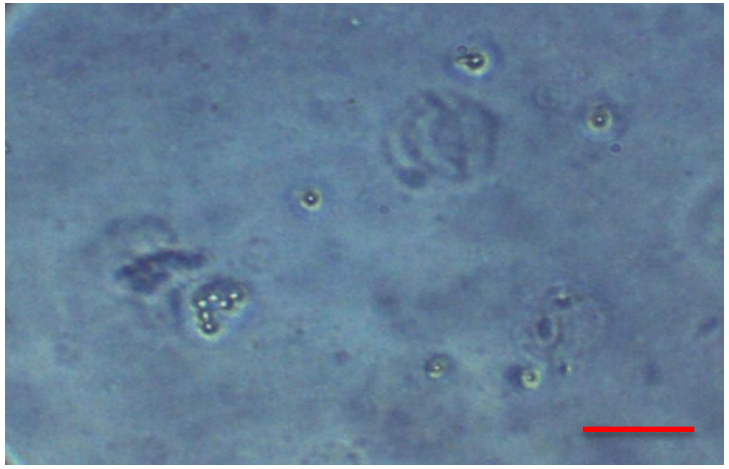
Συγκρίνοντας τις διαφορές του μήκους του βλαστικού σωλήνα μεταξύ του μάρτυρα και των συγκεντρώσεων *D. viscosa*, στις 8 ώρες η μεγαλύτερη μείωση παρατηρήθηκε στην 3η συγκέντρωση (60%), ακλούθησε η 1η με 30% και τελευταία η 2η στο 17%. Στις 10 ώρες η 3η άγγιξε το ποσοστό του 55%, η 1η παρουσίασε μείωση 30% και η 2η μόλις 20%. Τέλος, στις 12 ώρες η 3η συγκέντρωση έφτασε στο 62%, η 2η στο 39% και η μικρότερη μείωση αντιστοιχεί στην 1η συγκέντρωση με ποσοστό 29%.

Ακολουθούν ενδεικτικές φωτογραφίες των σπορίων του μύκητα *Penicillium digitatum* στις διάφορες δόσεις στις 8, 10,12 και 24 ώρες. (Οπτικό μικροσκόπιο: Nikon Labophot-2, Μεγέθυνση:200X, Κλίμακα: 20μm)

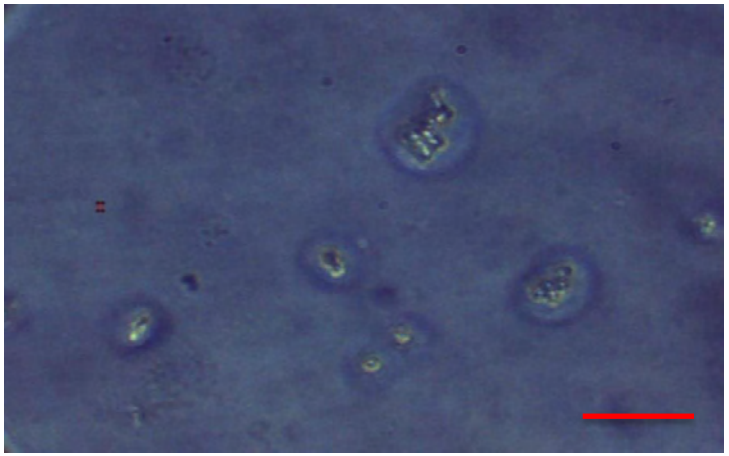
8h



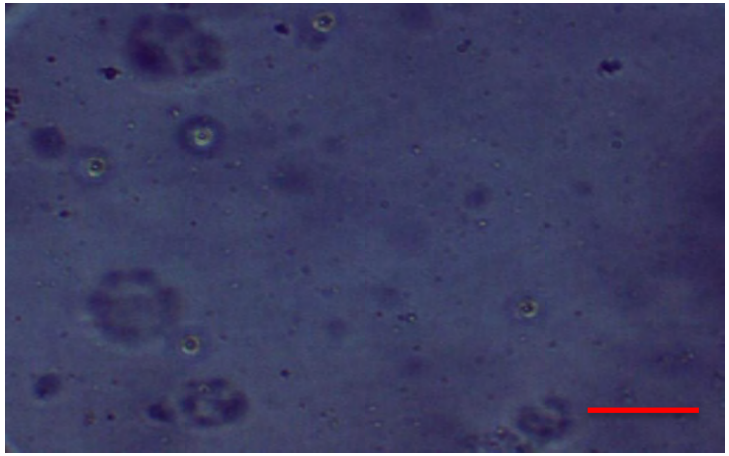
Εικόνα 3.14: *Μάρτυρας*



Εικόνα 3.15: *1η συγκέντρωση*

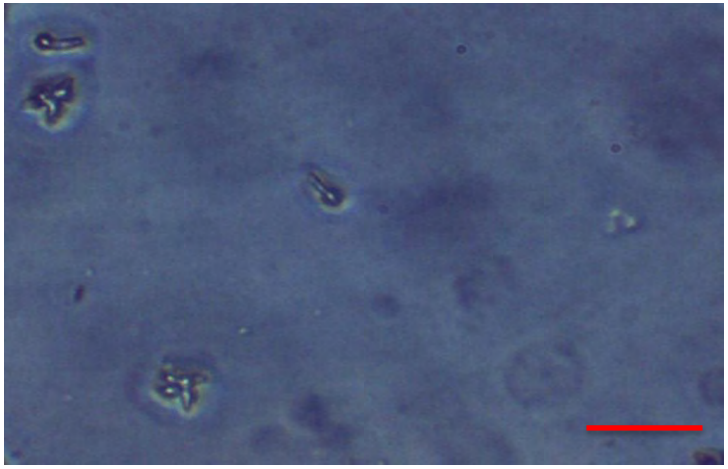


Εικόνα 3.16: *2η συγκέντρωση*

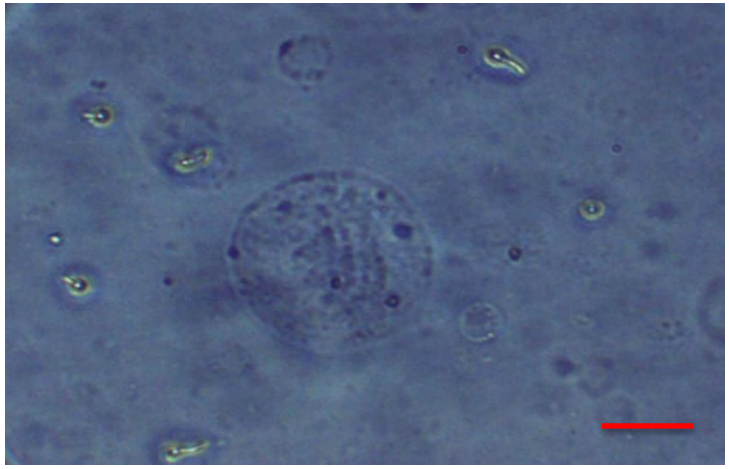


Εικόνα 3.17: *3η συγκέντρωση*

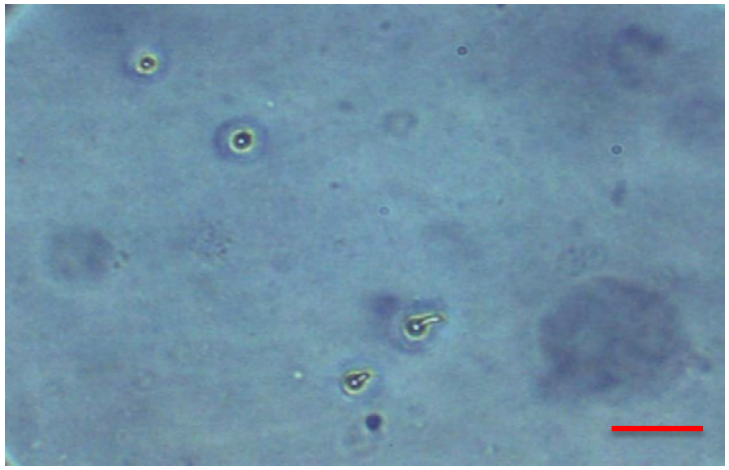
Στις 10h



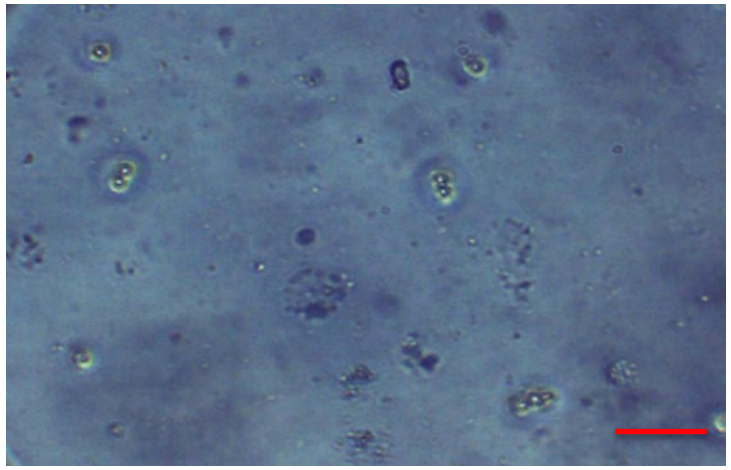
Εικόνα 3.18: *Μάρτυρας*



Εικόνα 3.19: *1η συγκέντρωση*



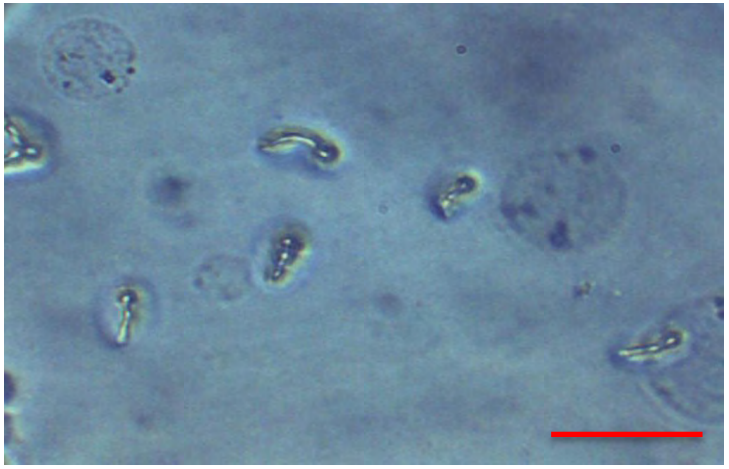
Εικόνα 3.20: *2η συγκέντρωση*



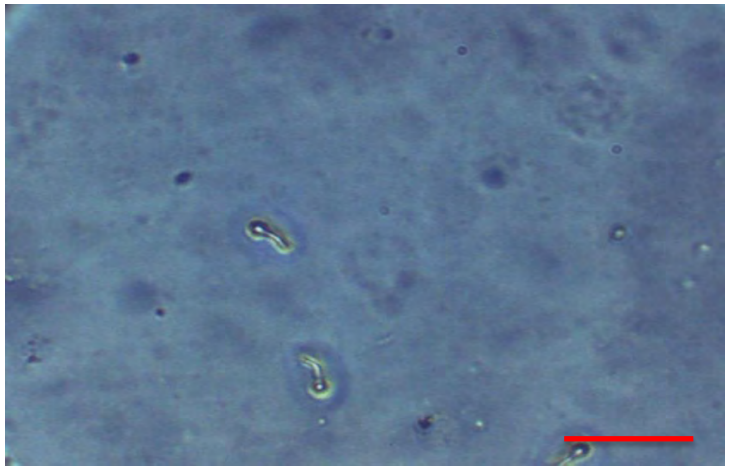
Εικόνα 3.21: *3η συγκέντρωση*

Στις 12h

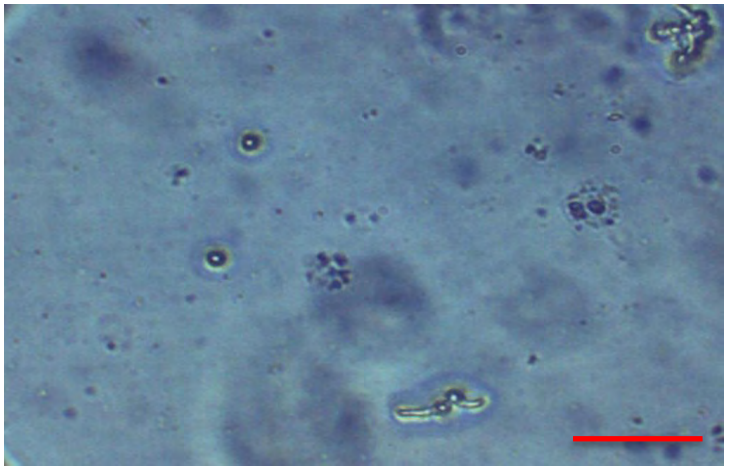
Εικόνα 3.22: *Μάρτυρας*



Εικόνα 3.23: *1η συγκέντρωση*



Εικόνα 3.24: *2η συγκέντρωση*



Εικόνα 3.25: *3η συγκέντρωση*

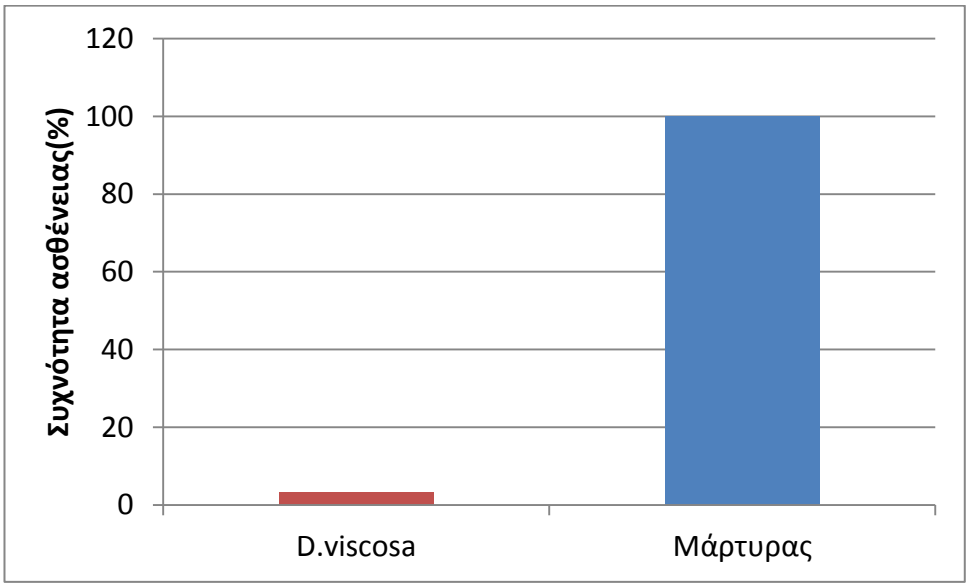
Στις 24 h

Εικόνα 3.26: *3η συγκέντρωση*

3. 2 *In vivo* δοκιμές

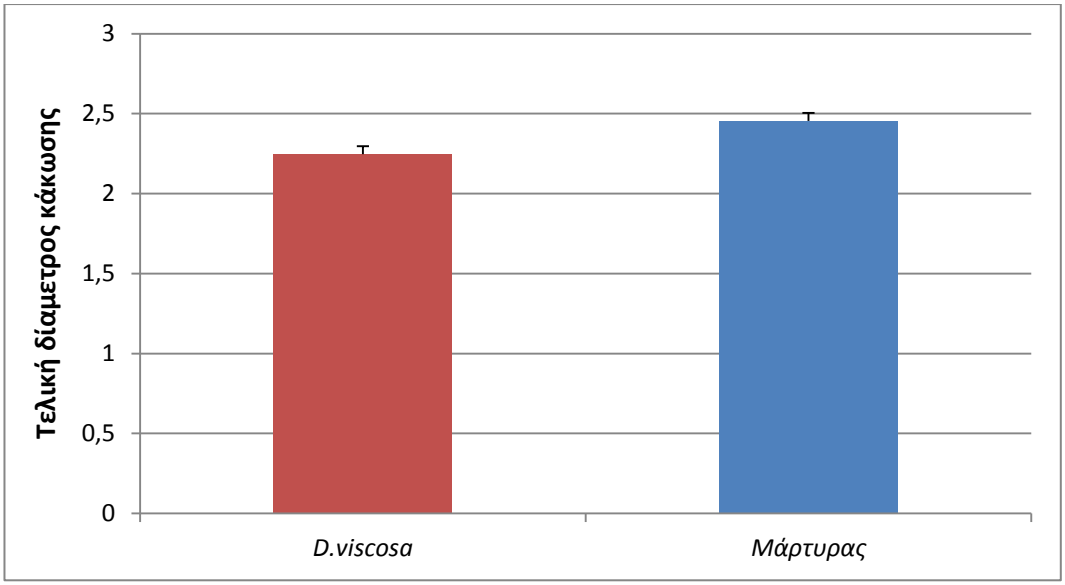
3.2.1 Πορτοκάλι

Ακολουθούν τα αποτελέσματα των *in vitro* πειραμάτων για τον μύκητα *Penicillium digitatum* που απομονώθηκε από πορτοκάλι.



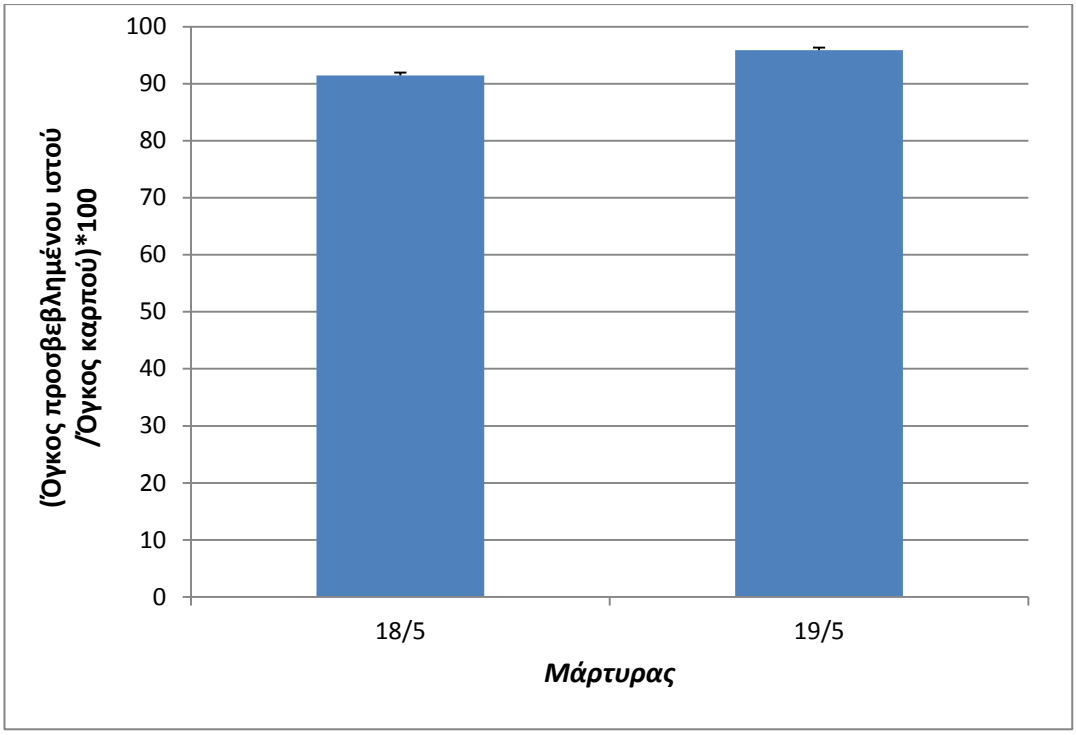
Σχήμα 3.7: *Συχνότητα ασθένειας στην μεταχείριση και στον μάρτυρα*

Όπως αναφέρθηκε στην περιγραφή του *in vivo* πειράματος στα «Υλικά και Μέθοδοι», η συχνότητα ασθένειας ορίζεται ως ο αριθμός προσβεβλημένων τεχνητών τραυμάτων προς τον συνολικό αριθμό τεχνητών τραυμάτων. Η 3η συγκέντρωση υλικού της *D. viscosa* που ήταν και η μόνη που ελέγχθηκε στο συγκεκριμένο κύκλο πειραμάτων προστάτευσε το πορτοκάλι από την ασθένεια αφού μόνο το 3% εμφάνισε προσβολή, ενώ στον μάρτυρα προσβλήθηκε το 100%.



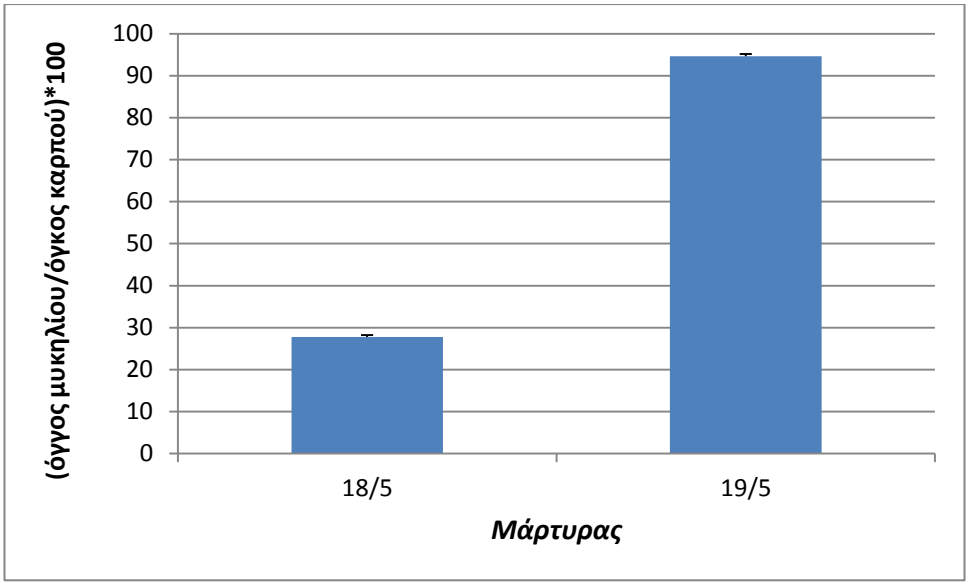
Σχήμα 3.8: *Τελική διάμετρος κάκωσης (Μ.Ο.±SD). Τα διαφορετικά γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο p<0.05.*

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.8, υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην μεταχείριση και στον μάρτυρα ως προς την τελική διάμετρο της κάκωσης, η οποία στους καρπούς της μεταχείρισης ήταν 2.25mm, ενώ αντίστοιχα για τον μάρτυρα έφτασε τα 2.45mm.



Σχήμα 3.9: *Όγκος προσβεβλημένου ιστού προς τον συνολικό όγκο του καρπού κατά τις 2 τελευταίες μέρες των μετρήσεων (Μ.Ο.±SD) στους καρπούς του μάρτυρα*

Κατά τις δύο τελευταίες μέρες των μετρήσεων οι καρποί που αποτέλεσαν τον μάρτυρα του πειράματος έφτασαν στο τελικό στάδιο της ασθένειας και ο όγκος της σήψης κατέλαβε σχεδόν το 95% του όγκου του καρπού.



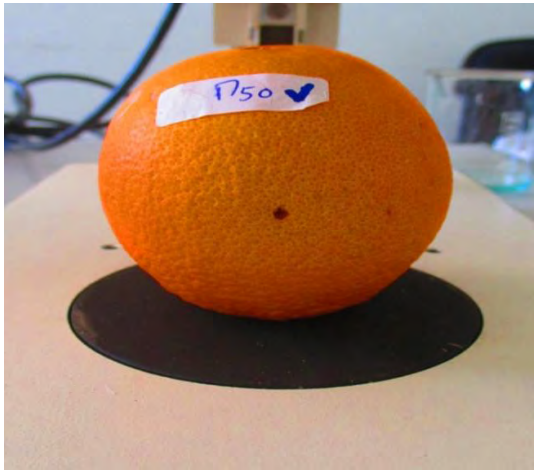
Σχήμα 3.10: *Όγκος μυκηλίου προς τον συνολικό όγκο του καρπού κατά τις 2 τελευταίες μέρες των μετρήσεων (Μ.Ο.±SD) στους καρπούς του μάρτυρα*

Κατά τις δύο τελευταίες μέρες των μετρήσεων οι καρποί που αποτέλεσαν τον μάρτυρα του πειράματος έφτασαν στο τελικό στάδιο της ασθένειας και ο όγκος του μηκυλίου κατέλαβε το 28% την προτελευταία μέρα, ενώ μία μέρα μετά σχεδόν το 95% του όγκου του καρπού.

Ακολουθούν ενδεικτικές φωτογραφίες καρπών του μάρτυρα και της μεταχείρισης στις 24 ώρες μετά την μόλυνση και την τελευταία μέρα των μετρήσεων.

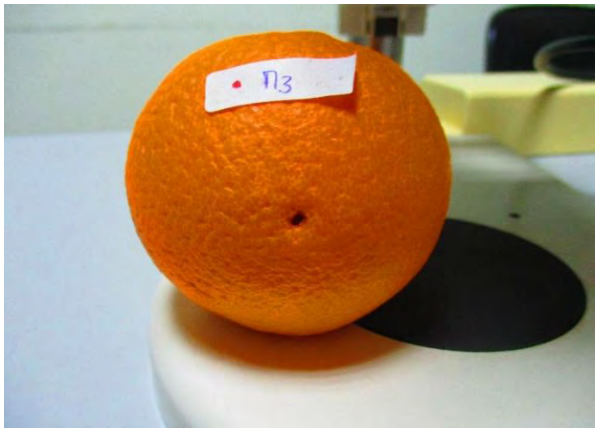
24 ώρες

Εικόνα 3.27: *Μεταχείριση*



Εικόνα 3.28: *Μάρτυρας*

Τελευταία μέρα



Εικόνα 3.29: *Μεταχείριση*

Εικόνα 3.30: *Μάρτυρας*

4. Συζήτηση

Το επιεφυμενιδικό έκκριμα της *Dittrichia viscosa* σύμφωνα με πειραματικά δεδομένα δρα ως φυτοπροστατευτικός παράγοντας έναντι αρκετών παθογόνων μικροοργανισμών. Η δράση του ως παρεμποδιστής ανάπτυξης έχει εξεταστεί σε βακτήρια και μύκητες ύψιστης γεωργικής σημασίας. Η εφαρμογή του έχει γίνει χρησιμοποιώντας ως διαλύτες είτε το νερό είτε το χλωροφόρμιο, με το τελευταίο να παρουσιάζει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα. Συγκεκριμένα, στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές για τη χρήση του εκκρίματος του εξεταζόμενου φυτού στους εξής φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς:

- **Βακτήρια**: *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus, Erwinia amylovora, Pseudomonas syringae pv. garcae, Pseudomonas syringae subsp. savastanoi, Pseudomonas syringae pv. Syringae, Xanthomonas campestris pv. Pelargonii*
- **Μύκητες**: *Sclerotinia sclerotiorum, Ustilago maydis, Penicillium italicum*

Στην παρούσα πτυχιακή διατριβή ελέγχθηκε η αντιμυκητιακή δράση του επιεφυμενιδικού υλικού της *D. viscosa* στο μύκητα *Penicillium digitatum*, ο οποίος προκαλεί πράσινη σήψη ,μετασυλλεκτικά στους καρπούς των δέντρων του γένους Citrus, και απομονώθηκε από πορτοκάλι και του *Penicillium* sp. που προκαλεί ενδοσήψη και απομονώθηκε από ρόδι. Και οι δύο μύκητες δεν έχουν εξεταστεί στο παρελθόν. Να σημειωθεί ότι τα πειράματα διεξήχθησαν με τη χρήση υδατικών εκπλυμάτων του επιεφυμενιδικού υλικού.

<u>*In vitro* δοκιμές</u>

Σε ότι αφορά το μύκητα *Penicillium* sp. που απομονώθηκε από το ρόδι, το επιεφυμενιδικό υδατικό διάλυμα προκάλεσε:

i) ισχυρή παρεμπόδιση της βλάστησης των σπορίων κατά τις πρώτες ώρες από τον εμβολιασμό. Στις 8 πρώτες ώρες το ποσοστό βλαστικότητας των σπορίων κυμάνθηκε για το μάρτυρα στο 43% και στη μέγιστη συγκέντρωση υλικού έφτασε μόλις 9,3%. Μάλιστα, ακόμη και 24 ώρες μετά παρουσία της μέγιστης συγκέντρωσης του υλικού, η βλαστικότητα περιορίστηκε στο 60%.

ii) συνολική καθυστέρηση της βλάστησης κατά αρκετές ώρες, ιδιαίτερα από την μέγιστη συγκέντρωση υλικού και

iii) πολύ σημαντική μείωση του μήκους του βλαστικού σωλήνα για όσα σπόρια βλάστησαν. Στις 8 ώρες καταγράφηκε 33% μείωση σε σχέση με το μάρτυρα στη μέγιστη δόση, ενώ στις 12 ώρες από τον εμβολιασμό η αντίστοιχη μείωση έφτασε το 81%.

Να σημειωθεί εδώ ότι οι τρεις συγκεντρώσεις του επιεφυμενιδικού υλικού που αποτέλεσαν τις διαφορετικές μεταχειρίσεις είχαν διαφορικό αποτέλεσμα σε όλες τις παραμέτρους που μετρήθηκαν, με τη χαμηλότερη συγκέντρωση να εμφανίζει και την μικρότερη επίδραση. Αντιθέτως, η 6-πλάσια της φυσικής συγκέντρωση εμφάνισε ισχυρή παρεμποδιστική δράση σε όλες τις παραμέτρους της ανάπτυξης του μύκητα.

Ανάλογα με τα παραπάνω ήταν και τα αποτελέσματα των *in vitro* δοκιμών για το *Penicillium digitatum*. Καταδεικνύουν μία σημαντική αρνητική δράση του επιεφυμενιδικού υλικού, η οποία εμφάνισε μία δοσο-εξαρτώμενη κλιμάκωση και είχε τρεις συνιστώσες:

i) έντονη μείωση του ποσοστού βλάστησης των σπορίων στις 8 πρώτες ώρες, σε σχέση με το μάρτυρα (μάρτυρας: 59% και μέγιστη συγκέντρωση υλικού: 1%). Στις δύο χαμηλότερες συγκεντρώσεις του υλικού, το 100% των σπορίων βλάστησαν μετά από 12 ώρες, ενώ στη μέγιστη συγκέντρωση υλικού το ποσοστό αυτό επετεύχθη μετά από 24 ώρες.

ii) συνολική καθυστέρηση της βλάστησης κατά αρκετές ώρες, ιδιαίτερα από την μέγιστη συγκέντρωση υλικού, όπως προκύπτει από τα προαναφερθέντα,

iii) πολύ σημαντική μείωση του μήκους του βλαστικού σωλήνα για τα σπόρια που βλάστησαν. Ακόμη και οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις του υλικού προκάλεσαν σημαντικά μειωμένο βλαστικό σωλήνα μέχρι και τις 12 ώρες. Τα σπόρια που βλάστησαν παρουσία της μέγιστης δόσης εμφάνισαν μία σταθερή μείωση του μήκους του βλαστικού

σωλήνα της τάξης του 60% από την αρχή (8 ώρες) μέχρι και τις 24 ώρες που επεκτάθηκαν οι μετρήσεις.

Σε μία ανάλογη μελέτη (Σταυριανάκου, 2009) για την έκπλυση του επιεφυμενιδικού υλικού της *Dittrichia viscosa* χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης α) χλωροφόρμιο, β) νερό, καθώς επίσης γ) πραγματοποιήθηκε και λυοφιλίωση του υδατικού εκπλύματος. Σε διάφορα είδη βακτηρίων και μυκήτων παρασχέθηκαν συγκεντρώσεις υλικού παρόμοιες με την παρούσα μελέτη. Η δράση του εκχυλίσματος εναντίον των παθογόνων μικροοργανισμών φάνηκε να εξαρτάται από το είδος αυτών, τον τρόπο εκχύλισης και εφαρμογής αλλά και από την εφαρμοζόμενη συγκέντρωση του υλικού. Το χλωροφορμικό διάλυμα αποδείχθηκε πιο αποτελεσματικό, καθώς διαλύει περισσότερες οργανικές ουσίες που υπάρχουν στο φυτικό ιστό. Εντούτοις, οι συγκρίσεις που θα συζητηθούν παρακάτω αφορούν το λυοφιλιωμένο υλικό που αποτελεί τον κοινό παράγοντα των δύο εργασιών. Σε πλήρη συμφωνία με τα δικά μας αποτελέσματα, η Σταυριανάκου (2009) κατέγραψε παρεμπόδιση σε διάφορες παραμέτρους της ανάπτυξης των μελετώμενων μυκήτων, ισχυρότερη για την υψηλότερη συγκέντρωση υλικού (6x της φυσικής συγκέντρωσης). Πράγματι, η παρεμπόδιση της μυκηλιακής ανάπτυξης βρέθηκε να είναι άνω του 80% για το μύκητα *Botrytis cinerea*, ενώ ένα παρόμοιο ποσοστό του 75% καταγράφηκε για τον *Sclerotinia sclerotiorum* και περίπου 50% για το *Fusarium sp*. Σε ότι αφορά τη βλαστικότητα των σπορίων των προαναφερθέντων μυκήτων, σε αντίθεση με τα δικά μας αποτελέσματα φάνηκε μία προωθητική δράση για τον *Botrytis cinerea* σε χαμηλές συγκεντρώσεις του επιεφυμενιδικού υλικού. Βέβαια στη μέγιστη συγκέντρωση παρατηρήθηκε αναστολή της τάξης του 45%. Επίσης, ενδιαφέρον είχε η μηδενική επίδραση των χαμηλών συγκεντρώσεων του υλικού στη βλαστικότητα του *Fusarium sp.* ενώ παρουσιάστηκε πλήρης παρεμπόδιση στη συγκέντρωση 6x.

Παρόμοιο πείραμα πραγματοποιήθηκε από τους Askarne et al. 2012, οι οποίοι αφού αποξήραναν το υπέργειο τμήμα του φυτού *Dittrichia viscosa* και στη συνέχεια το κορνιορτοποίησαν, ενσωμάτωσαν την παραγόμενη σκόνη στο θρεπτικό υπόστρωμα. Επικεντρώθηκαν στην καταγραφή της μυκηλιακής ανάπτυξης και του ποσοστού βλάστησης σπορίων για το *Penicillium italicum*.

Τα αποτελέσματα κατέδειξαν παρεμποδιστική δράση του υλικού στη μυκηλιακή ανάπτυξη (παρεμπόδιση>75%). Τέλος, η βλάστηση σπορίων επηρεάσθηκε ελάχιστα από την παρουσία του υδατικού διαλύματος της *D. viscosa*, αποτέλεσμα αντίθετο με τα αντίστοιχα που καταγράφηκαν στην παρούσα μελέτη, ιδιαίτερα για το *Penicillium sp*. που απομονώθηκε από το ρόδι.

In vivo δοκιμές

Στις *in vivo* δοκιμές στην παρούσα εργασία, το έκπλυμα της *D. viscosa* εφαρμόστηκε στην 6-πλάσια συγκέντρωση της δόσης προσομοίωσης. Το πρωταρχικό αποτέλεσμα του πειράματος ήταν ότι το έκπλυμα προστάτευσε τα πορτοκάλια από την ασθένεια: ενώ το 100% των καρπών-μαρτύρων εμφάνισε πράσινη σήψη, η οποία σε 19 ημέρες είχε καταλάβει το σύνολο σχεδόν του όγκου του καρπού, με την εφαρμογή της *D. viscosa*, ασθένεια εμφανίστηκε σε έναν μόνο καρπό επί συνόλου 30 (όλων των επαναλήψεων). Τα επιμέρους αποτελέσματα συνοπτικά είναι:

i) Η συχνότητα της ασθένειας στην μεταχείριση άγγιζε μόνο το 3,3%, ενώ στον μάρτυρα έφτασε το 100%.

ii) Στο προαναφερθέν 3,3% που εμφάνισε την ασθένεια, το μέγεθος της κάκωσης δεν διέφερε σημαντικά από το μάρτυρα: η διαφορά των τελικών διαστάσεων των κακώσεων ήταν 8,5%.

iii) Στους καρπούς-μάρτυρες, ο τελικός όγκος που κατέλαβε η σήψη επί του συνολικού όγκου του καρπού έφτασε στο 95,9%, ενώ ο τελικός όγκος που κατέλαβε η μυκηλιακή ανάπτυξη επί του συνολικού όγκου του καρπού ήταν 94,6%.

iv) Στους καρπούς που υπέστησαν μεταχείριση με το επιεφυμενιδικό υλικό και παρέμειναν «υγιείς» εμφανίστηκε ένας καφέ μεταχρωματισμός γύρω από την πληγή. Μετά το τέλος τους πειράματος, οι καρποί αυτοί κόπηκαν στο μεσημβρινό της πληγής και φάνηκε ότι το εσωτερικό του καρπού, τόσο στο ύψος της πληγής, όσο και συνολικά παρέμεινε άθικτο.

v) Μετά το τέλος του πειράματος, ενδεικτικά 10 πορτοκάλια που έφεραν την πληγή και είχαν εμβαπτιστεί στο διάλυμα τοποθετήθηκαν για 10 μέρες σε σακουλάκια με καρπούς-μάρτυρες σε πλήρη σήψη. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το ποσοστό προσβολής έφτασε μόλις στο 40 % (4/10).

Η επίδραση του λυοφιλιώμενου υδατικού εκπλύματος της *Dittrichia viscosa* έχει ελεγχθεί *in vivo* για τον μύκητα *Botrytis cinera* (Σταυριανάκου 2009), προσβάλλοντας το φυτό *Cucumis sativus* στα αναπτυξιακά στάδια των κοτυληδόνων και των καρπών. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν σημαντική παρεμποδιστική δράση της μεταχείρισης σε σχέση με τον μάρτυρα καθώς υπήρξε πλήρης αποτροπή της προσβολής, συμφωνώντας με τα αντίστοιχα της παρούσας εργασίας.

Τέλος, η αποτελεσματικότητα του επιεφυμενιδικού εκπλύματος της *D. viscosa* δοκιμάστηκε *in vivo* και στον μύκητα *Penicillium italicum*, προσβάλλοντας καρπούς πορτοκαλιού (*Citrus reticulata Blanco*) ποικιλίας Valencia-late και αποθηκεύοντας τα για 10 μέρες σε θάλαμο ψυγείο 20 ^{o}C (Askarne et al.2012). Το υδατικό διάλυμα του φυτού προστάτευσε το πορτοκάλι από την κυανή σήψη καθώς η συχνότητα της ασθένειας κυμάνθηκε στο 5-25%, ενώ στον μάρτυρα έφτασε το 98%. Το ποσοστό εμφάνισης της ασθένειας ήταν σημαντικά μεγαλύτερο από το αντίστοιχο της παρούσας μελέτης, κάτι που μπορεί να αποδοθεί σε διαφορές τόσο στο είδος του μύκητα, όσο και στον τρόπο παρασκευής του φυτικού εκχυλίσματος. Το γεγονός αυτό ενισχύει τις υπάρχουσες ενδείξεις για ειδο-ειδικότητα στο στόχο και στη δραστικότητα του επιεπφυμενιδικού υλικού της *Dittrichia viscosa.*

5. Συμπεράσματα

Το λυοφιλιωμένο έκπλυμα του φυτού *Dittrichia viscosa* μπορεί να αποτελέσει σημαντικό παράγοντα φυτοπροστασίας, όπως προέκυψε από τον *in vitro* και *in vivo* έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης του έναντι των δύο ειδών του Penicillium που προκαλούν σοβαρές μετασυλλεκτικές ασθένειες.

Συγκεκριμένα, στις *in vitro* δοκιμές η μέγιστη συγκέντρωση υλικού (6x της φυσικής συγκέντρωσης επί του φυτού) προκάλεσε σημαντική καθυστέρηση στην βλάστηση των σπορίων και επίσης σημαντική μείωση του μήκους του βλαστικού σωλήνα και στις δύο περιπτώσεις μυκήτων.

Όσον αφορά τις *in vivo* δοκιμές για τον μύκητα *Penicillium digitatum*, φάνηκε ότι η μέγιστη συγκέντρωση υλικού μπορεί να προστατεύσει τον καρπό του πορτοκαλιού από την εμφάνιση της ασθένειας.

Όλα τα παραπάνω δείχνουν ότι το επιεφυμενιδικό έκλυμα αποτελεί ισχυρό αντιμικροβιακό παράγοντα δίχως να προκαλεί κάποιου είδους φυτοτοξικότητας. Επομένως, είναι ισχυρές πλέον οι ενδείξεις ότι η *Dittrichia viscosa* μπορεί να αποτελέσει μία φυσική λύση στο τεράστιο πρόβλημα που προκαλούν τα δύο συγκεκριμένα είδη του Penicillium, μειώνοντας έτσι τις μετασυλλεκτικές απώλειες και προστατεύοντας την ποιότητα του τελικού προϊόντος.

6. Βιβλιογραφία

Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

Askarne, L., Talibi, I., Boubaker, H., Boudyach, E.H., Msanda, F., Saadi, B., Serghini, M.A., Ait Ben Aoumar , A.(2012). In vitro and in vivo antifungal activity of several Moroccan plants against *Penicillium italicum*, the causal agent of citrus blue mold. In: Elsevier, L. (ed.), *Crop Protection,* Vol 40 , pp. 53-58

Baydar, H., Curel, F.(1998). The pollen collection activity and preference of honey bees (*Apis mellifera*) in the natural habitant of Antalya and some morphological and quality properties of different pollen types [Antalya dogal florasinda bal arisi (*Apis mellifera*) nin polen toplama aktivitesi,polen terccihi ve farkli polen tiplerinin morfolojik ve kalite ozellikleri]. *Turkish Journal of Agriculture and Foresty,* 22:475-482

Campos, J.A., Herrera, M., Biurrun, I., Loidi, J.(2004). The role of alien plants in the natural coastal vegetation in central-northern Spain. *Biodiversity and Conservation*, 13:2275-2293

Fernandez, R., Bertrand, A., Casares, A., Garcia, R., Gonzalez, A., Tames, R.S.(2008). Cadmium accumulation and its effect on the in vitro growth of woody fleabane and mycorrhized white birch. *Environmental Pollution*, 152:522-529

Field, B., Jordan, F., Osbourn, A.(2006). First encounters-deployment of defence-related natural products by plants. *New Phytologist*, 172:193-207

Grierson, A.J.C.(1975). Inula L., In: *Flora of Turkey and the East Aegean Islands,* Vol. 5 (Davis,P.H. eds.). Edinburgh: Edinburgh University Press, pp. 54-73

Jorda, C., Font, I., Martinez, P.(2001). Current status and new natural hosts of Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV) in Spain. *Plant Disease*, 85:445-445

Karageorgou, P., Levizou, E., Manetas, Y.(2002). The influence of drought, shade and availability of mineral nutrients on exudate phenolics of *Dittrichia viscosa. Flora*, 197:285-289

Lev, E., Amar, Z.(2000). Ethnopharmacological survey of traditional drugs sold in Israel at the end of the 20th century. *Journal of Ethnopharmacology*, 72:191-205

Lykouressis, D., Perdikis, D., Tsagarakis, A.(2000). Polyphagous mirids in Greece: Host plants and abundance in traps placed in some crops. *Bollettino del Laboratorio di Entomologia Agraria Filippo Silverstri*, 56:57-68

Murciego Murciego, A., Garcia Sanchez, A., Rodriguez Gonzalez, M.A., Pinilla Gill, E., Toro Gordillo,C., Cabezas Fernadez, J., Buyolo Triguero, T.(2007). Antimony distribution and mobility in topsoils and plants (*Cyticus striatus,Cistus ladanifer and Dittrichia viscosa*) from polluted Sb-mining areas in Extremadura(Spain). *Environmental Pollution*, 145:15-21

Nikolakaki, A., Christodoulakis,N.S.(2004). Leaf structure and cytochemical investigation of secretory tissues in Inula viscosa. *Botanical journal of the Linnean Society,* 144:437-448

Nogales, R., Benitez, E.(2006). Absorbition of zinc and lead by *Dittrichia viscosa* grown in a contaminated soil amended with olive-derived wastes. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 76:538-544

Perez-Fernadez, M.A., Calvo-Magro, E., Ferrer-Castan, D.(2006). Simulation of germination of pioneer species along an experimental drought gradient. *Journal of Environmental Biology*, 27:679-685

Perez-Fernadez, M.A., Rodriguez-Echeverria, S., Calvo-Magro, E., David-Antonio,C.(2003). Germination of selected perennial plant species from western Spain undernitrogen,light and wet and dry heat treatments. *Journal of Mediterranean Ecology,* 4:23-33

Qasem, J.R., Al-Abed, A.S., Abu-Blan, H.A.(1995). Antifungal activity of clammy Inula (Inula viscosa) on Helminthosporium sativum and Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici. *Phytopathology Mediterranea*, 34:7-14

Stavrianakou, S., Liakopoulos, G., Karabourniotis, G.(2006). Boron deficiency effects on growth, photosynthesis and relative concentrations of phenolics of *Dittrichia viscosa* (Asteraceae). *Environmental and Experimental Botany*, 56:293-300

Stephanou, M., Manetas, Y.(1997a). Seasonal variations in UV-B absorbing capacity and allelopathic potential of Dittrichia viscosa leaf rinsates. *Canadian Journal of Botany,* 75:1371-1374

Stephanou, M., Manetas, Y.(1997b). Ultraviolet-b radiation effects on the Mediterranean ruderal *Dittrichia viscosa*. *Plant Ecology*, 128:109-112

Swaileh, K.M., Hussein, R.M., Abu-Elhaj, S.(2004).Assesment of heavy metal contamination in roadside surface soil and vegetation from the West Bank. *Archives of Enviromental Contamination and Toxicology*, 47:23-30

Ward, D., Lubin, Y.(1992). Temporal and spatial segregation of web-building in a community of orb-weaving spiders. *The Journal of Arachnology*, 20:73-78

Wang, B., Qiu, Y.-L.(2006). Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plant. *Mycorrhiza*, 16:299-363

Werker, E.(2000). Trichome diversity and development, In: *Advances in Botanical Research*, Vol.31 – Plant Trichomes (D.L. Hallahan,J.C. Gray eds.). London: Academic Press, pp.1-35

Wollenweber, E., Dietz, V.H.(1981). Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants. *Phytochemistry*, 20:869-932

Yaniv, Z., Dafni, A., Friedman, J., Palevitch, D.(1987). Plants used for the treatment of diabetes in Israel. *Journal of Ethnopharmacology*, 19:145-151

Ελληνική Βιβλιογραφία

Καββαδάς, Δ.Σ.(1956). Εικονογραφημένον Βοτανικόν Λεξικόν. Αθήνα, Εκδόσεις Γ.Π.Ξένου ,σελ.45-84

Σταυριανάκου, Σ.-Β.(2009). Χημική Σύσταση του επιεφυμενιδικού εκκρίματος του φυτού *Dittrichia viscosa* και αξιολόγηση του φυτοπροστατευτικού δυναμικού του έναντι παθογόνων μικροοργανισμών (Διδακτορική διατριβή). Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Παναγόπουλος, Χ.Γ (2007). Ασθένειες Καρποφόρων Δένδρων και Αμπέλου. Αθήνα, Εκδόσεις Αθ.Σταμούλη ,σελ.335-337

Βασιλακάκης, Μ.(2004).Γενική και Ειδική Δενδροκομία. Θεσσαλονίκη, Εκδόσεις Δ.Γαρταγάνη ,σελ.697-699