



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών



ΜΠΕΝΑΚΕΙΟ
ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ & ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

**ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ
ΡΟΔΑΚΙΝΟΥ, ΡΟΔΙΟΥ & ΕΥΛΩΝ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΚΑΛΛΥ-
ΝΤΙΚΩΝ & ΣΤΗ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ**
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



ΠΗΝΕΛΟΠΗ ΒΛΑΧΟΥ
ΓΕΩΠΟΝΟΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ
ΑΘΗΝΑ, ΙΟΥΝΙΟΣ 2016

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Φαρμακευτική Σχολή

Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα:

Απομόνωση- Ανάπτυξη- Παραγωγή και Έλεγχος Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων

Τίτλος Εργασίας:

« Αξιοποίηση παραπροϊόντων από την επεξεργασία ροδάκινου, ροδιού & ξύλων στη βιομηχανία καλλυντικών & στη φυτοπροστασία »

Φοιτήτρια:

Πηνελόπη Βλάχου

Γεωπόνος- Βιοτεχνολόγος

A.M.: 1302-12

Επιβλέπων Καθηγητής:

Επίκουρος Καθηγητής κ. Νικόλας Φωκιαλάκης

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Καθηγητής κ. Αλέξιος-Λέανδρος Σκαλτσούνης

Αναπληρωτής Καθηγητής κ. Νεκτάριος Αληγιάννης

Επίκουρος Καθηγητής κ. Νικόλας Φωκιαλάκης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, του τμήματος Φαρμακευτικής Αθηνών, ενώ ένα μέρος των βιολογικών δοκιμών έγινε σε συνεργασία με τον Τομέα Βακτηριολογίας και τον Τομέα Μυκητολογίας του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου. Με την ολοκλήρωση της διετούς αυτής πορείας θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά:

- ❖ Τα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, το Διευθυντή του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Καθηγητή κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Νεκτάριο Αληγιάννη και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Νικόλα Φωκιαλάκη, οι οποίοι δέχτηκαν να κρίνουν την παρούσα διπλωματική εργασία.
- ❖ Τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Νικόλα Φωκιαλάκη για την εξαιρετική συνεργασία μας, τη συνεχή επίβλεψη και την ακούραστη καθοδήγηση σε όλη τη διάρκεια των δυο αυτών ετών. Θέλω επίσης να τον ευχαριστήσω για την υπομονή, την κατανόηση, την αμέριστη συμπαράσταση, αλλά και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, αφήνοντάς μου χώρο να αναπτύσσω πρωτοβουλίες.
- ❖ Τη Δρ. κ. Μαρία Χολέβα, υπεύθυνη του Τομέα Βακτηριολογίας του Μ.Φ.Ι., για τη συνεχή καθοδήγηση, τη βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές της.
- ❖ Τη Δρ. κ. Αιμιλία Μαρκέλλου, για την ευγενική χορηγία των στελεχών του φυτοπαθογόνου μικροοργανισμού, την καθοδήγηση, αλλά και την προθυμία της να έρθει στο χώρο της Φαρμακογνωσίας, προκειμένου να με βοηθήσει στη διεξαγωγή των βιοδοκιμών.
- ❖ Το Δρ. Νικόλαο Τσαφαντάκη για τη βοήθειά του στη λήψη και την επεξεργασία φασμάτων, την καθοδήγηση στο φυτοχημικό μέρος της εργασίας, την υπομονή του και τις πολύτιμες συμβουλές του.
- ❖ Τη Δρ. κ. Αικατερίνη Τερμεντζή για τη λήψη φασμάτων LC-HRMS και μάζας και τη βοήθειά της στην επεξεργασία των φασμάτων αυτών. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Δρ. Νικόλαο Λεμονάκη, τη Δρ. Ειρήνη Μπαϊρά και Dr.Vincent Briudes για τη λήψη φασμάτων LC-HRMS και μάζας.
- ❖ Τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Κατερίνα Γεωργουσάκη για τη βοήθειά της στη διεξαγωγή μέρους των βιοδοκιμών.
- ❖ Όλους τους μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς φοιτητές στο εργαστήριο για την υποδοχή τους, τη βοήθεια τους και το κλίμα συνεργασίας που αναπτύχθηκε και φυσικά τους φίλους μου για τη στήριξή τους.
- ❖ Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, τους γονείς, την αδερφή μου και το Φάνη, χωρίς την αγάπη και τη στήριξη των οποίων τίποτα από όλα αυτά που έχω καταφέρει δε θα ήταν δυνατό.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	11
SUMMARY.....	13
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	15
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ, ΕΙΚΟΝΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	16
Πίνακες.....	16
Εικόνες	17
Διαγράμματα.....	21
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	22
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	23
A.1 ΓΕΝΙΚΑ.....	25
A.1.1 Αγρο-βιομηχανικά παραπροϊόντα και απόβλητα.....	25
A.1.2. Χρήση αγρο-βιομηχανικών παραπροϊόντων στη βιομηχανία αγροχημικών.....	26
A.1.3. Χρήση αγρο-βιομηχανικών παραπροϊόντων στη βιομηχανία καλλυντικών	27
A.2. <i>Prunus persica</i> (L.).....	27
A.2.1. Βοτανική Ταξινόμηση	28
A.2.2. Περιγραφή-Βοτανικά Χαρακτηριστικά.....	28
A.2.3. Γενικά στοιχεία - Χρήσεις.....	28
A.2.4. Δευτερογενείς μεταβολίτες του <i>Prunus persica</i>	29
A.2.5. Βιολογικές δράσεις.....	36
A.3. <i>Punica granatum</i> L.....	38
A.3.1. Βοτανική Ταξινόμηση	38
A.3.2. Περιγραφή-Βοτανικά Χαρακτηριστικά.....	38
A.3.3. Γενικά στοιχεία - Χρήσεις.....	39
A.3.5. Βιολογικές δράσεις.....	48
A.3.5.1. Παραδοσιακές χρήσεις.....	48
A.3.5.2. Φαρμακολογικές δράσεις	48
A.3.5.3. Φυτοπροστατευτικές δράσεις.....	52
A.4. <i>Eucalyptus globulus</i>	54
A.4.1. Βοτανική Ταξινόμηση	54
A.4.2. Περιγραφή-Βοτανικά Χαρακτηριστικά.....	54

A.4.3. Γεωγραφική Εξάπλωση	55
A.4.4. Χημική σύσταση.....	55
A.4.5. Ειδικές Χρήσεις	57
A.4.6. Φαρμακευτικές χρήσεις	58
A.4.7. Παρενέργειες	59
A.5. Γένος <i>Pinus</i>	60
A.5.1. <i>Pinus nigra</i>	61
A.5.1.1 Βοτανική Ταξινόμηση.....	61
A.5.1.2. Περιγραφή-Βοτανικά Χαρακτηριστικά.....	61
A.5.1.3. Γεωγραφική Εξάπλωση.....	62
A.5.1.4. Χρήσεις.....	62
A.5.1.5. Χημική σύσταση φλοιού	63
A.5.2. <i>Pinus heldreichii</i>	64
A.5.2.1. Βοτανική ταξινόμηση.....	64
A.5.2.2. Περιγραφή-Βοτανικά Χαρακτηριστικά.....	64
A.5.2.3. Γεωγραφική Εξάπλωση.....	65
A.5.2.4. Χρήσεις.....	66
A.5.2.5. Προστασία και διατήρηση του είδους.....	66
A.6. Φυτοπαθογόνα βακτήρια.....	67
A.6.1. Γένος <i>Acidovorax</i>	67
A.6.1.1. <i>Acidovorax citrulli</i> Willems et al. 1992.....	67
A.6.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	68
A.6.3. Γένος <i>Erwinia</i>	69
A.6.3.1. <i>E. carotovora</i> pv. <i>atroseptica</i> - <i>E. carotovora</i> pv. <i>carotovora</i> - <i>E. chrysanthemi</i>	69
A.6.4. Γένος <i>Pseudomonas</i>	70
A.6.4.1. <i>Pseudomonas cichorii</i> (Stapp, 1928)	71
A.6.4.2. <i>Pseudomonas corrugata</i>	72
A.6.4.3. <i>Pseudomonas savastanoi</i>	72
A.6.4.4. <i>Pseudomonas syringae</i>	73
A.6.4.5. <i>Pseudomonas tolaasii</i> (Paine 1919)	74
A.6.4.6. <i>Pseudomonas viridiflava</i> (Burkholder 1930) Dowson 1939.....	75
A.6.5. Γένος <i>Xanthomonas</i>	76
A.6.5.1. <i>Xanthomonas campestris</i>	76
A.7. Φυτοπαθογόνοι μύκητες.....	79

A.7.1. Γένος <i>Phytophthora</i>	79
A.7.2. <i>P. nicotianae</i> Breda de Haan	79
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	82
B.1. Παρασκευή δειγμάτων	84
B.1.1. Εκχύλιση με Υπέρηχους (UAE).....	84
B.1.2. Υδροαπόσταξη με Μικροκύματα (MAHD)	84
B.2. Βιοδοκιμές	85
B.2.1. Μελέτη Αντιοξειδωτικής Δράσης.....	85
B.2.1.1. Μέθοδος DPPH	85
B.2.1.2. Μέθοδος ABTS	86
B.2.2. Μελέτη Λευκαντικής Δράσης.....	88
B.2.3. Προσδιορισμός Ολικού Φαινολικού Περιεχομένου (TPC	89
B.2.4. Μελέτη Αντιμικροβιακής δράσης.....	90
B.2.4.1. Μέθοδος της διάχυσης με δίσκους (paper disk diffusion assay).....	90
B.2.4.2. Μέθοδος αραιώσης σε άγαρ (agar dilution assay).....	92
B.3. Φυτοχημική ανάλυση.....	93
B.3.1. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC).....	93
B.3.2. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης ή Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)	94
B.3.3. Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού.....	95
B.3.4. Κλασμάτωση με Χρωματογραφία Κατανομής με Φυγοκέντρωση (CPC)	97
B.3.3. Παρασκευαστική Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (preparative-TLC)	104
B.3.4. Ταυτοποίηση μεταβολιτών με LC-HRMS/MS.....	105
B.4.3. Ταυτοποίηση μεταβολιτών με NMR	106
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ	108
Γ.1 Αντιοξειδωτική δράση.....	110
Γ.2 Λευκαντική δράση	113
Γ.3 Ολικό Φαινολικό Περιεχόμενο.....	115
Γ.4 Αντιμικροβιακή Δράση	117
Γ.5 Φυτοχημική Ανάλυση	121
Γ.5.1. Φυτοχημικό Προφίλ του <i>Punica granatum</i> και του <i>Eucalyptus globulus</i>	121
Γ.5.2. Φυτοχημική ανάλυση του <i>Pinus heldreichii</i>	123
Γ.5.2.1. Φυτοχημική ανάλυση του Agro 04	124
Γ.5.2.2 Φυτοχημική ανάλυση του Agro 05	125

Γ.5.2.3 Ταυτοποίηση Δευτερογενών Μεταβολιτών του <i>P. heldreichii</i>	126
Γ.5.2.3.1. Μεταβολίτης 1 : (<i>cis</i>) -Τερπινόλη.....	127
Γ.5.2.3.2. Μεταβολίτης 2 : (<i>trans</i>) -Τερπινόλη.....	129
Γ.5.2.3.3. Μεταβολίτης 3: 5'μεθοξυ-3'-υδροξυστιλβένιο.....	132
Γ.5.2.3.4. Μεταβολίτης 4: 3',5'-διυδροξυστιλβένιο	134
Γ.5.2.3.5. Μεταβολίτης 5: 12α-υδροξυαβιετικό οξύ.....	136
Γ.5.2.3.6. Μεταβολίτης 6: 12β-υδροξυαβιετικό οξύ.....	142
Γ.5.2.3.7. Μεταβολίτης 7 : Πτεροστιλβένιο	146
Γ.5.2.3.8. Μεταβολίτης 8: Ισοκουπρεσικό οξύ	149
Γ.5.2.3.9. Μεταβολίτης 9: Κεμπρένιο.....	154
Γ.5.3. Φυτοχημική ανάλυση του <i>Pinus nigra</i>	157
Γ.5.3.1. Ταυτοποίηση Δευτερογενών Μεταβολιτών του <i>P. nigra</i>	158
Γ.5.3.1.1. Μεταβολίτης 10: 7,8-Διυδρο-3-υδροξυ-8-υδροξυμεθυλο-7-(3-μεθοξυ-4-υδροξυφαινυλο)-1' βενζοφουρανοπροπανόλη.....	159
Γ.5.3.1.2.: Μεταβολίτης 11: 4-μεθοξυφαινυλο-(6-δεοξυ-α-L-μανοπυρανοσυλο)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης.....	163
Γ.5.3.1.3. Μεταβολίτης 12: Διυδροκωνειφερίνη.....	167
Γ.5.3.1.4. Μεταβολίτης 13: : 3,4-διμεθοξυφαινυλο 2-O-(3-O-μεθυλο-α-L-ραμνοπυρανοσυλο)-β- D-γλυκοπυρανοσίδης	170
Γ.5.3.1.5. Μεταβολίτης 14 : 3,4-διμεθοξυφαινυλο 2-O-(α-L-ραμνοπυρανοσυλο)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης.....	173
Γ.6. Βιοκατευθυνόμενη απομόνωση στο αιθανολικό εκχύλισμα του <i>Pinus heldreichii</i>	177
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	179
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	181

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τεράστιες είναι οι ποσότητες των αποβλήτων που παράγονται ετησίως, ανά τον κόσμο, από τις βιομηχανίες που δραστηριοποιούνται στον αγρο-διατροφικό τομέα. Αν και μέχρι πριν από μερικά χρόνια αυτά θεωρούνταν απόβλητα και απορρίπτονταν μολύνοντας το περιβάλλον, σήμερα θεωρούνται αξιοποιήσιμη βιομάζα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή ενέργειας, χημικών πρώτων υλών και βιοδραστικών ενώσεων.

Σε συνέχεια των δραστηριοτήτων του εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας για την διερεύνηση αγρο-βιομηχανικών παραπροϊόντων, με στόχο την ανάδειξή τους ως πιθανές πηγές βιοδραστικών ενώσεων, πραγματοποιήθηκε και η παρούσα εργασία.

Συνολικά, αξιοποιήθηκαν παραπροϊόντα από ρόδι (*Punica granatum*), ροδάκινο (*Prunus persica*), λευκόδερμη (*Pinus heldreichii*) και μαύρη πεύκη (*Pinus nigra*), ευκάλυπτο (*Eucalyptus globulus*), και φοινικική άρκευθο (*Juniperous phoenicea*). Αρχικά παρασκευάστηκαν είκοσι εκχυλίσματα και τέσσερα υδρολύματα, τα οποία προέρχονταν από απόβλητα βιομηχανιών επεξεργασίας και μεταποίησης τροφίμων και ξυλείας.

Τα δείγματα εξετάστηκαν ως προς την αντιοξειδωτική (μέθοδος DPPH και ABTS) και τη λευκαντική τους δράση (αναστολή τυροσινάσης), καθώς και ως προς το ολικό φαινολικό τους φορτίο (TPC). Επίσης, μελετήθηκε η αντιμικροβιακή τους δράση έναντι 17 φυτοπαθογόνων βακτηρίων από τα γένη *Acidovorax*, *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* και *Xanthomonas* και 2 στελεχών του φυτοπαθογόνου μύκητα *Phytophthora nicotianae* (μέθοδος διάχυσης με δίσκους και μέθοδος αραιώσης σε άγαρ, αντίστοιχα).

Όλα τα εκχυλίσματα του ροδιού και του ευκαλύπτου παρουσίασαν αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική δράση, τόσο στις δοκιμές ABTS (99,5- 99,7% και 99,5- 99,8% αναστολή), όσο και στις δοκιμές DPPH (93,3- 94,3% και 93,3 έως 96,1% αναστολή) σε συγκεντρώσεις 100 μg/mL και 200 μg/mL, αντίστοιχα. Τα ίδια εκχυλίσματα εμφάνισαν και ιδιαίτερα υψηλό φαινολικό φορτίο με τιμές που κυμαίνονταν από 106,7±25,4 έως 109,2±22,7 και 123,1±2,1 έως 125,0±0,8 mg GA/g ξηρής ουσίας, για το ρόδι και τον ευκάλυπτο αντίστοιχα.

Επίσης, τα εκχυλίσματα του ροδιού παρεμπόδισαν σημαντικά την ανάπτυξη των *Pseudomonas corrugate* (14-20mm), *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (14-16mm) και όλων των μελετούμενων ειδών των *Xanthomonas* (12-28mm) και *Acidovorax* (8-20mm), ενώ τα εκχυλίσματα του ευκαλύπτου σημείωσαν σημαντική δράση κατά του *X. campestris* pv. *campestris* σε συγκέντρωση 1 mg/δίσκο (13-17mm). Επιπρόσθετα, αυτά τα εκχυλίσματα παρουσίασαν ισχυρή αντιμυκητιακή δράση έναντι και των δυο στελεχών του *P. nicotianae* σε συγκέντρωση 10 mg/mL (44,9-54,3% και 32,1-61,5%, για το ρόδι και τον ευκάλυπτο, αντίστοιχα).

Ακολούθησε ταυτοποίηση των βασικών μεταβολιτών των αιθανολικών εκχυλισμάτων των παραπροϊόντων ροδιού και του ευκαλύπτου με χρήση LC-HRMS/MS. Οι κυριότεροι μεταβολίτες του εκχυλίσματος του ροδιού ήταν η β-πουνικαλαγίνη και του ευκαλύπτου το ελλαγικό οξύ (και παράγωγα του) και η ισοραμνετίνη.

Το υδροαλκοολικό εκχύλισμα και το υδρόλυμα του *P. nigra* παρουσίασαν σημαντική αντιοξειδωτική δράση, τόσο στις δοκιμές ABTS ($99,4 \pm 0,8\%$ και $81,25 \pm 5,6\%$ αναστολή), όσο και στις δοκιμές DPPH ($66,6 \pm 31,0\%$ και $47,1 \pm 9,4\%$ αναστολή). Επίσης, το υδροαλκοολικό εκχύλισμα του *P. heldreichii* κατέδειξε υψηλή αντιοξειδωτική δράση (ABTS: $81,5 \pm 10,4$), αλλά και την υψηλότερη λευκαντική δράση σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα δείγματα ($62,3 \pm 2,4$). Τα δεδομένα αυτά, καθώς και το γεγονός ότι ελάχιστες μελέτες έχουν διενεργηθεί για τα δύο αυτά είδη πεύκου και ιδιαίτερα για το φλοιό, οδήγησαν στην επιλογή τους για περαιτέρω ανάλυση.

Για τη φυτοχημική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντρωση (CPC), χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (Sephadex) και παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος (TLC Preparative), η οποία οδήγησε στην απομόνωση και ταυτοποίηση 4 μεταβολιτών από το υδροαλκοολικό εκχύλισμα και 5 μεταβολιτών από το αιθανολικό εκχύλισμα του *P. heldreichii* καθώς και 5 μεταβολιτών από το υδατικό εκχύλισμα του *P. nigra*. Όλα τα μόρια που απομονώθηκαν ταυτοποιήθηκαν μέσω φασματοσκοπικών μεθόδων NMR (1D & 2D) και LC-HRMS. Έξι από τους μεταβολίτες που απομονώθηκαν από το *P. heldreichii* ανήκουν στην κατηγορία των τερπενίων: η *cis*-τερπινόλη (μεταβολίτης 1), η *trans*-τερπινόλη (μεταβολίτης 2), το **12α**- και **12β**-υδροξυαβιετικό οξύ (μεταβολίτης 5 και 6), το **ισοκουπρεσικό οξύ** (μεταβολίτης 8) και το **κεμπρένιο** (μεταβολίτης 9). Τρεις από τους μεταβολίτες ανήκουν στην κατηγορία των στυλβενίων: το **5'-μεθοξυ-3'-υδροξυστυλβένιο** (μεταβολίτης 3), η **πινოსιλβίνη** (μεταβολίτης 4) και το **πτεροστυλβένιο** (μεταβολίτης 7). Οι μεταβολίτες οι οποίοι απομονώθηκαν από το *P. nigra* ήταν η **7,8-διυδρο -3'-υδροξυ-8-υδροξυμεθυλο- (4-υδροξυ -4-μεθοξυφαινυλο)-1'-βενζοφουρανο-προπανόλη** (μεταβολίτης 10), ο **4-μεθοξυφαινυλο-(6-δεσοξυ-α-L-μαννοπυρανοσυλο)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης** (μεταβολίτης 11), η **διυδροκωνειφερίνη** (μεταβολίτης 12), η **3,4-διμεθοξυφαινυλο-2-O-(3-O-μεθυλο-α-L-ραμνοπυρανοσυλο)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης** (μεταβολίτης 13) και η **3,4-διμεθοξυφαινυλο 2-O-(α-L-ραμνοπυρανοσυλο)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης** (μεταβολίτης 14).

Τα κλάσματα του υδροαλκοολικού και του αιθανολικού εκχυλίσματος του *P. heldreichii* μελετήθηκαν ως προς τη λευκαντική τους δράση, με στόχο την ανάδειξη του/των βιοδραστικών μεταβολιτών, στο/ στους οποίους οφείλεται η λευκαντική δράση. Βιοκατευθυνόμενη απομόνωση υπέδειξε πως ο κύριος μεταβολίτης, στον οποίο οφείλεται η βιοδραστικότητά του, ήταν η πινοςιλβίνη.

Τα παραπροϊόντα αυτά μπορούν να αποτελέσουν μια ελπιδοφόρα και οικονομική πηγή βιοδραστικών ουσιών, με απώτερο σκοπό την εφαρμογή τους στη βιομηχανία καλλυντικών και τη φυτοπροστασία.

SUMMARY

Food and forestry processing industries produce annually enormous amounts of by-products worldwide. Until recently, these byproducts, considered as waste, were discarded, causing a negative environmental impact. Nowadays, however, they are counted as exploitable biomass, which could be used in the production of energy and chemical raw materials, as well as a source of obtaining biologically active ingredients.

The present study was carried out within the activities of the Department of Pharmacognosy, focusing on the investigation of agro-industrial byproducts as potential source of valuable compounds.

The evaluation was conducted in byproducts of pomegranate (*Punica granatum*), peach (*Prunus persica*), Bosnian (*Pinus heldreichii*) and black pine (*Pinus nigra*), eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) and juniper (*Juniperus phoenicea*). At first, twenty extracts and four hydrosols were prepared, deriving from food and wood processing industries' waste.

The samples were investigated for their antioxidant (DPPH and ABTS methods) and whitening activity (tyrosinase inhibition), as well as their total phenolic content (TPC). Moreover, they were examined for their antibacterial activity against 17 phytopathogenic bacteria of the species *Acidovorax*, *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas* and 2 strains of the phytopathogenic fungus *Phytophthora nicotianae* (disk diffusion and agar dilution assay, respectively).

Both the DPPH and the ABTS assay revealed remarkable antioxidant activity for all the extracts of pomegranate (up to 90.1 – 93.5 % and 99.5 – 99.7 % inhibition) and eucalyptus (up to 93.3 – 96.1 % and 99.5 – 99.8 % inhibition) at a concentration of 200 µg/mL and 100 µg/mL. In addition, the total phenolic content for *E. globulus* and *P. granatum* extracts was particularly high (up to 121.8-124.9 and 124.6-125.6 mg GAE/g).

Moreover, the pomegranate extracts inhibited remarkably the growth of *Pseudomonas corrugata* (14-20mm), *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (14-16mm) and all the tested species of *Xanthomonas* (12-28mm) and *Acidovorax* (8-20mm), while the eucalyptus extracts showed good control against *X. campestris* pv. *campestris*, in concentration of 1 mg/plate (13-17mm). Additionally, the same extracts presented strong antifungal activity against the two strains of *P. nicotianae*, in concentration of 10 mg/mL (44,9-54,3% and 32,1-61,5%, for the pomegranate and the eucalyptus respectively).

The ethanolic extracts of pomegranate and eucalyptus were investigated by LC-HRMS/MS for the identification of their major constituents. The major constituents of pomegranate extract were b-punicalagin, while in the eucalyptus extract were the ellagic acid (and his derivative products) and isoramnetine.

The hydroalcoholic extract and the hydrosol of *P. nigra*, revealed strong antioxidant activity in the ABTS assay (99,4±0,8% and 81,3±5,6% inhibition) and in the DPPH assay(66,6±31,0% and 47,1±9,4% inhibition). Moreover, the hydroalcoholic extract of *P. heldreichii* presented signifi-

cant antioxidant activity (ABTS: $81,5 \pm 10,4$), as well as the highest whitening activity in comparison with all the other samples ($62,3 \pm 2,4$). These results, together with the fact that very few studies have been conducted for the two plants (particularly their bark), were the main reasons for these species to be selected and analysed.

Concerning the phytochemical analysis, the following procedures were carried out: a Centrifugal Partition Chromatography (CPC), a Chromatography of molecular exclusion (Sephadex) and a Preparative Thin layer Chromatography (TLC Preparative). As a result, four metabolites from the hydroalcoholic and five metabolites from the ethanolic extract of *P. heldreichii* were isolated, as well as five metabolites from the aqueous extract of *P. nigra*. All the isolated molecules were identified through NMR (1D & 2D) spectroscopy and LC-HRMS. Six of the isolated metabolites of *P. heldreichii* belong to the category of terpenes: **cis-terpin** (metabolite 1), **trans-terpin** (metabolite 2), **12a-** and **12b-hydroxyabiatic acid** (metabolite 5 and 6), **isocupressic acid** (metabolite 8), **cembrene** (metabolite 9). Three of the metabolites belong to the category of stilbenes: **4-methoxy-2-hydroxystilbene** (metabolite 3), **pinosylvin** (metabolite 4) and **pterostibene** (metabolite 7). The metabolites, which were isolated from *P. nigra* were **7, 8-dihydro -3'-hydroxy-8-hydroxymethyl-(4-hydroxy-4-methoxyphenyl)-1'-benzofuranopropanol** (metabolite 10), **4-methoxyphenyl-(6-deoxy- α -L-mannopyranosyl)- β -D-glucopyranoside** (metabolite 11), **dihydroconiferin** (metabolite 12), **3,4-dimethoxyphenyl 2-O-(3-O-methyl- α -L-ramnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside** (metabolite 13) and **3,4-dimethoxyphenyl 2-O- α -L-ramnopyranosyl- β -D-glucopyranoside** (metabolite 14).

The fractions of the hydroalcoholic and ethanolic extracts of *P. heldreichii* were examined for their whitening activity, in order to detect the active metabolites, which are responsible for this effect. During the process of the bio-guided isolation, the main bioactive compound was found to be pinosylvin.

Conclusively, these by-products could serve as potential, cost effective source of valuable compounds, which could be used in the cosmetic industry and crop protection.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid
BPI	Benaki Phytopathological Institute
^{13}C -NMR	Carbon-13 nuclear magnetic resonance
COSY	Correlation Spectroscopy
CPC	Centrifugal Partition Chromatography
DCM	Dichloromethane
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
ESI	Electrospray Ionization
EtOH	Ethanol
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FAOSTAT	French Ministry of Agriculture and the Statistical Division of FAO
GAE	Gallic Acid Equivalents
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
^1H -NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
ITIS	Integrated Taxonomic Information System
IUCN	International Union for Conservation of Nature
LC	Liquid Chromatography
MAHD	Microwave-Assisted Hydrodistillation
MeOH	Methanol
MS	Mass Spectrometry
QE	Quercetin Equivalents
ROS	Reactive Oxygen Species
TLC	Thin-Layer Chromatography
TPC	Total Phenolic Content
UAE	Ultrasound Assisted Extraction

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ, ΕΙΚΟΝΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Πίνακες

<u>α/α</u>	<u>Περιγραφή</u>	<u>Σελίδα</u>
Πίνακας 1	Φλαβονοειδή που έχουν απομονωθεί από το είδος <i>Prunus persica</i> (Poonam et al., 2011)	30
Πίνακας 2	Στεροειδή και τερπενοειδών του είδους <i>Prunus persica</i> σύμφωνα με διάφορες μελέτες (Poonam et al., 2011)	31
Πίνακας 3	Φαινολικά οξέα του είδους <i>Prunus persica</i> σύμφωνα με διάφορες μελέτες (Poonam et al., 2011)	31
Πίνακας 4	Καροτενοειδή του είδους <i>Prunus persica</i> σύμφωνα με διάφορες μελέτες (Poonam et al., 2011)	31
Πίνακας 5	Γιββερίλινες του είδους <i>Prunus persica</i> σύμφωνα με διάφορες μελέτες (Poonam et al., 2011)	32
Πίνακας 6	Διάφορες ενώσεις του είδους <i>Prunus persica</i> σύμφωνα με διάφορες μελέτες (Poonam et al., 2011)	33
Πίνακας 7	Χημικός τύπος διαφόρων ενώσεων του <i>Prunus persica</i> .	34
Πίνακας 8	Κύριες ταννίνες του <i>Punica granatum</i> (Wang et al., 2010)	43
Πίνακας 9	Κύρια φλαβονοειδή του <i>Punica granatum</i> (Wang et al., 2010)	44
Πίνακας 10	Ορισμένες ταννίνες και φλαβονοειδή του <i>Punica granatum</i> και ο χημικός τους τύπος	45
Πίνακας 11	Κύρια αλκαλοειδή του <i>Punica granatum</i> (Wang et al., 2010)	46
Πίνακας 12	Ορισμένα οργανικά οξέα του <i>Punica granatum</i> και ο χημικός τους τύπος	47
Πίνακας 13	Συγκεντρωτικός πίνακας των δευτερογενών μεταβολιτών του <i>Punica granatum</i> στα διάφορα μέρη του φυτού (Jurenka, 2008)	48
Πίνακας 14	Χημικά συστατικά του φλοιού του ευκαλύπτου και ο χημικός τους τύπος	58
Πίνακας 15	Ποσοτικά αποτελέσματα για (+)- κατεχίνη και ταξιφολίνη από HPLC	61
Πίνακας 16	Κύρια συστατικά του φλοιού της μαύρης πεύκης	64
Πίνακας 17	Οι ξενιστές που έχει προσβάλει στην Ελλάδα το <i>P. Nicotianae</i>	81
Πίνακας 18	Φυτοπαθογόνοι μικροοργανισμοί	91
Πίνακας 19	Πειραματικές συνθήκες της HPLC	95
Πίνακας 20	Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της στήλης Sephadex	97
Πίνακας 21	Συστήματα διαλυτών για CPC	99
Πίνακας 22	Κλάσματα CPC	100
Πίνακας 23	Συνενώσεις 1 ^{ου} CPC	101
Πίνακας 24	Συνενώσεις 2 ^{ου} CPC	101
Πίνακας 25	Συστήματα διαλυτών για CPC	102
Πίνακας 26	Κλάσματα CPC του Agro05	103

Πίνακας 27	Συνενώσεις CPC του Agro05	103
Πίνακας 28	Σύστημα CPC που χρησιμοποιήθηκε στο υδατικό εκχύλισμα του <i>P. nigra</i>	104
Πίνακας 29	Πειραματικές συνθήκες LC	107
Πίνακας 30	Συνθήκες ιονισμού και θραυσμάτωσης MS/MS	107
Πίνακας 31	Είδος φυτού, διαλύτες εκχύλισης και βέλτιστη διαλυτότητα δειγμάτων στον αντίστοιχο διαλύτη	110
Πίνακας 32	Ποσοτικά αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης και τυπική απόκλιση	112
Πίνακας 33	Ποσοτικά αποτελέσματα λευκαντικής δράσης δειγμάτων και τυπική απόκλιση	115
Πίνακας 34	Ολικό φαινολικό περιεχόμενο και τυπική απόκλιση	117
Πίνακας 35	Αποτελέσματα αντιβακτηριακής δράσης των εκχυλισμάτων (Agro01-09) με τη μέθοδο διάχυσης με δίσκους σε συγκέντρωση 1mg/δίσκο	119
Πίνακας 36	Αποτελέσματα αντιβακτηριακής δράσης των εκχυλισμάτων (Agro10-25) με τη μέθοδο διάχυσης με δίσκους σε συγκέντρωση 1mg/δίσκο	120
Πίνακας 37	Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων του ροδιού και του ευκαλύπτου σε συγκέντρωση 10mg/mL	121
Πίνακας 38	Βασικοί μεταβολίτες του Agro 08	122
Πίνακας 39	Βασικοί μεταβολίτες του Agro 11	123
Πίνακας 40	Δευτερογενείς μεταβολίτες που απομονώθηκαν από το <i>Pinus. heldreichii</i>	127
Πίνακας 41	Χημικές μετατοπίσεις ^1H & ^{13}C NMR του μεταβολίτη 1 (ph_21)	128
Πίνακας 42	Χημικές μετατοπίσεις ^1H & ^{13}C NMR του μεταβολίτη 2 (ph_25)	131
Πίνακας 43	Χημικές μετατοπίσεις ^1H & ^{13}C NMR του μεταβολίτη 3 (ph13_21)	135
Πίνακας 44	Χημικές μετατοπίσεις ^1H & ^{13}C NMR του μεταβολίτη 4 (ph70_78)	137
Πίνακας 45	Χημικές μετατοπίσεις ^1H & ^{13}C NMR του μεταβολίτη 5 (ph6_1)	139
Πίνακας 46	Χημικές μετατοπίσεις ^1H & ^{13}C NMR του μεταβολίτη 6 (ph6_2)	144
Πίνακας 47	Χημικές μετατοπίσεις ^1H & ^{13}C NMR του μεταβολίτη 7 (ph6_3)	148
Πίνακας 48	Χημικές μετατοπίσεις ^1H & ^{13}C NMR του μεταβολίτη 8 (ph6_4)	153
Πίνακας 49	Χημικές μετατοπίσεις ^1H & ^{13}C NMR του μεταβολίτη 9 (ph5_146)	157
Πίνακας 50	Δευτερογενείς μεταβολίτες που απομονώθηκαν από το <i>P. nigra</i>	161
Πίνακας 51	Χημικές μετατοπίσεις ^1H & ^{13}C NMR του μεταβολίτη 10 (pn_17)	162
Πίνακας 52	Χημικές μετατοπίσεις ^1H & ^{13}C NMR του μεταβολίτη 11 (pn_18)	166
Πίνακας 53	Χημικές μετατοπίσεις ^1H & ^{13}C NMR του μεταβολίτη 12 (pn_19)	170
Πίνακας 54	Χημικές μετατοπίσεις ^1H & ^{13}C NMR του μεταβολίτη 13 (pn_20)	173
Πίνακας 55	Χημικές μετατοπίσεις ^1H & ^{13}C NMR του μεταβολίτη 14 (pn_2)	176
Πίνακας 56	Ποσοτικά αποτελέσματα λευκαντικής δράσης στα κλάσματα της CPC του Agro 05.	181

<u>Εικόνες</u> α/α	Περιγραφή	Σελίδα
Εικόνα 1	Καρπός του είδους <i>Prunus persica</i>	28
Εικόνα 2	Ανθισμένη ροδακινιά	29
Εικόνα 3	Καρπός και άνθος του είδους <i>Punica granatum</i>	39
Εικόνα 4	Εδώδιμο μέρος καρπού ροδιού	40
Εικόνα 5	Εκτίμηση της παρούσας παραγωγής ροδιών στον κόσμο (Melgarejo et al.)	41
Εικόνα 6	Φύλλα και άνθος του <i>eucalyptus globulus</i>	55
Εικόνα 7	<i>Eucalyptus Globus</i>	56
Εικόνα 8	Κώνος του <i>Pinus nigra</i>	62
Εικόνα 9	Γεωγραφική κατανομή του <i>Pinus nigra</i>	63
Εικόνα 10	Κώνος του <i>Pinus heldreichii</i>	65
Εικόνα 11	Γεωγραφική κατανομή του <i>Pinus heldreichii</i>	66
Εικόνα 12	Δένδρο <i>Pinus heldreichii</i>	67
Εικόνα 13	Βακτηριακή κηλίδωση σε κολοκύθι	68
Εικόνα 14	Κορωνωτός κάλλος σε βλαστό	70
Εικόνα 15	Μαλακή σήψη σε πατάτα, λαχανάκι Βρυξελλών και ανανά από τα βακτήρια <i>Eca</i> , <i>Ecc</i> και <i>Ech</i> αντίστοιχα	71
Εικόνα 16	Κηλίδωση των φύλλων από <i>P. Cichorii</i>	72
Εικόνα 17	Το <i>P. corrugata</i> προκαλεί νέκρωση της εντεριώνης στη τομάτα	73
Εικόνα 18	Καρκίνωση της ελιάς	74
Εικόνα 19	α) Βακτηριακό έλκος από <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> , β) βακτηριακή κηλίδωση από <i>P. tolaasii</i> , γ) κηλίδωση από <i>P. viridiflava</i>	76
Εικόνα 20	Μαλακή σήψη από α) <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> , β) <i>X. campestris</i> pv. <i>juglandis</i> , γ) <i>X. campestris</i> pv. <i>malvacearum</i>	79
Εικόνα 21	Προσβολή από <i>P. nicotianae</i> σε καλλιέργειες α) τομάτας β) καπνού	82
Εικόνα 22	Δομή του μορίου DPPH πριν και μετά την αντίδραση με αντιοξειδωτικό παράγοντα	86
Εικόνα 23	Οξειδωση του ABTS από υπερθειικό κάλιο προς σχηματισμό κατιοντικής ρίζας ABTS ^{•+} και η αντίδρασή της με αντιοξειδωτικό μόριο (AOH)	88
Εικόνα 24	Μηχανισμός δράσης της τυροσινάσης	89
Εικόνα 25	Εμποτισμός δίσκων με το υπό εξέταση δείγμα	93
Εικόνα 26	Αρχικό και φιλτραρισμένο δείγμα στα 254nm, 366nm και ορατό. Ανεπαίσθητες διαφορές διακρίνονται μεταξύ αρχικού και φιλτραρισμένου εκχυλίσματος	97
Εικόνα 27	TLC στα 254nm, 366nm και ορατό για τα τελικά κλάσματα Sephadex	98
Εικόνα 28	Παρουσίαση των 33 τελικών κλασμάτων CPC μέσω TLC στο ορατό	105

Εικόνα 29	Βακτηριακές καλλιέργειες στις οποίες έχει εφαρμοστεί η μέθοδος διάχυσης με δίσκους. Διακρίνονται οι ζώνες παρεμπόδισης από τα εκχυλίσματα και τον μάρτυρα.	118
Εικόνα 30	Καλλιέργειες <i>P. nicotianae</i> στις οποίες έχει εφαρμοστεί η μέθοδος αραίωσης σε άγαρ. Διακρίνεται η καλλιέργεια control και οι καλλιέργειες στις οποίες έχει ενσωματωθεί στο άγαρ εκχύλισμα ευκαλύπτου και ροδιού	121
Εικόνα 31	Χρωματογράφημα βασικών κορυφών του Agro 08	122
Εικόνα 32	Χρωματογράφημα βασικών κορυφών του Agro 11	123
Εικόνα 33	Χρωματογράφημα βασικών κορυφών του Agro 04	125
Εικόνα 34	Δευτερογενείς μεταβολίτες (1 και 2) από 1 ^ο CPC	125
Εικόνα 35	Δευτερογενείς μεταβολίτες (3 και 4) από 2 ^ο CPC	126
Εικόνα 36	Φυτοχημικό προφίλ του Agro05 με χρήση HPLC	126
Εικόνα 37	Κλάσματα της CPC του αιθανολικού εκχυλίσματος, στα οποία πραγματοποιήθηκε prep-TLC	127
Εικόνα 38	(cis)-Τερπινόλη	128
Εικόνα 39	Φάσμα ¹ H NMR για τον Μεταβολίτη 1	129
Εικόνα 40	Φάσμα DEPT για τον Μεταβολίτη 1	129
Εικόνα 41	Φάσμα HSQC για τον Μεταβολίτη 1	130
Εικόνα 42	Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 1	130
Εικόνα 43	(trans)-Τερπινόλη	131
Εικόνα 44	Φάσμα ¹ H NMR για τον Μεταβολίτη 2	132
Εικόνα 45	Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 2	132
Εικόνα 46	Φάσμα HSQC για τον Μεταβολίτη 2	133
Εικόνα 47	Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 2	134
Εικόνα 48	5'-μεθοξυ- 2'-υδροξυστυλβένιο	134
Εικόνα 49	Φάσμα ¹ H NMR για τον Μεταβολίτη 3	136
Εικόνα 50	Πινοσιλβίνη	136
Εικόνα 51	Φάσμα ¹ H NMR για τον Μεταβολίτη 4	138
Εικόνα 52	12α-υδροξυαβιετικό οξύ	138
Εικόνα 53	Φάσμα ¹ H NMR για τον Μεταβολίτη 5	140
Εικόνα 54	Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 5	141
Εικόνα 55	Φάσμα HSQC-DEPT για τον Μεταβολίτη 5	142
Εικόνα 56	Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 5	142
Εικόνα 57	Φάσμα μάζας ESI (-) HR-MS για τον μεταβολίτη 5	143
Εικόνα 58	12β-υδροξυαβιετικό οξύ	144
Εικόνα 59	Φάσμα ¹ H NMR για τον Μεταβολίτη 6	145
Εικόνα 60	Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 6	146
Εικόνα 61	Φάσμα HSQC για τον Μεταβολίτη 6	146

Εικόνα 62	Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 6	147
Εικόνα 63	Φάσμα μάζας ESI (-) HR-MS για τον μεταβολίτη 6	147
Εικόνα 64	Πτεροστιλβένιο	148
Εικόνα 65	Φάσμα ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 7	149
Εικόνα 66	Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 7	150
Εικόνα 67	Φάσμα HSQC για τον Μεταβολίτη 7	150
Εικόνα 68	Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 7	151
Εικόνα 69	Φάσμα μάζας ESI (-) HR-MS για τον μεταβολίτη 7	152
Εικόνα 70	Ισοκουπρεσικό οξύ	152
Εικόνα 71	Φάσμα ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 8	154
Εικόνα 72	Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 8	155
Εικόνα 73	Φάσμα HSQC-DEPT για τον Μεταβολίτη 8	155
Εικόνα 74	Φάσμα HSQC για τον Μεταβολίτη 8	156
Εικόνα 75	Φάσμα μάζας ESI (-) HR-MS για τον μεταβολίτη 8	156
Εικόνα 76	Κεμπρένιο ($\text{C}^{20}\text{H}^{20}$, MB=272.48)	157
Εικόνα 77	Φάσμα ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 9	158
Εικόνα 78	Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 9	159
Εικόνα 79	Φάσμα HSQC-DEPT για τον Μεταβολίτη 9	159
Εικόνα 80	Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 9	160
Εικόνα 81	Φυτοχημικό προφίλ του Agro03 με χρήση HPLC	160
Εικόνα 82	7,8-Δωδρο-3-υδροξυ-8-υδροξυμεθυλο-7-(3-μεθοξυ-4-υδροξυφαινυλο)-1' βενζοφουρανοπροπανάλη	162
Εικόνα 83	Φάσμα ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 10	163
Εικόνα 84	Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 10	164
Εικόνα 85	Φάσμα HSQC για τον Μεταβολίτη 10	164
Εικόνα 86	Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 10	165
Εικόνα 87	Φάσμα μάζας ESI (-) HR-MS για τον μεταβολίτη 10	165
Εικόνα 88	4-μεθοξυφαινυλο-(6-δεοξυ-α-L-μανοφυρανοσυλο)-β-D-γλυκοφυρανοσιδης	166
Εικόνα 89	Φάσμα ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 11	167
Εικόνα 90	Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 11	168
Εικόνα 91	Φάσμα HSQC-DEPT για τον Μεταβολίτη 11	168
Εικόνα 92	Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 11	169
Εικόνα 93	Φάσμα μάζας ESI (-) HR-MS για τον μεταβολίτη 11	169
Εικόνα 94	Δΐδροκωνειφερίνη	170
Εικόνα 95	Φάσμα ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 12	171
Εικόνα 96	Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 12	172
Εικόνα 97	Φάσμα μάζας ESI (-) HR-MS για τον μεταβολίτη 12	172

Εικόνα 98	3,4-διμεθοξυφαινυλο-2-O-(3-O-μεθυλο-α-L-ραμνοπυρανοσυλο)-β-D-γλυκοπυρα- νοσίδης	173
Εικόνα 99	Φάσμα ¹ H NMR για τον Μεταβολίτη 13	174
Εικόνα 100	Φάσμα μάζας ESI (-) HR-MS για τον μεταβολίτη 13	175
Εικόνα 101	3,4-διμεθοξυφαινυλο 2-O-(α-L-ραμνοπυρανοσυλο)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης	176
Εικόνα 102	Φάσμα ¹ H NMR για τον Μεταβολίτη 14	177
Εικόνα 103	Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 14	178
Εικόνα 104	Φάσμα HSQC-DEPT για τον Μεταβολίτη 14	179
Εικόνα 105	Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 14	179
Εικόνα 106	Φάσμα μάζας ESI (-) HR-MS για τον μεταβολίτη 14	180

Διαγράμματα

α/α	Περιγραφή	Σελίδα
Διάγραμμα 1	Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων	111
Διάγραμμα 2	Αποτελέσματα λευκαντικής δράσης των δειγμάτων	114
Διάγραμμα 3	Ολικό φαινολικό περιεχόμενο	116
Διάγραμμα 4.	Ποιοτικά αποτελέσματα λευκαντικής δράσης στα κλάσματα της CPC του Agro 05	181

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η αξιοποίηση συγκεκριμένων παραπροϊόντων από την βιομηχανία επεξεργασίας φρούτων και ξυλείας. Μελετήθηκαν οι φλοιοί από ρόδι (*Punica granatum*) και ροδάκινο (*Prunus persica*), οι οποίοι είναι παραπροϊόντα κατά την παραγωγή χυμού και κονσέρβας φρούτων. Επίσης μελετήθηκε ο φλοιός του ευκάλυπτου (*Eucalyptus globulus*), της λευκόδεσμης (*Pinus heldreichii*) και μαύρης πεύκης (*Pinus nigra*), και της φοινικικής άρκευθου (*Juniperous phoenicea*) που είναι παραπροϊόν κατά την επεξεργασία των προϊόντων δασικής ξυλείας.

Όλα τα παραπάνω παραπροϊόντα διερευνήθηκαν ως προς:

- ❖ την αντιοξειδωτική τους δράση
- ❖ τη λευκαντική τους δράση,
- ❖ το ολικό φαινολικό τους περιεχόμενο,
- ❖ την αντιμικροβιακή τους δράση έναντι φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών και
- ❖ τη φυτοχημική τους σύνθεση

Επιπλέον, λόγω της βιολογικής δράσης, επιλέχθηκαν να μελετηθούν φυτοχημικά σε βάθος τα *Pinus heldreichii* και *Pinus nigra*. Πολλά είδη του γένους των *Pinus* έχουν αναλυθεί φυτοχημικά και τα συστατικά τους έχει βρεθεί να κατέχουν μια σειρά σημαντικών βιολογικών δράσεων. Ωστόσο, ελάχιστες μελέτες έχουν διενεργηθεί για το είδος της λευκόδεσμης και της μαύρης πεύκης, ενώ οι φλοιοί των δέντρων αυτών δεν έχουν μελετηθεί καθόλου.

Συμπερασματικά, η εργασία αυτή επικεντρώθηκε στην ανεύρεση εκχυλισμάτων και ενώσεων με βιολογική δράση, τα οποία θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν στη βιομηχανία καλλυντικών και στη φυτοπροστασία, αποτελώντας έτσι μια ελπιδοφόρα και ιδιαίτερα οικονομική πηγή βιοδραστικών ενώσεων.

Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1 ΓΕΝΙΚΑ

A.1.1 Αγρο-βιομηχανικά παραπροϊόντα και απόβλητα

Τεράστιες είναι οι ποσότητες αποβλήτων που παράγονται ετησίως, ανά τον κόσμο, ως αποτέλεσμα της επεξεργασίας φρούτων και λαχανικών από τις βιομηχανίες τροφίμων και χυμοποιίας. Μόνο στην Ευρώπη, οι απώλειες τροφίμων και τα απόβλητα, από αυτή την επεξεργασία, υπολογίζεται ότι ξεπερνούν τα 190 εκατομμύρια τόνους και είναι υπεύθυνα για το 20-30% των αρνητικών περιβαλλοντικών επιπτώσεων που προκαλούν οι βιομηχανικές χώρες.

Τα απόβλητα αυτά, είναι αποτέλεσμα σημαντικών απωλειών στη μάζα των τροφίμων, οι οποίες λαμβάνουν χώρα σε όλη την αλυσίδα εφοδιασμού προϊόντων, που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση. Απώλειες σημειώνονται κατά την παραγωγή, μετά τη συγκομιδή, και στα στάδια επεξεργασίας και μεταποίησής τους. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι, στις περισσότερες χώρες του κόσμου, το ποσοστό του αρχικού βάρους των φρούτων και των λαχανικών, που χάνονται ή απορρίπτονται, είναι πάνω από 40%, ενώ σε λιγότερο βιομηχανοποιημένες χώρες οι απώλειες είναι περισσότερες από το 50% των πρώτων υλών (FAO 2011).

Από οικονομική άποψη, οι απώλειες των τροφίμων, που παράγονται κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας φρούτων και λαχανικών, είναι ένα σημαντικό πρόβλημα, διότι το κόστος της διαχείρισής τους επηρεάζει την τελική τιμή του προϊόντος, η οποία αυξάνεται σημαντικά εξαιτίας της εν λόγω δραστηριότητας. Επιπλέον, η διαχείριση αυτού του υλικού είναι ένα σοβαρό πρόβλημα, καθώς υπάρχουν σημαντικές νομικές απαιτήσεις που σχετίζονται με το χειρισμό του. Η περιβαλλοντική νομοθεσία στην Ευρωπαϊκή Ένωση απαιτεί την επεξεργασία των αποβλήτων, σύμφωνα με την οδηγία 2006/12 / EC, η οποία στη συνέχεια βελτιώθηκε στην οδηγία 2008/98 / EC. Η παρούσα οδηγία θεσπίζει την υποχρέωση των κρατών μελών να εφαρμόσουν μέτρα για τη μείωση των βιομηχανικών αποβλήτων με ανακύκλωση, ανάκτηση και επαναχρησιμοποίηση ως πηγή ενέργειας ή άλλες διαδικασίες για την εξαγωγή πολύτιμων πρώτων υλών.

Απορριπτόμενες φλούδες φρούτων και λαχανικών, σπόροι, πυρήνες, ή και ολόκληρα κομμάτια θεωρούνται απόβλητα, αν αυτά δεν χρησιμοποιούνται ως πηγές φυτοχημικών ή άλλων πολύτιμων προϊόντων. Εάν τα απόβλητα αυτά προορίζονται για περαιτέρω χρήση, τότε θεωρούνται παραπροϊόντα επεξεργασίας φρούτων και λαχανικών (De Ancos et al., 2015).

Η ολική ή μερική ανάκτηση των εν λόγω αποβλήτων ή παραπροϊόντων, που παράγονται κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας φρούτων και λαχανικών ή σε άλλα στάδια της αλυσίδας εφοδιασμού τροφίμων, περιλαμβάνει σημαντικά πλεονεκτήματα από οικονομική, κοινωνική και περιβαλλοντική άποψη. Σε γενικές γραμμές, τα προϊόντα αυτά επαναχρησιμοποιούνται ως ζωοτροφές, λίπασμα για τα χωράφια ή σε βιομάζα, που χρησιμοποιείται για την παραγωγή καυσίμων, όπως η βιοαιθανόλη (Lenucci et al. 2013).

Εκτός από τις βιομηχανίες επεξεργασίας και μεταποίησης τροφίμων, σημαντική πηγή παραπροϊόντων αποτελούν και βιομηχανίες που δραστηριοποιούνται στην επεξεργασία ξύλου. Τόσο η συμβατική δασοκομία, όσο και οι βιομηχανίες ξυλείας παράγουν αξιοσημείωτες ποσότητες αποβλήτων, όπως υπολείμματα υλοτομίας, φλοιός, πριονίδια και άλλα μη εμπορεύσιμα υλικά. Σύμφωνα με τα στοιχεία του 2011, η συνολική παραγωγή των υπολειμμάτων της υλοτομημένης ξυλείας

στην ΕΕ ανερχόταν στα 80,7 εκατομμύρια τόνους, ενώ τα απόβλητα που προέρχονταν από τις βιομηχανίες ξυλείας εκτιμήθηκαν στους 56.8 εκατομμύρια τόνους (Searle & Malins, 2013). Μέρος των δευτερευόντων αυτών προϊόντων ήδη χρησιμοποιείται στην παραγωγή βιομάζας ή ηλεκτρικής ενέργειας, ωστόσο ο μεγάλος τους όγκος παρέχει τη δυνατότητα περαιτέρω αξιοποίησης.

Προς το παρόν, παραγωγοί και βιομηχανίες αναζητούν καινοτόμους τρόπους για τη χρήση αυτών των αποβλήτων ως παραπροϊόντα και για την περαιτέρω αξιοποίησή τους στην βιομηχανία. Μια από τις καινοτόμες αυτές ερευνητικές γραμμές υποδεικνύει τα αγρο-βιομηχανικά παραπροϊόντα ως κύρια πηγή φυτοχημικών ουσιών, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φυσικά πρόσθετα τροφίμων και λειτουργικά συστατικά στην διαμόρφωση νέων τροφίμων ή συμπληρωμάτων με υψηλή θρεπτική και λειτουργική αξία (De Ancos et al., 2015).

Υπάρχουν αρκετές αναφορές, που συνοψίζουν τις δημοσιευμένες μελέτες, οι οποίες σχετίζονται με την απόκτηση βιοδραστικών ουσιών από αγρο-βιομηχανικά παραπροϊόντα και την εφαρμογή τους στο σχεδιασμό νέων λειτουργικών τροφίμων. Ο Schieber και οι συνεργάτες του το 2001, διεξήγαγε μια από τις πρώτες ανασκοπήσεις σχετικά με τη χρησιμότητα των φρούτων και λαχανικών επεξεργασίας υποπροϊόντων, ως φθηνή πρώτη ύλη για την παραγωγή φυτοχημικών ουσιών με υψηλή διατροφική αξία και δυνατότητα χρήσης τους ως αντιοξειδωτικών παραγόντων (βιταμίνη C, φαινολικές ενώσεις, καροτενοειδή, τοκοφερόλες, και ανόργανα άλατα). Από τότε πολλές μελέτες έχουν δημοσιευθεί σχετικά με την απόκτηση δραστικών βιομορίων από παραπροϊόντα φρούτων και λαχανικών (Djilas et al., 2009· Aguedo et al., 2012· Kalogeropoulos et al., 2012· O'Shea et al., 2012· Wijngaard et al., 2012· Yu and Ahmedna, 2013).

A.1.2. Χρήση αγρο-βιομηχανικών παραπροϊόντων στη βιομηχανία αγροχημικών

Η ιστορία της γεωργίας περιλαμβάνει μια αέναη πάλη με τα καταστρεπτικά ζιζάνια και τους φυτοπαθογόνους οργανισμούς, με στόχο την προστασία των καλλιεργειών. Μέχρι τις αρχές του 20ού αιώνα, οι καλλιεργητικές και μηχανικές μέθοδοι, ενισχύονταν με τη χρήση οργανικών και ανόργανων ουσιών, προερχόμενων από διάφορα φυτά, ζώα και ορυκτά και κατηύθυναν τον έλεγχο παρασίτων.

Ωστόσο, παρά το γεγονός ότι πολλοί παραδοσιακοί φυσικοί τρόποι ελέγχου των παρασίτων συνέχισαν να χρησιμοποιούνται, η περιορισμένη διαθεσιμότητα και μερικές φορές η χαμηλή αποτελεσματικότητά τους δεν μπορούσε να καλύψει τις συνεχώς αυξανόμενες ανάγκες της εντατικής καλλιέργειας. Έτσι, από τα μέσα του 20^{ου} αιώνα, λόγω της αναπτυσσόμενης χημικής βιομηχανίας, τα αποτελεσματικά και προσιτά συνθετικά φυτοφάρμακα κέρδισαν έδαφος.

Εντούτοις, τα φυσικά μόρια ακόμα συμβάλουν στον έλεγχο των παρασίτων. Κατά προσέγγιση, το 10% του συνόλου της καλλιεργητικής προστασίας είναι γνήσια φυσικά προϊόντα, με την κατηγορία των εντομοκτόνων να είναι, σε ποσοστό μεγαλύτερο από το ένα τρίτο των ενεργών συστατικών, είτε φυσικά προϊόντα, είτε ημι-συνθετικά παράγωγα αυτών (Cantrell et al., 2012).

Τα φυσικά προϊόντα δεν αποτελούν μόνο ενδιαφέρουσες χημικές δομές, αλλά και ουσίες με αξιοπρόσεκτες βιολογικές ιδιότητες. Οι ζωντανοί οργανισμοί έχουν εξελίξει περίπλοκους επιθετικούς

και αμυντικούς μηχανισμούς, με σκοπό την επιβίωση, γεγονός που παρέχει στις βιοδραστικές τους ουσίες ένα οικολογικό πλεονέκτημα. Σε βιοχημικό- φαρμακολογικό επίπεδο, ένα συστατικό μπορεί να έχει περισσότερους από έναν μοριακούς στόχους, κατά συνέπεια έχει πολλαπλή αμυντική δράση. Επιπλέον, τα φυσικά προϊόντα αποτελούν μείγματα διαφόρων δευτερογενών μεταβολικών ενώσεων με διαφορετικά φάσματα δραστηριότητας (Dixon, 2001).

Η ανεπαρκής επιλεκτικότητα, η ανάπτυξη αντίστασης των εχθρών των καλλιεργειών σε πολλά συνθετικά φυτοφάρμακα, καθώς και οι ανησυχίες σχετικά με τον πιθανό αντίκτυπο από τη χρήση φυτοφαρμάκων στην ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον, έχουν τροφοδοτήσει τις έρευνες για την ανακάλυψη νέων βιοδραστικών ουσιών και άλλων βιοκατευθυνόμενων τεχνολογιών ελέγχου (Dayan et al., 2009).

Η χρήση γεωργικών παραπροϊόντων ως πηγή νέων βιοδραστικών ουσιών, ενάντια στους εχθρούς των γεωργικών καλλιεργειών μπορεί να αποτελέσει μια ιδιαίτερα ελπιδοφόρα, οικονομική και φιλική προς το περιβάλλον λύση στον τομέα της φυτοπροστασίας.

A.1.3. Χρήση αγρο-βιομηχανικών παραπροϊόντων στη βιομηχανία καλλυντικών

Παρά την παγκόσμια οικονομική κρίση των τελευταίων ετών, η αγορά των καλλυντικών παρουσιάζει μια συνεχή αυξητική πορεία. Κάθε χρόνο εξακολουθούν να πωλούνται πάνω από 5 δισεκατομμύρια καλλυντικά προϊόντα, με τη μεγαλύτερη κατανάλωση να παρατηρείται σε εκείνα που αφορούν στη φροντίδα του δέρματος.

Η βιομηχανία καλλυντικών μπορεί σίγουρα να αποτελέσει μία ανταποδοτική λύση στην αξιοποίηση των αγρο-βιομηχανικών παραπροϊόντων. Η πολύπλοκη σύνθεση τους, σε συνδυασμό με το αυξανόμενο ενδιαφέρον για την εξεύρεση φυσικών συστατικών ως εναλλακτική λύση για τις συνθετικές ουσίες, καθιστά τα απόβλητα αυτά μια ιδιαίτερα ελκυστική πηγή για την παραγωγή ενώσεων στον τομέα της κοσμετολογίας (Barbulova et al., 2015).

Αρκετά είναι τα παραδείγματα των εκχυλισμάτων, που προέρχονται από απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων και χυμοποιίας, τα οποία ήδη χρησιμοποιούνται στα καλλυντικά σκευάσματα για την αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακή ή αντιγηραντική τους δράση, όπως απόβλητα επεξεργασίας εσπεριδοειδών, ελιάς, καφέ, κ.α. (Kim et al., 2013, Cicerale et al., 2009, Omar, 2010, Murthy et al., 2012).

Τα εκχυλίσματα, που λαμβάνονται από τα παραπροϊόντα, αποτελούν μια έγκυρη «πράσινη» εναλλακτική λύση έναντι των συνηθισμένων φυτικών εκχυλισμάτων, που χρησιμοποιούνται κατά κανόνα στην παρασκευή καλλυντικών. Εκτός από τις αποδεδειγμένα ευεργετικές επιδράσεις τους στην ανθρώπινη επιδερμίδα, τα αγρο-βιομηχανικά παραπροϊόντα έχουν το πλεονέκτημα ότι είναι οικολογικά, οικονομικά και ασφαλή για τον άνθρωπο (Barbulova et al., 2015).

A.2. *Prunus persica* (L.)

Α.2.1. Βοτανική Ταξινόμηση

Βασίλειο:	<i>Plantae</i>
Υποβασίλειο:	<i>Viridaeplantae</i>
Υπο-υποβασίλειο:	<i>Streptophyta</i>
Άθροισμα:	<i>Tracheophyta</i>
Υποάθροισμα:	<i>Spermatophytina</i>
Υπο- υποάθροισμα:	<i>Angiospermae</i>
Κλάση:	<i>Magnoliopsida</i>
Υπερτάξη:	<i>Rosanae</i>
Τάξη:	<i>Rosales</i>
Οικογένεια:	<i>Rosaceae</i>
Υποοικογένεια:	<i>Prunoideae</i>
Γένος:	<i>Prunus L.</i>
Υπογένος:	<i>Amygdalus Focke</i>
Είδος:	<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch



Εικόνα 1: Καρπός του είδους *Prunus persica*

(Συστηματική κατάταξη του είδους *Prunus persica* κατά το ITIS)

Α.2.2. Περιγραφή-Βοτανικά Χαρακτηριστικά

Η ροδακινιά είναι δέντρο φυλλοβόλο, μετρίου μεγέθους, ταχείας ανάπτυξης και βραχύβιο. Τα φύλλα είναι απλά, κατ' εναλλαγή, επιμήκη, λογχοειδή, οδοντωτά και συνήθως αδενοφόρα. Οι οφθαλμοί διακρίνονται σε ξυλοφόρους, με οξύ και επίμηκες σχήμα και σε απλούς ανθοφόρους, με σχήμα κυλινδρικό, που καλύπτονται με χνούδι. Τα άνθη είναι λευκά ή ρόδινα με πέντε σέπαλα, πέντε πέταλα, έναν ύπερο και 15 έως 30 στήμονες. Η ωοθήκη είναι περίγυνη, μονόχωρη, με δύο σπερματικές βλάστες και καλύπτεται από πυκνό χνούδι. Ο καρπός είναι δρύπη, έχει σχήμα σφαιρικό ή πλακέ με χαρακτηριστική κοιλιακή ραφή, εκπύρηνος ή συμπύρηνος. Ο φλοιός είναι λεπτός, κίτρινος ή λευκός με χνούδι ή χωρίς, και συνήθως κόκκινο επίχρωμα. Η σάρκα είναι λευκή ή κίτρινη, συνεκτική ή μαλακή, εκπύρηνη ή συμπύρηνη, χυμώδης και με γεύση γλυκιά ή υπόξινη. Ο πυρήνας είναι μεγάλος, με πολλές γλυφές, το δε σπέρμα μικρό.

Η ροδακινιά ανθίζει κατά το δεύτερο δεκαπενθήμερο του Μαρτίου, νωρίς ή αργά, ανάλογα με την ποικιλία, ενώ εισέρχεται σε αξιόλογη καρποφορία από το 2^ο- 4^ο έτος της ηλικίας της. Η παραγωγική της ζωή υπολογίζεται σε 15 έως 20 χρόνια (Ποντίκης, 1996).

Α.2.3. Γενικά στοιχεία - Χρήσεις

Είναι, βασικά, δένδρο της εύκρατης ζώνης. Κατάγεται από την Κίνα (Hendrick, 1917), ενώ στην Ελλάδα η καλλιέργειά της διαδόθηκε μεταξύ του 4^{ου} και 3^{ου} π.Χ. αιώνα, προερχόμενη από την Περσία. Σήμερα καλλιεργείται κυρίως στη Μακεδονία, τη Θεσσαλία και την Πελοπόννησο (Ποντίκης, 1996).

Σύμφωνα με το FAOSTAT, η Ελλάδα κατά τη δεκαετία 2000-2010 κατείχε σταθερά την 5^η θέση στην παγκόσμια παραγωγή ροδάκινου, ενώ η προβλεπόμενη ετήσια παραγωγή σε ροδάκινα για το 2014 υπολογίζεται σε 1.294.082 τόνους (*“Europech' 14”*).

Το είδος καλλιεργείται για τους καρπούς του, που είναι από τους πιο εύγευστους και εύπεπτους καρπούς, πλούσιοι σε άλατα, σάκχαρα και βιταμίνες. Χρησιμοποιούνται νωποί, είτε για απευθείας κατανάλωση, είτε στην παρασκευή χυμών, μαρμελάδων, σακχαρούχων κονσερβών, και για αποξήρανση (Ποντίκης, 1996). Η καρδιά του ξύλου είναι αρκετά σκληρή και χρησιμοποιείται στην κατασκευή κτιρίων καθώς είναι ανθεκτικό στους μύκητες και η επεξεργασία του είναι εύκολη (Roosnam et al., 2011).



Εικόνα 2: Ανθισμένη ροδακινιά

A.2.4. Δευτερογενείς μεταβολίτες του *Prunus persica*

Στους δευτερογενείς μεταβολίτες, που έχουν απομονωθεί από το *Prunus persica*, περιλαμβάνονται διάφορα φλαβονοειδή, στεροειδή και τερπένια, φαινολικά οξέα, καροτενοειδή, γιββεριλίνες και διάφορες άλλες ενώσεις.

Στους παρακάτω πίνακες (Πίνακες 1-9) παρουσιάζονται συνοπτικά οι διάφοροι μεταβολίτες, που έχουν απομονωθεί από το συγκεκριμένο είδος:

Πίνακας 1: Κατάταξη φλαβονοειδών που έχουν απομονωθεί από το είδος *Prunus persica* (Poonam et al., 2011)

Φλαβανόνες	Φλαβονόλες		Διυδροφλαβονόλες	Διφλαβόνες/ Διφλαβονόλες	Προανθοκυανιδίνες	Ανθοκυανίνες
Εριοδικτυόλη	3-O-ραμνοσίδης της καμπφερόλης	3-O-β-L-ραμνο-πυρανοσίδης της καμπφερόλης	Αρωμαδενδρίνη	Αναστολέας <i>Prunus a</i> (4)	Αφζελεκίνη	Χρυσανθεμίνη
5-O-β-D-γλυκοσίδης της εσπεριτίνης	Ισοκερκιτρίνη	Μουλτιφορίνη A	7- γλυκοσίδης της ταξιφολίνης	Αναστολέας <i>Prunus b</i> (5)		3- πεντοσυλεξοσίδης της κυανιδίνης
Ναριγενίνη (1)	Καμπφερόλη (2)	Μουλτιφορίνη B				3-γλυκοσίδης της πεωνιδίνης (30)
Περσικονίνη	3-γαλακτοσίδης της καμπφερόλης	Μουλτινοσίδης A				3- πεντοσυλεξοσίδης της πεωνιδίνης
Περσικογενίνη	3-γλυκοπυρανο-σουλ-(1→4)-α-D-γαλακτοπυρανοσίδης της καμπφερόλης	Κερκιτρίνη				
3'-O-β-D γλυκο πυρανοσίδης της περσικογενίνης	3-γλυκοσίδης της καμπφερόλης	Κερκετίνη (3)				
Προυνίνη	3-O-α-L-ραμνο πυρανοσίδης της καμπφερόλης	3-διγλυκοσίδης της κερκετίνης				
		Ρουτίνη				

Πίνακας 2: Στεροειδή και τερπενοειδή του είδους *Prunus persica* σύμφωνα με διάφορες μελέτες (Poonam et al., 2011)

Στεροειδή και Τερπένια	
Δ5-Αβεναστερόλη	
2α,3α-Δυδροξυολεαν-12-εν-28-οϊκό οξύ (6)	
2α,3α-Δυδροξυουρσ-12-εν-28-οϊκό οξύ (7)	
β-Σιτοστερόλη (8)	
β-D-γλυκοσίτης της β-σιτοστερόλης	
Στιγμαστερόλη	
1β,2α,3α,24-Τετραυδροξυολεαν-12-εν-28-οϊκό οξύ (9)	
1β,2α,3α,24-Τετραυδροξυουρσ-12-εν-28-οϊκό οξύ (10)	
2α,3α,24-Τριυδροξυουρσ-12-εν-28-οϊκό οξύ	
2α,3α,24-Τριυδροξυολεαν-12-εν-28-οϊκό οξύ	
2α,3β,24-Τριυδροξυολεαν-12-εν-28-οϊκό οξύ	
Προυνόλη	

Πίνακας 3: Φαινολικά οξέα του είδους *Prunus persica* σύμφωνα με διάφορες μελέτες (Poonam et al., 2011)

Φαινολικά οξέα
<i>Cis, trans</i> (+) Αμπσκιτικό οξύ
p-Κουμαρικό οξύ
Χλωρογενικό οξύ
3,5-Δυδροξυκινναμωμικό
Φερουλικό οξύ
Υδροξυμεθοξυ κινναμικό οξύ
Μεθυλο σαλικυλικό οξύ

Πίνακας 4: Καροτενοειδή του είδους *Prunus persica* σύμφωνα με διάφορες μελέτες (Poonam et al., 2011)

Καροτενοειδή	
trans-Χρυσοξανθίνη	νεο-β-Κρυπτοξανθίνη
α-Καροτένιο	Λουτεΐνη
β-Καροτένιο	trans-Λουτεΐνη
9-cis-β-Καροτένιο	trans-Μουτατοξανθίνη
13-cis-β-Καροτένιο	Περσικάξανθίνη
trans-β-Καροτένιο	Βιολαξανθίνη
Κρυπτοξανθίνη	Ζεαξανθίνη
trans-β-Κρυπτοξανθίνη	trans-Ζεαξανθίνη

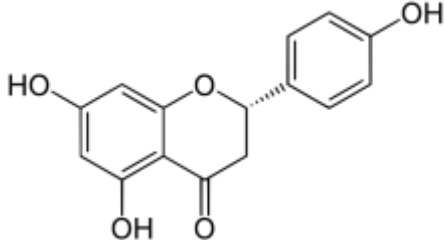
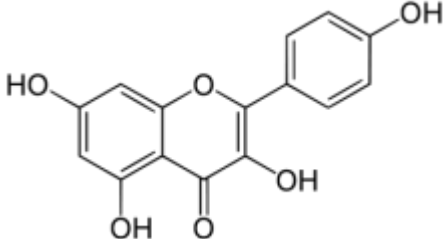
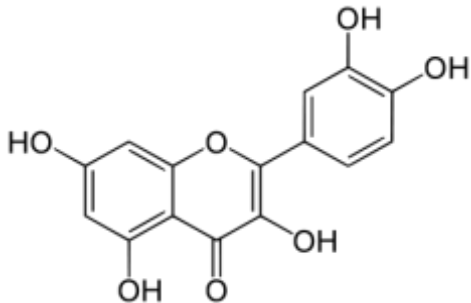
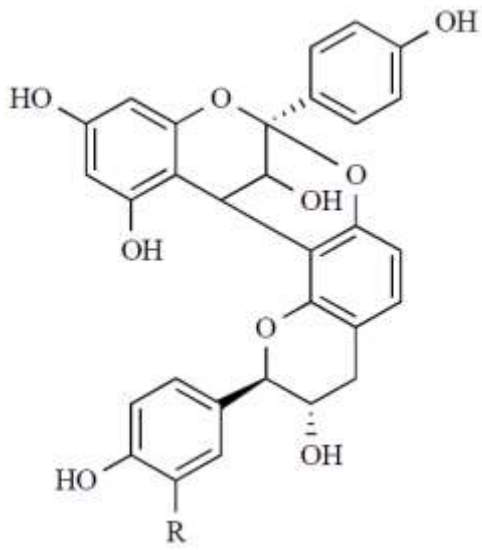
Πίνακας 5: Γιββεριλίνες του είδους *Prunus persica* σύμφωνα με διάφορες μελέτες (Poonam et al., 2011)

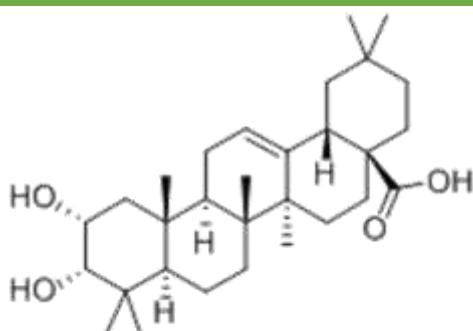
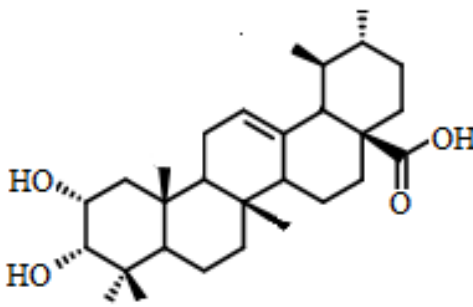
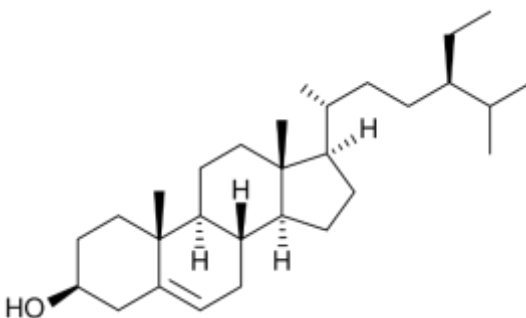
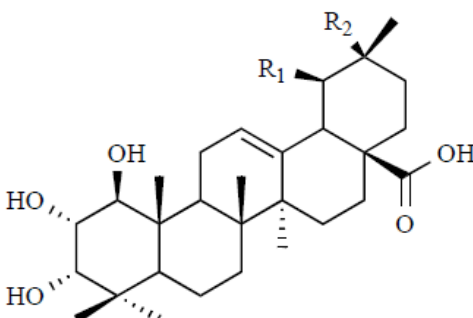
Γιββεριλίνες	
Γιββεριλίνη A3	Γιββεριλίνη GA 86
Γιββεριλίνη A5	Γιββεριλίνη GA87
Γιββεριλίνη A9	Γιββεριλίνη GA95
Γιββεριλίνη A17	ΓιββεριλίνηGA97
Γιββεριλίνη A19	ΓιββεριλίνηGA118
Γιββεριλίνη A30	ΓιββεριλίνηGA119
Γιββεριλίνη A32	ΓιββεριλίνηGA120
Γιββεριλίνη A32 ακετονίδιο	ΓιββεριλίνηGA121
Γιββεριλίνη A44	ΓιββεριλίνηGA122
Γιββεριλίνη A61	ΓιββεριλίνηGA123

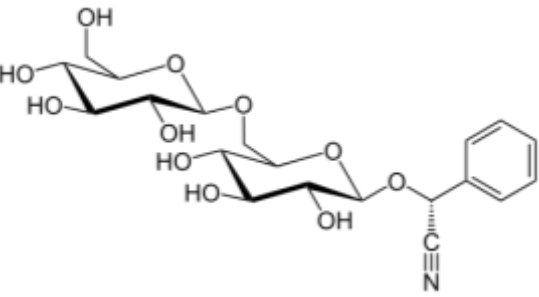
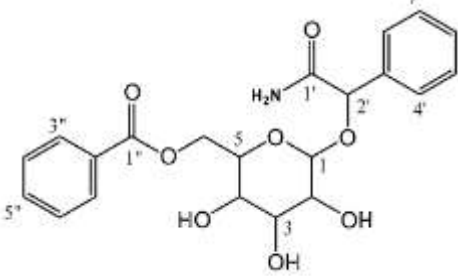
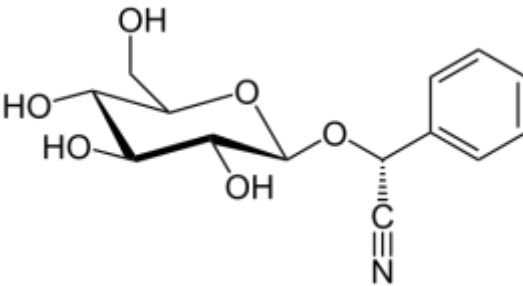
Πίνακας 6: Διάφορες ενώσεις του είδους *Prunus persica* σύμφωνα με διάφορες μελέτες (Poonam et al., 2011)

Διάφορες ενώσεις			
Οξικό οξύ	(2E,6Z)-3,7-Διμεθυλ-2,6-οκταδιεν-1,8-διόλη	(E)-2 Εξεν-1-όλη	Λιναλοόλη
Αμυγδαλίνη (11)	2,7-Διμεθυλ-2E,4E-οκταδιενεδιοϊκό οξύ	trans-2-Εξενάλη	(Z)-οξειδίο λιναλοόλης, πυρανοϊδικό
Βενζαλδεΐδη	γ-Δοδεκαλακτόνη	trans-3-Εξεν-1-όλη	(E)-οξειδίο λιναλοόλης, πυρανοϊδικό
Βενζοϊκό οξύ	Δοδεκανοϊκό οξύ	Εξανοϊκό οξύ	d1-Μανδελικό οξύ
Βενζυλική αλκοόλη	Δομestικοσίδη	4-Υδροξυακετοφαινόνη	Αμυγδαλινικό οξύ
Βενζυλ-β-γεντιοβιοσίδη	1-Δοτριάκοντανόλη	3-Υδροξυ-2-βουτανόνη	Μανδελικό οξύ β-D-γλυκοσίδη
Βουτανοϊκό οξύ	Εξαδεκανοϊκός αιθυλεστέρας	3-Υδροξυ-β-δαμασκόνη	γ- Οκταλακτόνη
Κινναμυλ-αλκοόλη	Ευγενόλη	4-Υδροξυ-β-δαμασκόνη	Περσικάσίδης (12)
Κυκλοδοδεκύνη	Γερανιόλη	3-Υδροξυ-7,8-διυδρο-β-ιονόλη	Σκουαλένιο
γ-Δεκαλακτόνη	Εικοσιενάνιο	3-Υδροξυ-7,8-διυδρο-β-ιονόνη	α- Τερπινεόλη
Διυδροβομφολιόλη	Τριακονταενάνιο	3-Υδροξυ-5,6-εποξυ-β-ιονόνη	Τυροσόλη
(6S)-Διυδροβομφολιόλη	Τριακονταενόλη	3-Υδροξυ-β-ιονόλη	α- Τοκοφερόλη
1,2-διυδρο-1,1,6-τριμεθυλναφθαλένιο	Εξαδεκανοϊκό οξύ	3-Υδροξυ-β-ιονόνη	Προυνασίνη (13)
2,6- Διμεθυλ-1,8-οκτανεδιόλη	Εξανόλη	4-(4-Υδροξυφαινυλ)-2-βουτανόνη	Μαρμελολακτόνη I
Ολεϊκό οξύ	Λινολεϊκό οξύ	Σορβιτόλη	Μαρμελολακτόνη II

Πίνακας 7: Χημικός τύπος διαφόρων ενώσεων του *Prunus persica*.

Φλαβονοειδή του <i>Prunus persica</i>	Χημικός τύπος						
Ναριγενίνη (1)							
Κεμπφερόλη (2)							
Κερκετίνη (3)							
Αναστολέας <i>Prunus</i> a (4) & Αναστολέας <i>Prunus</i> b (5)	 <table border="1" data-bbox="1172 1753 1380 1852"> <tr> <td></td><td>R</td></tr> <tr> <td>(4)</td><td>H</td></tr> <tr> <td>(5)</td><td>O</td></tr> </table>		R	(4)	H	(5)	O
	R						
(4)	H						
(5)	O						

Στεροειδή & Τερπένια του <i>Prunus persica</i>	Χημικός τύπος									
2α,3α-Δυδροξυολεαν-12-εν-28-οϊκό οξύ (6)										
2α,3α-Δυδροξουρσ-12-εν-28-οϊκό οξύ (7)										
β-Σιτοστερόλη (8)										
1β,2α,3α,24-Τετραυδροξυολεαν-12-εν-28-οϊκό οξύ (9) & 1β,2α,3α,24-Τετραυδροξουρσ-12-εν-28-οϊκό οξύ (10)	 <table data-bbox="1109 1772 1395 1866"><tr><th></th><th>R1</th><th>R2</th></tr><tr><td>(9)</td><td>H</td><td>CH3</td></tr><tr><td>(10)</td><td>CH3</td><td></td></tr></table>		R1	R2	(9)	H	CH3	(10)	CH3	
	R1	R2								
(9)	H	CH3								
(10)	CH3									

Διάφορες ενώσεις του <i>Prunus persica</i>	Χημικός τύπος
Αμυγδαλίνη (11)	
Περσικασίδης (12)	
Προυνασίνη (13)	

A.2.5. Βιολογικές δράσεις

Το *Prunus persica* και ιδιαίτερα οι σπόροι του έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στην παραδοσιακή λαϊκή θεραπευτική στην Ινδία, την Κίνα, την Κορέα και σε άλλες ασιατικές χώρες.

Τα φύλλα της ροδακινιάς δρουν ως ανθελμινθικά, εντομοκτόνα, καταπραϋντικά, διουρητικά, μαλακτικά, αποχρεμπτικά και παρασιτοκτόνα. Χρησιμοποιούνται στο λευκόδερμα και στις αιμορροΐδες, ενώ ο πολτός των φύλλων χρησιμοποιείται για να σκοτώσει τα σκουλήκια στις πληγές και τις μυκητιακές μολύνσεις. Η θεραπεία της γαστρίτιδας, του κοκκύτη και της χρόνιας βρογχίτιδας πραγματοποιείται με αφέψημα από φύλλα ροδακινιάς (Kirtikar & Basu, 1984).

Τα λουλούδια θεωρείται ότι έχουν καθαρτική και διουρητική δράση και χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της δυσκοιλιότητας και του οιδήματος, ενώ τα φρούτα χρησιμοποιούνται ως μαλακτικά, αντισκορβουτικά και καταπραϋντικά στομάχου. Επίσης είναι αφροδισιακά, αντιπυρετικά, δρουν σαν τονωτικό του εγκεφάλου, ενισχύουν το αίμα και αντιμετωπίζουν την κακοσμία του στόματος. Οι σπόροι έχουν ανθελμινθική και εμμηναγωγό δράση και το έλαιο που εξάγεται από αυτούς και είναι γνωστό ως «karpha», χρησιμοποιείται ως αμβλωτικό, είναι καλό για την κώφωση, τις αιμορροΐδες, για τα στομαχικά προβλήματα των παιδιών και τους πόνους στα αυτιά (Aziz et al., 2012).

Στην Κίνα και τη Μαλαισία οι πυρήνες των ροδάκινων χρησιμοποιούνται για τις ασθένειες του αίματος, τις διαταραχές της εμμήνου ρύσεως, τον βήχα και τους ρευματισμούς (Kirtikar & Basu, 1984). Το έλαιο των πυρήνων εφαρμόζεται στο κηρίο (δερματική λοίμωξη). Ο φλοιός χρησιμοποιείται στη λέπρα και τον ίκτερο (Aziz et al., 2012).

Το *P. persica* έχει ερευνηθεί στο παρελθόν για την αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη του δράση. Το υδατικό εκχύλισμα των φύλλων της ροδακινιάς επέδειξε αντιοξειδωτική δράση, εξαρτώμενη από τη δόση, σε *in vitro* μοντέλα (Deb et al., 2010), ενώ το αιθανολικό εκχύλισμα των φρούτων της ροδακινιάς σημείωσε αντιαλλεργική αντιφλεγμονώδη δράση (Shin et al., 2010).

Αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική δράση, ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, παρατηρήθηκε και από το μεθανολικό εκχύλισμα του φλοιού του *P. persica*. Το ίδιο εκχύλισμα επίσης επέδειξε, σε συγκεντρώσεις 50-150%, υψηλή αντιβακτηριακή δράση, έναντι θετικών κατά gram (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis* και *Enterococcus faecalis*) και αρνητικών κατά gram βακτηρίων (*Klebsiella pneumonia*, *Mycobacterium smegmatis*). Η παρεμποδιστική αυτή δράση οφείλεται στην παρουσία των βιοδραστικών ουσιών, όπως τη α-σιτοστερόλη, την D-γλυκόζη, το τριακονταενάνιο, την τριακονταενόλη, τα φλαβονοειδή ναριγκενίνη(1), δι-υδρο-καιμπερόλη, κερκετίνη (3) (Chandra et al., 1988) και την περσικασίδη (12) (Raturi et al., 2011).

Το κλάσμα πετρελαϊκού αιθέρα του μεθανολικού εκχυλίσματος επίσης παρεμπόδισε την ανάπτυξη των βακτηρίων *Escherichia coli* και *Staphylococcus aureus*, το κλάσμα διχλωρομεθανίου παρεμπόδισε τα *E. coli* και *K. pneumonia*, ενώ το κλάσμα οξικού αιθυλεστέρα επέδειξε σημαντική δράση κατά του *E. faecalis*.

Επιπλέον, το μεθανολικό εκχύλισμα του φλοιού του ροδάκινου επέδειξε φυτοτοξική δράση σε υψηλές δόσεις, καθώς και χαμηλή εντομοκτόνο δραστηριότητα (Aziz et al., 2012).

Από τα φλαβονοειδή, που έχουν απομονωθεί από το είδος, ενδιαφέρον παρουσιάζει η ναριγενίνη (1), η οποία εμφανίζει αντιοξειδωτική και αντιοιστρογόνο δράση και συμβάλει στη μείωση της χοληστερόλης (Bugianesi et al., 2002; Ho et al., 2001). Η κεμπφερόλη (2) εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση έναντι των ιών του απλού έρπητα (Piæ et al., 2004). Ο Choi και οι συνεργάτες του, το 2002, απομόνωσαν μια σειρά από γλυκοζίτες της καιμπφερόλης και της κερκετίνης από την *P. serrulata*, που έδειξαν *in vitro* αντιοξειδωτική δράση. Έρευνες για την κερκετίνη (3) έδειξαν ότι οι άνθρωποι με την υψηλότερη πρόσληψη κερκετίνης από τα τρόφιμα βρέθηκαν να έχουν χαμηλότερα επίπεδα θνησιμότητας, μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης άσθματος, καρδιακών παθήσεων και καρκίνου του πνεύμονα (Mertens-Talcott et al., 2003; Woude et al., 2003; Knekt et al., 2002; Morrow et al., 2001).

Οι διωδροφλαβονόλες, αρωμαδενδρίνη και ταξιφολίνη, επέδειξαν υψηλή αντιτροφική δραστηριότητα κατά των τερμιτών (Ohmura et al., 2000), ενώ οι δύο νέες διφλαβόνες (4, 5), που απομονώθηκαν από το ροδάκινο, έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξη του σποριόφυτού του (Ohigashi et al., 1982).

Τέλος, η αμυγδαλίνη (11) αποτελεί ένα από τα κύρια χημικά συστατικά του πυρήνα του ροδάκινου που απομονώθηκε το 1830. Τόσο η αμυγδαλίνη, όσο και η συνθετική της μορφή, η λαετρίλη, είναι ευρέως γνωστές ως εναλλακτικές θεραπείες για τον καρκίνο. Ωστόσο και οι δύο ενώσεις είναι τελείως αναποτελεσματικές και πιθανότατα τοξικές (Moertel et al., 1981), καθώς μπορούν να απελευθερώσουν κυανιδίνη στον οργανισμό και να προκαλέσουν δηλητηρίαση (O'Brien et al., 2005).

A.3. *Punica granatum* L.

A.3.1. Βοτανική Ταξινόμηση

Βασίλειο:	<i>Plantae</i>
Υποβασίλειο:	<i>Viridaeplantae</i>
Υπο-υποβασίλειο:	<i>Streptophyta</i>
Άθροισμα:	<i>Tracheophyta</i>
Υποάθροισμα:	<i>Spermatophytina</i>
Υπο- υποάθροισμα:	<i>Angiospermae</i>
Κλάση:	<i>Magnoliopsida</i>
Υπερτάξη:	<i>Rosanae</i>
Τάξη:	<i>Myrtales</i>
Οικογένεια:	<i>Lythraceae</i>
Γένος:	<i>Punica</i> L.
Είδος:	<i>Punica granatum</i> (L.)

(Συστηματική κατάταξη του είδους *Punica granatum* κατά το ITIS)



Εικόνα 3: Καρπός και άνθος του είδους *Punica granatum*

A.3.2. Περιγραφή-Βοτανικά Χαρακτηριστικά

Η ροδιά είναι θάμνος ή μικρό δέντρο ύψους 4 έως 5 μ., μπορεί όμως να φτάσει και το ύψος των 9 μ. Σχηματίζει σφαιρική κόμη με πολλά δύσκαμπτα κλαδιά, με γωνίες και περισσότερα ή λιγότερα αγκάθια ανάλογα με την ποικιλία. Ο κορμός καλύπτεται από έναν κοκκινωπό φλοιό, ο οποίος αργότερα γίνεται γκριζός. Τα φύλλα είναι γυαλιστερά, δερματώδη, έλλοβα, επιμήκη, στρογγυλωπά με κοντό μίσχο, αντίθετα και σταυρωτά σε ορθές γωνίες.

Τα άνθη μπορεί να είναι μονήρη, διπλά ή σε ταξιανθίες μέχρι 5 μαζί. Υπάρχουν τρία είδη ανθέων: τα αρσενικά, τα ερμαφρόδιτα και ο ενδιάμεσος τύπος. Τα αρσενικά άνθη είναι μικρότερου μεγέθους, κωνικά στη βάση τους με βραχείς στύλους, έχουν ατροφικές ωθήκες και είναι άγονα. Τα ερμαφρόδιτα (τέλεια) είναι μεγάλου μεγέθους, κυλινδρικά στη βάση τους, έχουν κανονική ωθήκη και μπορούν να γονιμοποιηθούν και να δώσουν καρπό. Ο ενδιάμεσος τύπος ανθέων έχει μικρότερο ποσοστό καρπόδεσης σε σύγκριση με τα ερμαφρόδιτα. Η άνθηση στη ροδιά διαρκεί για ένα - δύο μήνες, ενώ σε νεαρές ηλικίας δένδρα μπορεί να συνεχίζεται και όλο το καλοκαίρι. Η παρουσία τόσο αρσενικών (στείρων) όσο και ερμαφρόδιτων (γόνιμων) ανθέων στη ροδιά, επιτρέπουν να είναι αυτο-γονιμοποιούμενη όπως και σταυρο-γονιμοποιούμενη.

Ο καρπός είναι σαρκώδης ράγα. Το χρώμα του φλοιού του καρπού ποικίλλει από πράσινο-λευκό-κίτρινο, λευκό-κίτρινο με ροζ ή κόκκινο επίχρωμα, ολοκληρωτικά ερυθρό έως βυσσινί, αλλά και μαύρο χρώμα, ανάλογα με την ποικιλία και το στάδιο ωρίμανσης. Έχει βάρος μεταξύ 150 και 800 γραμμαρίων, διάμετρο 7-12 εκ. και σχήμα στρογγυλό – εξαγωνικό με υπερυψωμένο κάλυκα (κορώνο). Εξωτερικά φέρει το φλοιό, δερματώδες περίβλημα, το πάχος του οποίου ποικίλλει ανάλογα με την ποικιλία. Το εδώδιμο τμήμα του καρπού είναι οι σπόροι. Ο κάθε σπόρος αποτελείται από

έναν ασκό γεμάτο με χυμό, χρώματος λευκού - ρόζ έως έντονου ερυθρού, που περιβάλλεται από λεπτή μεμβράνη. Στο εσωτερικό του ασκού υπάρχει ένα σπέρμα που μπορεί να είναι σκληρό, ημίσκληρο ή μαλακό και μικρό ή μεγάλο. Κάθε ρόδι περιέχει 300-600 σπόρους, ανάλογα με το μέγεθος του καρπού.

Οι περισσότερες ποικιλίες της ροδιάς είναι φυλλοβόλες, υπάρχουν όμως και αείφυλλες. Αρχίζει να καρποφορεί από τον 3ο-4ο χρόνο, η μέγιστη παραγωγή επιτυγχάνεται στον 7ο χρόνο και η παραγωγική ζωή της διαρκεί επί 40 έως 50 χρόνια (Holland et al., 2009).

A.3.3. Γενικά στοιχεία - Χρήσεις

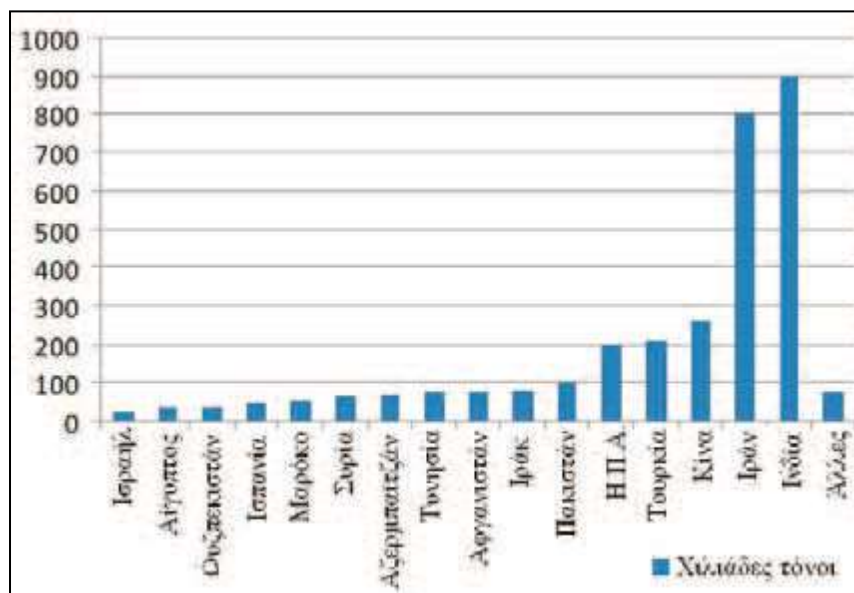
Η ροδιά είναι ένα από τα παλαιότερα γνωστά καλλιεργούμενα οπωροφόρα δένδρα, μεταξύ των επτά ειδών που αναφέρονται στη Βίβλο και αυτοφύεται στο Ιράν και τα Ιμαλάια στη βόρεια Ινδία (3500-2000 π.Χ.). Ο καρπός της είχε σημαντική θέση στη διατροφή και τις προσπάθειες των ανθρώπων να νικήσουν τις ασθένειες. Σήμερα, πληθώρα ιατρικών ερευνητικών εργασιών καταγράφουν τις θεραπευτικές ιδιότητες του ροδιού ενάντια σε ασθένειες, όπως καρκίνος, οι καρδιοαγγειακές παθήσεις, οι αιμορροΐδες, η υπογονιμότητα, η αρτηριακή πίεση, η οστεοαρθρίτιδα, τα αρνητικά συμπτώματα κατά την εμμηνόπαυση κ.α.

Οι ευεργετικές ιδιότητες του ροδιού στην ανθρώπινη υγεία και οι πολύ καλές οργανοληπτικές ιδιότητές του αποτέλεσαν ισχυρά επιχειρήματα για να διαφημιστεί και να γίνει γνωστό σε ανεπτυγμένες χώρες. Αποτέλεσμα ήταν να αυξηθεί η ζήτηση του ροδιού και οι καλλιεργούμενες εκτάσεις σε χώρες όπως ΗΠΑ, Ινδία, Νότια Αφρική, Αργεντινή και πρόσφατα στην Ελλάδα. Σήμερα στο εμπόριο πωλούνται εκτός από νωπούς καρπούς, σπόροι και χυμός ροδιού (100% φρέσκος, μαζί με άλλα ροφήματα και συμπυκνωμένος), διάφορα προϊόντα ροδιού όπως σιρόπι, ξύδι, μαρμελάδα, λάδι από τα σπέρματα, κρασί, αποξηραμένοι σπόροι, συμπληρώματα διατροφής και διάφορα καλλυντικά προϊόντα.



Εικόνα 4: Εδώδιμο μέρος καρπού ροδιού

Σύμφωνα με πρόσφατες εκτιμήσεις (έτος 2010), υπολογίζεται πως η συνολική παγκόσμια παραγωγή ροδιών ετησίως ανέρχεται σε 3 εκατομμύρια τόνους και οι καλλιεργούμενες εκτάσεις σε περισσότερα από 3 εκατομμύρια στρέμματα, από τα οποία ποσοστό μεγαλύτερο του 76% βρίσκονται σε πέντε χώρες (Ινδία, Ιράν, Κίνα, Τουρκία και ΗΠΑ). Χώρες όπως Ισπανία, Αίγυπτος και Ισραήλ, ενώ έχουν μικρότερες καλλιεργούμενες εκτάσεις, ανέπτυξαν περισσότερο τις εξαγωγές, το μάρκετινγκ και δημιούργησαν νέες ποικιλίες.



Εικόνα 5: Εκτίμηση της παρούσας παραγωγής ροδιών στον κόσμο (Melgarejo et al.)

Η Ινδία είναι η μεγαλύτερη παραγωγός χώρα ροδιών στον κόσμο, με μεγάλης έκτασης φυτεύσεις οπωρώνων ροδιάς, οι οποίοι έγιναν μόλις τις τελευταίες δύο δεκαετίες. Η Κίνα είναι επίσης μεγάλη παραγωγός χώρα ροδιών έχοντας 1.100.000 στρέμματα με μικρή παραγωγή, περίπου 250.000 τόνους, λόγω των σχετικά πρωτόγονων μέσων καλλιέργειας που εφαρμόζονται. Οι ΗΠΑ παράγουν περίπου 200.000 τόνους και από αυτούς εξάγουν 17.000 τόνους στην Ιαπωνία, τον Καναδά, το Μεξικό και την Αγγλία, ενώ το 80% της παραγωγής οδηγείται στη βιομηχανία για παραγωγή χυμού. Στην Ευρώπη, η Ισπανία είναι η κύρια παραγωγός χώρα ροδιών με παραγωγή περίπου 45.000 τόνους εκ των οποίων περισσότερο από το 55% εξάγεται. Μεγάλο ενδιαφέρον, για την καλλιέργεια της ροδιάς, έχουν δείξει τελευταία χώρες του νοτίου Ημισφαιρίου όπως η Αργεντινή, η Χιλή, το Περού, η Νότια Αφρική και η Αυστραλία.

Στην Ελλάδα στοιχεία της Εθνικής Στατιστικής Υπηρεσίας αναφέρουν πως το 2007 υπήρχαν 2.000 στρέμματα με ροδιές που βρίσκονταν κυρίως στην Πελοπόννησο, ενώ τα τελευταία χρόνια αδημοσίευντες πληροφορίες αναφέρουν πως τα στρέμματα πιθανόν να έχουν φτάσει τις 15.000. Εμπορικοί οπωρώνες ροδιάς εγκαθίστανται σε πολλές περιοχές της Ελλάδας, όπως τη Ξάνθη, τις Σέρρες, τη Δράμα, το Κιλκίς, την Πέλλα, τη Λαμία και άλλες (Δρογούδη και συνεργάτες, 2012).

A.3.4. Δευτερογενείς μεταβολίτες του *Punica granatum*

Πολλές προσπάθειες έχουν γίνει κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών με σκοπό να διερευνηθούν τα συστατικά του ροδιού, τα οποία κατηγοριοποιούνται σε πολυφαινόλες, συμπεριλαμβανομένων των ταννινών και των φλαβονοειδών, τα αλκαλοειδή, τα οργανικά οξέα, κλπ.

Ταννίνες

Οι υδρολυόμενες ταννίνες διαφόρων δομών, συμπεριλαμβανομένων των ελλαγιταννινών και των γαλλοταννινών, αποτελούν τα πιο διαδεδομένα συστατικά που απαντώνται σε διάφορα μέρη του ροδιού (Πίνακας 9). Συμπυκνωμένες ταννίνες, ωστόσο, σπάνια βρίσκονται σε αυτό το φυτό.

Οι ελλαγιταννίνες βρίσκονται κυρίως στο περικάρπιο, το φλοιό, τους σπόρους και τα άνθη. Για παράδειγμα, η πουνικαλίνη (14) και η πουνικαλαγίνη (15) είναι τα κύρια συστατικά του περικάρπιου και του φλοιού, ωστόσο, πρακτικά δεν παρατηρούνται στα φύλλα. Τα παράγωγα του ελλαγικού οξέως, είναι άφθονα σε όλα τα μέρη του φυτού σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις (0,1% στα άνθη έως και 0,2% στο περικάρπιο και τα φύλλα). Οι γαλλοταννίνες βρίσκονται κυρίως στα φύλλα, ενώ σπάνια έχουν παρατηρηθεί σε άλλα μέρη του φυτού (Wang et al. 2010).

Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή, που έχουν απομονωθεί από ρόδι (Πίνακας 10), περιλαμβάνουν φλαβόνες, φλαβονόλες, ανθοκυανιδίνες και φλαβαν-3-όλες. Τα έντονα χρώματα του περικάρπιου και του χυμού οφείλονται στις ανθοκυανιδίνες και τις φλαβαν-3-όλες, των οποίων η συγκέντρωση στο φυτό κυμαίνεται ανάλογα με το χρόνο ωρίμανσης. Οι ανθοκυανιδίνες, που έχουν αναφερθεί στο ρόδι, συνήθως είναι υπό την μορφή του γλυκοζίτη, με άγλυκα τη δελφινιδίνη, την κυανιδίνη και την πελαργονιδίνη, ενώ οι φλαβαν-3-όλες βρίσκονται μόνο στη μη γλυκοζυλιωμένη μορφή και συμπεριλαμβάνουν την κατεχίνη, την επικατεχίνη, την επιγαλλοκατεχίνη και τα παράγωγά τους. Οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες συνιστούν τα σημαντικότερα φλαβονοειδή του περικάρπιου και των φύλλων, τα οποία συχνά υφίστανται ως γλυκοζίτες με άγλυκα της λουτεολίνης (16), της καιμπφερόλης (2), της κερκετίνης (3), της απιγενίνης (17) και της ναρινγκίνης (Wang et al. 2010).

Πίνακας 8: Κύριες ταννίνες του *Punica granatum* (Wang et al., 2010)

Compound name	Plant part*	Bioactivity	Reference
Brevifolin	L	Hypolipidemic; antioxidant; hepatoprotective	Nawwar et al. 1994; Wang et al. 2005
Brevifolin carboxylic acid	L		Nawwar et al. 1994a
Ethyl brevifolin carboxylate	F, L	Antiviral	Hussain et al. 1997
Brevifolin carboxylic acid monopotassium sulphate	L		Hussain et al. 1997
3,4,8,9,10-penta-hydroxydibenzo[<i>b,d</i>]pyran-6-one	L		Nawwar et al. 1994a
Casuarinin	P	Antiviral; antioxidant	Satomi et al. 1993
Corilagin	L, P	Anti-hypertensive; anti-neoplastic	Satomi et al. 1993; Nawwar et al. 1994b
Ellagic acid	F, J, L, P	Anti-neoplastic; skin-whitening	Amakura et al. 2000a; Wang et al. 2004
Gallagylidilactone	P	Anti-inflammatory; anti-neoplastic	Satomi et al. 1993
Galllic acid	F, J, L, P	Anti-inflammatory; anti-mutagenic; antioxidant; antiviral	Amakura et al. 2000a; Huang et al. 2005a
Methyl gallate	P		Kasimu et al. 2009
1,2,3-tri- <i>O</i> -galloyl-β- ⁴ C1-glucose	L		Nawwar et al. 1994b
1,2,4-tri- <i>O</i> -galloyl-β-glucose	L		Hussain et al. 1997
1,3,4-tri- <i>O</i> -galloyl-β-glucose	L		Hussain et al. 1997
1,2,6-tri- <i>O</i> -galloyl-β- ⁴ C1-glucose	L		Nawwar et al. 1994b
1,4,6-tri- <i>O</i> -galloyl-β- ⁴ C1-glucose	L		Nawwar et al. 1994b
1,2,4,6-tetra- <i>O</i> -galloyl-β-D-glucose	L		Tanaka et al. 1985
1,2,3,4,6-penta- <i>O</i> -galloyl-β-D-glucose	L		Tanaka et al. 1985
3,6-(<i>R</i>)-hexahydroxydiphenyl-(α/β)- ¹ C4-glucose	L		Nawwar et al. 1994b
1,4-di- <i>O</i> -galloyl-3,6-(<i>R</i>)-hexahydroxydiphenyl-β-glucose	L		Hussain et al. 1997
1,2-di- <i>O</i> -galloyl-4,6- <i>O</i> -(<i>S</i>)-hexahydroxydiphenyl β-D-glucopyranoside	F	Anti-neoplastic	Xie et al. 2008
2- <i>O</i> -galloylpunicalin	B, W		Tanaka et al. 1986
2,3-(<i>S</i>)-HHDP-D-glucose	B		Tanaka et al. 1986; Liu et al. 2007
6- <i>O</i> -galloyl-2,3-(<i>S</i>)-HHDP-D-glucose	B		Tanaka et al. 1986
Granatin A	P		Tanaka et al. 1990
Granatin B	P	Anti-inflammatory	Tanaka et al. 1990; Liu et al. 2007
3- <i>O</i> -methylellagic acid	W		El-Toomy et al. 2003
3,3'-di- <i>O</i> -methylellagic acid	S	Antioxidant	Wang et al. 2004
4,4'-di- <i>O</i> -methylellagic acid	W		El-Toomy et al. 2003
3,3',4'-tri- <i>O</i> -methylellagic acid	S	Antioxidant	Wang et al. 2004
3'- <i>O</i> -methyl-3,4-methylenedioxycellagic acid	W		El-Toomy et al. 2003
Pedunculagin	P	Anti-neoplastic; antioxidant	Satomi et al. 1993
Pomegranate	F		Wang et al. 2006a
Punicacortecin A	B	Anti-HIV	Tanaka et al. 1986
Punicacortecin B	B	Anti-HIV	Tanaka et al. 1986
Punicacortecin C	B	Anti-HIV	Tanaka et al. 1986
Punicacortecin D	B	Anti-HIV	Tanaka et al. 1986
Punicafolin	L	Anti-neoplastic	Nawwar et al. 1994b
Punicalagin	B, L, P, R	Antioxidant; anti-hypertensive	Gil et al. 2000; Anand et al. 2004; Liu et al. 2007
Punicalin	B, L, P, R	Antioxidant; anti-HIV	Tanaka et al. 1986; Gil et al. 2000; Liu et al. 2007
Punigluconin	B	Antioxidant	Tanaka et al. 1986
Tellimagrandin	P	Anti-neoplastic	Satomi et al. 1993
Diellagic acid rhamnosyl(1→4)glucopyranoside	W		Sayed et al. 2002
5- <i>O</i> -galloylpunicacortecin D	W		Sayed et al. 2002

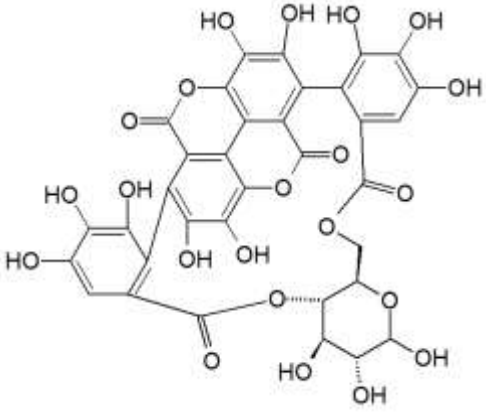
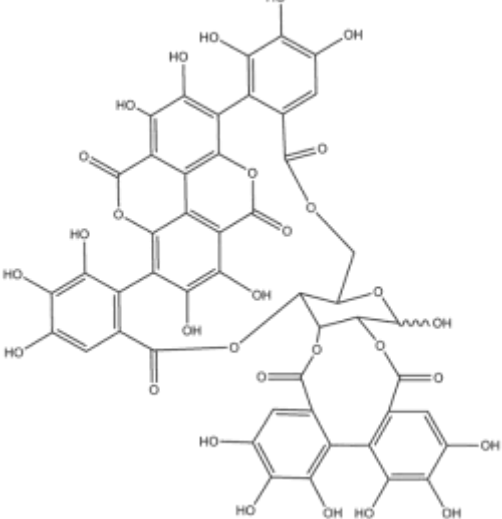
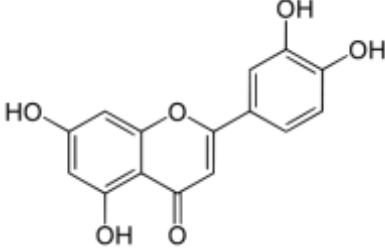
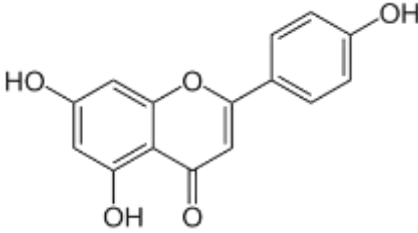
*B: bark; F: flowers; J: juice; L: leaves; P: pericarp; S: seeds; W: wood.

Πίνακας 9: Κύρια φλαβονοειδή του *Punica granatum* (Wang et al., 2010)

Compound name	Plant part*	Bioactivity	Reference
Apigenin	L	Antioxidant; anti-inflammatory; anti-neoplastic	Nawwar <i>et al.</i> 1994a
Apigenin 4'- <i>O</i> -glucopyranoside	L		Nawwar <i>et al.</i> 1994a
Catechin	J, P	Anti-neoplastic; antioxidant	de Pascual-Teresa <i>et al.</i> 2000
Catechol	J	Antioxidant; anti-neoplastic	Liu HX <i>et al.</i> 2002
Cyanidin	P	Antioxidant	Noda <i>et al.</i> 2002
Cyanidin 3- <i>O</i> -glucoside	J	Antioxidant	Hernández <i>et al.</i> 1999
Cyanidin 3,5-di- <i>O</i> -glucoside	J	Antioxidant	Hernández <i>et al.</i> 1999
Delphinidin 3- <i>O</i> -glucoside	J		Hernández <i>et al.</i> 1999
Delphinidin 3,5-di- <i>O</i> -glucoside	J		Hernández <i>et al.</i> 1999
Epicatechin	J, P	Anti-neoplastic	de Pascual-Teresa <i>et al.</i> 2000
Epigallocatechin 3-gallate	J, P	Anti-neoplastic	de Pascual-Teresa <i>et al.</i> 2000
Flavan-3-ol	J, P	Anti-neoplastic	de Pascual-Teresa <i>et al.</i> 2000
Isoquercetin	J	Hepatoprotective	Liu HX <i>et al.</i> 2002; Rena <i>et al.</i> 2009
Kaempferol	P	Antioxidant; anti-inflammatory	van Elswijk <i>et al.</i> 2004
Kaempferol-3- <i>O</i> -glucoside	P	Antioxidant	van Elswijk <i>et al.</i> 2004
Kaempferol-3- <i>O</i> -rhamnoglucoside	P	Anti-hypertensive	van Elswijk <i>et al.</i> 2004
Luteolin	P	Antioxidant; anti-inflammatory	van Elswijk <i>et al.</i> 2004
Luteolin 7- <i>O</i> -glucoside	P	Antioxidant	van Elswijk <i>et al.</i> 2004
Luteolin 4'- <i>O</i> -glucopyranoside	L	Antioxidant	Nawwar <i>et al.</i> 1994a
Luteolin 3'- <i>O</i> -glucopyranoside	L		Nawwar <i>et al.</i> 1994a
Luteolin 3'- <i>O</i> -xylopyranoside	L		Nawwar <i>et al.</i> 1994a
Naringenin-4'-methylether-7- <i>O</i> - α -L-arabinofuranosyl(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside	B		Srivastava <i>et al.</i> 2001
Naringin	P	Antiviral; antibacterial	Lansky <i>et al.</i> 2007
Pelargonidin	P	Anti-oxidant; antibacterial	Noda <i>et al.</i> 2002
Pelargonidin 3- <i>O</i> -glucoside	J	Antioxidant	Hernández <i>et al.</i> 1999
Pelargonidin 3,5-di- <i>O</i> -glucoside	J		Hernández <i>et al.</i> 1999
Procyanidin	J	Antioxidant; anti-neoplastic; anti-inflammatory	Liu <i>et al.</i> 2002
Prodelfinidin	P	Antioxidant	Plumb <i>et al.</i> 2003
Punicaflavone	F		Ali M <i>et al.</i> 2006
Quercetin	J, P	Anti-neoplastic; antioxidant; antiviral	Artik 1998
Quercetin-3,4-dimethylether-7- <i>O</i> - α -L-arabinofuranosyl(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside	B	Antioxidant	Chauhan <i>et al.</i> 2001
Rutin	P, J	Antioxidant; anti-hypertensive; antiviral	Artik 1998

*B: bark; F: flowers; J: juice; L: leaves; P: pericarp.

Πίνακας 10: Ορισμένες ταννίνες και φλαβονοειδή του *Punica granatum* και ο χημικός τους τύπος

Τανίνες & Φλαβονοειδή του <i>Punica granatum</i>	Χημικός τύπος
Πουνικαλίνη (14)	
Πουνικαλαγίνη (15)	
Λουτεολίνη (16)	
Απιγενίνη (17)	

Αλκαλοειδή

Αλκαλοειδή υπάρχουν κυρίως στον φλοιό του βλαστού, της ρίζας, καθώς επίσης και στο χυμό του ροδιού. Τα κύρια είδη των αλκαλοειδών είναι δύο, οι πιπεριδίνες και οι πυρρολιδίνες, με τις πιπεριδίνες να βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση. Οι πιπεριδίνες βρίσκονται τόσο στο φλοιό του βλαστού όσο και της ρίζας, για παράδειγμα, η ισοπελετιερίνη, η ψευδοπελετιερίνη και η N-μεθυλισοπελετιερίνη είναι τα κύρια αλκαλοειδή του φλοιού του βλαστού, ενώ η 2- (2'-υδροξυπροπυλο) -Δ1-πιπεριδίνη, η 2- (2'-προπενυλο) -Δ1-πιπεριδίνη, και η νορψευδοπελετιερίνη βρίσκονται σε αφθονία στο φλοιό της ρίζας. Οι πυρρολιδίνες μέχρι τώρα έχουν αναφερθεί σε μικρή συγκέντρωση μόνο στο φλοιό της ρίζας. Επιπλέον, στο χυμό του ροδιού έχουν βρεθεί ινδολαμίνες όπως η σεροτονίνη, η τρυπταμίνη και η μελατονίνη (Wang et al. 2010).

Πίνακας 11: Κύρια αλκαλοειδή του *Punica granatum* (Wang et al., 2010)

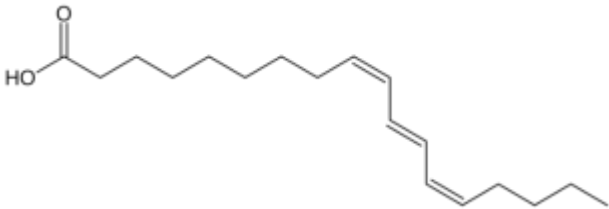
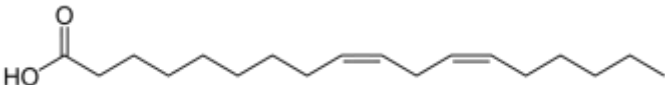
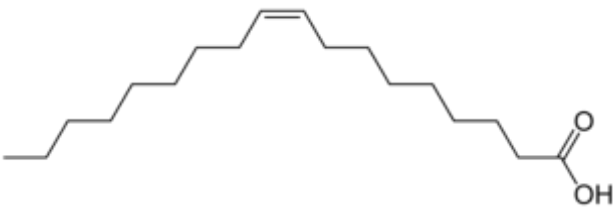
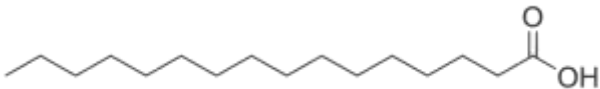
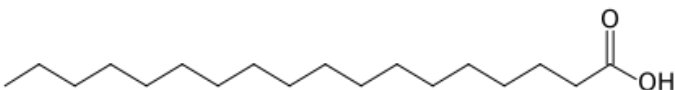
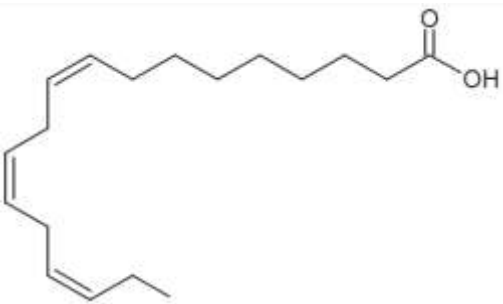
Compound name	Plant part*	Bioactivity	Reference
Tryptamine	J		Badria 2002
Serotonin	J	Antioxidant	Badria 2002
Melatonin	J	Antioxidant; anti-inflammatory; hepatoprotective	Badria 2002
Pelletierine	B, P, R		Neuhofer et al. 1993; Vidal et al. 2003
N-methylpelletierene	B, R		Neuhofer et al. 1993
Pseudopelletierene	B, R		Neuhofer et al. 1993
Norpseudopelletierene	R		Neuhofer et al. 1993
Sedridine	R		Neuhofer et al. 1993
2-(2'-hydroxypropyl)Δ1-piperidine	R		Neuhofer et al. 1993
2-(2'-propenyl)Δ1-piperidine	R		Neuhofer et al. 1993
N-(2',5'-dihydroxyphenyl)pyridium chloride	L		Andreas et al. 2007
Hygrine	R	Anti-neoplastic	Neuhofer et al. 1993
Norhygrine	R		Neuhofer et al. 1993
N-acetyl-sedridine	B, R		Neuhofer 1990

*B: bark; F: flowers; J: juice; L: leaves; P: pericarp; R: root.

Οργανικά οξέα

Οι σπόροι του ροδιού είναι πλούσιοι σε ακόρεστα λιπαρά οξέα, κυρίως πουνικικό οξύ (**18**), λινολεϊκό οξύ (**19**), ελαϊκό οξύ (**20**), παλμιτικό οξύ (**21**), στεατικό οξύ (**22**), και λινολενικό οξύ (**23**), των οποίων η συνολική συγκέντρωση υπολογίζεται στο 15.26% του βάρους των σπόρων. Ο χυμός περιέχει κυρίως λιπαρά οξέα ευθείας αλυσίδας, από τα οποία το κιτρικό οξύ και το μηλικό οξύ είναι οι κύριες ενώσεις με συγκέντρωση έως 4.85 και 1,75 g / L, αντίστοιχα. Επίσης, στο χυμό βρέθηκε τρυγικό, οξαλικό και ηλεκτρικό οξύ. Τα φαινολικά οξέα που απαντώνται είναι το καφεϊκό, το φουμαρικό, το χλωρογενικό και το p-κουμαρικό οξύ και συνήθως υπάρχουν στο χυμό ή / και στο περικάρπιο (Wang et al. 2010).

Πίνακας 12: Ορισμένα οργανικά οξέα του *Punica granatum* και ο χημικός τους τύπος

Οργανικά οξέα του <i>Punica granatum</i>	Χημικός τύπος
Πουνικικό οξύ (18)	
Λινολεϊκό οξύ (19)	
Ελαϊκό οξύ (20)	
Παλμιτικό οξύ (21)	
Στεατικό οξύ (22)	
Λινολενικό οξύ (23)	

Τριτερπένια και στεροειδή

Στα άνθη και στους σπόρους του φυτού βρίσκονται συνήθως τριτερπενικά άγλυκα, όπως το ουρ-
σουλικό οξύ, το ολεανολικό οξύ, το μασλινικό οξύ, το πουνικανολικό οξύ, η φριεδελίνη, το με-
τουλινικό οξύ και το ασιατικό οξύ.

Τα στεροειδή βρίσκονται μόνο στους σπόρους και αποτελούνται από στερόλες, όπως χοληστε-
ρόλη, στιγμαστερόλη, καμστερόλη, β-σιτοστερόλη, δαυκοστερόλη, 17-α-εστραδιόλη, οιστρόνη,
τεστοστερόνη και εστριόλη (Wang et al. 2010)

Άλλες ενώσεις

Άλλες ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων σακχαριτών, κουμαρινών και λιγνάνιων, αναφέρθηκαν ε-
πίσης στο ρόδι. Για παράδειγμα, η κουμπεστρόλη, η κωνειφερυλο 9-O-[β-δαπιοφουρανο-
συλ(1→6)]-O-β-D-γλυκοπυρανοσίδης, σιναυλ 9-O-[β δαπιοφουρανοσυλ(1→6)]-O-β-D-γλυκο-
πυρανοσίδης, φαιναίθυλο ρουτινοσίδης και ικαρισίδης D1 απομονώθηκαν από τους σπόρους
(Wang et al. 2004), και γλυκόζη, φρουκτόζη και σουκρόζη βρέθηκαν στο χυμό.

Πίνακας 13: Συγκεντρωτικός πίνακας των δευτερογενών μεταβολιτών του *Punica granatum*
στα διάφορα μέρη του φυτού (Jurenka, 2008)

Μέρος φυτού	Δευτερογενείς Μεταβολίτες
Χυμός	ανθοκυανίνες, γλυκόζη, ασκορβικό οξύ, ελλαγικό οξύ, γαλλικό οξύ, καφε- ϊκό οξύ, κατεχίνη, γαλλική επιγαλλοκατεχίνη, κερκετίνη, ρουτίνη, σίδη- ρος, αμινοξέα
Έλαιο σπερμάτων	95% πουνισικό οξύ, ελλαγικό οξύ, λιπαρά οξέα, στερόλες
Περικάρπιο	Φαινολικές πουνικαλαγίνες, γαλλικό οξύ και άλλα λιπαρά, κατεχίνη, γαλ- λική επιγαλλοκατεχίνη, κερκετίνη, ρουτίνη και άλλες φλαβονόλες, φλα- βόνες, φλαβονόνες, ανθοκυανιδίνες
Φύλλα	Ταννίνες (πουνικαλίνη & πουνικαφολίνη), γλυκοσίδες φλαβονών (λουτεο- λίνη & απιγενίνη)
Άνθη	Γαλλικό οξύ, ουρσουλικό οξύ, τριτερπενοειδή (μασλινικό & ασιατικό οξύ)
Ρίζα και Φλοιός	Ελλαγιταννίνες (όπως πουνικαλίνη & πουνικαλαγίνη), αλκαλοειδή πιπερι- δίνης

A.3.5. Βιολογικές δράσεις

A.3.5.1. Παραδοσιακές χρήσεις

Το *Punica granatum* έχει χρησιμοποιηθεί στη λαϊκή θεραπευτική από πολλές χώρες. Στην Τουρκία η στάχτη του εξωκάρπιου εφαρμόζοταν ως προστατευτικό κατά των δερματικών μολύνσεων. Στο Ιράν τα άνθη χρησιμοποιούνταν σαν στυπτικό, αιμοστατικό, αντιβακτηριακό, αντιμυκητιακό και αντικό, σαν θεραπευτικό για τα τραύματα από κόψιμο, τη βρογχίτιδα, τη διάρροια, τα πεπτικά προβλήματα, τη βελτίωση της ανδρικής σεξουαλικότητας, τα μολυσμένα τραύματα και το διαβήτη, σύμφωνα με την Ουνανική θεραπευτική βιβλιογραφία (Παραδοσιακή Ινδική Θεραπευτική). Στην κινεζική θεραπευτική τα λουλούδια χρησιμοποιούνταν για την κάλυψη των λευκών μαλλιών στους νεαρούς άνδρες. Επιπλέον, στην αγιουβερδική το ρόδι χρησιμοποιούνταν σαν αντιπαρασιτικό, σαν τονωτικό του αίματος και για τη θεραπεία του έλκους (Dipak et al., 2012).

A.3.5.2. Φαρμακολογικές δράσεις

I. Αγγειοπροστατευτικές ιδιότητες

❖ Αντιοξειδωτική δράση

Η αντιοξειδωτική δράση *in vitro* και *in vivo* είναι η πιο σημαντική δράση του ροδιού, καθώς αποτελεί τη βάση των άλλων ιδιοτήτων του, συμπεριλαμβανομένης της λιπιδιακής ρύθμισης, της αντιφλεγμονώδους, αντινεοπλασματικής και αντιδιαβητικής του δράσης (Lansky et al., 2007). Οι αντιοξειδωτικές ουσίες υπάρχουν κυρίως στα φύλλα και τα φρούτα, καθώς επίσης και στους σπόρους, το χυμό και το περικόρπιο. Ο χυμός και το υδατικό εκχύλισμα των φύλλων μπορεί να στοχεύει και να καταστρέφει ελεύθερες ρίζες, όπως ενεργά είδη οξυγόνου (ROS), ενεργά είδη αζώτου (RNS), ρίζες υδροξυλίου (OH) και μονοξειδίου του αζώτου (NO). Το εκχύλισμα του ροδιού είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό, σε σχέση με εκχυλίσματα από άλλα φρούτα. Οι αντιοξειδωτικές ουσίες του ροδιού είναι κυρίως οι ενώσεις με φαινολικές υδροξυλομάδες και διπλούς δεσμούς, όπως οι ταννίνες, τα φλαβονοειδή και τα ακόρεστα λιπαρά οξέα. Σημαντικές και θετικές συσχετίσεις βρέθηκαν μεταξύ ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας και των φαινολικών συστατικών, υποδεικνύοντας ότι οι φαινολικές ενώσεις είναι τα κυρίαρχα αντιοξειδωτικά συστατικά του ροδιού (Wang et al., 2010).

Οι ταννίνες, που είναι ουσίες εξαιρετικά αντιοξειδωτικές, βρέθηκαν σχεδόν σε όλα τα μέρη του ροδιού, που συνήθως περιέχουν πολλές εξαϋδροξυδιφαινολικές ομάδες και γαλλικές ομάδες. Αυτές οι δύο ομάδες έχουν την ικανότητα να παρέχουν πρωτόνια και να σχηματίζουν σταθερές ελεύθερες ρίζες, οι οποίες τους επιτρέπουν να είναι οι μεγάλες δραστικές ομάδες στο μόριο των ταννινών (Wang et al., 2005). Το ελλαγικό οξύ και η πουνικαλαγίνη θεωρούνται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική δράση του ροδιού (Sestili et al., 2007).

Τα φλαβονοειδή, επίσης, συμβάλουν στην αντιοξειδωτική δραστηριότητα, λόγω της επίδρασής τους στον περιορισμό των ελεύθερων ριζών. Τα σημαντικότερα φλαβονοειδή του ροδιού, ιδιαίτερα η κατεχίνη, η κερκετίνη, η καμπερόλη και η εκουόλη, διαδραματίζουν σημαντικό φωτοπροστατευτικό ρόλο στις βλάβες του δέρματος, που προκαλούνται από την UVB ακτινοβολία, γεγονός που αποδεικνύεται από το αυξημένο επίπεδο έκφρασης του προκολλαγόνου τύπου I και το μειωμένο επίπεδο έκφρασης της MMP-1. Φαινολικά υδροξύλια, όπως αυτά στα μόρια της λουτεολίνης, της δελφινιδίνης και της κυανιδίνης, όπως επίσης της λουτεολίνης και της πελαργονιδίνης, είναι οι υπεύθυνες ομάδες για την αντιοξειδωτική δράση. Άλλα δραστικά αντιοξειδωτικά συστατικά είναι τα λιγνάνια και τα ακόρεστα λιπαρά οξέα (Wang et al., 2010).

Ως εκ τούτου, η αντιοξειδωτική δράση του ροδιού είναι ένα πολυπαραγοντικό φαινόμενο με τη χημική συνεργειακή δράση πολλών ενώσεων.

❖ Λιπιδιακή ρύθμιση

Τα εκχυλίσματα από τα φύλλα, το περικάρπιο, ο χυμός και οι σπόροι έχουν αναφερθεί να έχουν ευεργετική επίδραση στην ρύθμιση των λιπιδίων του αίματος η οποία μπορεί να αποδοθεί στην αντιοξειδωτική τους δράση. Οι ταννίνες των φύλλων και ιδιαίτερα το ελλαγικό οξύ είναι η δραστική ουσία για τη ρύθμιση των λιπιδίων, η οποία μπορεί να μειώσει τα επίπεδα των TC, VLDL, TC / HDL και των τριγλυκεριδίων, να αυξήσει τα επίπεδα της HDL και έτσι να διαδραματίσει θετικό ρόλο στην αντιμετώπιση της λιπιδιακής μεταβολικής διαταραχής και της παχυσαρκίας.

❖ Αντιυπερτασική δράση

Η αντι-υπερτασική δράση του ροδιού είναι πολύ ισχυρή και ενεργεί με έναν πολύπλοκο τρόπο, ωστόσο, τα βασικά συστατικά, που είναι υπεύθυνα, φαίνεται να είναι οι πολυφαινόλες. Αυτές οι πολυφαινόλες βρίσκονται κυρίως στο χυμό, ο οποίος μπορεί να μειώσει σημαντικά τα επίπεδα μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης του ορού κατά 36% και τη μείωση της συστολικής πίεσης κατά 5%, ανάλογα με τη χορηγούμενη δόση (Wang et al., 2010).

II. Προστασία πεπτικού συστήματος

❖ Γαστρο-προστατευτικότητα

Το περικάρπιο και τα φύλλα του ροδιού αναφέρθηκαν να έχουν γαστροπροστατευτική δραστηριότητα, η οποία προκύπτει από τη στυπτική τους ιδιότητα και την αναστολή των βακτηρίων, οφείλεται δε στις πολυφαινόλες.

Οι πολυφαινόλες στο περικάρπιο, σε πειράματα σε ποντίκια, έδειξαν ότι δρουν προστατευτικά από επαγόμενες με αιθανόλη βλάβες του γαστρικού βλεννογόνου και μειώνουν τη συχνότητα των γαστρικών βλαβών κατά 53 έως 80%. Επίσης, βελτιώνουν την επούλωση του γαστρικού έλκους με μια θεραπευτική αναλογία της τάξεως του 97,4%. Η επίδραση αυτή πιστεύεται ότι σχετίζεται με την στυπτική ιδιότητα των ταννινών, οι οποίες είναι ικανές να δεσμεύονται με τις πρωτεΐνες, έτσι ώστε να επιταχυνθεί η επούλωση του έλκους ή του τραύματος (Murthy et al., 2004, Ajaikumar et al., 2005). Ωστόσο, αυτή η προστατευτική δράση μπορεί επίσης να συσχετίζεται με την αντιβακτηριακή δραστηριότητα του περικαρπίου, επειδή έχει αναφερθεί ότι το υδατικό εκχύλισμα του

περικαρπίου ανέστειλε σημαντικά την ανάπτυξη του Ελικοβακτηρίδιου του πυλωρού (HP) (Hu et al., 2006).

Το εκχύλισμα των φύλλων, το οποίο περιέχει άφθονες τανίνες, μπορεί να είναι ένας καλός γαστροπροστατευτικός παράγοντας. Μπορεί να αυξήσει την δραστηριότητα πεψίνης, να βελτιώσει την έκκριση της χολής, να ενισχύσει το περισταλτισμό του εντέρου, να αναστείλει την έκκριση γαστρικού οξέος, και να μειώσει τη συχνότητα εμφάνισης του γαστρικού έλκους (Wang et al., 2010).

❖ Ηπατοπροστατευτικότητα

Το εκχύλισμα των ανθέων επέδειξε ηπατοπροστατευτική δράση κατά του Fe-NTA, που προάγει την ηπατοτοξικότητα στα ποντίκια και πιθανότατα οφείλεται στην αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινόλων του εκχυλίσματος (Kaur et al., 2006, Çelik et al., 2009).

❖ Αντιδιαρροϊκότητα

Τόσο το οργανικό, όσο και το υδατικό εκχύλισμα των φύλλων, των ριζών, του φλοιού και του βλαστού επέδειξε αντι-διαρροϊκή δραστηριότητα, για την οποία μπορεί να είναι υπεύθυνη η αντιβακτηριακή δράση των υδρολυόμενων ταννινών ενάντια στα *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *S. flexneri* και *Salmonella typhi* (Mathabe et al., 2006).

III. Αντιμικροβιακή δράση

❖ Αντιβακτηριακή δράση

Εκτός από τα *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* και τους μικροοργανισμούς *Shigella* που αναφέρθηκαν πιο πάνω, τα εκχυλίσματα του ροδιού έχουν ισχυρή παρεμποδιστική δράση έναντι κοινών παθογόνων βακτηρίων, ιδιαίτερα στα θετικά κατά Gram. Έχει αναφερθεί ότι τόσο τα ανθεκτικά, όσο και τα ευαίσθητα στελέχη στη μεθικυκλίνη του *Staphylococcus aureus* ήταν ευαίσθητα στα εκχυλίσματα του περικαρπίου και των φρούτων, ενώ παρεμποδίστηκε και η παραγωγή εντεροτοξίνης, υποδεικνύοντας τις θεραπευτικές ιδιότητες του ροδιού ενάντια στις βακτηριακές μολύνσεις (Machado et al., 2003; Braga et al., 2005). Επιπρόσθετα, άλλοι μικροοργανισμοί όπως τα *Streptococcus hemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus paratyphosus*, *Proteus bacillus*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans*, κ.α. επίσης αναφέρθηκε ότι είναι ευαίσθητα σε εκχυλίσματα ροδιού (Wang et al., 2010). Οι αντιβακτηριακές ιδιότητες του ροδιού οφείλονται στις ταννίνες, όπως οι ελλαγιταννίνες και στα φλαβονοειδή (Machado et al. 2003; Wang et al., 2008; Al-Zoreky 2009).

❖ Αντι-υική δράση

Οι πολυφαινόλες, ιδίως οι ταννίνες, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αντι-υική δράση, εξαιτίας της ιδιότητας του να καθιζάνουν τις πρωτεΐνες και να επηρεάζουν δυσμενώς τα ένζυμα που

εμπλέκονται στον κύκλο ζωής του ιού. Ο Zhang και οι συνεργάτες ανέφεραν ότι το υδατικό εκχύλισμα του περικαρπίου, που περιέχει υψηλή περιεκτικότητα σε ταννίνες, αδρανοποιεί σημαντικά τους HSV-2 και HBV, μέσω αναστολής της DNA πολυμεράσης *in vitro*, ανάλογα με τη χορηγούμενη δόση (Zhang et al. 1995, 1997). Όπως και το περικάρπιο, ο χυμός περιέχει επίσης τεράστιες ποσότητες ταννινών και έδειξε αξιόλογη επίδραση στην αναστολή ή την εξάλειψη του HIV-1 (Neurath et al., 2004). Το εκχύλισμα πολυφαινόλης ανέστειλε την αντιγραφή της ανθρώπινης γρίπης (H3N2) *in vitro*, κατέστειλε αντιγραφή του ιού της γρίπης Α σε κύτταρα MDCK, και παρεμπόδισε τη συγκόλληση των ερυθροκυττάρων του κοτόπουλου (cRBC) που προκαλείται από τον ιό της γρίπης.

Τέσσερις μεγάλες πολυφαινόλες στο ρόδι, δηλαδή ελλαγικό οξύ, καφεϊκό οξύ, λουτεολίνη και πουνικαλαγίνη αξιολογήθηκαν για τη δράση τους κατά του ιού της γρίπης και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πουνικαλαγίνη είναι η πιο αποτελεσματική. Η πουνικαλαγίνη μπλοκάρει την αντιγραφή του RNA του ιού, ανέστειλε την συγκόλληση των ερυθρών αιμοσφαιρίων που προκαλείται στο κοτόπουλο από τον ιό και είχε αντι-ιικά αποτελέσματα (Haidari et al. 2009).

IV. Αντικαρκινική δράση

Το ρόδι μπορεί να επηρεάσει την εμφάνιση και την ανάπτυξη των όγκων σε πολλές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης φλεγμονής, της αγγειογένεσης, της απόπτωσης, του πολλαπλασιασμού και της εισβολής.

❖ Αντιφλεγμονώδης δράση

Οι αντιφλεγμονώδεις ενώσεις του ροδιού ερευνήθηκαν κυρίως στους σπόρους και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι πολυφαινόλες και τα λιπαρά οξέα είναι τα κύρια αντιφλεγμονώδη συστατικά. Οι πολυφαινόλες από έλαιο ψυχρής έκθλιψης σπόρων έχει αναφερθεί ότι καταστέλλουν τη φλεγμονή σε καρκινικά κύτταρα του παχέως εντέρου (Adams et al., 2006), ενώ το πουνισικό οξύ αναστέλλει την ανάπτυξη της φλεγμονής μέσω της καταστολής της βιοσύνθεσης της προσταγλανδίνης (Nugteren et al., 1987).

❖ Αντι-αγγειογένεση

Ο χυμός και το έλαιο των σπόρων του ροδιού μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την αγγειογένεση σε χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη κοτόπουλου (CAM) *in vivo* με καθοδική ρύθμιση του προ αγγειογενετικού αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) σε MCF-7 οιστρογόνο-εξαρτώμενα καρκινικά κύτταρα μαστού (Toi et al., 2003).

❖ Επαγωγή απόπτωσης

Ο καρπός συμπεριλαμβανομένου του περικαρπίου, του χυμού και των σπόρων αναφέρθηκε ότι διεγείρει την απόπτωση τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Ο χυμός, οι πολυφαινόλες του περικαρπίου και το έλαιο των σπόρων επάγουν ισχυρά την απόπτωση σε ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου του προστάτη *in vivo* (Albrecht et al., 2004).

❖ Παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού και της εισβολής καρκινικών κυττάρων

Τα εκχυλίσματα του περικαρπίου έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε διαφορετικές ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Τα εκχυλίσματα ανέστειλαν επιλεκτικά τα καρκινικά κύτταρα και επηρέασαν ελάχιστα τα φυσιολογικά, παρέχοντας μια πιθανή εφαρμογή για τη θεραπεία του καρκίνου. Η καταστολή της εισβολής των καρκινικών κυττάρων είναι επίσης μια ιδιότητα του εκχυλίσματος του ροδιού στην αναστολή του όγκου. (Wang et al., 2010).

V. Αντιδιαβητική δράση

Τα άνθη μπορούν να μειώσουν σημαντικά τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα ζώων με διαβήτη τύπου 2 με διάφορους μηχανισμούς, όπως ενίσχυση της έκφρασης mRNA, βελτίωση της ευαισθησίας του υποδοχέα ινσουλίνης, αύξηση της περιφερειακής γλυκόζης, κ.λπ.

VI. Ανοσορύθμιση

Το ακατέργαστο εκχύλισμα του περικαρπίου και των σπόρων έχει ανοσορυθμιστική δράση. Το υδατικό κλάσμα του περικαρπίου έχει αξιόλογη ανοσοδιεγερτική δράση σε κουνέλια (Ross et al., 2001), ενώ το σπορέλαιο καθιστά δυνατή την παραγωγή των ανοσοσφαιρινών στα κύτταρα σπλήνας ποντικών και πιθανώς βελτιώνει τη λειτουργία των B κυττάρων *in vivo* (Yamasaki et al., 2006).

VII. Άλλες δράσεις

Το υδατικό εκχύλισμα και το λάδι των σπόρων μπορεί να προάγει τον πολλαπλασιασμό της υποδερμίδας και επιδερμίδας (Aslam et al., 2006), το υδατικό εκχύλισμα του περικαρπίου μπορεί να καταστείλει τη γονιμότητα του σπέρματος και να αποτρέψει την εγκυμοσύνη σε κουνέλια (Sun et al., 1994), ενώ το εκχύλισμα πετρελαϊκού αιθέρα από σπόρους εκδηλώνει υψηλή οιστρογονική δραστηριότητα που μπορεί να ανταγωνιστεί την προγεστερόνη (Wang et al., 2010).

A.3.5.3. Φυτοπροστατευτικές δράσεις

Αρκετές είναι οι μελέτες που έχουν διεξαχθεί για τη φυτοπροστατευτική δράση των εκχυλισμάτων της φλούδας του ροδιού, καταδεικνύοντας το ως έναν ισχυρό παράγοντα αντιμετώπισης των εχθρών των γεωργικών καλλιεργειών.

I. Αντιμικροβιακή δράση έναντι φυτοπαθογόνων βακτηρίων

Το αιθανολικό εκχύλισμα της φλούδας του ροδιού μείωσε επιτυχώς τις επιπτώσεις και τη βαρύτητα της βακτηριακής νόσου, η οποία προκαλείται στην τομάτα από το στέλεχος *P. syringae* pv. *tomato* της νόσου, ενώ δεν καταγράφηκε καμία σημαντική φυτοτοξική επίδραση στην τομάτα. Η

in vivo αντιβακτηριακή δραστηριότητα αυτής της φυσικής ουσίας εξακολούθησε να είναι αποτελεσματική για τουλάχιστον 15 ημέρες, προσφέροντας τη δυνατότητα της αντικατάστασης, μείωσης ή ακόμη και εναλλασσόμενης θεραπείας με χαλκό. Οι κύριες δραστικές ουσίες του εκχυλίσματος είναι το ελλαγικό και το γαλλικό οξύ, τα οποία είναι γνωστό ότι έχουν αντιβακτηριακή δράση (Quattrucci et al., 2013).

Επίσης, το εκχύλισμα της φλούδας του ροδιού έδειξε αξιοσημείωτη αντιβακτηριακή δράση έναντι στα φυτοπαθογόνα *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas pisi* και *Xanthomonas malvacearum* (Mhaisgawali et al., 2010), καθώς και τα *Erwinia carotovora* and *Xanthomonas campestris* (Hassan et al., 2013).

II. Αντιμικροβιακή δράση έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων

Έρευνες έχουν δείξει ότι τα εκχυλίσματα του φλοιού του *Punica granatum* έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξη πολλών φυτοπαθογόνων μυκήτων, οι οποίοι περιλαμβάνουν είδη του γένους *Penicillium*, δύο μυκοτοξιογενικά στελέχη του *Aspergillus*, δύο στελέχη του *Colletotrichum*, καθώς και τους *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea*, και *Rhizoctonia solani* (Azzouz et al., 1982, Tayel et al., 2009, Tayel et al., 2011, Jayaprakasha et al., 2006, Osorio et al., 2010, Tehranifar et al., 2011). Επίσης, τα υδατικά εκχυλίσματα της φλούδας του ροδιού αποδείχθηκαν σημαντικά δραστικά έναντι των *Alternaria alternata*, *Stemphylium botryosum*, και *Fusarium spp.* (Glazer et al., 2012).

A.4. *Eucalyptus globulus*

A.4.1. Βοτανική Ταξινόμηση

Βασίλειο:	<i>Plantae</i>
Υποβασίλειο:	<i>Viridaeplantae</i>
Υπο-υποβασίλειο:	<i>Streptophyta</i>
Άθροισμα:	<i>Tracheophyta</i>
Υποάθροισμα:	<i>Spermatophytina</i>
Υπο- υποάθροισμα:	<i>Angiospermae</i>
Κλάση:	<i>Magnoliopsida</i>
Υπερτάξη:	<i>Rosanae</i>
Τάξη:	<i>Myrtales</i>
Οικογένεια:	<i>Myrtaceae</i>
Γένος:	<i>Eucalyptus</i>
Είδος:	<i>Eucalyptus globulus</i> (Labill)
(Συστηματική κατάταξη του είδους <i>Eucalyptus globulus</i> κατά το ITIS)	



Εικόνα 6: Φύλλα και άνθος του *Eucalyptus globulus*

A.4.2. Περιγραφή-Βοτανικά Χαρακτηριστικά

Ο *Eucalyptus globulus* (Labill) είναι ένα αειθαλές δέντρο με ύψος 40-70 μ., με ξερό φλοιό που μαδάει, βγάζοντας μακριές ταινίες, αφήνοντας τον κορμό λείο και το χρώμα του σταχτίλευκο. Ο ευθύς ογκώδης κορμός έχει διάμετρο 0.6-2 μ., φέρει μια στενή, ανώμαλη κορώνα από μεγάλα κλαδιά με αρωματικό φύλλωμα που γέρνει. Το ριζικό σύστημα είναι βαθύ και διακλαδισμένο. Τα φύλλα είναι άτριχα, μακριά, δερματώδη με σκούρο πράσινο χρώμα και στις δύο επιφάνειες, συνήθως κυρτά, αιχμηρά στην άκρη και οξεία στη βάση που φύονται κατ' εναλλαγή. Τα άνθη του είναι λευκά με πολλούς νηματοειδείς λευκούς στήμονες και 3-5χωρη ωοθήκη, που όταν γονιμοποιηθούν γίνονται γκρίζες κάψες με 3 έως 6 εγκοπές. Σπόροι πολλοί, ακανόνιστα ελλειπτικοί, θαμποί και μαύροι (Little, 1983).

Η ανθοφορία γίνεται Ιούνιο – Αύγουστο και είναι το ψηλότερο ανθοφόρο φυτό. Σε δυσμενείς συνθήκες έχει θαμνώδη εμφάνιση. Οι κορυφές των βλαστών και τα φύλλα συλλέγονται από τον Απρίλιο μέχρι τον Αύγουστο.

Αναπτύσσεται καλά σ' ένα ευρύ φάσμα εδαφών, με προτίμηση σε γόνιμα, μέτρια υγρά εδάφη, αν και είναι δυνατόν να αναπτυχθεί και σε άγονα, ξηρά, βαλτώδη εδάφη. Παρά το γεγονός ότι έχει μεγάλη κλιματική προσαρμοστικότητα, οι πιο επιτυχημένες εισαγωγές σε όλο τον κόσμο έχουν γίνει σε περιοχές με ήπια, εύκρατα κλίματα ή σε κλίματα με υψηλές, δροσερές ανυψώσεις, που παρατηρούνται στις τροπικές περιοχές. Αν και γενικά αναπτύσσεται καλά σε χώρες με μεσογειακή ή κρύα μέγιστη βροχόπτωση, αναπτύσσεται καλά και σε θερμές βροχοπτώσεις, όπως για παράδειγμα σε κλίματα της Αιθιοπίας και της Αργεντινής (Boland et al., 2006).

A.4.3. Γεωγραφική Εξάπλωση

Ο ευκάλυπτος Blue Gum της Τασμανίας (*E. globulus*) είναι ένα από τα πιο γνωστά είδη ευκαλύπτου στον κόσμο. Μπορεί να βρεθεί σε πάρκα και κήπους σε πολλά μέρη της Αυστραλίας, έχει όμως εδραιωθεί και στο εξωτερικό. Είναι το είδος του γένους όπου συναντάται στην Καλιφόρνια, την Ισπανία, τη Γαλλία, την Πορτογαλία, τη Χιλή, την Αλγερία, τη Βραζιλία και την Ινδία. Είναι από τα πρώτα είδη δένδρων που εισήχθησαν σε άλλες χώρες από την Αυστραλία και είναι πλέον

το πιο ευρέως φυτεμένο είδος ευκαλύπτου στον κόσμο. Το υποείδος Blue Gum έχει επίσης φυτευτεί πρόσφατα στην πατρίδα του την Τασμανία, όπου είναι σημαντική πηγή ξυλοπολτού.



Εικόνα 7: *Eucalyptus Globus*

Στο εγγενές φυσικό του περιβάλλον ο Blue Gum αναπτύσσεται σε αμιγείς συστάδες και σε μείγμα με όμοιους φλοιούς ευκαλύπτων *Eucalyptus Obliqua*, Mountain-Ash *Eucalyptus* (Regnans), Manna *Eucalyptus* (Viminalis), Black Peppermint *Eucalyptus* (Amygdalina), και White Peppermint *Eucalyptus* (Pulchella).

Παρά το γεγονός ότι, ως επί το πλείστον, έχει καλλιεργηθεί σε φυτείες με μόνο ένα είδος ευκαλύπτου στις χώρες όπου έχει εισαχθεί, έχει επίσης καλλιεργηθεί σε συνδυασμό και με δύο είδη. Στην Καλιφόρνια συνήθως αναμειγνύεται με το δασικό είδος ευκαλύπτου RedGum (*Tereticornis*) και το ποταμίσιο είδος ευκαλύπτου Redgum (*Camaldulensis*). Στη Χαβάη έχει

καλλιεργηθεί σε συνδυασμό με πολλούς άλλους ευκαλύπτους.

Η μεγαλύτερη πυκνότητα καλλιέργειας ευκαλύπτου Blue Gum βρίσκεται στην Καλιφόρνια και τη Χαβάη κι αυτό γιατί είναι περισσότερο πιθανό να σχετίζεται με το μάλλον ξηρό κλίμα, που παρέχει τις καλύτερες κλιματολογικές συνθήκες στην περιοχή για τα είδη (Boland et al., 2006).

Στην Ελλάδα ο ευκάλυπτος εισήχθη από τον βοτανολόγο και λόγιο Θεόδωρο Ορφανίδη το 1862. Καλλιεργείται κυρίως στη νότια Ελλάδα και στη Χαλκιδική και βρίσκεται σε δάση και κήπους.

A.4.4. Χημική σύσταση

Χημικά συστατικά του ξύλου

Τα κυριότερα συστατικά, που εντοπίστηκαν σε ακετονικό εκχύλισμα ξύλου, περιλαμβάνουν στερόλες, εστέρες στερόλης, λιπαρά οξέα, στεροειδικές κετόνες, υδρογονάνθρακες και τριγλυκερίδια. Ήσσονος σημασίας ενώσεις, όπως λιπαρές αλκοόλες, μονο- και διγλυκερίδια, κηροί και τοκοφερόλες, εντοπίστηκαν επίσης μεταξύ των λιπιδίων του ξύλου (Kumar et al., 2011).

Χημικά συστατικά των φύλλων

Το αιθέριο έλαιο των φύλλων αποτελείται κυρίως από οξυγονωμένα μονοτερπένια, μονοτερπένια και οξυγονωμένα σεσκιτερπένια. Από αυτά, τα κύρια οξυγονωμένα μονοτερπένια είναι η 1,8-ευκαλυπτόλη, η α-τερπινεόλη, η τερπινεν-4-όλη και η λιναλοόλη, τα κύρια μονοτερπένια είναι το α-πινένιο και το β-πινένιο, ενώ τα κύρια σεσκιτερπένια είναι η α-ευδεσμόλη, η (-)-γλομπουλόλη και η επιγκλομπουλόλη. Άλλα σημαντικά συστατικά είναι η α-τερπινεόλη, το β-σαβινένιο, η L-πινοκαρβεόλη και το τερπινολένιο (Kumar et al., 2011).

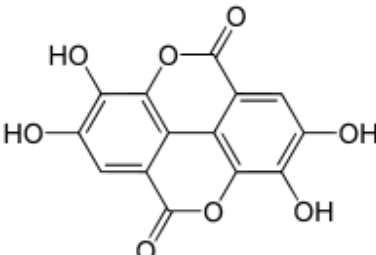
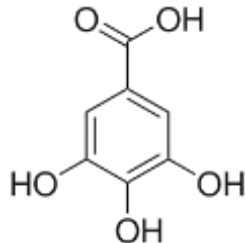
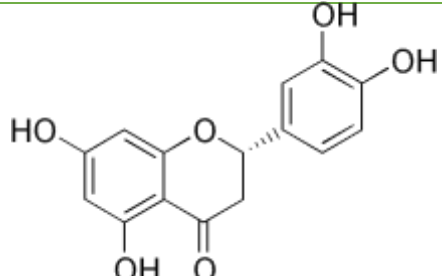
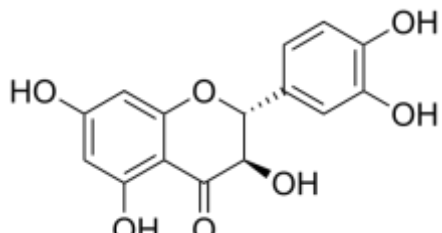
Χημικά συστατικά των καρπών

Οι καρποί περιέχουν β-σιτοτερόλη, βετουλινικό οξύ, στιγμαστερόλη, ευσκαρφικό οξύ, 2α-υδροξυβετουλινικό οξύ, μακροκαρπάλη Α και Β, ολεανολικό οξύ, 3,4,3'-Ο-τριμεθυλελλαγικό οξύ, 3-Ο-μεθυλελλαγικό οξύ 4'-Ο-(2''-Ο-ακετυλ)-α-ραμνοπυρανοσίδης, καμαλδουλενσίδης, 3-Ο-μεθυλελλαγικό οξύ 4'-Ο-α-ραμνοπυρανοσίδης, 3-Ο-μεθυλελλαγικό οξύ, ελλαγικό οξύ και γαλλικό οξύ (Kumar et al., 2011).

Χημικά συστατικά του φλοιού

Ο φλοιός του *E. Globulus* χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερη αφθονία σε ολικές φαινόλες, πολυμερικές προανθοκυανιδίνες και ελλαγιταννίνες. (Conde et al., 1996; Cadahva et al., 1997a). Συγκεκριμένα, παρουσιάζει υψηλή περιεκτικότητα σε ελλαγιταννίνες και ελλαγικό οξύ(24), ενώ σημαντική είναι και η παρουσία γαλλικού οξέως (25), εριοδικτυόλης (26) και ταξιφολίνης (27). Πιο σπάνια απαντώνται οι δευτερογενείς μεταβολίτες απιγενίνη (17), ναριγενίνη (1) κερκετίνη (13), βανιλλικό και πρωτοκατεχικό οξύ και πρωτοκατεχική αλδεΐδη (Conde et al., 1996).

Πίνακας 14: Χημικά συστατικά του φλοιού του ευκαλύπτου και ο χημικός τους τύπος.

Χημικά συστατικά του φλοιού	Χημικός τύπος
Ελλαγικό οξύ (24)	
Γαλλικό οξύ(25)	
Εριοδικτυόλη(26)	
Ταξιφολίνη(27)	

A.4.5. Ειδικές Χρήσεις

Ο ευκάλυπτος Blue Gum είναι ένα από τα πιο πολύτιμα δέντρα στον κόσμο με πολλά διαφορετικά χαρακτηριστικά και χρήσεις. Το ξύλο του είναι ανθεκτικό και ανοιχτόχρωμο με διακριτικούς αυξητικούς δακτυλίους και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ποικιλία σκοπών, όπως σε σιδηροδρομικούς πασσάλους, τραβέρσες, την επιπλοποιία, οικοδομικές κατασκευές και την παραγωγή ξυλοπολτού. Ο φλοιός του είναι αποδεκτός στις περισσότερες διαδικασίες πολτοποίησης και προσθέτει σημαντικά στην απόδοση. Χρησιμοποιείται κυρίως για λευκασμένα προϊόντα που κατασκευάζονται από θειϊκές, θειώδεις ή δισουλφιδικές διαδικασίες.

Μια από τις βασικότερες εφαρμογές του στη βιομηχανία είναι στην παραγωγή χαρτοπολτού. Ο ευκάλυπτος αποτελεί την πιο κοινή πηγή μικρής ίνας για παραγωγή χαρτοπολτού. Ο *Eucalyptus globulus* και ο *Eucalyptus grandis* είναι οι πλέον χρησιμοποιούμενες ποικιλίες για την παραγωγή χαρτιού. Συγκριτικά με άλλα ξύλα, το μήκος των ινών του ευκαλύπτου είναι σχετικά μικρό και ομοιόμορφο, με ελαφριά τραχύτητα. Τέλος, ο υψηλός αριθμός ινών ανά γραμμάριο, καθιστά τον ευκάλυπτο κατάλληλο για τη δημιουργία μικρών και λεπτών εφημερίδων.

Το είδος αυτό είναι μια σημαντική πηγή καυσόξυλων σε πολλές χώρες του κόσμου. Το ξύλο καίγεται ελεύθερα, αφήνει λίγη τέφρα, και παράγει καλό ξυλάνθρακα. Είναι επίσης ιδανικός για χρήση ως καύσιμο για την παραγωγή βιομάζας και τις ανανεώσιμες πηγές ενέργειας (FAO, 1981).

Όλα τα μέρη του ευκαλύπτου μπορεί να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία χρωστικών ουσιών, οι οποίες είναι πλούσιες σε πρωτεϊνικές φυτικές ίνες και κατάλληλες για χρήση σε μετάξι και μαλλί. Το υλικό, που απομένει από την επεξεργασία του φυτού, μπορεί στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί ως λίπασμα (Brooker and Kleinig, 2006).

Λόγω της μεγάλης ανθεκτικότητας του στον άνεμο χρησιμοποιείται σαν ανεμοφράκτης, ενώ λόγω της ικανότητάς του να φυτρώνει κατά μήκος του στελέχους, μπορεί να λειτουργήσει ως μία φυσική ηχομόνωση κατά μήκος των εθνικών οδών. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι, τα φύλλα του δέντρου παράγουν υδροδιαλυτές φυτοτοξίνες, που μπορούν να αποτρέψουν την ανάπτυξη πολλών αγριόχορτων και ποωδών φυτών, ενώ αποτρέπει και τη βοσκή των ζώων.

Άλλες χρήσεις περιλαμβάνουν την εξαγωγή των αιθέριων ελαίων από τα φύλλα του, τα οποία χρησιμοποιούνται στην αρωματοποιία, την αρωματοθεραπεία και την παρασκευή προϊόντων οικιακής χρήσης, την παραγωγή εξαιρετικής ποιότητας μελιού από το νέκταρ του και την παραγωγή λικέρ (η ονομασία του συγκεκριμένου λικέρ είναι **Eucalittino 38°** και παρασκευάζεται αποκλειστικά από φύλλα ευκαλύπτου).

Τέλος, η καλλιέργεια του ευκαλύπτου έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμη σε ορισμένους ασιατικούς υγροτόπους και στη Νότια Αμερική, λόγω της ικανότητάς του να απομακρύνει την υγρασία και να βοηθάει στην εξάλειψη παράσιτων και κουνουπιών, συντελώντας στον έλεγχο ασθενειών, όπως είναι η ελονοσία (FAO, 1981).

A.4.6. Φαρμακευτικές χρήσεις

Το δέντρο ευκαλύπτου, το οποίο είναι γηγενές της Αυστραλίας και της Τασμανίας, χρησιμοποιείται για ιατρικούς σκοπούς, όπως την επούλωση πληγών και τις μυκητιακές λοιμώξεις. Τα μέρη του ευκαλύπτου, που χρησιμοποιούνται γι' αυτούς τους σκοπούς, είναι τα φύλλα, τα έλαια που εξάγονται από τα φύλλα και τα υποπροϊόντα από τις κορυφές των κλαδιών. Αν και υπάρχουν πολλά είδη ευκαλύπτου, με κάποια είδη να φτάνουν τα 20 μέτρα ύψος ενώ άλλα να φτάνουν στο ύψος θάμνου, το είδος του ευκαλύπτου που χρησιμοποιείται περισσότερο για ιατρικούς σκοπούς είναι ο *Eucalyptus globulus*.

Ο ευκάλυπτος συμβάλλει στην ανακούφιση των συμπτωμάτων του κρυολογήματος, της γρίπης, της συμφόρησης του στήθους, του πονόλαιμου, της βρογχίτιδας, του άσθματος, της ιγμορίτιδας,

της ρινίτιδας, της πνευμονίας και άλλων λοιμώξεων του αναπνευστικού (Boland et al., 2006). Οι αποχρεμπτικές ιδιότητές του επιτρέπουν την απομάκρυνση της βλέννας, μειώνουν τη φλεγμονή και βοηθούν στην καλύτερη αναπνοή. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί με τη μορφή υγρού να ληφθεί ως χάπι, σε συσκευές εισπνοής ή και αλοιφή.

Οι αναγνωρισμένες αντιμικροβιακές και αντιμυκητιακές ιδιότητές του, τον καθιστούν ως την πιο αποτελεσματική επιλογή για την καταπολέμηση των μικροοργανισμών, όπως είναι ο σταφυλόκοκκος ή ο ιός της λύσσας. Ενδείκνυται ακόμα και για την καταπολέμηση της φυματίωσης. Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για εξωτερική χρήση σε θεραπείες διαφόρων δερματικών ασθενειών και καταστάσεων, όπως εγκαύματα, αμυχές, πληγές, δοθιήνες, έλκη, ακόμη και για την ακμή, την ουλίτιδα ή τον έρπητα. Είναι αποτελεσματικό στις περιπτώσεις σκασμένων χεριών, την καταπολέμηση της πιτυρίδας και για την βελτίωση των κηλίδων στα χέρια.

Τα φαρμακευτικά έλαια που εξάγονται από τον ευκάλυπτο μπορεί να περιέχουν σημαντικές ποσότητες ευκαλυπτόλης και θεωρείται ότι είναι τα πιο ισχυρά αντισηπτικά της κατηγορίας τους. Αυτός ο τύπος ελαίου, κατά κύρια βάση, χρησιμοποιείται ως τονωτικό και ως αντισηπτικό, το οποίο μπορεί να βοηθήσει στη θωράκιση της καρδιακής λειτουργίας, ενώ θωρακίζει και τον οργανισμό. Βοηθά στην ανακούφιση των πόνων της πλάτης, των ποδιών και των αρθρώσεων, καθώς μειώνει σημαντικά και τους μυϊκούς πόνους και συμβάλλει στην ανακούφιση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και της οστεοαρθρίτιδας.

Μια άλλη ιδιότητα του ευκαλύπτου τον καθιστά κατάλληλο για διαβητικούς, καθώς μειώνει τα επίπεδα του σακχάρου στο αίμα, καταπολεμώντας ακόμη και την εμφάνιση της νόσου σε μερικές περιπτώσεις, ενώ μερικοί χρησιμοποιούν τον ευκάλυπτο και ως εντομοαπωθητικό τρίβοντας τον επάνω στο δέρμα. Επίσης από το δέντρο μπορεί να ληφθεί μια ελαιορητίνη με τη δημιουργία τωμών στον κορμό. Αυτή περιέχει ταννίνες με στυπτική δράση και χρησιμοποιείται στη διάρροια και τις φλεγμονές (Braun L., Cohen M., 2007).

Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν στο φλοιό του κορμού του *E. globulus* οδήγησαν στην απομόνωση 4 ραμνοσιδών ελλαγικού οξέως, οι οποίοι επέδειξαν αντιοξειδωτική δράση. (Η αντιοξειδωτική δράση υπολογίστηκε μετρώντας την παρεμπόδιση της λιπιδικής υπεροξειδωσίας σε μικροσωμάτια συκωτιού ποντικών) (Kima et al., 2001).

Λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του φλοιού του ευκαλύπτου σε φαινολικά παράγωγα (>200 mg GAE*/g εκχυλίσματος) και φλαβονοειδή (>10 mg QE**/g) τα εκχυλίσματα του κορμού του παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά παρεμπόδισης της οξειδωσης του λινολεϊκού οξέως, καθώς και έντονη αντιβακτηριακή δράση έναντι θετικών κατά Gram βακτηρίων (Luis et al., 2014).

A.4.7. Παρενέργειες

Ανάμεσα στις πιο κοινές παρενέργειες είναι η διάρροια, η ναυτία και ο έμετος. Για εξωτερική εφαρμογή, υπάρχει η πιθανότητα αλλεργικών αντιδράσεων όπως είναι η δερματίτιδα. Η εφαρμογή του σε καθαρή μορφή μπορεί να προκαλέσει προβλήματα στο δέρμα για το λόγο αυτό συνιστάται η αραίωσή του με νερό, αλκοόλη ή άλλο φυτικό έλαιο (Braun L., Cohen M., 2007).

A.5. Γένος *Pinus*

Το γένος *Pinus* έχει 13 είδη στην Ευρώπη και τη Μεσόγειο, αρκετά από τα οποία υποδιαιρούνται σε υποείδη και/ ή ποικιλίες, και κάποια από αυτά έχουν προαχθεί ξανά σε είδη. Η περιοχή των Βαλκανίων και η Μεσόγειος έχουν το μεγαλύτερο μέρος αυτής της οριοθετημένης ποικιλότητας, αντανakλώντας μερικώς την καταφυγή των δενδρικών ειδών που υπήρχαν νότια των Άλπεων και των Πυρηναίων κατά τη διάρκεια της παγετωνοποίησης κατά την Πλειστόκαινο (Farjon, 2013).

Στην Ελλάδα βρίσκουμε 8 είδη πεύκου που είναι αυτοφυή :

- ***P. halepensis***. Το κοινό πεύκο, γνωστό με την ονομασία Χαλέπιος Πεύκη.
- ***P. brutia***. Το Θασίτικο πεύκο ή Τραχεία πεύκη.
- ***P. nigra***. Το μαυρόπευκο, επιστ. Μαύρη πεύκη
- ***P. sylvestris***. Το δασόπευκο, λιάχα ή Δασική πεύκη, επιστ. Πεύκη η αγρία
- ***P. mugo***. Το βουνόπευκο, επιστ. Πεύκο μούγκο
- ***P. peuce***. Το Μακεδονίτικο ή Βαλκανικό πεύκο, επιστ. Πεύκη η πεύκη
- ***P. pinea***. Η Κουκουναριά ή ήμερο πεύκο επιστ. Πεύκη η πίτυς.
- ***P. heldreichii***. Το ρόμπολο ή λευκόδερμο, επιστ. Λευκόδερμη πεύκη.

Αν και η χρήση των φλοιών των πεύκων χρονολογείται από τους αρχαίους χρόνους, πρόσφατα έχει βρει ευρεία εφαρμογή στους τομείς της διατροφής, της υγείας, της ιατρικής και της κοσμετολογίας. Τα εκχυλίσματα των φλοιών των πεύκων περιέχουν πολυάριθμες φαινολικές ενώσεις όπως η κατεχίνη, η επικατεχίνη, η ταξιφολίνη, καθώς και φαινολικά οξέα που χαίρουν ιδιαίτερης προσοχής λόγω της αντιμεταλλαξιγονικής και αντικαρκινικής δράσης τους και της υψηλής αντιοξειδωτικής τους δραστηριότητας. (Yesil-Celiktas, 2009).

Πίνακας 15: Ποσοτικά αποτελέσματα για (+)- κατεχίνη και ταξιφολίνη από HPLC

Table 1. Quantitative results for (+)-catechin and taxifolin by HPLC (percentage of each compound in the respective pine bark extract; relative standard deviation given in parenthesis; $n = 3$)		
	(+)-Catechin	Taxifolin
<i>Pinus brutia</i>	7.04 (0.13%)	18.56 (0.17%)
<i>Pinus pinea</i>	3.58 (0.16%)	2.87 (0.15%)
<i>Pinus sylvestris</i>	1.78 (0.16%)	0.66 (0.41%)
<i>Pinus nigra</i>	3.77 (0.02%)	0.30 (0.71%)
Pycnogenol®	0.15 (0.89%)	0.17 (0.21%)

A.5.1. *Pinus nigra*

A.5.1.1 Βοτανική Ταξινόμηση

Βασίλειο:	<i>Plantae</i>
Υποβασίλειο:	<i>Viridaeplantae</i>
Υπο-υποβασίλειο:	<i>Streptophyta</i>
Άθροισμα:	<i>Tracheophyta</i>
Υποάθροισμα:	<i>Spermatophytina</i>
Υπο- υποάθροισμα:	<i>Gymnospermae</i>
Κλάση:	<i>Pinopsida</i>
Τάξη:	<i>Pinales</i>
Οικογένεια:	<i>Pinaceae</i>
Γένος:	<i>Pinus</i>
Είδος:	<i>Pinus nigra</i> (Arnold)

(Συστηματική κατάταξη του είδους *Pinus nigra* κατά το IT IS)



Εικόνα 8: Κώνος του *Pinus nigra*

A.5.1.2. Περιγραφή-Βοτανικά Χαρακτηριστικά

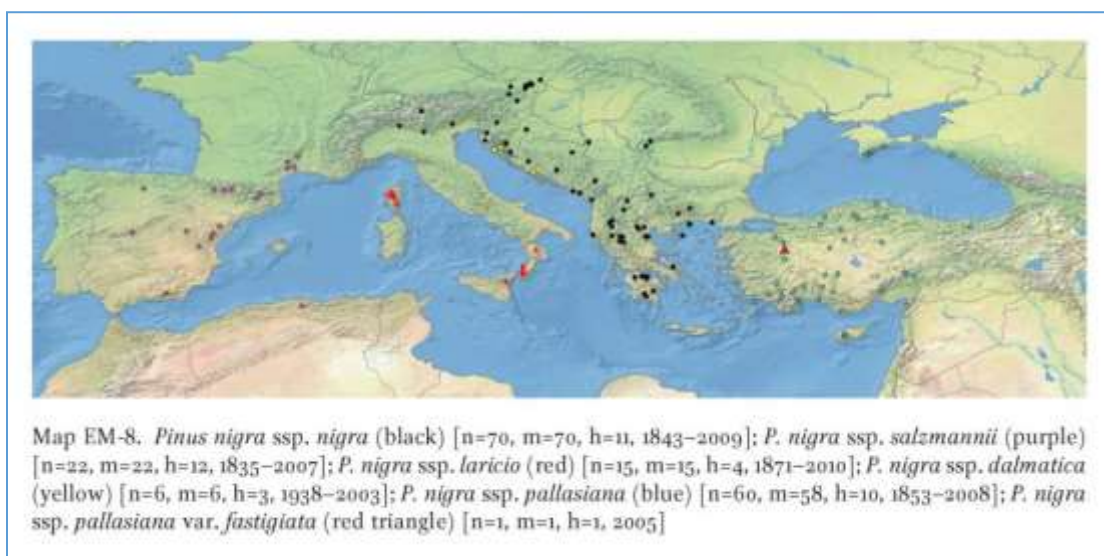
Η Μαύρη Πεύκη ή Αυστριακή πεύκη (*Pinus nigra* J.F. Arnold) είναι δένδρο ψηλό (20-45μ.) με κόμη πυραμιδοειδή μέχρι ομπρελοειδή, με κορμό ευθυτενή, με κλάδωση κατά κανόνα σπονδυλωτή και φλοιό αρχικά γυαλιστερό, στη συνέχεια με ξηρόφλοιο που σχίζεται βαθιά. Δημιουργεί βαθύ και έντονο ριζικό σύστημα. Τα φύλλα του είδους αυτού είναι βελόνες τραχείες, δύσκαμπτες, με μήκος 8-12 εκατοστά και κορυφή κιτρινωπή που αγκυλώνει. Είναι μονήρεις τον πρώτο χρόνο, αλλά στη συνέχεια ανά δύο σε σπειροειδή διάταξη και ζουν 4-6 χρόνια.

Όπως και τ' άλλα πεύκα είναι φυτό μόνοικο με άνθη μονογενή, που εμφανίζονται τον Απρίλο με Ιούνιο. Τα αρσενικά είναι κίτρινοι ίουλοι και τα θηλυκά κοκκινωποί όρθιοι κωνίσκοι. Ο καρπός είναι κώνος. Οι κώνοι είναι οξυκόρυφοι συμμετρικοί, φέρονται κατά σπονδύλους, σπανιότερα 4, κάθετοι στα κλαδιά χωρίς ποδίσκο. Είναι κιτρινωποί, και τα καρπικά λέπια φέρουν αποφύσεις ρομβικές με οξεία και εγκάρδια τρόπιδα και ομφαλό αγκαθωτό.

Η μαύρη πεύκη παρουσιάζει μεγάλη ποικιλία χαρακτηριστικών της. Έτσι διακρίνουμε διάφορες ποικιλίες ή φυλές. Είναι είδος ημισκιάφυτο, το περισσότερο ανθεκτικό στη σκιά είδος ελληνικής πεύκης (μετά την πενταβέλονη) και ψυχρόβιο, λιτοδίαιτο, με αντοχή στους ανέμους, με σχετική προσαρμοστικότητα στο περιβάλλον.

A.5.1.3. Γεωγραφική Εξάπλωση

Το *Pinus nigra* είναι ένα ευρέως διαδεδομένο και ευμετάβλητο είδος που εκτείνεται από την Ισπανία μέχρι τις χώρες γύρω από τη Μαύρη Θάλασσα. Είναι κυρίως νότιο ευρωπαϊκό είδος που επεκτείνεται στην Τουρκία, ενώ κάποιοι απομακρυσμένοι πληθυσμοί απαντώνται παράκτια της Βόρειας Αφρικής (Αλγερία, Μαρόκο), στην Κριμεία (Ουκρανία) και στην ακτή της Ανατολικής Μαύρης Θάλασσας. Η ανατολική Αυστρία, όπου και περιγράφηκε για πρώτη φορά (Wiener Wald) αποτελεί το βορειότερο άκρο που παρατηρείται το είδος (Farjon, 2013).



Εικόνα 9: Γεωγραφική κατανομή του *Pinus nigra*

Επειδή η διακύμανση φαίνεται να σχετίζεται με την κατανομή έχουν αναγνωριστεί πέντε υποείδη (στην Flora Europaea), τα οποία χαρτογραφούνται εδώ. Το υποείδος που απαντάται στην Ελλάδα είναι το *Pinus nigra* ssp. *nigra*, ένα υψίπεδο υποείδος ευρέως διαδεδομένο στη Βαλκανική χερσόνησο, νότια της Πελοποννήσου, στην ανατολική Αυστρία και στη βόρεια Ιταλία, όπου εντοπίζεται στους πρόποδες των Άλπεων και στην ανατολική Ρουμανία.

Είναι το κυρίως πεύκο των δασών της χώρας μας. Σχηματίζει δάση στα βουνά της Ηπειρωτικής Ελλάδας, της Πελοποννήσου και των νησιών Εύβοιας, Θάσου, Μυτιλήνης και Σάμου. Το υψόμετρο κυμαίνεται από 100μ. έως 2000μ. με τις περισσότερες περιπτώσεις να εντοπίζεται πάνω από τα 1200μ. στην Ελλάδα. Μπορεί να σχηματίσει μεγάλης έκτασης πευκοδάση, συχνά σε συνδυασμό με *P. sylvestris* (Farjon, 2013).

A.5.1.4. Χρήσεις

Η Ευρωπαϊκή μαύρη πεύκη είναι ένα διαδεδομένο και σημαντικό δέντρο ξυλείας στη Κεντρική και Νότια Ευρώπη, ιδιαίτερα στην Κορσική. Είναι εκμεταλλεύσιμη κυρίως για το ξύλο της, που είναι μέτρια σκληρό και μέτρια βαρύ, με λιγότερο ρετσίνι, σε σχέση με το ξύλο των άλλων ειδών

και καλής ποιότητας. Χρησιμοποιείται εκτενώς σε όλη την περιοχή της Μεσογείου για οικοδομικές κατασκευές, καθώς και στην επιπλοποιία, στην ναυπηγική, για ινοπλάκες, μοριοπλάκες, καπλαμάδες, κόντρα πλακέ, ξυλοπολτό, κ.ά. Σε ορεινές περιοχές μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε χώρους αναψυχής.

A.5.1.5. Χημική σύσταση φλοιού

Έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε εκχυλίσματα εξανίου, αιθυλικής αλκοόλης και ζεστού νερού από φλοιό *Pinus nigra* έδειξε ότι τα κύρια συστατικά του ήταν τα λιπαρά οξέα και αλειφατικές αλκοόλες, καθώς επίσης και ρητινικά οξέα και στερόλες. Το αιθερικό κλάσμα από διαλύματα μεθανόλης-νερού σε αναλογία 4:1 v/v περιείχε απλές φαινόλες όπως 4-υδροξυβενζαλδεΐδη, βανιλίνη, 3,4-διυδροξυβενζαλδεΐδη, 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ και 3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ. Επίσης βρέθηκε φερουλικό οξύ (Hafizoglu et al., 2002).

Πίνακας 16: Κύρια συστατικά του φλοιού της μαύρης πεύκης

Λιπαρά οξέα	Αλειφατικές αλκοόλες	Ρητινικά οξέα	Στερόλες
14:0	Τετραδεκανόλη	πιμαρικό	Καμπεστερόλη
16:1	Πενταδεκανόλη	σανταρακοπιμαρικό	Καμπεστανόλη
16:0 (παλμιτικό)	Εξαδεκανόλη	ισοπιμαρικό	Σιτοστερόλη
17:0ai	Επταδεκανόλη	Παλουστρικό	Σιτοστανόλη
9,12-18:2 (λινολεϊκό)	Οκταδεκανόλη	Δωδροαβιετικό	
9-18:1 (ελαϊκό)	Δοκοσανόλη	Αβιετικό	
11-18:1	Τετρακοσανόλη		
18:0 (στεαρικό)	Εξακοσανόλη		
5,9,12-20:3			
20:0			
18-υδροξυοκταδεκ-9-ενοϊκό			
Οκταδεκ-9-ενε-1,18-διοϊκό			
22:0			
24:0			

A.5.2. *Pinus heldreichii*

A.5.2.1. Βοτανική ταξινόμηση

Βασίλειο:	<i>Plantae</i>
Υποβασίλειο:	<i>Viridaeplantae</i>
Υπο-υποβασίλειο:	<i>Streptophyta</i>
Άθροισμα:	<i>Tracheophyta</i>
Υποάθροισμα:	<i>Spermatophytina</i>
Υπο- υποάθροισμα:	<i>Gymnospermae</i>
Κλάση:	<i>Pinopsida</i>
Τάξη:	<i>Pinales</i>
Οικογένεια:	<i>Pinaceae</i>
Γένος:	<i>Pinus</i>
Είδος:	<i>Pinus heldreichii</i> (Christ)



(Συστηματική κατάταξη του είδους *Pinus heldreichii* κατά το ITIS)

Εικόνα 10: Κώνος του *Pinus heldreichii*

A.5.2.2. Περιγραφή-Βοτανικά Χαρακτηριστικά

Το ρόμπολο ή πεύκη λευκόδερμη (*Pinus heldreichii* Christ συν. *Pinus leucodermis* Ant.) είναι δένδρο αειθαλές με ύψος από 20 έως 30μ., με κόμη αραιά πυραμιδοειδή, με αρωματικό ξύλο με ευθύ και μεγάλο κορμό που στην αρχή είναι σταχτόλευκος και γυαλιστερός, ενώ στη συνέχεια σχηματίζει ξηρόφλοιο σταχτοκαστανό θωρακόμορφο (λόγω του ότι σχίζεται κατακόρυφα και οριζόντια). Τα φύλλα είναι βελόνες σκληρές, δύσκαμπτες, με οξεία κορυφή παρυφές αραιά οδοντωτές, σχετικά κοντές μήκους 6-9 εκ., τοποθετημένες ανα δύο σε βραχυκλάδια, δίνοντας την εικόνα πράσινων θυσάνων. Τα άνθη του ρόμπολου είναι μονογενή και ανθίζουν τον Απρίλιο με Μαΐο. Τα αρσενικά είναι κίτρινοι ίουλοι ενώ τα θηλυκά είναι δύο ή μεμονωμένοι όρθιοι κωνίσκοι χρώματος μωβ.

Ο καρπός είναι κώνος. Οι κώνοι κατά την ωρίμανση είναι καστανωποί, με δερματώδη καρπικά λέπια και αποφύσεις επίπεδες ή πυραμιδοειδείς που εξέχουν. Ωριμάζουν το φθινόπωρο του δεύτερου, από την άνθηση, χρόνου. Τα σπέρματα του είναι μικρότερα των σπερμάτων της μαύρης πεύκης και πέφτουν αμέσως μετά την ωρίμανση του καρπού, η δε φυτρωτικότητά τους είναι περίπου 60-70% και φυτρώνουν σε 3-5 εβδομάδες.

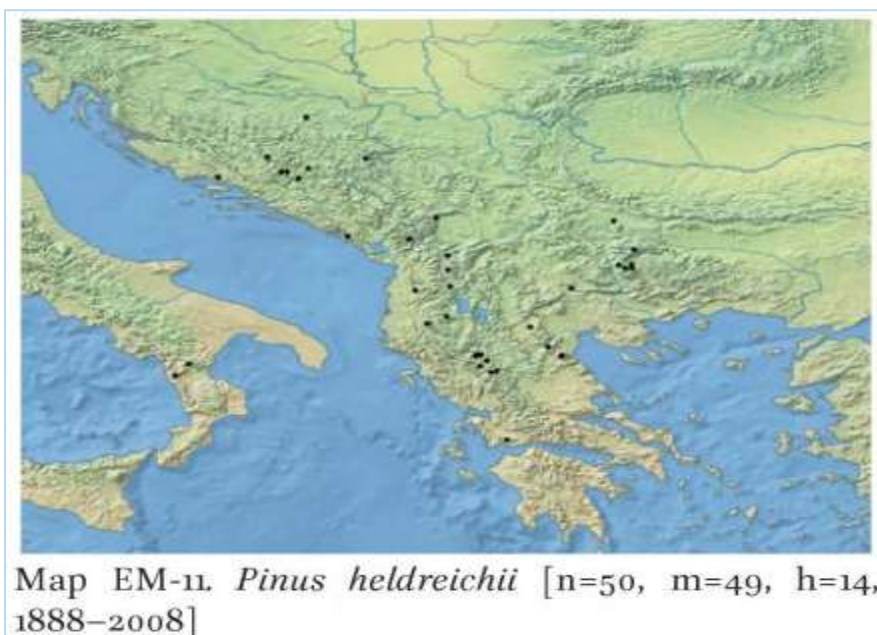
Σχηματίζει δάση αμιγή ή μικτά με οξυά και ψυχρόβια κωνοφόρα. Είναι είδος της ψυχρότερης περιοχής της φυτοδιάπλασης των φυλλοβόλων πλατυφύλλων, αλλά και της φυτοδιάπλασης των ψυχροβίων κωνοφόρων. Ευδοκίμει σε εδάφη βαθιά, ανεξάρτητα από την προέλευσή τους, αλλά και σε εδάφη λιγότερο βαθιά και γόνιμα, πάνω σε διάφορα πετρώματα. Οι κλαδίσκοι έχουν χαρακτηριστικά ανώμαλη επιφάνεια, διότι μετά την πτώση των βελονών παραμένουν μεγάλα προσκεφάλια.

Στην *Pinus heldreichii*, με βάση τις αποφύσεις των καρποφύλλων, διακρίνουμε δύο ποικιλίες: την *P. heldreichii* var *tyrica* στην οποία οι αποφύσεις των καρποφύλλων είναι επίπεδες και την *P. heldreichii* var *leucodermis* στην οποία οι αποφύσεις είναι πυραμιδοειδείς και εξέχουν. Και οι δύο παραπάνω ποικιλίες υπάρχουν στην Ελλάδα (Vendramin et al., 2008).

A.5.2.3. Γεωγραφική Εξάπλωση

Αυτό το είδος εντοπίζεται στα Βαλκάνια, με έναν απομακρυσμένο πληθυσμό στη νότια Ιταλία. Πιο συγκεκριμένα, το *P. heldreichii* βρίσκεται στη νότια Κροατία, στη Βοσνία-Ερζεγοβίνη, στη νότια Σερβία, την Αλβανία, τη νοτιοανατολική Γιουγκοσλαβία, τη Βουλγαρία, τη βόρεια Ελλάδα, τη Θεσσαλία και την Καλάμπρια της νότιας Ιταλίας (Farjon, 2013).

Το *Pinus heldreichii* σύμφωνα με τα μοριακά δεδομένα δε σχετίζεται στενά με το *P. nigra* αλλά με μία ομάδα μεσογειακών ειδών πεύκου που συμπεριλαμβάνουν τα είδη *P. brutia* και *P. pinea* (Parks et al., 2012).



Εικόνα 11: Γεωγραφική κατανομή του *Pinus heldreichii*

Το *P. heldreichii* είναι από τα σπάνια κωνοφόρα της Βαλκανικής και της Ευρώπης. Το ρόμπολο είναι είδος πεύκου που απαντάται στις ορεινές και υποαλπικές ζώνες, σε υψόμετρο από 1.300 ως 2.200μ. βρίσκεται διασκορπισμένο, με μικρούς πληθυσμούς να αναπτύσσονται συχνά σε υψηλά υψόμετρα (2200-2640 μ.), σε βραχώδεις ασβεστολιθικούς γκρεμούς ή απόκρυμνες πλαγιές. Στην Ελλάδα τη συναντάμε στην Πίνδο, στον Όλυμπο, στο Βέρμιο, Όρβηλο και Γκορίλα.. Αναπτύσσεται αργά και μερικά δέντρα στη Καλάμπρια πιστεύεται ότι είναι μεγαλύτερα από 1000 ετών. Στα Βαλκάνια τα είδη που φυτεύονται στη δασοκομία, σε καλύτερα εδάφη και σε χαμηλότερα υψόμετρα, αναπτύσσονται ταχύτερα απ' ότι στο φυσικό τους περιβάλλον (Farjon, 2013).

A.5.2.4. Χρήσεις

Η κύρια χρήση της λευκόδερμης πεύκης του βοσνιακού πεύκου είναι ως διακοσμητικό δέντρο παρά ως είδος ξυλείας. Εντούτοις, το ξύλο του μπορεί να χρησιμοποιηθεί για γενικότερες κατασκευές.

Το είδος παρουσιάζει μεγάλη προσαρμοστικότητα στις ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες και μεγάλη δυνατότητα αποικισμού, που το καθιστά κατάλληλο για την αναδάσωση των εκτεταμένων ξηρικών περιοχών.

Είναι επίσης ανθεκτικό στο διοξείδιο του θείου, το φθορίδιο υδρογόνου, το διοξείδιο αζώτου και τη ρύπανση όζοντος. Λόγω της δυνατότητάς του ν' αντιστέκεται στον αέρα, τον πάγο και την ισχυρή χιονόπτωση, το είδος χρησιμοποιείται επίσης για αναδασώσεις μεγάλου υψομέτρου. Η φύτευση πραγματοποιείται συνήθως χρησιμοποιώντας τα 3χρονα σπορόφυτα. Το ρόμπολο φυτεύεται στο νότο της Ιταλίας όχι μόνο λόγω της υψηλής προσαρμοστικότητάς του στα μεγάλα υψομέτρα, αλλά και επειδή είναι λιγότερο ευαίσθητο σε παράσιτα από άλλα είδη πεύκων (π.χ. είναι ανθεκτικό στη σήψη από το *Diplodia* που έχει σοβαρές επιπτώσεις στη μαύρη πεύκη (Vendramin et al., 2008).

Είναι ιδανικό για τη ναυπηγική, κυρίως στο πέτσωμα πλοίων, για την κατασκευή βαρελιών, για τεγίδες σε παραδοσιακά πέτρινα σπίτια, σε στέγες, εξωτερικές πόρτες και πατώματα. Καθώς έχει πολύ ισχυρή αντοχή και στην υγρασία, μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο νερό και κυρίως χωρίς εμποτισμό τοξικό ή μη.



Εικόνα 12: Δένδρο *Pinus heldreichii*

A.5.2.5. Προστασία και διατήρηση του είδους

Το ρόμπολο περιλαμβάνεται στην Κόκκινη Λίστα Απειλούμενων Ειδών της IUCN (IUCN Red List of Threatened Species), αν και εντάσσεται στα είδη χαμηλού κινδύνου. Η φυσική κατανομή του είδους περιορίζεται συνεχώς, κυρίως λόγω των δασικών πυρκαγιών, αλλά και λόγω υβριδισμού. Η κύρια στρατηγική η οποία έχει υιοθετηθεί για τη διατήρηση του είδους συνδέεται με εθνικά πάρκα και προστατευόμενες περιοχές (Vendramin et al., 2008).

Α.6. Φυτοπαθογόνα βακτήρια

Α.6.1. Γένος *Acidovorax*

Τα βακτήρια του γένους *Acidovorax* είναι αρνητικά κατά Gram, αερόβια, ραβδόμορφα, με διαστάσεις κατά μέσο όρο 0,5-1,7 μm, κινούμενα με ένα πολικό μαστίγιο (Schaad *et al.*, 1978; Willems *et al.*, 1992). Είναι θετικά στην οξειδάση, κι αναπτύσσονται σε θερμοκρασία 4-41°C σε διάφορα θρεπτικά υποστρώματα. Σχηματίζουν επίπεδες, στρογγυλές, υπόλευκου χρώματος, μη φθορίζουσες αποικίες.

Βασίλειο	<i>Bacteria</i>
Φύλο	<i>Proteobacteria</i>
Κλάση	<i>β-Proteobacteria</i>
Τάξη	<i>Burkholderiales</i>
Οικογένεια	<i>Comamonadaceae</i>
Γένος	<i>Acidovorax</i>

Το γένος περιέχει πολλά σημαντικά φυτοπαθογόνα βακτήρια, τα οποία είχαν ταξινομηθεί προηγουμένως ως μέλη του γένους *Pseudomonas*. Τα παθογόνα αυτά προσβάλλουν ένα ευρύ φάσμα οικονομικά σημαντικών μονοκοτυλήδων και δικοτυλήδων φυτών, όπως το καλαμπόκι, το ρύζι, το καρπούζι, και η ορχιδέα.

Το πρώτο παθογόνο που απομονώθηκε περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Manns (1909) (Roberts *et al.*, 2012), το οποίο προκάλεσε σήψη στα φύλλα της βρώμης (*Avena sativa* L.), δίνοντας το όνομα *Pseudomonas avenae*. Μεταγενέστερες έρευνες έδειξαν ότι το βακτήριο μπορεί να προκαλέσει ασθένειες σε πολλά είδη της οικογένειας των *Gramineae*.

Α.6.1.1. *Acidovorax citrulli* Willems *et al.* 1992

Το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Acidovorax citrulli* (συν.: *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*) προκαλεί την ασθένεια της βακτηριακής κηλίδωσης της καρπουζιάς και προσβάλλει φυτά σε καλλιέργειες καρπουζιάς, πεπονιάς, αγγουριάς, κολοκυθιάς και άλλων κολοκυνθοειδών. Μπορεί να προκαλέσει σημαντικές οικονομικές απώλειες στην παραγωγή κολοκυνθοειδών και σε ορισμένες περιπτώσεις είναι υπεύθυνο για την απώλεια κατά 90 % της απόδοσης των εμπορεύσιμων καρπουζιών.



Εικόνα 13: Βακτηριακή κηλίδωση σε κολοκύθι

Το παθογόνο έχει ένα ευρύ φάσμα ξενιστών στην οικογένεια *Cucurbitaceae* και μπορεί να προσβάλλει τα φύλλα και τους καρπούς σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης τους. Τα συμπτώματα που παρατηρούνται είναι πολύ δύσκολο να εντοπιστούν στον αγρό και συχνά συγχέονται με άλλες ασθένειες φυλλώματος πιο γνωστές και πιο διαδεδομένες. Ένα από τα πρώτα συμπτώματα της ασθένειας στα νεαρά φυτά είναι οι υδαρείς κηλίδες ανοιχτού

καφέ ως καστανοκόκκινου χρώματος στην κάτω επιφάνεια των κοτυληδόνων και των πρώτων πραγματικών φύλλων, οι οποίες γίνονται ορατές στο φυτώριο και συχνά 5-8 μέρες μετά την μεταφύτευση ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Οι κηλίδες αυτές αρχικά είναι υδαρείς, στη συνέχεια γίνονται νεκρωτικές και περιορίζονται κυρίως μεταξύ των δευτερευόντων νευρώσεων.

Η σημαντικότερη πηγή μολύσματος για την εξέλιξη της βακτηρίωσης είναι ο μολυσμένος σπόρος, ενώ η μετάδοση της ασθένειας εξαρτάται άμεσα από τις κλιματολογικές συνθήκες, όπως την υψηλή σχετική υγρασία και τις υψηλές θερμοκρασίες καθώς και την πυκνή φύτευση (Walcott, 2005).

Στην Ελλάδα, η πρώτη επίσημη ανακοίνωση για τη διαπίστωση της προσβολής καρπών και φυτών στην καρπουζιά έγινε το 2008. Νωρίτερα όμως, το 2005 είχαν σταλεί σε εργαστήριο δείγματα καρπών καρπουζιάς υβριδίου F1 Obla προερχόμενα από την περιοχή Χρυσούπολης Καβάλας και το 2006 από την περιοχή Βαγίων Θηβών, στα οποία είχαν διαπιστωθεί συμπτώματα πολύ μικρών, ακανόνιστων, ελαιοδών κηλίδων και καστανών ρωγμών στην επιφάνειά τους (Holeba et al., 2009)

Έχει αναφερθεί ότι, το *Acidovorax. citrulli* έχει απομονωθεί από σπόρο τομάτας στο Ισραήλ και έχει προκαλέσει συμπτώματα της ασθένειας σε διάφορους ξενιστές σολανωδών, μετά από τεχνητή μόλυνση. Το παγκόσμιο εμπόριο σπόρων κολοκυνθοειδών, πιθανότατα συμβάλλει στην εκτεταμένη εξάπλωση των στελεχών του βακτηρίου (Burdman S. & Walcott R, 2012).

A.6.2. *Agrobacterium tumefaciens*

Το *Agrobacterium tumefaciens* είναι ένα gram-αρνητικό ραβδόμορφο βακτήριο εδάφους, ανήκει στην οικογένεια Rhizobiaceae και προκαλεί την ευρέως διαδεδομένη ασθένεια της νεοπλασίας των φυτών που ονομάζεται κορονωτός κάλλος (crown gall disease).

Στη φύση, οι κάλλοι αυτοί σχηματίζονται το υπέργειο τμήμα του φυτού που εφάπτεται στο έδαφος (Χατζόπουλος, 2001). Οι όγκοι, εσωτερικά, παρουσιάζονται

σαν μια ανοργάνωτη μάζα αγγειακού και παρεγχυματικού ιστού. Οι νεαροί όγκοι έχουν λεία επιφάνεια, ενώ όσο μεγαλώνουν σκληραίνουν. Παρατηρείται καστανός μεταχρωματισμός κάτω από τους όγκους (Σαμουήλ, 2013).

Το παθογόνο προσβάλλει τα δικοτυλήδονα φυτά, προκαλώντας μεγάλες οικονομικές ζημιές σε φυτά γεωργικής σημασίας, όπως τα πυρηνόκαρπα, τα μηλοειδή, η καρυδιά, η άμπελος και η τριανταφυλλιά.

Βασίλειο	<i>Bacteria</i>
Φύλο	<i>Proteobacteria</i>
Κλάση	<i>α-Proteobacteria</i>
Τάξη	<i>Rhizobiales</i>
Οικογένεια	<i>Rhizobiaceae</i>
Γένος	<i>Agrobacterium</i>
Είδος	<i>A. tumefaciens</i> (Smith & Townsend, 1907)

Γενικά, έχει την ικανότητα να παρασιτεί σε ένα ευρύ φάσμα ξενιστών που προέρχονται από 93 οικογένειες και αριθμούνται περίπου στα 140 είδη (Kado, 2002). Μπορεί να ζήσει είτε ελεύθερα στο έδαφος, είτε μέσα στα φυτά ως παράσιτο. Η μόλυνση των φυτών γίνεται συνήθως μέσω μια ανοικτής πληγής. Οι φαινολικές ενώσεις που εκκρίνονται από την πληγή διεγείρουν το βακτήριο, το οποίο κινείται χημειοτακτικά προς την πηγή και εισέρχεται στο φυτό, μεταφέροντας ένα τμήμα του DNA του (T-DNA). Η μεταφορά των ονομαζόμενων ογκογενετικών γονιδίων από το παθογόνο στο φυτικό γονιδίωμα, δημιουργεί τη μοριακή βάση της επαγωγής του κορωνοτού κάλλου στα φυτά (Χατζόπουλος, 2001).



Εικόνα 14: Κορωνωτός κάλλος σε βλαστό

A.6.3. Γένος *Erwinia*

Το γένος *Erwinia* περιλαμβάνει Gram-αρνητικά, ραβδοειδή βακτήρια με περίτριχα μαστίγια και μέγεθος 0.5-1.0 x 1-3 μm. Η ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 26-30 °C, ενώ γενικά αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 36 °C. Όταν αναπτύσσονται σε θρεπτικό υπόστρωμα σχηματίζουν κυκλικές αποικίες, λείες, βλεννώδεις και θολές, χρώματος λευκού-μπεζ (Brenner & Farmer, 2001).

Βασίλειο	<i>Bacteria</i>
Φύλο	<i>Proteobacteria</i>
Κλάση	<i>γ-Proteobacteria</i>
Τάξη	<i>Enterobacteriales</i>
Οικογένεια	<i>Enterobacteriaceae</i>
Γένος	<i>Erwinia</i> (Winslow et al., 1920)

Το γένος *Erwinia* περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1917, ενσωματώνοντας όλα τα μέλη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* που προκαλούν ασθένεια σε φυτά.

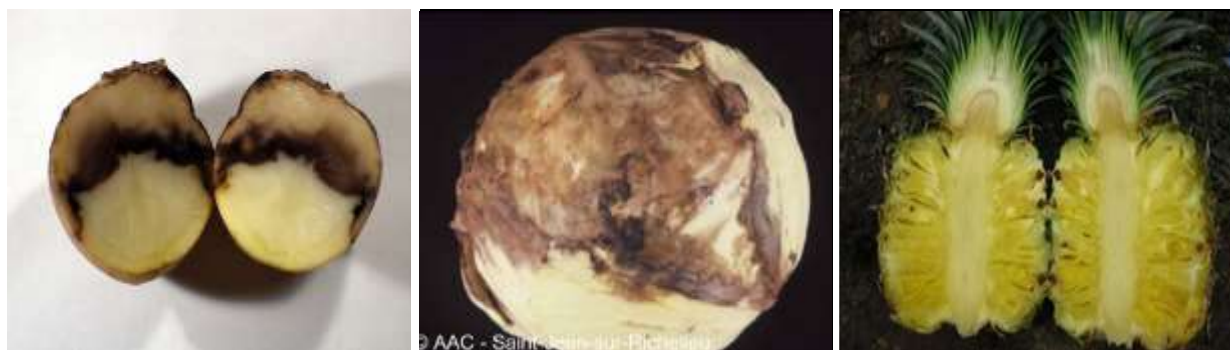
A.6.3.1. *E. carotovora* subsp. *atroseptica*- *E. carotovora* ssp. *carotovora*- *E. chrysanthemi*

Τα *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *E. carotovora* ssp. *carotovora*, *E. chrysanthemi* είναι σημαντικά παθογόνα βακτήρια που προκαλούν τη μαλακή σήψη στην πατάτα και σε άλλες καλλιέργειες σε εύκρατες και τροπικές περιοχές του κόσμου. Το 1998 ο Hauben και οι συνεργάτες του πρότειναν να μετονομαστούν σε *Pectobacterium carotovorum* ssp. *atrosepticum* (για *Eca*), *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* (*Ecc*) και *Pectobacterium chrysanthemi* (για *Ech*), ωστόσο τα ονόματα αυτά δεν χρησιμοποιούνται από την επιστημονική κοινότητα.

Το *Eca* έχει ένα στενό εύρος ξενιστών καθώς περιορίζεται σχεδόν αποκλειστικά στην πατάτα των εύκρατων περιοχών. Το *Ech* είναι πιο συχνό σε υποτροπικά και τροπικά κλίματα και έχει ένα εύρος ξενιστών που περιλαμβάνει το γαρύφαλλο, το καλαμπόκι, τον ανανά, την πατάτα και την

αφρικανική βιολέτα (*Saintpaulia ionantha*), η τελευταία εκ των οποίων έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς ως σύστημα- μοντέλο στην έρευνα. Το *Ech* επίσης προκαλεί τη νόσο σε ορισμένες καλλιέργειες και άλλα φυτά στις εύκρατες περιοχές, π.χ. στη ντάλια και την πατάτα. Το *Ecc* πλήττει κυρίως τις καλλιέργειες στις υποτροπικές και εύκρατες περιοχές και έχει ίσως το ευρύτερο φάσμα ξενιστών που περιλαμβάνει τα λαχανάκια Βρυξελλών, το καρότο, το σέλινο, το αγγούρι, την πιπεριά, το γογγύλι, τα ραδίκια και την πατάτα. Ωστόσο, πολλές άλλες καλλιέργειες σαπίζουν από αυτά τα παθογόνα μετά τη συγκομιδή.

Τα βακτήρια της μαλακής σήψης προκαλούν γενική διάλυση των ιστών, μέσω της παραγωγής ενζύμων αποικοδόμησης των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων. Εισέρχονται στο εσωτερικό του φυτού μέσω τραυμάτων ή φυσικών ανοιγμάτων, όπου διαμένουν στο αγγειακό ιστό και στον εξωκυττάριο χώρο των παρεγχυματικών ιστών και παραμένουν μέχρι οι περιβαλλοντικές συνθήκες να γίνουν κατάλληλες για την ανάπτυξη της νόσου. Περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, η χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου και το νερό διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της ασθένειας (Toth et al., 2003).



Εικόνα 15: Μαλακή σήψη σε πατάτα, λαχανάκι Βρυξελλών και ανανά από τα βακτήρια *Eca*, *Ecc* και *Ech* αντίστοιχα

A.6.4. Γένος *Pseudomonas*

Το γένος *Pseudomonas* ανήκει στα γ-πρωτεοβακτήρια, στην οικογένεια των *Pseudomonaceae*, ενώ περιλαμβάνει περισσότερα από 191 είδη (Euzebey, 1997). Μέλη του γένους εμφανίζουν αξιοσημείωτη μεταβολική και φυσιολογική ποικιλομορφία, γεγονός που τους επιτρέπει να αποικίζουν διάφορους χερσαίους και υδάτινους οικολογικούς θώκους (Madigan et al., 2005)

Βασίλειο	<i>Bacteria</i>
Φύλο	<i>Proteobacteria</i>
Κλάση	<i>γ-Proteobacteria</i>
Τάξη	<i>Pseudomonadales</i>
Οικογένεια	<i>Pseudomonadaceae</i>
Γένος	<i>Pseudomonas</i>

Τα είδη του γένους ταξινομήθηκαν προς τα τέλη του 19^{ου} αιώνα, ενώ η ετυμολογία του ονόματός τους είναι Ψευδής Μονάδα (Palleroni, 2010). Κατά τον Krieg (1984, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*) τα διάφορα είδη εμφανίζουν τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

- ευθύγραμμα ή κεκαμμένα ραβδόμορφα με μέγεθος 0,5-1,0 μm
- αρνητικά κατά Gram
- με ένα ή περισσότερα πολικά μαστίγια
- αερόβια
- μη σποροπαραγωγά

Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί περίπου 18 φυτοπαθογόνα βακτήρια στο γένος *Pseudomonas* καθώς και 3 είδη τα οποία είναι παθογόνα στα μανιτάρια, πολλά από τα οποία εμφανίζουν μεγάλη εξειδίκευση ως προς τον ξενιστή (Hofte and DeVos, 2006). Αυτά διαχωρίζονται με βάση την αντίδρασή τους στην οξειδάση.

Εξαιτίας της μεγάλης γενετικής ποικιλομορφίας των φυτοπαθογόνων βακτηρίων του γένους *Pseudomonas*, η συμπτωματολογία της ασθένειας στα φυτά ποικίλει από νεκρωτικές κηλίδες, νεκρωτικά τμήματα, έλκη ή και νεκρωτικό μαρασμό μέχρι σήψεις, υπερπλασίες και αδροβακτηριώσεις (Scroth et al., 2006).

A.6.4.1. *Pseudomonas cichorii* (Stapp, 1928)



Εικόνα 16: Κηλίδωση των φύλλων από *P. cichorii*.

Είναι ο αιτιώδης παράγοντας της κηλίδωσης των φύλλων και της σήψης στα καλλωπιστικά φυτά και τα λαχανικά. Απομονώθηκε από το αντίδι *Cichorium endivia* και προσβάλλει ένα μεγάλο εύρος ξενιστών που περιλαμβάνουν είδη από τα γένη *Brassica*, *Capsicum*, *Chrysanthemum*, *Cichorium*, *Gerbera*, *Solanum* κ.α (plantwise).

Τα συμπτώματα ποικίλουν ανάλογα με τον ξενιστή και το μολυσμένο τμήμα του φυτού. Τα πρώτα συμπτώματα είναι υγρές αλλοιώσεις, που αναπτύσσονται είτε κοντά στα αγγεία των φύλλων, είτε διανέμονται τυχαία ως κηλίδες. Οι κυκλικές αλλοιώσεις σταδιακά αποκτούν σκούρο καστανό ή μαύρο χρώμα και σε ορισμένες περιπτώσεις περιβάλλονται από ένα κίτρινο στεφάνι. Οι κηλίδες μπορεί να συνενώνονται σχηματίζοντας πολύ μεγάλες νεκρωτικές περιοχές και επηρεάζουν το σύνολο των φύλλων. Σε ορισμένους ξενιστές τα συμπτώματα εμφανίζονται στους ποδίσκους, στους μίσχους, στους βλαστούς, αλλά και στους οφθαλμούς. Η έκταση των αλλοιώσεων ευνοείται από συνθήκες υψηλής υγρασίας (Smith et al., 1988).

Το βακτήριο *P.Cichorii* όταν καλλιεργείται σε θρεπτικό υπόστρωμα σχηματίζει κυκλικές, κυρτές, λείες, ημιδιαφανείς αποικίες και οι βέλτιστες θερμοκρασίες για την ανάπτυξή του κυμαίνονται από 30 έως 35 °C.

A.6.4.2. *Pseudomonas corrugata*

Το παθογόνο βακτήριο προκαλεί νέκρωση της εντεριώνης στις τομάτες (*Solanum lycopersicum*) (Kado, 2010). Άλλοι ξενιστές του βακτηρίου είναι η πιπεριά (*Capsicum annuum*), το χρυσάνθεμο (*Chrysanthemum morifolium*) και το γεράνι (*Geranium*) (Plantwise Knowledge Bank).

Πολλά είδη του γένους *Pseudomonas* έχουν βρεθεί να προκαλούν νέκρωση στην εντεριώνη της τομάτας, συμπεριλαμβανομένων των *P. cichorii*, *P. mediterranea*, *P. viridiflava*, *P. fluorescens*, και άλλων αγνώστων ειδών (Jones et al., 2014).

Τα αρχικά συμπτώματα της ασθένειας είναι η χλώρωση των νεαρών φύλλων και του άνω τμήματος του στελέχους, ενώ όταν η προσβολή είναι σοβαρή συνοδεύεται και από νέκρωση του κάτω στελέχους. Κάποιοι βλαστοί μπορεί να μην εμφανίζουν εξωτερικές βλάβες, αλλά η εντεριώνη του φυτού ντομάτας σταδιακά θα αποκτήσει καφέ χρώμα και θα νεκρωθεί. Ακολούθως οι μίσχοι μπορεί να γίνουν κούφιοι και να σπάσουν. Τα φυτά της τομάτας μπορεί να παράγουν υπερβολικές ποσότητες τυχαίων ριζών ως απόκριση προς το θάνατο του το κύριου στελέχους. Παρόλο που τα αρχικά συμπτώματα φαίνονται καταστροφικά, η ασθένεια μπορεί να μην προχωρήσει και ο θάνατος των μολυσμένων φυτών δεν είναι πάντα βέβαιος (Jones, 1991).



Εικόνα 17: Το *P. corrugata* προκαλεί νέκρωση της εντεριώνης στη τομάτα

Το παθογόνο ευνοείται από χαμηλές θερμοκρασίες τη νύχτα, υψηλή υγρασία και υψηλή περιεκτικότητα σε άζωτο. Είναι ικανό να αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες μέχρι και 37 ° C (Jones, 1991). Η είσοδος του βακτηρίου γίνεται από φυσικά ανοίγματα και πληγές στις ρίζες και στους βλαστούς και εξαπλώνεται από μολυσμένους σπόρους και εξοπλισμό και το νερό άρδευσης (Fatmi et al., 2008).

Όταν καλλιεργείται σε θρεπτικό μέσο ΝΑ σχηματίζει αποικίες λευκού-υποκίτρινου χρώματος, είναι θετικό στην οξειδάση και στην αντίδραση υπερευαισθησίας στα φύλλα της τομάτας.

A.6.4.3. *Pseudomonas savastanoi*

Το *P. savastanoi* προκαλεί την καρκίνωση της ελιάς, μια ασθένεια που χαρακτηρίζεται από όγκους στους αναδυόμενους μίσχους, τα κλαδιά και τα φύλλα. Η ασθένεια περιγράφηκε για πρώτη φορά τον τέταρτο αιώνα π.Χ. από τον Έλληνα φιλόσοφο Θεόφραστο (Iacobellis, 2001). Η μόλυνση εμφανίζεται μέσω των τραυμάτων που προκύπτουν από το κλάδεμα ή από έντονα καιρικά φαινόμενα, όπως το πάγωμα και χαλάζι (Young, 2004). Τα συμπτώματα της ασθένειας περιλαμβάνουν την αποφύλλωση, τη δημιουργία μικρότερων σκελών, αλλά και μικρότερων φυτών γενικότερα, ακόμα και το θάνατο, ενώ η ποιότητα των καρπών είναι σημαντικά υποβαθμισμένη.

Η νόσος μπορεί να είναι ασυμπτωματική μέχρι και οκτώ μήνες μετά από την έκθεση από τον μικροοργανισμό (Iacobellis, 2001). Οι όγκοι συνήθως σχηματίζονται την άνοιξη που το φυτό βρίσκεται στη πιο δραστήρια αναπτυξιακή του περίοδο (Young, 2004), ενώ η ευπάθεια του φυτού αυξάνεται το φθινόπωρο όπου η πιθανότητα να προσβληθεί και από άλλο μικροοργανισμό ταυτόχρονα είναι αυξημένη (Teviotdale et al., 2004). Το βακτήριο μεταδίδεται εύκολα μέσα στον αγρό με τον άνεμο και τη βροχή, καθώς και από τα εργαλεία κλαδέματος (Young, 2004).



Εικόνα 18: Καρκίνωση της ελιάς

Το *P. savastanoi* προσβάλλει φυτά της οικογένειας *Oleaceae* και της οικογένειας *Aprocyneae*. Ο παθότυπος του βακτηρίου *savastanoi* δημιουργεί υπερπλαστικούς σχηματισμούς σε νεαρούς βλαστούς και κλαδιά κυρίως της ελιάς (*Olea spp.*), αλλά και της πικροδάφνης (*Nerium oleander*) (Ramos et al., 2012), της φοντανέσιας (*Fontanesia phillyreoides*) και της μυρτιάς (*Myrtus communis*), ενώ μια πρόσφατη έκθεση αναφέρεται σε προσβολή από τον ίδιο παθότυπο και στο βραζυλιάνικο γιασεμί (*Mandevilla sanderi*) (Eltlbany et al., 2012). Το *P. savastanoi* pv. *nerii* μολύνει την πικροδάφνη, το *P. savastanoi* pv. *fraxini* τη φλαμουριά (*Fraxinus excelsior*) (Mirik et al., 2011), ενώ η σόγια και η φασολιά είναι ξενιστές των παθότυπων *glycinea* και *phaseolicola*, αντίστοιχα (Gardan et al., 1992).

A.6.4.4. *Pseudomonas syringae*

Πρόκειται για ένα φυτοπαθογόνο βακτήριο που χαρακτηρίζεται από την αδυναμία να χρησιμοποιεί την αργινίνη, καθώς στερείται τη βοήθεια του συστήματος της διυδρολάσης της αργίνινης. Αυτό το είδος βακτηρίων στην πραγματικότητα αντιπροσωπεύεται από περισσότερους από 50 διαφορετικούς παθότυπους, που είναι παθογόνοι σε περισσότερα από 180 είδη φυτών και περιλαμβάνουν φρούτα, λαχανικά, καλλωπιστικά και άλλα ετήσια και πολυετή είδη.

Όλα τα στελέχη *Pseudomonas syringae* στερούνται μιας συγκεκριμένης οξειδάσης του κυτοχρώματος C στην αναπνευστική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων τους, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα μια αρνητική αντίδραση οξειδάσης. Πρόκειται για ένα ευέλικτο οργανισμό που ευδοκιμεί σε κατεστραμμένους ιστούς φυτών και αποικίζει κυρίως την επιφάνεια των φύλλων των φυτών.

Κάθε στέλεχος είναι ειδικό ως προς ένα συγκεκριμένο είδος φυτού το οποίο μολύνει. Ωστόσο, δεν είναι όλα τα στελέχη του *Pseudomonas syringae* απαραίτητα παθογόνα και μπορούν επίσης να αναπτυχθούν και σε φυτά μη-ξενιστές.

Το πρώτο στέλεχος απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1902 από τον Van Hall από μία πασχαλιά (*Syringa vulgaris*), οδηγώντας έτσι στην ταξινομική περιγραφή του. Στα χρόνια που ακολούθησαν, όλο και περισσότερα στελέχη απομονώθηκαν σε αλλοιώσεις άλλων φυτικών ειδών (Hirano & Uppel, 1990, 2000).

P. syringae pv. *syringae*

Ο παθότυπος είναι υπεύθυνος για το βακτηριακό έλκος στα πυρηνόκαρπα και τα μηλοειδή, προκαλώντας σημαντικές ζημιές σε πολλές καλλιέργειες παγκοσμίως. Προσβάλλει ένα μεγάλο εύρος ξενιστών, όπως τα καλλιεργούμενα κέρασια, τα δαμάσκηνα, τα ροδάκινα και τα βερίκοκα, μειώνοντας την απόδοση και την ποιότητα των φρούτων και περιορίζοντας τη διάρκεια ζωής των δέντρων στον οπωρώνα.

Τα συμπτώματα που προκαλούνται από το *P. syringae* pv. *syringae* περιλαμβάνουν αποχρωματισμό ή νεκρωτικές κηλίδες σε διάφορα όργανα πολλών φυτών, τον μαρασμό των βλαστών και έλκη στα κλαδιά. Οι κηλίδες των φύλλων δεν έχουν στεφάνι. Αυξάνουν σε μέγεθος και περιλαμβάνουν μεγαλύτερες επιφάνειες, ή και ολόκληρο το φύλλο που μπορεί να μαυρίσει και να πεθάνει.

Τα προσβεβλημένα κλαδιά ξεραίνονται στις άκρες ή μπορεί να νοσήσουν και χαμηλότερα. Σε μεγαλύτερης ηλικίας κλαδιά μπορεί να σχηματιστούν έλκη (π.χ. *Prunus spp.*). Τα άνθη ενδέχεται να καταστραφούν από μόλυνση των ποδίσκων και των μίσχων ή μέσω μόλυνσης των οφθαλμών. Κηλίδες μπορεί να εμφανιστούν και σε φρούτα (Bradbury, 1986).

A.6.4.5. *Pseudomonas tolaasii* (Paine 1919)

Πρόκειται για ένα βακτήριο εδάφους προκαλεί την βακτηριακή κηλίδωση των καλλιεργούμενων μανιταριών. Παράγει μια εξωκυτταρική τοξίνη, την τολαασίνη, η οποία είναι υπεύθυνη για τις καστανές κηλίδες με τις οποίες συνδέεται η ασθένεια. Όταν καλλιεργείται σε θρεπτικό μέσο, σχηματίζει λείες, ημιβλενώδεις, αδιαφανείς και μη φθορίζουσες αποικίες.

Προσβάλλει διάφορα είδη μανιταριών: *Agaricus*, *Agaricus bisporus*, *Agaricus campestris*, *Flammulina velutipes*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus eryngii* και *Pleurotus ostreatus* (Plantwise...)

Ο εποικισμός των μανιταριών από το βακτήριο έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη καστανών ή κρέμ αλλοιώσεων στον πύλο και στον στύπο. Οι αλλοιώσεις αυτές είναι μικρές, ελαφρώς κοίλες κηλίδες, στρογγυλές ή ακανόνιστου σχήματος διαμέτρου 1-4 mm. Όταν η βλάβη είναι πιο έντονη, οι κηλίδες εμφανίζονται πιο σκούρες και βυθισμένες. Το μαύρισμα επηρεάζει μόνο τα εξωτερικά στρώματα των ιστών και περιορίζεται στα 2-3 mm κάτω από την επιφάνεια του πύλου. Οι βλάβες μπορεί να συνενώνονται καλύπτοντας όλη την επιφάνεια του μανιταριού, ενώ σε άλλες περιπτώσεις παρατηρούνται μόνο μικρά μαύρα ή καφέ στίγματα.

Το *P. tolaasii* βρίσκεται παντού στο έδαφος και είναι στενά συνδεδεμένο με τα σαπρόφυτα του εδάφους. Μπορεί να προκαλέσει σοβαρές απώλειες στην παραγωγή, μπορεί ωστόσο εύκολα να ελεγχθεί με καλή υγιεινή και σωστή διαχείριση των καλλιεργειών (Soler-Rivas et al., 1999).

A.6.4.6. *Pseudomonas viridiflava* (Burkholder 1930) Dowson 1939

Το *P. viridiflava* έχει ένα μεγάλο εύρος ξενιστών, στους οποίους προκαλεί υδαρείς χλωρωτικές ή νεκρωτικές κηλίδες στα φύλλα, εκτεταμένα νεκρωτικά τμήματα συνήθως στις άκρες του ελάσματος και σήψη του κάτω μέρους του βλαστού και των ριζών. Αρχικά απομονώθηκε από τη νάνα φασολιά στην Ελβετία. Προκαλεί σοβαρές ζημιές στην τομάτα (*Solanum lycopersicum*), το πεπόνι (*Cucumis melo*), στο βλήτο (*Amaranthus blitum*), το χρυσάνθεμο (*Chrysanthemum morifolium*), τη μελιτζάνα (*Solanum melongena*) και το φυτό μοντέλο *Arabidopsis thaliana*.

Τυπικά συμπτώματα της ασθένειας στην τομάτα είναι ο γενικός μαρασμός και το κιτρίνισμα των φυτών, ενώ στα σημεία κλαδέματος του στελέχους αναπτύσσονται καφέ-μαύρες κηλίδες. Στο εσωτερικό μέρος του βλαστού, η εντεριώνη και οι αγγειακοί ιστοί εμφανίζουν καφέ αποχρωματισμό και συχνά αναπτύσσεται μαλακή σήψη. (Sarris et al.,2012).

Αναπτύσσεται σε συνθήκες υψηλής υγρασίας και ιδιαίτερα όταν στο φύλλωμα παραμένουν σταγόνες νερού για μεγάλο χρονικό διάστημα, σε θερμοκρασία 10-25° C. Επιβιώνει σε φυτικά υπολείμματα και ζιζάνια και διασπείρεται με το νερό και τα εργαλεία. Συχνά επιβιώνει επιφυτικά (Goumas & Chatzaki, 1998).

Πρόκειται για ένα σημαντικό φυτοπαθογόνο στην περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου και τα νησιά του Αιγαίου ειδικότερα, αντιπροσωπεύοντας το 12% και 50%, αντίστοιχα, των ειδών *Pseudomonas* που προκαλούν νέκρωση των βλαστών (Sarris et al.,2012).



Εικόνα 19: α) Βακτηριακό έλκος από *P. syringae* pv. *syringae*, β) βακτηριακή κηλίδωση από *P. tolaasii*, γ) κηλίδωση από *P. viridiflava*

A.6.5. Γένος *Xanthomonas*

Το γένος *Xanthomonas* αποτελείται από 27 είδη, πολλά από τα οποία προκαλούν σημαντικές νόσους σε καλλιέργειες και καλλωπιστικά φυτά, ενώ καθένα από τα είδη περιλαμβάνει πολλαπλούς παθότυπους (pathovars, pv.). Συνολικά, τα μέλη του γένους προσβάλλουν τουλάχιστον 124 είδη μονοκοτυλήδων και 268 είδη δικοτυλήδων φυτών, συμπεριλαμβανομένων των οπωροφόρων δένδρων και των ακρόδρυων, των σολανωδών και των σταυρανθών, καθώς και των δημητριακών (Hayward, 1993).

Βασίλειο	<i>Bacteria</i>
Φύλο	<i>Proteobacteria</i>
Κλάση	<i>γ-Proteobacteria</i>
Τάξη	<i>Xanthomonadales</i>
Οικογένεια	<i>Xanthomonadaceae</i>
Γένος	<i>Xanthomonas</i> <i>Dowson 1939</i>

Είναι ραβδόμορφα, μαστιγοφόρα, αρνητικά κατά Gram βακτήρια, που ομοιάζουν πολύ με τις ψευδομονάδες, σχηματίζουν όμως κίτρινες αποικίες, οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για το γένος και στις οποίες οφείλουν και το όνομά τους (Dowson, 1939). Το χρώμα των αποικιών οφείλεται σε μια μοναδική κατηγορία χρωστικών ουσιών, ομοιάζουσες με καροτενοειδή, τις **ξανθομοναδίνες**, οι οποίες είναι αδιάλυτες στο νερό και σχετίζονται αποκλειστικά με την εξωτερική μεμβράνη του κυτταρικού τοιχώματος των ξανθομονάδων (Stephens & Starr, 1963).

Τα φυτοπαθογόνα αυτά βακτήρια προκαλούν μια ποικιλία συμπτωμάτων, όπως νέκρωση, έλκη, κηλίδες και σήψη, ενώ επηρεάζουν διάφορα μέρη του φυτού όπως φύλλα, κλαδιά, και φρούτα (Leyns et al., 1984).

A.6.5.1. *Xanthomonas campestris*

Το *Xanthomonas campestris* προκαλεί τη μαύρη σήψη στα φυτά, σκουραίνοντας τους αγγειακούς ιστούς. Έχουν βρεθεί πάνω από 20 παθότυποι που προκαλούν εξειδικευμένη παθογένεια σ' ένα ευρύ φάσμα φυτών, συμπεριλαμβανομένων των καλλιεργούμενων αλλά και των άγριων φυτών.

Πρόκειται για ένα μεσοφίλικό βακτήριο που ευδοκμεί στους 25-30 °C ενώ σε θερμοκρασίες κάτω από 10°C παραμένει αδρανές. Μπορεί να ζήσει στο έδαφος για πάνω από ένα χρόνο και να εξαπλωθεί μέσω οποιασδήποτε κίνησης του νερού, όπως η βροχή, η άρδευση και τα επιφανειακά υδάτα.

X. campestris pv *campestris*

Η μαύρη σήψη θεωρείται η σημαντικότερη παγκόσμια ασθένεια των σταυρανθών (Williams, 1980). Το είδος *Brassica oleracea* (λάχανο, κουνουπίδι, μπρόκολο, λάχανο και Λαχανάκια Βρυξελλών) είναι από οικονομικής άποψης ο πιο σημαντικός ξενιστής του παθότυπου. Ωστόσο, η νόσος εμφανίζεται επίσης και σε άλλα καλλιεργούμενα και διακοσμητικά σταυρανθή, αλλά και σε συναφή είδη ζιζανίων (Bradbury, 1986).

Το τυπικό σύμπτωμα της νόσου είναι ο σχηματισμός χλωρωτικών, κίτρινων αλλοιώσεων, σχήματος V και σκουρόχρωμο αγγειακό σύστημα, που προκύπτει από την κίνηση του βακτηρίου μέσα σ' αυτό. Οι προσβεβλημένοι ιστοί μπορεί να νεκρωθούν, τα φύλλα πέφτουν πρόωρα, ενώ οι συστηματικές λοιμώξεις μπορεί να προκαλέσουν καχεκτική ανάπτυξη. Δευτερογενείς λοιμώξεις από άλλα είδη βακτηρίων μπορούν επίσης να συμβάλουν στην περαιτέρω σήψη των φυτικών ιστών (Vicente & Holub, 2013).

Τα συμπτώματα της ασθένειας μπορούν να παρατηρηθούν στα φυτά σε οποιοδήποτε στάδιο της ανάπτυξης και ποικίλουν ανάλογα με το γένος του ξενιστή, το είδος, την ποικιλία, την ηλικία του φυτού και το περιβάλλον. Παρόλο που η ασθένεια εμφανίζεται κυρίως στα υπέργεια μέρη του φυτού, σε ξενιστές όπως το γογγύλι και το ραπανάκι οι σαρκώδεις ρίζες μπορεί να επηρεαστούν, παρουσιάζοντας εσωτερικά σημάδια αγγειακού αποχρωματισμού (Lambe & Lacy, 1982; Sherf & MacNab, 1986). Οι μολυσμένοι σπόροι συνήθως δεν παρουσιάζουν κανένα σημάδι της μόλυνσης. Ωστόσο, έχει αναφερθεί αποχρωματισμός ή κηλίδες σε σπόρους από τον Shiomi το 1991.

Η μαύρη σήψη είναι πρωτίστως μια σπορογόνος ασθένεια. Ωστόσο, η νόσος μπορεί επίσης να μεταδοθεί μέσω μολυσμένων μοσχευμάτων και χώματος, υπολειμμάτων καλλιεργειών και από τη μεταφορά συναφών ειδών ζιζανίων. Η λοίμωξη είναι συχνά λανθάνουσα, όταν οι θερμοκρασίες είναι χαμηλές, καθώς τα βακτήρια μπορεί να παραμείνουν στο αγγειακό σύστημα χωρίς να δημιουργούν συμπτώματα και, όταν η θερμοκρασία ανεβαίνει, τα τυπικά συμπτώματα γίνονται εμφανή (Vicente & Holub, 2013).

Σε γενικές γραμμές, το Xcc ευδοκιμεί ως σοβαρός νοσογόνος παράγοντας σε θερμά, υγρά κλίματα και, κατά συνέπεια, σε τροπικές, υποτροπικές και υγρές ηπειρωτικές περιοχές (Williams, 1980).

X. campestris pv *juglandis*

Ο παθότυπος προσβάλλει είδη του γένους *Juglans*. Προκαλεί σήψη στην αγγλική ή περσική καρυδιά (*J. regia*), στη μαύρη καρυδιά (*J. nigra*), στη λευκή καρυδιά (*J. cinerea*) και στην καρυδιά Siebold (*J. Sieboldiana*). Μαύρες, νεκρωτικές κηλίδες εμφανίζονται στους νεαρούς καρπούς, τους πράσινους βλαστούς και τα φύλλα. Πολλοί καρποί πέφτουν πρόωρα, ενώ κάποιοι μπορεί να φτάσουν σε πλήρες μέγεθος με το φλοιό, το κέλυφος, και τον πυρήνα περισσότερο ή λιγότερο μαυρισμένο και κατεστραμένο (Horst, 2008).

X. campestris pv *malvacearum* (Smith)

Προκαλεί τη βακτηριακή σήψη στο βαμβάκι (*Gossypium hirsutum* L.) έχοντας ως συνέπεια σημαντικές απώλειες στην παραγωγή. Η πρώτη καταγραφή του παθότυπου έγινε στην Αυστραλία το 1923 (Allen, 1991).



Εικόνα 20: Μαλακή σήψη από α) *X. campestris* pv. *campestris*, β) *X. campestris* pv. *juglandis*, γ) *X. campestris* pv. *malvacearum*

A.7. Φυτοπαθογόνοι μύκητες

A.7.1. Γένος *Phytophthora*

Το γένος *Phytophthora* είναι από τα πιο ενδιαφέροντα γένη φυτοπαθογόνων μυκήτων. Το όνομά του προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις “φυτό” και “φθορά”. Αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1876 από τον Anton de Bary, γερμανό βοτανολόγο, ο οποίος περιγραψε το παθογόνο που προξενούσε τον περονόσπορο της πατάτας στην Ιρλανδία και στο οποίο έδωσε το όνομα *Phytophthora infestans*. Το γένος προσβάλλει ένα μεγάλο εύρος φυτών, με περισσότερα από 100 γένη και ένα μεγάλο αριθμό οικογενειών, που αναφέρονται σήμερα ως ξενιστές του γένους.

Πολλά είδη προσβάλλουν τα υπέργεια μέρη όπως φύλλα, στελέχη και καρπούς, ενώ άλλα προκαλούν τήξεις σπορείων ή προσβάλλουν τις ρίζες και τις βάσεις των ποωδών, αλλά και των πολυετών ξυλωδών φυτών, τα οποία είναι καρποφόρα δένδρα ή θάμνοι και δένδρα καλλωπιστικά και δασικά. Η προσβολή σ’ αυτά πολλές φορές αρχίζει από τα φυτώρια, μεταφέρεται στις φυτείες ή στους κήπους και όταν οι συνθήκες στο έδαφος είναι ευνοϊκές, σημειώνονται μεγάλες ζημιές. Τα περισσότερα είδη προσβάλλουν εντελώς υγιείς ιστούς και όχι ήδη προσβεβλημένους από άλλα παθογόνα.

Έχουν εξαιρετική ικανότητα να προσαρμόζονται σε ποικίλες συνθήκες περιβάλλοντος, δημιουργούν με μεγάλη ευκολία νέους παθότυπους και παράγουν εύκολα άφθονα μολύσματα και χημικές ουσίες για αποσύνθεση ιστών, όπως τοξίνες και ένζυμα.

A.7.2. *P. nicotianae* Breda de Haan

Ένα από τα σημαντικότερα είδη του γένους και το πιο διαδεδομένο στη χώρα μας είναι το *P. nicotianae*, το οποίο προσβάλλει ένα ευρύτατο κύκλο ξενιστών (Πίνακας 18).

Σχηματίζει σποριάγγεια διαφόρων σχημάτων, με ευδιάκριτη θηλή (πολλές φορές σχηματίζονται δύο), δεν αποσπώνται από τον σποριαγγειοφόρο, έχουν διαστάσεις ως επί το πλείστον 40x28 μm και ο λόγος μήκους προς πλάτος είναι μικρότερος από 1,4. Παράγονται συνήθως άφθονα χλαμυδοσπόρια επάκρια ή ενδιάμεσα με διάμετρο 28 μm κατά μέσο όρο. Ωοσπόρια σχηματίζονται δύσκολα σε απλές καλλιέργειες, σχηματίζονται όμως μερικές φορές, όταν οι καλλιέργειες είναι αρκετών μηνών ή κατόπιν διασταυρώσεων με διαφορετικού τύπου στελέχη (ετεροθαλισμός). Η διάμετρός τους κυμαίνεται από 13-35 μm. Το μέγιστο της θερμοκρασίας ανάπτυξής του είναι 37 °C (Ελένα, 1999).

Τομέας:	<i>Eukaryota</i>
Βασίλειο	<i>Fungi</i> (πρόσφατη κατάταξη: <i>Chromista</i>)
Φύλο	<i>Heterokontophyta</i>
Κλάση	<i>Oomycetes</i>
Τάξη	<i>Peronosporales</i>
Οικογένεια	<i>Pythiaceae</i>
Γένος	<i>Phytophthora</i>
Είδος	<i>P. nicotianae</i> Breda de Haan (<i>P. parasitica</i> Dastur)

Πίνακας 17: Οι ξενιστές που έχει προσβάλει στην Ελλάδα το *P. nicotianae*.

Είδος	Ξενιστές
<i>P. nicotianae</i>	Αμυγδαλιά, ανθούριο, αράλια, βαμβάκι, βερικοκιά, βίγκα, βοτρυόκαρπος, γαριφαλιά, γιούκα, γλοξινία, δενδρολίβανο, ζέμπερα, κάκτος, καπνός, κισσός, κυκλάμινο, λαβαντούλα, λάχανο, λεβάντα, λεμονιά, μανταρινιά, μελιτζάνα, μπανάνα, μυόπορο, πατάτα, παχύφυτο, πεπονιά, πορτοκαλιά, πρίμουλα, σάλβια, σαιντπώλια, σουσάμι, σπαθίφυλλο, τομάτα, φασόλι, φιστικιά

Οι σπουδαιότερες ασθένειες που προκαλεί το είδος στις καλλιέργειες είναι:

Η “**κομμίωση**” (*Citrus gummosis*) των εσπεριδοειδών. Πρόκειται για τη σοβαρότερη από τις ασθένειες που προξενεί το είδος στα εσπεριδοειδή, διότι καταστρέφει ολόκληρα τα δέντρα. Το παθογόνο προσβάλλει κυρίως το λαιμό των δένδρων και μέχρι ύψος 60-80 cm. από το έδαφος. Η προσβολή επεκτείνεται στον κορμό λίγα εκατοστά κάτω από την επιφάνεια του εδάφους, καθώς και στις κεντρικές επιφανειακές ρίζες. Ο φλοιός νεκρώνεται, το κάμβιο μεταχρωματίζεται και στα υπόγεια τμήματα παρατηρείται σήψη, ενώ σε προχωρημένη προσβολή, χλώρωση σε ολόκληρη την κόμη του δένδρου.

Η “**αποπληξία των πυρηνόκαρπων**” (*stone fruit apoplexy*), όπου παρατηρούνται απότομες ξηράνσεις μικρών και ενήλικων δένδρων και αλλοιώσεις στο φλοιό και στο κάμβιο, ιδιαίτερα τους θερινούς μήνες.

Οι προσβολές από *Phytophthora* στη μηλιά και στην αχλαδιά είναι από τις σοβαρότερες για τους ξενιστές αυτούς, μερικές από τις οποίες οφείλονται στο *P. nicotianae*, ενώ το ίδιο είδος είναι από τους βασικούς υπεύθυνους για την “**αποπληξία**” στην φιστικιά, ένα από τα σημαντικότερα φυτοπαθολογικά προβλήματα που αντιμετωπίζει η καλλιέργεια στη χώρα μας.

Σοβαρές ζημιές αναφέρονται επίσης στο καπνό, την τομάτα, τη μελιτζάνα και τα κολοκυνθοειδή (Ελένα, 1999)

P. nicotianae 1933 BPI & P. nicotianae 2501 BPI

Το στέλεχος *P. nicotianae* 1933 BPI προκαλεί τήξεις των σπορείων και σήψη των ριζών της τομάτας, ενώ όταν τα φυτά είναι νεαρά, το στέλεχος προσβάλλεται στην περιοχή του λαιμού και σχηματίζει έλκος που προκαλεί μάρανση και ξήρανση του φυτού.

Στους καρπούς τα αρχικά συμπτώματα είναι γκριζοπράσινες ή καφετιές κηλίδες. Όταν οι θερμοκρασίες είναι υψηλές, η μισή και πλέον επιφάνεια του καρπού προσβάλλεται. Συχνά σχηματίζονται σκουρόχρωμες ζώνες (*buckey rot*) στην προσβεβλημένη επιφάνεια, που παραμένουν λείες και χωρίς σαφή όρια. Οι νεαροί πράσινοι καρποί συχνά μουμιοποιούνται, ενώ οι ώριμοι σαπίζουν γρήγορα από δευτερογενείς μολύνσεις. Ευνοείται ιδιαίτερα από συνθήκες υψηλής υγρασίας και θερμοκρασίας μεγαλύτερης από 22°C.

Το στέλεχος *P. nicotianae* 2501 BPI έχει εξαπλωθεί σε όλα τα μέρη του κόσμου και δημιουργεί σοβαρά προβλήματα σε όλους τους τύπους καλλιεργουμένων καπνών. Προξενεί σήψη των ριζών και εν συνεχεία μαύρισμα του κάτω μέρους του στελέχους (black shank), ενώ η εντεριώνη σχίζεται σε οριζόντιους παράλληλους δίσκους. Το στέλεχος μπορεί να προσβληθεί και απ'ευθείας, όταν το νερό του ποτίσματος μεταφέρει ζωοσπόρια στο σπορείο και στο χωράφι. Σε μεγαλύτερα φυτά μπορεί να παρατηρηθεί μάρανση μερικών φύλλων ή και ολόκληρου του φυτού, ενώ όταν ο καιρός είναι βροχερός μπορούν να προσληφθούν τα κατώτερα φύλλα και να σχηματιστούν κυκλικές κυλίδες διαμέτρου περίπου 8 cm.

Από πολλούς ερευνητές αναφέρεται ότι τα στελέχη που προσβάλλουν τον καπνό, αποτελούν μια ξεχωριστή ομάδα, που ο μόνος ξενιστής τους είναι ο καπνός, ενώ σε τεχνητές μολύνσεις μπορεί να μολύνουν και άλλα είδη. Η ασθένεια ευνοείται, όταν η θερμοκρασία ξεπεράσει τους 20°C, η υγρασία είναι πολύ υψηλή και το pH κυμαίνεται από 6-7.

Κατά την αποσύνθεση των υπολειμμάτων της μολυσμένης καλλιέργειας, τα χλαμυδοσπόρια ενσωματώνονται στο έδαφος και επιβιώνουν για μερικά χρόνια χωρίς την παρουσία ξενιστή. Μεταδίδεται με το νερό, τα εργαλεία κατεργασίας και τους εργάτες (Ελένα, 1999).



Εικόνα 21: Προσβολή από *P. nicotianae* σε καλλιέργειες α) τομάτας β) καπνού

Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B.1. Παρασκευή δειγμάτων

B.1.1. Εκχύλιση με Υπέρηχους (UAE)

Αρχή μεθόδου

Στην εκχύλιση με υπέρηχους, το δείγμα τοποθετείται με κατάλληλο διαλύτη σε λουτρό υπερήχων. Η διάδοση των υπερήχων χαρακτηρίζεται από ελάχιστη συχνότητα 16kHz και προκαλεί κίνηση του υγρού λόγω συμπίεσης και αραιώσης. Με την αύξηση της πίεσης επιταχύνονται φαινόμενα διείσδυσης και μεταφοράς, ενώ με την αύξηση της θερμοκρασίας επιταχύνονται φαινόμενα διάχυσης και διαλυτοποίησης. Με την χρήση των υπερήχων μειώνεται ο χρόνος εκχύλισης, χρησιμοποιούνται μικρότεροι όγκοι διαλυτών και εκχυλίζονται ταυτόχρονα πολλά δείγματα. Η εκχύλιση με υπέρηχους εφαρμόζεται στον προσδιορισμό ενώσεων που είναι θερμικά ασταθείς (Man, 2001).

Πειραματική πορεία

Τοποθετήθηκαν 20g δείγματος με 250 mL διαλύτη σε λουτρό υπερήχων για 30 min. Στη συνέχεια το μίγμα αφέθηκε για 15 min. σε ηρεμία και επανατοποθετήθηκε στο υδατόλουτρο με τον ίδιο διαλύτη για άλλα 30 min. Μετά το πέρας της εκχύλισης ακολούθησε διήθηση υπό κενό, με διηθητικό χαρτί, σε χωνί Büchner. Το εκχύλισμα συμπυκνώθηκε σε Rotavapor Buchi R-210 και φυλάχθηκε σε σκουρόχρωμο δοχείο στους 4°C. Η πειραματική αυτή διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για τα 20 εκχυλίσματα.

B.1.2. Υδροαπόσταξη με Μικροκύματα (MAHD)

Αρχή μεθόδου

Η διαδικασία της υδροαπόσταξης με μικροκύματα, η οποία αναπτύχθηκε από τον Stashenko και τους συνεργάτες του το 2004, βασίζεται αποκλειστικά στην αρχή λειτουργίας της κλασικής υδροαπόσταξης. Ένα μέρος της συσκευής υδροαπόσταξης (σφαιρική φιάλη) είναι τοποθετημένο σε φούρνο μικροκυμάτων και περιέχει νερό και το φυτικό υλικό, ενώ το ψυκτικό σύστημα και το σύστημα συγκέντρωσης του αιθέριου ελαίου βρίσκονται έξω από τον φούρνο (Chemat & Cravotto, 2012).

Η τεχνική αυτή έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον σε ερευνητικό και βιομηχανικό επίπεδο λόγω της αποτελεσματικής θέρμανσης, της γρήγορης μεταφοράς ενέργειας, της υψηλής απόδοσης και της φιλικότητας προς το περιβάλλον. (Ranitha et al., 2014)

Πειραματική πορεία

Τα φυτικά δείγματα, αφού τεμαχίστηκαν, υποβλήθηκαν σε απόσταξη μεθ' υδρατμών σε συσκευή Clevenger με τη χρήση μικροκυμάτων για 15 min στα 700 W.

Το υδατικό λήμμα που παρέμεινε στη σφαιρική φιάλη, συλλέχθηκε και ακολούθησε διήθηση υπό κενό, με διηθητικό χαρτί, σε χωνί Büchner. Το υδρόλυμα συμπυκνώθηκε σε Rotavapor Buchi R-210 και φυλάχθηκε σε σκουρόχρωμο δοχείο στους 4 °C.

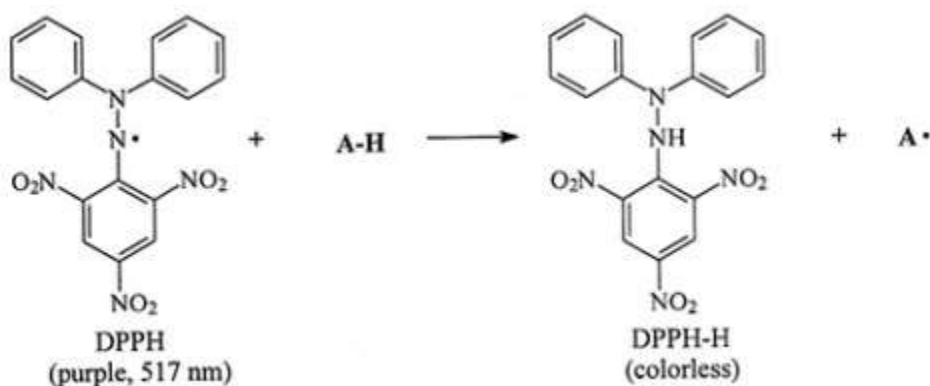
B.2. Βιοδοκιμές

B.2.1. Μελέτη Αντιοξειδωτικής Δράσης

B.2.1.1. Μέθοδος DPPH

Μηχανισμός δράσης

Το DPPH (2,2 –διφαινυλ-1-πικρυλυδραζίλιο) αποτελεί μία από τις λίγες σταθερές και εμπορικά διαθέσιμες οργανικές ρίζες αζώτου με έντονα ιώδες χρώμα. Τα αντιοξειδωτικά συστατικά του προς ανάλυση δείγματος, δεσμεύουν αυτή τη ρίζα, οδηγώντας στον αποχρωματισμό του διαλύματος από έντονο ιώδες σε υποκίτρινο. Η ελάττωση της απορρόφησης παρακολουθείται στα 517 nm, όπου παρατηρείται το μέγιστο του φάσματος του μορίου της ρίζας (Brand-Williams *et al.*, 1995). Η μεταβολή της έντασης της απορρόφησης αντικατοπτρίζει τη μείωση της ποσότητας της ελεύθερης ρίζας.



Εικόνα 22: Δομή του μορίου DPPH πριν και μετά την αντίδραση με αντιοξειδωτικό παράγοντα

Πειραματική πορεία

Αρχικά παρασκευάστηκε το αντιδραστήριο και τα δείγματα:

- Διάλυμα DPPH : 1,24 mg αντιδραστήριου DPPH + 10 mL EtOH. Το διάλυμα αναδεύτηκε και τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο υπερήχων μέχρι πλήρους διάλυσης.
- Παρασκευή δειγμάτων διαλυμένα στον αντίστοιχο διαλύτη σε c=4mg/mL.

Σε πηγάδι 96-τρυπης πλάκας τοποθετήθηκαν 10μL δείγματος και 190 μL αιθανολικού διαλύματος DPPH. Ο τελικός όγκος μέσα στο πηγάδι ήταν 200 μL με συγκέντρωση $c=0,2 \text{ mg/mL}$. Για το διαλύτη του κάθε δείγματος δημιουργήθηκε “control” δείγμα με 10 μL διαλύτη και 190 μL αιθανολικού διαλύματος DPPH. Επίσης, δημιουργήθηκε πηγάδι για τον αντιοξειδωτικό παράγοντα, το γαλλικό οξύ (10μL GA + 190 μL διαλύματος DPPH) με συγκέντρωση $c=0,1 \text{ mg/mL}$. (Koleva et al., 2002). Για όλα τα δείγματα, τον αντιοξειδωτικό παράγοντα αλλά και τα control δημιουργήθηκαν τα αντίστοιχα τυφλά “blank” που αποτελούνταν από 10 μL δείγματος και 190 μL EtOH. Το γαλλικό οξύ χρησιμοποιήθηκε σαν θετικός μάρτυρας., ενώ σε όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις.

Η πλάκα επώσθηκε στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου, για 30 λεπτά και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 517 nm.

Το ποσοστό δέσμευσης της DPPH ρίζας υπολογίστηκε από την ακόλουθη εξίσωση:

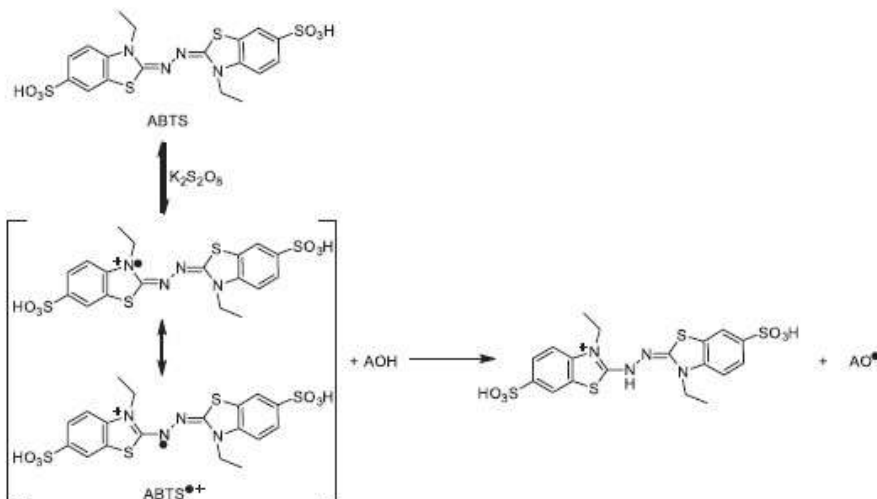
$$\{[(A-B)-(C-D)] / (A-B)\} \times 100,$$

όπου A: Control (χωρίς δείγμα), B: “blank” του “control” (χωρίς δείγμα, χωρίς DPPH), C: δείγμα, D: “blank” δείγματος (χωρίς DPPH).

B.2.1.2. Μέθοδος ABTS

Μηχανισμός δράσης

Η μέθοδος ABTS αναπτύχθηκε αρχικά από τους Miller και Rice-Evans το 1993 και αργότερα εξελίχθηκε. Η μέθοδος ABTS μετρά τη σχετική ικανότητα των αντιοξειδωτικών συστατικών των μελετούμενων δειγμάτων να εξουδετερώνουν το οξειδωτικό $\text{ABTS}^{\bullet+}$, το οποίο παράγεται από την οξείδωση του 2,2’-αζινοδι(3-αιθυλβενζοδιαζολινο-6-σουλφονικού οξέως)- ABTS^{2-} με υπερθεϊικά ιόντα, σε σύγκριση με το Trolox (6-υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυλχρωμαν-2-καρβοξυλικό οξύ). Μετά την αντίδραση με τον ισχυρό οξειδωτικό παράγοντα (υπερθεϊκό κάλιο) το διάλυμα αποκτά βαθύ κυανό χρώμα. Η μείωση του χρώματος του διαλύματος του ABTS από αντιοξειδωτικούς παράγοντες-δότες υδρογόνου, υπολογίζεται από τη μείωση της απορρόφησης στα 734nm (Re et al., 1999)



Εικόνα 23: Οξείδωση του ABTS από υπερθειϊκό κάλιο προς σχηματισμό κατιοντικής ρίζας $ABTS^{\bullet+}$ και η αντίδρασή της με αντιοξειδωτικό μόριο (AOH)

Πειραματική πορεία

Αρχικά παρασκευάστηκαν τα αντιδραστήρια και τα δείγματα:

- **Διάλυμα 1: 7mM ABTS** - 36,02mg ABTS + 10ml dH₂O (σε σκοτάδι). Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο υπερήχων και αναδεύτηκε με τη βοήθεια vortex.
- **Διάλυμα 2: 140mM υπερθειϊκό κάλιο $K_2S_2O_8$** - 37,84mg Potassium persulphate + 1ml dH₂O. Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο υπερήχων και αναδεύτηκε με τη βοήθεια vortex.
- **Διάλυμα 3:** Αναμίχθηκαν 6 mL από διάλυμα 1 + 98,4μL από διάλυμα 2 (σε σκοτάδι). Το διάλυμα παρέμεινε για επώαση, σε θερμοκρασία δωματίου, για 16-17 ώρες, οπότε και έλαβε βαθύ κυανό χρώμα. Πριν χρησιμοποιηθεί μετρήθηκε η απορρόφησή του διαλύματος στα 734 nm και προστέθηκε τόση αιθανόλη, ώστε η τιμή της απορρόφησης να ήταν $0,70 \pm 0,02$.
- Παρασκευή δειγμάτων διαλυμένα στον αντίστοιχο διαλύτη σε $c=0,3$ mg/mL.

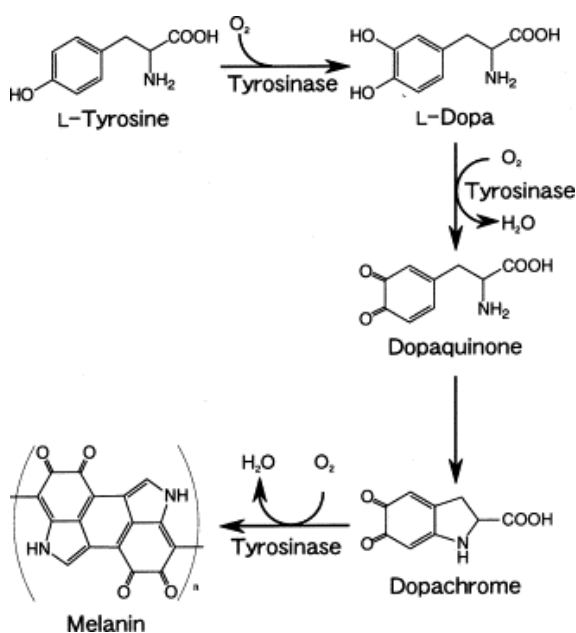
Σε πηγάδι 96-τρυπής πλάκας τοποθετήθηκαν 50μL δείγματος και 100 μL αιθανολικού διαλύματος ABTS. Ο τελικός όγκος μέσα στο πηγάδι ήταν 150 μL με συγκέντρωση $c=0,1$ mg/mL. Για το διαλύτη του κάθε δείγματος δημιουργήθηκε “control” δείγμα με 50 μL διαλύτη και 100 μL διαλύματος ABTS. Σαν πρότυπος αντιοξειδωτικός παράγοντας χρησιμοποιήθηκε το Trolox ($IC_{50}=30\mu g/ml$). Επίσης, δημιουργήθηκε πηγάδι για τον αντιοξειδωτικό παράγοντα, το trolox (50μL GA + 100 μL διαλύματος ABTS) με συγκέντρωση $c=0,03$ mg/mL. Για όλα τα δείγματα, τον αντιοξειδωτικό παράγοντα αλλά και τα control δημιουργήθηκαν τα αντίστοιχα τυφλά που αποτελούνταν από 50 μL δείγματος και 100 μL EtOH. Σε όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις.

Η πλάκα επώαστηκε στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου, για 10 λεπτά και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 734 nm.

B.2.2. Μελέτη Λευκαντικής Δράσης

Μηχανισμός δράσης

Η τυροσινάση είναι ένα ένζυμο ευρέως διαδεδομένο σε βακτήρια, μύκητες, ανώτερα φυτά και σε ζώα. Πρόκειται για μια μονοοξυγενάση που περιέχει χαλκό στο ενεργό της κέντρο και εμπλέκεται στη βιοσύνθεση της μελανίνης. Καταλύει την υδροξυλίωση της τυροσίνης, μιας μονοφαινόλης, σε 3,4-δihydroxyφαινυλαλανίνη ή σε DOPA, μια ο-διφαινόλη). Η οξείδωση της DOPA σε ντοπακουνόνη (ο-κουινόνη) μπορεί στη συνέχεια να μετασχηματιστεί στις χρωστικές μελανίνης μέσω μιας σειράς ενζυματικών και μη ενζυματικών αντιδράσεων (Sánchez-Ferrer et al., 1995).



Εικόνα 24: Μηχανισμός δράσης της τυροσινάσης

Πειραματική πορεία (Masuda et al., 2007)

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η ικανότητα των δειγμάτων να παρεμποδίσουν την οξείδωση της L-DOPA σε ντοπακινόνη και ακολούθως σε ντοπαχρώμη από τυροσινάση μανιταριού.

Αρχικά παρασκευάστηκαν τα αντιδραστήρια και τα δείγματα:

- ο **Ρυθμιστικό Διάλυμα** : 49,4g NaH_2PO_4 + 82,6 g Na_2HPO_4 + 1L dH₂O. Μαγνητική ανάδευση για μισή ώρα και μέτρηση pH=6,7±0,02. Διατήρηση στους 4°C.
- ο **L-DOPA** : 5 mg + 10 mL dH₂O (σε σκοτάδι). Το διάλυμα αναδεύτηκε με τη βοήθεια vortex και τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο υπερήχων για 15 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 2900rpm, για 10 λεπτά και μεταφορά του υπερκείμενου σε falcon. Το υπόστρωμα διατηρήθηκε σε σκοτεινό περιβάλλον και σε θερμοκρασία δωματίου.
- ο **Διάλυμα Τυροσινάσης**: 92 u/mL Τυροσινάση μανιταριού (Tyrosinase from mushroom lyophilized powder, ≥ 1.000 unit/mg solid T3824 (25KU), Sigma- Aldrich) διαλυμένη σε Potassium Buffer.

- ο Παρασκευή δειγμάτων διαλυμένα στον αντίστοιχο διαλύτη σε $c=1,5 \text{ mg/mL}$.

Σε πηγάδι 96-τρυπής πλάκας τοποθετήθηκαν 40 μL δείγματος, 80 μL ρυθμιστικού διαλύματος και 40 μL τυροσινάσης. Για το κάθε δείγμα δημιουργήθηκε και ένα πηγάδι με το αντίστοιχο blank (120 μL ρυθμιστικού διαλύματος και 40 μL δείγματος). Επίσης δημιουργήθηκε και ένα δείγμα control (120 μL ρυθμιστικού διαλύματος και 40 μL τυροσινάσης) με το αντίστοιχο blank (blank control=160 μL ρυθμιστικού διαλύματος). Σαν πρότυποι αναστολείς χρησιμοποιήθηκαν το κοζικό οξύ ($\text{IC}_{50}=2\mu\text{g/ml}$) και το μεθανολικό εκχύλισμα ριζών γλυκόριζας ($\text{IC}_{50}=5\mu\text{g/ml}$), ενώ σε όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις.

Η πλάκα επώαστηκε στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου, για 10 λεπτά και στη συνέχεια προστέθηκαν σε όλα τα πηγάδια 40 μL L-DOPA. Ο τελικός όγκος μέσα στο πηγάδι ήταν 200 μL . Ακολούθησε επώαση, στο σκοτάδι, για 5 λεπτά και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 475 nm.

Μετρήθηκε η παραγόμενη ποσότητα ντοπαχρώμης και υπολογίστηκε το ποσοστό παρεμπόδισης της τυροσινάσης όπως και στη μέθοδο DPPH.

B.2.3. Προσδιορισμός Ολικού Φαινολικού Περιεχομένου (TPC)

Μηχανισμός δράσης

Ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα και τα υδρολύματα έγινε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu με χρήση πρότυπης ουσίας το γαλλικό οξύ. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη μέτρηση της ολικής συγκέντρωσης υδροξυλομάδων που βρίσκονται στα υπό ανάλυση δείγματα. Το φαινολικό ιόν οξειδώνεται σε αλκαλικό περιβάλλον με ταυτόχρονη αναγωγή του φωσφορομολυβδαινικού και φωσφοροβολφραμικού συμπλόκου του αντιδραστήριου, με αποτέλεσμα το χρωματισμό του διαλύματος από κίτρινο σε μπλε και τη δυνατότητα μέτρησης της απορρόφησής του στα 765nm (Ainsworth et al., 2007).

Το ολικό φαινολικό περιεχόμενο εκφράζεται ως: $\text{FC (Folin – Ciocalteu)} = \text{mg γαλλικού οξέος (GAE)/ g ξηρής ουσίας}$.

Πειραματική πορεία

Αρχικά παρασκευάστηκαν τα αντιδραστήρια και τα δείγματα:

- ο Διάλυμα F-C: 0.25 mL διαλύματος Folin-Ciocalteu + 2.25 mL dH_2O (σε σκοτάδι)
- ο Διάλυμα Na_2CO_3 : 2.25 g Na_2CO_3 (75% w/v) + 30 mL dH_2O (σε σκοτάδι)
- ο Παρασκευή δειγμάτων διαλυμένα στον αντίστοιχο διαλύτη σε $c=4 \text{ mg/mL}$.

Σε πηγάδι 96-τρυπής πλάκας τοποθετήθηκαν 25 μL δείγματος, 125 μL διαλύματος F-C και 100 μL διαλύματος ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3). Ο τελικός όγκος μέσα στο πηγάδι ήταν 250 μL με συγκέντρωση $c=0,4 \text{ mg/mL}$. Για το διαλύτη του κάθε δείγματος δημιουργήθηκε “τυφλό” δείγμα

με την τοποθέτηση σε πηγάδι 25μL διαλύτη και 225 μL d H₂O. Για όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις.

Η πλάκα επώσθηκε στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου, για 30 λεπτά και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 765 nm.

Για τη δημιουργία της καμπύλης του γαλλικού οξέως πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις από αρχικό δείγμα c=1mg/mL, ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις μέσα στα πηγάδια να είναι 7.5, 10, 20, 25, 30, 35, 40, 80 και 100 μg/mL.

B.2.4. Μελέτη Αντιμικροβιακής δράσης

Οι φυτοπαθογόνοι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ευγενική προσφορά των εργαστηρίων Βακτηριολογίας και Μυκητολογίας του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου (Μπ.Φ.Ι.).

Τα φυτοπαθογόνα βακτήρια και μύκητες που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμές αναφέρονται στον ακόλουθο Πίνακα 19:

Πίνακας 18: Φυτοπαθογόνοι μικροοργανισμοί

ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ	
<i>Acidovorax citrulli</i> w1	<i>Pseudomonas savastanoi</i>
<i>Acidovorax</i> sp.	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> col2
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Ag 20)	<i>Pseudomonas tolaasii</i> 32k/1215
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> 363/2008	<i>Pseudomonas tolaasii</i> col1/2063
<i>Erwinia carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i> BPIC 162	<i>Pseudomonas viridiflava</i> col1/5473
<i>Erwinia chrysanthemi</i> 1530/2008	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
<i>Pseudomonas cichorii</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>juglandis</i>
<i>Pseudomonas corrugata</i> col2/2541	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>malvacearum</i>
<i>Pseudomonas corrugata</i> col1/2564	
ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΜΥΚΗΤΑΣ	
<i>Phytophthora nicotianae</i> 1933 BPI	<i>Phytophthora nicotianae</i> 2501 BPI

B.2.4.1. Μέθοδος της διάχυσης με δίσκους (paper disk diffusion assay)

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος διάχυσης με δίσκους αναφέρεται στην διάχυση ενός αντιμικροβιακού παράγοντα μιας καθορισμένης συγκέντρωσης από δίσκους, μέσα στο στερεό μέσο καλλιέργειας που έχει εμβολιαστεί με επιλεγμένο εμβόλιο από καθαρή καλλιέργεια. Βασίζεται στον προσδιορισμό της ζώνης αναστολής, η οποία είναι ανάλογη προς τη βακτηριακή ευαισθησία στον αντιμικροβιακό παράγοντα που υπάρχει στο δίσκο.

Η διάχυση του αντιμικροβιακού παράγοντα στο θρεπτικό υπόστρωμα της καλλιέργειας έχει ως αποτέλεσμα τη διαβάθμιση του αντιμικροβιακού παράγοντα. Όταν η συγκέντρωση του αντιμικροβιακού μειωθεί τόσο ώστε να μην μπορεί πλέον ν' αναστείλει την ανάπτυξη του υπό δοκιμή βακτηρίου, η ζώνη αναστολής οριοθετείται. Η διάμετρος αυτής της ζώνης αναστολής γύρω από τον αντιμικροβιακό δίσκο σχετίζεται με την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) για το συγκεκριμένο συνδυασμό βακτηρίου / αντιμικροβιακού παράγοντα. Η ζώνη αναστολής συσχετίζεται αντιστρόφως με τη MIC του μελετούμενου βακτηρίου. Σε γενικές γραμμές, όσο μεγαλύτερη είναι η ζώνη αναστολής, τόσο χαμηλότερη είναι η συγκέντρωση του αντιμικροβιακού που απαιτείται για την αναστολή της ανάπτυξης των οργανισμών (OIE Terrestrial Manual 2012).

Πειραματική πορεία

➤ Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος

Για την ανάπτυξη των φυτοπαθογόνων βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υπόστρωμα NA του οποίου η παρασκευή έγινε ως ακολούθως:

Σε 1 L απιονισμένου νερού τοποθετήθηκαν και 11,4 g σκόνης Nutrient Agar (NA) και το περιεχόμενο αναδεύτηκε υπό θέρμανση για λίγα λεπτά ώστε να διαλυθεί καλά. Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετήθηκε σε κλίβανο αποστείρωσης, όπου και αποστειρώθηκε στους 121 °C για 20 λεπτά. Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri υπό ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής. Το υλικό των τρυβλίων Petri αφέθηκε στο θάλαμο νηματικής ροής να σταθεροποιηθεί.

➤ Υγρή επίστρωση σε τρυβλίο

Εναιώρημα βακτηριακής καλλιέργειας 2 ημερών σε αποστειρωμένο και απιονισμένο νερό (100-300μL) ενοφθαλμίστηκε στην επιφάνεια των τρυβλίων με το θρεπτικό μέσο. Ακολούθησε ομοιόμορφη διασπορά της καλλιέργειας με τη βοήθεια αποστειρωμένου διανομέα.

➤ Εμποτισμός δίσκων

Πραγματοποιήθηκε εμποτισμός των χάρτινων αποστειρωμένων δίσκων διαμέτρου 6 mm με 20 μL των προς εξέταση δειγμάτων με $c=50 \text{ mg/mL}$, ώστε η τελική ποσότητα στο δίσκο για το κάθε δείγμα να είναι 1 mg. Οι χάρτινοι δίσκοι μεταφέρθηκαν με τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας περιμετρικά στα τρυβλία στα οποία είχε γίνει επίστρωση, ενώ σε κάθε τρυβλίο τοποθετήθηκε ως θετικός μάρτυρας και ένας δίσκος εμποτισμένος με το αντιβιοτικό χλωραμφενικόλη ($c = 30\mu\text{g}$).



Εικόνα 25: Εμποτισμός δίσκων με το υπό εξέταση δείγμα

Όλη η διαδικασία έλαβε χώρα υπό ασηπτικές συνθήκες, μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής. Οι ανακαλλιέργειες των βακτηρίων πραγματοποιούνταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες οι οποίοι περιείχαν κεκλιμένο θρεπτικό υπόστρωμα ΝΑ.

Ακολούθησε επώαση στους 28 °C για 48 ώρες. Μετά το πέρας των 2 ημερών ελήφθησαν μετρήσεις με την βοήθεια αριθμημένου χάρακα οπότε και πραγματοποιήθηκε μέτρηση της διαμέτρου σε 3 σημεία των ζωνών αναστολής που σχηματίστηκαν γύρω από την περιοχή των χάρτινων δίσκων.

Πραγματοποιήθηκαν 2 μεταχειρίσεις. Ο αριθμός των επαναλήψεων ανά μεταχείριση ήταν 3.

B.2.4.2. Μέθοδος αραιώσης σε άγαρ (agar dilution assay)

Αρχή μεθόδου

Η δοκιμή ευαισθησίας αραιώσεως στο άγαρ αποτελεί μια από τις παλιότερες μεθόδους που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών σε αντιβιοτικά. Περιλαμβάνει την ενσωμάτωση διαφόρων συγκεντρώσεων ενός αντιμικροβιακής ουσίας σε ένα στερεό θρεπτικό μέσο, χρησιμοποιώντας συνήθως διαδοχικές διπλές αραιώσεις, ακολουθούμενη από την εφαρμογή ενός ορισμένου εμβολίου του μικροοργανισμού στην επιφάνεια του μέσου στο τρυβλίο. Αυτή η τεχνική συχνά θεωρείται ως η πλέον αξιόπιστη για τον προσδιορισμό της MIC για το συγκεκριμένο συνδυασμό μικροοργανισμού / αντιμικροβιακής ουσίας (OIE Terrestrial Manual 2012).

Πειραματική πορεία

➤ Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος

Για την ανάπτυξη των 2 στελεχών του φυτοπαθογόνου μύκητα χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υπόστρωμα V8 (P.M. Miller 1955) του οποίου η παρασκευή έγινε ως ακολούθως: Διαλύθηκαν 200mL χυμού V8 (Campbell Soup Co.) σε 1 L απιονισμένου και απεσταγμένου και αναμίχθηκαν με 2 g CaCO_3 , για αρκετά λεπτά, με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα (ώστε το pH του διαλύματος να

ρυθμίζεται στο 7). Στη συνέχεια, προστέθηκαν 15 g αγαρ (Bacterial Grade Agar) και το διάλυμα τοποθετήθηκε σε κλίβανο αποστείρωσης, όπου και αποστειρώθηκε στους 121 °C για 20 λεπτά.

➤ Διάχυση εκχυλισμάτων σε θρεπτικό υλικό

Σε 45 mL θρεπτικού μεσου προστέθηκαν 5 mL δείγματος, διαλυμένου σε αποστειρωμένο και απεσταγμένο νερό ($c=100\text{mg/mL}$). Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε 6 αποστειρωμένα τρυβλία Petri (60mm), υπό ασηπτικές συνθήκες, σε θάλαμο νηματικής ροής. Το υλικό των τρυβλίων αφέθηκε στο θάλαμο νηματικής ροής να σταθεροποιηθεί.

➤ Επιμόλυνση με φυτοπαθογόνο μύκητα

Πραγματοποιήθηκε επιμόλυνση των τρυβλίων με μεταφορά τμήματος μυκηλιακών υφών, από καλλιέργεια μύκητα 5-6 ημερών (τρυβλία με V8), στο κέντρο του τρυβλίου. Το τμήμα ελήφθη με τη βοήθεια φελλοτρυπητήρα διαμέτρου 5mm, από την περιφέρεια του τρυβλίου της καλλιέργειας. Όλη η διαδικασία έλαβε χώρα υπό ασηπτικές συνθήκες, μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής.

Ακολούθησε επώαση στους 25-26 °C για 96 ώρες. Μετά το πέρας των 4 ημερών πραγματοποιήθηκε μέτρηση της διαμέτρου των υφών του μύκητα σε 3 σημεία, με την βοήθεια αριθμημένου χάρακα.

Πραγματοποιήθηκαν 2 μεταχειρίσεις, μία για κάθε στέλεχος του μύκητα. Ο αριθμός των επαναλήψεων ανά μεταχείριση ήταν 3.

B.3. Φυτοχημική ανάλυση

B.3.1. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)

Αρχή μεθόδου

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography –TLC) είναι μια από τις πιο συνηθισμένες τεχνικές για τον γρήγορο έλεγχο μιγμάτων και καθαρών ουσιών. Χρησιμοποιούνται ειδικές πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με γέλη πυριτίου. Το προς εξέταση δείγμα τοποθετείται λίγο πάνω από τη βάση της πλάκας με μορφή κηλίδας και στη συνέχεια η πλάκα τοποθετείται μέσα σε ένα θάλαμο ανάπτυξης, με τέτοιο τρόπο ώστε μόνο η βάση της να βρίσκεται σε επαφή με το σύστημα ανάπτυξης, που είναι συνήθως μίγμα οργανικών διαλυτών. Η γέλη πυριτίου αποτελεί τη στατική φάση της χρωματογραφίας ενώ το διάλυμα ανάπτυξης την κινητή φάση και οι ουσίες μετακινούνται προς τα επάνω μέσω τριχοειδών φαινομένων. Η απόσταση που διανύει κάθε ουσία καθορίζεται από τη σχετική της συγγένεια για τη στατική φάση ως προς την κινητή φάση (Watson 2005).

Πειραματική πορεία

Για τον έλεγχο των μιγμάτων και των καθαρών ουσιών με αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (αναλυτική TLC) χρησιμοποιήθηκαν πλάκες αλουμινίου κανονικής φάσης με επίστρωση γέλης οξειδίου του πυριτίου και με πάχος στιβάδας 0.1mm (Silica gel 60 F254-Merck). Τα χρωματογραφήματα παρατηρήθηκαν σε λαμπτήρες υπεριώδους ακτινοβολίας, σε μήκη κύματος 254

nm και 366 nm και ακολούθησε ψεκασμός με μεθανολικό διάλυμα θεικής βανιλίνης και θέρμανση.

B.3.2. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης ή Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Αρχή μεθόδου

Η χρωματογραφία HPLC (High Pressure Liquid Chromatography ή High Performance Liquid Chromatography) αποτελεί σημαντικά εξελιγμένη μορφή της χρωματογραφίας στήλης, όπου η κινητή φάση ρέει με τη βοήθεια αντλίας. Αυτό επιταχύνει την ανάλυση και επιτρέπει τη χρήση χρωματογραφικών στηλών με μικρό μέγεθος σωματιδίων υλικού πλήρωσης. Η χρήση μικρού μεγέθους σωματιδίων υλικού πλήρωσης αυξάνει το εμβαδόν της επιφάνειας της στατικής φάσης, που είναι διαθέσιμο να αλληλεπιδράσει με τα μόρια που μεταφέρονται μέσω της κινητής φάσης. Κατά συνέπεια, βελτιώνεται ο διαχωρισμός των αναλυόμενων μορίων και μειώνεται σημαντικά το μέγεθος της στήλης που απαιτείται για έναν διαχωρισμό (Kazakevich & LoBrutto, 2007).

Για την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) χρησιμοποιήθηκε σύστημα Thermo Finnigan που αποτελείται από:

- αντλία SpectraSystem P4000, με την ικανότητα ανάμειξης τεσσάρων διαφορετικών διαλυτών, σε οποιαδήποτε αναλογία □
- απαερωτή (degasser) SpectraSystem 1000
- αυτόματο δειγματολήπτη SpectraSystem AS3000 □
- ανιχνευτή UV SpectraSystem UV2000 □

Για την λήψη και την επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό ChromQuest™ 4.1.

Πειραματική πορεία

Οι πειραματικές συνθήκες για την λήψη χρωματογραφικού προφίλ των εκχυλισμάτων, παρατίθενται στον Πίνακα 20.

Πίνακας 19: Πειραματικές συνθήκες της HPLC

Στατική φάση	Column: Supelco RP18, Discovery HS-C18, 25 cm, 4.6 mm, 5 μ m.
Κινητή φάση	A. H ₂ O (0.5% FA) C. ACN (0.5% FA)
Ρυθμός ροής	1 mL/min
Όγκος ένεσης	10 μ L

Σύστημα ροής	Βαθμιδωτός τρόπος έκλουσης : 95% A , 5% C για 5 min, μείωση της ροής σε 70% A σε 20 min, μείωση της ροής σε 10% A σε 20 min, διατήρηση ροής για 10 min, αύξηση της ροής σε 95% A σε 10 min, διατήρηση ροής για 10 min.
---------------------	--

Όλα τα δείγματα μελετήθηκαν σε μεθανόλη σε συγκέντρωση 5 mg/mL. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν καθαρότητας HPLC και πριν τη χρησιμοποίησή τους πραγματοποιήθηκε διήθηση σε ειδική συσκευή υπό κενό και ηθμό 0.45μm.

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και καταγράφηκαν απορροφήσεις 220, 280 και 365nm.

B.3.3. Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού

Αρχή μεθόδου

Ο πρωταρχικός σκοπός της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού είναι ο ταχύς διαχωρισμός μορίων ανάλογα με το μέγεθος τους. Είναι μια χρωματογραφία στήλης με στερεή στατική φάση (gel) και υγρή κινητή φάση. Τα μεγαλύτερα μόρια διέρχονται από τη στήλη δίχως να επιβραδύνονται και εκλούνται πρώτα γιατί δεν μπορούν να εισχωρήσουν στο gel. Αντίθετα, τα μικρότερα μόρια, εισχωρούν στην πηκτή κατά ένα βαθμό που προσδιορίζεται από το μέγεθος τους, με αποτέλεσμα τα μικρότερα εξ αυτών να εκλούνται τελευταία.

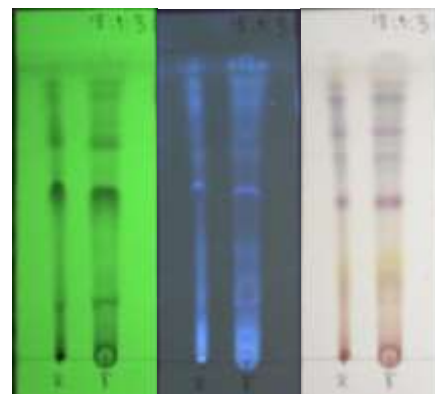
Ανάλογα με την πηκτή στατικής φάσης που επιλέγεται μπορούν να διαχωριστούν μόρια που έχουν μοριακό βάρος από 1000 μέχρι μερικά εκατοντάδες daltons. Ένα από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα gel είναι το Sephadex, κυρίως για το διαχωρισμό πρωτεϊνών και άλλων μεγάλων μορίων βιοχημικού ενδιαφέροντος. Το Sephadex έχει πολικό χαρακτήρα και παρασκευάζεται από τις δεξτράνες των πολυσακχαριτών, που παράγονται με την επίδραση ενός βακτηρίου στο καλαμοσάκχαρο.

Πειραματική πορεία

Για την κλασμάτωση και τον διαχωρισμό των μεταβολιτών του *Pinus nigra*, η πρώτη διεργασία που εφαρμόστηκε ήταν η χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού, Sephadex LH-20. Ο διαλύτης έκλουσης που επιλέχθηκε ήταν MeOH. Πριν τη χρήση η ρητίνη αφέθηκε να διογκωθεί με τον διαλύτη έκλουσης για 24 ώρες. Ακολούθησε «πακετάρισμα» της στήλης αρχικά χωρίς εξωτερική παροχή αέρα και στη συνέχεια διέλευση του διαλύτη έκλουσης με τη βοήθεια αέρα. Με τον τρόπο αυτό έγινε σωστή πλήρωση της στήλης χωρίς την δημιουργία κενών αέρος που θα μπορούσαν να επηρεάσουν αρνητικά το χρωματογραφικό διαχωρισμό.

Ποσότητα του εκχυλίσματος διαλύθηκε σε MeOH και διηθήθηκε με την χρήση μικροφίλτρου ώστε να αφαιρεθούν τυχόν στερεά υπολείμματα. Εφόσον δεν φαινόταν να επηρεάζεται η βασική σύσταση του εκχυλίσματος, το φιλτραρισμένο εκχύλισμα τοποθετήθηκε με προσοχή στο πάνω μέρος της στήλης, προστέθηκε ο διαλύτης έκλουσης και ξεκίνησε η συλλογή κλασμάτων.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε μια δοκιμαστική στήλη Sephadex με μικρή ποσότητα εκχυλίσματος, έχοντας ως σκοπό την αξιολόγηση του διαχωρισμού που δύναται να επιφέρει η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού στο εκχύλισμά μας, αλλά και τον προσδιορισμό της βιολογικής δραστηριότητας των κλασμάτων που θα προέκυπταν. Η ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε ανερχόταν στα 51.5mg από την οποία συλλέχθηκαν περίπου 90 κλάσματα του 0.5mL το καθένα, τα οποία συνενώθηκαν σε τρία μεγάλα κλάσματα Sephadex No1, Sephadex No2 και Sephadex No3.

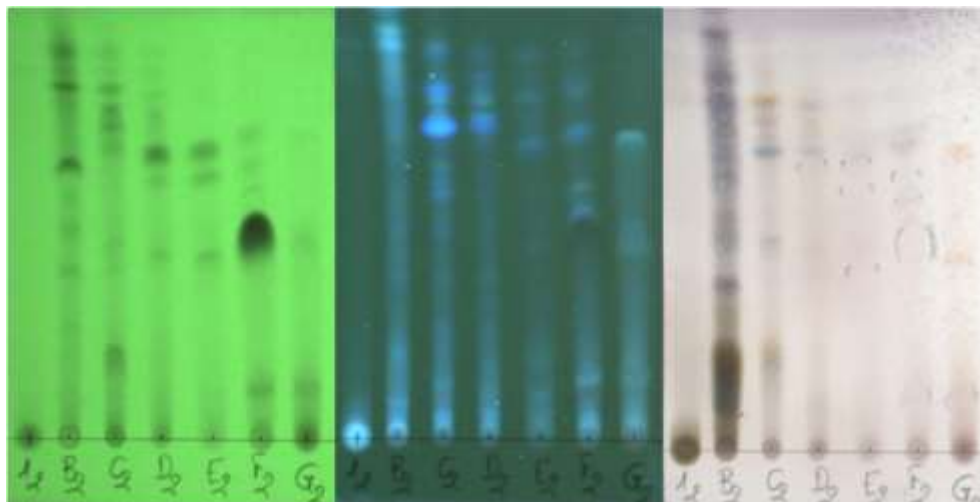


Εικόνα 26. Αρχικό και φιλτραρισμένο δείγμα στα 254nm, 366nm και λευκό. Ανεπαίσθητες διαφορές διακρίνονται μεταξύ αρχικού και φιλτραρισμένου εκχυλίσματος

Πίνακας 20. Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της στήλης Sephadex

	Αρχική ποσότητα	B κλάσμα	C κλάσμα	D κλάσμα	E κλάσμα	F κλάσμα	G κλάσμα
Sephadex 1	251.4mg	118.1mg	4.6mg	1.5mg	1.6mg	2.3mg	10.1mg
Sephadex 2	255.8mg	130.6mg	5.2mg	1.5mg	1.5mg	4.3mg	5.4mg
Sephadex 3	250.6mg	141.4mg	5.6mg	0.7mg	1.2mg	2.5mg	7.2mg
		390.1mg CPC	15.4mg Prep-TLC	8.0mg Prep-TLC			22.7mg Prep-TLC

Εφόσον ο διαχωρισμός φαινόταν ικανοποιητικός, πραγματοποιήθηκε στήλη Sephadex με μεγαλύτερη ποσότητα. Χρησιμοποιήθηκαν περίπου 250mg εκχυλίσματος και συλλέχτηκαν περίπου 90 κλάσματα των 3ml το καθένα, τα οποία στη συνέχεια συνενώθηκαν σε 7 μεγαλύτερα κλάσματα (Α-Γ). Το κλάσμα Α αντιστοιχούσε στο κλάσμα Sephadex No1 της δοκιμαστικής στήλης, το κλάσμα Β στο Sephadex No2, ενώ τα κλάσματα C-Γ στο Sephadex No3. Η όλη διαδικασία της στήλης Sephadex επαναλήφθηκε 3 φορές υπό τις ίδιες συνθήκες προκειμένου να συλλεχθούν επαρκείς ποσότητες από τα επιμέρους κλάσματα ώστε να προχωρήσουμε είτε σε διαχωρισμό μέσω CPC, είτε σε διαχωρισμό μέσω TLC Preparative.



Εικόνα 27. TLC στα 254nm, 366nm και white για τα τελικά κλάσματα Sephadex

Στο Β κλάσμα συνενώθηκαν όλα τα επιμέρους κλάσματα που περιείχαν μεγάλο αριθμό ουσιών, γι' αυτό και οδηγήθηκε στη συνέχεια σε διαχωρισμό μέσω χρωματογραφίας CPC. Τα κλάσματα C,D,E και G προχώρησαν έπειτα σε διαχωρισμό μέσω TLC Preparative.

B.3.4. Κλασμάτωση με Χρωματογραφία Κατανομής με Φυγοκέντρωση (CPC)

Αρχή μεθόδου

Η χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντρωση (CPC- Centrifugal Partition Chromatography) αποτελεί μια χρωματογραφία συστημάτων υγρού-υγρού, η οποία βασίζεται στην κατανομή των διαλυμένων ουσιών μεταξύ τουλάχιστον δυο μη αναμειξίμων υγρών φάσεων σύμφωνα με το συντελεστή κατανομής K_D (Hamzaoui et al., 2013).

Μια συσκευή CPC είναι σχεδιασμένη για να εκτελεί χρωματογραφία με τη χρήση ενός διαφασικού συστήματος υγρού-υγρού χωρίς στερεό υπόστρωμα για τη διατήρηση της στατικής φάσης (Marchal et al., 2003). Η τεχνική αυτή επιτρέπει ν' αποφευχθεί η μη αναστρέψιμη προσρόφηση των δειγμάτων στο στερεό υπόστρωμα και να διατηρηθεί η χημική ακεραιότητα των μιγμάτων που υποβάλλονται σε κλασμάτωση (Hamzaoui et al., 2013).

Το μηχάνημα CPC αποτελείται από μια σειρά από κανάλια που συνδέονται σε σειρά με αγωγούς και ευθυγραμμίζονται σε δίσκους κυκλικά γύρω από ένα στρόφειο. Η κίνηση του στρόφειο υποβάλλει την παρούσα διάταξη σ' ένα σταθερό πεδίο φυγοκέντρωσης

Δύο μη αναμείξιμα υγρά, που έχουν παρασκευαστεί με ανάμειξη δύο ή περισσότερων διαλυτών, χρησιμοποιούνται ως κινητές και στατικές φάσεις. Η κινητή φάση διέρχεται διαμέσου της στατικής, χάρη σε μια αντλία και στο φυγοκεντρικό πεδίο. Λόγω της υγρής τους φύσης και οι δυο φάσεις μπορούν να επιλεγουν ως κινητή ή στατική αντίστοιχα. Στην ανιούσα λειτουργία η ελαφρύτερη φάση διέρχεται μέσα από τη βαρύτερη, με μια κατεύθυνση αντίθετη από το πεδίο φυγοκέντρωσης (από την περιφέρεια προς κέντρο του στρόφειο σε κάθε κανάλι), ενώ στην κατιούσα λειτουργία η βαρύτερη φάση διέρχεται μέσω της ελαφρύτερης, στην κατεύθυνση του φυγοκεντρικού πεδίου (Marchal et al., 2003).

Η μέθοδος CPC εφαρμόστηκε σε μηχάνημα FCPC® Rousselet-Robatel Kromaton με στήλες χωρητικότητας: 200 mL και 1L. Η ταχύτητα περιστροφής κυμαίνεται από 200 έως 2000rpm, παράγοντας έτσι φυγόκεντρο δύναμη ίση με 120 x g στα 1000 rpm και 480 x g στα 2000 rpm. Η κινητή φάση εισέρχεται σε ανιούσα ή κατιούσα φάση μέσα από την ειδική αντλία (LabAlliance, Scientific System, Inc). Τα κλάσματα συλλέγονται μέσω του συλλέκτη Buchi B-684.

Η FCPC χαρακτηρίζεται από πολύ καλή συγκράτηση της στατικής φάσης, η οποία επιτρέπει υψηλές ταχύτητες ροής και σύντομους χρόνους ανάλυσης με μια καλή απόδοση, όταν χρησιμοποιούνται επαρκής ταχύτητα περιστροφής και ταχύτητα ροής (Marchal et al., 2003).

Πειραματική πορεία

1. Υδρο-αλκοολικό εκχύλισμα *P. heldreichii*

➤ Προετοιμασία συστημάτων

Τα συστήματα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή του πειράματος, παρατίθενται στον παρακάτω Πίνακα 23.

Πίνακας 21: Συστήματα διαλυτών για CPC

Συστήματα	Αναλογίες Διαλυτών					Όγκος (mL)
	n-Heptane	EtOAc	ButOH	EtOH	H ₂ O	
1ο	14	1	0	5	10	1200
2ο	10	5	0	5	10	400
3ο	5	10	0	5	10	400
4ο	1	14	0	5	10	400
5ο	1	12	2	5	10	400

Για την παρασκευή του συστήματος διαλυτών και το διαχωρισμό της στατικής από την κινητή φάση, όλοι οι διαλύτες τοποθετήθηκαν σε διαχωριστική χοάνη και αναδεύτηκαν 4-5 φορές, ενώ μετά από κάθε ανάδευση ακολουθούσε εκτόνωση του συστήματος. Στη συνέχεια το σύστημα αφέθηκε να ηρεμήσει για λίγα λεπτά, ώστε να πραγματοποιηθεί διαχωρισμός. Η κάτω φάση που παραλήφθηκε ήταν η στατική φάση (πολική) και η πάνω η κινητή (άπολη). Σε όλα τα συστήματα διαλυτών η διαδικασία που ακολουθήθηκε για το διαχωρισμό των φάσεων ήταν η ίδια.

➤ Προετοιμασία δείγματος

Διαλύθηκαν περίπου 140 mg του εκχυλίσματος σε 4 mL στατικής και σε 4 mL κινητής φάσης τοποθετώντας το δείγμα σε υδατόλουτρο υπερήχων ώστε να διευκολυνθεί η διάλυση.

➤ Προετοιμασία μηχανήματος FCPC200® Kromaton

Το μηχάνημα τέθηκε σε λειτουργία κατιούσας φάσης και μέρος της στατικής φάσης του 1^{ου} συστήματος χρησιμοποιήθηκε για την πλήρωση της στήλης χωρητικότητας 200 mL (200 rpm). Ακολούθως, έγινε εισαγωγή της κινητής φάσης του 1^{ου} συστήματος στη στήλη στις 1000 rpm, σε λειτουργία ανιούσας φάσης, ώστε να γίνει εξισορρόπηση των φάσεων. Το δείγμα εισήχθη ενέσιμα σε βρόγχο των 8mL και αφέθηκαν να τρέξουν τόσα ml κινητής φάσης, όσα χρειάστηκαν για να πληρωθεί η στήλη (Sf=0,74). Ακολούθησε η συλλογή των κλασμάτων (5ml) σε σωληνάκια με ροή 5 mL /min. Μετά την εφαρμογή των 5 συστημάτων ακολούθησε εξώθηση των ουσιών που είχαν παραμείνει στη στατική φάση εισάγοντας στη στήλη μέρος της πολικής φάσης (extrusion).

Τα κλάσματα που συλλέχθηκαν (Πίνακας 24) ελέχθηκαν ως προς το περιεχόμενό τους με τη χρήση χρωματογραφίας επί λεπτής στοιβάδας (TLC) σε σύστημα ανάπτυξης διαλυτών DCM/MeOH, σε αναλογία 90/10 και ακολούθησαν οι απαραίτητες συνενώσεις.

Πίνακας 22: Κλάσματα CPC

Συστήματα	Αριθμός κλασμάτων
1ο	40 (1-40)
2ο	37 (41-77)
3ο	38 (78-115)
4ο	40 (116-155)
5ο	40 (156-195)
Πολική φάση	40 (196-235)

Πίνακας 23: Συνενώσεις 1^{ου} CPC

1ο CPC					
No.	Συνενώσεις	Καθαρό βάρος (mg)	No.	Συνενώσεις	Καθαρό βάρος (mg)
1	6-7	1.17	20	105-109	4.06
2	8-10	0.73	21	110-120	43.14
3	11-14	0.77	22	121-123	1.37
4	15-19	0.41	23	124-125	0.66
5	20-30	0.78	24	126-135	5.37
6	31-40	0.62	25	136-141	2.22
7	41-51	0.42	26	142	0.48
8	52-57	0.46	27	143-146	2.50
9	58-64	0.40	28	147-152	2.14
10	65	0.44	29	153-158	1.95
11	66-67	1.13	30	159-166	1.85
12	68-70	1.37	31	167-177	1.00
13	71	0.44	32	178-186	0.35
14	72-77	1.20	33	187-205	2.17
15	78-82	0.21	34	206-221	1.06
16	83-93	1.46	35	222-230	1.35
17	94-97	0.78	36	231-234	3.94
18	98-99	1.92	37	235	1.09
19	100-104	6.72			
Συνολικό βάρος κλασμάτων					98.14
Εξώθηση					36.45

Πίνακας 24: Συνενώσεις 2^{ου} CPC

2ο CPC					
No.	Συνενώσεις	Καθαρό βάρος (mg)	No.	Συνενώσεις	Καθαρό βάρος (mg)
1.	1-3	0.57	19	126-129	1.15
2	4-9	1.68	20	130	0.37
3	10-12	3.32	21	131-139	4.18
4	13-21	3.17	22	140-141	1.15
5	22-27	2.25	23	142-144	1.52
6	28-33	1.77	24	145-148	1.92
7	34-42	1.32	25	149	0.39
8	43-52	1.44	26	150-152	1.40
9	53-66	3.48	27	153	0.26
10	67-69	0.76	28	154-156	0.99
11	70-78	3.42	29	157-160	0.96
12	79-88	2.57	30	161-171	2.13
13	89-97	1.68	31	172-187	2.20
14	98-102	3.86	32	188-205	3.71
15	103-110	4.59	33	206-229	3.20
16	111-112	0.60	34	230-232	1.57

17	113-114	1.45	35	233-235	5.52
18	115-125	21.58			
Συνολικό βάρος κλασμάτων					92.13
Εξώθηση					41.85

2. Αλκοολικό εκχύλισμα *P. heldreichii*

➤ Προετοιμασία συστημάτων

Ύστερα από δοκιμές με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας παρατηρήθηκε ότι το αλκοολικό εκχύλισμα του *P. heldreichii* έφερε περισσότερο άπολα μόρια από το αντίστοιχο υδρο-αλκοολικό. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά συστήματα διαλυτών ώστε η στατική φάση να είναι χαμηλής πολικότητας και η κινητή φάση υψηλής.

Τα συστήματα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή του πειράματος, παρατίθενται στον παρακάτω Πίνακα 26.

Πίνακας 25: Συστήματα διαλυτών για CPC

Συστήματα	Αναλογίες Διαλυτών				Όγκος (L)
	n-Heptane	EtOAc	EtOH	H ₂ O	
1ο	10	5	5	10	3
2ο	10	5	7	8	2
3ο	10	5	9	6	3
4ο	10	5	11	4	3

Για την παρασκευή των συστημάτων διαλυτών ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Η κάτω φάση που παραλήφθηκε ήταν η κινητή φάση (πολική) και η πάνω η στατική (άπολη).

➤ Προετοιμασία δείγματος

Διαλύθηκαν 6,4 g του εκχυλίσματος σε 25 mL στατικής και σε 5 mL κινητής φάσης τοποθετώντας το δείγμα σε υδατόλουτρο υπερήχων ώστε να διευκολυνθεί η διάλυση.

➤ Προετοιμασία μηχανήματος FCPC1000® Kromaton

Το μηχάνημα τέθηκε σε λειτουργία ανιούσας φάσης και μέρος της στατικής φάσης του 1^{ου} συστήματος χρησιμοποιήθηκε για την πλήρωση της στήλης χωρητικότητας 1 L (200 grm). Ακολούθως, έγινε εισαγωγή της κινητής φάσης του 1^{ου} συστήματος στη στήλη στις 600 grm, σε λειτουργία κατιούσας φάσης, ώστε να γίνει εξισορρόπηση των φάσεων. Το δείγμα εισήχθη ενέσιμα σε βρόγχο των 30 mL και αφέθηκαν να τρέξουν τόσα mL κινητής φάσης, όσα χρειάστηκαν για να πληρωθεί η στήλη (Sf=0,79). Ακολούθησε η συλλογή των κλασμάτων (40ml) σε σωληνάκια με ροή 10-20 mL /min. Μετά την εφαρμογή των 4 συστημάτων ακολούθησε εξώθηση των ουσιών που είχαν παραμείνει στη στατική φάση εισάγοντας στη στήλη μέρος της άπολης φάσης (extrusion).

Τα κλάσματα που συλλέχθηκαν (Πίνακας 27) ελέγχθηκαν ως προς το περιεχόμενό τους με τη χρήση χρωματογραφίας επί λεπτής στοιβάδας σε σύστημα ανάπτυξης διαλυτών DCM/MeOH, σε αναλογία 96/4 (+ 2-3 σταγόνες ακετόνης) και ακολούθησαν οι απαραίτητες συνενώσεις (Πίνακας 28).

Πίνακας 26: Κλάσματα CPC του Agro05

Συστήματα	Αριθμός κλασμάτων
1ο	22 (1-22)
2ο	25 (23-47)
3ο	37 (48-84)
4ο	37 (85-121)
Άπολη φάση	28 (122-150)

Πίνακας 27: Συνενώσεις CPC του Agro05

3ο CPC					
No.	Συνενώσεις	Καθαρό βάρος (mg)	No.	Συνενώσεις	Καθαρό βάρος (mg)
1.	1-7	28,9	25	69-71	59,17
2	8	38,54	26	72-75	40,61
3	9	30,07	27	76-79	33,77
4	10	62,76	28	80-90	93,05
5	11-14	184,5	29	91-96	27,29
6	15-17	18,15	30	97-100	41,09
7	18-20	14,89	31	101-103	147,71
8	21-28	35,56	32	104-105	329,3
9	29-30	7,7	33	106-108	1.036,38
10	31-32	11	34	109-111	708,97
11	33-34	27,29	35	112	131,65
12	35	13,18	36	113-115	584,88
13	36-37	32,95	37	116-117	254,7
14	38-39	28,94	38	118	54,82
15	40-41	22,57	39	119-123	95,84
16	42-43	15,93	40	124-128	26,52
17	44-48	46,45	41	129-135	37,67
18	49-52	41,21	42	136-140	27,31
19	53-58	74,21	43	141-142	45,31
20	59-61	53,11	44	143-145	890,34
21	62	21,17	45	146	53,91
22	63-65	119,92	46	147-148	85,33
23	66	61,76	47	149-150	8,08
24	67-68	95,28			
Συνολικό βάρος κλασμάτων					6.099.74
Εξώθηση					296.11

3. Υδατικό εκχύλισμα *P. nigra*

Το Β κλάσμα που προέκυψε από την επεξεργασία του αρχικού εκχυλίσματος με στήλη Sephadex προχώρησαν σε περαιτέρω κλασμάτωση μέσω χρωματογραφίας κατανομής (CPC). Ύστερα από δοκιμές με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας παρατηρήθηκε ότι το υδατικό εκχύλισμα του *P. nigra* έφερε κυρίως πολικές ενώσεις. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά συστήματα διαλυτών ώστε η στατική φάση να είναι υψηλής πολικότητας και η κινητή φάση χαμηλής.

Τα συστήματα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή του πειράματος, παρατίθενται στον παρακάτω Πίνακα 30 .

Πίνακας 28. Σύστημα CPC που χρησιμοποιήθηκε στο υδατικό εκχύλισμα του *P. nigra*

Συστήματα	Αναλογίες Διαλυτών					Όγκος (mL)
	n-Heptane	EtOAc	ButOH	EtOH	H ₂ O(TFA 0.1%)	
1ο	4	10	0	4	10	1200
2ο	1	13	0	4	10	400
3ο	1	12	1	4	10	400
4ο	1	10	3	4	10	400
5ο	1	7	6	4	10	400

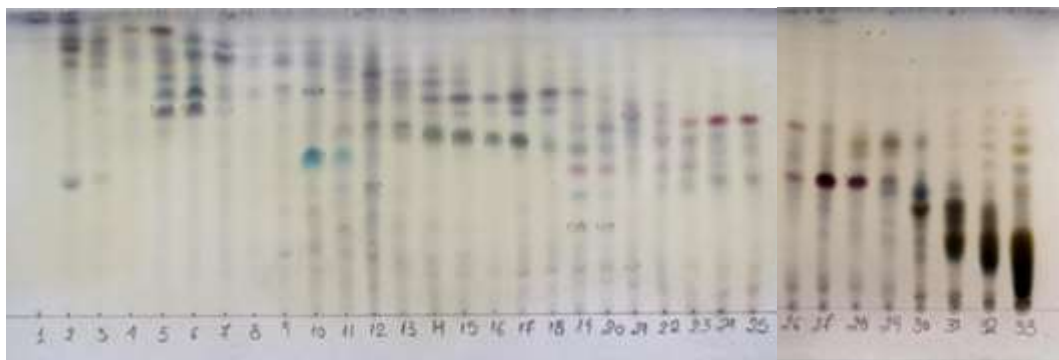
Για την παρασκευή των συστημάτων διαλυτών ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Η κάτω φάση που παραλήφθηκε ήταν η στατική φάση (πολική) και η πάνω η κινητή (άπολη).

➤ Προετοιμασία δείγματος

390mg του Β κλάσματος από τη Sephadex διαλύθηκαν σε 4 mL στατικής και σε 4 mL κινητής φάσης με τη βοήθεια υπερήχων.

➤ Προετοιμασία μηχανήματος FCPC1000® Kromaton

Η μόνη πολική φάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτή του 1ου συστήματος η οποία χρησιμοποιήθηκε για την πλήρωση της στήλης και εισήχθη στο μηχανήμα με κατιούσα λειτουργία (descending mode) στα 200 rpm. Ακολούθως, έγινε εισαγωγή της άπολης φάσης του 1ου συστήματος στη στήλη σε λειτουργία ανιούσας φάσης (ascending mode) και στα 1000 rpm, ώστε να γίνει εξισορρόπηση των φάσεων. Όταν το σύστημα ήρθε σε ισορροπία το δείγμα εισήχθη ενέσιμα σε βρόγχο των 8mL. Στη συνέχεια ξεκίνησε η συλλογή των κλασμάτων από τον συλλέκτη Büchi B-684. Οι άπολες φάσεις των συστημάτων εισάγονταν η μια μετά την άλλη αφήνονταν να τρέξουν για 40min η καθεμία, συλλέγοντας 40 κλάσματα με ροή 5 ml /min. Εν τέλει συλλέχθηκαν 240 κλάσματα των 5ml. Αυτά ελέγχθηκαν ως προς το περιεχόμενό τους μέσω TLC και συνενώθηκαν σε 33 τελικά κλάσματα (Εικόνα 28).



Εικόνα 28 : Παρουσίαση των 33 τελικών κλασμάτων CPC μέσω TLC στο ορατό

B.3.3. Παρασκευαστική Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (preparative-TLC)

Αρχή μεθόδου

Η παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας είναι μια υγρή χρωματογραφική τεχνική που χρησιμοποιείται για την τελική απομόνωση ουσιών από μίγματα με χαμηλό ολικό βάρος (συνήθως 5-1000mg) και μικρό αριθμό περιεχόμενων ουσιών, οι οποίες διαχωρίζονται ικανοποιητικά από ένα συγκεκριμένο σύστημα διαλυτών (Nyiredy, 2000).

Πειραματική πορεία

Για την preparative-TLC χρησιμοποιήθηκαν υάλινες πλάκες κανονικής φάσης επιστρωμένες με γέλη οξειδίου του πυριτίου Silica F₂₅₄ με πάχος 0,25mm (Silica gel 60 F₂₅₄-Merck, 20x20). Το προς μελέτη δείγμα διαλυμένο στον αντίστοιχο διαλύτη εφαρμόστηκε ως λεπτή οριζόντια στρώση περίπου 2cm πάνω από τη βάση της πλάκας με τη βοήθεια της συσκευής CAMAG –Linomat 5. Ακολούθως αναπτύχθηκε σε 100ml ενός επιλεγμένου συστήματος διαλυτών μέσα σε έναν καλά σφραγισμένο θάλαμο και μόλις το μέτωπο του διαλύτη έφτασε σε απόσταση περίπου 2cm από το τέλος της πλάκας, αυτή αφαιρέθηκε από το θάλαμο και αφέθηκε να στεγνώσει. Στη συνέχεια παρατηρήθηκε στα 254nm και 366nm όπου οι ουσίες ήταν εμφανείς σαν σκουρόχρωμες λωρίδες. Οι ουσίες που δεν ήταν εμφανείς στο UV, εντοπίστηκαν ύστερα από ψεκασμό ενός μικρού τμήματος της πλάκας με αντιδραστήριο βανιλίνης.

Κάθε λωρίδα απομακρύνθηκε με τη βοήθεια αιχμηρού κοπιδιού, συλλέχθηκε χωριστά και εκχυλίστηκε με διαλύτη ικανό να διαλυτοποιήσει και να αποδεσμεύσει την περιεχόμενη ουσία από τη Silica. Ακολούθησε εξάτμιση και ζύγιση των μορίων.

B.3.4. Ταυτοποίηση μεταβολιτών με LC-HRMS/MS

Αρχή μεθόδου

Η φασματομετρία μάζας είναι μια αναλυτική τεχνική αναγνώρισης άγνωστων ενώσεων, ποσοτικοποίησης γνωστών και διευκρίνησης της δομής τους. Το φασματόμετρο μαζών λειτουργεί με το σχηματισμό φορτισμένων μορίων ή μοριακών θραυσμάτων, είτε σε περιοχή υψηλού κενού, είτε αμέσως πριν την είσοδο του δείγματος στην περιοχή υψηλού κενού. Τα ιόντα σχηματίζονται στην αέρια φάση, έτσι ώστε να μπορούν να διαχειρισθούν με την εφαρμογή είτε ηλεκτρικού, είτε μαγνητικού πεδίου, για να είναι δυνατός ο προσδιορισμός των μοριακών τους βαρών.

Η φασματομετρία μαζών παρέχει μια ιδιαίτερα ειδική τεχνική για τον προσδιορισμό ή την επιβεβαίωση της ταυτότητας των φαρμάκων και των πρώτων υλών. Σε συνδυασμό με την υγροχρωματογραφία (LC-MS) παρέχει μεθόδους για τον χαρακτηρισμό των προσμίξεων σε φάρμακα, καθώς και για τον προσδιορισμό φαρμάκων και μεταβολιτών τους σε βιολογικά υγρά και ιστούς (Watson, 2005).

Στην παρούσα εργασία, για την ταυτοποίηση των δομών που περιείχαν τα εκχυλίσματα, αλλά και τα παραληφθέντα κλάσματα από τη CPC, πραγματοποιήθηκε Υγρή Χρωματογραφία συζευγμένη με Φασματομετρία Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας. Η παραγωγή ιόντων έγινε με ηλεκτοψεκασμό.

Η τεχνική πραγματοποιήθηκε σε μηχάνημα LTQ-Orbitrap platform, που δίνει μετρήσεις μοριακού βάρους με ακρίβεια 4 δεκαδικών ψηφίων, παρέχοντας τη δυνατότητα απόδοσης των μοριακών τύπων και των βαθμών ακορεστότητας με μεγάλη ακρίβεια. Για μεγαλύτερη ακρίβεια λήφθηκαν και φάσματα MS/MS.

Πειραματική πορεία

Οι πειραματικές συνθήκες της Υγρής Χρωματογραφίας και Φασματομετρίας Μάζας παρατίθενται στους πίνακες που ακολουθούν:

Πίνακας 29: Πειραματικές συνθήκες LC

Στατική φάση	Column: Fortis C₁₈ (100 mm x 2.1 mm, 1.7u) , Θερμοκρ.: 40°C.
Κινητή φάση	A. H ₂ O (0.1% FA) B. ACN
Ρυθμός ροής	0.35 mL/min
Όγκος ένεσης	2μL
Σύστημα ροής	Βαθμιδωτός τρόπος έκλουσης : 95% A , 5% B για 3 min, αύξηση της ροής σε 100% B σε 20 min, διατήρηση ροής για 2 min, μείωση της ροής σε 95% A, 5%B σε 2 min, διατήρηση ροής για 4 min.

Πίνακας 30: Συνθήκες ιονισμού και θραυσμάτωσης MS/MS

Εύρος Μάζας	100-1500 (FS & MS/MS)
Διακριτική Ικανότητα Μάζας	30 000
Ρυθμισμένη Ενέργεια Πρόσκρουσης	35% (Act.Q 0.250)
Ανιχνευτής Ιονισμού	Negative mode
Συνθήκες ES I	Capillary temp.: 300°C; capillary voltage: -3.5V; tube lens: -98 V Sheath gas nitrogen: 40 arb. units; auxiliary gas nitrogen: 10 arb. units

B.4.3. Ταυτοποίηση μεταβολιτών με NMR

Αρχή μεθόδου

Η Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) βασίζεται στην ιδιότητα που έχουν οι πυρήνες των ατόμων που εισέρχονται σε μαγνητικό πεδίο να απορροφούν και να επανεκπέμπουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Χρησιμοποιείται ακτινοβολία στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων για τη διέγερση ατόμων, συνήθως πρωτονίων ή ατόμων άνθρακα -13, έτσι ώστε τα spin τους να αλλάζουν από παράλληλα σε αντιπαράλληλα προς ένα εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο. Η περιοχή συχνοτήτων, που απαιτούνται για τη διέγερση και την πολλαπλότητα των κορυφών που προκύπτουν, είναι πολύ χαρακτηριστική της δομής του μορίου.

Πρόκειται για μια ισχυρή τεχνική, η οποία παρέχει πολύ περισσότερες πληροφορίες για τη μοριακή δομή από κάθε άλλη τεχνική. Βρίσκει ευρύτετη εφαρμογή στην φαρμακευτική ανάλυση, καθώς δίνει τη δυνατότητα για το χαρακτηρισμό της ακριβούς δομής των πρώτων υλών και των τελικών προϊόντων, αλλά και του προσδιορισμού προσμίξεων, συμπεριλαμβανομένων και εναντιομερών προσμίξεων, χωρίς διαχωρισμό, μέχρι και επιπέδου 10%. Επίσης, παρέχει τη δυνατότητα χρήσης για δακτυλικό αποτύπωμα μιγμάτων και για ποσοτική ανάλυση φαρμάκων σε σκευάσματα χωρίς προηγούμενο διαχωρισμό (Watson, 2005).

Πειραματική πορεία

Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε φασματογράφο Bruker Ultrashield™ PLUS 600MHz. Τα κλάσματα διαλύθηκαν σε 0,5-0,6 mL MeOD ή DMSO-d₆ και μεταγγίστηκαν σε στενούς υάλινους σωλήνες NMR. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε διάλυμα σε δευτεριωμένο διαλύτη, για να εξασφαλιστεί ότι δεν υπήρχε παρεμπόδιση του σήματος των πρωτονίων των δειγμάτων από τα πρωτόνια του διαλύτη, που βρισκόταν σε σχετικά μεγάλη ποσότητα.

Το κάθε δείγμα περιστράφηκε υπό σταθερό μαγνητικό πεδίο σε περίπου 30 περιστροφές/s, με τη βοήθεια αεροστροβίλου, εξασφαλίζοντας έτσι την ομοιογένεια του μαγνητικού πεδίου σε όλο το δείγμα στην οριζόντια κατεύθυνση.

Ακολούθησε λήψη φασμάτων ¹HNMR, COSY, HSQC, HMBC, πραγματοποιώντας σάρωση ακτινοβολιών ραδιοσυχνότητας 6000 Hz, σε μια περιοχή 10 ppm. Το πηνίο του δέκτη μέτρησε την απορρόφηση της ακτινοβολίας, καθώς σαρώθηκε η συχνότητα στην εξεταζόμενη περιοχή, αλλά και την επιφάνεια κάθε σήματος, που είναι ανάλογη προς τον αριθμό των πρωτονίων που απορροφούν την ακτινοβολία.

Οι πληροφορίες που συλλέχθηκαν από τα φάσματα οδήγησαν στη διεξαγωγή συμπεράσματος για τη μοριακή δομή των ουσιών.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Γ. Αποτελέσματα-Συζήτηση

Για την εκπόνηση της παρούσας ερευνητικής εργασίας παρασκευάστηκαν τα δείγματα με εφαρμογή τεχνικών εκχύλισης και υδραπόσταξης. Το μέρος του φυτού που χρησιμοποιήθηκε για το κάθε δείγμα καθώς και ο αντίστοιχος διαλύτης στον οποίο παρουσίαζαν την βέλτιστη διαλυτότητα παρατίθενται στον Πίνακα 33 .

Πίνακας 31 : Είδος φυτού, διαλύτες εκχύλισης και βέλτιστη διαλυτότητα δειγμάτων στον αντίστοιχο διαλύτη

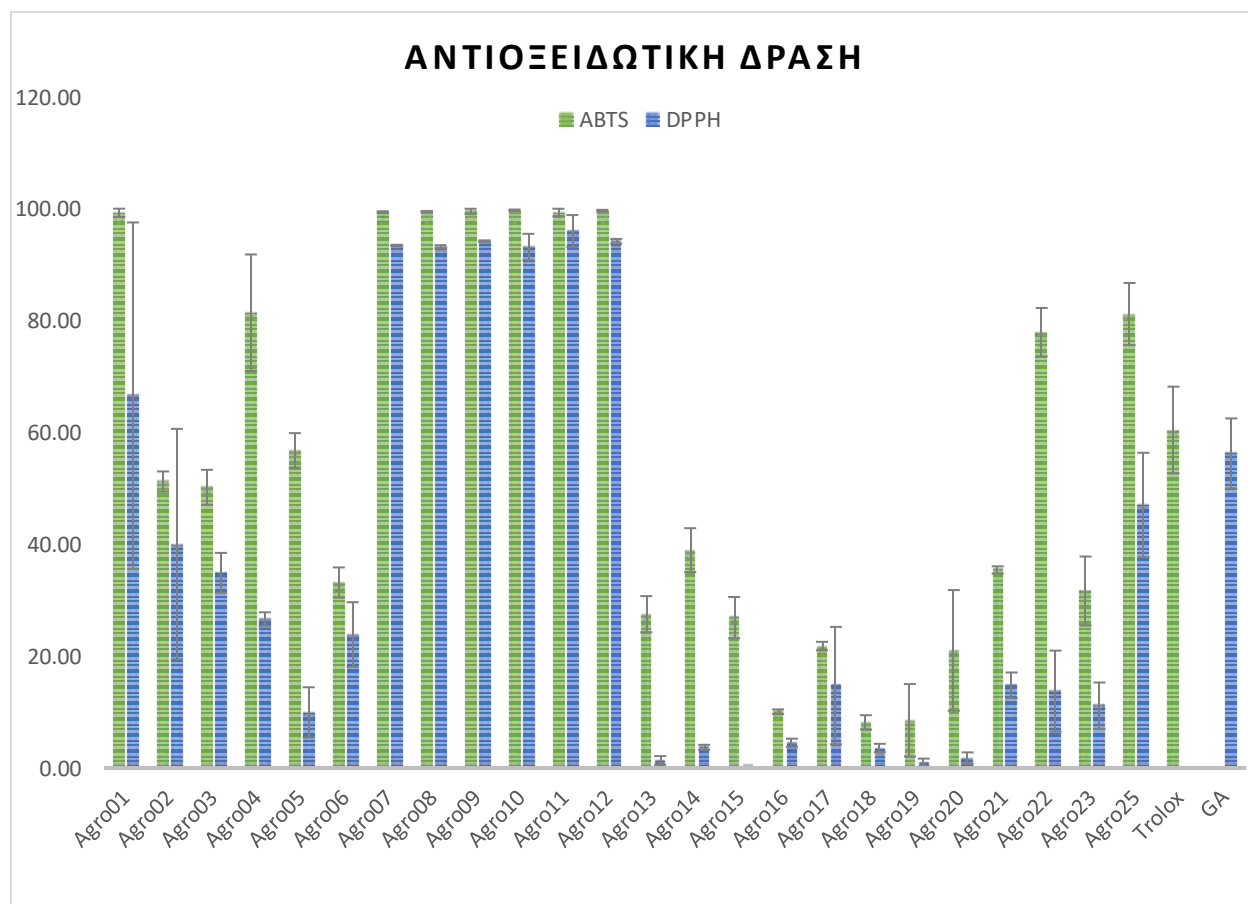
No	ΕΙΔΟΣ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ	ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ
Agro 01	<i>Pinus nigra</i>	Εκχύλισμα φλοιού, H ₂ O:EtOH (90:10)	DMSO (100%)
Agro 02	<i>Pinus nigra</i>	Εκχύλισμα φλοιού, EtOH (100%)	EtOH:DMSO (50:50)
Agro 03	<i>Pinus nigra</i>	Εκχύλισμα φλοιού, H ₂ O (100%)	DMSO:H ₂ O (50:50)
Agro 04	<i>Pinus heldreichii</i>	Εκχύλισμα ξύλου, H ₂ O:EtOH (90:10)	DMSO:H ₂ O (50:50)
Agro 05	<i>Pinus heldreichii</i>	Εκχύλισμα ξύλου, EtOH (100%)	DMSO (100%)
Agro 06	<i>Pinus heldreichii</i>	Εκχύλισμα ξύλου, H ₂ O (100%)	H ₂ O:DMSO (50:50)
Agro 07	<i>Punica granatum</i>	Εκχύλισμα εξωκαρπίου, H ₂ O:EtOH (90:10)	DMSO (100%)
Agro 08	<i>Punica granatum</i>	Εκχύλισμα εξωκαρπίου, EtOH (100%)	DMSO (100%)
Agro 09	<i>Punica granatum</i>	Εκχύλισμα εξωκαρπίου, H ₂ O (100%)	EtOH:H ₂ O (50:50)
Agro 10	<i>Eucalyptus globulus</i>	Εκχύλισμα φλοιού, H ₂ O:EtOH (90:10)	DMSO (100%)
Agro 11	<i>Eucalyptus globulus</i>	Εκχύλισμα φλοιού, EtOH (100%)	DMSO (100%)
Agro 12	<i>Eucalyptus globulus</i>	Εκχύλισμα φλοιού, H ₂ O (100%)	DMSO (100%)
Agro 13	<i>Prunus persica</i>	Εκχύλισμα φλοιού, H ₂ O:EtOH (90:10)	DMSO (100%)
Agro 14	<i>Prunus persica</i>	Εκχύλισμα φλοιού, EtOH (100%)	DMSO (100%)
Agro 15	<i>Prunus persica</i>	Εκχύλισμα φλοιού, H ₂ O (100%)	DMSO (100%)
Agro 16	<i>Prunus persica</i>	Εκχύλισμα πολτού, H ₂ O:EtOH (90:10)	H ₂ O (100%)
Agro 17	<i>Prunus persica</i>	Εκχύλισμα πολτού, EtOH (100%)	DMSO (100%)
Agro 18	<i>Prunus persica</i>	Εκχύλισμα πολτού, H ₂ O (100%)	H ₂ O (100%)
Agro 19	<i>Prunus persica</i>	Εκχύλισμα ενδοκαρπίου, EtOH (100%)	DMSO (100%)
Agro 20	<i>Prunus persica</i>	Εκχύλισμα ενδοκαρπίου, H ₂ O (100%)	H ₂ O (100%)
Agro 21	<i>Juniperus phoenicea</i>	Υδρόλυμα από καρπούς 1 ^{ου} έτους	EtOH:H ₂ O (50:50)
Agro 22	<i>Juniperus phoenicea</i>	Υδρόλυμα από καρπούς 2 ^{ου} έτους	H ₂ O (100%)
Agro 23	<i>Pinus heldreichii</i>	Υδρόλυμα από ξύλο	DMSO:H ₂ O (50:50)
Agro 25	<i>Pinus nigra</i>	Υδρόλυμα από φλοιό	DMSO:H ₂ O (50:50)

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν δοκιμές ελέγχου της βιολογικής δράσης των προς μελέτη δειγμάτων.

Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε μελέτη της αντιοξειδωτικής και λευκαντικής ικανότητας των δειγμάτων και προσδιορισμός του ολικού φαινολικού περιεχομένου τους, ενώ παράλληλα διερευνήθηκε η αντιμικροβιακή δράση τους σε φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς. Ακολούθησε βιοκατευθυνόμενη κλασμάτωση, ποσοτική παραλαβή, απομόνωση και ταυτοποίηση της δομής των μεταβολιτών.

Γ.1 Αντιοξειδωτική δράση

Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου με την μέθοδο **DPPH** και τη μέθοδο **ABTS**. Τα ποσοτικά αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων υπολογίζονται σε ποσοστά % (**Πίνακας 33**), ενώ τα ποιοτικά αποτελέσματα παρατίθενται στο **Διάγραμμα 1**.



Διάγραμμα 1: Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων.

Πίνακας 32: Ποσοτικά αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης και τυπική απόκλιση.

Δείγματα	ABTS			DPPH		
	0,1 mg/mL		IC50 mg/ml	0,2 mg/mL		IC50 mg/ml
	Τιμή (%)	Τυπ. Από- κλιση		Τιμή (%)	Τυπ. Απόκλιση	
Agro 01	99,37	0,75	0,04	66,63	31,02	
Agro 02	51,28	1,8		40,08	20,63	
Agro 03	50,25	3,12		34,93	3,57	
Agro 04	81,49	10,43		26,62	1,25	
Agro 05	56,85	3,09		9,95	4,50	
Agro 06	33,19	2,71		23,89	5,79	
Agro 07	99,51	0,15	0,057	93,53	0,08	0,042
Agro 08	99,59	0,08	0,052	93,31	0,28	0,039
Agro 09	99,65	0,46	0,056	94,3	0,14	0,044
Agro 10	99,84	0,13	0,036	93,27	2,35	0,025
Agro 11	99,45	0,66	0,046	96,12	2,85	0,042
Agro 12	99,75	0,16	0,034	94,28	0,43	0,028
Agro 13	27,53	3,23		1,34	0,78	
Agro 14	39,00	3,93		3,68	0,47	
Agro 15	26,92	3,69		0,02	0,54	
Agro 16	10,07	0,42		4,51	0,73	
Agro 17	21,83	0,76		14,75	10,51	
Agro 18	8,16	1,29		3,58	0,75	
Agro 19	8,54	6,49		0,98	0,70	
Agro 20	21,05	10,80		1,75	1,05	
Agro 21	35,45	0,65		14,8	2,30	
Agro 22	78,01	4,34		13,77	7,24	
Agro 23	31,68	6,18		11,16	4,14	
Agro 25	81,25	5,57		47,07	9,36	
Trolox	60,49	7,77				
GA				56,31	6,27	

Όλα τα εκχυλίσματα και του ροδιού και του ευκαλύπτου επέδειξαν αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική δράση τόσο στις δοκιμές ABTS όσο και στις δοκιμές DPPH. Συγκεκριμένα, στις δοκιμές ABTS, και τα 6 εκχυλίσματα είχαν περίπου 1,7 φορές μεγαλύτερη δράση από εκείνη του μάρτυρα, με τιμές που κυμαίνονταν από $99,51 \pm 0,15$ έως $99,65 \pm 0,46$ και από $99,45 \pm 0,66$ έως $99,84 \pm 0,13$ για τα εκχυλίσματα του ροδιού και του ευκαλύπτου, αντίστοιχα. Η ισχυρή δράση επιβεβαιώθηκε και από τις δοκιμές DPPH όπου τα δείγματα είχαν 1,7 φορές μεγαλύτερη δράση από την αντίστοιχη του μάρτυρα ($93,31 \pm 0,28$ – $94,3 \pm 0,14$ και $93,27 \pm 2,35$ – $96,12 \pm 2,85$, για το ρόδι και τον ευκάλυπτο αντίστοιχα). Η μέση ανασταλτική συγκέντρωση των δειγμάτων που προήλθαν από την εκχύλιση της φλούδας του ροδιού υπολογίστηκε σε 52 – $57 \mu\text{g/mL}$ με τη μέθοδο ABTS και 39 – $44 \mu\text{g/mL}$ με τη μέθοδο DPPH, ενώ για τα δείγματα που προήλθαν από το φλοιό του ευκαλύπτου σε 34 – $46 \mu\text{g/mL}$ και 25 – $42 \mu\text{g/mL}$, με τις μεθόδους ABTS και DPPH αντίστοιχα.

Οι δοκιμές ABTS κατέδειξαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και για τα υδροαλκοολικό εκχύλισμα και το υδρόλυμα της μαύρης πεύκης, το υδροαλκοολικό εκχύλισμα της λευκόδερμης πεύκης και το υδρόλυμα των καρπών 2^{ου} έτους της φοινικικής αρκεύθου ($99,37 \pm 0,75$, $81,25 \pm 5,57$, $81,49 \pm 10,43$ και $78,01 \pm 4,34$, αντίστοιχα). Η μέση ανασταλτική συγκέντρωση για το υδροαλκοολικό εκχύλισμα του *P. nigra* υπολογίστηκε σε $40 \mu\text{g/mL}$.

Η δραστηριότητα των δειγμάτων της μαύρης πεύκης επιβεβαιώθηκε μερικώς και από τη μέθοδο DPPH, καθώς παρουσίασαν σχετικά υψηλές τιμές, συγκρινόμενα με τα υπόλοιπα δείγματα ($66,63 \pm 31,02$ και $47,07 \pm 9,36$ για το υδροαλκοολικό εκχύλισμα και το υδρόλυμα αντίστοιχα).

Γ.2 Λευκαντική δράση

Η δοκιμή της τυροσινάσης εφαρμόστηκε σε όλα τα εκχυλίσματα προκειμένου να διερευνηθεί εάν τα δείγματα έχουν την ικανότητα να παρεμποδίζουν της οξείδωση της L-DOPA από τυροσινάση μανιταριού και κατ'έπекταση να επιδεικνύουν λευκαντική δράση. Τα ποσοτικά αποτελέσματα υπολογίζονται σε ποσοστά % (Πίνακας 34), ενώ τα ποιοτικά αποτελέσματα παρατίθενται στο Διάγραμμα 2.



Διάγραμμα 2: Αποτελέσματα λευκαντικής δράσης των δειγμάτων.

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 2, την ισχυρότερη δράση επέδειξε το υδροαλκοολικό εκχύλισμα της λευκόδερμης πεύκης, το οποίο παρουσιάζει περίπου 1,2 φορές μεγαλύτερη δραστηριότητα από το μάρτυρα κοζικό οξύ με ποσοστό δράσης $62,28 \pm 2,37$, χωρίς ωστόσο να ξεπερνά τη δράση του δεύτερου μάρτυρα (γλυκόριζα). Η μέση ανασταλτική συγκέντρωση για το Agro 04 υπολογίστηκε στα 230 $\mu\text{g/mL}$.

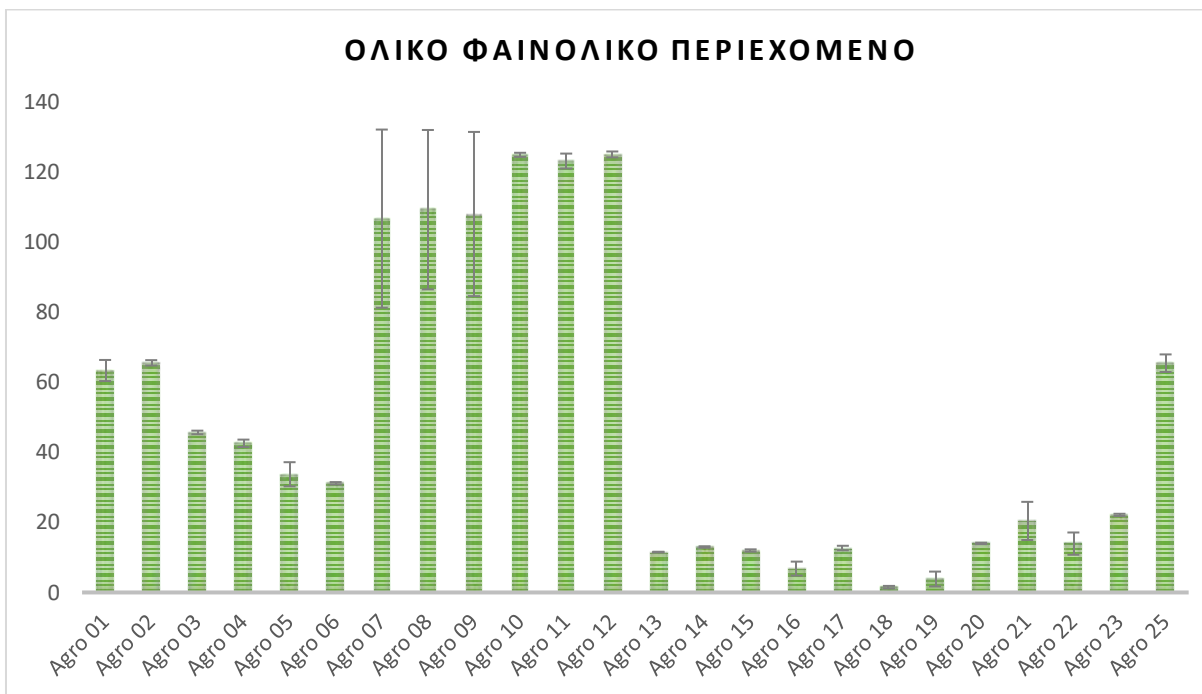
Αρκετά υψηλή δράση παρατηρήθηκε και στο αιθανολικό εκχύλισμα της μαύρης πεύκης, ακολουθούμενη από όλα τα εκχυλίσματα του ευκαλύπτου και το υδατικό εκχύλισμα του ροδιού, με τιμές πολύ κοντινές με εκείνην του κοζικού οξέως. Τη χαμηλότερη μέση ανασταλτική συγκέντρωση παρουσίασαν τα εκχυλίσματα του ευκαλύπτου με τιμές 140, 150 και 180 $\mu\text{g/mL}$ για το υδατικό, το υδροαλκοολικό και το αιθανολικό εκχύλισμα αντίστοιχα.

Πίνακας 33: Ποσοτικά αποτελέσματα λευκαντικής δράσης δειγμάτων και τυπική απόκλιση.

Δείγματα	TYR		
	0,3 mg/mL		IC50 mg/ml
	Τιμή (%)	Τυπ. Απόκλιση	
Agro 01	33,40	9,54	
Agro 02	52,38	28,12	0,20
Agro 03	23,75	14,34	
Agro 04	62,28	2,37	0,23
Agro 05	38,45	5,93	
Agro 06	36,92	4,93	
Agro 07	31,32	11,82	
Agro 08	39,48	4,64	
Agro 09	49,25	6,52	0,28
Agro 10	49,15	2,31	0,15
Agro 11	49,82	1,71	0,18
Agro 12	50,67	6,99	0,14
Agro 13	24,53	3,08	
Agro 14	26,90	0,76	
Agro 15	23,84	4,10	
Agro 16	1,71	2,41	
Agro 17	24,59	1,91	
Agro 18	1,10	1,55	
Agro 19	26,46	1,07	
Agro 20	17,45	17,16	
Agro 21	45,24	4,77	0,36
Agro 22	16,85	7,71	
Agro 23	32,91	8,26	
Agro 25	31,53	1,28	
KA (c=2μg/mL)	52,91	1,12	
GL(c=5μg/mL)	78,04	0,86	

Γ.3 Ολικό Φαινολικό Περιεχόμενο

Σε όλα τα δείγματα υπολογίστηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (σε mg γαλλικού οξέως/g ξηρής ουσίας) και τα ποσοτικά και ποιοτικά αποτελέσματα παρατίθενται στον **Πίνακα 35** και το **Διάγραμμα 3**, αντίστοιχα.



Διάγραμμα 3: Ολικό φαινολικό περιεχόμενο.

Το υψηλότερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο παρουσίασαν όλα τα εκχυλίσματα του ευκαλύπτου με τιμές που κυμαίνονταν από $123,11 \pm 2,13$ έως $125,00 \pm 0,83$ mg GA/g ξηρής ουσίας, ακολουθούμενα από τα εκχυλίσματα του ροδιού ($106,68 \pm 25,41$ – $109,23 \pm 22,74$ mg GA/g ξηρής ουσίας). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα των προηγούμενων δοκιμών καθώς τα εκχυλίσματα με πολύ υψηλό φαινολικό περιεχόμενο παρουσιάζουν και πολύ ισχυρή αντιοξειδωτική δράση.

Τέλος, τα δείγματα της μαύρης πεύκης και συγκεκριμένα το υδροαλκοολικό, το αιθανολικό και το υδρόλυμα παρουσίασαν σημαντικά υψηλό φαινολικό περιεχόμενο με τιμές $63,33 \pm 3,01$, $65,53 \pm 0,76$, $65,42 \pm 2,51$ mg GA/g ξηρής ουσίας, αντίστοιχα.

Πίνακας 34: Ολικό φαινολικό περιεχόμενο και τυπ. απόκλιση

Δείγματα	TPC	
	0,4 mg/mL	
	Τιμή (mg GA/g ξ.ο.)	Τυπ. Απόκλιση
Agro 01	63,33	3,01
Agro 02	65,53	0,76
Agro 03	45,66	0,51
Agro 04	42,55	1,065
Agro 05	33,72	3,45
Agro 06	31,15	0,34
Agro 07	106,68	25,41
Agro 08	109,23	22,74
Agro 09	107,99	23,43
Agro 10	124,88	0,58
Agro 11	123,11	2,13
Agro 12	125,00	0,83
Agro 13	11,52	0,10
Agro 14	12,97	0,21
Agro 15	11,97	0,33
Agro 16	6,80	2,00
Agro 17	12,68	0,64
Agro 18	1,51	0,36
Agro 19	3,84	2,12
Agro 20	14,00	0,21
Agro 21	20,41	5,44
Agro 22	13,93	3,18
Agro 23	22,14	0,32
Agro 25	65,42	2,51

Γ.4 Αντιμικροβιακή Δράση

▪ Αντιβακτηριακή δράση

Για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης των προς μελέτη εκχυλισμάτων και υδρόλυμάτων έναντι των φυτοπαθογόνων βακτηρίων εφαρμόστηκε η μέθοδος της διάχυσης με δίσκους. Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 36** όλα τα εκχυλίσματα του ροδιού έδειξαν σημαντική αντιβακτηριακή δράση έναντι μερικών από τα προς μελέτη βακτήρια. Τα δύο στελέχη του *Pseudomonas corrugata*, όλοι οι παθότυποι του *Xanthomonas*, το *E. carotovora* pv. *atroseptica* αλλά και τα *Acidovorax* sp. και *A.citrulli* φάνηκαν να είναι ευαίσθητα στα εκχυλίσματα. Ιδιαίτερα στο *P.corrugata*, η ζώνη αναστολής που προέκυψε ως αποτέλεσμα της παρουσίας των εκχυλισμάτων ροδιού ήταν μεγαλύτερη από εκείνη του μάρτυρα.

Τα εκχυλίσματα των δύο ειδών πεύκου έδειξαν χαμηλή δραστηριότητα έναντι κάποιων βακτηρίων, ενώ το υδατικό εκχύλισμα της μαύρης πεύκης παρουσίασε χαμηλή αντιβακτηριακή δράση έναντι όλων των βακτηρίων. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι από το ίδιο εκχύλισμα παρατηρήθηκε μικρή παρεμπόδιση του *P. tolaasi* το οποίο όμως παρουσιάστηκε ανθεκτικό ακόμα και στον μάρτυρα.

Το *X.campestris* pv. *campestris* παρουσιάστηκε μετρίως ευαίσθητο στα εκχυλίσματα του ευκαλύπτου, ενώ μικρή ευαισθησία έδειξε και το *Acidovorax* sp. στο υδρόλυμα της μαύρης πεύκης (**Πίνακας 37**).



Εικόνα 29: Βακτηριακές καλλιέργειες στις οποίες έχει εφαρμοστεί η μέθοδος διάχυσης με δίσκους. Διακρίνονται οι ζώνες παρεμπόδισης από τα εκχυλίσματα και τον μάρτυρα.

Πίνακας 35: Αποτελέσματα αντιβακτηριακής δράσης των εκχυλισμάτων (Agro 01-09) με τη μέθοδο διάχυσης με δίσκους σε συγκέντρωση 1mg/δίσκο.

ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ	Χλωραμφ.		Agro 01		Agro 02		Agro 03		Agro 04		Agro 05		Agro 06		Agro 07		Agro 08		Agro 09	
	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η
<i>A. citrulli</i> w1	27	33	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	-	-	18	14	9	16	-	14
<i>Acidovorax</i> sp.	33	30	10	9	-	7	-	7	-	-	-	8	-	-	8	16	12	20	-	17
<i>A. tumefaciens</i> (Ag 20)	13	12	-	-	-	-	0	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> 363/2008	24	29	-	-	-	-	-	9	10	-	-	-	-	-	14	-	14	-	14	16
<i>E. carotovora</i> pv. <i>carotovora</i> BPIC 162	30	32	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. chrysanthemi</i> 1530/2008	23	29	9	-	10	-	7	9	8	-	7	-	10	-	9	-	9	-	8	-
<i>P. cichorii</i>	22*	16	-	-	-	-	-	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. corrugata</i> col2/2541	16	-	13	-	-	-	8	8	-	-	10	-	-	-	16	19	15	16	18	16
<i>P. corrugata</i> col1/2564	16	17	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-	17	20	14	19	19	17
<i>P. savastanoi</i>	21	20	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> col2	20	21	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. tolaasii</i> 32k/1215	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. tolaasii</i> col1/2063	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. viridiflava</i> col1/5473	17	18	-	8	-	-	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	32	34	-	-	-	-	10	9	-	-	-	-	-	-	23	28	26	28	24	24
<i>X. campestris</i> pv. <i>juglandis</i>	31	30	12	-	-	-	-	9	-	-	-	-	-	-	12	9	22	23	22	22
<i>X. campestris</i> pv. <i>malvacearum</i>	34	35	-	9	-	-	-	10	9	0	-	-	-	-	21	19	23	23	24	21

* Ο μάρτυρας δεν παρεμπόδισε πλήρως την ανάπτυξη του βακτηρίου .

Πίνακας 36: Αποτελέσματα αντιβακτηριακής δράσης των εκχυλισμάτων(Agro 10-25) με τη μέθοδο διάχυσης με δίσκους σε συγκέντρωση 1mg/δίσκο.

ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ	Χλωραμφ.		Agro 10		Agro 11		Agro 12		Agro 13		Agro 19		Agro 22		Agro 23		Agro 25	
	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η
<i>Acidovorax sp.</i>	33	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	9
<i>E. carotovora</i> pv. <i>carotovora</i> BPIC 162	30	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	7	-	9	-
<i>P. savastanoi</i>	21	20	-	-	-	-	-	-	-	7	-	7	-	-	-	-	-	-
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	32	34	13	14	13	14	17	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>X. campestris</i> pv. <i>juglandis</i>	31	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8
<i>X. campestris</i> pv. <i>malvacearum</i>	34	35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	10

▪ Αντιμυκητιακή δράση

Για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης των προς μελέτη δειγμάτων έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα εφαρμόστηκε η μέθοδος αραίωσης σε άγαρ. Τα εκχυλίσματα του ροδιού και του ευκαλύπτου εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη δύο στελεχών του *Phytophthora nicotianae* σε συγκέντρωση 10 mg/mL θρεπτικού μέσου. Τα ποσοστά παρεμπόδισης του μύκητα παρατίθενται στον Πίνακα 38.

Πίνακας 37: Αποτελέσματα αντιμυκητιακής δράσης των εκχυλισμάτων του ροδιού και του ευκαλύπτου σε συγκέντρωση 10mg/mL.

c=10 mg/mL	% Inhibition					
	Agro 07	Agro 08	Agro 09	Agro 10	Agro 11	Agro 12
<i>P. nicotianae</i> BPI 1933	44,87	48,72	44,87	51,71	61,54	51,50
<i>P. nicotianae</i> BPI 2501	50,99	54,30	53,64	39,96	43,38	32,05

Τόσο τα εκχυλίσματα του ροδιού, όσο και του ευκαλύπτου έδειξαν σαφή παρεμπόδιση και των δύο στελεχών του μύκητα. Στα δείγματα του ευκαλύπτου η παρεμπόδιση αντιστοιχεί σε μετρήσεις που ελήφθησαν την 4^η ημέρα. Οι υφές του μυκηλίου ήταν πάρα πολύ ασθενείς ενώ στο υδατικό του εκχύλισμα το μυκήλιο ήταν κάπως «υγρό». Την 6^η ημέρα η ανάπτυξη του μύκητα είχε υποχωρήσει τελείως.



Εικόνα 30: Καλλιέργειες *P. nicotianae* στις οποίες έχει εφαρμοστεί η μέθοδος αραίωσης σε άγαρ. Διακρίνεται η καλλιέργεια control και οι καλλιέργειες στις οποίες έχει ενσωματωθεί στο άγαρ εκχύλισμα ευκαλύπτου και ροδιού.

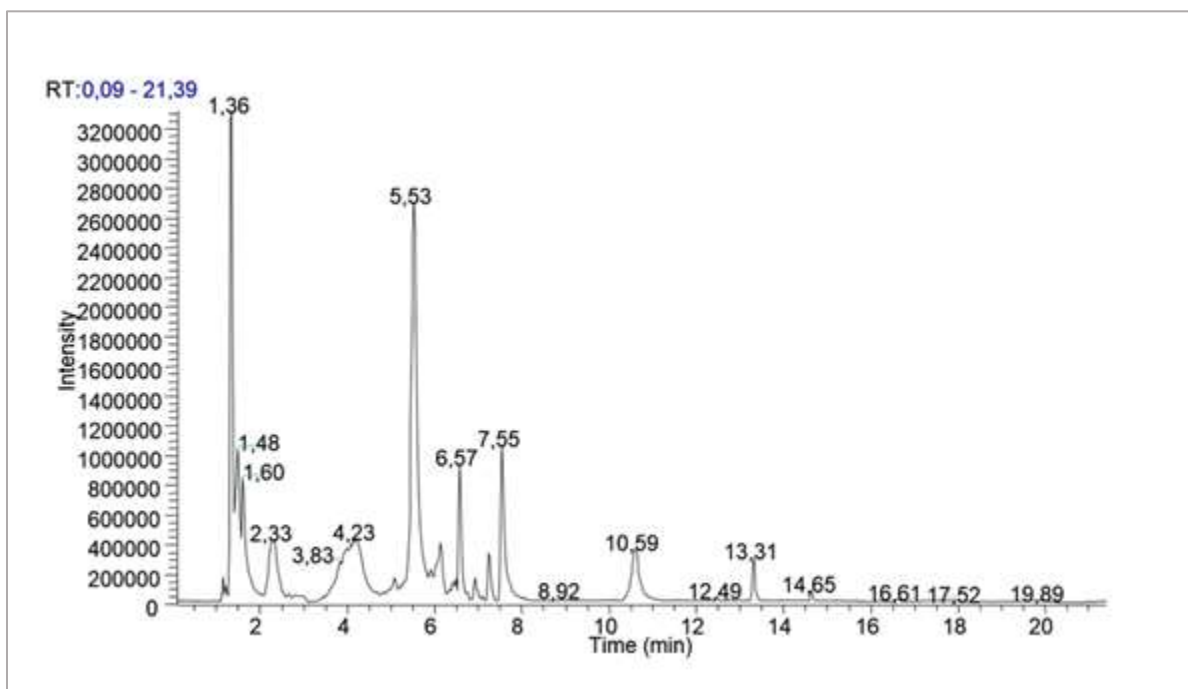
Γ.5 Φυτοχημική Ανάλυση

Γ.5.1. Φυτοχημικό Προφίλ του *Punica granatum* και του *Eucalyptus globulus*

Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών κατέδειξαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, αλλά και αντιμικροβιακή έναντι των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών, τόσο για τα εκχυλίσματα του ροδιού, όσο και του ευκαλύπτου. Η δραστηριότητα των εκχυλισμάτων ήταν αναμενόμενη και επιβεβαιώνεται βιβλιογραφικά (Quattrucci et al., 2013, Shibani et al., 2012).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση των βασικών μεταβολιτών του αιθανολικού εκχυλίσματος του ροδιού (Agro 08) και του ευκαλύπτου (Agro 11) με χρήση LC-HRMS/MS. Τα δεδομένα συγκρίθηκαν και επιβεβαιώθηκαν από τη βιβλιογραφία (Romani et al., 2012).

■ Φυτοχημικό Προφίλ Αιθανολικού Εκχυλίσματος του *P. granatum* (Agro 08)



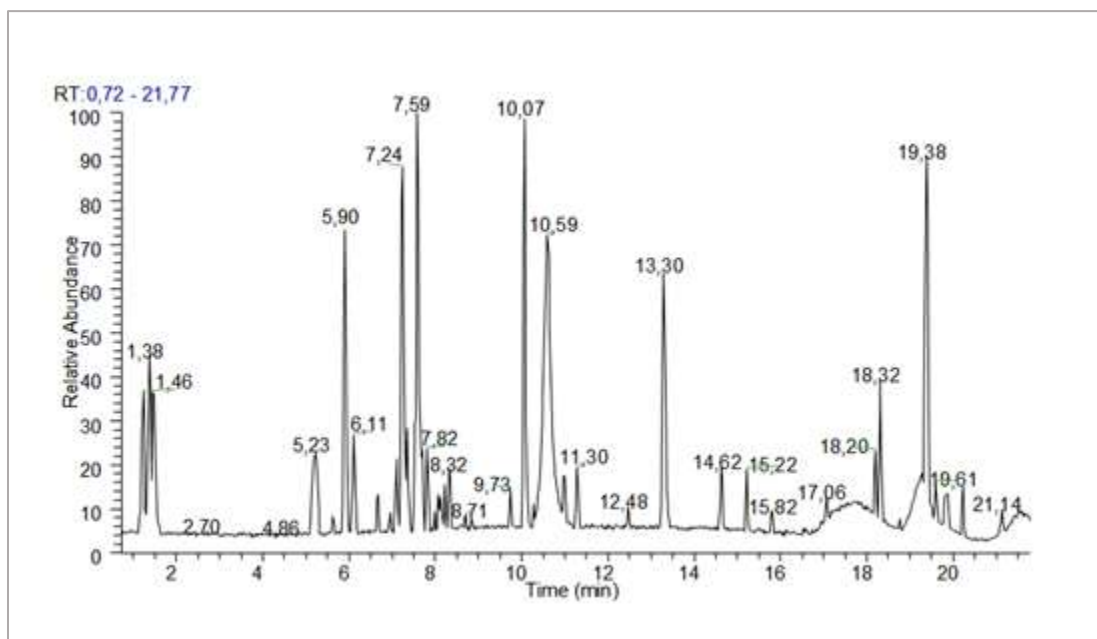
Εικόνα 31: Χρωματογράφημα βασικών κορυφών του Agro 08.

Πίνακας 38: Βασικοί μεταβολίτες του Agro 08.

Rt (min)	Μεταβολίτης
1.36	Εξαϋδροξυδιφαινοϋλογλυκόζη
1.64	α-πουνικαλίνη
2.33	β-πουνικαλίνη
4.23	α-πουνικαλαγίνη
5.53	β-πουνικαλαγίνη
6.13	Ελλαγιταννίνη
6.57	Εξοσίδης Ελλαγικού οξέος
6.92	Ταννίνη
6.94	Γαλλοταννίνη
7.24	Εξοσίδης Ελλαγικού οξέος
7.55	Ελλαγικό οξύ
13.31	Φουρανικό παράγωγο

Ο κυριότερος μεταβολίτης του εκχυλίσματος ήταν η β-πουνικαλαγίνη. Μελέτες που έχουν διεξαχθεί για τους περισσότερους από αυτούς τους μεταβολίτες επιβεβαιώνουν τη βιολογική δράση που παρατηρήθηκε στις βιοδοκιμές (Gil et al., 2000, Taguri et al., 2006).

▪ **Φυτοχημικό Προφίλ Αιθανολικού Εκχυλίσματος του *E. globulus* (Agro 11)**



Εικόνα 32: Χρωματογράφημα βασικών κορυφών του Agro 11.

Πίνακας 39: Βασικοί μεταβολίτες του Agro 11.

Rt (min)	Μεταβολίτης
5.23	Διμερές προανθοκυανιδίνης
5.90	Κατεχίνη
7.10	Εξοσίδης αρωμαδενδρίνης
7.24	Πεντοσίδης μεθυλοελλαγικού οξέως
7.32	Ελλαγικό οξύ
7.59	Παράγωγο ελλαγικού οξέως
7.82	Παράγωγο ελλαγικού οξέως
8.32	Παράγωγο ελλαγικού οξέως
9.73	Εριοδικτυόλη
10.07	Ισοραμνετίνη
14.62	Λουτεολίνη
19.38	Ολεανικό ή ουρσουλικό οξύ

Οι κυριότεροι μεταβολίτες του εκχυλίσματος ήταν το ελλαγικό οξύ και η ισοραμνετίνη. Μελέτες που έχουν διεξαχθεί για τους περισσότερους από αυτούς τους μεταβολίτες επιβεβαιώνουν τη βιολογική δράση που παρατηρήθηκε στις βιοδοκιμές (Taguri et al., 2006).

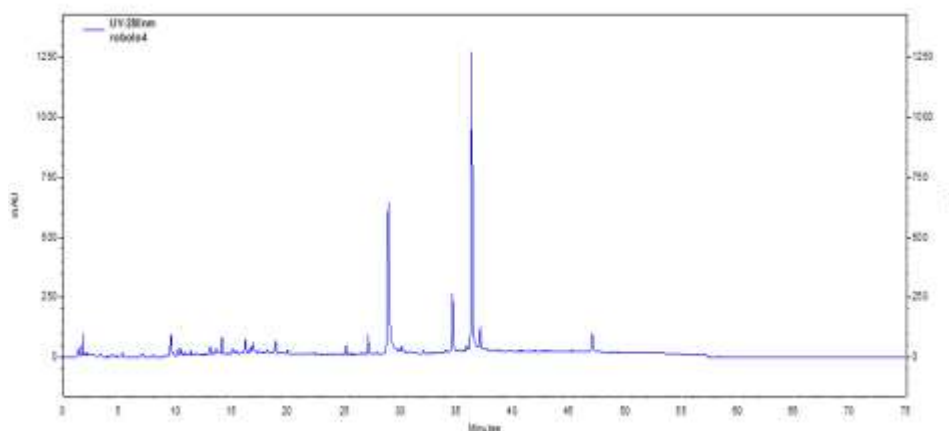
Γ.5.2. Φυτοχημική ανάλυση του *Pinus heldreichii*

Παράλληλα, όπως προκύπτει από τις βιολογικές δοκιμές, το υδροαλκοολικό εκχύλισμα του *P. heldreichii*, παρουσίασε την υψηλότερη λευκαντική δράση από όλα τα δείγματα, ενώ τόσο το υδροαλκοολικό, όσο και το αιθανολικό εκχύλισμα του ίδιου φυτού κατέδειξαν υψηλή αντιοξειδωτική δράση (δοκιμή ABTS). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις δοκιμές δράσης τυροσινάσης και μέτρησης των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες.

Ως εκ τούτου, κρίθηκε σκόπιμη η φυτοχημική ανάλυση των 2 δραστικών εκχυλισμάτων του φυτού.

Γ.5.2.1. Φυτοχημική ανάλυση του Agro 04

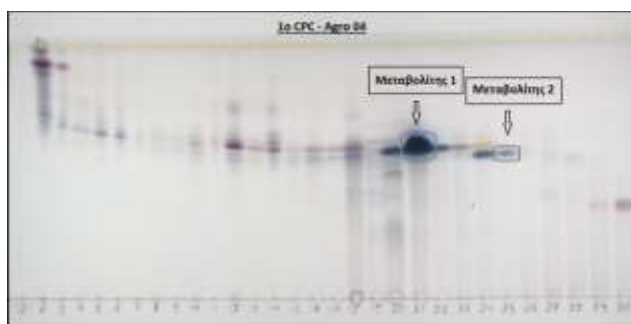
Στο υδροαλκοολικό εκχύλισμα του *Pinus heldreichii* πραγματοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και ελήφθη το φυτοχημικό προφίλ (Εικόνα 33), το οποίο ωστόσο δεν παρουσίαζε αρκετές κορυφές.



Εικόνα 33: Χρωματογράφημα βασικών κορυφών του Agro 04 .

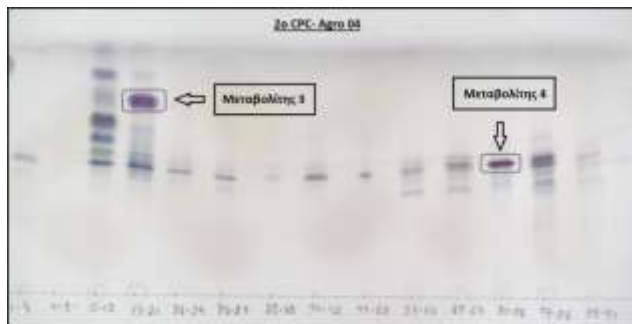
Καθώς, το εκχύλισμα δε φαίνεται να εμφανίζει απορρόφηση στο UV-ορατό, δε μπορούν να χρησιμοποιηθούν τεχνικές που χρησιμοποιούν ανιχνευτές υπεριώδους-ορατού. Ως εκ τούτου, αποφασίστηκε να πραγματοποιηθεί κλασμάτωση με χρήση χρωματογραφίας κατανομής με φυγοκέντρηση. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε δύο φορές για την ανάκτηση μεγαλύτερης ποσότητας κλασμάτων. Μετά το πέρας των συνενώσεων η πρώτη CPC έδωσε 37 κλάσματα και η δεύτερη 35.

Από την 1^η CPC παρελήφθησαν οι **δευτερογενείς μεταβολίτες 1 και 2**, οι οποίοι αντιστοιχούσαν στα κλάσματα 21 και 25 που παρουσίαζαν υψηλή καθαρότητα (Εικόνα 34). Ο μεταβολίτης 1 μάλιστα είναι και ο κυριότερος για το εκχύλισμα αφού αποτελεί περίπου το 20% της αρχικής ποσότητας του εκχυλίσματος.



Εικόνα 34: Δευτερογενείς μεταβολίτες (1&2) από 1^ο CPC

Από την 2^η CPC παρελήφθησαν οι δευτερογενείς μεταβολίτες **3** και **4**, οι οποίοι αντιστοιχούσαν στα κλάσματα (13-21) και (70-78) (Εικόνα 35).

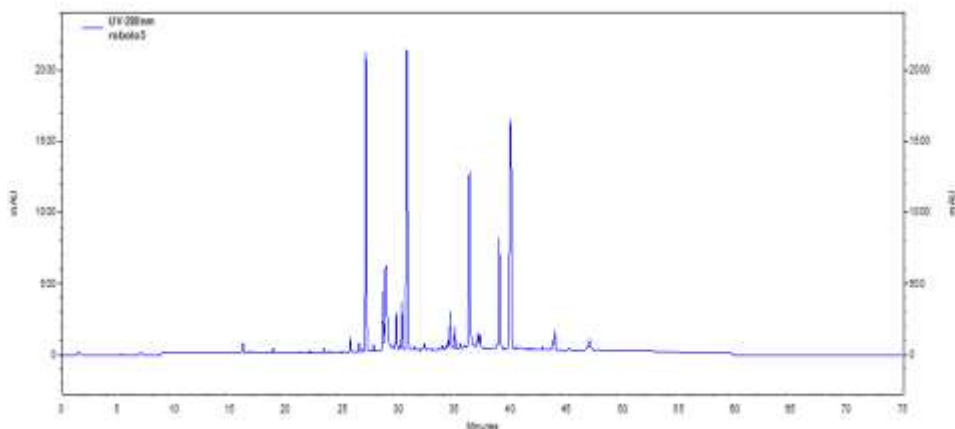


Εικόνα 35: Δευτερογενείς μεταβολίτες (3&4) από 2^ο CPC

Ακολούθησε ταυτοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών με τη λήψη φασμάτων LC-HRMS/MS και NMR.

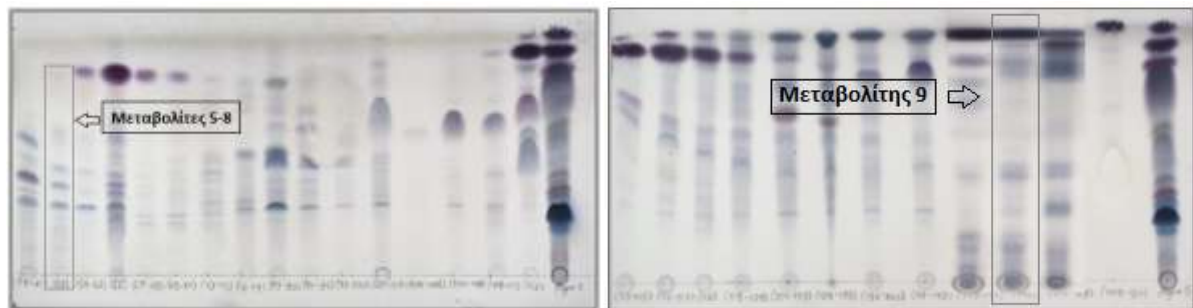
Γ.5.2.2 Φυτοχημική ανάλυση του Agro 05

Στο αλκοολικό εκχύλισμα του *Pinus heldreichii* πραγματοποιήθηκε επίσης υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και ελήφθη το φυτοχημικό προφίλ (Εικόνα 36).



Εικόνα 36: Φυτοχημικό προφίλ του Agro 05 με χρήση HPLC.

Το εκχύλισμα αυτό εμφάνιζε περισσότερες κορυφές συγκριτικά με το υδροαλκοολικό, ωστόσο κρίθηκε καλύτερο να πραγματοποιηθεί κλασμάτωση με CPC. Μετά το πέρας των συνενώσεων παρελήφθησαν 47 κλάσματα. Στα κλάσματα 62 και 146 πραγματοποιήθηκε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας που οδήγησε στην απομόνωση τεσσάρων μεταβολιτών από το πρώτο κλάσμα και ενός από το δεύτερο (μεταβολίτες 5 έως 8 και μεταβολίτης 9, αντίστοιχα).



Εικόνα 37: Κλάσματα της CPC του αιθανολικού εκχυλίσματος στα οποία πραγματοποιήθηκε prep- TLC

Ακολούθησε η ταυτοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών με τη λήψη φασμάτων LC-HRMS/MS και NMR.

Γ.5.2.3 Ταυτοποίηση Δευτερογενών Μεταβολιτών του *P. heldreichii*.

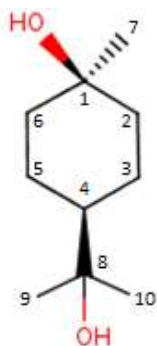
Οι μεταβολίτες που απομονώθηκαν από τα δύο εκχυλίσματα του *P. heldreichii* παρατίθενται στον Πίνακα 40. Σημειώνονται οι ονομασίες των δομών, το εκχύλισμα από το οποίο προήλθαν, το κλάσμα από το οποίο απομονώθηκαν, καθώς και ο κωδικός του μορίου.

Πίνακας 40: Δευτερογενείς μεταβολίτες που απομονώθηκαν από το *Pinus heldreichii*.

No.	Μεταβολίτης	Εκχύλισμα	Κλάσμα	Κωδικός
1.	<i>cis</i> -Τερπινόλη	Agro 04	21	ph21
2.	<i>trans</i> -Τερπινόλη	Agro 04	25	ph25
3.	5'-μεθοξυ-3'-υδροξυστιλβένιο	Agro 04	(13-21)	ph13_21
4.	Πινοσιλβίνη	Agro 04	(70-78)	ph70_78
5.	12α-υδροξυαβιετικό οξύ	Agro 05	62	ph6_1
6.	12β-υδροξυαβιετικό οξύ	Agro 05	62	ph6_2
7.	Πτεροστιλβένιο	Agro 05	62	ph6_3
8.	Ισοκουπρεσικό οξύ	Agro 05	62	ph6_4
9.	Κεμπρένιο	Agro 05	146	ph5_146

Γ.5.2.3.1. Μεταβολίτης 1 : (cis) -Τερπινόλη

Ο μεταβολίτης 1 που απομονώθηκε από το υδροαλκοολικό εκχύλισμα του φυτού ταυτοποιήθηκε ως **(cis) -τερπινόλη**. Πρόκειται για ένα μονοτερπένιο το οποίο έχει απομονωθεί ξανά από το φλοιό του *Pinus heldreichii*, αλλά και από άλλα είδη του γένους. Επίσης, έχει βρεθεί σαν συστατικό ελαίου σε είδη των γενών *Origanum*, *Thymus* και *Eucalyptus*.

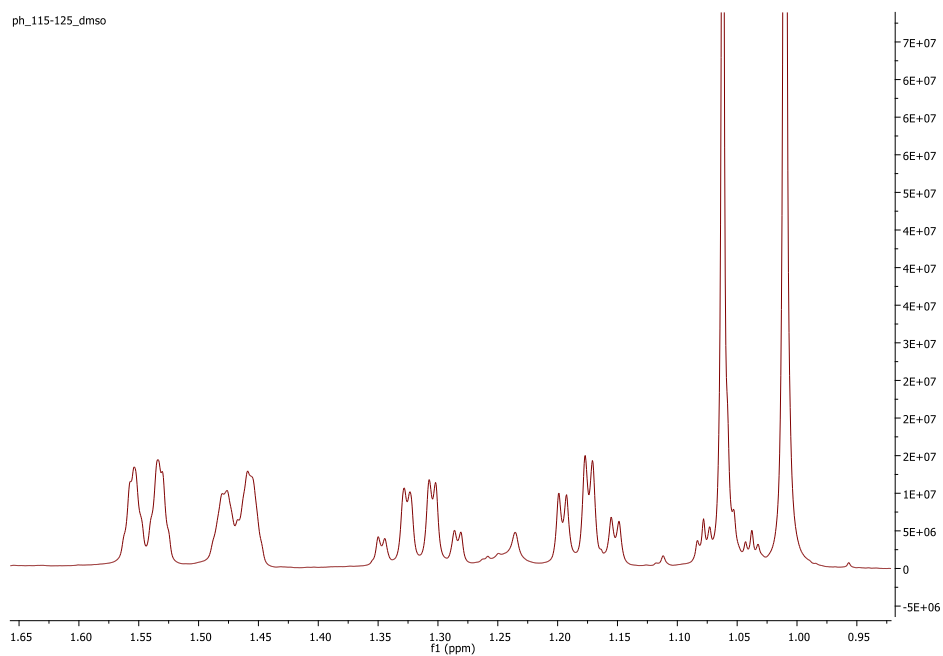


Εικόνα 38: (cis) -Τερπινόλη

Πίνακας 41: Χημικές μετατοπίσεις ^1H & ^{13}C NMR του μεταβολίτη 1 (ph_21)

Θέση	^1H NMR (600MHz, DMSO, δ ppm, J σε Hz)	^{13}C NMR (600MHz, MeOD, δ ppm)
1	-	68.01
2a	1.54 (1H, m)	38.31
2b	1.32 (1H, dd)	
3a	1.47 (1H, dd)	22.34
3b	1.17 (1H, td)	
4	1.04-1.08 (1H, m)	48.51
5a	1.47 (1H, dd)	22.33
5b	1.17 (1H, td)	
6a	1.54 (1H, m)	38.31
6b	1.32 (1H, dd)	
7	1.06 (3H, s)	30.19
8	-	71.99
9	1.01 (3H, s)	25.45
10	1.01 (3H, s)	25.45

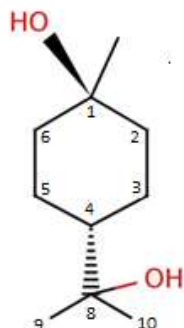
Η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων με τις τιμές που προτείνονται από την βιβλιογραφία (Bleif et al., 2011) είχαν σαν αποτέλεσμα την ταυτοποίηση του μεταβολίτη (Vekki et al., 2006). Η ταυτοποίηση του μεταβολίτη επιβεβαιώθηκε πειραματικά και από το σημείο τήξης του μορίου (104°C).



Εικόνα 39:Φάσμα ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 1.

Γ.5.2.3.2. Μεταβολίτης 2 : (*trans*) -Τερπινόλη

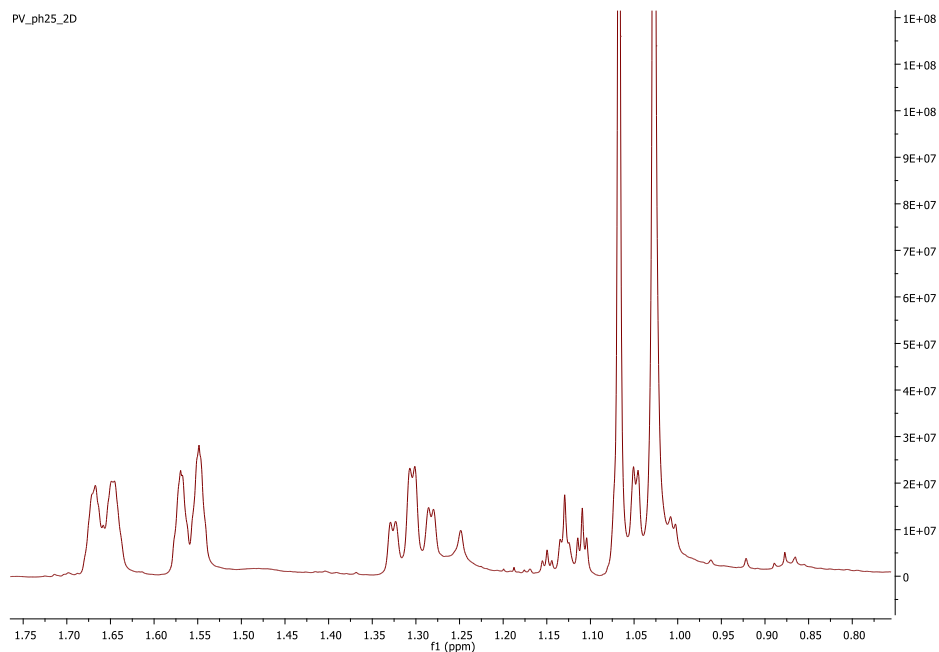
Ο μεταβολίτης 2 που απομονώθηκε από το κλάσμα rh_25 ταυτοποιήθηκε ως *trans*-τερπινόλη.



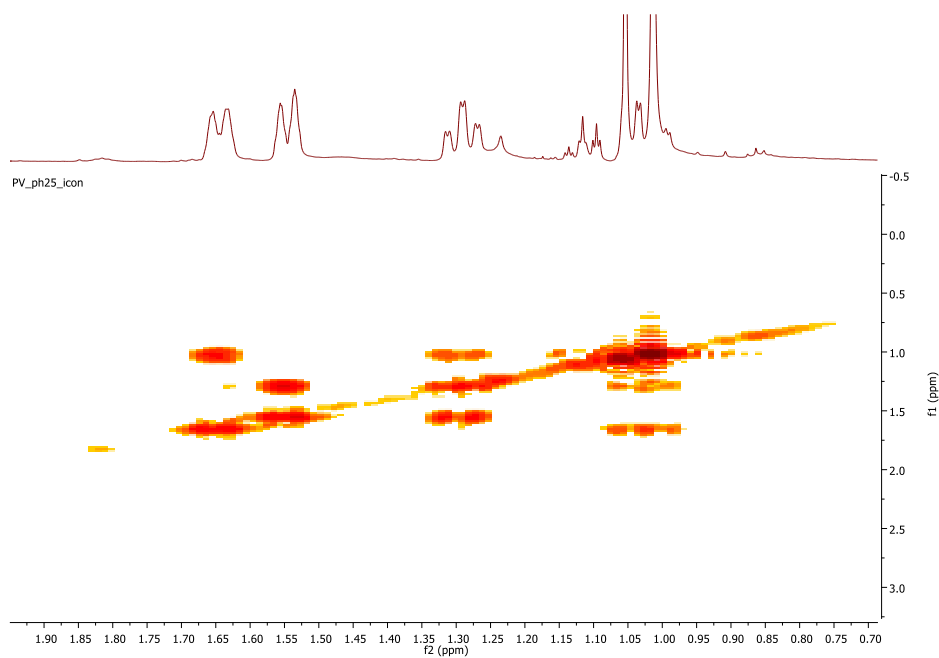
Εικόνα 43: (*trans*) -Τερπινόλη

Πίνακας 42. Χημικές μετατοπίσεις ^1H & ^{13}C NMR του μεταβολίτη 2 (rh_25).

Θέση	^1H NMR (600MHz, DMSO, δ ppm, J σε Hz)	^{13}C NMR (600MHz, MeOD, δ ppm)
1	-	68.50
2a	1.54 (1H,m)	40.10
2b	1.29 (1H,td)	
3a	1.64 (1H,dd)	24.24
3b	0.99 (1H,m)	
4	1.12 (1H,tt)	48.34
5a	1.64 (1H,dd)	24.24
5b	0.99 (1H,m)	
6a	1.54 (1H,m)	40.10
6b	1.29 (1H,td)	
7	1.05 (3H, s)	24.92
8	-	70.76
9	1.01 (3H, s)	26.85
10	1.01 (3H, s)	26.85



Εικόνα 44: Φάσμα ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 2.



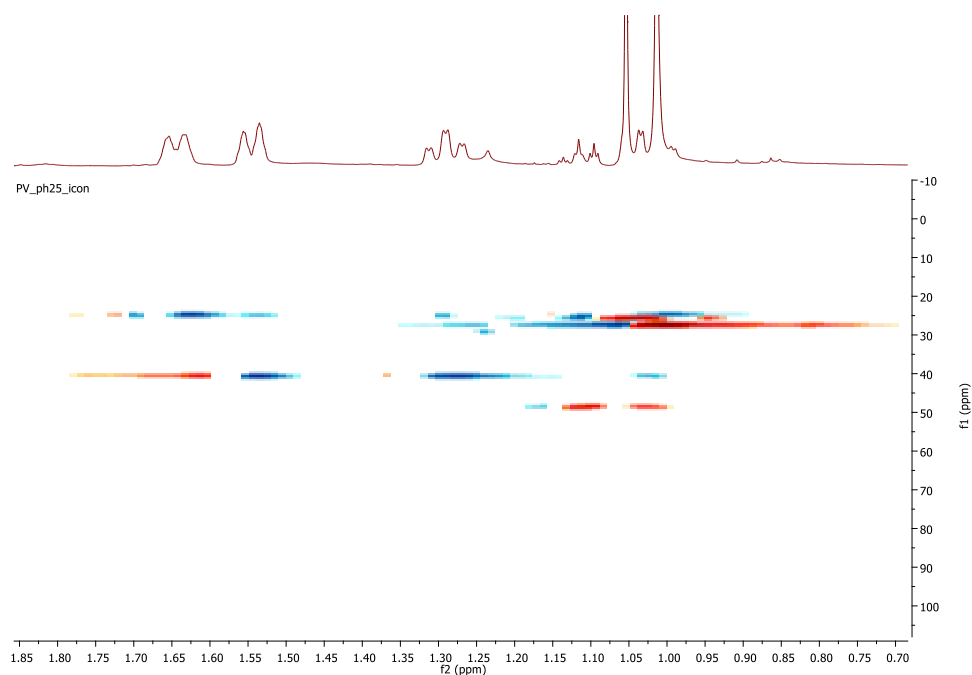
Εικόνα 45: Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 2.

Ο μεταβολίτης 2 αποτελεί την *trans* μορφή του μεταβολίτη 1. Η απόδοση και διάταξη των πρωτονίων και των ανθράκων στο μόριο έγινε με την βοήθεια των φασμάτων COSY, HSQC και

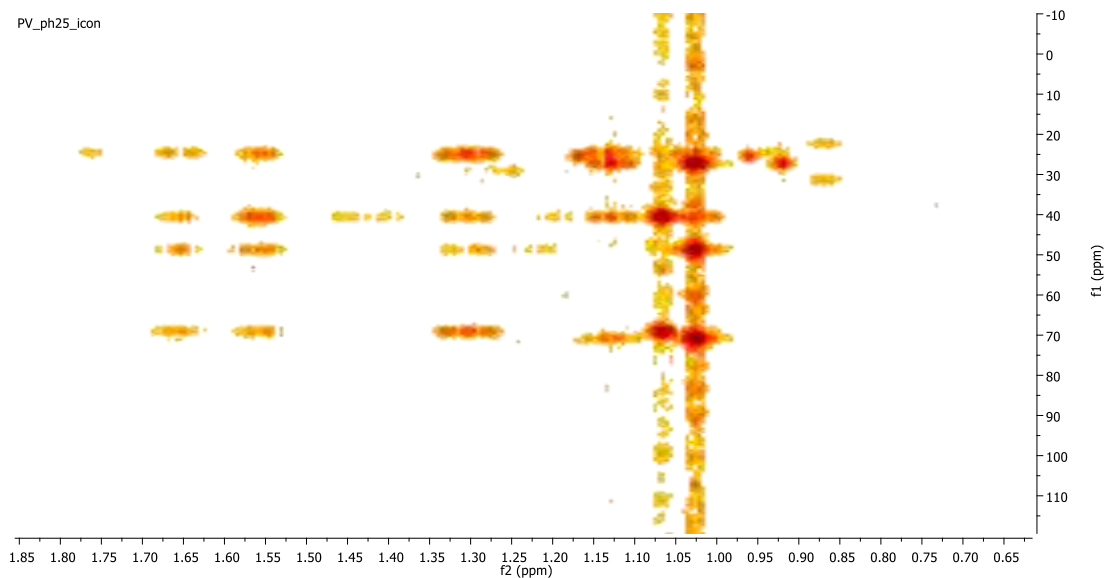
HMBC, όπου επιβεβαιώθηκε η παρουσία τριών μεθυλίων, δυο οξυγονωμένων ανθράκων και τεσσάρων μεθυλενίων, τα οποία και σε αυτή την περίπτωση φέρουν, ανά δύο, άνθρακες πρωτόνια με τις ίδιες χημικές μετατοπίσεις.

Λόγω της διαφορετικής στερεοχημείας των δυο μορίων, ο μεταβολίτης 2 παρουσιάζει σημαντική μετατόπιση, σε χαμηλότερα πεδία, των πρωτονίων 3a και 5a, καθώς του H-4, ενώ τα πρωτόνια 3b και 5b μετατοπίστηκαν στα υψηλότερα πεδία.

Η ταυτοποίηση του μεταβολίτη επιβεβαιώθηκε πειραματικά και από το σημείο τήξης του μορίου (118°C).



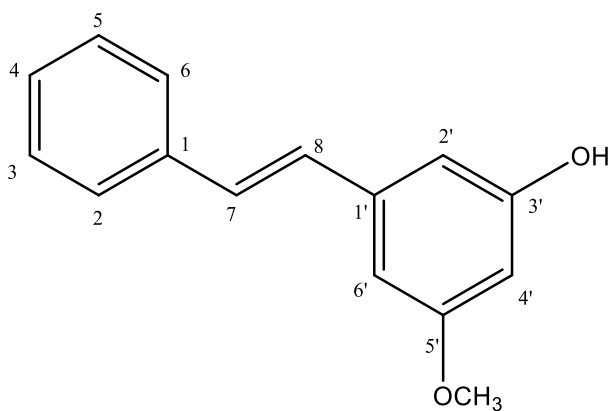
Εικόνα 46: Φάσμα HSQC για τον Μεταβολίτη 2.



Εικόνα 47: Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 2.

Γ.5.2.3.3. Μεταβολίτης 3: 5'-μεθοξυ-3'-υδροξυστιλβένιο

Ο μεταβολίτης που ταυτοποιήθηκε από το κλάσμα ph13_21 ήταν το **5'-μεθοξυ-3'-υδροξυστιλβένιο**.



Εικόνα 48: 5'-μεθοξυ-3'-υδροξυστιλβένιο

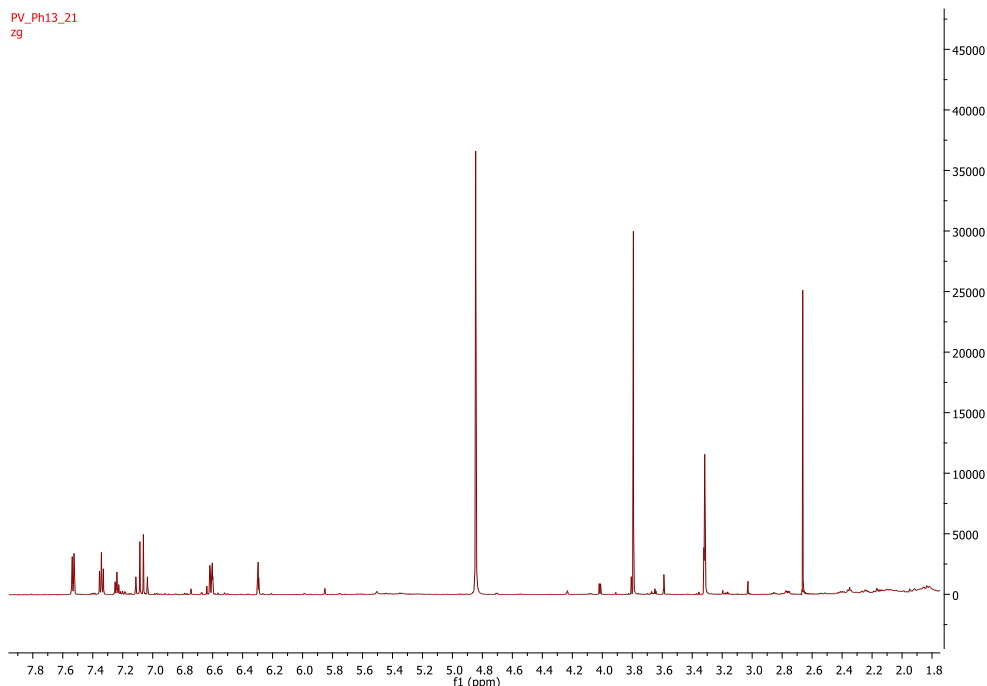
Η ουσία έχει απομονωθεί ξανά από το *Pinus heldreichii*, αλλά και από άλλα είδη του γένους, κυρίως από τον φλοιό (Pan et al., 1996, Carvalho et al., 1996). Έχει επίσης απομονωθεί από τα υπέργεια τμήματα του *Helichrysum chionosphaerum* (Asteraceae) (Jakupovic et al., 1989), από τα υπέργεια τμήματα του *Relhania corymbosa* (Asteraceae) (Tsichritzis & Jakupovic, 1990), από τις ρίζες του *Didymochlaena truncatula* (Dryopteridaceae) (Cao et al., 2006) και από το *Phragmipedium calurum* (Orchidaceae) (Garro et al., 2007).

Πίνακας 43. Χημικές μετατοπίσεις ^1H & ^{13}C NMR του μεταβολίτη 3 (ph13_21).

Θέση	^1H NMR (600MHz, MeOD, δ ppm, J σε Hz)	^{13}C NMR (600MHz, MeOD, δ ppm)
1	-	138.9
2	7.53 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8.5)	127.7
3	7.34 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7.7)	130.0
4	7.24 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7.4)	128.8
5	7.34 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7.7)	130.0
6	7.53 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8.5)	127.7
7	7.05 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 16.2)	130.1
8	7.10 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 16.2)	130.1
1'	-	140.9
2'	6.61 (1H, <i>dt</i> , <i>J</i> = 9.5/1.6)	107.2
3'	-	159.8
4'	6.29 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 2.2)	102.1
5'	-	162.8
6'	6.62 (1H, <i>brs</i>)	105.0
5'-OCH₃	3.79 (3H, <i>s</i>)	56.0

[†] Η απόδοση των ανθράκων έγινε με τη βοήθεια των φασμάτων HSQC και HMBC

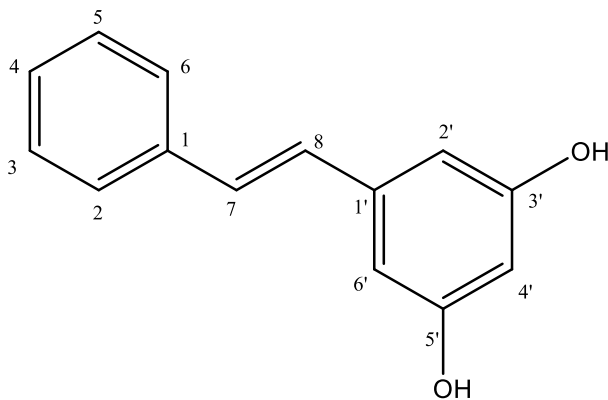
Στην αρωματική περιοχή του φάσματος παρατηρείται η ύπαρξη δύο αρωματικών πυρήνων. Ο ένας εκ των δύο αρωματικών δακτυλίων φέρει 5 πρωτόνια, από τα οποία τα H-2, H-6 και H-3, H-5 είναι χημικά ισοδύναμα. Το πρωτόνιο H-4 συντονίζει στα 7.24 ppm σαν τριπλή κορυφή με *J*=7.4 Hz, λόγω των σταθερών σύζευξης που εμφανίζει με τα πρωτόνια 3 και 5 που βρίσκονται σε ορθο-θέσεις. Ο δακτύλιος συνδέεται μέσω της θέσεως 1 με άνθρακα διπλού δεσμού. Ο διπλός δεσμός έχει *trans* διαμόρφωση, όπως παρατηρείται από τα σταθερά σύζευξης των πρωτονίων 7 και 8 στα 16.2 Hz. Στον άνθρακα της θέσεως 8 συνδέεται ο δεύτερος αρωματικός δακτύλιος. Η δομή αυτή είναι χαρακτηριστική της κατηγορίας των στυλβενίων. Τα πρωτόνια του δεύτερου δακτυλίου χαρακτηρίζονται από μικρές σταθερές σύζευξης (*J* = 1.7, 2.2 Hz), κάτι που υποδηλώνει ότι βρίσκονται σε μετα- θέσεις και ότι στις θέσεις 3' και 5' υπάρχουν υποκαταστάτες. Σε δ 3.79 εμφανίζεται σαν απλή κορυφή μία μεθοξυλομάδα, η οποία από το φάσμα HMBC διαπιστώνεται ότι συνδέεται στη θέση 5' της ουσίας. Από τη χημική μετατόπιση του C-3' φαίνεται ότι στη θέση αυτή υπάρχει υδροξύλιο.



Εικόνα 49: Φάσμα ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 3.

Γ.5.2.3.4. Μεταβολίτης 4: 3',5'-διυδροξυστυλβένιο

Ο μεταβολίτης που ταυτοποιήθηκε από το κλάσμα PV_Ph70-78 ήταν το 3',5'-διυδροξυστυλβένιο (πινοσιλβίνη).



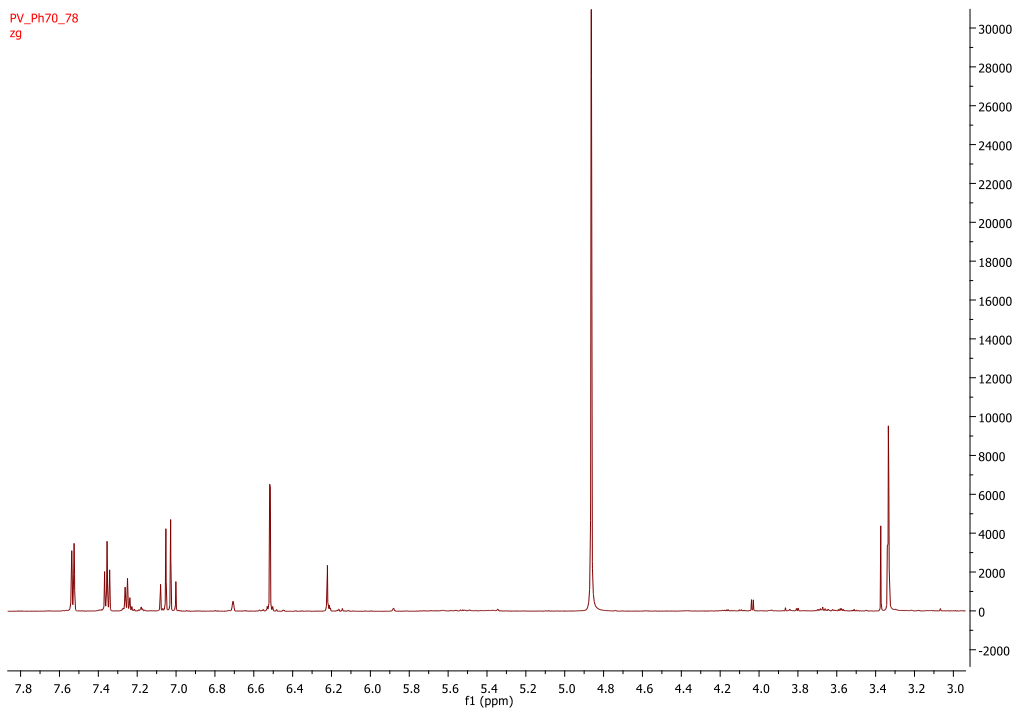
Εικόνα 50: πινοσιλβίνη

Πρόκειται για ουσία που χαρακτηρίζει το γένος *Pinus*, από όπου πήρε και το όνομά της, και απαντάται κυρίως στο φλοιό. Έχει επίσης απομονωθεί από τα υπέργεια τμήματα του *Polygonum nodosum* (Polygonaceae) (Kuroyanagi *et al.*, 1982), από τις ρίζες του *Matteuccia orientalis* (Onocleaceae) (Basnet *et al.*, 1995), από τα φύλλα του *Nothophagus alessandri* (Fagaceae) (Russell *et al.*, 2000) και από τα σπέρματα του *Alpinia katsumadai* (Zingiberaceae) (Huang *et al.*, 2007).

Πίνακας 44. Χημικές μετατοπίσεις ^1H & ^{13}C NMR του μεταβολίτη 4 (ph70_78)

Θέση	^1H NMR (600MHz, MeOD, δ ppm, J σε Hz)	^{13}C NMR (600MHz, MeOD, δ ppm)
1	-	138.3
2	7.53 (1H, d, $J = 7.7$)	127.7
3	7.36 (1H, t, $J = 7.7$)	129.9
4	7.25 (1H, t, $J = 7.2$)	128.7
5	7.36 (1H, t, $J = 7.7$)	129.9
6	7.53 (1H, d, $J = 7.7$)	127.7
7	7.07 (1H, d, $J = 16.2$)	129.9
8	7.01 (1H, d, $J = 16.2$)	130.1
1'	-	140.3
2'	6.52 (1H, m)	106.3
3'	-	154.9
4'	6.22 (1H, t, $J = 1.9$)	103.4
5'	-	159.2
6'	6.52 (1H, m)	106.3

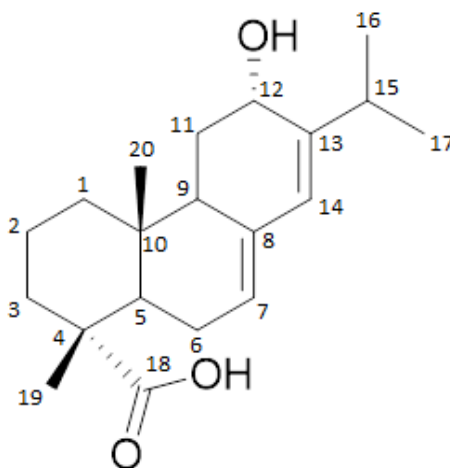
Στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^1H -NMR διακρίνονται σήματα τα οποία αντιστοιχούν στην ύπαρξη δύο αρωματικών πυρήνων. Επιπλέον, παρατηρείται η ύπαρξη διπλού δεσμού σε *trans* διαμόρφωση, μεταξύ των πρωτονίων στις θέσεις 7 και 8, όπως διαπιστώνεται από τη μεγάλη σταθερά σύζευξης ($J = 16.2$ Hz). Από τους αρωματικούς δακτυλίους ο ένας, συνδέεται μέσω της θέσεως 1 με τον άνθρακα του διπλού δεσμού και δεν φέρει επιπλέον υποκατάσταση. Ο δεύτερος πυρήνας φέρει υποκατάσταση στις θέσεις 3' και 5'. Η χημική μετατόπιση των αντίστοιχων ανθράκων και η απουσία περαιτέρω ομάδας υποδηλώνει ότι στις θέσεις αυτές υπάρχουν υδροξύλια.



Εικόνα 51: Φάσμα ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 4.

Γ.5.2.3.5. Μεταβολίτης 5: 12α-υδροξυαβιετικό οξύ

Ο μεταβολίτης που απομονώθηκε από το κλάσμα 62 (ph6_1) αναγνωρίστηκε ως το **12α-υδροξυαβιετικό οξύ**. Η ουσία έχει απομονωθεί ξανά από το γένος *Pinus* (Yang et al., 2008). Η μελέτη των φασμάτων NMR 1D και 2D του μεταβολίτη και η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων με τις τιμές που προτείνονται από την βιβλιογραφία (Bleif et al., 2011) είχαν σαν αποτέλεσμα την ταυτοποίηση του μεταβολίτη.

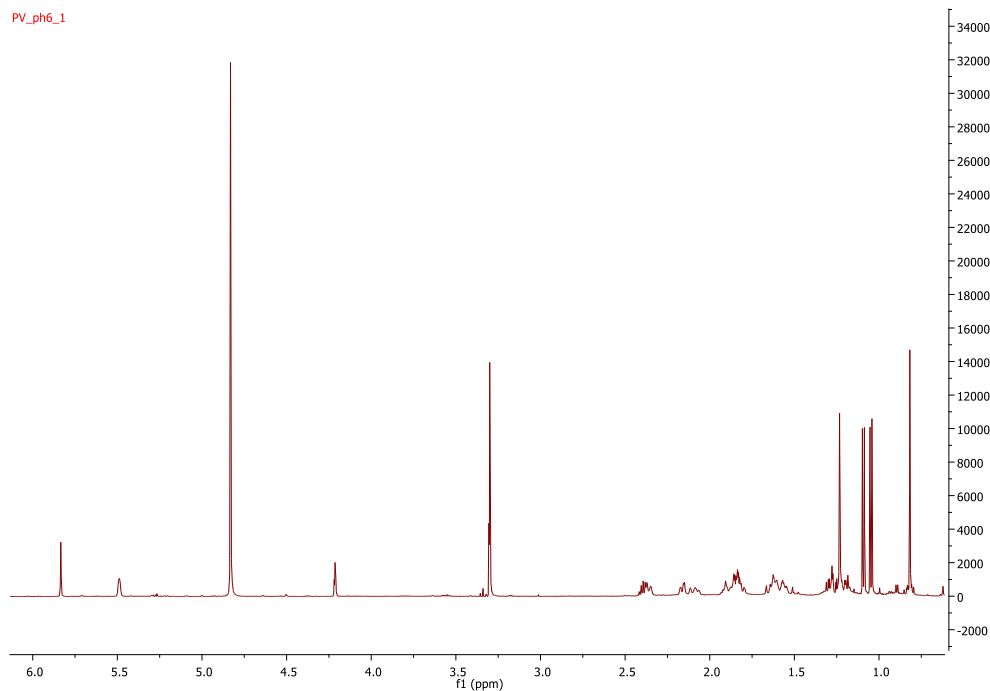


Εικόνα 52: 12α-υδροξυαβιετικό οξύ

Πίνακας 45. Χημικές μετατοπίσεις ^1H & ^{13}C NMR του μεταβολίτη 5 (ph6_1)

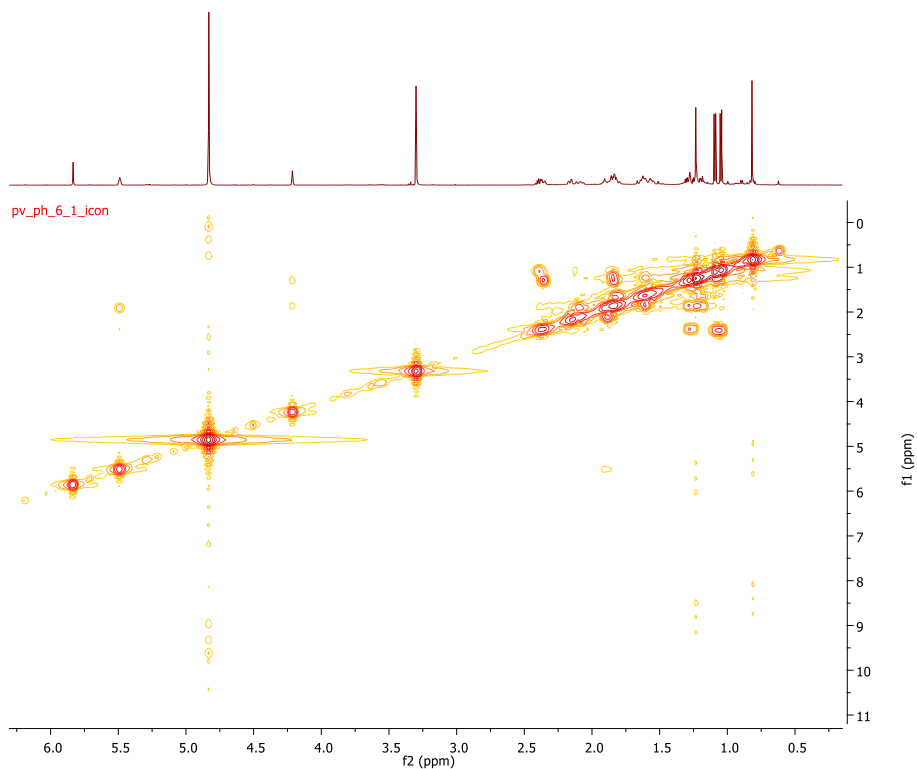
Θέση	^1H NMR (600MHz, MeOD, δ ppm, J σε Hz)	^{13}C NMR (600MHz, MeOD, δ ppm)
1a	1.19 (m)	37.84
1b	1.85 (m)	
2	1.61 (m, 2H)	17.97
3a	1.83(m)	37.19
3b	1.65 (m)	
4	-	45.71
5	2.16 (dd, J=12.3/ 3.6Hz)	44.68
6a	1.91 (m)	25.42
6b	2.09 (m)	
7	5.49 (1H, m)	122.77
8	-	134.79
9	2.35 (m)	43.32
10	-	33.27
11a	1.88 (m)	30.26
11b	1.29(dd, 13.1/3.4Hz)	
12a	4.21 (t, J=2.9Hz)	65.49
12b		
13	-	143.26
14	5.83 (s)	125.28
15	2.39 (m)	32.19
16	1.05 (d, J=6.9Hz, 3H)	20.90
17	1.09 (d, J=6.9HZ, 3H)	21.72
18	-	182.00
19	1.23 (s, 3H)	16.67
20	0.82 (s, 3H)	13.24

Στο φάσμα ^1H -NMR διακρίνονται δύο μονές και 2 διπλές κορυφές που ολοκληρώνουν για 3 H και εντοπίζονται στα 0.82, 1.23 και 1.05, 1.09 ppm αντίστοιχα και υποδηλώνουν την παρουσία τεσσάρων μεθυλίων, ενώ οι κορυφές στα 5.83 ppm και 5.49 ppm υποδεικνύουν την ύπαρξη διπλών δεσμών στο μόριο.



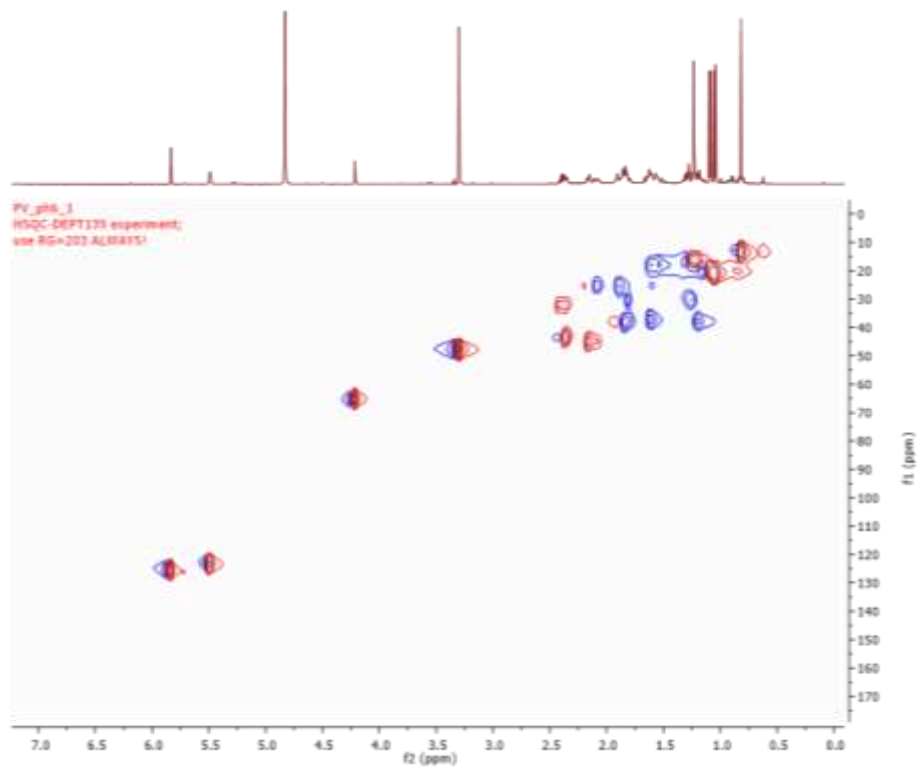
Εικόνα 53: Φάσμα ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 5

Από το φάσμα COSY προσδιορίστηκαν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτονίων. Αναλυτικότερα, παρατηρήθηκε σύζευξη του πρωτονίου H-2 στα 1.61 ppm με πρωτόνια H-1a και H-1b καθώς και με το πρωτόνιο H-3a στα 1.83 ppm. Επιπλέον, από το πείραμα COSY, τα δυο μεθύλια με διπλή κορυφή στα 1.05 και 1.09 ppm παρουσίασαν σύζευξη με το πρωτόνιο στα 2.39 ppm (H-15), όπως επίσης και τα πρωτόνια στα 5.49 ppm (H-7) με το πρωτόνιο στα 1.91 ppm (H-6a).

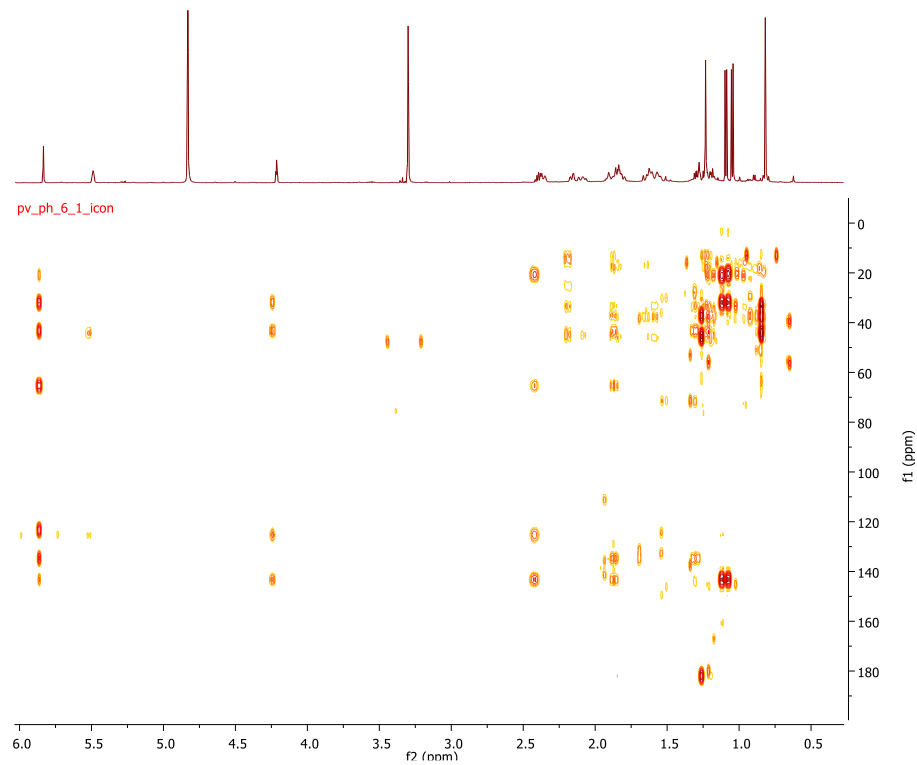


Εικόνα 54: Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 5

Οι χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων του μορίου αποδόθηκαν βάσει του 2D φάσματος HSQC-DEPT, ενώ από το φάσμα HMBC προσδιορίστηκαν οι χημικές μετατοπίσεις των τεταρτοταγών ανθράκων αλλά και η διάταξη των ατόμων του μορίου. Στο φάσμα HMBC παρατηρήθηκαν οι κοινές συζεύξεις των δυο μεθυλίων στις θέσεις 16 και 17 με τον ανθρακα C-15 (32.19 ppm) και C-13 (143.26 ppm) αλλά και η μεταξύ τους συσχέτιση. Με παρόμοιο τρόπο προσδιορίστηκε η θέση της καρβοξυλομάδας καθώς και των υπολοίπων μεθυλίων και ολεφινικών πρωτονίων στο μόριο.

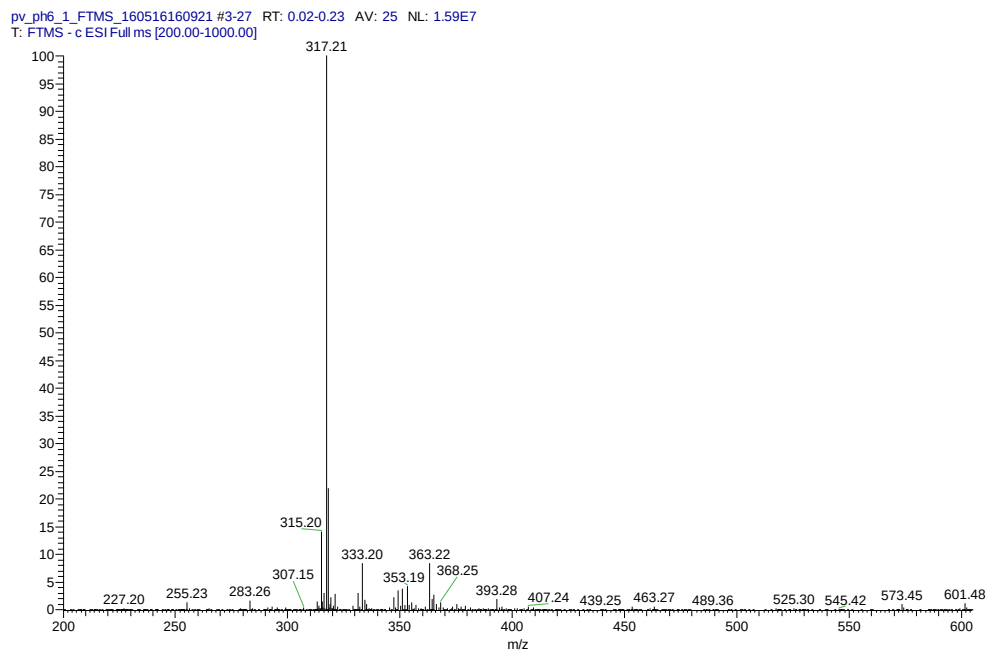


Εικόνα 55: Φάσμα HSQC-DEPT για τον Μεταβολίτη 5



Εικόνα 56: Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 5

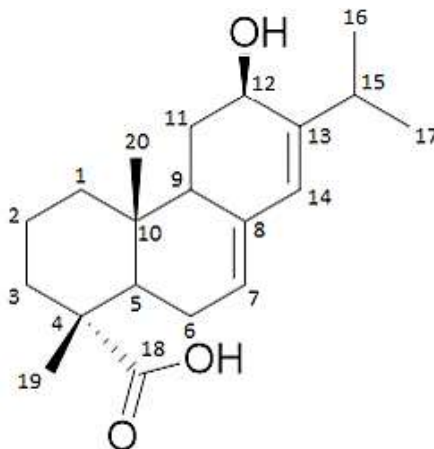
Η ανάλυση των 1D και 2D φασμάτων και η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων με των προτεινόμενων από τη βιβλιογραφία μας έδωσαν τη δυνατότητα να προσδιορίσουμε το μοριακό τύπο του μεταβολίτη 5 ως $C_{20}H_{30}O_3$ με $MB= 318.46$. Ο μοριακός τύπος επιβεβαιώθηκε και από το φάσμα μάζας ESI(-) HR-MS, όπου εμφανίστηκε το ψευδομοριακό ιόν στα $m/z= 317.21$.



Εικόνα 57: Φάσμα μάζας ESI(-) HR-MS για τον Μεταβολίτη 5.

Γ.5.2.3.6. Μεταβολίτης 6: 12β-υδροξυαβιετικό οξύ

Ο μεταβολίτης που απομονώθηκε από το κλάσμα 62 (ph6_2) ήταν το **12β-υδροξυαβιετικό οξύ**. Πρόκειται για το στερεοϊσομερές του μεταβολίτη 5. Όπως και στον προηγούμενο μεταβολίτη, η μελέτη των φασμάτων NMR 1D και 2D και η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων με τις τιμές που προτείνονται από την βιβλιογραφία (Bleif et al., 2011) είχαν σαν αποτέλεσμα την ταυτοποίηση του μορίου.



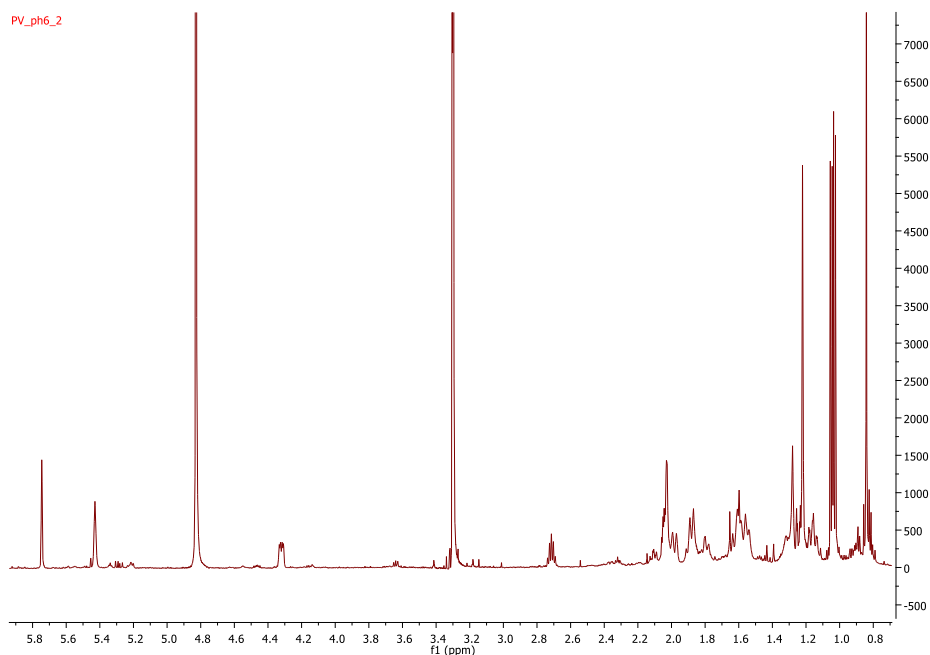
Εικόνα 58:12β-υδροξυαβιετικό οξύ

Πίνακας 46. Χημικές μετατοπίσεις ^1H & ^{13}C NMR του μεταβολίτη 6 (ph6_2)

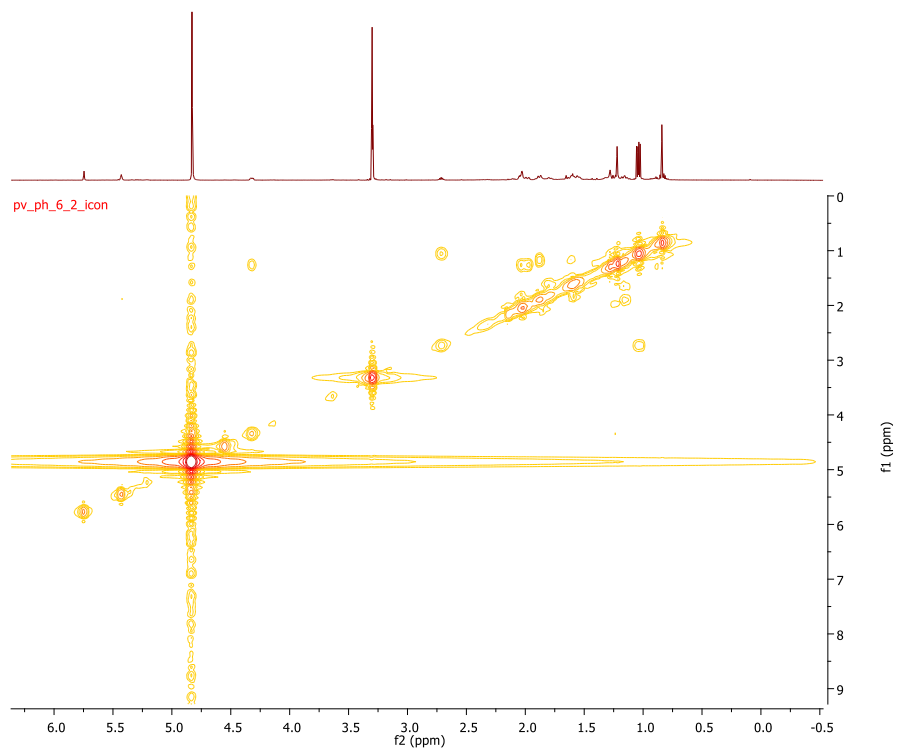
Θέση	^1H NMR (600MHz, MeOD, δ ppm, J σε Hz)	^{13}C (600MHz, MeOD, δ ppm)
1a	1.15 (m)	3.79
1b	1.89 (m)	
2	1.61 (m, 2H)	17.65
3a	1.79 (m)	37.28
3b	1.67 (m)	
4	-	47.92
5	2.03 (m)	44.32
6a	1.91 (m)	25.04
6b	2.07 (m)	
7	5.43 (m)	121.57
8	-	134.88
9	2.05 (m)	48.58
10	-	34.01
11a	2.11 (ddd, J=12/4.5,3.5Hz)	32.16
11b	1.26	
12a	4.32 (dd, J=10.2/4.5Hz)	68.17
12b		
13	-	147.29
14	5.75 (s)	122.95
15	2.71 (sep J=7Hz)	27.11
16	1.03 (d, J=6.8Hz, 3H)	22.71

17	1.05 (d, J=6.8HZ, 3H)	21.43
18	-	182.78
19	1.21 (s, 3H)	16.09
20	0.84 (s, 3H)	12.84

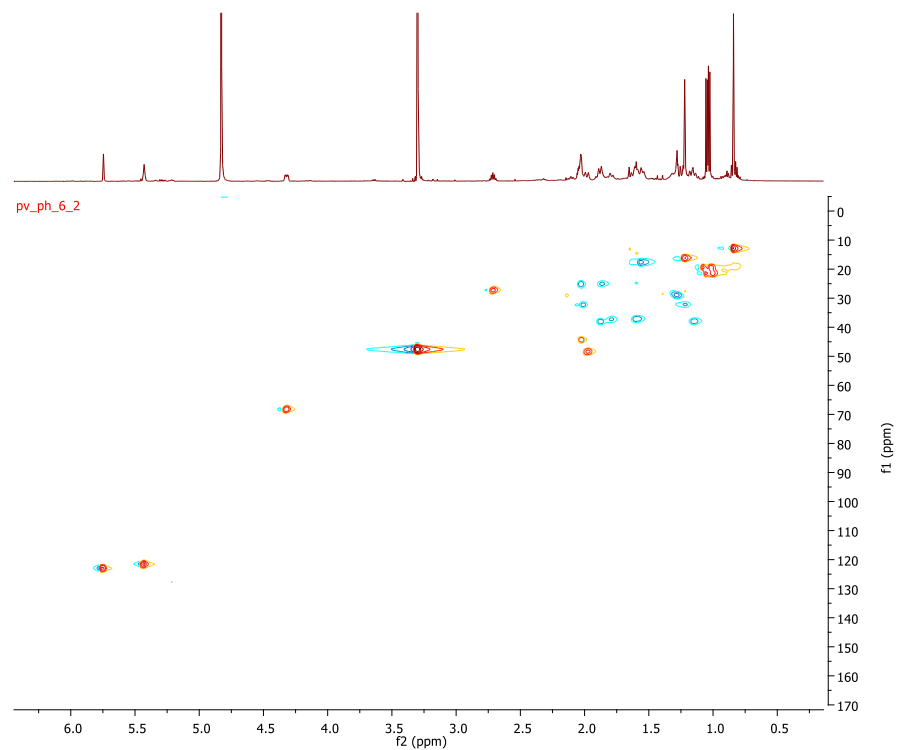
Από το φάσμα COSY προσδιορίστηκαν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτονίων, ενώ οι χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων και η διάταξη των ατόμων του μορίου αποδόθηκαν βάσει των 2D φασμάτων HSQC-DEPT και HMBC. Σημαντικό ρόλο στην απόδοση και διάκριση της δομής του μεταβολίτη 6 ως στερεοισομερές του μεταβολίτη 5 έπαιξε αφενός η χημική διαφοροποίηση στην μετατόπιση των πρωτονίων H-12 αλλά και οι πολλαπλότητα των κορυφών αυτών. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση του 12β-υδροξυαβιετικό οξέως, σύμφωνα και με βιβλιογραφικές αναφορές, η κορυφή που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-12 παρουσιάζεται ως διπλή διπλών στα 4.32 ppm με J=10.2/4.5 Hz σε αντίθεση με το πρωτόνιο H-12 του 12α-υδροξυαβιετικού οξέως το οποίο συντονίζεται στα 4.21 ppm ως τριπλή κορυφή με J=2.9 Hz (Bleif et al., 2011).



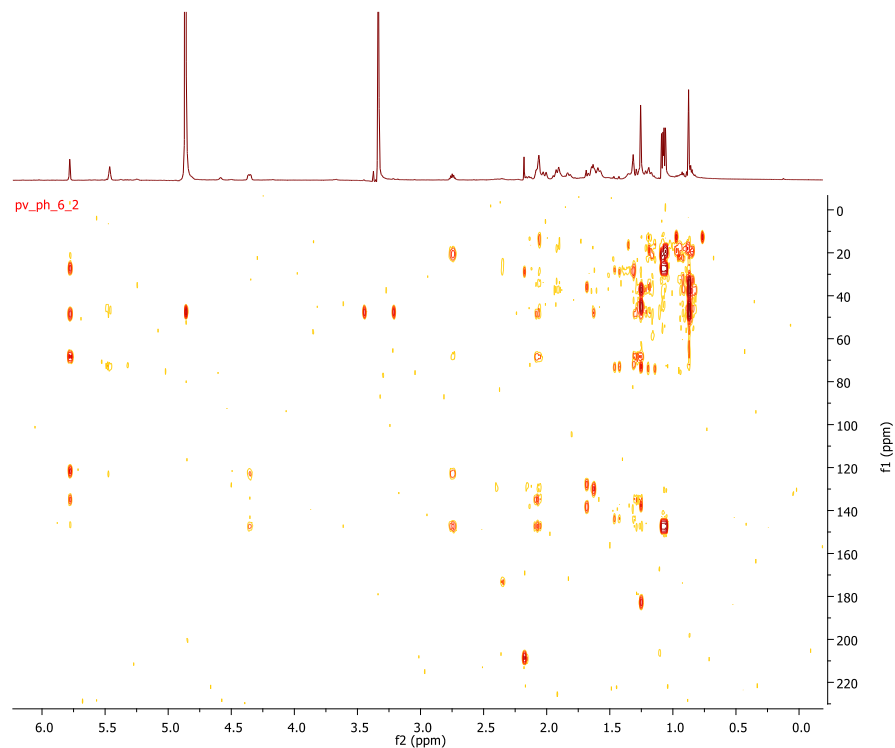
Εικόνα 59: Φάσμα ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 6.



Εικόνα 60: Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 6.

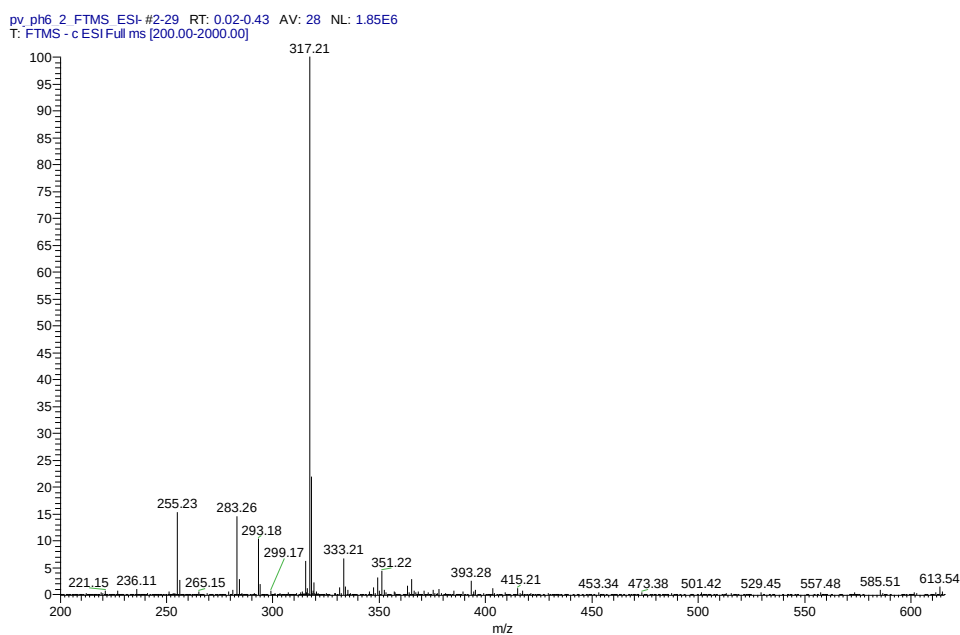


Εικόνα 61: Φάσμα HSQC για τον Μεταβολίτη 6.



Εικόνα 62: Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 6.

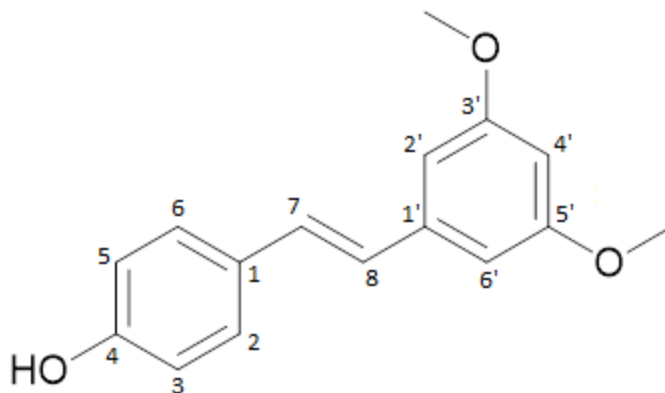
Η ανάλυση των 1D και 2D φασμάτων και η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων με των προτεινόμενων από τη βιβλιογραφία μας έδωσαν τη δυνατότητα να προσδιορίσουμε το μοριακό τύπο του μεταβολίτη 6 ως $C_{20}H_{30}O_3$ με MB= 318.46. Ο μοριακός τύπος επιβεβαιώθηκε και από το φάσμα μάζας ESI(-) HR-MS, όπου εμφανίστηκε το ψευδομοριακό ιόν στα m/z 317.21.



Εικόνα 63: Φάσμα μάζας ESI(-) HR-MS για τον Μεταβολίτη 6.

Γ.5.2.3.7. Μεταβολίτης 7 : Πτεροστιλβένιο

Ο μεταβολίτης που απομονώθηκε από το κλάσμα 62 (ph6_3) ήταν το **πτεροστιλβένιο** (3',5'-διμεθοξυ-4-υδροξυστιλβένιο). Το μόριο έχει απομονωθεί από το *Pterocarpus spp.* (*Leguminosae*) από το οποίο έλαβε και το όνομά του, αλλά και από το *Pinus radiata* (*Pinaceae*), το *Picea spp.* (*Pinaceae*), το *Laburnum alpinum* (*Leguminosae*) κ.α. (Rowe, 2012).

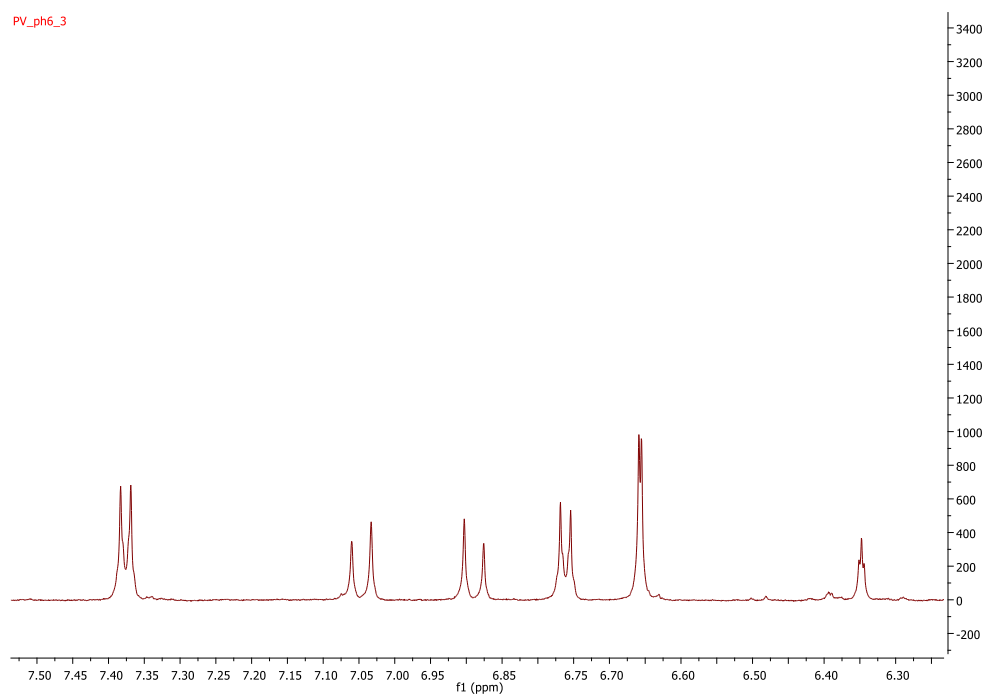


Εικόνα 64: Πτεροστιλβένιο

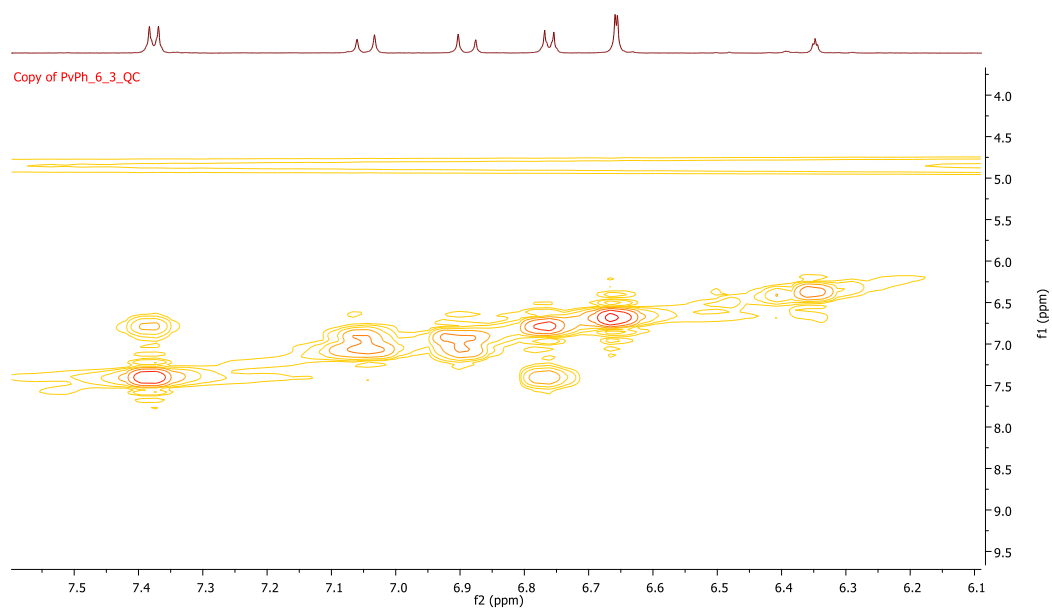
Πίνακας 47. Χημικές μετατοπίσεις ^1H & ^{13}C NMR του μεταβολίτη 7 (ph6_3)

Θέση	^1H NMR (600MHz, MeOD, δ ppm, J σε Hz)	^{13}C (600MHz, MeOD, δ ppm)
1	-	128,64
2	7.39 (d, J=8.4Hz, 1H)	114.9
3	6.78 (d, J=8.4Hz, 1H)	127.25
4	-	157,06
6	7.39 (d, J=8.4Hz, 1H)	127.25
5	6.78 (d, J=8.4Hz, 1H)	114.59
7	7.05 (d, J=16.5Hz, 1H)	128.34
8	6.90 (d, J=16.5Hz, 1H)	125.1
1'	-	139,83
2'	6.66 (d, J=2.1Hz, 1H)	103.51
3'	-	161,08
4'	6.36 (t, J=2.5Hz, 1H)	98.67
5'	-	161,08
6'	6.66 (d, J=2.1Hz, 1H)	103.51

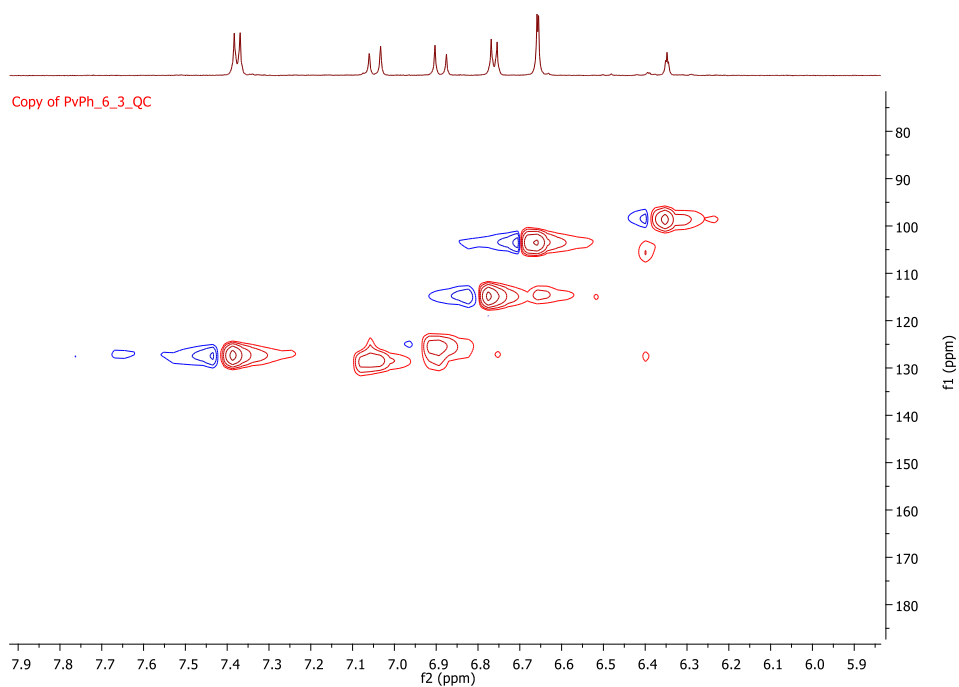
Στην αρωματική περιοχή του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ διακρίνονται σήματα τα οποία αντιστοιχούν στην ύπαρξη δύο αρωματικών πυρήνων, καθώς και δύο σήματα που προσδιορίζουν την παρουσία διπλού δεσμού των πρωτονίων H-7 και H-8 σε *trans* διαμόρφωση, όπως διαπιστώνεται από τη μεγάλη σταθερά σύζευξης ($J = 16.5 \text{ Hz}$). Τα πρωτόνια των θέσεων 2 και 6, αλλά και των θέσεων 3 και 5, παρουσιάζονται ως χημικά ισοδύναμα λόγω της ύπαρξης ενός μόνο υποκαταστάτη (-OH) στη θέση 4. Ο δεύτερος πυρήνας φέρει υποκατάστασεις στις θέσεις 3' και 5', με αποτέλεσμα να παρουσιάζει ένα μόνο ζευγος χημικά ισοδύναμων πρωτονίων με $J=2.1 \text{ ppm}$. Η περεταίρω σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων με τις τιμές που προτείνονται από την βιβλιογραφία (Lee et al., 2012) είχαν σαν αποτέλεσμα την ταυτοποίηση του μεταβολίτη.



Εικόνα 65: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ για τον Μεταβολίτη 7.

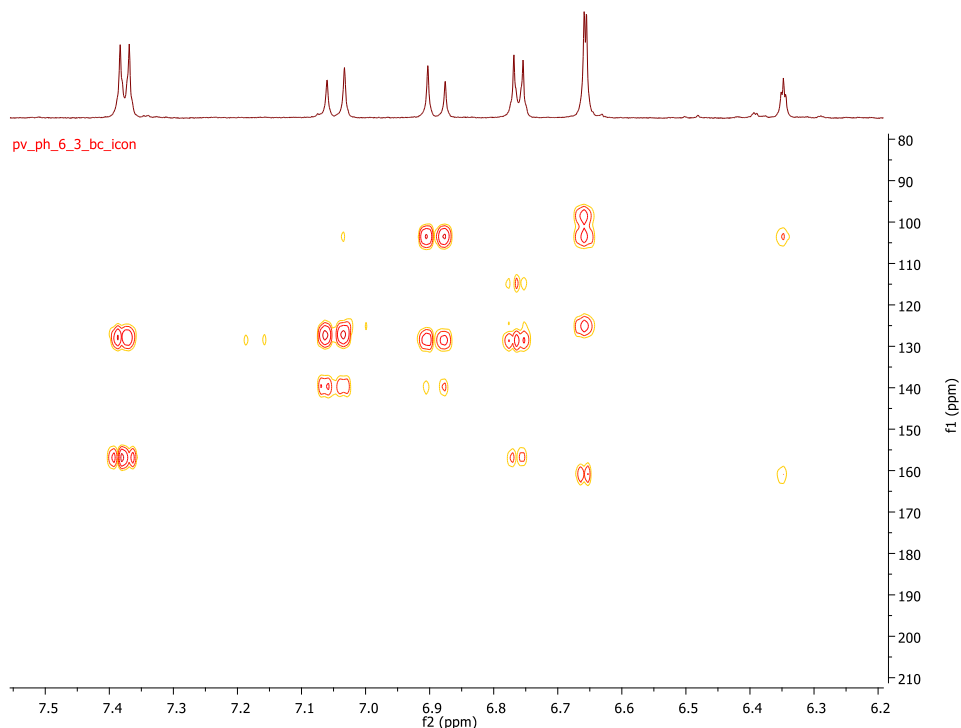


Εικόνα 66: Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 7.



Εικόνα 67: Φάσμα HSQC για τον Μεταβολίτη 7.

Από το φάσμα COSY προσδιορίστηκαν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτονίων, ενώ οι χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων του μορίου αποδόθηκαν βάσει των 2D φασμάτων HSQC-DEPT και HMBC.



Εικόνα 68: Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 7.

Η ανάλυση των 1D και 2D φασμάτων και η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων με των προτεινόμενων από τη βιβλιογραφία, μας έδωσαν τη δυνατότητα να προσδιορίσουμε το μοριακό τύπο του μεταβολίτη 7 ως $C_{16}H_{16}O_3$ με MB= 256.30. Ο μοριακός τύπος επιβεβαιώθηκε και από το φάσμα μάζας ESI(-) HR-MS, όπου εμφανίστηκε το ψευδομοριακό ιόν στα $m/z = 255.10$.

Εικόνα 69: Φάσμα μάζας ESI(-) HR-MS για το Μεταβολίτη 7.

Γ.5.2.3.8. Μεταβολίτης 8: Ισοκουπρεσικό οξύ

Ο μεταβολίτης που απομονώθηκε από το κλάσμα rh_6_4 ταυτοποιήθηκε ως το **ισοκουπρεσικό οξύ**. Πρόκειται για ένα λαβδανικό διτερπενικό οξύ που έχει βρεθεί στα φύλλα, αλλά και στο φλοιό πολλών κωνοφόρων ειδών (Garland & Barr, 1998). Είναι η πρώτη φορά που απομονώνεται από το *Pinus heldreichii*.

Θέση	¹ H NMR (600MHz, CDCl ₃ , δ ppm, J σε Hz)	¹³ C NMR (600MHz, MeOD, δ ppm)
1	0.89-2.39	38.1
2	0.89-2.39	20.1
3	0.89-2.39	38.4
4	-	44.5
5	1.33 (m,1H)	55.9
6	0.89-2.39	26.0
7	0.89-2.39	37.7
8	-	148.6
9	1.63 (m,1H)	55.0
10	-	40.6
11	0.89-2.39	19.5
12	0.89-2.39	38.3
13	-	138.7
14	5.30 (t, <i>J</i> = 6.7 Hz, 1H)	123.2
15	4.07 (d, <i>J</i> = 6.7 Hz, 2H)	57.68
16	1.65 (s, 3H)	14.53
17a	4.84 (s, 1H)	105.01
17b	4.53 (s, 1H)	
18	1.18 (s, 3H)	27.94
19	-	180.37
20	0.63 (s, 3H).	11.76

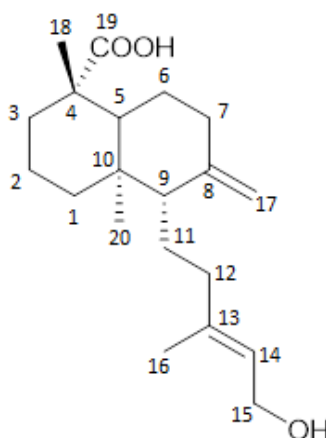
Εικόνα
πρεσικό

κας 48.
πίσεις
¹³C
του Με-

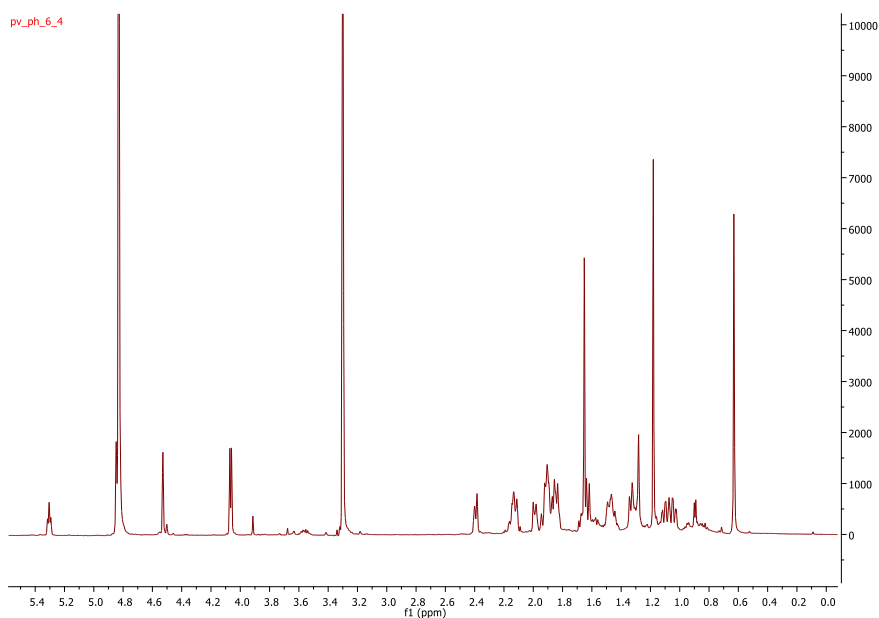
70:
Ισοκου-
οξύ

Πίνα-
Χημικές
μετατο-
¹H &
NMR
ταβο-

λίτη 8 (ph_6_4)

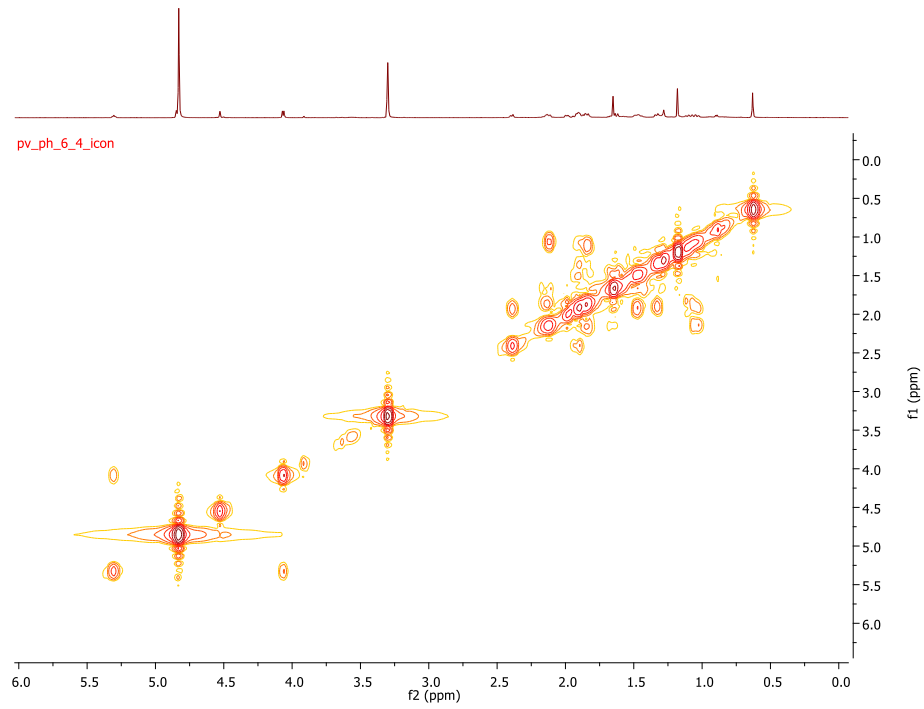


Στον πίνακα διακρίνονται οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων καθώς και των ανθράκων, του μορίου όπως αυτές προέκυψαν από την ανάλυση των φασμάτων ^1H -NMR, COSY, HSQC-DEPT και HMBC.

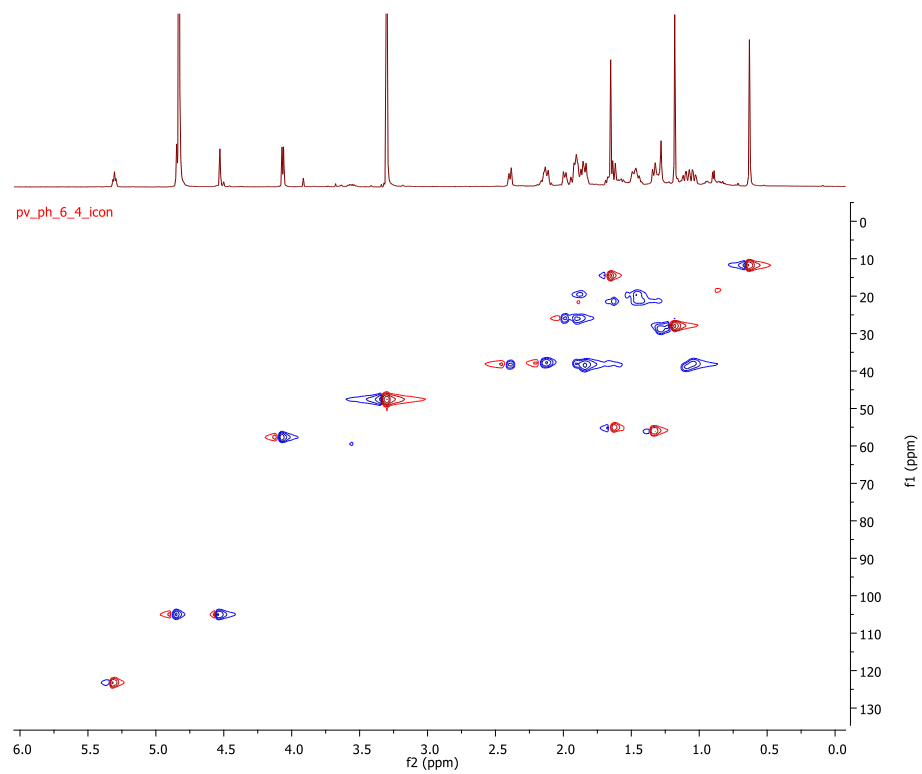


Εικόνα 71: Φάσμα ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 8

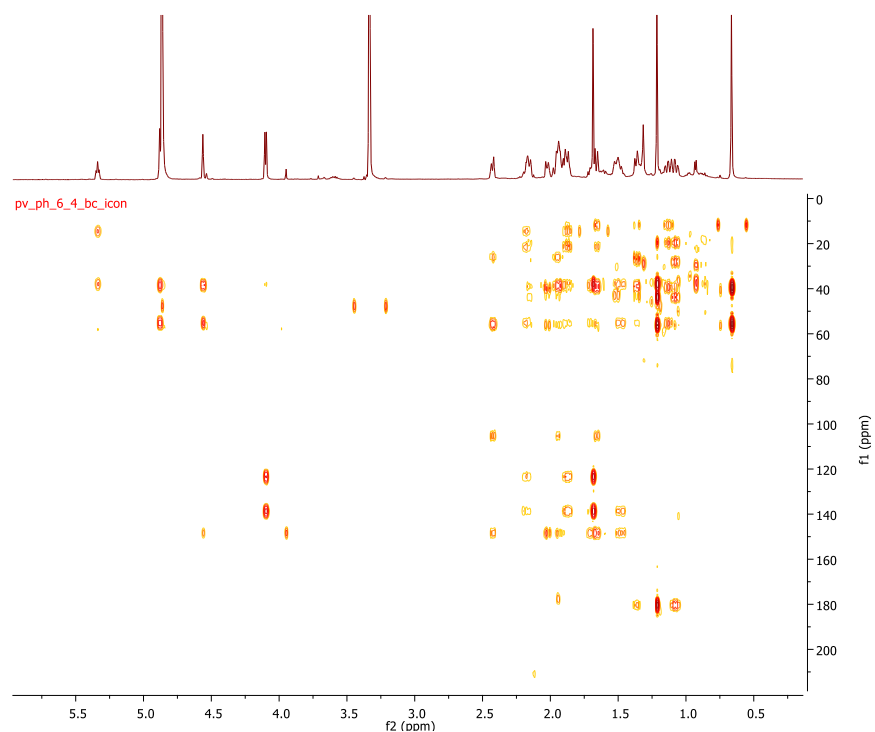
Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη διακρίνεται η παρουσία τριών μεθυλίων που συνδέονται σε τεταρτοταγείς άνθρακες. Συγκεκριμένα, υπάρχουν 3 μονές κορυφές που ολοκληρώνουν για 3 πρωτόνια η καθεμία, στα 0.63ppm, 1.18ppm και 1.65ppm και αντιστοιχούν στις θέσεις 20, 18 και 16. Στην ολεφινική περιοχή του φάσματος παρατηρούνται 2 απλές κορυφές στα 4.84ppm και στα 4.53ppm, οι οποίες αντιστοιχούν στα H-17a και H-17b, καθώς επίσης και οι μετατοπίσεις των H-15 και H-16 στα 4.07ppm (d, $J=6.7\text{Hz}$, 2H) και στα 5.30ppm (t, $J=6.7\text{Hz}$), αντίστοιχα. Από το φάσμα HSQC-DEPT επιβεβαιώνεται η απόδοση των H-17a και H-17b, καθώς παρουσιάζεται σύζευξη με τον ίδιο άνθρακα στα 105.01ppm. Τέλος, οι συσχετίσεις μεταξύ των πρωτονίων που προέκυψαν από το φάσμα COSY καθώς επίσης και οι ετεροπυρηνικές σύζεύξεις τους πειράματος HMBC βοήθησαν σημαντικά στον προσδιορισμό της σχετικής θέσης των πρωτονίων και των ανθράκων της αλειφατικής περιοχής.



Εικόνα72: Φάσμα COSY του Μεταβολίτη 8.

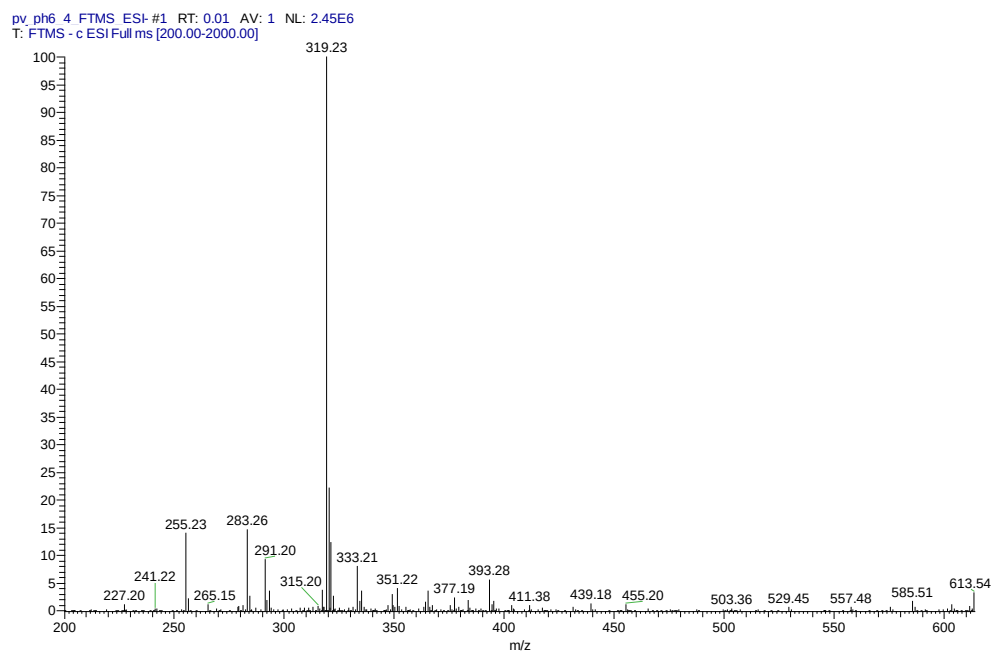


Εικόνα73: Φάσμα HSQC-DEPT του Μεταβολίτη 8.



Εικόνα 74: Φάσμα HMBC του Μεταβολίτη 8.

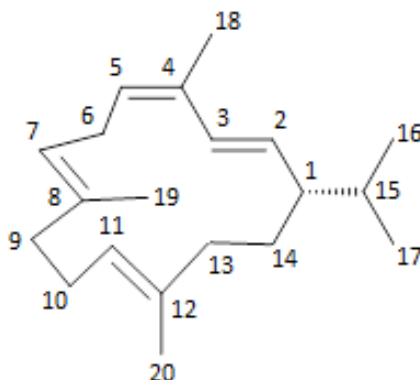
Η ανάλυση των 1D και 2D φασμάτων και η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων με των προτεινόμενων από τη βιβλιογραφία μας έδωσαν τη δυνατότητα να προσδιορίσουμε το μοριακό τύπο του μεταβολίτη 8 ως $C_{20}H_{32}O_{34}$ με MB= 320.47. Ο μοριακός τύπος επιβεβαιώθηκε και από το φάσμα μάζας ESI(-) HR-MS στο οποίο εμφανίστηκε το ψευδομοριακό ιόν στα $m/z = 319.23$.



Εικόνα 75: Φάσμα μάζας ESI (-) HR-MS για το Μεταβολίτη 8.

Γ.5.2.3.9. Μεταβολίτης 9: Κεμπρένιο

Ο μεταβολίτης που απομονώθηκε από το κλάσμα rh_5_146 ήταν το **κεμπρένιο**. Το μόριο έχει απομονωθεί από πολλές πηγές, κυρίως όμως από το γένος *Pinus* (Nakanishi et al., 1974) και αποτελεί ένα από τα βασικά συστατικά του αιθέριου ελαίου του φλοιού του *P. heldreichii* (Graïkou et al., 2012).



Εικόνα 76: Κεμπρένιο ($C_{20}H_{32}$, MB=272.48)

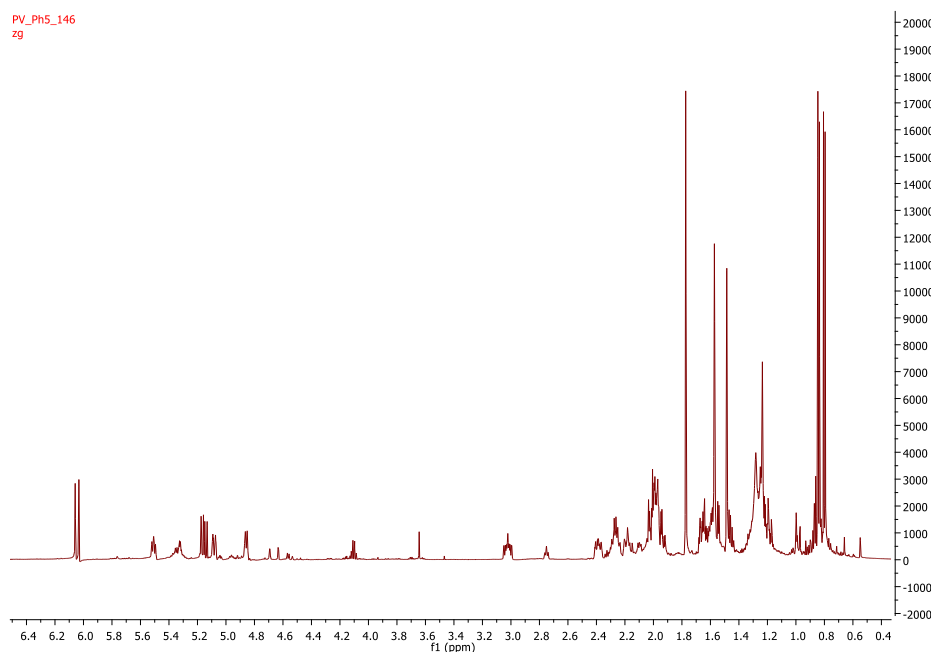
Πίνακας 49: Χημικές μετατοπίσεις 1H & ^{13}C NMR του Μεταβολίτη 9 (rh_5_146)

Θέση	1H NMR (600MHz, MeOD, δ ppm, J σε Hz)	^{13}C NMR (600MHz, MeOD, δ ppm)
1	1.57-1.69 (m, 1H)	47.46
2	5.16 (dd, J=15.4/ 9.8Hz, 1H)	130.06
3	6.05 (d, J=15.4Hz, 1H)	129.46
4	-	134.74
5	5.51(t, J=6.9Hz, 1H)	124.79
6a	2.14-2.42 (m, 1H)	25.07
6b	3.02 (m, 1H)	
7	5.08 (dd, J=11.1/1.4Hz, 1H)	125.52
8	-	130.94
9	1.89-2.05 (m, 1H) 2.14-2.42 (m, 1H)	
10a	1.89-2.05 (m, 1H)	
10b	2.14-2.42 (m, 1H)	124.39
11	4.86 (dd, J=6.3/1.4Hz, 1H)	
12	-	132.12
13	1.57-1.69 (m, 1H) 1.89-2.05 (m, 1H)	35.94
14	1.15-1.25 (m, 2H)	
15	1.42-1.50 (m, 1H)	27.04
16	0.80 (dd, J=6.8Hz, 3H)	32.02
17	0.84 (dd, J=6.8Hz, 3H)	19.08
18	1.77 (s, 3H)	19.97
		18.27

19	1.57 (s, 3H)	13.46
20	1.49 (s, 3H)	13.38

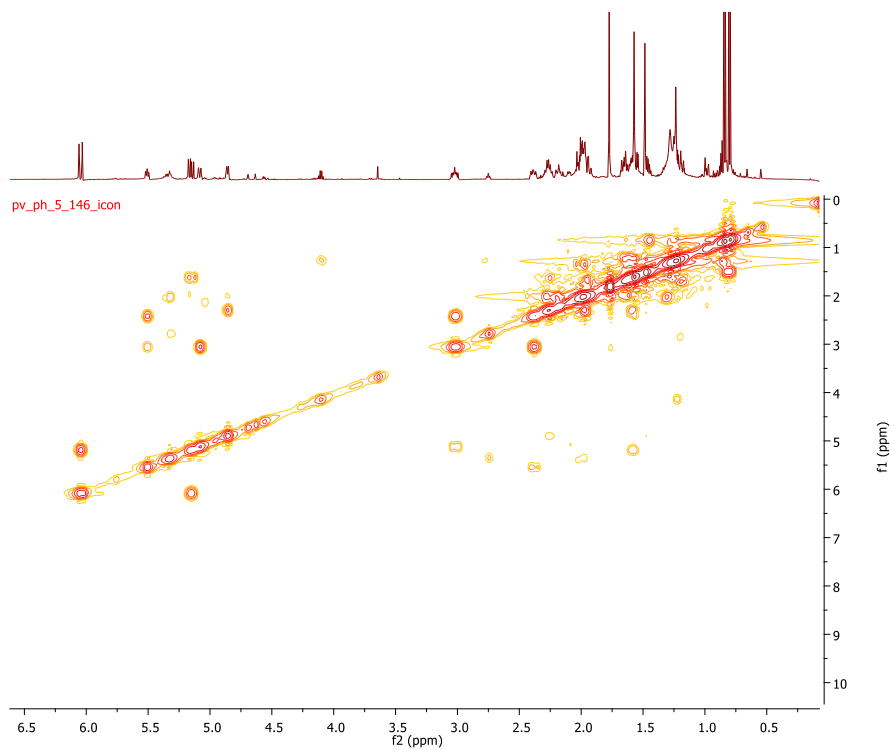
Η μελέτη των φασμάτων NMR 1D και 2D του μεταβολίτη και η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων με τις τιμές που προτείνονται από την βιβλιογραφία (Farkas & Pfander, 1990) είχαν σαν αποτέλεσμα την ταυτοποίηση του μορίου.

Συγκεκριμένα, το φάσμα πρωτονίου υποδεικνύει την παρουσία 5 μεθυλίων, από τα οποία τα 3 είναι συνδεδεμένα σε τεταρτοταγή άνθρακα, δίνοντας μονές κορυφές στα 1.49ppm, 1.57ppm και 1.77ppm και αντιστοιχούν στις θέσεις 20, 19 και 18. Τα άλλα 2 μεθύλια με χημική μετατόπιση 0.80ppm και 0.84ppm, δίνουν διπλή κορυφή με σύζευξη $J=6.8\text{Hz}$ και αντιστοιχούν στις θέσεις 16 και 17, ενώ συνδέονται με τον C-15. Παράλληλα η παρουσία 5 πρωτονίων στην ολεφινική περιοχή υποδηλώνει την παρουσία διπλών δεσμών στο μόριο. Πιο συγκεκριμένα, η διπλή διπλών κορυφή που συντονίζει στα 5.16ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-2, η διπλή κορυφή στα 6.05ppm στο πρωτόνιο H-3, η τριπλή στα 5.51ppm στο πρωτόνιο στη θέση 5, ενώ η διπλές διπλών κορυφές στα 5.08ppm και στα 4.86ppm, στα πρωτόνια H-7 και H-11 αντίστοιχα.

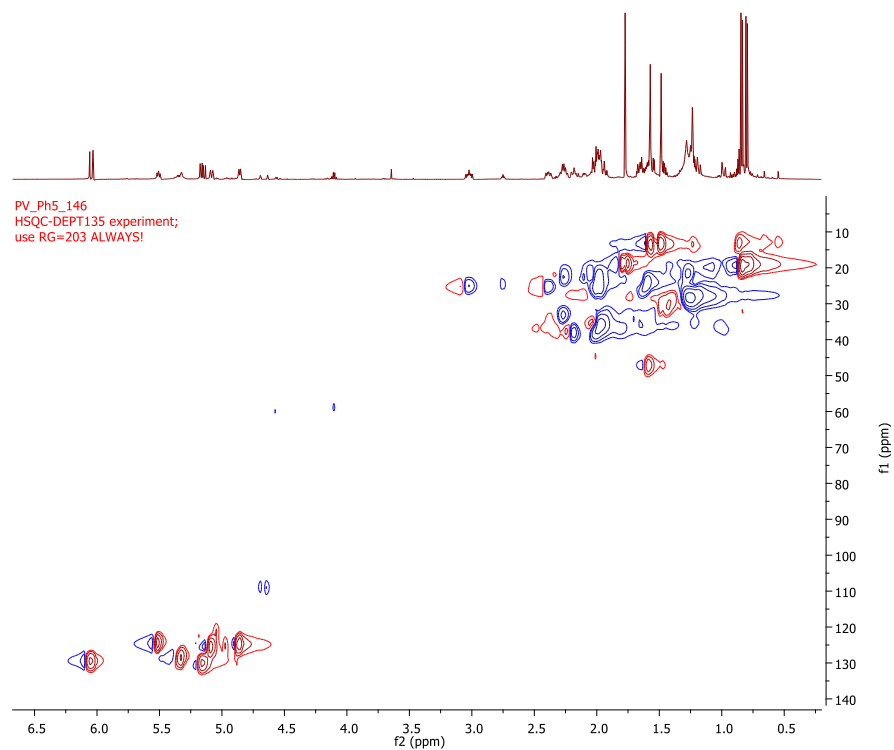


Εικόνα 77: Φάσμα ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 9

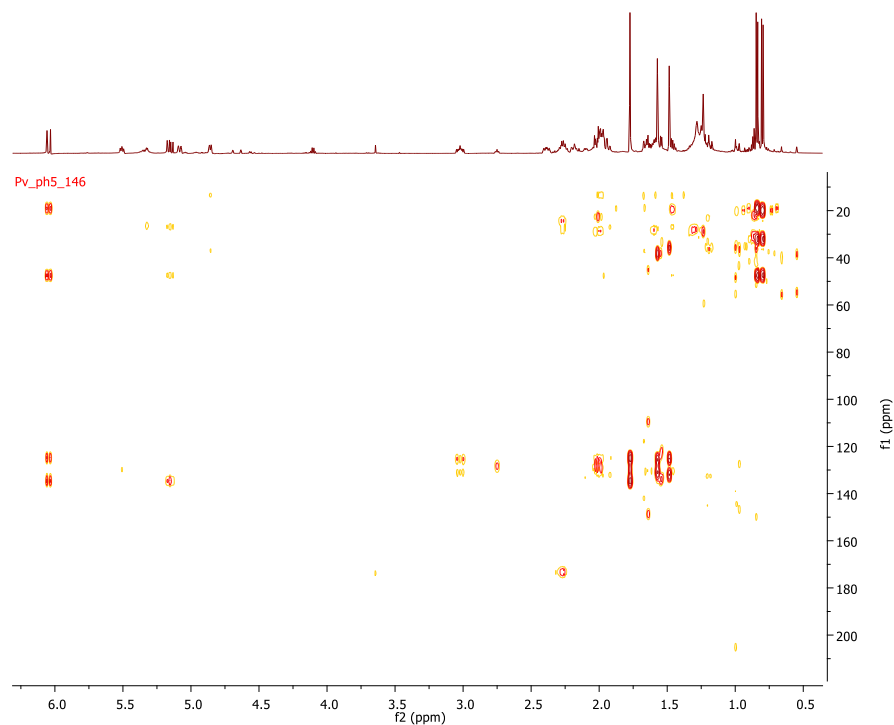
Οι συσχετίσεις μεταξύ των πρωτονίων που προέκυψαν από το φάσμα COSY βοήθησαν σημαντικά στον προσδιορισμό της σχετικής θέσης των πρωτονίων στο μόριο, ενώ από το φάσμα HSQC-DEPT αποδόθηκαν οι μετατοπίσεις των C του μορίου. Το φάσμα HMBC έδωσε περαιτέρω πληροφορίες για τις μετατοπίσεις των τεταρτοταγών ανθράκων αλλά και για τη δομή του μορίου.



Εικόνα 78: Φάσμα COSY του Μεταβολίτη 9.



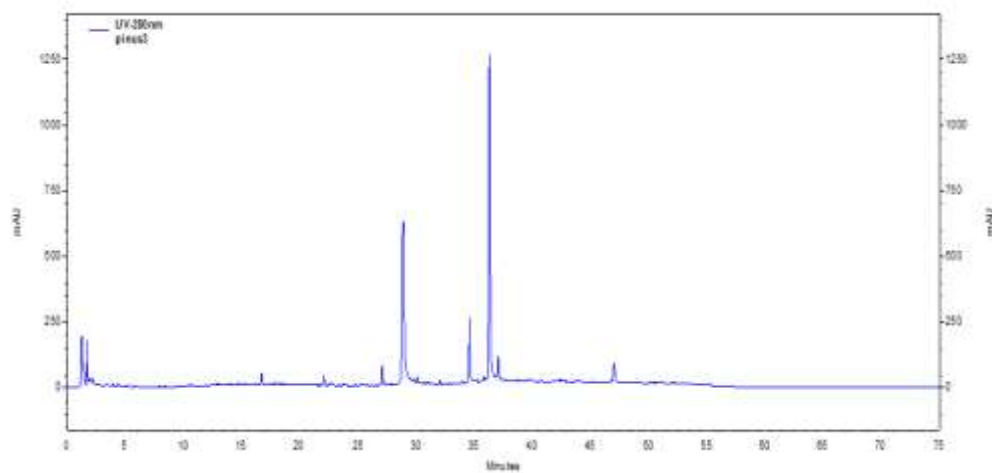
Εικόνα 79: Φάσμα HSQC-DEPT του Μεταβολίτη 9.



Εικόνα 80: Φάσμα HMBC του Μεταβολίτη 9.

Γ.5.3. Φυτοχημική ανάλυση του *Pinus nigra*

Στο υδατικό εκχύλισμα του *Pinus nigra* πραγματοποιήθηκε επίσης υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και το φυτοχημικό προφίλ που ελήφθη (Εικόνα 81), πάλι δεν παρουσίαζε αρκετές κορυφές.



Εικόνα 81: Φυτοχημικό προφίλ του Agro 03 με χρήση HPLC.

Στο κλάσμα Β που παρελήφθη από τη Sephadex πραγματοποιήθηκε κλασμάτωση με CPC. Στα κλάσματα Β1, Β3, Β4 και Β5 που παρελήφθησαν μετά το πέρας των συνενώσεων πραγματοποιήθηκε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας και απομονώθηκαν οι μεταβολίτες 11, 12, 13 και 14. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε TLC preparative και στο κλάσμα C8 της Sephadex από το οποίο απομονώθηκε ο μεταβολίτης 10.

Ακολούθησε η ταυτοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών με τη λήψη φασμάτων LC-HRMS/MS και NMR.

Γ.5.3.1. Ταυτοποίηση Δευτερογενών Μεταβολιτών του *P. nigra*

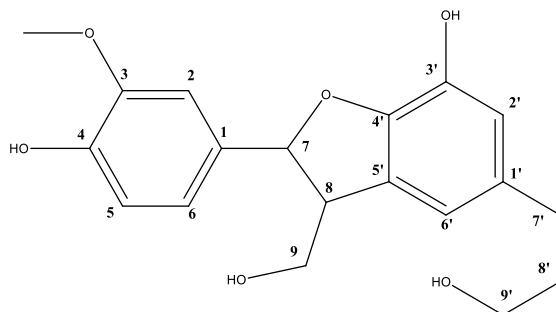
Οι μεταβολίτες που απομονώθηκαν από *P. nigra* παρατίθενται στον Πίνακα 49. Σημειώνονται οι ονομασίες των δομών, το εκχύλισμα από το οποίο προήλθαν, το κλάσμα από το οποίο απομονώθηκαν, καθώς και ο κωδικός του μορίου.

Πίνακας 50: Δευτερογενείς μεταβολίτες που απομονώθηκαν από το *Pinus nigra*.

No.	Μεταβολίτης	Εκχύλισμα	Κλάσμα	Κωδικός
10.	7,8-Διυδρο-3-υδροξυ-8-υδροξυμεθυλο-7-(3-μεθοξυ-4-υδροξυφαινυλο)-1' βενζοφουρανοπροπανόλη	Agro 03	C8	pn17
11.	4-μεθοξυφαινυλο-(6-δεοξυ-α-L-μανοπυρανοσυλο)-β-D-γλυκοπυρανοσιδής	Agro 03	B1	pn18
12.	Διυδροκωνιφερίνη ή 3-(3-μεθοξυ-4-O-β-D-γλυκοπυρανοσυλφαινυλο)-προπαν-1-όλη	Agro 03	B3	pn19
13.	3,4-διμεθοξυφαινυλο-2-O-(3-O-μεθυλο-α-L-ραμνοπυρανοσυλο)-β-D-γλυκοπυρανοσιδής	Agro 03	B4	pn20
14.	3,4-διμεθοξυφαινυλο 2-O-(α-L-ραμνοπυρανοσυλο)-β-D-γλυκοπυρανοσιδής	Agro 03	B5	pn2

Γ.5.3.1.1. Μεταβολίτης 10: 7,8-Διυδρο-3-υδροξυ-8-υδροξυμεθυλο-7-(3-μεθοξυ-4-υδροξυφαινυλο)-1' βενζοφουρανοπροπανόλη

Ο μεταβολίτης που απομονώθηκε από το κλάσμα C8 ήταν το **7,8-διυδρο-3-υδροξυ-8-υδροξυμεθυλο-7-(3-μεθοξυ-4-υδροξυφαινυλο)-1' βενζοφουρανοπροπανόλη**. Το μόριο έχει απομονωθεί ξανά από το ξύλο του *Santalum album L.* (οικ. *Santalaceae*), ενώ γλυκοσίδες του μεταβολίτη έχουν βρεθεί στο *Juniperus communis* (οικ. *Cupressaceae*), *Pinus silvestris* (οικ. *Pinaceae*) καθώς και στο *Cedrus deodara* (οικ. *Pinaceae*) (Kim et al., 2005).

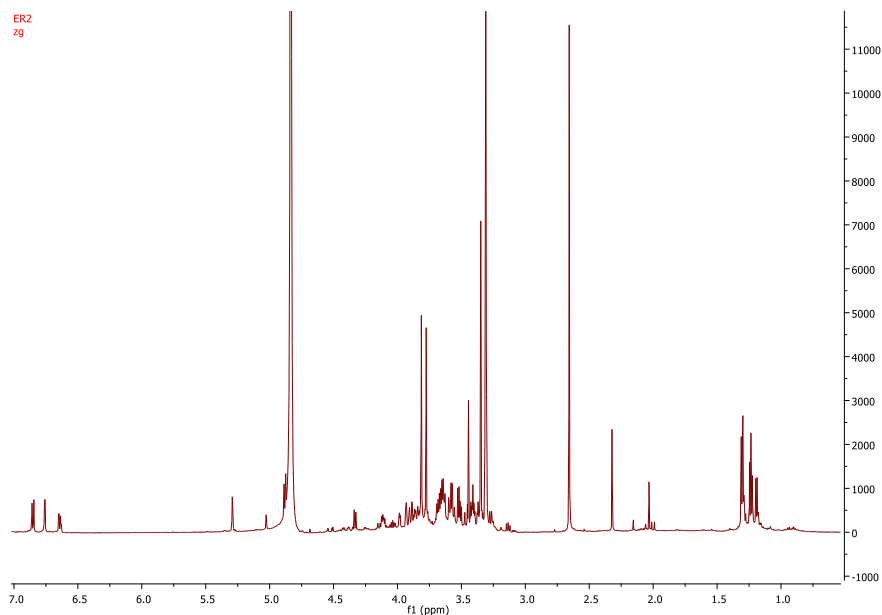


Εικόνα 82: 7,8-διυδρο -3'-υδροξυ-8-υδροξυ-μεθυλ-7-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφενυλ)-1'βενζοφουρανοπροπανόλη

Πίνακας 51: Χημικές μετατοπίσεις ^1H & ^{13}C NMR του μεταβολίτη 10 (pn_17)

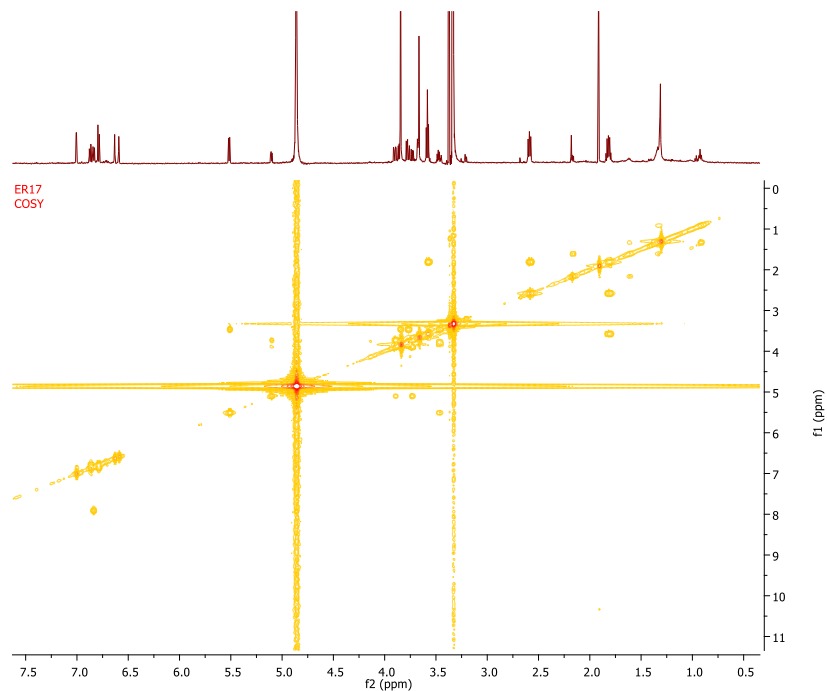
Θέση	^1H NMR (600MHz, MeOD, δ ppm, J σε Hz)	^{13}C NMR (600MHz, MeOD, δ ppm)
1		134.30
2	7.01 (1H, d, 1.9Hz)	109.20
3	-	147.51
4	-	146.72
5	6.79 (1H, d, 8.1Hz)	114.76
6	6.87(1H, dd, 1.8/8.1Hz)	118.16
7	5.52(1H, d, 6.1Hz)	87.14
8	3.48 (1H, dd, 6.1/12.5Hz)	54.21
9	3.87 (1H, m)	63.72
Hydroxymethyl	3.77 (1H, dd, 7.3/10.9Hz)	
1'	-	135.33
2'	6.59 (1H, d, 1.2Hz)	115.31
3'	-	140.39
4'	-	145.01
5'	-	135
6'	6.63 (1H, d, 1.3Hz)	114.99
7'	2.59 (2H, t, 7.6Hz)	31.14
8'	1.82 (2H, m)	34.41
9'	3.58 (2H, t, 6.5Hz)	60.80
Hydroxypropyl		
-OCH3	3.85 (3H, s)	54.90

Η ανάλυση της αρωματικής περιοχής του φάσματος ^1H NMR του μεταβολίτη 10, ανέδειξε την παρουσία 2 αρωματικών δακτυλίων. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχει μια διπλή κορυφή στα 6.79ppm με $J=8.1\text{Hz}$ η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-5, μια διπλή-διπλών κορυφή στα 6.87ppm με $J=8.1/1.8\text{Hz}$ η οποία αποδίδεται στο πρωτόνιο H-6 καθώς και μια διπλή κορυφή που συντονίζεται στα 7.01ppm με $J=2.0\text{Hz}$ και που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-2, υποδεικνύοντας έναν τρις υποκατεστημένο αρωματικό δακτύλιο. Επίσης, διακρίνεται μια μονή κορυφή στα 6.63ppm και μια διπλή στα 6.59ppm που αντιστοιχούν στα H-2' και H-6' του δεύτερου αρωματικού δακτυλίου. Η μονή κορυφή στα 3.85ppm που ολοκληρώνει για 3 πρωτόνια αντιστοιχεί στη μεθοξυλομάδα της θέσης 3, ενώ η διπλή κορυφή στα 5.52ppm και η διπλή διπλών στα 3.47ppm ανήκουν στα H-7 και H-8 που βρίσκονται σε threo σχέση. Η σχέση αυτή μεταξύ των πρωτονίων στις θέσεις 7 και 8 υποδεικνύεται από τη σταθερά σύζευξης $J=6.1\text{Hz}$ που είναι παρόμοια με αυτή που αναφέρεται στη βιβλιογραφία (Kim et al., 2005)



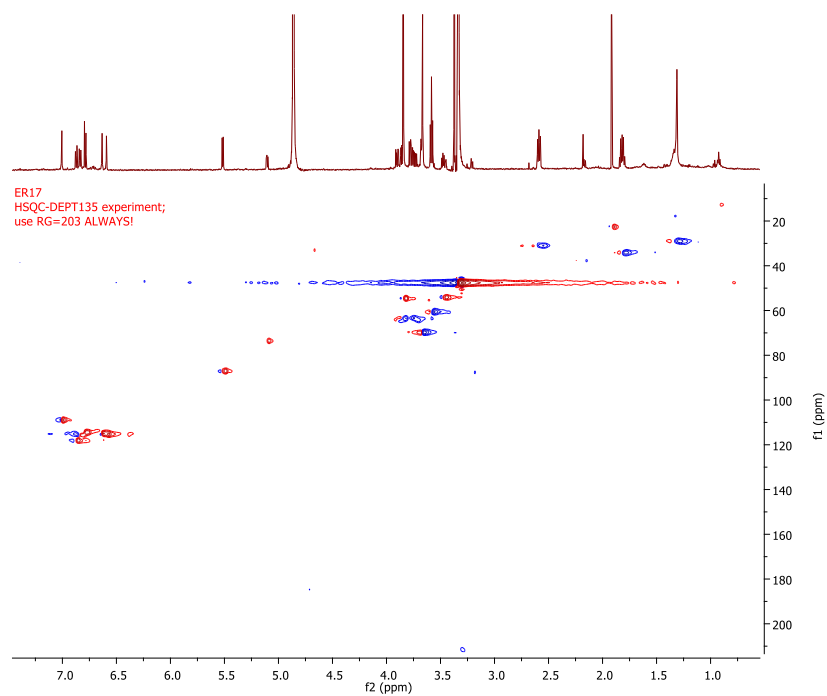
Εικόνα 83: Φάσμα ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 10.

Από το φάσμα COSY επιβεβαιώνεται η συσχέτιση μεταξύ των H-7 και H-8, ενώ παράλληλα διακρίνονται οι συζεύξεις μεταξύ του H-8 με τα 2 πρωτόνια της θέσης 9 στα 3.77ppm και 3.85ppm. Τέλος, παρατηρείται σύζευξη των πρωτονίων της θέσης 8' στα 1.82ppm με τα H-7' και H-9' στα 2.59ppm και 3.58ppm, αντίστοιχα.

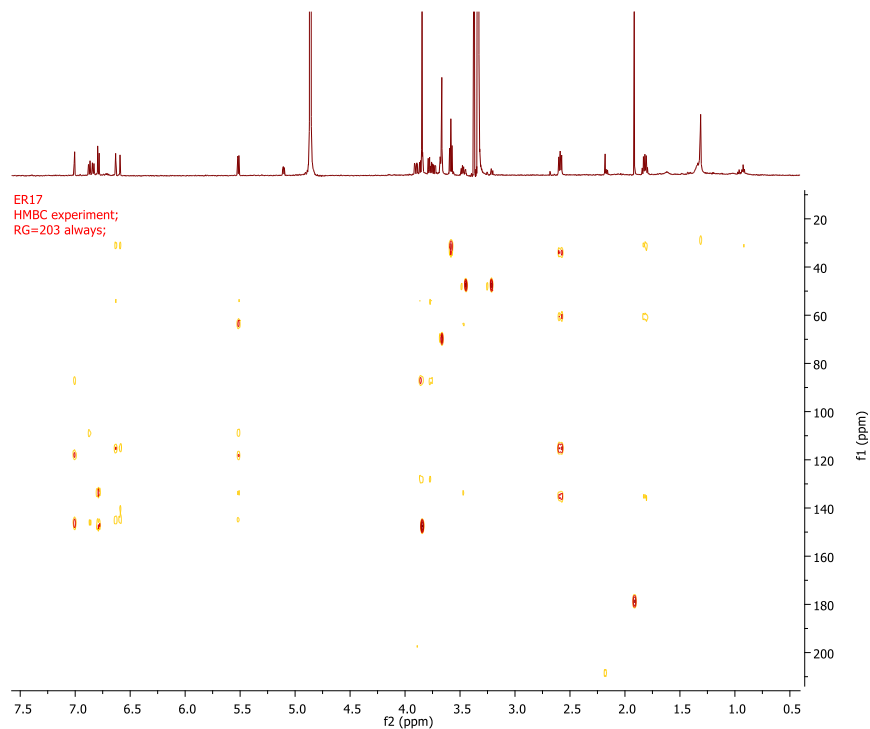


Εικόνα 84: Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 10.

Μέσω του φάσματος ετεροπυρηνικής συσχέτισης HSQC-DEPT αποδόθηκαν οι χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων του μορίου, ενώ η ταυτοποίηση των τεταρτοταγών ανθράκων C-1, C-1', C-4' C-5', καθώς και των 2 υδροξυλιωμένων (C-4 και C-3') και του C-3 που συνδέεται με τη μεθοξυλομάδα πραγματοποιήθηκε μέσω του φάσματος HMBC.

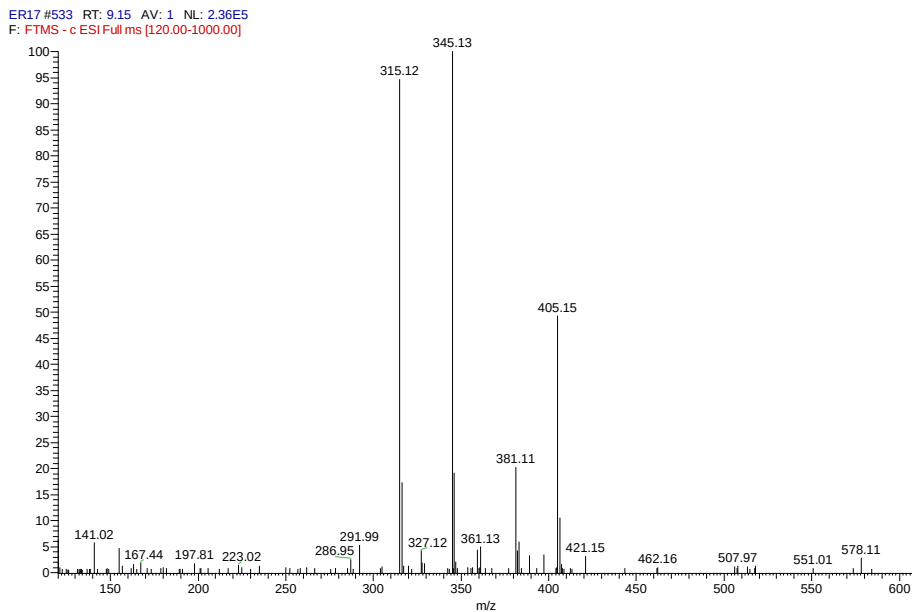


Εικόνα 85: Φάσμα HSQC για τον Μεταβολίτη 10.



Εικόνα 86: Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 10.

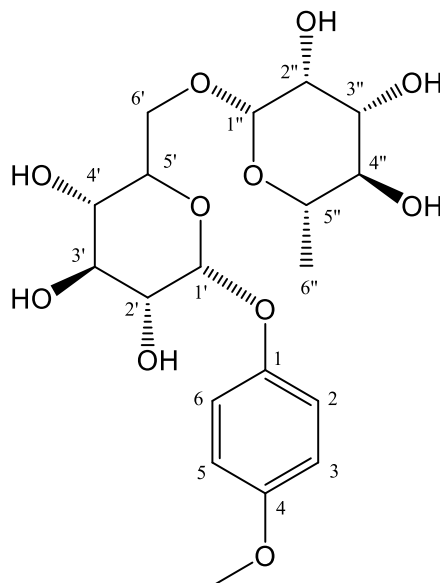
Η ανάλυση των 1D και 2D φασμάτων και η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων με των προτεινόμενων από τη βιβλιογραφία μας έδωσαν τη δυνατότητα να προσδιορίσουμε το μοριακό τύπο του μεταβολίτη 10 ως $C_{19}H_{22}O_6$ με MB= 346.37. Ο μοριακός τύπος επιβεβαιώθηκε και από το φάσμα μάζας ESI(-) HR-MS στο οποίο εμφανίστηκε το ψευδομοριακό ιόν στα $m/z = 345.13$.



Εικόνα 87: Φάσμα μάζας ESI(-) HR-MS για τον Μεταβολίτη 10.

Γ.5.3.1.2.: Μεταβολίτης 11: 4-μεθοξυφαινυλο-(6-δεοξυ-α-L-μανοπυρανοσυλο)-β-D-γλυκο- πυρανοσιδης

Ο μεταβολίτης που απομονώθηκε από το κλάσμα Β-1 ήταν ο **4-μεθοξυφαινυλο-(6-δεοξυ-α-L-μανοπυρανοσυλο)-β-D-γλυκοπυρανοσιδης**. Το μόριο έχει απομονωθεί ξανά από το φλοιό του *Illicium difengpi* (οικ. *Illiciaceae*). Η μελέτη των φασμάτων NMR 1D και 2D του μεταβολίτη και η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων με τις τιμές που προτείνονται από την βιβλιογραφία (Li et al., 2015) είχαν σαν αποτέλεσμα την ταυτοποίηση του μορίου.



Εικόνα 88: 4-μεθοξυφαινυλο-(6-δεοξυ-α-L-μανοπυρανοσυλο)-β-D-γλυκοπυρανοσιδης.

Πίνακας 52: Χημικές μετατοπίσεις ^1H & ^{13}C NMR του μεταβολίτη 11 (pn_18)

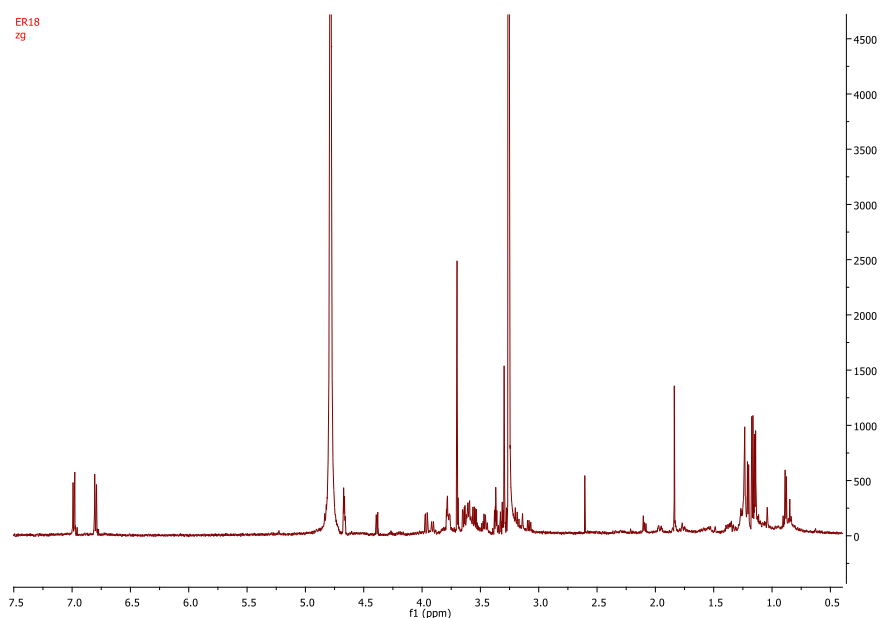
Θέση	^1H NMR (600MHz, MeOD, δ ppm, J σε Hz)	^{13}C NMR (600MHz, MeOD, δ ppm)
1	-	152.97
2, 6	6.80 (2H, d, J = 9.4 Hz)	115.32
4	-	156.7
3, 5	6.98 (2H, d, J = 9.4 Hz)	119.2
H-1'	4.67 (1H, d, J = 7.5 Hz,)	102.46
H-1''	4.67 (1H, d, J = 1.4 Hz)	102.46
H-6'b	3.96 (1H, d, J = 11.04, 1.8 Hz)	67.9
H-3''	3.79 (1H, dd, J = 3.5 and 1.7 Hz)	72.02
4-OCH₃	3.70 (3H, s, 4-OCH ₃)	55.7
H-2''	3.65 (1H, dd, J = 9.5 and 3.5 Hz)	72.4
H-5''	3.60 (1H, m, H-5'')	69.6
H-6'a	3.55 (1H, dd, J = 11.0 and 6.6 Hz,)	67.9
H-2'	3.46 (1H, m)	76.75
H-4'	3.37 (1H, m)	-
H-4''	3.36 (1H, m)	74.82

H-3'	3.33 (1H, m)	74.18
H-5'	3.30 (1H, m)	77.9
H-6''	1.17 (3H, d, J = 6.2 Hz)	18.0

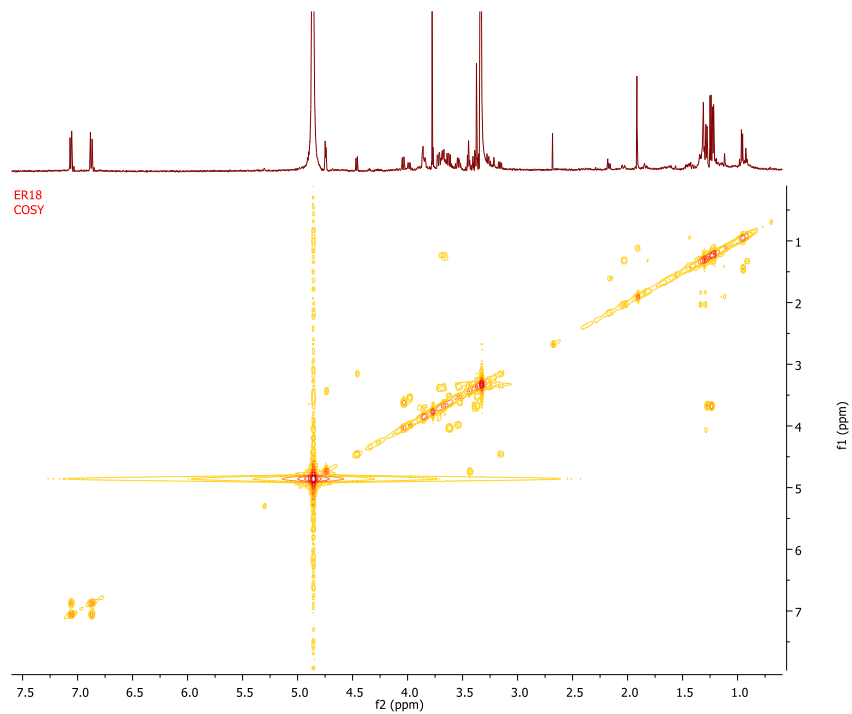
Η ανάλυση της αρωματικής περιοχής του φάσματος ^1H NMR του μεταβολίτη 11, υποδεικνύει ένα αρωματικό δις υποκατεστημένο σύστημα στο οποίο συμμετέχουν τα χημικά ισοδύναμα πρωτόνια H-2 και H-6 που συντονίζονται στα 6.80ppm, καθώς και τα H-3 και H-5 στα 6.98ppm και παρουσιάζονται ως διπλές κορυφές με $J=9.4\text{Hz}$. Η μονή κορυφή στα 3.74ppm που ολοκληρώνει για 3 υδρογόνα αντιστοιχεί στο μεθοξύλιο της θέσης 4. Η παρουσία του πρωτονίου που εμφανίζεται ως διπλή κορυφή με $J=7.5\text{Hz}$ στα 4.67ppm (ανωμερικό H-1'), αλλά και των πολλαπλών κορυφών στα 3-4ppm, υποδηλώνουν την παρουσία ενός μορίου γλυκόζης. Επίσης, η επιπλέον παρουσία μιας διπλής κορυφής με $J=1.2\text{Hz}$ στην ίδια περιοχή του φάσματος ^1H NMR (ανωμερικό - H-1''), σε συνδυασμό με την διπλή κορυφή στα 1.17ppm που ολοκληρώνει για 3 υδρογόνα (H-6''), υποδεικνύουν την παρουσία ενός επιπλέον σακχάρου το οποίο φέρει ένα μεθύλιο στην δομή του.

Η ανάλυση των 1D και 2D φασμάτων και η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων με των προτεινόμενων από τη βιβλιογραφία μας έδωσαν τη δυνατότητα να προσδιορίσουμε τις δομές καθώς και την διάταξη όλων των σακχάρων στο μόριο. Πιο συγκεκριμένα, μέσω των φασμάτων ετεροπυρηνικής συσχέτισης HSQC-DEPT και HMBC προσδιορίστηκαν οι χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων C-1, C-1', C-1'', C-6' καθώς και οι συσχετίσεις αυτών με τα πρωτόνια H-1', H-1'', H-6α' και H-6β', επιβεβαιώνοντας ότι το 6-δεοξυ-μαννοπυρανοζύλιο προσδένεται στο σε ένα μοριο γλυκόζης με δεσμο α ($6' \rightarrow 1''$).

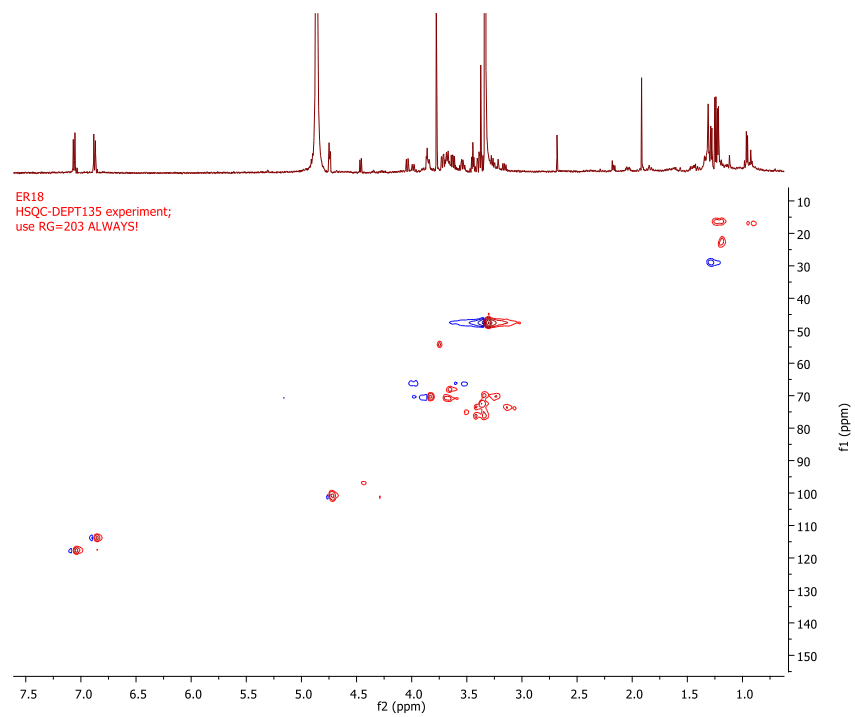
Με παρόμοιο τρόπο και με την βοήθεια και του φάσματος COSY, προσδιορίστηκαν οι χημικές μετατοπίσεις και συζεύξεις των υπολοίπων πρωτονίων και ανθράκων των δυο σακχάρων καθώς και εκείνων της αρωματικής περιοχής του μορίου.



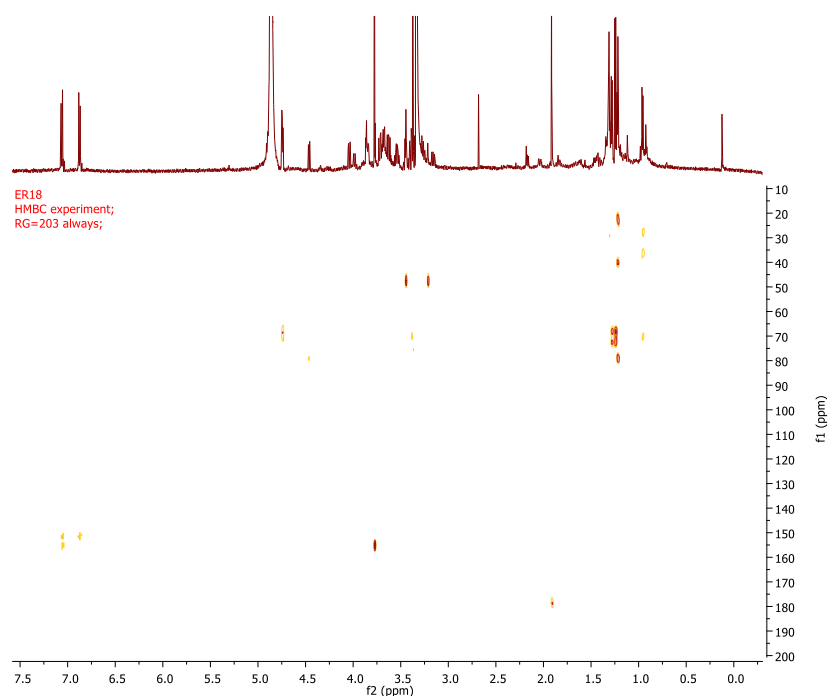
Εικόνα 89: Φάσμα ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 11.



Εικόνα 90 Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 11.

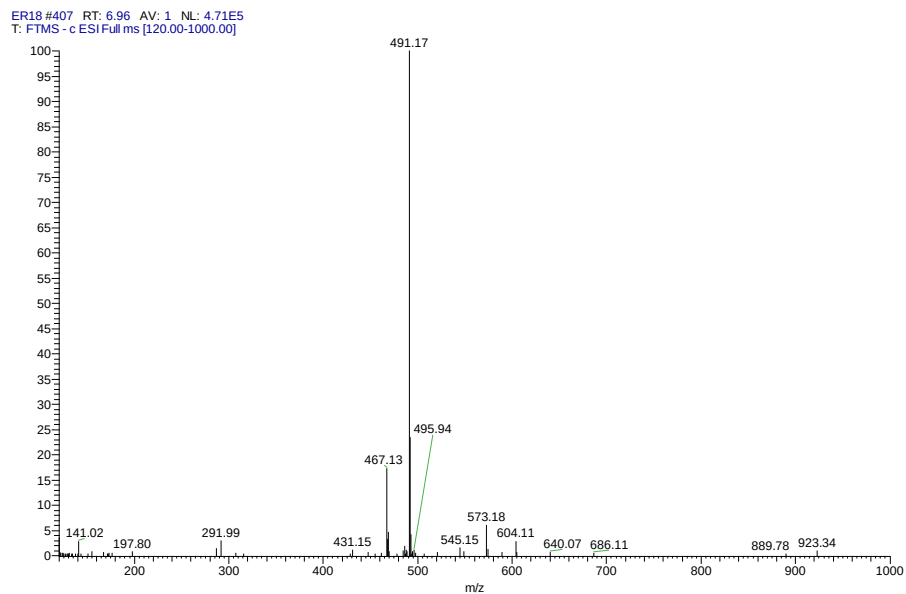


Εικόνα 91: Φάσμα HSQC-DEPT για τον Μεταβολίτη 11.



Εικόνα 92: Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 11.

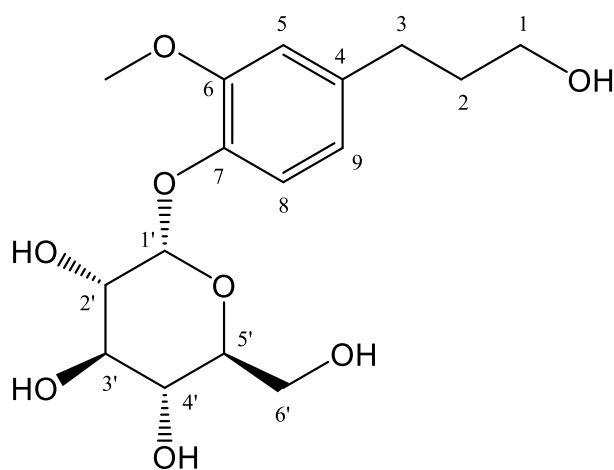
Η ανάλυση των 1D και 2D φασμάτων και η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων με των προτεινόμενων από τη βιβλιογραφία μας έδωσαν τη δυνατότητα να προσδιορίσουμε το μοριακό τύπο του μεταβολίτη 11 ως $C_{19}H_{28}O_{11}$ με $MB=432.42$. Ο μοριακός τύπος επιβεβαιώθηκε και από το φάσμα μάζας ESI(-) HR-MS, όπου εμφανίστηκε το ψευδομοριακό ιόν στα $m/z = 491.17$. Πρόκειται για το μεταβολίτη 11 ($m/z = 431.12$), ο οποίος σχηματίζει ένωση προσθήκης (adduct) με ένα μόριο οξικού οξέως (CH_3COOH , $MB=60.05$).



Εικόνα 93: Φάσμα μάζας ESI(-) HR-MS για τον Μεταβολίτη 11.

Γ.5.3.1.3. Μεταβολίτης 12: Διϋδροκωνειφερίνη

Ο μεταβολίτης 12 απομονώθηκε από το υδατικό εκχύλισμα του φυτού και συγκεκριμένα από το B3 κλάσμα της CPC, κατόπιν διαχωρισμού μέσω TLC Preparative. Η μελέτη του φάσματος πρωτονίου NMR του μορίου και η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων με τις τιμές που προτείνονται από την βιβλιογραφία (Li et al., 2015) είχαν σαν αποτέλεσμα την ταυτοποίηση του μεταβολίτη ως **3-(3-μεθοξυ-4-O-β-D-γλυκοκυρανοσουλφαινυλο)-προπαν-1-όλη** ή κοινώς **διϋδροκωνειφερίνη**. Το μόριο έχει απομονωθεί ξανά από το ξύλο του *Pinus nigra* (Wallis et al., 2011) και από άλλα είδη του γένους (Pan & Lundgren, 1996).

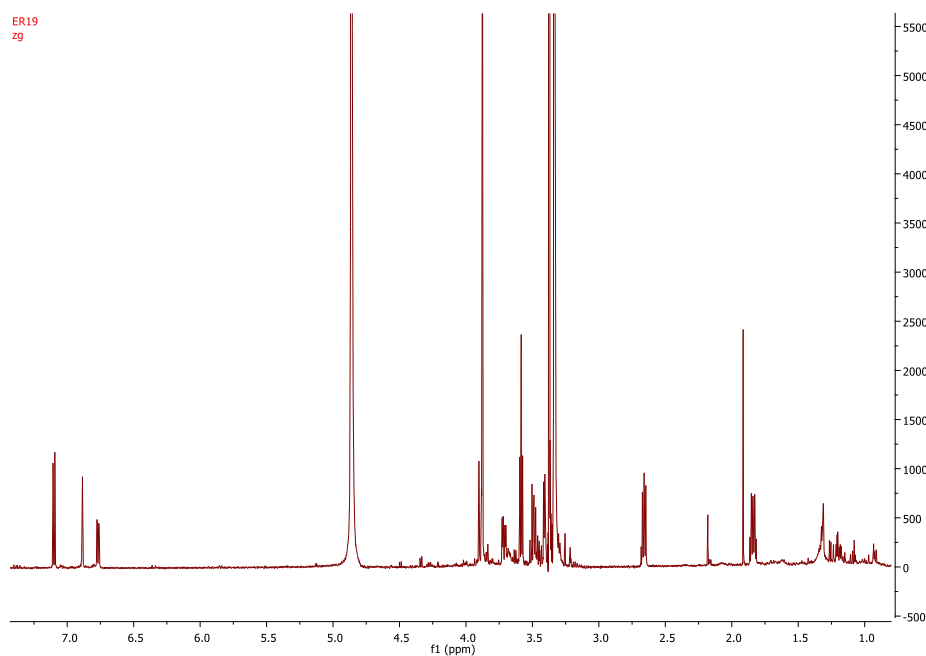


Εικόνα 94: Διϋδροκωνειφερίνη

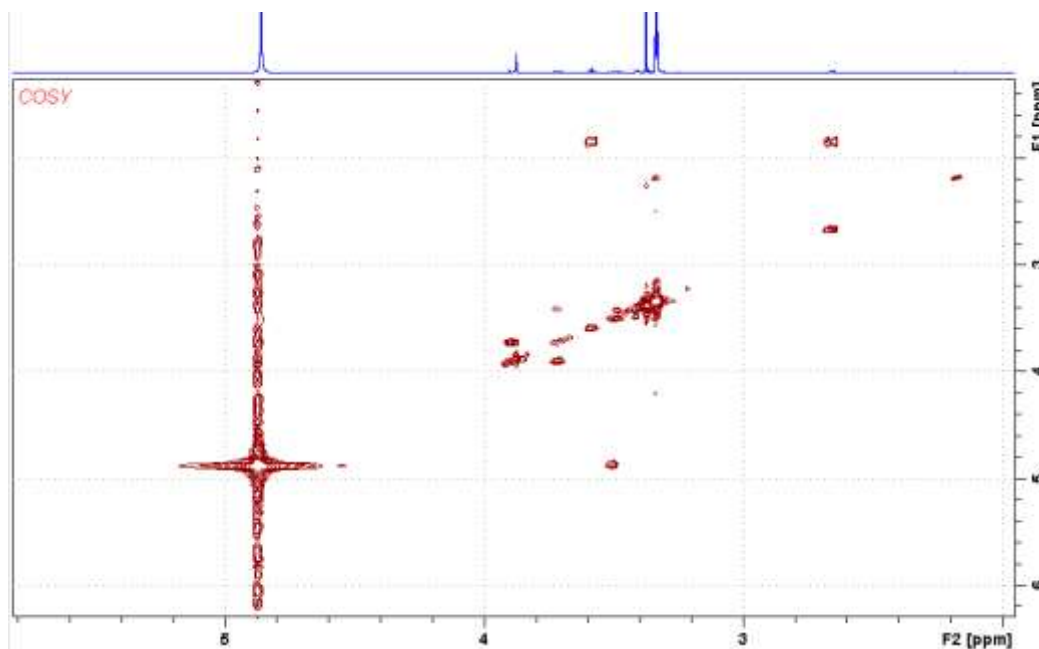
Πίνακας 53: Χημικές μετατοπίσεις ^1H & ^{13}C NMR του μεταβολίτη 12 (pn_19).

Θέση	^1H NMR (600MHz, MeOD, δ ppm, J σε Hz)	^{13}C NMR (600MHz, MeOD, δ ppm)
1	3.58 (2H, t, 6.5 Hz)	62.5
2	1.84 (2H, m)	33.0
3	2.66 (2H, t, 7.5 Hz)	35.9
4	-	138.8
5	6.89 (1H, d, 2.0Hz)	122.2
6	-	151.0
7	-	148.8
8	7.10 (1H, d, 8Hz)	118.6
9	6.77 (1H, dd, 8,2Hz)	114.4
1'	4.87	103.4
2'	3.34-3.52 (4H, m)	75.3
3'		78.1
4'		71.7
5'		78.5
6'	3.89 (1H, dd, 12/ 2 Hz) 3.71 (1H, dd, 12/5 Hz)	62.8
-OCH ₃	3.88 (3H, s)	57.0

Το φάσμα πρωτονίου του μεταβολίτη 12 υποδεικνύει ένα αρωματικό τρισυποκατεστημένο σύστημα στο οποίο συμμετέχουν τα πρωτόνια που συντονίζονται στα 6.89ppm, 7.10ppm και 6.77ppm ως διπλή (1H, d, 2.0Hz), διπλή (1H, d, 8Hz) και διπλή διπλών (1H, dd, 8,2Hz) κορυφή και αντιστοιχούν στις θέσεις 5, 8 και 9 αντίστοιχα. Η απλή κορυφή στα 3.88 ppm υποδηλώνει την ύπαρξη μεθόξυ ομάδας στο μόριο (-OCH₃ στη θέση 6). Η παρουσία σημάτων στην οξυγονωμένη περιοχή 3.34-3.52ppm (H-2', H-3', H-4' και H-5'), καθώς και οι κοινές μετατοπίσεις των 2 πρωτονίων H-6' στα 3.89ppm και 3.71ppm με τις εκείνες της βιβλιογραφίας, υποδηλώνουν την πιθανή ύπαρξη ενός μορίου γλυκόζης (Ushiyama & Furuya, 1989). Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την κοινή χημική μετατόπιση του ανωμερικού πρωτονίου, όπως αυτό εντοπίστηκε με την βοήθεια του φάσματος COSY (καθώς στο φάσμα H¹NMR καλυπτόταν από το σήμα του H₂O), επιβεβαιώνουν την ύπαρξη μιας β-D-γλυκοκυρανοσυλ-ομάδας στο μόριο. Με τη βοήθεια του φάσματος COSY οι κορυφές στα 3.58ppm, 1.84ppm, 2.66ppm βρέθηκαν να αντιστοιχούν στα πρωτόνια των θέσεων 1, 2 και 3, με τα πρωτόνια της θέσης 1 να είναι πιο αποθωρακισμένα λόγω της ύπαρξης υδροξυλίου.

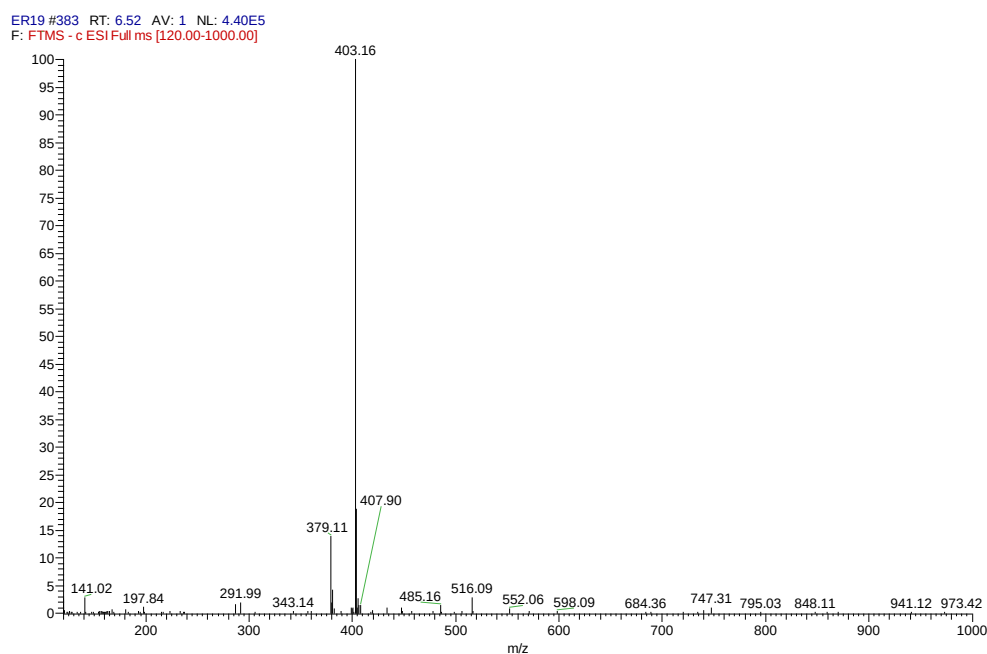


Εικόνα 95: Φάσμα ¹H NMR για τον Μεταβολίτη 12.



Εικόνα 96: Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 12.

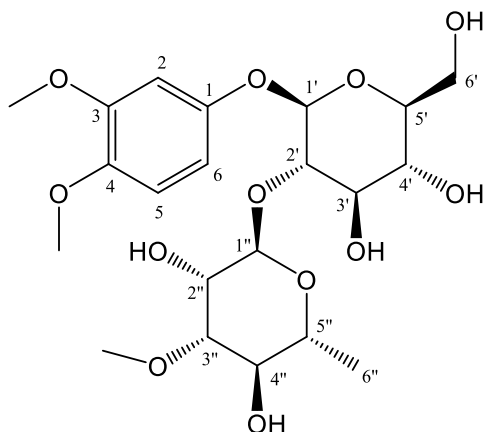
Η ανάλυση των 1D και 2D φασμάτων και η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων με των προτεινόμενων από τη βιβλιογραφία μας έδωσαν τη δυνατότητα να προσδιορίσουμε το μοριακό τύπο του μεταβολίτη 12 ως $C_{16}H_{24}O_8$ με $MB = 344.36$. Ο μοριακός τύπος επιβεβαιώθηκε και από το φάσμα μάζας ESI(-) HR-MS, όπου εμφανίστηκε το ψευδομοριακό ιόν στα $m/z = 403.16$. Πρόκειται για το μεταβολίτη 12 ($m/z = 343.11$) ο οποίος σχηματίζει ένωση προσθήκης (adduct) με ένα μόριο οξικού οξέως (CH_3COOH , $MB = 60.05$).



Εικόνα 97: Φάσμα μάζας ESI(-) HR-MS για τον Μεταβολίτη 12.

Γ.5.3.1.4. Μεταβολίτης 13: 3,4-διμεθοξυφαινυλο-2-O-(3-O-μεθυλο-α-L-ραμνοπυρανοσυλο)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης

Ο μεταβολίτης 13 απομονώθηκε από το υδατικό εκχύλισμα του φυτού και συγκεκριμένα από το B₄ κλάσμα της CPC, κατόπιν διαχωρισμού μέσω παρασκευαστικής TLC Preparative. Η μελέτη του φάσματος πρωτονίου NMR του μορίου και η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων με τις τιμές που προτείνονται από την βιβλιογραφία (Pan & Lundgren, 1995) είχαν σαν αποτέλεσμα την ταυτοποίηση του μεταβολίτη ως 3,4-διμεθοξυφαινυλο-2-O-(3-O-μεθυλο-α-L-ραμνοπυρανοσυλο)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης.



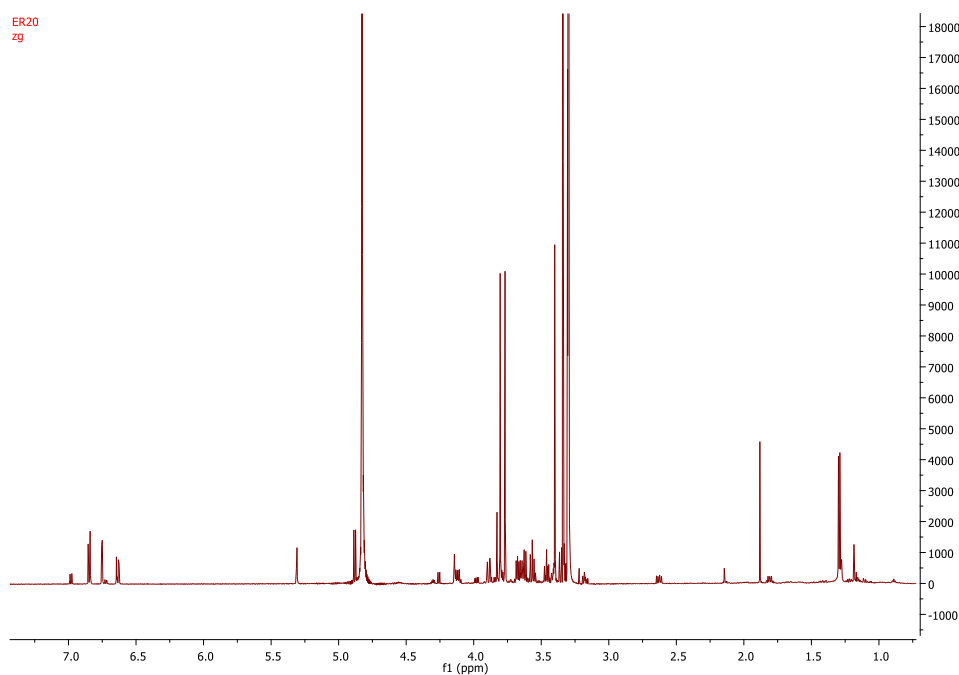
Εικόνα 98: 3,4-διμεθοξυφαινυλο-2-O-(3-O-μεθυλο-α-L-ραμνοπυρανοσυλο)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης

Πίνακας 54: Χημικές μετατοπίσεις ¹H & ¹³C NMR του μεταβολίτη 13 (pn₂₀).

Θέση	¹ H NMR (600MHz, MeOD, δ ppm, J σε Hz)	¹³ C NMR (600MHz, MeOD, δ ppm)
1	-	145.9
2	6.75 (d, J = 2.8 Hz, 1H)	103.6
3	-	153.8
4	-	151.2
5	6.85 (d, J = 8.8 Hz, 1H)	108.5
6	6.64 (dd, J = 8.8, 2.8 Hz, 1H)	114.2
O-Me-3	3.80 (3H, s)	56.5
O-Me-4	3.77 (3H, s)	57.2
1'	4.88 (d, J = 7.6 Hz, 1H)	101.6
2'	3.63 (dd, J = 8.4/ 7.6 Hz, 1H)	78.9
3'	3.56 (1H, 9.3/ 8.4Hz, 1H)	79.2
4'	3.34 (1H, m)	71.7
5'	3.42 (1H, m)	78.1
6'a	3.90 (1H, dd, J = 12.0/ 2.3, Hz, 1H)	62.6
6'b	3.67 (dd, J = 12.0/ 5.5, Hz, 1H)	
1''	5.31 (d, J = 1.8 Hz, 1H)	102.2
2''	4.14 (dd, J = 3.1/ 2.0 Hz, 1H)	68.0

3''	3.30	82.0
4''	3.46 (1H, t, J=9.6 Hz)	72.7
5''	4.12 (, 1H, m)	69.9
6''	1.29 (d, J = 6.2 Hz, 3H)	18.2
O-Me-3''	3.40 (s, 3H)	57.2

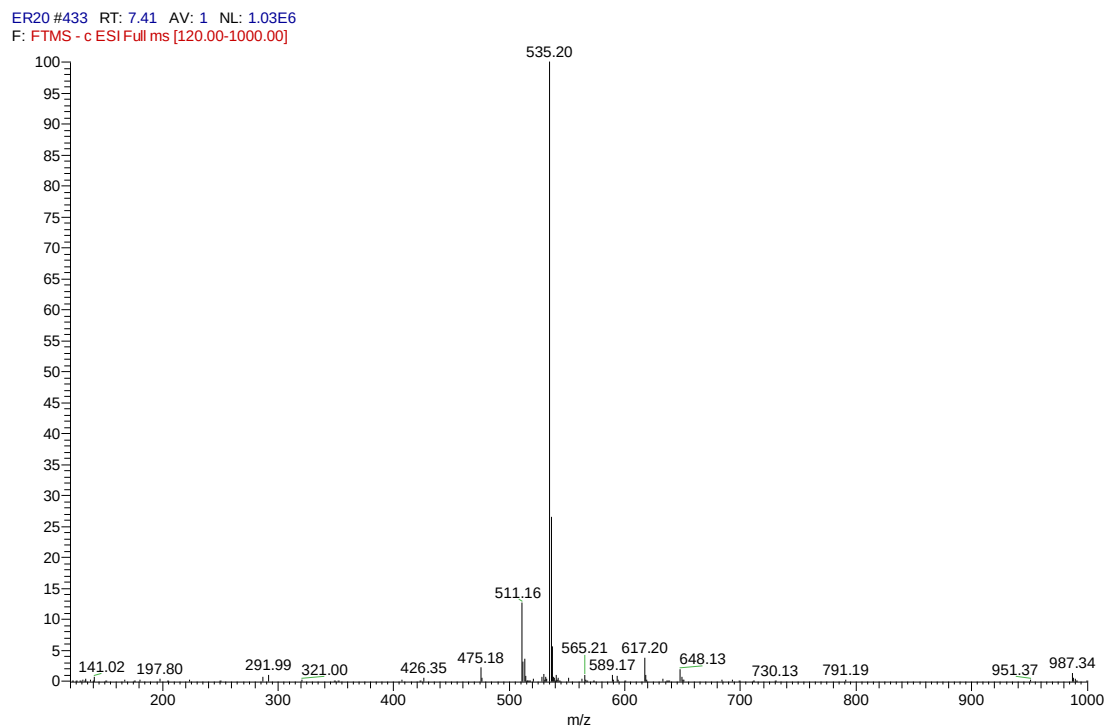
Το φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη 13 υποδεικνύει ένα αρωματικό τρισυποκατεστημένο σύστημα στο οποίο συμμετέχουν τα πρωτόνια που συντονίζονται στα 6.75ppm, 6.85ppm και 6.64ppm ως διπλή (d, J = 2.8 Hz, 1H), διπλή (d, J = 8.8 Hz, 1H) και διπλή διπλών (dd, J = 8.8, 2.8 Hz, 1H) κορυφή και αντιστοιχούν στις θέσεις 2, 5 και 6 αντίστοιχα. Η παρουσία του ανωμερικού πρωτονίου που εμφανίζεται ως διπλή κορυφή με J=7.6Hz στα 4.88ppm, αλλά και των κορυφών στα 3-4ppm, υποδηλώνουν την πιθανή ύπαρξη γλυκόζης. Επίσης, η διπλή κορυφή στα 5.31ppm με J=1.8Hz, η διπλή κορυφή στα 1.29ppm που ολοκληρώνει για 3 υδρογόνα (H-6'') καθώς και χαρακτηριστικές κορυφές στα 3-4ppm, υποδεικνύουν την παρουσία και μιας ραμνόζης. Η μονή κορυφή στα 3.40ppm που ολοκληρώνει για 3 υδρογόνα αντιστοιχεί στη μεθόξυ ομάδα της θέσης 3'' της ραμνόζης.



Εικόνα 99: Φάσμα ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 13.

Η ανάλυση του φάσματος ^1H NMR και η απόλυτη ταύτιση των χημικών μετατοπίσεων με των προτεινόμενων από τη βιβλιογραφία μας έδωσαν τη δυνατότητα να προσδιορίσουμε την δομή του μεταβολίτη 13 . Ο μοριακός τύπος ($\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_{12}$ με MB= 476.47) επιβεβαιώθηκε και από το φάσμα

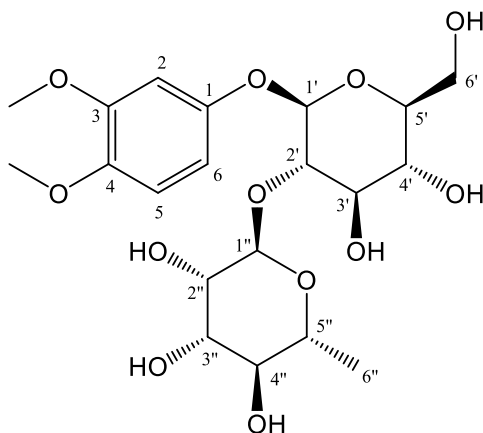
μάζας ESI(-) HR-MS, όπου εμφανίστηκε το ψευδομοριακό ιόν στα $m/z=535.20$. Πρόκειται για το μεταβολίτη 11 ($m/z=475.15$) οποίος σχηματίζει ένωση προσθήκης (adduct) με ένα μόριο οξικού οξέως (CH_3COOH , MB=60.05).



Εικόνα 100: Φάσμα μάζας ESI(-) HR-MS για τον Μεταβολίτη 13.

Γ.5.3.1.5. Μεταβολίτης 14 :3,4-διμεθοξυφαινυλο 2-O-(α-L-ραμνοπυρανοσυλο)-β-D-γλυκο- πυρανοσίδης

Ο μεταβολίτης 14 απομονώθηκε από το υδατικό εκχύλισμα του φυτού και συγκεκριμένα από το κλάσμα B5 της CPC, κατόπιν διαχωρισμού μέσω TLC Preparative. Η μελέτη των φασμάτων NMR 1D και 2D του μεταβολίτη είχε σαν αποτέλεσμα την ταυτοποίηση ενός **νέου φυσικού προϊόντος**, του μεταβολίτη **3,4-διμεθοξυφαινυλο 2-O-(α-L-ραμνοπυρανοσυλο)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης**.



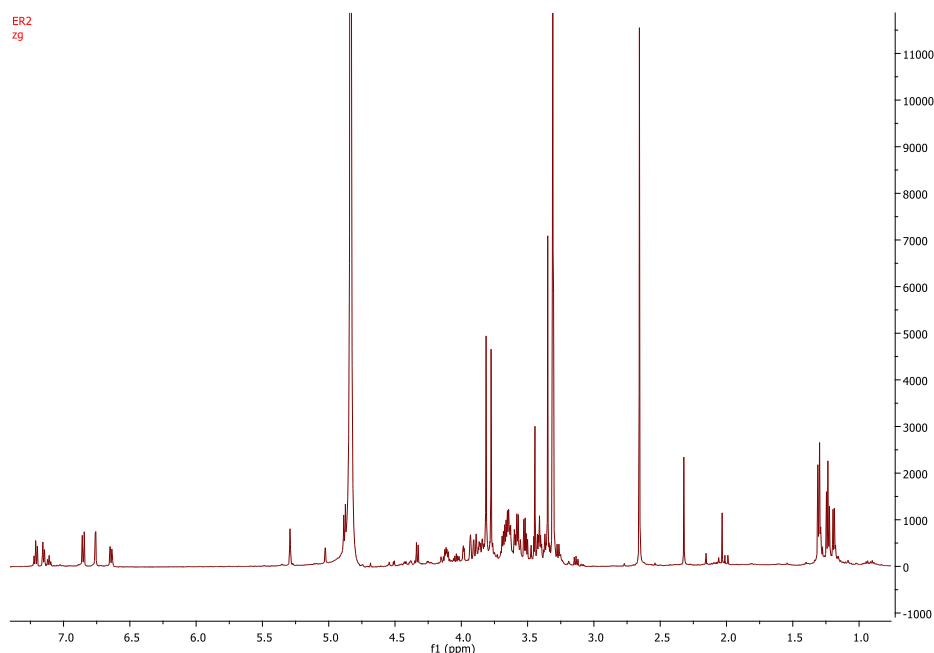
Εικόνα 101: 3,4-διμεθοξυφαινυλο 2-O-(α-L-ραμνοπυρανοσυλο)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης

Πίνακας 55: Χημικές μετατοπίσεις ^1H & ^{13}C NMR του μεταβολίτη 14 (pn_2).

Θέση	^1H NMR (600MHz, MeOD, δ ppm, J σε Hz)	^{13}C NMR (600MHz, MeOD, δ ppm)
1	-	144.3
2	6.75 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H)	103.4
3	-	151.7
4	-	150.9
5	6.84 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H)	113.85
6	6.63 (dd, $J = 8.8, 2.7$ Hz, 1H)	108.3
O-Me-3	3.80 (3H, s)	56.1
O-Me-4	3.77 (3H, s)	56.5
1'	4.87 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H)	101.4
2'	3.65 (m, 1H, overlapped)	78.64
3'	3.41 -3.58 overlapped	
4'		
5'		
6'a 6'b	3.89 (d, $J = 12.0/2.2$ Hz, 1H) 3.67 (dd, $J = 12.0, 6.0$ Hz, 1H)	62.3
1''	5.29 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H)	102.0
2''	3.94 (1H)	71.80

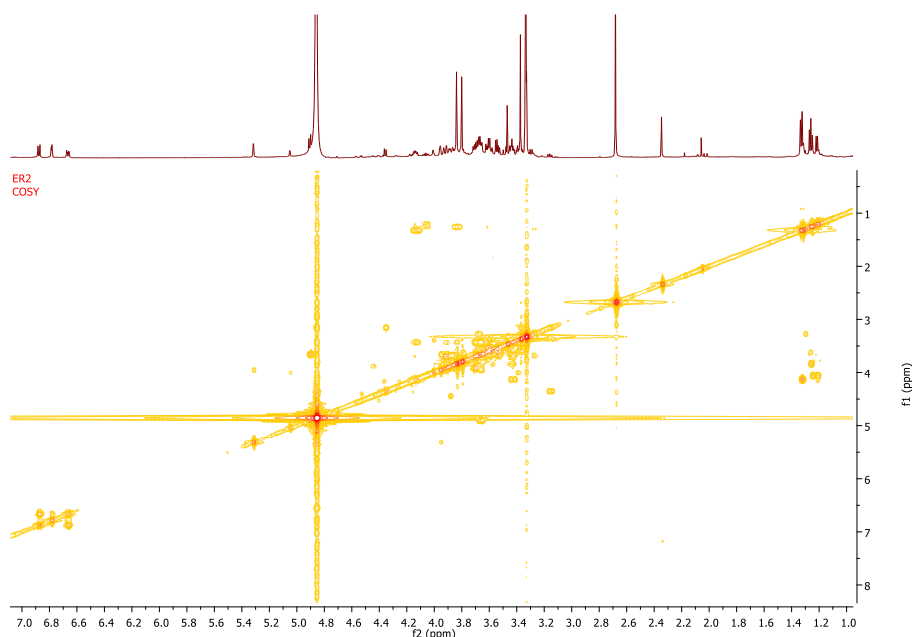
3''	-overlapped	-
4''	3.44 (1H, overlapped)	72.4
5''	4.11 (1H, m)	69.70
6''	1.30 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H)	17.86

Το φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη 14 υποδεικνύει ένα αρωματικό τρις υποκατεστημένο σύστημα στο οποίο συμμετέχουν τα πρωτόνια H-2, H-5 και H-6 που συντονίζονται στα 6.75ppm, 6.84ppm και 6.63ppm ως διπλή (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), διπλή (d, $J = 8.8$ Hz, 1H) και διπλή διπλών (dd, $J = 8.8$, 2.7 Hz, 1H) κορυφές. Οι μονές κορυφές που ολοκληρώνουν για 3 πρωτόνια στα 3.80ppm και 3.77ppm αντιστοιχούν στις μεθόξυ ομάδες των θέσεων 3 και 4 του αρωματικού δακτυλίου, αντίστοιχα. Η παρουσία ενός ανωμερικού πρωτονίου που εμφανίζεται ως διπλή κορυφή με $J=7.7\text{Hz}$ στα 4.87ppm, αλλά και κορυφών στην περιοχή 3-4ppm του φάσματος, υποδηλώνουν την παρουσία σακχάρου, συγκεκριμένα ενός μορίου γλυκόζης. Επίσης, η διπλή κορυφή στα 5.31ppm με $J=1.7\text{Hz}$, η διπλή κορυφή στα 1.30ppm που ολοκληρώνει για 3 υδρογόνα (H-6'') και οι χαρακτηριστικές κορυφές και συζεύξεις πρωτονίων και ανθράκων στο φάσμα HSQC-DEPT, υποδεικνύουν την παρουσία και ενός μορίου ραμνόζης.



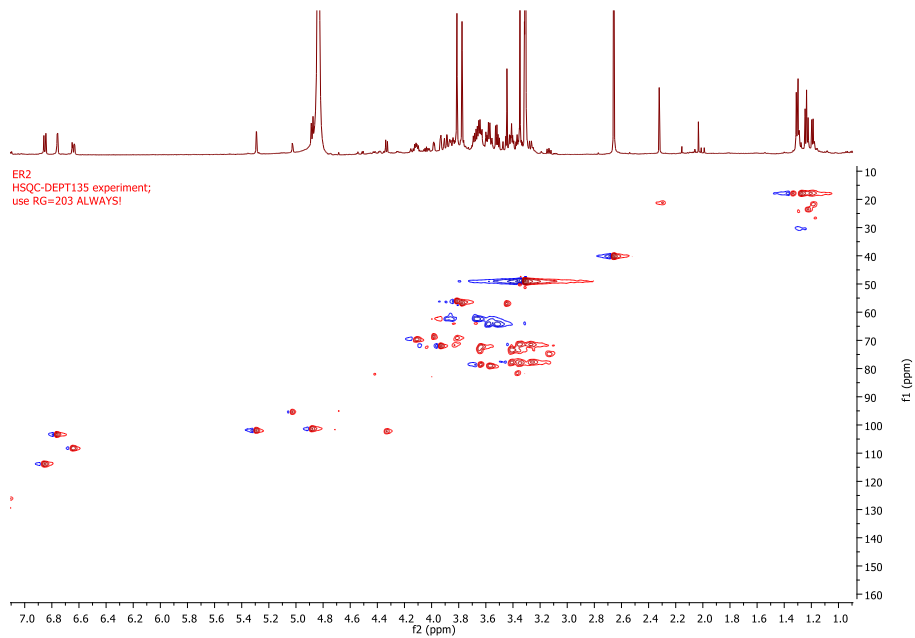
Εικόνα 102: Φάσμα ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 14.

Σημαντικό ρολό στην αποσαφήνιση της δομής του μεταβολίτη 14 έπαιξαν οι συζεύξεις που προέκυψαν από το ομοπυρηνικό πείραμα 2D COSY. Πιο συγκεκριμένα, στο δισδιάστατο φάσμα εντοπίστηκε η συσχέτιση του ανωμερικού πρωτονίου H-1' στα 4,87ppm με το πρωτόνιο H-2' στα 3.65ppm το οποίο με την σειρά του, όπως προέκυψε από το πείραμα HSQC-DEPT, παρουσίασε σύζευξη με τον άνθρακα στα 76.8ppm (C-2'). Ο προσδιορισμός της θέσης του συγκεκριμένου άνθρακα αποτελεί σημαντικό δεδομένο, καθώς παρουσιάζει ετεροπυρηνική συσχέτιση 3J με το ανωμερικό πρωτόνιο της ραμνόζης στα 5,29ppm, καθορίζοντας έτσι το σημείο στο οποίο προσδένεται το συγκεκριμένο σάκχαρο στο μεταβολίτη 14.

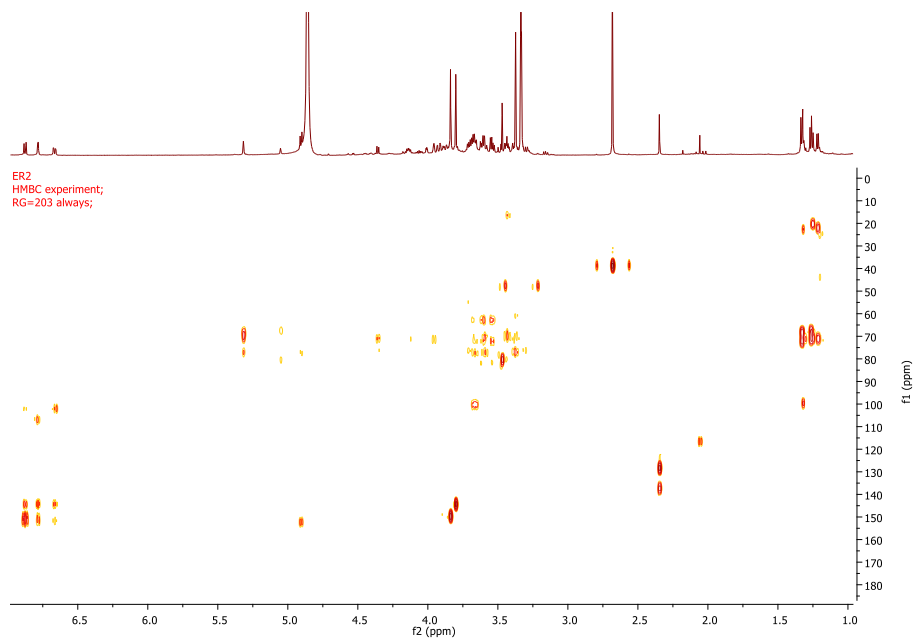


Εικόνα 103: Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 14.

Μέσω του φάσματος ετεροπυρηνικής συσχέτισης HSQC-DEPT αποδόθηκαν οι χημικές μετατοπίσεις των υπολοίπων ανθράκων του μορίου, ενώ η ταυτοποίηση των τεταρτοταγών ανθράκων C-1 στα 144.3ppm, C-3 στα 151.7ppm και C-4 στα 150.9ppm καθώς και το σημείο πρόσδεσης της γλυκόζης στον αρωματικό δακτύλιο, πραγματοποιήθηκε μέσω του φάσματος HMBC.

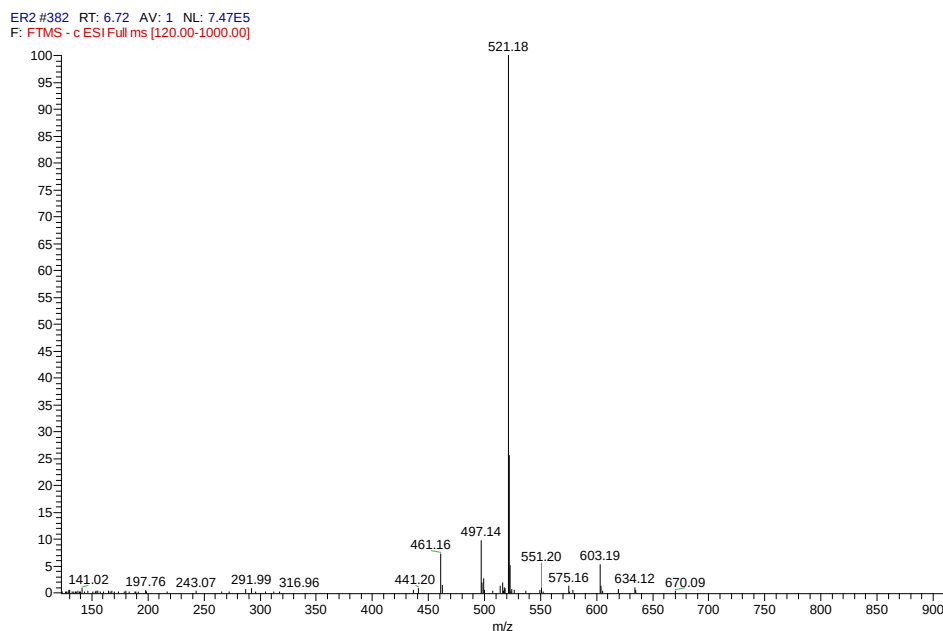


Εικόνα 104: Φάσμα HSQC-DEPT για τον Μεταβολίτη 14.



Εικόνα 105: Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 14.

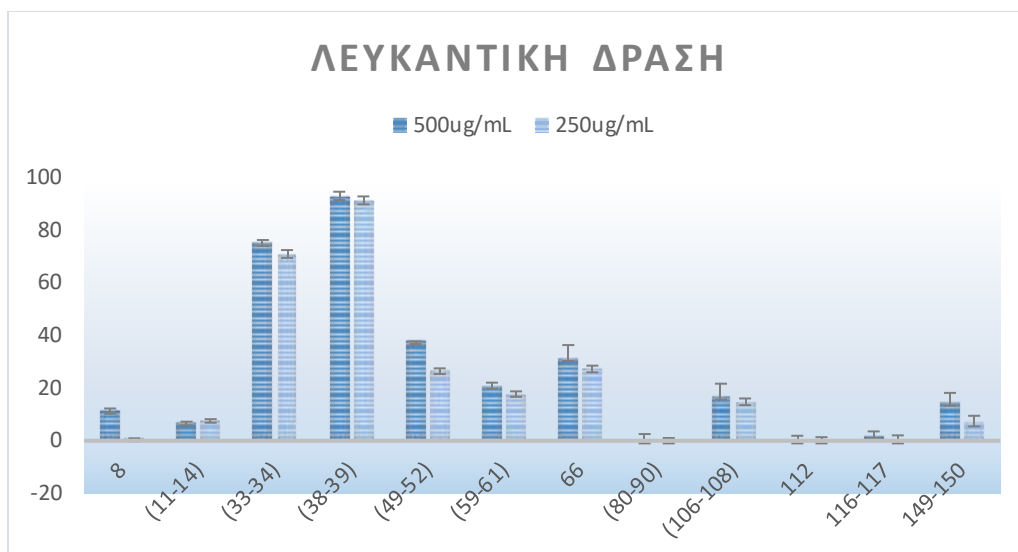
Η ανάλυση των φασμάτων NMR 1D και 2D έδωσε τη δυνατότητα να προσδιορίσουμε την δομή του μεταβολίτη 14 με MB 462.45 και μοριακό τύπο $C_{20}H_{30}O_{12}$. Ο μοριακός τύπος επιβεβαιώθηκε και από το φάσμα μάζας ESI(-) HR-MS, όπου εμφανίστηκε το ψευδομοριακό ιόν στα $m/z=521.18$. Πρόκειται για το μεταβολίτη 11 ($m/z=461.13$) ο οποίος σχηματίζει ένωση προσθήκης (adduct) με ένα μόριο οξικού οξέως (CH_3COOH , MB=60.05).



Εικόνα 106: Φάσμα μάζας ESI(-) HR-MS για τον Μεταβολίτη 14.

Γ.6. Βιοκατευθυνόμενη απομόνωση στο αιθανολικό εκχύλισμα του *Pinus heldreichii*

Επιλεγμένα κλάσματα της CPC που πραγματοποιήθηκε στο αιθανολικό εκχύλισμα του *Pinus heldreichii* ελέγχθηκαν ως προς τη λευκαντική τους δράση με τη μέθοδο της παρεμπόδισης του ενζύμου της τυροσινάσης σε συγκεντρώσεις 500μg/mL και 250μg/mL. Τα δραστικότερα κλάσματα ήταν τα (33-34) και (38-39) τα οποία είχαν υψηλή περιεκτικότητα σε πινοσιλβίνη. Ιδιαίτερα το κλάσμα (38-39) παρουσίασε αξιοσημείωτα ποσοστά παρεμπόδισης που ανέρχονταν στο 92,4% σε συγκέντρωση 500μg/mL και στο 90.8% σε συγκέντρωση 250μg/mL. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι το κλάσμα 66 από το οποίο απομονώθηκε ο μεταβολίτης 3 που αποτελεί τη μεθοξυλιωμένη μορφή της πινοσιλβίνης, παρουσίασε πολύ χαμηλότερα ποσοστά παρεμπόδισης. Τα ποιοτικά και ποσοτικά αποτελέσματα παρατίθενται στο Διάγραμμα 4 και τον Πίνακα 55, αντίστοιχα.



Διάγραμμα 4. Ποιοτικά αποτελέσματα λευκαντικής δράσης στα κλάσματα της CPC του Agro 05.

Πίνακας 56. Ποσοτικά αποτελέσματα λευκαντικής δράσης στα κλάσματα της CPC του Agro 05.

TYR				
Κλάσματα	500 µg/mL		250 µg/mL	
	Παρεμπόδιση %	Τυπ. Αποκλιση	Παρεμπό- διση %	Τυπ. Αποκλιση
8	11.24	2.21	0.75	2.05
(11-14)	6.83	1.90	7.87	1.36
(33-34)	74.98	1.02	70.44	0.18
(38-39)	92.39	0.41	90.78	0.34
(49-52)	37.71	1.24	26.33	1.97
(59-61)	20.78	2.18	17.69	2.01
66	31.29	0.04	26.98	1.17
(80-90)	0	0	0	0
(106-108)	16.65	5.04	14.52	1.54
112	0	0	0	0
116-117	1.35	5.02	0	0
149-150	14.34	3.84	6.46	3.02

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κατά τη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης έναντι των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών, πιο δραστικά αποδείχθηκαν τα εκχυλίσματα του ροδιού επιδεικνύοντας σημαντική αντιβακτηριακή δράση κατά των *Acidovorax* sp., *Acidovorax citrulli*, *P. corrugata*, όλων των παθότυπων του είδους *X. Campestris*, καθώς και ήπια δράση έναντι του *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, ενώ τα εκχυλίσματα του ευκαλύπτου ήταν δραστικά έναντι του είδους *X. campestris* pv. *campestris*. Επίσης, όλα τα εκχυλίσματα του ροδιού και του ευκαλύπτου σημείωσαν σημαντική αντιμικροβιακή δράση έναντι και των 2 στελεχών του *Phytophthora nicotianae*, ενώ μετά το πέρας των 6 ημερών τα εκχυλίσματα του ευκαλύπτου ανέστειλαν τελείως την ανάπτυξη του μύκητα.

Η φυτοχημική τους ανάλυση ανέδειξε την β-πουνικαλαγίνη για το ρόδι και το ελλαγικό οξύ και την ισοραμνετίνη ως τα βασικά τους συστατικά, μεταβολίτες οι οποίοι έχουν μελετηθεί στο παρελθόν και διαθέτουν αποδεδειγμένη αντιμικροβιακή δράση έναντι αρκετών φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών.

Τα εκχυλίσματα του ροδιού και του ευκαλύπτου επέδειξαν αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική δράση και υψηλό φαινολικό φορτίο, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από βιβλιογραφικά δεδομένα. Υψηλή αντιοξειδωτική δράση σημείωσαν, ωστόσο, και τα υδροαλκοολικά εκχυλίσματα της μαύρης και της λευκόδερμης πεύκης, καθώς και το υδρόλυμα των καρπών της φοινικικής αρκεύθου και της μαύρης πεύκης, ενώ το υδροαλκοολικό εκχύλισμα της λευκόδερμης πεύκης παρουσίασε την υψηλότερη λευκαντική δράση έναντι όλων των υπόλοιπων εκχυλισμάτων. Τα δεδομένα αυτά, σε συνδυασμό με ότι ελάχιστα βιβλιογραφικά δεδομένα υπάρχουν για τα δύο είδη *Pinus* οδήγησαν στην επιλογή των δύο παραπροϊόντων ξύλου για φυτοχημική ανάλυση.

Κατά την ανάλυση της λευκόδερμης πεύκης απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 9 μεταβολίτες. Συγκεκριμένα από το υδροαλκοολικό εκχύλισμα απομονώθηκε η (*cis*)- και η (*trans*)-τερπινόλη (μεταβολίτης 1 και 2), η πινοσιλβίνη και η μεθοξυλιωμένη της μορφή (μεταβολίτης 4 και 3) που έχουν απομονωθεί ξανά από το είδος. Από το αλκοολικό εκχύλισμα απομονώθηκε το 12α & 12β υδροξυαβιετικό οξύ (μεταβολίτης 5 & 6), το πετροστιλβένιο (μεταβολίτης 7), το ισοκουπρεσικό οξύ (μεταβολίτης 8) & το κεμπρένιο (μεταβολίτης 9) τα οποία απαντώνται σε αρκετά είδη του γένους, ενώ το κεμπρένιο έχει απομονωθεί ξανά από το αιθέριο έλαιο του φλοιού του είδους.

Κατά τη φυτοχημική ανάλυση της μαύρης πεύκης απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 5 μεταβολίτες. Η 7,8-διυδρο-3-υδροξυ-8-υδροξυμεθυλο-7-(3-μεθοξυ-4-υδροξυφαινυλο)-1'βενζοφουρανοπροπανόλη (μεταβολίτης 10) που έχει απομονωθεί ξανά από την οικογένεια και το γένος *Pinus*, ο 4-μεθοξυφαινυλο-(6-δεοξυ-α-L-μανοπυρανοσυλο)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης (μεταβολίτης 11) που απαντάται πρώτη φορά στο γένος και η διυδροκωνειφερίνη (μεταβολίτης 13) η οποία έχει απομονωθεί ξανά από το φλοιό του είδους. Τέλος απομονώθηκε ο 3,4-διμεθοξυφαινυλο-2-O-(3-O-μεθυλο-α-L-ραμνοπυρανοσυλο)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης (μεταβολίτης 13) και ο 3,4-διμεθοξυφαινυλο-2-O-(α-L-ραμνοπυρανοσυλο)-β-D-γλυκοπυρανοσίδης (μεταβολίτης 14) που αποτελεί νέο φυσικό προϊόν.

Τέλος, τα κλάσματα της CPC του αιθανολικού εκχυλίσματος της λευκόδερμης πεύκης ελέγχθηκαν ως προς τη λευκαντική τους δράση. Βιοκατευθυνόμενη απομόνωση υπέδειξε πως ο κύριος μεταβολίτης, στον οποίο οφείλεται η βιοδραστικότητά του, ήταν η πινοσιλβίνη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adams L.S., Seeram N.P., Aggarwal B.B., “Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54, 980-985.

Aguedo, M., Kohnen, S., Rabetafika, N., Vanden Bossche, S., Sterckx, J., Blecker, C., et al. “Composition of by-products from cooked fruit processing and potential use in food products”. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2012, 27(1), 61–69.

Ainsworth M., E. A., & Gillespie, K. M.: “Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent”. *Nature Protocols*, 2007, 2(4): 875-877.

Albrecht, M., Jiang, W., Kumi-Diaka, J., Lansky, E.P., Gommersall, L.M., Patel, A., Mansel, R.E., Neeman, I., Geldof, A.A. and Campbell, M.J., “Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth, and invasion of human prostate cancer cells”, *Journal of medicinal food*, 2004 7(3):274-283.

Allen S.J.: “Predominance of Race of *Xanthomonas campestris* pv.*malvacearum* on Cotton in Australia”, *Plant Disease*, 1991, 75 (1): 43-44.

Al-Zoreky, N. S., “Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels”, *International journal of food microbiology*, 2009, 134(3), 244-248.

Arden F. Sherf, Alan A. MacNab: “Vegetable Diseases and Their Control”, 2nd Edition, John Wiley & Sons, 1986, ISBN 978-0-471-05860-1.

Aslam, M. N., Lansky, E. P., & Varani, J., “Pomegranate as a cosmeceutical source: pomegranate fractions promote proliferation and procollagen synthesis and inhibit matrix metalloproteinase-1 production in human skin cells”, *Journal of ethnopharmacology*, 2006, 103(3), 311-318.

Averre, C. W.: “Black Rot of Cabbage and Related Crops”, 2007.

Ajaikumar, K. B., Asheef, M., Babu, B. H., & Padikkala, J. “The inhibition of gastric mucosal injury by *Punicagranatum* L.(pomegranate) methanolic extract”, *Journal of ethnopharmacology*, 2005, 96(1), 171-176.

Aziz S., Rahman H: “Biological activities of *Prunus persica*”, L. batch, *Journal of Medicinal Plants Research*, 2012, (15): 947-951.

Azzouz, M. A.; Bullerman, L. B. “Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents: J. Food Prot., 1982, 45, 1298–1306.

Barbulova, A., Colucci, G., & Apone, F. “New Trends in Cosmetics: By-Products of Plant Origin and Their Potential Use as Cosmetic Active Ingredients”, *Cosmetics*, 2015, 2(2), 82-92.

Bleif, S., Hannemann, F., Lisurek, M., von Kries, J. P., Zapp, J., Dietzen, M., Bernhardt, R. (2011). Identification of CYP106A2 as a regioselective allylic bacterial diterpene hydroxylase. *ChemBioChem*, 12(4), 576-582.

Boland D.J., Brooker M.I.H., McDonald M.W., Chippendale G.M., Hall N., Hyland B.P.M., Kleinig D.A.: "Forest Trees of Australia", Collingwood, Victoria: CSIRO Publishing, 2006, 5th Edition, ISBN 0-643-06969-0.

Bradbury J.F.: "Guide to Plant Pathogenic Bacteria". 1986. Slough: CAB International.

Braga, L.C., Shupp, J.W., Cummings, C., Jett, M., Takahashi, J.A., Carmo, L.S., Chartone-Souza, E. and Nascimento, A.M.A., "Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production", *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, 96(1): 335-339.

Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C.: "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity", *LWT - Food Science and Technology*, 1995, Volume 28, Issue 1, Pages 25-30.

Braun L., Cohen M.: "Herbs and Natural Supplements", 2007, 2nd Edition, Elsevier Australia.

Brenner D. J. & Farmer J.J. III: "Family I. Enterobacteriaceae", in Bergey's *Manual of Systematic Bacteriology*, 2001, 2nd Edition, Vol. 2, Part B: 587-897.

Brooker M.I.H., Kleinig D.A.: "Field Guide to Eucalyptus", *Bloomings*, 3rd Edition, Melbourne, South-eastern Australia, 2006, vol. 1, ISBN 1-876473-52-5.

Bradbury J.F., "Guide to Plant pathogenic Bacteria", CAB International Mycological Institute, Kew, U.K, 1986.

Bugianesi Catasta, R.G., Spigno P., D'Uva A., Maiani G.: "Narigenin from cooked tomato paste is bioavailable in men", *J. Nutr.*, 2002, 132: 3349-3352.

Burdman S., Walcott R.R.: "Acidovorax citrulli: generating basic and applied knowledge to tackle a global threat to the cucurbit industry" *Mol Plant Pathol*, 2012, 13: 805-815.

Cantrell, C. L., Dayan, F. E., & Duke, S.O. (2012). Natural products as sources for new pesticides. *Journal of Natural Products*, 75(6), 1231-1242.

Celik I., Temur A., & Isik I., "Hepatoprotective role and antioxidant capacity of pomegranate (*Punica granatum*) flowers infusion against trichloroacetic acid-exposed in rats", *Food and Chemical Toxicology*, 2009, 47(1), 145-149.

Chandra, S., & Sastry, M. S. "Phytochemical investigations on *Prunus persica* heart wood". *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1988, 50(6), 321-322.

Choi J.S., Jung H.A., Kim A.R., Chung H.Y.: "In vitro antioxidant activity of some selected *Prunus* species in Korea". *Arch. Pharm. Res.*, 2002, 25: 865-872.

Cicerale, S.; Conlan, X.A.; Sinclair, A.J.; Keast, R.S. Chemistry and health of olive oil phenolics. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2009, 49, 218–236. 24.

Conde E., Cadahia E., Diez-Barra R., Garcia-Vallejo M.C.: “Polyphenolic bark extracts from *Eucalyptus camaldulensis*, *E. globules* and *E. rudis*”, *Springer-Verlag*, 1996, 54: 175-181.

Dayan, F. E., Cantrell, C. L., & Duke, S. O. (2009). “Natural products in crop protection.” *Bioorganic & medicinal chemistry* 17(12), 4022-4034.

De Ancos B., Colina-Coca C., González-Peña D. & Sánchez-Moreno C.: “Bioactive compounds from vegetable and fruit by-products”, 2015, *Biotechnology of Bioactive Compounds: Sources and Applications*, 1.

Deb L., Gupta R., Dutta A., Yadav A., D. Bhowmik, Kumar K.P.S.: “Evaluation of antioxidant activity of aqueous fraction of *Prunus persica* L leaf aqueous extract”, *Der Pharmacia Sinica*, 2010, 1(3): 157-164.

Dipak G., Axay P., Manodeep C., Jagdish K.V.: “Phytochemical and pharmacological profile of *Punica granatum*: an overview”, *IRJP*, 2012, 3(2): 65-68.

Dixon, R. A. (2001). “Natural products and plant disease resistance.” *Nature*, 411(6839), 843-847.

Djilas S., Canadanovic-Brunet J. and Cetokovic G.: “By-products of fruits processing as a source of phytochemicals”, *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.*, 2009, 15(4): 191–202.

Dowson, W. J.: “On the systematic position and generic names of the gram negative bacterial pathogens”, *Zentr. Bakteriell. Parasitenk.*, 1939, Abt. II 100: 177-193.

Eltlbany N., Prokscha Z.Z., Castaneda-Ojeda M.P., Krogerrecklenfort E., Heuer H., Wohanka W., Ramos C., Smalla K.: “A new bacterial disease on *Mandevilla sanderi*, caused by *Pseudomonas savastanoi*”, *Applied Environmental Microbiology*, 2012, 78(23): 8492-8297.

Euzéby J.P.: “List of bacterial names with standing in nomenclature”, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1997, 47(2): 590-2.

Farjon A.: “An Atlas of the World’s Conifers”, *Royal Botanic Gardens*, ISBN 9-789004211803.
Farkas, I., & Pfander, H. (1990). Neue Synthese von (–)-(R)-Cembren A, Synthese von (+)-(R)-Cembrenen und (+)-(S)-Cembren. *Helvetica Chimica Acta*, 73(7), 1980-1985.

Fatmi M., Collmer A., Iacobellis N.S., Mansfield J.W., Murillo J., Schadd N., Ullrich M.: “*Pseudomonas syringae* Pathovars and Related Pathogens: Identification, Epidemiology, and Genomics”, *Springer Science and Business Media*, B. V. 2008.

Gardan L., Bollet C., Ghorrah M. Abu, Grimont F., Grimont P.A.D.: "DNA relatedness among the pathovar strains of *Pseudomonas syringae*", subsp. *Savastanoi* Janse (1982) and proposal of *Pseudomonas savastanoi* sp.nov. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, 1992, 42(4): 606-612.

Garland T., Barr C. A. (1998). "Toxic Plants and Other Natural Toxicants". CABI Publishing ISBN 0 85199 263 3, p.340-343

Giancarlo, Cravotto, Farid, Chemat (Editors): "Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice", ebook, 2012, Technology & Engineering, www.springer.com, ISBN 987-1-4614-4830-3.

Glazer I., Masaphy S., Marciano P., Bar-Ilan I., Holland D., Kerem Z., & Amir R., "Partial identification of antifungal compounds from *Punica granatum* peel extracts", *Journal of agricultural and food chemistry*, 2012, 60(19), 4841-4848.

Goumas D. E. & Chatzaki A. K.: "Characterization and host range evaluation of *Pseudomonas viridiflava* from melon, blite, tomato, chrysanthemum and eggplant", *European Journal of Plant Pathology*, 1998, 104(2): 181-188.

Graikou, K., Gortzi, O., Mantanis, G., & Chinou, I. (2012). Chemical composition and biological activity of the essential oil from the wood of *Pinus heldreichii* Christ. var. *leucodermis*. *Eur. J. Wood Prod*, 70, 615-620.

Hafizoğlu H., Bjarne Holmbom and Markku Reunanen.: "Chemical composition of lipophilic and phenolic constituents of barks from *Pinus nigra*, *Abies bornmülleriana* and *Castanea sativa*", *Holzforschung*, 2002, 56.3: 257-260.

Haidari M., Ali M., Casscells S.W. & Madjid M., "Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir", *Phytomedicine*, 2009, 16(12), 1127-1136.

Hamzaoui M., Renault J. H., Reynaud R. & Hubert J.: "Centrifugal partition extraction in the pH-zone-refining displacement mode: An efficient strategy for the screening and isolation of biologically active phenolic compounds", *Journal of Chromatography B*, 2013, 937: 7-12.

Hassan N.A., El-Feky G.S., Elegami H.M., "Antibacterial Activity of Thirty Two Pomegranate (*Punica granatum* L.) Accessions Growing in Egypt Fruit Peels", *World Applied Sciences Journal*, 2013, 21(7), 960.

Hassane El L., Nobuhir H., Mitsuya T., Hajime O.: "Triterpene phytoalexins from nectarine fruits", *Phytochemistry*, 1999, 52: 623-629.

Hayward AC: "The host of *Xanthomonas*", J.G. Swings and E.L. Civerolo (eds.), Chapman & Hall, London, United Kingdom, 1993, 51-54.

Hirano, S.S. and C.D. Upper. "Population biology and epidemiology of *Pseudomonas syringae*", *Annual Reviews in Phytopathology*, 1990, 28:155-177.

Hirano, S.S. and C.D. Upper. Bacteria in the Leaf Ecosystem with Emphasis on *Pseudomonas syringae* — a Pathogen, Ice Nucleus, and Epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 64: 624-653.

Ho P.C., Saville D.J., Wanwimolruk S.: "Inhibition of human CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids, furanocoumarins and related compounds", *J. Pharm. Sci.*, 2001, 4: 217-227.

Hofte M., De Vos P.: "Plant pathogenic *Pseudomonas* species", *Plant-Associated Bacteria*, 2006, 3: 507-533.

Holeva M.C., Karafla C.D., Glynos P.E. & Alivizatos A.S.: "*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* newly reported to cause bacterial fruit blotch of watermelon in Greece", 2009.

Holland D., Hatib K. and Ya'akov I.B.: "Pomegranate: Botany, Horticulture, Breeding", *Horticultural Reviews*, 2009, Vol 35: 127-191.

Horst R. K.: "Westcott's Plant Disease Handbook", 7th Edition, 2008, Springer, p.126, ISBN 978-1-4020-4585-1.

Hu W., Dai W., Yang Y.M., Zhou Z.F., Li X.Y., & Duan L.P., "Study of In Vitro Inhibition Effect of Pomegranate Rind on *H. pylori* [J]", *Journal of Kunming Medical College*, 4, 006, 2006.

Iacobellis NS.: "Olive knot", in Maloy OC, Murray TD, eds. *Encyclopedia of plant pathology*, New York, NY, USA: John Wiley & Sons, 2001, 7143–715.

IEA/CON/98/37: "Large Scale Power Generation using Forestry and Wood Industry By-Products".

Iliæ S.B., Konstantinoviæ S.S., Todoroviæ Z.B. Series: Physics, Chemistry and Technology, 2004, 3: 73, ISBN 978-92-9043-789-5.

Jayaprakash G.K., Negi P.S., Jena B.S., "Antimicrobial activities of pomegranate: In Pomegranates: Ancient Roots to Modern Medicine", Seeram, N. P., Schulman, R. N., Heber, D., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, 2006, pp 167–183.

Jones J. B., Zitter T. A., Momol T. M., Miller S. A.: "Compendium of Tomato Diseases and Pests", 2nd Edition, *American Phytopathological Society*, St. Paul, 2014, MN. 27.

Jones J. B.: "Compendium of Tomato Diseases", *American Phytopathological Society*, St. Paul, 1991, MN. 27.

Jorgensen J. H. and Turnidge J. D.: "Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods", 2007, 1152–1172 (In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen).

Jurenka, J. S. "Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review." *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic* 13, no. 2 (2008): 128-144.

Kado C.I.: "Crown gall tumors" (in: *Encyclopedia of Genetics*. S. Brenner and J. H. Miller), eds. *Academic Press*, San Diego, CA, 2002, 1-3.

Kado C.I.: "Plant Bacteriology", *American Phytopathological Society*, St. Paul, 2010, Minnesota, 72.

Kalogeropoulos N., Chiou A., Pyriochou V., Peristeraki A. and Karathanos V.T.: "Bioactive phytochemical in industrial tomatoes and their processing byproducts", 2012, *LWT-Food Sci.Technol.* 49(2): 213–216.

Kaur, G., Jabbar, Z., Athar, M., & Alam, M. S. (2006). *Punica granatum* (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 44(7), 984-993.

Kazakevich Y. V. & LoBrutto R. (2007) HPLC for pharmaceutical scientists. New Jersey: John Wiley & Sons Inc., ISBN: 978-0-471-68162-5

Kim, S., Kim, M.J., Choi, Y., Kim, B., Kim, K., Park, K., Park, S., Lee, N., Hyun, N. Down-regulation of tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and MITF expressions by citrus press-cakes in murine B16 F10 melanoma. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2013, 3, 617–622.

Kima J.-P., Leea I.-K., Yuna B.-S., Chungb S.- H. , Shimb G.-S., Koshinoc H., Yooa I.-D.: "Ellagic acid rhamnosides from the stem bark of *Eucalyptus globules*", 2001, *Phytochemistry* 57: 587–591.

Kirtikar, K.R. Basu, B.D. "Indian Medicinal Plants". Bishen Singh Mahendra Pal Singh, Dehradun, 1984.

Knekt P., Kumpulainen J., Jarvinen R., Rissanen H., Heliovaara M., Reunanen A., Hakulinen T., Aromaa A.: "Flavonoid intake and risk of chronic diseases", *Am. J. Clin. Nutr.*, 2002, 76: 560-568.

Koleva I.I., van Beek T.A., Linssen J.P.H., Groot A.d. and Evstatieva L.N.: "Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparative Study on Three Testing Methods", *Phytochem. Anal.*, 2002, 13: 8-17.

Kumar H.D., Laxmidhar S.: "A review on phytochemical and pharmacological of *Eucalyptus globules*: A multipurpose tree", 2011, 2 (5): 1527-1530.

Lambe R C and Lacy G H.: "Controls for two important diseases: black rot and black leg of cabbage", *American Vegetable Grower*, 1982, 30: 10-12.

Landry M.L. and Pfaller M.A.(ed.): "Manual of clinical microbiology", 9th Edition, 2007, ASM Press, Washington, D.C.

Lansky, Ephraim P., and Robert A. Newman: "Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer", *Journal of ethnopharmacology*, 2007, 109.2: 177-206.

Lee I, Choe Y. S., Choi, J. Y., Lee K., Kim B. (2012). "Synthesis and Evaluation of ^{18}F -Labeled Styryltriazole and Resveratrol Derivatives for β -Amyloid Plaque Imaging". *J. Med. Chem* 55: 883–892.

Lenucci, M. S., Durante, M., Anna, M., Dalessandro, G., & Piro, G. "Possible Use of the Carbohydrates Present in Tomato Pomace and in Byproducts of the Supercritical Carbon Dioxide Lycopene Extraction Process as Biomass for Bioethanol Production". *Journal of agricultural and food chemistry*, 2013, 61(15), 3683-3692.

Leyns F, De Cleene M, Swings J, De Ley, J, 1984, *Bot. Rev.* 50: 308-356.

Little, E.L. Jr.: "Common fuelwood crops: a handbook for their identification", McClain Printing Co., 1983, Parsons, WV.

Luís Â., Neiva D., Pereira H., Gominho J., Domingues F., Duarte A. P.: "Stumps of Eucalyptus globulus as a Source of Antioxidant and Antimicrobial Polyphenols Molecules", 2014, 19: 16428-16446.

Machado, T.B., Pinto, A.V., Pinto, M.C.F.R., Leal, I.C.R., Silva, M.G., Amaral, A.C.F., Kuster, R.M. and Netto-dosSantos, K.R. (2003). In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International journal of antimicrobial agents*, 21(3): 279-284.

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J., Brock: "Βιολογία των Μικροοργανισμών", Τόμος I, 2005, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, ISBN 960-524-200-1.

Man, J.: "Micro-Steam-Distillation-Extraction of Biosynthesis", Users' Manual, 2001.

Marchal L., Legrand, J. & Foucault A.: "Centrifugal partition chromatography: a survey of its history, and our recent advances in the field", *The Chemical Record*, 2003, 3(3): 133-143.

Masuda T., Fujita N., Odaka Y., Takeda Y., Yonemori S., Nakamoto K., Kuninaga H.: "Tyrosinase inhibitory activity of ethanol extracts from medicinal and edible plants cultivated in okinawa and identification of a water-soluble inhibitor from the leaves of *Nandina domestica*", *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 2007, 71: 2316–2320.

Mathabe, M. C., Nikolova, R. V., Lall, N., & Nyazema, N. Z. (2006). Antibacterial activities of medicinal plants used for the treatment of diarrhoea in Limpopo Province, South Africa. *Journal of ethnopharmacology*, 105(1), 286-293.

Mertens-Talcott S.U., Talcott S.T., Percival S.S.: "Low concentrations of quercetin and ellagic acid synergistically influence proliferation, cytotoxicity and apoptosis in MOLT-4 human leukemia cells", *J. N UTR*, 2003, 133: 2669-2673.

Mhaigawali, M. A., Gomashe, A. V., Gogle, D. P., Tumane, P. M., & Narwadiya, S. C. (2010). Antibacterial investigation of *Punica granatum* (Pomegranate rind) extract against different plant pathogenic bacteria. *Biosciences, Biotechnology Research Asia*, 7(1), 377-382.

- Mirik M., Aysan Y. & Sahin F.: “Characterization of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strains isolated from several host plants in Turkey and report of *Fontanesia* as a new host”, *Journal of Plant Pathology*, 2011, 93(2): 263-270.
- Moertel C.G., Ames M.M., Kovach J.S., Moyer T.P., Rubin J.R., Tinker J.H. A pharmacologic and toxicological study of amygdalin. *JAMA* 1981; 245:591–4.
- Morrow D.M., Fitzsimmons P.E., Chopra N., McGlynn H.: “Dietary supplementation with the anti-tumour promoter quercetin: its effects on matrix metalloproteinase gene regulation”, *Mutat. Res.*, 2001, 480-481, 269-276.
- Murthy C, K. N., Reddy V., Veigas M., Murthy U.: “Study on wound healing activity of *Punica granatum* peel”, *Journal of Medicinal Food*, 2004, 7.2: 256-259.
- Murthy, S.; Naidu, M. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—A review. *Resour. Conserv. Recycl.* 2012, 66, 45–58.
- Nakanishi K., Goto T., Itô S. (1974). “Natural Products Chemistry, Vol.1”, Academic Press, ISBN 0-12-513901-2
- Neurath, A. R., Strick, N., Li, Y. Y., & Debnath, A. K. (2004). *Punica granatum* (Pomegranate) juice provides an HIV-1 entry inhibitor and candidate topical microbicide. *BMC infectious diseases*, 4(1), 41.
- Nugteren, D. H., & Christ-Hazelhof, E. (1987). Naturally occurring conjugated octadecatrienoic acids are strong inhibitors of prostaglandin biosynthesis. *Prostaglandins*, 33(3), 403-417.
- Nyiredy, S. (2000). Preparative Thin-Layer (Planar) Chromatography. Research Institute for Medicinal Plants, Hungary. Academic Press
- O'Brien B, Quigg C, Leong T. Severe cyanide toxicity from 'vitamin supplements'. *Eur. J. Emerg. Med.* 2005;12:257–8
- O'Shea N., Arendt E.K. and Gallagher E.: “Dietary fibre and phytochemical characteristics of fruit and vegetable by-products and their recent applications as novel ingredients in food products”, *Innov.Food Sci. Emerg. Technol.*, 2012, 16:1-10.
- Ohigashi H., Minami S., Fukui H., Koshimizu K., Mizutani F., Sugiura A., Tomana T.: “Flavonols, as plant growth inhibitors from roots of peach”, *Prunus persica* Batsh, cv. 'Hakuto'. *Agric. Biol. Chem.*, 1982, 46: 2555-2561.
- Ohmura W., Doi S., Aoyama M., Ohara S.: “Antifeedant activity of flavonoids and related compounds against the subterranean termite *Coptotermes formosanus* Shiraki”, *J. Wood Sci.*, 2000, 46: 149-153.
- OIE Terrestrial Manual 2012, General Guidelines, part 3, Laboratory Methodologies for Bacterial Antimicrobial Susceptibility Testing, 1309-1321.

Omar, S.H. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Sci. Pharm.* 2010, 78, 133–154.

Osorioa, E.; Floresa, M.; Hermndeza, D.; Venturab, J.; Rodrgiez, R.; Aguilar, C. N. (2010). Biological efficiency of polyphenolic extracts from pecan nuts shell (*Carya Illinoensis*), pomegranate husk (*Punica granatum*) and creosote bush leaves (*Larrea tridentate* Cov.) against plant pathogenic fungi. *Ind. Crops Prod.*, 31, 153–157.

Palleroni N. and Norberto J.: “The *Pseudomonas* Story”, *Environ. Microb.* 2010, 12(6): 1377-1383.

Pan, H., & Lundgren, L. N. (1996). Phenolics from inner bark of *Pinus sylvestris*. *Phytochemistry*, 42(4), 1185-1189.

Paquot: “Composition of by-products from cooked fruit processing and potential use in food products”, *J. Food Compos. Anal.*, 2012, 27(1): 61–69.

Poonam V., Raunak, Kumar G., Reddy L.C.S., Jain R., Sharma S.K., Prasad A.K. and Parmar V.S.: “Chemical Constituents of the Genus *Prunus* and their Medicinal Properties”, *Cur Med Chem*, 2011, 18: 3758-3824.

Quattrucci A., Ovidi E., Tiezzi A., Vinciguerra V., Balestra G.M.: “Biological control of tomato bacterial speck using *Punica granatum* fruit peel extract”, *Crop Protection*, 2013, (46):18-22.

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., A. Panna la, Yang M. and Rice-Evans C.: “Free Radical Biology and Medicine”, 1999, 26: 1231.

Ramos C., Matas I.M., L. Bardaji L., Argon I.M., Murillo: “*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*: some like it knot”, *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13(9): 998-1009.

Ranitha M, Abdurahman H.N., Ziad A.S., Azhari H. N., ThanaRaj S.: “Optimization of microwave assisted hydrodistillation of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) using response surface methodology”, *International Journal of Research in Engineering and Technology*, 2014, eISSN: 2319-1163, pISSN: 2321-7308.

Raturi R., Singh H., Bahuguna P., Sati S.C., Badonil P.P.: “Antibacterial and antioxidant activity of methanolic extract of bark of *Prunus persica*”, *J. Appl. & Nat. Sci.*, 2011, (2): 312-314.

Ritchie D. F., Averre C. W.: “Bacterial Spot of Pepper and Tomato”, North Carolina State University College of Agriculture and Life Sciences, 2007.

Roberts, J., Ma, B., Tredway, L. P., Clarke, B., and Ritchie, D. 2012. “Identification and characterization of bacteria associated with creeping bentgrass putting greens”. *Am. Phytopath. Assn. Int. Ann. Meet* : 74836.

Romani, A., Campo, M., & Pinelli, P. (2012). HPLC/DAD/ESI-MS analyses and anti-radical activity of hydrolyzable tannins from different vegetal species. *Food Chemistry*, 130, 214-221.

Ross, R. G., Selvasubramanian, S., & Jayasundar, S. (2001). Immunomodulatory activity of *Punica granatum* in rabbits—a preliminary study. *Journal of Ethnopharmacology*, 78(1), 85-87.

Rowe J. W. (2012). Natural “Products of Woody Plants: Chemicals Extraneous to the Lignocellulosic Cell Wall”. *Springer Science & Business Media*, ISBN 978-3-642-74075.

Sánchez-Ferrer Á., Rodríguez-López J. N., García-Cánovas F. & García-Carmona F.: “Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1995, 1247(1): 1-11.

Sarris PF, Trantas EA, Mpalantinaki E, Ververidis F, Goumas De: “*Pseudomonas viridiflava*, a Multi Host Plant Pathogen with Significant Genetic Variation at the Molecular Level”, 2012, PLoS ONE 7(4): e36090.

Schaad N.W., Sowell G., Goth R.W., Colwell R.R., Webb R.E. “*Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* subsp. nov.”, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 28 (1978) 117–125.

Schieber A., Stinzing F.C. and Carle R.: “By-products of plant food processing as a source of functional compounds: recent developments”, *Trends Food Sci. Technol.*, 2001, 12(11): 401-413.

Schroth M., Hildebrand D., Panopoulos N.: “Phytopathogenic pseudomonads and related plant-associated pseudomonads”, *The Prokaryotes*, 2006, 3(3.3): 714-740.

Shiban, M. S., Al-Otaibi, M. M., & Al-Zoreky, N. S. (2012). Antioxidant Activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *Food and Nutrition Sciences*, 3(7), 991.

Shin TY, Park SB, Yoo JS, Kim IK, Lee HS, Kwon TK, Kim MK, Kim JC, Kim SH.: “Anti-allergic inflammatory activity of the fruit of *Prunus persica*: role of calcium and NF-kappa B”, PubMed, 2010, 48(10): 2797-802.

Searle, S., & Malins, C. (2013). Availability of cellulosic residues and wastes in the EU. *International Council on Clean Transportation, Washington, USA (2013 Oct)*, 7.

Sestili, P., Martinelli, C., Ricci, D., Fraternale, D., Bucchini, A., Giamperi, L., Curcio, R., Piccoli, G. and Stocchi, V., 2007. Cytoprotective effect of preparations from various parts of *Punica granatum* L. fruits in oxidatively injured mammalian cells in comparison with their antioxidant capacity in cell free systems. *Pharmacological Research*, 56(1), pp.18-26.

Smith, Dunez, Lelliot, Phillips and Archer (1988) European Handbook of Plant Disease. Blackwell Scientific Publications.

Soler-Rivas C., Jolivet S., Arpin N., Olivier J.M. & Wichers H.J.: “Biochemical and physiological aspects of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*” *FEMS microbiology reviews*, 1999, 23(5): 591-614.

Stephens W.L. and Starr M. P.: “Localization of carotenoid pigment in the cytoplasmic membrane of *Xanthomonas juglandis*”, *J.Bacteriol*, 1963, 86:1070-1074.

Sun W.H., Zhou J.Q., Zhan B.Y. (1994). Experimental study on the novel vaginal prophylactic pomegranate rind. *Reproduction and Contraception* 14, 350-353.

Taguri T., Tanaka T., Kouno I. (2006). "Antibacterial Spectrum of Plant Polyphenols and Extracts Depending upon Hydroxyphenyl Structure". *Biol. Pharm. Bull.* 29(11), 2226-2235.

Tayel, A. A.; El-Baz, A. F.; Salem, M. F.; El-Hadary, M. H. (2009). Potential applications of pomegranate peel extract for the control of citrus green mold. *J. Plant Dis. Prot.*, 116, 252–256.

Tayel, A. A.; Salem, M. F.; El-Tras, W. F.; Brimer, L. (2011). Exploration of islamic medicine plant extracts as powerful antifungals for the prevention of mycotoxigenic *Aspergilli* growth in organic silage. *J. Sci. Food Agric.*, 91, 2160–2165.

TehraniFar, A.; Selahvarzi, Y.; Kharrazi, M.; Bakhsh, V. J. (2011). High potential of agro-industrial by-products of pomegranate (*Punica granatum* L.) as the powerful antifungal and antioxidant substances. *Ind. Crops Prod.*, 34, 1523–1527.

Teviotdale B.L., Krueger W.H.: "Effects of copper sprays, defoliation, rainfall, and inoculum concentration on incidence of olive knot disease", *Plant Disease*, 2004, 88: 131-135.

Toi, M., Bando, H., Ramachandran, C., Melnick, S.J., Imai, A., Fife, R.S., Carr, R.E., Oikawa, T. and Lansky, E.P. (2003). Preliminary studies on the anti-angiogenic potential of pomegranate fractions in vitro and in vivo. *Angiogenesis*, 6(2), 121-128.

Toth Ian, Bell K., Kenneth S.; Holeva Maria C., Birch Paul R. J.: "Soft rot erwiniae: from genes to genomes", *Molecular Plant Pathology*, 2003, 4(1): 17–30.

Vendramin G.G., Fineschi S., Fady B.: "EUFORGEN Technical guidelines for genetic conservation and use: Bosnian pine, *Pinus heldreichii* syn. *Pinus leucodermis*", 2008.

Vicente J.G. & Holub E.B. : "Xanthomonas campestris pv. campestris (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops", *Molecular plant pathology*, 2013, 14(1): 2-18.

Walcott R.R.: "Bacterial fruit blotch of cucurbits", *The Plant Health Instructor*, 2005, DOI: 10.1094/PHI-I-2005-1025-02.

Wallis, C., Eyles, A., Chorbajian, R. A., Riedl, K., Schwartz, S., Hansen, R., ... & Bonello, P. (2011). Differential effects of nutrient availability on the secondary metabolism of Austrian pine (*Pinus nigra*) phloem and resistance to *Diplodia pinea*. *Forest Pathology*, 41(1), 52-58.

Wang R.F., Xie W.D., Zhang Z., Xing D.M., Ding Y., Wang W., Ma C., Du L.J. "Bioactive compounds from the seeds of *Punica granatum* (pomegranate)". *Journal of Natural Products*, 2004, 67, 2096-2098.

Wang, X., Xing, D., Ding, Y., Chen, Y., & Meng, Z. (2005). Determination and pharmacokinetic study of brevifolin in rat after ig administration of pomegranate leaf extract. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 21(3), 369-372.

Wang X.Y., Gao X.L., Mai E.M. (2008). Advances in pharmacological studies of *Punica granatum*. L. *China Medical Herald* 5, 13-15

Wang R., Ding Y., Liu R., Xiang L., Du L.: “Pomegranate: Constituents, Bioactivities and Pharmacokinetics”, *Global Science Books*, 2010, (4): 77-87.

Watson D.G., Φαρμακευτική Ανάλυση 2^η Έκδοση, 2005, Παρισιάνου Α.Ε. ISBN 978-960-394-772-6.

Wijngaard H.H., Ballay M. and Brunton N.: “The optimisation of extraction of antioxidants from potato peel by pressurised liquids”, *Food Chem.*, 2012, 133(4):1123-1130.

Willems A, Goor M, Thielemans S, Gillis M, Kersters K, De Ley J. “Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. nov., comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjaci*”. *International journal of systematic bacteriology*. 1992, 42(1):107-19.

Williams P.H.: “Black rot: a continuing threat to world crucifers”, *Plant Dis.*, 1980, 64: 736-742.

Woude H. van der, Gliszczynska-Swiglo A., Struijs K., Smeets A., Alink G.M., Rietjens I.M.: “Biphasic modulation of cell proliferation by quercetin at concentrations physiologically relevant in humans”, *Cancer Lett.*, 2003, 200: 41-47.

Yamasaki, M., Kitagawa, T., Koyanagi, N., Chujo, H., Maeda, H., Kohno-Murase, J., Imamura, J., Tachibana, H. and Yamada, K. (2006). Dietary effect of pomegranate seed oil on immune function and lipid metabolism in mice. *Nutrition*, 22(1): 54-59.

Yang, X., Zhang, Y. C., Zhang, H., & Wang, J. (2008). Isolation and identification of diterpenoids from *Pinus koraiensis*. *Zhong yao cai= Zhongyaocai= Journal of Chinese medicinal materials*, 31(1), 53-55.

Yesil-Celiktas, Ozlem, et al.: “Determination of polyphenolic constituents and biological activities of bark extracts from different *Pinus* species”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2009, 89.8: 1339-1345.

Young J.M.: “Olive knot and its pathogens”, *Australian Plant Pathology*, 2004, 33: 33-39.

Yu J. and Ahmedna M.: “Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications”, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2013, 48(2): 221-237.

Zhang J, Zhan B.Y., Yao X.J., (1995). “Experimental study on the anti-herpes virus of pomegranate rind”. *Chinese Journal of Traditional Medical Science and Technology* 2, 28-30

Zhang J, Zhan B.Y., Yao X.J., (1995). "In vitro inactivation of hepatitis virus B (HBV) by pomegranate rind and its clinical significance". *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica* 13, 29-31.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Δρογούδη Π., Βασιλακάκης Μ., Θωμίδης Θ., Ναβροζίδης Ε., Παντελίδης Γ.,: "Εγχειρίδιο για την καλλιέργεια της ροδιάς", Ελληνικός Γεωργικός Οργανισμός "ΔΗΜΗΤΡΑ", 2012.

Ελένα Κ.: "Μύκητες του γένους *Phytophthora* στην Ελλάδα. Είδη-Ασθένειες", Τεχνικό Δελτίο αρ. 13, Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, Κηφισιά, 1999, σ. 94.

Ποντίκης Κ.Α.: "Ειδική Δενδροκομία Ακρόδρυα-Πυρηνόκαρπα-Λοιπά Καρποφόρα", Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Αθήνα 1996, σ 205-210, ISBN 960-351-080-7.

Σαμουήλ Σ., Ιακωβίδης Τ., Νεοφύτου Γ.: "Ασθένειες Μηλοειδών", Υπουργείο Γεωργίας, Φυτικών Πόρων και Περιβάλλοντος, Τμήμα Γεωργίας, Κύπρος, 2013.

Χατζόπουλος Π.: "Βιοτεχνολογία Φυτών", Εκδόσεις Έμβρυο, 2001, ISBN 960-8002-08-7.