



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

***S. aromaticum* ekstrakto poveikis braškių antioksidacinei  
sistemai ir galimybės kontroliuoti pilkąjį puvinį**

Baigiamasis magistro projektas

---

**Greta Laurinaitytė**

Projekto autorė

**Doc. dr. Ilona Jonuškienė**

Vadovė

**M. d. dr. Lina Dėnė**

Konsultantė

---

**Kaunas, 2024**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

***S. aromaticum* ekstrakto poveikis braškių antioksidacinei sistemai ir galimybės kontroliuoti pilkąjį puvinį**

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

---

**Greta Laurinaitytė**

Projekto autorė

**Doc. dr. Ilona Jonuškienė**

Vadovė

**M. d. dr. Lina Dėnė**

Konsultantė

**Doc. dr. Neringa Petrašauskienė**

Recenzentė

---

**Kaunas, 2024**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos pavadinimas

Greta Laurinaitytė

## ***S. aromaticum* ekstrakto poveikis braškių antioksidacinei sistemai ir galimybės kontroliuoti pilkąjį puvinį**

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

1. baigiamąjį projektą parengiau savarankiškai ir sąžiningai, nepažeisdama(s) kitų asmenų autoriaus ar kitų teisių, laikydamasi(s) Lietuvos Respublikos autorių teisių ir gretutinių teisių įstatymo nuostatų, Kauno technologijos universiteto (toliau – Universitetas) intelektinės nuosavybės valdymo ir perdavimo nuostatų bei Universiteto akademinės etikos kodekse nustatytų etikos reikalavimų;
2. baigiamajame projekte visi pateikti duomenys ir tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti teisėtai, nei viena šio projekto dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar elektroninių šaltinių, visos baigiamojo projekto tekste pateiktos citatos ir nuorodos yra nurodytos literatūros sąrašė;
3. įstatymų nenumatytų piniginių sumų už baigiamąjį projektą ar jo dalis niekam nesu mokėjęs (-usi);
4. suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo ar kitų asmenų teisių pažeidimo faktui, man bus taikomos akademinės nuobaudos pagal Universitete galiojančią tvarką ir būsiu pašalinta(s) iš Universiteto, o baigiamasis projektas gali būti pateiktas Akademinės etikos ir procedūrų kontrolieriaus tarnybai nagrinėjant galimą akademinės etikos pažeidimą.

Greta Laurinaitytė

*Patvirtinta elektroniniu būdu*

Laurinaitytė, Greta. *S. aromaticum* ekstrakto poveikis braškių antioksidacinei sistemai ir galimybės kontroliuoti pilkąjį puvinį. Magistro baigiamasis projektas; vadovė doc. dr. Ilona Jonuškienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas; konsultantė m. d. dr. Lina Dėnė, Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centras, Sodininkystės ir daržininkystės institutas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų krypties grupė): Biotechnologijos, Technologijų mokslai.

Reikšminiai žodžiai: antioksidacinis atsakas, augalinis ekstraktas, biokontrolė, braškių pilkasis puvinys, *Syzygium aromaticum*.

Kaunas, 2024. 73 p.

## Santrauka

Alternatyvios antigrybinės medžiagos yra ypač svarbios kovojant su didele ekonomine reikšme turinčiomis ligoms, tokiomis kaip braškių pilkasis puvinys, sukeltas *B. cinerea*. Šis patogenas gali paveikti daug augalų šeiminių, o dėl gausaus fungicidų naudojimo ir išsivysčiusio patogenų atsparumo ieškomi nauji būdai kovoti su pilkuoju puvinio augimo metu ir sandėliuojant derlių. Turtingas įvairiomis veikliosiomis savybėmis pasižyminčių junginių, gvazdikmedis (lot. *Syzygium aromaticum*) ir iš jo išgaunami ekstraktai bei eteriniai aliejai pasižymi antimikrobinu, antigrybinu ir antioksidaciniu aktyvumu. Gvazdikmedžio pumpurų ekstraktų naudojimas rodo daug žadančius rezultatus kontroliuojant grybines augalų ligas, tačiau augalų reakcija į alternatyvią apsaugą naudojant augalinės kilmės produktus iki šiol tiksliai nėra žinoma. Biotinis ir abiotinis aplinkos stresas augaluose sukelia antioksidacinės sistemos pokyčius, ir nors yra pranešimų apie ekstraktų ir eterinių aliejų antigrybinį poveikį ir antioksidacinį aktyvumą atskirai, tačiau iki šiol nėra atlikta pakankamai kompleksinių tyrimų, vertinančių antigrybinį aktyvumą kartu su poveikiu augalų antioksidacinei sistemai ir antrinių metabolitų sintezei.

Šio darbo metu buvo tiriamas braškių augalų antioksidacinis atsakas paveikus gvazdikmedžio ekstraktu kartu su šio ekstrakto gebėjimu slopinti pilkąjį puvinį braškėse. Pirmiausia, gvazdikmedžio pumpurų ekstraktas, gautas subkizinės CO<sub>2</sub> ekstrakcijos būdu, buvo tiriamas kontroliuojamoje aplinkoje auginamose braškėse, vertinant pilkojo puvinio (lot. *Botrytis cinerea*) infekcijos slopinimą. Toliau, siekiant ištirti augalų reakciją į gvazdikmedžio ekstraktą, ABTS, DPPH ir FRAP metodais buvo įvertintas antioksidacinis aktyvumas sveikų ir pilkojo puvinio pažeistų braškių lapuose skirtingais eksperimento etapais. Taip pat buvo nustatytas fenolinių junginių, chlorofilo *a*, chlorofilo *b* ir karotinoidų koncentracijų pokytis. Rezultatai parodė, kad tyrimuose naudotas 0,20 % koncentracijos gvazdikmedžio ekstraktas pasižymėjo silpnu *B. cinerea* sukeltos infekcijos slopinimu braškėse, auginantose šiltnamyje. Ekstraktu paveiktose sveikose ir pilkojo puvinio pažeistose braškėse, vertinant skirtingais eksperimento laikotarpiais, nustatytas didėjantis ABTS antioksidacinis aktyvumas, mažėjantis DPPH antioksidacinis aktyvumas ir kintantis FRAP antioksidacinis aktyvumas. Kintanti tendencija fiksuota ir vertinant bendrą fenolinių junginių, chlorofilų ir karotinoidų koncentraciją. Nustatyta padidėjusi šių junginių koncentracija sveikose ir pilkojo puvinio pažeistose braškėse, kuri eksperimento eigoje sumažėjo. Apibendrinant galima teigti, jog nors parodė nežymų braškių pilkojo puvinio slopinimą realiomis augimo sąlygomis, gvazdikmedžio ekstraktas nedemonstravo neigiamos įtakos braškių antioksidacinės sistemos veiklai ir antrinių metabolitų koncentracijoms, tad turi aukštą potencialą tolesniems antigrybinio poveikio tyrimams ir pritaikymui.

Laurinaitytė, Greta. Impact of *S. aromaticum* Extract on the Antioxidant System of Strawberry and its Potential to Control Grey Mould. Master's Final Degree Project; supervisor Assoc. Prof. dr. Ilona Jonuškienė; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology; consultant researcher dr. Lina Dėnė, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Institute of Horticulture.

Study field and area (study field group): Biotechnology, Technological Sciences.

Keywords: antioxidant response, biocontrol, plant extract, strawberry grey mould, *Syzygium aromaticum*.

Kaunas, 2024. 73.

### Summary

Alternative antifungal materials are very important for controlling diseases with high economic significance, such as strawberry grey mould, caused by *Botrytis cinerea*. This pathogen can affect a wide range of plant hosts, and the widespread application of fungicides and the development of pathogen resistance has led researchers to look for novel alternative methods of controlling grey mould during plant growth and storage. Clove (*Syzygium aromaticum*) extracts and essential oils have antimicrobial, antifungal and antioxidant activity due to high concentrations of secondary metabolites. Although the application of clove bud extracts appears to be effective in controlling fungal plant diseases, little is known about how plants react to other plant-based compounds used for protection. Environmental stress, both biotic and abiotic, induces changes in the antioxidant system of plants. While there are separate reports on the antifungal properties and antioxidant activity of essential oils and plant extracts, comprehensive studies that evaluate antifungal activity, impact on the plant antioxidant system, and the synthesis of secondary metabolites during the growth of plants are still lacking.

This research investigated how clove extract affected strawberry plants' antioxidant system along with the ability of this extract to prevent gray mould in strawberries. Firstly, the ability of subcritical CO<sub>2</sub> clove bud extract to inhibit grey mould (*Botrytis cinerea*) infection in strawberry leaves during growth in a controlled environment was examined. Secondly, the antioxidant activity in the leaves of both healthy and gray mould damaged strawberry leaves was evaluated at different stages of the experiment using ABTS, DPPH and FRAP methods to determine how plants responded to clove bud extract. It was also determined how the concentrations of phenolic compounds, chlorophyll *a*, *b* and carotenoids changed in the plants. Results revealed that clove extract at a dosage of 0,20 % minimally inhibited infection caused by *B. cinerea* in the leaves of strawberry plants cultivated in a greenhouse. Increasing ABTS antioxidant activity, reducing DPPH antioxidant activity and changing FRAP antioxidant activity was observed and different experimental periods in strawberries exposed to the extract, both healthy and gray mould infected. When evaluating concentration of carotenoids, chlorophylls, and total phenolics, an overall changing tendency was also observed. Throughout the study, the concentration of these substances decreased from higher values in both healthy and gray mould damaged strawberries. It can be concluded that, even though clove bud extract minimally inhibited grey mould during strawberry growth, it did not have negative impact on secondary metabolite concentrations or the activity of the strawberry antioxidant system, and it has a high potential for further antifungal research and application.

## Turinys

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Lentelių sąrašas .....</b>   | <b>8</b>  |
| <b>Paveikslų sąrašas .....</b>  | <b>9</b>  |
| <b>Santrumpų ir terminų sąrašas .....</b>   | <b>10</b> |
| <b>Įvadas.....</b>  | <b>11</b> |
| <b>1. Literatūros apžvalga .....</b>  | <b>13</b> |
| 1.1. Augalų patogenai ir jų sukeltos ligos .....  | 13        |
| 1.1.1. <i>Botrytis</i> genties grybai .....   | 14        |
| 1.2. Sodo ir daržo augalų ligų kontrolė .....   | 16        |
| 1.2.1. Cheminė augalų ligų kontrolė .....   | 17        |
| 1.2.2. Biologinė augalų ligų kontrolė .....   | 17        |
| 1.2.3. Alternatyvios augalų apsaugos priemonės .....  | 18        |
| 1.3. Antriniai augalų metabolitai ir biologiškai aktyvios medžiagos .....   | 20        |
| 1.3.1. Augalų atsakas į stresą ir aplinkos poveikį.....   | 22        |
| 1.4. Gvazdikmedžio (lot. <i>Syzygium aromaticum</i> ) apibūdinimas, paplitimas, panaudojimo būdai .   | 23        |
| 1.4.1. Gvazdikmedžio ekstraktų ir eterinių aliejų aktyviosios medžiagos .....   | 24        |
| 1.4.2. Gvazdikmedžio ekstraktų biologinis aktyvumas.....  | 25        |
| 1.5. Literatūros apžvalgos apibendrinimas .....   | 27        |
| <b>2. Medžiagos ir tyrimų metodai .....</b>   | <b>28</b> |
| 2.1. Tyrimų atlikimo vieta .....  | 28        |
| 2.2. Tyrimų eiga .....  | 28        |
| 2.3. Tyrimų metu naudota įranga ir reagentai .....  | 28        |
| 2.4. Ekstrakto gamyba .....   | 29        |
| 2.5. <i>B. cinerea</i> kolonijų paruošimas augalų užkrėtimui .....  | 30        |
| 2.6. Eksperimento su braškių augalais vykdymas .....  | 31        |
| 2.7. Braškių lapų mėginių paruošimas biocheminiams tyrimams.....  | 34        |
| 2.8. Braškių antioksidacinės sistemos atsako pokyčių tyrimai.....   | 35        |
| 2.8.1. Antioksidacinio aktyvumo braškių lapuose nustatymas ABTS metodu .....  | 35        |
| 2.8.2. Antioksidacinio aktyvumo braškių lapuose nustatymas DPPH metodu .....  | 36        |
| 2.8.3. Antioksidacinio aktyvumo braškių lapuose nustatymas FRAP metodu.....   | 37        |
| 2.9. Braškių lapų bendros fenolinių junginių koncentracijos nustatymo tyrimas pagal Folino –<br>Kiokalto metodą .....                                 | 38        |
| 2.10. Chlorofilų <i>a</i> , <i>b</i> ir karotinoidų koncentracijos nustatymas braškių lapuose .....   | 39        |
| 2.11. Tyrimų duomenų analizė ir apdorojimas.....  | 39        |
| <b>3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....</b>  | <b>40</b> |
| 3.1. Pilkojo puvinio (lot. <i>B. cinerea</i> ) slopinimas gvazdikmedžio ekstraktu braškių augimo metu.  | 40        |
| 3.2. Sausos medžiagos braškių lapuose .....   | 43        |
| 3.3. Antioksidacinės braškių sistemos atsakas į poveikį gvazdikmedžio ekstraktu .....   | 43        |
| 3.3.1. Antioksidacinio aktyvumo braškių lapuose nustatymo ABTS metodu rezultatai.....   | 44        |
| 3.3.2. Antioksidacinio aktyvumo braškių lapuose nustatymo DPPH metodu rezultatai.....   | 45        |
| 3.3.3. Antioksidacinio aktyvumo braškių lapuose nustatymo FRAP metodu rezultatai .....  | 46        |
| 3.4. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos pokyčiai veikiant gvazdikmedžio ekstraktui<br>sveikose ir pilkojo puvinio pažeistose braškėse ..... | 48        |
| 3.5. Chlorofilų ir karotinoidų koncentracijų pokyčiai į poveikį gvazdikmedžio ekstraktu sveikose ir<br>pilkojo puvinio pažeistose braškėse .....      | 50        |

|                                     |           |
|-------------------------------------|-----------|
| <b>4. Rekomendacijų dalis .....</b> | <b>55</b> |
| <b>Išvados .....</b>                | <b>58</b> |
| <b>Literatūros sąrašas .....</b>    | <b>59</b> |

## Lentelių sąrašas

|  |    |
|--|----|
| <b>1.1 lentelė.</b> Augalų grybinių, bakterinių ir virusinių ligų pavyzdžiai ..... | 13 |
| <b>2.1 lentelė.</b> Eksperimento su braškių augalais variantai .....               | 32 |
| <b>2.2 lentelė.</b> Eksperimento metu surinkti braškių lapų ėminiai .....          | 34 |
| <b>3.1 lentelė.</b> Braškių lapų liofilizuotos ir žalios masės santykis .....      | 43 |
| <b>4.1 lentelė.</b> Subkizinėje CO <sub>2</sub> ekstrakcijoje naudota įranga ..... | 55 |



## Paveikslų sąrašas

|  |    |
|--|----|
| <b>1.1 pav.</b> <i>B. cinerea</i> ligos ciklas braškėse [42] .....   | 16 |
| <b>1.2 pav.</b> Karvakolio (a), timolio (b) ir eugenolio (c) cheminė struktūra [92] .....  | 21 |
| <b>1.3 pav.</b> Gvazdikmedžio žiedpumpuriai [107] .....  | 23 |
| <b>2.1 pav.</b> Tyrimo eiga ir pagrindiniai etapai .....   | 28 |
| <b>2.2 pav.</b> Gvazdikmedžio (lot. <i>Syzygium aromaticum</i> ) ekstrakto gavimas iš augalo pumpurų .....   | 30 |
| <b>2.3 pav.</b> 7 parų <i>B. cinerea</i> kolonija Petri lėkštelėje .....   | 31 |
| <b>2.4 pav.</b> Braškių eksperimento įrengimas LAMMC SDI Augalų fiziologijos laboratorijos šiltnamyje .....  | 31 |
| <b>2.5 pav.</b> Braškių trilapių užkrėtimas <i>B. cinerea</i> .....  | 32 |
| <b>2.6 pav.</b> <i>B. cinerea</i> pažeidimo skalė ant braškių lapų [7] .....   | 33 |
| <b>2.7 pav.</b> Pilkojo puvinio (lot. <i>B. cinerea</i> ) sukulto pažeidimo ir braškių lapo matavimas slankmačiu .....                                     | 33 |
| <b>2.8 pav.</b> Braškių lapų mėginių centrifugavimas (a); nucentrifuguotas ekstraktas (b) .....  | 35 |
| <b>2.9 pav.</b> Spalvos kitimas atliekant ABTS tyrimą (a); ABTS tyrimo reakcijos (b) .....   | 35 |
| <b>2.10 pav.</b> Spalvos kitimas atliekant DPPH tyrimą (a); DPPH tyrimo reakcijos (b) .....  | 36 |
| <b>2.11 pav.</b> Spalvos kitimas atliekant FRAP tyrimą (a); FRAP tyrimo reakcijos (b) .....  | 37 |
| <b>2.12 pav.</b> Spalvos kitimas atliekant FC tyrimą (a); <i>Folin – Ciocalteu</i> reagento redukcija, kurią sukelia fenolių oksidacija mėginyje (b) ..... | 38 |
| <b>3.1 pav.</b> Pilkojo puvinio pažeidimo intensyvumas balais braškių lapuose vertinant 4 ir 7 parą po užkrėtimo .....                                     | 40 |
| <b>3.2 pav.</b> Pažeistų lapų dalis (%) praėjus 4 ir 7 paroms po užkrėtimo .....   | 41 |
| <b>3.3 pav.</b> Antioksidacinis ABTS aktyvumas (mM TE/g) braškių lapuose skirtinguose eksperimento etapuose .....  | 44 |
| <b>3.4 pav.</b> Antioksidacinis DPPH aktyvumas (mM TE/g) braškių lapuose skirtinguose eksperimento etapuose .....  | 45 |
| <b>3.5 pav.</b> Antioksidacinis FRAP aktyvumas (μmol TE/g) braškių lapuose skirtinguose eksperimento etapuose .....  | 46 |
| <b>3.6 pav.</b> Braškių lapų bendroji fenolinių junginių koncentracija (mg GAE/g) .....  | 48 |
| <b>3.7 pav.</b> Chlorofilo <i>a</i> koncentracija (mg/g) braškių lapuose .....   | 50 |
| <b>3.8 pav.</b> Chlorofilo <i>b</i> koncentracija (mg/g) braškių lapuose .....   | 51 |
| <b>3.9 pav.</b> Chlorofilo <i>a</i> ir <i>b</i> koncentracija (mg/g) braškių lapuose .....   | 52 |
| <b>3.10 pav.</b> Karotinoidų (ksantofilų ir karotinų) koncentracija (mg/g) braškių lapuose .....   | 53 |
| <b>4.1 pav.</b> Subkryzinės CO <sub>2</sub> ekstrakcijos aparatūrinė schema .....  | 56 |

## Santrumpų ir terminų sąrašas

### Santrumpos:

ABTS – 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonrūgštis;

ABTS<sup>•+</sup> – ABTS radikalo katijonas;

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas;

DPPH<sup>•</sup> – DPPH radikalas;

DPU – dienos po užkrėtimo;

FC – *Folin-Ciocalteu* tyrimas/reagentas;

FRAP – geležį redukuojančios antioksidacinės galios tyrimas;

GV – purkštos gvazdikmedžio 0,20 % koncentracijos ekstraktu ir nekrėstos braškės;

GV-BC – purkštos gvazdikmedžio 0,20 % koncentracijos ekstraktu ir *B. cinerea* užkrėstos braškės;

KONTR – nepurkštos ekstraktu ir nekrėstos braškės;

KONTR-BC – nepurkštos ekstraktu ir *B. cinerea* užkrėstos braškės;

LAAMC – Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centras;

SDI – Sodininkystės ir daržininkystės institutas;

TE – Trolokso ekvivalentas;

TPTZ – 2,4,6-tripiridil-s-triazinas.

### Terminai:

Nekrotrofai – parazitiniai organizmai, naikinantys gyvas šeimininko ląsteles, o vėliau mintantys negyva arba mirštančia medžiaga ir gaunantys iš to energiją.

## Įvadas

Didėjant tvariai ir ekologiškai maisto produkcijos paklausai, siekiant patenkinti vartotojų poreikius ir prisitaikyti prie pokyčių pasaulinėje maisto rinkoje, auga efektyvių, aplinką tausojančių ūkininkavimo metodų poreikis [1]. Maždaug trečdalis per metus pasaulyje pagaminamo žmonėms vartoti skirto maisto yra prarandama arba iššvaistoma dėl fizinės žalos augalams, netinkamo tvarkymo, sandėliavimo ir transportavimo, blogų pakuočių, senėjimo ir įvairių patogenų sukeltamų ligų [2]. Grybai yra atsakingi už daugybę augalų ligų, kurios daro žalą ir nuostolius maistiniams pasėliams visame pasaulyje juos auginant ir sandėliuojant, o kai kurios patogeninių grybų gaminamos ir išskiriamos medžiagos yra toksiškos [3]. Daugybę metų sintetiniai fungicidai buvo pagrindinė priemonė kovoje su grybiniais augalų patogenais, tačiau didėjant susirūpinimui ir rizikai, kylančiai dėl fungicidų likučių aplinkoje ir maisto produktuose, ieškoma alternatyvių augalų apsaugos priemonių [4]. Pastaraisiais metais sparčiai tiriama antigrybinių medžiagų šaltiniai – augaliniai ekstraktai ir eteriniai aliejai, pasižymintys biologiniu aktyvumu dėl juose susikaupusių cheminių junginių, turinčių slopinamąjį poveikį patogenams [5]. Patogenų sukulto streso metu braškių augaluose vyksta antioksidacinės ir fotosintezės sistemų pokyčiai. Nepaisant to, natūralūs junginiai, esantys augalų ekstraktuose, taip pat daro įtaką augalo gynybiniam atsakui, sukeldami pokyčius tose pačiose sistemose. Biologiškai aktyvios medžiagos gali turėti augimą skatinantį poveikį, padidinti antioksidacinį aktyvumą, atsparumą stresui, biotiniam ir abiotiniam poveikiui. Reaguodami į padidėjusį oksidacinį stresą, augalai padidina kai kurių mažos molekulinės masės antioksidantų (pvz., vitamino C, E, fenolio rūgščių, karotinoidų) ir didelės molekulinės masės antrinių metabolitų (pvz., tanino), gamybą ir kaupimąsi [6]. Fenolinių junginių kiekis yra vienas iš pagrindinių augalų reakcijos į stresą rodiklių ir rodo natūralią augalų apsaugą nuo patogenų. Augalų ekstraktai tiriama ir taikomi tvarios augalų apsaugos srityje, o šios alternatyvios antigrybinės medžiagos ypač svarbios pagrindinių ekonominiu požiūriu svarbių patogenų, tokių kaip *Botrytis cinerea* (braškių pilkojo puvinio sukėlėjas), kontrolei [7]. Vienas iš aromatinių vaistinių augalų, sulaukiantis daug susidomėjimo augalų ligų kontrolėje, yra *Syzygium aromaticum*, žinomas kaip gvazdikmedis. Augalas priklauso *Myrtaceae* šeimai ir dėl jame esančių antrinių metabolitų yra pripažintas vertingu antivirusinio, antibakterinio, antioksidacinio ir antigrybinio poveikio šaltiniu [8]. Laboratorinėmis sąlygomis augalinių ekstraktų ir eterinių aliejų antigrybinis poveikis patogenams yra gana plačiai tiriama, tačiau nėra daug eksperimentų, kuomet ligoms slopinti jie naudojami realiomis augalų augimo sąlygomis. Ne mažiau svarbi augalų antioksidacinės sistemos reakcija į patogeno poveikį bei tiriamojo augalo ekstraktą. Ir nors yra pranešimų apie ekstraktų ir eterinių aliejų antigrybinį poveikį ir antioksidacinį aktyvumą atskirai, tačiau iki šiol nėra atlikta pakankamai kompleksinių tyrimų, vertinančių antigrybinį aktyvumą kartu su poveikiu augalų antioksidacinei sistemai ir antrinių metabolitų sintezei. Kompleksiniai eksperimentai padėtų identifikuoti ne tik efektyvias ligai slopinti, bet ir teigiamai veikiančias augalų medžiagas.

**Darbo tikslas** – ištirti pilkojo puvinio slopinimą gvazdikmedžio CO<sub>2</sub> ekstraktu braškėse ir šio ekstrakto poveikį antioksidacinei braškių sistemai bei antrinių metabolitų koncentracijai.

### **Darbo uždaviniai:**

1. ištirti gvazdikmedžio ekstrakto gebėjimą slopinti pilkąjį puvinį (lot. *B. cinerea*) braškių augimo metu;

2. įvertinti antioksidacinės braškių sistemos atsako pokyčius į gvazdikmedžio ekstraktą sveikose ir pilkojo puvinio pažeistose braškėse;
3. nustatyti fenolinių junginių koncentracijų pokyčius į poveikį gvazdikmedžio ekstraktu sveikose ir pilkojo puvinio pažeistose braškėse;
4. įvertinti gvazdikmedžio ekstrakto įtaką chlorofilo *a* ir *b* bei karotinoidų koncentracijoms sveikose ir pilkojo puvinio pažeistose braškėse;
5. nubraižyti gvazdikmedžio CO<sub>2</sub> ekstrakto gamybos aparatūrinę schemą ir pateikti tolimesnes gvazdikmedžio ekstrakto tyrimų rekomendacijas.

## 1. Literatūros apžvalga

### 1.1. Augalų patogenai ir jų sukeltos ligos

Augalų patogenai, arba fitopatogeniniai mikroorganizmai, sukeltys biotines (infekcines) ligas augaluose – tai grybai, bakterijos, virusai, viroidai ir pirmuonys. Infekcinė liga pasireiškia fitopatogeno gebėjimu užkrėsti augalą ir plisti iš paveikto augalo į sveiką, sukeldami tą pačią ligą ir simptomus [9]. Kadangi augalų patogenai paprastai yra dažniau veikiami įvairių veiksnių, ligų rizikai ir plitimui didelę įtaką daro aplinkos sąlygos, o pagrindiniai veiksniai yra: temperatūra, šviesos ir vandens prieinamumas, dirvožemio derlingumas, vėjo greitis ir atmosferos ozono, metano ir CO<sub>2</sub> koncentracija [10, 11]. Augalų ligos veikiamos klimato kaitos, todėl tokie kintamieji, kaip temperatūra ir krituliai, yra stebimi, reguliuojami ir naudojami priimant sprendimus ir įvertinant augalų ligų riziką [10]. Siekiant išmaitinti sparčiai gausėjantį pasaulio gyventojų skaičių, labai svarbu kontroliuoti augalų ligas, teikti kokybišką ir gausų maistą, pašarus. Augalų ligoms kontroliuoti arba gydyti gali būti taikomos įvairios augalų ligų valdymo strategijos [12]. Augalų ligos gali turėti pražūtingų ekonominių, socialinių ar ekologinių pasekmių pasauliniu mastu. Ne visos ligos yra vienodos pagal sukeltą žalą ir užkrečiamų pasėlių tipą [11]. Įvairios patogenų grupės augalus puola atskirai, tačiau pasitaiko atvejų, kai keli patogenų kompleksai sukelia sudėtingesnių ligų. Augalų kenkėjai gali užpulti įvairiais būdais: kolonizuoti augalo audinius, nusėsti ant augalo šeimininko paviršiaus, užkrėsti konkrečias sritis, tokias kaip lapai, stiebai ar šaknys. Patogenai dažniausiai sukelia tokias ligas kaip puviniai (įvairių audinių, tiek požeminių, tiek antžeminių), rudavimas, vaisiaus sumažėjimas, kai kuriais atvejais net augalo šeimininko mirtį [13].

Lentelėje (žr. žemiau) pateikiami keli įprasti grybinių, bakterinių ir virusinių augalų ligų požymių ir simptomų pavyzdžiai:

**1.1 lentelė.** Augalų grybinių, bakterinių ir virusinių ligų pavyzdžiai

| Patogenas  | Liga ir jos požymiai   |
|------------|--|
| Grybai     | Dėmės (antraknozė), miltligė, rūdys, ankstyvasis ir vėlyvasis puvinys, maras, raudonasis puvinys, fuzariozė [14] |
| Bakterijos | Chlorozė, lapų dėmės su geltona aureole, vaisiaus dėmės, vėžys/opos, vainiko pūslės [15]                         |
| Virusai    | Mozaikinis lapų raštas, gelsvi lapai, susiraukšlėję lapai, šiurkštūs vaisiai [16]                                |

Augalų ligų kontrolė yra daugialypė, tačiau daugelis specifinių ligų valdymo strategijų augintojams nepasiekiamos. Daugiametis pasėlių pobūdis ir unikalūs sodininkystės reikalavimai maksimaliai produkcijos gamybai vis dar priklauso nuo kultūrinės praktikos ir cheminių kontrolės priemonių kontroliuojant ligas [17].

Patogeniniai augalų grybai sukelia didelių nuostolių ir žalos pasėliams, sumažina žemės ūkio produktų kokybę ir derlių visame pasaulyje. Šie nuostoliai kelia grėsmę pasaulinei maisto gamybai, o sukelta patogeninė infekcija laukuose ar sandėliuojant po derliaus nuėmimo gali turėti įtakos žmonių ir gyvulių sveikatai, ypač jei patogenas gamina toksinus vartojamuose produktuose [18]. Dėl

augalų ligų kasmet prarandama 10–15 % užaugintų pasaulio pasėlių, o 70–80 % iš šių ligų sukelia patogeniniai grybai [19]. Pastaraisiais metais grybinės pasėlių ligos tampa svarbia tvaraus žemės ūkio plėtros kliūtimi [20]. Per ilgą evoliucijos istoriją patogeniniai grybai ir augalai sukūrė labai specializuotus ir sudėtingus ryšius, dėl kurių atsirado bendros evoliucijos ir abipusės atrankos sistema. Todėl nuolat atsirandant naujoms patogeninių grybų atmainoms ir variacijoms, keičiasi ir jų ryšiai su augalais [21]. Grybiniai patogenai išskiria junginius, kurie susidaro fitopatogenui kontaktuojant su augalais. Fiziologinės ir biocheminės reakcijos, vykstančios paviršiaus molekulių kontakto ir signalo perdavimo metu, sukelia toksiškų junginių metabolizmą grybuose, o jie veikia kaip patogenai augalams [22]. Iki šiol yra nustatyta daugiau nei 10 000 su augalais susijusių grybų rūšių, todėl nenuostabu, kad grybinės infekcijos padaro daugiau žalos nei ligos, sukeltos kitų patogeninių mikroorganizmų [23]. Yra atlikta daugybė molekulinės augalų patologijos tyrimų ir specialistų apklausų, kurie leido atrinkti dešimt reikšmingiausių fitopatogeninių grybų: *Magnaporthe oryzae*, *Botrytis cinerea*, *Puccinia* spp., *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Blumeria graminis*, *Mycosphaerella graminicola*, *Colletotrichum* spp., *Ustilago maydis*, *Melampsora lini*, *Phakopsora pachyrhizi*, *Rhizoctonia solani* [24]. Gedimą sukeltantys organizmai (*Botrytis cinerea*, įvairios *Alternaria*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus* ar *Cladosporium* genčių rūšys) daro nuostolius daugiau nei 200 augalų rūšių, o kai kurie iš šių patogenų yra susiję su aplinkos ir produktų užterštumu mikotoksinais, nuodingais gyvūnams ir žmonėms. Tarp svarbiausių grybų genčių, gaminančių mikotoksinius, yra *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. ir *Penicillium* spp. [25].

### 1.1.1. *Botrytis* genties grybai

*Botrytis* genties grybai yra vieni iš plačiausiai paplitusių augalų patogenų planetoje ir užkrečiantys įvairias augalų rūšis beveik visose klimato zonose, kur auga jų šeimininkai – nuo atogrąžų ir tropinių vietovių iki vidutinio klimato zonų Šiaurės ir Pietų Žemės rutulio regionuose, įskaitant vietoves, kuriose augalai auginami itin šaltu oru, pvz., arktinėje tundroje, arba kur ūkininkaujama dykumoje [26, 27]. *Botrytis* spp. sukelia augalų ligas ir didelius derliaus nuostolius ir laukuose, ir šiltnamiuose auginamiems pasėliams, taip pat yra svarbūs patogenai ir po derliaus nuėmimo [27]. Platų šeimininkų spektrą turintys patogenai, pvz., *B. cinerea* ir *B. pseudocinerea*, gali užkrėsti daug skirtingų kultūrų ir ekonominiu požiūriu paveikia įvairius augalus, pavyzdžiui, pomidorus, svogūnus, česnakus, vynuoges, pipirus, obuolius, kriaušes, avietes, braškes, skintas gėles ir kt. [27, 28]. Kiti *Botrytis* spp. grybai turi siaurą šeimininkų diapazoną. Specifiniai patogenai dažnai pavadinami savo šeimininko vardu, pavyzdžiui, *B. tulipae* yra viena iš daugelio rūšių, kuri puola konkretų augalą, šiuo atveju tik *Tulipa* spp., *B. narcissicola* yra *Narcissus* genties patogenas [26]. Kai kuriais atvejais kelios *Botrytis* rūšys gali turėti tą patį šeimininką, pvz., *B. squamosa*, *B. allii* ir *B. aclada* kelia didelę ekonominę grėsmę komercinei svogūnų gamybai. Taip pat svarbu tai, kad *B. squamosa* yra būdinga ir patogeniška svogūnams, česnakams ir porams (lot. *Allium* spp.), o jai giminingos seserinės rūšys – tik lelijoms (lot. *B. elliptica*) ir vienadienėms lelijoms (lot. *B. deweyae*) [29, 30]. *Botrytis* gentis susideda iš ~35 nekrotrofinių<sup>1</sup> rūšių, turinčių įtakos ir užkrečiančių daugiau nei 1400 skirtingų augalų rūšių, apimančių beveik 600 genčių, tačiau šie skaičiai nuolat didėja ir tai tik įrodo, kaip greitai keičiasi *Botrytis* gentis [26, 27, 32]. *Botrytis* spp. pasižymi kultūrine morfologija, virulentiškumu ir šeimininkų diapazonu bei specifiškumu. Visus pilkojo puvinio grybus vienija jų nekrotrofinis gyvenimo būdas, sukeltantis ląstelių mirtį, siekiant gauti maistinių medžiagų ir vėliau kolonizuojant

<sup>1</sup> Nekrotrofai – parazitiniai organizmai, naikinantys gyvas šeimininko ląsteles, o vėliau mintantys negyva arba mirštančia medžiaga ir gaunantys iš to energiją [31].

negyvus augalų audinius [30, 33]. Pilkąjį puvinį sukeliantys *Botrytis* genties grybai yra eukariotai, priklausantys grybų (lot. *Fungi*) karalystei. Morfologiškai jiems būdinga smulki, balta arba pilkai balta grybiena, atsirandanti ant užkrėstos, nekrozuojančios ar supuvusios augalo šeimininko vietos [34]. Kai užkrėstas plotas ant augalo didėja, pažeidimai tampa tamsesni, o kraštai lieka blyškūs. Pilkos sporų masės (kuriuose yra konidijakočių su konidijomis) atsiranda pažengusios kolonizacijos metu, kai kurie izoliatai gamina labai melanizuotus skleročius, kad ilgiau išliktų. Tinkamomis aplinkos sąlygomis skleročiai gali sudygti, kad susidarytų apotecijos arba grybiena, iš kurių susidaro konidijakočiai, turintys konidijų, kurios yra pagrindinis užkrato šaltinis. Nors šis mikroskopinis grybas gali daugintis lytiškai, gamtoje apoteciai randami retai [29]. *Botrytis* spp. grybai yra aktyvūs įvairiuose temperatūrų diapazonuose, bet sparčiausiai sporos dygsta ir užkrečia šeimininką esant 20–25 °C temperatūrai ir didelei drėgmei. *Botrytis* genties grybai gali būti aktyvūs ir santykinai žemoje temperatūroje, pavyzdžiui, sandėliuojant pasėlius 0–10 °C temperatūroje *Botrytis* auga ir sparčiai plinta [35, 36].

#### 1.1.1.1. *Botrytis cinerea*

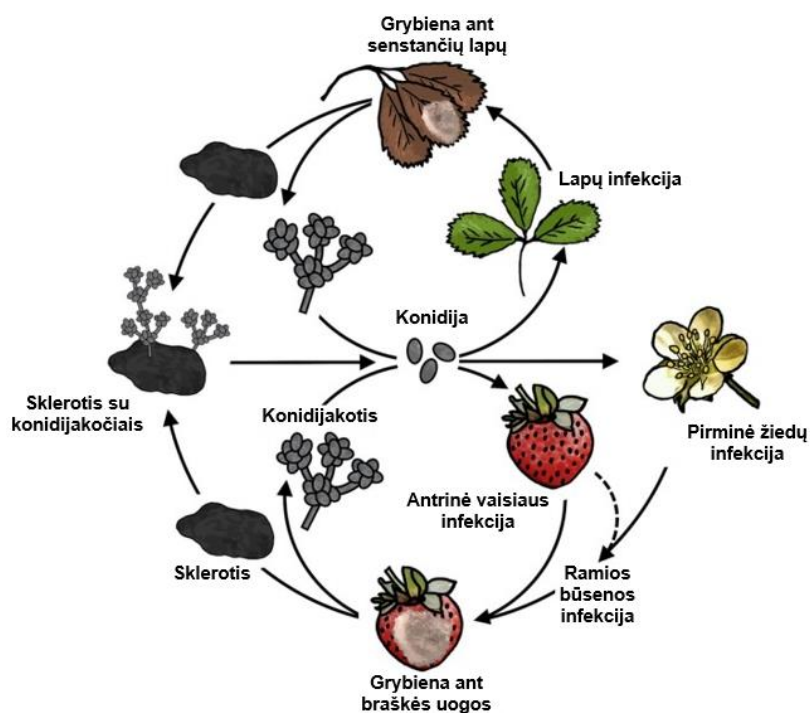
*Botrytis* spp. – viena seniausių ir geriausiai ištirtų grybų genčių, o iš daugiau nei 35 *Botrytis* rūšių, *Botrytis cinerea* yra labiausiai žinomas ir dėl savo žalingumo yra priskirtas kaip antras pagal svarbą augalų patogenas pasaulyje. *B. cinerea* – plačiai paplitęs nekrotrofinis augalų patogenas, sukeliantis pilkąjį puvinį [37]. Neturi šeimininko specifiškumo, gali atakuoti daugybę augalų rūšių ir beveik visas jų dalis: stiebus, lapus, vaisius, žiedus, sėklas ir kt. [38]. *B. cinerea* paveikia ekonomiškai svarbias kultūras: daržoves (pvz., agurkai, pomidorai, salotos), svogūninius augalus (pvz., svogūnai, česnakai, ženšenis), vaisius (pvz., arbūzai, vynuogės, kiviai), uogas (pvz., braškės, avietės, mėlynės, spanguolės) ir kt. Sukelta infekcija gali siekti 10–70 % nuostolių prieš ir po derliaus nuėmimo [38, 39, 40, 41]. Dėl savo nekrotrofinio veikimo mechanizmo *B. cinerea* linkęs atakuoti ir užkrėsti pažeistus arba senstančius augalų audinius, sukeldamas jų nykimą ar žūtį [42]. *B. cinerea* infekcijos augaluose procesas paprastai aprašomas pagrindiniais etapais:

- 1) įsiskverbimas į šeimininko paviršių;
- 2) šeimininko audinių naikinimas – pirminio pažeidimo susidarymas;
- 3) pažeidimų plitimas – audinių maceracija (brinkimas);
- 4) sporuliacija.

Grybas augaluose sukelia labai platų simptomų spektrą, bet tipiškiausi yra greitai suminkštėję audiniai, atsiradusios pilkos konidijų masės, susitraukę ir žuvę audiniai [43, 44].

Braškės (lot. *Fragaria × ananassa*) yra vienos daugiausiai vartojamų uogų pasaulyje, pasižymintios unikaliu skoniu ir didele fitocheminių medžiagų koncentracija. Dėl braškių uogų fizinių savybių jos yra labai jautrios saugojimui po derliaus nuėmimo, o tais atvejais, kai pagrindinis ligas sukeliantis patogenas yra *B. cinerea*, jos labai lengvai pažeidžiamos [45]. Iš grybinių patogenų *B. cinerea* laikomas pagrindiniu pasaulyje skanamų braškių kenkėju, dėl kurio braškių pramonės patiriami nuostoliai yra labai dideli. Drėgnomis sąlygomis *B. cinerea* gali paveikti daugiau nei 80 % braškių žiedų ir vaisių, ypač jei nenaudojamos jokios fungicidinės priemonės. Pilkasis puvinys braškėse gali atsirasti dėl *B. cinerea* užsikrėtusių atvirų žiedų – pirminės infekcijos, arba patogenui prasiskverbus į vaisiaus audinius – antrinės infekcijos. Pirminės infekcijos metu *B. cinerea* užkrečia žiedinius organus žydėjimo metu arba iš karto po jo, hifams įaugant į audinius. Pirminio inokulianto šaltiniai svyruoja nuo žiemojančių skleročių iki konidijų ar grybienos iš užkrėstų kaimyninių augalų. Antrinės

infekcijos metu grybas pereina į nekrotrofinę fazę be ramybės būsenos, o konidijų šaltiniai taip pat gali būti įvairūs – nuo senstančių lapų iki užkrėstų vaisių (žr. 1.1 pav.) [42]. Taigi, *B. cinerea* atakuoja tiek antžemines, tiek požemines braškių dalis ir užkrečia įvairius jų audinius, įskaitant šaknis, stiebus, lapus, uogas, sėklas ir žiedus [38].



1.1 pav. *B. cinerea* ligos ciklas braškėse [42]

*B. cinerea* gamina daugybę ląstelių žūtį sukeliančių baltymų, ląstelių sienelę ardančių fermentų, rūgščių ir augalų hormonų analogų, sutrikdančių šeiminingo metabolizmą, imuninę sistemą ir ląstelių struktūrą [44, 46]. Kadangi šis grybas yra ir patogeninis, ir saprotrofinis, iš pradžių užkrečiamos silpnos arba negyvos augalo dalys, o vėliau liga plinta į sveiką augalo dalį. *B. cinerea* gamina būdingus grybinius metabolitus, kurių pagrindą sudaro botriano skeletas – daugiausia botridialą ir dihidrobotridialą. Botridialas yra ypač kenksmingas fitotoksinas, sintetinamas augalų infekcijos metu, ir sukeliantis augalų chlorozę bei ląstelių žūtį [46].

## 1.2. Sodo ir daržo augalų ligų kontrolė

Fitopatogeniniai mikroorganizmai ir augalų kenkėjai yra natūralūs augalų supančios aplinkos gyventojai [47], tačiau jų sukeltos ligos daro įtaką derliaus praradimui, kuris tiesiogiai veikia nacionalines ir pasaulines maisto gamybos sistemas, todėl taip pat sukelia ir didelių ekonominių nuostolių. Formuojantis augalų ligoms, įtakos turi trys pagrindiniai veiksniai: augalas šeimininkas, palanki aplinka ir patogenas. Dažniausiai liga paveikia augalą iš apačios į viršų, o užsikrėtus vienam augalui – liga pasklinda visame pasėlyje [48]. Augalų ligos yra įvairių tipų ir pažeidžia skirtingus augalų organus. Lapų ligos pasižymi ryškiausiais požymiais, kuriuos galima nustatyti vizualiai apžiūrėjus augalą [49]. Patogenų sukeltos ligos augaluose kontroliuojamos taikant ekologinio arba tradicinio ūkininkavimo sistemas. Ekologinis ligų valdymas apima įvairias jų kontrolės praktikas, kurios palaiko gerą ekosistemų ir aplinkos būklę, užtikrina agroekosistemos stabilumą didinant biologinę įvairovę. Ekologinio ūkininkavimo šalininkai dažniausiai taiko kultūrinius augalų apsaugos metodus, tokius kaip sanitarinė pasėlių priežiūra, sėjomainos, organinio dirvožemio keitimas, veislių



atranka, polikultūrų auginimas ar mažesnis žemės dirbimas. Priešingai tradicinei augalininkystei – jai būdingas sintetinių pesticidų ir trąšų naudojimas [50, 51].

### 1.2.1. Cheminė augalų ligų kontrolė

Cheminė kenkėjų kontrolė – tai ligų ir patogenų kontrolė naudojant cheminius pesticidus. Pesticidas – tai bet kokia medžiaga arba medžiagų mišinys, naudojamas siekiant užkirsti kelią kenkėjams, įskaitant vabzdžius, grybus, nepageidaujamas augalų rūšis ar graužikus, juos kontroliuoti ir naikinti. [52]. Medžiagų, vadinamų pesticidais, grupei priklauso fungicidai, insekticidai, herbicidai, rodenticidai, nematocidai, moliuskocidai ir kt. Visuotinai pripažįstama, kad pesticidai atlieka svarbų vaidmenį plėtojant žemės ūkį, nes jie gali sumažinti žemės ūkio produktų nuostolius ir pagerinti derliaus bei maisto kokybę [53]. 2018 metais Europos Sąjungoje pesticidų pardavimai siekė 370 mln. kilogramų, o daugiausia parduodami buvo fungicidai (46 %), toliau buvo herbicidai (35 %) ir insekticidai (11 %) [54]. Prognozuojama, kad per ateinančius kelerius metus pesticidų suvartojimas dar padidės – nuo maždaug 4,3 mln. tonų 2023 metais iki apytiksliai 4,41 mln. tonų 2027 metais [55]. Tačiau pastaruoju laikotarpiu pesticidai tapo ir svarbia vyraujančia žemės ūkio sistemų problema. Nors gali padidinti ir padėti išsaugoti pasėlių derlių, pesticidai daro didelį neigiamą poveikį aplinkai. Per didelis pesticidų naudojimas naikina biologinę įvairovę, kelia grėsmę aplinkos tvarumui ir stabilumui, žmonių ir gyvūnų sveikatai [56].

Fungicidai yra pesticidų klasė, skirta grybiniams ligų sukėlėjams slopinti. Paprastai fungicidai skirstomi į sisteminius ir kontaktinius:

- *Sisteminiai fungicidai* purškiami ant viršutinių augalo paviršių, prasiskverbia į vidinius jo audinius, toksiškai veikdami grybinį patogeną. Sisteminių fungicidų pavyzdžiai: benomilas, kripokonazolas, imazalilis.
- *Kontaktiniai fungicidai* po panaudojimo neprasiskverbia į vidinius audinius ir lieka ant augalo paviršiaus. Paprastai tokio tipo fungicidai naudojami lapų ligoms kontroliuoti. Kontaktinių fungicidų pavyzdžiai: Mancozeb, tiramas [57].

Nuolat naudojami to pačio veikimo būdo fungicidai skatina atsparumo jiems išsivystymą patogenuose, kuris kelia rimtą grėsmę veiksmingai augalų apsaugai [58]. Dėl tos priežasties taip pat reikia ieškoti efektyvesnių ir mažesniais kiekiais purškiamų pesticidų naudojimo būdų. Norint nustatyti etapus, kada augalus reikia purkšti fungicidais, svarbu atsižvelgti į epidemiologinę patogeno raidą [59]. Grybinių patogenų kontroliavimas cheminiais fungicidais yra reguliuojamas ir prižiūrimas dėl jų poveikio aplinkai, netiksliniams organizmams ir žmonių sveikatai. Siekiant išvengti neigiamų ekologinių pasekmių, būtina kurti naujus metodus ir produktus, kurie valdytų esamus ir atsirandančius patogenus, tačiau būtų nekenksmingi žmonių sveikatai ir aplinkai [60].

### 1.2.2. Biologinė augalų ligų kontrolė

Biologinė augalų apsauga – tai kenkėjų ir ligų kontrolė pasėliuose įvedant natūralius kenksmingų organizmų priešus, biologinius augalų apsaugos produktus ir natūralios kilmės augalų apsaugos produktus [61]. Biokontrolės mechanizmus galima suskirstyti į dvi pagrindines kategorijas: tuos, kurie tiesiogiai slopina patogenus arba jų virulentiškumo veiksnius, ir tuos, kurie pagerina augalo šeiminingo atsparumą [62]. Biopesticidai – augalų, mikroorganizmų ir vabzdžių dariniai, tai natūralūs produktai, keliantys nedidelę grėsmę aplinkai ir žmonių sveikatai [63, 64]. Biopesticidai yra galimos

sintetinių pesticidų alternatyvos, o jų šaltiniai yra lengvai prieinami, patys produktai biologiškai skaidomi, pasižymi įvairiais veikimo būdais ir specifiskumu, yra mažai toksiški žmonėms ir netiksliniams organizmams [63]. Biopesticidai, turintys patogeninį potencialą prieš kenkėjus, pagal veikimo mechanizmą ir išskirtą organizmą gali būti skirstomi į:

- mikrobinius biopesticidus (pvz., bakterijų, bakteriofagų, grybų, virusų, nematodų gaminamos pesticidinės medžiagos);
- augaluose esančias apsaugos priemones (pvz., augaluose gaminamos ir esančios pesticidinės medžiagos ar genetinė medžiaga);
- botaninius/biocheminius biopesticidus (pvz., feromonai, augalų ekstraktai) [65].

Kaip alternatyva cheminiams fungicidams svarbią reikšmę įgijo ir vis dar didelio dėmesio sulaukia naudingi mikroorganizmai – biologinės kontrolės agentai (*angl. biological control agents* – BCAs). Įvairios nematodų, pirmuonių, bakterijų ir grybų padermės rodo antagonistinį aktyvumą ir gali būti naudojamos įvairių augalų ligų, vabzdžių ir kitų kenkėjų kontrolei. Antibiotikai, bakteriocinai, hidroliziniai fermentai ir kiti antriniai metabolitai, kuriuos gamina šie mikroorganizmai, slopina bakterinius ir grybinius patogenus [66]. Antagonistiniai grybai, tokie kaip *Trichoderma* spp., taip pat bakterijos iš *Pseudomonas*, *Bacillus* ir *Streptomyces* genčių, sudaro daugumą rizosferos mikroorganizmų, dažniausiai naudojamų grybinių ligų biokontrolėje [67]. Nepaisant intensyvių tyrimų, eksperimentų ir lauko bandymų, BCA naudojimas yra ribotas dėl tam tikrų ekologinių parametrų, pvz., klimato sąlygų, augalų fiziologinės ir genetinės būklės. Dėl tos priežasties biologinių kontrolės agentų naudojimas labiau apsiriboja šiltnamio pasėlių auginimu, kur aplinkos sąlygos yra labiau kontroliuojamos. Laukuose auginamų kultūrų patikimesnė ligų kontrolė gali būti pagrįsta BCA ir fungicidų deriniais [68].

Botaniniai biopesticidai yra natūraliai augaluose atsirandantys junginiai, skirti kenkėjams kontroliuoti, naudojant netoksiškus mechanizmus. Augaluose sintetinama daug junginių, kurie gali padėti kovoti su patogeniniais mikroorganizmais ir infekcijos, ir atakos metu. Šie junginiai apima įvairius antrinius metabolitus: steroidus, alkaloidus, fenilpropanoidus, fenolius, terpenoidus, azotinius junginius ir kt. [69]. Augalai yra pagrindiniai biologiškai aktyvių junginių sintezės šaltiniai ir alternatyva šiuo metu naudojamoms sintetinėms kenkėjų kontrolės priemonėms. Gaminami antriniai metabolitai pasižymi antibakterinėmis ir antigrybinėmis savybėmis ir gali būti naudojami tiek augimo metu, tiek po derliaus nuėmimo [70]. Botaniniai pesticidai yra gaunami iš augalų, priklausančių skirtingoms šeimoms, ir yra naudojami kaip augalų ekstraktai, eteriniai aliejai arba abu. Augalų dalys, naudojamos botaniniams pesticidams gaminti, yra žievės, lapai, šaknys, gėlės, vaisiai, sėklos, pumpurai, šakniastiebiai ir stiebai. Šeimos, kuriose yra augalų, turinčių bioaktyvių junginių ir veikiančių prieš kenkėjus, yra *Myrtaceae*, *Lamiaceae*, *Piperaceae*, *Lauraceae*, *Asteraceae*, *Rutaceae*, *Apiaceae*, *Sapotaceae*, *Cupressaceae*, *Liliaceae*, *Poaceae*, *Apocynaceae*, *Zingiberaceae*, *Caesalpinaceae*, *Solanaceae* [71]. Augalų ekstraktų antigrybinio aktyvumo veiksmingumas yra susijęs su ekstrakcijos procesu, ypač su sąveika tarp tirpiklio ir žaliavos bei jų santykiu, dalelių dydžiu, temperatūra, išgavimo laiku [72].

### 1.2.3. Alternatyvios augalų apsaugos priemonės

Kontroliuojant augalų ligas, ypač patogeninių grybų, kaip alternatyva sintetiniams pesticidams gali būti anksčiau minėti bioaktyvūs junginiai, gauti iš dumblių/augalų ekstraktų, eterinių aliejų ar kitų

medžiagų. Augalinių ekstraktų panaudojimas ir jų savybės augalų ligų kontrolėje kaip alternatyva cheminiams pesticidams plačiau aptarti 1.2.2, 1.4.1 ir 1.4.2 skyriuose. Kita svarbi tvaraus kenkėjų valdymo dalis yra natūralūs priešai, pvz., šaknų grybiniai endofitai ar kiti mikroorganizmai. Pagrindinis ir sunkiausias uždavinys augalų apsaugos srityje yra alternatyvių pesticidinio aktyvumo junginių šaltinių paieška ir jų sudėties tobulinimas [73]. Dėl patogenų prisitaikymo prie aplinkos ir įgyjamo atsparumo, svarbu ieškoti vis naujesnių jų kontrolės būdų. Patogeninių grybų struktūrų morfologiniai pakitimai buvo pastebėti veikiant juos ne tik ekstraktais, eteriniais aliejais ir jų aktyviais komponentais, bet ir specifiniu šviesos spektru, druskų tirpalais ar nanodalelėmis, pritaikant naujausias technologijas [74].

Kalio bikarbonatas, kalcio chelatas ir natro silikatas, pripažinti saugiais (*angl. generally recognized as safe* – GRAS) junginiais, naudojant prieš augalų patogeninius grybus [75]. Youssef'as, K. ir Roberto'as, S. R. atliko tyrimus su aštuoniomis druskomis: natrio silikatu, natrio sulfatu, natrio karbonatu, natrio bikarbonatu, geležies chelatu, geležies sulfatu, amonio bikarbonatu ir amonio oksalatu. *In vitro* eksperimentų metu natrio silikatas, natrio karbonatas, natrio bikarbonatas, geležies sulfatas ir amonio bikarbonatas visiškai slopino patogeno *B. cinerea* augimą, esant 0,25 % druskų koncentracijai [76]. Taip pat tirtas EDTA (etilendiamintetraacto rūgštis) antigrybinis poveikis *B. cinerea*. Eksperimentų metu užfiksuotas slopinamasis poveikis sporų dygimui ir grybienos augimui, sukeltas grybo žūtį. *In vivo* antigrybinio vertinimo metu pupelių lapų ir pomidorų vaisių veikimas EDTA rodė reikšmingą slopinamąjį poveikį *B. cinerea* infekcijai. Šie rezultatai svarbūs, nes EDTA sukelia daugialypį poveikį grybams, todėl gali būti potencialus fungicidinis agentas ir perspektyvi *B. cinerea* kontrolės priemonė, padedanti sumažinti įprastų cheminių fungicidų naudojimą [77].

Nanotechnologijos padarė didelę pažangą farmacijoje ir medicinoje, tačiau sulaukia mažiau susidomėjimo žemės ūkyje. Mokslininkai palaipsniui kuria nanodaleles su norimomis savybėmis – porų dydžiu, forma, paviršiaus savybėmis, kurias vėliau galima naudoti kaip apsaugines medžiagas arba įkapsuliuoti tam tikrus junginius, pavyzdžiui, pesticidus ar biopesticidus. Tobulėjant žemės ūkio nanotechnologijoms, didėja naujos kartos pesticidų ir kitų augalų ligų valdymo veikliųjų medžiagų galimybės [78]. Nanotechnologijos gali padėti sušvelninti ar panaikinti trūkumus, susijusius su klasikinėmis pesticidų formavimo ir taikymo technologijomis. Nanopesticidai klasifikuojami ir aprašomi atsižvelgiant į nanonešiklio cheminę sudėtį, pvz., organinių polimerų pagrindu pagaminti preparatai, lipidų pagrindu pagaminti preparatai, nanodydžio metalai ir metalų oksidai, molio pagrindu pagamintos nanomedžiagos, sluoksniuotieji dvigubi hidroksidai, silicio dioksido nanodalelės. Priklausomai nuo konkretaus gamybos metodo, nanodalelės, priskiriamos bet kuriai iš aukščiau paminėtų klasių, gali turėti įvairias struktūras ir morfologijas su skirtingomis savybėmis, pavyzdžiui, nanokapsulės, nanosferos, micelės, nanogeliai, nanopluoštai, nanoliposomos, kietosios lipidų nanodalelės ir pan. [79]. Fungicidinis poveikis buvo užfiksuotas veikiant *B. cinerea* chitozanolio nanodalelėmis (NCS–Thy) [80], cinko oksido nanodalelėmis su įkapsuliuotais eteriniais aliejais ir aktyviais junginiais (ZnO NPs) [81], vario oksido nanodalelėmis (NCuO) kombinacijoje su fungicidais [82].

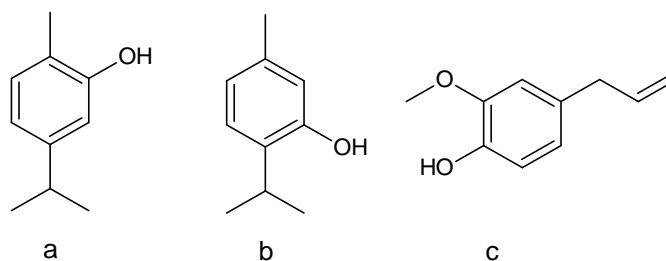
Šviesos diodai (LED) su specifiniu šviesos spektru vis dažniau naudojami kaip augalų apšvietimo šaltinis šiltnamiuose. Pasirinktas šviesos spektras taip pat gali turėti įtakos patogenų augimui ir poveikiui. Meng'as, L. ir kt. atliktų tyrimų metu buvo užfiksuotas skirtingas *B. cinerea* izoliatų fenotipinis atsakas į įvairios šviesos spektrus. Raudona šviesa žymiai pagerino lapų bazinį atsparumą visiems tirtiems *B. cinerea* izoliatams, o pirminis apdorėjimas mėlyna šviesa padidino lapų jautrumą kai kuriems iš jų [83]. Taip pat tirtas raudonos, žalios, mėlynos ir baltos LED šviesos poveikis

nuskintoms braškės, kontroliuojant *B. cinerea* patogeną. Eksperimentų metu nustatyta, kad braškių paveikimas LED šviesa prieš derliaus nuėmimą pagerino vaisių kokybę, raudona šviesa skatino didžiausią antocianinų kiekį uogose ir stabdė *B. cinerea* susidarymą [84]. Nuo ultravioletinių iki tolimų raudonų bangų ilgių šviesa sukelia specifines fitopatogeninių grybų reakcijas į augimą, dauginimąsi ir antrinį metabolizmą. Šviesos taikymo metodai, reguliuojantys antrinį metabolizmą, vis dar tyrinėjami, norint šias žinias pritaikyti žemės ūkiui, medicinai ir pramonei [85].

### 1.3. Antriniai augalų metabolitai ir biologiškai aktyvios medžiagos

Augalai sintetina daugybę organinių junginių, kurių daugelis dalyvauja tokiuose gyvybiniuose procesuose kaip augimas, kvėpavimas, ląstelių dalijimasis, dauginimasis ir fotosintezė. Šiuose procesuose dalyvaujančios biomolekulės vadinamos pirminiais metabolitais. Tuo tarpu antriniai metabolitai – junginiai, kurie nėra būtini organizmo augimui ir dauginimuisi, tačiau atlieka kitas svarbias funkcijas ir suteikia unikalių savybių augalui. Dėl įvairių struktūrinių ir cheminių antrinių metabolitų savybių jie yra tinkami substratai biokurui, biomedžiagoms ir farmacijos pramonei [86]. Kalbant apie antrinių metabolitų naudojimo ir taikymo būdus, jie gali atlikti daugybę apsauginių funkcijų nuo įvairių patogeninių mikroorganizmų. Natūralūs augaliniai produktai turi naudos žemdirbystės, sodininkystės ir panašiose srityse dėl antivirusinio, antibakterinio, antigrybinio, antioksidacinio poveikio. Antriniai metabolitai yra tiesiogiai susiję su augalų apsauga, sisteminiu atsparumu ir kitomis ekologinėmis funkcijomis. Įvairios augalų šeimos sintetina bioaktyvius antrinius metabolitus, įskaitant flavonoidus, lignanus, karotinoidus, terpenoidus ir vitaminus, kuriems būdingas stiprus antioksidacinis aktyvumas. Natūralūs antioksidantai iš augalinių medžiagų daugiausiai yra polifenoliai (fenolinės rūgštys, flavonoidai, antocianinai, lignanai, katechinai), karotinoidai (ksantofilai, karotinais, likopenas) ir vitaminai (vitaminai C, E). Tačiau augalų antriniai metabolitai pagal jų cheminę struktūrą yra suskirstyti į šias pagrindines klases: terpenoidus, fenolinius junginius ir azoto turinčius junginius [87].

Terpenai, dar vadinami terpenoidais arba izoprenoidais, sudaro didelę šeimą natūralių produktų, kurių struktūra, funkcijos ir savybės yra labai įvairios [88]. Terpenai klasifikuojami į skirtingas grupes pagal jų struktūroje esančių izopreno vienetų skaičių: hemiterpenoidai ( $C_5$ ), monoterpenoidai ( $C_{10}$ ), seskviterpenoidai ( $C_{15}$ ), diterpenoidai ( $C_{20}$ ), sesterterpenoidai ( $C_{25}$ ), triterpenoidai ( $C_{30}$ ), tetraterpenoidai ( $C_{40}$ ), politerpenoidai ( $C > 40$ ), kai kurie gali būti cikliniai ir acikliniai [88, 89]. Terpenoidai yra labai įvairi natūralių junginių grupė, kurią galima rasti daugelyje augalų. Monoterpenoidai yra pagrindiniai eterinių aliejų komponentai ir yra žinomi dėl savo aromatinių savybių. Pagrindiniai terpenoidai yra šie: limonenas, geraniolis, farnesolis, artemisininas, taksolis, ginkgolidas, leukosceptrinas, nitiolis, skvalenas, stigmasterolis,  $\beta$ -karotinas, likopenas, natūrali guma [90]. Karotinoidai – geltonos, oranžinės ir raudonos spalvos tetraterpenoidiniai pigmentai, sintetinami visų taksonų rūšių, išskyrus gyvūnus, kartu su chlorofilais jie yra būtini pigmentai fotosintezės reakcijose. Tokie karotinoidai, kaip  $\beta$ -karotinas, liuteinas,  $\beta$ -kriptoksantinas, neoksantinas, zeaksantinas yra svarbios augalų apsaugos priemonės nuo fotooksidacinės žalos, sulaukančios molekulinis deguonies ir peroksido radikalus [88]. Taigi, karotinoidai augaluose daugiausia atsakingi už pigmentines savybes ir gebėjimą pašalinti susidariusius pavienius molekulinis deguonies ir peroksido radikalus, todėl veikia ir kaip antioksidantai [91]. Tyrimai parodė, kad terpenoidai gali sunaikinti daugybę kenksmingų grybinių ir bakterinių patogenų, tokių kaip *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* ir *Pseudomonas aeruginosa*, įskaitant ir atsparias padermes. Tarp bioaktyvių terpenoidų, turinčių antigrybinį poveikį, karvakrolis, timolis ir eugenolis sulaukia didžiausio mokslinių tyrimų dėmesio (žr. 1.2 pav.) [92].



**1.2 pav.** Karvakrolio (a), timolio (b) ir eugenolio (c) cheminė struktūra [92]

Fenoliniai junginiai yra viena iš svarbiausių augalų antrinių metabolitų grupių. Bendra šių augaluose paplitusių junginių savybė yra vienos ar kelių fenolio grupių buvimas, prisidedančių prie specifinio skonio, spalvos ir aromato. Fenoliniai junginiai pagal jų struktūrą gali būti skirstomi į tris pagrindines grupes: paprastus fenolius, taninus ir flavonoidus. Flavonoidai yra didžiausia natūraliai susidarantių fenolių grupė, kuri skirstoma į įvairias klases: flavonolius, flavonus, flavanonus, antocianidinus, izoflavonus [87]. Geriausiai žinomi fenoliniai junginiai yra fenolio monoterpentai ir diterpenai (priskiriami ir terpenams, ir fenoliniams junginiams, pvz., karvakrolis, timolis, karnozolis), įvairios hidroksibenzenkarboksirūgštys (pvz., *p*-hidroksibenzoinė rūgštis, galo rūgštis, vanilino rūgštis) ir fenilpropano rūgštys, kumarinai, flavanai, flavonai ir flavanoliai. Vaistiniuose augaluose esantys fenoliai turi didelį antioksidacinį aktyvumą ir yra dominuojantys aromatinių augalų antioksidaciniai komponentai [93]. Fenolinių junginių biologinės funkcijos apima antioksidacines, antibakterines, priešuždegimines, analgetines, karščiavimą mažinančias ir priešnavikines savybes, o pastaraisiais metais vis daugiau pripažintas natūralių augalų fenolinių junginių antigrybinis poveikis [94]. Polifenoliai atlieka įvairius vaidmenis augalų sistemose, išskirdami augimo hormonus, užkirsdami kelią mikrobinių infekcijų plitimui. Turintys potencialų antioksidacinį aktyvumą, jie gali būti laikomi natūraliomis alternatyvomis daugeliui sintetinių medžiagų, gerinant maisto kokybę, prailginant augalo gyvenimo trukmę ir stiprinant jo imuninę sistemą [87].

Azoto turintys junginiai yra alkaloidai, cianogeniniai gliukozidai ir gliukozinatai [87]. Alkaloidų cikliniuose organiniuose junginiuose yra azoto, tačiau gamtoje jų yra labai nedaug. Šiai grupei priskiriama keletas garsiausių junginių, tokių kaip kofeinas, nikotinas, kokainas ir morfinas, kurie žinomi dėl savo anksiolitinio, analgezinio ir haliucinogeninio poveikio [89]. Pastaraisiais metais pranešama apie augalų ekstraktus, tinkamus kovoje su kenkėjais, dėl juose esančių didelio kiekio alkaloidų, turinčių platų antigrybinį poveikį. Nors yra tyrimų, patvirtinančių augalų ekstraktų, kaip botaninių fungicidų, veiksmingumą, daugeliu atvejų informacijos apie šių ekstraktų toksiškumą yra mažai ar jos visai nėra [95].

Kita svarbi augaluose esanti pirminių metabolitų grupė yra chlorofilai. Šie asimiliaciniai pigmentai yra vieni iš svarbiausių cheminių junginių augaluose, nes turi įtakos biomasės gamybai, fotosintezės metu šviesos energiją paversdami cheminių ryšių energija. Dažniausiai gamtoje pasitaikantys chlorofilų tipai – *a* ir *b*, tačiau žaliuosiuose dumbliuose ir visuose augaluose, atliekančiuose fotosintezę, galima aptikti ir kitų rūšių [96]. Augaluose esantys fotosintetiniai pigmentai taip pat gali turėti biologinį aktyvumą, kuris siejamas su chlorofilų gebėjimu veikti kaip antioksidantai, antikancerogenai ar antimutagenai. Tuo pačiu metu chlorofilo pigmentai dėl jų katalizinio poveikio gali turėti ir prooksidacinių savybių, kurios gali turėti neigiamos įtakos slopinamos antioksidacinę augalo sistemą [97].

### 1.3.1. Augalų atsakas į stresą ir aplinkos poveikį

Augalai yra veikiami įvairių aplinkos veiksnių, kurie gali sukelti abiotinį arba biotinį stresą, turintį įtakos žemės ūkio augalų produktyvumui. Abiotinį stresą sukelia fizinių ar cheminių veiksnių kitimas, pvz., sausros, druskingumas, potvyniai, sunkieji metalai, ekstremali temperatūra ir pan. Biotinį stresą sukelia gyvi organizmai, tokie kaip voragyviai, bakterijos, grybai, žolėdžiai gyvūnai, vabzdžiai, nematodai, oomicetai, virusai ir piktžolės. Dėl biotinių veiksnių sukeltų ligų, infekcijų, sumažėja maistinių medžiagų, miršta augalai ir patiriami dideli derliaus nuostoliai [98]. Biotinis ir abiotinis stresas neigiamai veikia augalininkystę ir stipriai sumažina tiek kokybinį, tiek kiekybinį derlių. Pastaruoju metu mokslininkai ir žemdirbiai ieško alternatyvių būdų, kaip susidoroti su abiotiniu ir biotiniu stresu ir sumažinti jų neigiamą poveikį [99].

Augalai turi sudėtingus gynybos mechanizmus, trukdančius žalingiems aplinkos ir biotinio streso padariniams veikti juos. Bet koks augalo medžiagų apykaitos fiziologijos pokytis negali būti siejamas su vienu unikaliu streso veiksmu, nes įvairūs veiksniai funkcionuoja kartu, paveikdami augalus. Antriniai metabolitai, tokie kaip fenoliai, terpenai, karotinoidai, alkaloidai, sukuria augalų gynybos sistemą nuo įvairių tipų patogenų, skatina augalų išgyvenimą, formuoja medžiagų apykaitą, padedančią būti atspariems ligoms. Aktyvūs junginiai dažniausiai veikia darydami įtaką ląstelių signalų perdavimui arba veikdami patogeno komponentus, taip slopindami jų fermentus ar reprodukcinę sistemą [100]. Patogeno atakos metu gali pasireikšti suderinama kenkėjo ir augalo sąveika – sėkminga infekcija, arba nesuderinama sąveika – nesėkminga infekcija, tačiau tarp šių rezultatų yra nenutrūkstamas jautrumo ir atsparumo konkrečiam patogenui sąryšis. Augalų imuninei sistemai būdingos apsauginės reakcijos, tokios kaip jonų srautų pokyčiai per plazminę membraną, reaktyviųjų deguonies rūšių gamyba (ROS), mitogeno aktyvuotų proteinkinazių aktyvavimas (MAPKs), antimikrobinių antrinių metabolitų sintezė, skirtinga su gynyba susijusių genų ekspresija ir kt. Taip pat fitohormonai, tokie kaip salicilo ar jazmono rūgštis, etilenas, kaupiasi kaip augalų sisteminės gynybos nuo patogenų, kenkėjų ir abiotinio streso dalis [101].

Kalbant apie braškes, jos yra pažeidžiamos daugelio ligų sukėlėjų, paveikiant įvairias augalo dalis – šaknis, žiedus, uogas, stiebelius. Siekdamos apriboti patogenų augimą ir apsisaugoti nuo jų, braškės taip pat gamina įvairių antrinių metabolitų, kaip svarbiausius išskiriant terpenus, į alergenų panašius su patogenezė susijusius baltymus ir flavonoidus. Genai, dalyvaujantys antrinių metabolitų biosintezėje braškėse, po patogeno atakos yra indukuojami, o tai rodo, kad jų transkripcijos aktyvacija lemia didesnę galutinių junginių kaupimąsi. Be to, antriniai metabolitai taip pat dalyvauja augalų sąveikoje su naudingais mikrobais, sudarydami simbiotinius ryšius. Genai, dalyvaujantys terpenų, alergenų ir flavonoidų biosintezėje, gali būti naudojami gerinant braškių augalų kokybę, įskaitant atsparumą ligoms, ilgesnį galiojimo laiką ir sumažėjusį jautrumą aplinkos veiksniams [102]. Augalinės kilmės antioksidantai, gaminami antrinio metabolizmo keliu, braškių augaluose veikia kaip pagrindinis apsauginis barjeras nuo biotinių ir abiotinių stresą sukeliančių veiksnių. Antrinių metabolitų kaupimasis ne tik daro įtaką augalų ir vaisių savybėms, pvz., specifinei spalvai, skoniui, aromatum, bet ir padidina bendrą antioksidacinį pajėgumą, kuris leidžia neutralizuoti laisvuosius radikalus ir mažina oksidacinį stresą. Labiausiai paplitę antriniai metabolitai braškių vaisiuose yra flavonoidai, įskaitant antocianinus, kurie yra susiję su antioksidacinėmis ir priešuždegiminėmis savybėmis [103]. Pagrindinis patogenas, sukeliantis braškių ligas, *B. cinerea* taip pat skatina metabolizmo pokyčius braškių augaluose. Yra pranešta, kad dėl aktyvių *B. cinerea* infekcijų specifinių antrinių metabolitų kiekis gali ir sumažėti, todėl ši sąveika iki galo dar nėra aiški [42, 104]. *B. cinerea* sintetina ląstelių sienelės ardančius fermentus, reaktyviąsias deguonies rūšis ir toksinus,

taip užkrėsdamas ir kolonizuodamas braškes, o augalai reaguoja į sukeltą stresą įvairiais mechanizmais. Antioksidantų fermentų aktyvumas koreliuoja su augalų imunine sistema – ir pirminiai, ir antriniai metabolitai padeda apriboti patogeno infekciją, turėdami įtakos augalų atsparumui arba tiesiogiai slopindami *B. cinerea* patogeną [105].

#### **1.4. Gvazdikmedžio (lot. *Syzygium aromaticum*) apibūdinimas, paplitimas, panaudojimo būdai**

*Syzygium aromaticum*, paprastai vadinamas gvazdikmedžiu, yra apie 8–10 m ilgio visžalis medis, kilęs iš *Myrtaceae* šeimos, įprastai augantis Indonezijoje, Šri Lankoje, Madagaskare. Gvazdikmedžiai daugiausia auginami tropiniuose regionuose, nes jiems reikalingas drėgnas, šiltas klimatas, gerai nusausintas dirvožemis, pakankama šviesos ir oro cirkuliacija. Gvazdikėlis – *Myrtaceae* šeimos gvazdikmedžio neatsivėręs žiedpumpuris (žr. 1.3 pav.) [106, 107]. Europoje džiovinti gvazdikėliai buvo naudojami nuo ankstyvųjų viduramžių, tačiau dėl klimato gvazdikmedžio auginimas šiame žemyne vis dar ribotas. Šiais laikais gvazdikmedžiai auginami visame pasaulyje tuose regionuose, kuriuose vyrauja okeaninis klimatas ir sudaromos tinkamos augimo sąlygos [108].



**1.3 pav.** Gvazdikmedžio žiedpumpuriai [107]

Gvazdikėlis – tai išskirtinio skonio prieskonis, plačiai naudojamas kaip kvapioji medžiaga, maisto konservantas ir kaip sudedamoji dalis įvairiose pramonės šakose – maisto, kosmetikos, medicinos, farmacijos sektoriuose. Pastaraisiais metais išaugo didesnės vertės produktų iš gvazdikėlių kūrimo procesas [109].

*S. aromaticum* vaisiuose, žiedpumpuriuose, lapuose, šakose ir sėklose gausu įvairių maistinių medžiagų: baltymų, aminorūgščių, riebalų rūgščių, mineralinių elementų, vitaminų ir kt. Gvazdikmedžio vaisiuose yra didžiausias bendras angliavandenių, pumpuruose – riebalų, o lapuose – baltymų kiekis [108]. *S. aromaticum* yra apie 15–20 % eterinio aliejaus, kuriame yra daug fenolinių junginių, pasižyminčių įvairiomis biologinėmis savybėmis, pvz., antigrybinėmis, antibakterinėmis, antioksidacinėmis ar insekticidinėmis savybėmis [110]. Gvazdikmedžio eterinis aliejus ir ekstraktai gali būti gaunami iš augalų pumpurų, stiebų ir lapų, o išgauti ekstraktai skiriasi savo chemine sudėtimi, aromatu ir spalva, priklausomai nuo klimato sąlygų, auginimo metodų ir genetinių veiksnių. Geros kokybės gvazdikmedžio eterinis aliejus dažniausiai gaunamas iš pumpurų ir yra tankesnis,

geltonesnis už vandenį. Pumpurų eteriniame aliejuje vyrauja eugenolis, eugenolio acetatas,  $\beta$ -kariofilenas ir  $\alpha$ -humulenas [111].

#### 1.4.1. Gvazdikmedžio ekstraktų ir eterinių aliejų aktyviosios medžiagos

Gvazdikmedžio ekstraktai ir eterinis aliejus per šimtmečius sulaukė didelio susidomėjimo ir yra plačiai naudojami kosmetikos, kvėpalų, maisto, medicinos ir kt. pramonės srityse. Biologinis *S. aromaticum* ekstraktų aktyvumas priklauso nuo ekstrahavimo metodo, lakiųjų junginių koncentracijos ir jų sudėties [110]. Pranešama ne tik apie reikšmingus biologiškai aktyvius junginius, gautus iš skirtingų *S. aromaticum* augalo dalių, bet pastebėti ir sudėties skirtumai tarp įvairių ekstraktų ir eterinių aliejų išgavimo būdų. Atlikus fitocheminę augalo analizę, nustatyta, kad jo sudėtyje yra įvairių klasių fitokomponentų, įskaitant flavonoidus, terpenus, steroidus ir taninus [112]. Gvazdikmedžio žiedpumpuriai yra pagrindinis fenolinių junginių, tokių kaip flavonoidai, hidroksibenzenkarboksirūgštys, hidroksifenilpropenai, hidroksicinamono rūgštys ir eugenolis, šaltinis. Svarbūs biologiškai aktyvūs junginiai, kurie buvo išgauti iš *S. aromaticum*, yra eugenolis, kvercetas, galo rūgštis, kempferolis, krategolio rūgštis,  $\beta$ -kariofilenas, oleanolio rūgštis, stigmasterolis, eugenitinas, eugeninas, bikorninas ir kt. [113].

Bioaktyvius junginius iš gvazdikmedžio žiedpumpurių galima išgauti tradiciniais arba pažangesniais, efektyvesniais žaliosios gavybos metodais. Kalbant apie gvazdikmedžio ekstraktus, fenoliams ir bioaktyviems junginiams iš augalinės medžiagos išgauti naudojami skirtingo poliškumo tirpikliai, nuo kurių priklauso ekstrakcijos išeiga. Bioaktyvių junginių ekstrahavimui dažniausiai naudojamas vanduo, vandeninis etanolis (70–80 %), vandeninis metanolis (50 %) ir acetonas, taip pat kaip tirpiklis gali būti naudojamas etilo acetatas [114], n-heksanas, dichlormetanas [112]. Naudojant dujų chromatografiją kartu su masių spektrometrijos (GC-MS) analize [113], taip pat UV spektrofotometrija, galima nustatyti bendrą fenolių ir flavonoidų kiekį visuose ekstraktuose. El-Maati'is ir kt. nustatė, kad etanolis ir vanduo yra geriausi tirpikliai fenoliams, o vanduo – flavonoidams ekstrahuoti. Ekstrahavimo iš skirtingų tirpiklių išeigų skirtumai siejami su augalinėje medžiagoje esančių sudedamųjų dalių poliškumo skirtumais [114]. Yra pranešta apie džiovintų gvazdikmedžio žiedpumpurių vandeniniame acetono ekstrakte aptiktus hidrolizuojamus taninus, taip pat nustatyta, kad metanolio ekstrakte yra keletas alkaloidų, angliavandenių, flavonoidų, ketonų, terpenoidų, glikozidų, taninų, aldehydų ir steroidų [112].

Superkryzinė ir subkryzinė skysčių ar CO<sub>2</sub> ekstrakcija yra viena iš plačiai naudojamų technologijų, kuri gali būti efektyvesnė alternatyva įprastiniam ekstrahavimui tirpikliais, hidrodistiliacijai ir kt. eterinių aliejų, ekstraktų ir kitų biologiškai aktyvių komponentų gavimui. Ekstrahuojant CO<sub>2</sub> išvengiama termolabilių komponentų skilimo dėl veikimo žemesnėje temperatūroje, be to, galima keisti komponentų tirpimo galią ir selektyvumą dėl naudojamo tirpiklio tankio pokyčių [115]. Subkryzinė skysčių ekstrakcija yra toks procesas, kurio metu naudojamas subkryzinės būsenos tirpiklis, esant tam tikram medžiagos ir tirpiklio santykiui, ekstrahavimo temperatūrai, laikui, slėgiui ir kt. Subkryzinė ekstrakcija vykdoma esant žemesnėms negu kritinė slėgio ir temperatūros reikšmėms, priešingai negu superkryzinės ekstrakcijos metu [116]. Kaip subkryzinis tirpiklis plačiai naudojamas vanduo ir anglies dioksidas. Subkryzinė CO<sub>2</sub> sistema veikia esant žemai temperatūrai (< 31 °C) ir nedideliame slėgiu (< 7,1 MPa), todėl tokio tirpiklio naudojimas gali pagerinti ekstraktinių medžiagų išeigą ir pačių ekstraktų kokybę [117]. Naudojant CO<sub>2</sub> ekstrakciją iš įvairių gvazdikmedžio dalių galima išgauti eterinius aliejus ir ekstraktus, kuriuose gausu eugenolio, eugenolio acetato,  $\alpha$ -humuleno,  $\beta$ -kariofileno, daug fenolinių rūgščių [116, 118].



Pagrindinė gvazdikmedžio eterinio aliejaus sudedamoji dalis yra eugenolis, kurio koncentracija gali svyruoti nuo 45 % iki 90 %, tačiau atskirų cheminių medžiagų kiekis gali skirtis priklausomai nuo kelių kintamųjų, tokių kaip aplinkos sąlygos, derliaus nuėmimo sezonas, genetika, auginimo metodai [119]. Keletas tyrimų rodo, kad eugenolis,  $\beta$ -kariofilenas ir eugenilacetatas yra pagrindiniai *S. aromaticum* eterinio aliejaus junginiai, kurių procentinė dalis skiriasi nuo minėtų veiksnių [120, 121, 122]. Selles'as ir kt. užfiksavo 65 skirtingus junginius *S. aromaticum* eteriniame aliejuje, kurio pagrindinės sudedamosios dalys buvo eugenolis (78,72 %),  $\beta$ -kariofilenas (8,82 %) ir eugenilo acetatas (8,74 %) [123]. Taip pat Barakat'as pranešė, kad pagrindiniai *S. aromaticum* eterinio aliejaus junginiai buvo eugenolis (80,19 %), eugenilo acetatas (7,91 %), kariofilenas (3,79 %), furanas, tetrahidro-3-metilas (2,26 %) ir 2-propanonas, metilhidrazonas (1,54 %) [124].

#### 1.4.2. Gvazdikmedžio ekstraktų biologinis aktyvumas

Įvairios *S. aromaticum* dalys pasižymi plačiu biologinio aktyvumo spektru, įskaitant antioksidacinį, priešūždegiminį, anestetinį, priešvėžinį, insekticidinį, herbicidinį ir nematocidinį poveikį, tačiau dėl savo antibakterinio, antigrybinio ir antioksidacinio poveikio sulaukia itin didelio susidomėjimo [112].

##### *Antibakterinis aktyvumas*

Gvazdikmedžio eterinis aliejus, išgautas iš sausų gvazdikmedžio žiedpumpurių, pasižymi antibakterinėmis savybėmis dėl sudėtyje esančio eugenolio ir kitų fenolinių junginių. Jis žinomas dėl savo antimikrobinio aktyvumo prieš keletą patogeninių bakterijų, įskaitant *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* ir *Staphylococcus aureus*. Mokslininkų *in vitro* eksperimentų metu gvazdikmedžio eterinis aliejus pasižymėjo baktericidiniu poveikiu visiems tirtiems mikroorganizmams iki 0,304 mg/mL koncentracijos [125]. Pagrindiniai gvazdikmedžio ekstraktų junginiai yra eugenolis ir  $\beta$ -kariofilenas, kurie yra galingi antibakteriniai agentai. Gvazdikmedžio etanolinis ekstraktas parodė aktyvumą slopinant gramteigiamas ir neigiamas bakterijas, tokias kaip *S. aureus*, *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*. Tuo tarpu užfiksuota, kad eterinis aliejus pasižymėjo antibakteriniu aktyvumu prieš *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *A. hydrophila*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *P. gingivalis* ir *P. mirabilis* [126]. Taip pat El-Maati'is ir kt. atliko eksperimentus su įvairiais gvazdikmedžio ekstraktais ir nustatė antibakterinį jų poveikį prieš *S. aureus* ir *E. coli* augimą, koncentracijai svyruojant nuo 50 iki 100  $\mu$ g/mL. Rezultatai parodė, kad stipresnio antibakterinio pajėgumo ekstraktuose taip pat buvo didesnis fenolinių junginių kiekis [114].

##### *Antigrybinis aktyvumas*

Pagrindinis gvazdikmedžio ekstraktų komponentas, atsakingas už antigrybinį jų poveikį, yra eugenolis. Tai svarbiausias lakus junginys iš gvazdikmedžio pumpurų gaunamų ekstraktinių medžiagų, naudojamų tradicinėje medicinoje, kaip baktericidai, fungicidai, anestetikai ar kt. Gvazdikėlių eterinis aliejus parodė gebėjimą slopinti *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. Albicans* ir *V. inaequalis* augimą [126]. Tyrėjai siekė nustatyti kelių skirtingų koncentracijų vandeninių ekstraktų, įskaitant ir *S. aromaticum*, *in vitro* ir *in vivo* slopinamąjį poveikį rudojo puvinio *Monilinia laxa* ir *Monilinia fructigena* sukėlėjams. Naudojant 1,5 mg/mL koncentracijos *S. aromaticum* vandeninį ekstraktą *in vitro*, abiejų padermių grybienos augimas žymiai sumažėjo – slopinimas viršijo 90 %, o *in vivo* sąlygomis ekstraktas taip pat sumažino rudojo puvinio sunkumą ir dažnį [127]. Gvazdikmedžio eterinio aliejaus fungicidinis poveikis buvo tirtas *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 1322 patogeniui. Išgautas eterinis aliejus buvo sudarytas iš eugenolio (75,41 %), E-

kariofileno (15,11 %),  $\alpha$ -humuleno (3,78 %) ir kariofileno oksido (1,13 %), ir geriausią slopinamąjį *in vitro* poveikį parodė esant 5 % gvazdikmedžio eterinio aliejaus koncentracijai, sumažindamas pomidorų augalų ligas net 86,5 % [128]. Įdomūs eksperimentai buvo atlikti Aguilar–González ir kt. mokslininkų. Viename iš darbų jie vertino skirtingos gvazdikmedžio ir garstyčių eterinių aliejų koncentracijos garų fazėje *in vitro* ir *in vivo* poveikį *Botrytis cinerea*. *In vitro* ir *in vivo* gvazdikėlių eterinio aliejaus minimali slopinamoji koncentracija buvo 92,56  $\mu\text{L}/\text{L}_{\text{air}}$ . Naudojant gvazdikmedžio ir garstyčių eterinių aliejų derinius *in vitro* minimali slopinamoji koncentracija buvo 46,28  $\mu\text{L}/\text{L}_{\text{air}}$  ir 1,93  $\mu\text{L}/\text{L}_{\text{air}}$  atitinkamai, tuo tarpu *in vivo* – 11,57  $\mu\text{L}/\text{L}_{\text{air}}$  gvazdikmedžio ir 1,93  $\mu\text{L}/\text{L}_{\text{air}}$  garstyčių eterinio aliejaus [129]. Lietuvoje taip pat vykdomi eksperimentai tiriant skirtingų ekstraktų ir eterinių aliejų fungicidinį poveikį įvairiems patogenams. Vieni iš daugiausiai rezultatų pateikę yra LAMMC Sodininkystės ir daržininkystės instituto mokslininkai. Dėnė ir kt. tyrė *B. cinerea* izoliatų jautrumą skirtingų koncentracijų augalų ekstraktams. Apdorojus *B. cinerea* izoliatas 800  $\mu\text{L}/\text{L}$  koncentracijos gvazdikėlių ekstraktu *in vitro* sąlygomis, buvo pastebėtas 70 % izoliatų augimo slopinimas. Braškių izoliatas buvo jautriausias gvazdikmedžio ekstraktui, nes *B. cinerea* augimas nebuvo matomas jau nuo 500  $\mu\text{L}/\text{L}$  ekstrakto koncentracijos [74]. Šernaitės ir kt. *in vitro* tyrimų metu gauti rezultatai rodo daug žadančias galimybes naudojant gvazdikmedžio ekstraktus ir eterinius aliejus prieš pilkojo puvinio sukėlėją braškėse *B. cinerea*. 200  $\mu\text{L}/\text{L}$  koncentracijos gvazdikmedžio ekstraktas rodė didesnę nei 80 % patogeno slopinimą, o esant 600–2000  $\mu\text{L}/\text{L}$  koncentracijoms buvo užfiksuota visiška *B. cinerea* inhibicija. Tuo tarpu gvazdikmedžio eterinis aliejus nepastoviai slopino patogeno augimą esant 200–1000  $\mu\text{L}/\text{L}$  koncentracijoms, tačiau naudojant 1200–2000  $\mu\text{L}/\text{L}$  koncentracijų eterinį aliejų patogeno augimas nepasireiškė. Šių dviejų augalinės kilmės produktų veiksmingumo skirtumai gali priklausyti nuo skirtingų ekstrahavimo metodų [130].

#### *Antioksidacinis aktyvumas*

Kadangi gvazdikmedžio žiedpumpuriuose yra gausu eugenolio,  $\beta$ -kariofileno, eugenilo acetato ir įvairių fenolinių rūgščių, iš šios žaliavos gauti ekstraktai taip pat pasižymi stipriu antioksidaciniu aktyvumu. Naudojant skirtingus tirpiklius ir ekstrahavimo metodus, gaunamos skirtingos aktyvių junginių koncentracijos ekstraktuose. Ekstraktų antioksidacinės savybės turi stiprią teigiamą koreliaciją su bendru fenolių ir flavonoidų kiekiu, o tai įrodo, kad *S. aromaticum* žiedpumpurių ekstraktų antioksidacinės savybės skiriasi dėl polifenolių kiekio [131]. Al Mashkor'as tyrė 50 % acetoninių gvazdikmedžio ekstraktų, gautų iš įvairių augalo dalių, antioksidacinį aktyvumą FRAP ir DPPH metodais, taip pat nustatinėjo bendrą fenolinių junginių koncentraciją. Didžiausia fenolinių junginių koncentracija buvo nustatyta augalo vaisiuose – 247,61 mg/100 g sausos medžiagos, taip pat ir antioksidacinis aktyvumas – FRAP metodu buvo gauta 437,29 mg TE/100 g sausos masės ir 87,50 % DPPH• radikalo surišimo geba [132]. Kiki taip pat tyrė laisvųjų radikalų surišimo gebą gvazdikmedžio eteriniame aliejuje DPPH metodu. Matavimai buvo atliekami 30–120 min. intervalu, naudojant 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ir 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  koncentracijas. Buvo pastebėta, kad eterinio aliejaus aktyvumas didėja palaipsniui, didėjant koncentracijai ir laikui. Nustatyta, kad antioksidacinis potencialas yra didžiausias, kai laisvųjų radikalų surišimo geba yra 98,6 %, esant 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  gvazdikmedžio eterinio aliejaus koncentracijai [119]. Afrendi'is ir kt. tyrė gvazdikmedžio lapų ir pumpurų etanolio ekstraktų bendrą fenolinių junginių koncentraciją ir antioksidacinį aktyvumą DPPH ir ABTS metodais. Lapų ir pumpurų ekstraktų fenolių koncentracija atitinkamai buvo 441,28 mg GAE/g ekstrakto ir 394,73 mg GAE/g ekstrakto. Gvazdikmedžio lapų ekstraktas pasižymėjo stipriu antioksidaciniu aktyvumu *in vitro* prieš DPPH ir ABTS radikalus –  $\text{IC}_{50}$  vertė buvo 9,29 ppm ir 29,57 ppm atitinkamai [133]. Gvazdikmedžio lapuose ir pumpuruose tyrėjai

rado skirtingus chlorofilų kiekius. Lapų dalyse rasta daugiau chlorofilų – apie 1,123 mg, o pumpuruose – apie 0,900 mg. *Syzygium aromaticum* ekstraktai rodo ne tik daug žadančius rezultatus slopinant grybinių patogenų ligas, bet ir dėl antioksidacinių junginių gausos savo sudėtyje stiprina augalų imuninę sistemą [134].

### 1.5. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Augalai sudaryti iš daugybės antrinių metabolitų ir biologiškai aktyvių junginių, kurie gali būti pritaikomi kaip alternatyva pesticidų naudojimui žemės ūkyje. Augaliniai ekstraktai sulaukia didelio komercinio susidomėjimo pirmiausia dėl herbicidinių, insekticidinių, antimikrobinių, antigrybinių ir antioksidacinių savybių bei dėl jų natūralios kilmės, o tai paprastai kelia mažesnę riziką aplinkai ir žmonių sveikatai [135]. Gvazdikmedis ir jo ekstraktai yra plačiai tiriami dėl naudingų savybių, o duomenų apie jų toksiškumą nėra daug. Mokslinės literatūros duomenimis, gvazdikmedžio pumpurų ekstrakto naudojimas slopino *B. cinerea* ir kitų patogenų augimą laboratorinėmis sąlygomis. Antioksidantų sistema augaluose turi lemiamą vaidmenį saugant juos nuo įvairių stresų, įskaitant tuos, kuriuos sukelia grybiniai patogenai, tokie kaip *Botrytis cinerea*. Kai braškių augalai patiria stresą dėl grybinės infekcijos, jų antioksidacinė sistema, įskaitant fermentinius ir nefermentinius komponentus, suaktyvėja, kad sumažintų patogeno keliamą oksidacinę žalą. Nors yra įvairių mokslinių pranešimų apie skirtingų ekstraktų *in vitro* slopinamąjį poveikį patogeniniams grybams, eksperimentų realiomis augimo sąlygomis, tiriančių *S. aromaticum* ekstraktų ir eterinių aliejų poveikį braškių pilkojo puvinio sukėlėjui *B. cinerea*, nėra daug. Ribotas tyrimų kiekis aptinkamas ir vertinant augalų antioksidacinės sistemos pokyčius paveikus augaliniiais ekstraktais, ypač kartu vertinant ir grybinio patogeno sukeltą infekciją. Tikėtina, kad dėl gausaus bioaktyvių junginių kiekio, gvazdikmedžių ekstraktas ne tik slopinančiai veikia *B. cinerea* infekcijos plitimą braškėse, bet ir turi įtakos augalo antioksidacinei gynybos sistemai bei antrinių metabolitų sintezei. Duomenys apie gvazdikmedžio pumpurų ekstrakto veikimą braškėse reikšmingai papildytų alternatyvių medžiagų ir junginių tvariam žemės ūkiui tyrimus, siekiant sumažinti priklausomybę nuo sintetinių cheminių medžiagų žemės ūkyje, sumažinti ekologinį poveikį ir užtikrinti ilgalaikį augalų ligų valdymo efektyvumą.

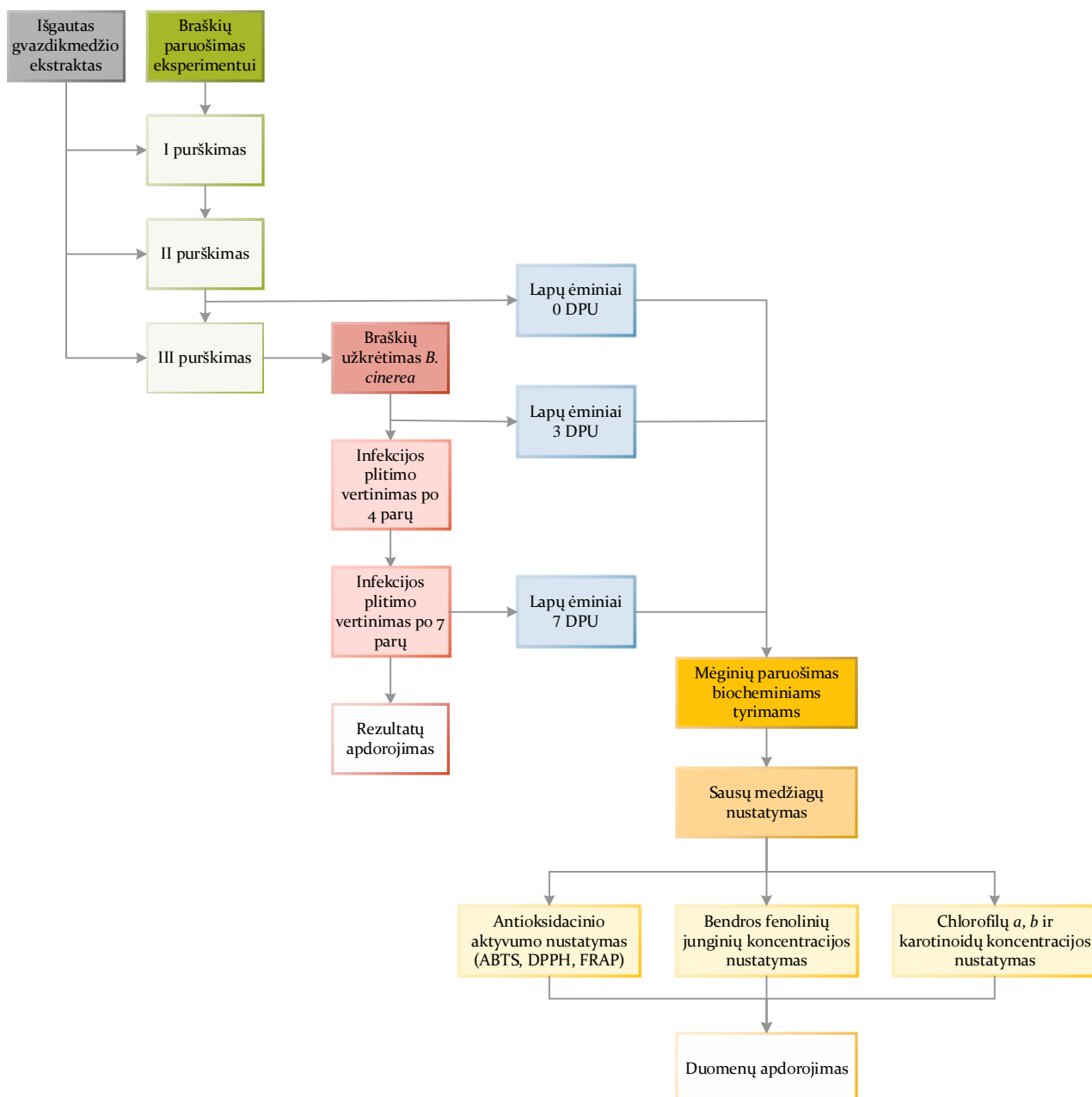
## 2. Medžiagos ir tyrimų metodai

### 2.1. Tyrimų atlikimo vieta

Baigiamojo projekto eksperimentai atlikti Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centre (LAMMC), Sodininkystės ir daržininkystės institute (SDI) (Babtai, Kauno raj.), 2022 m. rugsėjo–2023 m. balandžio mėn.

### 2.2. Tyrimų eiga

Baigiamojo darbo tyrimų eiga ir principinė schema pateikiama paveiksle žemiau:



2.1 pav. Tyrimo eiga ir pagrindiniai etapai

### 2.3. Tyrimų metu naudota įranga ir reagentai

Tyrimams naudota įranga:

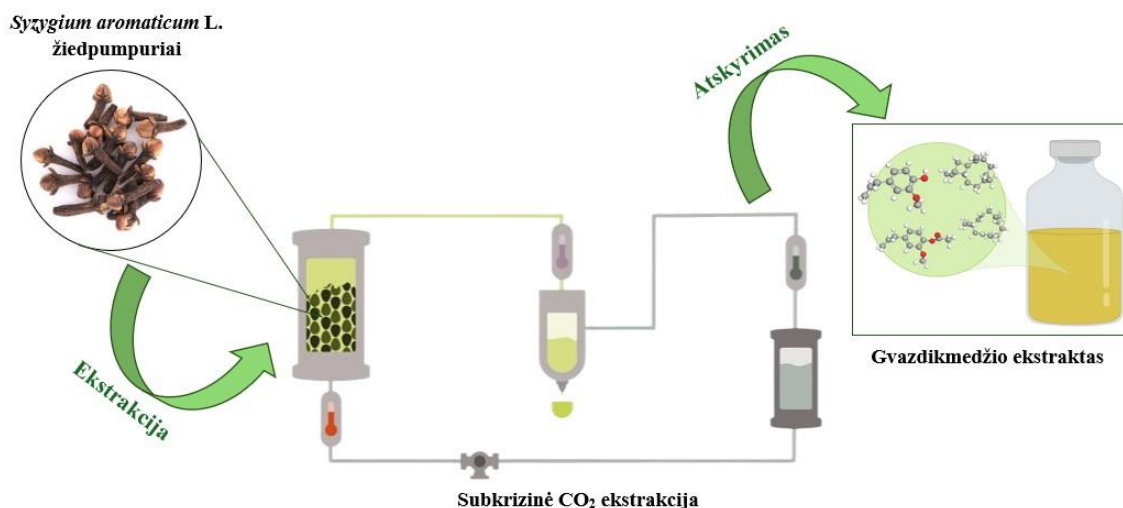
- subkrizinis CO<sub>2</sub> ekstraktorius;
- elektrinis malūnas RRH-2000A;
- laminarinė spinta (Esco Airstream® Class II Biological Safety Cabinet);
- laboratorinis malūnas (Retsch GM 200);
- laboratorinis aukšto slėgio autoklavas (CertoClav CV-EL 12 LGS);
- inkubatorius (Mettler Lab Incubator I);
- vandens distiliavimo įranga (Millipore);
- stalinė centrifuga (HERMLE Z 366 K);
- analitinės svarstyklės (Toledo MS-S);
- liofilizatorius (FD-7);
- spektrofotometras (SPECTROstar® Nano BMG LABTECH UV/vis spectrometer);
- kiti įrankiai: automatinės reguliuojamo tūrio pipetės, slankmatis/liniuotė, mėgintuvėliai, pincetas, šaukštelis, metalinis pjaustymo įrankis, adatėlės, spiritinė lemputė, plastikinės dėžutės ėminių surinkimui, žirkklės, *Petri* lėkštelės, sterilūs įrankiai, mikrolėkštelės (*microplate*), popierinis filtras, stalinė purtyklė.

Tyrimams naudoti reagentai ir cheminės medžiagos:

- gvazdikmedžio ekstraktas;
- sterilus dejonizuotas vanduo;
- etanolis (80 %);
- metanolis (grynas);
- bulvių dekstrozės agarų terpė (PDA);
- ABTS (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonrūgštis);
- DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazilas);
- *Folin–Ciocalteu* reagentas;
- troloksas (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-karboksirūgštis);
- kalio persulfato (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) tirpalas;
- PBS (fosfatinis buferinis tirpalas);
- natrio acetato buferinis tirpalas;
- TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazinas);
- druskos rūgštis (HCl);
- geležies chlorido heksahidrato tirpalas (FeCl<sub>3</sub>×6H<sub>2</sub>O);
- natrio karbonatas (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>);
- galo rūgštis (3,4,5-trihidroksibenzenkarboksirūgštis).

#### 2.4. Ekstrakto gamyba

Gvazdikmedžio (lot. *Syzygium aromaticum*) ekstrakto gamyba atlikta naudojant subkrizinį CO<sub>2</sub> ekstraktorių. Džiovinti gvazdikėlių pumpurai buvo įsigyti iš UAB „Sauda“ (Lietuva). Prieš ekstrakciją pumpurai buvo sumalti elektriniu malūnu iki homogeniškų miltelių pavidalo. 10 kg miltelių buvo patalpinta į ekstraktorių, susidedantį iš ekstrahavimo indo, aušintuvo, šildytuvo ir skysto CO<sub>2</sub> surinkimo indo. Gamybos parametrai buvo: 40 barų slėgis, 10 °C temperatūra ir 6 valandų ekstrakcijos laikas. Po gamybos surinktas ekstraktas filtruotas per popierinį filtrą. Gautas ekstraktas buvo laikomas 4 °C temperatūroje iki kitų analizių ir tyrimų (žr. 2.2 pav.).



**2.2 pav.** Gvazdikmedžio (lot. *Syzygium aromaticum*) ekstrakto gavimas iš augalo pumpurų

Eksperimentams naudotas 0,20 % koncentracijos gvazdikmedžio CO<sub>2</sub> ekstraktas (v/v) paruošiamas sumaišant ekstraktą su steriliu distiliuotu vandeniu. Reikiamas ekstrakto ir vandens tūris atmatuojamas automatine pipete į mėgintuvėlį ir suplakamas purtykle.

## 2.5. *B. cinerea* kolonijų paruošimas augalų užkrėtimui

Šioje tyrimo dalyje buvo paruošta mitybinė terpė, skirta patogeno išgryninimui, ir paruoštos *B. cinerea* kolonijos eksperimentui šiltnamyje su braškių augalais.

*B. cinerea* auginti laboratorinėmis sąlygomis naudota PDA – bulvių dekstrozės agaras (angl. Potato Dextrose Agar) mitybinė terpė, paruošta pagal gamintojo nurodytas specifikacijas – 1 l mitybinės terpės paruošti reikia 42 g sausos terpės mišinio miltelių. Pirmiausia, analitinėmis svarstyklėmis atsveriamas reikiamas kiekis PDA miltelių ir suberiama į butelį su steriliu distiliuotu vandeniu, gerai išmaišoma, siekiant tolygaus sausų medžiagų pasiskirstymo. Po to mišinys 15 min. sterilizuojamas autoklave 121 °C temperatūroje. Po autoklavavimo buteliai su mitybine terpe šiek tiek ataušinami. Mitybinei terpei esant dar šiltai, ji išpilstoma į *Petri* lėkšteles. Siekiant išvengti pašalinių patogenų patekimo į terpę, ji į lėkšteles pilstoma laminarinėje spintoje. Kai mitybinė terpė *Petri* lėkštelėse atvėsta ir sustingsta, ją galima naudoti tolimesniems procesams.

Tyrimams naudotas LAMMC SDI Augalų apsaugos laboratorijos kolekcijos mikroskopinis grybas *B. cinerea*. Jis buvo izoliuotas nuo braškių augalo dalių, turinčių pilkojo puvinio ligos simptomų ir požymių. Tyrimuose naudotos išgrynintos *B. cinerea* izoliatų kolonijos *Petri* lėkštelėse. Sterilėmis sąlygomis laminarinėje spintoje adatėle paimamas gabalėlis grybo kolonijos iš lėkštelės krašto ir perkeliamas į šviežios PDA terpės lėkštelės centrą. Tokiu būdu paruošiamas reikiamas *B. cinerea* grybo lėkštelių skaičius tyrimams su augalais. Lėkštelės laikomos inkubatoriuje 7 paras pastovioje 22±2 °C temperatūroje, tamsoje ir išimamos tik prieš pat tolimesnius eksperimentus (žr. 2.3 pav.). *B. cinerea* kolonijos paruošiamos augalų užkrėtimui supjaustant jas steriliu metaliniu įrankiu. Įrankis sterilizuojamas liepsna iš stalinės lempelės, pjaustoma 7 mm skersmens diskeliais laminarinėje spintoje. Supjausčius grybą lėkštelėse, jos uždengiamos, kraštai apvyniojami Parafilm plėvele ir jos paruošiamos transportavimui į šiltnamį.



**2.3 pav.** 7 parų *B. cinerea* kolonija Petri lėkštelėje

## 2.6. Eksperimento su braškių augalais vykdymas

Eksperimentas vykdytas LAMMC SDI Augalų fiziologijos laboratorijos šiltnamyje (žr. 2.4 pav.). Braškių daigai pasodinti į 15×15 cm plastikinius vazonėlius su durpių substrato mišiniu. Šiltnamyje buvo palaikomos pastovios klimatinės sąlygos: 21 °C temperatūra, 70 % drėgmė ir 16 val. fotoperiodu veikė aukšto slėgio natrio lempų apšvietimas ( $200 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Braškių augalai buvo laistomi pagal poreikį, o nuo 1,5 mėn. po pasodinimo kas savaitę tręšiami kompleksinėmis trąšomis pagal auginimo rekomendacijas.



**2.4 pav.** Braškių eksperimento įrengimas LAMMC SDI Augalų fiziologijos laboratorijos šiltnamyje

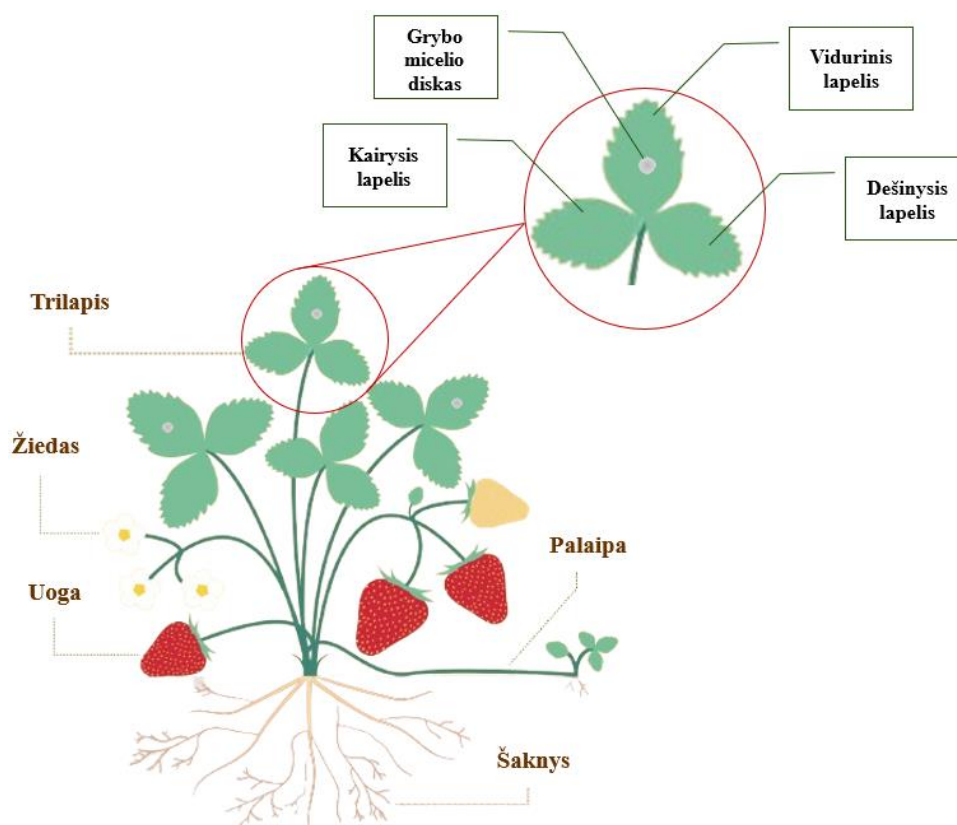
Prieš pradėdant purškimus, eksperimentas išdėstytas randomizuotais blokais. Vienam variantui priskirta 3 pakartojimai po 5 augalus. Visas eksperimentas kartotas du kartus. Eksperimentiniai variantai pateikti 2.1 lentelėje.

## 2.1 lentelė. Eksperimento su braškių augalais variantai

| Varianto kodas | Veislė  | Eksperimento variantas   |
|----------------|---------|--|
| KONTR          | Malwina | Nepurkštos ekstraktu braškės   |
| KONTR–BC       | Malwina | Nepurkštos ekstraktu ir <i>B. cinerea</i> užkrėstos braškės                    |
| GV             | Malwina | Purkštos gvazdikmedžio 0,20 % ekstraktu braškės                                |
| GV–BC          | Malwina | Purkštos gvazdikmedžio 0,20 % ekstraktu ir <i>B. cinerea</i> užkrėstos braškės |

Eksperimento metu augalų purškimai vykdyti 3 kartus: 7, 4 paros iki užkrėtimo ir tą pačią dieną kaip ir užkrečiant grybu. Gvazdikmedžių ekstrakto mišinys su vandeniu paruošiamas šviežiai prieš kiekvieną purškimą, tą pačią dieną. Kaip kontroliniai augalai buvo naudojamos nepurkštos braškės. Vieno purškimo metu buvo išpurškiama 10 ml ekstrakto mišinio vienam eksperimento variantui.

Po paskutinio purškimo, braškės užkrėstos *B. cinerea* micelio disku. Užkrėtimas atliktas mažiausiai ant 3 vieno augalo lapų. Sterilia adatėle padarytos žaizdos ant braškių trilapių vidurinio lapo. Ant kiekvienos žaizdos buvo uždėtas 7 mm skersmens *B. cinerea* micelio diskas, dedant miceliu į apačią. (žr. 2.5 pav.). Po užkrėtimo braškės paliktos augti tomis pačiomis sąlygomis, duodant laiko infekcijai plisti.



2.5 pav. Braškių trilapių užkrėtimas *B. cinerea*



Praėjus 4 ir 7 paroms po užkrėtimo, vertintas pilkojo puvinio plitimas braškėse. Kiekviename varianto augale įvertintas užkrėstų lapų pažeidimo intensyvumas balais ir procentinė pažeisto lapo dalis.

Ligos intensyvumas užkrėstų lapų plote buvo vertinamas balais nuo 0 iki 5, kur:

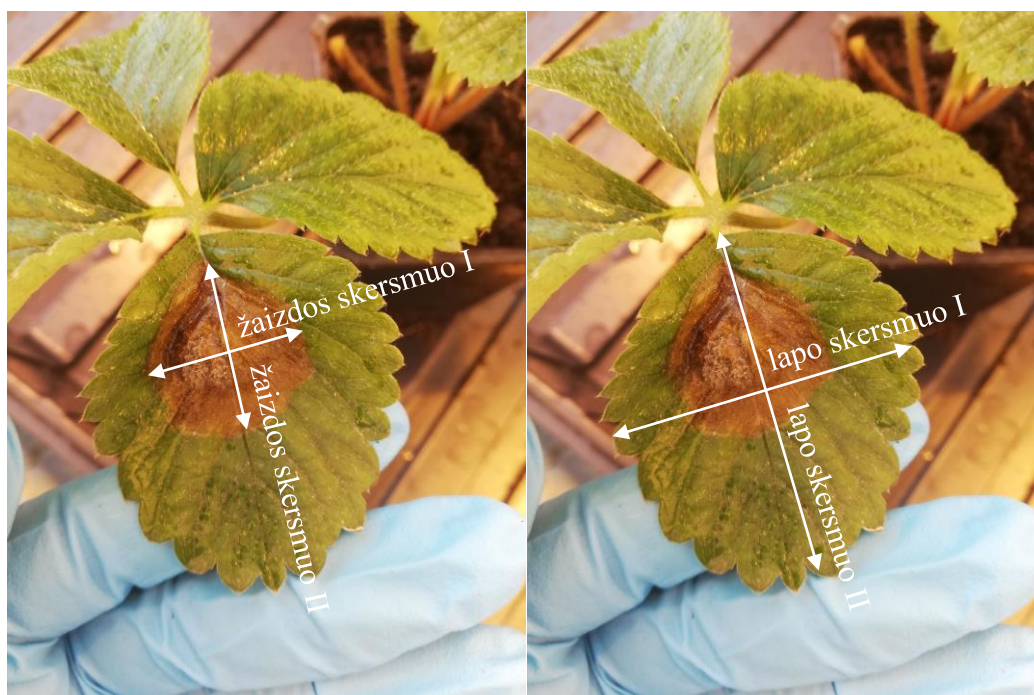
- 0 – nėra infekcijos;
- 1 – pažeista <5 % lapo ploto;
- 2 – pažeista <10 % lapo ploto;
- 3 – pažeista <15 % lapo ploto;
- 4 – pažeista <20 % lapo ploto;
- 5 – pažeista >21 % lapo ploto.

Matavimui naudotas vizualus vertinimo skalės pavyzdys pateiktas žemiau:



**2.6 pav.** *B. cinerea* pažeidimo skalė ant braškių lapų [7]

Procentinė pažeisto lapo dalis buvo apskaičiuota atlikus matavimus slankmačiu. Vertinimo metu slankmačiu buvo išmatuota pilkojo puvinio (*B. cinerea*) sukulto pažeidimo skersmuo (mm) dviem kryptimis, taip pat bendras braškių lapo skersmuo dviem kryptimis (žr. 2.7 pav.), išvedami vidurkiai.



**2.7 pav.** Pilkojo puvinio (lot. *B. cinerea*) sukulto pažeidimo ir braškių lapo matavimas slankmačiu

Taikant formulę:

$$\frac{\text{Pilkojo puvinio pažeidimo plotas, mm}^2}{\text{Lapo plotas, mm}^2} \times 100 \%; \quad (2.1)$$

apskaičiuota procentinė pažeistų lapų dalis kiekviename iš augalų bei apskaičiuojami vidurkiai eksperimentiniuose variantuose.

## 2.7. Braškių lapų mėginių paruošimas biocheminiams tyrimams

Antioksidacinės sistemos atsako pokyčiams ir kitų antrinių metabolitų koncentracijų nustatymui iš kiekvieno varianto buvo surenkama 10 vienodo dydžio trilapių, kurie laboratorijoje pasverti ir sudėti į plastikinius maišelius. Ėminių šiltnamyje surinkimo sąlygos pateiktos 2.2 lentelėje.

2.2 lentelė. Eksperimento metu surinkti braškių lapų ėminiai

| Ėminio Nr. | Paruošto mėginio kodas | Ėminių surinkimo aprašymas  |
|------------|------------------------|---|
| 1          | 0 DPU                  | Lapų ėminiai surinkti prieš 3-įjį purškimą ir prieš užkrėtimą <i>B. cinerea</i> |
| 2          | 3 DPU                  | Lapų ėminiai surinkti praėjus 3 dienoms po augalų užkrėtimo <i>B. cinerea</i>   |
| 3          | 7 DPU                  | Lapų ėminiai surinkti praėjus 7 dienoms po augalų užkrėtimo <i>B. cinerea</i>   |

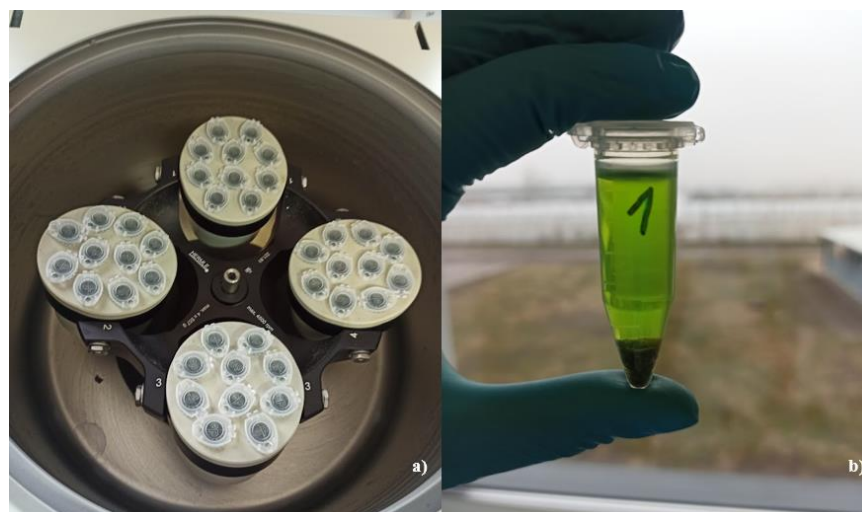
Paruošti maišeliai su ėminiais liofilizuoti 24 val. Po liofilizavimo registruota sausų lapų masė, apskaičiuotas liofilizuotos ir žalios braškių lapų masės santykis:

$$\frac{\text{Liofilizuota masė, g}}{\text{Žalia masė, g}}, \quad (2.2)$$

Toliau liofilizuoti braškių lapai buvo smulkiai sumalti laboratoriniu malūnu ir ruošti jų ekstraktai biocheminiams tyrimams.

Kiekvieną biocheminių tyrimų variantą sudarė trys analitiniai pakartojimai iš bendros surinktos liofilizuotos braškių lapų masės.

Ruošiant braškių lapų ekstraktus biocheminiams tyrimams, 0,03 g liofilizuotų mėginių buvo pasverta analitinėmis svarstyklėmis į žinomos masės mėgintuvėlius ir užpilta 3 mL 80 % etanoliu, kuris naudojamas kaip tirpiklis. Mėgintuvėliai su paruoštais mišiniais palikti ekstrahuotis šaldytuve (4 °C) parą laiko. Kitą dieną, praėjus atitinkamam laikui, mėgintuvėliai nucentrifuguojami ir supernatantas surenkamas (žr. 2.8 pav.). Iš paruoštų ekstraktų buvo atliekamos biocheminės analizės – braškių antioksidacinės sistemos atsako tyrimai skirtingais metodais, bendros fenolinių junginių bei chlorofilų *a*, *b* ir karotinoidų koncentracijos nustatymas.

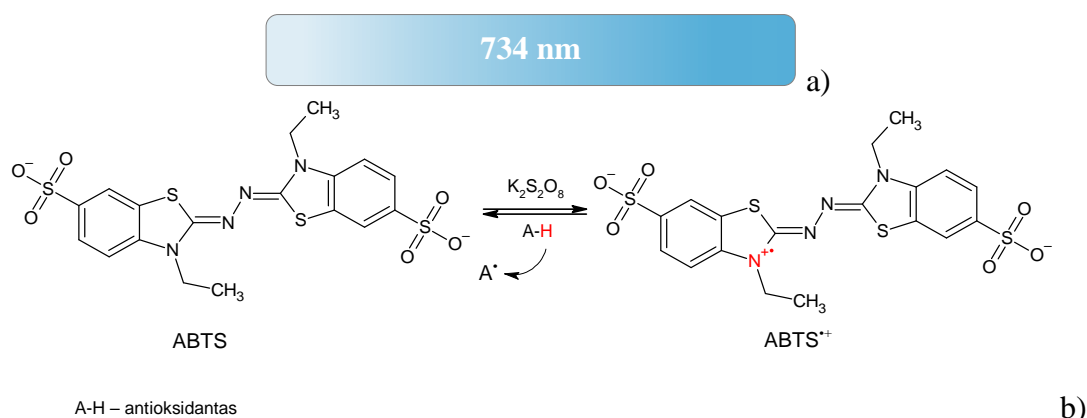


2.8 pav. Braškių lapų mėginių centrifugavimas (a); nucentrifuguotas ekstraktas (b)

## 2.8. Braškių antioksidacinės sistemos atsako pokyčių tyrimai

### 2.8.1. Antioksidacinio aktyvumo braškių lapuose nustatymas ABTS metodu

ABTS antioksidacinio aktyvumo nustatymo metodas yra kolorimetrinis tyrimas, taikomas tiek lipofiliniams, tiek hidrofiliams antioksidantams. Šio tyrimo metu matuojamas santykinis antioksidantų gebėjimas sunaikinti vandeninėje fazėje susidariusį  $ABTS^{\bullet+}$  – ABTS radikalo katijoną. Jis susidaro reaguojant ABTS druskai su stipriu oksidatoriumi, pvz., kalio persulfatu ( $K_2S_2O_8$ ), sudarydamas žaliai mėlyną spalvą. Tiriamajame junginyje esant antioksidantų, susidariusi spalva šviesėja ir blunka, o tai reiškia, kad antioksidantas redukuoja  $ABTS^{\bullet+}$  atgal į bespalvį ABTS, o spalvų pokyčiai gali būti išmatuoti spektrofotometriškai ilgųjų bangų sugerties spektre (žr. 2.9 pav.). Spalvos pakitimo laipsnis yra proporcingas  $ABTS^{\bullet+}$  slopinimui.  $ABTS^{\bullet+}$  radikalų surišimo metodas yra greitas ir gali būti naudojamas esant įvairioms pH vertėms tiek vandeninėse, tiek organinėse tirpiklių sistemose, taip pat turi gerą atkartojamumą bei yra paprastas atlikti [136].



2.9 pav. Spalvos kitimas atliekant ABTS tyrimą (a); ABTS tyrimo reakcijos (b)

ABTS antioksidacinis aktyvumas išmatuotas pagal modifikuotą Re ir kt. (1999) metodiką [137].

Pradinio  $ABTS^{\bullet+}$  tirpalo ruošimas: 0,112 g ABTS ištirpinamas 100 mL distiliuoto vandens. Papildomai įpilama 400  $\mu$ L 70 mM  $K_2S_2O_8$  tirpalo – taip gaunamas ABTS radikalo katijonas ( $ABTS^{\bullet+}$ ). Mišinys paliekamas tamsoje kambario temperatūroje 16 val., kol susidaro tamsi žaliai mėlyna tirpalo spalva.

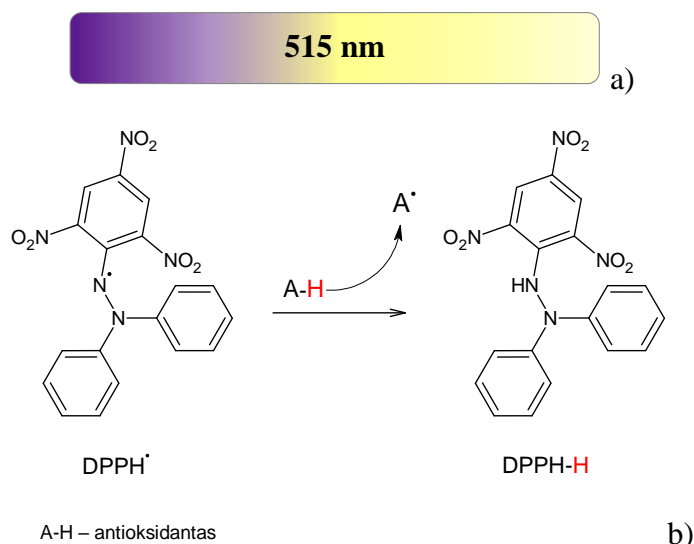
Darbinio ABTS<sup>•+</sup> tirpalo ruošimas: pradinis ABTS<sup>•+</sup> tirpalas skiedžiamas distiliuotu vandeniu iki 0,80 ± 0,03 absorbcijos ties 734 nm bangos ilgiu.

Kalibracinei kreivei gauti buvo paruošiamos skirtingų koncentracijų (0,25–2,5 μM) Trolox etaloniniai tirpalai, išmatuojama jų absorbcija ties 734 nm bangos ilgiu, nubraižoma kalibracinė kreivė ir išvedama lygtis. Trolox ekvivalentas (TE), atitinka tokį Trolox kiekį μmol, kuris tokiomis pačiomis tyrimo sąlygomis turi vienodą antioksidacinį aktyvumą, kokį turi 1 g sausos augalinės medžiagos.

Antioksidacinis braškių lapų aktyvumas buvo tiriamas į 280 μL praskiesto ABTS<sup>•+</sup> tirpalo įpylus 20 μL ekstrakto. Kaip kontrolinis mėginys naudotas distiliuotas vanduo. Kiekvienam tiriamajam mėginiui atlikta po 3 pakartojimus. Minėti tirpalai supilstomi į mikrolėkšteles, paliekama inkubuotis 20 min. kambario temperatūroje. Po įvykusios reakcijos, spektrofotometru matuojamas tiriamųjų tirpalų absorbcijos slopinimas ir sumažėjimas ties 734 nm bangos ilgiu. Gauti rezultatai apskaičiuojami ir lyginami su Trolox standartinių tirpalų 0,25–2,5 μM koncentracijos diapazone sukeltu slopinimu. ABTS antioksidacinis aktyvumas išreiškiamas trolokso ekvivalento antioksidacine geba 1 g liofilizuotos braškių lapų masės (mM TE/g).

### 2.8.2. Antioksidacinio aktyvumo braškių lapuose nustatymas DPPH metodu

DPPH tyrimas yra vienas iš metodų, naudojamų augalų ekstraktų antioksidaciniam potencialui nustatyti. Tai kolorimetrinis tyrimas, taikomas hidrofobiniams antioksidantams. Radikalas tirpsta įvairiuose organiniuose tirpikliuose, bet netirpsta vandenyje. Paprastai jis ištirpsta metanolyje, etanolyje arba jų vandeniniuose mišiniuose. DPPH antioksidacinio aktyvumo nustatymo metodas pagrįstas tamsiai violetinės tirpalo spalvos intensyvumo sumažėjimu ir DPPH<sup>•</sup> radikalo redukavimu iki stabilių, suteikiančių tirpalui šviesiai gelsvą spalvą DPPH-H molekulių, dalyvaujant antioksidantui (žr. 2.10 pav.). Spalvos pokytis nustatomas išmatuojant absorbciją spektrofotometru esant 515–520 nm bangos ilgiui [136].



2.10 pav. Spalvos kitimas atliekant DPPH tyrimą (a); DPPH tyrimo reakcijos (b)

DPPH antioksidacinis aktyvumas išmatuotas pagal modifikuotą Brand-Williams ir kt. (1995) metodiką [138].

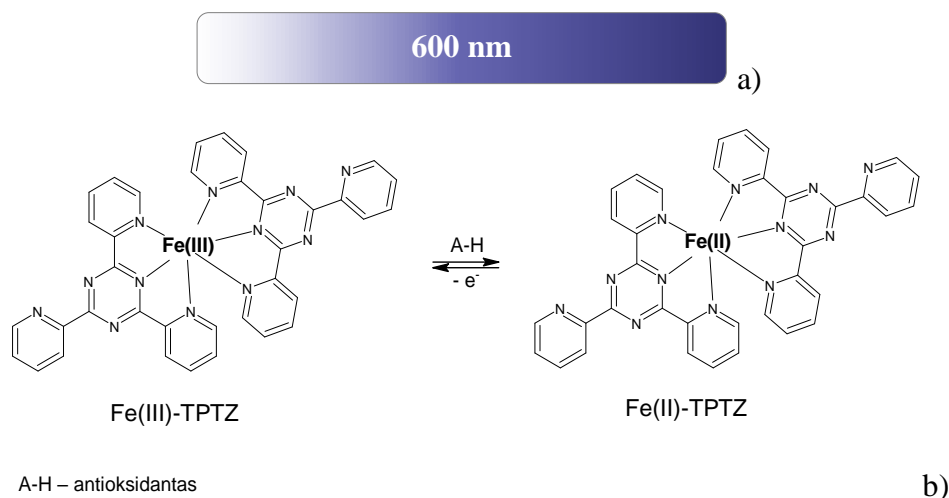
Antioksidacinis braškių lapų aktyvumas buvo nustatytas naudojant DPPH<sup>•</sup> kaip laisvąjį radikalą. Prieš analizę šviežiai paruošiamas pradinis DPPH<sup>•</sup> tirpalas: 0,005 g DPPH praskiedžiama 100 mL gryno metanolio matavimo kolboje ir apsaugoma nuo šviesos, naudojant aliuminio foliją. Absorbcijos vertės buvo nustatytos  $0,80 \pm 0,03$  515 nm bangos ilgiyje.

Antioksidacinis braškių lapų aktyvumas buvo tiriamas į 280 µL DPPH<sup>•</sup> tirpalo įpylus 20 µL ekstrakto. Kaip kontrolinis mėginys naudotas grynas metanolis. Kiekvienam tiriamajam mėginiui atlikta po 3 pakartojimus. Minėti tirpalai supilstomi į mikrolėkšteles, paliekama inkubuotis 16 min. kambario temperatūroje. Išmatuojama absorbcija 515 nm bangos ilgiyje.

Kalibracinė kreivė ruošama iš skirtingų koncentracijų Trolox etaloninių tirpalų (0,25–2,5 µM), kurių absorbcija matuota esant 515 nm bangos ilgiui. DPPH antioksidacinis aktyvumas išreiškiamas trolokso ekvivalento antioksidacine geba 1 g liofilizuotos braškių lapų masės (mM TE/g).

### 2.8.3. Antioksidacinio aktyvumo braškių lapuose nustatymas FRAP metodu

Geležį redukuojančios antioksidacinės galios (FRAP) tyrimas yra tipiškas elektronų perdavimu pagrįstas kolorimetrinis metodas, kuriuo matuojamas geležies jonų ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) komplekso redukavimas į intensyviai mėlyną geležies ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ) kompleksą veikiant antioksidantams rūgštinėje terpėje. Antioksidacinis aktyvumas nustatomas kaip absorbcijos padidėjimas matuojant 600 nm bangos ilgiyje (žr. 2.11 pav.). FRAP tyrimas atliekamas rūgštinėje terpėje (pH 3,6), siekiant išlaikyti geležies tirpumą ir paskatinti elektronų perdavimą [136].



**2.11 pav.** Spalvos kitimas atliekant FRAP tyrimą (a); FRAP tyrimo reakcijos (b)

Antioksidacinio aktyvumo nustatymas FRAP metodu buvo atliktas pagal modifikuotą Benzie ir Strain'o (1996) metodiką [139].

Prieš darbą šviežiai pagaminamas FRAP reagentas: santykiu 10:1:1 sumaišoma natrio acetato buferinis tirpalas (300 mM; pH 3,6), TPTZ tirpalas (10 mM; HCl rūgštyje (40mM)) ir geležies chlorido heksahidrato tirpalas (20 mM).

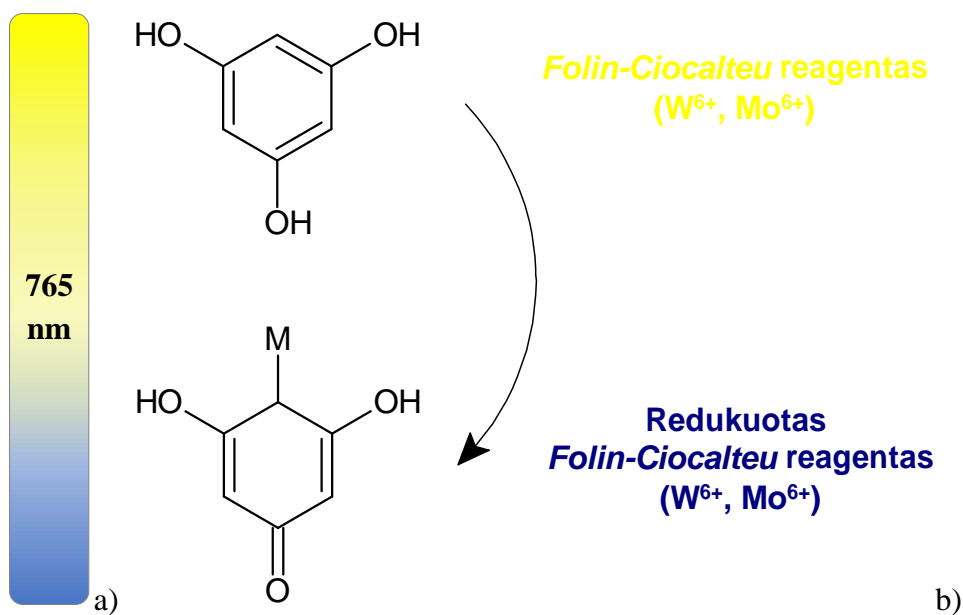
Analizei tiriamasis tirpalas paruošiamas 20 µL ekstrakto sumaišant su 280 µL paruošto FRAP reagento tirpalo mikrolėkštelėse ir inkubuojama kambario temperatūroje 20 min. prieš išmatuojant absorbciją 600 nm. Kiekvienas matavimas atliktas trimis pakartojimais. Etaloninis tirpalas pagaminamas tokiu pačiu būdu, vietoj ekstrakto pilant išgrynintą vandenį. Kalibracinei kreivei

ruošiami skirtingų koncentracijų trolokso tirpalai (0,20–2,0 mM), kurių absorbcija matuota esant 600 nm bangos ilgiui. Geležį redukuojantis antioksidacinis aktyvumas išreiškiamas trolokso ekvivalento antioksidacinę geba 1 g liofilizuotos braškių lapų masės ( $\mu\text{mol TE/g}$ ).

## 2.9. Braškių lapų bendros fenolinių junginių koncentracijos nustatymo tyrimas pagal Folino – Kiokalto metodą

*Folin – Ciocalteu* (FC) tyrimas yra dažniausiai naudojamas metodas bendrai fenolinių junginių koncentracijai (TPC) įvairiuose augaluose ir jų ekstraktuose nustatyti.

FC tyrimas yra kolorimetrinis metodas, pagrįstas elektronų perdavimo reakcijomis tarp FC reagento ir fenolinių junginių, kur antioksidantai veikia kaip elektronų donorai (reduktoriai), o FC – kaip elektronų akceptorius (oksidatorius). Fosfomolibdato ir fosfovolframo rūgščių anjoninių darinių redukcija antioksidantais sukelia spalvos pasikeitimą iš geltonos į mėlyną, o spalvos poslinkio dydis pasibaigus reakcijai yra tiesiogiai proporcingas fenolinių junginių redukciniam aktyvumui (žr. 2.12 pav.). Dėl elektronų pernešimo iš fenolinių junginių į rūgščių kompleksus šarminiam tirpale susidarys mėlyni kompleksai spektrofotometriškai gali būti išmatuoti 765 nm bangos ilgyje. Fenoliai ir polifenoliniai junginiai su FC reagentu reaguoja esant stipriai šarminėms sąlygoms (pH 10,9), tačiau aprašyta metodų, kai FC tyrimas atliekamas ir stipriai rūgštinėmis sąlygomis (pH 1,8) [136].



2.12 pav. Spalvos kitimas atliekant FC tyrimą (a); *Folin – Ciocalteu* reagento redukcija, kurią sukelia fenolių oksidacija mėginyje (b)

Tyrimas atliekamas pagal modifikuotą Singleton'o ir kt. (1999) metodiką [140].

Paruošiamas *Folin – Ciocalteu* fenolių reagentas, pradinį reagentą praskiedus 10 kartų distiliuotu vandeniu. Mikrolėkštelėse į 20  $\mu\text{L}$  ekstrakto įdedama 40  $\mu\text{L}$  FC reagento ir 160  $\mu\text{L}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7,5 %), inkubuojama 20 min. kambario temperatūroje tamsoje. Tiriamųjų tirpalų absorbcija matuojama spektrofotometriškai, esant 765 nm bangos ilgiui, trimis pakartojimais. Etaloninis tirpalas pagaminamas tokiu pačiu būdu, vietoj ekstrakto pilant 80 % etanolį. Kaip standartas kalibracinei kreivei naudojama galo rūgštis ir antioksidanto redukcinis gebėjimas matuojamas galo rūgšties ekvivalentais (mg GAE)/g liofilizuotos braškių lapų masės. Mėginiai kalibracinei kreivei paruošiami

ta pačia metodika kaip ir tiriamieji, tik vietoj ekstrakto pilamas skirtingų koncentracijų galo rūgšties tirpalas.

## 2.10. Chlorofilų *a*, *b* ir karotinoidų koncentracijos nustatymas braškių lapuose

Chlorofilai ir karotinoidai yra pigmentai, randami įvairiose augalų rūšyse. Ir chlorofilai, ir karotinoidai atlieka svarbų vaidmenį fotosintezėje ir turi antioksidacinių savybių, padedančių apsaugoti augalų ląsteles nuo oksidacinės pažaidos, kurią sukelia įvairūs biotiniai ir abiotiniai veiksniai. Tik dviejų tipų chlorofilai (*a* ir *b*) yra aukštesniuose augaluose, o kiti (*c*, *d*, *e*, *f*) aptinkami dar ir dumbliuose bei bakterijose. Augalai, turintys didesnę chlorofilų kiekį, pasižymi geresne laisvųjų radikalų surišimo geba ir biologiškai aktyviomis savybėmis. Karotinoidų daugiausia yra augaluose, vaisiuose, daržovėse, dumbliuose ir fotosintetinančiose bakterijose. Šie lipofiliniai pigmentai suteikia augalams geltoną, oranžinę ir raudoną spalvą. Karotinodai pagal funkcines grupes skirstomi į karotinus ir ksantofilus. Karotinams priskiriami:  $\alpha$ -karotinas,  $\beta$ -karotinas, likopenas, o ksantofilams: liuteinas, neoksantinas, zeaksantinas [141].

Chlorofilų *a*, *b* ir karotinoidų koncentracijos nustatymas atliktas pagal modifikuotas šių junginių nustatymo metodikas [142, 143].

Chlorofilų (*a*, *b*, bendrojo (*a+b*)) ir karotinoidų (ksantofilų ir karotinu) koncentracija nustatyta spektrofotometriškai matuojant iš anksto paruoštus braškių lapų etanolinius ekstraktus prie 470, 645 ir 662 nm bangos ilgių. Junginių koncentracija apskaičiuota pagal metodikoje pateiktas lygtis ir išreikšta mg/g liofilizuotos braškių lapų masės:

$$C_a = 11.75 \cdot A_{662} - 2.35 \cdot A_{645}; \quad (2.3)$$

$$C_b = 18.61 \cdot A_{645} - 3.96 \cdot A_{662}; \quad (2.4)$$

$$C_{a+b} = 7.79 \cdot A_{662} + 16.26 \cdot A_{645}; \quad (2.5)$$

$$C_{x+c} = \frac{1000 \cdot A_{470} - 2.27 \cdot C_a - 81.4 \cdot C_b}{227}; \quad (2.6)$$

čia:

$C_a$  – chlorofilo *a* koncentracija, mg/g;

$C_b$  – chlorofilo *b* koncentracija, mg/g;

$C_{a+b}$  – chlorofilo *a* ir *b* koncentracija, mg/g;

$C_{x+c}$  – karotinoidų (ksantofilų ir karotinu) koncentracija, mg/g;

A – absorbcija pasirinktame bangos ilgyje.

## 2.11. Tyrimų duomenų analizė ir apdorojimas

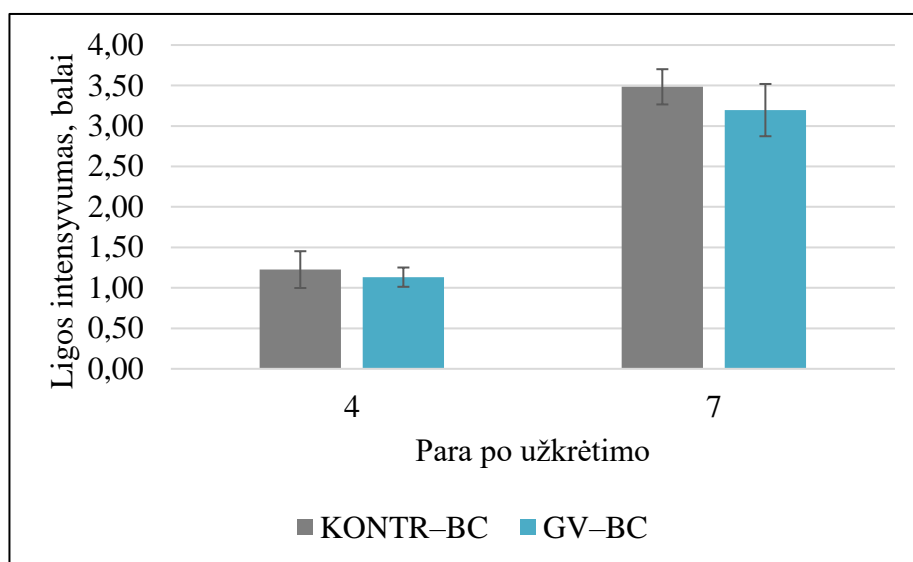
Gautų tyrimų rezultatų analizė ir apdorojimas atliktas Microsoft Excel kompiuterine programa. Struktūrinės cheminių junginių formulės braižytos ChemSketch programa. Gvazdikmedžio ekstrakto aparatūrinė schema nubraižyta naudojant Microsoft Visio programą.

### 3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

#### 3.1. Pilkojo puvinio (lot. *B. cinerea*) slopinimas gvazdikmedžio ekstraktu braškių augimo metu

Siekiant iširti gvazdikmedžio pumpurų ekstrakto gebėjimą slopinti braškių pilkąjį puvinį, kurį sukelia *B. cinerea*, buvo įvertintas užkrėstų lapų ligos intensyvumas balais (0-5) ir apskaičiuotas procentinis lapų pažeidimas. Pilkojo puvinio plitimas braškėse vertintas praėjus 4 ir 7 paroms po užkrėtimo, slankmačiu matuojant patogeno sukulto pažeidimo ir braškių lapų skersmenį dviem kryptimis (mm), bei įvertinant lapų pažeidimą balais (balų vidurkis). Taip pat apskaičiuoti standartiniai nuokrypiai nuo vidurkio.

Braškių lapų pilkojo puvinio pažeidimo vertinimas balais pateiktas 3.1 pav. Lyginamos purkštos gvazdikmedžio 0,20 % koncentracijos augaliniu ekstraktu ir *B. cinerea* užkrėstos braškės (GV–BC), su kontrolinio varianto nepurkštomis, tačiau *B. cinerea* užkrėstomis braškėmis (KONTR–BC).



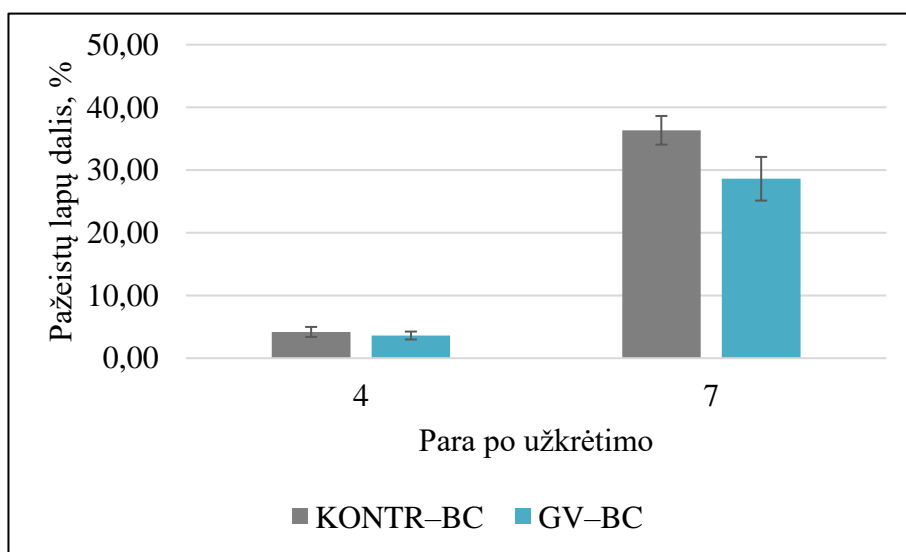
**3.1 pav.** Pilkojo puvinio pažeidimo intensyvumas balais braškių lapuose vertinant 4 ir 7 parą po užkrėtimo

Įvertinus ligos sukulto pažeidimo intensyvumą balais praėjus 4 paroms po augalų užkrėtimo patogenu, matyti, kad gvazdikmedžio ekstraktu nupurkštus ir užkrėstus augalus pilkasis puvinys paveikė šiek tiek mažiau (1,13 balo), negu nepurkštus ir užkrėstus augalus (1,23 balo). Vertinimo rezultatai, praėjus 7 paroms po užkrėtimo, rodo panašią rezultatų tendenciją kaip ir praėjus 4 paroms, išskyrus tai, kad padidėjo balų vidurkio skirtumas tarp variantų – gvazdikmedžio ekstraktu purkštų ir *B. cinerea* krėstų braškių lapų pažeidimas siekė 3,20 balų, o kontrolinio varianto augalų – 3,48 balų. Nuo 4 iki 7 paros pažeidimas pilkuoju puvinu augaluose paintensyvėjo 2,8 karto abiejuose tiriamuosiuose variantuose. Skirtumas tarp gautų rezultatų nėra didelis, tačiau registruotas slopinamasis gvazdikmedžio CO<sub>2</sub> ekstrakto poveikis *B. cinerea* sukulto pilkojo puvinio intensyvumui, kas rodo šio ekstrakto, kaip antigrybinės medžiagos, perspektyvas. Šiame tyrime taikytas mažai koncentruotas (0,20 %) ekstrakto mišinys su vandeniu. Grybinių ligų intensyvumas balais mokslininkų daugiausia vertintas *in vitro* sąlygomis arba vaisiuose ir uogose. Palyginus gautus rezultatus su kitų mokslininkų tyrimais, matomos tam tikros tendencijos. Mokslininkai [144] tyrė gauruotosios unkarijos (lot. *Uncaria tomentosa*) žievės ekstrakto poveikį *B. cinerea* kontrolei *in vitro* ir po derliaus nuėmimo, uogų saugojimo metu. Atsižvelgiant į efektyviausių *in vitro* tyrimų rezultatus, braškės buvo apdorotos chitozanų oligomerų ir *U. tomentosa* konjuguotais kompleksais ir vertintos



10 dienų po užkrėtimo. Geriausia *B. cinerea* dirbtinai užkrėstų braškių vaisių apsauga buvo stebima esant didžiausiai koncentracijai (1000 µg/mL), kur įvertintas ligos sunkumo laipsnis balais buvo tik 0,5. Mažesnis slopinimas buvo fiksuotas veikiant 500 µg/mL koncentracija (1,7 balo) ir 100 µg/mL koncentracija (3,5 balo), lyginant su 4,4 balo įvertintu kontroliniu variantu. Tiriamas ir kitų aromatinių augalų eterinių aliejų antigrybinis poveikis *B. cinerea* [145]. Tiriant antigrybinį aktyvumą *in vitro* geriausius rezultatus parodė šaltnėtės (lot. *Mentha spicata*) ir imbierinės citrinžolės (lot. *Cymbopogon martinii*) eteriniai aliejai. Augimo metu šiais eteriniais aliejais (10 % koncentracijos) apdorotose braškėse patogeno sukeltos ligos sunkumas nebuvo toks didelis, o dažnis sumažėjo atitinkamai 100 % ir 83 %. Nors gauti daug žadantys rezultatai, tokių didelių koncentracijų augalinių medžiagų naudojimas gali sukelti augalų stresą, kuris gali pasireikšti netgi herbicidiniu poveikiu ir sunaikinti augalus. Kai kurie mokslininkai [135] netgi tiria skirtingų gvazdikmedžio eterinių aliejų frakcijų fitotoksinį poveikį piktžolėms. Tyrimų metu buvo nustatyta, kad skirtingos eterinių aliejų frakcijos slopina *Senna obtusifolia* ir *Mimosa pudica* šaknų daigumą ir augimą, taigi, turi fitotoksinį poveikį invazinėms augalų rūšims. Taip pat buvo tiriamas gvazdikmedžio ir eukalipto eterinio aliejaus (2,5 %, 5 % ir 10 % koncentracijų) herbicidinis poveikis [146] ir prieš kitas vienmetes piktžoles: *Sisymbrium irio*, *Melilotus indicus*, *Raphanus raphanistrum* ir *Chenopodium album*. Šiame tyrime 10 % gvazdikmedžio eterinis aliejus parodė stiprų bioherbicidinį potencialą prieš tirtas piktžoles, tačiau eukalipto eterinis aliejus žolių augimą stabdė efektyviau. Dėl tokio įvairiapusiško gvazdikmedžio ekstraktų ir eterinių aliejų poveikio, atliekami tyrimai naudojant skirtingus ekstraktus įvairiomis koncentracijomis. Nors augalų ekstraktai ir eteriniai aliejai gali būti labai veiksmingi prieš grybinius patogenus kontroliuojamomis laboratorinėmis sąlygomis, sudėtingas ir įvairus realios aplinkos poveikis dažnai sumažina jų efektyvumą. Štai, pavyzdžiui, Šernaitės [147] atliktų eksperimentų išvados tai patvirtina. Nepaisant gauto didelio antigrybinio aktyvumo *in vitro* sąlygomis prieš *B. cinerea*, išskirto iš obuolių ir braškių, tirtų cinamono, kvapiojo pipiro ir lauro ekstraktų poveikis naudojant ant obuolių vaisių nebuvo veiksmingas. Cinamono ekstraktas pasižymėjo geriausiu antigrybiniu aktyvumu prieš obuolių pilkąjį puvinį, tačiau slopinamasis poveikis nebuvo reikšmingas.

4 ir 7 parą po augalų užkrėtimo taip pat buvo matuojama infekcijos sukelta žaizda ir apskaičiuojamas procentinis lapo pažeidimas (žr. formulę (2.1), 34 p.). Gauti rezultatai (žr. 3.2 pav.) koreliuoja su užkrėstų lapų pažeidimo vertinimu balais.



**3.2 pav.** Pažeistų lapų dalis (%) praėjus 4 ir 7 paroms po užkrėtimo

Apskaičiavus pažeistų lapų dalį (%) 4 parą po užkrėtimo buvo gauti mažai besiskiriantys rezultatai tarp variantų. Nepurkštų braškių lapų procentinio pažeidimo vidurkis siekė 4,19 %, o gvazdikmedžio ekstraktu purkštų braškių – 3,62 %. Praėjus dar 3 paroms ir atlikus paskutinį vertinimą, 7 parą po užkrėtimo buvo fiksuotas padidėjęs lapų pažeidimas – 8,7 k. kontroliniame variante ir 7,9 k. panaudojus augalinį ekstraktą. Pastarojo varianto buvo pažeista 7,73 % mažiau lapų lyginant su nepurkštomis braškėmis. Galima teigti, kad 0,20 % koncentracijos gvazdikmedžio CO<sub>2</sub> ekstraktas slopino *B. cinerea* sukeltus lapų pažeidimus šiltnamyje auginamose braškėse.

Nors yra tyrimų apie įvairių augalinių ekstraktų ir eterinių aliejų veiksmingumą nuo grybinių ligų sukėlėjų laboratorinėmis sąlygomis, nėra daug eksperimentų tiriančių *B. cinerea* infekcijos plitimą naudojant gvazdikmedžio ekstraktą realiomis augimo sąlygomis. Dauguma tyrimų atliekami *in vitro* sąlygomis dėl praktiškumo ir suteikia pirminius duomenis, padedančius nustatyti perspektyvias medžiagas tolesniems tyrimams sudėtingesnėmis ir kintančiomis *in vivo* sąlygomis. Dėl to yra svarbu pradėti tirti įvairių formų natūralių augalų ekstraktų veiksmingumą augalų augimo metu (šiltnamiuose, laukuose) arba sandėliuojant. Castellanos ir kt. [148] nustatė, kad gvazdikmedžio eterinis aliejus ir ekstraktas galėtų būti alternatyvus sprendimas pavojingų cheminių fungicidų naudojimui pomidorų vaisiams sandėliavimo ir transportavimo metu, siekiant sumažinti infekciją po derliaus nuėmimo. Mokslininkų tyrimų metu gauti rezultatai parodė, kad ši biologinė medžiaga yra veiksminga prieš grybinius patogenus *F. oxysporum* ir *A. niger in vitro*, kai koncentracija yra nuo 400 ppm (0,04 %) iki 500 ppm (0,05 %) ir praėjus 10 grybų kolonijų augimo dienų. Kita vertus, eteriniai aliejai ir funkciniai ekstraktai (350, 400 ir 450 ppm) sumažino *A. niger* augimą nuo 50 % iki 70 %, o *F. oxysporum* – iki 40 % pomidorų vaisiuose. Lyginant mūsų eksperimento rezultatus su aprašyto tyrimo duomenimis, pastebimas panašus tiriamųjų medžiagų poveikis, kuomet negautas stiprus ligos slopinimas. Tai gali būti siejama su tam tikrais aplinkos veiksniais ir ekstraktų koncentracija. Platus tyrimas, analizuojant cinamono ir gvazdikmedžio ekstraktų biofungicidinį poveikį pilkajam puvinii *in vitro* ir braškių lapuose *Petri* lėkštelėse, buvo atliktas Šernaitės ir kt. [149]. Buvo pastebėtas gvazdikmedžio ekstrakto gebėjimas slopinti *B. cinerea* braškių lapuose *in vitro* sąlygomis, tačiau jų tyrime nebuvo atliktas vertinimas augalų augimo metu. Būtent todėl šiame tyrime užfiksuoti priešingi duomenys: braškės buvo auginamos realioje aplinkoje šiltnamyje, registruotas silpnas slopinantis patogeną ekstrakto poveikis, kurį galėjo lemti natūralioje aplinkoje augalą veikiantys kintamieji bei pačio augalo gebėjimas kovoti su patogeno kelijama infekcija.

Plačiai tiriami ir kitų aromatinių augalų ekstraktai bei eteriniai aliejai įvairių augalų augimo metu. Daug žadančius rezultatus gavo Ahmed'as ir kt. [150], tyrę 8 skirtingų aromatinių augalų eterinių aliejų ir augalinių ekstraktų slopinamąjį poveikį prieš medetkų patogeninius grybus. Augalų sėklų mirkymas ir lapų purškimas augalniais produktais vazonuose augintose medetkose efektyviai padėjo slopinti šaknų puvinį ir lapų vytimą. Sėjamųjų kanapių (lot. *Cannabis sativa*) ir baltojo jostro (lot. *Plumeria alba*) vandeninių ekstraktų efektyvumas prieš aitrųjų pipirų pilkajį puvinį buvo vertintas augalų panardinimo ir impregnavimo metodais [151]. Pastebėta, kad dirbtinai *B. cinerea* užkrėstų aitriosios paprikos vaisių tinkamumo vartoti terminas po panardinimo ekstraktuose pagerėjo atitinkamai 4 ir 5 dienomis, o apvyniojus impregnuotais apvalkalais – pailgėjo 3 ir 5 dienomis. Buvo tirtas ir kalendrų sėklų produktų veiksmingumas slopinant *B. cinerea* infekciją braškių augaluose [7]. Efektyviausiai patogeno plitimą *in vitro* slopinę kalendrų produktai antigrybiniu aktyvumu pasižymėjo ir augalų augimo metu. Mažiausia patogeno infekcija užfiksuota braškių lapuose, apdorotuose 1,2 % koncentracijos eteriniu aliejumi bei 0,12 % koncentracijos eteriniu aliejumi su hidroliu, o purškimas kalendrų ekstraktu nebuvo veiksmingas. Šio tyrimo rezultatai koreliuoja su

mūsų tyrimo metu užfiksuotais duomenimis, abiejuose tyrimuose naudotos nedidelių koncentracijų augalinės priemonės ir gautas panašus patogeno slopinimo efektyvumas.

Šio tyrimo rezultatai suteikia svarbios informacijos apie tolesnį natūralių augalinių medžiagų naudojimo etapą *in vivo*, siekiant užkirsti kelią pilkojo puvinio plitimui, nes iki šiol gvazdikmedžio ekstrakto fungicidinis poveikis dažniausiai tirtas *in vitro*. Eksperimentų su braškėmis metu gvazdikmedžio CO<sub>2</sub> ekstraktas sumažino *B. cinerea* sukeltos ligos sunkumą *in vivo*. Kol kas nėra daug duomenų apie augalų ekstraktų naudojimą ant braškių kontroliuojamomis klimato sąlygomis, todėl apibendrintai galima pasakyti, kad *in vivo* eksperimentų atlikimas yra labai svarbus norint patvirtinti arba paneigti laboratorinius duomenis, suprasti visapusišką augalinių ekstraktų poveikį natūralioje aplinkoje ir užtikrinti jų praktinį pritaikymą ir veiksmingumą.

### 3.2. Sausos medžiagos braškių lapuose

3.1 lentelėje pateiktas apskaičiuotas skirtingų variantų braškių lapų liofilizuotos ir žalios masės santykis (žr. formulę (2.2), 34 p.). Rezultatuose matoma, kad surinktų lapų mėginiai atitinka 26–35 % žalių braškių lapų masės. KONTR–BC variante pastebėtas didėjantis sausos ir žalios masės santykis, kas gali būti paaiškinta plintančia *B. cinerea* sukelta infekcija. Pirmiausia, šie pokyčiai gali būti siejami su patogeno sukelta dehidracija braškių lapuose, medžiagų apykaitos pokyčiais, sustiprėjusiais gynybos mechanizmais bei pagreitetą senėjimu. Tai atspindi sudėtingas fiziologines ir biochemines augalų reakcijas, kuriomis kovojama su patogenu. Tačiau GV–BC varianto ėminiuose liofilizuotos ir žalios lapų masės santykio didėjimas nefiksuotas. Kita vertus, GV varianto braškių lapuose stebėtas mažėjantis liofilizuotos ir žalios masės santykis bėgant laikui, kas gali būti siejama su suaktyvėjusia augalo vandens apykaita po poveikio augaliniu ekstraktu.

3.1 lentelė. Braškių lapų liofilizuotos ir žalios masės santykis

| Ėminių Nr.<br>Varianto kodas | 0 DPU       | 3 DPU       | 7 DPU       |
|------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| KONTR                        | 0,30 ± 0,03 | 0,27 ± 0,02 | 0,31 ± 0,03 |
| KONTR–BC                     | 0,27 ± 0,08 | 0,29 ± 0,04 | 0,30 ± 0,05 |
| GV                           | 0,30 ± 0,05 | 0,28 ± 0,06 | 0,26 ± 0,08 |
| GV–BC                        | 0,35 ± 0,02 | 0,30 ± 0,09 | 0,30 ± 0,06 |

### 3.3. Antioksidacinės braškių sistemos atsakas į poveikį gvazdikmedžio ekstraktu

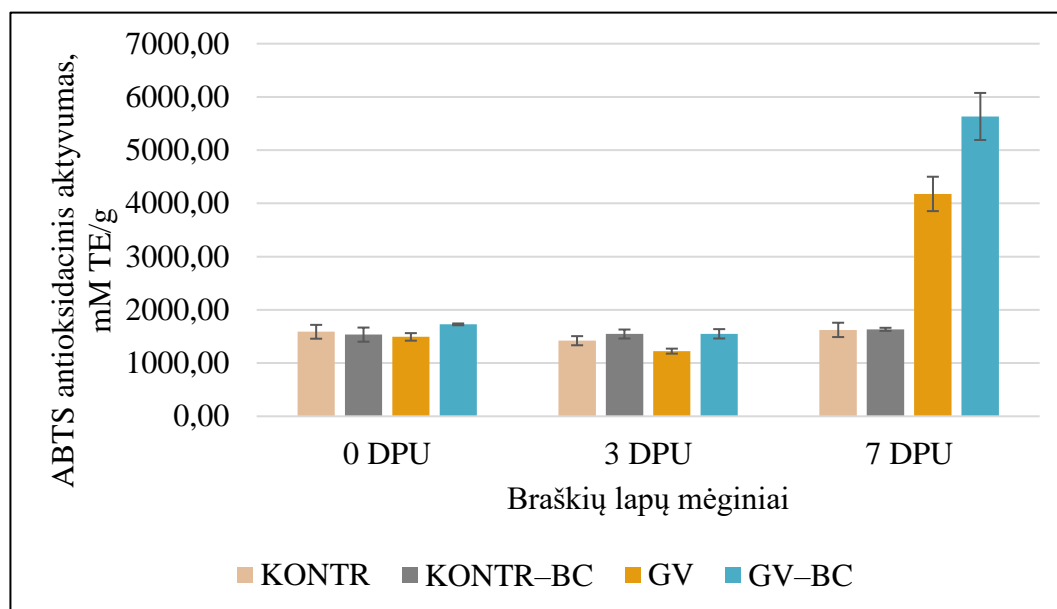
Antioksidacinės sistemos atsako pokyčiai sveikose ir pilkojo puvinio pažeistose braškėse, paveikus jas gvazdikmedžio ekstraktu, buvo įvertinti trimis skirtingais metodais:

- matuojant ABTS antioksidacinį aktyvumą;
- tiriant DPPH antioksidacinį aktyvumą;
- nustatant antioksidacinį aktyvumą FRAP metodu.

Tyrimams braškių lapų ėminiai buvo surinkti prieš 3-iąją purškimą dar neužkrėtus augalų (0 DPU), vėliau praėjus 3 (3 DPU) ir 7 (7 DPU) dienoms po augalų užkrėtimo *B. cinerea*.

### 3.3.1. Antioksidacinio aktyvumo braškių lapuose nustatymo ABTS metodu rezultatai

ABTS antioksidacinio aktyvumo tyrimo rezultatai braškių lapų mėginiuose pateikti 3.3 pav.:



**3.3 pav.** Antioksidacinis ABTS aktyvumas (mM TE/g) braškių lapuose skirtinguose eksperimento etapuose

Vertinant tiriamųjų braškių lapų mėginių, surinktų prieš 3-iąją purškimą (0 DPU), 3-ią dieną po užkrėtimo (3 DPU) ir 7-ą dieną po užkrėtimo (7 DPU), rezultatus matyti, kad nepurkštų sveikų augalų lapai (KONTR) antioksidaciniu aktyvumu mažai skyrėsi nuo nepurkštų, bet užkrėstų augalų (KONTR-BC) visomis vertinimo dienomis. Taigi galima teigti, jog užkrėtimas *B. cinerea* nepaveikė augalo antioksidantų, gebančių surišti ABTS<sup>•+</sup> radikalą, kaupimo.

Po 3-iojo augalų purškimo augaliniu ekstraktu, tačiau pilkojo puvinio infekcijai dar nespėjus išplisti (3 DPU rezultatai), nepastebėta antioksidacinio ABTS aktyvumo didelių pokyčių gvazdikmedžio ekstraktu purkštuose sveikuose augaluose (GV). Registruotas mažesnis aktyvumas lyginant su pirmojo matavimo rezultatais.

Ženklus antioksidacinio aktyvumo padidėjimas fiksuotas ištyrus 7 parą po užkrėtimo gvazdikmedžio ekstraktu purkštų, sveikų braškių lapų mėginius (GV). Juose išmatuoto ABTS antioksidacinio aktyvumo vidurkis buvo 4177,72 mM TE/g ir tai yra beveik 3 k. daugiau lyginant su nepurkštais sveikais augalais. Rezultatai rodo, kad braškių apdorojimas gvazdikmedžio ekstraktu reikšmingai paveikė antioksidacinį aktyvumą jų lapuose, lyginant su KONTR ėminiais. Kadangi augalai reaguoja į visus aplinkos pokyčius, todėl panaudojus gausų antioksidantų ir kitų veikliųjų medžiagų gvazdikmedžio ekstraktą ant braškių lapų, buvo pastebėtas išaugęs jų antioksidacinės ABTS sistemos atsakas.

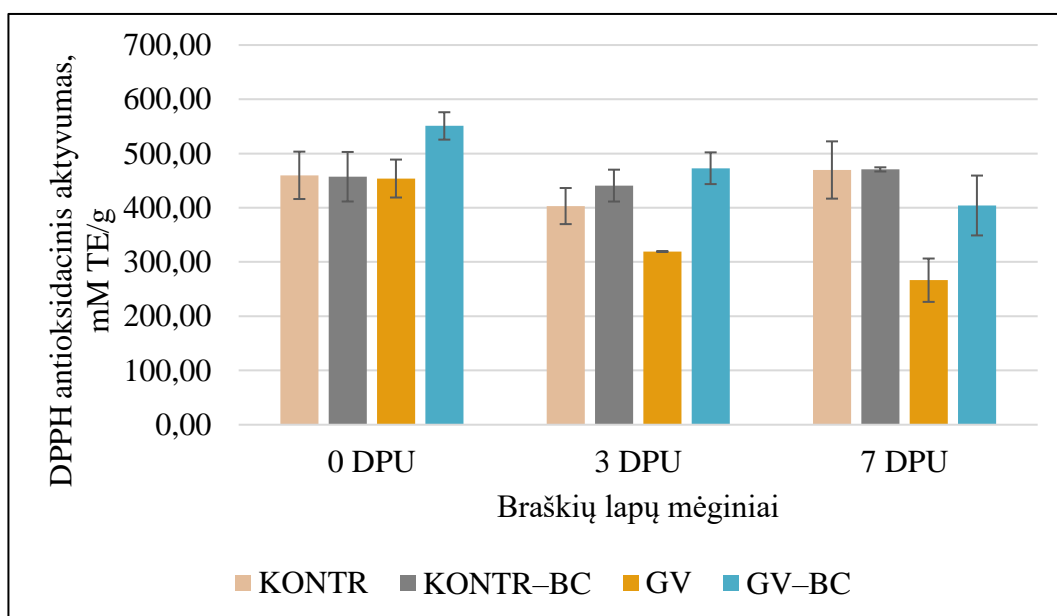
Didžiausias antioksidacinio aktyvumo šuolis buvo fiksuotas išmatavus gvazdikmedžio ekstraktu purkštų ir *B. cinerea* užkrėstų braškių lapų (GV-BC) ABTS antioksidacinį aktyvumą. Braškių lapų inokuliacija ir veikimas gvazdikmedžio ekstraktu eksperimento metu padidino augalų antioksidacinės

sistemos aktyvumą daugiau nei 3 k. lyginant su užkrėstomis ir nepurkštomis braškėmis eksperimento pradžioje ir pabaigoje. Infekcijos plitimas kartu su poveikiu augaliniu ekstraktu sukėlė stiprų braškių antioksidacinės sistemos atsaką, kuris vertinamas kaip padidėjęs ABTS<sup>+</sup> laisvųjų radikalų surišimas lapuose. Antioksidacinio aktyvumo padidėjimas rodo augalinių ekstraktų vaidmenį aktyvinant augalų apsaugos sistemą sintetinant reaktyviųjų laisvųjų radikalų surišime dalyvaujančius junginius, kurie susidaro ir patogeno infekcijos plitimo metu.

Iš gautų rezultatų matyti, kad braškių lapų purškimas 0,20 % koncentracijos gvazdikmedžio CO<sub>2</sub> ekstraktu padidino tiek užkrėstų, tiek sveikų augalų lapų antioksidacinį aktyvumą, išmatuotą ABTS metodu. Aktyvus ABTS antioksidacinės sistemos atsakas po veikimo gvazdikmedžio ekstraktu galimai turėjo poveikį ir *B. cinerea* sukeltos ligos intensyvumo mažinimui.

### 3.3.2. Antioksidacinio aktyvumo braškių lapuose nustatymo DPPH metodu rezultatai

DPPH antioksidacinio aktyvumo tyrimo rezultatai braškių lapų mėginiuose pateikti 3.4 pav.:



**3.4 pav.** Antioksidacinis DPPH aktyvumas (mM TE/g) braškių lapuose skirtinguose eksperimento etapuose

Atlikus mėginių antioksidacinio aktyvumo analizę DPPH metodu, gauti skirtingi rezultatai tarp braškių, kurios buvo nupurkštos ekstraktu, bei neapdorotų braškių.

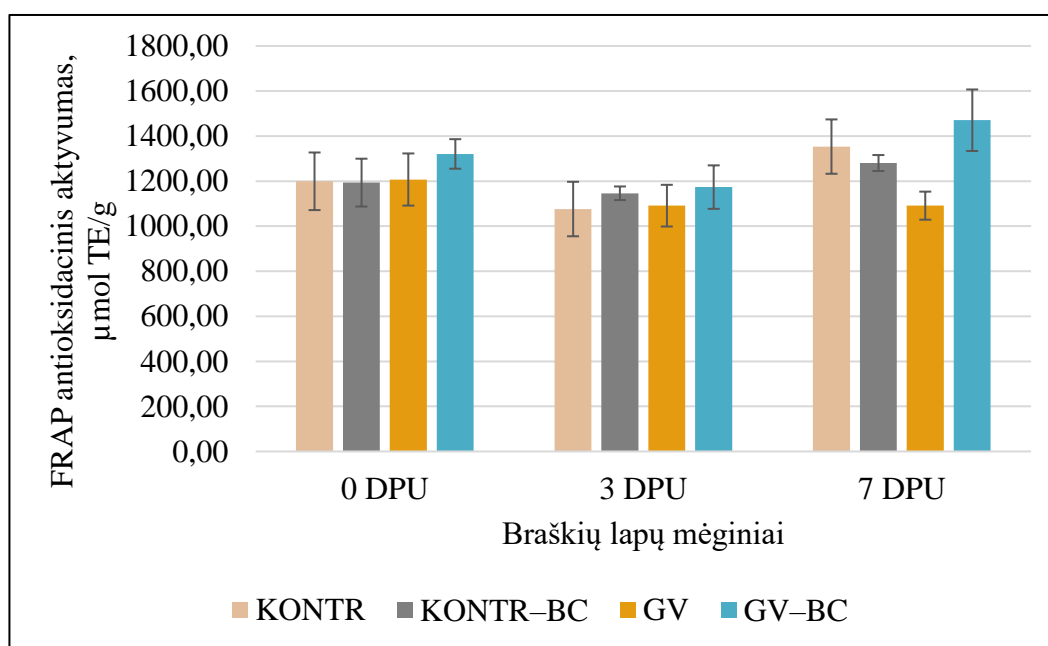
Pradiniuose braškių lapų mėginiuose (0 DPU) DPPH metodu išmatuotas antioksidacinis aktyvumas nepurkštuose variantuose (KONTR ir KONTR-BC) bei purkštame gvazdikmedžio ekstraktu GV variante tarpusavyje beveik nesiskyrė. Tuo tarpu GV-BC ėminyje fiksuotas didesnis antioksidacinis DPPH aktyvumas nei minėtuose variantuose. Kadangi GV ir GV-BC augalai prieš pirmuosius lapų ėminius tiriamu ekstraktu buvo apdoroti vienodai, nustatytas didesnis antioksidacinis aktyvumas galimai priklausė nuo kitų išorinių veiksnių šiltnamyje. Abu kontroliniai variantai, KONTR ir KONTR-BC, 0 DPU pasižymėjo didesniu antioksidaciniu aktyvumu negu 3 DPU, tačiau paskutinio matavimo metu surinktų braškių lapų antioksidacinis aktyvumas šiek tiek padidėjo. Tokie svyruojantys, bet mažai besiskiriantys, rezultatai rodo, kad šio eksperimento metu braškių DPPH antioksidacinė sistema mažai reagavo į užkratą patogenų, kadangi kontroliniai variantai tarpusavyje beveik nesiskiria, taip pat skirtumas mažas ir eksperimento eigoje.

Apdorojus augalus gvazdikmedžio ekstraktu 3-ią kartą ir praėjus 3 dienoms po užkrėtimo (3 DPU rezultatai) buvo pastebėti antioksidacinės sistemos pokyčiai ekstraktu apdorotuose augaluose. GV ir GV-BC variantuose pastebėta antioksidacinio DPPH aktyvumo mažėjimo tendencija bėgant laikui. Šiuo atveju pastebėta braškių antioksidacinės sistemos reakcija į poveikį gvazdikmedžio ekstraktu buvo priešinga negu ABTS tyrimo atveju, kai buvo gautas padidėjęs antioksidacinis aktyvumas. Žymiausias DPPH antioksidacinio aktyvumo sumažėjimas fiksuotas gvazdikmedžio ekstraktu purkštuose augaluose (GV), o iš viso praėjus 7 paroms nuo 3-iojo apdoravimo ekstraktu, DPPH aktyvumas sumažėjo 1,7 k. Gvazdikmedžio ekstraktu purkštų ir *B. cinerea* užkrėstų braškių (GV-BC) antioksidacinis aktyvumas proporcingai mažėjo. Dar neužkrėsto GV-BC augalo (0 DPU) antioksidacinis aktyvumas buvo didesnis negu po užkrėtimo (3 DPU) ir infekcijai išplitus (7 DPU). Abiejų gvazdikmedžio ekstraktais paveiktų variantų antioksidacinis aktyvumas, išmatuotas DPPH metodu, buvo mažesnis už KONTR ir KONTR-BC 7-ą dieną po inokuliacijos patogeninio grybo miceliu surinktuose lapų ėminiuose.

Išanalizavus DPPH metodu gautus rezultatus, pastebėtas priešingas braškių lapų antioksidacinės sistemos atsakas, negu matuojant ABTS metodu. Tai parodo ne vienodą augaluose esančių antioksidantų atsaką į poveikį gvazdikmedžio ekstraktu. Matuojant antioksidacinį DPPH aktyvumą braškių lapuose, buvo pastebėta aktyvumo mažėjimo tendencija tuose variantuose, kurie buvo paveikti 0,20 % koncentracijos gvazdikmedžio ekstraktu. Galima manyti, kad junginių, surišančių DPPH\* radikalą sintezė buvo pristabdyta ir aktyvumo mažėjimas buvo nulemtas gvazdikmedžio ekstrakto. Reikia įvertinti, jog nesant infekcijai, apdorojimas gvazdikmedžio ekstraktų sumažintų DPPH antioksidacinį aktyvumą, kas gali turėti ir neigiamų pasekmių augalui.

### 3.3.3. Antioksidacinio aktyvumo braškių lapuose nustatymo FRAP metodu rezultatai

Braškių antioksidacinės sistemos atsako nustatymo FRAP metodu rezultatai tirtuose mėginiuose skirtingais eksperimento etapais pateikti 3.5 pav.:



3.5 pav. Antioksidacinis FRAP aktyvumas ( $\mu\text{mol TE/g}$ ) braškių lapuose skirtinguose eksperimento etapuose

Braškių lapų antioksidacinio aktyvumo FRAP metodu tyrimo rezultatai parodė, kad pokyčių tendencijos buvo panašios visuose tirtuose variantuose, išskyrus gvazdikmedžiu purkštose sveikose

braškėse. Antioksidacinio aktyvumo kitimo tendencija kontrolinių braškių augalų lapuose buvo panaši kaip ir DPPH antioksidacinio aktyvumo, kuomet eksperimento eigoje buvo nustatytas sumažėjęs aktyvumas, kuris pabaigoje padidėjo.

Atlikta gvazdikmedžio ekstraktu purkštų sveikų braškių lapų (GV) analizė parodė, kad jų antioksidacinis potencialas sumažėjo praėjus 3 paroms po poveikio gvazdikmedžio pumpurų ekstraktu ir buvo mažesnis už abu kontrolinius variantus 7 DPU. Nesiskiriantys 3 DPU ir 7 DPU ėminių rezultatai rodo, kad braškių lapų purškimas gvazdikmedžio ekstraktu neturėjo didelės įtakos antioksidaciniame FRAP aktyvumo nustatyme dalyvaujantiems braškių lapų junginiams, priešingai, galėjo sukelti silpnėjantį sistemos atsaką, nes aktyvumas buvo mažesnis nei prieš 3-įjį augalų purškimą (0 DPU).

Analizuojant KONTR–BC ir GV–BC braškių lapų ėminių rezultatus matyti, kad atlikus 3-įjį purškimą ekstraktu ir užkrėtus augalus, dar esant infekcijos pradžiai, braškių lapų antioksidacinis aktyvumas truputį sumažėjo (3 DPU rezultatai) lyginant su rezultatais prieš užkrėtimą (0 DPU). Tai rodo, kad pirminėse infekcijos stadijose augalai į užkratą reaguoja kaip į stresą, patirdami antioksidacinės sistemos šoką, tačiau greitai prisitaiko prie aplinkos pokyčių, suaktyvindami skirtingų sistemų ir metabolizmo veiklas, dėl ko antioksidacinis aktyvumas vėl padidėja (7 DPU rezultatai). Taigi, remiantis gautais gvazdikmedžio ekstraktu purkštų ir *B. cinerea* užkrėstų braškių lapų (GV–BC) antioksidacinio aktyvumo rezultatais, nustatytas padidėjęs aktyvumas praėjus 7 paroms po užkrėtimo lyginant su nepurkštais sveikais augalais (KONTR) ir nepurkštais, bet užkrėstais, augalais (KONTR–BC). Gvazdikmedžio ekstraktas sąveikoje su *B. cinerea* sukelta infekcija padidino braškių lapų antioksidacinį atsaką.

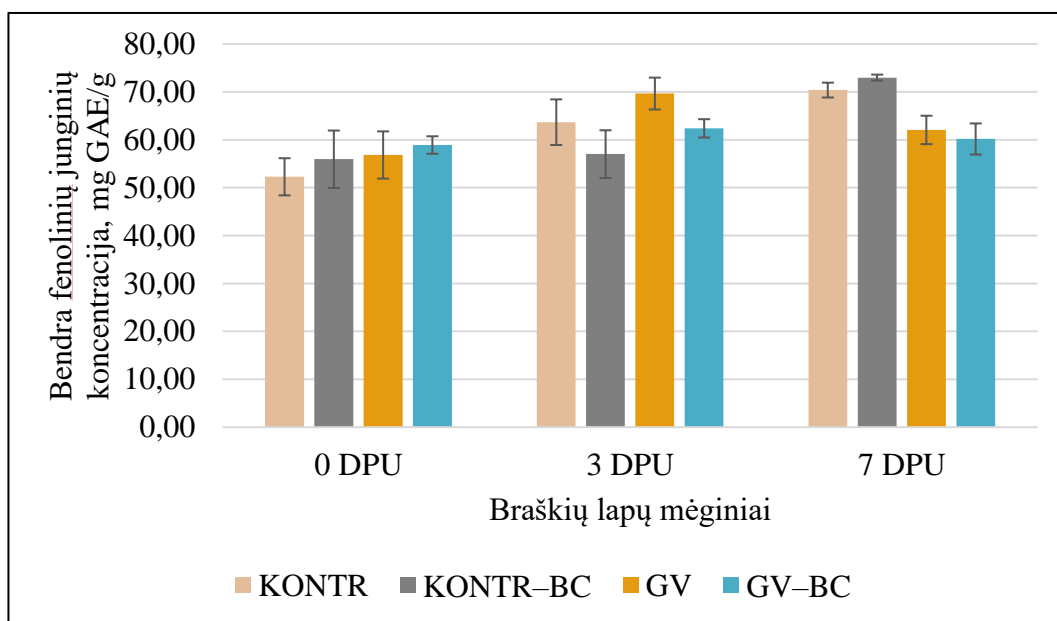
Iš surinktų rezultatų matyti, kad 0,20 % koncentracijos gvazdikmedžio ekstrakto ir *B. cinerea* patogeno poveikis braškių augalams turėjo skirtingą poveikį antioksidaciniam aktyvumui, išmatuotam FRAP metodu, lyginant su kitais metodais. Po užkrėtimo ar kito pasikeitusio aplinkos poveikio braškių imuninė sistema susiduria su stresu, todėl pasikeičia augalo antioksidacinės sistemos veikla. Augalai greitai adaptuojasi prie pasikeitusių aplinkos veiksnių ir dažnu atveju pradeda sintetinti dar daugiau biologiškai aktyvių medžiagų, kurios gali apsaugoti biologinę augalo sistemą nuo žalingo patogenų sukkelto oksidacinio streso poveikio. Tokių junginių buvimas braškių lapuose yra susijęs su antioksidaciniu pajėgumu. Apsauginių molekulių koncentracijos padidėjimas antioksidacinių junginių pavidalu padeda įvertinti augalo atsaką ir imuninės sistemos stiprumą.

Patogeno sukeltas stresas ir pakitę aplinkos veiksniai sukelia braškių antioksidacinės sistemos pokyčius, todėl svarbu ištirti antioksidacinius parametrus ir augalų reakciją. Mokslinėje literatūroje nėra daug pranešimų apie kompleksinius, antigrybinio aktyvumo ir poveikio augalų antioksidacinei sistemai, tyrimus. Panašios tematikos tyrimą atlikusi Dėnė [7] su komanda tyrė braškių gynybinį atsaką naudojant kalendrų sėklų produktus. Ji ne tik nustatė, kad kalendrų eterinis aliejus geriausiai slopina *B. cinerea*, bet ir ištyrė braškių antioksidacinės sistemos atsaką. Tačiau antioksidacinis atsakas buvo matuotas tik vieną kartą po užkrėtimo, netirtas jo pokytis. Tyrimų metu buvo nustatyta, kad patogeno inokuliacija padidino braškių antioksidacinį aktyvumą iki dviejų kartų. Didžiausias aktyvumas, išmatuotas DPPH ir ABTS metodais, buvo nustatytas naudojant 1,6 % koncentracijos ekstraktą ir 1,2 % koncentracijos eterinį aliejų. Antioksidacinis aktyvumas ir DPPH, ir ABTS metodu didėjo kartu su padidėjusia ekstrakto koncentracija. Mūsų atliktų eksperimentų rezultatai iš dalies koreliuoja su aptarto tyrimo metu padarytomis išvadomis – augalinio ekstrakto veikimas sąveikoje su plintančia infekcija padidino braškių lapų antioksidacinį aktyvumą, tačiau tik užkrėstuose lapuose

nepastebėtas padidėjęs aktyvumas. Mūsų stebėjimai taip pat atitinka ankstesnių tyrėjų pateiktas išvadas. Kiti mokslininkai [152] nustatė, kad braškių purškimas arbatmedžio aliejumi prieš derliaus nuėmimą sumažina uogų puvimą ir palaiko jų kokybę. Šis poveikis susijęs su mikroorganizmų skaičiaus sumažėjimu vaisių paviršiuje, padidėjusiu antioksidantų aktyvumu ir su gynybiniu atsaku susijusių baltymų reguliavimu. Taip pat pastebėta panašumų tarp mūsų tyrimo rezultatų ir ankstesnių mokslininkų išvalgų. Pavyzdžiui, remiantis Moshari–Nasirkandi ir kt. [153] atliktais tyrimų rezultatais matyti, kad citrininės verbenos augalinis ekstraktas padidino braškių vaisių antioksidacinės sistemos pajėgumą, o Wang‘ui ir kt. [154] ištyrus kelis eterinius aliejus ir jų komponentus buvo nustatytas braškių antioksidacinės sistemos suaktyvėjimas. Kaip gynybinis atsakas augalai gamina papildomų fenolinių junginių ir flavonoidų bei padidina jų antioksidacinį aktyvumą. Savo tyrime mokslininkai pateikė įrodymų, kad eteriniai aliejai, turintys eugenolio, mentolio arba timolio, gali sustiprinti braškių uogų DPPH radikalų surišimo gebą.

### 3.4. Bendrosios fenolinių junginių koncentracijos pokyčiai veikiant gvazdikmedžio ekstraktui sveikose ir pilkojo puvinio pažeistose braškėse

*Folin – Ciocalteu* (FC) tyrimas buvo naudotas nustatant bendrąją fenolinių junginių koncentraciją (TPC) paveiktuose braškių lapuose. Nustatytos bendrosios fenolinių junginių koncentracijos braškių mėginiuose rezultatai pateikti 3.6 pav.:



3.6 pav. Braškių lapų bendroji fenolinių junginių koncentracija (mg GAE/g)

Analizuojant dar neužkrėstų braškių lapų ėminių, surinktų prieš 3-iąją purškimą gvazdikmedžio ekstraktu, rezultatus (0 DPU rezultatai) nebuvo pastebėtas žymus skirtumas tarp eksperimentinių variantų, tačiau gvazdikmedžio ekstraktu apdoroti augalai turėjo keliais vienetais didesnę fenolinių junginių koncentraciją, lyginant su nepurkštais augalais.

3-iąją dieną po braškių lapų užkrėtimo (3 DPU rezultatai) buvo pastebėti skirtumai tarp mėginių. KONTR-BC ir GV-BC bandiniuose *B. cinerea* infekcijai dar nespėjus išplisti, nefiksuotas fenolinių junginių koncentracijos pokytis, priešingai nei KONTR bei GV variantuose. Šiuose eksperimentiniuose variantuose nustatyta padidėjusi fenolinių junginių koncentracija, ypač GV variante. Vertinant tokius rezultatus galima daryti prielaidą, kad augalų apdorėjimas gvazdikmedžio



ekstraktu skatino fenolinių junginių sintezę braškių lapuose, tuo tarpu besiplečianti pilkojo puvinio infekcija ją slopino.

Įvertinus 7-osios dienos po užkrėtimo surinktų braškių lapų ėminiuose (7 DPU) esančią fenolinių junginių koncentraciją, buvo pastebėti pokyčiai. Neužkrėstuose ir nepurkštuose braškių lapuose (KONTR) ir užkrėstuose, bet nepurkštuose augaluose (KONTR-BC), buvo užfiksuotas fenolių koncentracijos padidėjimas lyginant su anksčiau surinktų kontrolinių mėginių rezultatais, kuris ypač išreikštas buvo KONTR-BC variante. Lyginant GV ir GV-BC eksperimentinius variantus tarpusavyje ir su kontroliniais variantais matyti, kad fenolinių junginių koncentracija braškių lapuose sumažėjo veikiant tik gvazdikmedžio ekstraktu, o sąveikoje kartu su *B. cinerea* liga palaikė greičiau pastovią fenolių koncentraciją augaluose viso tyrimo metu.

Atlikta analizė parodė didelį rezultatų pasiskirstymą tarp eksperimentinių variantų. Fenoliniai junginiai atlieka svarbų vaidmenį elektronų perdavimo reakcijose, kurias panaudojant galima įvertinti mėginių antioksidacinį aktyvumą anksčiau aptartais metodais. Dėl to tarp nustatyto antioksidacinio aktyvumo ir *Folin – Ciocalteu* išmatuotos fenolinių junginių koncentracijos atsiranda koreliacija – fenoliniai junginiai yra stiprūs antioksidantai, prisidedantys prie antioksidacinio augalų pajėgumo. Didžiausia koreliacija tarp *Folin – Ciocalteu* metodu apskaičiuotos fenolinių junginių koncentracijos pastebėta su DPPH ir FRAP metodais išmatuotu antioksidaciniu aktyvumu. Kadangi fenolinių junginių koncentracija yra vienas iš pagrindinių augalų reakcijos į stresą rodiklių ir rodo natūralią augalų apsaugą nuo patogenų, bendra braškių fenolių koncentracija ir antioksidacinis aktyvumas labai reaguoja į užkrėtimą *B. cinerea*. Taip pat gvazdikmedžio pumpurų ekstrakto, kurio sudėtyje yra daugybė biologiškai aktyvių fenolinių junginių, naudojimas gali padidinti fenolinių junginių koncentraciją braškių lapuose, kas prisideda prie padidėjusio antioksidacinio aktyvumo.

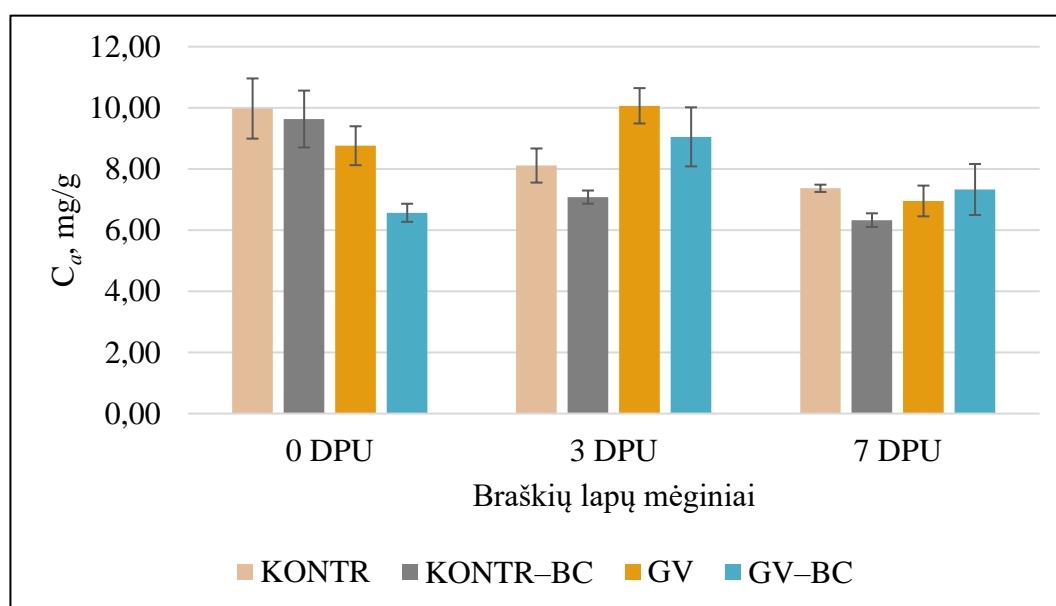
Augaluose esantys fenoliniai junginiai yra susiję su vaistinių augalų priešuždegiminiu, antibakteriniu, antigrybiniu ir antioksidaciniu aktyvumu. Fenolinės fitocheminės medžiagos augaluose atlieka įvairias apsaugines funkcijas nuo abiotinio streso, pvz., UV šviesos, arba biotinio streso, ypač plėšrūnų ir patogenų atakų [93]. Fenolinių junginių koncentracija yra vienas iš pagrindinių augalų reakcijos į stresą rodiklių ir rodo natūralią augalų apsaugą nuo patogeno. Fenoliniai junginiai ir antioksidacinis aktyvumas dažniau tiriamas braškių uogose, bet ne pačiuose augaluose/lapuose [7]. Tyrėjų komanda [155] nustatinėjo fenolinius junginius ir jų koncentraciją *F. × ananassa* cv. Festival braškių uogų ir lapų ekstraktuose. Bendra fenolinių junginių koncentracija braškių lapų ekstrakto (70 % etanolio) buvo 122 k. didesnė negu uogose, o antioksidacinis aktyvumas – 13 k. didesnis negu uogose. Šiame ekstrakto polifenolių koncentracija buvo  $108,83 \pm 4,65$  mg GAE/g. Lyginant šiuos duomenis su mūsų tyrimų rezultatais, pastebimi skirtumai, tačiau svarbu įvertinti tai, kad tiriamos skirtingos braškių veislės. Skirtingų braškių veislių bioaktyvių junginių sudėtį tyrė Michalska su komanda [156]. Mažiausią fenolinių junginių koncentraciją jie nustatė *Lucy* veislei (79,13 mg GAE/g), o didžiausią – *Darselect* veislės uogose (119,00 mg GAE/g). Fenolių koncentracija lapuose svyravo nuo 644 iki 1476 mg GAE/g – veislės *Selvik*, *Diana* ir *Clever* turėjo žymiai daugiau fenolinių junginių negu *Darselect*, *Joly* ir *Lucy*. Mūsų vykdyto eksperimento metu nustatyta fenolinių junginių koncentracija nepaveiktuose *Malwina* veislės braškių lapuose daugiausia siekė 70,38 mg GAE/g. Gauti tokie skirtingi rezultatai įrodo, kad kiekviena braškių veislė geba kaupti skirtingą kiekį fenolinių junginių, o skirtingose augalo dalyse taip pat aptinkamos nevienodos jų koncentracijos. Zahedi'is ir kt. [157] lygino dviejų komercinių braškių veislių – *Camarosa* ir *Gaviota*, fenolinių junginių pokyčius esant aplinkos stresui – nepakankamam kiekiui drėgmės. Dėl sausros itin sumažėjo santykinis vandens kiekis, antioksidantų aktyvumas, fenolinių junginių koncentracija ir kt.

parametrai. Buvo pastebėta, kad *Camarosa* kaupia daugiau tirpių angliavandenių bei sintetina fermentinių ir nefermentinių antioksidantų, todėl galėtų būti laikoma atsparia sausrui veisle. Rezultatai rodo, kad braškių augalams susiduriant su dideliu stresu, fenolinių junginių koncentracija pradeda mažėti.

Braškėse (lot. *Fragaria* × *ananassa* Duch.) esantys fenoliniai junginiai ir naudojami jų ekstrakcijos būdai daro didelę įtaką braškių vaisių ir lapų ekstraktų biologiniam aktyvumui. Ekstrahavimas yra esminis žingsnis siekiant gauti biologiškai aktyvius junginius ir nėra priimtos vienos fenolinių junginių ekstrahavimo technikos. Braškių ekstraktai gali skirtis pagal polifenolių sudėtį, priklausomai nuo veislės, auginimo sąlygų, auginimo būdų ir brandumo laipsnio. Dažnu atveju jauni braškių lapai pasižymi turtingesniu polifenolių kiekiu nei seni lapai ar uogų minkštimas. Nepaisant to, vis dar yra mažai duomenų, rodančių ryšį tarp bioaktyvių junginių kiekio braškių lapuose ir vaisiuose. Fenoliniai junginiai yra vieni iš pagrindinių bioaktyvių junginių augaluose, suteikiantys jiems ypatingas maistines savybes ir stiprinantys augalo imuninę sistemą.

### 3.5. Chlorofilų ir karotinoidų koncentracijų pokyčiai į poveikį gvazdikmedžio ekstraktu sveikose ir pilkojo puvinio pažeistose braškėse

Tirtų mėginių chlorofilų (*a*, *b*, bendrojo (*a+b*)) ir karotinoidų (ksantofilų ir karotinų) koncentracijų rezultatai pateikti atitinkamai 3.7 pav., 3.8 pav., 3.9 pav. ir 3.10 pav.:



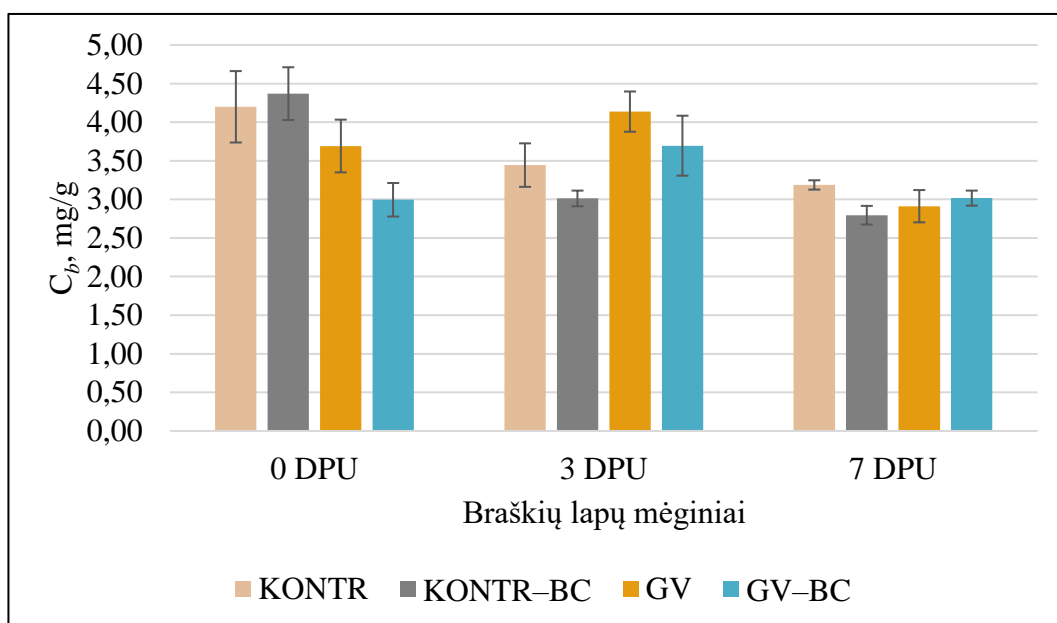
3.7 pav. Chlorofilo *a* koncentracija (mg/g) braškių lapuose

Braškių lapuose chlorofilo *a* yra daugiau nei chlorofilo *b*, tai būdinga daugumai žaliųjų augalų ir gali būti siejama su skirtingais chlorofilų molekulių vaidmenimis įvairiose augalų sistemose. Pagrindinis fotosintezėje dalyvaujantis pigmentas yra chlorofilas *a*.

Bendrieji tyrimo rezultatai rodo, kad chlorofilo *a* koncentracija į grybinio patogeno sukeltą infekciją ir poveikį ekstraktu reagavo skirtingai. Apdorojus braškių lapus gvazdikmedžio ekstraktu 2 kartus buvo pastebėti skirtumai tarp kontrolinių ir tiriamųjų grupių – paveiktuose ekstraktu lapuose nustatyta mažesnė chlorofilo *a* koncentracija (0 DPU rezultatai). Kalbant apie KONTR ir KONTR-BC rezultatus, surinkti duomenys parodė proporcingą chlorofilo *a* koncentracijos mažėjimo tendenciją visuose lapų mėginiuose bėgant laikui.

Tyrime išryškėjo žymus chlorofilo *a* koncentracijos padidėjimas 3 DPU surinktuose GV ir GV–BC bandiniuose. Iš rezultatų matyti, kad braškių lapų apdorojimas gvazdikmedžio ekstraktu teigiamai paveikė chlorofilo *a* sintezę augaluose, padidindamas jo koncentraciją, lyginant su sveikais augalais (KONTR). Atsižvelgiant į GV–BC ėminio padidėjusią chlorofilo *a* koncentraciją, lyginant su buvusia prieš 3-įjį purškimą ir užkrėtimą (0 DPU), galima manyti, kad augalas į *B. cinerea* sukeltą stresą ir poveikį ekstraktu reagavo teigiamai, suaktyvindamas chlorofilo *a* sintezę. Tačiau kadangi GV–BC bandinyje gauta didesnė koncentracija negu KONTR–BC, bet mažesnė negu GV, galima daryti prielaidą, kad gvazdikmedžio ekstraktas padėjo sustiprinti chlorofilo *a* sintezę ir infekcijos metu.

Chlorofilo *a* koncentracijos sumažėjimas buvo pastebėtas ištyrus 7 dienas po užkrėtimo braškių lapų ėminius. Žemesnės koncentracijos vertės buvo fiksuotos tiek abiejuose kontroliniuose, tiek kituose tiriamuosiuose variantuose. Grybiniai patogenai sukelia stresą augalams, todėl išplitus *B. cinerea* infekcijai braškių lapuose susidaro reaktyviosios deguonies rūšys, kurios gali pažeisti įvairias ląstelių struktūras, įskaitant chloroplastus, todėl chlorofilo molekulės pradeda irti. GV–BC bandinyje 7 DPU fiksuota mažesnė, negu 3 DPU, chlorofilo *a* koncentracija, tačiau didesnė lyginant su KONTR–BC 7 DPU – tai rodo, kad gvazdikmedžio ekstraktas indukuoja pigmento sintezę ir kovoja su patogeno kelijama infekcija.

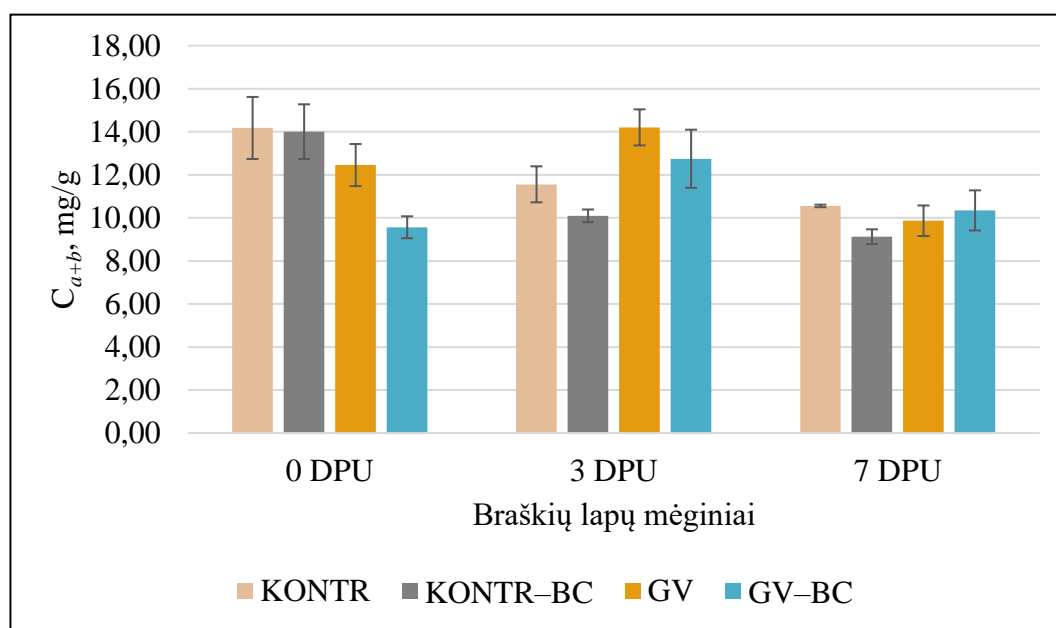


**3.8 pav.** Chlorofilo *b* koncentracija (mg/g) braškių lapuose

Matuojant chlorofilo *b* koncentracijas braškių lapuose, užfiksuotas beveik identiškas kitimas, lyginant su chlorofilu *a*, išskyrus tai, kad gautos mažesnės koncentracijos. Taip yra, nes chlorofilas *b* augaluose veikia kaip papildomas pigmentas ir, nors svarbus, jo vaidmuo labiau yra palaikomas, lyginant su chlorofilu *a*.

Visuose ėminiuose nustatytos chlorofilo *b* koncentracijos koreliuoja su chlorofilo *a* koncentracijų kitimu. Chlorofilo *a* ir *b* koncentracijos augaluose, įskaitant braškių lapus, glaudžiai siejasi dėl jų tarpusavio priklausomo veikimo fotosintezėje. Chlorofilas *a* ir *b* sintetami bendrame biosintezės kelyje, todėl vieno reguliavimas ar pasikeitimas dažnai veikia kitą. Biosintezės sistemos palaiko tipiską chlorofilo *a* ir *b* santykį, subalansuoja jų gamybą atsižvelgiant į aplinkos sąlygas ir fiziologinius poreikius. Yra išimčių, kai chlorofilas *a* ir *b* augaluose gali skirti skirtingu greičiu: dažnu

atveju chlorofilas *a* yra labiau pažeidžiamas esant stiprioms streso sąlygoms, lyginant su chlorofilu *b*, kuris veikia kaip papildomas pigmentas.



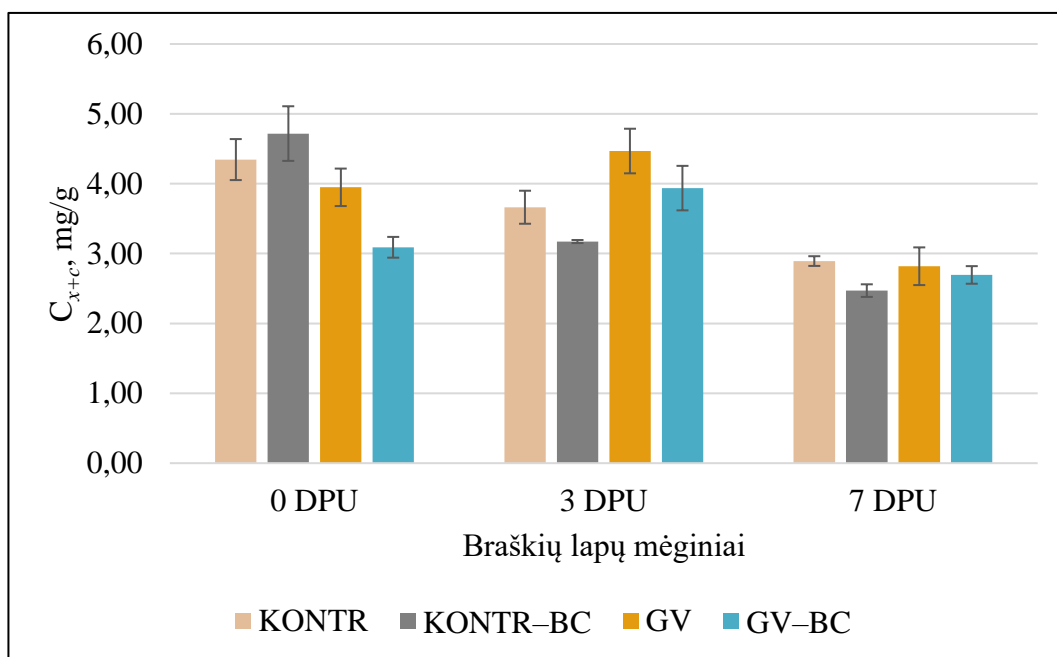
**3.9 pav.** Chlorofilo *a* ir *b* koncentracija (mg/g) braškių lapuose

Kadangi chlorofilas *a* ir *b* sudaro vieną sistemą, pateikiama bendra jų koncentracija (žr. 3.9 pav.). Chlorofilo *a* ir *b* koncentracijos braškių lapuose keitėsi dėl grybinės infekcijos ir veikimo gvazdikmedžio ekstraktu sukeltų fiziologinių ir biocheminių pokyčių augalo sistemose. Esant grybinei infekcijai, dažniausiai chlorofilų koncentracija mažėja dėl jų skilimo, fotosintezės slopinimo ir lapų nekrozės bei pageltimo. Gvazdikmedžio ekstraktas pasižymi antigrybinėmis ir antioksidacinėmis savybėmis, todėl gali sušvelninti patogeno infekciją, sumažindamas patiriamo streso lygį augalui ar net padidinti chlorofilo sintezę. Kad ir kaip būtų, esant per didelei ekstrakto koncentracijai, jo poveikis gali pasireikšti fitotoksiniu poveikiu, tada chlorofilų kiekis pradės mažėti.

Chlorofilai *a* ir *b* netiesiogiai prisideda prie antioksidacinės sistemos braškių lapuose, optimizuodami fotosintezės efektyvumą, išsklaidydami energijos perteklių ir užkirsdami kelią laisvųjų radikalų susidarymui. Jų vaidmuo palaikant chloroplastų vientisumą yra labai svarbus norint suaktyvinti augalo antioksidacinę apsaugą. Užtikrindami efektyvų energijos naudojimą ir sumažindami oksidacinį stresą, chlorofilai atlieka gyvybiškai svarbų vaidmenį bendrai augalo sveikatai ir atsparumui stresui.

Norint palaikyti pastovų ar padidinti fotosintezės aktyvumą augaluose, būtina išlaikyti aukštą chlorofilų kiekį, kuris yra susijęs su atsparumu ligoms, derliaus kiekiu, pesticidų tolerancija. Didelis oksidacinis stresas slopina chlorofilų, pigmentų, kurie sugeria ir naudoja šviesą fotosintezėje, gamybą ir kaupimąsi. Yra įrodymų iš įvairių tyrimų rodančių, kad chlorofilų koncentracija didėja reaguojant į žemo lygio stresą ir mažėja reaguojant į aukšto lygio stresą [158]. Zahedi'is ir kt. [159] nustatė, kad esant sausros sąlygoms ir sukeltam stresui, augalų apdorojimas SiO<sub>2</sub> ir SiO<sub>2</sub>-NPs pagerino chlorofilų (*a* ir *b*) susidarymą braškių augaluose, nes koncentracija svyravo nuo 1,70 ± 0,06 mg/g iki 4,88 ± 0,06 mg/g. Mūsų atlikto eksperimento metu priešingai – braškių lapuose, patyrusiuose patogeno sukeltą stresą ir paveiktuose gvazdikmedžio ekstraktu, chlorofilų sintezė ypatingai nesuaktyvėjo. Tie patys mokslininkai kitų tyrimų metu [157] taip pat tyrė *Camarosa* ir *Gaviota* braškių veislių bendrą chlorofilų koncentraciją esant sausrai. *Camarosa* braškėse didžiausia chlorofilų koncentracija

pasižymėjo kontrolinis bandinys ( $3,69 \pm 0,08$  mg/g), o mažiausia – braškės, augusios esant stipriai sausrui ( $1,07 \pm 0,11$  mg/g). *Gaviota* veislėje pastebėti ne tokie dideli svyravimai, tačiau didžiausia ir mažiausia bendra chlorofilų koncentracija pasižymėjo tomis pačiomis sąlygomis augusios braškės, atitinkamai  $2,85 \pm 0,09$  mg/g ir  $2,37 \pm 0,10$  mg/g. Iš gautų rezultatų matyti, kad dėl streso chlorofilų koncentracija braškėse sumažėjo, ką gali patvirtinti ir mūsų tyrimo metu gauti rezultatai. Da Costa ir kt. [160] tyrė chlorofilų *a* ir *b* bei bendrojo chlorofilo koncentraciją braškių lapuose, užaugintuose šiltnamyje naudojant šešėliavimo tinklelį. Buvo tirtos dvi veislės – *Camarosa* parodė didesnę chlorofilo *a*, *b* ir bendrą koncentraciją nei veislė *Oso Grande*. Nepaisant to, įvairiaspalvių tinklelių naudojimas neturėjo įtakos chlorofilų koncentracijai, o abiejų veislių braškėse buvo nustatyta didesnė chlorofilo *b*, negu *a*, koncentracija. Apibendrintai galima pasakyti, kad chlorofilų koncentracija priklauso ne tik nuo braškių veislės, bet ir nuo tiriamos augalo dalies, o augimo sąlygos ir aplinkos poveikis daro labai didelę įtaką ir todėl turi būti įvertintas.



**3.10 pav.** Karotinoidų (ksantofilų ir karotinų) koncentracija (mg/g) braškių lapuose

Ir chlorofilai, ir karotinoidai yra svarbūs pigmentai augalų lapuose, kurie atlieka lemiamą vaidmenį fotosintezėje ir apsaugo nuo fotooksidacinės žalos. Koreliacija tarp chlorofilo ir karotinoidų koncentracijos braškių lapuose gali skirtis priklausomai nuo kelių veiksnių, įskaitant augalo vystymosi stadiją, aplinkos sąlygas ir specifinius streso veiksnius. Iš šio tyrimo metu gautų karotinoidų koncentracijų braškių lapuose matyti panaši ir atsikartojanti rezultatų kitimo tendencija, lyginant su nustatyta chlorofilų koncentracija. Tai gali būti siejama su bendru pigmentų pokyčiu braškėse, kadangi visi variantai buvo veikiami vienodomis sąlygomis.

Karotinoidų koncentracija kontroliniuose braškių lapų ėminiuose (KONTR ir KONTR-BC) mažėjo su kiekvienu etapu, tuo tarpu kituose dviejuose eksperimentiniuose variantuose (GV ir GV-BC) svyravo. Po 3-iojo braškių purškimo augaliniu ekstraktu ir pilkojo puvinio infekcijai tik pradėjus plisti (3 DPU rezultatai), pastebėtas karotinoidų koncentracijos padidėjimas gvazdikmedžio ekstraktu purkštuose, sveikuose ir užkrėstuose, lapuose. Pastaruosiuose registruota mažesnė karotinoidų koncentracija negu tik purkštuose lapuose, tačiau didesnė už nepurkštą ir užkrėstą kontrolę (KONTR-BC). Karotinoidų koncentracijos sumažėjimas fiksuotas ištyrus 7 DPU mėginius. Mažiausia karotinoidų koncentracija pasižymėjo užkrėsti ir nepurkšti augalai (KONTR-BC), o daugiausia

karotinoidų nustatyta sveikuose augaluose bei tik gvazdikmedžio ekstraktu apdorotuose braškių lapuose.

Paprastai kintant chlorofilo koncentracijai, keičiasi ir karotinoidų koncentracija, nes abu pigmentai dalyvauja tose pačiose sistemose. Būna atvejų, kai streso sąlygomis koreliacija tarp jų kinta: esant oksidaciniam stresui, karotinoidų kiekis gali padidėti, siekiant apsaugoti chlorofilą ir kitus ląstelių komponentus.

Nėra daug literatūros apie braškių chlorofilų ir karotinoidų koncentraciją, o ypač į jos pokyčius ir atsaką į stresą. Augalų pigmentai yra svarbūs kontroliuojant fotosintezę, augimą ir vystymąsi, taip pat atlieka apsauginę funkciją nuo įvairių veiksnių: vabzdžių, gyvūnų, mikroorganizmų, aplinkos pokyčių, UV šviesos.

Karotinoidai atlieka daugialypį vaidmenį braškių lapų antioksidacinėje sistemoje, nes tiesiogiai pašalina reaktyvias deguonies rūšis, išsklaido šviesos energijos perteklių, stabilizuoja fotosintezės kompleksus ir išlaiko membranos vientisumą. Šios funkcijos yra labai svarbios norint apsaugoti augalą nuo oksidacinio streso ir užtikrinti efektyvią fotosintezę, taip prisidedant prie bendros braškių lapų sveikatos ir atsparumo ligoms.

Karotinoidai yra būtini augalams, nes atlieka fotosintezės, apsaugos, pigmentacijos, fitohormonų sintezės ir kt. funkcijas. Zahedi'is su komanda [157, 159] tyrė ne tik chlorofilų koncentracijas sausras metu, bet nustatinėjo ir karotinoidų koncentracijų pokyčius braškių lapuose. Reikšmingo skirtumo tarp *Camarosa* ir *Gaviota* karotinoidų koncentracijos, atsižvelgiant į sausras sunkumą, nebuvo. *Camarosa* karotinoidų koncentracija svyravo nuo  $1,34 \pm 0,16$  mg/g iki  $0,83 \pm 0,21$  mg/g, o *Gaviota* nuo  $1,44 \pm 0,13$  mg/g iki  $0,68 \pm 0,18$  mg/g. Tuo tarpu kito eksperimento metu buvo nustatyta, kad esant stipriai sausras ir apdorojus braškes  $\text{SiO}_2$  ir  $\text{SiO}_2$ -NPs, karotinoidų koncentracija braškių lapuose padidėjo lyginant su kontroliniais variantais. Lyginant aptarto tyrimo rezultatus su šio tyrimo duomenimis galima pastebėti, kad *Malwina* veislė pasižymi didesne karotinoidų koncentracija bei yra atsparesnė aplinkos stresui. Įdomūs tyrimai atlikti Cardoso ir kt. [161]. Jie palygino vitamino C ir karotinoidų (likopeno ir  $\beta$ -karotino) koncentracijas trijuose vaisiuose (braškėse, persimonuose ir aceroloje), užaugintuose ekologiniu ir tradiciniu ūkininkavimo būdais. Vidutinis  $\beta$ -karotino išskyrimas iš braškių buvo 97,7 %. Vidutinė likopeno ir  $\beta$ -karotino koncentracija ekologinio ir tradicinio ūkininkavimo užaugintose valgomosiose braškių dalyse buvo  $54,08 \pm 7,71$   $\mu\text{g}/100\text{g}$  ir  $53,02 \pm 2,15$   $\mu\text{g}/100\text{g}$  atitinkamai.

#### 4. Rekomendacijų dalis

Šiame tiriamajame darbe gvazdikmedžio ekstraktas buvo gautas naudojant subkrižinį CO<sub>2</sub> ekstrakcijos metodą. Šis būdas yra saugus, selektyvus, efektyvus ir aplinkai nekenksmingas metodas vertingiems junginiams išgauti iš natūralių šaltinių. Vykdamas ekstrakciją CO<sub>2</sub> išsaugomi termolabilūs junginiai, tai aukšto selektyvumo ir universalumo metodas. Gvazdikmedis ir iš jo gaunami ekstraktai, eteriniai aliejai pasižymi plačiu spektru biologinių savybių, todėl šios žaliavos ekstrakto naudojimas įvairiose pramonės srityse ir skirtingi gavimo būdai yra aktuali tema, siekiant išgauti efektyviausiai veikiančią produktą. Šiame darbe gvazdikmedžio ekstraktas, išgautas subkrižinės CO<sub>2</sub> ekstrakcijos būdu, pasižymėjo antigrybiniu poveikiu *B. cinerea* patogeniui bei darė įtaką braškių lapų antioksidacinei sistemai, fenolinių junginių ir pigmentų sintezei.

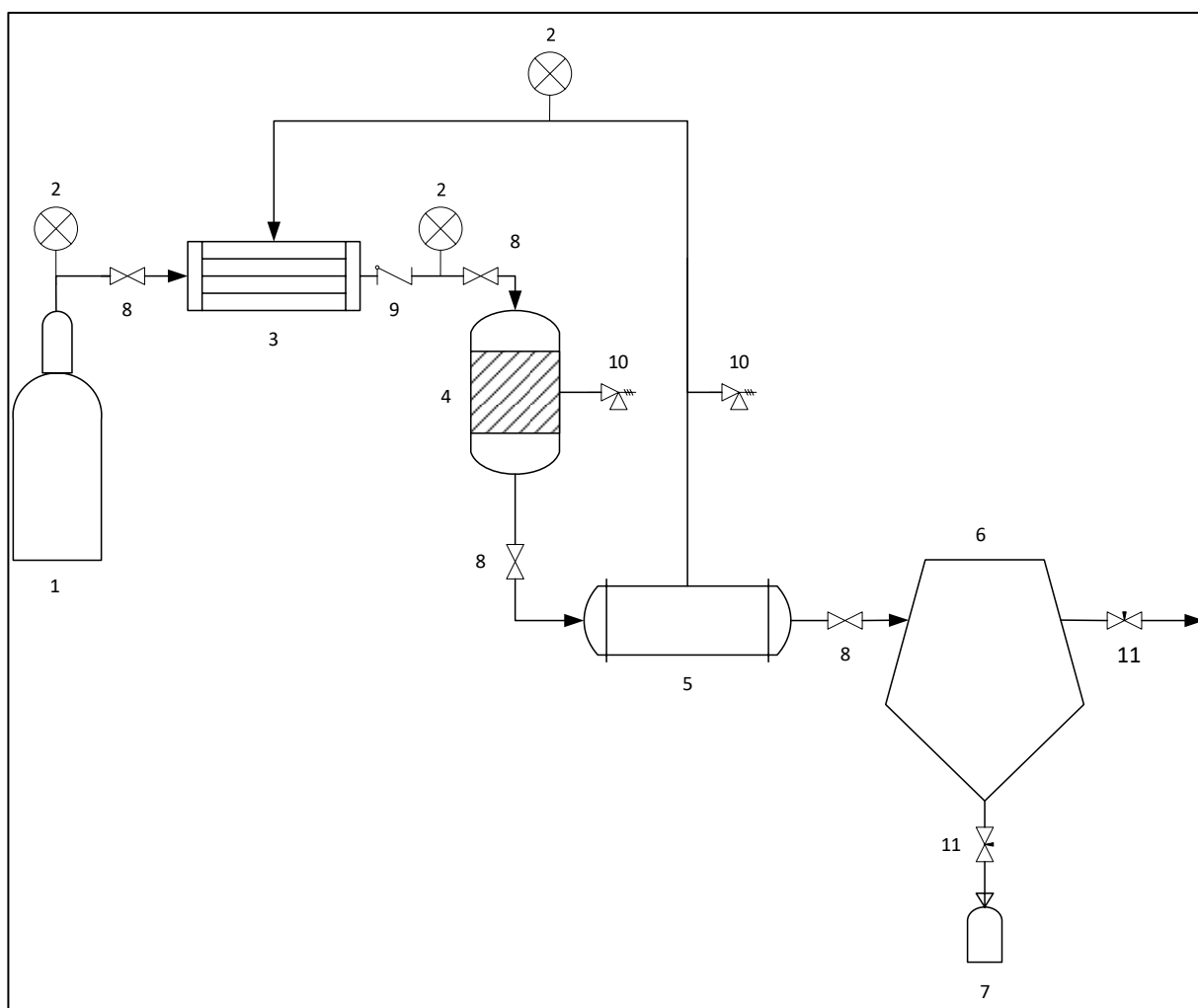
4.1 lentelėje pateikiama aptarto ekstrakto gavimui naudota įranga ir proceso aparatūrinė schema (žr. 4.1 pav.).

4.1 lentelė. Subkrižinėje CO<sub>2</sub> ekstrakcijoje naudota įranga

| Įrenginio Nr. | Įrenginio pavadinimas         |
|---------------|-------------------------------|
| 1             | CO <sub>2</sub> rezervuaras   |
| 2             | Slėgio matuoklis (manometras) |
| 3             | Aušintuvas                    |
| 4             | Ekstraktorius                 |
| 5             | Šilumokaitis                  |
| 6             | Separatorius                  |
| 7             | Mėginio surinkimo indas       |
| 8             | Įjungimo – išjungimo vožtuvas |
| 9             | Atbulinis vožtuvas            |
| 10            | Apsauginis vožtuvas           |
| 11            | Adatinis vožtuvas             |

Ekstrakcijos procesas prasideda nuo žaliavos paruošimo – ekstrahuojama medžiaga paprastai sumalama ar kitaip susmulkinama, siekiant padidinti jos paviršiaus plotą ir pagerinti ekstrakcijos efektyvumą. Tuomet susmulkinta medžiaga patalpinama į ekstraktorių **4**, kuris yra specialiai pritaikytas atlaikyti aukštą slėgį. Ekstrakcijos indas yra sandarus, kad proceso metu iš jo nepasišalintų CO<sub>2</sub>. CO<sub>2</sub> dujos iš talpyklos **1** patenka į aušintuvą **3**, kur atvėsintos iki 10 °C temperatūros, dujos tampa subkrižinės būsenos (skysčiu) ir tiekiamos į ekstrakcijos indą **4**, kuriame palaikomas 40 barų slėgis. Ekstraktoriuje **4** subkrižinės būsenos CO<sub>2</sub> sąveikauja su susmulkinta žaliava. Visuose proceso etapuose slėgis matuojamas manometrais **2**. Ekstrakcijos procesas gali trukti nuo kelių valandų iki paros, viso proceso metu ekstraktoriuje palaikoma procesui reikalinga temperatūra ir slėgis.

Ekstrakcijos metu subkryzinis CO<sub>2</sub> sąveikauja su žaliava ir praeidamas per medžiagą ištirpina aktyvius junginius. Pasibaigus ekstrakcijai, subkryzinės būsenos CO<sub>2</sub> teka į šilumokaitį **5**, kuriame išgarinamos dujos. CO<sub>2</sub> dujos garuodamos atsiskiria ir vamzdžiu vėl patenka į aušintuvą **3**. Gautas produktas perkeliamas į separatorių **6**, kuriame galutinai atskiriamas ir išgryninamas ekstraktas, kuris į surinkimo indą **7** surenkamas per adatinį vožtuvą **11**. Išgrynintas ekstraktas, kuriame yra biologiškai aktyvių junginių, yra galutinis subkryzinės CO<sub>2</sub> ekstrakcijos proceso produktas, o CO<sub>2</sub> dujos, atgautos po ekstrakcijos, panaudojamos pakartotinai. Dėl tos priežasties subkryzinė CO<sub>2</sub> ekstrakcija yra tvarus metodas. Vožtuvai **8, 9, 10** užtikrina proceso reguliavimą, izoliavimą, srauto ir slėgio kontrolę [162, 163].



**4.1 pav.** Subkryzinės CO<sub>2</sub> ekstrakcijos aparatūrinė schema

Išanalizavus šio tyrimo metu gautus rezultatus ir remiantis padarytomis išvadomis, pateikiamos rekomendacijos tolimesnei gvazdikmedžio ekstraktų poveikio *B. cinerea* ar kitų patogeninių grybų analizei, išsamesniems ekstraktų poveikio tiriamajam augalui tyrimams bei taikymui:

- palyginti duomenis su kitais ekstrakcijos būdais gautais gvazdikmedžio ekstraktais, siekiant išskirti įvairius biologiškai aktyvius junginius: ekstrahavimo būdo parinkimas priklauso nuo norimų išskirti junginių, augalinės medžiagos, numatomo gautų ekstraktų panaudojimo, nes visi ekstrahavimo metodai atskiria skirtingus junginius dėl jų veikimo mechanizmo ir savybių skirtumų;



- ištirti skirtingų koncentracijų gvazdikmedžio ekstraktų poveikį *B. cinerea* ir kitiems patogeniniams grybams, įvertinant poveikį apdorojamam augalui: atlikti tyrimai su skirtingomis koncentracijomis padės nustatyti optimalią ekstrakto koncentraciją grybų augimui slopinti, kartu sumažinant fitotoksinį poveikį tirtiems augalams. Tai gali padėti nustatyti koncentracijos diapazoną, kuriame ekstraktai pasižymi didžiausiu antigrybiniu aktyvumu ir aktyvinančiu poveikiu augalų antioksidacinei sistemai;
- identifikuoti ekstraktuose esančias aktyvias medžiagas: frakcionuoti gvazdikmedžio pumpurų ekstraktus, atskiriant junginius arba junginių grupes. Tai padės nustatyti konkrečius biologiškai aktyvius junginius, atsakingus už antigrybinį poveikį. Identifikavus junginius, juos galima toliau tirti, siekiant nustatyti jų veikimo mechanizmus ar optimizuoti veiksmingumą;
- atlikti papildomus lauko eksperimentus su augalais: atlikti lauko eksperimentai padėtų įvertinti gvazdikmedžio pumpurų ekstrakto veiksmingumą prieš patogenus bei įtaką augalams realiomis augimo sąlygomis. Galima ištirti ekstraktų gebėjimą kontroliuoti ir slopinti grybines ligas bei pasėlių derlių ir kokybę, lyginant su įprastais fungicidais;
- įvertinti gvazdikmedžio ekstrakto fitotoksiškumą: svarbu įvertinti ir galimą neigiamą ekstrakto poveikį augalų vystymuisi, fiziologijai, augimui, pvz., sėklų daugumui ir augimui, fotosintezės efektyvumui ir kt.;
- nustatyti ekstrakto poveikį aplinkai: atlikus poveikio aplinkai vertinimą, būtų galima įvertinti gvazdikmedžio ekstrakto, kaip biofungicido, naudojimo įtaką gamtai, t. y. poveikį netiksliniams organizmams, įvertinti patvarumą.

Įgyvendinant šias rekomendacijas galima įgyti platesnį ir gilesnį supratimą apie ekstraktų poveikį patogeniniams grybams ir galimą jų pritaikymą augalų ligų valdymui, teigiamą ar neigiamą įtaką veikianam augalui, kartu užtikrinant ekstraktų, kaip biofungicidų, naudojimo žemės ūkyje saugumą ir tvarumą.

## Išvados

1. Ištyrus gvazdikmedžio (lot. *Syzygium aromaticum*) ekstrakto gebėjimą slopinti pilkąjį puvinį (lot. *B. cinerea*) braškių augimo metu, nustatyta, kad 0,20 % koncentracijos gvazdikmedžio CO<sub>2</sub> ekstraktas nežymiai sumažino sukeltos ligos intensyvumą ir procentinę tirtų braškių lapų pažeidimą.
2. Antioksidacinio aktyvumo tyrimų rezultatai rodo, kad gvazdikmedžio ekstraktas turi įtakos ir sveikų, ir pilkojo puvinio pažeistų braškių antioksidacinei sistemai, tačiau veikia skirtingų antioksidantų, surišančių nevienodus radikalus, sintezę. Paveikus braškių lapus 0,20 % koncentracijos gvazdikmedžio ekstraktu, eksperimento eigoje nustatytas didėjantis ABTS antioksidacinis aktyvumas sveikose ir pilkojo puvinio pažeistose braškėse, o DPPH – mažėjantis. Tuo tarpu FRAP antioksidacinis aktyvumas nepakito ekstraktu apdorotose sveikose braškėse, bet padidėjo pilkojo puvinio pažeistose braškėse po purškimo.
3. Gvazdikmedžio ekstraktas minimaliai padidino bendrą fenolinių junginių koncentraciją sveikose ir pilkojo puvinio pažeistose braškėse, tačiau praėjus 7 paroms po pirminio apdoravimo buvo fiksuotas koncentracijos sumažėjimas.
4. Įvertinus gvazdikmedžio ekstrakto įtaką chlorofilo *a*, *b* ir karotinoidų koncentracijoms užkrėstose ir sveikose braškėse, nustatytas koncentracijų kitimas. Po trečiojo augalų purškimo ir užkrėtus juos patogenų, užfiksuotas chlorofilo *a*, *b* ir karotinoidų koncentracijos padidėjimas, tačiau infekcijai išplitus, ir sveikose, ir pilkojo puvinio pažeistose braškėse šių junginių koncentracija buvo mažesnė.
5. Suprojektuota gvazdikmedžio ekstrakto gamybos aparatūrinė schema, naudojant subkrizinį CO<sub>2</sub> ekstraktorių, ir pateiktos gvazdikmedžio ekstraktų tolesnio panaudojimo braškių tyrimams rekomendacijos, siekiant įgyti gilesnį supratimą apie patogenų sukeltamų ligų slopinimą, kontroliavimą ir augalų imuninės sistemos stiprinimą.

## Literatūros sąrašas

1. HEMATHILAKE, D. M. K. S., GUNATHILAKE, D. M. C. C. Chapter 31 - Agricultural productivity and food supply to meet increased demands. *Future Foods - Global Trends, Opportunities, and Sustainability Challenges* [interaktyvus]. **2022**; p. 539-553 [žiūrėta 2024-02-25]. ISSN 978-0-323-91001-9. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91001-9.00016-5>.
2. NXUMALO, K. A., AREMU, A. O., FAWOLE, O. A. Potentials of Medicinal Plant Extracts as an Alternative to Synthetic Chemicals in Postharvest Protection and Preservation of Horticultural Crops: A Review. *Sustainability* [interaktyvus]. **2021**; 13(11), 5897 [žiūrėta 2024-02-25]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/su13115897>.
3. RAJARAM, S., DUBIN, H. J. Plant Diseases, Global Food Security and the Role of R. Glenn Anderson. In: Scott, P., Strange, R., Korsten, L., Gullino, M. L., (eds.) *Plant Diseases and Food Security in the 21st Century*. Springer International Publishing: Cham, Switzerland. **2021**; 10, p. 35-45 [žiūrėta 2024-02-25]. ISBN 978-3-030-57899-2. Prieiga per: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-57899-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-57899-2_3).
4. PALMIERI, D., IANIRI, G., DEL GROSSO, C., BARONE, G., DE CURTIS, F., et al. Advances and Perspectives in the Use of Biocontrol Agents against Fungal Plant Diseases. *Horticulturae* [interaktyvus]. **2022**; 8(7), 577 [žiūrėta 2024-02-25]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/horticulturae8070577>.
5. PINTO, L., BONIFACIO, M. A., DE GIGLIO, E., COMETA, S., LOGRIECO, A. F., et al. Unravelling the Antifungal Effect of Red Thyme Oil (*Thymus vulgaris* L.) Compounds in Vapor Phase. *Molecules* [interaktyvus]. **2020**; 25(20), 4761 [žiūrėta 2024-02-25]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/molecules25204761>.
6. KASOTE, D. M., KATYARE, S. S., HEGDE, M. V., BAE, H. Significance of Antioxidant Potential of Plants and its Relevance to Therapeutic Applications. *International Journal of Biological Sciences* [interaktyvus]. **2015**; 11(8), 982-991 [žiūrėta 2024-02-25]. Prieiga per: <https://doi.org/10.7150%2Fijbs.12096>.
7. DĖNĖ, L., LAUŽIKĖ, K., RASIUKEVIČIŪTĖ, N., CHRAPAČIENĖ, S., BRAZAITYTĖ, A., et al. Defense response of strawberry plants against *Botrytis cinerea* influenced by coriander extract and essential oil. *Frontiers Plant Science* [interaktyvus]. **2023**; 13 [žiūrėta 2024-02-25]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1098048>.
8. MOSTAFA, A. A.-F., YASSIN, M. T., AL-ASKAR, A. A., AL-OTIBI, F. O. Phytochemical analysis, antiproliferative and antifungal activities of different *Syzygium aromaticum* solvent extracts. *Journal of King Saud University – Science* [interaktyvus]. **2023**; 35(1), 102362 [žiūrėta 2024-02-25]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.102362>.
9. RIGOBELLO, E. Plant Growth. *IntechOpen* [interaktyvus]. 2016; p. 232 [žiūrėta 2024-02-17]. ISBN 978-953-51-2772-7. Prieiga per: <https://doi.org/10.5772/62601>.
10. GARRETT, K. A., NITA, M., DE WOLF, E. D., ESKER, P. D., GOMEZ-MONTANO, L., et al. Chapter 24 – Plant pathogens as indicators of climate change. *Climate Change (Third Edition)*, Elsevier [interaktyvus]. **2021**; p. 499-513 [žiūrėta 2024-02-17]. ISBN 9780128215753. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821575-3.00024-4>.
11. VELÁSQUEZ, A. C., CASTROVERDE, C. D. M., HE, S. Y. Plant–Pathogen Warfare under Changing Climate Conditions. *Current Biology, Review* [interaktyvus]. **2018**; 28(10) [žiūrėta 2024-02-17]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.03.054>

12. SHAFI, J., TIAN, H., JI, M. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* [interaktyvus]. **2017**; 31(3), p. 446-459 [žiūrėta 2024-02-17]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1286950>.
13. KATAN, J. Diseases caused by soilborne pathogens: biology, management and challenges. *Journal of Plant Pathology* [interaktyvus]. **2017**; 99(2), p. 305–315 [žiūrėta 2024-02-18]. Prieiga per: <http://www.jstor.org/stable/44686775>.
14. PUJARI, J. D., YAKKUNDIMATH, R., BYADGI, A. S. Image Processing Based Detection of Fungal Diseases in Plants. *Procedia Computer Science* [interaktyvus]. **2015**; 46, p. 1802-1808 [žiūrėta 2024-02-18]. ISSN 1877-0509. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.procs.2015.02.137>.
15. PFEILMEIER, S., CALY, D. L., MALONE, J. G. Bacterial pathogenesis of plants: future challenges from a microbial perspective. *Molecular Plant Pathology* [interaktyvus]. **2016**; 17: 1298-1313 [žiūrėta 2024-02-18]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1111/mps.12427>.
16. JONES, R. A. C. Global Plant Virus Disease Pandemics and Epidemics. *Plants* [interaktyvus]. **2021**; 10(2):233 [žiūrėta 2024-02-18]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/plants10020233>.
17. SHERMAN, J., BURKE, J. M., GENT, D. H. Cooperation and Coordination in Plant Disease Management. *Phytopathology*<sup>®</sup> [interaktyvus]. **2019**; 109(10), p. 1720-1731 [žiūrėta 2024-02-18]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-19-0010-R>.
18. THAMBUGALA, K. M., DARANAGAMA, D. A., PHILLIPS, A. J. L., KANNANGARA, S. D., PROMPUTHA, I. Fungi vs. Fungi in Biocontrol: An Overview of Fungal Antagonists Applied Against Fungal Plant Pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [interaktyvus]. **2020**; 10 [žiūrėta 2024-02-18]. ISSN 2235-2988. Prieiga per: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.604923>.
19. PENG, Y., LI, S. J., YAN, J., TANG, Y., CHENG, J. P., et al. Research Progress on Phytopathogenic Fungi and Their Role as Biocontrol Agents. *Frontiers in Microbiology* [interaktyvus]. **2021**; 12 [žiūrėta 2024-02-18]. ISSN 1664-302X. Prieiga per: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.670135>.
20. MARÍN-MENGUIANO, M., MORENO-SÁNCHEZ, I., BARRALES, R. R., FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, A., IBEAS, J. I. N-glycosylation of the protein disulfide isomerase Pdi1 ensures full *Ustilago maydis* virulence. *PLoS Pathogens* [interaktyvus]. **2019**; 15(11):e1007687 [žiūrėta 2024-02-18]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007687>.
21. QUINTANILHA-PEIXOTO, G., TORRES, R. O., REIS, I. M. A., DE OLIVEIRA, T. A. S., BORTOLINI, D. E., et al. Calm Before the Storm: A Glimpse into the Secondary Metabolism of *Aspergillus welwitschiae*, the Etiologic Agent of the Sisal Bole Rot. *Toxins* [interaktyvus]. **2019**; 11(11):631 [žiūrėta 2024-02-18]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/toxins11110631>.
22. VINCENT, D., RAFIQI, M., JOB, D. The Multiple Facets of Plant–Fungal Interactions Revealed Through Plant and Fungal Secretomics. *Frontiers in Plant Science* [interaktyvus]. **2020**; 10:1626 [žiūrėta 2024-02-18]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01626>.
23. HUSSAIN, F., USMAN, F. *Abiotic and Biotic Stress in Plants*. London, UK: IntechOpen. **2019**. ISBN 978-1-78923-812-9 [žiūrėta 2024-02-18]. Prieiga per: <https://doi.org/10.5772/intechopen.77845>.
24. NAZAROV, P. A., BALEEV, D. N., IVANOVA, M. I., SOKOLOVA, L. M., KARAKOZOVA, M. V. Infectious Plant Diseases: Etiology, Current Status, Problems and Prospects in Plant Protection. *Acta Naturae* [interaktyvus]. **2020**; 12(3):46-59 [žiūrėta 2024-02-18]. Prieiga per: <https://doi.org/10.32607%2Factanaturae.11026>.

25. FERNANDEZ-SAN MILLAN, A., LARRAYA, L., FARRAN, I., ANCIN, M., VERAMENDI, J. Successful biocontrol of major postharvest and soil-borne plant pathogenic fungi by antagonistic yeasts. *Biological Control* [interaktyvus]. **2021**; 160 [žiūrėta 2024-02-18]. ISSN 1049-9644. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104683>.
26. GARFINKEL, A. R. The History of *Botrytis* Taxonomy, the Rise of Phylogenetics, and Implications for Species Recognition. *Phytopathology* [interaktyvus]. **2021**; 111(3):437-454 [žiūrėta 2024-02-24]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-20-0211-IA>.
27. ELAD, Y., PERTOT, I., COTES PRADO, A. M., STEWART, A. Plant Hosts of *Botrytis* spp. In: Fillinger, S., Elad, Y. (eds) *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Springer International Publishing, Cham. **2016**; p. 413–486, ISBN 978-3-319-23371-0 [žiūrėta 2024-02-24]. Prieiga per: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0\\_20](https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0_20).
28. PLESKEN, C., WEBER, R. W. S., RUPP, S., LEROCH, M., HAHN, M. *Botrytis pseudocinerea* is a significant pathogen of several crop plants but susceptible to displacement by fungicide-resistant *B. cinerea* strains. *Applied and Environmental Microbiology* [interaktyvus]. **2015**; 81(20):7048-7056 [žiūrėta 2024-02-24]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1128/AEM.01719-15>.
29. RICHARDS, J. K., XIAO, C.-L., JURICK, W. M. *Botrytis* spp.: A Contemporary Perspective and Synthesis of Recent Scientific Developments of a Widespread Genus that Threatens Global Food Security. *Phytopathology* [interaktyvus] **2021**; 111(3):432-436 [žiūrėta 2024-02-24]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-20-0475-IA>.
30. STEENTJES, M. B. F., SCHOLTEN, O. E., VAN KAN, J. A. L. Peeling the onion: Towards a Better Understanding of *Botrytis* Diseases of Onion. *Phytopathology* [interaktyvus]. **2021**; 111(3):464-473 [žiūrėta 2024-02-24]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-20-0258-IA>.
31. MCCOMBE, C. L., GREENWOOD, J. R., SOLOMON, P. S., WILLIAMS, S. J. Molecular plant immunity against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic fungi. *Essays in Biochemistry* [interaktyvus]. **2022**; 66(5):581-593 [žiūrėta 2024-02-24]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1042/EBC20210073>.
32. GARFINKEL, A. R., COATS, K. P., SHERRY, D. L., CHASTAGNER, G. A.. Genetic analysis reveals unprecedented diversity of a globally-important plant pathogenic genus. *Scientific Reports* [interaktyvus]. **2019**; 9, 6671 [žiūrėta 2024-02-24]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43165-y>.
33. VELOSO, J., VAN KAN, J. A. Many shades of grey in *Botrytis*–Host Plant Interactions. *Trends Plant Science* [interaktyvus]. **2018**; 23(7):613-622 [žiūrėta 2024-02-24]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.03.016>.
34. SPADARO, D., TORRES, R., ERRAMPALLI, D., EVERETT, K., RAMOS, L., MARI, M. Pome fruits. In: Palou, L., Smilanick, J. L. (eds) *Postharvest Pathology of Fresh Horticultural Produce*. CRC Press, Boca Raton, FL. **2019**; p. 55-112 [žiūrėta 2024-02-24]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1201/9781315209180>.
35. FEDELE, G., BRISCHETTO, C., ROSSI, V. Biocontrol of *Botrytis cinerea* on Grape Berries as Influenced by Temperature and Humidity. *Frontiers in Plant Science* [interaktyvus]. **2020**; 11 [žiūrėta 2024-02-24]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01232>.
36. NIELSEN, K. A. G., SKÅRN, M. N., TALGØ, V., PETTERSSON, M., FLØISTAD, I. S., et al. Fungicide-Resistant *Botrytis* in Forest Nurseries May Impact Disease Control in Norway Spruce.

- Plant Disease* [interaktyvus]. **2024**; 108(1):139-148 [žiūrėta 2024-02-24]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-23-0037-RE>.
37. BI, K., LIANG, Y., MENGISTE, T., SHARON, A. Killing softly: a roadmap of *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Trends in Plant Science* [interaktyvus]. **2022**; 28(2):211-222 [žiūrėta 2024-02-25]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2022.08.024>.
38. OROZCO-MOSQUEDA, MA. DEL C., KUMAR, A., FADIJI, A. E., BABALOLA, O. O., PUOPOLO, G., et al. Agroecological Management of the Grey Mould Fungus *Botrytis cinerea* by Plant Growth-Promoting Bacteria. *Plants* [interaktyvus]. **2023**; 12(3), 637 [žiūrėta 2024-02-25]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/plants12030637>.
39. RISOLI, S., COTROZZI, L., SARROCCO, S., NUZZACI, M, PELLEGRINI, E., et al. *Trichoderma*-Induced Resistance to *Botrytis cinerea* in *Solanum* Species: A Meta-Analysis. *Plants* [interaktyvus]. **2022**; 11(2), 180 [žiūrėta 2024-02-25]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/plants11020180>.
40. MONTEIRO, E., GONÇALVES, B., CORTEZ, I., CASTRO, I. The Role of Biostimulants as Alleviators of Biotic and Abiotic Stresses in Grapevine: A Review. *Plants* [interaktyvus]. **2022**; 11(3), 396 [žiūrėta 2024-02-25]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/plants11030396>.
41. WANG, R., LIU, K., CHEN, B., DING, W., LI, Y. Genetic and pathogenic variation of *Botrytis cinerea*, the causal agent of grey mould on *Panax ginseng* in China. *Canadian Journal of Plant Pathology* [interaktyvus]. **2022**; 44(5):744-753 [žiūrėta 2024-02-25]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1080/07060661.2022.2067900>.
42. PETRASCH, S., KNAPP, S. J., VAN KAN, J. A. L., BLANCO-ULATE, B. Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology* [interaktyvus]. **2019**; 20(6):877-892 [žiūrėta 2024-02-25]. PMID: 30945788; PMCID: PMC6637890. Prieiga per: <https://doi.org/10.1111%2Fmpp.12794>.
43. POVEDA, J., BARQUERO, M., GONZÁLEZ-ANDRÉS, F. Insight into the Microbiological Control Strategies against *Botrytis cinerea* Using Systemic Plant Resistance Activation. *Agronomy* [interaktyvus]. **2020**; 10(11), 1822 [žiūrėta 2024-02-25]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/agronomy10111822>.
44. CHEUNG, N., TIAN, L., LIU, X., LI, X. The Destructive Fungal Pathogen *Botrytis cinerea*-Insights from Genes Studied with Mutant Analysis. *Pathogens* [interaktyvus]. **2020**; 9(11), 923 [žiūrėta 2024-02-25]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/pathogens9110923>.
45. KAHRAMANOĞLU, İ., PANFILOVA, O., KESIMCI, T. G., BOZHÜYÜK, A. U., GÜRBÜZ, R., et al. Control of Postharvest Gray Mold at Strawberry Fruits Caused by *Botrytis cinerea* and Improving Fruit Storability through *Origanum onites* L. and *Ziziphora clinopodioides* L. Volatile Essential Oils. *Agronomy* [interaktyvus]. **2022**; 12(2), 389 [žiūrėta 2024-02-25]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/agronomy12020389>.
46. HUANG, L., YONG, K. W. L., FERNANDO, W. C., CARPINELLI DE JESUS, M., DE VOSS, J. J., et al. The Inactivation by Curcumin-Mediated Photosensitization of *Botrytis cinerea* Spores Isolated from Strawberry Fruits. *Toxins* [interaktyvus]. **2021**; 13(3), 196 [žiūrėta 2024-02-25]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/toxins13030196>.
47. TARIQ, M., MOHAMMAD, K. N., AHMED, B., SIDDIQUI, M. A., LEE, J. Biological Synthesis of Silver Nanoparticles and Prospects in Plant Disease Management. *Molecules* [interaktyvus]. **2022**; 27(15), 4754 [žiūrėta 2024-02-25]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/molecules27154754>.

48. AHMAD, A., SARASWAT, D., EL GAMAL, A. A survey on using deep learning techniques for plant disease diagnosis and recommendations for development of appropriate tools. *Smart Agricultural Technology* [interaktyvus]. **2023**; 3, 100083 [žiūrėta 2024-02-25]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.atech.2022.100083>.
49. PICON, A., ALVAREZ-GILA, A., SEITZ, M., ORTIZ-BARREDO, A., ECHAZARRA, J., et al. Deep convolutional neural networks for mobile capture device-based crop disease classification in the wild. *Computers and Electronics in Agriculture* [interaktyvus]. **2019**; 161, p. 280-290 [žiūrėta 2024-02-25]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.compag.2018.04.002>.
50. VAN BRUGGEN, A. H. C. Chapter 4.1: Introduction to Plant Disease Management in Organic Agriculture. In: Finckh, M. R., van Bruggen, A. H. C., Tamm, L. (eds.) *Plant Diseases and Their Management in Organic Agriculture*. St. Paul, Minnesota: APS Press. **2017**; p. 119-126, ISBN 978-0-89054-478-5 [žiūrėta 2024-03-02]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1094/9780890544785.010>.
51. VAN BRUGGEN, A. H. C., FINCKH, M. R. Plant Diseases and Management Approaches in Organic Farming Systems. *Annual Review of Phytopathology* [interaktyvus]. **2016**; 54(1):25-54 [žiūrėta 2024-03-02]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100123>.
52. ABUBAKAR, Y., TIJJANI, H., EGBUNA, C., ADETUNJI, C. O., KALA, S., et al. Chapter 3 – Pesticides, History, and Classification. *Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control* [interaktyvus]. **2020**, p. 29-42 [žiūrėta 2024-03-02]. ISBN 978-012-81-9304-4. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819304-4.00003-8>.
53. TUDI, M., DANIEL RUAN, H., WANG, L., LYU, J., SADLER, R., et al. Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [interaktyvus]. **2021**; 18(3), 1112 [žiūrėta 2024-03-02]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/ijerph18031112>.
54. JACQUET, F., JEUFFROY, M. H., JOUAN, J., LE CADRE, E., LITRICO, I., et al. Pesticide-free agriculture as a new paradigm for research. *Agronomy for Sustainable Development* [interaktyvus]. **2020**; 42(8) [žiūrėta 2024-03-02]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s13593-021-00742-8>.
55. Forecast: global agricultural use of pesticides 2023-2027. Published by Statista Research Department, **2023** [žiūrėta 2024-03-02]. Prieiga per: <https://www.statista.com/statistics/1401556/global-agricultural-use-of-pesticides-forecast/>.
56. KAUR, R., KAUR MAVI, G., RAGHAV, S., KHAN, I. Pesticides Classification and its Impact on Environment. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* [interaktyvus]. **2019**; 8(3):1889-1897 [žiūrėta 2024-03-02]. Prieiga per: <https://doi.org/10.20546/ijemas.2019.803.224>.
57. TSALIDIS, G. A. Human Health and Ecosystem Quality Benefits with Life Cycle Assessment Due to Fungicides Elimination in Agriculture. *Sustainability* [interaktyvus]. **2022**; 14(2), 846 [žiūrėta 2024-03-02]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/su14020846>.
58. YIN, Y., MIAO, J., SHAO, W., LIU, X., ZHAO, Y., et al. Fungicide Resistance: Progress in Understanding Mechanism, Monitoring, and Management. *Phytopathology* [interaktyvus]. **2023**; 113(4):707-718 [žiūrėta 2024-03-02] Prieiga per: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-22-0370-KD>.
59. WANG, H., LIU, M., ZHANG, W., YAN, J., TANG, X., et al. An Effect and Less Spraying Control Method Successfully Controls *Botrytis cinerea* on Grapes in China. *Agronomy*

- [interaktyvus]. **2023**; 13(10), 2578 žiūrėta [2024-03-02]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/agronomy13102578>.
60. ROSA, S., PESARESI, P., MIZZOTTI, C., BULONE, V., MEZZETTI, B., et al. Game-changing alternatives to conventional fungicides: small RNAs and short peptides. *Trends in Biotechnology* [interaktyvus]. **2022**; 40(3):320-337 [žiūrėta 2024-03-02]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2021.07.003>.
  61. SHAVANOV, M. V., SHIGAPOV, I. I., NIAZ, A. Biological methods for pests and diseases control in agricultural plants. *AIP Conference Proceedings* [interaktyvus]. **2022**; 2390(1), 030081 [žiūrėta 2024-03-09]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1063/5.0070487>.
  62. VERO, S., GARMENDIA, G., ALLORI, E., SANZ, J. M., GONDA, M., et al. Microbial Biopesticides: Diversity, Scope, and Mechanisms Involved in Plant Disease Control. *Diversity* [interaktyvus]. **2023**; 15(3), 457 [žiūrėta 2024-03-09]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/d15030457>.
  63. LENGAI, G. M. W., MUTHOMI, J. W. Biopesticides and Their Role in Sustainable Agricultural Production. *Journal of Biosciences and Medicines* [interaktyvus]. **2018**; 6(6) [žiūrėta 2024-03-09]. Prieiga per: <https://doi.org/10.4236/jbm.2018.66002>.
  64. YADAV, T., SINGH, S., SINGH, A. N. Biopesticides: Current status and future prospects. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences* [interaktyvus]. **2022**; 12(3): 211-233 [žiūrėta 2024-03-09]. Prieiga per: [https://www.researchgate.net/publication/362667605\\_Biopesticides\\_Current\\_status\\_and\\_future\\_prospects](https://www.researchgate.net/publication/362667605_Biopesticides_Current_status_and_future_prospects).
  65. THAKUR, N., KAUR, S., TOMAR, P., THAKUR, S., YADAV, A. N. Chapter 15 - Microbial biopesticides: Current status and advancement for sustainable agriculture and environment. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* [interaktyvus]. **2020**; p. 243-282 [žiūrėta 2024-03-09]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820526-6.00016-6>.
  66. LAHLALI, R., EZRARI, S., RADOUANE, N., KENFAOUI, J., ESMAEEL, Q., et al. Biological Control of Plant Pathogens: A Global Perspective. *Microorganisms* [interaktyvus]. **2022**; 10(3), 596 [žiūrėta 2024-03-09]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030596>.
  67. CIANCIO, A., PIETERSE, C. M. J., MERCADO-BLANCO, J. Editorial: Harnessing Useful Rhizosphere Microorganisms for Pathogen and Pest Biocontrol – Second Edition. *Front. Microbiol* [interaktyvus]. **2019**; 10, 1935 [žiūrėta 2024-03-09]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01935>.
  68. ONS, L., BYLEMANS, D., THEVISSSEN, K., CAMMUE, B. P. A. Combining Biocontrol Agents with Chemical Fungicides for Integrated Plant Fungal Disease Control. *Microorganisms* [interaktyvus]. **2020**; 8(12), 1930 [žiūrėta 2024-03-09]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121930>.
  69. KUMAR, J., RAMLAL, A., MALLICK, D., MISHRA, V. An Overview of Some Biopesticides and Their Importance in Plant Protection for Commercial Acceptance. *Plants* [interaktyvus]. **2021**; 10(6), 1185 [žiūrėta 2024-03-09]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/plants10061185>.
  70. KHURSHEED, A., RATHER, M. A., JAIN, V., WANI, A. R., RASOOL, S. Plant based natural products as potential ecofriendly and safer biopesticides: A comprehensive overview of their advantages over conventional pesticides, limitations and regulatory aspects. *Microbial*



- Pathogenesis* [interaktyvus]. **2022**; 173, 105854 [žiūrėta 2024-03-09]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105854>.
71. LENGAI, G. M. W., MUTHOMI, J. W., MBEGA, E. R. Phytochemical activity and role of botanical pesticides in pest management for sustainable agricultural crop production. *Scientific African* [interaktyvus]. **2020**, 7 [žiūrėta 2024-03-09]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00239>.
  72. EL KHETABI, A., LAHLALI, R., EZRARI, S., RADOUANE, N., LYOUSFI, N., et al. Role of plant extracts and essential oils in fighting against postharvest fruit pathogens and extending fruit shelf life: A review. *Trends in Food Science & Technology* [interaktyvus]. **2022**; 120, p. 402-417 [žiūrėta 2024-03-09]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.01.009>.
  73. ŠUNJKA, D., MECHORA, Š. Advances in Alternative Measures in Plant Protection. *Plants (Basel)* [interaktyvus]. **2023**; 12(4): 805 [žiūrėta 2024-03-09]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/plants12040805>.
  74. DĒNĒ, L., VALIUŠKAITĒ, A. Sensitivity of *Botrytis cinerea* Isolates Complex to Plant Extracts. *Molecules* [interaktyvus]. **2021**; 26(15), 4595 [žiūrėta 2024-03-09]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/molecules26154595>.
  75. YOUSSEF, K., ROBERTO, S. R., DE OLIVEIRA, A. G. Ultra-Structural Alterations in *Botrytis cinerea*—The Causal Agent of Gray Mold—Treated with Salt Solutions. *Biomolecules* [interaktyvus]. **2019**; 9(10), 582 [žiūrėta 2024-03-09]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/biom9100582>.
  76. YOUSSEF, K., ROBERTO, S. R. Salt strategies to control *Botrytis* mold of ‘Benitaka’ table grapes and to maintain fruit quality during storage. *Postharvest Biology and Technology* [interaktyvus]. **2014**, 95, p. 95-102 [žiūrėta 2024-03-10]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.04.009>.
  77. YANG, D., SHI, H., ZHANG, K., LIU, X., MA, L. The antifungal potential of the chelating agent EDTA against postharvest plant pathogen *Botrytis cinerea*. *International Journal of Food Microbiology* [interaktyvus]. **2023**; 388, 110089 [žiūrėta 2024-03-10]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110089>.
  78. WORRALL, E. A., HAMID, A., MODY, K. T., MITTER, N., PAPPU, H. R. Nanotechnology for Plant Disease Management. *Agronomy* [interaktyvus]. **2018**; 8(12), 285 [žiūrėta 2024-03-10]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/agronomy8120285>.
  79. BALAURE, P. C., GUDOVAN, D., GUDOVAN, I. 4 - Nanopesticides: a new paradigm in crop protection. *New Pesticides and Soil Sensors* [interaktyvus]. **2017**; p. 129-192 [žiūrėta 2024-03-10]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804299-1.00005-9>.
  80. ZHAO, X., ZHANG, Y., CHEN, L., MA, Z., ZHANG, B. Chitosan-thymol nanoparticle with pH responsiveness as a potential intelligent botanical fungicide against *Botrytis cinerea*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* [interaktyvus]. **2023**; 195, 105571 [žiūrėta 2024-03-10]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2023.105571>.
  81. TRYFON, P., KAMOU, N. N., PAVLOU, A., MOURDIKOU DIS, S., MENKISSOGLU-SPIROUDI, U., et al. Nanocapsules of ZnO Nanorods and Geraniol as a Novel Mean for the Effective Control of *Botrytis cinerea* in Tomato and Cucumber Plants. *Plants* [interaktyvus]. **2023**; 12(5), 1074 [žiūrėta 2024-03-10]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/plants12051074>.
  82. PARADA, J., TORTELLA, G., SEABRA, A. B., FINCHEIRA, P., RUBILAR, O. Potential Antifungal Effect of Copper Oxide Nanoparticles Combined with Fungicides against *Botrytis*

- cinerea* and *Fusarium oxysporum*. *Antibiotics* [interaktyvus]. **2024**; 13(3), 215 [žiūrėta 2024-03-10]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/antibiotics13030215>.
83. MENG, L., MESTDAGH, H., AMEYE, M., AUDENAERT, K., HÖFTE, M. Phenotypic Variation of *Botrytis cinerea* Isolates Is Influenced by Spectral Light Quality. *Front. Plant Sci* [interaktyvus]. **2020**; 11:1233 [žiūrėta 2024-03-10]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01233>.
84. LAURIA, G., LO PICCOLO, E., CECCANTI, C., GUIDI, L., BERNARDI, R., et al. Supplemental red LED light promotes plant productivity, “photomodulates” fruit quality and increases *Botrytis cinerea* tolerance in strawberry. *Postharvest Biology and Technology* [interaktyvus]. **2023**; 198, 112253 [žiūrėta 2024-03-10]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2023.112253>.
85. CERÓN-BUSTAMANTE, M., BALDUCCI, E., BECCARI, G., NICHOLSON, P., COVARELLI, L., et al. Effect of light spectra on cereal fungal pathogens, a review. *Fungal Biology Reviews* [interaktyvus]. **2023**; 46, 100291 [žiūrėta 2024-03-10]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2022.10.004>.
86. BHATLA, S. C., LAL, M. A. Secondary Metabolites. In: *Plant Physiology, Development and Metabolism*. Springer, Singapore. **2023**; p. 765-808, ISBN 978-981-99-5736-1 [žiūrėta 2024-03-10]. Prieiga per: [https://doi.org/10.1007/978-981-99-5736-1\\_33](https://doi.org/10.1007/978-981-99-5736-1_33).
87. ELSHAFIE, H. S., CAMELE, I., MOHAMED, A. A. A Comprehensive Review on the Biological, Agricultural and Pharmaceutical Properties of Secondary Metabolites Based-Plant Origin. *Int. J. Mol. Sci* [interaktyvus]. **2023**; 24(4), 3266 [žiūrėta 2024-03-10]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/ijms24043266>.
88. CHIOCCHIO, I., MANDRONE, M., TOMASI, P., MARINCICH, L., POLI, F. Plant Secondary Metabolites: An Opportunity for Circular Economy. *Molecules* [interaktyvus]. **2021**; 26(2), 495 [žiūrėta 2024-03-10]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/molecules26020495>.
89. TWAJJ, B. M., HASAN, M. N. Bioactive Secondary Metabolites from Plant Sources: Types, Synthesis, and Their Therapeutic Uses. *Int. J. Plant Biol.* [interaktyvus]. **2022**; 13 (1), 4-14 [žiūrėta 2024-03-10]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/ijpb13010003>.
90. POWDER-GEORGE, Y. L. Chapter 10 – Terpenoids. *Pharmacognosy (Second Edition). Fundamentals, Applications, and Strategies* [interaktyvus]. **2024**; p. 253-294 [žiūrėta 2024-03-10]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-18657-8.00006-2>.
91. SWAPNIL, P., MEENA, M., SINGH, S. K., DHULDHAJ, U. P., HARISH, MARWAL, A. Vital roles of carotenoids in plants and humans to deteriorate stress with its structure, biosynthesis, metabolic engineering and functional aspects. *Current Plant Biology* [interaktyvus]. **2021**; 26, 100203 [žiūrėta 2024-03-10]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2021.100203>.
92. KHWAZA, V., ADERIBIGBE, B. A. Antifungal Activities of Natural Products and Their Hybrid Molecules. *Pharmaceutics* [interaktyvus]. **2023**; 15(12), 2673 [žiūrėta 2024-03-10]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15122673>.
93. SUN, W., SHAHRAJABIAN, M .H. Therapeutic Potential of Phenolic Compounds in Medicinal Plants—Natural Health Products for Human Health. *Molecules* [interaktyvus]. **2023**; 28(4), 1845 [žiūrėta 2024-03-10]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/molecules28041845>.
94. ZHOU, X., ZENG, M., HUANG, F., QIN, G., SONG, Z., et al. The potential role of plant secondary metabolites on antifungal and immunomodulatory effect. *Applied Microbiology and*

- Biotechnology* [interaktyvus]. **2023**; 107, p. 4471–4492 [žiūrėta 2024-03-10]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12601-5>.
95. SEQUIN, C. J., APPELHANS, S. C., HEIS, M. S., TORRENT, W. A. TROSSERO, J. A., et al. Antifungal and toxicological evaluation of the alkaloids fraction from *Neltuma nigra* leaves. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* [interaktyvus]. **2023**; 54, 102914 [žiūrėta 2024-03-10]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102914>.
  96. ZIELEWICZ, W., WRÓBEL, B., NIEDBAŁA, G. Quantification of Chlorophyll and Carotene Pigments Content in Mountain Melick (*Melica nutans* L.) in Relation to Edaphic Variables. *Forests* [interaktyvus]. **2020**; 11(11), 1197 [žiūrėta 2024-03-10]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/f11111197>.
  97. UĞUZ, A. C., ROCHA-PIMIEN, J., MARTILLANES, S., GARRIDO, M., ESPINO, J., et al. Chlorophyll Pigments of Olive Leaves and Green Tea Extracts Differentially Affect Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* [interaktyvus]. **2023**; 28(6), 2779 [žiūrėta 2024-03-10]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/molecules28062779>.
  98. AL-KHAYRI, J. M., RASHMI, R., TOPPO, V., CHOLE, P. B., BANADKA, A., et al. Plant Secondary Metabolites: The Weapons for Biotic Stress Management. *Metabolites* [interaktyvus]. **2023**; 13(6), 716 [žiūrėta 2024-03-11]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/metabo13060716>.
  99. SALAM, U., ULLAH, S., TANG, Z.-H., ELATEEQ, A. A.; KHAN, Y., et al. Plant Metabolomics: An Overview of the Role of Primary and Secondary Metabolites against Different Environmental Stress Factors. *Life* [interaktyvus]. **2023**; 13(3), 706 [žiūrėta 2024-03-11]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/life13030706>.
  100. ANJALI, KUMAR, S., KORRA, T., THAKUR, R., ARUTSELVAN, R. Role of plant secondary metabolites in defence and transcriptional regulation in response to biotic stress. *Plant Stress* [interaktyvus]. **2023**; 8, 100154 [žiūrėta 2024-03-11]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100154>.
  101. CARO, M. DEL P., POTT, D. M., TOMAS-GRAU, R. H., PERATO, M., ALBORNOZ, P. L., et al. Defence responses triggered during the plant-pathogen interaction between strawberry (*Fragaria x ananassa*) and *Colletotrichum acutatum*. *Plant Stress* [interaktyvus]. **2023**; 10, 100219 [žiūrėta 2024-03-11]. ISSN 2667-064X. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100219>.
  102. BADMI, R., GOGOI, A., DOYLE PRESTWICH, B. Secondary Metabolites and Their Role in Strawberry Defense. *Plants* [interaktyvus]. **2023**; 12(18), 3240 [žiūrėta 2024-03-11]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/plants12183240>.
  103. WARNER, R., WU, B.-S., MACPHERSON, S., LEFSRUD, M. A Review of Strawberry Photobiology and Fruit Flavonoids in Controlled Environments. *Frontiers in Plant Science* [interaktyvus]. **2021**; 12 [žiūrėta 2024-03-11]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.611893>.
  104. HU, Z., CHANG, X., DAI, T., LI, L., LIU, P., et al. Metabolic Profiling to Identify the Latent Infection of Strawberry by *Botrytis cinerea*. *Evol Bioinform Online* [interaktyvus]. **2019**; 15:1176934319838518 [žiūrėta 2024-03-11]. PMID: 31024215; PMCID: PMC6472161. Prieiga per: <https://doi.org/10.1177%2F1176934319838518>.
  105. ZHAO, Y., VLASSELAER, L., RIBEIRO, B., TERZOUKIS, K., VAN DEN ENDE, W., et al. Constitutive Defense Mechanisms Have a Major Role in the Resistance of Woodland Strawberry

- Leaves Against *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Plant Science* [interaktyvus]. **2022**; 13 [žiūrėta 2024-03-11]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.912667>.
106. OTUNOLA, G. A. Culinary Spices in Food and Medicine: An Overview of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. and L. M. Perry [Myrtaceae]. *Front. Pharmacol* [interaktyvus]. **2022**; 12:793200 [žiūrėta 2024-03-11]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.793200>.
107. KAARUNIYA, G., SASI PRIYA, T. A review on therapeutic use of essential oils from traditional herbal plants. *International Journal of Botany Studies* [interaktyvus]. **2022**; 3(5), p. 8-14 [žiūrėta 2024-03-11]. ISSN: 2455-541X. Prieiga per: [ResearchGate](https://www.researchgate.net).
108. XUE, Q., XIANG, Z., WANG, S., CONG, Z., GAO, P., et al. Recent advances in nutritional composition, phytochemistry, bioactive, and potential applications of *Syzygium aromaticum* L. (Myrtaceae). *Front. Nutr.* [interaktyvus]. **2022**; 9:1002147 [žiūrėta 2024-03-11]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1002147>.
109. ABDUL AZIZ, A. H., RIZKIYAH, D. N., QOMARIYAH, L., IRIANTO, I., CHE YUNUS, M. A., et al. Unlocking the Full Potential of Clove (*Syzygium aromaticum*) Spice: An Overview of Extraction Techniques, Bioactivity, and Future Opportunities in the Food and Beverage Industry. *Processes* [interaktyvus]. **2023**; 11(8), 2453 [žiūrėta 2024-03-11]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/pr11082453>.
110. HARO-GONZÁLEZ, J. N., CASTILLO-HERRERA, G. A., MARTÍNEZ-VELÁZQUEZ, M., ESPINOSA-ANDREWS, H. Clove Essential Oil (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): Extraction, Chemical Composition, Food Applications, and Essential Bioactivity for Human Health. *Molecules* [interaktyvus]. **2021**; 26(21):6387 [žiūrėta 2024-03-17]. PMID: 34770801; PMCID: PMC8588428. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/molecules26216387>.
111. KAUSHAL, S., RASHMI. Chapter 27 – Composition and functionality of clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil. *Clove (Syzygium aromaticum). Chemistry, Functionality and Applications* [interaktyvus]. **2022**; p. 461-483 [žiūrėta 2024-03-17]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85177-0.00037-9>.
112. DAS, N., DEY, A., MANDAL, S. K., CHATTERJEE, D., LOGESH, R., et al. Chapter 10 - Secondary metabolites of clove (*Syzygium aromaticum*). *Clove (Syzygium aromaticum). Chemistry, Functionality and Applications* [interaktyvus]. **2022**; p. 175-193 [žiūrėta 2024-03-23]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85177-0.00020-3>.
113. EL-SABER BATIHA, G., ALKAZMI, L. M., WASEF, L. G., BESHBIHY, A. M., NADWA, E. H., et al. *Syzygium aromaticum* L. (Myrtaceae): Traditional Uses, Bioactive Chemical Constituents, Pharmacological and Toxicological Activities. *Biomolecules* [interaktyvus]. **2020**; 10(2), 202 [žiūrėta 2024-03-23]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/biom10020202>.
114. EL-MAATI, M. F. A., MAHGOUB, S. A., LABIB, S. M., AL-GABY, A. M. A., RAMADAN, M. F. Phenolic extracts of clove (*Syzygium aromaticum*) with novel antioxidant and antibacterial activities. *European Journal of Integrative Medicine* [interaktyvus]. **2016**; 8(4), 494-504 [žiūrėta 2024-03-24]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2016.02.006>.
115. CHOUAIBI, M. Chapter 31 - Supercritical carbon dioxide extraction of clove essential oil: Optimization and characterization. *Clove (Syzygium aromaticum). Chemistry, Functionality and Applications* [interaktyvus]. **2022**; p. 531-540 [žiūrėta 2024-03-24]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85177-0.00040-9>.

116. MC GAW, D., SKEENE, R. Comparison of the Sub-Critical Fluid Extraction of the Essential Oil of Turmeric (*Curcuma longa* L.) with That of Hydrodistillation. *Eng* [interaktyvus]. **2021**; 2(5), 608-619 [žiūrėta 2024-03-23]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/eng2040038>.
117. GHAFUOR, K., SARKER, M. Z. I., AL-JUHAIMI, F. Y., BABIKER, E. E., ALKALTHAM, M. S., et al. Extraction and Evaluation of Bioactive Compounds from Date (*Phoenix dactylifera*) Seed Using Supercritical and Subcritical CO<sub>2</sub> Techniques. *Foods* [interaktyvus]. **2022**; 11(12), 1806 [žiūrėta 2024-03-23]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/foods11121806>.
118. PANDEY, V., K., SRIVASTAVA, S., ASHISH, DASH, K. K., SINGH, R., et al. Bioactive properties of clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil nanoemulsion: A comprehensive review. *Heliyon* [interaktyvus]. **2024**; 10(1): e22437 [žiūrėta 2024-03-24]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016%2Fj.heliyon.2023.e22437>.
119. KIKI, M. J. In Vitro Antiviral Potential, Antioxidant, and Chemical Composition of Clove (*Syzygium aromaticum*) Essential Oil. *Molecules* [interaktyvus]. **2023**; 28(6):2421 [žiūrėta 2024-03-24]. PMID: 36985392; PMCID: PMC10058340. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390%2Fmolecules28062421>.
120. ACIDI, A., SEDIK, A., RIZI, A., BOUASLA, R., RACHEDI, K. O., et al. Examination of the main chemical components of essential oil of *Syzygium aromaticum* as a corrosion inhibitor on the mild steel in 0.5 M HCl medium. *Journal of Molecular Liquids* [interaktyvus]. **2023**; 391(B), 123426 [žiūrėta 2024-03-24]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.123423>.
121. BEHBAHANI, B. A., NOSHAD, M., FALAH, F. Study of chemical structure, antimicrobial, cytotoxic and mechanism of action of *Syzygium aromaticum* essential oil on foodborne pathogens. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences* [interaktyvus]. **2019**; 13(1), 875–883 [žiūrėta 2024-03-24]. Prieiga per: <https://doi.org/10.5219/1226>.
122. BOUGHENDJIOUA, H. Essential Oil Composition of *Syzygium aromaticum* (L.). *International Research Journal of Pharmacy and Medical Sciences (IRJPMS)* [interaktyvus]. **2018**; 1(3), 26-28 [žiūrėta 2024-03-24]. ISSN (Online): 2581-3277. Prieiga per: [IRJPMS Editor](https://doi.org/10.3390/IRJPMS).
123. SELLES, S. M. A., KOUIDRI, M., BELHAMITI, B. T., AMRANE, A. A. Chemical composition, in-vitro antibacterial and antioxidant activities of *Syzygium aromaticum* essential oil. *Food Measure* [interaktyvus]. **2020**; 14, 2352–2358 [žiūrėta 2024-03-24]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00482-5>.
124. BARAKAT, H. Composition, antioxidant, antibacterial activities and mode of action of clove (*Syzygium aromaticum* L.) buds essential oil. *British Journal of Applied Science & Technology* [interaktyvus]. **2014**; 4(13), 1934–1951 [žiūrėta 2024-03-24]. Prieiga per: <https://doi.org/10.9734/BJAST/2014/8902>.
125. RADÜNZ, M., DA TRINDADE, M. L. M., CAMARGO, T. M., RADÜNZ, A. L., BORGES, C. D., et al. Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil. *Food Chemistry* [interaktyvus]. **2019**; 276, 180-186 [žiūrėta 2024-03-24]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.173>.
126. HIWANDIKA, N., SUDRAJAT, S. E., RAHAYU, I. Antibacterial and Antifungal Activity of Clove Extract (*Syzygium Aromaticum*): Review. *Eureka Herba Indonesia* [interaktyvus]. **2021**; 2(2), 86-94 [žiūrėta 2024-03-24]. Prieiga per: <https://doi.org/10.37275/ehi.v2i2.18>.
127. EL KHETABI, A., EL GHADRAOUI, L., OUAABOU, R., ENNAHLI, S., BARKA, E. A., et al. Antifungal activities of aqueous extracts of moroccan medicinal plants against *Monilinia* spp.

- agent of brown rot disease. *Journal of Natural Pesticide Research* [interaktyvus]. **2023**; 5, 100038 [žiūrėta 2024-03-24]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.napere.2023.100038>.
128. SHARMA, A., RAJENDRAN, S., SRIVASTAVA, A., SHARMA, S., KUNDU, B. Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [interaktyvus]. **2017**; 123(3), 308-313 [žiūrėta 2024-03-24]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.09.011>.
129. AGUILAR-GONZÁLEZ, A. E., PALOU, E., LÓPEZ-MALO, A. Antifungal activity of essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*) and/or mustard (*Brassica nigra*) in vapor phase against gray mold (*Botrytis cinerea*) in strawberries. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* [interaktyvus]. **2015**; 32, 181-184 [žiūrėta 2024-03-24]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.09.003>.
130. ŠERNAITĖ, L., RASIUKIČIŪTĖ, N., DAMBRAUSKIENĖ, E., VIŠKELIS, P., VALIUŠKAITĖ, A. Biocontrol of strawberry pathogen *Botrytis cinerea* using plant extracts and essential oils. *Zemdirbyste-Agriculture* [interaktyvus]. **2020**; 107(2): 147-152 [žiūrėta 2024-03-24]. ISSN 1392-3196 / e-ISSN 2335-8947. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.13080/z-a.2020.107.019>.
131. TEMESGEN, S., SASIKUMAR, J. M., EGIGU, M. C. Effect of Extraction Solvents on Total Polyphenolic Content and Antioxidant Capacity of *Syzygium Aromaticum* L. Flower Bud from Ethiopia. *BioMed Research International* [interaktyvus]. **2022**; 2022, 9, 4568944 [žiūrėta 2024-03-24]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1155/2022/4568944>.
132. AL-MASHKOR, I. M. A. Evaluation of antioxidant activity of clove (*Syzygium aromaticum*). *International Journal of Chemical Sciences* [interaktyvus]. **2015**; 13(1), 23-30 [žiūrėta 2024-03-24]. Prieiga per: <https://med.utq.edu.iq/wp-content/uploads/sites/7/2021/07/evaluation-of-antioxidant-activity-of-clove.pdf>.
133. AFRENDI, E., PRASTYA, M. E., ASTUTI, R. I., WAHYUNI, W. T., BATUBARA, I. Bioactivity of the Ethanol Extract of Clove (*Syzygium aromaticum*) as Antitoxin. *International Journal of Food Science* [interaktyvus]. **2023**; 2023:3245210 [žiūrėta 2024-03-24]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1155%2F2023%2F3245210>.
134. WANKHEDE, T. B., SHIVAJI, S. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of the Indian clove *Syzygium aromaticum* L. Merr. & Perr. *The International Research Journal of Science and Engineering* [interaktyvus]. **2015**; 3(4):166-172 [žiūrėta 2024-03-24]. Prieiga per: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:54866078>.
135. DE OLIVEIRA, M. S., DA COSTA, W. A., PEREIRA, D. S., BOTELHO, J. R. S., DE ALENCAR MENEZES, T. O., et al. Chemical composition and phytotoxic activity of clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil obtained with supercritical CO<sub>2</sub>. *The Journal of Supercritical Fluids* [interaktyvus]. **2016**; 118, 185-193 [žiūrėta 2024-03-24]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.08.010>.
136. MUNTEANU, I. G., APETREI, C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* [interaktyvus]. **2021**; 22(7), 3380 [žiūrėta 2024-04-13]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>.
137. RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free*

- Radical Biology and Medicine* [interaktyvus]. **1999**; 26(9–10), 1231–1237 [žiūrėta 2024-04-13]. Prieiga per: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
138. SHARMA, O. P., BHAT, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry* [interaktyvus]. **2009**; 113(4), 1202-1205 [žiūrėta 2024-04-13]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.008>.
139. BENZIE, I. F. F., STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry* [interaktyvus]. **1996**; 239(1), 70-76 [žiūrėta 2024-04-13]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>.
140. AINSWORTH, E. A., GILLESPIE, K. M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols* [interaktyvus]. **2007**; 2(4), 875-877 [žiūrėta 2024-04-13]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>.
141. NABI, B. G., MUKHTAR, K., AHMED, W., MANZOOR, M. F., RANJHA, M. M. A. N., et al. Natural pigments: Anthocyanins, carotenoids, chlorophylls, and betalains as colorants in food products. *Food Bioscience* [interaktyvus]. **2023**; 52, 102403 [žiūrėta 2024-04-14]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102403>.
142. HU, X., TANAKA, A., TANAKA, R. Simple extraction methods that prevent the artifactual conversion of chlorophyll to chlorophyllide during pigment isolation from leaf samples. *Plant Methods* [interaktyvus]. **2013**; 9(1), p. 19 [žiūrėta 2024-04-14]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1186/1746-4811-9-19>.
143. WELLBURN, A. R., LICHTENTHALER, H. Formulae and Program to Determine Total Carotenoids and Chlorophylls A and B of Leaf Extracts in Different Solvents. In: Sybesma, C. (eds) *Advances in Photosynthesis Research. Advances in Agricultural Biotechnology*. **1984**; vol. 1, p. 9-12 [žiūrėta 2024-04-14]. Springer, Dordrecht, 978-94-017-6368-4. Prieiga per: [https://doi.org/10.1007/978-94-017-6368-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-017-6368-4_3).
144. SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, E., MARTÍN-RAMOS, P., MARTÍN-GIL, J., SANTIAGO-ALISTE, A., HERNÁNDEZ-NAVARRO, S. Bark Extract of *Uncaria tomentosa* L. for the Control of Strawberry Phytopathogens. *Horticulturae* [interaktyvus]. **2022**; 8(8), 672 [žiūrėta 2024-05-01]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/horticulturae8080672>.
145. DE OLIVEIRA FILHO, J. G., DA CRUZ SILVA, G., DE AGUIAR, A. C., CIPRIANO, L., DE AZEREDO, H. M. C. Chemical composition and antifungal activity of essential oils and their combinations against *Botrytis cinerea* in strawberries. *Journal of Food Measurement and Characterization* [interaktyvus]. **2021**; 15(2):1-11 [žiūrėta 2024-05-01]. Prieiga per: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11694-020-00765-x>.
146. ALMARIE, A. A. Bioherbicidal Potential of Eucalyptus and Clove Oil and their Combinations on Four Weedy Species. *Iraqi Journal of Science* [interaktyvus]. **2021**; 62(5):1494-1502 [žiūrėta 2024-05-01]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.24996/ijcs.2021.62.5.13>.
147. ŠERNAITĖ, L., RASIUKIČIŪTĖ, N., VALIUŠKAITĖ, A. Application of Plant Extracts to Control Postharvest Gray Mold and Susceptibility of Apple Fruits to *B. cinerea* from Different Plant Hosts. *Foods* [interaktyvus]. **2020**; 9(10), 1430 [žiūrėta 2024-05-01]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/foods9101430>.
148. CASTELLANOS, L. M., OLIVAS, N. A., AYALA-SOTO, J., DE LA O CONTRERAS, C. M., ORTEGA, M. Z. In Vitro and In Vivo Antifungal Activity of Clove (*Eugenia caryophyllata*) and Pepper (*Piper nigrum* L.) Essential Oils and Functional Extracts Against *Fusarium*

- oxysporum* and *Aspergillus niger* in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *International Journal of Microbiology* [interaktyvus]. **2020**; 2020, 1702037, 8 p. [žiūrėta 2024-05-01]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1155/2020/1702037>.
149. ŠERNAITĖ, L., RASIUKAVIČIŪTĖ, N., VALIUŠKAITĖ, A. The Extracts of Cinnamon and Clove as Potential Biofungicides against Strawberry Grey Mould. *Plants* [interaktyvus]. **2020**; 9(5), 613 [žiūrėta 2024-05-01]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/plants9050613>.
150. AHMED, H. F. A., SELEIMAN, M. F., MOHAMED, I. A. A., TAHA, R. S., WASONGA, D.O. Activity of Essential Oils and Plant Extracts as Biofungicides for Suppression of Soil-Borne Fungi Associated with Root Rot and Wilt of Marigold (*Calendula officinalis* L.). *Horticulturae* [interaktyvus]. **2023**; 9(2), 222 [žiūrėta 2024-05-01]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/horticulturae9020222>.
151. RANI, A., TRIPATHI, P. In vitro and in vivo antifungal activity of some plant extracts against Gray mould rot of Chilli. *Gorteria Journal* [interaktyvus]. **2024**; ISSN: 0017-2294 [žiūrėta 2024-05-01]. Prieiga per: <https://www.researchgate.net/publication/377307012> In vitro and in vivo antifungal activity of some plant extracts against Gray mould rot of Chilli.
152. WEI, Y., SHAO, X., WEI, Y., XU, F., WANG, H. Effect of preharvest application of tea tree oil on strawberry fruit quality parameters and possible disease resistance mechanisms. *Scientia Horticulturae* [interaktyvus]. **2018**; 241, p. 18-28 [žiūrėta 2024-05-06]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.06.077>.
153. MOSHARI-NASIRKANDI, A., ALIREZALU, A., HACHESU, M. A. Effect of lemon verbena bio-extract on phytochemical and antioxidant capacity of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch. cv. Sabrina) fruit during cold storage. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* [interaktyvus]. **2020**; 25, 101613 [žiūrėta 2024-05-06]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101613>
154. WANG, C. Y., WANG, S. Y., YIN, J-J., PARRY, J., YU, L. L. Enhancing Antioxidant, Antiproliferation, and Free Radical Scavenging Activities in Strawberries with Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [interaktyvus]. **2007**; 55(16):6527-32 [žiūrėta 2024-05-06]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1021/jf070429a>.
155. SALAS-ARIAS, K., IRÍAS-MATA, A., SÁNCHEZ-KOPPER, A., HERNÁNDEZ-MONCADA, R.; SALAS-MORGAN, B., et al. Strawberry *Fragaria* × *ananassa* cv. Festival: A Polyphenol-Based Phytochemical Characterization in Fruit and Leaf Extracts. *Molecules* [interaktyvus]. **2023**; 28(4), 1865 [žiūrėta 2024-05-06]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/molecules28041865>.
156. MICHALSKA, A., CARLEN, C., HERITIER, J., ANDLAUER, W. Profiles of Bioactive Compounds in Fruits and Leaves of Strawberry Cultivars. *Journal of Berry Research* [interaktyvus]. **2017**; 7(2): 71 – 84 [žiūrėta 2024-05-07]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.3233/JBR-160146>.
157. ZAHEDI, S. M., HOSSEINI, M. S., FAHADI HOVEIZEH, N., KADKHODAEI, S., VACULÍK, M. Physiological and Biochemical Responses of Commercial Strawberry Cultivars under Optimal and Drought Stress Conditions. *Plants* [interaktyvus]. **2023**; 12(3), 496 [žiūrėta 2024-05-07]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/plants12030496>.
158. AGATHOKLEOUS, E., FENG, Z., PEÑUELAS, J. Chlorophyll hormesis: Are chlorophylls major components of stress biology in higher plants? *Science of The Total Environment*



- [interaktyvus]. **2020**; 726:138637 [žiūrėta 2024-05-07]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138637>.
159. ZAHEDI, S. M., HOSSEINI, M. S., FAHADI HOVEIZEH, N., KADKHODAEI, S., VACULÍK, M. Comparative morphological, physiological and molecular analyses of drought-stressed strawberry plants affected by SiO<sub>2</sub> and SiO<sub>2</sub>-NPs foliar spray. *Scientia Horticulturae* [interaktyvus]. **2023**; 309, 111686 [žiūrėta 2024-05-07]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111686>.
160. DA COSTA, R. C., CALVETE, E., SCHONS, J., REGINATTO, F. Chlorophyll Content in Strawberry Leaves Produced under Shading Screens in Greenhouse. *Acta Horticulturae* [interaktyvus]. **2012**; 926(926) [žiūrėta 2024-05-07]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.926.44>.
161. CARDOSO, P. C., TOMAZINI, A. P. B., STRINGHETA, P. C., RIBEIRO, S. M. R., PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Vitamin C and carotenoids in organic and conventional fruits grown in Brazil. *Food Chemistry* [interaktyvus]. **2011**; 126(2), 411-416 [žiūrėta 2024-05-07]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.109>.
162. PANGESTUTI, R., SIAHAAN, E. A., KIM, S.-K. Photoprotective Substances Derived from Marine Algae. *Mar. Drugs* [interaktyvus]. **2018**; 16(11), 399 [žiūrėta 2024-05-14]. Prieiga per: <https://doi.org/10.3390/md16110399>.
163. PRATAMA, I. S., PUTRA, Y., PANGESTUTI, R., KIM, S.-K., SIAHAAN, E. A. Bioactive peptides-derived from marine by-products: development, health benefits and potential application in biomedicine. *Fisheries and Aquatic Sciences* [interaktyvus]. **2022**; 25(7):357-379 [žiūrėta 2024-05-14]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.47853/FAS.2022.e33>.