



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Σχολή Γεωπονικών Επιστημών

Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΦΥΤΙΑΤΡΙΚΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**"Αντιμετώπιση των κομβοηματοδών με μίγματα  
φυτικών εκχυλισμάτων"**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ : ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ  
ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**

**Σεραφείμ Αργύριος**

**Βόλος, 2023**



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Σχολή Γεωπονικών Επιστημών

Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΦΥΤΙΑΤΡΙΚΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**"Αντιμετώπιση των κομβοηματοδών με μίγματα  
φυτικών εκχυλισμάτων"**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ : ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ  
ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**

**Σεραφείμ Αργύριος**

**Βόλος, 2023**

**Αντιμετώπιση των κομβοηματοδών με μίγματα  
φυτικών εκχυλισμάτων**

**Nematicidal activity of plant extract**

**Σεραφείμ Αργύριος**

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή**

**Νικόλαος Γ. Τσιρόπουλος (Επιβλέπων)**

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

**Ντάλλη Νικολέττα (Μέλος)**

Επίκουρη καθηγήτρια, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού  
Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Αθανασίου Γ. Χρήστος (Μέλος)**

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

Copyright © Σεραφείμ Αργύριος, 2022

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

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

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

«Εγώ ο Σεραφείμ Αργύριος, είμαι ο συγγραφέας αυτής της Μ.Δ.Ε. Αυτή η Μ.Δ.Ε. αντικατοπτρίζει την έρευνα που έγινε από εμένα και δεν έχει υποβληθεί (εξ' ολοκλήρου ή μέρος της) σαν προπτυχιακή διατριβή ή Μ.Δ.Ε. ή ως μέρος Διδακτορικής Διατριβής σε αυτό ή άλλο Προπτυχιακό ή Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών Ιδρυμάτων Τριτοβάθμιας Εκπαίδευσης του εσωτερικού ή εξωτερικού. Όποια συνεργασία καθώς και το μέγεθος αυτής δηλώνονται επακριβώς στο αντίστοιχο πεδίο αυτής της διατριβής. Επίσης έχω διαβάσει όλες τις βιβλιογραφικές αναφορές που παρατίθενται στο τέλος».

«Ως επιβλέπων της έρευνας που περιγράφεται σε αυτή τη διατριβή, δηλώνω ότι όλοι οι όροι του Εσωτερικού Κανονισμού του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος έχουν τηρηθεί από τον κ. Σεραφείμ Αργύριο».

## Ευχαριστίες

Πρώτα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Τσιρόπουλο Νικόλαο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε προκειμένου να αναλάβω την συγκεκριμένη Μεταπτυχιακή Διατριβή και για όλη τη βοήθεια του κατά τη συγγραφή της.

Επιπλέον, δεν μπορώ παρά να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην κ. Ντάλλη Νικολέτα για την αστείρευτη υποστήριξη, καθοδήγηση και βοήθεια που έλαβα από μεριάς της, καθ' όλη την περίοδο διεξαγωγής του πειράματος, αλλά και κατά τη διαδικασία συγγραφής της εργασίας.

Φυσικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής για την διόρθωση της εργασίας και τα εποικοδομητικά τους σχόλια.

Επίσης, οφείλω να ευχαριστήσω την ομάδα του εργαστηρίου Υδατοκαλλιεργειών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την παροχή των εγκαταστάσεων και του απαραίτητου εξοπλισμού τους, όσες φορές κρίθηκε αναγκαίο.

Δεν θα παρέλειπα να εκφράσω την απεριόριστη ευγνωμοσύνη μου και στην συνάδελφο και συμφοιτήτρια μου Κυργιαφίνη Δήμητρα για την αγαστή συνεργασία που είχαμε όλο αυτό το διάστημα εκπόνησης της Διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την αδιάλειπτη και απεριόριστη συμπαράσταση τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

## Περιεχόμενα

|                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Περίληψη .....                                                                                                                   | x  |
| Abstract .....                                                                                                                   | xi |
| Εισαγωγή .....                                                                                                                   | 1  |
| 1 Νηματώδεις.....                                                                                                                | 1  |
| 1.1 Κομβονηματώδεις .....                                                                                                        | 2  |
| 1.2 Ταξινόμηση .....                                                                                                             | 3  |
| 1.3 Γεωγραφική εξάπλωση .....                                                                                                    | 3  |
| 1.4 Οικονομική σημασία προσβολής .....                                                                                           | 5  |
| 2 Βιολογικός κύκλος.....                                                                                                         | 5  |
| 3 Συμπτώματα προσβολής.....                                                                                                      | 8  |
| 4 Μέθοδοι καταπολέμησης νηματωδών .....                                                                                          | 10 |
| 4.1 Καλλιεργητικά μέτρα .....                                                                                                    | 11 |
| 4.1.1 Ανθεκτικές ποικιλίες.....                                                                                                  | 11 |
| 4.1.2 Αμειψισπορά.....                                                                                                           | 11 |
| 4.1.3 Αγρανάπαυση.....                                                                                                           | 12 |
| 4.1.4 Φυτά παγίδες.....                                                                                                          | 12 |
| 4.1.5 Ηλιοαπολύμανση .....                                                                                                       | 13 |
| 4.2 Χημική καταπολέμηση.....                                                                                                     | 13 |
| 4.3 Δευτερογενείς μεταβολίτες ως αμυντικοί μηχανισμοί φυτών.....                                                                 | 15 |
| 4.4 Νηματωδοκτόνος δράση φυτικών εκχυλισμάτων και αιθέριων ελαίων .....                                                          | 16 |
| 4.4.1 <i>Melia azedarach</i> .....                                                                                               | 18 |
| 4.4.2 <i>Lavandula angustifolia</i> .....                                                                                        | 20 |
| 5 Σκοπός της εργασίας.....                                                                                                       | 23 |
| 6 Υλικά & Μέθοδοι .....                                                                                                          | 24 |
| 6.1 Ανάπτυξη φυτών τομάτας στο θάλαμο ανάπτυξης .....                                                                            | 24 |
| 6.2 Παραλαβή προνυμφών κομβονηματωδών δευτέρου σταδίου (J2) από μολυσμένες ρίζες .....                                           | 24 |
| 6.3 Μόλυνση φυτών για διατήρηση πληθυσμού.....                                                                                   | 26 |
| 6.4 Παρασκευή υδατικού εκχυλίσματος <i>Melia azedarach</i> .....                                                                 | 26 |
| 6.5 Παρασκευή υδατικού εκχυλίσματος <i>Lavandula angustifolia</i> .....                                                          | 27 |
| 6.6 Παραλαβή αιθέριων ελαίων λεβάντας Α και Β (ΑΕΛΑ / ΑΕΛΒ) με τη μέθοδο της απόσταξης.....                                      | 27 |
| 6.7 Μέθοδος προσδιορισμού της ολικής σύστασης του αιθέριου ελαίου σε σύστημα αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας της μάζας..... | 27 |

|      |                                                                                                                                                                           |    |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 6.8  | Δοκιμές πρόκλησης παράλυσης των αιθέριων ελαίων και των υδατικών εκχυλισμάτων σε προνύμφες J2 <i>M. incognita</i> .....                                                   | 28 |
| 6.9  | Δοκιμές πρόκλησης παράλυσης των μιγμάτων των υδατικών εκχυλισμάτων και των αιθέριων ελαίων στην παράλυση των προνυμφών J2 <i>M. incognita</i> .....                       | 30 |
| 6.10 | Στατιστική ανάλυση .....                                                                                                                                                  | 31 |
| 7    | Αποτελέσματα.....                                                                                                                                                         | 33 |
| 7.1  | Χημική σύσταση αιθέριων ελαίων λεβάντας (ΑΕΛΑ / ΑΕΛΒ) .....                                                                                                               | 33 |
| 7.2  | Δοκιμές πρόκλησης παράλυσης του αιθέριου ελαίου λεβάντας Α' (ΑΕΛΑ) σε προνύμφες J2 <i>M. incognita</i> .....                                                              | 38 |
| 7.3  | Δοκιμές πρόκλησης παράλυσης του αιθέριου ελαίου λεβάντας Β' (ΑΕΛΒ) σε προνύμφες J2 <i>M. incognita</i> .....                                                              | 38 |
| 7.4  | Επίδραση πρόκλησης παράλυσης του υδατικού εκχυλίσματος του φυτού <i>Melia azedarach</i> (ΥΕΜ) στην παράλυση των προνυμφών J2 <i>M. incognita</i> .....                    | 39 |
| 7.5  | Επίδραση πρόκλησης παράλυσης του υδατικού εκχυλίσματος του φυτού <i>Lavandula angustifolia</i> (ΥΕΛ) στην παράλυση των προνυμφών J2 <i>M. incognita</i> ..                | 40 |
| 7.6  | Επίδραση πρόκλησης παράλυσης του συνδυασμού του υδατικού εκχυλίσματος του φυτού <i>Lavandula angustifolia</i> με το αιθέριο έλαιο ΑΕΛΑ.....                               | 40 |
| 7.7  | Επίδραση πρόκλησης παράλυσης του συνδυασμού του υδατικού εκχυλίσματος του φυτού <i>Melia azedarach</i> με υδατικό εκχύλισμα του φυτού <i>Lavandula angustifolia</i> ..... | 42 |
| 7.8  | Επίδραση πρόκλησης παράλυσης του συνδυασμού του υδατικού εκχυλίσματος του φυτού <i>Melia azedarach</i> με το αιθέριο έλαιο ΑΕΛΒ.....                                      | 43 |
| 7.9  | Επίδραση πρόκλησης παράλυσης του συνδυασμού του υδατικού εκχυλίσματος του φυτού <i>Melia azedarach</i> με το αιθέριο έλαιο ΑΕΛΑ.....                                      | 45 |
| 8    | Συζήτηση - Συμπεράσματα.....                                                                                                                                              | 46 |
| 9    | Βιβλιογραφία .....                                                                                                                                                        | 52 |

## Περίληψη

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η νηματωδοκτόνος δράση δύο υδατικών εκχυλισμάτων, δύο αιθέριων ελαίων και των δυαδικών μιγμάτων τους εναντίον των κομβονηματωδών *Meloidogyne incognita*. Τα πειράματα είχαν στόχο την πρόκληση παράλυσης των προνυμφών δευτέρου σταδίου ανάπτυξης (J2) *M. incognita*, το οποίο αποτελεί το μολυσματικό στάδιο του βιολογικού του κύκλου. Στις βιολογικές δοκιμές πρόκλησης παράλυσης των προνυμφών δοκιμάστηκαν τα υδατικά εκχυλίσματα των φυτών *Lavandula angustifolia* (YEL) και *Melia azedarach* (YEM) και δύο αιθέρια έλαια λεβάντας Α (ΑΕΛΑ) + Β (ΑΕΛΒ) διαφορετικής σύστασης. Για την παρασκευή των αιθέριων ελαίων πραγματοποιήθηκε απόσταξη και έπειτα ανάλυση της σύστασης με χρωματογραφικές τεχνικές. Αρχικά, μελετήθηκε η μεμονωμένη επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων και των αιθέριων ελαίων στις προνύμφες J2, ώστε να βρεθεί η τιμή  $EC_{50}$  και η κατάλληλη δόση που θα χρησιμοποιηθεί μετέπειτα στα δυαδικά μίγματα. Τα μίγματα που εφαρμόστηκαν ήταν τα YEL + YEM, YEL + ΑΕΛΑ, YEM + ΑΕΛΒ και YEM + ΑΕΛΑ. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε πλάκες πολυστυρενίου στις 24, 48 και 72 ώρες από την έναρξη του πειράματος, ενώ μελετήθηκε και η καπνιστική τους δράση σε παρακείμενα πηγάδια από τα πηγάδια ελέγχου. Κατά γενική εικόνα, η πλειοψηφία των δυαδικών μιγμάτων εμφάνισε συνεργιστική δράση και στις τρεις ημερομηνίες μετρήσεων, ενώ στον έλεγχο της καπνιστικής δράσης υπήρξε αθροιστική δράση των μιγμάτων σε πολλές περιπτώσεις.

## Abstract

In the present study, the nematocidal activity of two aqueous extracts, two essential oils, and their binary mixtures were investigated against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. The experiments aimed to induce paralysis in the second-stage juveniles (J2) of *M. incognita*, which is the infective stage of its biological cycle. The biological paralysis assays tested the aqueous extracts of *Lavandula angustifolia* (LWE) and *Melia azedarach* (MWE), as well as two lavender essential oils A (LEOA) and B (LEOB) with different compositions. The essential oils were prepared by distillation, followed by analysis of their composition using chromatographic techniques. Initially, the individual effects of the aqueous extracts and essential oils on the J2 juveniles were studied to determine the EC<sub>50</sub> value and the appropriate dosage for further testing in the binary mixtures for synergism effect. The applied mixtures were LWE + MWE, LWE + LEOA, MWE + LEOB and MWE + LEOA. Measurements of all binary mixtures were taken on 96 well polystyrene plates at 24, 48 and 72 hours after the start of the experiment, while their fumigant activity was also studied in adhering to the treatment wells, where J2 were immersed in water. Overall, most of the binary mixtures exhibited synergistic effects at all three measurement dates, while in the case of fumigant activity an additive effect was evident in many cases.

# Εισαγωγή

## 1 Νηματώδεις

Το φύλο nematoda απαριθμεί περισσότερα από 30.000 καταγεγραμμένα είδη παγκοσμίως. Κατατάσσονται στα εκδυσόζωα, δηλαδή τους οργανισμούς με την ικανότητα να αποβάλλουν την επιδερμίδα τους μέσω της έκδυσης. Η ικανότητά τους να αποικίζουν διάφορα περιβάλλοντα, όπως θαλάσσια, εδαφικά και υδάτινα τους δίνει το πλεονέκτημα της εξέλιξης και της μακροζωίας (Bernard et al., 2017). Η δομή του σώματός τους χαρακτηρίζεται ως σκωληκόμορφη, επιμήκη, κυλινδρική, χωρίς την παρουσία μελών. Στην πλειοψηφία τους οι νηματώδεις είναι αρκετά μικροσκοπικοί σε μέγεθος, γεγονός που έχει παίξει καθοριστικό ρόλο στην μέχρι τώρα εξέλιξή τους. Παρά την εξαιρετικά απλή μορφολογία τους, καθώς και το γεγονός ότι χρειάζονται τουλάχιστον ένα φιλμ υγρού για να διατηρηθούν στη ζωή έχουν επιτύχει να αποικίσουν ένα τεράστιο φάσμα οικοσυστημάτων και οργανισμών (Perry & Moens, 2011). Οι νηματώδεις χαρακτηρίζονται από την ικανότητα προσβολής και παρασιτισμού ποικίλων οργανισμών, τόσο ζωικών όσο και φυτικών. Αν και οι περισσότεροι νηματώδεις είναι αρκετά μικροί τα είδη των νηματωδών που προσβάλλουν τα ζώα είναι συχνά πολύ μεγαλύτερα σε μέγεθος. Οι περισσότεροι νηματώδεις κυμαίνονται σε εύρος μεγέθους μεταξύ 0,2 mm και 6 m (Blaxter & Koutsonoulos, 2015). Παρόλα αυτά, το μεγαλύτερο είδος που έχει ανακαλυφθεί, το *Placentonema gigantisma*, το οποίο παρασιτεί φάλαινες, έχει μήκος ενήλικου που μπορεί να φτάσει μέχρι και τα 8 μέτρα. Εκτός από τα ζώα και τα φυτά, ορισμένα είδη νηματωδών έχουν αναπτύξει την ικανότητα να παρασιτούν τον ανθρώπινο οργανισμό. Μάλιστα, εκτιμάται πως περίπου το ένα τέταρτο του παγκόσμιου ανθρώπινου πληθυσμού έχει υποστεί κάποια στιγμή παρασιτισμό από νηματώδεις (Blaxter & Koutsonoulos, 2015). Μία από τις σημαντικότερες ασθένειες που προκαλείται στον άνθρωπο είναι η ελεφαντίαση που προκαλείται από το είδος *Wuchereria bancrofti* (Perry & Moens, 2011), ωστόσο συχνές είναι και οι περιπτώσεις όπου καταγράφονται περιστατικά τύφλωσης, εντερικών νόσων, αναπνευστικών νόσων, παραμόρφωσης άκρων έως και θάνατος (Jasmer et al., 2003). Όσον αφορά τους φυτοπαρασιτικούς νηματώδεις αποτελούν το 15% του συνολικού αριθμού νηματωδών που είναι ευρέως γνωστοί και ο παρασιτισμός τους στους φυτικούς οργανισμούς αποτελεί έναν από τους κυριότερους βιολογικούς παράγοντες καταπόνησης της φυτικής παραγωγής (Fuller et al., 2008).

Αναφορικά με τη στρατηγική παρασιτισμού μπορούν να διαχωριστούν σε εκτοπαράσιτα και ενδοπαράσιτα. Τα εκτοπαράσιτα δεν εισέρχονται στις ρίζες αλλά τρέφονται με εισχώρησή του στίλετου στα επιδερμικά κύτταρα. Αρκετά εκτοπαράσιτα μεταφέρουν και ιώσεις, που αποτελούν δευτερογενείς προσβολές στον ξενιστή (Jasmer et al., 2003). Αντιθέτως, τα ενδοπαράσιτα εισέρχονται στο φυτό και προκαλούν συνήθως διογκώσεις στα διάφορα όργανα που προσβάλλουν. Συνήθως ο παρασιτισμός δεν προκαλεί απευθείας θάνατο στο φυτό, αλλά δευτερεύοντα συμπτώματα όπως καθυστερημένη ανάπτυξη, χλώρωση, μειωμένες αποδόσεις που προκύπτουν από την παρεμπόδιση μεταφοράς νερού (Bird & Kaloshian, 2003).

### 1.1 Κομβονηματώδεις

Με τον όρο κομβονηματώδεις (root-knot nematodes) αναφέρονται οι νηματώδεις που κατά την προσβολή τους στα φυτά δημιουργούν κυτταρικές τροποποιήσεις στους ιστούς της ρίζας που οδηγούν σε σχηματισμούς κόμβων στον ξενιστή τους (Bird & Kaloshian, 2003).

Το γένος *Meloidogyne*, περιλαμβάνει περισσότερα από 98 καταγεγραμμένα είδη και έχει αναφερθεί ως το πιο σημαντικό γένος φυτοπαρασιτικών νηματωδών παγκοσμίως, καθώς διαθέτει την ικανότητα να προσβάλλει τους φυτικούς οργανισμούς είτε μόνο του είτε σε συνδυασμό με άλλα παθογόνα, τα οποία μεταφέρει ως ξενιστής (Yigezu Wendimu, 2021). Οι κομβονηματώδεις μπορούν να βρεθούν σε περιοχές που χαρακτηρίζονται από ζεστό και εύκρατο κλίμα με μικρή διάρκεια χειμώνα (Ralmi et al., 2016).

Οι κομβονηματώδεις του γένους *Meloidogyne* χαρακτηρίζονται ως βιοτροφικά ενδοπαράσιτα και είναι ικανά να προσβάλλουν πρακτικά κάθε είδος ανώτερου φυτού. Επιπλέον, είναι υποχρεωτικά παράσιτα, τα οποία προσβάλλουν τα υπόγεια όργανα των φυτών (Elling, 2013). Δεδομένου, λοιπόν, ότι είναι υποχρεωτικά παράσιτα των φυτών οι προνύμφες που προκαλούν τις προσβολές έχουν περιορισμένα αποθέματα ενέργειας για επιβίωση στις περιπτώσεις που δεν υπάρχει ξενιστής και επίσης η επιβίωσή τους καθορίζεται σε σημαντικό βαθμό από τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως τη θερμοκρασία και την υγρασία.

Παρόλο που έχουν καταγραφεί επίσημως περίπου 100 είδη νηματωδών του γένους *Meloidogyne* σε παγκόσμια κλίμακα, τα πιο συνηθισμένα που απασχολούν τον

αγροδιατροφικό τομέα είναι τα *M. incognita*, *M. javanica*, *M. hapla* και *M. arenaria* (Taylor & Sasser, 1978).

Όσον αφορά τις προσβολές που πραγματοποιούν στους φυτικούς οργανισμούς, οι κομβονηματώδεις αντιπροσωπεύουν ένα από τα πιο πολυφάγα και καταστρεπτικά γένη των φυτοπαρασιτικών νηματωδών και κατατάσσονται πολύ ψηλά στη λίστα με τα επιβλαβέστερα ζωικά παράσιτα που επηρεάζουν την φυτική παραγωγή παγκοσμίως (Sasser, 1977). Το εύρος των ξενιστών που προσβάλλουν μπορεί να ποικίλει σημαντικά. Η επιλογή αυτή καθορίζεται και από το είδος των νηματωδών που προκαλούν την προσβολή, αλλά και από το είδος του ξενιστή. Παρασιτισμός έχει βρεθεί σε δέντρα, λαχανικά, θάμνους, ζιζάνια κλπ. Αναφέρεται ότι περίπου 5% της παγκόσμιας αγροτικής παραγωγής καταστρέφεται από το γένος *Meloidogyne* κάθε χρόνο (Karajeh, 2008).

## 1.2 Ταξινόμηση

Το γένος *Meloidogyne* είναι ένα μικρό μέρος του φύλου Nematoda. Ανήκει στην κλάση Secernentea, στην τάξη Tylenchida και οικογένεια Heteroderidae (Taylor & Sasser, 1978).

Πίνακας 1.1 Κατάταξη του είδους *M. incognita*

|                   |                     |
|-------------------|---------------------|
| <b>Βασίλειο</b>   | Animalia            |
| <b>Φύλο</b>       | Nematoda            |
| <b>Κλάση</b>      | Secernentea         |
| <b>Τάξη</b>       | Tylenchida          |
| <b>Οικογένεια</b> | Heteroderidae       |
| <b>Γένος</b>      | <i>Meloidogyne</i>  |
| <b>Είδος</b>      | <i>M. incognita</i> |

## 1.3 Γεωγραφική εξάπλωση

Οι κομβονηματώδεις που ανήκουν στο γένος *Meloidogyne* είναι οι πλέον διαδεδομένοι παγκοσμίως σε σχέση με οποιοδήποτε άλλο γένος φυτοπαρασιτικών νηματωδών. Απαντώνται σε μεγάλο εύρος κλιματικών ζωνών στον παγκόσμιο χάρτη. Το είδος *M. incognita* ευνοείται στο εύκρατο και τροπικό κλίμα. Στις τροπικές ζώνες, και ιδιαίτερα πιο κοντά στον ισημερινό, τα πιο κοινά είδη κομβονηματωδών είναι τα *M. incognita* και *M. javanica* (Taylor & Sasser, 1978). Συγκεκριμένα, σε πολλές περιοχές της

τροπικής Αφρικής, Αυστραλίας και νότιας Ασίας, το είδος *M. javanica* είναι πιθανόν το πιο κοινό είδος, ενώ ακολουθούν τα είδη *M. incognita* και *M. arenaria* (Ralmi et al., 2016).

Εκτός από τα πιο κοινά είδη κομβονηματωδών που αναφέρθηκαν παραπάνω, σε κάθε περιοχή έχουν αναπτυχθεί και άλλα είδη δευτερογενούς σημασίας με πιο περιορισμένη εξάπλωση. Για παράδειγμα, στην κεντρική και νότια Αμερική έχουν εξαπλωθεί τα είδη *M. exigua*, *M. coffeicola*, *M. lordelloi*, *M. inornate* και *M. bauruensis*, στην Αφρική τα είδη *M. africana*, *M. acronea*, *M. kikuyensis*, *M. ethiopica*, *M. decalineata* κ.α., στην Ευρώπη τα είδη *M. deconincki*, *M. litoralis*, *M. naasi*, στην Ασία τα είδη *M. indica*, *M. lucknowica* και *M. brevicauda*, ενώ σε μεγάλα νησιωτικά κράτη, όπως το Ηνωμένο Βασίλειο και η Ιαπωνία τα είδη *M. artiellia*, *M. naasi*, *M. ardenensis* και *M. mali*, αντίστοιχα (Sasser, 1977).

Σε περιπτώσεις όπου κυριαρχούν ψυχρότερα κλίματα, το πιο συνηθισμένο είδος είναι το *Meloidogyne hapla*. Τέτοιες είναι οι περιοχές με θερμοκρασίες γύρω στους 0-15 °C. Επιπλέον, το συγκεκριμένο είδος συναντάται συχνά στην βόρεια Ευρώπη, στα βόρεια τμήματα των ΗΠΑ, στον Καναδά, στη βόρεια Ασία, στα νοτιότερα τμήματα της νότιας Αμερικής, στην Αφρική σε περιοχές με υψόμετρο μεγαλύτερο από 1500 μέτρα και στην Αυστραλία στα νοτιότερα τμήματα, κυρίως στην πολιτεία της Βικτόρια (Taylor & Sasser, 1978).

Στην ευρύτερη περιοχή της Μεσογειακής λεκάνης ισχύει ότι και στις υπόλοιπες περιοχές, δηλαδή συχνότερη εμφάνιση των κύριων ειδών *M. incognita*, *M. javanica*, *M. hapla* και *M. arenaria*. Τα κράτη που διαβρέχονται από τη Μεσόγειο θάλασσα καλλιεργούν σε μεγάλες εκτάσεις αρκετά οπωροκηπευτικά προϊόντα, τα οποία καλύπτουν μεγάλο ποσοστό των διατροφικών αναγκών όχι μόνο των ίδιων αλλά και των παγκόσμιων απαιτήσεων. Ταυτόχρονα, το ιδιαίτερα εύκρατο κλίμα σε συνδυασμό με την καταλληλότητα των καλλιεργειών για προσβολή από νηματώδεις καθιστούν την Μεσογειακή λεκάνη ιδιαίτερα επιθυμητή περιοχή για εξάπλωση των κομβονηματωδών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα κυριότερα είδη κομβονηματωδών που αναφέρθηκαν παραπάνω να αποτελούν το κύριο πρόβλημα εδαφογενών παθογόνων στα Μεσογειακά κράτη. Ωστόσο, δεν είναι λίγα και τα δευτερογενή είδη που συναντώνται συχνά στις χώρες της Μεσογείου, όπως για παράδειγμα τα είδη *M. artiellia*, *M. baetica*, *M. lusitanica* και *M. hispanica*, τα οποία προκαλούν και αυτά σημαντικές προσβολές (Ornat & Sorribas, 2008).

Στην Ελλάδα, τα είδη που συναντώνται περισσότερο τα τελευταία 30 χρόνια είναι το *M. arenaria* στην Κρήτη και στη Θράκη, το *M. incognita* στην Κρήτη και την Πελοπόννησο και το *M. javanica* στην Κρήτη, την Ήπειρο, τη Θεσσαλία, τη Θράκη και την Πελοπόννησο (Tzortzakakis et al., 2011).

#### **1.4 Οικονομική σημασία προσβολής**

Οι φυτοπαρασιτικοί νηματώδεις προκαλούν εξαιρετικά σημαντική ετήσια απώλεια παραγωγής στην παγκόσμια αλυσίδα παραγωγής τροφίμων, σε ποσοστό που φτάνει έως και το 12,3%. Αυτό εκτιμάται στα 157 δις δολάρια παγκοσμίως ανά καλλιεργητικό έτος. Στις ΗΠΑ η μείωση της απόδοσης που προκαλείται από νηματώδεις εκτιμάται στα 10 δις δολάρια ετησίως. Αντίθετα, έχουν καταγραφεί ζημιές 6,6 δις από έντομα (Gianessi & Carpenter, 1999) και 5,4 δις από ζιζάνια (Hassan et al., 2013), γεγονός που αναδεικνύει τη σημαντικότητα των προσβολών από τους νηματώδεις.

Σε τροπικές και υποτροπικές χώρες η μέση απώλεια στις αποδόσεις των καλλιεργειών από φυτοπαρασιτικούς νηματώδεις βρέθηκε 12,3% και 14,6% στις αναπτυσσόμενες χώρες (Gowda et al., 2007). Επιπλέον, δαπανάται ποσό των 500 εκατομμυρίων δολαρίων στα νηματωδοκτόνα σκευάσματα.

Οι προσβολές από νηματώδεις συχνά παραβλέπονται ή αναγνωρίζονται λανθασμένα, εξαιτίας του ότι μοιάζουν με άλλες ασθένειες ή με καταπονήσεις από αβιοτικούς παράγοντες όπως η έλλειψη νερού και θρεπτικών στοιχείων, γεγονός που οξύνει το πρόβλημα των προσβολών και μεγεθύνει το οικονομικό αντίκτυπο στις καλλιέργειες (Hassan et al., 2013).

## **2 Βιολογικός κύκλος**

Ο βιολογικός κύκλος των κομβονηματωδών ολοκληρώνεται, συνήθως, σε 20-40 ημέρες ανάλογα με τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος, το ποσοστό εδαφικής υγρασίας στο ριζικό σύστημα, καθώς και το είδος του ξενιστή (Ahmad et al., 2021). Οι περιβαλλοντικές συνθήκες επιδρούν σε πολύ σημαντικό βαθμό στην διάρκεια του βιολογικού κύκλου των κομβονηματωδών επηρεάζοντας τα διάφορα βιολογικά στάδια, όπως το ρυθμό ανάπτυξης τους ανά στάδιο, τη χρονική διάρκεια επώασης των αυγών και τη στιγμή εκκόλαψής τους, καθώς και την κίνηση των κινητών μορφών των νηματωδών, εντός του ξενιστή αλλά και στο έδαφος (Goodell & Ferris, 1989).

Η διαδικασία της εκκόλαψης των αυγών διαφέρει ανάλογα με το είδος των νηματωδών και μπορεί να διαρκέσει από μερικές μέρες μέχρι και μήνες (Taylor & Sasser, 1978). Η

εκκόλαψη των αυγών είναι ένας συνδυασμός φυσικοχημικών δραστηριοτήτων, η οποία μπορεί να χωριστεί σε τρεις κύριες φάσεις. Οι φάσεις αυτές είναι οι αλλαγές στη διαπερατότητα του κελύφους, το στάδιο ενεργοποίησης της προνύμφης και η διάτρηση του κελύφους. Η χρονολογική σειρά μεταξύ των δύο πρώτων φάσεων διαφέρει μεταξύ των γενών. Στην περίπτωση του γένους *Meloidogyne* πρώτα πραγματοποιείται ενεργοποίηση της προνύμφης και μετά οι αλλαγές στη διαπερατότητα του κελύφους. Η εκκόλαψη επηρεάζεται κυρίως από την υγρασία του εδάφους, καθώς βρέθηκε πως σε περιπτώσεις υψηλής εδαφικής υγρασίας υπήρξε παρεμπόδιση της εκκόλαψης, εξαιτίας της υψηλότερης πίεσης στην επιφάνεια του κελύφους (Goodell & Ferris, 1989). Επιπλέον, σε περιπτώσεις ακραίων τιμών θερμοκρασίας και υγρασίας πραγματοποιείται περιορισμός της εκκόλαψης, που λειτουργεί ως προσαρμοστικός μηχανισμός για τους νηματώδεις, καθώς δεν τους επιτρέπει να εκκολαφθούν υπό συνθήκες μη ευνοϊκές για τον ξενιστή (Goodell & Ferris, 1989). Οι προνύμφες που εκκολάπτονται είναι δευτέρου σταδίου J2 (Perry & Moens, 2011). Οι προνύμφες J2 μετά την εκκόλαψη είναι έτοιμες για πρόκληση νέας μόλυνσης.

Η εισχώρηση των νηματωδών στο φυτό γίνεται από το ριζικό σύστημα (Oerke, 2006) και πιο συγκεκριμένα από τη ζώνη επιμήκυνσης των αναπτυσσόμενων άκρων των ριζών, καθώς και από κατεστραμμένους ιστούς στη βάση των πλάγιων ριζών ή από διάφορες πληγές (von Mende, 1997). Κατά την εισχώρηση, το στίλετο εναποθέτει ορισμένα ένζυμα αποικοδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος και πιο συγκεκριμένα των στοιβάδων πηκτίνης (Haegeman et al., 2012). Τέτοια ένζυμα είναι οι κυτταρινάσες (ενδογλυκανάσες), οι ενδοξυλανάσες, οι πηκτατελυσάσες και οι πολύγαλακτουρονάσες. Τα συγκεκριμένα ένζυμα παράγονται από τους υποκοιλιακούς αδένες των νηματωδών (Perry & Moens, 2011).

Οι νηματώδεις του γένους *Meloidogyne*, προσελκύονται από ποικίλες φυσιολογικές αντιδράσεις του φυτού, οι οποίες ενεργοποιούν τους αντίστοιχους μηχανισμούς ανίχνευσης τους (Ahmad et al., 2021). Προκειμένου να αντιληφθούν τα διάφορα χημικά ερεθίσματα του περιβάλλοντος χρησιμοποιούν ορισμένους χημειοαισθητήρες τους, τα αμφίδια, για να προσανατολιστούν προς τις ρίζες του φυτού-ξενιστή (Perry & Moens, 2011). Τα ερεθίσματα που δέχονται οι νηματώδεις μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις κύριες κατηγορίες. Τα ελκυστικά μεγάλων αποστάσεων, που επιτρέπουν στους νηματώδεις να προσανατολιστούν προς την περιοχή της ρίζας, στα ελκυστικά μικρών αποστάσεων που επιτρέπουν στους νηματώδεις να στοχεύσουν

μεμονωμένα ριζικά τριχίδια και στα τοπικά ελκυστικά, που χρησιμοποιούνται από τους ενδοπαρασιτικούς νηματώδεις για τον εντοπισμό του ιδανικότερου σημείου εισβολής στη ρίζα (Perry, 2005). Μερικά παραδείγματα ελκυστικών ουσιών που εκλύει ο ξενιστής είναι αρκετές πτητικές και μη πτητικές ενώσεις, διαφόρων τύπου ιόντα και το CO<sub>2</sub> (Perry & Moens, 2011). Επιπρόσθετες οργανικές ενώσεις που έχουν προσελκυστικό ρόλο είναι τα αμινοξέα, τα σάκχαρα και άλλοι μεταβολίτες που απελευθερώνονται από τον ξενιστή στη ριζόσφαιρα. Άλλοι παράγοντες που ενδέχεται να επηρεάζουν την προσέλκυση είναι η ηλικία της ρίζας και η παρουσία μικροοργανισμών σε αυτήν (Perry, 2005). Το CO<sub>2</sub>, το οποίο είναι από τα σημαντικότερα ελκυστικά των φυτών προς τους κομβονηματώδεις, χαρακτηρίζεται ως μακράς απόστασης και κατά την απελευθέρωσή του από τους ζωντανούς οργανισμούς βοηθάει τους νηματώδεις να αντιληφθούν την πιθανή τοποθεσία τροφής τους ανάμεσα στα διάφορα εδαφικά σώματα (Perry, 2005).

Μετά την εύρεση του κατάλληλου ξενιστή ξεκινάει η διαδικασία εγκατάστασης της προνύμφης, ώστε να ξεκινήσει η διατροφή της. Σε όλα τα είδη των φυτοπαρασιτικών νηματωδών η σίτιση εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό από τη χρήση του στιλέτου το οποίο εισάγεται σε ένα κύτταρο προκειμένου να εξαχθεί το περιεχόμενό του (Perry & Moens, 2011). Το αρχικό σημείο σίτισης των κομβονηματωδών του γένους *Meloidogyne* δεν αλλάζει κατά τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου (Tapia-Vázquez et al., 2022). Τα συνήθη σημεία διατροφής τους είναι ο φλοιός, η ενδοδερμίδα, το περικύκλιο και το αγγειακό παρέγχυμα του φυτού. Οι συγκεκριμένες θέσεις τροφοδοσίας είναι ιδιαίτερα σημαντικές για την φωτοσύνθεση του φυτού, επομένως με την πρόκληση βλαβών σε αυτές δυσχεραίνεται και η ανάπτυξη του φυτού, καθώς παρεμποδίζεται η μεταφορά νερού και θρεπτικών εντός του φυτού (Vovlas et al., 2005).

Με το πέρας της εδραίωσης των προνυμφών στη θέση σίτισης, οι προνύμφες J2 μεγαλώνουν σημαντικά σε μέγεθος και υφίστανται μια σειρά εκδύσεων, ώστε να εξελιχθούν από το δεύτερο (J2) σε τρίτο (J3) και τέταρτο στάδιο προνυμφών (J4) αντίστοιχα (Kavitha et al., 2011). Μετά το τέταρτο και τελευταίο στάδιο (J4) μεταμορφώνονται σε ενήλικα άτομα, αρσενικά ή θηλυκά. Τα ενήλικα αρσενικά επανακτούν την κινητικότητά τους και μπορούν να εγκαταλείψουν τη ρίζα, ενώ τα θηλυκά παραμένουν στατικά για το υπόλοιπο του βιολογικού του κύκλου. Στα είδη του γένους *Meloidogyne* υπάρχουν τέσσερα προνυμφικά στάδια, γεγονός που σημαίνει ότι τέσσερις φορές πραγματοποιείται αλλαγή της παλιάς επιδερμίδας από τη νέα (Kavitha

et al., 2011). Επιπλέον, στα είδη *Meloidogyne sp.* παρατηρείται απώλεια σχηματισμού των αρσενικών ατόμων και σε αυτές τις περιπτώσεις η αναπαραγωγή πραγματοποιείται παρθενογενετικά (Elling, 2013). Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι παρθενογένεσης η μειωτική παρθενογένεση (αυτομιξία) και η μιτωτική παρθενογένεση (απομιξία). Στα περισσότερα είδη *Meloidogyne* πραγματοποιείται η μιτωτική παρθενογένεση, η οποία είναι η πιο κοινή μέθοδος ασεξουαλικής αναπαραγωγής. Η μόνη διαίρεση είναι η μίτωση και τα ωκύτταρα διατηρούν το διπλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων (Taylor & Sasser, 1978). Τα ώριμα θηλυκά του γένους *Meloidogyne* εναποθέτουν τα αυγά τους σε ωόσακους, ο οποίος είναι φτιαγμένος από ζελατινωειδή ουσία που παράγεται στους αδένες του ορθού. Η χημική σύσταση των ωόσακων αποτελείται από ένα συνδυασμό πρωτεϊνών και υδατανθράκων και είναι μορφολογικά ομοιογενής (Rogers & Bird, 1965).

### 3 Συμπτώματα προσβολής

Η σωστή αναγνώριση της προσβολής από κομβονηματώδεις, μέσω της αναγνώρισης των συμπτωμάτων τους είναι μια δύσκολη αλλά σημαντική διαδικασία, καθώς αποτελεί στάδιο για τον έλεγχο της εξάπλωσης τους και τον περιορισμό των προσβολών. Το πιο χαρακτηριστικό σύμπτωμα της προσβολής των φυτών από κομβονηματώδεις του γένους *Meloidogyne* είναι ο σχηματισμός κόμβων στο σημείο σίτισης των νηματωδών (Εικόνα 3.1, Εικόνα 3.2).



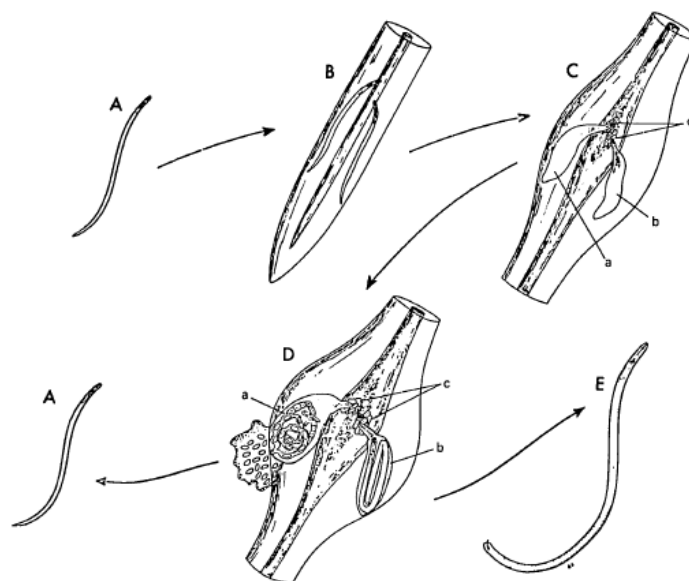
Εικόνα 3.1 Προσβολή από κομβονηματώδεις. Πηγή:  
<https://www.semanticscholar.org/paper/RESEARCH-NOTE-NOTA-INVESTIGATIVA-THE-ROOT-KNOT-ON-Khan-Kumar>



*Εικόνα 3.2 Εμφάνιση κόμβων σε προσβεβλημένες ρίζες. Πηγή:  
<https://www.researchgate.net/figure/Galls-on-roots-of-vegetable-crops-produced-by-root-knot-nematodes>*

Οι κόμβοι είναι διευρυμένες πολυπύρηνες θέσεις σίτισης των κομβονηματωδών και προέρχονται από μία σειρά φυσιολογικών και μορφολογικών τροποποιήσεων στα ριζικά φυτικά κύτταρα. Το μέγεθος των κόμβων σε κάθε προσβολή μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με το είδος του φυτού, το είδος των κομβονηματωδών που προκαλούν την προσβολή (Absmanner et al., 2013) και την ποσότητα του μολύσματος. Σε περιπτώσεις με μικρή ποσότητα μολύσματος παρατηρούνται μεμονωμένοι και διάσπαρτοι κόμβοι, ενώ σε έντονες προσβολές οι κόμβοι είναι περισσότεροι, πιο κοντά μεταξύ τους και οι ρίζες παραμορφώνονται αυξάνοντας το μέγεθός τους (Ornat & Sorribas, 2008).

Ο σχηματισμός των γιγαντιαίων κυττάρων που απαρτίζουν τους κόμβους οφείλεται στην ατελή κυτταροδιαίρεση που προκαλείται από τις ουσίες που παράγονται στα κύτταρα του οισοφαγικού αδένος των νηματωδών, οι οποίες εισέρχονται στο φυτό με τη βοήθεια του στυλέτου κατά τη διαδικασία σίτισης (Hewezi & Baum, 2013). Επιπροσθέτως, στην περιοχή των κυττάρων που υπόκεινται αλλαγές, τα επιδερμικά κύτταρα του φλοιού γίνονται υπερτροφικά, τα περικυκλικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται και παρατηρείται διατάραξη του ξυλώματος, καθώς τα νέα κύτταρα εγκλωβίζονται από ένα νέο ιστό ξυλώματος.



Εικόνα 3.3 Κύκλος ζωής του γένους *Meloidogyne*. Α: προνύμφη δευτέρου σταδίου (J2), Β: Είσοδος προνυμφών στη ρίζα, Γ: Έναρξη σχηματισμού κόμβου, Δ: Κόμβος με ώριμο θηλυκό και ωόσακα, Ε: Αρσενικό, Πηγή: Taylor et al, 1978

Στο υπέργειο μέρος του φυτού τα συμπτώματα εξαρτώνται κυρίως από την ένταση της προσβολής. Σε προσβολές χαμηλής έντασης ενδέχεται να μην εμφανιστούν συμπτώματα, ενώ έντονες προσβολές μπορούν να οδηγήσουν μέχρι και στο θάνατο του φυτού. Σε έντονα προσβεβλημένες ρίζες παρατηρούνται αρνητικές επιπτώσεις στην απορρόφηση νερού και θρεπτικών από το έδαφος. Ως αποτέλεσμα, δημιουργούνται φυτά καχεκτικής ανάπτυξης, παρατηρούνται τροφοπενίες στο φύλλωμα, μαρασμός, κιτρίνισμα ή χλώρωση των φύλλων και νέκρωση. Στην περίοδο της άνθισης παρατηρείται μείωση του αριθμού των ανθέων και ξήρανση αυτών, ενώ στο στάδιο της καρποφορίας παρατηρείται μείωση των καρπών ή του μεγέθους τους κάνοντάς τους μη εμπορικά διαθέσιμους (Ornat & Sorribas, 2008).

#### 4 Μέθοδοι καταπολέμησης νηματωδών

Η παραγωγικότητα των καλλιεργειών, και η διαρκής ανάγκη για ύπαρξη υψηλών αποδόσεων για την κάλυψη των ανθρώπινων αναγκών, διατρέχουν τον κίνδυνο αβιοτικών και βιοτικών καταπονήσεων.

Οι τρόποι αντιμετώπισης των βιοτικών καταπονήσεων αφορούν τα βιολογικά μέτρα, τα καλλιεργητικά μέτρα και τη χημική μέθοδο καταπολέμησης, που αποτελεί και τη συνηθέστερη μορφή καταπολέμησης για τους περισσότερους εχθρούς των καλλιεργειών (Oerke, 2006).

## 4.1 Καλλιεργητικά μέτρα

Στην κατηγορία αντιμετώπισης των φυτοπαρασίτων που περιλαμβάνουν καλλιεργητικά μέτρα περιλαμβάνονται διάφορες τεχνικές, όπως η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών, η αμειψισπορά ή απολύμανση εδαφών με θερμότητα, η αγρανάπαυση και η χρήση καλλιεργειών που λειτουργούν ως φυτά για παγίδευση των νηματωδών. Σκοπός των συγκεκριμένων μέτρων αποτελεί ο περιορισμός του πληθυσμού των νηματωδών με τη χρήση μεθόδων φιλικών προς το περιβάλλον.

### 4.1.1 Ανθεκτικές ποικιλίες

Η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών είναι μία άκρως φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος και αποτελεί εξαιρετική λύση για την οικονομική βιωσιμότητα των παραγωγών (Starr et al., 2002). Οι ανθεκτικές ποικιλίες περιορίζουν σε σημαντικό βαθμό την είσοδο των νηματωδών στο φυτό, καθώς και την αναπαραγωγή των νηματωδών μέσα σε αυτό. Οι ανθεκτικές ποικιλίες αφορούν καλλιέργειες, οι οποίες περιέχουν κάποιο γονίδιο, το οποίο είναι ικανό να προσδώσει ανθεκτικότητα στις προσβολές από κομβονηματώδεις. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι και η καλλιέργεια της τομάτας. Η τομάτα ως φυτό είναι ευπαθές σε προσβολή από νηματώδεις, ωστόσο ένα είδος της, το *Lycopersicon peruvianum* εμφανίζει υψηλή ανθεκτικότητα. Η ικανότητα αυτή βασίζεται στο γονίδιο Mi (Wubie & Temesgen, 2019). Από τη δεκαετία του 1940 έγιναν οι πρώτες προσπάθειες για μεταφορά του γονιδίου Mi από *L. peruvianum* PI128657 σε κοινά φυτά καλλιεργούμενης τομάτας και τα αποτελέσματα έδειξαν υψηλή ανθεκτικότητα εναντίον των κομβονηματωδών στα γένη *M. incognita*, *M. javanica* και *M. arenaria* (Messeguer et al., 1991). Ωστόσο, η ανθεκτικότητα που προκαλείται από το συγκεκριμένο γονίδιο έχει βρεθεί πως ανατρέπεται σε υψηλές τιμές θερμοκρασίας εδάφους ( $\theta > 28^{\circ}\text{C}$ ), γεγονός που αποτρέπει τη χρήση της συγκεκριμένης μεθόδου στη Μεσογειακή λεκάνη, όπου η θερινές θερμοκρασίες μπορεί να είναι αρκετά υψηλότερες (Dropkin, 1969).

### 4.1.2 Αμειψισπορά

Η αμειψισπορά, ως μεθοδολογία, βασίζεται στην αδυναμία των νηματωδών να προσβάλλουν ορισμένα φυτικά είδη. Η αλλαγή των καλλιεργειών σε μια καλλιεργούμενη έκταση μπορεί να αποφέρει σημαντική μείωση του πληθυσμού των νηματωδών του γένους *Meloidogyne* (Kratochvil et al., 2004). Πιο συγκεκριμένα, σε καλλιέργειες καλαμποκιού, όπου γινόταν αμειψισπορά με χειμερινή καλλιέργεια

βρώμης παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του πληθυσμού *M. incognita*, κατά τους χειμερινούς μήνες και για κάθε έτος που πραγματοποιήθηκε η συγκεκριμένη αλλαγή των καλλιεργειών. Σε άλλα πειράματα φάνηκε πως η αντικατάσταση υπαίθριας καλλιέργειας πατάτας από καλλιέργειες ελαιοκράμβης (*Brassica napus*) ή λευκού τριφυλλίου (*Trifolium angustifolium*) έδειξε σημαντικά αποτελέσματα μείωσης του πληθυσμού των κομβονηματωδών (Kratochvil et al., 2004).

Η αποτελεσματικότητα της αμειψισποράς μπορεί να χαθεί αν μια ευπαθής καλλιέργεια καλλιεργηθεί επί σειρά καλλιεργητικών περιόδων, επομένως η συγκεκριμένη στρατηγική απαιτεί μια διαρκή εναλλαγή των καλλιεργειών (McSorley & Gallaher, 1993).

Όσον αφορά τον περιορισμό του πληθυσμού των κομβονηματωδών με αμειψισπορά, οι καλλιέργειες του σόργου και του μπιζελιού έχουν εμφανίσει πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα στον περιορισμό του, ενώ και τα όσπρια μπορούν να αποτελέσουν καλή λύση γιατί βοηθούν και στην αύξηση αζώτου στο έδαφος. (Ralmi et al., 2016).

#### **4.1.3 Αγρανάπαυση**

Η ύπαρξη ενός ξενιστή κρίνεται απαραίτητη για την ολοκλήρωση του βιολογικού κύκλου των νηματωδών, καθώς αυτοί χαρακτηρίζονται ως υποχρεωτικά παράσιτα. Επομένως, η απουσία ξενιστή αποτελεί σημαντικό παράγοντα μείωσης του πληθυσμού με το πέρασμα του χρόνου. Σε πειράματα που βασίστηκαν στην απουσία ξενιστή βρέθηκε πως η διάρκεια ζωής των νηματωδών έχει μειωθεί σημαντικά ακόμα και υπό ευνοϊκές εργαστηριακές συνθήκες (Goodell & Ferris, 1989).

#### **4.1.4 Φυτά παγίδες**

Η καλλιεργητική τεχνική των φυτών παγίδευσης χρησιμοποιείται από τα τέλη του 1800. Η τεχνική αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι μετά την είσοδο των νηματωδών στο φυτό, τα ώριμα θηλυκά δεν εγκαταλείπουν το φυτό (Ralmi et al., 2016). Επομένως, εάν όλοι οι ξενιστές καταστραφούν, τότε καταστρέφονται μαζί και οι παγιδευμένοι νηματώδεις εντός των ριζών, πριν αρχίσει το στάδιο της ωοτοκίας. Για το λόγο αυτό εγκαθίστανται φυτά με το ρόλο του ξενιστή εντός του χωραφιού. Οι νηματώδεις χρησιμοποιούν αυτή την καλλιέργεια για τη διατροφή και τον πολλαπλασιασμό τους. Μερικά παραδείγματα καλλιεργειών παγίδευσης είναι τα φυτά τομάτας, τα φασόλια και τα καρότα. Πριν την εγκατάσταση της επόμενης καλλιέργειας, πραγματοποιείται ξερίζωμα των φυτών παγίδων και καταστροφή τους με σκοπό την καταστροφή των

νηματωδών και τη μείωση του αρχικού μολύσματος (Ornat et al., 2001). Η καλλιεργητική πρακτική των φυτών παγίδευσης είναι αποτελεσματική μόνο για πολύ μικρές καλλιέργειες και όχι για μεγάλες εκτάσεις, ωστόσο το αποτέλεσμα μπορεί να μειώσει σε σημαντικό βαθμό τη ζημιά για τις επόμενες καλλιέργειες (Sasanelli et al., 2021).

#### **4.1.5 Ηλιοαπολύμανση**

Η μέθοδος της ηλιοαπολύμανσης είναι μία ιδιαίτερα αποτελεσματική μέθοδος μείωσης του πληθυσμού των νηματωδών, πιο οικονομική από τις περισσότερες και περιβαλλοντικά ασφαλής (Candido et al., 2008). Πραγματοποιείται στα μέσα του καλοκαιριού, ώστε να έχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα. Η τεχνική αυτή βασίζεται στον εγκλωβισμό της θερμότητας που εκπέμπει ο ήλιος με την εγκατάσταση πλαστικών φιλμ στην επιφάνεια του εδάφους. Η επιφάνεια του εδάφους, αφού πρώτα βραχεί, καλύπτεται με διάφανο πλαστικό για τουλάχιστον δύο εβδομάδες με αποτέλεσμα να προκαλείται θάνατος των αυγών των νηματωδών και να μειώνεται ο πληθυσμός τους. Η υψηλή αποτελεσματικότητα της μεθόδου βασίζεται στην ευαισθησία των νηματωδών στις υψηλές θερμοκρασίες (Sasanelli et al., 2021). Η επαναλαμβανόμενη εφαρμογή της μεθόδου για δύο ή περισσότερα καλλιεργητικά έτη μπορεί να εμφανίσει σημαντικά ποσοστά αποτελεσματικότητας εναντίον ανθεκτικών σπόρων ζιζανίων και κομβονηματωδών, που έχουν επιβιώσει μετά την πρώτη εφαρμογή (Candido et al., 2008). Η πιο επιτυχημένη ηλιοαπολύμανση γίνεται σε πιο βαριά εδάφη παρά στα αμμώδη, καθώς τα εδάφη που έχουν μεγαλύτερη υδατοχωρητικότητα βοηθούν στη μεταφορά της θερμότητας σε βαθύτερα στρώματα (Ralmi et al., 2016).

#### **4.2 Χημική καταπολέμηση**

Η χημική καταπολέμηση εναντίον των κομβονηματωδών περιλαμβάνει δύο κύριες κατηγορίες χημικών σκευασμάτων. Αυτές είναι τα καπνιστικά και τα μη καπνιστικά νηματωδοκτόνα. Τα καπνιστικά νηματωδοκτόνα χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα, ωστόσο με τη εφαρμογή τους ελλοχεύει ο κίνδυνος εμφάνισης φυτοτοξικότητας στην καλλιέργεια, επομένως η εφαρμογή τους πρέπει να υφίσταται τουλάχιστον 3 εβδομάδες πριν τη σπορά (Ralmi et al., 2016). Επιπλέον, είναι καθολικά σκευάσματα που σημαίνει ότι είναι μη εκλεκτικά στην πρόκληση τοξικότητας. Τα καπνιστικά δρουν υπό τη μορφή αερίου και ενδέχεται να διαφύγουν στην ατμόσφαιρα εάν δεν εφαρμοστούν με σωστό τρόπο. Στην περίπτωση των επεμβάσεων στο έδαφος απαιτείται κάλυψη της επιφάνειας του εδάφους με πλαστικό. Η αποτελεσματικότητα

των καπνιστικών νηματωδοκτόνων εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες, όπως η σύσταση, η δομή, η υγρασία και η θερμοκρασία του εδάφους (Ζιώγας Β., 2017). Τα μη καπνιστικά νηματωδοκτόνα πρέπει να κατανέμονται ομοιόμορφα στο έδαφος προκειμένου να έρθουν σε επαφή με τους νηματώδεις και να συνδυάζονται με άλλες μεθόδους ελέγχου των νηματωδών (Ralmi et al., 2016).

Το βρωμιούχο μεθύλιο, ίσως το πιο γνωστό και ευρέως διαδεδομένο καπνιστικό νηματωδοκτόνο έχει ήδη απαγορευτεί σε αρκετές χώρες και μέσω διεθνής συμφωνίας σχεδιάζεται και η απόσυρση του από την αγορά και άλλων χωρών. Από την Ελλάδα, καθώς και από άλλα κράτη της Ευρωπαϊκής Ένωσης, η κατάργηση του βρωμιούχου μεθυλίου πραγματοποιήθηκε μετά την απόφαση της Ευρωπαϊκής Επιτροπής το 2008 (Ευρωπαϊκή Ένωση, 2008). Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της χρήσης μη καπνιστικών νηματωδοκτόνων για τα οποία έχει ήδη απαγορευτεί η χρήση τους. Το γεγονός αυτό κρούει τον κίνδυνο για νέες προκλήσεις, καθώς ορισμένες δραστικές των ομάδων αυτών, π.χ. aldicarb, έχουν βρεθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις σε υπόγεια ύδατα (Oka et al., 2000).

Η γενικότερη εντατική χρήση των νηματωδοκτόνων έχει οδηγήσει σε υγειονομική ανησυχία και ανάγκασε την Ευρωπαϊκή Ένωση στη θέσπιση νέων νόμων. Ως εκ τούτου, πολλά σκευάσματα αποσύρθηκαν από την αγορά σύμφωνα με την κοινοτική οδηγία 91/414/EK (Rodrigues, 2022). Ο κύριος ρόλος της οδηγίας 91/414/EK ήταν η εναρμόνιση των διαφορετικών εθνικών κανονισμών που σχετίζονται με την εξουσιοδότηση των φυτοφαρμάκων εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Magrans et al., 2002). Η εφαρμογή της κοινοτικής οδηγίας 91/414/EK ήταν ο αρχικός λόγος που έχουν αποσυρθεί πολλά σκευάσματα από την αγορά (Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο, 2009b). Με τον κανονισμό 1107/2009 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου καταργήθηκε η οδηγία 91/414/EK και αντικαταστάθηκε από την κοινοτική οδηγία 2009/128/EK, η οποία θέτει νέα κριτήρια επιλογής των προϊόντων που θα παρέχουν φυτοπροστατευτική κάλυψη (Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο, 2009a).

Αυτή τη στιγμή τα φυτοπροστατευτικά σκευάσματα που είναι εγκεκριμένα στη χώρα μας είναι ελάχιστα, ενώ αναμένεται περαιτέρω μείωσή τους τα επόμενα χρόνια, αφήνοντας ελάχιστες λύσεις για καταπολέμηση των νηματωδών (Πίνακας 4.1). Μάλιστα, σύμφωνα και με την Πράσινη Συμφωνία της Ευρωπαϊκής Ένωσης, η οποία στον τομέα της αγροδιατροφής προασπίζει την επισιτιστική ασφάλεια αλλά και τη

διασφάλιση της βιοποικιλότητας, αναμένεται μείωση έως και 50% των διαθέσιμων σκευασμάτων έως και το 2030 (European Commission, 2023).

Πίνακας 4.1 Εγκεκριμένα γεωργικά φάρμακα και βιοκτόνα με νηματωδοκτόνο δράση, σύμφωνα με το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων ([www.minagric.gr](http://www.minagric.gr), 19/05/2023).

| Δραστική Ουσία                                                                                   | Τελευταία ημερομηνία κυκλοφορίας των σκευασμάτων που περιέχουν την αντίστοιχη δραστική ουσία |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1,3-dichloropropene                                                                              | 28/09/2023                                                                                   |
| abamectin                                                                                        | 30/04/2024                                                                                   |
| <i>Bacillus firmus</i> i-1582                                                                    | 30/09/2023                                                                                   |
| chloropicrin                                                                                     | 28/09/2023                                                                                   |
| dazomet                                                                                          | 31/05/2025                                                                                   |
| fluopyram                                                                                        | 31/01/2025                                                                                   |
| fosthiazate                                                                                      | 31/10/2024                                                                                   |
| garlic extract                                                                                   | 31/08/2023                                                                                   |
| geraniol                                                                                         | 30/11/2024                                                                                   |
| oxamyl                                                                                           | 31/10/2024                                                                                   |
| <i>Purpureocillium lilacinum</i> strain 251<br>(former <i>paecilomyces lilacinus</i> strain 251) | 31/07/2023                                                                                   |
| thymol                                                                                           | 30/11/2024                                                                                   |

### 4.3 Δευτερογενείς μεταβολίτες ως αμυντικοί μηχανισμοί φυτών

Οι φυτικοί οργανισμοί έχουν αναπτύξει μέσω της διαδικασίας της εξέλιξης μια σειρά μηχανισμών άμυνας, που τους προστατεύουν από βιοτικές καταπονήσεις του περιβάλλοντος. Τέτοιοι είναι και οι χημικοί μηχανισμοί άμυνας, οι οποίοι περιλαμβάνουν τη σύνθεση ουσιών που έχουν στόχο την απώθηση των φυτοπαρασίτων, την πρόκληση τοξικότητας στους εχθρούς ή την ενίσχυση της άμυνας των φυτών (Goyal et al., 2012). Οι δευτερογενείς μεταβολίτες υπάγονται στους χημικούς μηχανισμούς άμυνας του φυτού και παράγονται κατά τον δευτερογενή μεταβολισμό των φυτών. Ενώ οι πρωτογενείς μεταβολίτες έχουν καθοριστικό ρόλο στις φυσιολογικές λειτουργίες των φυτών, οι δευτερογενείς μεταβολίτες εμφανίζονται συνήθως μόνο υπό στρεσογόνες συνθήκες, όπως για παράδειγμα τη βιοτική και αβιοτική καταπόνηση (Goyal et al., 2012).

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγει το φυτό κατατάσσονται με βάση την διαδικασία βιοσύνθεσής τους αλλά και τα χαρακτηριστικά του μόριού τους. Ορισμένες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών είναι οι φαινολικές ενώσεις, τα τερπενοειδή και οι αζωτούχες ενώσεις (Crozier et al., 2006) τα αλκαλοειδή, οι φαινόλες, τα διτερπένια και οι αλδεϋδες (Sithole et al., 2021).

Τα τερπένια είναι μία από τις μεγαλύτερες ομάδες δευτερογενών μεταβολιτών. Ως βάση έχουν μια αλυσίδα πέντε ατόμων άνθρακα που ονομάζεται ισοπρένιο και

ταξινομούνται σύμφωνα με τον αριθμό των μονάδων ισοπρενίου που υπάρχουν στο μόριο τους. Ως αποτέλεσμα, μπορούν να διακριθούν στα μονοτερπένια, τα σεσκιτερπένια, τα διτερπένια, τα τριτερπένια, τα σεσκαρτερπένια, τα τετρατερπένια και τα πολυτερπένια (Elshafie et al., 2023). Άλλη μία μεγάλη ομάδα είναι οι φαινολικές ενώσεις, οι οποίες μπορούν να χωριστούν σε πέντε κύριες κατηγορίες. Αυτές είναι οι απλές φαινόλες και τα φαινολικά οξέα, τα φαινυλοπροπανοειδή, τα φλαβονοειδή, οι τανίνες και οι κινόνες (Ohri & Pannu, 2010).

Συχνά παρατηρείται πως ανιχνεύονται παρόμοιοι δευτερογενείς μεταβολίτες σε φυτά που ανήκουν στις ίδιες οικογένειες. Για παράδειγμα, τα Solanaceae παράγουν σεσκιτερπένια, τα Leguminosae παράγουν ισοφλαβόνες, τα Meliaceae λιμονοειδή και τα Vitaceae στιλβενοειδή (Goyal et al., 2012).

#### **4.4 Νηματωδοκτόνος δράση φυτικών εκχυλισμάτων και αιθέριων ελαίων**

Τα υδατικά εκχυλίσματα πολλών φυτικών ειδών αποτελούν καινοτόμα λύση στην αντιμετώπιση των κομβονηματωδών. Έχουν καταφέρει σε πολλές περιπτώσεις να περιορίσουν την εξάπλωση των κομβονηματωδών *M. incognita* και *M. javanica* σε πολλές κηπευτικές καλλιέργειες. Μέρικα από τα φυτά που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή υδατικών εκχυλισμάτων για την καταπολέμηση των κομβονηματωδών είναι τα *Lavandula spp.*, *Thymus spp.*, *Nicotiana spp.*, *Allium sativum*, *Melia azedarach*, *Euphorbia orientalis*, *Xanthium strumarium*, *Eucalyptus spp.*, *Capsicum annuum* κ.α. (Asadi Sardari et al., 2015), καθώς και αρκετά είδη μέντας, όπως *Mentha piperita*, *Mentha spicata* και *Mentha pulegium* (Caboni et al., 2013). Ορισμένα εγχώρια ενδημικά φυτικά είδη που έχουν μελετηθεί για την νηματωδοκτόνο δράση τους σε *in vitro* πειράματα είναι τα *Origanum vulgare*, *Mentha piperita*, *Melissa officinalis*, *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Thymus citriodorus*, *Rosmarinus officinalis*, *Ocimum basilicum*, τα οποία έδωσαν και ικανοποιητικά αποτελέσματα. Τα παραπάνω φυτικά είδη ανήκουν στην οικογένεια Lamiaceae. Αναλυτικότερα, το *T. citriodorus* και το *O. vulgare*, τα οποία ήταν τα πιο αποτελεσματικά, προκάλεσαν 100% παράλυση σε προνύμφες *J2 Meloidogyne javanica* στις 96 ώρες από την έναρξη του πειράματος σε εύρος συγκεντρώσεων από 3,9-200  $\mu\text{L/mL}$ . Το *T. citriodorus* ήταν το πιο αποτελεσματικό, καθώς στη μικρότερη δόση, σε συγκέντρωση 4  $\mu\text{L/mL}$  στις 96 ώρες από την έναρξη του πειράματος προκάλεσε 100% θνησιμότητα (Ntalli et al., 2020). Για την οικογένεια Lamiaceae, ικανοποιητικά αποτελέσματα εναντίον των κομβονηματωδών προκλήθηκαν και από τις βιοδοκιμές των υδατικών εκχυλισμάτων

των φυτών *Ocimum sanctum* και *O. basilicum*. Ύστερα από ταυτοποίηση των συστατικών των αιθέριων ελαίων των φυτών βρεθήκαν πως τα κύρια συστατικά ήταν η eugenol και linalool αντίστοιχα. Η παράλυση του συνόλου (100%) των προνυμφών *Meloidogyne incognita* επιτεύχθηκε στα 120 λεπτά για το *Ocimum sanctum* και στα 160 λεπτά για το *O. Basilicum* (Chatterjee et al., 1982).

Σε άλλο πείραμα πρόκλησης παράλυσης σε κομβονηματώδεις *Meloidogyne incognita* μελετήθηκε η επίδραση των μεθανολικών εκχυλισμάτων των φυτών άλλων οικογενειών, όπως το *Gomphera serrata*, *Pentanema indicum*, *Crotalaria retusa*, *Couroupita quianensis*, *Allamanda cathartical*, *Guazuma ulmifolis*, *Nepeta cataria*, *Leucus aspera*, *Cymbopogon citratus* και *Aristida stricta* στα 10-100 ppm. Βρέθηκε πως το *Couroupita quianensis* και το *Nepeta cataria* παρουσίασαν τη μεγαλύτερη θνησιμότητα (73-86%) μετά από 72 ώρες από την έναρξη του πειράματος. Το *Couroupita quianensis* είχε τη μικρότερη τιμή LC<sub>50</sub> στις 24 ώρες σε σχέση με τα υπόλοιπα φυτά και το *Nepeta cataria* στις 48 και 72 ώρες, σύμφωνα με ανάλυση probit (Pavaraj et al., 2012).

Σε άλλη έρευνα μελετήθηκε η νηματωδοκτόνος δράση σε J2 *M. incognita* και *M. javanica* των εκχυλισμάτων είκοσι διαφορετικών φυτών. Όσον αφορά την αποτελεσματικότητα στο γένος *M. incognita* βρέθηκε πως το εκχύλισμα μεθανόλης από το φυτό της Αρτεμίσιας (*Artemisia herba-alba*) είχε αποτελεσματικότητα 22%, 51% και 54% στις 24, 48 και 72 ώρες αντίστοιχα σε συγκέντρωση 20 μg/mL. Ικανοποιητικά αποτελέσματα έδειξαν και τα εκχυλίσματα των φυτών *Euphorbia macroclada* και *Pimpinella anisum* (Al-Banna et al., 2003).

Ικανοποιητική νηματωδοκτόνος δράση βρέθηκε και στα φυτικά εκχυλίσματα άλλων φυτών, όπως το *Nicotiana tabacum*, *Syzygium aromaticum*, *Piper betle* και *Acorus calamus*, σε J2 των κομβονηματωδών *M. incognita*, βρέθηκε ισχυρή τοξικότητα εναντίον των προνυμφών σε εύρος συγκεντρώσεων LC<sub>50</sub> 1,9 – 3,2 mg/mL. Τα αποτελέσματα των ερευνών αυτών πλησίαζαν σε ικανοποιητικό βαθμό την αποτελεσματικότητα των χημικών νηματωδοκτόνων (Taniwiryono et al., 2009).

Σημαντική νηματωδοκτόνος δράση έχει βρεθεί και για το είδος *Melia azedarach* (N. Ntalli et al., 2010) και *Lavandula angustifolia* (Asadi Sardari et al., 2015), τα οποία ανήκουν στις οικογένειες Meliaceae και Lamiaceae αντίστοιχα.

#### 4.4.1 *Melia azedarach*

Το φυτό *Melia azedarach*, με την κοινή ονομασία αγριοπασχαλιά, είναι φυτό της οικογένειας Meliaceae και έχει ευρύ φάσμα εφαρμογών τόσο στον αγροτικό τομέα, όσο και στη φαρμακευτική (Cavoski et al., 2012). Η συγκεκριμένη βοτανική οικογένεια έχει λάβει αρκετή προσοχή για την εντομοκτόνο και νηματωδοκτόνο δράση της εξαιτίας της ύπαρξης των λιμονοειδών τριτερπενίων στα φυτά της (N. G. Ntalli, F. Ferrari, et al., 2010). Είναι ιθαγενές φυτό της Ασίας, ωστόσο συναντάται στην βόρεια Αυστραλία και στη νότια Αμερική (Nikoletta & Filippo, 2010). Αναπτύσσεται επίσης σε εύκρατες ζώνες της Ευρώπης και της Βόρειας Αμερικής, όπου και χρησιμοποιείται συχνά ως καλλωπιστικό φυτό σε αστικά τοπία (Toselli et al., 2010). Μερικά από τα λιμονοειδή που έχουν απομονωθεί από το φυτό *Melia azedarach* είναι η melantrirole, melanione (Lavie & Jain, 1967), meliacine, meliacarpine και meliartenine (Lee et al., 1991). Στο πλαίσιο της μείωσης των συμβατικών χημικών σκευασμάτων, έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενέστερα τα εκχυλίσματα του φυτού, με τα αποτελέσματα να δείχνουν ικανοποιητική εντομοκτόνο (Bohnenstengel et al., 1999; Charleston et al., 2005) μυκητοκτόνο (Carpinella et al., 2003) και νηματωδοκτόνο δράση αγρονομικού ενδιαφέροντος (Cavoski et al., 2012).

Η ισχυρή νηματωδοκτόνος δράση των εκχυλίσμάτων του φυτού βασίζεται κατά κύριο λόγο στα καρβοξυλικά οξέα και τις αλδεϋδες από τους καρπούς του φυτού και ειδικότερα στο οξικό, βουτυρικό, εξανοϊκό, δεκανοϊκό οξύ και εξαδεκανοϊκό οξύ, καθώς επίσης και στη φουρφουράλη, στη 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλη και στη φουρφουρόλη. Μάλιστα, η φουρφουράλη βρέθηκε να έχει την υψηλότερη νηματωδοκτόνο δράση συγκριτικά με τα υπόλοιπα συστατικά του εκχυλίσματος με συγκέντρωση  $EC_{50}$  στις 24 ώρες από την έναρξη του πειράματος στα 8,5  $\mu\text{g/mL}$  για την παράλυση των J2, ενώ οι αμέσως επόμενες δραστικότερες, η φουρφουρόλη και η 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλη στα 41,2  $\mu\text{g/mL}$  και 45,7  $\mu\text{g/mL}$  αντίστοιχα. Με εξαίρεση το εξαδεκανοϊκό οξύ και την 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλη, όλες οι άλλες ουσίες παρουσιάζουν καπνιστική δράση στα πειράματα κινητικότητας εναντίον προνυμφών δευτέρου σταδίου, γεγονός που κάνει το εκχύλισμα ιδιαίτερα χρήσιμο για εφαρμογές στο πεδίο (N. G. Ntalli, S. Vargiu, et al., 2010). Τα αποτελέσματα της παραπάνω έρευνας καθιστούν την εφαρμογή εκχυλίσμάτων του φυτού *Melia azedarach* ως βιολογική και βιοκαπνιστική επιλογή, φιλική προς το περιβάλλον, ικανή να αντιμετωπίσει πληθυσμούς κομβονηματωδών που εγκαθίστανται στο ριζικό

σύστημα του φυτού. Η καπνιστική δράση των ουσιών παίζει σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματικότητά τους, καθώς καλούνται να δράσουν σε βαθύτερα στρώματα εδάφους.

Σε πειράματα ελέγχου της αναπαραγωγικής διαδικασίας των νηματωδών σε φυτά αγγουριού παρατηρήθηκε μείωση του ρυθμού αναπαραγωγής των νηματωδών. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην επίδραση των εκχυλίσμάτων των φυτών της οικογένειας Meliaceae, και συγκεκριμένα του *Melia azedarach*, στην εκκόλαψη των αυγών των νηματωδών και στη αύξηση της θνησιμότητας στις προνύμφες δευτέρου σταδίου. Επιπλέον, παρεμποδίζεται η εισβολή των προνυμφών στο φυτό και μειώνεται δραστικά η δραστηριότητά τους εντός αυτού. Η τιμή  $EC_{50}$  σε πειράματα παράλυσης J2 με το υδατικό εκχύλισμα των ώριμων καρπών της *M. azedarach* προσδιορίστηκε στα 500  $\mu\text{g/mL}$  (Cavoski et al., 2012).

Σε διαφορετικά πειράματα που περιελάμβαναν την εφαρμογή και ενσωμάτωση εκχυλίσματος από πολτοποιημένους καρπούς του φυτού *Melia azedarach* σε φυτά ντομάτας προσβεβλημένα από νηματώδεις του γένους *Meloidogyne spp.* βρέθηκε πως ο αριθμός των θηλυκών νηματωδών στις ρίζες τις ντομάτας μειώθηκε μέχρι και 50% σε συγκέντρωση πολτού 0,4% w/w στις 24 ώρες. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση των καρπών της *Melia azedarach* ήταν πολικά και μη πολικά, μεθανόλη και εξάνιο αντίστοιχα (N. Ntalli et al., 2010).

Επιπλέον, τα φύλλα, οι καρποί και άλλα βλαστικά μέρη του φυτού μπορούν να αποτελέσουν σημαντική πηγή οργανικής λίπανσης στις καλλιέργειες. Σε καλλιέργειες όπου ακολουθούν μια ολοκληρωμένη ή βιολογική προσέγγιση στον τρόπο καλλιέργειας κρίνεται απαραίτητη η ενσωμάτωση φυτικών παραγώγων στις πρακτικές της λίπανσης. Σε σχετικά πειράματα αποδείχτηκε πως τα υποπροϊόντα του φυτού *M. azedarach* σε συνδυασμό με ανόργανα λιπάσματα έπαιξαν σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση του εδάφους σε νιτρικά και αμμωνιακά ιόντα (Toselli et al., 2010). Επιπλέον, με την προσθήκη φύλλων του φυτού *M. azedarach* μπορεί να επηρεαστεί και η τιμή pH το εδάφους, καθώς φαίνεται να αυξάνεται η αλκαλικότητα του. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην υψηλή συγκέντρωση Ca και Mg στα φύλλα του φυτού (Noble et al., 1996).

Επίσης, με την εφαρμογή υδατικού εκχυλίσματος από το φυτό της *M. azedarach* στις ρίζες φυτών αγγουριάς παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης των ενζύμων της

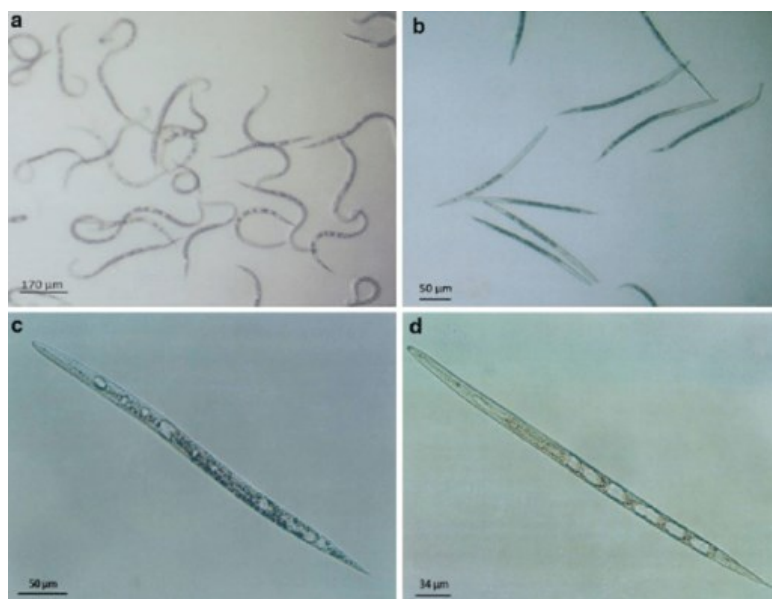
καταλάσης (CAT) και της ασκορβικής υπεροξειδάσης (ARX) στις ρίζες των φυτών σε σχέση με τους μάρτυρες. Τα συγκεκριμένα ένζυμα παράγονται από τα φυτά σε συνθήκες καταπόνησης, όπως για παράδειγμα προσβολή από νηματώδεις, και προάγουν την αύξηση ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS), οι οποίες έχουν αρνητικές συνέπειες στην υγεία των φυτών (Cavoski et al., 2012).

#### **4.4.2 *Lavandula angustifolia***

Το φυτό της λεβάντας ανήκει στα αρωματικά φυτά. Πιο συγκεκριμένα, ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae και στην υποοικογένεια Nepetoideae. Το γένος *Lavandula* περιέχει περισσότερα από 39 είδη και δεκάδες υποείδη και ποικιλίες. Τα κύρια καλλιεργούμενα είδη λεβάντας είναι τα *L. angustifolia*, *L. latifolia*, *L. lanata* (Héral et al., 2021). Ως φυτό είναι ευρέως διαδεδομένο στη Μεσογειακή λεκάνη για το μεγάλο φάσμα δράσης του στον τομέα της φαρμακευτικής, της αρωματοποιίας, των καλλυντικών και της διατροφής (Radulescu et al., 2017). Το φυτό αναφέρεται από τα αρχαία χρόνια για τις ευεργετικές δράσεις του στον άνθρωπο από τα κείμενα του Θεόφραστου (370-285 π.Χ.) και την ευρεία χρήση του κατά τη Βικτοριανή εποχή (Lis-Balchin, 2002). Η εμπορική του αξιοποίηση ξεκίνησε από τις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα για την παραλαβή αιθέριων ελαίων, τα οποία αρχικά χρησιμοποιήθηκαν ως καλλωπιστικά. Στις μέρες μας, οι κύριες χώρες παραγωγοί αιθέριου ελαίου λεβάντας είναι η Βουλγαρία, η Γαλλία, η Κίνα, η Ουκρανία, η Ισπανία και το Μαρόκο (Héral et al., 2021).

Τα αιθέρια έλαια που παράγονται από τα διάφορα είδη του φυτού της λεβάντας εμφανίζουν πληθώρα αντιμικροβιακών δράσεων. Μερικά είδη εμφανίζουν μυκητοκτόνο και αντιοξειδωτική δράση, ενώ μερικά εμφανίζουν και εντομοκτόνο δράση (Lis-Balchin, 2002).

Τα υδατικά εκχυλίσματα της λεβάντας έχουν χρησιμοποιηθεί σε αρκετές έρευνες προκειμένου να εξακριβωθεί η νηματωδοκτόνος δράση τους. Σε πειράματα κινητικότητας σε προνύμφες δευτέρου σταδίου *M. javanica* βρέθηκε πως η τιμή του LC<sub>50</sub> του εκχυλίσματος ήταν 20,42 mg/mL, γεγονός που το κατέταξε ιδιαίτερα τοξικό συγκριτικά και με τα εκχυλίσματα άλλων φυτών. Μάλιστα στο ίδιο πείραμα βρέθηκε πως σε συγκεντρώσεις των 50 και 100 mg/mL υδατικό εκχυλίσματος το φυτό της λεβάντας είχε την υψηλότερη τοξικότητα σε σχέση με τα υπόλοιπα 20 φυτά του πειράματος στις μετρήσεις που πάρθηκαν στις 24 και 48 ώρες από την έναρξη του πειράματος (Asadi Sardari et al., 2015).



Εικόνα 4.1 Εμφάνιση ζωντανών (a) και νεκρών προνυμφών (b,c,d) *Meloidogyne incognita* δευτέρου σταδίου. Πηγή: [https://www.researchgate.net/figure/Meloidogyne-incognita-2nd-stage-juvenile-after-treatment-with-feravenulin-isolated-from\\_fig3\\_51571724](https://www.researchgate.net/figure/Meloidogyne-incognita-2nd-stage-juvenile-after-treatment-with-feravenulin-isolated-from_fig3_51571724)

Επιπροσθέτως, τα αιθέρια έλαια αποτελούν φυσικά εκχυλίσματα των αρωματικών φυτών και χρησιμοποιούνται για τις ιδιότητές τους σε ποικίλα πεδία συμπεριλαμβανομένου της αγροδιατροφής, φυτοπροστασίας, αρωματοθεραπείας, της φαρμακευτικής και πολλών άλλων κλάδων. Έχει βρεθεί πως τα αιθέρια έλαια διάφορων φυτικών ειδών παρέχουν αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική (Tere et al., 2004), μυκητοκτόνο (Daferera et al., 2000), εντομοκτόνο (Isman, 2000) και νηματοδοκτόνο δράση (Al-Banna et al., 2003). Ειδικότερα για την εντομοκτόνο δράση τους έχουν μελετηθεί δεκάδες αιθέρια έλαια και για την καπνιστική τους δράση εμφανίζοντας αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα, ωστόσο έχουν παρατηρηθεί και φαινόμενα φυτοτοξικότητας (Isman, 2000).

Τα αιθέρια έλαια είναι φυσικές πτητικές ουσίες, οι οποίες βρίσκονται σε πολλά από τα αρωματικά φυτά. Είναι μη διαλυτά στο νερό και αποτελούνται από δευτερογενείς μεταβολίτες των αρωματικών φυτών. Συγκεντρώνονται κυρίως στα φύλλα, τους βλαστούς και στους καρπούς των φυτών, από τα οποία παραλαμβάνονται συνήθως με την τεχνική της απόσταξης (Ntalli et al., 2011). Στις περισσότερες περιπτώσεις είναι ένα σύνθετο μίγμα τερπενίων, κυρίως μονοτερπενίων και σεκιτερπενίων, καθώς και αρωματικών φαινολών, οξειδίων, αιθέρων, εστέρων, αλκοολών, αλδευδών και κετονών που καθορίζουν το χαρακτηριστικό άρωμα και οσμή των συγκεκριμένων φυτών. Η χημική σύσταση των αιθέριων ελαίων μπορεί να ποικίλει σημαντικά μεταξύ των ειδών των αρωματικών φυτών, αλλά και ακόμα και μέσα στην ίδια ποικιλία σε

διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Πέραν αυτών, σημαντικό ρόλο στη χημική σύσταση παίζει και ο βαθμός ωριμότητας των φυτών κατά τη συγκομιδή τους πριν το στάδιο της εκχείλισης του ελαίου (Andrés et al., 2012).

Όσον αφορά τη νηματοδοκτόνο δράση των αιθέριων ελαίων, έχουν μελετηθεί φυτά από διάφορες οικογένειες συμπεριλαμβανομένου των οικογενειών Lamiaceae, Asteraceae, Myrtaceae, Rutaceae, Poaceae κ.α.

Μερικά φυτά από τα οποία βρέθηκε ικανοποιητική νηματοδοκτόνος δράση είναι τα *Pelargonium graveolens*, *Ocimum sanctum*, *Mentha piperita* και *Mentha spicata* τα οποία περιέχουν τις ουσίες citronellol, eugenol, geraniol, linalool. Μάλιστα, η εφαρμογή 1500 ppm geraniol, eugenol και linalool στο έδαφος κατάφερε να ελέγξει σημαντικά πληθυσμούς νηματωδών του γένους *M. arenaria*. Σε άλλη έρευνα τα αιθέρια έλαια των φυτών *Carum carvi*, *Foeniculum vulgare*, *Mentha rotundifolia* με κύριο συστατικό την ουσία carvacrol εμφάνισαν σημαντική αποτελεσματικότητα εναντίον προνυμφών δευτέρου σταδίου του γένους *Meloidogyne javanica* και παρεμπόδισαν την εκκόλαψη των αυγών. Νηματοδοκτόνος δράση βρέθηκε και από την ουσία thymol, ωστόσο ήταν λιγότερη αποτελεσματική από την carvacrol (Oka et al., 2000).

Σε άλλα πειράματα όπου δοκιμάστηκε η νηματοδοκτόνος δράση αιθέριων ελαίων από διάφορα φυτά σε προνύμφες δευτέρου σταδίου *Meloidogyne incognita*, μεταξύ αυτών και ενός είδους λεβάντας, το *Lavandula officinalis*, σε συγκεντρώσεις 1%, 3% και 5% με μετρήσεις στις 12, 24, 48 και 72 ώρες, βρέθηκε πως το αιθέριο έλαιο από το φυτό της λεβάντας ήταν μεταξύ των ισχυρότερων σε νηματοδοκτόνο δράση, καθώς είχε ως αποτέλεσμα την πρόκληση θνησιμότητας των προνυμφών δευτέρου σταδίου σε ποσοστό μεγαλύτερο από 90% (Ozdemir & Gozel, 2017).

Ο μηχανισμός δράσης των αιθέριων ελαίων εναντίον των κομβονηματωδών δεν είναι ιδιαίτερα ξεκάθαρος. Στα έντομα, έχει βρεθεί πως τα αιθέρια έλαια δρουν ως παρεμποδιστές της ακετυλοχολινεστεράσης επηρεάζοντας έτσι το νευρικό σύστημά τους (Ryan & Byrne, 1988). Αξίζει να αναφερθεί πως τα περισσότερα αιθέρια έλαια που εμφανίζουν εντομοκτόνο δράση έχουν και νηματοδοκτόνο δράση. Αν και η δράση τους εναντίον των νηματωδών είναι ασαφής πιστεύεται ότι τα αιθέρια έλαια μπορούν να αποδιοργανώσουν την κυτταρική μεμβράνη των νηματωδών και να τροποποιήσουν τη διαπερατότητά της (Oka et al., 2000).

## 5 Σκοπός της εργασίας

Στο πλαίσιο ανακάλυψης νέων μεθόδων αντιμετώπισης των κομβονηματωδών, μελετήσαμε τη μεμονωμένη και συνεργιστική δράση των υδατικών εκχυλισμάτων των φυτών *Melia azedarach* (YEM) και *Lavandula angustifolia* (YEL), καθώς και των αιθέριων ελαίων της λεβάντας.

Το πρώτο στάδιο μελέτης αφορούσε τον έλεγχο της πρόκλησης παράλυσης των υδατικών εκχυλισμάτων των φυτών *Melia azedarach* και *Lavandula angustifolia* σε προνύμφες J2 *Meloidogyne incognita* και των δύο αιθέριων ελαίων λεβάντας Α και Β (ΑΕΛΑ, ΑΕΛΒ) σε προνύμφες J2 *Meloidogyne incognita*. Ο λόγος που χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά δείγματα αιθέριων ελαίων ήταν για να ελεγχθεί η επίδραση της διαφορετικής περιεκτικότητας σε άνθη στη χημική σύσταση και την πρόκληση παράλυσης σε προνύμφες δευτέρου σταδίου.

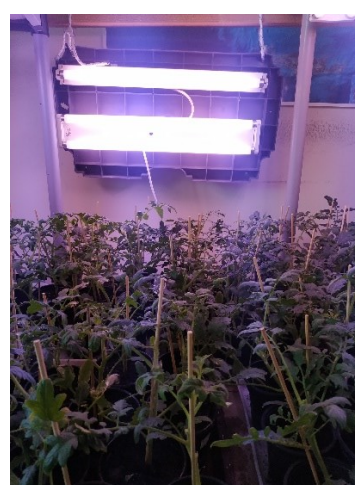
Το δεύτερο στάδιο αφορούσε τον έλεγχο πρόκλησης παράλυσης των συνδυαστικών δυαδικών μιγμάτων των παραπάνω ουσιών σε προνύμφες J2 *Meloidogyne incognita*. Έτσι, δημιουργήθηκαν τα μίγματα YEM+YEL, YEM+ΑΕΛΑ, YEM+ΑΕΛΒ και YEL+ΑΕΛΑ, τα οποία ελέγχθηκαν για συνεργιστική, αθροιστική ή ανταγωνιστική νηματωδοκτόνο δράση στις 24, 48 και 72 ώρες από την έναρξη του πειράματος.

## 6 Υλικά & Μέθοδοι

### 6.1 Ανάπτυξη φυτών τομάτας στο θάλαμο ανάπτυξης

Η διατήρηση του πληθυσμού των κομβονηματωδών *Meloidogyne incognita* πραγματοποιήθηκε σε φυτά τομάτας (*Solanum lycopersicum*) ποικιλίας Belladonna που αναπτύσσονταν σε πλαστικά φυτοδοχεία με διάμετρο 18cm και περιείχαν τύρφη. Ο συγκεκριμένος ξενιστής επιλέχθηκε, καθώς είναι ιδιαίτερα ευπαθής στις προσβολές από τους κομβονηματώδεις.

Η ανάπτυξη των φυτών έγινε σε θερμοκρασία 25-28 °C, υγρασία στο 60% και φωτοπερίοδο 16 h φως (Εικόνα 6.1).



Εικόνα 6.1 Φυτά τομάτας εντός του θαλάμου ανάπτυξης

Κατά την παραμονή των φυτών στο θάλαμο ανάπτυξής τους πραγματοποιούνταν τακτικά ποτίσματα και κλαδέματα των φυτών κάθε τρεις και δέκα ημέρες αντίστοιχα.

### 6.2 Παραλαβή προνυμφών κομβονηματωδών δευτέρου σταδίου (J2) από μολυσμένες ρίζες

Για την αρχική μόλυνση των φυτών χρησιμοποιήθηκαν προνύμφες δευτέρου σταδίου από ήδη προσβεβλημένες ρίζες από κομβονηματώδεις *Meloidogyne incognita* (Εικόνα 6.2). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν 3-5 ρίζες, που υποβλήθηκαν σε προσεκτικό πλύσιμο σε τρεχούμενο νερό, ώστε να απομακρυνθεί το έδαφος, χωρίς να αποκοπούν τα πλευρικά ριζίδια, τα οποία φέρουν και το μεγαλύτερο αριθμό ωόσacων.



Εικόνα 6.2 Προσβεβλημένες ρίζες από *Meloidogyne incognita*

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εκχύλιση των ριζών με NaOCl με ανάδευση για 5 min και πλύσιμό τους με νερό για 10 min σε κόσκινα διατομής 250 και 38  $\mu\text{m}$ . (Hussey & Barker, 1973).

Οι ωόσακοι που συλλέχθηκαν από το κόσκινο διαμέτρου 38  $\mu\text{m}$  μεταφέρθηκαν σε τροποποιημένο δοχείο Baermann. Το δοχείο Baermann αποτελούνταν από δύο πλαστικά πιατάκια και ένα πλαστικό δακτύλιο με ενσωματωμένο δίχτυ (Εικόνα 6.3). Πάνω στο δίχτυ τοποθετήθηκε χαρτί που φιλοξενούσε το εκχύλισμα των ριζών με τους ωόσακους και ερχόταν σε συνεχή επαφή με την επιφάνεια του νερού ώστε οι νεοεκκολαφθήσες προνύμφες να περάσουν στο κάτω πιατάκι.



Εικόνα 6.3 Τροποποιημένο δοχείο Baermann

Το αυτοσχέδιο δοχείο Baermann διατηρήθηκε για 7 ημέρες εντός του θαλάμου ανάπτυξης των φυτών, ώσπου και πραγματοποιήθηκε η παραλαβή των προνυμφών δευτέρου σταδίου J2. Η παραλαβή των προνυμφών γινόταν κάθε 2 μέρες, έως ότου σταματήσει η εκκόλαψη.

### 6.3 Μόλυνση φυτών για διατήρηση πληθυσμού

Η λήψη J2 για τη διαδικασία της μόλυνσης των φυτών έγινε με σифώνι από ποτήρι ζέσεως, όπου έχει προστεθεί το εκχύλισμα του δοχείου Baermann. Η εισχώρηση των προνυμφών J2 σε υγιή φυτά με τη μέθοδο του εμβολιασμού απαιτεί 24-48 ώρες (von Mende, 1997).

Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας μόλυνσης, τα φυτά παρέμειναν στους θαλάμους ανάπτυξής τους, έως ότου ολοκληρωθεί ο βιολογικός κύκλος των νηματωδών, δημιουργηθούν κόμβοι στην επιφάνεια των ριζών και οι ρίζες μπορέσουν να δώσουν προνύμφες δευτέρου σταδίου. Για τις συνθήκες του συγκεκριμένου πειράματος χρειάστηκαν περίπου 40 ημέρες στους 27°C

Η πρώτη παραλαβή J2 από το Baermann πραγματοποιήθηκε στις 7 ημέρες, ενώ οι επόμενες παραλαβές γίνονταν κάθε 3 ημέρες.

### 6.4 Παρασκευή υδατικού εκχυλίσματος *Melia azedarach*

Η παρασκευή του υδατικού εκχυλίσματος έγινε ακολουθώντας το πειραματικών πρωτόκολλο των Ntalli et al., 2010 και Cavoski et al., 2012. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε 1 g από αλεσμένους ώριμους καρπούς του φυτού *M. azedarach*, το οποίο ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας. Έπειτα, η ποσότητα αυτή τοποθετήθηκε σε πλαστικό σωλήνα τύπου Falcon, όπου προστέθηκαν και 10 mL νερού. Ο σωλήνας μεταφέρθηκε σε συσκευή Ultrasonic Bath (Sonicator) (Εικόνα 6.4).



Εικόνα 6.4 Συσκευή Ultrasonic Bath (Sonicator)

Ο συνολικός χρόνος της εκχύλισης ήταν 10 λεπτά. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε διήθηση σε βαμβάκι και παραλαβή του εκχυλίσματος. Το υδατικό εκχύλισμα που προέκυψε μεταφέρθηκε σε νέο Falcon, όπου και ακολούθησαν οι απαραίτητες

αραιώσεις του σε δοχεία Eppendorf, προκειμένου να εφαρμοστούν οι απαιτούμενες βιολογικές δοκιμές. Η συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος ήταν 40000 mg/L εκφρασμένη επί ξηρού βάρους του εκχυλίσματος μετά από εξαντλητική εξάτμιση.

### **6.5 Παρασκευή υδατικού εκχυλίσματος *Lavandula angustifolia***

Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν 5 g από τεμαχισμένα φυτά λεβάντας, τα οποία ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας και προστέθηκαν μαζί με 20 mL νερό σε σωλήνα τύπου Falcon. Ο σωλήνας μεταφέρθηκε στο Sonicator για 10 λεπτά. Στη διήθηση σε βαμβάκι και παραλαβή του υδατικού εκχυλίσματος, το οποίο τοποθετήθηκε σε νέο σωλήνα Falcon για τις απαραίτητες αραιώσεις του σε δοχεία Eppendorf, ώστε να χρησιμοποιηθεί για τις βιολογικές δοκιμές εναντίον των J2.

### **6.6 Παραλαβή αιθέριων ελαίων λεβάντας Α και Β (ΑΕΛΑ / ΑΕΛΒ) με τη μέθοδο της απόσταξης**

Τα αιθέρια έλαια ήταν μια ευγενική χορηγία της εταιρείας AiTHERIA essential oils and more ([www.aitheria.gr](http://www.aitheria.gr)).

### **6.7 Μέθοδος προσδιορισμού της ολικής σύστασης του αιθέριου ελαίου σε σύστημα αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας της μάζας**

Ο διαχωρισμός του αιθέριου ελαίου έγινε με αέριο χρωματογράφο. Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε στήλη Phenomenex Zebron ZB-5 (30m, 2.5 mm i.d., 0.25 cm film thickness) και η ανίχνευση σε φασματογράφο μάζας απλού τετραπόλου, τύπου 5973 Network. Για την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Enhanced ChemStation. Με το πέρας της εκχύλισης, ακολούθησε αραιώση 1:1000 (v/v) του αιθέριου ελαίου σε εξάνιο και μεταφέρθηκε μέσω της θερμοστατούμενης γραμμής μεταφοράς σε αέριο χρωματογράφο. Η είσοδος τους στη στήλη έγινε με εισαγωγέα τύπου splitless σε όγκο 1  $\mu$ L. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα ήταν 270 °C, της γραμμής μεταφοράς ήταν 290 °C και του ανιχνευτή ήταν στους 270 °C. Ο διαχωρισμός στην τριχοειδή στήλη πραγματοποιήθηκε με την εξής διαδικασία: Αρχικά, εφαρμογή θερμοκρασίας 60 °C για 5 min και εν συνεχεία ακολούθησε αύξηση της θερμοκρασίας στους 100, 200, 250 και 290 °C με ρυθμό 3, 5, 10 και 20 °C ανά λεπτό, αντίστοιχα. Η διατήρηση της θερμοκρασίας επήλθε στο τελευταίο στάδιο για 7 min. Η ροή του φέροντος αερίου (He) ήταν mL min<sup>-1</sup>. Για να πραγματοποιηθεί η ανίχνευση των συστατικών του αιθέριου ελαίου χρησιμοποιήθηκε φασματογράφος

μάζας με την τεχνική του συστήματος ιονισμού με πρόσκρουση ηλεκτρονίων και σε δυναμικό ιονισμού 70 eV και θερμοκρασία 250 °C.

Η ταυτοποίηση της κάθε κορυφής έγινε με τη χρήση των τιμών του χρόνου κατακράτησης  $R_t$  και για τον υπολογισμό των τιμών του δείκτη κατακράτησης  $R_I$  βάση του τύπου Kovats index, για χρωματογραφικό διαχωρισμό με προγραμματισμό θερμοκρασίας και για σειρά αλκανίων  $C_9$ - $C_{24}$  και σύγκριση τιμών  $R_I$ . Επιπλέον, για την ταυτοποίηση ήταν απαραίτητο να γίνει σύγκριση του φάσματος μάζας του κάθε συστατικού, σε συνθήκες ολικού ιόντος, με τα αντίστοιχα δεδομένων ηλεκτρονικών βιβλιοθηκών Nist98 και Wolley275L και χρήση τους σε αναλογία 30:70. Η ποιότητα της σύγκρισης γινόταν αποδεκτή μόνο όταν ήταν μεγαλύτερη από 90 % για να γίνει η ταυτοποίηση της ουσίας.

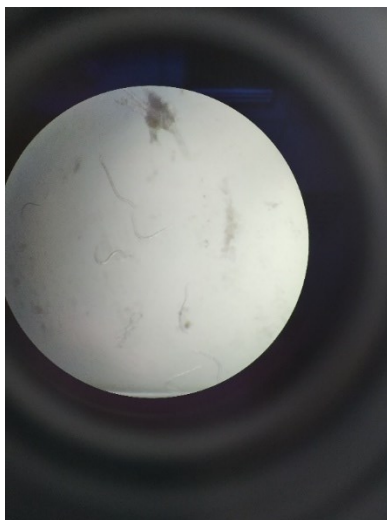
## **6.8 Δοκιμές πρόκλησης παράλυσης των αιθέριων ελαίων και των υδατικών εκχυλισμάτων σε προνύμφες *J2 M. incognita***

Για τα υδατικά εκχυλίσματα και για τα αιθέρια έλαια πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε πέντε διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων. Σκοπός της αξιολόγησης της μεμονωμένης παρακολούθησης της κάθε ουσίας ήταν η εύρεση τις τιμές  $EC_{50}$ , καθώς της κατάλληλης συγκέντρωσης ελέγχου σε δυαδικά μίγματα για τη μελέτη του συνεργισμού.

Τα μητρικά διαλύματα των αιθέριων ελαίων λεβάντας (ΑΕΛΑ + ΑΕΛΒ) είχαν συγκέντρωση 5000 ppm. Παρασκευάστηκαν με 5  $\mu$ L της δραστικής ουσίας σε 20  $\mu$ L αιθανόλης και 975  $\mu$ L του φορέα (νερό με Tween-20). Τα διαλύματα παρασκευάστηκαν σε δοχεία Eppendorf και ανακινήθηκαν σε αναδευτήρα Vortex.

Οι συγκεντρώσεις ελέγχου των αιθέριων ελαίων 2000, 1000, 500, 250, 125, 0  $\mu$ L/L. Επομένως, παρασκευάστηκαν αρχικά διαλύματα διπλάσιων συγκεντρώσεων, καθώς στις πλάκες πολυστυρενίου θα αναμιγνύονταν με το αιώρημα των νηματωδών σε νερό, σε αναλογία με τα διαλύματα ελέγχου στο κάθε κελί της πλάκας 1:1 (v/v). Σε κάθε πηγάδι προστέθηκαν 30 νηματώδεις, κατά προσέγγιση, στα 70  $\mu$ L αιωρήματος καθώς και 70  $\mu$ L διαλύματος ελέγχου. Για κάθε μεταχείριση πραγματοποιήθηκαν 5 επαναλήψεις. Επιπλέον, εντός της ίδιας πλάκας σε κάθε μεταχείριση ελέγχθηκε και η καπνιστική δράση της κάθε συγκέντρωσης, εμβαπτίζοντας *J2* σε νερό σε πηγάδια παρακείμενα των διαλυμάτων ελέγχου. Στη συνέχεια οι πλάκες έκλεισαν με καπάκι, ώστε να αποφευχθούν φαινόμενα εξάτμισης, που θα επηρέαζαν την

αποτελεσματικότητα του πειράματος. Οι πλάκες τοποθετήθηκαν σε ελεγχόμενο περιβάλλον με θερμοκρασία στους 28 °C. Για τον έλεγχο της κινητικότητας των J2 χρησιμοποιήθηκε ανάστροφο μικροσκόπιο υπό μεγέθυνση 40x (Εικόνα 6.5). Ο έλεγχος της κινητικότητας πραγματοποιήθηκε στις 24, 48, 72 ώρες από την έναρξη του πειράματος και η τελική ταξινόμηση των προνυμφών ήταν σε κινητές ή ακίνητες.



Εικόνα 6.5 Παρατήρηση κινητών προνυμφών στο ανάστροφο μικροσκόπιο

Η αξιολόγηση του υδατικού εκχυλίσματος του φυτού *M. azedarach* έγινε σε πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Οι συγκεντρώσεις αυτές ήταν τα 2000, 1000, 500, 250, 125 mg/L. Για το συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε το υδατικό εκχύλισμα που παρασκευάστηκε με απευθείας αραίωση σε νερό και οι συγκεντρώσεις τους ήταν εκφρασμένες επί ξηρού βάρους εκχυλίσματος μετά από εξάτμιση όπως αναφέρεται στην υποενότητα 6.4. Επί του εκχυλίσματος έγιναν οι απαιτούμενες αραιώσεις με νερό, ώστε να ληφθούν οι επιθυμητές συγκεντρώσεις. Για τον έλεγχο πρόκλησης παράλυσης ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως και για τα αιθέρια έλαια, δηλαδή έλεγχος πέντε κελιών σε πλάκες πολυστυρενίου για κάθε συγκέντρωση και έλεγχος της καπνιστικής του δράσης σε παρακείμενα κελιά.

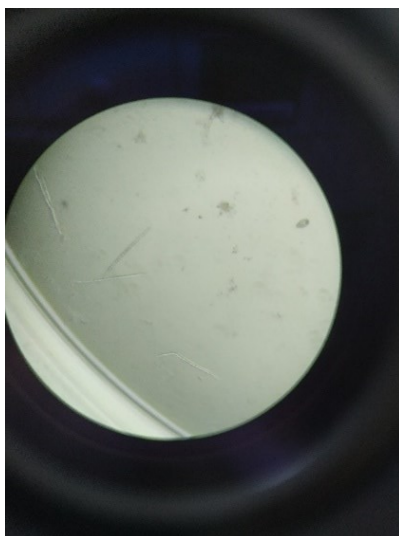
Ο έλεγχος του υδατικού εκχυλίσματος της λεβάντας έγινε σε συγκεντρώσεις 62500 έως 7810  $\mu\text{L/L}$ . Για το υδατικό διάλυμα της λεβάντας ελέγχθηκε και η καπνιστική δράση των μεταχειρίσεων σε παρακείμενα, όπως στις προηγούμενες μεταχειρίσεις.

## 6.9 Δοκιμές πρόκλησης παράλυσης των μυγμάτων των υδατικών εκχυλισμάτων και των αιθέριων ελαίων στην παράλυση των προνυμφών J2 *M. incognita*

Το πρώτο στάδιο του πειράματος αφορούσε την επιλογή των συγκεντρώσεων ελέγχου που είχαν ποσοστό αποτελεσματικότητας παράλυσης των προνυμφών J2 μικρότερο του 50%, για να μελετηθούν μετέπειτα σε δυαδικά μίγματα. Ως συνεργισμός ορίστηκε η αυξημένη δράση του μίγματος των εκχυλισμάτων συγκριτικά με άθροισμα της δράσης των μεμονωμένων μεταχειρίσεων. Για το λόγο αυτό το άθροισμα της μεμονωμένης δράσης των επί μέρους εκχυλισμάτων δεν θα μπορούσε να ξεπερνά το 100%. Αφού βρέθηκαν οι επιθυμητές συγκεντρώσεις, πραγματοποιήθηκε συνδυασμός και των τεσσάρων διαλυμάτων ανά δύο (*M. azedarach*, *L. angustifolia*, ΑΕΛΑ, ΑΕΛΒ). Αναλυτικότερα, για το υδατικό εκχύλισμα *M. Azedarach* και τα διαλύματα των αιθέριων ελαίων επιλέχθηκε η συγκέντρωση των 125 mg/L, ενώ για το υδατικό εκχύλισμα της λεβάντας η συγκέντρωση 7812 μL/L.

Η διαδικασία παρασκευής των μητρικών διαλυμάτων παρέμεινε ίδια με αυτήν που αναλύθηκε προηγουμένως για κάθε διάλυμα. Τα διαλύματα τοποθετήθηκαν σε πλάκες πολυστυρενίου με το αιώρημα νηματωδών σε αναλογία 1:1 (v/v). Σε κάθε κελί της πλάκας προστέθηκαν 30 νηματώδεις, κατά προσέγγιση, σε 70 μL αιωρήματος. Για κάθε μεταχείριση ελέγχθηκαν πέντε πηγάδια της πλάκας πολυστυρενίου. Σε κάθε πλάκα ελέγχθηκε και η καπνιστική δράση του συνδυασμού των μυγμάτων. Για την παρασκευή των μυγμάτων αρχικά παρασκευάστηκαν διαλύματα τετραπλάσιας συγκέντρωσης, ώστε να έρθουν στις επιθυμητές συγκεντρώσεις εντός των πηγαδιών της πλάκας πολυστυρενίου, μετά την ανάμειξη μεταξύ τους (1/1: v/v) και με το και το αιώρημα των νηματωδών (1/1: v/v).

Τέλος, οι πλάκες τοποθετήθηκαν σε ελεγχόμενο περιβάλλον με θερμοκρασία στους 28 °C. Χρησιμοποιήθηκε αντίστροφο μικροσκόπιο υπό μεγέθυνση 40x για τον έλεγχο της κινητικότητας των J2 και ο έλεγχος της κινητικότητας πραγματοποιήθηκε στις 24, 48, 72 ώρες από την έναρξη του πειράματος και η τελική ταξινόμηση των προνυμφών ήταν σε κινητές ή ακίνητες (Εικόνα 6.6).



*Εικόνα 6.6 Παρατήρηση ακίνητων προνυμφών στο ανάστροφο μικροσκόπιο*

### **6.10 Στατιστική ανάλυση**

Κάθε πειραματική μεταχείριση πραγματοποιήθηκε έξι φορές σε πειραματικό σχέδιο πλήρους τυχαιοποίησης, ενώ το κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε δύο φορές. Η ανάλυση των δεδομένων ήταν συνδυασμένη ως προς το χρόνο (δύο πειράματα). Η χρονική στιγμή κατά την οποία πραγματοποιήθηκαν οι δύο επεμβάσεις δεν εμφάνισαν αλληλεπίδραση στην ανάλυση της παραλλακτικότητας, επομένως παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των δύο χρονικών επαναλήψεων για το κάθε πείραμα.

Κατά την πειραματική διαδικασία και συγκεκριμένα την ανάλυση των αποτελεσμάτων βρέθηκε πως η παράλυση στο φορέα (αιθανόλη και νερό με Tween 20) δεν παρουσίασε διαφορές σε σχέση με τις μετρήσεις στο νερό. Επομένως, τα δεδομένα της παράλυσης εκφράστηκαν ως εκατοστιαία ποσοστά των αποτελεσμάτων παράλυσης που αντιστοιχούσαν στη μεταχείριση του μάρτυρα, δηλαδή στο νερό. Η εξίσωση που αποτύπωνε το συγκεκριμένο εγχείρημα βασίστηκε στην εξίσωση των Schneider Orelli's:

$$\text{Αύξηση παράλυσης}\% = \{(\text{παράλυση \% στη μεταχείριση} - \text{παράλυση \% στον μάρτυρα}) / (100 - \text{παράλυση \% στο μάρτυρα})\} * 100.$$

Στην περίπτωση των αναλύσεων που αφορούσαν τις μετρήσεις παράλυσης, ύστερα από εμβάπτιση στα διαλύματα των υδατικών εκχυλισμάτων και των αιθέριων ελαίων, καθώς και τους συνδυασμούς αυτών, τα διορθωμένα σύμφωνα με το μάρτυρα δεδομένα υποβλήθηκαν σε ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) και εφαρμόστηκαν στη

λογαριθμική-λογιστική (log-logistic) εξίσωση των Seefeldt et al, 1995 για τον υπολογισμό των τιμών  $EC_{50}$ ., όπως φαίνεται στην παρακάτω εξίσωση.

$$y = C + \frac{D - C}{1 + \left(\frac{x}{EC_{50}}\right)^b}$$

Στην εξίσωση  $C$  = το χαμηλότερο όριο,  $D$  = το υψηλότερο όριο,  $b$  = η κλίση της ευθείας στον υπολογισμό της τιμής  $EC_{50}$  και  $EC_{50}$  = η συγκέντρωση του αιθέριου ελαίου ή υδατικού εκχυλίσματος που απαιτείται για να προκληθεί 50% αύξηση των ακίνητων προνυμφών δευτέρου σταδίου (J2) σε σχέση με τις προνύμφες που καταμετρούνται στο μάρτυρα. Στη συγκεκριμένη εξίσωση συμμεταβολής, η συγκέντρωση των ουσιών ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) ήταν ο ανεξάρτητος παράγοντας ( $x$ ) και οι ακίνητες προνύμφες J2 (ποσοστιαία αύξηση επί του μάρτυρα) ο εξαρτημένος ( $y$ ).

Όσον αφορά την ανάλυση των πειραματικών δεδομένων, που προέκυψαν από την εμφάνιση στα συνεργιστικά διαλύματα των υδατικών εκχυλισμάτων και των αιθέριων ελαίων, τα διορθωμένα κατά το μάρτυρα δεδομένα υποβλήθηκαν σε περαιτέρω ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) για κάθε χρόνο εμφάνισης (24, 48 και 72 h).

## 7 Αποτελέσματα

### 7.1 Χημική σύσταση αιθέριων ελαίων λεβάντας (ΑΕΛΑ / ΑΕΛΒ)

Τα αποτελέσματα της χημικής ανάλυσης έδειξαν ότι πρόκειται για πολύπλοκα μίγματα πολλών ουσιών. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος GC/MS (Trace GC Ultra gas chromatograph με ανιχνευτή Trace ISQ MS – Thermo Finnigan). Τα δύο δείγματα αναλύθηκαν εις τριπλούν και οι τιμές στους παρακάτω πίνακες είναι οι μέσοι όροι που προέκυψαν και παρουσιάζεται η σύσταση και η εκατοστιαία περιεκτικότητα των συστατικών του κάθε δείγματος. Αναλυτικότερα, στο δείγμα Α τακτοποιήθηκαν 54 συστατικά που αντιστοιχούν στο 98,92% του συνόλου. Τα κύρια συστατικά είναι το Linalyl anthranilate (26,27%), η  $\beta$ -Linalool (24,63%) και ακολουθούν τα trans- $\beta$ -Ocimene,  $\beta$ -Ocimene, ( $\pm$ )-Lavandulyl acetate, 4-Terpineol, Camphol, Caryophyllene και Eucalyptol (p-Cineole).

Στο δείγμα Β τακτοποιήθηκαν 57 συστατικά που αντιστοιχούν στο 99,47% του συνόλου. Τα κύρια συστατικά είναι η  $\beta$ -Linalool (43,28%) και Eucalyptol (p-Cineole) (22,12) και ακολουθούν τα  $\alpha$ -Terpineol και Germacrene D.

Στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 7.1, Πίνακας 7.2) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των αναλύσεων για τα δύο αιθέρια έλαια (ΑΕΛΑ, ΑΕΛΒ).

Πίνακας 7.1 Η σύσταση και η εκατοστιαία περιεκτικότητα του αιθέριου ελαίου λεβάντας Α (ΑΕΛΑ)

| Συστατικά                     | Έκλυση<br>Rt | Περιεκτικότητα<br>(%) |
|-------------------------------|--------------|-----------------------|
| 2-Thujene                     | 6,85         | 0,13                  |
| d- $\alpha$ -Pinene           | 7,08         | 0,40                  |
| Camphene                      | 7,57         | 0,23                  |
| Sabinene<br>(4-Thujene)       | 8,26         | 0,23                  |
| $\beta$ -Pinene               | 8,38         | 0,39                  |
| 1-Octen-3-ol                  | 8,45         | 0,13                  |
| n-Octanone-3                  | 8,59         | 0,44                  |
| $\beta$ -Myrcene              | 8,71         | 0,57                  |
| Butanoic acid,<br>butyl ester | 8,88         | 0,08                  |

|                                                        |              |              |
|--------------------------------------------------------|--------------|--------------|
| 3-Octanol                                              | 8,93         | 0,08         |
| $\alpha$ -Fellandrene                                  | 9,19         | 0,09         |
| 3-Carene                                               | 9,26         | 0,75         |
| n-Hexyl acetate                                        | 9,34         | 0,18         |
| Terpinolene                                            | 9,50         | 0,05         |
| o-Cymene                                               | 9,70         | 0,79         |
| D-Limonene                                             | 9,83         | 0,58         |
| <b>Eucalyptol</b><br><b>(p-Cineole)</b>                | <b>9,91</b>  | <b>2,74</b>  |
| <b>trans-<math>\beta</math>-Ocimene</b>                | <b>10,01</b> | <b>6,15</b>  |
| <b><math>\beta</math>-Ocimene</b>                      | <b>10,30</b> | <b>4,92</b>  |
| $\gamma$ -Terpinene                                    | 10,61        | 0,24         |
| cis- $\beta$ -Terpineol                                | 10,95        | 0,19         |
| $\alpha$ - Terpinolen                                  | 11,32        | 0,31         |
| <b><math>\beta</math>-Linalool</b>                     | <b>11,70</b> | <b>24,63</b> |
| 1-Octen-3-yl-<br>acetate                               | 11,85        | 0,80         |
| cis- $\beta$ -Terpineol                                | 12,31        | 0,04         |
| Myrtenol                                               | 12,64        | 0,05         |
| <b>Camphor,</b><br><b>(1R,4R)-(+)-</b>                 | <b>12,85</b> | <b>1,34</b>  |
| ( $\pm$ )-Lavandulol                                   | 13,24        | 0,88         |
| <b>Camphol</b>                                         | <b>13,45</b> | <b>3,43</b>  |
| <b>(-)-4-Terpineol</b>                                 | <b>13,64</b> | <b>4,08</b>  |
| Ethyl linalool                                         | 13,84        | 0,67         |
| $\alpha$ -Terpineol                                    | 13,96        | 0,99         |
| L-isopulegol                                           | 14,72        | 0,23         |
| <b>Linalyl</b><br><b>anthranilate</b>                  | <b>15,14</b> | <b>26,27</b> |
| Bergamol                                               | 15,58        | 0,03         |
| <b>(<math>\pm</math>)-Lavandulyl</b><br><b>acetate</b> | <b>15,82</b> | <b>5,67</b>  |
| p-Cymen-3-ol                                           | 16,09        | 0,64         |

|                                      |              |             |
|--------------------------------------|--------------|-------------|
| Nerol acetate                        | 17,37        | 0,80        |
| (R)-lavandulyl acetate               | 17,87        | 0,13        |
| Farnesene                            | 17,95        | 0,11        |
| trans- $\alpha$ -Bergamotene         | 18,23        | 0,03        |
| <b><math>\alpha</math>-Santalene</b> | <b>18,58</b> | <b>1,37</b> |
| <b>Caryophyllene</b>                 | <b>18,64</b> | <b>3,44</b> |
| $\alpha$ -Bergamotene                | 18,83        | 0,55        |
| Isocaryophyllene                     | 19,04        | 0,07        |
| (E)- $\beta$ -Farnesene              | 19,14        | 0,77        |
| $\beta$ -Caryophyllen                | 19,30        | 0,22        |
| Germacrene D                         | 19,76        | 0,97        |
| $\beta$ -Bisabolene                  | 20,18        | 0,06        |
| $\gamma$ -Cadinene                   | 20,32        | 0,35        |
| $\beta$ -(Z)-Santalol                | 20,45        | 0,12        |
| Caryophyllene oxide                  | 21,58        | 0,35        |
| Cadinol T                            | 22,56        | 0,12        |

Πίνακας 7.2 Η σύσταση και η εκατοστιαία περιεκτικότητα του αιθέριου ελαίου λεβάντας Β (AEAB)

| Συστατικά                         | Έκλυση<br>Rt | Περιεκτικότητα<br>(%) |
|-----------------------------------|--------------|-----------------------|
| 2-Thujene                         | 6,85         | 0,03                  |
| d- $\alpha$ -Pinene               | 7,08         | 0,92                  |
| Camphene                          | 7,58         | 0,13                  |
| Sabinene<br>(4-Thujene)           | 8,24         | 0,69                  |
| <b><math>\beta</math>-Pinene</b>  | <b>8,39</b>  | <b>1,88</b>           |
| <b><math>\beta</math>-Myrcene</b> | <b>8,71</b>  | <b>1,05</b>           |
| 3-Carene                          | <b>9,27</b>  | <b>0,02</b>           |
| Terpinolene                       | 9,50         | 0,11                  |

|                                              |              |              |
|----------------------------------------------|--------------|--------------|
| o-Cymene                                     | 9,70         | 0,03         |
| <b>Eucalyptol<br/>(p-Cineole)</b>            | <b>9,93</b>  | <b>22,12</b> |
| $\beta$ -Ocimene                             | 10,30        | 0,14         |
| $\gamma$ -Terpinene                          | 10,61        | 0,20         |
| cis- $\beta$ -Terpineol                      | 10,94        | 0,35         |
| E-Linalool oxide<br>(furan)                  | 11,36        | 0,23         |
| cis-Furan linalool<br>oxide                  | 11,45        | 0,02         |
| <b><math>\beta</math>-Linalool</b>           | <b>11,72</b> | <b>43,28</b> |
| 1-Octen-3-yl-<br>acetate                     | 11,85        | 0,02         |
| cis- $\beta$ -Terpineol                      | 12,31        | 0,02         |
| Myrtenol                                     | 12,64        | 0,03         |
| Camphor                                      | 12,85        | 0,39         |
| <b>Camphol</b>                               | <b>13,45</b> | <b>1,24</b>  |
| (-)-4-Terpineol                              | 13,64        | 0,44         |
| L-isopulegol                                 | 14,72        | 0,06         |
| <b>Borneol, acetate,<br/>(1S,2R,4S)-(-)-</b> | <b>15,90</b> | <b>1,28</b>  |
| exo-2-<br>Hydroxycineole<br>acetate          | 16,99        | 0,10         |
| Eugenol                                      | 17,29        | 0,96         |
| alfa.-Copaene                                | 17,78        | 0,30         |
| $\beta$ -Elemene, (-)-                       | 18,02        | 0,95         |
| $\alpha$ -Cubebene                           | 18,12        | 0,07         |
| Caryophyllene                                | 18,64        | 0,14         |
| Cedrene                                      | 18,74        | 0,05         |
| <b><math>\alpha</math>-Bergamotene</b>       | <b>18,83</b> | <b>1,71</b>  |
| $\alpha$ -Guaiene                            | 18,89        | 0,70         |
| E)- $\beta$ -Farnesene                       | 19,14        | 0,13         |

|                                                                                        |              |             |
|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-------------|
| Humulene,<br>( $\alpha$ -Caryophyllene)                                                | 19,30        | 0,56        |
| $\beta$ -Cubebene                                                                      | 19,41        | 0,40        |
| <b>Germacrene D</b>                                                                    | <b>19,76</b> | <b>2,24</b> |
| $\gamma$ -Elemene                                                                      | 20,02        | 0,57        |
| <b><math>\gamma</math>-Cadinene</b>                                                    | <b>20,31</b> | <b>2,52</b> |
| <b>Azulene,<br/>(<math>\alpha</math>-Bulnesene)</b>                                    | <b>20,11</b> | <b>1,40</b> |
| $\delta$ -Cadinene                                                                     | 20,38        | 0,18        |
| L-calamenene                                                                           | 20,44        | 0,26        |
| <b>(-)-Spathulenol</b>                                                                 | <b>21,45</b> | <b>1,14</b> |
| Caryophyllene<br>oxide                                                                 | 21,56        | 0,17        |
| $\alpha$ -Muurolene                                                                    | 21,74        | 0,15        |
| Humulene epoxide<br>2                                                                  | 22,02        | 0,07        |
| (-)-Cubenol                                                                            | 22,09        | 0,86        |
| (-)-Spathulenol                                                                        | 22,38        | 0,10        |
| <b>Cadinol T</b>                                                                       | <b>22,51</b> | <b>5,77</b> |
| $\beta$ -Eudesmol                                                                      | 22,76        | 0,43        |
| Alloaromadendrene<br>oxide-(2)                                                         | 22,83        | 0,10        |
| Ent-Spathulenol                                                                        | 22,99        | 0,10        |
| Ledene oxide-(II)                                                                      | 23,36        | 0,15        |
| 6-Isopropenyl-<br>4,8a-dimethyl-<br>1,2,3,5,6,7,8,8a-<br>octahydro-<br>naphthalen-2-ol | 23,62        | 0,10        |
| trans-<br>Longipinocarveol                                                             | 23,92        | 0,20        |

## 7.2 Δοκιμές πρόκλησης παράλυσης του αιθέριου ελαίου λεβάντας Α' (ΑΕΛΑ) σε προνύμφες J2 *M. incognita*

Η επίδραση του αιθέριου ελαίου λεβάντας Α' (ΑΕΛΑ) στην παράλυση των προνυμφών δευτέρου σταδίου ελέγχθηκε στις 24, 48, 72h από την έναρξη του πειράματος. Στα πηγάδια ελέγχου, στις 24h η τιμή του EC<sub>50</sub> υπολογίστηκε στα 1073.8 μL/L με τυπικό σφάλμα 75.7, στις 48h 677.5 μL/L με τυπικό σφάλμα 47.6 και στις 72h 381.1 μL/L με τυπικό σφάλμα 27.2. Αντίστοιχα, η καπνιστική δράση, που ελέγχθηκε σε παρακείμενα πηγάδια εντός της ίδιας πλάκας και περιείχε αιώρημα νηματωδών και νερό σε αναλογία 1:1, είχε τιμή EC<sub>50</sub> 1284.8 μL/L και τυπικό σφάλμα 93.6 στις 24h, στις 48h 850.4 μL/L και τυπικό σφάλμα 74.3 και στις 72h τιμή 483.6 μL/L και τυπικό σφάλμα 32.0.

Πίνακας 7.3 Επίδραση του ΑΕΛΑ σε J2 *M. incognita*

|      | Εμβάπτιση       |           |                      | Καπνιστική<br>δράση |           |                      |
|------|-----------------|-----------|----------------------|---------------------|-----------|----------------------|
| ΑΕΛΑ | EC 50<br>(μL/L) | Std.Error | 95%<br>Conf.<br>Int. | EC 50<br>(μL/L)     | Std.Error | 95%<br>Conf.<br>Int. |
| 24h  | 1073.8          | 75.7      | 917.2 -<br>1230.4    | 1284.8              | 93.6      | 1091.1 –<br>1478.5   |
| 48h  | 677.5           | 47.6      | 579.1 –<br>775.9     | 850.4               | 74.3      | 696.8 –<br>1004.1    |
| 72h  | 381.1           | 27.2      | 324.8 –<br>437.5     | 483.6               | 32.0      | 417.4 –<br>549.8     |

## 7.3 Δοκιμές πρόκλησης παράλυσης του αιθέριου ελαίου λεβάντας Β' (ΑΕΛΒ) σε προνύμφες J2 *M. incognita*

Αντίστοιχα, ελέγχθηκε και το αιθέριο έλαιο λεβάντας Β' (ΑΕΛΒ) στην παράλυση των J2 στις 24, 48, 72h από την έναρξη του πειράματος. Στα πηγάδια ελέγχου, στις 24h, η τιμή του EC<sub>50</sub> βρέθηκε 1917.3 μL/L με τυπικό σφάλμα 177.9, στις 48h βρέθηκε 350.2 μL/L με τυπικό σφάλμα 79.9, ενώ στις 72h δεν προσδιορίστηκε η τιμή EC<sub>50</sub> διότι η χαμηλότερη συγκέντρωση ελέγχου (125μL/L) προκάλεσε μεγαλύτερη από 50% παράλυση. Όσον αφορά στην καπνιστική δράση, η τιμή EC<sub>50</sub> στις 24 και 48h

αναμένεται μεγαλύτερη από 2000  $\mu\text{L/L}$  και στις 72h βρέθηκε τιμή  $\text{EC}_{50}$  762.5  $\mu\text{L/L}$  με τυπικό σφάλμα 126.7.

Πίνακας 7.4 Επίδραση του ΑΕΛΒ σε *J2 M. incognita*

|      | Εμβάπτιση                    |           |                      | Καπνιστική δράση             |           |                      |
|------|------------------------------|-----------|----------------------|------------------------------|-----------|----------------------|
| ΑΕΛΒ | EC 50<br>( $\mu\text{L/L}$ ) | Std.Error | 95%<br>Conf.<br>Int. | EC 50<br>( $\mu\text{L/L}$ ) | Std.Error | 95%<br>Conf.<br>Int. |
| 24h  | 1917.3                       | 177.9     | 1549.1 –<br>2285.4   | >2000                        | n.a.      | n.a.                 |
| 48h  | 350.2                        | 79.9      | 184.8 –<br>515.6     | >2000                        | n.a.      | n.a.                 |
| 72h  | <125                         | n.a.      | n.a.                 | 762.5                        | 126.7     | 500.4 –<br>1024.6    |

#### 7.4 Επίδραση πρόκλησης παράλυσης του υδατικού εκχυλίσματος του φυτού *Melia azedarach* (YEM) στην παράλυση των προνυμφών *J2 M. incognita*

Το υδατικό εκχύλισμα του φυτού *Melia azedarach* δοκιμάστηκε στα 2000, 1000, 500, 250 και 125  $\text{mg/L}$  για την πρόκληση παράλυσης στις προνύμφες *J2 M. incognita*. Η τιμή του  $\text{EC}_{50}$  του υδατικού εκχυλίσματος των ώριμων αλεσμένων καρπών του φυτού *Melia azedarach* βρέθηκε σε προηγούμενη έρευνα ίση με 500  $\text{mg/L}$  στις 24 ώρες (N. Ntalli et al., 2010).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας η συγκέντρωση ελέγχου των 125  $\text{mg/L}$  του υδατικού εκχυλίσματος του φυτού εμφάνισε 5% θνησιμότητα στις 24 ώρες, 19% στις 48 ώρες και 25% στις 72 ώρες και ήταν αυτή που χρησιμοποιήθηκε στα δυαδικά μίγματα που περιλάμβαναν το υδατικό εκχύλισμα του συγκεκριμένου φυτού.

### 7.5 Επίδραση πρόκλησης παράλυσης του υδατικού εκχυλίσματος του φυτού *Lavandula angustifolia* (YEA) στην παράλυση των προνυμφών J2 *M. incognita*

Στις 24h η τιμή του EC<sub>50</sub> βρέθηκε στα 35264.1 µL/L με τυπικό σφάλμα 2313.5, για τις 48h 46916.9 µL/L με τυπικό σφάλμα 7747.9 και στις 72h 31677.0 µL/L με τυπικό σφάλμα 5220.7.

Πίνακας 7.5 Επίδραση του YEA σε J2 *M. incognita*

|     | Εμβάπτιση               |           |                   |
|-----|-------------------------|-----------|-------------------|
| YEA | EC <sub>50</sub> (µL/L) | Std.Error | 95% Conf. Int.    |
| 24h | 35264.1                 | 2313.5    | 30525.0 – 40003.2 |
| 48h | 46916.9                 | 7747.9    | 31045.9 – 62787.9 |
| 72h | 31677.0                 | 5220.7    | 20982.8 – 42371.1 |

Η συγκέντρωση ελέγχου που έδινε ποσοστά παράλυσης μικρότερα του 50% ήταν η 7812 µL/L και ελέγχθηκε στα πειράματα συνδυασμών.

### 7.6 Επίδραση πρόκλησης παράλυσης του συνδυασμού του υδατικού εκχυλίσματος του φυτού *Lavandula angustifolia* με το αιθέριο έλαιο ΑΕΛΑ

Κατά το συνδυασμό του υδατικού εκχυλίσματος της λεβάντας (YEA) και του αιθέριου ελαίου της λεβάντας Α (ΑΕΛΑ), φάνηκε πως η παράλυση των προνυμφών J2 αυξάνονταν με το πέρασμα του χρόνου. Στις πρώτες 24 ώρες ο συνδυασμός αυτός παρουσιάζει αθροιστική δράση, δηλαδή δεν διέφερε στατιστικά σε σχέση με το άθροισμα της δράσης των επί μέρους συστατικών, ενώ στις 48 και στις 72 ώρες παρουσίασε συνεργιστική δράση.

Πίνακας 7.6 Επίδραση του συνδυαστικού μίγματος ΥΕΛ και ΑΕΛΑ σε J2 *M. incognita*

| <b>Αποτελέσματα συνδυαστικής δράσης μεταξύ του υδατικού εκχυλίσματος της λεβάντας (ΥΕΛ) και του αιθέριου ελαίου λεβάντας Α (ΑΕΛΑ) εναντίον <i>M. incognita</i></b> |                       |                            |                                        |                                                 |                       |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|----------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------|
|                                                                                                                                                                    | Συγκέντρωση<br>(μL/L) | Παρατήρηση<br><sup>a</sup> | Αναμενόμενο<br>αποτέλεσμα <sup>b</sup> | Στατιστικά<br>σημαντική<br>διαφορά <sup>c</sup> | Δράση                 |
| 24h                                                                                                                                                                | 7812/125              | 11 ± 5.9                   | 6 ± 5.6                                | *                                               | Αθροιστική<br>δράση   |
| 48h                                                                                                                                                                |                       | 24 ± 8.7                   | 12 ± 6.7                               | **                                              | Συνεργιστική<br>δράση |
| 72h                                                                                                                                                                |                       | 45 ± 12.6                  | 28 ± 9.8                               | **                                              | Συνεργιστική<br>δράση |

- Παρατήρηση παράλυσης <sup>a</sup>%, αφαιρέθηκε η φυσική παράλυση στο μάρτυρα, έπειτα από εμφάνιση των προνυμφών J2 σε συνδυασμό διαλυμάτων τερπενίων
- Αναμενόμενη παράλυση <sup>b</sup> %, διορθώθηκε σύμφωνα με το μάρτυρα, υπολογίστηκε ως το άθροισμα της παράλυσης που παρατηρήθηκε μετά την εμφάνιση των προνυμφών J2 σε καθαρά διαλύματα τερπενίων
- Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ παρατηρούμενης και αναμενόμενης παράλυσης όπως παρουσιάζεται από κάθε σειρά στον πίνακα (P<0,05). \* Καμία σημαντική διαφορά, \*\* σημαντική διαφορά

Αντίθετα, στον έλεγχο της καπνιστικής δράσης του μίγματος ΥΕΛ και ΑΕΛΑ, που ελέγχθηκε σε παρακείμενα πηγάδια από τα πηγάδια ελέγχου της πλάκας πολυστυρενίου, υπήρξε αθροιστική δράση στις πρώτες 24 ώρες του πειράματος, ανταγωνιστική δράση στις 48 ώρες και στις 72 ώρες ξανά αθροιστική δράση.

Πίνακας 7.7 Έλεγχος καπνιστικής δράσης του συνδυαστικού μίγματος ΥΕΛ και ΑΕΛΑ σε J2 *M. incognita*

| <b>Καπνιστική δράση του συνδυασμού ΥΕΛ και ΑΕΛΑ</b> |                       |                            |                                        |                                                 |                        |
|-----------------------------------------------------|-----------------------|----------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------|
|                                                     | Συγκέντρωση<br>(μL/L) | Παρατήρηση<br><sup>a</sup> | Αναμενόμενο<br>αποτέλεσμα <sup>b</sup> | Στατιστικά<br>σημαντική<br>διαφορά <sup>c</sup> | Δράση                  |
| 24h                                                 | 7812/125              | 14 ± 7.4                   | 25 ± 14.1                              | *                                               | Αθροιστική<br>δράση    |
| 48h                                                 |                       | 11 ± 10.7                  | 27 ± 10.3                              | **                                              | Ανταγωνιστική<br>δράση |
| 72h                                                 |                       | 45 ± 16.7                  | 49 ± 11.8                              | *                                               | Αθροιστική<br>δράση    |

- Παρατήρηση παράλυσης <sup>a</sup>%, αφαιρέθηκε η φυσική παράλυση στο μάρτυρα, έπειτα από εμφάνιση των προνυμφών J2 σε συνδυασμό διαλυμάτων τερπενίων
- Αναμενόμενη παράλυση <sup>b</sup> %, διορθώθηκε σύμφωνα με το μάρτυρα, υπολογίστηκε ως το άθροισμα της παράλυσης που παρατηρήθηκε μετά την εμφάνιση των προνυμφών J2 σε καθαρά διαλύματα τερπενίων

- Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ παρατηρούμενης και αναμενόμενης παράλυσης όπως παρουσιάζεται από κάθε σειρά στον πίνακα ( $P < 0,05$ ). \* Καμία σημαντική διαφορά, \*\* σημαντική διαφορά

## 7.7 Επίδραση πρόκλησης παράλυσης του συνδυασμού του υδατικού εκχυλίσματος του φυτού *Melia azedarach* με υδατικό εκχύλισμα του φυτού *Lavandula angustifolia*

Στη συνέχεια μελετήθηκε η συνδυαστική δράση των δύο υδατικών εκχυλισμάτων YEM και YEA. Τα αποτελέσματα των συγκεκριμένων μετρήσεων λήφθηκαν στις 24, 48, 72 ώρες. Οι ουσίες αυτές ελέγχθηκαν στα 125 mg/L και 7812  $\mu$ L/L αντίστοιχα. Στα πηγάδια ελέγχου της πλάκας πολυστυρενίου, ο συνδυασμός των δύο υδατικών εκχυλισμάτων έδειξε συνεργιστική δράση και στις τρεις μετρήσεις.

Πίνακας 7.8 Επίδραση του συνδυαστικού μίγματος YEA και AEAA σε J2 *M. incognita*

| Αποτελέσματα συνδυαστικής δράσης μεταξύ του υδατικού εκχυλίσματος της <i>Melia azedarach</i> (YEM) και του υδατικού εκχυλίσματος της λεβάντας (YEA) εναντίον <i>M. incognita</i> |                             |                            |                                        |                                                 |                       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------|
|                                                                                                                                                                                  | Συγκέντρωση<br>( $\mu$ L/L) | Παρατήρηση<br><sup>a</sup> | Αναμενόμενο<br>αποτέλεσμα <sup>b</sup> | Στατιστικά<br>σημαντική<br>διαφορά <sup>c</sup> | Δράση                 |
| 24h                                                                                                                                                                              | 7812/125                    | 16 $\pm$ 3.3               | 6 $\pm$ 6.2                            | **                                              | Συνεργιστική<br>δράση |
| 48h                                                                                                                                                                              |                             | 46 $\pm$ 9.5               | 24 $\pm$ 7.7                           | **                                              | Συνεργιστική<br>δράση |
| 72h                                                                                                                                                                              |                             | 54 $\pm$ 11.3              | 32 $\pm$ 14.7                          | **                                              | Συνεργιστική<br>δράση |

- Παρατήρηση παράλυσης <sup>a</sup>%, αφαιρέθηκε η φυσική παράλυση στο μάρτυρα, έπειτα από εμφύσηση των προνυμφών J2 σε συνδυασμό διαλυμάτων τερπενίων
- Αναμενόμενη παράλυση <sup>b</sup>%, διορθώθηκε σύμφωνα με το μάρτυρα, υπολογίστηκε ως το άθροισμα της παράλυσης που παρατηρήθηκε μετά την εμφύσηση των προνυμφών J2 σε καθαρά διαλύματα τερπενίων
- Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ παρατηρούμενης και αναμενόμενης παράλυσης όπως παρουσιάζεται από κάθε σειρά στον πίνακα ( $P < 0,05$ ). \* Καμία σημαντική διαφορά, \*\* σημαντική διαφορά

Στα πηγάδια ελέγχου της καπνιστικής δράσης βρέθηκε αθροιστική δράση των δύο υδατικών εκχυλισμάτων στις 24 ώρες, ενώ στις 48 και στις 72 ώρες βρέθηκε ανταγωνιστική δράση.

Πίνακας 7.9 Έλεγχος καπνιστικής δράσης του συνδυαστικού μίγματος YEM και YEA σε J2 *M. incognita*

| Καπνιστική δράση του συνδυασμού YEM/YEA |                       |                            |                                        |                                                 |                        |
|-----------------------------------------|-----------------------|----------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------|
|                                         | Συγκέντρωση<br>(μL/L) | Παρατήρηση<br><sup>a</sup> | Αναμενόμενο<br>αποτέλεσμα <sup>b</sup> | Στατιστικά<br>σημαντική<br>διαφορά <sup>c</sup> | Δράση                  |
| 24h                                     | 7812/125              | 35 ± 13.7                  | 33 ± 17.7                              | *                                               | Αθροιστική<br>δράση    |
| 48h                                     |                       | 22 ± 4.3                   | 59 ± 15.6                              | **                                              | Ανταγωνιστική<br>δράση |
| 72h                                     |                       | 21 ± 15.2                  | 61 ± 17.5                              | **                                              | Ανταγωνιστική<br>δράση |

- Παρατήρηση παράλυσης <sup>a</sup>%, αφαιρέθηκε η φυσική παράλυση στο μάρτυρα, έπειτα από εμφύσηση των προνυμφών J2 σε συνδυασμό διαλυμάτων τερπενίων
- Αναμενόμενη παράλυση <sup>b</sup>%, διορθώθηκε σύμφωνα με το μάρτυρα, υπολογίστηκε ως το άθροισμα της παράλυσης που παρατηρήθηκε μετά την εμφύσηση των προνυμφών J2 σε καθαρά διαλύματα τερπενίων
- Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ παρατηρούμενης και αναμενόμενης παράλυσης όπως παρουσιάζεται από κάθε σειρά στον πίνακα (P<0,05). \* Καμία σημαντική διαφορά, \*\* σημαντική διαφορά

## 7.8 Επίδραση πρόκλησης παράλυσης του συνδυασμού του υδατικού εκχυλίσματος του φυτού *Melia azedarach* με το αιθέριο έλαιο AEAB

Ο επόμενος συνδυασμός που μελετήθηκε ήταν του YEM και του αιθέριου ελαίου AEAB. Ο συνδυασμός ελέγχθηκε στα 125 mg/L YEM και 125 μL/L AEAB και οι μετρήσεις λήφθηκαν στις 24, 48 και 72 ώρες. Στα πηγάδια ελέγχου του μίγματος παρατηρήθηκε συνεργιστική δράση και στις τρεις μετρήσεις.

Πίνακας 7.10 Επίδραση του συνδυαστικού μίγματος YEM και AEAB σε J2 *M. incognita*

| <b>Αποτελέσματα συνδυαστικής δράσης μεταξύ του υδατικού εκχυλίσματος της <i>Melia azedarach</i> (YEM) και του αιθέριου ελαίου λεβάντας B (AEAB) εναντίον <i>M. incognita</i></b> |                       |                            |                                        |                                                 |                       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|----------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------|
|                                                                                                                                                                                  | Συγκέντρωση<br>(μL/L) | Παρατήρηση<br><sup>a</sup> | Αναμενόμενο<br>αποτέλεσμα <sup>b</sup> | Στατιστικά<br>σημαντική<br>διαφορά <sup>c</sup> | Δράση                 |
| 24h                                                                                                                                                                              | 125/125               | 13 ± 6.3                   | 5 ± 3.7                                | **                                              | Συνεργιστική<br>δράση |
| 48h                                                                                                                                                                              |                       | 45 ± 12.1                  | 28 ± 8.0                               | **                                              | Συνεργιστική<br>δράση |
| 72h                                                                                                                                                                              |                       | 58 ± 9.1                   | 34 ± 8.9                               | **                                              | Συνεργιστική<br>δράση |

- Παρατήρηση παράλυσης <sup>a</sup>%, αφαιρέθηκε η φυσική παράλυση στο μάρτυρα, έπειτα από εμφύσηση των προνυμφών J2 σε συνδυασμό διαλυμάτων τερπενίων
- Αναμενόμενη παράλυση <sup>b</sup> %, διορθώθηκε σύμφωνα με το μάρτυρα, υπολογίστηκε ως το άθροισμα της παράλυσης που παρατηρήθηκε μετά την εμφύσηση των προνυμφών J2 σε καθαρά διαλύματα τερπενίων
- Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ παρατηρούμενης και αναμενόμενης παράλυσης όπως παρουσιάζεται από κάθε σειρά στον πίνακα (P<0,05). \* Καμία σημαντική διαφορά, \*\* σημαντική διαφορά

Στον έλεγχο του συνδυασμού για την καπνιστική δράση βρέθηκαν ικανοποιητικά αποτελέσματα για όλες τις μετρήσεις. Στις 24, 48 και 72 ώρες υπήρξε αθροιστική δράση εναντίον των J2, όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 7.11 Έλεγχος καπνιστικής δράσης του συνδυαστικού μίγματος YEM και AEAB σε J2 *M. incognita*

| <b>Καπνιστική δράση του συνδυασμού YEM/AEAB</b> |                       |                            |                                        |                                                 |                     |
|-------------------------------------------------|-----------------------|----------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------|
|                                                 | Συγκέντρωση<br>(μL/L) | Παρατήρηση<br><sup>a</sup> | Αναμενόμενο<br>αποτέλεσμα <sup>b</sup> | Στατιστικά<br>σημαντική<br>διαφορά <sup>c</sup> | Δράση               |
| 24h                                             | 125/125               | 22 ± 13.1                  | 26 ± 18.8                              | *                                               | Αθροιστική<br>δράση |
| 48h                                             |                       | 35 ± 15.1                  | 51 ± 21.6                              | *                                               | Αθροιστική<br>δράση |
| 72h                                             |                       | 47 ± 13.5                  | 61 ± 14.9                              | *                                               | Αθροιστική<br>δράση |

- Παρατήρηση παράλυσης <sup>a</sup>%, αφαιρέθηκε η φυσική παράλυση στο μάρτυρα, έπειτα από εμφύσηση των προνυμφών J2 σε συνδυασμό διαλυμάτων τερπενίων
- Αναμενόμενη παράλυση <sup>b</sup> %, διορθώθηκε σύμφωνα με το μάρτυρα, υπολογίστηκε ως το άθροισμα της παράλυσης που παρατηρήθηκε μετά την εμφύσηση των προνυμφών J2 σε καθαρά διαλύματα τερπενίων
- Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ παρατηρούμενης και αναμενόμενης παράλυσης όπως παρουσιάζεται από κάθε σειρά στον πίνακα (P<0,05). \* Καμία σημαντική διαφορά, \*\* σημαντική διαφορά

## 7.9 Επίδραση πρόκλησης παράλυσης του συνδυασμού του υδατικού εκχυλίσματος του φυτού *Melia azedarach* με το αιθέριο έλαιο ΑΕΛΑ

Για το συνδυασμό του YEM και του ΑΕΛΑ επιλέχθηκε η συγκέντρωση 125 mg/L και 125  $\mu$ L/L, αντίστοιχα. Στα πηγάδια ελέγχου της πλάκας πολυστυρενίου βρέθηκε αθροιστική δράση στις 24 ώρες από την έναρξη του πειράματος χωρίς στατιστική διαφορά, ανταγωνιστική δράση στις 48 ώρες με σημαντική στατιστική διαφορά και συνεργιστική δράση στις 72 ώρες με σημαντική στατιστική διαφορά.

Πίνακας 7.12 Επίδραση του συνδυαστικού μίγματος YEM και ΑΕΛΑ σε J2 *M. incognita*

| <b>Αποτελέσματα συνδυαστικής δράσης μεταξύ του υδατικού εκχυλίσματος της <i>Melia azedarach</i> (YEM) και του αιθέριου ελαίου λεβάντας Α (ΑΕΛΑ) εναντίον <i>M. incognita</i></b> |                             |                            |                                        |                                                 |                        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------|
|                                                                                                                                                                                  | Συγκέντρωση<br>( $\mu$ L/L) | Παρατήρηση<br><sup>a</sup> | Αναμενόμενο<br>αποτέλεσμα <sup>b</sup> | Στατιστικά<br>σημαντική<br>διαφορά <sup>c</sup> | Δράση                  |
| 24h                                                                                                                                                                              | 125/125                     | 4 $\pm$ 1.8                | 4 $\pm$ 2.8                            | *                                               | Αθροιστική<br>δράση    |
| 48h                                                                                                                                                                              |                             | 14 $\pm$ 6.1               | 27 $\pm$ 6.5                           | **                                              | Ανταγωνιστική<br>δράση |
| 72h                                                                                                                                                                              |                             | 46 $\pm$ 16.5              | 26 $\pm$ 5.7                           | **                                              | Συνεργιστική<br>δράση  |

- Παρατήρηση παράλυσης <sup>a</sup> %, αφαιρέθηκε η φυσική παράλυση στο μάρτυρα, έπειτα από εμφάνιση των προνυμφών J2 σε συνδυασμό διαλυμάτων τερπενίων
- Αναμενόμενη παράλυση <sup>b</sup> %, διορθώθηκε σύμφωνα με το μάρτυρα, υπολογίστηκε ως το άθροισμα της παράλυσης που παρατηρήθηκε μετά την εμφάνιση των προνυμφών J2 σε καθαρά διαλύματα τερπενίων
- Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ παρατηρούμενης και αναμενόμενης παράλυσης όπως παρουσιάζεται από κάθε σειρά στον πίνακα (P<0,05). \* Καμία σημαντική διαφορά, \*\* σημαντική διαφορά

Ο έλεγχος της καπνιστικής δράσης του συνδυασμού έδειξε καλύτερα αποτελέσματα. Αναλυτικότερα, στις 24 ώρες υπήρξε αθροιστική δράση των μιγμάτων, στις 48 ώρες συνεργιστική δράση και στις 72 ώρες αθροιστική δράση.

Πίνακας 7.13 Έλεγχος καπνιστικής δράσης του συνδυαστικού μίγματος YEM και AEΛΑ σε J2 *M. incognita*

| Καπνιστική δράση του συνδυασμού YEM/AEΛΑ |                       |                            |                                        |                                                 |                       |
|------------------------------------------|-----------------------|----------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------|
|                                          | Συγκέντρωση<br>(μL/L) | Παρατήρηση<br><sup>a</sup> | Αναμενόμενο<br>αποτέλεσμα <sup>b</sup> | Στατιστική<br>σημαντική<br>διαφορά <sup>c</sup> | Δράση                 |
| 24h                                      | 125/125               | 20 ± 6.7                   | 32 ± 14.3                              | *                                               | Αθροιστική<br>δράση   |
| 48h                                      |                       | 25 ± 6.9                   | 17 ± 3.2                               | **                                              | Συνεργιστική<br>δράση |
| 72h                                      |                       | 49 ± 10.8                  | 67 ± 21.0                              | *                                               | Αθροιστική<br>δράση   |

- Παρατήρηση παράλυσης <sup>a</sup>%, αφαιρέθηκε η φυσική παράλυση στο μάρτυρα, έπειτα από εμφύσηση των προνυμφών J2 σε συνδυασμό διαλυμάτων τερπενίων
- Αναμενόμενη παράλυση <sup>b</sup> %, διορθώθηκε σύμφωνα με το μάρτυρα, υπολογίστηκε ως το άθροισμα της παράλυσης που παρατηρήθηκε μετά την εμφύσηση των προνυμφών J2 σε καθαρά διαλύματα τερπενίων
- Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ παρατηρούμενης και αναμενόμενης παράλυσης όπως παρουσιάζεται από κάθε σειρά στον πίνακα (P<0,05). \* Καμία σημαντική διαφορά, \*\* σημαντική διαφορά

## 8 Συζήτηση - Συμπεράσματα

Οι κομβονηματώδεις του γένους *Meloidogyne* είναι το πιο καταστροφικό είδος φυτοпараσιτικών νηματωδών για τις καλλιέργειες (Sithole et al., 2021). Διαχρονικά, η καταπολέμηση των κομβονηματωδών επιτυγχάνεται είτε με καλλιεργητικά μέτρα, είτε με τη χρήση γεωργικών φαρμάκων (Chitwood, 2002). Ωστόσο, βάσει των κοινοτικών οδηγιών της Ευρωπαϊκής Ένωσης που διέπουν τον τομέα της γεωργίας και συγκεκριμένα των οδηγιών 91/414/EK και 2009/128/EK, όλο και λιγότερα εμπορικά σκευάσματα με νηματωδοκτόνο δράση είναι διαθέσιμα στην αγορά (Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο, 2009b).

Αντιθέτως, παρατηρείται αρκετά έντονα το φαινόμενο της χρήσης των φυτικών εκχυλισμάτων και των αιθέριων ελαίων όχι μόνο στον τομέα της φυτοπροστασίας, αλλά και στην αντιμετώπιση προβλημάτων υγειονομικού ενδιαφέροντος, όπως είναι ο περιορισμός εχθρών δημόσιας υγείας ή διάφορων παθογόνων.

Αναλυτικότερα, έχουν μελετηθεί εκτενώς οι αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες των αιθέριων ελαίων και των φυτικών εκχυλισμάτων πολλών διαφορετικών φυτών. Η αντιοξειδωτική δράση των αιθέριων ελαίων οφείλεται κυρίως στις φαινολικές ενώσεις που περιέχονται σε αυτά. Σχετικό παράδειγμα αποτελεί η μελέτη του αιθέριου ελαίου και του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Achillea*

*millefolium*, τα οποία αποτελούνταν από πλήθος μονοτερπενίων, όπως οι ουσίες Eucalyptol, camphor, α-terpineol, β-pinene και borneol, που αποτελούσαν το 59,7% της συνολικής σύστασης του αιθέριου ελαίου. Τα αποτελέσματα έδειξαν αρκετά ικανοποιητική αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με λοιπά κοινά αντιοξειδωτικά, αλλά και πολύ καλά αντιμικροβιακά αποτελέσματα εναντίον του βακτηρίου *Clostridium perfringens*, που αποτελεί κίνδυνο για τα ζώα και τον άνθρωπο (Candan et al., 2003).

Πολλοί ερευνητές βασιζόμενοι στα παραπάνω αποτελέσματα δοκίμασαν την επίδραση των αιθέριων ελαίων και των φυτικών εκχυλισμάτων και εναντίον των εντόμων, τόσο υγειονομικού όσο και αγροτικού ενδιαφέροντος. Παράδειγμα αποτελούν οι βιοδοκιμές επίδρασης και απώθησης ορισμένων αιθέριων ελαίων και των συνδυαστικών μιγμάτων τους εναντίον προνυμφών και ενηλίκων ατόμων της σπιτικής μύγας, *Musca domestica*. Δοκιμάστηκαν αιθέρια έλαια από τα φυτά *Chrysopogon zizanioides*, *Cinnamomum zeylanicum* και *Lavandula angustifolia*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ικανοποιητική ωοκτόνο και προνυμφοκτόνο δράση, ενώ επιτεύχθηκε και πλήρης θνησιμότητα (100%) των ενήλικων ατόμων σε πολύ μικρή συγκέντρωση των αιθέριων ελαίων (0,6%). Η δράση των συνδυασμών των αιθέριων ελαίων ανά δύο δεν έδειξε περαιτέρω αποτελεσματικότητα από την μεμονωμένη εφαρμογή των αιθέριων ελαίων ούτε στην περίπτωση δοκιμών σε προνύμφες, ούτε στις δοκιμές στα ενήλικα άτομα (Khater & Geden, 2019).

Ομοίως μελετήθηκε και η δράση δυαδικών μιγμάτων εναντίον των κουνουπιών *Aedes aegypti*. Πιο συγκεκριμένα, δοκιμάστηκαν ορισμένα αιθέρια έλαια σε συγκεντρώσεις 1% και 5%, σε συνδυαστικά μίγματα με διάφορα πυρεθρινοειδή. Από τις δοκιμές βρέθηκε η παρουσία των ελαίων να ενισχύει την τοξική δράση των πυρεθρινοειδών permethrin, deltamethrin, β-cyfluthrin και φυσικών πυρεθρινών εναντίον των κουνουπιών. Τα αιθέρια έλαια 8 φυτών ενίσχυσαν την τοξικότητα του permethrin στις 24 ώρες, 6 φυτών την τοξικότητα των φυσικών πυρεθρινών στις 24 ώρες και 3 φυτών την τοξικότητα του deltamethrin και β-cyfluthrin. Ωστόσο στην περίπτωση του malathion βρέθηκε ανταγωνιστική δράση και παρεμποδίστηκε η αποτελεσματικότητά του (Norris et al., 2019).

Εκτός από την σπιτική μύγα, η επίδραση του αιθέριου ελαίου (EO) του φυτού *Lavandula angustifolia*, καθώς και του φυτού *Thymus vulgaris* δοκιμάστηκε και κατά της πράσινης αφίδας *Myzus persicae*. Μάλιστα, εκτός της επιβεβαιωμένης

μεμονωμένης επίδρασης κάθε ελαίου στην πράσινη αφίδα, μελετήθηκε και η περίπτωση συνδυασμού των δύο αιθέριων ελαίων με τις δραστικές ουσίες imidacloprid και spirotetramat, οι οποίες χρησιμοποιούνται συχνά στην καταπολέμηση του συγκεκριμένου εχθρού. Στα *in vitro* πειράματα συνεργισμού της ουσίας imidacloprid με χαμηλές συγκεντρώσεις των δύο αιθέριων ελαίων παρατηρήθηκε αύξηση της αποτελεσματικότητας της 16-20 φορές. Επιπλέον, με την εφαρμογή του συνδυαστικού μίγματος imidacloprid + ΕΟ βρέθηκε αύξηση 2-3 φορές της αποτελεσματικότητας σε ψεκασμούς φυλλώματος σε σχέση με την εφαρμογή μόνο του imidacloprid. Αντιθέτως, ο συνδυασμός με το spirotetramat είχε ανταγωνιστική δράση και δεν έδωσε επιθυμητά αποτελέσματα (Faraone et al., 2015).

Συνεργιστική δράση των αιθέριων ελαίων βρέθηκε και στην καταπολέμηση του *Planococcus lilacinus* με την εφαρμογή δυαδικών μιγμάτων. Πιο συγκεκριμένα, τα μίγματα geraniol+ L-menthol και L-limonene + geraniol παρουσίασαν ισχυρή συνεργιστική δράση όταν εφαρμόστηκαν σε μικρές συγκεντρώσεις (0,03 μg/έντομο) (Arokiyaraj et al., 2022).

Όσον αφορά τις περιπτώσεις δυαδικών μιγμάτων εναντίον των κομβονηματωδών έχουν μελετηθεί κατά καιρούς συνδυασμοί διάφορων δραστικών ουσιών. Για παράδειγμα, ο συνδυασμός του chloropicrin και του dazomet με το fosthiazate έδειξε καλύτερα αποτελέσματα από ότι η εφαρμογή του fosthiazate μόνη της. Πιο συγκεκριμένα, τα συνδυαστικά μίγματα αύξησαν το χρόνο ημιζωής του fosthiazate στο έδαφος κατά 1,25 φορές, μείωσαν το χρόνο που χρειάζεται το fosthiazate για να διαπεράσει την επιδερμίδα των κομβονηματωδών, ενώ αύξησαν και την απόδοση των καλλιεργειών που εφαρμόστηκαν, σε σχέση με τις ουσίες μεμονωμένες (Huang et al., 2019).

Ο συνδυασμός δύο ή περισσότερων μιγμάτων προερχόμενα από φυτικά εκχυλίσματα φαίνεται να έχει ικανοποιητικά αποτελέσματα εναντίον των κομβονηματωδών του είδους *Meloidogyne incognita*. (Ntalli et al., 2011). Παρόλα αυτά, η συγκεκριμένη τεχνική είναι ακόμα υπό μελέτη, καθώς υπάρχουν λιγοστές έρευνες σχετικές με το συγκεκριμένο θέμα.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε αρχικά η μεμονωμένη δράση δύο υδατικών εκχυλισμάτων και δύο αιθέριων ελαίων στην παράλυση προνυμφών δευτέρου σταδίου του γένους *Meloidogyne incognita*. Τα υδατικά εκχυλίσματα που μελετήθηκαν

προήλθαν από τα φυτά *Lavandula angustifolia* (YEL) μια *Melia azedarach* (YEM), ενώ τα δύο αιθέρια έλαια διαφορετικής σύστασης, ΑΕΛΑ και ΑΕΛΒ, από φυτά λεβάντας. Οι μετρήσεις όλων των μεταχειρίσεων πραγματοποιήθηκαν στις 24, 48 και 72 ώρες από την έναρξη του πειράματος. Αρχικά μελετήθηκε η μεμονωμένη δράση κάθε ουσίας με σκοπό να βρεθούν οι τιμές  $EC_{50}$ . Έτσι, παρατηρήθηκε η νηματοδοκτόνος δράση κάθε ουσίας στις προνύμφες J2 *M. incognita*, αλλά υπολογίστηκε και η τιμή της συγκέντρωσης που θα πρέπει να εφαρμοστεί για κάθε ουσία στην περίπτωση των συνδυαστικών δυαδικών μιγμάτων. Οι ουσίες ΑΕΛΑ, ΑΕΛΒ και YEM μελετήθηκαν στα 2000, 1000, 500, 250, 125  $\mu\text{L/L}$ , ενώ το YEL σε συγκεντρώσεις 249984, 124992, 62496, 31248, 15624, 7812  $\mu\text{L/L}$ . Μελετήθηκε και η καπνιστική δράση για κάθε ουσία σε παρακείμενα πηγάδια από τα πηγάδια ελέγχου. Οι συγκεντρώσεις ελέγχου που αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθούν στα δυαδικά μίγματα ήταν 125  $\mu\text{L/L}$  για τη ΑΕΛΑ, ΑΕΛΒ και 125  $\text{mg/L}$  YEM, ενώ η συγκέντρωση του YEL στα 7812  $\mu\text{L/L}$ .

Στις δοκιμές επίδρασης του ΑΕΛΑ στην παράλυση των προνυμφών *M. incognita* βρέθηκε πως η τιμή  $EC_{50}$  στα πηγάδια ελέγχου ήταν ίση με 1073.8  $\mu\text{L/L}$  στις 24 ώρες από την έναρξη του πειράματος, 677.5  $\mu\text{L/L}$  στις 48 ώρες και 381.1  $\mu\text{L/L}$  στις 72 ώρες. Στον έλεγχο της καπνιστικής δράσης η τιμή  $EC_{50}$  στις 24 ώρες βρέθηκε 1284.8  $\mu\text{L/L}$ , στις 48 ώρες 850.4  $\mu\text{L/L}$  και 483.6  $\mu\text{L/L}$  στις 72 ώρες.

Αντίστοιχα, για το ΑΕΛΒ στα πηγάδια ελέγχου η τιμή  $EC_{50}$  βρέθηκε ίση με 1917.3  $\mu\text{L/L}$  στις 24 ώρες, 350.2  $\mu\text{L/L}$  στις 48 ώρες και <125  $\mu\text{L/L}$  στις 72 ώρες. Στα παρακείμενα πηγάδια κατά τον έλεγχο της καπνιστικής δράσης η τιμή του  $EC_{50}$  βρέθηκε >2000  $\mu\text{L/L}$  στις 24 και στις 48 ώρες από την έναρξη του πειράματος, ενώ στις 72 ώρες βρέθηκε ίση με 762.5  $\mu\text{L/L}$ .

Το ΑΕΛΑ είχε σύσταση 60% βλαστού και 40% ανθέων του φυτού λεβάντας, ενώ το ΑΕΛΒ είχε σύσταση 40% βλαστού και 60% ανθέων. Κατά της δοκιμές επίδρασης στην παράλυση των J2 βρέθηκε πως το ΑΕΛΒ είχε καλύτερα αποτελέσματα σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το ΑΕΛΑ για τις 48 και 72 ώρες από την έναρξη του πειράματος. Ύστερα από την χημική ανάλυση των δύο αιθέριων ελαίων βρέθηκε πως αποτελούνται από τα ίδια συστατικά, ωστόσο η περιεκτικότητα των συστατικών στα αιθέρια έλαια διαφέρει αρκετά, γεγονός που οφείλεται στην διαφορετική αναλογία ανθέων/βλαστών. Η καλύτερη αποτελεσματικότητα του ΑΕΛΒ είναι πολύ πιθανό να

οφείλεται στην υψηλότερη συγκέντρωση της ουσίας β-linalool, η οποία έχει μελετηθεί για την επίδρασή της στους κομβονηματώδεις και εμφανίζει πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα (Chatterjee et al., 1982; Oka et al., 2000).

Στις δοκιμές επίδρασης του YEL στην παράλυση των προνυμφών J2 *M. incognita* βρέθηκε πως η τιμή EC<sub>50</sub> στα πηγάδια ελέγχου ήταν ίση με 35264.1 µL/L στις 24 ώρες, 46916 µL/L στις 48 ώρες και 31677 µL/L στις 72 ώρες.

Οι συνδυασμοί των δυαδικών μιγμάτων που μελετήθηκαν ήταν YEL + YEM, YEL + AEΛA, YEM + AEΛB και YEM + AEΛA. Οι μετρήσεις όλων των δυαδικών μιγμάτων πραγματοποιήθηκαν στις 24, 48 και 72 ώρες από την έναρξη του πειράματος. Επιπλέον, μελετήθηκε και η καπνιστική δράση του κάθε μίγματος σε παρακείμενα πηγάδια από τα πηγάδια ελέγχου της ίδιας πλάκας πολυστυρενίου.

Κατά γενικό κανόνα, η πλειοψηφία των δυαδικών μιγμάτων, που δοκιμάστηκε, εμφάνισε συνεργιστική δράση σε όλους τους χρόνους μέτρησης, πλην ελάχιστων εξαιρέσεων. Αντίστοιχα, στον έλεγχο της καπνιστικής δράσης εμφανίζεται κυρίως αθροιστική δράση των μιγμάτων.

Τα καλύτερα αποτελέσματα από τα δυαδικά μίγματα εμφάνισε ο συνδυασμός YEM + AEΛB. Ο συνδυασμός είχε συνεργιστική δράση σε κάθε μέτρηση στις 24, 48 και 72 ώρες στα πηγάδια ελέγχου. Επιπλέον, στον έλεγχο της καπνιστικής δράσης του μίγματος είχε αθροιστική δράση και στις τρεις μετρήσεις.

Τα αποτελέσματα του YEM + AEΛA διέφεραν σημαντικά από το YEM + AEΛB γεγονός που υποδηλώνει πως ακόμα και πολύ μικρές διαφορές στη σύσταση δύο σχετικά όμοιων αιθέριων ελαίων μπορεί να επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό την αποτελεσματικότητα του μίγματος. Αναλυτικότερα, το δυαδικό μίγμα YEM+AEΛA εμφάνισε στα πηγάδια ελέγχου αθροιστική δράση στις 24 ώρες, ανταγωνιστική δράση στις 48 ώρες και συνεργιστική δράση στις 72 ώρες, ενώ στον έλεγχο της καπνιστικής δράσης είχε αθροιστική δράση στις 24 ώρες, συνεργιστική δράση στις 48 ώρες και αθροιστική δράση στις 72 ώρες από την έναρξη του πειράματος.

Από τα υπόλοιπα μίγματα, το YEL + YEM εμφάνισε συνεργιστική δράση και στις τρεις ημερομηνίες αξιολόγησης εντός των πηγαδιών ελέγχου, ωστόσο στην καπνιστική δράση του μίγματος είχε αθροιστική δράση στις 24 ώρες και ανταγωνιστική στις 48 και 72 ώρες.

Τέλος, σχετικά καλός ήταν και ο συνδυασμός ΥΕΛ + ΑΕΛΑ, ο οποίος εμφάνισε αθροιστική δράση στις 24 ώρες και συνεργιστική δράση στις 48 και στις 72 ώρες στα πηγάδια ελέγχου, ενώ στην καπνιστική δράση εμφάνισε αθροιστική δράση στις 24 ώρες, ανταγωνιστική στις 48 ώρες και αθροιστική στις 72 ώρες.

Στην παρούσα διατριβή, η νηματωδοκτόνος δράση των εκχυλίσμάτων, των αιθέριων ελαίων και των συνδυασμών τους φάνηκε ικανοποιητική σε αρκετές περιπτώσεις κατά τη διάρκεια του πειράματος. Το γεγονός ότι τα υδατικά εκχυλίσματα, καθώς και τα αιθέρια έλαια, προήλθαν από φυτά που συμπεριλαμβάνονται στην εγχώρια χλωρίδα καθιστά πιθανή την ενσωμάτωσή τους σε προγράμματα ολοκληρωμένης αντιμετώπισης των κομβονηματωδών. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας δίνουν το ερέθισμα για περαιτέρω μελέτη της νηματωδοκτόνου δράσης επιπλέον φυτών, αρωματικών και μη, τα οποία μπορούν να αποτελέσουν λύση στην αντιμετώπιση του προβλήματος της μείωσης-απόσυρσης των περισσότερων εμπορικών σκευασμάτων, τα οποία δεν αφορούν μόνο τους νηματώδεις, αλλά και λοιπούς σημαντικούς εχθρούς των καλλιεργειών.

## 9 Βιβλιογραφία

- Absmanner, B., Stadler, R., & Hammes, U. Z. (2013). Phloem development in nematode-induced feeding sites: the implications of auxin and cytokinin. *Frontiers in plant science*, 4, 241.
- Ahmad, G., Khan, A., Khan, A. A., Ali, A., & Mohhamad, H. I. (2021). Biological control: a novel strategy for the control of the plant parasitic nematodes. *Antonie van Leeuwenhoek*, 114(7), 885-912.
- Al-Banna, L., Aburjai, T., & Darwish, R. (2003). Effect of plant eztracts and essential oils on root-knot nematode. *Effect of plant eztracts and essential oils on root-knot nematode*, 1000-1006.
- Andrés, M. F., González-Coloma, A., Sanz, J., Burillo, J., & Sainz, P. (2012). Nematicidal activity of essential oils: a review. *Phytochemistry Reviews*, 11, 371-390.
- Arokiyaraj, C., Bhattacharyya, K., & Reddy, S. G. E. (2022). Toxicity and synergistic activity of compounds from essential oils and their effect on detoxification enzymes against *Planococcus lilacinus*. *Frontiers in plant science*, 13.
- Asadi Sardari, A., Hojat Jalali, A., Bahraminejad, S., & Safaei, D. (2015). Effect of plant extracts on the mortality of root-knot nematodes' J2, *Meloidogyne javanica*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 48(4), 365-375.
- Bernard, G. C., Egnin, M., & Bonsi, C. (2017). The impact of plant-parasitic nematodes on agriculture and methods of control. *Nematology-concepts, diagnosis and control*, 10, 121-151.
- Bird, D. M., & Kaloshian, I. (2003). Are roots special? Nematodes have their say. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62(2), 115-123.
- Blaxter, M., & Koutsovoulos, G. (2015). The evolution of parasitism in Nematoda. *Parasitology*, 142(S1), S26-S39.

- Bohnenstengel, F., Wray, V., Witte, L., Srivastava, R., & Proksch, P. (1999). Insecticidal meliacarpins (C-seco limonoids) from *Melia azedarach*. *Phytochemistry*, 50(6), 977-982.
- Caboni, P., Saba, M., Tocco, G., Casu, L., Murgia, A., Maxia, A., Menkissoglu-Spiroudi, U., & Ntalli, N. (2013). Nematicidal activity of mint aqueous extracts against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(41), 9784-9788.
- Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A., & Akpulat, H. A. (2003). Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan.(Asteraceae). *Journal of ethnopharmacology*, 87(2-3), 215-220.
- Candido, V., d'Addabbo, T., Basile, M., Castronuovo, D., & Miccolis, V. (2008). Greenhouse soil solarization: effect on weeds, nematodes and yield of tomato and melon. *Agronomy for sustainable Development*, 28, 221-230.
- Carpinella, M. C., Giorda, L. M., Ferrayoli, C. G., & Palacios, S. M. (2003). Antifungal effects of different organic extracts from *Melia azedarach* L. on phytopathogenic fungi and their isolated active components. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(9), 2506-2511.
- Cavoski, I., Chami, Z. A., Bouzebboudja, F., Sasanelli, N., Simeone, V., Mondelli, D., Miano, T., Sarais, G., Ntalli, N., & Caboni, P. (2012). *Melia azedarach* controls *Meloidogyne incognita* and triggers plant defense mechanisms on cucumber. *Crop Protection*, 35, 85-90.
- Charleston, D., Kfir, R., Vet, L., & Dicke, M. (2005). Behavioural responses of diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to extracts derived from *Melia azedarach* and *Azadirachta indica*. *Bulletin of entomological research*, 95(5), 457-465.

- Chatterjee, A., Sukul, N., Laskar, S., & Ghoshmajumdar, S. (1982). Nematicidal principles from two species of Lamiaceae. *Journal of Nematology*, 14(1), 118.
- Chitwood, D. J. (2002). Phytochemical based strategies for nematode control. *Annual review of phytopathology*, 40(1), 221-249.
- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2006). Phenols, polyphenols and tannins: an overview. *Plant secondary metabolites: Occurrence, structure and role in the human diet*, 1, 1-25.
- Daferera, D. J., Ziogas, B. N., & Polissiou, M. G. (2000). GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(6), 2576-2581.
- Dropkin, V. (1969). Necrotic reaction of tomatoes and other hosts resistant to *Meloidogyne*: reversal by temperature. *Phytopathology*.
- Elling, A. A. (2013). Major emerging problems with minor *Meloidogyne* species. *Phytopathology*, 103(11), 1092-1102.
- Elshafie, H. S., Camele, I., & Mohamed, A. A. (2023). A Comprehensive review on the biological, agricultural and pharmaceutical properties of secondary metabolites based-plant origin. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3266.
- European Commission. (2023). Agriculture and the Green Deal.
- Faraone, N., Hillier, N. K., & Cutler, G. C. (2015). Plant essential oils synergize and antagonize toxicity of different conventional insecticides against *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *PloS one*, 10(5), e0127774.
- Fuller, V. L., Lilley, C. J., & Urwin, P. E. (2008). Nematode resistance. *New Phytologist*, 180(1), 27-44.
- Gianessi, L. P., & Carpenter, J. E. (1999). *Agricultural biotechnology: Insect control benefits*: National Center for Food and Agricultural Policy Washington, DC.

- Goodell, P., & Ferris, H. (1989). Influence of environmental factors on the hatch and survival of *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, 21(3), 328.
- Gowda, M. T., Rai, A., & Singh, B. (2007). Root knot nematode: A threat to vegetable production and its management.
- Goyal, S., Lambert, C., Cluzet, S., Mérillon, J., & Ramawat, K. G. (2012). Secondary metabolites and plant defence. *Plant defence: Biological control*, 109-138.
- Haegeman, A., Mantelin, S., Jones, J. T., & Gheysen, G. (2012). Functional roles of effectors of plant-parasitic nematodes. *Gene*, 492(1), 19-31.
- Hassan, M. A., Pham, T. H., Shi, H., & Zheng, J. (2013). Nematodes threats to global food security. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B–Soil & Plant Science*, 63(5), 420-425.
- Héral, B., Stierlin, É., Fernandez, X., & Michel, T. (2021). Phytochemicals from the genus *Lavandula*: A review. *Phytochemistry Reviews*, 20, 751-771.
- Hewezi, T., & Baum, T. J. (2013). Manipulation of plant cells by cyst and root-knot nematode effectors. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(1), 9-16.
- Huang, B., Qian, W., GUO, M.-x., FANG, W.-s., WANG, X.-n., WANG, Q.-x., YAN, D.-d., OUYANG, C.-b., Yuan, L., & CAO, A.-c. (2019). The synergistic advantage of combining chloropicrin or dazomet with fosthiazate nematicide to control root-knot nematode in cucumber production. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(9), 2093-2106.
- Hussey, R., & Barker, K. (1973). Comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant disease reporter*.
- Isman, M. B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19(8-10), 603-608.

- Jasmer, D. P., Goverse, A., & Smant, G. (2003). Parasitic nematode interactions with mammals and plants. *Annual review of phytopathology*, 41(1), 245-270.
- Karajeh, M. R. (2008). Interaction of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) and tomato as affected by hydrogen peroxide. *Journal of Plant Protection Research*, 48(2).
- Kavitha, P., Jonathan, E., & Nakkeeran, S. (2011). Life cycle, histopathology and yield loss caused by root knot nematode, *Meloidogyne incognita* on Noni. *Madras Agricultural Journal*, 98(10-12), 386-389.
- Khater, H. F., & Geden, C. J. (2019). Efficacy and repellency of some essential oils and their blends against larval and adult house flies, *Musca domestica* L.(Diptera: Muscidae). *Journal of Vector Ecology*, 44(2), 256-263.
- Kratochvil, R. J., Sardanelli, S., Everts, K., & Gallagher, E. (2004). Evaluation of crop rotation and other cultural practices for management of root-knot and lesion nematodes. *Agronomy Journal*, 96(5), 1419-1428.
- Lavie, D., & Jain, M. K. (1967). Tetranortriterpenoids from *Melia azadirachta* L. *Chemical Communications (London)*(6), 278-280.
- Lee, S. M., Klocke, J. A., Barnby, M. A., Yamasaki, R. B., & Balandrin, M. F. (1991). Insecticidal constituents of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* (Meliaceae): ACS Publications.
- Lis-Balchin, M. (2002). *Lavender: the genus Lavandula*: CRC press.
- Magrans, J. O., Alonso-Prados, J. L., & García-Baudín, J. M. (2002). Importance of considering pesticide stereoisomerism—proposal of a scheme to apply Directive 91/414/EEC framework to pesticide active substances manufactured as isomeric mixtures. *Chemosphere*, 49(5), 461-469.
- McSorley, R., & Gallaher, R. (1993). Effect of crop rotation and tillage on nematode densities in tropical corn. *Journal of Nematology*, 25(4S), 814.

- Messeguer, R., Ganal, M., De Vicente, M., Young, N., Bolkan, H., & Tanksley, S. (1991). High resolution RFLP map around the root knot nematode resistance gene (Mi) in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 82, 529-536.
- Nikoletta, G., & Filippo, C. (2010). Cytotoxic Tirucallane Triterpenoids from *Melia azedarach*. *Fruits. Molecules*, 15, 5866-5877.
- Noble, A., Zenneck, I., & Randall, P. (1996). Leaf litter ash alkalinity and neutralisation of soil acidity. *Plant and Soil*, 179, 293-302.
- Norris, E. J., Gross, A. D., Bartholomay, L. C., & Coats, J. (2019). Plant essential oils synergize various pyrethroid insecticides and antagonize malathion in *Aedes aegypti*. *Medical and veterinary entomology*, 33(4), 453-466.
- Ntalli, N., Menkissoglu-Spiroudi, U., & Giannakou, I. (2010). Nematicidal activity of powder and extracts of *Melia azedarach* fruits against *Meloidogyne incognita*. *Annals of Applied Biology*, 156(2), 309-317.
- Ntalli, N. G., Ferrari, F., Giannakou, I., & Menkissoglu-Spiroudi, U. (2010). Phytochemistry and nematicidal activity of the essential oils from 8 Greek Lamiaceae aromatic plants and 13 terpene components. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(13), 7856-7863.
- Ntalli, N. G., Ferrari, F., Giannakou, I., & Menkissoglu-Spiroudi, U. (2011). Synergistic and antagonistic interactions of terpenes against *Meloidogyne incognita* and the nematicidal activity of essential oils from seven plants indigenous to Greece. *Pest management science*, 67(3), 341-351.
- Ntalli, N. G., Ozalexandridou, E. X., Kasiotis, K. M., Samara, M., & Golfinopoulos, S. K. (2020). Nematicidal activity and phytochemistry of Greek Lamiaceae species. *Agronomy*, 10(8), 1119.
- Ntalli, N. G., Vargiu, S., Menkissoglu-Spiroudi, U., & Caboni, P. (2010). Nematicidal carboxylic acids and aldehydes from *Melia azedarach* fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(21), 11390-11394.

- Oerke, E.-C. (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144(1), 31-43.
- Ohri, P., & Pannu, S. K. (2010). Effect of phenolic compounds on nematodes-A review. *Journal of Applied and Natural Science*, 2(2), 344-350.
- Oka, Y., Nacar, S., Putievsky, E., Ravid, U., Yaniv, Z., & Spiegel, Y. (2000). Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. *Phytopathology*, 90(7), 710-715.
- Ornat, C., & Sorribas, F. (2008). Integrated management of root-knot nematodes in Mediterranean horticultural crops. *Integrated management and biocontrol of vegetable and grain crops nematodes*, 295-319.
- Ornat, C., Sorribas, F., Verdejo-Lucas, S., & Galeano, M. (2001). Effects of planting date on development of *Meloidogyne javanica* on lettuce in northeastern Spain. *Nematropica*, 31(2), 148-149.
- Ozdemir, E., & Gozel, U. (2017). Efficiency of some plant essential oils on root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Journal of Agricultural Science and Technology A*, 7(3), 178-183.
- Pavaraj, M., Bakavathiappan, G., & Baskaran, S. (2012). Evaluation of some plant extracts for their nematicidal properties against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Journal of Biopesticides*, 5, 106.
- Perry, R. N. (2005). An evaluation of types of attractants enabling plant-parasitic nematodes to locate plant roots. *Russian Journal of Nematology*, 13(2), 83.
- Perry, R. N., & Moens, M. (2011). Introduction to plant-parasitic nematodes; modes of parasitism. *Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions*, 3-20.

- Radulescu, C., Stihl, C., Ilie, M., Lazurcă, D., Gruia, R., Olaru, O. T., Bute, O. C., Dulama, I. D., Stirbescu, R. M., & Teodorescu, S. (2017). Characterization of Phenolics in *Lavandula angustifolia*. *Analytical Letters*, 50(17), 2839-2850.
- Ralmi, N., Khandaker, M. M., & Mat, N. (2016). Occurrence and control of root knot nematode in crops: a review. *Australian Journal of Crop Science*, 10(12), 1649-1654.
- Rodrigues, M. M. G. (2022). *Control of the root-knot nematode, Meloidogyne incognita, using plant bioproducts*.
- Rogers, G., & Bird, A. F. (1965). Ultrastructural and histochemical studies of the cells producing the gelatinous matrix in *Meloidogyne*. *Nematologica*, 11(2), 231-238.
- Ryan, M., & Byrne, O. (1988). Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. *Journal of Chemical Ecology*, 14, 1965-1975.
- Sasanelli, N., Konrat, A., Migunova, V., Toderas, I., Iurcu-Straistaru, E., Rusu, S., Bivol, A., Andoni, C., & Veronico, P. (2021). Review on control methods against plant parasitic nematodes applied in southern member states (C Zone) of the European Union. *Agriculture*, 11(7), 602.
- Sasser, J. (1977). Worldwide dissemination and importance of the root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. *Journal of Nematology*, 9(1), 26.
- Sithole, N., Kulkarni, M., Finnie, J., & Van Staden, J. (2021). Potential nematicidal properties of plant extracts against *Meloidogyne incognita*. *South African Journal of Botany*, 139, 409-417.
- Starr, J., Bridge, J., & Cook, R. (2002). Resistance to plant-parasitic nematodes: history, current use and future potential *Plant resistance to parasitic nematodes* (pp. 1-22): Cabi Publishing Wallingford UK.

- Taniwiriyono, D., Berg, H., Riksen, J., Rietjens, I., Djiwantia, S., Kammenga, J., & Murk, A. (2009). Nematicidal activity of plant extracts against the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *The open natural products journal*, 2(1).
- Tapia-Vázquez, I., Montoya-Martínez, A. C., De los Santos-Villalobos, S., Ek-Ramos, M. J., Montesinos-Matías, R., & Martínez-Anaya, C. (2022). Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) a threat to agriculture in Mexico: Biology, current control strategies, and perspectives. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(2), 26.
- Taylor, A., & Sasser, J. (1978). Biology, identification and control of root-knot nematodes. *North Carolina State University Graphics*, 111.
- Tepe, B., Donmez, E., Unlu, M., Candan, F., Daferera, D., Vardar-Unlu, G., Polissiou, M., & Sokmen, A. (2004). Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). *Food chemistry*, 84(4), 519-525.
- Toselli, M., Baldi, E., Sorrenti, G., Quartieri, M., & Marangoni, B. (2010). Evaluation of the effectiveness of soil-applied plant derivatives of Meliaceae species on nitrogen availability to peach trees. *Scientia horticultruae*, 124(2), 183-188.
- Tzortzakakis, E., da Conceicao, I., dos Santos, M., & Abrantes, I. d. O. (2011). Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Greece. *Hellenic Plant Protection Journal*, 4(1), 25-30.
- von Mende, N. (1997). Invasion and migration behaviour of sedentary nematodes. *Cellular and molecular aspects of plant-nematode interactions*, 51-64.
- Vovlas, N., Rapoport, H. F., Jiménez Díaz, R. M., & Castillo, P. (2005). Differences in feeding sites induced by root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., in chickpea. *Phytopathology*, 95(4), 368-375.

- Wubie, M., & Temesgen, Z. (2019). Resistance mechanisms of tomato (*Solanum lycopersicum*) to root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 11(2), 33-40.
- Yigezu Wendimu, G. (2021). Biology, taxonomy, and management of the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in sweet potato. *Advances in Agriculture*, 2021, 1-13.
- Ευρωπαϊκή Ένωση. (2008). *ΑΠΟΦΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ*. Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008D0753&from=EN>.
- Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο. (2009a). Κανονισμός 1107/2009. *Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης*, 50.
- Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο. (2009b). *Οδηγία 2009/128/EK* Ευρωπαϊκή Ένωση Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009L0128&qid=1684328867663>.
- Ζιώγας Β., Μ. Α. (2017). *ΓΕΩΡΓΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ* (Vol. Γ' ). ΑΘΗΝΑ: Greenbooks publications