



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

*"Σύγχρονα Συστήματα Αγροτικής Παραγωγής στο Μεσογειακό Χώρο με
Έμφαση στην Αειφορική Παραγωγή και τη Χρησιμοποίηση Νέων Τεχνολογιών"*

2^η Κατεύθυνση: Σύγχρονη Φυτοπροστασία

**«Αξιολόγηση επιλεγμένων φυτοχημικών ουσιών προς τη
νηματοδοκτόνο δράση τους σε
καλλιέργεια τομάτας»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Θανασενάρης Α. Αναστάσιος
Γεωπόνος Π.Θ.**

Βόλος 2014

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

*"Σύγχρονα Συστήματα Αγροτικής Παραγωγής στο Μεσογειακό Χώρο με
Έμφαση στην Αειφορική Παραγωγή και τη Χρησιμοποίηση Νέων Τεχνολογιών"*

2η Κατεύθυνση: Σύγχρονη Φυτοπροστασία

**«Αξιολόγηση επιλεγμένων φυτοχημικών ουσιών προς τη
νηματοδοκτόνο δράση τους σε
καλλιέργεια τομάτας»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Θανασενάρης Α. Αναστάσιος
Γεωπόνος Π.Θ.**

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

**Τσιρόπουλος Νικόλαος, Καθηγητής (Επιβλέπων)
Αθανασίου Χρήστος, Αναπληρωτής Καθηγητής (Μέλος)
Βέλλιος Ευάγγελος, Επίκουρος Καθηγητής (Μέλος)**

Στα πλαίσια της προστασίας του ανθρώπου και του περιβάλλοντος από τα ανεπιθύμητα υπολείμματα των ξενοβιοτικών ουσιών, αποτέλεσμα εν μέρει της μη ορθής χρήσης των συνθετικών γεωργικών φαρμάκων, η Ευρωπαϊκή νομοθεσία που διέπει την κυκλοφορία τους γίνεται συνεχώς πιο αυστηρή με συνέπεια την απόσυρση μεγάλου αριθμού δραστικών ουσιών και τη δημιουργία κενού στη φυτοπροστατευτική κάλυψη της γεωργίας. Στο πλαίσιο της ολοκληρωμένης διαχείρισης της παραγωγής, μελετώνται σε παγκόσμιο επίπεδο οι φυσικές ουσίες φυτικής προέλευσης, θέτοντας νέες προοπτικές στη φυτοπροστασία. Παραδοσιακά από την αρχαιότητα τα εκχυλίσματα των φυτών, κατεργασμένα ή όχι, έχουν χρησιμοποιηθεί ως μορφές της εναλλακτικής ιατρικής, της φαρμακευτικής αλλά και της φυτοπροστασίας. Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν για τις νηματωδοκτόνες ιδιότητές τους πέντε ουσίες βοτανικής προέλευσης, που προέρχονταν από τα βοτανικά είδη *Melia azedarach*, *Ailanthus altissima* και *Ruta chalepensis* που ανήκουν στις οικογένειες Meliaceae, Simaroubaceae και Rutaceae, αντίστοιχα. Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Σύγχρονα Συστήματα Αγροτικής Παραγωγής στο Μεσογειακό Χώρο με Έμφαση στην Αειφορική Παραγωγή και τη Χρησιμοποίηση Νέων Τεχνολογιών» κατά τα έτη 2012–2014 στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας και Γεωργικής Φαρμακολογίας του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Ν. Τσιρόπουλου.

Ολοκληρώνοντας την προσπάθεια αυτή και πριν από την ανάπτυξή της θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους που συνέβαλαν με κάθε τρόπο στην ολοκλήρωσή της. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον καθηγητή μου κ. Νίκο Τσιρόπουλο για την αποδοχή μου ως υποψήφιο μεταπτυχιακό φοιτητή υπό την επίβλεψή του, για τη συνεχή επιστημονική καθοδήγηση, την άψογη συνεργασία, το ειλικρινές ενδιαφέρον, την εμπιστοσύνη και την αμέριστη υποστήριξη του.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Χρήστο Αθανασίου και Επικουρο Καθηγητή κ. Ευάγγελο Βέλλιο καταρχάς για την αποδοχή του ρόλου τους και την έκτοτε ενεργή συμμετοχή

τους, για το πραγματικό ενδιαφέρον, τη συνεργασία, για τη διαθεσιμότητα τους σε εποικοδομητικές συζητήσεις και τις εύστοχες παρατηρήσεις τους και την εξασφάλιση των απαραίτητων εργαστηριακών υποδομών για την πραγματοποίηση των βιολογικών πειραμάτων με νηματώδεις. Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον κ. Χρήστο Ρούμπο, Γεωπόνο (PhD) για το ενδιαφέρον, τις πολύτιμες συμβουλές του στα θέματα νηματοδολογίας, τη μετάδοση των επιστημονικών του γνώσεων, την υποστήριξη, την εμπύχωση και τη συνεργασία καθόλη τη διάρκεια μεταπτυχιακών σπουδών μου. Επίσης, ευχαριστώ τα “Θερμοκήπια Φαλάνης” για την ευγενική χορήγηση των σπορόφυτων τομάτας αλλά και των φυτοχωμάτων. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους τους φίλους μου που πίστεψαν σε μένα και με ενθάρρυναν σε κάθε στάδιο των σπουδών μου, καθώς και όσους συναδέλφους συμφοιτητές συνέβαλαν με τα σχόλια, την κριτική και τις γνώσεις τους στην αντιμετώπιση των δυσκολιών.

Πάνω από όλους θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου Ανδρέα και Μαρία και την αδελφή μου Έλλη, για το θεμελιώδη ρόλο τους στη ζωή μου και για όλα όσα μου έχουν προσφέρει. Σαν ελάχιστο δείγμα ευγνωμοσύνης και αγάπης αφιερώνω στους γονείς μου την εργασία μου αυτή.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	8
Abstract	9
Κεφάλαιο 1 Βιβλιογραφική ανασκόπηση	10
1.1 Φυτοпараσιτικοί Νηματώδεις	11
1.1.1 Ανασκόπηση της ταξινόμησης και της ονοματολογίας του γένους <i>Meloidogyne</i>	13
1.1.2 Οικονομική σημασία της προσβολής από Κομβονηματώδεις.....	14
1.1.3 Βιολογικός κύκλος νηματωδών του γένους <i>Meloidogyne</i>	16
1.1.4 Συμπτώματα προσβολής και δυνατότητες βελτίωσης των προσβεβλημένων φυτών.....	19
1.2 Μέθοδοι και μέτρα καταπολέμησης των φυτοпараσιτικών νηματωδών	22
1.2.1 Καλλιεργητικά μέτρα	23
1.2.1.1 Ανθεκτικές ποικιλίες.....	23
1.2.1.2 Αμειψισπορά	24
1.2.1.3 Φυτά παγίδες.....	25
1.2.1.4 Απολύμανση του εδάφους με θερμότητα	25
1.2.1.5 Αγρανάπαυση.....	27
1.2.2 Χημική μέθοδος καταπολέμησης.....	27
1.2.3 Βιολογικές μέθοδοι καταπολέμησης	28
1.2.3.1 Με μύκητες και βακτήρια	29
1.2.3.2 Βιοαπολύμανση.....	31
1.2.3.3 Φυσικές ουσίες Φυτικής προέλευσης	32
1.3 Σκευάσματα φυτικής προέλευσης.....	33
1.3.1 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα - φραγμοί στην ανάπτυξη εμπορικών σκευασμάτων βοτανικής προέλευσης.....	33
1.3.2 Σκευάσματα φυτικής προέλευσης – εμπορικά νηματωδοκτόνα έως σήμερα ανά τον κόσμο και την Ελλάδα.....	34
1.3.3 Σκευάσματα φυτικής προέλευσης – έρευνα και πραγματικότητα	35

Κεφάλαιο 2 Νηματωδοκτόνες ουσίες βοτανικής προέλευσης	39
2.1 Εισαγωγή	40
2.2 Οικογένειες φυτών με νηματωδοκτόνες ιδιότητες.....	41
2.3 Μελλοντικές προοπτικές και εμπόδια στα νηματωδοκτόνα φυτικής προέλευσης	48
2.4 Σκοπός της εργασίας	50
Κεφάλαιο 3 Υλικά και μέθοδοι	51
3.1 Ουσίες φυσικής προέλευσης	52
3.2 Ανάπτυξη και συντήρηση του πληθυσμού <i>M. incognita</i>	52
3.2.1 Μέθοδος παραλαβής προνυμφών δευτέρου σταδίου ανάπτυξης (J2).....	52
3.3 Δοκιμές επίδρασης των ουσιών δεκαδιενάλη, δεκενάλη, συνδεκανόνη και φουρφουράλη στην παράλυση των προνυμφών <i>M. incognita</i>	53
3.4 Δοκιμές επίδρασης των ουσιών στο βιολογικό κύκλο του <i>M. incognita</i>	55
3.4.1 Αρχικές δοκιμές επίδρασης των ουσιών δεκαδιενάλη, δεκενάλη, φουρφουράλη και υδροξυμεθυλοφουρφουράλη στο βιολογικό κύκλο του <i>M. incognita</i> σε δύο συγκεντρώσεις.....	56
3.4.2 Δοκιμές επίδρασης των ουσιών δεκαδιενάλη και φουρφουράλη στο βιολογικό κύκλο του <i>M. incognita</i>	58
3.4.3 Δοκιμές επίδρασης των ουσιών δεκαδιενάλη και δεκενάλη, στο βιολογικό κύκλο του <i>M. incognita</i>	59
3.4.4 Δοκιμές επίδρασης της ουσίας συνδεκανόνη στο βιολογικό κύκλο του <i>M. incognita</i>	61
3.5 Στατιστική ανάλυση.....	63
Κεφάλαιο 4 Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	65
4.1 Επίδραση των ουσιών δεκαδιενάλη, δεκενάλη, συνδεκανόνη και φουρφουράλη στην παράλυση των προνυμφών <i>M. incognita</i>	66
4.1.1 Επίδραση της δεκενάλης στην παράλυση των προνυμφών <i>M. incognita</i> ..	66
4.1.2 Επίδραση της δεκαδιενάλης στην παράλυση των προνυμφών <i>M. incognita</i>	69

4.1.3	Επίδραση της συνδεκανόνης στην παράλυση των προνυμφών <i>M. incognita</i>	72
4.1.4	Επίδραση της φουρφουράλης στην παράλυση των προνυμφών <i>M. incognita</i>	75
4.1.5	Επίδραση των μικτών διαλυμάτων δεκαδιενάλης και δεκενάλης στην παράλυση των προνυμφών <i>M. incognita</i>	78
4.2	Επίδραση των ουσιών στο βιολογικό κύκλο του <i>M. incognita</i>	81
4.2.1	Επίδραση των ουσιών δεκαδιενάλη, δεκενάλη, φουρφουράλη και υδροξυμεθυλοφουρφουράλη στο βιολογικό κύκλο του <i>M. incognita</i> σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων.....	81
4.2.2	Επίδραση των ουσιών δεκαδιενάλη και φουρφουράλη στο βιολογικό κύκλο του <i>M. incognita</i>	82
4.2.2.1	Επίδραση της δεκαδιενάλης στο βιολογικό κύκλο του <i>M. incognita</i>	82
4.2.2.2	Επίδραση της φουρφουράλης στο βιολογικό κύκλο του <i>M. incognita</i>	83
4.2.3	Επίδραση των ουσιών δεκαδιενάλη και δεκενάλη στο βιολογικό κύκλο του <i>M. incognita</i>	85
4.2.3.1	Επίδραση της δεκαδιενάλης στο βιολογικό κύκλο του <i>M. incognita</i>	85
4.2.3.2	Επίδραση της δεκενάλης στο βιολογικό κύκλο του <i>M. incognita</i>	88
4.2.3.3	Επίδραση των μικτών διαλυμάτων δεκαδιενάλης και δεκενάλης σε αναλογία 1:1, στο βιολογικό κύκλο του <i>M. incognita</i>	91
4.2.4	Επίδραση της συνδεκανόνης στο βιολογικό κύκλο του <i>M. incognita</i>	94
4.3	Συζήτηση – Συμπεράσματα	97
	Βιβλιογραφία.....	105

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η νηματοδοκτόνος δράση πέντε ουσιών φυτικής προέλευσης (συναντώνται σε φυτικούς ιστούς) εναντίον του κομβονηματώδη *M. incognita*. Τα βιολογικά πειράματα αφορούσαν στην πρόκληση παράλυσης σε προνύμφες δευτέρου σταδίου ανάπτυξης (J2) του *M. incognita* καθώς και στην επίδραση στο βιολογικό κύκλο των κομβονηματωδών εντός της ρίζας προσβεβλημένων φυτών τομάτας. Οι ουσίες φυτικής προέλευσης που μελετήθηκαν ήταν οι (E,E)-2,4-δεκαδιενάλη, (E)-2-ενδεκανόνη, (E)-2-δεκενάλη, φουρφουράλη και 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλη, που συναντώνται μεταξύ άλλων ουσιών στα βοτανικά είδη *Ailanthus altissima*, *Melia azedarach*, *Ruta chalepensis* και που ανήκουν στις οικογένειες Meliaceae, Rutaceae και Simaroubaceae, αντίστοιχα. Στα πειράματα παράλυσης προνυμφών αποδείχθηκε ότι αυξάνοντας τη δόση εφαρμογής όλων των μελετηθέντων ουσιών αυξάνεται το ποσοστό ακίνητων προνυμφών. Η δεκαδιενάλη προέκυψε η πιο δραστική με τιμές $EC_{50/24h}$ και $EC_{50/96h}$ 11,7 και 13,5 mg/L, αντίστοιχα. Για τις υπόλοιπες ουσίες οι τιμές $EC_{50/24h}$ κυμάνθηκαν από 20,7 έως 34 mg/L ενώ αυτές του $EC_{50/96h}$ από 20,9 έως 26,5 mg/L. Σε αρχικά πειράματα βιοδοκιμών σε φυτοδοχεία σε καλλιέργεια τομάτας, ώστε να αξιολογηθεί η νηματοδοκτόνος δράση τους μετά από εφαρμογή τους με ενσωμάτωση στο έδαφος σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων εφαρμογής (300 και 600 mg/kg), όλες οι ουσίες αποδείχτηκε ότι παρουσιάζουν νηματοδοκτόνο δράση και η επίδρασή τους στην ολοκλήρωση του βιολογικού κύκλου των κομβονηματωδών ήταν εμφανής. Σε περαιτέρω πειράματα βιοδοκιμών σε φυτοδοχεία σε καλλιέργεια τομάτας, ώστε να αξιολογηθεί η νηματοδοκτόνος δράση μέσω της εκτίμησης της τιμής EC_{50} για την κάθε ουσία, επαληθεύτηκε πως η δεκαδιενάλη αλλά και η δεκενάλη παρουσιάζουν νηματοδοκτόνο δράση σε όλες τις συγκεντρώσεις εφαρμογής, αλλά και πως ο συνδυασμός τους είναι αποτελεσματικός στη μείωση των θηλυκών προνυμφών *M. incognita*. Η δεκαδιενάλη με τιμή EC_{50} 54,3 mg/kg εδάφους είναι δραστικότερη ως προς την νηματοδοκτόνο δράση της από τις υπόλοιπες ουσίες, ενώ η δεκενάλη (EC_{50} 69,3 mg/kg), ενδεκανόνη και φουρφουράλη ακολουθούν. Είναι η πρώτη αναφορά που πραγματοποιούνται πειράματα βιοδοκιμών σε φυτοδοχεία με τις ανωτέρω ουσίες φυτικής προέλευσης και θέτουν ενδιαφέρουσες προοπτικές χρήσης τους, στο πλαίσιο μιας περιβαλλοντικά προσανατολισμένης καταπολέμησης των εχθρών (νηματωδών) των φυτών.

«Evaluation of selected phytochemical compounds as nematocides in tomato plants»

ABSTRACT

In the present study, five phytochemical compounds (extracted by plant tissues) were studied for their nematicidal activity against the root-knot nematodes *Meloidogyne incognita*. Water based solutions of (E,E)-2,4-decadienal, (E)-2-undecanone, (E)-2-decenal, furfural and 5-hydroxymethylfurfural were used *in vitro* (in ELISA plate microwells) and *in vivo* (in pot experiments with tomato plants) against populations of freshly hatched second-stage juveniles (J2). In microwell experiments increasing the concentration of the studied compounds, resulted in increase of the number of paralyzed juveniles. (E,E)-2,4-Decadienal showed the highest nematicidal activity with $EC_{50/24h}$ and $EC_{50/96h}$ 11.7 and 13.5 mg/L, respectively. Regarding the rest of the compounds tested, $EC_{50/24h}$ ranged from 20.7 to 34 mg/L, while $EC_{50/96h}$ ranged 20.9 to 26.5 mg/L. At preliminary pot experiment, all phytochemicals studied had significant nematicidal activity in both concentrations that were applied (300 and 600 mg/kg). Further pot experiments with tomato plants confirmed that (E,E)-2,4-decadienal and (E)-2-decenal had nematicidal activity in all concentrations studied, and in addition, the combination of (E,E)-2,4-decadienal and (E)-2-decenal decreased significantly the *M. incognita* infestation of tomato roots. (E,E)-2,4-decadienal showed the highest nematicidal activity with EC_{50} 54.3 mg/kg, in comparison with (E)-2-decenal (EC_{50} 69.3 mg/kg), (E)-2-undecanone and furfural. This is the first report on the effect of botanical origin compounds in root-knot nematodes *M. incognita* in pot experiments and raises possibly their use in Integrated Pest Management protocols.

Κεφάλαιο 1 Βιβλιογραφική ανασκόπηση

1.1 Φυτοпараσιτικοί Νηματώδεις

Η λέξη Νηματώδης, (Nematoda ή Nematelminthes) προήλθε από την ελληνική λέξη «νήμα» (thread ή threadworms). Οι νηματώδεις ανήκουν στο Ζωικό Βασίλειο, Υποβασίλειο Metazoa, Φύλο Nematoda, (Chitwood, 1957) και αποτελούν την πολυπληθέστερη και πιο ευμετάβολη ομάδα από τα Μετάζωα, μετά τα Αρθρόποδα. Η διάδοσή τους στη γη είναι ευρεία από τη δυνατότητα που έχουν να προσαρμόζονται και να ζουν λόγω της εσωτερικής και εξωτερικής μορφολογίας τους, όπου μπορεί να υπάρξει ζωή (Hirschmann, 1960).

Αυτοί οι λεπτοί και δραστήριοι σκωληκόμορφοι μικροοργανισμοί συναντώνται στο έδαφος στα γλυκά, θαλάσσια ή υφάλμυρα νερά, όπου υπάρχει οργανική ουσία, με ελεύθερη διαβίωση ή ως ζωικά ή φυτικά παράσιτα. Στη Φυτοπροστασία μας ενδιαφέρουν τα είδη των νηματωδών που προσβάλλουν και προκαλούν ζημιές στα καλλιεργούμενα φυτά και λέγονται φυτοпараσιτικοί νηματώδεις. Οι φυτοпараσιτικοί νηματώδεις είναι πολύπλοκοι, ευκαρυωτικοί, ασπόνδυλοι οργανισμοί και υπάγονται στους πολυπληθέστερους ζωικούς οργανισμούς του πλανήτη. Μερικοί είναι μεταναστευτικά εκτοπαράσιτα και ζουν έξω από τη ρίζα των ξενιστών τους, άλλοι είναι μεταναστευτικά ενδοπαράσιτα και ζουν στο εσωτερικό της ρίζας του ξενιστή τους και άλλοι είναι μη μεταναστευτικοί και ζουν εντός της ρίζας σε συγκεκριμένο σημείο όπου τρέφονται και αναπαράγονται (Raaijmakers et al., 2009).

Οι νηματώδεις σαν φυτικά παράσιτα αποτελούν πολλές φορές ένα σπουδαίο περιοριστικό παράγοντα της ανάπτυξης και της παραγωγής των φυτών με ευρεία διάδοση σ' όλο τον κόσμο (Dao, et al., 1970). Προσβάλλουν όλες γενικά τις καλλιέργειες προκαλώντας ζημιές που μακροσκοπικά μπορούν εύκολα να αποδοθούν σε άλλα παθογόνα ή άλλα αίτια. Τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχθεί η μεγάλη οικονομική σημασία αυτών των παρασίτων σε πολλές περιοχές της χώρας μας, από τις ζημιές που προκαλούν στις διάφορες καλλιέργειες. Συχνά παρατηρούνται προσβολές από διάφορα γένη και είδη νηματωδών, σε σπορεία, κηπευτικές και ανθοκομικές καλλιέργειες, θερμοκήπια ή στον αγρό, και σε φυτώρια ή οπωρώνες.

Οι πιο συχνές με οικονομικό ενδιαφέρον προσβολές, οφείλονται στους νηματώδεις των ριζοκόμβων (κομβονηματώδεις), του γένους *Meloidogyne*, (root-knot

nematodes) ή νηματώδεις του εξοιδητικού των ριζών (Τριανταφύλλου, 1960) και στους κυστογόνους των γενών *Heterodera-Globodera* (cyst nematodes). Είδη *Meloidogyne*, που προκαλούν στις ρίζες εξογκώματα, το γνωστό πατάτιασμα, όταν βρεθούν σε ευνοϊκές συνθήκες, όπως είναι αυτές που επικρατούν για πολύ χρόνο στα θερμοκήπια και δεν καταπολεμηθούν μπορούν όχι μόνο να μειώσουν την παραγωγή αλλά να καταστρέψουν την καλλιέργεια. Παρόμοιες ζημιές παρουσιάζονται συχνά στα ζαχαρότευτλα, στον καπνό και μάλιστα σε αγρούς, που καλλιεργούνται για πολλά χρόνια με τις ίδιες ευπαθείς καλλιέργειες. Από τους νηματώδεις των ριζοκόμβων, καθώς και από άλλα είδη έχουμε συχνά προβλήματα στα φυτώρια των οπωροφόρων δένδρων, στους οπωρώνες, και σε άλλες καλλιέργειες αφού μόνον οι νηματώδεις *Meloidogyne* προσβάλλουν γύρω στα 2.000 καλλιεργούμενα και μη φυτά.

Σοβαρές επίσης ζημιές προκαλούνται συχνά σε ορισμένες καλλιέργειες από τους κυστογόνους νηματώδεις. Έτσι η πατάτα προσβάλλεται από τον χρυσονηματώδη του γένους *Globodera* (*Globodera rostochiensis*). Στις περιπτώσεις αυτές τα φυτά παρουσιάζονται κατά κηλίδες χλωρωτικά, με αραιή, χαμηλή βλάστηση και τελικά όταν η προσβολή προχωρήσει, τα πατατόφυτα χάνονται και τη θέση τους παίρνουν τα αγριόχορτα. Παρόμοια σχεδόν συμπτώματα με ανάλογες ζημιές προκαλούνται στα ζαχαρότευτλα από τον κυστογόνο νηματώδη του γένους *Heterodera*, (*Heterodera schachtii*) καθώς και στα σιτηρά από τον *Heterodera avenae*. Πολύ γνωστός είναι επίσης και ο νηματώδης του σίτου (*Anguina tritici*) που προκαλεί καρουλιάσματα και συστροφές στα φύλλα του σίτου και αργότερα προσβάλλει τους στάχεις και τους κόκκους με αποτέλεσμα την σοβαρή μείωση της παραγωγής ή και την εκμηδένισή της. Εάν στα παραπάνω προστεθεί και η δυνατότητα, που έχουν ορισμένοι νηματώδεις να ενεργούν σαν φορείς διαφόρων ιών (Longidoridae), τότε μπορεί να γίνει μια καλύτερη εκτίμηση, του πόσο επιζήμια μπορεί να γίνουν αυτά τα παράσιτα (Powell, 1971; Pitcher, 1965; Πολυχρονόπουλος, 1970).

Σήμερα με την έρευνα και εκπαίδευση αντιμετωπίζονται με επιτυχία ορισμένοι νηματώδεις. Η επιλογή των πιο κατάλληλων μεθόδων για την έγκαιρη και σωστή διάγνωση και αντιμετώπισή τους σ' ένα σύστημα ολοκληρωμένης καταπολέμησης είναι έργο ειδικά εκπαιδευμένων νηματοδολόγων. Οι μέθοδοι αυτές πρέπει να είναι αποτελεσματικές, οικονομικές και με την μικρότερη κατά το δυνατό δυσμενή επίδραση στο περιβάλλον.

1.1.1 Ανασκόπηση της ταξινόμησης και της ονοματολογίας του γένους *Meloidogyne*

Ιστορικά η ταξινόμηση του γένους *Meloidogyne* Goldi, 1892 μπορεί να χωριστεί σε τρεις βασικές περιόδους. Κατά τη διάρκεια της πρώτης (1855-1878) είχε απλά παρατηρηθεί μια συσχέτιση μεταξύ των κόμβων και των νηματωδών. Στη μακρά περίοδο που ακολούθησε (1879-1948) επικράτησε μια γενικότερη σύγχυση αφού οι κομβονηματώδεις είχαν καταταχθεί στο γένος των κυστωδών νηματωδών (*Heterodera*; Schmidt, 1871). Κατά την τρίτη περίοδο, εντάχθηκαν για πρώτη φορά σε ξεχωριστό γένος (*Meloidogyne*; Chitwood, 1949) του οποίου πολλά είδη περιγράφηκαν και ταξινομήθηκαν (Karssen, 2002).

Η πρώτη αναφορά συσχέτισης της εμφάνισης κόμβων σε ρίζες φυτών, με την αποίκηση από κομβονηματώδεις ήταν το 1855 από τον Άγγλο M. J. Berkeley ο οποίος έκανε την συγκεκριμένη παρατήρηση σε φυτά αγγουριάς. Στην Ευρώπη, η πρώτη αναφορά κομβονηματωδών ήταν το 1879 από τον Γάλλο Cornu και αφορούσε στο βοτανικό είδος *Onobrychis sativa* (*Leguminosae*). Αργότερα ο Goldi (1887) ονόμασε ένα είδος κομβονηματώδη που προσέβαλε φυτείες καφέ στη Βραζιλία, ως *Meloidogyne exigua* χρησιμοποιώντας για πρώτη φορά τη συγκεκριμένη ονομασία για τον προσδιορισμό του γένους. Παρόλα αυτά η συγκεκριμένη αναφορά παρέμεινε άγνωστη στους περισσότερους νηματωδολόγους έως και το 1949, όταν ο Chitwood δημοσίευσε την ανασκόπηση στο γένος *Meloidogyne*, αλλάζοντας τη μέχρι τότε ταξινόμηση των κομβονηματωδών. Συγκεκριμένα, ξεχώρισε τους κομβονηματώδεις από το γένος *Heterodera* και τους κατέταξε στο γένος *Meloidogyne* (Πίνακας 1) προσδιορίζοντας τις αρχές της ταυτοποίησης τους. Σε επίπεδο ειδών ο Chitwood μελέτησε την ταξινόμηση των *Meloidogyne arenaria*, *M. exigua*, *M. incognita* και *M. javanica* (Karssen, 2002).

Για την κατάταξη των ειδών, αρχικά χρησιμοποιήθηκε αποκλειστικά το απλό μικροσκόπιο. Το 1952 ο Sasser εισήγαγε μια νέα μέθοδο που βασιζόταν στην αντίδραση του φυτού ξενιστή στην προσβολή από το νηματώδη, γνωστή έως και σήμερα με το όνομα: “North Carolina differential host test”. Το 1977 χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά η ηλεκτρονική μικροσκοπία για σκοπούς ταυτοποίησης του κομβονηματώδη *Meloidogyne propora* από τον Spaul (Karssen, 2002). Σήμερα η ταυτοποίηση γίνεται βάση ευρωπαϊκής νομοθεσίας που αφορά τα

υλικά και τις μεθόδους (Franklin 2008), ενώ παράλληλά με την ταυτοποίηση βάση των μορφολογικών χαρακτηριστικών χρησιμοποιούνται και μέθοδοι υψηλής ευαισθησίας και ακρίβειας, όπως η ανάλυση DNA (Adam et al., 2006; Tesarova et al., 2003; Adam et al., 2005) και τα ισοένζυμα (Xu et al., 2004).

Πίνακας 1 Η ταξινόμηση των κομβονηματωδών κατά Chitwood 1949.

Βασίλειο	Animalia
Φύλο	Nematoda
Κλάση	Secernentea
Τάξη	Tylenchida
Οικογένεια	Heteroderidae
Γένος	<i>Meloidogyne</i>

1.1.2 Οικονομική σημασία της προσβολής από κομβονηματώδεις

Η ανησυχητική αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού οδηγεί σε επείγουσα ανάγκη για αύξηση παραγωγής εδωδιμων προϊόντων. Αφού το 99% των διατροφικών απαιτήσεων του ανθρώπου και των κατοικίδιων ζώων προέρχεται από χερσαία φυτά, η κάλυψη των τροφικών αναγκών του αυξανόμενου πληθυσμού είναι σχεδόν ολοκληρωτικά εξαρτώμενη από την διαθεσιμότητα της γης για καλλιέργεια. Επιπλέον γη για την αύξηση της γεωργικής παραγωγής θα μπορούσε να βρεθεί στην Αφρική και Λατινική Αμερική αλλά η διαδικασία αυτή έχει μεγάλο οικονομικό και χρονικό κόστος. Επομένως, η αύξηση της απόδοσης της ήδη καλλιεργούμενης γης αποτελεί την μοναδική επιλογή για την αντιμετώπιση της έλλειψης τροφής και του υποσιτισμού. Σε περιοχές που δεν υπάρχουν περιοριστικοί παράγοντες (νερό, θρεπτικά στοιχεία) για την ανάπτυξη των φυτών και το περιβάλλον είναι ευνοϊκό, αύξηση της απόδοσης της καλλιεργούμενης γης επιτυγχάνεται με την αντιμετώπιση των εχθρών και των ασθενειών (Brady, 1985).

Τα ποσοστά απώλειας της παραγωγής, λόγω προσβολής της καλλιέργειας από κομβονηματώδεις, εξαρτώνται γενικά από το στάδιο ανάπτυξης του φυτού ξενιστή κατά την προσβολή, το επίπεδο προσβολής, τις κλιματολογικές συνθήκες και τα μέτρα καταπολέμησης. Τα σύμπλοκα των κομβονηματωδών με μύκητες του εδάφους, όπως *Fusarium oxysporum* και *Rhizoctonia solani*, αυξάνουν τη σοβαρότητα της

προσβολής και τις απώλειες της παραγωγής, μειώνοντας την ανθεκτικότητα του φυτού ξενιστή (Back et al., 2002). Η οικονομική σημασία της προσβολής από *Meloidogyne spp.* για μια δεδομένη γεωγραφική περιοχή εξαρτάται από τη συχνότητα προσβολής και τα σχετικά επίπεδα του πληθυσμού σε σχέση με τα όρια αντοχής της καλλιέργειας (επίπεδο της προσβολής που δεν προκαλεί οικονομική ζημιά), όπου αυτά έχουν προσδιοριστεί. Για παράδειγμα, σε πειράματα σε φυτοδοχεία τα όρια αντοχής στο είδος *Meloidogyne incognita* για την καλλιέργεια της μελιτζάνας, της τομάτας, της αγκινάρας, της πιπεριάς και του λάχανου είναι αντίστοιχα 0.054, 0.55, 1.1, 0.3 και 0.5 αυγά και προνύμφες ανά cm³ εδάφους (Ornat and Sorribas, 2008).

Σε παγκόσμια βάση, το γένος *Meloidogyne* είναι το σημαντικότερο θεωρώντας τις ζημιές που προκαλεί στην αγροτική παραγωγή. Αυτό είναι το συμπέρασμα της εκτίμησης 371 νηματωδολόγων που αντιπροσώπευαν 75 χώρες (Sasser, 1989). Περισσότερα από 2.000 διαφορετικά είδη φυτών συμπεριλαμβανομένων μονοκότυλων, δικότυλων, φυλλωδών και ξυλωδών φυτών παρασιτίζονται από είδη του γένους *Meloidogyne*. Οι αγρότες στις αναπτυσσόμενες χώρες αντιμετωπίζουν σημαντικές απώλειες και οι όγκοι που σχηματίζονται από τον νηματώδη στις ρίζες των προσβεβλημένων φυτών θεωρούνται συχνά λανθασμένα ως “φυσιολογικοί” (Sasser, 1989).

Από τα περισσότερα των 40 ειδών του γένους *Meloidogyne* που έχουν περιγραφεί, 4 έχουν θεωρηθεί ως τα πιο σημαντικά και βρέθηκαν στα ακόλουθα ποσοστά: *M. incognita* 47%, *M. javanica* 40%, *M. arenaria* 7% και *M. hapla* 6% (σύμφωνα με την αναγνώριση 662 πληθυσμών από 76 χώρες με βάση το International Meloidogyne Project) (Sasser, 1980).

Κάποια παραδείγματα ποσοστών ετήσιας απώλειας της παραγωγής από κομβοηματοδείς ανά την Ευρώπη καθώς και των αντίστοιχων επιπέδων της προσβολής των καλλιεργειών είναι: α) η απώλεια του 36 και 21% των θερμοκηπιακών καλλιεργειών τομάτας στη Βόρεια Ισπανία και τις Βαlearίδες νήσους, αντίστοιχα, β) η απώλεια του 50% των θερμοκηπιακών καλλιεργειών και του 27% των υπαιθρίων καλλιεργειών για επίπεδα προσβολής *M. javanica* (41%) και *M. incognita* (50%) στις θερμοκηπιακές και στις υπαίθριες καλλιέργειες της Νοτιοανατολικής Ισπανίας αντίστοιχα. Τα επίπεδα του πληθυσμού στην έναρξη της καλλιεργητικής περιόδου, για τις δυο τελευταίες περιπτώσεις, κυμάνθηκαν από 1 έως

590 προνύμφες και από 1 με 2100 προνύμφες, ανά 250 cm³ εδάφους, για τις ανοιξιότικες και τις θερινές καλλιέργειες αντίστοιχα. Συγκεκριμένα παραδείγματα συσχέτισης των επιπέδων προσβολής με τις απώλειες παραγωγής που βρέθηκε να προκαλούν είναι : α) 4750 προνύμφες *M. javanica* ανά 250 cm³ εδάφους προκάλεσε μείωση της παραγωγής σε επίπεδο 36 και 61% σε θερμοκηπιακή καλλιέργεια μαρουλιού και τομάτας, αντίστοιχα, και β) 1100 προνύμφες *M. javanica* ανά 250cm³ εδάφους προκάλεσε απώλεια παραγωγής σε καλλιέργεια αγγουριού 60% (Ornat and Sorribas, 2008).

1.1.3 Βιολογικός κύκλος νηματωδών του γένους *Meloidogyne*

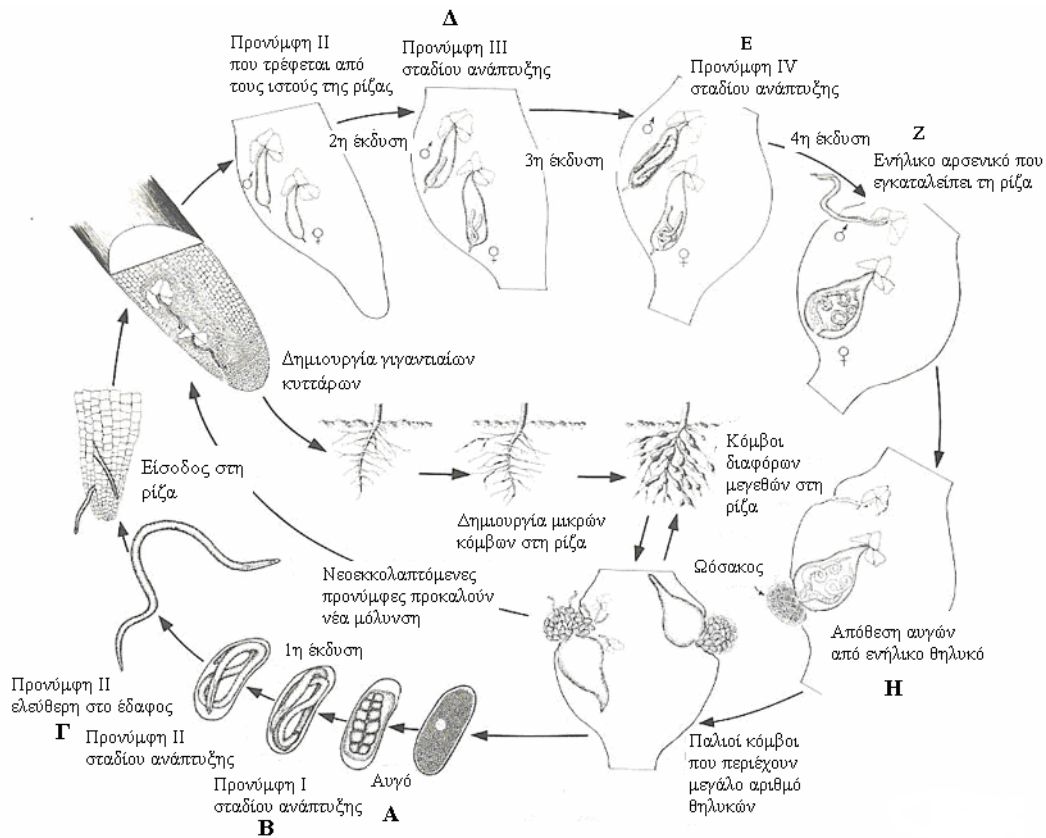
Οι φυτοπαρασιτικοί νηματώδεις είναι υποχρεωτικά παράσιτα και τρέφονται από τα φυτικά κύτταρα. Τα προνυμφικά και ενήλικα στάδια πολλών νηματωδών είναι ενεργά (κινούμενα) για την εύρεση τροφής στην επιφάνεια ή στο εσωτερικό των φυτικών ιστών.

Από το αυγό εκκολάπτεται η προνύμφη που μοιάζει με το ενήλικο και υφίσταται 4 εκδύσεις. Κατά την στιγμή της εκκόλαψής της, η προνύμφη έχει πλήρως ανεπτυγμένα όλα τα οργανικά συστήματα, εκτός από το αναπαραγωγικό. Οι μόνες επομένως μεταβολές που εμφανίζονται κατά την μετεμβρυακή εξέλιξη σε ακμαίο είναι η μικρή αύξηση του μεγέθους του σώματός τους και η ανάπτυξη του αναπαραγωγικού συστήματος.

Υπάρχουν όμως ορισμένα γένη νηματωδών τα οποία κατά το τέλος της ανάπτυξης των προνυμφικών σταδίων εμφανίζουν ουσιώδεις μορφολογικές διαφορές μεταξύ των δύο φύλων. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα θηλυκά άτομα του γένους *Meloidogyne*, τα οποία στο τέλος της ανάπτυξής τους παίρνουν σχήμα λεμονοειδές, απιόμορφο ή σφαιρικό ενώ τα αρσενικά διατηρούν το επίμηκες κυλινδρικό σχήμα τους (φυλετικός σεξουαλικός διμορφισμός). Τα διάφορα είδη του γένους *Meloidogyne* αν και διαφέρουν μεταξύ τους, κυρίως στις σχέσεις τους με τους ξενιστές, έχουν όλα τον ίδιο βιολογικό κύκλο.

Οι προνύμφες που ελευθερώνονται από τα αυγά μέσα στο έδαφος, είναι μικρού μεγέθους και 2^{ου} σταδίου επειδή έχουν ήδη υποστεί μια έκδυση μέσα στο αυγό. Η προνύμφη μετακινείται προς τις ρίζες από ερεθίσματα προερχόμενα από τα φυτά και εισέρχεται σχεδόν σε όλα τα μέρη του φυτού-ξενιστή που έρχονται σε

επαφή με το υγρό έδαφος και κυρίως στο ακραίο και τρυφερό μέρος των ριζιδίων, τρέφεται εις βάρος τους και αυξάνει σε μέγεθος.



Εικόνα 1 Βιολογικός κύκλος των κομβοηματοδών *Meloidogyne spp.* (A) Διαφοροποιημένο αυγό (πέντε κυττάρων), (B) Αυγό που εμπεριέχει προνύμφη πρώτου σταδίου ανάπτυξης, (Γ) Προνύμφη δευτέρου σταδίου ανάπτυξης (μολυσματικό στάδιο), (Δ) Προνύμφη τρίτου σταδίου ανάπτυξης, (E) Προνύμφες τέταρτου σταδίου ανάπτυξης πλήρως διαφοροποιημένες φυλετικά, (Z) Ενήλικο θηλυκό και αρσενικό (H) Ενήλικο θηλυκό που έχει ωοτοκήσει σε ωόσακκο και ενήλικο αρσενικό (Ntalli et al., 2010).

Μετά από την διείσδυση μεταναστεύει ανάμεσα στα κύτταρα, στο παρέγχυμα στην περιοχή της διαφοροποίησης των κυττάρων και εγκαθιστά μόνιμη θέση θρέψεως στην περιφέρεια του αγγειακού ιστού. Η θρέψη μετασχηματίζει κανονικά κύτταρα σε πολυσύνθετα θρεπτικά γιγαντιαία κύτταρα και οι ιστοί γύρω από τον νηματώδη και το σημείο θρέψεως υφίσταται υπερπλασία και υπερτροφία προκαλώντας όγκους. Η φυσιολογία των μολυσμένων φυτών μεταβάλλεται δραστικά εξαιτίας της θρέψης των νηματωδών με συνέπειες δυσμενείς στην διατροφή, φωτοσύνθεση και ικανότητα προσρόφησης νερού.

Από τις προνύμφες άλλες θα εξελιχθούν σε αρσενικά και άλλες σε θηλυκά άτομα. Τα μεν αρσενικά αποκτούν το σκωληκόμορφο σχήμα, εγκαταλείπουν τις ρίζες και κινούνται ελεύθερα μέσα στο έδαφος. Τα δε θηλυκά παραμένουν καθ' όλη την υπόλοιπη ζωή τους μέσα στους φυτικούς ιστούς. Θα πρέπει να αναφέρουμε ότι ο σεξουαλικός διαχωρισμός δεν είναι προκαθορισμένος αλλά εξαρτάται κυρίως από την διαθεσιμότητα τροφής. Στα περισσότερα είδη η αναπαραγωγή γίνεται παρθενογενετικά. Η ανάπτυξη του γένους *Meloidogyne* και η συμπλήρωση του βιολογικού του κύκλου εξαρτάται από την θρεπτική κατάσταση του ξενιστή και τις συνθήκες του περιβάλλοντος, κυρίως την θερμοκρασία.

Το ώριμο αναπαραγωγικά θηλυκό εκκρίνει μια ζελατινώδη ουσία μέσα στην οποία τοποθετεί στην συνέχεια τα αυγά του. Η ουσία αυτή χρησιμεύει για να συγκρατεί τα αυγά σε ομάδα, σχηματίζει δε ένα προστατευτικό περίβλημα τον ωόσακκο.



Εικόνα 2 Απεικόνιση νηματωδών του γένους *Meloidogyne* και των συμπτωμάτων της προσβολής που προκαλούν σε ρίζες φυτών ξενιστών. (I) Αυγά στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, (II) Προνύμφη δευτέρου σταδίου ανάπτυξης στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, (III) Ενήλικο θηλυκό στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, (IV) Ρίζα προσβεβλημένη από κομβοηματούδεις, (V) Ριζικό σύστημα προσβεβλημένο από κομβοηματούδεις και εμφανείς ωόσακκοι και (VI) Υγής ρίζα.

Ο ωόσακκος προστατεύει τα αυγά από την απώλεια υγρασίας και από τις αντίξοες συνθήκες του περιβάλλοντος (Wallace, 1968), καθώς και από επιβλαβείς

μικροοργανισμούς που υπάρχουν στο έδαφος. Με το πέρας του χρόνου αλλάζει το χρώμα του από διάφανο σε σκούρο κίτρινο (Byrd, 1958). Ο βιολογικός κύκλος διαρκεί από 3 εβδομάδες έως και πολλούς μήνες εξαρτώμενος από την θερμοκρασία εδάφους, το είδος και την καταλληλότητα των φυτών-ξενιστών. Το θηλυκό μπορεί να γεννήσει μέχρι και 2.000 αυγά με μέσο όρο 300-500.

Τα είδη *M. incognita*, *M. javanica* και *M. arenaria*, αναπαράγονται αποκλειστικά με μιτωτική παρθενογένεση. Η θερμοκρασία είναι ο κύριος παράγοντας για την ανάπτυξη των εμβρύων, την εκκόλαψη, την είσοδο στα φυτά, την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή (Madulu and Trudgil, 1994; Trudgill, 1995). Εκτός από την θερμοκρασία αρκετοί άλλοι παράγοντες όπως η υγρασία, το φως, η ποιότητα του φυτού ξενιστή, η σύσταση του εδάφους και η ωσμωτική πίεση επηρεάζουν επίσης την βιολογία του νηματώδη και την σοβαρότητα της ασθένειας των φυτών που προσβάλλονται (Hussey, 1985, Van Gundy, 1985).

1.1.4 Συμπτώματα προσβολής και δυνατότητες βελτίωσης των προσβεβλημένων φυτών

Οι ζημιές που προκαλούνται από τους νηματώδεις στα φυτά μπορεί να είναι:

1. Μηχανικές. Δηλαδή βλάβες που προκαλούνται από τον τρόπο που προσβάλλουν οι νηματώδεις με το στίλετο τους τον ιστό του φυτού ή από την κίνησή τους ανάμεσα ή μέσα στα κύτταρα του φυτού.
2. Νεκρώσεις. Επιδερμικές ή κυτταρικές που προκαλούνται κατά τον παρασιτισμό από δευτερογενή αίτια (ένζυμα, παθογόνα) ή κατά την είσοδο ορισμένων ειδών νηματωδών μέσα στους φυτικούς ιστούς.
3. Μολύνσεις. Διάφορες ιώσεις ή άλλες ασθένειες μπορούν να μεταδοθούν στα φυτά κατά τον παρασιτισμό τους, από διάφορα είδη νηματωδών. Οι ασθένειες αυτές μπορεί να είναι πιο καταστρεπτικές από τους νηματώδεις.
4. Παρακμή του φυτού. Από την απορρόφηση των χυμών του φυτού για την διατροφή των παράσιτων (Christie, 1959).

Τα συμπτώματα στα φυτά από προσβολές των νηματωδών διαφέρουν πολύ και εξαρτώνται:

1. Από το είδος του παρασίτου.
2. Από το είδος και την ηλικία του φυτού.
3. Από τις συνθήκες, στις οποίες μεγαλώνει το φυτό.

Την προσβολή των νηματωδών στα φυτά μπορούμε να υποψιαστούμε, όταν μέσα στην καλλιέργεια εμφανίζονται κηλίδες με φυτά πτωχής ανάπτυξης και ασθενικά, σε σύγκριση με άλλα σποραδικά υγιή φυτά, με μεγάλη και ζωηρή ανάπτυξη. Στις περιπτώσεις, που οι νηματώδεις προσβάλλουν το υπόγειο μέρος των φυτών, τα συμπτώματα στο υπέργειο μέρος του φυτού μοιάζουν με εκείνα που προκαλούνται, όταν οι ρίζες του φυτού δεν λειτουργούν καλά ή όταν λείπουν ορισμένα θρεπτικά συστατικά (τροφοπενίες). Η μόλυνση των φυτών από κομβονηματώδεις σε νεαρό στάδιο ανάπτυξης μπορεί να προκαλέσει θάνατο, ενώ μόλυνση σε μεταγενέστερα στάδια μειώνει απλά την παραγωγή της καλλιέργειας (Ornat and Sarribas, 2008).



Εικόνα 3 Συμπτώματα από κομβονηματώδεις (*Meloidogyne incognita*). (I) Προσβολή φυτού ντομάτας σε νεαρό στάδιο ανάπτυξης, όπου έχει προκαλέσει την νέκρωσή του, (II) Συμπτώματα στο υπέργειο μέρος, που παρομοιάζουν με τροφοπενία.

A. Συμπτώματα στο υπέργειο μέρος

1. Τα φυτά, μεμονωμένα ή κατά κηλίδες, χάνουν τη ζωηρότητα και την ευρωστία τους, σε μικρό η μεγάλο βαθμό.

2. Οι καρποί των λαχανικών και φρούτων γίνονται μικροί και υστερούν σε ποιότητα.
3. Τα φυτά παρουσιάζουν μάρανση σε διάφορο βαθμό και σε σοβαρές προσβολές νεκρώνονται.
4. Νεκρώσεις και μεταχρωματισμοί εμφανίζονται στα στελέχη και στα φύλλα, επίσης νέκρωση και εκφυλισμός στους οφθαλμούς.
5. Παραμορφώσεις στα στελέχη, βλαστούς, φύλλα (αναδιπλώσεις, συστροφές) και μετατροπή των σπόρων σε σποροκηκίδες.
6. Καθυστέρηση της βλάστησης, νανισμός.
7. Σχηματισμός φυματίων στα φύλλα, στα στελέχη και στους καρπούς..
8. Νέκρωση βραχιόνων, μικροφυλλία, φυλλόπτωση (κυρίως σε δένδρα).

B. Συμπτώματα στο υπόγειο μέρος

1. Κόμβοι και εξογκώματα πάνω στις ρίζες.
2. Μεταχρωματισμός των ριζών, εξελκώσεις.
3. Σάπισμα των ριζών, νεκρώσεις.
4. Συστροφές και διόγκωση των λεπτών ριζιδίων.
5. Υπερβολική διακλάδωση των ριζών (θυσανωτή ρίζα).
6. Διακοπή της ανάπτυξης της ρίζας, παραγωγή πλαγίων ριζιδίων.

Ορισμένα συμπτώματα όπως οι συστροφές των φύλλων και η μετατροπή του σπόρου του σιταριού σε κηκιδόμορφους κόκκους με πολλές χιλιάδες νύμφες μπορούν να οδηγήσουν στην παρουσία του νηματώδη του σίτου, *Anguina tritici*. Κόμβοι και εξογκώματα στις ρίζες των κηπευτικών, ζαχαροτεύτων, καπνού κλπ. μπορεί να αποδοθούν σε προσβολές από τους νηματώδεις των ριζοκόμβων (*Meloidogyne spp.*). Φυτά ζαχαρότευτων με αραιό, μικρό και κιτρινωπό φύλλωμα, με μακρείς μίσχους και πράσινη σκούρα κορυφή, με υπερβολική ανάπτυξη πλάγιων ριζιδίων, που τα περισσότερα έχουν νεκρωθεί, μαρτυρούν την παρουσία του κυστονηματώδη των ζαχαρότευτων *Heterodera schachtii*. Νεαρά φυτά βρώμης, με ορθωτά (λογχοειδή)

κιτρινοκόκκινα φύλλα και αργότερα με ρίζα θυσανωτή υπερβολικά διακλαδωμένη, προδίδουν την παρουσία του νηματώδη των σιτηρών *Heterodera avenae* (Wallace, 1963). Τα προσβεβλημένα από τους νηματώδεις φυτά συνήθως δεν αντιδρούν στα λιπάσματα τόσο καλά όσο τα υγιή. Εν τούτοις η κατάσταση των φυτών είναι δυνατόν, μερικές φορές να βελτιωθεί, με μεγάλες δόσεις λιπασμάτων και αρδεύσεις.

Η επιβίωση του νηματώδη απουσία του φυτού ξενιστή επηρεάζεται από τη θερμοκρασία και υγρασία του εδάφους. Ως άριστες θερμοκρασίες επιβίωσης των αυγών και των προνυμφών βρέθηκαν οι θερμοκρασίες μεταξύ 10 και 15° C. Με βάση τα παραπάνω, η γνώση των αναγκών του κάθε είδους νηματώδη σε θερμότητα επιτρέπει την πρόβλεψη της πορείας ανάπτυξης του πληθυσμού του, υπό συγκεκριμένες συνθήκες, άρα και τη λήψη κατάλληλων μέτρων καταπολέμησης (Ornat and Sorribas, 2008).

1.2 Μέθοδοι και μέτρα καταπολέμησης των φυτοпараσιτικών νηματωδών

Τα τελευταία χρόνια, οι ανθεκτικές ποικιλίες και τα νηματωδοκτόνα χρησιμοποιούνται ευρέως στην αντιμετώπιση των φυτοπαρασιτικών νηματωδών. Η ανθεκτικότητα των φυτών είναι μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος, παρόλα αυτά σε πολλές περιπτώσεις, η μεγάλη πίεση επιλογής, οδήγησε στη μη ανοχή των ανθεκτικών ποικιλιών. Επίσης, τα περισσότερα νηματωδοκτόνα, προοδευτικά απαγορεύτηκαν, ως τοξικά για τον άνθρωπο και το περιβάλλον. Επιπλέον εμφανίζονται νέα είδη νηματωδών και ανθεκτικοί νηματώδεις σε νηματωδοκτόνα. Επίσης η επαναλαμβανόμενη χρήση των νηματωδοκτόνων οδηγεί στην γρήγορη βιοαποδόμηση τους στο έδαφος από μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται. Ο μικρός αριθμός των συνθετικών νηματωδοκτόνων σε συνδυασμό με την ανεπαρκή αποτελεσματικότητά τους, κυρίως λόγω της βιοαποδόμησής τους στο έδαφος, δημιουργεί μεγάλη ανάγκη για εύρεση εναλλακτικών μεθόδων καταπολέμησης των νηματωδών.

Τα μέτρα αντιμετώπισης χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, σε αυτά που εφαρμόζουμε σε έναν αγρό που είναι είδη προσβεβλημένος από νηματώδεις και αυτά που εφαρμόζονται όταν δεν υπάρχει εγκατεστημένος ο νηματώδης. Στην πρώτη περίπτωση εφαρμόζονται κυρίως μέτρα αντιμετώπισης ενώ στην δεύτερη μέτρα

πρόληψης για την αποφυγή εγκατάστασης. Τα μέτρα πρόληψης, μπορούμε να τα κατατάξουμε σε επίπεδο παραγωγού και σε επίπεδο κράτους. Στην πρώτη περίπτωση τα μέτρα υγιεινής που παίρνει ο παραγωγός έχουν καθοριστική σημασία, για την αποτροπή μόλυνσης. Η υιοθέτηση νομοθετικών μέτρων και η διενέργεια φυτουγειονομικών ελέγχων μπορεί να εφαρμοστεί σε επίπεδο κράτους. Τα μέτρα πρόληψης είναι πολύ σημαντικά διότι από την στιγμή που ένας αγρός μολύνθηκε είναι αδύνατο να απαλλαγεί από τους νηματώδεις. Τα μέτρα αντιμετώπισης χωρίζονται στις φυσικές, καλλιεργητικές, βιολογικές και χημικές μεθόδους. Σίγουρα δεν πρέπει να ξεχνάμε την υιοθέτηση ορίων επέμβασης, που όμως στην συγκεκριμένη περίπτωση, λόγω του τεράστιου δυναμικού αναπαραγωγής των νηματωδών (>2000 αυγά/θηλυκό), από πολλές έρευνες και μελέτες ορίζεται ως 1νημ/1kg εδάφους. Γενικά η οικονομική ζημιά της προσβολής από κομβονηματώδεις είναι μεγαλύτερη στις καλλιέργειες υπό κάλυψη σε σχέση με τις υπαίθριες, λόγω της εντατικοποίησης τους και του ευνοϊκότερου των συνθηκών για τους νηματώδεις. Παρακάτω περιγράφονται οι κυριότερες μέθοδοι και μέτρα καταπολέμησης των κομβονηματωδών.

1.2.1 Καλλιεργητικά Μέτρα

1.2.1.1 Ανθεκτικές Ποικιλίες

Πρόκειται για ποικιλίες καλλιεργούμενων φυτών, ιδιαίτερα λαχανικών, που διατίθενται στο εμπόριο μετά από γενετική βελτίωση με ενσωματωμένα γονίδια ανθεκτικότητας. Συνεργιστικά μαζί με άλλες μεθόδους έχουν βρεθεί πολύ καλά αποτελέσματα. Η έκφραση της ανθεκτικότητας αφορά κατά κύριο λόγο στους φραγμούς εισόδου των νηματωδών στη ρίζα του ανθεκτικού φυτού ή σε άμυνες που σχετίζονται με τη θρέψη ή στην έκφραση αντίδρασης υπερευαισθησίας (Kaplan and Keen, 1980). Στην περίπτωση της τομάτας η ανθεκτικότητα βασίζεται στο κυρίαρχο γονίδιο Mi, το οποίο έχει απομονωθεί από το άγριο είδος τομάτας *Lycopersicon peruvianum* και προσδίδει ανθεκτικότητα στο φυτό έναντι των ειδών *M. incognita*, *M. javanica* και *M. arenaria* (Roberts and Thomason, 1989).

Σήμερα έχουν δημιουργηθεί ανθεκτικές ποικιλίες σε διάφορα είδη φυτών σε ένα ή περισσότερα είδη νηματωδών. Στα πυρηνόκαρπα π.χ. (ροδακινιά, βερικοκιά, κερασιά, δαμασκηνιά), παρήχθησαν υποκείμενα ανθεκτικά ή απρόσβλητα σε ένα ή

περισσότερα είδη νηματώδων των ριζοκόμβων, του γένους *Meloidogyne* (*M. incognita*, *M. javanica*). Ενώ μερικά απ' αυτά είναι ανθεκτικά ή σχετικά ανθεκτικά ή σχετικά ευαίσθητα, στο είδος *Pratylenchus vulnus*. Μερικά υποκείμενα πυρηνοκάρπων με διάφορο βαθμό ανθεκτικότητας στα παραπάνω είδη νηματώδων είναι τα: NemaGuard, Rancho Resistant S-37, Okinawa Royal (Blenheim) Myrobalan, Myrobalan 29C, Marianna 2624 Mahalep, Sour Cherry-Stockton Morello.

Ορισμένες ανθεκτικές ποικιλίες έχουν αναπτυχθεί και στην τομάτα όπως η Hawaii 5229, που είναι ανθεκτική σε 3 είδη από τους νηματώδεις των ριζοκόμβων *M. incognita*, *M. javanica* και *M. arenaria*. Ανθεκτικές ποικιλίες έχουν δημιουργηθεί στην πατάτα, όπως η Maris Piper για τον χρυσονηματώδη της πατάτας. Επίσης στον καπνό, βαμβάκι, εσπεριδοειδή κλπ. Πολλές ποικιλίες μηδικής δημιουργήθηκαν στο παρελθόν με ανθεκτικότητα στον νηματώδη του στελέχους (*Ditylenchus dipsaci*) αλλά με παραγωγή μικρότερη από τις ευαίσθητες ποικιλίες. Οι ανθεκτικές ποικιλίες πριν να καλλιεργηθούν πρέπει να δοκιμάζονται στις τοπικές συνθήκες, για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητά τους, στους υπάρχοντες πληθυσμούς των νηματώδων. Από πολλά χρόνια καταβάλλεται προσπάθεια από ιδρύματα του εξωτερικού εξεύρεσης ανθεκτικού ζαχαρότευτλου στον νηματώδη των ζαχαρότευτλων (*H. schachtii*). Τελευταία εμπορικές σποροπαραγωγικές εταιρείες σε συνεργασία με ευρωπαϊκά κέντρα νηματωδολογικής έρευνας, έχουν δραστηριοποιηθεί για την εξεύρεση ανθεκτικών γονότυπων ζαχαρότευτλων στον *H. schachtii* (Nusbaum and Ferris, 1793).

1.2.1.2 Αμειψισπορά

Οι κομβονηματώδεις είναι υποχρεωτικά παράσιτα και ως εκ τούτου, απουσία του ξενιστή τους δε μπορούν να συμπληρώσουν το βιολογικό τους κύκλο, λόγω έλλειψης τροφής και λόγω της μεγαλύτερης έκθεσης τους στις δυσμενείς συνθήκες του περιβάλλοντος. Έτσι με την καλλιέργεια των φυτών, που δεν προσβάλλονται από τους νηματώδεις, που είναι μολυσμένος ο αγρός είναι δυνατόν, ύστερα από ένα χρονικό διάστημα, ο πληθυσμός τους να ελαττωθεί σε ποσοστό που να επιτρέπει να καλλιεργηθεί και πάλι η ευαίσθητη ποικιλία, με επιτυχία (Nusbaum and Ferris, 1973).

Για παράδειγμα στην Κρήτη η παραγωγή των καλλιεργειών σολανωδών ευπαθών σε κομβονηματώδεις αυξάνεται κατά 60%, όταν έπονται ανθεκτικών

ποικιλιών έναντι ευαίσθητων (Tzorzakakis et al., 2000). Αμειψισπορά με καλλιέργειες που φιλοξενούν νηματωδοβόρους μύκητες και βακτήρια αυξάνουν ακόμα περισσότερο την αποτελεσματικότητα της μεθόδου (Hidalgo-Diaz and Kerry, 2008). Τέλος για την αμειψισπορά μπορούν να χρησιμοποιούνται καλλιέργειες που δρουν ανταγωνιστικά ως προς τους νηματώδεις μετά από ενσωμάτωση της φυτικής μάζας τους στο έδαφος, όπως τα γένη *Tagetes* και *Brasiceae*, συνδυάζοντας και τη βιοαπολύμανση σαν μέτρο καταπολέμησης (Hidalgo-Diaz and Kerry, 2008).

Η διάρκεια της αμειψισποράς μπορεί να είναι ένα, δύο ή και περισσότερα χρόνια (4-6). Η διάρκεια αυτή εξαρτάται:

1. από το είδος του νηματώδη
2. από τη σχέση αριθμού νηματωδών και βαθμού ζημίας της καλλιέργειας
3. από την ετήσια τιμή της ελάττωσης του πληθυσμού των νηματωδών δίχως ξενιστή (Jones and Jones, 1964).

1.2.1.3 Φυτά παγίδες

Αφορά στην εγκατάσταση στον αγρό φυτών τα οποία είναι καλοί ξενιστές του νηματώδη, για τόσο χρονικό διάστημα όσο απαιτείται για την είσοδο του στο ριζικό τους σύστημα. Στη συνέχεια, και πριν την εγκατάσταση της επόμενης καλλιέργειας, πραγματοποιείται ξερίζωμα και καταστροφή των φυτών με σκοπό την καταστροφή των νηματωδών και τη μείωση του αρχικού μολύσματος. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται κυρίως στις περιπτώσεις καλλιεργειών λαχανικών με μικρό βιολογικό κύκλο, όπως το μαρούλι (Ornat et al., 2001).

1.2.1.4 Απολύμανση του εδάφους με θερμότητα

Το μέτρο αυτό έχει ως στόχο την καταπολέμηση των παθογόνων και των ζωικών εχθρών που ζουν στο έδαφος και πραγματοποιείται με τους ακόλουθους τρόπους: θερμό νερό, απολύμανση με ατμό και ηλιοαπολύμανση. Έτσι για παράδειγμα με αύξηση της θερμοκρασίας του εδάφους στους 70° C μπορούμε να θανατώσουμε τον *M. Incognita* σε λίγα λεπτά. Τα κύρια μειονεκτήματα αυτών των μεθόδων είναι το μεγάλο κόστος και η πιθανότητα δημιουργίας βιολογικού κενού θανατώνοντας ωφέλιμους οργανισμούς.

Θερμό νερό. Με τη μέθοδο αυτή ανυψώνεται η θερμοκρασία του φυτού, με εμβάπτιση σε θερμό νερό, σε σημείο που να σκοτώνονται οι νηματώδεις, χωρίς να παθαίνουν καμιά ζημιά οι φυτικοί ιστοί. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα περιθώρια μεταξύ των δύο ορίων είναι τόσο μικρά ώστε να χρειάζεται μεγάλη ακρίβεια στη ρύθμιση, τόσο της θερμοκρασίας, όσο και στη διάρκεια της επέμβασης. Η θερμοκρασία για την καταπολέμηση των νηματωδών αλλάζει με το είδος τους, π.χ. ο νηματώδης του χρυσάνθεμου *Aphelenchoides ritzemabosi* είναι ευκολότερο να θανατωθεί απ' ό τι ο νηματώδης του στελέχους *Ditylenchus dipsaci*. Έτσι ο πρώτος θανατώνεται με εμβάπτιση των μοσχευμάτων για 20 λεπτά σε θερμοκρασία 43° C ή για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 46° C, ενώ ο δεύτερος με εμβάπτιση των στολόνων για 4 ώρες σε θερμοκρασία 43° C. Η μέθοδος του θερμού νερού συνιστάται για πολλά βολβώδη ανθοκομικά είδη όπως η τουλίπα, για τον νηματώδη *Ditylenchus dipsaci*, η βιγόνια για τους νηματώδεις των ριζόκομβων, *Meloidogyne spp.* στον υάκινθο για τον *Ditylenchus dipsaci*, στην ίριδα για τον *Ditylenchus destructor*, στον κρόκο για τους *Ditylenchus destructor* και *Aphelenchoides subtenuis*. Επίσης στα κύμινια για τον *Ditylenchus dipsaci*, στα χρυσάνθεμα για τον *Aphelenchoides ritzemabosi*, στη φράουλα (στους στόλους) για τους *Aphelenchoides fragariae*, *Aphelenchoides ritzemabosi*, *Ditylenchus dipsaci* (Ornat et al., 2001).

Με ατμό. Περιλαμβάνει την εισαγωγή ατμού στο εσωτερικό του εδάφους, υπό κάλυψη με μαύρο χοντρό πλαστικό, μέσα στο οποίο η απελευθέρωση της θερμότητας γίνεται κατά την συμπύκνωση των ατμών σε νερό. Η μεταχείριση συνήθως περιλαμβάνει επικράτηση θερμοκρασίας εδάφους 70° C για τουλάχιστον μισή ώρα (Runia, 2000), ενώ θάνατος του *Meloidogyne incognita* έχει παρατηρηθεί σε θερμοκρασίες ανώτερες των 48° C για λίγα μόνο λεπτά.

Ηλιοαπολύμανση. Περιλαμβάνει την κάλυψη υγρού εδάφους με διαφανές λεπτό πλαστικό που παγιδεύει την ηλιακή ακτινοβολία. Είναι μια τακτική που είχε αναπτυχθεί για πρώτη φορά στο Ισραήλ στα μέσα της δεκαετίας του 70 (Katan, et al., 2007). Μπορεί να έχει διάρκεια μέχρι και 6 με 8 εβδομάδες κάτω από έντονη ηλιακή ακτινοβολία, συνθήκες συνήθεις στις Μεσογειακές χώρες κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού.

1.2.1.5 Αγρανάπωση

Το να μείνει ο αγρός χωρίς καλλιέργεια κατά το θέρος και να οργωθεί μια-δύο φορές ώστε οι προσβεβλημένες ρίζες να εκτεθούν, όπως προαναφέρθηκε, στον ήλιο και στον αέρα είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος για να ελαττωθεί ο πληθυσμός των νηματωδών και μάλιστα για ορισμένα είδη που δεν αντέχουν στην ξηρασία, όπως οι νηματώδεις των ριζοκόμβων (*Meloidogyne spp.*). Ταυτόχρονη απομάκρυνση των ζιζανίων από το μη καλλιεργούμενο έδαφος, αυξάνει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου, αφού τα ζιζάνια φιλοξενούν τους νηματώδεις, ενώ η απομάκρυνσή τους εκθέτει το έδαφος στην ηλιακή ακτινοβολία η οποία, αυξάνοντας τη θερμοκρασία του, το απολυμαίνει (Goodell and Ferris, 1989).

1.2.2 Χημική μέθοδος καταπολέμησης

Η χημική καταπολέμηση στοχεύει στη θανάτωση των νηματωδών με χημικά μέσα. Απαραίτητη προϋπόθεση για τις φυσιολογικές αντιδράσεις, που θα προκαλέσουν το θάνατο είναι η θανατηφόρα δόση να διαπεράσει το νηματώδη. Τούτο μπορεί να γίνει από το στόμα, την έδρα, το γεννητικό άνοιγμα καθώς και από την επιδερμίδα. Επίσης κατά τη διατροφή τους σε φυτά, που ψεκάστηκαν ή απορρόφησαν τέτοιες χημικές ουσίες. Οι νύμφες φαίνεται να παρουσιάζουν μικρότερη αντοχή απ' ό τι τα αυγά στα νηματωδοκτόνα (Thorne, 1961).

Τα χημικά νηματωδοκτόνα χωρίζονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες, τα καπνιστικά και τα μη καπνιστικά. Τα καπνιστικά εφαρμόζονται πριν την εγκατάσταση της καλλιέργειας για λόγους φυτοτοξικότητας, ενώ τα μη καπνιστικά εφαρμόζονται μετά, αφού δρουν εξ επαφής ή κινούμενα διασυστηματικά μέσα στο φυτό. Η κατανομή των καπνιστικών στο έδαφος εξαρτάται από την εδαφική υγρασία. Τα μη καπνιστικά χωρίζονται σε δυο υποκατηγορίες βάση της χημικής ομάδας στην οποία ανήκουν, τα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμιδικά.

Γενικά τα καπνιστικά νηματωδοκτόνα είναι πιο αποτελεσματικά από τα μη καπνιστικά, γιατί τα δεύτερα βιοαποδομούνται εύκολα στο έδαφος όταν εφαρμόζονται επαναλαμβανόμενα (Ornat and Sorribas, 2008) με συνέπεια να μειώνεται η αποτελεσματικότητα της καταπολέμησης.

Γενικότερα στο παρελθόν η καταπολέμηση των νηματωδών βασιζόταν κυρίως στην χρήση εμπορικών συνθετικών νηματοδοκτόνων, η μακροχρόνια χρήση των οποίων έχει προκαλέσει δυσμενείς επιπτώσεις στον άνθρωπο και το περιβάλλον, και οδήγησε ως εκ τούτου στην απόσυρσή τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα απόσυρσης νηματοδοκτόνου σκευάσματος σε παγκόσμια κλίμακα λόγω των δυσμενών επιπτώσεων του στο περιβάλλον και το χρήστη είναι το βρωμιούχο μεθύλιο, που ήταν το πλέον αποτελεσματικό καπνιστικό-απολυμαντικό εδάφους και χρησιμοποιούνταν για την καταπολέμηση παθογόνων, εντόμων, νηματωδών και ζιζανίων. Επί του παρόντος τα νηματοδοκτόνα που έχουν έγκριση κυκλοφορίας στην Ελλάδα είναι τα: fenamiphos, oxamyl, dazomet, ethoprophos, fosthiazate, iprodione 1,3-dichloropropene (http://www.minagric.gr/syspest/syspest_bycat_byactive.aspx, cited 040814).

Ένα άλλο σκεύασμα που ξεκίνησε να χρησιμοποιείται αρχικά στην νότια Αφρική για την καταπολέμηση των νηματωδών σε αρκετές καλλιέργειες και σήμερα χρησιμοποιείται επίσης και στην Αμερική για την καταπολέμηση των νηματωδών στο γρασίδι είναι το Multiguard Protect που περιέχει την δραστική ουσία furfural. Η furfural είναι οργανική ένωση που προέρχεται από μία ποικιλία γεωργικών παραπροϊόντων παρουσιάζει σταθερότητα σε ακραίες θερμοκρασίες και pH και δρα εξ επαφής. Μεγάλο πλεονέκτημά της είναι ότι δεν είναι τοξική για οργανισμούς μη στόχους. Νέες έρευνες πραγματοποιούνται για χρήση και σε άλλες καλλιέργειες.

Ο μικρός αριθμός των συνθετικών νηματοδοκτόνων σε συνδυασμό με την ανεπαρκή αποτελεσματικότητά τους, κυρίως λόγω της βιοαποδόμησής τους στο έδαφος (Giannakou et al., 2005; Karpouzas et al., 2001), δημιουργεί μεγάλη ανάγκη για εύρεση εναλλακτικών μεθόδων καταπολέμησης των νηματωδών.

1.2.3 Βιολογικές μέθοδοι Καταπολέμησης

Η ανάγκη για την αύξηση της αγροτικής παραγωγής και η εισαγωγή διαφορετικών καλλιεργειών σε νέες αγροοικολογικές ζώνες στο παρελθόν αύξησαν την χρήση των χημικών για την αντιμετώπιση των εχθρών και των ασθενειών. Ο χημικός έλεγχος των νηματωδών αν και ήταν αποτελεσματικός, κατέληξε να είναι μια συνηθισμένη εφαρμογή “βιοκτόνων” τοξικών και επικίνδυνων για τους ωφέλιμους οργανισμούς και τα θερμόαιμα. Οι απολυμάνσεις με EDB έχουν ήδη απαγορευθεί σε

πολλές χώρες. Η χρήση του βρωμιούχου μεθυλίου και 1,3-dichloropropene αναθεωρείται ενώ το μέλλον των μη πτητικών νηματωδοκτόνων είναι αβέβαιο μετά την ανακάλυψη υπολειμμάτων σε υπόγεια νερά. Η αμειψισπορά η οποία έχει ιστορικώς αποτελέσει την βάση των περισσότερων προγραμμάτων ελέγχου παθογόνων εδάφους, έχει περιορισμένη εφαρμογή για οικονομικούς λόγους. Ο χρόνος που απαιτείται για την δημιουργία ανθεκτικών ποικιλιών και η περιορισμένη τους χρήση όταν επιλεγούν μολυσματικοί παθότυποι του παθογόνου, έχει εστιάσει την έρευνα στην διαχείριση των νηματωδών με βιολογικούς παράγοντες.

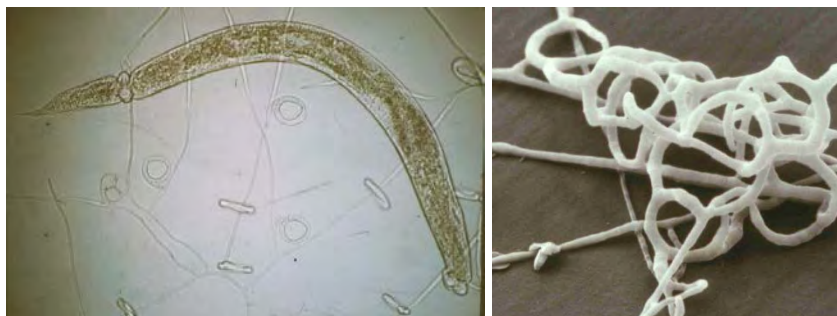
Οι προσπάθειες βιολογικού ελέγχου των νηματωδών συζητούνται για περισσότερο από έναν αιώνα, αλλά μέχρι τώρα οι δυνατότητες που υπάρχουν για μια περαιτέρω πρακτική εφαρμογή στον αγρό είναι περιορισμένες. Δυστυχώς μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν βιολογικά σκευάσματα στο εμπόριο με δυνατότητες πρακτικής εφαρμογής σε ευρεία κλίμακα. Η βιολογική καταπολέμηση μπορεί να χωριστεί σε τρεις υπο-ομάδες: καταπολέμηση με μύκητες και βακτήρια, καταπολέμηση με τη χρήση πτητικών ουσιών στο έδαφος (βιοαπολύμανση) καθώς και με τη χρήση φυτικών ουσιών φυτικής προέλευσης.

1.2.3.1 Με μύκητες και βακτήρια

Με βάση τον ορισμό των Baker και Cook ο βιολογικός έλεγχος των νηματωδών αποβλέπει σε: “Μείωση της ζημιάς των νηματωδών από οργανισμούς ανταγωνιστές, μέσω της ρύθμισης του πληθυσμού του νηματώδη σε χαμηλά επίπεδα και / ή την μείωση της ικανότητας των νηματωδών να προκαλέσουν ζημιά δια μέσου διαχείρισης του περιβάλλοντος ή από την μαζική εισαγωγή ανταγωνιστών” (Paracer et al., 1966). Αν και κάτω από εργαστηριακές συνθήκες, αρκετοί μύκητες, βακτήρια και σπορόζωα μειώνουν τους πληθυσμούς των νηματωδών, οι λεπτομερειακές μελέτες για βιολογικό έλεγχο σε δοκιμές στον αγρό είναι λίγες και χωρίς σημαντικά πρακτικά συμπεράσματα. Οι περισσότερες αναφορές έχουν γίνει για τους κυστογόνους νηματώδεις και κομβονηματώδεις.

Έχουν ταυτοποιηθεί πολλοί ανταγωνιστικοί μύκητες των κομβονηματωδών στην Μεσογειακή λεκάνη, όπως οι *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, *P. chlamydosporia* var. *catenulate*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Fusarium* spp., *Acremonium strictum*, *Gliocladium roseum*, *Cylindrocarpon* spp., *Engiodontium*

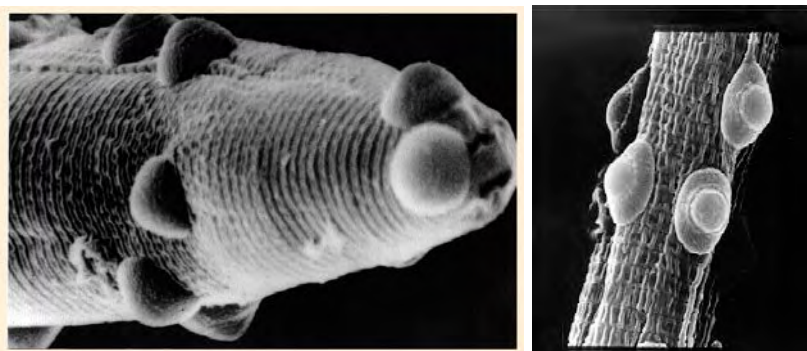
album, *Dactylella oviparasitica* αλλά και πολλά είδη του γένους *Arthrobotrys*. Ο *Pochonia chlamydosporia* έχει χρησιμοποιηθεί σε Ελλάδα, Ισπανία και Ιταλία. (Verdejo-Lucas et al., 2002; Mazurkiewicz- Zapałowicz, et al., 2009). Είδη του γένους *Arthrobotrys* μοιάζουν σαν δακτύλιοι που όταν ο νηματώδης εισέλθει μέσα αυτό τον σφίγγουν και δεν τον αφήνουν να κινηθεί.



Εικόνα 4 *Arthrobotrys* spp.: σύλληψη των νηματωδών με δακτυλιοειδείς κατασκευές (<http://www.ctahr.hawaii.edu>).

Οι ανταγωνιστικοί μύκητες χρησιμοποιούν διάφορα όργανα τους, όπως τα σπόρια και τα απρεσσόρια, για να προσβάλουν τους νηματώδεις. Παράλληλες ιδιότητες, όπως η ικανότητά των ανταγωνιστικών μυκήτων να αποικούν ενδοφυτικά τη ρίζα των φυτών, καθιστά εύκολη την εγκατάστασή τους στην καλλιέργεια άρα και τη χρήση τους στα πλαίσια της βιολογικής καταπολέμησης (Lopez-Llorca, 2008).

Στην ομάδα των ανταγωνιστικών βακτηρίων των κομβονηματωδών ανήκει το είδος *Pasteuria penetrans* που έχει μελετηθεί ιδιαίτερα ως βιολογικό μέσο καταπολέμησης.



Εικόνα 5 Προσκόλληση σπορείων του βακτηρίου *Pasteuria penetrans* σε νηματώδεις του γένους *Meloidogyne* (<http://nematology.ucdavis.edu>).

Σε πειράματα υπό κάλυψη που πραγματοποιήθηκαν στην Κρήτη εφαρμόστηκαν 20000 με 25000 σπόρια ανά γραμμάριο εδάφους που οδήγησαν σε

ποσοστό παρασιτισμού των ενηλίκων θηλυκών νηματωδών, 65 με 75 % (Tzortzakakis et al., 1999). Ο τρόπος δράσης του είναι απλός αφού τα σπόρια του βακτηρίου προσκολλώνται στους νηματώδεις και εισχωρούν μέσα τους όπου πολλαπλασιάζονται και έτσι καταστρέφουν τον νηματώδη. Απουσία νηματωδών επιβιώνει στο έδαφος ως σπόριο για πολλά χρόνια. Στις ΗΠΑ υπάρχει σαν σκεύασμα για τον έλεγχο νηματωδών σε γρασίδι.

1.2.3.2 Βιοαπολύμανση

Τα τελευταία χρόνια, μια νέα μέθοδος, η βιοαπολύμανση του εδάφους, η οποία βασίζεται στη δημιουργία συνθηκών αναεροβίωσης έχει προταθεί για την αντιμετώπιση των νηματωδών. Ο όρος βιοαπολύμανση αναφέρεται στην απελευθέρωση τοξικών πτητικών ουσιών, κατά τη διαδικασία αποσύνθεσης οργανικών υλικών, φυτικών υπολειμμάτων και ιστών, που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των ασθενειών, των νηματωδών και των ζιζανίων (Kirkegaard and Sarwar, 1998). Κατά την εφαρμογή της μεθόδου γίνεται ενσωμάτωση φυτικής μάζας στο έδαφος, ακολουθεί πότισμα και εφαρμογή στην επιφάνεια διαφανούς πλαστικού επί 12-15 εβδομάδες. Τα πλεονεκτήματα της βιοαπολύμανσης έναντι της ηλιοαπολύμανσης είναι ότι η μέθοδος δεν απαιτεί υψηλή ηλιακή ακτινοβολία και μπορεί να εφαρμοστεί σε περιοχές ή περιόδους με χαμηλή ηλιοφάνεια ώστε να μην χάνεται μία καλλιεργητική περίοδος.

Τα είδη *Brassica* είναι τα πλέον μελετημένα βοτανικά είδη όσον αφορά στην καταπολέμηση των κομβονηματωδών με τη μέθοδο της βιοαπολύμανσης. Περιέχουν γλυκοσινολικές ουσίες οι οποίες μετά τη μηχανική ρήξη των κυττάρων που τις περιέχουν μετατρέπονται σε ισοθιοκυανιούχες, ενώσεις τοξικές για τους νηματώδεις. Λόγω του ότι το είδη *Brassica* προσβάλλονται τα ίδια από τους κομβονηματώδεις, προβλέπεται να καλλιεργούνται το χειμώνα, ώστε να αποφεύγεται η προσβολή (άρα και η διατήρηση των νηματωδών στον αγρό), και την άνοιξη να ενσωματώνονται στο έδαφος πριν την εγκατάσταση της καλλιέργειας υπό προστασία (Ploeg, 2008; Buena et al., 2006).

1.2.3.3 Φυσικές ουσίες Φυτικής προέλευσης

Στις μέρες μας παρατηρείται έντονη εκδήλωση ενδιαφέροντος για τη χρησιμοποίηση φυσικών ουσιών φυτικής προέλευσης, προϊόντων του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών, ως μέτρο καταπολέμησης των νηματωδών (Chitwood, 2002; Isman, 2000; Akhtar and Mahmood, 1994). Πολλές από αυτές τις ουσίες, όπως κάποια τερπένια συστατικά αιθέριων ελαίων, είναι πιο ασφαλείς από τα συμβατικά νηματωδοκτόνα για τον άνθρωπο και το περιβάλλον (Isman, 2000) λόγω της ταχύτατης βιοαποδόμησης τους και της κατά συνέπεια μικρής υπολειμματικής τους διάρκειας στο νερό και στο έδαφος (Rabenhorst 1996, Misra and Pavlostathis 1997). Επιπλέον, μελέτες αποδεικνύουν το τοξικολογικά και περιβαλλοντικά φιλικό προφίλ πολλών από αυτές τις ενώσεις που έχουν αποδειχθεί εκλεκτικές ως προς το στόχο, χαμηλής τοξικότητας στον άνθρωπο και στο περιβάλλον, μικρής υπολειμματικής διάρκειας και γρήγορης αποδόμησης (Chitwood, 2002)

Μέχρι στιγμής έχουν απομονωθεί τουλάχιστον 80000 τέτοιες ενώσεις από φυτά και αναμένεται να ταυτοποιηθούν πολύ περισσότερες, αφού μόνο μια μικρή αναλογία επί του συνόλου των φυτών που τις συνθέτει έχει, προς το παρόν, μελετηθεί. Η απομόνωση αυτών των ενώσεων απαιτεί συνήθως επίπονες διαδικασίες εκχύλισης, διαχωρισμού κλασμάτων των εκχυλισμάτων, και καθαρισμού των ενώσεων με χρωματογραφικές τεχνικές. Η βιολογική δράση που εμφανίζουν, τους προσδίδει επιθυμητές/ευεργετικές ιδιότητες, με συνέπεια να τους καθιστά πρότυπα σύνθεσης μορίων για χρήση στη φαρμακοποιία (Ebada et al., 2008; Wink, 2004), ενώ η δραστηριότητά τους έναντι παθογόνων και εχθρών στηρίζει τη χρήση τους και στη φυτοπροστασία. Επί τους παρόντος κυκλοφορούν στο εμπόριο τέτοια σκευάσματα (Isman 2000; Ntalli et al., 2009), ενώ η ανάπτυξή τους στο μέλλον αναμένεται πολλά υποσχόμενη στα πλαίσια εξεύρεσης εναλλακτικών των κλασικών συνθετικών νηματωδοκτόνων.

1.3 Σκευάσματα φυσικής προέλευσης

Το ποσοστό των νηματωδοκτόνων επί του συνόλου των εν κυκλοφορία φυτοπροστατευτικών προϊόντων ήταν ανέκαθεν μικρό. Ο λόγος ήταν το ότι η χημική βιομηχανία σπάνια επένδυσε στην ανάπτυξη νηματωδοκτόνων σκευασμάτων λόγω του ότι ήταν οικονομικά ασύμφορο σε αντίθεση με την ανάπτυξη εντομοκτόνων, μυκητοκτόνων και ζιζανιοκτόνων, οι πρόσοδοι των οποίων ήταν συγκριτικά πάντα μεγαλύτεροι. Το ότι οι νηματώδεις ζουν στο έδαφος και έχουν δερμάτιο μη περατό σε οργανικά μόρια, καθιστά δύσκολη την καταπολέμηση τους, η οποία στο παρελθόν βασιζόταν σε ιδιαίτερα τοξικά καπνιστικά νηματωδοκτόνα (Chitwood, 2002).

Η ανεπάρκεια των συμβατικών νηματωδοκτόνων καθιστά απαραίτητη την εύρεση νέων τρόπων καταπολέμησης των νηματωδών, και αυτό το ρόλο μπορούν να παίξουν τα βοτανικά σκευάσματα. Τα σκευάσματα αυτά υπάγονται στην μεγάλη κατηγορία των σκευασμάτων που οι δραστικές ουσίες τους είναι φυσικής προέλευσης και προέρχονται από φυτά, ζώα ή ορυκτά (*biopesticides*). Μέχρι το τέλος του 2001 ο αριθμός των εγκεκριμένων σκευασμάτων και των δραστικών, αυτής της κατηγορίας παγκοσμίως, ήταν 780 και 195 αντίστοιχα.

1.3.1 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα - φραγμοί στην ανάπτυξη εμπορικών σκευασμάτων βοτανικής προέλευσης

Πλεονεκτήματα. Τα πλεονεκτήματα των σκευασμάτων βοτανικής προέλευσης έναντι των συμβατικών σκευασμάτων είναι η μικρότερη τοξικότητα (αν και αυτό δεν ισχύει πάντα και θα πρέπει να εξετάζεται ανά περίπτωση), η εκλεκτικότητα, η γρήγορη αποδόμηση και ο χαμηλός κίνδυνος ανάπτυξης ανθεκτικότητας στην περίπτωση των εκχυλισμάτων-μιγμάτων ουσιών (Isman, 2006). Σύμφωνα με την EPA τα παραπάνω χαρακτηριστικά καθιστούν τα σκευάσματα φυσικής προέλευσης χαμηλότερου κινδύνου έναντι των συμβατικών, και για το λόγο αυτό στις Ηνωμένες Πολιτείες υποβάλλονται σε μικρότερης κλίμακας οικοτοξικολογικό έλεγχο, ενώ ο χρόνος που απαιτείται για την έγκριση κυκλοφορίας τους είναι σχεδόν το ένα τρίτο του αντίστοιχου των συμβατικών (16 αντί για 36 μήνες) (EPA). Με τον τρόπο αυτό εισέρχονται στο εμπόριο γρήγορα για να αντικαταστήσουν τα αποσυρθέντα συμβατικά σκευάσματα και να καλύψουν τα κενά στη φυτοπροστασία. Αν και η φράση «προϊόν χαμηλού κινδύνου» αποκλείεται από

την ετικέτα, σύμφωνα με την EPA, αποτελεί σίγουρα επιχειρηματικό πλεονέκτημα (EPA/OPP'S).

Μειονεκτήματα. Μειονεκτήματα των σκευασμάτων φυσικής προέλευσης μπορούν να θεωρηθούν α) η μειωμένη αποτελεσματικότητα, συγκριτικά με αυτή των συμβατικών φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων, πράγμα που επιβάλλει το επαναλαμβανόμενο των εφαρμογών, β) η παραλλακτικότητα της αποτελεσματικότητας μεταξύ διαφορετικών παρτίδων του σκευάσματος, γ) η αργή τους δράση, δ) η εύκολη και γρήγορα αποδόμηση τους κατά την αποθήκευση (μικρό «*shelf life*»), ε) η γρήγορη αποδόμηση και η μικρή υπολειμματική διάρκεια δράσης στον αγρό και ζ) η δυσκολία παρασκευής τους σε εμπορική κλίμακα λόγω I) περιορισμένης διαθεσιμότητας της πρώτης ύλης, II) αδυναμίας σταθεροποίησης και ελέγχου της διαδικασίας παραγωγής των παρτίδων και III) δυσκολιών όσον αφορά στην έγκριση κυκλοφορίας τους στην Ευρώπη (Isman, 2006).

1.3.2 Σκευάσματα φυτικής προέλευσης – εμπορικά νηματοδοκτόνα έως σήμερα ανά τον κόσμο και την Ελλάδα

Αν και η έρευνα, σχετική με τις βιολογικές δράσεις διάφορων βοτανικών ειδών είναι ευρεία λίγα από αυτά κατάφεραν να αναπτυχθούν σε εμπορικά σκευάσματα και σε αυτή την περίπτωση έχουν κατά κανόνα εντομοκτόνο χρήση. Παραδείγματα αποτελούν η αζαδιραχτίνη, η ρυάνια, η ροτενόνη, το πύρεθρο και τα αιθέρια έλαια (Isman, 2006; Akhtar, et al., 2008). Από τα παραπάνω μόνο τα αιθέρια έλαια και η αζαδιραχτίνη, χρησιμοποιούνται και ως νηματοδοκτόνα. Παραδείγματα σκευασμάτων αιθέριων ελαίων που διακινούνται επί του παρόντος για χρήση στη φυτοπροστασία, είναι το Cinnamite και Valero (Mycotech Corporation) από την EcoSMART Technologies, η οποία αποτελεί παγκοσμίως την βασική εταιρεία διακίνησης σκευασμάτων βασισμένων στα αιθέρια έλαια, για οικιακή χρήση αλλά και για χρήση στη φυτοπροστασία (Isman, 2000). Μια άλλη εταιρεία που διακινεί νηματοδοκτόνα βοτανικά σκευάσματα με δραστικές ουσίες διάφορα τερπένια είναι η EDEN (<http://www.edenresearch.com>). Ένα άλλο σκεύασμα που ξεκίνησε να χρησιμοποιείται αρχικά στην νότια Αφρική για την καταπολέμηση των νηματοδών σε αρκετές καλλιέργειες και σήμερα χρησιμοποιείται επίσης και στην Αμερική για την καταπολέμηση των νηματοδών στο γρασίδι είναι το Multiguard Protect που περιέχει την δραστική ουσία furfural. Η furfural είναι οργανική ένωση που

προέρχεται από μία ποικιλία γεωργικών παραπροϊόντων παρουσιάζει σταθερότητα σε ακραίες θερμοκρασίες και pH και δρα εξ επαφής. Μεγάλο πλεονέκτημά της είναι ότι δεν είναι τοξική για οργανισμούς μη στόχους. Νέες έρευνες πραγματοποιούνται για χρήση και σε άλλες καλλιέργειες.

Η χρήση των βοτανικών σκευασμάτων είναι σίγουρα δεδομένη στις αναπτυσσόμενες χώρες, όπου το κόστος των συμβατικών γεωργικών φαρμάκων είναι ασύμφορο. Στις αναπτυγμένες χώρες, εύκολα μπαίνουν στο εμπόριο των προϊόντων οικιακής χρήσης λόγω χαμηλής τοξικότητας στα θηλαστικά καθώς και λόγω των καπνιστικών τους ιδιοτήτων (*αιθ. έλαια*), ακολουθεί η χρήση τους στη βιολογική γεωργία και τέλος στη συμβατική όπου οι ισχυρότεροι ανταγωνιστές τους είναι τα “μειωμένου κινδύνου, *reduced risk*” σκευάσματα όπως τα νεονικοτινοειδή (Isman, 2006).

1.3.3 Σκευάσματα φυτικής προέλευσης – έρευνα και πραγματικότητα

Στα πλαίσια της έρευνας για εναλλακτικές μεθόδους καταπολέμησης των φυτοπαρασιτικών νηματωδών, έχουν μελετηθεί διάφορα βοτανικά είδη, ενσωματώνοντας τα φυτικά τους μέρη στο έδαφος, καθώς και καλλιεργούμενα σε εναλλαγή με την καλλιέργεια υπό προστασία. Διάφορα βοτανικά είδη έχουν επίσης μελετηθεί υπό τη μορφή των εκχυλισμάτων τους, ως επενδυτικά σπόρων καθώς και ως διαλύματα εμβάπτισης των ριζών των φυτών πριν τη μεταφύτευση σε πειράματα σε φυτοδοχεία αλλά και στον αγρό. Παρόλα αυτά δεν έγινε πάντα γνωστό το συστατικό/ά στο/α οποίο/α οφείλεται η δράση, ούτε και ο μηχανισμός της (Akhtar and Mahmood, 1994).

Στη συνέχεια αναφέρονται οι χημικές ομάδες των νηματωδοκτόνων φυτικών ουσιών και οι αντίστοιχες οικογένειες των βοτανικών ειδών στα οποία περιέχονται και έχουν μελετηθεί μέχρι στιγμής. Μια βασική κατηγορία είναι τα *Polythienyls* από είδη *Tagetes spp* (*Asteraceae*), που απαιτούν την επίδραση φωτός ή υπεροξειδωση για να απελευθερώσουν τα ενεργά συστατικά τους. Τέτοιες ουσίες έχουν μελετηθεί σε βιοδοκιμές υπό τη μορφή καλλιεργειών κάλυψης και εναλλαγής, ενσωματωμένης φυτομάζας στο έδαφος, καθώς και εκχυλισμάτων ή μεμονωμένων ουσιών *in vitro*. Μια άλλη κατηγορία ενώσεων με νηματωδοκτόνες ιδιότητες είναι γλυκοσινολικά παράγωγα (*glucosinolates*) των ειδών *Brasiceae* και *Sinapis spp.* και τα

ισοθειοκυανικά προϊόντα υδρόλυσης τους στο έδαφος (*isothiocyanates*). Οι ενώσεις αυτές είναι το βασικότερο παράδειγμα φυσικού υποκαπνισμού σε συνθήκες αγρού με ενσωμάτωση φυτικών μερών και έχουν μελετηθεί επίσης υπό τη μορφή εκχυλισμάτων ή μεμονωμένων ουσιών *in vitro* και εναλλασσόμενων καλλιεργειών στον αγρό. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το νηματοδοκτόνο *metam sodium* που ενεργεί απελευθερώνοντας τέτοιες ουσίες μετά από αποσύνθεση. Επίσης νηματοδοκτόνα είναι τα κυανογενή γλυκοσίδια των ειδών *Sorghum spp.* (*Poaceae*) και *Cassava* (*Manihot esculenta*) που έχουν μελετηθεί υπό τη μορφή ενσωματωμένης φυτικής μάζας, τα πολυακετυλένια ειδών *Asteraceae*, που δρουν με την παρουσία φωτός, και έχουν δοκιμαστεί υπό τη μορφή μεμονωμένων ουσιών *in vitro*. Τα αλκαλοειδή (*Fabaceae*, *Papaveraceae*), τα λιπαρά οξέα (*Poaceae*, *Fabaceae*, *Papaveraceae*, *Lilaceae*), τα τερπενοειδή (*Lamiaceae*, *Myrtaceae*, *Poaceae*), τα σεσκιτερπενοειδή (*Malvaceae*, *Asteraceae*, *Solanaceae*, *Pinaceae*), τα διτερπενοειδή (*Thymelaeaceae*), τα κουασινοειδή (*Simarubaceae*), τα στεροειδή (*Liliaceae*) και τριτερπενοειδή (*Fabaceae*, *Verbenaceae*, *Lamiaceae*, *Meliaceae*, *Curcubitaceae*), και τέλος οι φαινολικές ουσίες (*Caprifoliaceae*, *Zingiberaceae*) που έχουν δοκιμαστεί υπό τη μορφή εκχυλισμάτων ή μεμονωμένων ουσιών *in vitro* (Chitwood, 2002; Matthiessen and Kirkegaard, 2006; Akhtar, 2000).

Όσο λιγότερο επεξεργασμένο είναι το προϊόν του βοτανικού είδους (φυτικά μέρη, εκχυλίσματα, κλάσματα εκχυλισμάτων, μεμονωμένες ουσίες) που χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση και όσο μεγαλύτερη η κλίμακα του πειράματος (αγρός, φυτοδοχείο, τριβλίο), τόσο περισσότεροι είναι οι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα, καθιστώντας σχεδόν αδύνατη την απόδοσή της σε ένα και μοναδικό παράγοντα. Για παράδειγμα, η ενσωμάτωση φυτικών μερών στο έδαφος σε συνθήκες αγρού, λειτουργεί στην καταπολέμηση των νηματωδών αλλάζοντας τη δομή και τη γονιμότητα του εδάφους, ενεργοποιώντας ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς ή/και συσσωρεύοντας νηματοδοκτόνες ουσίες (απελευθέρωση δευτερογενών μεταβολιτών ή προϊόντων αποδόμησης) (Akhtar and Malik, 2000). Η χημική σύσταση των φυτικών μερών που χρησιμοποιούνται για την ενσωμάτωση, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, το είδος του εδάφους και το είδος των μικροοργανισμών που περιέχει το έδαφος επηρεάζουν το βιολογικό σύστημα ελέγχου (Matthiessen and Kirkegaard, 2006). Αντίθετα, όταν μελετάται μεμονωμένα η νηματοδοκτόνος δράση ενός συστατικού που έχει απομονωθεί από κάποιο φυτικό

μέρος του βοτανικού είδους, εναντίον ενός συγκεκριμένου σταδίου ανάπτυξης του νηματώδη, τότε η ανεξάρτητη μεταβλητή είναι η συγκέντρωση του συστατικού υπό έλεγχο και μόνο. Όταν υπάρχει η αναγκαία εργαστηριακή υποδομή, η εκχύλιση, ο καθαρισμός και η ταυτοποίηση των δραστικών συστατικών του φυτού γίνονται ταυτόχρονα με τις βιολογικές βιοδοκιμές «*bioassay guided fractionation*» ελέγχου της νηματωδοκτόνου δράσης τους, για να απορρίπτονται στην πορεία τα μη δραστικά κλάσματα. Αν και η αποτελεσματικότητα είναι συχνά αποτέλεσμα των πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συστατικών των εκχυλισμάτων (Lahlou, 2004), υπάρχει πάντα το ενδεχόμενο απόδοσής της σε ένα και μόνο συστατικό. Το γεγονός αυτό καθιστά απαραίτητο τον μεμονωμένο έλεγχο, τουλάχιστον των ποσοτικά επικρατέστερων συστατικών. Η εμπορική απουσία των συστατικών των περισσότερων βοτανικών ειδών που μελετώνται σε τέτοιου είδους δοκιμές, με εξαίρεση τα συστατικά των αιθέριων ελαίων, καθιστά απαραίτητη την επίπονη διαδικασία του καθαρισμού. Τελικά μετά την απομόνωση και τον βιολογικό έλεγχο, και συσχετίζοντας τις τιμές EC_{50} των φυτικών μερών, των εκχυλισμάτων και των μεμονωμένων συστατικών για συγκεκριμένο βιολογικό σύστημα, εντοπίζεται η βιολογική δράση σε μεμονωμένα συστατικά ή όχι. Η συσχέτιση της αποτελεσματικότητας με το κόστος του καθαρισμού και τις σχετικές αποδόσεις σε νηματωδοκτόνο εκχύλισμα ή μεμονωμένο συστατικό, καθορίζει την οικονομικότητα της διαδικασίας. Από την άλλη, σε περίπτωση απόδοσης της αποτελεσματικότητας σε ένα μοναδικό συστατικό, συνήθως εξετάζεται η δυνατότητα σύνθεσης του μορίου η οποία έχει διαφορετικό βαθμό δυσκολίας, ανάλογα με την πολυπλοκότητα της στερεοδομής του. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η αζαδιραχτίνη, της οποίας η σύνθεση πραγματοποιήθηκε μετά από επίπονη και πολύχρονη προσπάθεια πολλών ερευνητών σε 20 χρόνια από την απομόνωση και διευκρίνιση της δομής της (Morgan, 2009). Έτσι με τη δυνατότητα εκχύλισης ή σύνθεσης, εξετάζεται η πιθανότητα ανάπτυξης του νηματωδοκτόνου συστατικού σε εμπορική κλίμακα. Κατά περίπτωση λαμβάνονται υπ' όψιν, πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα όπως η ύπαρξη συνεργιστικής ή ανταγωνιστικής δράσης σε εκχυλίσματα έναντι μεμονωμένων συστατικών, το μεγαλύτερο εύρος της βιολογικής τους δράσης και η μείωση του κινδύνου της ανάπτυξης ανθεκτικότητας (Morgan, 2009). Αντίστοιχα παράγοντες όπως, το εάν ή όχι το βοτανικό είδος είναι ενδημικό και καλλιεργήσιμο, καθώς και το κόστος της καλλιέργειας, της συγκομιδής, της μεταφοράς των φυτικών μερών ή/και της απλής εκχύλισής τους καθορίζουν τη χρήση του με ενσωμάτωση, εναλλαγή

καλλιιεργειών ή/και εφαρμογή ακατέργαστων εκχυλισμάτων (crude extracts)
(Immaraju, 1998).

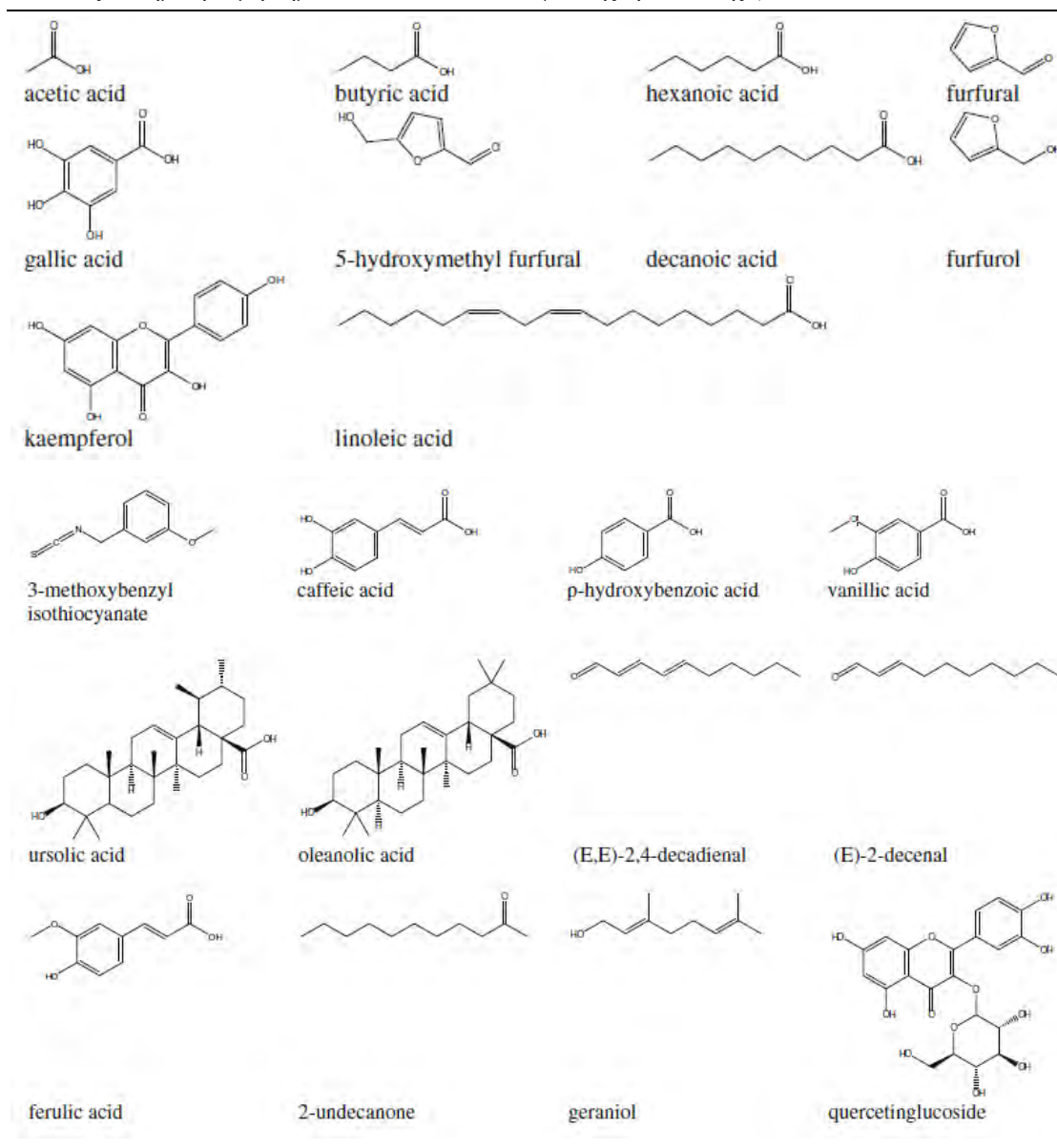
Κεφάλαιο 2 Νηματωδοκτόνες ουσίες βοτανικής προέλευσης

2.1 Εισαγωγή

Οι ιατρικές θεραπείες που διαδίδονται από γενιά σε γενιά στη λεκάνη της Μεσογείου έχουν χτιστεί επί πολλούς αρχαίους πολιτισμούς και κουλτούρες (Talhounk et al., 2007). Τα φυτά της Μεσογείου είναι πλούσια σε φυτοχημικές ουσίες, δευτερογενείς μεταβολίτες, που παίζουν κρίσιμο ρόλο στην προσαρμογή τους σε μια ποικιλία περιβαλλοντικών στρεσογόνων παραγόντων. Επί του παρόντος, υπάρχουν αδιάσειστα στοιχεία που δείχνουν ότι αυτοί οι μεταβολίτες έχουν ισχυρές δυνατότητες για την ρύθμιση και την διαμόρφωση της ανθρώπινης υγείας μέσω των αλληλεπιδράσεων τους με αγνώστων στοιχείων, δευτερευόντων πρωτεϊνών του ανθρώπινου οργανισμού (Murakami & Ohnishi 2012). Παρά το γεγονός ότι οι ουσίες φυτικής προέλευσης έχουν για καιρό χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία ή την πρόληψη των ανθρώπινων ασθενειών, υπάρχουν πολύ λίγες μελέτες που να έχουν ασχοληθεί με την εφαρμογή τους στην καταπολέμηση των εχθρών και ασθενειών των φυτών (Isman 2006, 2008). Τα μεσογειακά φυτά φαίνεται να έχουν ένα ανταγωνιστικό πλεονέκτημα λαμβάνοντας υπόψη το χημικό προφίλ τους, αλλά η έρευνα, που ασχολείται με την αλληλοχημική αλληλεπίδραση μεταξύ φυτών με φυτά, φυτών με έντομα και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτών και μυκήτων στο περιβάλλον της Μεσογείου, συχνά στερείται συνοχής και δομής, καθιστώντας το ρόλο τους κάθε άλλο παρά σαφή (Vokou 2007).

Η νηματωδοκτόνος δράση των φυτοχημικών ουσιών έχει μελετηθεί σε ένα ακόμα μικρότερο βαθμό. Παρά την τρέχουσα ανάγκη, που υπάρχει, για έλεγχο των νηματωδών, η χημική βιομηχανία σπάνια επένδυσε στην ανάπτυξη νηματωδοκτόνων σκευασμάτων λόγω του ότι ήταν οικονομικά ασύμφορο σε αντίθεση με την ανάπτυξη εντομοκτόνων, μυκητοκτόνων και ζιζανιοκτόνων, οι πρόσδοδοι των οποίων ήταν συγκριτικά πάντα μεγαλύτεροι (Chitwood 2002). Ο σκοπός αυτού του κεφαλαίου είναι να παρουσιάσει της νηματωδοκτόνες ιδιότητες, ουσιών φυτικής προέλευσης από διαφορετικές οικογένειες φυτών και κυρίως κατά των ειδών *Meloidogyne spp.* Μερικές από τις ουσίες φυτικής προέλευσης που αναφέρονται στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται στον Πίνακα 2, ενώ ορισμένα είδη φυτών με τα αντίστοιχα δραστικά συστατικά τους και το είδος του νηματώδη που προσβάλουν παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 2 Χημική δομή νηματοδοκτόνων ουσιών φυτικής προέλευσης (Ntalli & Caboni 2012).



2.2 Οικογένειες φυτών με νηματοδοκτόνες ιδιότητες

Το φυτό *Melia azedarach*, μέλος της οικογένειας *Meliaceae*, που κοινός ονομάζεται «μελία», είναι ένα δέντρο που φυτρώνει κυρίως ως καλλωπιστικό και φαρμακευτικό φυτό στην Αργεντινή, αλλά αναπτύσσεται επίσης στις νότιες Ηνωμένες Πολιτείες και είναι γνωστό ως Chinaberry, ινδική πασχαλιά ή λευκός κέδρος. Επίσης μπορεί να βρεθεί στην Αλγερία, Αυστραλία, Βραζιλία, Καραϊβική, Ινδία, Ισραήλ, Νέα Ζηλανδία, Κύπρο και Ελλάδα. Όταν τα φρούτα αυτού του φυτού ενσωματωθούν ως σκόνη σε έδαφος που έχει μολυνθεί με *M. incognita* σε συγκέντρωση 0,4% w/w, επιτυγχάνεται μείωση του αριθμού των θηλυκών

Πίνακας 3 Είδη φυτών με τα αντίστοιχα δραστικά συστατικά τους και το είδος του νηματώδη που προσβάλλουν (Ntalli & Caboni 2012).

Φυτικό είδος	Νηματωδοκτόνος ουσία	Είδος νηματώδη	Βιβλιογραφία
<i>Melia azedarach</i>	Acetic acid, butyric acid, hexanoic acid, decanoic acid, furfural, 5-hydroxymethylfurfural and furfural	<i>Meloidogyne incognita</i>	Ntalli et al. (2010a, b)
<i>Crotalaria</i>	1,2-Dehydropyrolizidine alkaloids	<i>M. incognita</i> <i>Heterodera schacht</i> <i>Pratylenchus penetrans</i> <i>Phasmarhabditis hermaphrodita</i> <i>Rhabditis spp.</i>	Thoden et al. (2009)
<i>Peganum harmala</i>	Alkaloids	<i>Meloidogyne spp.</i>	El Allagui et al. (2007)
<i>Acacia gummifera</i>	Flavonoids	<i>Meloidogyne spp.</i>	El Allagui et al. (2007)
<i>Tagetes patula</i>			
<i>Ononis natrix</i>		<i>Meloidogyne spp.</i>	El Allagui et al. (2007)
<i>Ceratonia siliqua</i>			
<i>Medicago sativa</i>	Triterpeneglycosides of medicagenic acid	<i>Xiphinema index</i> <i>M. incognita</i> <i>Globodera rostochiensis</i>	D'Addabbo et al. (2011) Leonetti et al. (2011)
<i>Tagetes</i>	Polyacetylenes polyethienyls flavonoids	<i>Meloidogyne spp.</i>	Chitwood (2002), Wat et al. (1981), Marahatta et al. (2010), El Allagui et al. (2007)
<i>T. patula</i>	α -Terthienyl acid, gallic acid and linoleic acid	<i>Heterodera zea</i>	Faizi et al. (2011)
<i>T. patula</i>		<i>M. incognita</i> <i>M. hapla</i>	Piedra Buena et al. (2008)
<i>Aster sedifolius</i>	Saponins	<i>M. incognita</i>	Di Vito et al. (2010)
<i>Ageratum houstonianum</i>	1,2-Dehydropyrolizidine alkaloids	<i>M. hapla</i>	Thoden et al. (2009)
<i>Senecio bicolor</i>			
<i>Gochnatia barrosii</i>	Kaempferol 3-O- β -D-(6'-O-E-p-coumaroyl)-glucopyranoside	<i>Meloidogyne exigua</i>	dos Santos et al. (2010)
<i>Brassica juncea</i>	Glucosinolates	<i>Pratylenchus penetrans</i>	Zasada et al. (2009)
<i>Sinapis alba</i>		<i>M. incognita</i>	
<i>B. oleracea</i>		<i>M. incognita</i>	López-Pérez et al. (2010)
<i>Raphanus sativus</i>		<i>M. incognita</i>	Lazzeri et al. (2009)
<i>Eruca sativa</i>			
<i>Limnanthes alba</i>	3-Methoxybenzyl isothiocyanate	<i>M. hapla</i>	Zasada et al. (2012)
<i>Lantana camara</i>	11-Oxo triterpenic acid	<i>M. incognita</i>	Srivastava et al. (2006)
	Pomolic acid, lantanolic acid, lantoic acid, camarin, lantacin, camarinin and ursolic acid	<i>M. incognita</i>	Begum et al. (2008)
	Lantanilic acid, camaric acid and oleanolic acid	<i>M. incognita</i>	Qamar et al. (2005)
<i>L. camara</i>	p-Hydroxybenzoic acid, vanillic acid, caffeic acid, ferulic acid, quercetinglycoside and 7-glucoside	<i>M. javanica</i>	Shazaukat et al. (2003)
<i>Piper</i>	Capsaicin	<i>Meloidogyne spp.</i>	Neves et al. (2009), Dayan et al. (2009), Edelson et al. (2002)
<i>Allium sativum</i>		<i>M. incognita</i>	Cetintas and Yarba (2010)
<i>Pistacia terebinthus</i>		<i>M. incognita</i>	Ntalli et al. (2011a, b)
<i>Ruta chalepensis</i>	2-Undecanone	<i>M. incognita</i> <i>M. javanica</i>	

Πίνακας 3 Συνέχεια (Ntalli & Caboni 2012).

Φυτικό είδος	Νηματωδοκτόνος ουσία	Είδος νηματώδη	Βιβλιογραφία
<i>Ailanthus altissima</i>	(E,E)-2,4-Decadienal and (E)-2-decenal and furfural	<i>M. javanica</i>	Caboni et al. (2012)
<i>Aloysia triphylla</i>		<i>Meloidogyne spp.</i>	Duschatzky et al. (2004)
<i>Lippia juneliana</i>			
<i>L. turbinata</i>			
<i>Syzygium aromaticum</i>		<i>Anthemintic</i>	Meyer et al. (2008)
<i>Chrysanthemum coronarium</i>		<i>Meloidogyne artiellia</i>	Pérez et al. (2003)
<i>Thymus vulgaris</i>		<i>M. incognita</i>	Cetintas and Yarba (2010)
<i>Origanum vulgare</i>		<i>M. incognita</i>	Ntalli et al. (2010b, c)
<i>O. dictamnus</i>			
<i>Metha pulegium</i>			
<i>Melissa officinalis</i>			
<i>Foeniculum vulgare</i>			
<i>Pimpinella anisum</i>			
<i>Eucalyptus meliodora</i>			
<i>Artemisia dracunculus</i>		<i>M. javanica</i>	Klein et al. (2011)
<i>Mentha spicata</i>			
<i>Eruca sativa</i>			
<i>Chrysanthemum coronarium</i>		<i>Meloidogyne spp.</i>	Pérez et al. (2003)
<i>Mentha piperita</i>	Geraniol, eugenol, linalool	<i>M. arenaria</i>	Walker and Melin (1996)
<i>M. spicata</i>		<i>M. incognita</i>	
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	(Z)-Ascaridole	<i>M. incognita</i>	Chuan et al. (2011)
<i>Carum carvi</i>		<i>M. javanica</i>	Pandey (2000)
<i>Foeniculum vulgare</i>		<i>M. incognita</i>	
<i>Mentha rotundifolia</i>			
<i>M. spicata</i>			
<i>Origanum vulgare</i>			
<i>O. syriacum</i>			
<i>Coridothymus capitatus</i>			
<i>Eucalyptus citriodora</i>			
<i>E. hybrida</i>			
<i>Ocimum basilicum</i>			
<i>Pelargonium graveolens</i>			
<i>Cymbopogon martini</i>			
<i>Mentha arvensis</i>			
<i>M. piperita</i>			
<i>M. spicata</i>			
<i>Eucalyptus citriodora</i>			
<i>E. hybrida</i>			
<i>Ocimum basilicum</i>			
<i>Artemisia judaica</i>		<i>M. javanica</i>	Oka et al. (2000)
<i>E. meliodora</i>	Benzaldehyde	<i>M. incognita</i>	Ntalli et al. (2010c, 2011a)

νηματωδών κατά 50%, ενώ το μεθανολικό και υδατικό εκχύλισμα εμφανίζουν τιμές EC_{50} 0,916% w/w (Ntalli et al., 2010) και 1,152% w/w αντίστοιχα (Κοντέα, 2014). Η νηματωδοκτόνος δραστηριότητα του φυτού *M. azedarach* αποδίδεται κυρίως στο λιπώδες εκχύλισμα από τα φρούτα και ειδικά στα περιεχόμενα οργανικά οξέα, αλδεύδες και αλκοόλες. Σε ορισμένα από τα οργανικά οξέα, acetic, butyric, hexanoic και decanoic, οι τιμές $EC_{50/1h}$ υπολογίζονται σε 64,0, 69,8, 88,7 και 353,7 $\mu\text{g/ml}$

αντίστοιχα, ενώ 24h μετά την εγκατάσταση των πειραμάτων παράλυσης προνυμφών *M. incognita*, οι τιμές EC_{50} για την furfural, 5-hydroxymethylfurfural και furfurool υπολογίζονται σε 8,5, 45,7 και 41,2 $\mu\text{g/ml}$. Είναι ενδιαφέρον ότι η furfural εμφανίζει υψηλή υποκαπνιστική δράση και η τιμή $EC_{50/\text{υποκαπνιστική}}$ υπολογίζεται σε 24,1 $\mu\text{g/ml}$, 24h μετά την εμβάπτιση των προνυμφών σε διαλύματα furfural (Ntalli et al., 2010). Σε πειράματα παράλυσης των προνυμφών *M. incognita* και *M. javanica* που πραγματοποίησαν οι Fourie H., et al. (2014), με το σκεύασμα cropguard (δ.ο. furfural), υπολόγισαν πως μετά από έκθεση 24 h σε συγκεντρώσεις cropguard ≥ 1 και $\geq 0,01\%$ παρατηρήθηκε 100% παράλυση των προνυμφών *M. incognita* και *M. javanica*, αντίστοιχα, ενώ το ποσοστό αυτό δεν άλλαξε σε μετρήσεις που έγιναν στις 48, 72 και 96 h.

Μία άλλη οικογένεια φυτών που περιλαμβάνει βοτανικά είδη με ισχυρή νηματωδοκτόνο δράση είναι η οικογένεια *Fabaceae*. Πιο συγκεκριμένα στο είδος *Fabaceae crotalaria*, υπάρχει η νηματωδοκτόνος ουσία 1,2-dehydropyrolizidine (Thoden et al., 2009), όπως και στο είδος *Peganum harmala*, η δραστηριότητα των οποίων βασίζεται στα αλκαλοειδή και είναι παρόμοια με το εμπορικό νηματωδοκτόνο σκεύασμα Vydate (δ.ο. oxamy1). Από την άλλη πλευρά, η νηματωδοκτόνος δράση των φυτών *Acacia gummifera* και *Tagetes patula* βασίζεται στα φλαβονοειδή ενώ τα εκχυλίσματα των *Ononis natrix* και *Ceratonia siliqua* παρουσιάζουν νηματωδοκτόνο δράση εναντίον των ειδών *Meloidogyne spp.* με ποσοστό θνησιμότητας 67 και 71% αντίστοιχα (El Allagui et al., 2007). Το είδος *Medicago sativa* είναι πλούσιο σε τριτερπενιογλυκοζίτες από μεντικάγενές οξύ και παρουσιάζει ισχυρή νηματωδοκτόνο δράση έναντι των ειδών *Xiphinema spp.*, των κομβονηματωδών *M. incognita* και του χρυσονυματώδη της πατάτας *Globodera rostochiensis*, με το τελευταίο να είναι πιο ευπαθές είδος (D' Addabbo et al., 2011). Όταν το *Medicago sativa* ενσωματωθεί στο έδαφος σε συγκέντρωση 20 έως 40 τόνους/εκτάριο αυξάνει την απόδοση των καλλιεργειών τομάτας και μειώνει την πυκνότητα του κομβονηματώδη *M. incognita* και έχει αποτέλεσμα την απουσία προσβολής στις ρίζες (Leonetti et al., 2011).

Το είδος *Tagetes*, κοινώς ως «κατιφές», που ανήκει στην οικογένεια *Asteraceae* βρέθηκε να περιέχει πολυακετυλένια και πολυθένια που παρουσιάζουν νηματωδοκτόνες ιδιότητες (Chitwood 2002, Wat et al., 1981). Η νηματωδοκτόνος δράση των εκχυλισμάτων του φυτού καλεντούλα, δεν είναι σταθερή και έχει παρατηρηθεί πως εξαρτάται από τον τρόπο χρήσης, την ποικιλία και την ηλικία του

φυτού καλεντούλα αλλά και την θερμοκρασία (Hooks et al., 2010). Μελέτες που έχουν γίνει με την περιστρεφόμενη καλεντούλα, εφαρμόζοντάς την σε ένα σύστημα αμειψισποράς, έδειξαν ότι μειώνει σε μεγάλο ποσοστό την προσβολή από νηματώδη στην επόμενη καλλιέργεια (Wang et al., 2007). Ο κατιφές μειώνει τον πληθυσμό *M. incognita* αποτελεσματικά όταν εγκατασταθεί αμέσως μετά από μια ευπαθή καλλιέργεια (Marahatta et al., 2010), ενώ ενσωματώνοντας τον κατιφέ στο έδαφος μειώνεται επιπλέον ο αριθμός των νηματωδών και η επόμενη καλλιέργεια δεν παρουσιάζει έντονη προσβολή από *M. incognita* (Adekunle, 2011). Η νηματωδοκτόνος δράση του βασίζεται στα φλαβονοειδή, που περιέχει και παρουσιάζουν ισχυρή νηματωδοκτόνο δράση. Σε μελέτες έχει βρεθεί ότι μπορεί να μειώσει τον αριθμό των κομβονηματωδών σε ποσοστό 82% (El Allagui et al., 2007). Επιπλέον τα υδατικά εκχυλίσματα ρίζας του κατιφέ επιδρούν αποτελεσματικά στην ανάπτυξη και απόδοση της καλλιέργειας που εφαρμόζεται (Olabiyi 2008). Το πολικό εκχύλισμα των λουλουδιών του είδους *Tagetes patula* είναι δραστικό έναντι του είδους *Heterodera zea* και από πειράματα παράλυσης που πραγματοποιήθηκαν βρέθηκε ότι συγκέντρωση 0,125% w/w και πάνω ελέγχει 100% το είδος *M. incognita*, μετά από 24 h έκθεσης (Faizi et al., 2011). Τα φύλλα και τα υπολείμματα ριζών από το είδος *Aster sedifolius*, που είναι πλούσια σε σαπωνίνες, καταστέλλουν την αναπαραγωγή του *M. incognita* σε ποσοστό περίπου 97% όταν εφαρμόζονται σε συγκέντρωση 0,5 mg/100cm³ εδάφους (Di Vito et al., 2010). Τα είδη *Ageratum houstonianum* και *Senecio bicolor* περιέχουν ουσίες που καταστέλλουν εντελώς την νεανική ανάπτυξη του είδους *M. halpa* (Thoden et al., 2009).

Κονιορτοποιημένα μέρη από τα είδη *Brassica juncea*, *Brassica napus* και *Sinapis alba*, που ανήκουν στην οικογένεια Brassicaceae, δρουν ως νηματωδοκτόνα κατά των *Platylenchus penetrans* και *M. incognita* (Zasada et al., 2009). Πρόγραμμα αμειψισποράς με μπρόκολο (*Brassica oleracea*), και καλλιέργεια τομάτας, αφού ενσωματωθούν τα υπολείμματα της καλλιέργειας του μπρόκολου, έχει δείξει ότι μειώνει της προσβολή από κομβονηματώδεις *M. incognita* στην τομάτα (Lopea-Perez et al., 2010). Το είδος *Limnanthes alba*, έχει βρεθεί ότι περιέχει μία ουσία, την 3-methoxybenzyl, η οποία είναι πολύ τοξική για το είδος *M. halpa*, με τιμή EC₅₀ = 2,5 – 2,7 µg/ml (Zasada et al., 2012). Χαρακτηριστικό παράδειγμα νηματωδοκτόνου σκευάσματος, που εκχυλίζεται από το *Limnanthes alba*, είναι το τυποποιημένο νηματωδοκτόνο Dazitol που διατίθεται στο εμπόριο στις ΗΠΑ (Cao et al., 2007).

Το είδος *Lantana camara*, που ανήκει στην οικογένεια Verbenaceae, περιέχει ένα ισχυρά νηματοδοκτόνο οξύ, το 11-oxo triterpenic, που παρουσιάζει υψηλό ποσοστό θνησιμότητας κατά του είδους *M. incognita* (Srivastava et al., 2006). Πρόσθετες επίσης νηματοδοκτόνες ουσίες που περιέχει το είδος *L. camara*, είναι το pomolic acid, lantanolic acid, και lantoic acid, προκαλώντας σε πειράματα παράλυσης 100% θνησιμότητα σε συγκέντρωση 1 mg/ml, μετά από 24 h έκθεσης των προνυμφών *M. incognita* σε διαλύματα ελέγχου, ενώ επιπλέον μετά από 48 h οι ουσίες αυτές παρουσιάζουν την ίδια δραστηριότητα (Begum et al., 2008). Σε μία παρόμοια έρευνα οι Qamar et al. (2005) απέδειξαν ότι το lantanolic acid σε συγκέντρωση 0,5% w/w μπορεί να παρουσιάσει 98,9% θνησιμότητα έναντι στο είδος *M. incognita*. Υδατικά εκχυλίσματα από την ρίζα του *L. Camara*, είναι πλούσια σε p-hydroxybenzoic, vanillic, caffeic, ferulic οξέα, quercetinglycoside και 7-glucoside και χρησιμοποιούνται για την δημιουργία ριζοβακτηριδίων *Pseudomonas* που δρουν κατά του είδους *M. javanica* (Shazaukat et al., 2003).

Το αιθέριο έλαιο του είδους *Allium sativum* (σκόρδο), που ανήκει στην οικογένεια Amaryllidaceae, εμφανίζει ισχυρή νηματοδοκτόνο δράση. Όταν εφαρμόζεται σε συγκέντρωση 50 µl/φυτό μειώνει την δημιουργία κόμβων στη ρίζα και επιπλέον την αναπαραγωγή των θηλυκών νηματωδών (Cetintas & Yabra 2010). Το αιθέριο έλαιο του είδους *Pistacia terebinthus*, που ανήκει στην οικογένεια Anacardiaceae, εμφανίζει τιμή EC_{50} 1,12 µl/ml εναντίον του κομβονηματώδη *M. incognita* (Ntalli et al., 2011). Το αιθέριο έλαιο του είδους *Ruta chalepensis*, που ανήκει στην οικογένεια Rutaceae, σε πειράματα παράλυσης βρέθηκε ότι ελέγχει τα είδη *M. incognita* και *M. javanica* ($EC_{50/24h}$ 77,5 και 107,3 mg/L, αντίστοιχα), ενώ η ουσία 2-undecanone που απομονώθηκε από το *Ruta chalepensis*, παρουσιάζει ισχυρή δραστηριότητα εναντίον των ειδών *M. incognita* και *M. javanica* με τιμές EC_{50} = 20,6 και 22,5 mg/L αντίστοιχα (Ntalli et al., 2011). Τα μεθανολικά εκχυλίσματα ξύλου του είδους *Ailanthus altissima*, που ανήκει στην οικογένεια Simaroubaceae, παρουσιάζουν νηματοδοκτόνες ιδιότητες εναντίον του είδους *M. javanica* με τιμή $EC_{50/3d}$ 58,9 mg/L, όταν εφαρμόστηκαν σε πειράματα παράλυσης. Μεταξύ των νηματοδοκτόνων ουσιών, που περιέχει το εκχύλισμα ξύλου, προσδιορίζονται οι ουσίες 2,4-decadienal, 2-decenal και furfural με τιμές $EC_{50/24h}$ 11,7, 20,43 και 21,79 mg/L αντίστοιχα (Caboni et al., 2012). Το αιθέριο έλαιο του είδους *Chenopodium ambrosioides* (Chenopodiaceae) επιδεικνύει έντονη νηματοδοκτόνο δράση, έναντι

του είδους *M. incognita* με τιμή LC_{50} 49,5 $\mu\text{g/ml}$, ενώ στο κύριο συστατικό του (Z)-ascaridole η τιμή LC_{50} μειώνεται σε 32,7 $\mu\text{g/ml}$ (Chuan et al. 2011).

Επίσης, οι βοτανικές οικογένειες Apiaceae, Lamiaceae, Myrtaceae, Poaceae περιλαμβάνουν διάφορα βοτανικά είδη τα οποία υπάρχουν στην λεκάνη της Μεσογείου και παρουσιάζουν ισχυρές νηματοδοκτόνες ιδιότητες. Τα αιθέρια έλαια των *Carum carvi* (Apiaceae), *Foeniculum vulgare* (Apiaceae), *Mentha rotundifolia* (Lamiaceae) και *M. spicata* (Lamiaceae) παρουσιάζουν έντονη νηματοδοκτόνο δράση έναντι του είδους *M. javanica* σε συγκέντρωση 1 μL . Όταν τα προαναφερθέντα αιθέρια έλαια, αλλά και εκείνα από τα *Origanum vulgare* (Lamiaceae), *O. syriacum* (Lamiaceae) και *Coridothymus capitatus* (Lamiaceae) ενσωματωθούν στο έδαφος σε συγκέντρωση 100 και 200 mg/kg εδάφους αντίστοιχα, μειώνουν την δημιουργία κόμβων στις ρίζες σε καλλιέργεια αγγουριού (Oka et al., 2000). Επιπλέον, τα αιθέρια έλαια των *Eucalyptus citriodora* (Myrtaceae), *E. hybrida* (Myrtaceae) και *Ocimum basilicum* (Lamiaceae) παρουσιάζουν ισχυρή νηματοδοκτόνο δράση εναντίον του είδους *M. incognita*, ενώ τα έλαια από τα *Pelargonium graveolens* (Geraniaceae), *Cymbopogon martini* (Poaceae), *Mentha arvensis* (Lamiaceae), *M. piperita* (Lamiaceae) και *M. spicata* (Lamiaceae) ακολουθούν με μικρότερη δραστηριότητα. Τα έλαια του *E. citriodora* και *E. hybrida* είναι εξαιρετικά τοξικά σε συγκεντρώσεις πολύ χαμηλές, ακόμα μικρότερες και από 250ppm (Pandey 2000). Το αιθέριο έλαιο της *Artemisia judaica* σε πειράματα παράλυσης που εφαρμόστηκε κατά του είδους *M. javanica* μείωσε την κινητικότητα των προνυμφών σε ποσοστό 15% και επιπλέον διέκοψε την εκκόλαψη αυγών σε ποσοστό 25,5% (Oka et al., 2000). Τα αιθέρια έλαια των *Aloysia triphylla* (Verbenaceae), *Lippia juneliana* (Verbenaceae) και *L. turbilate* (Verbenaceae) παραλύουν περισσότερο από το 80% τις προνύμφες των κομβονηματωδών *Meloidogyne spp.* σε συγκέντρωση 667 $\mu\text{L/L}$ (Duschatzky et al., 2004). Το αιθέριο έλαιο του *Syzygium aromaticum* (Myrtaceae) σε πειράματα παράλυσης προνυμφών και πειράματα διακοπής εκκόλαψης των αυγών παρουσιάζει τιμές $EC_{50} = 0,145\%$ και 0,097% v/v, αντίστοιχα. Οι πτητικές ουσίες του *S. aromaticum* μειώνουν την εκκόλαψη των αυγών στο νερό κατά 30% και επιπλέον θανατώνουν τις νεοεκκολαφθείσες προνύμφες σε ποσοστό 100%. Σε δοκιμές με ενσωμάτωση του αιθέριου ελαίου στο έδαφος η τιμή EC_{50} υπολογίστηκε ίση με 0,192% v/w (Meyer et al., 2002). Το αιθέριο έλαιο από το είδος *Chrysanthemum coronarium* (Asteraceae)

όταν εφαρμόζεται σε συγκεντρώσεις 2, 4, 8 και 16 $\mu\text{l/ml}$, μειώνει την εκκόλαψη των αυγών και την επιβίωση του είδους *Meloidogyne ariella* (Fares et al., 2003). Το αιθέριο έλαιο του *Thymus vulgaris* (Lamiaceae) όταν εφαρμόζεται σε συγκέντρωση 150 $\mu\text{l/ml}$ μειώνει τη δημιουργία κόμβων στις ρίζες σημαντικά και επιπλέον μειώνει το ποσοστό εκκόλαψης των αυγών (Cetintas & Yabra 2010). Οι τιμές EC_{50} που υπολογίζονται για τα αιθέρια έλαια των *Origanum vulgare* (Lamiaceae), *Origanum dictamnus* (Lamiaceae), *Mentha pulegium* (Lamiaceae), *Melissa officinalis* (Lamiaceae), *Foeniculum vulgare* (Apiaceae), *Pimpinella anisum* (Apiaceae) και *Eucalyptus meliodora* (Myrtaceae) για το είδος *M. incognita* είναι 1.55, 1.72, 3.15, 6.15, 231, 269 και 807 $\mu\text{l/ml}$ αντίστοιχα (Ntalli et al., 2010). Παρομοίως, τα υπολείμματα των αρωματικών φυτών φαίνεται να παρουσιάζουν νηματωδοκτόνες ιδιότητες όταν ενσωματωθούν στο έδαφος έναντι των κομβονηματωδών (Klein et al., 2011). Σε δοκιμές σε φυτοδοχεία με ρεβίθι, με εκχύλισμα από *Chrysanthemum coronarium* (Asteraceae) σε συγκεντρώσεις 10-40 $\mu\text{l}/500\text{cm}^3$ εδάφους παρατηρήθηκε μείωση της αναπαραγωγής των νηματωδών (Perez et al., 2003). Πολύ καλά αποτελέσματα έχει βρεθεί ότι παρουσιάζουν τα είδη *Mentha piperita* (Lamiaceae) και *M. Spicata* (Lamiaceae), καθώς όταν υπολείμματα τους ενσωματώθηκαν σε μολυσμένο έδαφος με *M. arenaria* 8 εβδομάδες πριν την εγκατάσταση καλλιέργειας τομάτας, προκάλεσαν μείωση κατά 90% των κόμβων στις ρίζες (Walker & Melin 1996). Η benzaldehyde ως συστατική ουσία του *E. Melliodora* (Myrtaceae), παρουσιάζει υψηλή νηματωδοκτόνο δράση με τιμή EC_{50} 9 $\mu\text{l/ml}$ (Ntalli et al., 2011).

2.3 Μελλοντικές προοπτικές και εμπόδια στα νηματωδοκτόνα φυτικής προέλευσης.

Η χημική ποικιλομορφία που υπάρχει στα φυτά είναι μια καλή πηγή έτσι ώστε να βρεθούν νέες ουσίες που να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν στην διαχείριση των νηματωδών (Chitwood, 2002). Παρόλα αυτά εκτός από την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας που παρουσιάζουν οι ουσίες φυτικής προέλευσης, τα κριτήρια για την επιτυχία τους πρέπει να περιλαμβάνουν 1^{ov}) την εκτίμηση του κόστους από την ανάπτυξη νέων νηματωδοκτόνων σκευασμάτων και 2^{ov}) την ανάπτυξη σκευασμάτων που εξασφαλίζουν μεγάλη κλίμακα χρήσης για περισσότερα από ένα είδος νηματώδη. Για την παραγωγή βοτανικών σκευασμάτων σε εμπορική κλίμακα, η φυτική μάζα που χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη, πρέπει να παράγεται συστηματικά

σε καλλιέργεια που επιτρέπει κατά προτίμηση τη συνεχή και όχι εποχική συγκομιδή. Επίσης πρέπει το κόστος της καλλιέργειας και της συγκομιδής να μην είναι ασύμφορο. Ένα συχνό μειονέκτημα των βοτανικών σκευασμάτων είναι η παραλλακτικότητα στην αποτελεσματικότητα καταπολέμησης μεταξύ διαφορετικών παρτίδων, λόγω της φυσικής παραλλακτικότητας της χημικής σύστασης της πρώτης ύλης που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση-τυποποίηση. Όσο λιγότερα είναι τα βήματα του διαχωρισμού μεταξύ των συστατικών, και του καθαρισμού τους, τόσο μεγαλύτερο είναι το συγκεκριμένο πρόβλημα. Η ανάπτυξη μεθόδων ανάλυσης ποιοτικής και ποσοτικής ταυτοποίησης του-ων δραστικού-ών συστατικού-ών βοηθά στην σταθεροποίηση της διαδικασίας παρασκευής των σκευασμάτων (Isman, 2006). Η τιμή των βοτανικών σκευασμάτων πρέπει να είναι χαμηλή ώστε να συμφέρει η χρήση τους. Για να συμβεί αυτό θα πρέπει να είναι εφικτή η βιομηχανοποίηση της συγκομιδής της πρώτης ύλης που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση, να είναι δυνατή η εύρεση αποδοτικότερων μεθόδων εκχύλισης, η απόδοσή τους σε εκχύλισμα να είναι συμφέρουσα και να υπάρχει δυνατότητα εκμετάλλευσης των παραπροϊόντων. Μια τέτοια προσπάθεια γίνεται όσον αφορά στο βοτανικό είδος *A. indica* (Morgan, 2009).

Σε αντίθεση με τις ΗΠΑ, όπου, βάσει της EPA, τα νηματωδοκτόνα φυτικής προέλευσης περνούν από ευκολότερη διαδικασία αξιολόγησης για τη χορήγηση άδειας έγκρισης κυκλοφορίας, στην Ευρώπη το νομοθετικό πλαίσιο για τα βοτανικά σκευάσματα είναι το ίδιο με αυτό των συμβατικών (2009/128/EK). Για παράδειγμα στις ΗΠΑ τα αιθέρια έλαια που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα και τα ποτά, όπως αυτά των αρωματικών ειδών *Rosmarinus officinalis*, *Syzygium aromaticum* και *Thymus vulgaris*, δεν υπόκεινται στη συνήθη διαδικασία χορήγησης άδειας έγκρισης κυκλοφορίας όταν προορίζονται για τυποποίηση ως φυτοπροστευτικά σκευάσματα (Quarles, 1996; Isman, 2006). Αντίθετα, στην Ευρώπη τα φυτικά εκχυλίσματα και τα δραστικά συστατικά τους παραμένουν σε πειραματικό στάδιο και δε διευκολύνεται η είσοδός τους στο εμπόριο. Φαίνεται πως λανθασμένα δίνεται μεγαλύτερη προσοχή στα υπολείμματα των συμβατικών γεωργικών φαρμάκων στα τρόφιμα παρά στην αντικατάστασή τους από ουσίες πιο φιλικές στον άνθρωπο και το περιβάλλον.

2.4 Σκοπός της εργασίας.

Με στόχο τη διερεύνηση και μελέτη ουσιών φυτικής προέλευσης που δεν έχουν μέχρι στιγμής μελετηθεί για τη νηματωδοκτόνο δράση τους εναντίον του *M. incognita*, επιλέχθηκαν πέντε φυτικές ουσίες και εξετάστηκαν ως προς την δυνατότητα πρόκλησης παράλυσης των προνυμφών δευτέρου σταδίου ανάπτυξης (μολυσματικό στάδιο του κομβονηματώδη) καθώς και ως προς την επίδρασή τους στο βιολογικό του κύκλο σε πειράματα βιοδοκιμών σε φυτοδοχεία. Οι φυτικές ουσίες επιλέχθηκαν με βασικό κριτήριο την ελληνική τους προέλευση, αφού υπάρχουν σε βοτανικά είδη που φύονται στην Ελλάδα και τις βιβλιογραφικές αναφορές, τις σχετικές με τις βιολογικές τους δράσεις.

Οι τρόποι μελέτης των φυτικών ουσιών επιλέχθηκαν ώστε να καλύπτουν όλο το φάσμα των μεθόδων εφαρμογής των ουσιών αυτών, για έλεγχο νηματωδοκτόνου δράσης, στο πλαίσιο των δυνατοτήτων του εργαστηρίου. Έτσι πραγματοποιήθηκαν βιοδοκιμές ενσωμάτωσης διαλυμάτων των ουσιών σε φυτοδοχεία, όπου σε έδαφος τεχνητά μολυσμένο με νηματώδεις αναπτύχθηκαν φυτά τομάτας. Παράλληλα πραγματοποιήθηκαν βιοδοκιμές εφαρμογής των ουσιών, σε υδατικά διαλύματα για απευθείας έλεγχο της επίδρασης τους στους νηματώδεις. Δύο ουσίες φυτικής προέλευσης ήταν οι (E,E)-2,4-decadienal και (E)-2-decenal όπου έχουν απομονωθεί από το βοτανικό είδος *Ailanthus altissima* που ανήκει στην οικογένεια Simaroubaceae, άλλες δύο ήταν οι furfural και 5-hydroxymethylfurfural που έχουν απομονωθεί από το βοτανικό είδος *Melia azedarach* που ανήκει στην οικογένεια Meliaceae, ενώ η τελευταία ήταν η (E)-2-undecanone που έχει απομονωθεί από το βοτανικό είδος *Ruta chalepensis* που ανήκει στην οικογένεια Rutaceae.

Οι πέντε ουσίες μελετήθηκαν για πρώτη φορά εναντίον του *M. incognita* σε πειράματα βιοδοκιμών σε φυτοδοχεία. Αρχικά ελέχθησαν ως προς την ικανότητα παράλυσης των προνυμφών υπό τη μορφή υδατικών διαλυμάτων. Στη συνέχεια ελέχθησαν υπό τη μορφή υδατικών διαλυμάτων με ενσωμάτωση σε φυτοδοχεία για τον έλεγχο της επίδρασης στον βιολογικό κύκλο του νηματώδη *M. incognita*.

Κεφάλαιο 3 Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Ουσίες φυσικής προέλευσης

Οι ουσίες φυσικής προέλευσης που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα δοκιμών βιολογικής δράσης, τόσο σε πειράματα παράλυσης όσο και σε πειράματα στα φυτοδοχεία σε φυτά τομάτας, (E,E)-2,4-decadienal (δεκαδιενάλη), (E)-2-undecanone (ενδεκανόνη), (E)-2-decenal (δεκενάλη), furfural (φουρφουράλη) και 5-hydroxymethylfurfural (υδροξυμεθυλοφουρφουράλη), καθαρότητας 98%, προμηθεύτηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich (Milano, Italy). Επίσης από την ίδια εταιρία προμηθεύτηκε η βοηθητική ουσία Tween 20.

3.2 Ανάπτυξη και συντήρηση του πληθυσμού *M. incognita*

Ο αρχικός πληθυσμός νηματωδών *M. incognita*, ως προνύμφες σταδίου J2, παραλήφθηκε από μολυσμένες ρίζες τομάτας που παραχωρήθηκαν από το Εργαστήριο Γεωργικών Φαρμάκων της Σχολής Γεωπονίας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και στη συνέχεια αναπτύχθηκε σε φυτά τομάτας (*Solanum lycopersicum* L.) ποικιλίας Belladonna. Τα φυτά της τομάτας που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη του πληθυσμού των κομβονηματωδών βρίσκονταν στο στάδιο του πέμπτου αναπτυγμένου φύλλου. Τοποθετήθηκαν σε πλαστικά φυτοδοχεία (18 cm διαμέτρου) που περιείχαν φυτόχωμα, συντηρήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης στους 28° C, 40 % σχετική υγρασία και 16 h φωτοπερίοδο και ποτίζονταν κάθε τρεις περίπου ημέρες.

3.2.1 Μέθοδος παραλαβής προνυμφών δευτέρου σταδίου ανάπτυξης (J2)

Πενήντα έως εξήντα ημέρες μετά τη επιμόλυνση και με την ολοκλήρωση ενός βιολογικού κύκλου οι ρίζες των φυτών αφερέθηκαν, πλύθηκαν για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα του εδάφους και επεξεργάστηκαν κατάλληλα για την παραλαβή των αυγών και ακολούθως την εκκόλαψη των προνυμφών J2. Συγκεκριμένα, η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιλάμβανε την κοπή των ριζών σε μικρά τεμάχια των 2cm, την τοποθέτησή τους σε διάλυμα 1% NaOCl (υποχλωριώδες νάτριο) και ανακίνηση του αιωρήματος για πέντε λεπτά. Ακολούθησε πλύση σε τρεχούμενο νερό με ήπια ροή μέσα από κόσκινα διατομής 150, 250 και 400 mesh (Hussey and Barkey, 1973), παραλαβή των αυγών των νηματωδών στα κόσκινα και

μεταφορά και επώασή τους σε τροποποιημένα δοχεία Baermann στους 28° C. Μετά από 24h παραλαμβάνονταν οι νέο- εκκολαφθείσες προνύμφες J2. Οι J2 που εκκολάπτονταν κατά τη διάρκεια της πρώτης ημέρας απορρίπτονταν, λόγω της διαφοράς μεταξύ τους ως προς την ηλικία, ενώ εκείνες που συλλέγονταν ανά 48h από τη δεύτερη μέρα και μετά χρησιμοποιούνταν τόσο για τη διατήρηση του πληθυσμού όσο και για τις βιολογικές δοκιμές. Σε όλο το κείμενο η αναφορά J2 σημαίνει προνύμφες δευτέρου σταδίου ανάπτυξης και ηλικίας δυο ημερών (48 h).



Εικόνα 6 (I) Ανάπτυξη πληθυσμού του *M. incognita* σε φυτά τομάτας ποικιλίας Belladonna, (II) Τροποποιημένο δοχείο Baermann για την εκκόλαψη των αυγών και την παραλαβή των J2.

3.3 Δοκιμές επίδρασης των ουσιών δεκαδιενάλη, δεκενάλη, ενδεκανόνη και φουρφουράλη στην παράλυση των προνυμφών *M. incognita*

Η νηματοδοκτόνος δράση των ουσιών δεκαδιενάλη και δεκενάλη ελέγχθηκε με πειράματα παράλυσης σε οχτώ επίπεδα συγκεντρώσεων: 2, 5, 10, 15, 20, 25, 40 και 50 mg/L ενώ αυτή των ενδεκανόνη και φουρφουράλη στα επίπεδα συγκεντρώσεων: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 και 40 mg/L. Επίσης πραγματοποιήθηκε έλεγχος της νηματοδοκτόνου δράσης, του μικτού διαλύματος δεκαδιενάλη και δεκενάλη σε αναλογία 1:1, σε επτά επίπεδα, 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5 και 20 mg/L. Αρχικά παρασκευάστηκαν πυκνά μητρικά υδατικά διαλύματα σε νερό που περιείχε Tween-20 και μεθανόλη για να διευκολυνθεί η διαλυτότητα των ουσιών, ενώ οι επόμενες αραιώσεις γίνονταν με νερό. Οι συγκεντρώσεις της μεθανόλης και του Tween-20 στα τελικά διαλύματα εμβάπτισης των J2 δεν ξεπέρασαν ποτέ το 1,0 και 0,3 % v/v, αντίστοιχα, αφού αυτά τα επίπεδα συγκεντρώσεων, με βάση προκαταρκτικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν δεν προκαλούν παράλυση των J2. Ως μάρτυρες στα πειράματα παράλυσης χρησιμοποιήθηκαν νερό καθώς και νερό με μεθανόλη και Tween-20, σε συγκεντρώσεις όμοιες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στις

μεταχειρίσεις. Τα διαλύματα αρχικά παρασκευάστηκαν σε συγκεντρώσεις διπλάσιες των συγκεντρώσεων ελέγχου και στη συνέχεια αναμίχθηκαν μέσα στα πηγάδια των πλακών με το αιώρημα των νηματωδών σε αναλογία 1:1 (v/v). Ο συνολικός αριθμός των J2 που προστέθηκαν σε κάθε πηγάδι της πλάκας πολυστυρενίου των 96 πηγαδίων και χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση των δοκιμών παράλυσης, ήταν είκοσι (20). Οι πλάκες καλύφθηκαν με καπάκι για να αποφευχθεί η εξάτμιση των διαλυμάτων, καθώς και οι επιμολύνσεις μεταξύ των μεταχειρίσεων. Επιπλέον, για τον έλεγχο της επιμόλυνσης μεταξύ των μεταχειρίσεων, τα περιφερειακά της κάθε μεταχείρισης πηγάδια χρησιμοποιήθηκαν για την εμβάπτιση των J2 σε νερό. Απουσία παράλυσης σε αυτές τις προνύμφες σημαίνει απουσία επιμόλυνσης μεταξύ μεταχειρίσεων. Στη συνέχεια οι πλάκες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο 28 °C και η κινητικότητα των προνυμφών αξιολογήθηκε με τη βοήθεια ανάστροφου μικροσκοπίου (Euromex, Holland) σε μεγέθυνση 40x, στις 24, 48 και 96h από την εγκατάσταση του πειράματος. Οι κατηγορίες κινητικότητας στις οποίες ταξινομήθηκαν οι J2 ήταν: κινητές και ακίνητες. Οι μεταχειρίσεις επαναλήφθηκαν έξι φορές σε πειραματικό σχέδιο πλήρως τυχαιοποιημένων ομάδων.



Εικόνα 7 (I) Προσθήκη των διαλυμάτων της κάθε ουσίας σε πλάκα πολυστυρενίου, (II) Πλάκες πολυστυρενίου κλεισμένες με καπάκι, αφού έχει προστεθεί και το διάλυμα με τις προνύμφες, (III) Ανάστροφο μικροσκόπιο.

3.4 Δοκιμές επίδρασης των ουσιών στο βιολογικό κύκλο του *M. incognita*

Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν και αφορούσαν την επίδραση των ουσιών φυτικής προέλευσης στο βιολογικό κύκλο του *M. incognita* εφαρμόστηκαν σε φυτοδοχεία με φυτά τομάτας και έδαφος συγκεκριμένης παρτίδας.

Αρχικά οι ουσίες δεκαδιενάλη, δεκενάλη, φουρφουράλη και υδροξυμεθυλοφουρφουράλη εφαρμόστηκαν σε ένα δοκιμαστικό πείραμα που αφορούσε την έκθεση των νηματωδών σε δύο συγκεντρώσεις της κάθε ουσίας, έτσι ώστε να παρουσιαστεί μια πρώτη εικόνα της επίδρασης που παρουσιάζουν οι ουσίες στον βιολογικό κύκλο του *M. incognita*. Στη συνέχεια οι ουσίες δεκαδιενάλη και φουρφουράλη εφαρμόστηκαν σε ένα νέο πείραμα που αφορούσε την έκθεση των νηματωδών J2 *M. incognita* σε περισσότερα επίπεδα συγκεντρώσεων της κάθε ουσίας, ώστε να μπορέσει να προκύψει η καμπύλη επίδρασης – δόσης για τον υπολογισμό του EC₅₀ της κάθε ουσίας. Λόγω των πολύ καλών αποτελεσμάτων που έδωσε η δεκαδιενάλη στο δεύτερο πείραμα, πραγματοποιήθηκε ένα νέο πείραμα που δοκιμάστηκε εκ νέου η δεκαδιενάλη καθώς επίσης και η δεκενάλη. Στο ίδιο πείραμα υπήρχαν και μεταχειρίσεις με μικτά διαλύματα δεκαδιενάλης και δεκενάλης σε αναλογία 1:1. Τέλος πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα που δοκιμάστηκε η επίδραση της ενδεκανόνης στο βιολογικό κύκλο του *M. incognita* που αφορούσε την έκθεση των νηματωδών J2 σε περισσότερα επίπεδα συγκεντρώσεων της ουσίας ώστε να μπορέσει να προκύψει η καμπύλη επίδρασης – δόσης για τον υπολογισμό του EC₅₀.

Το έδαφος που χρησιμοποιήθηκε ήταν άργιλο-πηλώδες με οργανική ουσία σε ποσοστό 1,3 % και pH 7,8 και συλλέχθηκε από αγρό του αγροκτήματος της Γεωπονικής Σχολής του Αριστοτέλειου Πανεπιστήμιου Θεσσαλονίκης που δεν είχε ιστορικό προσβολής από νηματώδεις. Το έδαφος πέρασε από κόσκινο διατομής 3 mm και στη συνέχεια αεροξηράθηκε μερικώς για μια νύχτα. Με τη χρήση της μεθόδου Bearmann επιβεβαιώθηκε η απουσία κομβονηματωδών. Στη συνέχεια το έδαφος αναμείχθηκε με άμμο σε αναλογία 2:1 και το μίγμα εδάφους-άμμου που παρασκευάστηκε χρησιμοποιήθηκε για τις βιοδοκιμές βιολογικής δράσης των ουσιών σε φυτοδοχεία.

3.4.1 Αρχικές δοκιμές επίδρασης των ουσιών δεκαδιενάλη, δεκενάλη, φουρφουράλη και υδροξυμεθυλοφουρφουράλη στο βιολογικό κύκλο του *M. incognita* σε δύο συγκεντρώσεις

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ένα δοκιμαστικό πείραμα που αφορούσε την έκθεση των νηματωδών σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων της κάθε ουσίας, έτσι ώστε να παρατηρηθεί μια πρώτη εικόνα της επίδρασης που παρουσιάζουν οι ουσίες στον βιολογικό κύκλο του *M. incognita*.

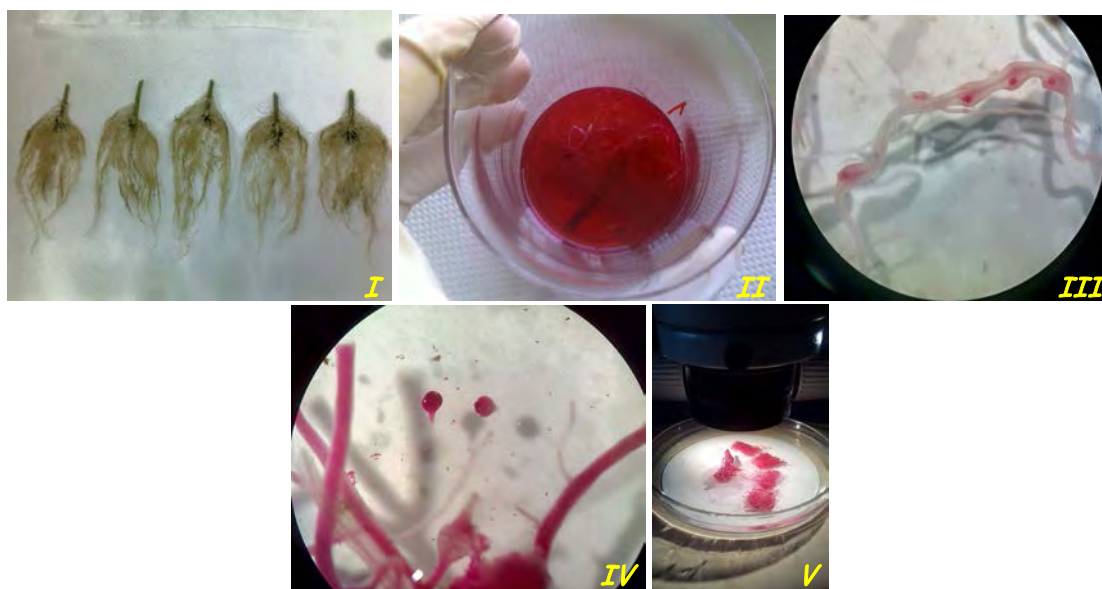
Έδαφος παρτίδας όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 3.4 χωρίστηκε σε έντεκα μέρη (1kg χλωρό βάρος/μέρος) που αντιπροσώπευαν τις μεταχειρίσεις του πειράματος. Τα εδάφη εμβολιάστηκαν με αιώρημα 12.500 J2/kg εδάφους, αναμείχθηκαν με ανάδευση για την καλύτερη κατανομή των νηματωδών και αφέθηκαν στο σκοτάδι για 24h. Στη συνέχεια, κοσκινίστηκαν ξανά σε κόσκινο διαμέτρου 3 mm και δέχθηκαν τις μεταχειρίσεις.

Όπως αναφέρθηκε, η κάθε ουσία εφαρμόστηκε σε δύο επίπεδα, ένα χαμηλό 300 mg kg⁻¹ εδάφους και ένα υψηλό 600 mg kg⁻¹ εδάφους. Στην παρούσα δοκιμή χρησιμοποιήθηκαν οι ουσίες δεκαδιενάλη, δεκενάλη, φουρφουράλη και υδροξυμεθυλοφουρφουράλη για την παρασκευή μητρικών διαλυμάτων σε μεθανόλη (1ml). Το μητρικό διάλυμα κάθε ουσίας αραιωνόταν με νερό που περιείχε Tween-20 (0,3% w/v) ώστε να προκύψουν τα διαλύματα ελέγχου, στις συγκεντρώσεις που αναφέρθηκαν. Η προσθήκη του επιφανειοδραστικού Tween-20 απαιτήθηκε για την παρασκευή ομογενούς γαλακτώματος των ουσιών με μικρή διαλυτότητα στο νερό. Το νηματωδοκτόνο σκεύασμα Vydate® 10 SL (a.i. oxamyl 10%, DuPont) χρησιμοποιήθηκε στη συγκέντρωση των 120 μl kg⁻¹ εδάφους, ως χημικός μάρτυρας. Καθαρό νερό, όπως επίσης νερό με Tween-20 (0,3% w/v) και μεθανόλη (0,5% v/v) (μάρτυρας αντίστοιχος του φορέα των διαλυμάτων ελέγχου) χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες. Μετά από 24 h το έδαφος κοσκινίστηκε για τελευταία φορά και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για τη μεταφύτευση φυταρίων τομάτας, ποικιλίας Belladonna, σε πλαστικά φυτοδοχεία 200 g. Τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταφύτευση ήταν 7 εβδομάδων, στο στάδιο του έκτου αναπτυγμένου φύλλου και μετά την εγκατάστασή τους ποτίστηκαν με 30 ml νερό ανά φυτό. Το πείραμα

τοποθετήθηκε σε θάλαμο ανάπτυξης στους 28° C, 40 % σχετική υγρασία και 16 h φωτοπερίοδο και ποτίζονταν κάθε τρεις περίπου ημέρες με 30 – 50 ml νερό.



Εικόνα 8 (I) Τα έντεκα μέρη (1kg χλωρό βάρος/μέρος) εδάφους που αντιπροσώπευαν τις μεταχειρίσεις του πειράματος, (II) Μεταφύτευση φυταρίων τομάτας σε πλαστικά φυτοδοχεία.



Εικόνα 9 (I) Πλύσιμο και στέγνωμα των ριζών, (II) Εμβάπτιση των ριζών σε διάλυμα φουξίνης, (III – V) Οπτική παρατήρηση των ριζών σε στερεοσκόπιο, (IV) Αφαίρεση θηλυκών ατόμων και καταμέτρηση τους.

Πενήντα ημέρες περίπου μετά την εγκατάσταση του πειράματος, αφερόνταν το υπέργειο μέρος των φυταρίων στο ύψος του λαιμού, οι ρίζες των φυτών πλένονταν προσεκτικά σε τρεχούμενο νερό για την απομάκρυνση του εδάφους και αφού στέγνωσαν, ζυγίστηκαν. Ακολουθούσε χρώση των ριζών με εμβάπτιση σε διάλυμα φουξίνης (Sigma, Aldrich) σύμφωνα με τους Byrd et al., (1983). Συνολικά γίνονταν οι εξής μετρήσεις: χλωρό βάρος ρίζας, χλωρό βάρος υπέργειου τμήματος και αριθμός θηλυκών *M. incognita* ανά γραμμάριο ρίζας. Η καταμέτρηση των θηλυκών έγινε σε μεγέθυνση 10x σε συνθήκες ομοιόμορφου φωτισμού μέσα στον ιστό του δείγματος ή μετά από αφαίρεση του κατά περίπτωση, όταν η χρώση δεν ήταν επιτυχής. Το

πειραματικό σχέδιο ήταν πλήρους τυχαιοποίησης και η κάθε μεταχείριση είχε πέντε επαναλήψεις.

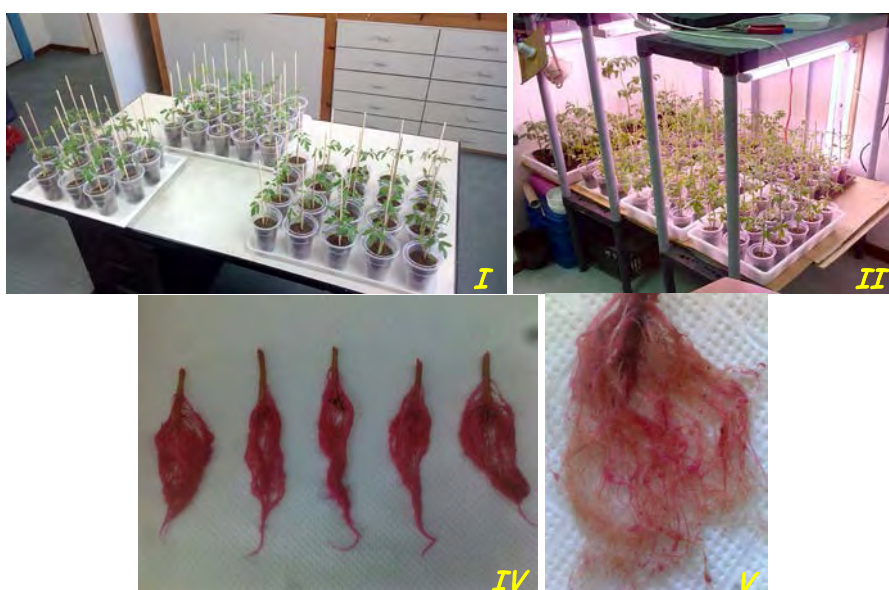
3.4.2 Δοκιμές επίδρασης των ουσιών δεκαδιενάλη και φουρφουράλη στο βιολογικό κύκλο του *M. incognita*

Οι ουσίες δεκαδιενάλη και φουρφουράλη, αφού δοκιμάστηκαν σε ένα αρχικό πείραμα δύο συγκεντρώσεων, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.4.1, εφαρμόστηκαν σε ένα νέο πείραμα που αφορούσε την έκθεση των νηματωδών J2 σε περισσότερα επίπεδα συγκεντρώσεων της κάθε ουσίας, ώστε να μπορέσει να προκύψει η καμπύλη επίδρασης δόσης για τον υπολογισμό του EC₅₀ (μέση θανατηφόρος δόση) της κάθε ουσίας.

Έδαφος της ίδιας παρτίδας με εκείνο που αναφέρθηκε στην παράγραφο 3.4 χωρίστηκε σε δεκατέσσερα μέρη (1kg/μέρος), καθένα από τα οποία αντιπροσώπευε και μια μεταχείριση του πειράματος. Τα εδάφη μολύνθηκαν με αιώρημα 12.500 J2/kg εδάφους, αναμείχθηκαν με ανάδευση για την καλύτερη κατανομή των νηματωδών και αφέθηκαν στο σκοτάδι για 24h. Στη συνέχεια, κοσκινίστηκαν με κόσκινο διαμέτρου 3 mm και δέχθηκαν τις μεταχειρίσεις της δεκαδιενάλης και φουρφουράλης. Η δεκαδιενάλη εφαρμόστηκε στις συγκεντρώσεις 75, 112,5, 150, 225, και 300 mg kg⁻¹ εδάφους, ενώ η furfural στις συγκεντρώσεις 125, 187,5, 250, 375, 500 και 750 mg kg⁻¹ εδάφους. Το νηματωδοκτόνο σκεύασμα Vydate® 10 SL (a.i. oxamyl 10%, DuPont) χρησιμοποιήθηκε στη συγκέντρωση των 120 ml kg⁻¹ εδάφους, ως χημικός μάρτυρας. Καθαρό νερό, νερό με Tween-20 (0,3% w/v) και μεθανόλη (0,5% v/v) (μάρτυρας αντίστοιχος του φορέα των διαλυμάτων ελέγχου) χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες. Μετά από 24 h το έδαφος κοσκινίστηκε για τελευταία φορά και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για τη μεταφύτευση φυταρίων τομάτας, ποικιλίας Belladonna, σε πλαστικά φυτοδοχεία 200 g. Τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταφύτευση ήταν 7 εβδομάδων, στο στάδιο του έκτου αναπτυγμένου φύλλου και μετά την εγκατάστασή τους ποτίστηκαν με 30 ml νερό ανά φυτό. Το πείραμα τοποθετήθηκε σε θάλαμο ανάπτυξης στους 28° C, 40 % σχετική υγρασία και 16 h φωτοπερίοδο και ποτίζονταν κάθε τρεις περίπου ημέρες με 30 – 50 ml νερό.

Πενήντα ημέρες περίπου μετά την εγκατάσταση του πειράματος, αφαιρούνταν το υπέργειο μέρος των φυταρίων στο ύψος του λαιμού, οι ρίζες των φυτών πλένονταν

προσεκτικά σε τρεχούμενο νερό για την απομάκρυνση του εδάφους και αφού στέγνωσαν, ζυγίστηκαν. Ακολουθούσε χρώση των ριζών με εμβάπτιση σε διάλυμα φουξίνης (Sigma, Aldrich) σύμφωνα με τους Byrd et al., (1983). Συνολικά γίνονταν οι εξής μετρήσεις: χλωρό βάρος ρίζας, χλωρό βάρος υπέργειου τμήματος και αριθμός θηλυκών *M. incognita* ανά γραμμάριο ρίζας. Η καταμέτρηση των θηλυκών έγινε σε μεγέθυνση 10x σε συνθήκες ομοιόμορφου φωτισμού μέσα στον ιστό του δείγματος ή μετά από αφαίρεση του κατά περίπτωση, όταν η χρώση δεν ήταν επιτυχής. Το πειραματικό σχέδιο ήταν πλήρους τυχαιοποίησης και η κάθε μεταχείριση είχε πέντε επαναλήψεις.



Εικόνα 10 (I – II) Μεταφύτευση φυταρίων τομάτας και μεταφορά σε χώρο με ελεγχόμενη θερμοκρασία και φωτισμό, (IV – V) Αποψη ρίζας μετά τη χρώση με εμβάπτιση σε διάλυμα φουξίνης.

3.4.3 Δοκιμές επίδρασης των ουσιών δεκαδιενάλη και δεκενάλη στο βιολογικό κύκλο του *M. incognita*

Η δεκενάλη αφού δοκιμάστηκε σε ένα αρχικό πείραμα δύο επιπέδων συγκεντρώσεων, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.4.1, εφαρμόστηκε σε ένα νέο πείραμα που αφορούσε την έκθεση των νηματωδών J2 σε περισσότερες συγκεντρώσεις της ουσίας, έτσι ώστε να μπορέσει να προκύψει η καμπύλη επίδρασης – δόσης για τον υπολογισμό του EC_{50} (μέση θανατηφόρος δόση) της ουσίας. Στο ίδιο πείραμα δοκιμάστηκε επίσης η δεκαδιενάλη που έδωσε πολύ καλά αποτελέσματα στο πείραμα που περιγράφεται στην παράγραφο 3.4.2. Τέλος, υπήρξαν μεταχειρίσεις με τον συνδυασμό μικτών διαλυμάτων δεκαδιενάλης και δεκενάλης σε αναλογία 1:1.

Έδαφος της ίδιας παρτίδας με εκείνο που αναφέρθηκε στην παράγραφο 3.4 χωρίστηκε σε δεκαεπτά μέρη (1kg/ μέρος), καθένα από τα οποία αντιπροσώπευε και μια μεταχείριση του πειράματος. Τα εδάφη μολύνθηκαν με αιώρημα 12.500 J2/kg εδάφους, αναμείχθηκαν με ανάδευση για την καλύτερη κατανομή των νηματωδών και αφέθηκαν στο σκοτάδι για 24h. Στη συνέχεια, κοσκινίστηκαν με κόσκινο διαμέτρου 3 mm και δέχθηκαν τις μεταχειρίσεις. Η δεκενάλη εφαρμόστηκε στις συγκεντρώσεις 30, 75, 120, 170, 230, 300 και 400 mg kg⁻¹ εδάφους, η δεκαδιενάλη στις συγκεντρώσεις 30, 75, 120, 170 και 230 mg kg⁻¹ εδάφους, ενώ ο συνδυασμός τους που βρίσκονταν σε αναλογία 1:1 είχε τις συγκεντρώσεις 75, 120 και 220 mg kg⁻¹ εδάφους. Το νηματωδοκτόνο σκεύασμα Vydate® 10 SL (a.i. oxamyl 10%, DuPont) χρησιμοποιήθηκε στη συγκέντρωση των 120 μl kg⁻¹ εδάφους, ως χημικός μάρτυρας. Νερό χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας. Μετά από 24 h το έδαφος κοσκινίστηκε για τελευταία φορά και στη χρησιμοποιήθηκε για τη μεταφύτευση φυταρίων τομάτας, ποικιλίας Belladonna, σε πλαστικά φυτοδοχεία 200g.



Εικόνα 11 (I – II) Ορισμένα από τα διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων που εφαρμόστηκαν στο έδαφος του πειράματος (III) Μεταφύτευση φυταρίων τομάτας σε πλαστικά φυτοδοχεία.

Τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταφύτευση ήταν 7 εβδομάδων, στο στάδιο του έκτου αναπτυγμένου φύλλου και μετά την εγκατάστασή τους ποτίστηκαν με 30 ml νερό ανά φυτό. Το πείραμα τοποθετήθηκε σε θάλαμο ανάπτυξης στους 28° C, 40 % σχετική υγρασία και 16 h φωτοπερίοδο και ποτίζονταν κάθε τρεις περίπου ημέρες με 30 – 50 ml νερό.

Πενήντα ημέρες περίπου μετά την εγκατάσταση του πειράματος, αφερόνταν το υπέργειο μέρος των φυταρίων στο ύψος του λαιμού, οι ρίζες των φυτών πλένονταν προσεκτικά σε τρεχούμενο νερό για την απομάκρυνση του εδάφους και αφού στέγνωσαν, ζυγίστηκαν. Ακολουθούσε χρώση των ριζών με εμβάπτιση σε διάλυμα φουξίνης σύμφωνα με τους Byrd et al., (1983). Συνολικά γίνονταν οι εξής μετρήσεις: χλωρό βάρος ρίζας, χλωρό βάρος υπέργειου τμήματος και αριθμός θηλυκών *M. incognita* ανά γραμμάριο ρίζας. Η καταμέτρηση των θηλυκών έγινε σε μεγέθυνση 10x σε συνθήκες ομοιόμορφου φωτισμού μέσα στον ιστό του δείγματος ή μετά από αφαίρεση του κατά περίπτωση, όταν η χρώση δεν ήταν επιτυχής. Το πειραματικό σχέδιο ήταν πλήρους τυχαιοποίησης και η κάθε μεταχείριση είχε πέντε επαναλήψεις.

3.4.4 Δοκιμές επίδρασης της ενδεκανόνης στο βιολογικό κύκλο του *M. incognita*

Η ενδεκανόνη αφού δοκιμάστηκε σε ένα αρχικό πείραμα παράλυσης προνυμφών J2, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.3, εφαρμόστηκε σε ένα νέο πείραμα που αφορούσε την επίδραση της ουσίας στο βιολογικό κύκλο του *M. incognita*, ώστε να μπορέσει να προκύψει η καμπύλη επίδρασης – δόσης για τον υπολογισμό του EC₅₀ (μέση θανατηφόρος δόση) της ουσίας.

Έδαφος της ίδιας παρτίδας με εκείνο που αναφέρθηκε στην παράγραφο 3.4 χωρίστηκε σε έντεκα μέρη (1kg/ μέρος), καθένα από τα οποία αντιπροσώπευε και μια μεταχείριση του πειράματος. Τα εδάφη μολύνθηκαν με αιώρημα 12.500 J2/kg εδάφους, αναμείχθηκαν με ανάδευση για την καλύτερη κατανομή των νηματωδών και αφέθηκαν στο σκοτάδι για 24h. Μια μεταχείριση δεν δέχτηκε καθόλου νηματώδεις J2, εφαρμόστηκε σκέτο νερό και χρησιμοποιήθηκε ως λευκός μάρτυρας. Στη συνέχεια, κοσκινίστηκαν με κόσκινο διαμέτρου 3 mm και δέχθηκαν τις μεταχειρίσεις. Η ενδεκανόνη εφαρμόστηκε στις συγκεντρώσεις 30, 75, 120, 170, 230, 300, και 400 mg kg⁻¹ εδάφους. Το νηματωδοκτόνο σκεύασμα Vydate® 10 SL (a.i. oxamyl 10%, DuPont) χρησιμοποιήθηκε στη συγκέντρωση των 120 μl kg⁻¹ εδάφους, ως χημικός μάρτυρας. Καθαρό νερό, καθώς επίσης νερό με Tween-20 (0,3% w/v) και μεθανόλη (0,5% v/v) (μάρτυρας αντίστοιχος του φορέα των διαλυμάτων ελέγχου) χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες. Στον λευκό μάρτυρα εφαρμόστηκε ξανά μόνο νερό. Μετά από 24 h το έδαφος κοσκινίστηκε για τελευταία φορά και στη

συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για τη μεταφύτευση φυταρίων τομάτας, ποικιλίας Belladonna, σε πλαστικά φυτοδοχεία 200 g. Τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταφύτευση ήταν 7 εβδομάδων, στο στάδιο του έκτου αναπτυγμένου φύλλου και μετά την εγκατάστασή τους ποτίστηκαν με 30 ml νερό ανά φυτό. Το πείραμα τοποθετήθηκε σε θάλαμο ανάπτυξης στους 28° C, 40 % σχετική υγρασία και 16 h φωτοπερίοδο και ποτίζονταν κάθε τρεις περίπου ημέρες με 30 – 50 ml νερό.



Εικόνα 12 (I) Μεταφύτευση φυταρίων τομάτας και μεταφορά σε χώρο με ελεγχόμενη θερμοκρασία και φωτισμό, (II) Άποψη φυτών τομάτας 50 μέρες μετά την μεταφύτευση, (III) Προσθήκη ριζών σε νερό μετά την μέτρηση του βάρους, για ολιγοήμερη συντήρηση στο ψυγείο, (IV) Μέτρηση θηλυκών νηματωδών ανά ρίζα σε στερεοσκόπιο.

Πενήντα ημέρες περίπου μετά την εγκατάσταση του πειράματος, αφερόνταν το υπέργειο μέρος των φυταρίων στο ύψος του λαιμού, οι ρίζες των φυτών πλένονταν προσεκτικά σε τρεχούμενο νερό για την απομάκρυνση του εδάφους και αφού στέγνωσαν, ζυγίστηκαν. Ακολουθούσε χρώση των ριζών με εμβάπτιση σε διάλυμα φουξίνης (Sigma, Aldrich) σύμφωνα με τους Byrd et al., (1983). Συνολικά γίνονταν οι εξής μετρήσεις: χλωρό βάρος ρίζας, χλωρό βάρος υπέργειου τμήματος και αριθμός θηλυκών *M. incognita* ανά γραμμάριο ρίζας. Η καταμέτρηση των θηλυκών έγινε σε μεγέθυνση 10x σε συνθήκες ομοιόμορφου φωτισμού μέσα στον ιστό του δείγματος ή μετά από αφαίρεση του κατά περίπτωση, όταν η χρώση δεν ήταν επιτυχής. Το

πειραματικό σχέδιο ήταν πλήρους τυχαιοποίησης και η κάθε μεταχείριση είχε πέντε επαναλήψεις.

3.5 Στατιστική ανάλυση

Οι δοκιμές δόσης απόκρισης για τη μελέτη της επίδρασης παράλυσης των ουσιών στις προνύμφες νηματωδών J2 είχαν έξι επαναλήψεις ανά μεταχείριση σε πειραματικό σχέδιο πλήρους τυχαιοποίησης. Τα δεδομένα της παράλυσης εκφράστηκαν ως εκατοστιαία ποσοστά των τιμών παράλυσης που αντιστοιχούσαν στο μάρτυρα σύμφωνα με την εξίσωση των Schneider Orelli's (Puntener, 1981). Στη συνέχεια και αφού υποβλήθηκαν σε ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA), χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγκριση των μέσων όρων που έγινε με τη μέθοδο της Ελάχιστης Σημαντικής Διαφοράς (ΕΣΔ) και σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Οι δοκιμές δόσης απόκρισης για τη μελέτη της επίδρασης των ουσιών στο βιολογικό κύκλο του *M. incognita* είχαν πέντε επαναλήψεις ανά μεταχείριση σε πειραματικό σχέδιο πλήρους τυχαιοποιημένων ομάδων. Τα δεδομένα εκφράστηκαν ως ποσοστιαία μείωση του αριθμού των ενηλίκων θηλυκών *M. incognita* επί του μάρτυρα, σύμφωνα με τον τύπο του Abbott: Διορθωμένος αριθμός θηλυκών % = $100 \times \{1 - (\text{αριθμός θηλυκών της μεταχείρισης} / \text{αριθμός θηλυκών του μάρτυρα})\}$ (Abbott, 1925). Στη συνέχεια και αφού υποβλήθηκαν σε ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA), χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγκριση των μέσων όρων που έγινε με τη μέθοδο της Ελάχιστης Σημαντικής Διαφοράς (ΕΣΔ) και σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Στα πειράματα παράλυσης καθώς και στα πειράματα των βιοδοκιμών, πραγματοποιήθηκε χρήση της στατιστικής ανάλυσης Probit ($p < 0.05$) και με αυτόν τον τρόπο υπολογίστηκαν οι τιμές EC_{50} . Η ανάλυση Probit (ποσοστιαία στατιστική ανάλυση) είναι μια μαθηματική τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανάλυση της δυνωμικής απόκρισης μεταβλητών (π.χ. θάνατος/ επιβίωση). Χρησιμοποιείται στην τοξικολογία για τον προσδιορισμό της τοξικότητας χημικών ουσιών σε οργανισμούς. Αυτό επιτυγχάνεται με την καταγραφή της απόκρισης των οργανισμών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις έκθεσης σε κάποια χημική ουσία και στη συνέχεια με συσχέτιση των συγκεντρώσεων αυτών με τις αποκρίσεις. Μέσω αυτής της ανάλυσης είναι δυνατή η μετατροπή της σιγμοειδούς καμπύλης δόσης-απόκρισης σε ευθεία

γραμμή μέσω επεξεργασίας των δεδομένων είτε με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, είτε με τη μέθοδο της μεγίστης πιθανότητας. Η ανάλυση Probit στο συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου SPSS.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η ανάλυση Probit χρησιμοποιείται για να μετατρέψει τη σχέση της απόκρισης μιας εξαρτημένης μεταβλητής (Y) από μια ανεξάρτητη μεταβλητή (X) σε γραμμική. Ο τύπος είναι ο ακόλουθος:

$$Y = a + bX + e$$

Όπου a: σταθερά, b: η κλίση της ευθείας, e: σφάλμα

Με την ανάλυση Probit μετατρέπεται η σιγμοειδής καμπύλη σε ευθεία και στη συνέχεια μπορεί να υπολογιστεί εκείνη η συγκέντρωση της χημικής ουσίας που επιφέρει το θάνατο στο 50% του πληθυσμού των βιολογικών οργανισμών (EC₅₀).

Κεφάλαιο 4 Αποτελέσματα και Συζήτηση

4.1 Επίδραση των ουσιών δεκαδιενάλη, δεκενάλη, ενδεκανόνη και φουρφουράλη στην παράλυση των προνυμφών *M. incognita*

4.1.1 Επίδραση της δεκενάλης στην παράλυση των προνυμφών *M. incognita*

Στον Πίνακα 4 παρουσιάζεται η επίδραση στην κινητικότητα των J2, μετά από την εμβάπτισή τους σε διαλύματα δεκενάλης, συγκεντρώσεων ελέγχου 2 έως 50 mg/L, για χρονικά διαστήματα 24, 48 και 96 h. Με βάση την ανάλυση παραλλακτικότητας υπήρξε σημαντική αλληλεπίδραση της συγκέντρωσης εφαρμογής με τον χρόνο εμβάπτισης ($P < 0.05$), όσον αφορά στην προκαλούμενη παράλυση των J2, και για το λόγο αυτό στα αποτελέσματα παρουσιάζονται οι μέσοι όροι της αλληλεπίδρασης.

Η μείωση της κινητικότητας των J2 μετά από εμβάπτιση σε διαλύματα δεκενάλης συγκέντρωσης από 2 έως 20 mg/L είχε πολύπλοκη πορεία στο χρόνο. Αρχικά παρατηρήθηκε παράλυση στις J2 αλλά αργότερα ανέκαμπταν και ανακτούσαν την κινητικότητά τους. Στην Εικόνα 13 (IV) φαίνεται προνύμφη J2 στη χαρακτηριστική της μορφή-θέση ακινησίας. Στις Εικόνες 13 (I, II και III) παρουσιάζονται κινητές J2.



Εικόνα 13 Προνύμφες *M. incognita* στο δεύτερο στάδιο ανάπτυξης. (I, II, III) Χαρακτηριστική μορφή κινητών προνυμφών, (IV) Ακίνητη προνύμφη.

Αντίθετα στα διαλύματα με συγκεντρώσεις δεκενάλης μεγαλύτερες των 25 mg/L προκλήθηκε παράλυση ήδη από τις 24 ώρες μετά την έναρξη της εμφάνισης στα διαλύματα ελέγχου, η οποία δεν ανετράπη ποτέ. Επιπλέον η παράλυση αυτή αντιστοιχούσε σε μεγαλύτερο ποσοστό των J2 σε σχέση με αυτή που προκάλεσαν οι μικρότερες συγκεντρώσεις ελέγχου (2 έως 20 mg/L), που αυξανόμενου του χρόνου εμφάνισης το ποσοστό των παράλυτων J2 παρέμενε σταθερό, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 5. Η αναστρέψιμη στο χρόνο παράλυση των J2 που προκάλεσαν οι μικρότερες της 25 mg/L συγκεντρώσεις δεκενάλης αποδεικνύει νηματοδοστατική παρά νηματοδοκτόνο δράση. Αυτό αποδίδεται στο σοκ που υπέστησαν οι προνύμφες J2 μετά την εμφάνισή τους στα διαλύματα της δεκενάλης. Προνύμφες που είχαν εμφάνιστεί σε διαλύματα δεκενάλης συγκεντρώσεων μεγαλύτερων από 25 mg/L και καταγράφηκαν παράλυτες μετά από έκθεση 24 h δεν ανέκτησαν ποτέ την ικανότητά τους να κινούνται αφού το ποσοστό των παράλυτων προνυμφών των μεταγενέστερων μετρήσεων δεν διαφοροποιήθηκε στατιστικά.

Πίνακας 4 Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων (2 έως 50 mg/L) της δεκενάλης και διάρκειας εμφάνισης (24, 48 και 96 h) στην κινητικότητα J2 του *M. incognita*.

(E)-2-decenal (mg/L)	% Ποσοστό ακίνητων J2s διορθωμένο ως προς το μάρτυρα		
	24h	48h	96h
2	11,2 ± 3,7 ^e	17 ± 5,1 ^a	14,1 ± 3,9 ^a
5	22,3 ± 8,3 ^a	21,5 ± 4,6 ^{ab}	20,8 ± 5,6 ^{ab}
10	30,1 ± 5,9 ^{ab}	28 ± 7,8 ^b	23,4 ± 2,2 ^{ab}
15	36,3 ± 3,3 ^{bc}	32,1 ± 9,3 ^b	26,1 ± 6,7 ^b
20	42,3 ± 10,5 ^c	55,6 ± 8,6 ^d	40 ± 10,4 ^d
25	90,6 ± 8,1 ^e	89,4 ± 9,3 ^e	89,5 ± 9 ^e
40	100 ± 0 ^d	100 ± 0 ^c	100 ± 0 ^c
50	100 ± 0 ^d	100 ± 0 ^c	100 ± 0 ^c

Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι έξι επαναλήψεων με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις. Ίδιο γράμμα (ανά χρόνο καταμέτρησης) σημαίνει στατιστικά μη σημαντική διαφορά σύμφωνα με το τεστ LSD για επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.05$, και βαθμούς ελευθερίας $df=7$.

Καμία σημαντική επίδραση στην κινητικότητα δεν υπήρξε μετά από έκθεση των προνυμφών σε νερό με Tween-20 και μεθανόλη (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Για αυτό το λόγο το ποσοστό των ακίνητων J2 υπολογίστηκε βάσει

των ακινήτων προνυμφών που μετρήθηκαν στη μεταχείριση με καθαρό νερό, που ήταν μηδέν.

Οι τιμές EC_{50} για όλα τα διαστήματα εμφάνισης, όπως προέκυψαν από τη μαθηματική επεξεργασία (Probit Analysis) των αποτελεσμάτων, παρουσιάζονται στον Πίνακα 5 όπου φαίνεται καθαρά η νηματοδοστατική δράση στις 24 h από την έναρξη της εμφάνισης των J2 στα διαλύματα ελέγχου. Η τιμή EC_{50} στον χρόνο αυτό υπολογίστηκε στα 20,7 mg/L. Αύξηση της διάρκειας εμφάνισης στις 48 h είχε ως αποτέλεσμα χαμηλότερη τιμή EC_{50} , η οποία στον χρόνο αυτό υπολογίστηκε στα 19,5 mg/L και ήταν η μικρότερη όλων των αξιολογήσεων. Αντίθετα αύξηση της διάρκειας εμφάνισης στις 96 h είχε ως αποτέλεσμα υψηλότερη τιμή EC_{50} . Δηλαδή οι παράλυτες J2 της αξιολόγησης των 48 h δεν ήταν νεκρές στο σύνολό τους και κάποιες από αυτές ανέκτησαν την κινητικότητά τους μεταγενέστερα. Σε όλες τις περιπτώσεις, οι J2 που βρέθηκαν παράλυτες 96 h μετά την εγκατάσταση του πειράματος χαρακτηρίστηκαν νεκρές. Συνεπώς η τιμή EC_{50} στη καταγραφή της παράλυσης 96 h μετά την έναρξη της εμφάνισης των J2 θεωρήθηκε αυτή που αντιπροσωπεύει καλύτερα τη νηματοδοκτόνο δράση της δεκενάλης και υπολογίστηκε στα 20,9 mg/L.

Πίνακας 5 Τιμές EC_{50} και EC_{90} με τα αντίστοιχα όρια εμπιστοσύνης, μετά από 24, 48 και 96 ώρες εμφάνιση των προνυμφών *M. incognita* σε υδατικά διαλύματα ελέγχου συγκεντρώσεων δεκενάλης από 2 έως 50 mg/L.

Διάρκεια Εμφάνισης	R^2	* EC_{50} (mg/L)	Όρια Εμπιστοσύνης	* EC_{90} (mg/L)
24h	0,99	20,7	17,3 – 22,2	25,2
48h	0,99	19,5	8,9 – 21,6	25,7
96h	0,99	20,9	17,9 – 22,4	25,4

* EC_{50} και EC_{90} η συγκέντρωση του διαλύματος που προκαλεί θάνατο/ακινήσια των προνυμφών σε ποσοστό 50 και 90% αντίστοιχα.

4.1.2 Επίδραση της δεκαδιενάλης στην παράλυση των προνυμφών *M. incognita*

Στον Πίνακα 6 παρουσιάζεται η επίδραση στην κινητικότητα των J2, σε διαλύματα συγκεντρώσεων ελέγχου δεκαδιενάλης από 2 έως 50 mg/L, για χρονικά διαστήματα 24, 48 και 96 h. Με βάση την ανάλυση παραλλακτικότητας υπήρξε σημαντική αλληλεπίδραση της συγκέντρωσης εφαρμογής με τον χρόνο εμφάνισης ($P < 0.05$), όσον αφορά στην προκαλούμενη παράλυση των J2, και για το λόγο αυτό στα αποτελέσματα παρουσιάζονται οι μέσοι όροι της αλληλεπίδρασης.

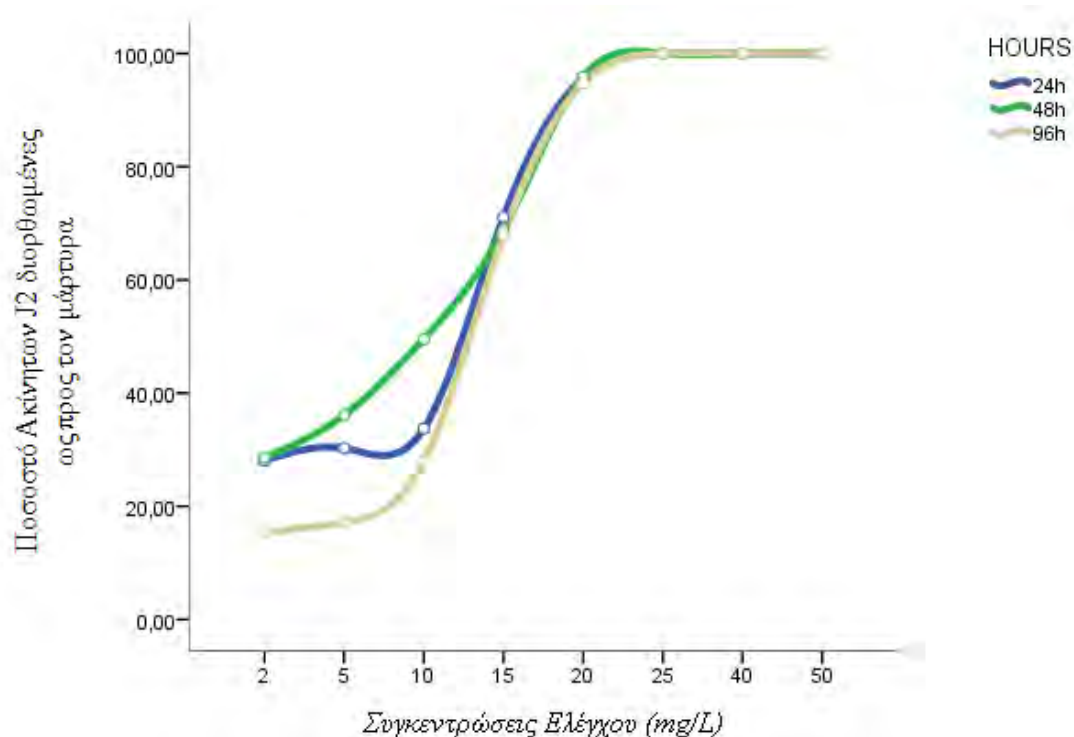
Πίνακας 6 Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων (2 έως 50 mg/L) της δεκαδιενάλης και διάρκειας εμφάνισης (24, 48 και 96 h) στην κινητικότητα J2 του *M. incognita*.

(E,E)-2,4-decadienal (mg/L)	% Ποσοστό ακίνητων J2s διορθωμένο ως προς το μάρτυρα		
	24h	48h	96h
2	28,1 ± 9,3 ^a	28,6 ± 4,9 ^a	15,4 ± 7,3 ^a
5	30,2 ± 8,7 ^a	36,1 ± 10 ^a	17,1 ± 7,8 ^a
10	33,7 ± 3,3 ^a	49,5 ± 8,3 ^c	28 ± 3,7 ^c
15	71,1 ± 10,8 ^c	68,8 ± 10,9 ^d	67,9 ± 9,4 ^d
20	95,6 ± 5,4 ^b	95,8 ± 5 ^b	94,7 ± 8,2 ^b
25	100 ± 0 ^b	100 ± 0 ^b	100 ± 0 ^b
40	100 ± 0 ^b	100 ± 0 ^b	100 ± 0 ^b
50	100 ± 0 ^b	100 ± 0 ^b	100 ± 0 ^b

Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι έξι επαναλήψεων με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις. Ίδιο γράμμα (ανά χρόνο καταμέτρησης) σημαίνει στατιστικά μη σημαντική διαφορά σύμφωνα με το τεστ LSD για επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.05$, και βαθμούς ελευθερίας $df=7$.

Η μείωση της κινητικότητας των J2 μετά από εμφάνιση σε διαλύματα δεκαδιενάλης συγκέντρωσης από 2 έως 15 mg/L είχε πολύπλοκη πορεία στο χρόνο. Αρχικά παρατηρήθηκε παράλυση στις J2 αλλά αργότερα ανέκαμπταν και ανακτούσαν την κινητικότητά τους. Αντίθετα, οι συγκεντρώσεις της δεκαδιενάλης που ήταν μεγαλύτερες της 15 mg/L προκάλεσαν παράλυση, ήδη από τις 24 ώρες μετά την έναρξη της εμφάνισης στα διαλύματα ελέγχου, η οποία δεν ανετράπη ποτέ. Επιπλέον η παράλυση αυτή αντιστοιχούσε σε μεγαλύτερο ποσοστό των J2 σε σχέση με αυτή που προκάλεσαν οι μικρότερες συγκεντρώσεις ελέγχου (2 έως 15 mg/L) και

αυξανόμενου του χρόνου εμφάνισης το ποσοστό των παράλυτων J2 παρέμενε σταθερό, όπως φαίνεται στον Πίνακα 6 καθώς και στο Διάγραμμα 1. Η αναστρέψιμη στο χρόνο παράλυση των J2 που προκάλεσαν, οι χαμηλές συγκεντρώσεις δεκαδιενάλης (<20 mg/L) αποδεικνύει νηματοδοστατική παρά νηματοδοκτόνο δράση. Συγκεκριμένα, εμφάνιση J2 σε διαλύματα δεκαδιενάλης συγκεντρώσεων 2 έως 15 mg/L για 48 h προκάλεσε παράλυση σημαντικά μεγαλύτερη (28,6 έως 100 %) τόσο από αυτή που είχε μετρηθεί προηγουμένως (28,1 έως 100 % μέτρηση 24 h) όσο και της μεταγενέστερης μέτρησης (15,4 έως 100 % μέτρηση 96 h). Αντίθετα, προνύμφες που είχαν εμβαιπιστεί σε διαλύματα δεκαδιενάλης συγκεντρώσεων υψηλότερων από 15 mg/L και καταγράφηκαν παράλυτες μετά από έκθεση 24 h δεν ανέκτησαν ποτέ την ικανότητά τους να κινούνται αφού, το ποσοστό των παράλυτων προνυμφών των μεταγενέστερων μετρήσεων δεν διαφοροποιήθηκε στατιστικά.



Διάγραμμα 1 Εξέλιξη του ποσοστού παράλυσης των προνυμφών *M. incognita*, σε διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων (2 έως 50 mg/L) διαλύματος δεκαδιενάλης. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει το μέσο όρο των έξι επαναλήψεων του πειράματος.

Καμία σημαντική επίδραση στην κινητικότητα δεν υπήρξε μετά από έκθεση των προνυμφών σε νερό με Tween-20 και μεθανόλη. Για αυτό το λόγο το ποσοστό των ακίνητων J2 υπολογίστηκε βάση των ακινήτων προνυμφών που μετρήθηκαν στη μεταχείριση με καθαρό νερό που ήταν μηδέν.

Οι τιμές EC_{50} για όλα τα διαστήματα εμβάπτισης, που προέκυψαν από τη μαθηματική επεξεργασία (Probit Analysis) των αποτελεσμάτων, παρουσιάζονται στον Πίνακα 7 όπου φαίνεται καθαρά η νηματοδοστατική δράση στις 24 h από την έναρξη της εμβάπτισης των J2 στα διαλύματα ελέγχου. Η τιμή EC_{50} στον χρόνο αυτό υπολογίστηκε στα 11,7 mg/L. Αύξηση της διάρκειας εμβάπτισης στις 48 h είχε ως αποτέλεσμα χαμηλότερη τιμή EC_{50} που υπολογίστηκε στα 10,1 mg/L και ήταν η χαμηλότερη τιμή όλων των αξιολογήσεων. Αντίθετα αύξηση της διάρκειας εμβάπτισης στις 96 h είχε ως αποτέλεσμα υψηλότερη τιμή EC_{50} . Δηλαδή οι παράλυτες J2 της αξιολόγησης των 48 h δεν ήταν νεκρές στο σύνολό τους και κάποιες από αυτές ανέκτησαν την κινητικότητά τους μεταγενέστερα. Σε όλες τις περιπτώσεις, οι J2 που βρέθηκαν παράλυτες 96 h μετά την εγκατάσταση του πειράματος χαρακτηρίστηκαν νεκρές αφού δεν ανέκτησαν ποτέ την κινητικότητά τους. Συνεπώς η τιμή EC_{50} που αντιπροσώπευε τη καταγραφή της παράλυσης 96 h μετά την έναρξη της εμβάπτισης των J2 θεωρήθηκε αυτή που αντιπροσωπεύει καλύτερα τη νηματοδοκτόνο δράση της δεκαδιενάλης και υπολογίστηκε στα 13,5 mg/L.

Πίνακας 7 Τιμές EC_{50} και EC_{90} με τα αντίστοιχα όρια εμπιστοσύνης, μετά από 24, 48 και 96 ώρες εμβάπτιση των προνυμφών *M. incognita* σε υδατικά διαλύματα ελέγχου, συγκεντρώσεων δεκαδιενάλης από 2 έως 50 mg/L.

Διάρκεια Εμβάπτισης	R^2	* EC_{50} (mg/L)	Όρια Εμπιστοσύνης	** EC_{90} (mg/L)
24h	0,97	11,7	9,2 – 13,5	18,3
48h	0,94	10,1	4,2 – 12,5	19,4
96h	0,99	13,5	5,4 – 15,2	17,7

* EC_{50} και EC_{90} η συγκέντρωση του διαλύματος που προκαλεί θάνατο/ακίνησια των προνυμφών σε ποσοστό 50 και 90% αντίστοιχα.

4.1.3 Επίδραση της ενδεκανόνης στην παράλυση των προνυμφών *M. incognita*

Στον Πίνακα 8 παρουσιάζεται η επίδραση στην κινητικότητα των J2, μετά από την εμβάπτισή τους σε διαλύματα ενδεκανόνης, συγκεντρώσεων ελέγχου 5 έως 40 mg/L, για χρονικά διαστήματα 24, 48 και 96 h. Με βάση την ανάλυση παραλλακτικότητας υπήρξε στατιστικός σημαντική διαφορά της συγκέντρωσης εφαρμογής ($P < 0.05$), όσον αφορά στην προκαλούμενη παράλυση των J2 και για το λόγο αυτό στα αποτελέσματα παρουσιάζονται οι μέσοι όροι της αλληλεπίδρασης. Αντίθετα δεν υπήρξε σημαντική αλληλεπίδραση της συγκέντρωσης εφαρμογής με τον χρόνο εμβάπτισης ($P > 0.05$), όσον αφορά στην προκαλούμενη παράλυση των J2.

Πίνακας 8 Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων (5 έως 40 mg/L) της ενδεκανόνης και διάρκειας εμβάπτισης (24, 48 και 96 h) στην κινητικότητα J2 του *M. incognita*.

(E)-2-undecanone (mg/L)	% Ποσοστό ακίνητων J2s διορθωμένο ως προς το μάρτυρα		
	24h	48h	96h
5	9,8 ± 8,8 ^a	12,5 ± 5,5 ^a	27 ± 11,2 ^a
10	10 ± 6,3 ^a	13,2 ± 2,5 ^a	31,5 ± 3,1 ^a
15	34,2 ± 12,7 ^e	25,9 ± 9,7 ^a	38,2 ± 13,4 ^a
20	41,2 ± 19,2 ^b	34,2 ± 18,7 ^b	47,1 ± 14,1 ^b
25	51,2 ± 6,2 ^b	39,5 ± 8,5 ^b	52,3 ± 13,7 ^b
30	62,5 ± 8,5 ^{bc}	48,2 ± 7 ^b	58,3 ± 11,7 ^{bc}
35	77,7 ± 10,8 ^{cd}	67,6 ± 14,5 ^c	71,4 ± 13,2 ^c
40	84,9 ± 10,8 ^d	70,3 ± 12,2 ^c	97,7 ± 3,8 ^d

Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι έξι επαναλήψεων με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις. Ίδιο γράμμα (ανά χρόνο καταμέτρησης) σημαίνει στατιστικά μη σημαντική διαφορά σύμφωνα με το τεστ LSD για επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.05$, και βαθμούς ελευθερίας $df=7$.

Η μείωση της κινητικότητας των J2 μετά από εμβάπτιση σε διαλύματα ενδεκανόνης συγκέντρωσης από 15 έως 40 mg/L είχε πολύπλοκη πορεία στο χρόνο. Αρχικά παρατηρήθηκε παράλυση στις J2 αλλά αργότερα ανέκαμπταν και ανακτούσαν την κινητικότητά τους. Αντίθετα στα διαλύματα με συγκεντρώσεις της ενδεκανόνης μικρότερες των 15 mg/L προκλήθηκε παράλυση, ήδη από τις 24 ώρες μετά την έναρξη της εμβάπτισης στα διαλύματα ελέγχου, που αυξανόμενου του χρόνου

εμβάπτισης το ποσοστό των παράλυτων J2 αυξάνονταν, όπως φαίνεται στον Πίνακα 8. Η αναστρέψιμη στο χρόνο παράλυση των J2 που προκάλεσαν οι συγκεντρώσεις ενδεκανόνης μεγαλύτερες της 10 mg/L αποδεικνύει νηματωδοστατική παρά νηματωδοκτόνο δράση. Συγκεκριμένα, εμβάπτιση J2 σε διαλύματα ενδεκανόνης συγκεντρώσεων από 15 έως 40 mg/L για 24 h προκάλεσε παράλυση σημαντικά μεγαλύτερη (34,2 έως 84,9 %) από αυτή που μετρήθηκε στις 48 h (25,9 έως 70,3 %). Όσο για την μεταγενέστερη μέτρησης 96 h παρατηρήθηκε σημαντικά μεγαλύτερη παράλυση των προνυμφών J2 (38,2 έως 97,7 %) από εκείνη την μέτρηση στις 48 h αλλά και από την μέτρηση στις 24 h για συγκεντρώσεις από 15 έως 40 mg/L. Αντίθετα, προνύμφες που είχαν εμβάπτιστεί σε διαλύματα ενδεκανόνης συγκεντρώσεων μικρότερων από 15 mg/L και καταγράφηκαν παράλυτες μετά από έκθεση 24 h δεν ανέκτησαν ποτέ την ικανότητά τους να κινούνται αφού το ποσοστό των παράλυτων προνυμφών των μεταγενέστερων μετρήσεων ήταν μεγαλύτερο (Πίνακας 9). Καμία σημαντική επίδραση στην κινητικότητα δεν υπήρξε μετά από έκθεση των προνυμφών σε νερό με Tween-20 και μεθανόλη. Για αυτό το λόγο το ποσοστό των ακίνητων J2 υπολογίστηκε βάση των ακινήτων προνυμφών που μετρήθηκαν στη μεταχείριση με καθαρό νερό, που ήταν μηδέν.

Οι τιμές EC_{50} για όλα τα διαστήματα εμβάπτισης, που προέκυψαν από τη μαθηματική επεξεργασία (Probit Analysis) των αποτελεσμάτων, παρουσιάζονται στον Πίνακα 9 όπου φαίνεται καθαρά η νηματωδοστατική δράση στις 24 h από την έναρξη της εμβάπτισης των J2 στα διαλύματα ελέγχου. Η τιμή EC_{50} στον χρόνο αυτό υπολογίστηκε στα 25,4 mg/L όπου ήταν η χαμηλότερη τιμή όλων των αξιολογήσεων. Αύξηση της διάρκειας εμβάπτισης στις 48 h είχε ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη τιμή EC_{50} που υπολογίστηκε στα 30,1 mg/L. Δηλαδή οι παράλυτες J2 της αξιολόγησης των 24 h, δεν ήταν νεκρές στο σύνολό τους και κάποιες από αυτές ανέκτησαν την κινητικότητά τους μεταγενέστερα. Αντίθετα αύξηση της διάρκειας εμβάπτισης στις 96 h είχε ως αποτέλεσμα χαμηλότερη τιμή EC_{50} που υπολογίστηκε στα 26,5 mg/L. Σε όλες τις περιπτώσεις, οι J2 που βρέθηκαν παράλυτες 96 h μετά την εγκατάσταση του πειράματος χαρακτηρίστηκαν νεκρές. Συνεπώς η τιμή EC_{50} που αντιπροσώπευε τη καταγραφή της παράλυσης 96 h μετά την έναρξη της εμβάπτισης των J2 θεωρήθηκε αυτή που αντιπροσωπεύει καλύτερα τη νηματωδοκτόνο δράση της ενδεκανόνης.

Πίνακας 9 Τιμές EC₅₀ και EC₉₀ με τα αντίστοιχα όρια εμπιστοσύνης, μετά από 24, 48 και 96 ώρες εμβάπτιση των προνυμφών *M. incognita* σε υδατικά διαλύματα ελέγχου, συγκεντρώσεων ενδεκανόνης από 5 έως 40 mg/L.

Διάρκεια Εμβάπτισης	R ²	*EC ₅₀ (mg/L)	Όρια Εμπιστοσύνης	**EC ₉₀ (mg/L)
24h	0,98	25,4	8,9 – 29,5	> 40
48h	0,91	30,1	–	> 40
96h	0,96	26,5	19,3 – 29,6	> 40

* EC₅₀ και EC₉₀ η συγκέντρωση του διαλύματος που προκαλεί θάνατο/ακινησία των προνυμφών σε ποσοστό 50 και 90% αντίστοιχα.

4.1.4 Επίδραση της φουρφουράλης στην παράλυση των προνυμφών *M. incognita*

Στον Πίνακα 10 παρουσιάζεται η επίδραση στην κινητικότητα των J2, σε διαλύματα συγκεντρώσεων ελέγχου φουρφουράλης από 5 έως 40 mg/L, για χρονικά διαστήματα εμφάνισης 24, 48 και 96 h. Με βάση την ανάλυση παραλλακτικότητας υπήρξε σημαντική αλληλεπίδραση της συγκέντρωσης εφαρμογής με τον χρόνο εμφάνισης ($P < 0.05$), όσον αφορά στην προκαλούμενη παράλυση των J2, και για το λόγο αυτό στα αποτελέσματα παρουσιάζονται οι μέσοι όροι της αλληλεπίδρασης.

Πίνακας 10 Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων (5 έως 40 mg/L) της φουρφουράλης και διάρκειας εμφάνισης (24, 48 και 96 h) στην κινητικότητα J2 του *M. incognita*.

furfural (mg/L)	% Ποσοστό ακίνητων J2s διορθωμένο ως προς το μάρτυρα		
	24h	48h	96h
5	4,7 ± 3,7 ^a	4,9 ± 5 ^a	16 ± 3,4 ^a
10	5,1 ± 7,3 ^a	8,1 ± 4,5 ^{ab}	18,4 ± 6,4 ^a
15	6,2 ± 6 ^{ab}	8,8 ± 8 ^{ab}	38,9 ± 8,7 ^b
20	9,3 ± 4,3 ^{ab}	12 ± 8,7 ^{abc}	39,2 ± 5,7 ^b
25	10,5 ± 4,3 ^{ab}	14,4 ± 7,6 ^{bc}	76,4 ± 4,4 ^c
30	20,5 ± 7,3 ^b	15,3 ± 9,2 ^{bc}	79,8 ± 6,2 ^c
35	75,9 ± 10,4 ^c	17 ± 7,5 ^c	90,2 ± 3,9 ^d
40	88,3 ± 9,2 ^d	20,4 ± 2,2 ^c	92,9 ± 8,7 ^d

Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι έξι επαναλήψεων με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις. Ίδιο γράμμα (ανά χρόνο καταμέτρησης) σημαίνει στατιστικά μη σημαντική διαφορά σύμφωνα με το τεστ LSD για επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.05$, και βαθμούς ελευθερίας $df=7$.

Η μείωση της κινητικότητας των J2 μετά από εμφάνιση σε διαλύματα φουρφουράλης συγκέντρωσης 30, 35 και 40 mg/L είχε πολύπλοκη πορεία στο χρόνο. Αρχικά παρατηρήθηκε παράλυση στις J2 αλλά αργότερα ανέκαμψαν και ανακτούσαν την κινητικότητά τους. Αντίθετα οι συγκεντρώσεις της φουρφουράλης από 5 έως 25 mg/L προκάλεσαν παράλυση, ήδη από τις 24 ώρες μετά την έναρξη της εμφάνισης στα διαλύματα ελέγχου, η οποία δεν ανετράπη ποτέ. Επιπλέον αυξανόμενου του χρόνου εμφάνισης, το ποσοστό των παράλυτων J2 στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις αυξανόταν, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 10. Η αναστρέψιμη στο

χρόνο παράλυση των J2 που προκάλεσαν, οι συγκεντρώσεις φουρφουράλης 30, 35 και 40 mg/L αποδεικνύει νηματωδοστατική παρά νηματωδοκτόνο δράση. Συγκεκριμένα, εμφάνιση J2 σε διαλύματα φουρφουράλης συγκεντρώσεων 30, 35 και 40 mg/L για 48 h, προκάλεσε παράλυση σημαντικά χαμηλότερη (15,3, 17 και 20,4 % αντίστοιχα) από αυτή που είχε μετρηθεί προηγουμένως (20,5, 75,9 και 88,3 % μέτρηση 24 h). Όσο για την μεταγενέστερη μέτρηση στις 96 h το ποσοστό παράλυσης των J2 ήταν σημαντικά μεγαλύτερο (79,8, 90,2 και 92,9 % αντίστοιχα). Αντίθετα, προνύμφες που είχαν εμβάπτιστεί σε διαλύματα φουρφουράλης συγκεντρώσεων 5 έως 25 mg/L και καταγράφηκαν παράλυτες μετά από έκθεση 24 h, δεν ανέκτησαν ποτέ την ικανότητά τους να κινούνται αφού το ποσοστό των παράλυτων προνυμφών των μεταγενέστερων μετρήσεων ήταν υψηλότερο. Καμία σημαντική επίδραση στην κινητικότητα δεν υπήρξε μετά από έκθεση των προνυμφών σε νερό με Tween-20 και μεθανόλη. Για αυτό το λόγο το ποσοστό των ακίνητων J2 υπολογίστηκε βάση των ακινήτων προνυμφών που μετρήθηκαν στη μεταχείριση με καθαρό νερό που ήταν μηδέν.

Οι τιμές EC_{50} , όπως προέκυψαν από τη μαθηματική επεξεργασία (Probit Analysis) των αποτελεσμάτων, παρουσιάζονται στον Πίνακα 11 όπου φαίνεται καθαρά η νηματωδοστατική δράση της φουρφουράλης στις 24 h. Η τιμή EC_{50} στον χρόνο αυτό υπολογίστηκε στα 34 mg/L, ενώ στις 48 h παρουσίασε μεγαλύτερη τιμή EC_{50} (>40 mg/L). Δηλαδή οι παράλυτες J2 της αξιολόγησης των 24 h δεν ήταν νεκρές στο σύνολό τους και κάποιες από αυτές ανέκτησαν την κινητικότητά τους μεταγενέστερα. Αντίθετα αύξηση της διάρκειας εμφάνισης στις 96 h είχε ως αποτέλεσμα τιμή EC_{50} που υπολογίστηκε στα 20,9 mg/L και ήταν η χαμηλότερη τιμή όλων των αξιολογήσεων. Όρια εμπιστοσύνης για τους χρόνους εμφάνισης 24 και 48 h δεν μπόρεσαν να υπολογιστούν, με βάση την Probit Analysis. Σε κάθε περίπτωση, οι J2 που βρέθηκαν παράλυτες 96 h μετά την εγκατάσταση του πειράματος χαρακτηρίστηκαν νεκρές. Συνεπώς η τιμή EC_{50} στη καταγραφή της παράλυσης 96 h μετά την έναρξη της εμφάνισης των J2, θεωρήθηκε ως αυτή που αντιπροσωπεύει νηματωδοκτόνο δράση της φουρφουράλης.

Πίνακας 11 Τιμές EC₅₀ και EC₉₀ με τα αντίστοιχα όρια εμπιστοσύνης, μετά από 24, 48 και 96 ώρες εμφάνιση των προνυμφών *M. incognita* σε υδατικά διαλύματα ελέγχου, συγκεντρώσεων φουρφουράλης από 5 έως 40 mg/L.

Διάρκεια Εμβάπτισης	R ²	*EC ₅₀ (mg/L)	Όρια Εμπιστοσύνης	**EC ₉₀ (mg/L)
24h	0,95	34	31,6 – 36,1	> 40
48h	0,99	> 40	–	> 40
96h	0,92	20,9	13,1 – 24,8	35,8

* EC₅₀ και EC₉₀ η συγκέντρωση του διαλύματος που προκαλεί θάνατο/ακίνησία των προνυμφών σε ποσοστό 50 και 90% αντίστοιχα.

4.1.5 Επίδραση μικτών διαλυμάτων δεκαδιενάλης και δεκανάλης στην παράλυση των προνυμφών *M. incognita*

Στον Πίνακα 12 παρουσιάζεται η επίδραση στην κινητικότητα των J2, μετά από την εμβάπτισή τους σε μικτά διαλύματα δεκαδιενάλης και δεκανάλης, συγκεντρώσεων ελέγχου από 1 έως 20 mg/L, για χρονικά διαστήματα εμβάπτισης 24, 48 και 96 h. Η συγκέντρωση 1 mg/L αντιστοιχεί σε 0,5 mg/L δεκαδιενάλης και 0,5 mg/L δεκανάλης, παρόμοια δε ισχύει και για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις έως 20 mg/L. Με βάση την ανάλυση παραλλακτικότητας υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά της συγκέντρωσης εφαρμογής ($P < 0.05$), όσον αφορά στην προκαλούμενη παράλυση των J2 και για το λόγο αυτό στα αποτελέσματα παρουσιάζονται οι μέσοι όροι της αλληλεπίδρασης. Αντίθετα δεν υπήρξε σημαντική αλληλεπίδραση της συγκέντρωσης εφαρμογής με το χρόνο εμβάπτισης ($P > 0.05$), όσον αφορά στην προκαλούμενη παράλυση των J2.

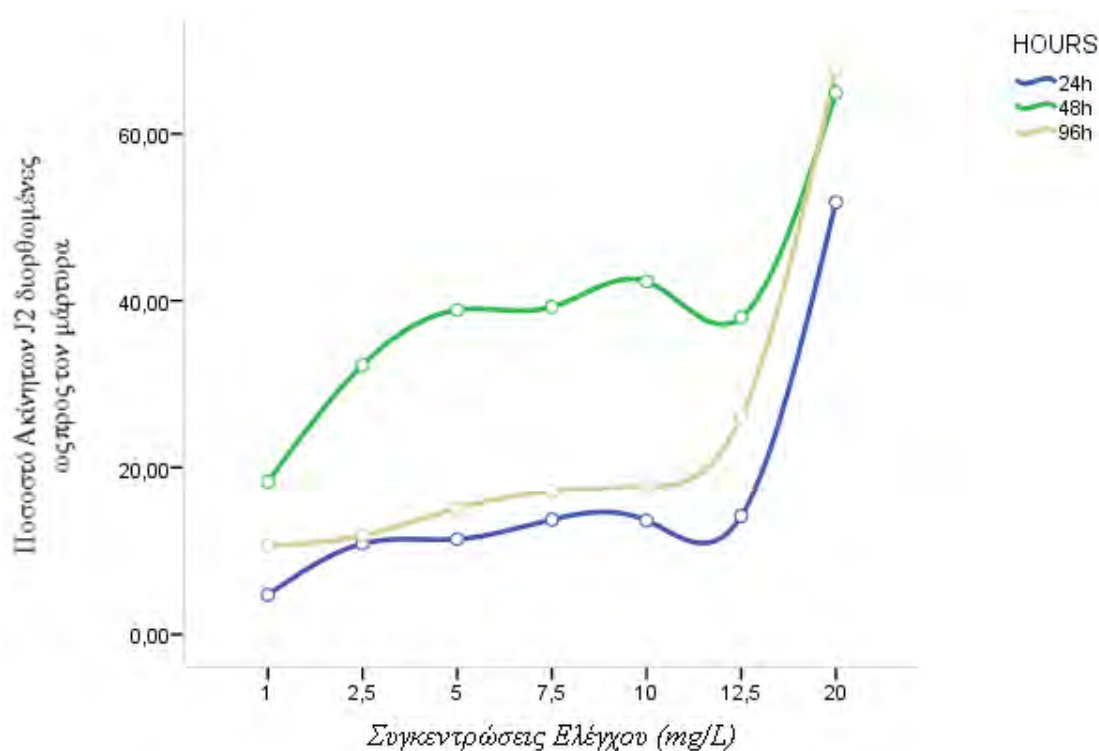
Πίνακας 12 Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων (1 έως 20 mg/L) του μικτού διαλύματος δεκαδιενάλης και δεκανάλης και διάρκειας εμβάπτισης (24, 48 και 96 h) στην κινητικότητα J2 του *M. incognita*.

(E,E)-2,4-decadienal + (E)-2-decenal (mg/L)	% Ποσοστό ακίνητων J2s διορθωμένο ως προς το μάρτυρα		
	24h	48h	96h
1 (0,5 + 0,5)	4,7 ± 4 ^a	18,2 ± 8,2 ^a	10,6 ± 3,4 ^a
2,5 (1,25 + 1,25)	10,9 ± 8,2 ^a	32,2 ± 12,6 ^{ab}	11,8 ± 4 ^a
5 (2,5 + 2,5)	11,4 ± 11,2 ^a	38,1 ± 15,5 ^b	15,1 ± 6,4 ^a
7,5 (3,75 + 3,75)	13,1 ± 7 ^a	39,2 ± 10,2 ^b	17,2 ± 2,3 ^a
10 (5 + 5)	13,7 ± 4,9 ^a	42,3 ± 15,6 ^b	17,9 ± 1,9 ^a
12,5 (6,25 + 6,25)	14,2 ± 1,7 ^a	46,4 ± 2 ^b	26,2 ± 4,5 ^b
20 (10 + 10)	51,8 ± 16,7 ^b	65 ± 17 ^c	70,9 ± 18 ^c

Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι έξι επαναλήψεων με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις. Ίδιο γράμμα (ανά χρόνο καταμέτρησης) σημαίνει στατιστικά μη σημαντική διαφορά σύμφωνα με το τεστ LSD για επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.05$ και βαθμούς ελευθερίας $df=6$.

Η μείωση της κινητικότητας των J2 μετά από εμβάπτιση σε μικτά διαλύματα δεκαδιενάλης και δεκανάλης συγκέντρωσης από 1 έως 12,5 mg/L είχε πολύπλοκη πορεία στο χρόνο. Αρχικά παρατηρήθηκε παράλυση στις J2 αλλά αργότερα ανέκαμπταν και ανακτούσαν την κινητικότητά τους. Αντίθετα η συγκέντρωση του

μικτού διαλύματος δεκαδιενάλης και δεκανάλης 20 mg/L προκάλεσε παράλυση, ήδη από τις 24 ώρες μετά την έναρξη της εμφάνισης στα διαλύματα ελέγχου, η οποία δεν ανετράπη ποτέ. Επιπλέον η παράλυση αυτή, αντιστοιχούσε σε μεγαλύτερο ποσοστό των J2, σε σχέση με αυτή που προκάλεσαν οι μικρότερες συγκεντρώσεις ελέγχου (1 έως 12,5 mg/L), που αυξανόμενου του χρόνου εμφάνισης το ποσοστό των παράλυτων J2 αυξανόταν, όπως φαίνεται στον Πίνακα 12 καθώς και στο Διάγραμμα 2.



Διάγραμμα 2 Εξέλιξη του ποσοστού παράλυσης των προνυμφών *M. incognita*, σε διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων (1 έως 20 mg/L) του συνδυασμού δεκαδιενάλης και δεκανάλης. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει το μέσο όρο των έξι επαναλήψεων του πειράματος.

Η αναστρέψιμη στο χρόνο παράλυση των J2 που προκάλεσαν, συγκεντρώσεις μικρότερες της 20 mg/L αποδεικνύει νηματωδοστατική παρά νηματωδοκτόνο δράση. Αυτό αποδίδεται στο σοκ που υπέστησαν οι προνύμφες J2 μετά την εμφάνισή τους στις διάφορες συγκεντρώσεις του διαλύματος. Συγκεκριμένα, εμφάνιση J2 σε μικτά διαλύματα δεκαδιενάλης και δεκανάλης συγκεντρώσεων 1 έως 12,5 mg/L για 48 h, προκάλεσε παράλυση σημαντικά μεγαλύτερη (18,2 έως 46,4 %) τόσο από αυτή που είχε μετρηθεί προηγουμένως (4,7 έως 14,2 % μέτρηση 24 h) όσο και της μεταγενέστερης μέτρησης (10,6 έως 26,2 % μέτρηση 96 h). Αντίθετα, προνύμφες που είχαν εμφάνιστεί σε διαλύματα συγκεντρώσεων μεγαλύτερων από 12,5 mg/L και καταγράφηκαν παράλυτες μετά από έκθεση 24 h, δεν ανέκτησαν ποτέ την ικανότητά

τους να κινούνται αφού το ποσοστό των παράλυτων προνυμφών των μεταγενέστερων μετρήσεων ήταν μεγαλύτερο. Καμία σημαντική επίδραση στην κινητικότητα δεν υπήρξε μετά από έκθεση των προνυμφών σε νερό με Tween-20 και μεθανόλη. Για αυτό το λόγο το ποσοστό των ακίνητων J2 υπολογίστηκε βάση των ακινήτων προνυμφών που μετρήθηκαν στη μεταχείριση με καθαρό νερό που ήταν μηδέν.

Οι τιμές EC_{50} για όλα τα διαστήματα εμβάπτισης, που προέκυψαν από τη μαθηματική επεξεργασία (Probit Analysis) των αποτελεσμάτων, παρουσιάζονται στον Πίνακα 13.

Πίνακας 13 Τιμές EC_{50} και EC_{90} με τα αντίστοιχα όρια εμπιστοσύνης, μετά από 24, 48 και 96 ώρες εμβάπτιση των προνυμφών *M. incognita* σε υδατικά διαλύματα ελέγχου, συγκεντρώσεων μικτών διαλυμάτων δεκαδιενάλης και δεκανάλης συγκεντρώσεων από 1 έως 20 mg/L.

Διάρκεια Εμβάπτισης	R^2	* EC_{50} (mg/L)	Όρια Εμπιστοσύνης	* EC_{90} (mg/L)
24h	0,78	> 20	-	> 20
48h	0,95	14,5	-	> 20
96h	0,98	16,2	13,6 – 23,8	> 20

* EC_{50} και EC_{90} η συγκέντρωση του διαλύματος που προκαλεί θάνατο/ακίνησια των προνυμφών σε ποσοστό 50 και 90% αντίστοιχα.

Η τιμή EC_{50} στον χρόνο 24 h βρισκόταν εκτός των συγκεντρώσεων ελέγχου. Αύξηση της διάρκειας εμβάπτισης στις 48 h είχε ως αποτέλεσμα χαμηλότερη τιμή EC_{50} που στον χρόνο αυτό υπολογίστηκε στα 14,5 mg/L και ήταν η μικρότερη όλων των αξιολογήσεων. Αντίθετα αύξηση της διάρκειας εμβάπτισης στις 96 h είχε ως αποτέλεσμα υψηλότερη τιμή EC_{50} . Δηλαδή οι παράλυτες J2 της αξιολόγησης των 48 h δεν ήταν νεκρές στο σύνολό τους και κάποιες από αυτές ανέκτησαν την κινητικότητά τους μεταγενέστερα. Σε όλες τις περιπτώσεις, οι J2 που βρέθηκαν παράλυτες 96 h μετά την εγκατάσταση του πειράματος χαρακτηρίστηκαν νεκρές αφού δεν ανέκτησαν ποτέ την κινητικότητά τους. Συνεπώς η τιμή EC_{50} που αντιπροσώπευε τη καταγραφή της παράλυσης 96 h μετά την έναρξη της εμβάπτισης των J2 θεωρήθηκε αυτή που αντιπροσωπεύει καλύτερα τη νηματωδοκτόνο δράση των μικτών διαλυμάτων δεκαδιενάλης και δεκανάλης και υπολογίστηκε στα 16,2 mg/L.

Όπως αναφέρθηκε στην 4.1.1 και 4.1.2 παράγραφο, η τιμή $EC_{50/96h}$ που υπολογίστηκε για την δεκενάλη και δεκαδιενάλη ήταν 20,9 και 13,5 mg/L αντίστοιχα.

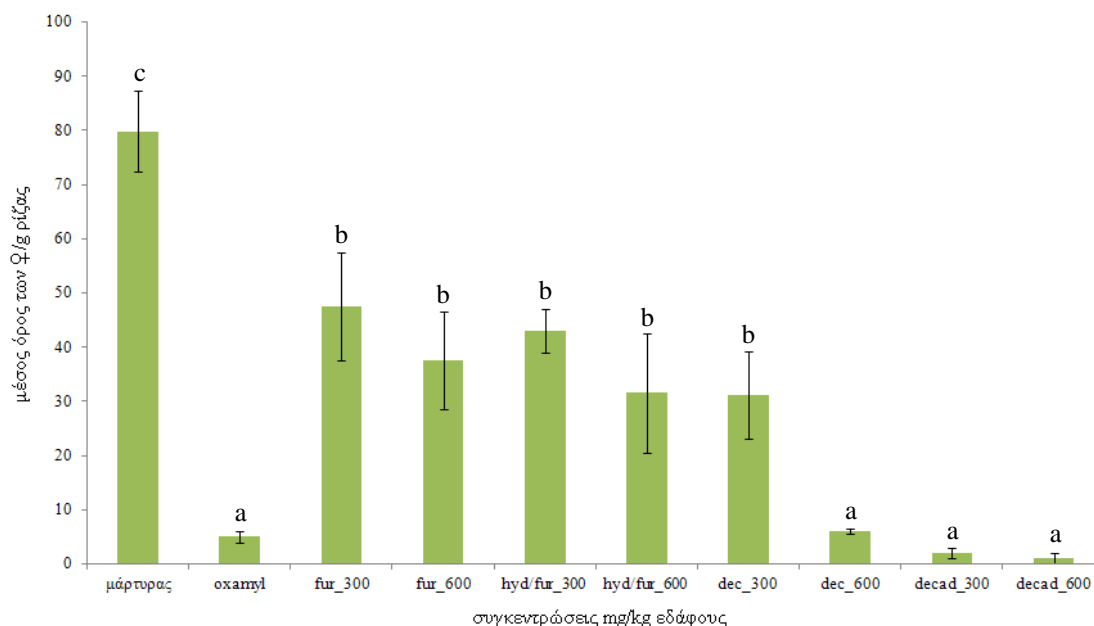
Αντιστοιχώντας με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την επίδραση των μικτών διαλυμάτων δεκενάλης με δεκαδιενάλη ($EC_{50/96h}$: 16,2 mg/L), στην παράλυση των *M. incognita*, μπορούμε να πούμε πως όταν η δύο ουσίες εφαρμοστούν με μικτά διαλύματα σε αναλογία 1:1 έχουν μικρότερη δράση απ'ότι όταν εφαρμόζεται μόνη της η δεκαδιενάλη ενώ, αντίθετα δίνουν καλύτερα αποτελέσματα απ' ότι όταν εφαρμόζεται μόνη της η δεκενάλη. Δηλαδή η δεκαδιενάλη βοηθά την δεκενάλη και αυξάνει την νηματοδοκτόνο δράση της, δίνοντας μικρότερη τιμή $EC_{50/96h}$ ενώ, η δεκενάλη δεν βοηθά την δεκαδιενάλη ως αποτέλεσμα να προκύπτει μεγαλύτερη τιμή $EC_{50/96h}$.

4.2 Επίδραση των ουσιών στο βιολογικό κύκλο του *M. incognita*

4.2.1 Επίδραση των ουσιών δεκαδιενάλη, δεκενάλη, φουρφουράλη και υδροξυμεθυλοφουρφουράλη στο βιολογικό κύκλο του *M. incognita* σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων

Ο αριθμός των ενήλικων θηλυκών ατόμων *M. incognita* που μετρήθηκαν στις ρίζες των φυτών τομάτας που είχαν δεχθεί μεταχειρίσεις με δεκαδιενάλη, δεκανάλη, φουρφουράλη και υδροξυμεθυλοφουρφουράλη, σε δύο συγκεντρώσεις 300 και 600 mg kg⁻¹ εδάφους παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3.

Συγκεντρώσεις των ουσιών δεκαδιενάλη, δεκανάλη, φουρφουράλη και υδροξυμεθυλοφουρφουράλη μείωσαν σημαντικά ($P < 0.05$) τον αριθμό των θηλυκών ατόμων *M. incognita* στις ρίζες των φυτών σε σχέση με τον αντίστοιχο αριθμό θηλυκών ενηλίκων που μετρήθηκαν στη μεταχείριση του μάρτυρα (Διάγραμμα 3). Σημαντικά λιγότεροι νηματώδεις μετρήθηκαν στη μεταχείριση της υψηλότερης δόσης της δεκενάλης και δεκαδιενάλης (600 mg/kg εδάφους). Μηδενικός σχεδόν ήταν ο αντίστοιχος αριθμός των ατόμων *M. incognita* που μετρήθηκαν στη μεταχείριση του oxamyl. Τα χλωρά βάρη του υπέργειου μέρους του φυτού και της ρίζας δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων ($P > 0.05$), όπως επίσης σε καμία των μεταχειρίσεων δεν παρουσιάστηκε φυτοτοξικότητα (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Επίσης, καμία σημαντική επίδραση στο βιολογικό κύκλο δεν υπήρξε μετά από ενσωμάτωση των προνυμφών σε νερό με Tween-20 και μεθανόλη.



Διάγραμμα 3 Επίδραση των δεκαδιενάλη, δεκανάλη, φουρφουράλη και υδροξυμεθυλοφουρφουράλη στο βιολογικό κύκλο του *M. incognita* μετά από ενσωμάτωση στο έδαφος σε συγκεντρώσεις 300 και 600 mg/kg εδάφους. Το oxamyl (Vydate® 10SL) χρησιμοποιήθηκε ως χημικός μάρτυρας του πειράματος στη συγκέντρωση 120 μl kg⁻¹ εδάφους. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται οι μέσοι όροι πειράματος πέντε επαναλήψεων, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις. Ίδιο γράμμα σημαίνει στατιστικά μη σημαντική διαφορά σύμφωνα με το τεστ LSD για επίπεδο σημαντικότητας P≤0.05, και βαθμούς ελευθερίας df=9.

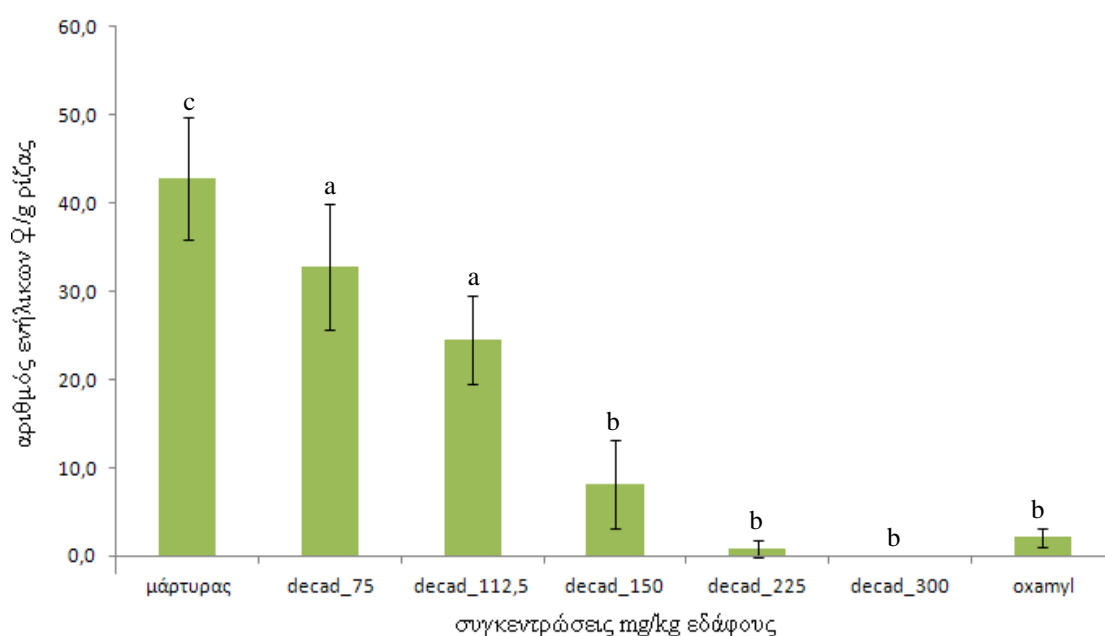
4.2.2 Επίδραση των ουσιών δεκαδιενάλη και φουρφουράλη στο βιολογικό κύκλο του *M. incognita*

4.2.2.1 Επίδραση της δεκαδιενάλης στο βιολογικό κύκλο του *M. incognita*

Η επίδραση της δεκαδιενάλης, στον αριθμό των θηλυκών νηματωδών ανά g ρίζας, όταν εφαρμόζεται σε δοκιμές σε φυτοδοχεία σε εύρος συγκεντρώσεων από 75 έως 300 mg kg⁻¹ εδάφους, παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 4. Αυξανόμενες συγκεντρώσεις της δεκαδιενάλης μείωσαν σημαντικά (P <0.05) τον αριθμό των θηλυκών ατόμων *M. incognita* στις ρίζες των φυτών σε σχέση με τον αντίστοιχο αριθμό θηλυκών ενηλίκων που μετρήθηκαν στη μεταχείριση του μάρτυρα. Σχεδόν μηδενικός ήταν ο αντίστοιχος αριθμός των ατόμων *M. incognita* που μετρήθηκαν στη μεταχείριση του oxamyl. Σημαντικά λιγότεροι νηματώδεις μετρήθηκαν στις μεταχειρίσεις με δόσεις της δεκαδιενάλης 150 και 225 mg/kg εδάφους ενώ μηδενικός ήταν ο αριθμός των ενήλικων θηλυκών στην μεταχείριση 300 mg/kg εδάφους. Τα χλωρά βάρη του υπέργειου μέρους του φυτού και της ρίζας δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων (P >0.05), όπως επίσης σε καμία των

μεταχειρίσεων δεν παρουσιάστηκε φυτοτοξικότητα (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Επίσης, καμία σημαντική επίδραση στο βιολογικό κύκλο δεν υπήρξε μετά από ενσωμάτωση των προνυμφών στο έδαφος, σε νερό με Tween-20 και μεθανόλη.

Οι τιμές EC_{50} και EC_{90} προέκυψαν από τη μαθηματική επεξεργασία (Probit Analysis) των αποτελεσμάτων και παρουσιάζονται στον Πίνακα 14. Η τιμή EC_{50} υπολογίστηκε στα $111,4 \text{ mg kg}^{-1}$ εδάφους με όριο εμπιστοσύνης $80,6 - 141,8 \text{ mg/kg}$ εδάφους. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η τιμή EC_{90} είναι ίση με 184 mg kg^{-1} εδάφους.



Διάγραμμα 4 Επίδραση της δεκαδιενάλης, στο βιολογικό κύκλο του *M. incognita* μετά από ενσωμάτωσή της στο έδαφος σε συγκεντρώσεις 75 έως 300 mg/kg εδάφους. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται οι μέσοι όροι πειράματος πέντε επαναλήψεων με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις. Ίδιο γράμμα σημαίνει στατιστικά μη σημαντική διαφορά σύμφωνα με το τεστ LSD για επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.05$, και βαθμούς ελευθερίας $df=6$.

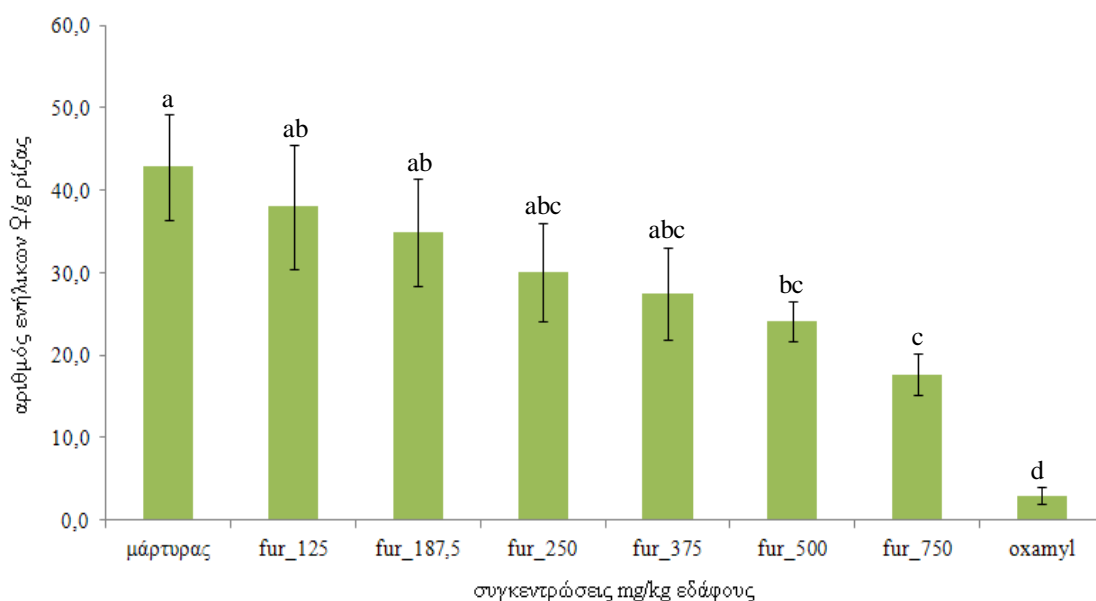
Πίνακας 14 Τιμές EC_{50} και EC_{90} των προνυμφών *M. incognita* με τα αντίστοιχα όρια εμπιστοσύνης μετά από ενσωμάτωση της δεκαδιενάλης σε έδαφος συγκεντρώσεων 75 έως 300 mg/kg εδάφους.

	R^2	* EC_{50} (mg/kg)	Όρια Εμπιστοσύνης	* EC_{90} (mg/kg)
<i>M. incognita</i>	0,97	111,4	80,6 – 141,8	184

* EC_{50} και EC_{90} η συγκέντρωση του διαλύματος που προκαλεί θάνατο των προνυμφών σε ποσοστό 50 και 90% αντίστοιχα.

4.2.2.2 Επίδραση της φουρφουράλης στο βιολογικό κύκλο του *M. incognita*

Η επίδραση της φουρφουράλης στον αριθμό των θηλυκών νηματωδών ανά g ρίζας, όταν εφαρμόζεται σε δοκιμές σε φυτοδοχεία σε εύρος συγκεντρώσεων από 75 έως 300 mg kg⁻¹ εδάφους, παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 5. Αυξανόμενες συγκεντρώσεις της φουρφουράλης μείωσαν σημαντικά (P <0.05) τον αριθμό των θηλυκών ατόμων *M. incognita* στις ρίζες των φυτών σε σχέση με τον αντίστοιχο αριθμό θηλυκών ενηλίκων που μετρήθηκαν στη μεταχείριση του μάρτυρα. Σχεδόν μηδενικός ήταν ο αντίστοιχος αριθμός των ατόμων *M. incognita* που μετρήθηκαν στη μεταχείριση του oxamyl. Σημαντικά λιγότεροι νηματώδεις μετρήθηκαν στις μεταχειρίσεις με δόσεις 500 και 750 mg/kg εδάφους. Τα χλωρά βάρη του υπέργειου μέρους του φυτού και της ρίζας δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων (P >0.05), όπως επίσης σε καμία των μεταχειρίσεων δεν παρουσιάστηκε φυτοτοξικότητα. Επίσης, καμία σημαντική επίδραση στο βιολογικό κύκλο δεν υπήρξε μετά από ενσωμάτωση των προνυμφών σε νερό με Tween-20 και μεθανόλη.



Διάγραμμα 5 Επίδραση της φουρφουράλης, στο βιολογικό κύκλο του *M. incognita* μετά από ενσωμάτωση στο έδαφος, σε συγκεντρώσεις 125 έως 750 mg/kg εδάφους. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται οι μέσοι όροι πείραματος πέντε επαναλήψεων, με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις. Ίδιο γράμμα σημαίνει στατιστικά μη σημαντική διαφορά σύμφωνα με το τεστ LSD για επίπεδο σημαντικότητας P≤0.05, και βαθμούς ελευθερίας df=7.

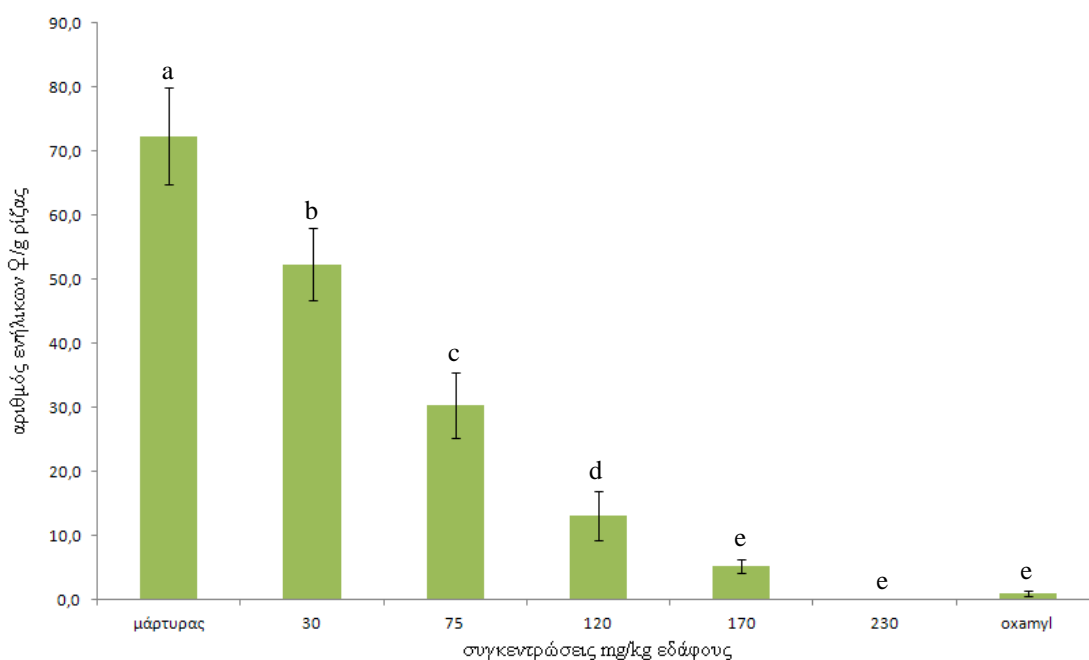
Η τιμή EC₅₀ προέκυψε από τη μαθηματική επεξεργασία (Probit Analysis) των αποτελεσμάτων και υπολογίστηκε στα 612,7 mg kg⁻¹ εδάφους με R² = 0,94. Τα όρια

εμπιστοσύνης και η τιμή EC₉₀ δεν μπόρεσαν να υπολογιστούν διότι βρίσκονταν εκτός των συγκεντρώσεων ελέγχου.

4.2.3 Επίδραση των ουσιών δεκαδιενάλη και δεκενάλη στο βιολογικό κύκλο του *M. incognita*

4.2.3.1 Επίδραση της δεκαδιενάλης στο βιολογικό κύκλο του *M. incognita*

Με βάση τα αποτελέσματα του πειράματος που περιγράφεται στην παράγραφο 4.2.2 βρέθηκε ότι η δεκαδιενάλη μείωσε σημαντικά τον αριθμό των θηλυκών ατόμων *M. incognita* σε όλες τις συγκεντρώσεις ελέγχου και συνεπώς διερευνήθηκε περαιτέρω η χρήση της σε βιοδοκιμές στα φυτοδοχεία. Η επίδραση της δεκαδιενάλης, στον αριθμό των θηλυκών νηματωδών ανά g ρίζας, όταν εφαρμόζεται σε δοκιμές σε φυτοδοχεία σε εύρος συγκεντρώσεων από 30 έως 230 mg kg⁻¹ εδάφους, παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 6.

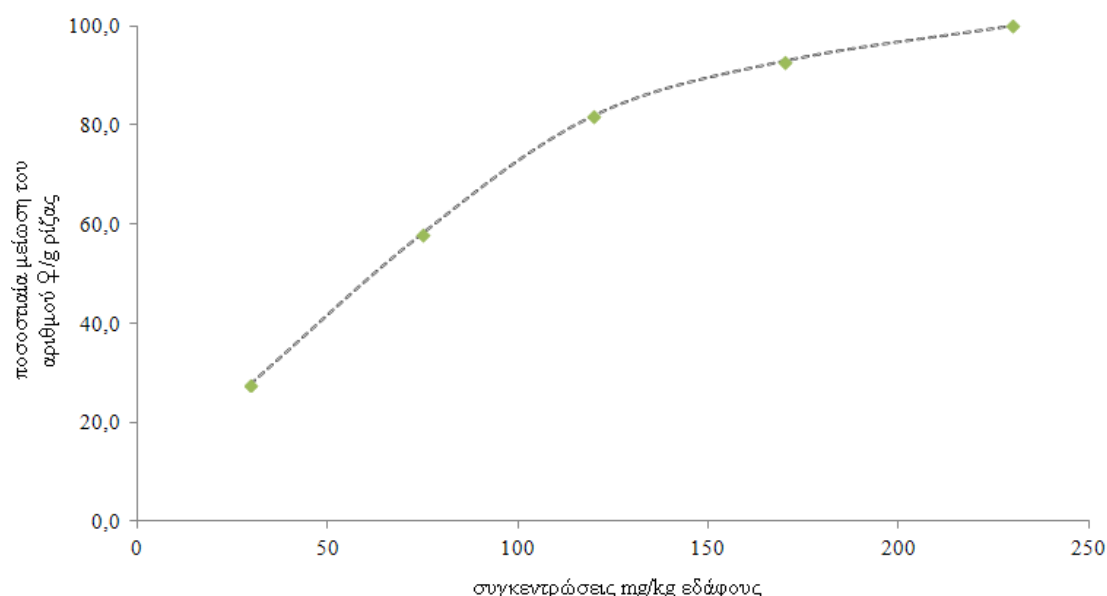


Διάγραμμα 6 Επίδραση της δεκαδιενάλης, στο βιολογικό κύκλο του *M. incognita* μετά από ενσωμάτωσή της στο έδαφος σε συγκεντρώσεις 30 έως 230 mg/kg εδάφους. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται οι μέσοι όροι πέντε επαναλήψεων με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις. Ίδιο γράμμα σημαίνει στατιστικά μη σημαντική διαφορά σύμφωνα με το τεστ LSD για επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.05$, και βαθμούς ελευθερίας $df=6$.

Αυξανόμενες συγκεντρώσεις της δεκαδιενάλης μείωσαν σημαντικά ($P < 0.05$) τον αριθμό των θηλυκών ατόμων *M. incognita* στις ρίζες των φυτών σε σχέση με τον αντίστοιχο αριθμό θηλυκών ενηλίκων που μετρήθηκαν στη μεταχείριση του μάρτυρα.

Σχεδόν μηδενικός ήταν ο αντίστοιχος αριθμός των ατόμων *M. incognita* που μετρήθηκαν στη μεταχείριση του oxamyl.

Η καμπύλη συμμεταβολής των συγκεντρώσεων ελέγχου με την ποσοστιαία μείωση του αριθμού των θηλυκών *M. incognita* ανά g ρίζας των φυτών της τομάτας παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 7. Συγκέντρωση εφαρμογής 230 mg kg⁻¹ εδάφους προκάλεσε 100 % έλεγχο των νηματωδών και η προσβολή στη ρίζα των φυτών τομάτας ήταν μηδενική.



Διάγραμμα 7 Καμπύλη συμμεταβολής του αριθμού των θηλυκών ατόμων *M. incognita* ανά γραμμάριο ρίζας και της συγκέντρωσης ελέγχου της δεκαδιενάλης που εφαρμόστηκε για τη μελέτη της επίδρασης στο βιολογικό κύκλο του νηματώδη. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει το μέσο όρο των πέντε επαναλήψεων του πειράματος. Τα ποσοστά έχουν διορθωθεί ως προς το μάρτυρα (Abbott) και εκφράζουν την % μείωση του αριθμού των νηματωδών στις ρίζες τομάτας που δέχθηκαν επέμβαση με δεκαδιενάλη.

Οι τιμές EC₅₀ και EC₉₀ προέκυψαν από τη μαθηματική επεξεργασία (Probit Analysis) των αποτελεσμάτων και παρουσιάζονται στον Πίνακα 15. Η τιμή EC₅₀ υπολογίστηκε στα 54,3 mg kg⁻¹ εδάφους με όριο εμπιστοσύνης 45,6 – 62,7 mg/kg εδάφους. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η τιμή EC₉₀ είναι ίση με 159,2 mg kg⁻¹ εδάφους.

Πίνακας 15 Τιμές EC₅₀ και EC₉₀ με τα αντίστοιχα όρια εμπιστοσύνης, για προνύμφες *M. incognita* σε έδαφος συγκεντρώσεων δεκαδιενάλης από 30 έως 230 mg/kg εδάφους.

	R ²	*EC ₅₀ (mg/kg)	Όρια Εμπιστοσύνης	*EC ₉₀ (mg/kg)
<i>M. incognita</i>	0,99	54,3	45,6 – 62,7	159,2

* EC₅₀ και EC₉₀ η συγκέντρωση του διαλύματος που προκαλεί θάνατο των προνυμφών σε ποσοστό 50 και 90% αντίστοιχα.

Τα χλωρά βάρη του υπέργειου μέρους του φυτού και της ρίζας δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων (P >0.05), όπως επίσης σε καμία των μεταχειρίσεων δεν παρουσιάστηκε φυτοτοξικότητα. Επίσης, καμία σημαντική επίδραση στο βιολογικό κύκλο δεν υπήρξε μετά από ενσωμάτωση των προνυμφών στο έδαφος, σε νερό με Tween-20 και μεθανόλη.

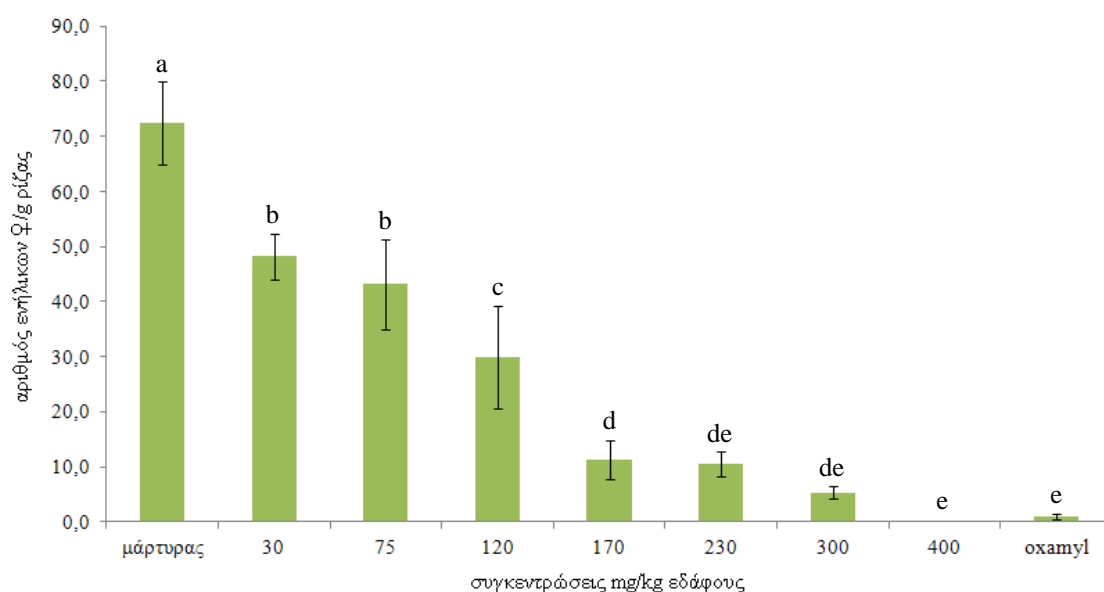
Στην Εικόνα 14 (II – III) παρουσιάζεται το ριζικό σύστημα φυτού τομάτας που αναπτύχθηκε σε έδαφος που είχε δεχθεί μεταχείριση με δεκαδιενάλη σε συγκεντρώσεις 75 και 230 mg kg⁻¹ εδάφους αντίστοιχα. Είναι εμφανής η απουσία κόμβων, συγκρίνοντας το ριζικό σύστημα της Εικόνας 14 (III) με εκείνη της μεταχείρισης του μάρτυρα, Εικόνα 14 (I).



Εικόνα 14 (I) Ρίζα φυτού τομάτας που αντιστοιχεί στο μάρτυρα, και (II – III) Ρίζα τομάτας της μεταχείρισης δεκαδιενάλης σε συγκεντρώσεις 75 και 230 mg kg⁻¹ εδάφους αντίστοιχα.

4.2.3.2 Επίδραση της δεκενάλης στο βιολογικό κύκλο του *M. incognita*

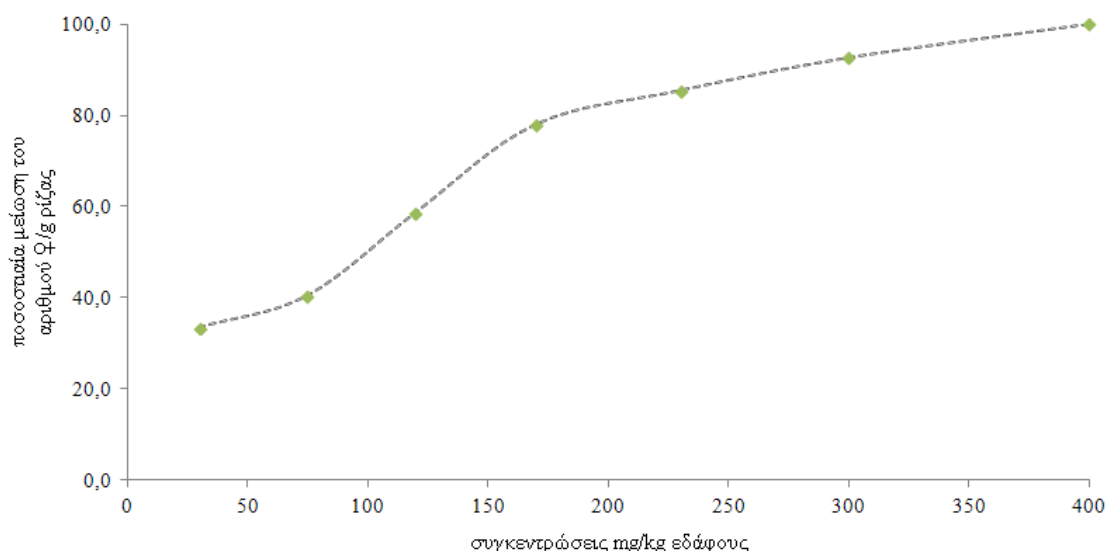
Με βάση τα αποτελέσματα του πειράματος που περιγράφεται στην παράγραφο 4.2.1 βρέθηκε ότι η δεκενάλη μείωσε σημαντικά τον αριθμό των θηλυκών ατόμων *M. incognita* και συνεπώς διερευνήθηκε περαιτέρω η χρήση της σε βιοδοκιμές στα φυτοδοχεία. Η επίδραση της δεκενάλης, στον αριθμό των θηλυκών νηματωδών ανά g ρίζας, όταν εφαρμόζεται σε δοκιμές σε φυτοδοχεία σε εύρος συγκεντρώσεων από 30 έως 400 mg kg⁻¹ εδάφους, παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 8.



Διάγραμμα 8 Επίδραση της δεκενάλης, στο βιολογικό κύκλο του *M. incognita* μετά από ενσωμάτωσή της στο έδαφος σε συγκεντρώσεις 30 έως 400 mg/kg εδάφους. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται οι μέσοι όροι πέντε επαναλήψεων με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις. Ίδιο γράμμα σημαίνει στατιστικά μη σημαντική διαφορά σύμφωνα με το τεστ LSD για επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.05$, και βαθμούς ελευθερίας $df=8$.

Αυξανόμενες συγκεντρώσεις της δεκενάλης μείωσαν σημαντικά ($P < 0.05$) τον αριθμό των θηλυκών ατόμων *M. incognita* στις ρίζες των φυτών σε σχέση με τον αντίστοιχο αριθμό θηλυκών ενηλίκων που μετρήθηκαν στη μεταχείριση του μάρτυρα. Σχεδόν μηδενικός ήταν ο αντίστοιχος αριθμός των ατόμων *M. incognita* που μετρήθηκαν στη μεταχείριση του oxamyl.

Η καμπύλη συμμεταβολής των συγκεντρώσεων ελέγχου με την ποσοστιαία μείωση του αριθμού των θηλυκών *M. incognita* ανά g ρίζας των φυτών της τομάτας παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 9. Συγκέντρωση εφαρμογής 400 mg kg⁻¹ εδάφους προκάλεσε 100 % έλεγχο των νηματωδών και η προσβολή στη ρίζα των φυτών τομάτας ήταν μηδενική.



Διάγραμμα 9 Καμπύλη συμμεταβολής του αριθμού των θηλυκών ατόμων *M. incognita* ανά γραμμάριο ρίζας και της συγκέντρωση ελέγχου της δεκενάλης που εφαρμόστηκε για τη μελέτη της επίδρασης στο βιολογικό κύκλο του νηματώδη. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει το μέσο όρο των πέντε επαναλήψεων του πειράματος. Τα ποσοστά έχουν διορθωθεί ως προς το μάρτυρα (Abbott) και εκφράζουν την % μείωση του αριθμού των νηματωδών στις ρίζες τομάτας που δέχθηκαν επέμβαση με δεκενάλη.

Οι τιμές EC_{50} και EC_{90} προέκυψαν από τη μαθηματική επεξεργασία (Probit Analysis) των αποτελεσμάτων και παρουσιάζονται στον Πίνακα 16. Η τιμή EC_{50} υπολογίστηκε στα $69,3 \text{ mg kg}^{-1}$ εδάφους με όριο εμπιστοσύνης $36,9 - 99,7 \text{ mg/kg}$ εδάφους. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η τιμή EC_{90} είναι ίση με $279,5 \text{ mg kg}^{-1}$ εδάφους. Τα χλωρά βάρη του υπέργειου μέρους του φυτού και της ρίζας δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων ($P > 0,05$), όπως επίσης σε καμία των μεταχειρίσεων δεν παρουσιάστηκε φυτοτοξικότητα. Επίσης, καμία σημαντική επίδραση στο βιολογικό κύκλο δεν υπήρξε μετά από ενσωμάτωση των προνυμφών στο έδαφος, σε νερό με Tween-20 και μεθανόλη.

Πίνακας 16 Τιμές EC_{50} και EC_{90} των προνυμφών *M. incognita* με τα αντίστοιχα όρια εμπιστοσύνης, μετά από ενσωμάτωση σε έδαφος συγκεντρώσεων δεκενάλης 30 έως 400 mg/kg εδάφους.

	R^2	* $EC_{50}(\text{mg/kg})$	Όρια Εμπιστοσύνης	* $EC_{90}(\text{mg/kg})$
<i>M. incognita</i>	0,96	69,3	36,9 – 99,7	279,5

* EC_{50} και EC_{90} η συγκέντρωση του διαλύματος που προκαλεί θάνατο των προνυμφών σε ποσοστό 50 και 90% αντίστοιχα.

Στην Εικόνα 15 (III) παρουσιάζεται το ριζικό σύστημα φυτού τομάτας που αναπτύχθηκε σε έδαφος που είχε δεχθεί μεταχείριση με δεκενάλη σε συγκέντρωση

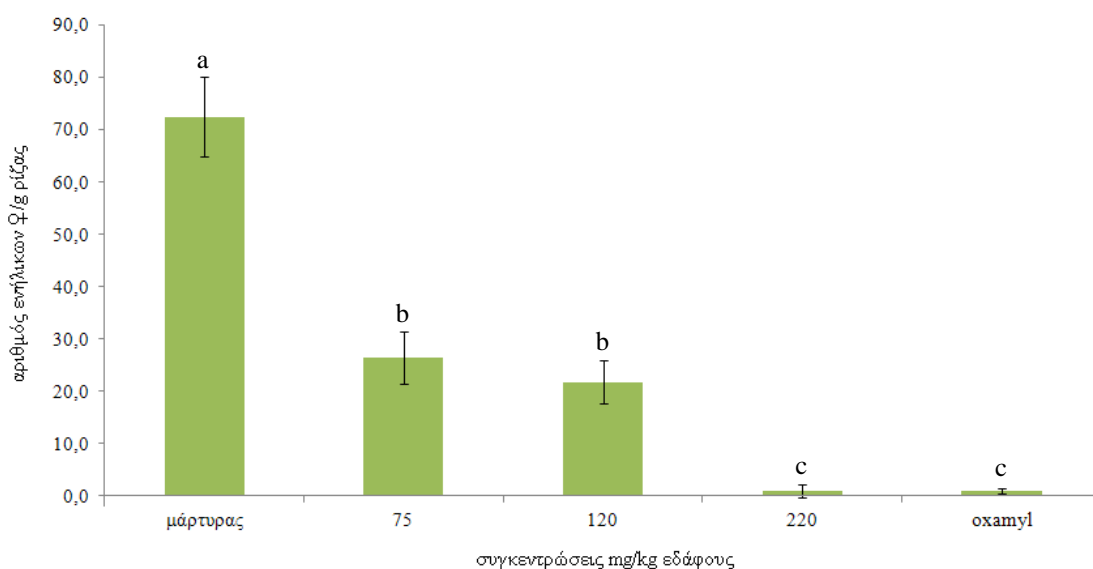
400 mg kg⁻¹ εδάφους. Είναι εμφανής η απουσία κόμβων, συγκρίνοντας το ριζικό σύστημα της Εικόνας 15 (III) με εκείνη της μεταχείρισης του μάρτυρα, Εικόνα 15 (I) αλλά και εκείνης της μεταχείρισης του μάρτυρα με Tween 20 και μεθανόλη Εικόνα 15 (II).



Εικόνα 15 (I – II) Ρίζα φυτού τομάτας που αντιστοιχεί στο μάρτυρα και στον μάρτυρα με Tween 20 και μεθανόλη, (III) Ρίζα τομάτας της μεταχείρισης δεκενάλη σε συγκέντρωση 400 mg kg⁻¹.

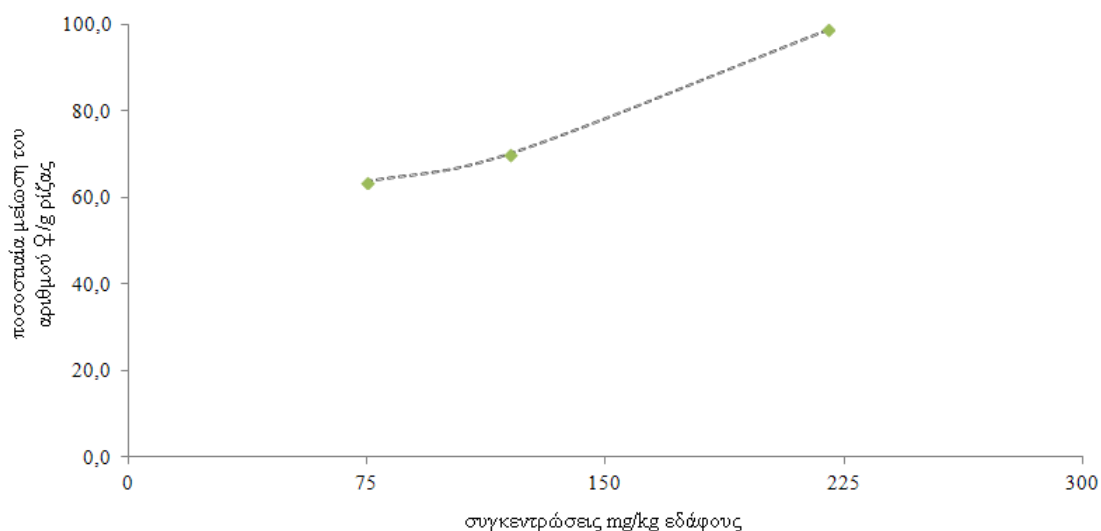
4.2.3.3 Επίδραση του μικτού διαλύματος δεκαδιενάλης και δεκενάλης σε αναλογία 1:1, στο βιολογικό κύκλο του *M. incognita*

Με βάση τα αποτελέσματα του πειράματος παράλυσης που περιγράφεται στην παράγραφο 4.1.5 βρέθηκε ότι ο συνδυασμός δεκαδιενάλης και δεκενάλης μείωσε σημαντικά τον αριθμό των προνυμφών ατόμων *M. incognita* και συνεπώς διερευνήθηκε περαιτέρω η χρήση τους σε βιοδοκιμές στα φυτοδοχεία. Η επίδραση του μικτού διαλύματος δεκαδιενάλης και δεκενάλης σε αναλογία 1:1, στον αριθμό των θηλυκών νηματωδών ανά g ρίζας, όταν εφαρμόζεται σε δοκιμές σε φυτοδοχεία σε συγκεντρώσεις 75, 120 και 220 mg kg⁻¹ εδάφους, παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 10.



Διάγραμμα 10 Επίδραση του μικτού διαλύματος δεκαδιενάλης και δεκενάλης σε αναλογία 1:1, στο βιολογικό κύκλο του *M. incognita* μετά από ενσωμάτωσή στο έδαφος σε συγκεντρώσεις 75, 120 και 220 mg/kg εδάφους. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται οι μέσοι όροι πέντε επαναλήψεων με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις. Ίδιο γράμμα σημαίνει στατιστικά μη σημαντική διαφορά σύμφωνα με το τεστ LSD για επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.05$, και βαθμούς ελευθερίας $df=4$.

Η καμπύλη συμμεταβολής των συγκεντρώσεων ελέγχου με την ποσοστιαία μείωση του αριθμού των θηλυκών *M. incognita* ανά g ρίζας των φυτών της τομάτας παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 11. Συνδυασμός συγκέντρωσης εφαρμογής 110 + 110 mg kg⁻¹ εδάφους (δεκαδιενάλη και δεκενάλη) προκάλεσε 98 % έλεγχο των νηματωδών και η προσβολή στη ρίζα των φυτών τομάτας ήταν σχεδόν μηδενική.



Διάγραμμα 11 Καμπύλη συμμεταβολής του αριθμού των θηλυκών ατόμων *M. incognita* ανά γραμμάριο ρίζας και της συγκέντρωσης ελέγχου του μικτού διαλύματος δεκαδιενάλης και δεκενάλης σε αναλογία 1:1, που εφαρμόστηκε για τη μελέτη της επίδρασης στο βιολογικό κύκλο του νηματώδη. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει το μέσο όρο των πέντε επαναλήψεων του πειράματος. Τα ποσοστά έχουν διορθωθεί ως προς το μάρτυρα (Abbott) και εκφράζουν την % μείωση του αριθμού των νηματωδών στις ρίζες τομάτας που δέχθηκαν την επέμβαση.

Οι τιμές EC_{50} και EC_{90} προέκυψαν από τη μαθηματική επεξεργασία (Probit Analysis) των αποτελεσμάτων και παρουσιάζονται στον Πίνακα 17. Η τιμή EC_{50} υπολογίστηκε στα $65,4 \text{ mg kg}^{-1}$ εδάφους για τον συνδυασμό των ουσιών, ενώ η τιμή EC_{90} είναι ίση με $187,2 \text{ mg kg}^{-1}$ εδάφους. Τα χλωρά βάρη του υπέργειου μέρους του φυτού και της ρίζας δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων ($P > 0,05$), όπως επίσης σε καμία των μεταχειρίσεων δεν παρουσιάστηκε φυτοτοξικότητα. Επίσης, καμία σημαντική επίδραση στο βιολογικό κύκλο δεν υπήρξε μετά από ενσωμάτωση των προνυμφών στο έδαφος, σε νερό με Tween-20 και μεθανόλη.

Πίνακας 17 Τιμές EC_{50} και EC_{90} των προνυμφών *M. incognita* μετά από ενσωμάτωση σε έδαφος συγκεντρώσεων, μικτού διαλύματος δεκαδιενάλης και δεκενάλης 75, 120 και 220 mg kg^{-1} εδάφους.

	R^2	* $EC_{50}(\text{mg/kg})$	$EC_{90}(\text{mg/kg})$
<i>M. incognita</i>	0,96	65,4	187,2

* EC_{50} και EC_{90} η συγκέντρωση του διαλύματος που προκαλεί θάνατο των προνυμφών σε ποσοστό 50 και 90% αντίστοιχα.

Στην Εικόνα 16 παρουσιάζεται το ριζικό σύστημα φυτού τομάτας που αναπτύχθηκε σε έδαφος που είχε δεχθεί μεταχείριση με μικτά διαλύματα δεκαδιενάλης και δεκενάλης σε αναλογία 1:1. Είναι εμφανής η απουσία κόμβων, συγκρίνοντας το ριζικό σύστημα της Εικόνας 16 (III) με εκείνη της μεταχείρισης χαμηλότερης συγκέντρωσης, Εικόνα 16 (I – II).

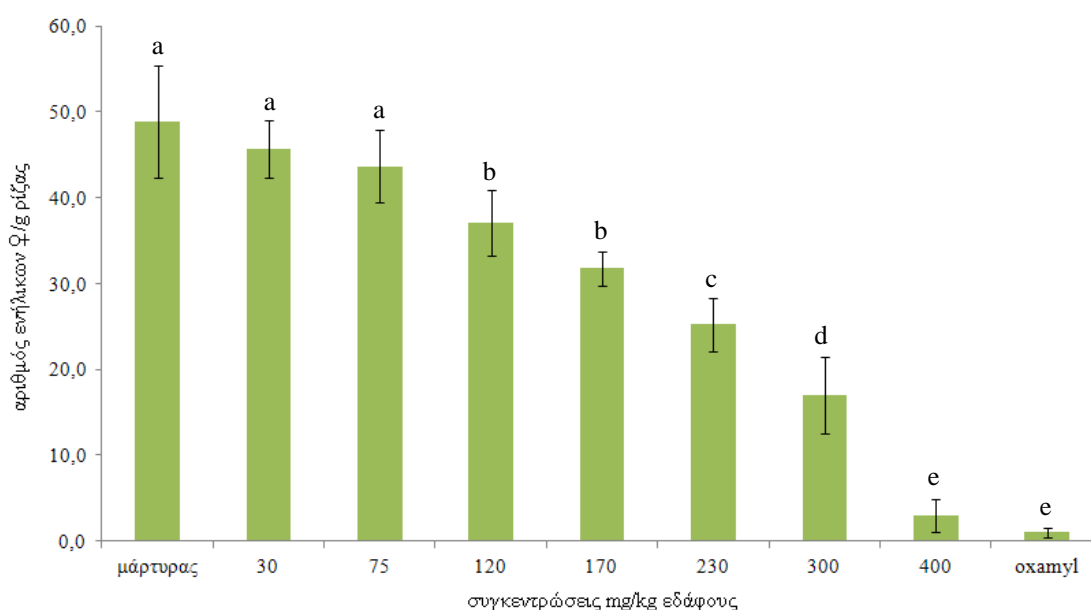


Εικόνα 16 (I – II – III) Ριζικό σύστημα φυτού τομάτας που αναπτύχθηκε σε έδαφος που είχε δεχθεί μεταχείριση με συνδυασμό δεκαδιενάλης και δεκενάλης σε αναλογία 1:1.

Όπως αναφέρθηκε στην 4.2.3.1 και 4.2.3.2 παράγραφο, η τιμή EC_{50} που υπολογίστηκε για την δεκαδιενάλη και δεκενάλη ήταν 54,3 και 69,3 mg/kg εδάφους αντίστοιχα. Αντιστοιχώντας με την τιμή EC_{50} (65,4 mg/kg εδάφους) που προέκυψε από την επίδραση των μικτών διαλυμάτων δεκενάλης με δεκαδιενάλη στην επίδραση στο βιολογικό κύκλο του *M. incognita*, μπορούμε να πούμε πως όταν η δύο ουσίες εφαρμοστούν με μικτά διαλύματα σε αναλογία 1:1 έχουν μικρότερη δράση απ'ότι όταν εφαρμόζεται μόνη της η δεκαδιενάλη ενώ, αντίθετα δίνουν καλύτερα αποτελέσματα απ' ότι όταν εφαρμόζεται μόνη της η δεκενάλη. Δηλαδή η δεκαδιενάλη βοηθά την δεκενάλη και αυξάνει την νηματοδοκτόνο δράση της, δίνοντας μικρότερη τιμή EC_{50} ενώ, η δεκενάλη δεν βοηθά την δεκαδιενάλη ως αποτέλεσμα να προκύπτει μεγαλύτερη τιμή EC_{50} .

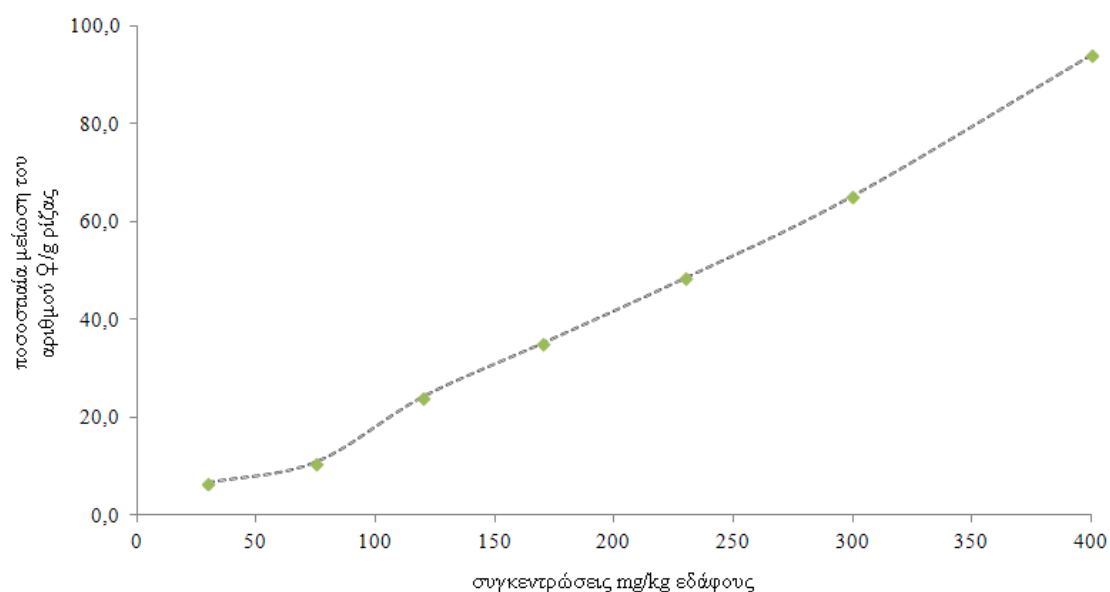
4.2.4 Επίδραση της ενδεκανόνης στο βιολογικό κύκλο του *M. incognita*

Με βάση τα αποτελέσματα του πειράματος παράλυσης που περιγράφεται στην παράγραφο 4.1.5 βρέθηκε ότι η ενδεκανόνη μείωσε σημαντικά τον αριθμό των προνυμφών *M. incognita* και συνεπώς διερευνήθηκε περαιτέρω η χρήση της σε βιοδοκιμές στα φυτοδοχεία. Η επίδραση της ενδεκανόνης στον αριθμό των θηλυκών νηματωδών ανά g ρίζας, όταν εφαρμόζεται σε δοκιμές σε φυτοδοχεία σε εύρος συγκεντρώσεων από 30 έως 400 mg kg⁻¹ εδάφους, παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 12.



Διάγραμμα 12 Επίδραση της ενδεκανόνης, στο βιολογικό κύκλο του *M. incognita* μετά από ενσωμάτωσή της στο έδαφος σε συγκεντρώσεις 30 έως 400 mg/kg εδάφους. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται οι μέσοι όροι πέντε επαναλήψεων με τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις. Ίδιο γράμμα σημαίνει στατιστικά μη σημαντική διαφορά σύμφωνα με το τεστ LSD για επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.05$, και βαθμούς ελευθερίας $df=8$.

Η καμπύλη συμμεταβολής των συγκεντρώσεων ελέγχου με την ποσοστιαία μείωση του αριθμού των θηλυκών *M. incognita* ανά g ρίζας των φυτών της τομάτας παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 13. Συγκέντρωση εφαρμογής 400 mg kg⁻¹ εδάφους προκάλεσε 93 % μείωση των νηματωδών και η προσβολή στη ρίζα των φυτών τομάτας ήταν σχεδόν μηδενική.



Διάγραμμα 13 Καμπύλη συμμεταβολής του αριθμού των θηλυκών ατόμων *M. incognita* ανά γραμμάριο ρίζας και της συγκέντρωσης ελέγχου της ενδεκανόνης που εφαρμόστηκε για τη μελέτη της επίδρασης στο βιολογικό κύκλο του νηματώδη. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει το μέσο όρο των πέντε επαναλήψεων του πειράματος. Τα ποσοστά έχουν διορθωθεί ως προς το μάρτυρα (Abbott) και εκφράζουν την % μείωση του αριθμού των νηματωδών στις ρίζες τομάτας που δέχθηκαν επέμβαση με ενδεκανόνη.

Η τιμή EC_{50} προέκυψε από τη μαθηματική επεξεργασία (Probit Analysis) των αποτελεσμάτων και παρουσιάζεται στον Πίνακα 18. Η τιμή EC_{50} υπολογίστηκε στα $200,8 \text{ mg kg}^{-1}$ εδάφους με όριο εμπιστοσύνης $139,9 - 316,8 \text{ mg/kg}$ εδάφους. Η τιμή EC_{90} δεν μπόρεσε να υπολογιστεί διότι βρισκόταν εκτός των μεταχειρίσεων. Τα χλωρά βάρη του υπέργειου μέρους του φυτού και της ρίζας δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων ($P > 0,05$), όπως επίσης σε καμία των μεταχειρίσεων δεν παρουσιάστηκε φυτοτοξικότητα. Επίσης, καμία σημαντική επίδραση στο βιολογικό κύκλο δεν υπήρξε μετά από ενσωμάτωση των προνυμφών στο έδαφος, σε νερό με Tween-20 και μεθανόλη.

Πίνακας 18 Τιμές EC_{50} και EC_{90} των προνυμφών *M. incognita* με τα αντίστοιχα όρια εμπιστοσύνης, μετά από ενσωμάτωση σε έδαφος συγκεντρώσεων ενδεκανόνης 30 έως 400 mg/kg εδάφους.

	R^2	* EC_{50} (mg/kg)	Όρια Εμπιστοσύνης	* EC_{90} (mg/kg)
<i>M. incognita</i>	0,97	200,8	139,9 – 316,8	-

* EC_{50} και EC_{90} η συγκέντρωση του διαλύματος που προκαλεί θάνατο των προνυμφών σε ποσοστό 50 και 90% αντίστοιχα.

Στην Εικόνα 17 παρουσιάζεται το ριζικό σύστημα φυτού τομάτας που αναπτύχθηκε σε έδαφος που είχε δεχθεί μεταχείριση με ενδεκανόνη σε συγκεντρώσεις 75, 230 και 400 mg kg⁻¹ εδάφους, αντίστοιχα. Είναι εμφανής η απουσία κόμβων, συγκρίνοντας το ριζικό σύστημα της Εικόνας 17 (III) με εκείνη της μεταχείρισης χαμηλότερης συγκέντρωσης, Εικόνα 17 (I – II).



Εικόνα 17 (I – II – III) Ριζικό σύστημα φυτού τομάτας που αναπτύχθηκε σε έδαφος που είχε δεχθεί μεταχειρίσεις με ενδεκανόνη σε συγκεντρώσεις 75, 230 και 400 mg kg⁻¹ εδάφους.

4.3 Συζήτηση – Συμπεράσματα

Στο πλαίσιο ανάπτυξης εναλλακτικών της χημικής, μεθόδων καταπολέμησης των εχθρών, έως σήμερα πολλά φυσικά προϊόντα φυτικής προέλευσης έχουν μελετηθεί και αξιολογηθεί χρησιμοποιούμενα υπό τη μορφή καπνιστικών-απολυμαντικών εδάφους, συστατικών οργανικής λίπανσης, εκχυλισμάτων και καθαρών, φυσικών ενώσεων. Η χλωρή λίπανση προερχόμενη από είδη *Brassicaceae* και *Asteraceae*, εκχυλίσματα των ειδών *Tagetes*, καθώς και προϊόντα του βοτανικού είδους *A. indica*, κοινώς «Νιμ», είναι τα πλέον τυπικά παραδείγματα της διεθνούς βιβλιογραφίας που έχουν ελεγχθεί ως προς τις νηματοδοκτόνες ιδιότητές τους (εφαρμοζόμενα υπό τη μορφή ενσωμάτωσης και εναλλακτικής ή ενδιάμεσης καλλιέργειας) στον αγρό (Akhtar and Malik, 2000; Perez et al., 2003), ενώ εκχυλίσματα και καθαρές ουσίες χρησιμοποιούνται κυρίως πειραματικά *in vitro* ή *in vivo*.

Επίσης πολλές εργασίες έχουν μελετήσει την νηματοδοκτόνο δράση των φυτικών ειδών *Melia azedarach* και *Ailanthus altissima* (Ntalli et al., 2010; Caboni et al., 2012; Κοντέα 2014). Οι καρποί του *M. azedarach* όταν ενσωματωθούν ως σκόνη σε έδαφος που έχει μολυνθεί με κομβονηματοδείς (*M. incognita*, *M. javanica*) επιτυγχάνουν μείωση του αριθμού των θηλυκών νηματωδών, ενώ επίσης το μεθανολικό και υδατικό εκχύλισμα των καρπών εμφανίζουν υψηλή νηματοδοκτόνο δράση. Ως κύρια δραστικά συστατικά των καρπών του *M. azedarach* βρέθηκαν οι ουσίες φουρφουράλη, υδροξυμεθυλοφουρφουράλη και φουρφουρόλη (Ntalli et al., 2010). Αντίστοιχα, κονιορτοποιημένα μέρη του ξύλου καθώς επίσης και μεθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα ξύλου από το είδος *A. altissima* έχει βρεθεί πως παρουσιάζουν νηματοδοκτόνες ιδιότητες εναντίον των ειδών *M. javanica* και *M. incognita* (Caboni et al., 2012; Κοντέα 2014). Μεταξύ των νηματοδοκτόνων ουσιών, που περιέχει το εκχύλισμα ξύλου, προσδιορίζονται οι ουσίες δεκαδιενάλη, δεκενάλη και φουρφουράλη (Caboni et al., 2012). Επίσης το αιθέριο έλαιο του είδους *Ruta chalepensis* και κυρίως η ουσία ενδεκανόνη που απομονώθηκε από το *R. chalepensis* παρουσιάζουν ισχυρή δραστικότητα έναντι στα είδη *M. incognita* και *M. javanica* (Ntalli et al., 2011). Αναλυτικότερα στο Κεφάλαιο 2, της παρούσας διατριβής, παρουσιάζονται βοτανικά είδη που έχουν μελετηθεί για τις νηματοδοκτόνες ιδιότητές τους.

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε αρχικά η πρόκληση παράλυσης προνυμφών *M. incognita* με την εμφάνιση τους σε υδατικά διαλύματα ουσιών φυτικής προέλευσης και συγκεκριμένα της δεκενάλης, δεκαδιενάλης, ενδεκανόνης και φουρφουράλης και τα αποτελέσματα συνοπτικά παρουσιάζονται στον Πίνακα 19.

Πίνακας 19 Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων πειραμάτων παράλυσης. Παρουσιάζονται οι τιμές EC₅₀ με τα αντίστοιχα R² όπως υπολογίστηκαν μετά από 24, 48 και 96 ώρες παραμονής των προνυμφών *M. incognita* σε διαλύματα ελέγχου της δεκενάλης, δεκαδιενάλης, ενδεκανόνης, φουρφουράλης και μικτών διαλυμάτων δεκενάλης με δεκαδιενάλη σε αναλογία 1:1.

Ουσίες φ.π.	24 h		48 h		96 h	
	*EC ₅₀ (mg/L)	R ²	*EC ₅₀ (mg/L)	R ²	*EC ₅₀ (mg/L)	R ²
(E)-2-decenal	20,7	0,99	19,5	0,99	20,9	0,99
(E,E)-2,4-decadienal	11,7	0,97	10,1	0,94	13,5	0,99
(E)-2-undecanone	25,4	0,98	30,1	0,91	26,5	0,96
furfural	34	0,95	>40		20,9	0,92
(E,E)-2,4-decadienal + (E)-2-decenal	>20		14,5	0,90	16,2	0,98

* EC₅₀ η συγκέντρωση που προκαλεί θάνατο/ακίνησία των προνυμφών σε ποσοστό 50 %.

Συγκεκριμένα, στις εμφάνισεις σε διαλύματα δεκενάλης παρατηρήθηκε 100% παράλυση των προνυμφών J2 των *M. incognita* σε συγκεντρώσεις ≥ 40 mg/L. Οι τιμές EC₅₀ που πρόεκυψαν για την ίδια ουσία από τα πειράματα παράλυσης μετά από 24, 48 και 96 h εμφάνισης ήταν 20,7, 19,5 και 20,9 mg/L, αντίστοιχα. Σε εμφάνισεις σε διαλύματα δεκαδιενάλης συγκέντρωσης ≥ 25 mg/L παρατηρήθηκε 100% παράλυση των προνυμφών J2 των *M. incognita*, ενώ οι τιμές EC₅₀ που πρόεκυψαν από τα πειράματα παράλυσης μετά από 24, 48 και 96 h εμφάνισης ήταν 11,7, 10,1 και 13,5 mg/L, αντίστοιχα. Όσον αφορά στην ενδεκανόνη παρατηρήθηκε παράλυση των προνυμφών J2 των *M. incognita* σε ποσοστό μεγαλύτερο του 70% σε διαλύματα συγκέντρωσης ≥ 35 mg/L, ενώ οι τιμές EC₅₀ που πρόεκυψαν μετά από 24, 48 και 96 h εμφάνισης ήταν 25,4, 30,1 και 26,5 mg/L, αντίστοιχα. Λιγότερο δραστική μεταξύ των ουσιών της μελέτης, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων παράλυσης in vitro, φαίνεται να είναι η φουρφουράλη για την οποία οι τιμές EC₅₀ μετά από 24, 48 και 96 h εμφάνισης υπολογίστηκαν σε 34, ≥ 40 και 20,9 mg/L, αντίστοιχα. Όσον αφορά, την επίδραση του μικτού διαλύματος δεκαδιενάλης

και δεκενάλης σε αναλογία 1:1, στην παράλυση των προνυμφών *M. incognita*, η τιμή EC_{50} που υπολογίστηκε στις 48 και 96 h εμφάνισης ήταν 14,5 και 16,2mg/L, αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα πειράματα παράλυσης (Πίνακας 19) σε γενικές γραμμές είναι αντίστοιχα με αυτά άλλων ερευνητών που υποστηρίζουν ομοίως τη νηματοδοκτόνο δράση των ουσιών αυτών. Έναντι των προνυμφών του είδους *M. javanica* για τις ουσίες δεκενάλη, δεκαδιενάλη και φουρφουράλη έχουν υπολογιστεί τιμές $EC_{50/24h}$ 20,4, 11,7 και 21,8 mg/L, αντίστοιχα (Caboni et al., 2012). Τιμή $EC_{50/24h}$ για την ενδεκανόνη έχει υπολογιστεί σε 22,5 και 20,6 mg/L για επίδραση στα είδη *M. javanica* και *M. incognita*, αντίστοιχα (Ntalli et al., 2011). Επίσης οι Ntalli et al. (2010), χρησιμοποιώντας την φουρφουράλη, υδροξυμεθυλοφουρφουράλη και φουρφουρόλη, συστατικά των καρπών του είδους *M. azedarach*, σε πειράματα παράλυσης προνυμφών *M. incognita* υπολόγισε τιμές $EC_{50/24h}$: 8,5, 45,7 και 41,2 mg/L, αντίστοιχα. Σε πειράματα παράλυσης που έχουν πραγματοποιηθεί, χρησιμοποιώντας υδατικά (Κοντέα 2014) και μεθανολικά (Ntalli 2010) εκχυλίσματα των καρπών μελίας (*M. azedarach*) προέκυψε ότι η συγκέντρωση που μείωσε τον αριθμό των προνυμφών *M. incognita* στο μισό (50%) μετά από εμφάνιση 24 h ήταν 1280 και 60 mg/L, αντίστοιχα, ενώ η αντίστοιχη συγκέντρωση μετά από 48 h παραμονής των προνυμφών σε υδατικά και μεθανολικά εκχυλίσματα ήταν 1360 και 426 mg/L, αντίστοιχα. Επίσης η Κοντέα (2014) σε πειράματα παράλυσης προνυμφών *M. javanica* με υδατικά εκχυλίσματα καρπών μελίας, υπολόγισε $EC_{50/24h}$ και $EC_{50/48h}$ με τιμή 1470 mg/L και για τους δύο χρόνους παραμονής, αντίστοιχα. Σε πειράματα παράλυσης των προνυμφών *M. incognita* και *M. javanica* που πραγματοποίησαν οι Fourie H., et al. (2014), με το σκεύασμα cropguard (δ.ο. furfural), υπολόγισαν πως μετά από έκθεση 24 h σε συγκεντρώσεις cropguard ≥ 1 και $\geq 0,01\%$ παρατηρήθηκε 100% παράλυση των προνυμφών *M. incognita* και *M. javanica*, αντίστοιχα, ενώ το ποσοστό αυτό δεν άλλαξε σε μετρήσεις που έγιναν στις 48, 72 και 96 h. Τέλος, το αιθαίριο έλαιο του είδους *R. chalepensis* (περιέχει ως συστατικό την ενδεκανόνη) σε πειράματα παράλυσης βρέθηκε ότι ελέγχει τα είδη *M. incognita* και *M. javanica* με τιμές $EC_{50/24h}$ 77,5 και 107,3 mg/L, αντίστοιχα (Ntalli et al., 2011).

Συμπερασματικά τόσο με βάση τα πειράματα παράλυσης που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, όσο και με βιβλιογραφικές αναφορές

προκύπτει ότι η δεκαδιενάλη και δεκενάλη παρουσιάζουν υψηλότερη νηματωδοκτόνο δράση σε σχέση με τις άλλες ουσίες. Οι Caboni et al. (2012) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η δεκαδιενάλη και δεκενάλη παρουσιάζουν υψηλότερη νηματωδοκτόνο δράση σε σύγκριση με άλλες ουσίες που μελετήθηκαν και περιέχονταν ως συστατικά του ξήλου του είδους *Ailanthus altissima*. Μερικές από αυτές ήταν οι (E)-2-undecenal, (E)-2-octenal, nonanal, heptanal, hexanal, φουρφουράλη και υδροξυμεθυλοφουρφουράλη. Επίσης στην ίδια μελέτη υπολογίστηκε πως η δεκαδιενάλη παρουσιάζει ισχυρότερη νηματωδοκτόνο δράση από το fosthiazate που είχε χρησιμοποιηθεί ως χημικός μάρτυρας.

Στη συνέχεια της παρούσας μελέτης αξιολογήθηκε η νηματωδοκτόνος δράση των παραπάνω ουσιών φυτικής προέλευσης μετά από εφαρμογή τους με ενσωμάτωση στο έδαφος σε πειράματα βιοδοκιμών σε φυτοδοχεία με φυτά τομάτας. Αρχικά πραγματοποιήθηκε η αξιολόγηση των ουσιών δεκαδιενάλη, δεκενάλη, φουρφουράλη και υδροξυμεθυλοφουρφουράλη σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων εφαρμογής στο έδαφος, μία συγκέντρωση 300 και μία 600 mg kg⁻¹ εδάφους και ακολούθως πραγματοποιήθηκε σειρά περαιτέρω πειραμάτων με στόχο την αξιολόγηση της επίδρασής τους στο βιολογικό κύκλο του *M. incognita* και τον υπολογισμό EC₅₀ για κάθε μία ουσία.

Στο αρχικό στάδιο της αξιολόγησης αποδείχτηκε ότι όλες οι ουσίες και στα δύο επίπεδα συγκεντρώσεων που δοκιμάστηκαν παρουσιάζουν νηματωδοκτόνο δράση και η επίδρασή τους στην ανάκαμψη του βιολογικού κύκλου των κομβονηματωδών ήταν εμφανής. Σημαντικά λιγότεροι νηματώδεις (αριθμός ενήλικων ♀/g ρίζας) μετρήθηκαν στις ρίζες των φυτών τομάτας στη μεταχείριση της υψηλότερης δόσης τους (600 mg/kg εδάφους).

Από τα περαιτέρω πειράματα για την αξιολόγηση της επίδρασης των ουσιών της μελέτης στο βιολογικό κύκλο του *M. incognita* και τον υπολογισμό της τιμής EC₅₀ για κάθε μία ουσία προέκυψαν τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 20.

Η επίδραση της δεκαδιενάλης στο βιολογικό κύκλο του *M. incognita*, όπως προέκυψε από τα πειράματα βιοδοκιμών στα φυτοδοχεία ήταν ουσιαστική καθώς σημαντικά λιγότεροι νηματώδεις μετρήθηκαν στις μεταχειρίσεις με δόσεις 150 και 225 mg/kg εδάφους ενώ μηδενικός ήταν ο αριθμός των ενήλικων θηλυκών στις ρίζες

στη μεταχείριση των 300 mg/kg εδάφους. Η τιμή EC₅₀, που προέκυψε από τα πειράματα βιοδοκιμών για την δεκαδιενάλη ήταν 111,4 mg kg⁻¹ εδάφους. Εφαρμογές της φουρφουράλης σε συγκεντρώσεις 500 και 750 mg/kg εδάφους μείωσε σημαντικά τον αριθμό των νηματωδών και την προσβολή σε σύγκριση με τον μάρτυρα ενώ η τιμή EC₅₀, που προέκυψε από τα πειράματα βιοδοκιμών ήταν 612,7 mg kg⁻¹ εδάφους.

Καθώς με βάση τα αποτελέσματα τόσο των πειραμάτων παράλυσης, των προαναφερομένων πειραμάτων βιοδοκιμών σε φυτοδοχεία, αλλά και των αναφορών της βιβλιογραφίας προκύπτει ότι η δεκαδιενάλη είναι η πιο δραστική μεταξύ αυτών που μελετήσαμε και έτσι αξιολογήθηκε η δράση της στο βιολογικό κύκλο του *M. incognita* σε βιοδοκιμές στα φυτοδοχεία και με δεύτερο πείραμα. Επίσης στο ίδιο πείραμα εξετάστηκε η δεκενάλη ως προς την επίδρασή της στον βιολογικό κύκλο του κομβονηματώδη *M. incognita* καθώς και ο συνδυασμός δεκαδιενάλης και δεκενάλης σε αναλογία 1:1 και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 20 (στήλη 2^ο πείραμα). Η τιμή EC₅₀, που προέκυψε από τα πειράματα βιοδοκιμών ήταν 54,3 mg kg⁻¹ εδάφους για την δεκαδιενάλη και 69,3 mg kg⁻¹ εδάφους για την δεκενάλη. Αντίστοιχα 100 % έλεγχος των νηματωδών και μηδενική προσβολή στη ρίζα των φυτών τομάτας παρουσιάστηκε σε συγκέντρωση εφαρμογής 230 mg/kg εδάφους δεκαδιενάλης και 400 mg kg⁻¹ εδάφους δεκενάλης.

Πίνακας 20 Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων, όπου παρουσιάζονται οι τιμές EC₅₀ με τα αντίστοιχα R², των τριών βιολογικών πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν σε φυτοδοχεία με φυτά τομάτας για τον έλεγχο επίδρασης των ουσιών δεκενάλη, δεκαδιενάλη, ενδεκανόνη, φουρφουράλη καθώς και μίγματος (1:1) δεκενάλη με δεκαδιενάλη κατά των προνυμφών *M. incognita*.

Ουσίες φ.π.	*1 ^ο Πείραμα		*2 ^ο Πείραμα		*3 ^ο Πείραμα	
	EC ₅₀ (mg/kg)	R ²	EC ₅₀ (mg/kg)	R ²	EC ₅₀ (mg/kg)	R ²
(E)-2-decenal	-	-	69,3	0,96	-	-
(E,E)-2,4-decadienal	111,4	0,97	54,3	0,99	-	-
(E)-2-undecanone	-	-	-	-	200,8	0,97
furfural	612,7	0,94	-	-	-	-
(E,E)-2,4-decadienal + (E)-2-decenal	-	-	65,4	0,96	-	-

* Το κάθε πείραμα αξιολογήθηκε σε διαφορετικό χρόνο και με επίδραση διαφορετικής γενιάς μάρτυρα *M. incognita*.

Συγκρίνοντας λοιπόν τις δύο ουσίες, τις οποίες χρησιμοποιήσαμε στο συγκεκριμένο πείραμα σε φυτά τομάτας, προκύπτει, σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα της εργασίας, ότι η δεκαδιενάλη είναι δραστικότερη ως προς τη νηματωδοκτόνο δράση της από τη δεκενάλη, αποτέλεσμα που συμβαδίζει και επιβεβαιώνει τις τιμές EC₅₀ για τις δύο ουσίες που υπολογίστηκαν τόσο από τα πειράματα παράλυσης της εργασίας αυτής (Πίνακας 19), όσο και από τις λίγες υπάρχουσες βιβλιογραφικές αναφορές. Σχετικά με την αξιολόγηση της δράσης του συνδυασμού των δεκαδιενάλη και δεκενάλη σε αναλογία 1:1, προέκυψε ότι προκάλεσε 98 % έλεγχο των νηματωδών και η προσβολή στη ρίζα των φυτών τομάτας ήταν σχεδόν μηδενική σε συγκέντρωση 220 mg kg⁻¹ εδάφους, ενώ η τιμή EC₅₀ για το μικτό διάλυμα των ουσιών αυτών εκτιμήθηκε στα 65,4 mg kg⁻¹ εδάφους.

Τέλος, εξετάστηκε η επίδραση της ενδεκανόνης στο βιολογικό κύκλο του *M. incognita* σε πειράματα βιοδοκιμών σε φυτοδοχεία. Συγκέντρωση εφαρμογής 400 mg kg⁻¹ εδάφους προκάλεσε 93 % έλεγχο των νηματωδών και η προσβολή στη ρίζα των φυτών τομάτας ήταν σχεδόν μηδενική. Η αντίστοιχη τιμή EC₅₀ υπολογίστηκε στα 200,8 mg kg⁻¹ εδάφους. Με βάση τα αποτελέσματα τόσο των πειραμάτων παράλυσης, των προαναφερομένων πειραμάτων βιοδοκιμών σε φυτοδοχεία, αλλά και των αναφορών της βιβλιογραφίας προκύπτει ότι η ενδεκανόνη είναι λιγότερο δραστική από την δεκαδιενάλη και δεκενάλη άλλα πιο δραστική από την φουρφουράλη.

Όπως έχει αναφερθεί αυτή είναι η πρώτη αναφορά επίδρασης των φυτικών ουσιών δεκαδιενάλη, δεκενάλη, ενδεκανόνη, φουρφουράλη και υδροξυμεθυλοφουρφουράλη σε κομβονηματοώδεις σε πειράματα βιοδοκιμών σε φυτοδοχεία. Υπάρχουν βέβαια μερικές μελέτες που έχουν εξετάσει την νηματωδοκτόνο δράση φυτικών ειδών που περιέχουν ως συστατικό τους αυτές τις ουσίες. Έχει βρεθεί ότι καρποί του φυτού *Melia azedarach* (φουρφουράλη και υδροξυμεθυλοφουρφουράλη περιέχονται ως συστατικά) όταν ενσωματωθούν ως σκόνη σε έδαφος που έχει μολυνθεί με *M. incognita* σε συγκέντρωση 0,4% w/w, επιτυγχάνεται μείωση του αριθμού των ενήλικων θηλυκών νηματωδών κατά 50% (Ntalli et al., 2010), ενώ το μεθανολικό και υδατικό εκχύλισμα των καρπών εμφανίζουν τιμές EC₅₀ 0,916 (Ntalli et al., 2010) και 1,152% w/w (Κοντέα 2014), αντίστοιχα. Επίσης η Κοντέα (2014) σε πειράματα που πραγματοποίησε σε φυτοδοχεία με ενσωμάτωση αλεσμένου ξύλου του είδους *Ailanthus altissima* (δεκενάλη, δεκαδιενάλη και φουρφουράλη περιέχονται ως συστατικά) σε έδαφος που

έχει μολυνθεί με κομβονηματώδεις *M. incognita* υπολόγισε τιμή EC_{50} 0,195% w/w, ενώ υδατικό εκχύλισμα ξύλου εμφάνισε τιμή EC_{50} ίση με 0,28% w/w.

Χρειάζεται βέβαια να αναφερθεί επί των σχολίων και συμπερασμάτων που αναφέρθηκαν παραπάνω ότι, γενικά, είναι επισφαλής η σύγκριση της δραστηρότητας των βοτανικών εκχυλισμάτων, λόγω διαφορών στην προέλευση της πρώτης ύλης και στη μεθοδολογία της εκχύλισης (Li, 1999). Παρόλα αυτά, η σύγκριση με αυτά τα στοιχεία της βιβλιογραφίας είναι αναπόφευκτη, λόγω του φυσικού περιορισμού στη διαθεσιμότητα των βοτανικών ειδών που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στις βιοδοκιμές σε πειράματα σε φυτοδοχεία.

Ανακεφαλαιώνοντας, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αποδεικνύεται η πρόκληση παράλυσης, καθώς και η επίδραση στο βιολογικό κύκλο του *M. incognita* των ουσιών δεκαδιενάλη, δεκενάλη, ενδεκανόνη, φουρφουράλη και υδροξυμεθυλοφουρφουράλη. Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν τόσο από τα πειράματα παράλυσης όσο και από τα πειράματα βιοδοκιμών σε φυτοδοχεία προκύπτει ότι η δεκαδιενάλη είναι δραστικότερη ως προς την νηματωδοκτόνο δράση της από τις υπόλοιπες ουσίες, ενώ η δεκενάλη, ενδεκανόνη και φουρφουράλη ακολουθούν. Ο συνδιασμός δεκαδιενάλη με δεκενάλη παρουσίασε εξίσου ισχυρή νηματωδοκτόνο δράση σε πειράματα παράλυσης και πειράματα βιοδοκιμών σε φυτοδοχεία αλλά σε καμία των περιπτώσεων δεν παρουσίασε ισχυρότερη δράση από τη δεκαδιενάλη μόνη της. Η ισχυρή νηματωδοκτόνος δράση που παρουσιάζει η δεκαδιενάλη αλλά και δεκενάλη επιπλέον προκύπτει και από την σύγκριση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την μεταχείριση του χημικού μάρτυρα στα πειράματα βιοδοκιμών σε φυτοδοχεία. Το oxamy1 (Vydate 10SL) που χρησιμοποιήθηκε ως χημικός μάρτυρας παρουσίασε παρόμοια νηματωδοκτόνο δράση από τη δεκαδιενάλη και δεκενάλη σε συγκέντρωση 230 και 400 mg kg⁻¹ εδάφους, αντίστοιχα. Συνεπώς, η δεκαδιενάλη και δεκενάλη αλλά και η ενδεκανόνη και φουρφουράλη θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως μέσα βιολογικής καταπολέμησης των κομβονηματωδών μόνα τους ή σε συνδυασμό με άλλα μέσα, όπως καλλιεργητικές τεχνικές και χημικά μέσα καταπολέμησης.

Με βάση τα συμπεράσματα της παρούσας εργασίας κρίνεται ενδιαφέρουσα η διεύρυνση της μελέτης επίδρασης των ουσιών δεκαδιενάλη, δεκενάλη, ενδεκανόνη και φουρφουράλη και σε άλλα είδη νηματωδών. Μελέτες πρακτικής και οικονομικής

βιωσιμότητας της εφαρμογής των ουσιών αυτών σε έδαφος που θα φιλοξενήσει καλλιέργειες-ξενιστές των κομβομηματωδών, ως μέθοδο βιολογικής καταπολέμησης τους, είναι απαραίτητες για την αξιολόγηση της πρακτικής σημασίας των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η μελέτη της νηματωδοκτόνου δράσης μικτών διαλυμάτων των ουσιών που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη. Παράλληλα περαιτέρω έρευνα είναι αναγκαία για την επιβεβαίωση της επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων ή τη μελέτη της διακύμανσης τους στο χρόνο. Με βάση τα αποτελέσματα τέτοιων ερευνών θα μπορούν να εξαχθούν χρήσιμα συμπεράσματα όσον αφορά στην ανάπτυξη σκευασμάτων βασισμένων στις ουσίες αυτές ή στα εκχυλίσματα φυτικών ιστών.

Βιβλιογραφία

- Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticides. J. of Econ. Entom., 18: 265-267.
- Adam, M.A.M., Phillips, M.S., Blok, V.C. (2006). Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Plant Pathol. 56, 190-197.
- Adam, M.A.M., Philips, M.S., Blok, V.C. (2005). Identification of *Meloidogyne* spp. from North East Libya and comparison of their inter- and intra- specific genetic variation using RAPDs. Nematology. 7, 599-609.
- Adekunle OK (2011) Amendment of soil with African marigold and sunn hemp for management of *Meloidogyne incognita* in selected legumes. Crop Prot 30:1392–1395.
- Akhtar, M. & Mahmood, I. (1994). Potentiality of phytochemicals in nematode control: A review. Bioresource Technol., 48: 189-201, ISSN: 0960-8524.
- Akhtar, Y.; Yeoung, Y.-R. & Isman, M.B. (2008). Comparative bioactivity of selected extracts from Meliaceae and some commercial botanical insecticides against two noctuid caterpillars, *Trichoplusia ni* and *Pseudaletia unipuncta* Phytochem. Rev., 7: 77–88, ISSN: 1568-7767, EISSN: 1572-980X.
- Akhtar, M. (2000). Nematicidal potential of the neem tree *Azadirachta indica* (A. Juss). Int. Pest Mgmt Rev.. 5, 57-66.
- Akhtar, A., Malik, A. (2000). Roles of organic amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematodes: a review. Bioresour Technol 74, 35-47.
- Back, M.A., Haydock, P.P.J., Jenkinson, P. (2002). Disease complexes involving plant parasitic nematodes and soilborne pathogens. Plant Patholog. 51, 683-697.

- Begum S, Zehra SQ, Siddiqui BS, Fayyaz S, Ramzan M (2008) Pentacyclic triterpenoids from the aerial parts of *Lantana camara* and their nematocidal activity. *Chem Biodivers* 5:1856–1866.
- Brady N.C., (1985). Agricultural research and food production. In: An Advanced Treatise on Meloidogyne. Vol 1: Biology and Control J.N. Sasser, C.C. Carted (Eds). North Carolina State University Graphics. pp: 3-9.
- Byrd, A.F. (1958). The adult female cuticle and egg sac of the genus *Meloidogyne* Goeldi, 1887. *Nematologica*, 3, 205-212.
- Buena, A.P., Garcia-Alvarez, A., Diez-Rojo, M.A., Bello, A. (2006). Use of crop residues for the control of *Meloidogyne incognita* under laboratory conditions. *Pest Manag. Sci.* 62, 919-926.
- Caboni P, Ntalli NG, Aissani N, Cavoski I, Angioni A (2012) Nematicidal activity of (E, E)-2,4-decadienal and (E)-2-decenal from *Ailanthus altissima* against *Meloidogyne javanica*. *J Agric Food Chem* 60:1146–1151.
- Cavoski I, Caboni P, Miano T (2012) Natural pesticides and future perspectives. *Pesticides Modern World Pesticides Use Manag* 35:169–190.
- Cao AC, Zhang WJ, Liu JH (2007) Progress in the alternatives to methyl bromide in soil disinfestation. *Plant Prot* 33:15–18.
- Cetintas R, Yarba MM (2010) Nematicidal effects of five plant essential oils on the southern root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* race 2. *J Anim Vet Adv* 9:222–225.
- Chitwood, B.G. (1957). The English Word «Nema». Revised. *Systemic Zoology*, 6, 184-186.
- Christie, J. R. (1959). *Plant Nematodes, Their Bionomics and Control*. Agr. Exp. Sta., Univ. Fla., Gainesville. *Gochnatia barrosii* Cabrerae (Asteraceae) leaves and evaluation of the nematocidal activity. *Cienc Agrotec* 34:1224–1231.
- Chitwood, D.J. (2002). Phytochemical based strategies for nematode control. *Annu.Rev.Phytopathol.* 40, 221-249.

- Chuan QB, Zhi LL, Qi ZL (2011) Nematicidal constituents from the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* aerial parts. *E J Chem* 8:143–148.
- Dao F., Oostenbrink, M. and Viets, H.A. (1970). A list of nematode surveys made for agricultural purposes. *Verslagen en Mededelingen van de Plantenziektenkundige Dienst Wageningen. S. Ser. No 415*, 84 pp.
- D'Addabbo T, Carbonara T, Leonetti P, Radicci V, Tava A, Avato P (2011) Control of plant parasitic nematodes with active saponins and biomass from *Medicago sativa*. *Phytochem Rev* 10:503–519.
- Dayan FE, Cantrell CL, Duke SO (2009) Natural products in crop protection. *Bioorg Med Chem* 17:4022–4034.
- Di Vito M, Catalano F, Pecchia P, Cammareri M, Conicella C (2010) Effects of meal and saponins of *Aster caucasicus* and of *A. sedifolius* on the control of nematodes. *Acta Hortic* 883:361–368.
- Digilio MC, Mancini E, Voto E, De Feo V (2008) Insecticide activity of Mediterranean essential oils. *J Plant Interact* 3:17–23.
- Dos Santos JHM, Tirelli AA, Carvalho HWP, Oliveira DF, Do Prado NRT, Campos VP (2010) Purification of the flavonoid trans-tiliroside from the methanolic extract of *Gochnatia barrosii* Cabrerae (Asteraceae) leaves and evaluation of the nematicidal activity. *Cienc Agrotec* 34:1224–1231.
- Duschatzky CB, Martinez AN, Almeida NV, Bonivardo SL (2004). Nematicidal activity of the essential oils of several Argentina plants against the root-knot nematode. *J Ess Oil Res* 16:626–628.
- Ebada, S. S., Edrada, R.A., Lin W., Proksch, P. (2008). Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. *Nature Protocols* 3, 1820-1831.
- Edelson JV, Duthie J, Roberts W (2002) Toxicity of biorational insecticides: activity against the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Pest Manag Sci* 58(3):255–260.

- El Allagui N, Tahrouch S, Bourijate M, Hatimi A (2007) Action of plant extracts on root-knot nematods (*Meloidogyne* spp.) mortality 503. *Acta Bot Gallica* 154:503–509.
- Faizi S, Fayyaz S, Bano S, Iqbal EY, Lubna L, Siddiqi H, Naz A (2011) Isolation of nematicidal compounds from *Tagetes patula* L. yellow flowers: structure-activity relationship studies against cyst nematode *Heterodera zea* infective stage larvae. *J Agric Food Chem* 59:9080–9093.
- Fourie, H., Van Aardt, W.J., Venter, C., Tiedt, L.R. (2014) The effects of cropguard on the motility, ultrastructure, and respiration of two *meloidogyne* species. *Nematropica*. Volume 44, Issue 1, June 2014, Pages 85-92.
- Franklin, M. (2008). The Present Position in the Systematics of *Meloidogyne*. *EPPO Bulletin*. 2, 5-15.
- Giannakou I.O., Karpouzas D.G., Anastasiades I., Tsiropoulos N.G., Georgiadou. A. (2005). Factors affecting the efficacy of non-fumigant nematicides for controlling root-knot nematodes. *Pest Manag. Sci.* 61, 961-972.
- Goodell, P. B., Ferris, H. (1989). Influence of environmental factors on the hatch and survival of *Meloidogyne incognita*. *J Nematol.* 21, 328-334.
- Hirschmann, H. (1960). Gross morphology of nematodes. In: *Nematology*. (Eds) Sasser, J.N. and Jenkins, W.R. California Univ. Press Chapel Hill. pp. 125-129.
- Hidalgo-Diaz, L., Kerry, B.R. (2008). Integration of biological control with other methods on nematode management. In A. Ciancio & K.G. Mukerji (eds.), *Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes*, 29-49.
- Hooks CRR, Wang KH, Ploeg A, McSorley R (2010) Using marigold (*Tagetes* spp.) as a cover crop to protect crops from plant-parasitic nematodes. *Appl Soil Ecol* 46:307–320.
- Hussey R.S. (1985). Host parasite relationships and associated physiological changes. In: *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. Vol 1: *Biology and Control* J.N.

- Sasser, C.C. Carted (Eds). North Carolina State University Graphics. pp:143-153.
- Immaraju, J.A., 1998. The commercial use of Azadirachtin and its integration into viable pest control programmes. *J. Pestic. Sci.* 54, 285-289.
- Isman, M.I. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot.* 19, 603-608.
- Isman MB (2000) Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot* 19:603–608.
- Isman MB (2006) Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu Rev Entomol* 51:45–66.
- Isman MB (2008) Botanical insecticides: for richer, for poorer. *Pest Manag Sci* 64(8–11):1207.
- Jones FGW, Jones MG (1964). *Pest of field crops*. Edward Arnold Ltd. London p. 404.
- Karssen, G., (2002). *The plant Parasitic Nematode Genus Meloidogyne Goldi, 1892 (Tylenchida) in Europe*. Brill. The Netherlands.
- Kaplan, D.T., Keen, N.T. (1980). Mechanisms conferring plant incompatibility to nematode. *Revue de Nematologie.* 3, 123-124.
- Katan, J., Greenberger, A., Laon, H., Grinstein, A. (2007). Solar heating by polyethylene mulching for the control of diseases caused by soil-borne pathogens. *Phytopathology.* 66, 683-688.
- Karpouzas, D.G., Walker, A., Drennan, D.S.H., Froud-Williams, R.J. (2001). The effect of initial concentration of carbofuran on the development and stability of its enhanced biodegradation in top-soil and sub-soil. *Pest Manag. Sci.* 57, 72–81.
- Kirkegaard, J., Sarwar, M. (1998). Biofumigation potential of Brassicas-I. Variation in glucosinolate profiles of diverse field-grown Brassicas. *Plant and Soil.* 201, 71-89.

- Klein E, Katan J, Gamliel A (2011) Combining residues of herb crops with soil heating for control of soilborne pathogens in a controlled laboratory system. *Crop Prot* 30:368–374.
- Lahlou M (2004) Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytother Res* 18(6):435–448.
- Lazzeri L, Curto G, Dallavalle E, D’Avino L, Malaguti L, Santi R, Patalano G (2009) Nematicidal efficacy of biofumigation by defatted brassicaceae meal for control of *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White) Chitw. on a full field zucchini crop. *J Sust Agr* 33:349–358.
- Leonetti P, D’Addabbo T, Avato P, Tava A (2011) Control of root-knot nematodes with biomasses from alfalfa (*Medicago sativa* L.) and their bioactive saponins. *Acta Hort* 914:225–228.
- Lopez-Llorca, L.V., Macia-Vicente, J.G., Jansson, H.B. (2008). Mode of action and interactions of nematophagous fungi. In A. Ciancio & K.G. Mukerji (eds.), *Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes*. 51-76.
- Lopez-Perez JA, Roubtsova T, de Cara Garcí’a M, Ploeg A (2010) The potential of five winter-grown crops to reduce root-knot nematode damage and increase yield of tomato. *J Nematol* 42:120–127.
- Madulu, J., Trudgill, D.L. (1994). Influence of temperature on *Meloidogyne javanica*. *Nematologica*. 40, 230-243.
- Mazurkiewicz-Zapałowicz, K., Kołodziejczyk, L., (2009). Antagonistic interactions between saprotrophic fungi and geohelminths. 1. Saprotrophic fungi in the biological control of phytopathogenic geohelminths. *Wiadomości parazytologiczne*. 55, 1-8.
- Matthiessen, J.N., Kirkegaard, J.A. (2006). Biofumigation and Enhanced Biodegradation: opportunity and challenge in soilborne pest and disease management. *Crit. Rev. Plant Sci*. 25, 235-265.

- Marahatta SP, Wang KH, Sipes BS, Hooks CRR (2010) Striptilled cover cropping for managing nematodes, soil mesoarthropods, and weeds in a bitter melon agroecosystem. *J Nematol* 42:111–119.
- Mari M, Leoni O, Bernardi R, Neri F, Palmieri S (2008) Control of brown rot on stonefruit by synthetic and and glucosinolate- derived isothiocyanates. *Postharvest Biol Technol* 47:61–67.
- Meyer SLF, Lakshman DK, Zasada IA, Vinyard BT, Chitwood DJ (2008) Phytotoxicity of clove oil to vegetable crop seedlings and nematotoxicity to root-knot nematodes. *HortTechnology*. 18:631–638.
- Meyer SLF, Lakshman DK, Zasada IA, Vinyard BT, Chitwood DJ, Midiwo JO, Yenesew A, Juma BF, Derese S, Ayoo JA, Aluoch AO, Guchu S (2002) Bioactive compounds from some Kenyan ethnomedicinal plants: Myrsinaceae, Polygonaceae and *Psiadia punctulata* (Conference Paper). *Phytochem Rev* 1:311–323.
- Morgan, E.D. (2009). Azadirachtin, a scientific gold mine. *Bioorg Med Chem*. 17, 4096-4105.
- Murakami A, Ohnishi K (2012) Target molecules of food phytochemicals: food science bound for the next dimension. *Food Funct* 3:462–476.
- Neves WS, de Freitas LG, Coutinho MM, Dallemole-Giaretta R, Fabry CFS, Dhingra OD, Ferraz S (2009) Nematicidal activity of extracts of red hot chilli pepper, mustard and garlic on *Meloidogyne javanica* in green house. *Summa Phytopathol* 35:255–261.
- Ntalli N. G., Menkissoglu-Spiroudi U., Giannakou I. (2010). Nematicidal activity of powder and extracts of *Melia azedarach* fruits against *Meloidogyne incognita*. *An. of Ap. Biol.* 156(2), 309-317.
- Ntalli, N.G., Menkisoglou-Spiroudi, U., Giannakou, I.O., Prophetou Athanasiadou, D.A. (2009). Efficacy evaluation of a neem (*Azadirachta indica* A. Juss) formulation against root-knot nematodes *Meloidogyne incognita*. *Crop Prot.* 28, 489-494.

- Ntalli NG, Ferrari F, Giannakou IO, Menkissoglu-Spiroudi U (2010) Phytochemistry and nematicidal activity of the essential oils from 8 Greek Lamiaceae aromatic plants and 13 terpene components. *J Agric Food Chem* 58:7856–7863.
- Ntalli NG, Vargiu S, Menkissoglu-Spiroudi U, Caboni P (2010) Nematicidal carboxylic acids and aldehydes from *Melia azedarach* fruits. *J Agric Food Chem* 58:11390–11394.
- Ntalli NG, Ferrari F, Giannakou IO, Menkissoglu-Spiroudi U (2011) Synergistic and antagonistic interactions of terpenes against *Meloidogyne incognita* and nematicidal activity of essential oils from 7 plants indigenous in Greece. *Pest Manag Sci* 67:341–351.
- Ntalli NG, Manconi F, Leonti M, Maxia A, Caboni P (2011) Aliphatic ketones from *Ruta chalepensis* (Rutaceae) induce paralysis on root knot nematodes. *J Agric Food Chem* 59:7098–7103.
- Nusbaum, C. J., Ferris, H. (1973). The role of cropping systems in nematode population management. *Ann. Rev. of Phytopath.* 11, 423-440.
- 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* 90:710–715.
- Olabiyi TI (2008) Pathogenicity study and nematotoxic properties of some plant extracts on the root-knot nematode pest of tomato, *Lycopersicon esculentum* (L.) Mill. *J Plant Pathol* 7:45–49.
- Ornat, C., Sorribas, F. J. (2008). Integrated management of root-knot nematodes in Mediterranean horticultural crops. In: Integrated management and biological control of vegetable and grain crops nematodes. pp. 295-319.
- Ornat, C., Sorribas, F. J., Verdejo-Lucas, S., Galeano, M. (2001). Effect of planting date on development of *Meloidogyne javanica* on lettuce in northeastern Spain. *Nematropica*. 31, 148-149.

- Pandey R (2000) Additive effect of three organic materials and nematicides on the reproduction of *Meloidogyne incognita* and yield of *Mentha arvensis*. *Nematropica* 30:155–160.
- Paracer, S.M., Brzeski, M.W. and Zuckerman, B.M. (1966). Nematophagous and predaceous nematodes associated with cranberry soil in Massachusetts. *Plant Dis. Repr.* 50, 584-586.
- Perez MP, Navas-Corte´s JA, Pascual-Villalobos MJ, Castillo P (2003) Nematicidal activity of essential oils and organic amendments from Asteraceae against root-knot nematodes. *Plant Pathol* 52:395–401.
- Piedra Buena A, Díez-Rojo MA, López-Pérez JA, Robertson L, Escuer M, Bello A (2008) Screening of *Tagetes patula* L. on different populations of *Meloidogyne*. *Crop Prot* 27:96–100.
- Pitcher, R.S. (1965). Interrelationships of nematodes and other pathogens of plant. *Helminth. Abst.* 34, 1-17.
- Ploeg, A. Biofumigation to manage plant-parasitic nematodes. (2008). In A. Ciancio & K.G. Mukerji (eds.), *Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes*. 239-248.
- Powel, N.T. (1971). Interaction of plant parasitic nematodes with other disease-causing agents. In: *Plant parasitic nematodes* (eds): Zuckerman, B.M., Mai, W.F and Rohde, R.A Academic Press. New York and London. Vol. II, 119-135.
- Qamar F, Begum S, Raza SM, Waha A, Siddiqui BS (2005) Nematicidal natural products from the aerial parts of *Lantana camara* Linn. *Nat Prod Res* 19:609–613.
- Raaijmakers, J.M., Paulitz, T.C., Steiberg, C., Alabouvette, C., Moenne-Loccoz, Y. (2009). The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil*. 321, 341-361.

- Rabenhorst, J. (1996). Production of methoxyphenol-type natural aroma chemicals by biotransformation of eugenol with a new *Pseudomonas* sp. *Appl. Microb. And Biotech.* 46, 470-474.
- Roberts, P. A., Thomason, I.J. (1989). A review of variability in four *Meloidogyne* spp. measured by reproduction on several hosts including *Lycopersicon*. *Agric Zool Rev.* 3, 225-252.
- Runia, W. T. (2000). Steaming methods for soils and substrates. *Acta Hort.* 532, 115-123.
- Sasser J.N., (1980). Root-knot nematodes : a global nematode to crop production. *Plant Disease* 64: 36-41.
- Sasser J.N., (1989). *Plant Parasitic Nematodes. The farmer' s Hidden Enemy.* North Carolina State University Graphics.
- Shazukat SS, Siddiqui IA, Ali NI, Ali SA, Khan GH (2003) Nematicidal and allelopathic responses of *Lantana camara* root extract. *Phytopathol Mediterr* 42:71–78.
- Srivastava M, Kapoor A, Sharma S, Siddiqui NU, Aslam M (2006) Microbial active triterpene from *Lantana camara*. *Biosci, Biotechnol Res Asia* 3:505–507.
- Talhok RS, Karam C, Fostok S, El-Jouni W, Barbour EK (2007) Anti-inflammatory bioactivities in plant extracts. *J Med Food* 10:1–10.
- Tesarova, B., Zouhar, M., Rysanek, P. (2003). Development of PCR for specific determination of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Pl Prot Sci.* 39, 23-28.
- Thorne, G. (1961). *Principles of Nematology*, New York, McGraw-Hill Book Co. 553 pp.
- Thoden TC, Boppre´ M, Hallmann J (2009) Effects of pyrrolizidine alkaloids on the performance of plant-parasitic and free-living nematodes. *Pest Manag Sci* 65:823–830.

- Triantaphylloy, A.C. (1960). Sex Determination in *Meloidogyne incognita* Chitwood, 1949 and intersexuality in *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949. *Ann. Inst. Phytopath. Benaki, N. S.* 3, 12-31.
- Trudgill, D.L. (1995). An assessment of the relevance of thermal time relationships to nematology. *Appl Nematol.* 18, 407-417.
- Tzorzakakis, E. A., Phillips, M.S., Thudgill, D. L. (2000). Rotational management of *Meloidogyne javanica* in a small scale greenhouse trial in Crete. Greece. *Nematropica.* 30, 167-175.
- Tzortzakakis, E. A., Verdejo-Lucas, S., Ornat, C., Sorribas, F. J., Goumas, D.E. (1999). Effect of a previous resistant cultivar and *Pasteuria penetrans* on population densities of *Meloidogyne javanica* in greenhouse grown tomatoes in Crete, Greece. *Crop Prot.* 18, 159-162.
- Van Gundy S.D., (1985). Ecology of *Meloidogyne* spp-emphasis on environmental factors affecting survival and pathogenesis. In: *An Advanced Treatise on Meloidogyne. Vol 1: Biology and Control* J.N. Sasser, C.C. Carted (Eds). North Carolina State University Graphics. pp: 177-182.
- Verdejo-Lucas, S., Ornat, C., Sorribas, F.J., Stchiegel, A. (2002). Species of root knot nematodes and fungal egg parasites recovered from vegetables in Almeria and Barcelona, Spain. *J Nematol.* 34, 405-408.
- Vig AP, Rampal G, Thind TS, Arora S (2009) Bio-protective effects of glucosinolates—a review. *LWT Food Sci Technol* 42:1561–1572.
- Vokou D (2007) Allelochemicals, allelopathy and essential oils: a field in search of definitions and structure. *Allelopath J* 19(119):134.
- Wallace, H.R. (1968). The influence of soil moisture on survival and hatch of *Meloidogyne javanica*. *Nematologica.* 14, 231-242.
- Wallace, H.R. (1963). *The biology of plant parasitic nematodes.* Edward Arnold (Publ.) Ltd. 280 pp.
- Walker JT, Melin JB (1996) *Mentha piperita*, *Mentha spicata* and effects of their essential oils on *Meloidogyne* in soils. *J Nematol* 28:629–635.

- Wat CK, Prasad SK, Graham EA, Partington S, Arnason T, Towers GHN, Lam J (1981) Photosensitization of invertebrates by natural polyacetylenes. *Biochem Syst Ecol* 9:59–62.
- Wang Q, Li Y, Handoo Z, Klassen W (2007) Influence of cover crops on populations of soil nematodes. *Nematropica* 37:79–92.
- Wink, M. (2004). Evolution of toxins and antinutritional factors in plants with special emphasis on Leguminosae. In *Poisonous Plants and Related Toxins*, pp. 1–25 T Acamovic, CS Stewart and TW Pennycott. CABI publishing. United Kingdom.
- Xu, J., Liu, P., Meng, Q., and Long, H., (2004). Characterisation of *Meloidogyne* species from China using isoenzyme phenotypes and amplified mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism. *Eur. J. Plant Pathol.* 110, 309-315.
- Zasada IA, Meyer SLF, Morra MJ (2009) Brassicaceous seed meals as soil amendments to suppress the plant-parasitic nematodes *Pratylenchus penetrans* and *Meloidogyne incognita*. *J Nematol* 41:221–227.
- Zasada IA, Weiland JE, Reed RL, Stevens JF (2012) Activity of meadowfoam (*Limnanthes alba*) seed meal glucolimnanthin degradation products against soilborne pathogens. *J Agric Food Chem* 60:339–345.
- Γιαννακού Ι. και Προφήτου – Αθανασιάδου Δ., 2001. Νηματωδολογία, Τμήμα εκδόσεων Πανεπιστημιακό Τυπογραφείο.
- Κοντέα Δ., (2014). Εκτίμηση της αποτελεσματικότητας φυσικής προέλευσης γεωργικών φαρμάκων με νηματωδοκτόνο δράση σε καλλιέργεια τομάτας. Μεταπτυχιακή διατριβή. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Γεωπονικών επιστημών.
- Ντάλλη Ν., (2010). Αντιμετώπιση των ριζόκομβων νηματωδών (*Meloidogyne incognita*) σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες με φυσικά προϊόντα και μελέτη της χημικής σύστασης αυτών. Διδακτορική Διατριβή. Α.Π.Θ.
- Πολυχρονόπουλος Α.Γ. (1970). Οι φυτοпараσιτικοί νηματώδεις σκόληκες. Το πρόβλημα και η οικονομική σημασία αυτού. *Γεωπονικά Τ.* 188-189,93-96.