

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΥΠΟΔΟΜΩΝ &

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ & ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ

Π.Μ.Σ. Επιστήμες & Συστήματα Φυτικής Παραγωγής

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**«ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΚΑΙ ΥΔΡΟΛΥΜΑΤΩΝ ΣΕ ΕΠΙΒΛΑΒΗ
ΕΝΤΟΜΑ ΚΑΙ ΑΚΑΡΕΑ ΚΗΠΕΥΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ»**

ΧΡΥΣΟΒΑΛΑΝΤΗ Κ. ΤΡΑΚΑ

ΑΘΗΝΑ 2015

Επιβλέπων: Διονύσιος Περδίκης, Επίκουρος Καθηγητής

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΥΠΟΔΟΜΩΝ &

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ & ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ

Π.Μ.Σ. Επιστήμες & Συστήματα Φυτικής Παραγωγής

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**«ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΚΑΙ ΥΔΡΟΛΥΜΑΤΩΝ ΣΕ ΕΠΙΒΛΑΒΗ
ΕΝΤΟΜΑ ΚΑΙ ΑΚΑΡΕΑ ΚΗΠΕΥΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ»**

ΧΡΥΣΟΒΑΛΑΝΤΗ Κ. ΤΡΑΚΑ

ΑΘΗΝΑ 2015

Επιβλέπων: Διονύσιος Περδίκης, Επίκουρος Καθηγητής

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**«ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΚΑΙ ΥΔΡΟΛΥΜΑΤΩΝ ΣΕ ΕΠΙΒΛΑΒΗ
ΕΝΤΟΜΑ ΚΑΙ ΑΚΑΡΕΑ ΚΗΠΕΥΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ»**

ΧΡΥΣΟΒΑΛΑΝΤΗ Κ. ΤΡΑΚΑ

Τριμελής Εξεταστική επιτροπή:

Επιβλέπων: Διονύσιος Περδίκης, Επίκουρος Καθηγητής

Μέλη: Μόσχος Πολυσίου, Καθηγητής

Γεώργιος Παπαδούλης, Καθηγητής

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη είχε ως σκοπό: α) την διερεύνηση των ποιοτικών και ποσοτικών χαρακτηριστικών δύο αιθερίων ελαίων και των αντίστοιχων υδρολυμάτων τους, που παραλήφθηκαν με υδροαπόσταξη από τα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά *Ocimum basilicum*, Lamiaceae (βασιλικός) και *Ruta chalepensis*, Rutaceae (απήγανος), β) τον έλεγχο της τοξικής δράσης των αιθερίων ελαίων και των υδρολυμάτων τους, επί των εχθρών κηπευτικών καλλιεργειών *Aphis gossypii* και *Myzus persicae*, (Hemiptera: Aphididae) και *Tetranychus urticae*, (Acari: Tetranychidae) και την επίδραση στο αναπαραγωγικό δυναμικό αυτών, γ) την εκτίμηση της δραστηριότητας των αιθερίων ελαίων στο αναπαραγωγικό δυναμικό των απογόνων των ψεκασμένων αφίδων και δ) την επίδραση των αιθερίων ελαίων στην εκκολαψιμότητα των ωών του τετράνυχου.

Αρχικά, γίνεται αναφορά στους δευτερογενείς μεταβολίτες αιθερίων ελαίων και υδρολυμάτων που προέρχονται από αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά, καθώς και βιβλιογραφική ανασκόπηση του μηχανισμού δράσης τους. Εν συνεχεία, παρατίθενται τα επιλεγμένα για την παρούσα εργασία αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά βασιλικός και απήγανος, τα ταξινομικά τους χαρακτηριστικά και οι διαδεδομένες χρήσεις αυτών. Ακολούθως, αναλύονται οι μέθοδοι παραλαβής, διαχωρισμού και ταυτοποίησης των πτητικών συστατικών των εν λόγω φυτών, ενώ το κεφάλαιο ολοκληρώνεται με τα επιβλαβή έντομα και ακάρεα κηπευτικών καλλιεργειών *A. gossypii*, *M. persicae* και *T. urticae*.

Στο πειραματικό μέρος περιγράφονται η τεχνική της υδροαπόσταξης με την συσκευή Clevenger και ο ποιοτικός προσδιορισμός των προϊόντων αυτής (αιθέρια έλαια, πτητικά συστατικά υδρολυμάτων) με αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών (GC-MS). Ακολουθεί η προετοιμασία των υλικών για τις βιοδοκιμές, η οποία περιλαμβάνει τα φυτικά υλικά, τρυβλία και ειδικές κατασκευές. Επιπρόσθετα, αναλύεται η διεξαγωγή των πειραμάτων από τον συγχρονισμό εντόμων και ακάρεων μέχρι και την διαδικασία των επεμβάσεων. Η βιοδραστηριότητα των αιθερίων ελαίων μελετήθηκε και στους τρεις εχθρούς σε πέντε συγκεντρώσεις: 0.05%, 0.1%, 0.25%, 0.5% και 1% (v/v), ενώ των υδρολυμάτων σε δύο από αυτούς (*A. gossypii* και *T. urticae*), χρησιμοποιώντας τα αυτούσια.

Στα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι το κύριο συστατικό του αιθερίου ελαίου του βασιλικού ήταν η λιναλοόλη (80.0%) και του απήγανου η 2-ενδεκανόνη (72.0%). Το γαλακτώμα του αιθερίου ελαίου του βασιλικού φάνηκε ότι δρα περισσότερο στο *M. persicae* και του απήγανου στο *T. urticae*, ενώ και τα δύο γαλακτώματα είχαν ισχυρή δράση (το ποσοστό θνησιμότητας ήταν παρόμοιο με του εντομοκτόνου που ήταν 100%) επί του *A. gossypii* σε σχέση με τους μάρτυρες. Επίσης, η επίδραση του γαλακτώματος του βασιλικού σε σύγκριση με του απήγανου ήταν εντονότερη στον συνολικό αριθμό των απογόνων και για τα δύο είδη αφίδων και παρόμοια με των εντομοκτόνων σε ορισμένες συγκεντρώσεις. Το αναπαραγωγικό δυναμικό των απογόνων των ψεκασμένων αφίδων δεν διέφερε κατά πολύ σε σχέση με τους μάρτυρες. Ακόμη, αξιολογώντας την επίδραση των δύο ελαίων στην εκκολαψιμότητα των ωών του τετράνυχου, βρέθηκε ότι το έλαιο του απήγανου ήταν ισχυρότερο, μειώνοντας σημαντικά το ποσοστό εκκολαψιμότητας συγκριτικά με τον μάρτυρα.

Όσον αφορά τα υδρολύματα, σημειώθηκε ότι το κύριο συστατικό επί του συνόλου των πτητικών ενώσεων του υδρολύματος του βασιλικού ήταν η λιναλοόλη (66.5%), ενώ του απήγανου η 2-εννεανόνη (77.0%). Η επίδραση των δύο υδρολυμάτων στην επιβίωση και την αναπαραγωγή (συνολικός αριθμός απογόνων) των *A. gossypii* και *T. urticae* παρατηρήθηκε ότι ήταν παρόμοια και το ποσοστό θνησιμότητας υψηλότερο σε σύγκριση με τους μάρτυρες, αλλά μικρότερο σε σχέση με τα εντομοκτόνα.

Συμπερασματικά, η επίδραση των αιθερίων ελαίων ήταν σημαντική και συγκρίσιμη με αυτή των εντομοκτόνων. Αυτό το εύρημα υποδεικνύει ότι θα πρέπει να εξεταστεί περαιτέρω η πιθανή αποτελεσματικότητά τους στην αντιμετώπιση των *A. gossypii*, *M. persicae* και *T. urticae*. Τέλος, στην περίπτωση των υδρολυμάτων φαίνεται ότι θα πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω η επίδρασή τους, για παράδειγμα η πιθανή απωθητική τους δράση.

Επιστημονική περιοχή της εργασίας: Βιολογικές και άλλες μέθοδοι αντιμετώπισης

Λέξεις κλειδιά: αιθέρια έλαια, *Ocimum basilicum*, *Ruta chalepensis*, υδρολύματα, *A. gossypii*, *M. persicae*, *T. urticae*

Effect of essential oils and hydrosols on insect and mite pests of vegetable crops

ABSTRACT

The main objective of the current study was: a) the investigation of qualitative and quantitative characteristics of two essential oils and their corresponding hydrosols, derived from the aromatic and medicinal plants *Ocimum basilicum*, Lamiaceae (basil) and *Ruta chalepensis*, Rutaceae (rue), via hydrodistillation, b) the examination of toxicity of the essential oils and their hydrosols against the vegetable pests *Aphis gossypii* and *Myzus persicae*, (Hemiptera: Aphididae) and *Tetranychus urticae*, (Acari: Tetranychidae) and the effects on their reproductive rate (number of offsprings), c) the estimation of the essential oils effect on the fecundity of the offsprings acquired from the sprayed aphids and d) the evaluation of the essential oils effect on spider mites egg hatchability.

Firstly, secondary metabolites of essential oils and hydrosols derived from aromatic and medicinal plants are mentioned, as well as a literature review on their mode of action. Secondly, the selected plants for this study basil and rue are referred, along with their taxonomic characteristics and traditional uses. Subsequently, the methods applied for the collection, separation and identification of the plant volatile compounds are analyzed, while the chapter ends with the potential damages and other details of the insects and mites of vegetable crops used, *A. gossypii*, *M. persicae* and *T. urticae*.

In the experimental part, the technique of hydrodistillation using Clevenger apparatus and the qualitative analysis of its products with Gas Chromatography- Mass Spectrometry were described. Afterwards, the preparation of the materials used for the bioassays followed, which included plant materials, plates (Petri dishes) and special constructions. Furthermore, the experimental procedure from obtaining insect and mite individuals of the same age (synchronization of the population) until sprays was analyzed. Bioactivity of the essential oils was studied on all three pests in five

concentrations: 0.05%, 0.1%, 0.25%, 0.5% and 1% (v/v), whilst the hydrosols on *A. gossypii* and *T. urticae*, as they were received.

In the results, it was observed that the main constituent of basil oil was linalool (80.0%) and rue's 2-undecanone (72.0%). The emulsion of basil essential oil had a stronger effect on *M. persicae* and rue's on *T. urticae*, but both had significant effect (mortality percentage was similar to the insecticide's, which caused 100% mortality) on *A. gossypii* in comparison with the controls. In addition, the effect of basil oil on fecundity (total number of offsprings) was more intense than rue's for both aphids and similar to the effect of the insecticides in certain concentrations. The reproductive rate of the offsprings of sprayed aphids was not significantly affected. Moreover, the evaluation of both essential oils effect on spider mites egg hatchability showed that rue oil was more efficient than basil's on reducing the hatchability percentage significantly, in comparison to the control.

As far as hydrosols are concerned, the main constituent of basil hydrosol was linalool (66.5%) and rue's 2-nonanone (77.0%). The effect of both hydrosols on the survival and fecundity of *A. gossypii* and *T. urticae* was similar and the mortality percentage was higher than the controls, but lesser than the pesticides.

Consequently, the effects of both essential oils were significant and similar to those the pesticides had. This finding suggests that further studies should be conducted to assess their efficacy or possible use in the control of *A. gossypii*, *M. persicae* and *T. urticae*. In the case of the hydrosols, more research should be done as well, in order to investigate their potential in pest control, for example their possible repellent activity.

Scientific region of the assay: Biological control and other control methods

Key words: essential oils, *Ocimum basilicum*, *Ruta chalepensis*, hydrosols, *A. gossypii*, *M. persicae*, *T. urticae*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη με θέμα “Επίδραση αιθερίων ελαίων και υδρολυμάτων σε επιβλαβή έντομα και ακάρεα κηπευτικών καλλιεργειών” πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γεωργικής Ζωολογίας και Εντομολογίας καθώς και στο Εργαστήριο Χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής της Σχολής Αγροτικής Παραγωγής, Υποδομών και Περιβάλλοντος με τίτλο “Επιστήμες και Συστήματα Φυτικής Παραγωγής”.

Η ανάθεση του θέματος έγινε από τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Διονύσιο Περδίκη, στον οποίο θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες για την δυνατότητα που μου χάρισε να ασχοληθώ με την παρούσα εργασία και την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου. Η επιστημονική του καθοδήγηση καθώς και οι συνεχείς υποδείξεις του, κατά την διάρκεια διεξαγωγής της μελέτης συνέβαλαν καθοριστικά στην ολοκλήρωση του πονήματος.

Εν συνεχεία, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Καθηγητή κ. Μόσχο Πολυσιού για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε σχετικά με την εκπόνηση της παρούσας μελέτης, την συνεργασία του, την διαρκή καθοδήγησή του καθώς και τις πολύτιμες συμβουλές του.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Γεώργιο Παπαδούλη για την συμμετοχή του στην Τριμελή Εξεταστική Επιτροπή και τις διορθώσεις του όσον αφορά την μεταπτυχιακή μου μελέτη.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω ειλικρινά τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Παναγιώτη Τρίγκα για την αναγνώριση φυτικών δειγμάτων και την παροχή πληροφοριών για τα φυτικά είδη που πραγματεύεται η εργασία.

Οφείλω, έπειτα, να ευχαριστήσω την Ερευνήτρια Γ΄ του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου κ. Ελευθερία Καπαξίδη για τις χρήσιμες υποδείξεις της σε θέματα που αφορούσαν τις ειδικές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Ευχαριστώ θερμά τον υποψήφιο Διδάκτορα κ. Ελευθέριο Πετράκη, για την ιδιαίτερη συμβολή του στην πειραματική διαδικασία της εργασίας, τις διορθώσεις του επί του κειμένου, την υποστήριξή του και την άριστη συνεργασία που είχαμε.

Ακολούθως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους Διδάκτορες κ. Κωνσταντίνα Αρβανίτη και κ. Θεόδωρο Σταθάκη καθώς και την Δρ Ιωάννα Λύτρα για την έμπρακτη βοήθειά τους, την δημιουργία ευχάριστου κλίματος και την ηθική τους συμπαράσταση κατά την διεξαγωγή της παρούσας μελέτης.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα την οικογένειά μου για την ενθάρρυνση και αμέριστη υποστήριξή της καθ'όλη την διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|--|----|
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 4 |
| 1. Δευτερογενείς Μεταβολίτες από Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά | 4 |
| 1.1 Ιστορική Αναδρομή | 4 |
| 1.2 Αιθέρια Έλαια | 5 |
| 1.3 Υδρολύματα | 6 |
| 1.4 Μηχανισμός Δράσης | 6 |
| 2. Επιλεγμένα Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά | 7 |
| 2.1 Περιγραφή Φυτικών Υλικών | 8 |
| 2.1.1 <i>Ocimum basilicum</i> L., Βασιλικός | 8 |
| 2.1.2 <i>Ruta chalepensis</i> L., Απήγανος | 10 |
| 2.2 Διαδεδομένες Χρήσεις | 12 |
| 3. Παραλαβή, Διαχωρισμός και Ταυτοποίηση των Πτητικών Συστατικών των Αρωματικών Φυτών | 14 |
| 3.1 Παραλαβή Πτητικών Συστατικών..... | 14 |
| 3.1.1 Κλασική Υδροαπόσταξη | 15 |
| 3.2 Διαχωρισμός και Ταυτοποίηση των Συστατικών | 17 |
| 3.2.1 Αέρια Χρωματογραφία | 18 |
| 3.2.2 Φασματομετρία Μαζών | 22 |
| 4. Επιβλαβή Έντομα και Ακάρεα Κηπευτικών Καλλιεργειών | 26 |
| 4.1 Η Αφίδα <i>Aphis gossypii</i> Glover (Hemiptera: Aphididae) | 26 |

| | | |
|--------------------------------|--|-----------|
| 4.1.1 | Μορφολογικά Χαρακτηριστικά | 26 |
| 4.1.2 | Βιολογία-Οικολογία | 27 |
| 4.1.3 | Ζημιογόνος Δράση | 27 |
| 4.2 | Η Αφίδα <i>Myzus persicae</i> (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) | 28 |
| 4.2.1 | Μορφολογικά Χαρακτηριστικά | 28 |
| 4.2.2 | Βιολογία-Οικολογία | 29 |
| 4.2.3 | Ζημιογόνος Δράση | 29 |
| 4.3 | Το Άκαρι <i>Tetranychus urticae</i> Koch (Prostigmata: Tetranychidae)..... | 29 |
| 4.3.1 | Μορφολογικά Χαρακτηριστικά | 30 |
| 4.3.2 | Βιολογία-Οικολογία | 31 |
| 4.3.3 | Ζημιογόνος Δράση | 31 |
| 4.4 | Σκοπός της Μελέτης | 32 |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | | 33 |
| 5. | Υλικά και Μέθοδοι | 33 |
| 5.1. | Φυτικά Υλικά και Μέθοδοι Απομόνωσης, Διαχωρισμού και Ταυτοποίησης των Συστατικών | 33 |
| 5.1.1 | Φυτικά Υλικά | 33 |
| 5.1.2 | Μεθοδολογία Υδροαπόσταξης | 34 |
| 5.1.3 | Διαχωρισμός και Ταυτοποίηση Συστατικών με GC-MS..... | 37 |
| 5.2 | Προετοιμασία Υλικών για τις Βιολογικές Δοκιμές | 38 |
| 5.2.1 | Ανάπτυξη του Φυτικού Υλικού | 38 |
| 5.2.2 | Διατήρηση των Φυτών | 39 |
| 5.2.3 | Εκτροφή των <i>A. gossypii</i> , <i>M. persicae</i> και <i>T. urticae</i> | 40 |

| | |
|---|-----------|
| 5.2.4 Ατομικοί Κλωβοί | 43 |
| 5.2.5 Τρυβλία και Ειδικές Κατασκευές | 43 |
| 5.3 Διεξαγωγή Πειραμάτων | 45 |
| 5.3.1 Συγχρονισμός Ενήλικων Εντόμων και Ακάρων | 46 |
| 5.3.2 Παρασκευή Γαλακτωμάτων | 47 |
| 5.3.3 Προετοιμασία Υδρολυμάτων | 48 |
| 5.3.4 Διαδικασία Επεμβάσεων | 49 |
| 5.4 Στατιστική Ανάλυση Αποτελεσμάτων | 53 |
| ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 54 |
| 6.1 Απόδοση σε Αιθέριο Έλαιο | 54 |
| 6.2 Συγκέντρωση Υδρολυμάτων σε Πτητικά Συστατικά | 54 |
| 6.3 Αποτελέσματα GC-MS | 54 |
| 6.3.1 Χημική Σύσταση Αιθερίου Ελαίου και Υδρολύματος Βασιλικού | 55 |
| 6.3.2 Χημική Σύσταση Αιθερίου Ελαίου και Υδρολύματος Απήγανου | 58 |
| 6.4 Αποτελέσματα Βιοδοκιμών | 62 |
| 6.4.1 Βιοδοκιμές με Αιθέρια Έλαια | 62 |
| 6.4.2 Βιοδοκιμές με Υδρολύματα | 86 |
| ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 92 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 99 |

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Δευτερογενείς μεταβολίτες από αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά

1.1 Ιστορική αναδρομή

Ανάμεσα στα είδη που ανήκουν στο βασίλειο των φυτών υπάρχει μία μεγάλη κατηγορία που κατέχει παραδοσιακά εξέχουσα θέση για ποικίλες χρήσεις από τον άνθρωπο, τα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά (Α.Φ.Φ). Η θέση τους αυτή έγκειται στην παρουσία δευτερογενών μεταβολιτών, όπως τα αιθέρια έλαια και οι φαινολικές ενώσεις με γνωστές θεραπευτικές ιδιότητες (Lubbe & Verpoorte, 2011; Regnault-Roger & Philogéne, 2008).

Οι πρώτες μαρτυρίες τους για τις χρήσεις τους ως φάρμακα προέρχονται από τους Σουμέριους και Ακκάδιους (3η χιλιετία π. Χ.) (Gunnar Samuelson, 2004). Αργότερα οι Αιγύπτιοι χρησιμοποίησαν μεγάλο αριθμό δρογών όπως το αραβικό κόμμα (Σκρουμπής, 1985), ενώ οι αρχαίοι Έλληνες με την μελέτη του Ιπποκράτη μάθαιναν για τις θεραπευτικές ιδιότητες των βοτάνων (Pollio *et al.*, 2008).

Η πρώτη όμως αυθεντική περιγραφή απόσταξης αιθερίων ελαίων ανήκει στον Καταλανό γιατρό Arnaldus de Villanova (1235-1311 μ. Χ.) (Gerwing, 2011), ο οποίος θεωρείται ότι εισήγαγε στην Ευρώπη την τεχνική της απόσταξης στο πλαίσιο της διαγνωστικής θεραπείας. Ενώ αργότερα την επανάσταση έφερε ο Lavoisier τον 18^ο αιώνα, ο οποίος μελέτησε την φυσική και χημική σύσταση των αιθερίων ελαίων (Σκρουμπής, 1985).

Στην σημερινή εποχή εκτός από τις φαρμακευτικές ιδιότητες, το ενδιαφέρον στρέφεται και προς τους δευτερογενείς μεταβολίτες (πηκτικά συστατικά) που συσσωρεύονται στους διάφορους ιστούς και κάνουν ικανά τα φυτά στην προσέλκυση ωφέλιμων εντόμων επικονιαστών, στην απόθεση άλλων που θεωρούνται εχθροί των καλλιεργειών, στην προστασία από τα φυτοφάγα ζώα και την απώλεια υγρασίας (Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010).

1.2 Αιθέρια έλαια

Τα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά φέρουν χαρακτηριστική οσμή, που οφείλεται στα πτητικά συστατικά των αιθερίων ελαίων, τα οποία υπάρχουν στις εκκριτικές δομές (ειδικά κύτταρα, αδένες ή αγωγοί) διαφόρων μερών των φυτών όπως φύλλα, άνθη, καρπούς, βλαστούς ακόμα και ρίζες (Κουκ, 2003). Η χημική τους σύσταση ποικίλλει και είναι περίπλοκη.

Τα επιμέρους συστατικά των αιθερίων ελαίων μπορεί να απαρτίζονται από ουσίες μικρού μοριακού βάρους όπως:

- α) Υδρογονάνθρακες και ειδικότερα μονοτερπένια (C10) και σесκιτερπένια (C15) και
- β) Οξυγονούχα παράγωγα τερπενίων όπως αλκοόλες, κετόνες, φαινόλες, φαινολικοί αιθέρες και αλδεΐδες.

Με τον όρο τερπένια θεωρούνται η σειρά ή οι σειρές ισομερών ακόρεστων υδρογονανθράκων του τύπου $C_{10}H_{16}$ και είναι προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού.

Κατά την διαδικασία βιοσύνθεσης των αιθερίων ελαίων, η οποία δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί, διάφορες θεωρίες και υποθέσεις έχουν προταθεί. Επικρατέστερη είναι αυτή του 'βιογενετικού κανόνα του ισοπρενίου' (Ruzicka *et al.*, 1953) στην οποία μέσω της φωτοσύνθεσης πρόδρομες ενώσεις του ισοπρενίου, με κύριο το μεβαλονικό οξύ, ακολουθώντας διάφορες μεταβολικές οδούς σχηματίζουν τις ενώσεις από τις οποίες αργότερα απαρτίζονται τα αιθέρια έλαια (Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010).

Εκτός από τον τρόπο σχηματισμού των ενώσεων αυτών, σημαντικό ρόλο στην σύσταση των αιθερίων ελαίων στο φυτό διαδραματίζουν και οι εξής παράγοντες (Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010; Σκρουμπής, 1985; Regnault-Roger, 2013) :

- α) ο γενετικός παράγοντας: είδος, ποικιλία κλπ.,
- β) το μέρος του φυτού: υπάρχει διακύμανση μεταξύ των ιστών,
- γ) το στάδιο ανάπτυξης ή οντογένεσης του φυτού: στάδιο ανθοφορίας, σποροποίησης κλπ.,
- δ) φως και φωτοπερίοδος: αύξηση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας ευνοεί την βιοσύνθεση τερπενίων,
- ε) έδαφος: παρουσία μικροοργανισμών, διακύμανση pH, θρεπτικά στοιχεία,
- στ) θερμοκρασία, διαθεσιμότητα νερού, υψόμετρο και λίπανση.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι ο παράγοντας της τεχνικής και της τεχνολογίας που ακολουθείται για την παραλαβή αιθερίων ελαίων συμβάλλει στην διαφοροποίηση της σύστασης των τελικών προϊόντων και θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη.

1.3 Υδρολύματα

Στα υδρολύματα η συγκέντρωση του αιθερίου ελαίου που υπάρχει σε αυτά είναι της τάξης του 0.02% κ. ό. περίπου, ενώ ενδέχεται να φθάσει το 7% της συνολικής απόδοσης σε αιθέριο έλαιο. Αιωρούμενα μικροσωματίδια απομακρύνονται από τα έλαια και εμπίπτουν στα υδρολύματα. Από χημικής πλευράς τα τελευταία αποτελούνται από οξυγονούχα πτητικά συστατικά που είναι πιο υδρόφιλα σε σχέση με τους μονοτερπενικούς ή σесκιτερπενικούς υδρογονάνθρακες, που απουσιάζουν. Οι πιο υδρόφιλες αυτές ενώσεις προκύπτουν μέσω της υδρόλυσης των εστέρων, του πολυμερισμού των αλδεΐδων και της διάσπασης διαφόρων άλλων ενώσεων (Rajeswara-Rao *et al.*, 2002; Schorr, 2004).

1.4 Μηχανισμός δράσης

Τις τελευταίες δεκαετίες γίνεται επισταμένη μελέτη της επίδρασης των αιθερίων ελαίων και υδρολυμάτων εναντίον διαφόρων εχθρών καλλιεργειών. Λίγες όμως, παραμένουν οι έρευνες που αφορούν την κατανόηση του μηχανισμού δράσης αυτών. Τα περισσότερα παραδείγματα επικεντρώνονται στην τοξική επίδραση που φέρουν τα τελευταία στην επιβίωση και συμπεριφορά των εντόμων (Regnault-Roger, 1997).

Συγκεκριμένα, τα αιθέρια έλαια λόγω της λιποφιλικής σύστασής τους, έχουν την ικανότητα να δημιουργούν μια λεπτή επιφάνεια (‘φιλμ’) επάνω στον εξωσκελετό (cuticula) των εντόμων τροποποιώντας τις φυσιολογικές λειτουργίες του (Regnault-Roger, 1997). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η είσοδος του αέρα και άλλων ουσιών εντός του σώματος τους με αποτέλεσμα να μην λειτουργεί το αναπνευστικό τους σύστημα. Εκτός όμως από τις φυσικές ιδιότητες των ελαίων, στον μηχανισμό δράσης διαδραματίζουν ρόλο και οι χημικές ιδιότητες τους.

Τα πτητικά συστατικά των αιθερίων ελαίων και κυρίως τα τερπένια (μονοτερπένια) φαίνεται ότι δρουν ανασταλτικά στοχεύοντας το νευρικό σύστημα των εντόμων (Isman, 2000). Κάποια από αυτά λειτουργούν ως νευροτοξίνες και παρεμποδίζουν την μετάδοση των νευρικών σημάτων (Shaaya & Rafaeli, 2007). Δύο τρόποι έχουν διατυπωθεί, α) με την αναστρέψιμη παρεμπόδιση του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης (López & Pascual-Villalobos, 2010) και β) με την διακοπή της λειτουργίας των GABA υποδοχέων (συνάψεων) αυξάνοντας την συγκέντρωση του cAMP μέσω των διαύλων ιόντων χλωρίου (Cl⁻), προκαλώντας υποθανατηφόρα επίδραση (Rattan, 2010).

Επίσης, τα μονοτερπένια, λόγω της πτητικότητάς τους, δύναται να συνδέονται με διάφορες οικογένειες πρωτεϊνών. Λόγω του μικρού μεγέθους των μορίων τους μπορούν να εμπλέκονται στην μετάδοση αερομεταφερόμενων σημάτων από τα φυτά στα έντομα. Τα δεύτερα αντιλαμβάνονται (μέσω των χημειοανιχνευτών) τις διάφορες κατηγορίες των αρωμάτων που ελευθερώνονται και αποκρίνονται ανάλογα με την ουσία, θεωρώντας ότι το ερέθισμα που λαμβάνουν προέρχεται από το φυτό (Regnault-Roger, 2013).

Από όλα τα παραπάνω συνεπάγεται ότι η εντομοκτόνος δράση των τερπενίων (κυρίως μονοτερπενίων) και επομένως των αιθερίων ελαίων αλλά και των υδρολυμάτων, είναι το αποτέλεσμα πολλών μηχανισμών που επηρεάζουν τους κυτταρικούς ιστούς και την φυσιολογική λειτουργία των εντόμων.

2. Επιλεγμένα Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά

Οι πιο σημαντικές οικογένειες από τις οποίες παραλαμβάνονται αιθέρια έλαια, είναι οι: Asteraceae, Apiaceae, Cupressaceae, Geraniaceae, Graminae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Oleaceae, Pinaceae, Piperaceae, Rosaceae και Rutaceae (Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010). Αυτές όμως που κατέχουν εξαιρετική αφθονία σε αιθέρια έλαια είναι οι Apiaceae, Cupressaceae, Lamiaceae, Pinaceae, Myrtaceae και Rutaceae (Regnault-Roger, 1997). Τα έλαια των Lamiaceae και Geraniaceae είναι επιφανειακά ενώ τα περισσότερα των υπολοίπων υποδόρια, σύμφωνα με τον Denny (2001) ο οποίος κατατάσσει τις εκκριτικές δομές τους σε αυτές τις δύο κατηγορίες.

Στην παρούσα μελέτη θα αναλυθούν δύο φυτικά είδη που ανήκουν στις οικογένειες Lamiaceae και Rutaceae αντίστοιχα.

2.1 Περιγραφή φυτικών υλικών

Η οικογένεια Lamiaceae, Χειλανθή περιλαμβάνει ποώδη μονοετή ή πολυετή φυτά, θαμνώδη ή ημιθαμνώδη με αρωματικά φύλλα και σπάνια δένδρα ή αναρριχώμενα (Στεφανάκη-Νικηφοράκη, 1999b). Τα φύλλα τους είναι πλούσια σε αδένες που εκκρίνουν αιθέριο έλαιο. Αρωματικά, μελισσοκομικά και αρτυματικά φυτά περιλαμβάνονται σε αυτήν την οικογένεια, τα οποία είναι πλούσια σε έλαια αλκοολικής, φαινολικής, τερπενικής, κετονικής ή αλδεϋδικής σύστασης (Στεφανάκη-Νικηφοράκη, 1999a). Χρησιμοποιούνται ως στομαχικά, αντισπασμωδικά, αντινευρικά, διουρητικά ή καθαρτικά. Ανάμεσα στα 200 γένη που απαρτίζουν την οικογένεια, ταξινομούνται 3.200 είδη περίπου κοσμοπολιτικής εξάπλωσης με επίκεντρο την περιοχή της Μεσογείου. Αντιπροσωπευτικά γένη για την Ελλάδα είναι τα *Lavandula*, *Melissa*, *Mentha*, *Ocimum*, *Origanum*, *Rosmarinus* κ.α.

Η οικογένεια Rutaceae, Ρουτίδες περιλαμβάνει κυρίως ξυλώδη φυτά και σπάνια ποώδη (Στεφανάκη-Νικηφοράκη, 1999b). Τα φυτά είναι πλούσια σε λυσιγενείς εκκριματοφόρους κοιλότητες που περιέχουν αιθέρια έλαια έντονης οσμής και πολλές φορές διακρίνονται πάνω στα φύλλα ή τους καρπούς ως διαφανή στίγματα (Στεφανάκη-Νικηφοράκη, 1999a). Χρησιμοποιούνται στην αρωματοποιία, φαρμακευτική, κοσμητολογία και πολλά εξ'αυτών καλλιεργούνται ως γεωργικά και βιομηχανικά (Καββαδάς, 1956). Η οικογένεια περιλαμβάνει 150 γένη με 1.500 περίπου είδη, ιθαγενή των θερμών περιοχών της Ευρώπης, Αμερικής, Βορείου Αφρικής και Αυστραλίας. Στην Ελλάδα αντιπροσωπευτικά γένη είναι τα *Dictamnus*, *Harpophyllum*, *Ruta* και το καλλιεργούμενο *Citrus*.

2.1.1 *Ocimum basilicum* L., Βασιλικός

Το *Ocimum basilicum* L., κοινώς Βασιλικός, ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae. Το είδος αυτό καλλιεργείται από την αρχαιότητα στην Ινδία και πιθανότατα κατάγεται από την τροπική και υποτροπική ζώνη της Αφρικής και της

Ασίας (Κουτσός, 2006). Σήμερα καλλιεργείται σε πολλές ασιατικές και μεσογειακές χώρες μεταξύ των οποίων η Γαλλία, Ιταλία και το Ισραήλ (Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010).

Ο βασιλικός παρουσιάζει έντονο πολυμορφισμό που καθιστά την βοτανική του ταξινόμηση δύσκολη. Για τον λόγο αυτό ο διαχωρισμός του σε ποικιλίες γίνεται με βάση τα κύρια συστατικά των αιθερίων ελαίων (χημειότυποι). Επομένως, το είδος *O. basilicum* κατατάσσεται σε 4 τύπους βάσει χημειοταξινόμησης: α) τον Ευρωπαϊκό (γλυκός βασιλικός, πλατύφυλλος, Genovese) με κύριο συστατικό την λιναλοόλη και την μεθυλοκαβικόλη (Ευρώπη, Αμερική κ.α.), β) τον Reunion με κύριο συστατικό την μεθυλοκαβικόλη (Κομόρες, Μαδαγασκάρη κ.α.), γ) τον Τροπικό με κύριο συστατικό το methyl cinnamate (Ινδία, Πακιστάν κ.α.) και δ) τον Java με κύριο συστατικό την ευγενόλη (Ρωσία, Μαρόκο κ.α.) (Marotti *et al.*, 1996; Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010). Στην παρούσα εργασία μελετάται ο Ευρωπαϊκός τύπος, ο οποίος περιγράφεται ως ακολούθως.

Είναι ετήσιο ποώδες φυτό, ύψους 40-70cm, με φύλλα αντίθετα ωοειδή ανοιχτού πράσινου χρώματος, άνθη μικρά συνήθως λευκά σε μακρείς στάχεις ή κορυφαίους κορύμβους και καρπό τετραχαίνιο (Στεφανάκη-Νικηφοράκη, 1999b) (Εικ. 1 α, β). Ευδοκίμει σε μέσης σύστασης, καλώς στραγγιζόμενα και αεριζόμενα εδάφη, πλούσια σε οργανική ουσία και με επαρκή ηλιακή έκθεση (Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010). Πολλαπλασιάζεται κυρίως με σπόρο και λιγότερο με θερινά μοσχεύματα και ανθίζει από Ιούνιο έως Ιούλιο (Κουτσός, 2006).



α)



β)

Εικόνα 1. *O. basilicum* α) Αγροτεμάχιο με καλλιέργεια βασιλικού, β) Φυτό βασιλικού
(Πηγή: Πετράκης Ελευθέριος)

Το φυτό καλλιεργείται για όλο το υπέργειο μέρος του, όταν όμως προορίζεται για ξηρή δρόγη ή/και ακολούθως για παραλαβή αιθερίου ελαίου, η συλλογή των φύλλων γίνεται πριν την ανθοφορία. Η απόδοση του βασιλικού σε αιθέριο έλαιο σύμφωνα με την βιβλιογραφία κυμαίνεται στο 0.7% και συγκεκριμένα του πλατύφυλλου βασιλικού μπορεί να φθάσει το 1% σε εργαστηριακό επίπεδο (Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010; Κουτσός, 2006).

2.1.2 *Ruta chalepensis* L., Απήγανος

Το *Ruta chalepensis* L., κοινώς Απήγανος, ανήκει στην οικογένεια Rutaceae. Είναι φυτό γνωστό από την αρχαιότητα. Αναφέρεται ότι χρησιμοποιούταν στις θεραπευτικές πρακτικές του Ιπποκράτη (Pollio *et al.*, 2008) και κατά τον Πλίνιο απέδιδαν σε αυτό και άλλες μυστηριώδεις ιδιότητες· θεωρούταν εμμηναγωγό, διουρητικό και χορηγούταν ως αντίδοτο για διάφορα δηλητήρια καθώς και κατά των επιδημιών (Σπύρου, 1984).

Είναι πολυετής πόα. Έχει βλαστό όρθιο, λείο, γλαυκού χρώματος, ύψους 30-80cm, φύλλα βραχύμισχα διπλά πτεροσχιδή, άνθη κίτρινα σε ακραίους κορύμβους και καρπό κάψα (Tutin *et al.*, 1968) (Εικ. 2, 3). Αυτοφύεται σε ξηρές, βραχώδεις τοποθεσίες της Ευρώπης, της Μικράς Ασίας και σε περιοχές που βρέχονται από την Μεσογειακή λεκάνη και δύναται να βρεθεί μέχρι τα 2.300m υψόμετρο (A guide to medicinal plants, 2005). Στην Ελλάδα φύεται κυρίως στα νότια (Καββαδάς, 1956). Ευδοκμεί σε ασβεστούχα εδάφη, πτωχά έως μέτριας γονιμότητας καθώς και σε ξηρικά ή αμμώδη (Σκρουμπής, 1990).



Εικόνα 2. Ταξιανθία *R. chalepensis*
(Πηγή: Τράκα Χρυσοβαλάντη)



Εικόνα 3. Φυτό *R. chalepensis*

Πολλαπλασιάζεται με σπόρο την άνοιξη και με μοσχεύματα το καλοκαίρι (A guide to medicinal plants, 2005). Ανθίζει από Απρίλιο έως Αύγουστο (Σκρουμπής, 1990). Τα υπέργεια τμήματα που χρησιμοποιούνται είναι τα φύλλα, άνθη και οι βλαστοί και συλλέγονται όταν το φυτό βρίσκεται σε πλήρη άνθιση, ενώ μπορούν να χρησιμοποιηθούν και οι ρίζες. Από βιβλιογραφικές αναφορές η απόδοση του απήγανου σε αιθέριο έλαιο κυμαίνεται από 0.27% έως και 5.5% (Dob *et al.*, 2008; Mejri *et al.*, 2010; Zellagui *et al.*, 2012).

2.2 Διαδεδομένες χρήσεις

Ο βασιλικός χρησιμοποιείται κυρίως ως άρτυμα στην μαγειρική και την ζαχαροπλαστική. Άλλες χρήσεις του είναι: ως βελτιωτικό γεύσης, καλλυντικό, σε προϊόντα υγιεινής και ακόμη στην αρωματοποιία και ποτοποιία (Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010; Κουτσός, 2006). Εκτός όμως από τα παραπάνω, το αιθέριο έλαιο του βασιλικού έχει αντιμικροβιακές, αντιμυκητικές και εντομοαπωθητικές ιδιότητες (Hiltunen, 1999).

Όσον αφορά τον απήγανο από την αρχαιότητα έως σήμερα χρησιμοποιείται ως φαρμακευτικό φυτό και πολύ λιγότερο ως καλλωπιστικό (Mansour *et al.*, 1990). Επίσης, σε πρόσφατες έρευνες έχει βρεθεί ότι δρα ως εντομοκτόνο σε έντομα αποθηκών, ότι προκαλεί παράλυση σε φυτοпараσιτικούς νηματώδεις και ότι δύναται να χρησιμοποιηθεί ως φυσικό αντιοξειδωτικό για τον άνθρωπο (Jeon *et al.*, 2013; Ntalli *et al.*, 2011; Fakhfakh *et al.*, 2012).

Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται οι χρήσεις του βασιλικού και του απήγανου στην παραδοσιακή ιατρική (Craker & Simon, 1986; Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010; Κουτσός, 2006; Hiltunen, 1999).

Πίνακας 1. Χρήσεις βασιλικού και απήγανου στην παραδοσιακή ιατρική

| Επιστημονική ονομασία | Θεραπευτικές ενδείξεις για | Μέρος του φυτού | Προετοιμασία και χρήση |
|-------------------------|----------------------------------|--|--|
| <i>Ocimum basilicum</i> | Διαταραχές γαστρεντερικού | Βότανο | Αφέψημα σε μίγμα με άλλες δρόγες |
| | Ναυτία | Φύλλα | Κατανάλωση αφεψήματος |
| <i>Ruta chalepensis</i> | Πληγές | Φύλλα | Αφέψημα και πλύση περιοχής |
| | Δάγκωμα φιδιού | Φύλλα | Κατανάλωση αφεψήματος |
| | Ψείρες του κεφαλιού | Φύλλα | Ξέπλυμα του κεφαλιού με αφέψημα |
| | Κακή κυκλοφορία αίματος | Βότανο | Κατανάλωση αφεψήματος |
| | Βήχας | Φύλλα | Σκόνη με χαμομήλι σε επιδέσμους γύρω από το στήθος |
| | Ασθμα | Φύλλα | Αφέψημα με φύλλα Δάφνης Βράσιμο σε λάδι & εντριβή |
| | Γαστρικούς πόνους | Φύλλα | Κατανάλωση αφεψήματος |
| | Πόνοι στα ότια | Φύλλα | Βράσιμο και εφαρμογή ατμού στα ότια |
| | Καταπονημένοι οφθαλμοί | Φύλλα | Κρύα κομπρέσα εμβαπτισμένη σε αφέψημα |
| | Πυρετός και πονοκέφαλοι | Φύλλα | Κατανάλωση αφεψήματος Με λάδι & εντριβή μέτωπο |
| | Ρευματισμοί | Φύλλα | Σύνθλιψη με ελαιόλαδο & μαλάξεις στις αρθρώσεις |
| | Πέτρες στα νεφρά | Φύλλα | Κατανάλωση αφεψήματος |
| | Τοπική παράλυση | Ρίζες | Επίδεσμοι με συνθλιμμένες ρίζες |
| | | Φύλλα | Συνθλιμμένα φύλλα με ελαιόλαδο και μαλάξεις |
| Παραφροσύνη | Φύλλα | Ξηρά φύλλα με γάλα & εφαρμογή στο κεφάλι | |

3. Παραλαβή, διαχωρισμός και ταυτοποίηση των πτητικών συστατικών των αρωματικών φυτών

Κατά την μελέτη των φυσικών προϊόντων λαμβάνει χώρα μία σειρά διεργασιών από τις οποίες η επιλογή και η ταξινόμηση του βιολογικού είδους, που στην παρούσα εργασία απαρτίζεται μόνο από φυτικά είδη, αποτελούν τα πρωταρχικά βήματα. Ακολουθεί η συλλογή των δειγμάτων και έπειτα η συντήρησή τους, εάν αυτά δεν χρησιμοποιηθούν νωπά ως έχουν. Η συντήρηση επιτυγχάνεται μέσω της ξήρανσης με τις εξής τεχνικές: με έκθεση του δείγματος στον αέρα, με θέρμανση σε ξηραντήρα ή με λυοφιλίωση (κρυοαφυδάτωση). Με το μετασυλλεκτικό στάδιο αυτό περιορίζονται οι ενζυμικές διεργασίες που γίνονται στο υδατικό περιβάλλον των φυτικών ιστών και που οδηγούν στην υποβάθμιση των χαρακτηριστικών τους. Τα επόμενα στάδια που ακολουθούν περιλαμβάνουν την παραλαβή των υπό μελέτη δευτερογενών μεταβολιτών, που συνιστούν τα αιθέρια έλαια και τα αντίστοιχα υδρολύματα, την απομόνωση ή διαχωρισμός των δραστικών ουσιών και τέλος, την ταυτοποίηση της δομής των εν λόγω ουσιών (Πολυσίου & Ταραντίλης, 2008).

3.1 Παραλαβή πτητικών συστατικών

Η παραλαβή των συστατικών από το φυτικό υλικό επιτυγχάνεται με τεχνικές απόσταξης και εκχύλισης. Οι μέθοδοι παραλαβής και οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται σε κάθε περίπτωση εξαρτώνται από το φυτικό δείγμα και το είδος των συστατικών που πρόκειται να απομονωθούν. Για συστατικά μεγάλου μοριακού βάρους ακολουθούνται τεχνικές εκχύλισης, ενώ για πτητικά συστατικά μικρού μοριακού βάρους τεχνικές απόσταξης (Πολυσίου & Ταραντίλης, 2008).

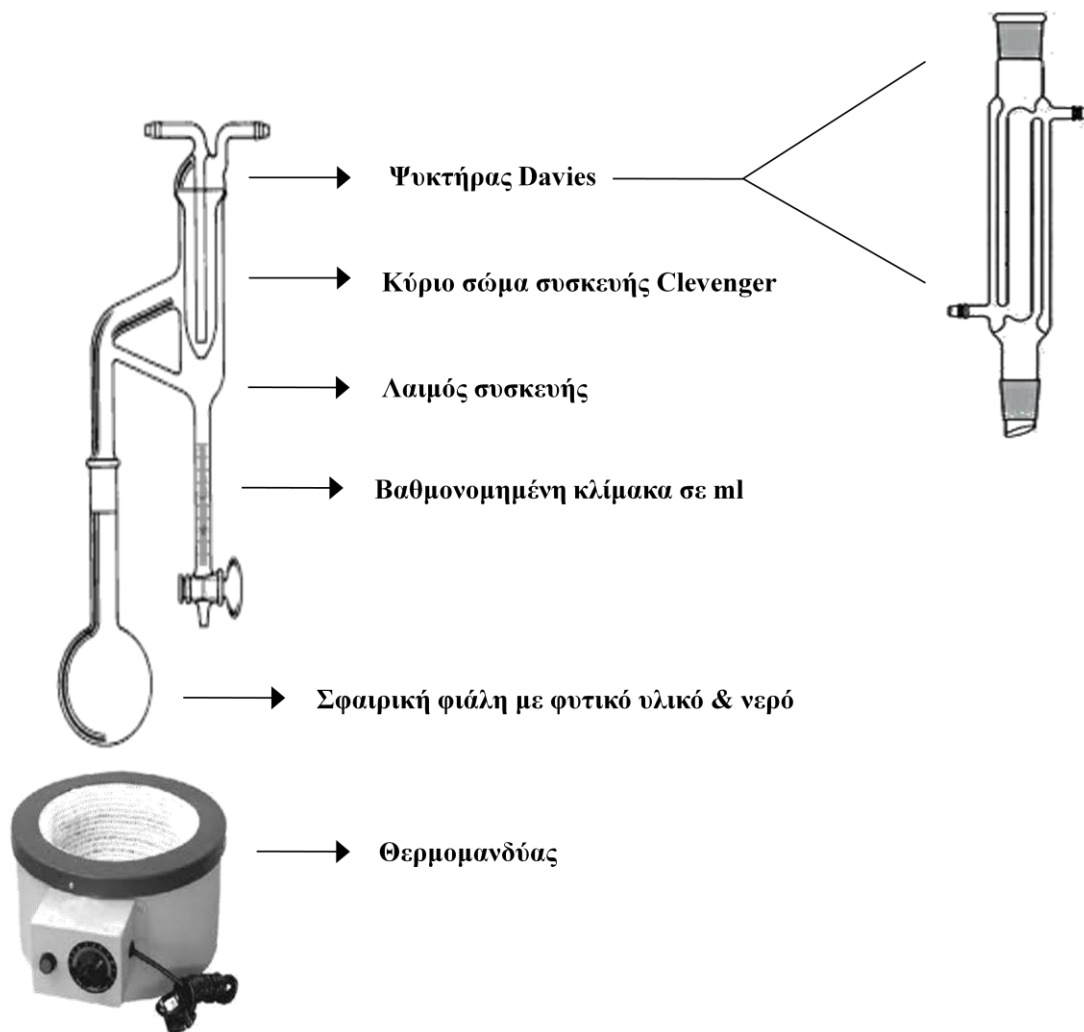
Η παραλαβή πτητικών συστατικών γίνεται, κυρίως, με τις εξής μεθόδους:

- ❖ Απόσταξη με υδρατμούς (**Steam Distillation, SD**) ή Υδροαπόσταξη (**Hydro Distillation, HD**)
- ❖ Μικρο-απόσταξη με υδρατμούς - εκχύλιση με οργανικό διαλύτη (**Micro- Steam Distillation Extraction, MSDE**)
- ❖ Παραλαβή από τον χώρο πάνω από το φυτό (**Head Space, HS**)
- ❖ Απόσταξη με κενό (**Vacuum Head Space Distillation, VHSD**)

Στις νέες τεχνικές που εφαρμόζονται για την απομόνωση πτητικών συστατικών περιλαμβάνονται η υδροαπόσταξη με την χρήση μικροκυμάτων (**Microwave-Assisted Hydro Distillation, MAHD**), η εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά (**Supercritical Fluid Extraction, SFE**) και η μικρο-εκχύλιση στερεής φάσης (**Solid Phase MicroExtraction, SPME**). Στην παρούσα εργασία, προκειμένου να μελετηθούν τα πτητικά συστατικά των φυτικών υλικών, εφαρμόζεται μόνο η τεχνική της απόσταξης και συγκεκριμένα της υδροαπόσταξης, η οποία και αναλύεται παρακάτω.

3.1.1 Κλασική Υδροαπόσταξη

Η πιο απλή και εύχρηστη μέθοδος απόσταξης σε εργαστηριακή κλίμακα είναι η κλασική υδροαπόσταξη (**Hydro Distillation, HD**). Το αποστακτικό συγκρότημα απαρτίζεται από: α) έναν θερμομανδύα, ως πηγή θερμότητας, β) μία σφαιρική φιάλη, γ) την συσκευή υδροαπόσταξης Clevenger και δ) την συσκευή Davies (ψυκτήρας) (Εικ. 4).



Εικόνα 4. Αποστακτικό συγκρότημα (Πηγή: τροποποιημένη από Τράκα Χρυσοβαλάντη από το διαδίκτυο)

Αργή λειτουργία της μεθόδου

Κατά την διάρκεια της θέρμανσης παράγονται υδρατμοί οι οποίοι συμπαρασύρουν τα πτητικά συστατικά του φυτικού δείγματος ακολουθώντας ανοδική πορεία. Οι εμπλουτισμένοι αυτοί υδρατμοί, μέσω του λαιμού της συσκευής Clevenger, φθάνουν στον ψυκτήρα όπου ψύχονται και συμπυκνώνονται. Οι σταγόνες που σχηματίζονται, στην συνέχεια, κατέρχονται μέσω του σωλήνα του κυρίου σώματος της συσκευής για να καταλήξουν στο άνω μέρος της βαθμονομημένης περιοχής της Clevenger σχηματίζοντας διπλή στοιβάδα. Η ανώτερη στοιβάδα αποτελεί την υπερκείμενη φάση ή στοιβάδα του αιθέριου ελαίου (για αιθέρια έλαια

ελαφρύτερα του νερού) και η κατώτερη την υποκείμενη φάση ή στοιβάδα του υδρολύματος. Μέρος της υποκείμενης υδατικής φάσης επιστρέφει στην σφαιρική φιάλη που περιέχει το φυτικό υλικό, ενώ παράλληλα παράγεται νέα ποσότητα ατμών. Η όλη διαδικασία ολοκληρώνεται όταν δεν παρατηρείται περαιτέρω αύξηση του συλλεγόμενου αιθέριου ελαίου για μία ώρα (Πολυσίου & Ταραντίλης, 2008).

Μετά το τέλος της απόσταξης, το έλαιο αφήνεται να ψυχθεί και ο όγκος του μετράται στην βαθμονομημένη κλίμακα της συσκευής. Το ποσό του αιθέριου ελαίου εκφράζεται σε mL/ 100 g ξηρού φυτικού υλικού (% v/w). Εντός της σφαιρικής φιάλης παραμένει το αποσπασμένο φυτικό υλικό και το υδατικό εκχύλισμα. Τα προϊόντα της απόσταξης είναι το *αιθέριο έλαιο*, που αποτελεί την υπερκείμενη οργανική φάση, και το *υδρόλυμα* που αποτελεί την υποκείμενη σε μορφή γαλακτώματος υδατική φάση, η οποία όμως περιέχει και μέρος των συστατικών του αιθέριου ελαίου.

3.2 Διαχωρισμός και ταυτοποίηση των συστατικών

Την απομόνωση των πτητικών συστατικών του φυτικού υλικού με χρήση υδροαπόσταξης, ακολουθεί ο διαχωρισμός και η ταυτοποίησή τους. Για τον διαχωρισμό των πτητικών συστατικών των αιθερίων ελαίων και υδρολυμάτων χρησιμοποιείται η αέρια χρωματογραφία (**Gas Chromatography, GC**) ή και η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (**Thin Layer Chromatography, TLC**). Η ταυτοποίηση των δομών των συστατικών (ποιοτικός προσδιορισμός) πραγματοποιείται με τις ακόλουθες φασματοσκοπικές τεχνικές:

- ❖ Φασματομετρία μαζών (**Mass Spectrometry, MS**)
- ❖ Πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (**Nuclear Magnetic Resonance, NMR**)
- ❖ Υπεριώδους-Ορατού (**Ultraviolet-Visible, UV-Vis**)
- ❖ Υπερύθρου (**Infra-Red, IR**)
- ❖ Φασματοσκοπία **Raman**

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με την φασματομετρία μαζών (**GC-MS**), ούτως ώστε να επιτευχθεί ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των πτητικών συστατικών. Η τεχνική GC-MS αποτελεί το πιο διαδεδομένο αναλυτικό εργαλείο για τον ποιοτικό προσδιορισμό των

πητικόν ουσιών και είναι ένα σπουδαίο μέσο για την ταυτοποίηση πολύπλοκων δειγμάτων.

3.2.1 Αέρια χρωματογραφία

Βασικές αρχές-Χρωματογραφικές παράμετροι (Πολυσίου & Ταραντίλης, 2008)

Η αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC) συνιστά ένα είδος χρωματογραφίας κατανομής. Ο διαχωρισμός καθίσταται εφικτός με κατανομή των συστατικών μεταξύ δύο φάσεων, μιας κινητής (φέρουσας) και μιας στατικής φάσης που βρίσκεται εντός χρωματογραφικής στήλης. Ειδικότερα, ο διαχωρισμός πραγματοποιείται σε μη πτητικό υγρό (στατική φάση) που βρίσκεται καθηλωμένο επάνω σε αδρανές στερεό υλικό, ενώ παράλληλα την κινητή φάση αποτελεί το φέρον αέριο. Καθώς η κινητή φάση διέρχεται μέσα από την χρωματογραφική στήλη, τα συστατικά του μίγματος μετατοπίζονται διαφορετικά επάνω στην στατική φάση, κυρίως λόγω των διαφορών στην φυσικοχημική συγγένεια και την συνακόλουθη αλληλεπίδραση κάθε ενός από αυτά με τις δύο φάσεις της στήλης. Κατά αυτόν τον τρόπο, ουσίες οι οποίες κατανέμονται περισσότερο στην κινητή φάση διαχωρίζονται διαδοχικά από άλλες που κατανέμονται περισσότερο στην στατική φάση. Ως εκ τούτου, τα συστατικά του μίγματος διαχωρίζονται και εξέρχονται από την στήλη σε διαφορετικούς χρόνους.

Η αέρια χρωματογραφία φέρει πολλά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με άλλες μεθόδους διαχωρισμού, με σπουδαιότερο την μεγάλη ευαισθησία της. Παρουσιάζει επίσης, μεγάλη ταχύτητα, απλότητα στην χρήση και την δυνατότητα διαχωρισμών που είναι απαιτητικοί. Σημαντικό είναι, εξίσου, και το γεγονός ότι σε πολλές περιπτώσεις, τα συστατικά μπορούν να απομονωθούν ποσοτικά και να ληφθούν με την μορφή που βρίσκονται στο αρχικό μίγμα. Όλα τα προαναφερθέντα καθιστούν την αέρια χρωματογραφία μία από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές διαχωρισμού και ελέγχου καθαρότητας που χρησιμοποιείται, τόσο στην ποιοτική όσο και στην ποσοτική ανάλυση. Ωστόσο, απαραίτητη προϋπόθεση είναι οι προς εξέταση ουσίες να είναι πτητικές ή να μπορούν να μετατρέπονται σε πτητικά παράγωγα με την χρήση κατάλληλων αντιδραστηρίων.

Η αρχή λειτουργίας της αέριας χρωματογραφίας στηρίζεται στην “θεωρία των πλακών”. Με βάση αυτήν, η κίνηση μιας ουσίας στο εσωτερικό της στήλης θεωρείται

σαν ένα σύνολο διαδοχικών κινήσεων μέσα από θαλάμους εξισορρόπησης που βρίσκονται συνδεδεμένοι στην σειρά. Κάθε τέτοιος θάλαμος συνιστά μία θεωρητική πλάκα όπου αποκαθίσταται η ισορροπία μιας ουσίας μεταξύ στατικής και κινητής φάσης. Η ισορροπία αυτή περιγράφεται με τον λόγο κατανομής της συγκέντρωσης ή τον συντελεστή κατανομής K που ορίζεται από την σχέση:

$$K = C_s / C_m$$

όπου C_s και C_m οι συγκεντρώσεις της εκάστοτε ουσίας στην στατική και κινητή φάση αντίστοιχα. Στην θεωρία των πλακών λαμβάνονται ως παραδοχές τα ακόλουθα:

- α) ο συντελεστής κατανομής K είναι ανεξάρτητος από την συγκέντρωση,
- β) η ισορροπία ανάμεσα στις δύο φάσεις αποκαθίσταται πολύ γρήγορα και
- γ) η ταχύτητα διάχυσης μέσα σε μία φάση κατά μήκος της στήλης είναι αμελητέα.

Υπό αυτές τις ιδανικές συνθήκες, η συγκέντρωση της ουσίας στην κινητή φάση κατά μήκος της στήλης ακολουθεί κανονική κατανομή κατά Gauss. Το προηγούμενο έχει ως συνέπεια η συγκέντρωση μιας ουσίας που εκλύεται από την στήλη συναρτήσει του χρόνου, να παρίσταται σε ένα χρωματογράφημα υπό μορφή καμπύλης (κορυφή) αν η ροή της κινητής φάσης είναι σταθερή.

Χαρακτηριστικά της κορυφής αποτελούν ο **χρόνος συγκράτησης (retention time, t_r)** ή αλλιώς ο χρόνος που μεσολαβεί από την στιγμή της εισαγωγής του δείγματος μέχρι την εμφάνιση του μέγιστου της κορυφής, το **ύψος κορυφής (Y)** που είναι η απόσταση του μέγιστου της κορυφής από την βασική γραμμή του χρωματογραφήματος και το **πλάτος κορυφής (W_b)** που είναι η απόσταση μεταξύ των σημείων τομής της βασικής γραμμής και των εφαπτόμενων στα σημεία καμπής των πλευρών της κορυφής. Σημειώνεται ότι το εμβαδόν κάθε κορυφής είναι ανάλογο της συγκέντρωσης της αντίστοιχης ουσίας στο εξεταζόμενο δείγμα.

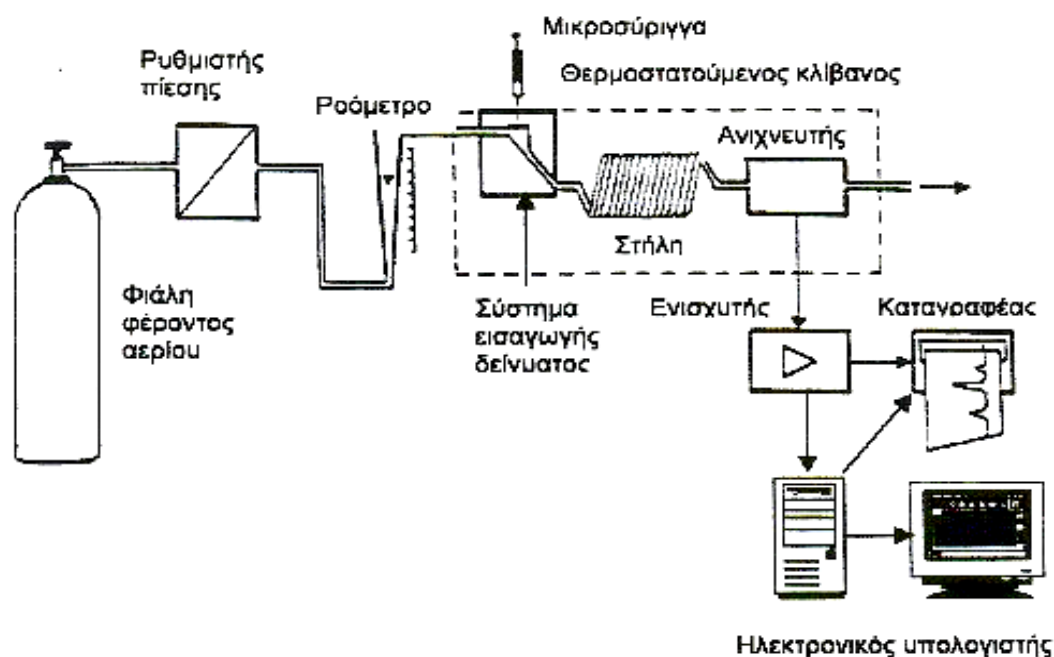
Όσον αφορά την χρωματογραφική στήλη, κύρια παράμετρος αποτελεί η **διαχωριστική ικανότητα (R)**, δηλαδή η χαρακτηριστική ικανότητα της στήλης να διαχωρίζει τα συστατικά ενός μίγματος με παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως είναι το σημείο ζέσεως, η πολικότητα, το μέγεθος των μορίων κ.ά. Η αύξηση του αριθμού των θεωρητικών πλακών με αύξηση του μήκους της στήλης και μείωση της διαμέτρου της, η ανάλυση με κατάλληλα προγραμματισμένη θερμοκρασία, καθώς και

η επιλογή κατάλληλης στατικής ή κινητής φάσης και βέλτιστης ταχύτητας ροής συνιστούν τρόπους βελτίωσης της διαχωριστικής ικανότητας της στήλης.

Οργανολογία

Τα κύρια μέρη ενός αέριου χρωματογράφου κατά σειρά (Εικ. 5,) είναι:

- i. η οβίδα ή φιάλη φέροντος αερίου,
- ii. ο ρυθμιστής πίεσης-ροόμετρο,
- iii. το σύστημα εισαγωγής δείγματος,
- iv. ο θερμοστατούμενος κλίβανος
- v. η χρωματογραφική στήλη,
- vi. ο ανιχνευτής,
- vii. ο ενισχυτής και
- viii. ο καταγραφέας ή ηλεκτρονικός υπολογιστής-εκτυπωτής



Εικόνα 5. Μέρη αέριου χρωματογράφου (Πηγή: chimikoergastirio.blogspot.gr)

Το **φέρων αέριο** συνιστά την κινητή φάση. Θα πρέπει να είναι χημικά αδρανές και να μην αλληλεπιδρά με την στατική φάση ή τις ουσίες που πρόκειται να διαχωριστούν. Η επιλογή του φέροντος αερίου γίνεται σύμφωνα με τον τύπο του χρησιμοποιούμενου ανιχνευτή, επειδή το φέρων αέριο θα πρέπει να διαφέρει σημαντικά από τις διαχωριζόμενες ουσίες ως προς μία τουλάχιστον ιδιότητα στην οποία βασίζεται η λειτουργία του ανιχνευτή, παραδείγματι η θερμική αγωγιμότητα ή η πυκνότητα. Συνήθως χρησιμοποιούνται τα αέρια άζωτο (N₂), ήλιο (He) και αργό (Ar).

Ο **ρυθμιστής πίεσης** επιτρέπει στο φέρων αέριο να εισέλθει στην στήλη με πίεση 1-3atm., ενώ στην φιάλη βρίσκεται σε πίεση 100-200atm. Η ταχύτητα ροής του φέροντος αερίου διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στον διαχωρισμό των συστατικών ενός μίγματος, εφόσον εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από αυτήν οι χρόνοι συγκράτησης. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιείται το **ροόμετρο** το οποίο μετρά με ακρίβεια την ταχύτητα ροής του φέροντος αερίου.

Η έγχυση του δείγματος **στο σύστημα εισαγωγής** πραγματοποιείται με την βοήθεια μικροσύριγγας. Η διαδικασία ολοκληρώνεται πολύ σύντομα και για τον λόγο αυτό ο χώρος του συστήματος θερμαίνεται γρήγορα, ούτως ώστε να επιτευχθεί η εξαέρωση των υγρών δειγμάτων. Ο όγκος του δείγματος κυμαίνεται από 1 έως 10 μL όταν πρόκειται για υγρά και καθορίζεται κυρίως από παράγοντες όπως η διαθέσιμη ποσότητα δείγματος, η χωρητικότητα της στήλης και η ευαισθησία του ανιχνευτή.

Η λειτουργία του **κλίβανου** δύναται να είναι ισόθερμη ή αυξομειούμενης θερμοκρασίας μεταξύ 50-250 °C κατά την διάρκεια της ανάλυσης. Η τελευταία βρίσκει συνήθως εφαρμογή όταν το προς διαχωρισμό μίγμα αποτελείται από χαμηλού όσο και υψηλού σημείου ζέσεως συστατικά.

Όσον αφορά την **χρωματογραφική στήλη**, είναι ένας επιμήκης σωλήνας που απαντά συνήθως υπό μορφή σπειράματος και κατασκευάζεται από ανοξείδωτο χάλυβα, ύαλο ή πλαστικό. Χρησιμοποιούνται δύο είδη στηλών: α) οι *πληρωμένες στήλες* (packed columns) με μήκος 1-3m και διάμετρο 3-10mm και β) οι *τριχοειδείς στήλες* (capillary columns) μήκους 10-50m και διαμέτρου 0.2-1.2mm. Το μειονέκτημα των τριχοειδών στηλών είναι η πολύ μικρή χωρητικότητά τους, ενώ στα πλεονεκτήματα συγκαταλέγεται η δυνατότητα χρησιμοποίησης εξαιρετικά μικρής ποσότητας δείγματος (1 μg) και η υψηλή διαχωριστική ικανότητα λόγω του πολύ μεγάλου αριθμού θεωρητικών πλακών.

Οι **στατικές φάσεις** μπορούν ανάλογα με την πολικότητά τους να είναι πολικές, σχετικά πολικές ή μη πολικές. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η καταλληλότερη στατική φάση για δεδομένο δείγμα θεωρείται εκείνη που είναι σχεδόν της ίδιας πολικότητας με τα συστατικά του.

Οι διαφορές στην σύσταση του εκάστοτε υλικού που εκλούεται από την χρωματογραφική στήλη μετρώνται με τον **ανιχνευτή**. Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι οι ακόλουθοι:

- Ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας (**Thermal Conductivity Detector, TCD**)
- Ανιχνευτής συλλήψεως ηλεκτρονίων (**Electron Capture Detector, ECD**)
- Ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (**Flame Ionization Detector, FID**)

(Ο τελευταίος προορίζεται για ποσοτικό προσδιορισμό, ενώ οι υπόλοιποι κυρίως για ποιοτικό). Οι ανιχνευτές θα πρέπει να είναι αρκετά θερμοί ώστε τα συστατικά του δείγματος να μην συμπυκνώνονται μέσα σε αυτόν. Για τον λόγο αυτό η θερμοκρασία του ρυθμίζεται υψηλότερα από την θερμοκρασία της στήλης, η οποία είναι συνήθως 50°C πάνω από το σημείο ζέσεως των συστατικών.

Τέλος το σήμα, που προέρχεται από τον ανιχνευτή και έχει πιθανόν ενδυναμωθεί από έναν **ενισχυτή**, καταγράφεται στον ηλεκτρονικό υπολογιστή όπου γίνεται επεξεργασία των δεδομένων και αμέσως μετά παρουσίαση των αποτελεσμάτων με την μορφή χρωματογραφήματος.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η αέρια χρωματογραφία είναι μέθοδος διαχωρισμού των συστατικών και για να επιτευχθεί η ταυτοποίησή τους θα πρέπει να συνδυαστεί με την φασματομετρία μαζών (**Mass Spectrometry, MS**). Ως αποτέλεσμα το σύστημα GC-MS, που είναι μία συνδυαστική τεχνική ανάλυσης από τις περισσότερο πετυχημένες και ευρέως διαδεδομένες, συνιστά ένα πολύ σημαντικό εργαλείο ταυτοποίησης πολύπλοκων ενώσεων.

3.2.2 Φασματομετρία Μαζών

Βασικές αρχές-Οργανολογία

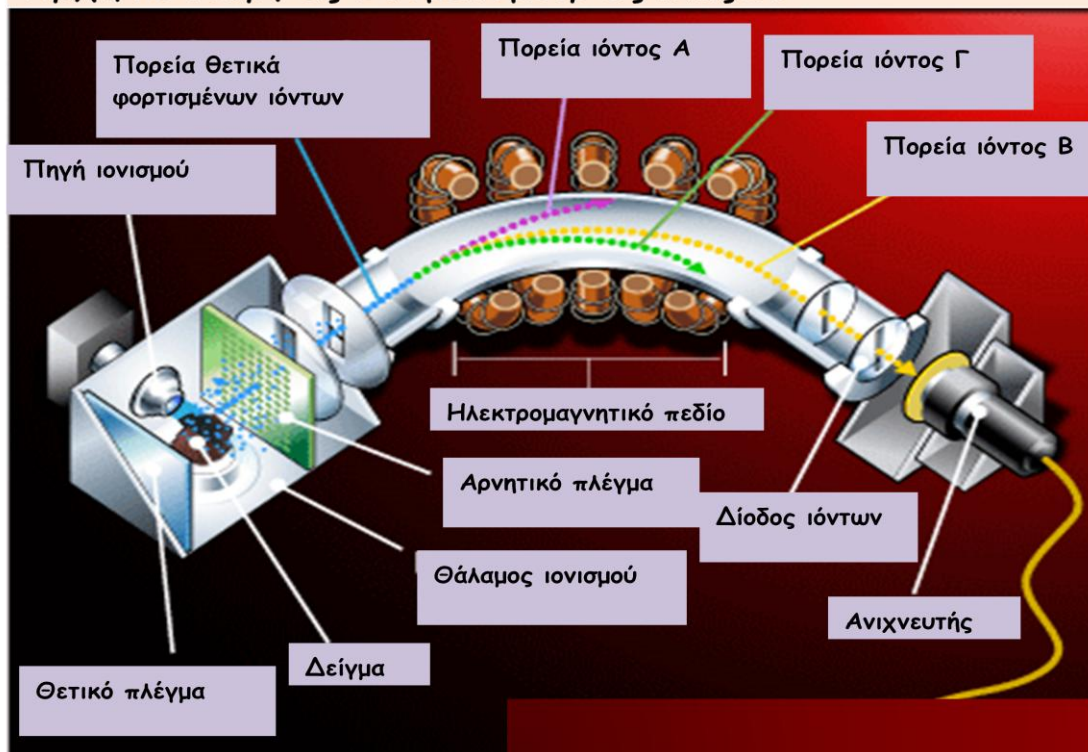
Τα βασικά τμήματα ενός φασματόμετρου μάζας είναι τα εξής:

- ❖ σύστημα εισαγωγής δείγματος
- ❖ θάλαμος παραγωγής ιόντων-επιταχυντής

- ❖ αναλυτής μαζών
- ❖ ανιχνευτής-συλλέκτης ιόντων
- ❖ ενισχυτής και
- ❖ καταγραφέας ή ηλεκτρονικός υπολογιστής-εκτυπωτής

Μία ουσία, η οποία βρίσκεται σε αέρια φάση, βομβαρδίζεται με μία δέσμη ηλεκτρονίων που έχει τέτοια ενέργεια ικανή να διασπάσει το μόριο σε θραύσματα. Τα θετικά θραύσματα που παράγονται (κατιόντα) επιταχύνονται υπό κενό μέσα σε σωλήνα και με την επίδραση μαγνητικού πεδίου αποκλίνουν από την αρχική τους πορεία, βάσει του λόγου μάζας προς φορτίο (m/e). Τα ιόντα που έχουν μικρή μάζα (χαμηλή ορμή) εκτρέπονται και συγκρούονται με τα τοιχώματα της συσκευής ανάλυσης, ενώ παράλληλα αυτά με την κατάλληλη αναλογία (m/e) ακολουθούν την πορεία της συσκευής και εξερχόμενα συγκρούονται με τον συλλέκτη (Εικ. 6). Στην συνέχεια παράγεται ηλεκτρικό ρεύμα το οποίο ενισχύεται, ανιχνεύεται και τελικά μετράται. Το διάγραμμα που προκύπτει από την μέτρηση της έντασης του ρεύματος συναρτήσει του λόγου m/e αποτελεί το φάσμα μαζών, που είναι χαρακτηριστικό για κάθε ουσία. Αυτό συγκρινόμενο με άλλα γνωστά φάσματα που εμπεριέχονται σε ηλεκτρονικές βιβλιοθήκες και με την χρήση κατάλληλου λογισμικού, δίνει την δυνατότητα ταυτοποίησης μιας ένωσης.

Αρχή λειτουργίας Φασματομετρίας Μαζών



Εικόνα 6. Πορεία ιόντων στο φασματομέτρο μαζών (Πηγή: τροποποιημένη από Τράκα Χρυσοβαλάντη από science.howstuffworks.com)

Οι κυριότερες μέθοδοι παραγωγής ιόντων είναι: α) ιονισμός με ηλεκτρόνια, β) χημικός ιονισμός, γ) ιονισμός πεδίου και δ) ιονισμός με σπινθήρα. Οι συνηθέστεροι τύποι αναλυτών μαζών είναι: α) αναλυτές απλής εστίασης με μαγνητική εκτροπή, β) αναλυτές διπλής εστίασης, γ) τετραπολικό αναλυτές μαζών, δ) αναλυτές 'χρόνου πτήσης' και ε) αναλυτές 'παγίδας ιόντων'.

Στις αναλύσεις των δευτερογενών μεταβολιτών του φυτικού υλικού που μελετήθηκε στα πειράματα, η αέρια χρωματογραφία συνδυάστηκε με την φασματομετρία μαζών, όπως φαίνεται και στην εικόνα 7 που ακολουθεί και απεικονίζει το σύστημα GC-MS που χρησιμοποιήθηκε.



Εικόνα 7. Αέριος χρωματογράφος συζευγμένος με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών (GC-MS) (Πηγή: Πετράκης Ελευθέριος)

Φάσματα Μαζών

Σε ένα φάσμα μάζας διακρίνονται τρεις κατηγορίες κορυφών, η μητρική (μοριακό ιόν), η βασική και οι κορυφές θραυσμάτων. Μοριακό ιόν είναι το κύριο ιόν που παράγεται από την απώλεια ενός ηλεκτρονίου και δίνει ένα απλό φάσμα μάζας το οποίο αποτελείται μόνο από την μητρική κορυφή. Η κορυφή αυτή δίνει το ακριβές μοριακό βάρος του δείγματος. Βασική κορυφή καλείται η μεγαλύτερη κορυφή που παρατηρείται σε ένα διάγραμμα θραύσης με τις συγκεντρώσεις των επιμέρους ιόντων να δίνονται σε επί τοις εκατό ποσοστά της κορυφής αυτής. Συνήθως το μοριακό ιόν που παράγεται αρχικά, έχει σημαντική περίσσεια ενέργειας και τόσο η ενέργεια όσο και το φορτίο διασπείρονται γρήγορα προκαλώντας διασπάσεις. Το προηγούμενο οδηγεί στην δημιουργία ενός ή περισσότερων θραυσμάτων τα οποία απεικονίζονται σε ένα φάσμα μάζας με αντίστοιχες κορυφές (κορυφές θραυσμάτων).

4. Επιβλαβή έντομα και ακάρεα κηπευτικών καλλιεργειών

Ανάμεσα στους σημαντικότερους εχθρούς των θερμοκηπιακών καλλιεργειών υπάγονται οι αφίδες και τα ακάρεα. Οι εχθροί αυτοί δύναται να προκαλέσουν σοβαρές ζημιές σε πληθώρα κηπευτικών φυτών, ζημιώνοντας την παραγωγή. Τα είδη *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae), *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae), και *Tetranychus urticae* (Prostigmata: Tetranychidae) ανήκουν στην κατηγορία των πολυφάγων και πολύ σημαντικών εχθρών, μερικά χαρακτηριστικά των οποίων αναλύονται παρακάτω.

4.1 Η αφίδα *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae)

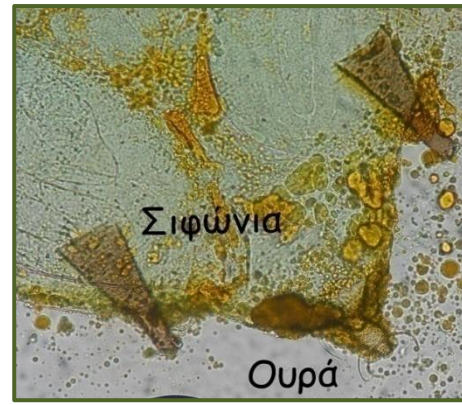
Το *A. gossypii*, κοινώς αφίδα του βαμβακιού, αποτελεί ένα κοσμοπολίτικο, πολυφάγο είδος, ευρέως διαδεδομένο σε τροπικές, υποτροπικές και εύκρατες περιοχές. Ως κύριο φυτό-ξενιστή έχει το βαμβάκι, όμως προσβάλλει και έναν σημαντικό αριθμό φυτικών ειδών που ανήκουν στις οικογένειες Curcubitaceae, Malvaceae και Rutaceae (Blackman & Eastop, 1984). Σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες μπορεί να βρεθεί σε αγγουριά, κολοκυθιά, πεπονιά, μελιτζάνα κ.ά.

4.1.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Τα άπτερα άτομα ποικίλουν σε χρωματισμό από σκούρο πράσινο έως ανοιχτό κίτρινο και το μήκος των ενήλικων θηλυκών κυμαίνεται από 1.6-1.8mm (Τόλης, 1986) (Εικ. 8). Τα σιφόνια είναι μαύρα, κυλινδρικά με μήκος ίσο περίπου με το 1/5 του μήκους του σώματος, ενώ η ουρά είναι ανοιχτού ή σκούρου χρωματισμού και φέρει λίγα ζεύγη τριχών (Εικ. 9). Τα πόδια και οι κεραίες είναι κίτρινα με κοντά τριχίδια (Margaritopoulos *et al.*, 2006). Το σώμα των πτερωτών θηλυκών είναι ατρακτοειδές, σε αντίθεση με των άπτερων που είναι ωσειδές, η κεφαλή και ο θώρακας είναι μαύρα, ενώ η κοιλία είναι ανοιχτού πράσινου χρώματος με πλευρικά στίγματα (Blackman & Eastop, 1984).



Εικόνα 8. Ενήλικο άπτερο θηλυκό *A. gossypii*
(Πηγή: Τράκα Χρυσοβαλάντη)



Εικόνα 9. Σιφώνια και ουρά ενήλικου
(Πηγή: Τράκα Χρυσοβαλάντη)

4.1.2 Βιολογία-Οικολογία

Στις εύκρατες περιοχές διαχειμάζει ως χειμερινό ωό. Η αναπαραγωγή στα τροπικά και υποτροπικά κλίματα γίνεται παρθενογεννητικά με ταχύτατο ρυθμό (Τόλης, 1986). Στην Ελλάδα προσβάλλει τα νεαρά βαμβακόφυτα ως πτερωτό θηλυκό και στην συνέχεια γεννά άπτερες νύμφες. Στις Η.Π.Α. εμφανίζεται ως ολοκυκλικό με πρωτεύοντες ξενιστές την κατάληψη και το ιβίσκο τον συριακό (Blackman & Eastop, 1984). Η διάρκεια του βιολογικού κύκλου του *A. gossypii* εξαρτάται από τις κλιματικές συνθήκες και κατά μέσο όρο είναι 8-10 ημέρες σε θερμοκρασίες 22-25°C.

4.1.3 Ζημιογόνος δράση

Ενήλικα και νύμφες νύσσουν και μυζούν μεγάλη ποσότητα χυμού από τα φυτά-ξενιστές. Με τα νύγματα τους προκαλούν χλώρωση, συστροφή και ξήρανση των φύλλων. Τα άφθονα μελιτώδη εκκρίματα που παράγουν ρυπαίνουν το φυτό, υποβαθμίζουν την ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων και ευνοούν την ανάπτυξη μυκήτων καπνιάς (Τζανακάκης & Κατσόγιαννος, 2003).

Η αφίδα αυτή είναι φορέας περισσότερων από 50 ιώσεων, όπως του ιού του μωσαϊκού της αγγουριάς, του ιού του κίτρινου μαρασμού της πεπονιάς κ.ά. Οι ιοί αυτοί μεταδίδονται με μη έμμοιο τρόπο, με αποτέλεσμα το έντομο να παραμένει φορέας του ιού για λίγες μόνο ώρες (Blackman & Eastop, 1984).

4.2 Η αφίδα *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae)

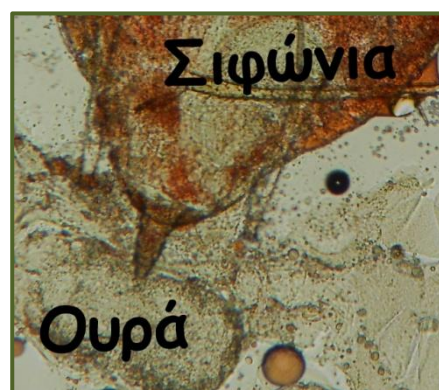
Το *M. persicae*, κοινώς αφίδα της ροδακινιάς, είναι πολυφάγο είδος και ευρέως διαδεδομένο. Ως κύριο φυτό-ξενιστή έχει την ροδακινιά, όμως προσβάλλει και έναν σημαντικό αριθμό φυτικών ειδών που ανήκουν στις οικογένειες Solanaceae, Malvaceae, Asteraceae και Rutaceae (Τζανακάκης & Κατσόγιαννος, 2003). Σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες μπορεί να βρεθεί σε τομάτα, μελιτζάνα, πιπεριά, φασόλι κ.ά.

4.2.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Τα άπτερα θηλυκά έχουν πράσινο, ρόδινο ή κίτρινο χρωματισμό και μήκος που κυμαίνεται από 1.5-2.5mm (Εικ. 10). Τα σιφώνια είναι λεπτά, μακριά, ανοιχτόχρωμα μήκους 0.4mm και η ουρά στενόμακρη, ανοιχτόχρωμη και φέρει 3 ζεύγη τριχών (Εικ. 11) (Τζανακάκης & Κατσόγιαννος, 2003). Το σώμα των πτερωτών ενήλικων θηλυκών είναι μακρόστενο και έχει το ίδιο μέγεθος με το άπτερο. Η κεφαλή και ο θώρακας έχουν σχεδόν μαύρο χρώμα, ενώ νωτιαίως και κοντά στο κέντρο της κοιλίας υπάρχει μια ευμεγέθης περιοχή σκούρου χρώματος.



Εικόνα 10. Ενήλικο άπτερο θηλυκό *M. persicae*
(Πηγή: Τράκα Χρυσοβαλάντη)



Εικόνα 11. Σιφώνια και ουρά ενήλικου
(Πηγή: Τράκα Χρυσοβαλάντη)

4.2.2 Βιολογία-Οικολογία

Στην Ευρώπη και σε περιοχές με ψυχρό χειμώνα διαχειμάζει ως χειμερινό ωό στον φλοιό του κύριου ξενιστή και έχει περισσότερες από 5 γενεές το έτος (Τζανακάκης & Κατσόγιαννος, 2003). Αντέχει στο κρύο και σε περιοχές με ήπιο χειμώνα αναπαράγεται παρθενογεννητικά όλες τις εποχές του έτους, χωρίς να είναι απαραίτητο να γεννηθούν χειμερινά ωά (Blackman & Eastop, 1984). Τα θηλυκά ζουν κατά μέσον όρο 25 ημέρες στους 25°C.

4.2.3 Ζημιογόνος δράση

Η ζημιογόνος δράση είναι παρόμοια με της αφίδας *A. gossypii*, μόνο που προτιμά περισσότερο την νεαρή βλάστηση. Το είδος *M. persicae* είναι πολύ ικανός φορέας περισσότερων από 100 ιώσεων, όπως του ιού του κοινού μωσαϊκού του φασολιού, κ.ά. (Τζανακάκης & Κατσόγιαννος, 2003).

4.3 Το άκαρι *Tetranychus urticae* Koch (Prostigmata: Tetranychidae)

Το *Tetranychus urticae*, κοινώς δίστικτος τετράνυχος, ανήκει στην οικογένεια Tetranychidae και αποτελεί εξαιρετικά πολυφάγο είδος, με ευρεία εξάπλωση. Προσβάλλει περισσότερα από 150 είδη φυτών μεταξύ των οποίων θερμοκηπιακές καλλιέργειες αγγουριού, τομάτας, μελιτζάνας, πιπεριάς κ.ά., φυτά μεγάλης καλλιέργειας, καλλωπιστικά και δενδρώδεις καλλιέργειες (Κωβαίος, 2010).

4.3.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Το σώμα του ενήλικου θηλυκού είναι ενιαίο, ωσειδές και έχει μήκος 540μm (Εικ. 12, 13 α), ενώ του αρσενικού είναι οξύληκτο (Εικ. 13 β), μήκους 460μm Το χρώμα των μη διαπαυόντων θηλυκών είναι πράσινο και φέρει δύο σκουρόχρωμες κηλίδες στην νωτιαία πλευρά του ιδιοσώματος. Τα διαχειμάζοντα-διαπαύοντα θηλυκά έχουν κοκκινωπό χρωματισμό. Στο πρόσθιο μέρος (γναθόσωμα) υπάρχουν οι ποδοπροσακτρίδες και τα χηληκέρατα που χρησιμεύουν στην νύξη της τροφής (Εμμανουήλ, 2004).



Εικόνα 12. Ενήλικο θηλυκό άτομο *T. urticae*
(Πηγή: Τράκα Χρυσοβαλάντη)



α)



β)

Εικόνα 13. α) Ενήλικο θηλυκό άτομο *T. urticae* **β)** Ενήλικο αρσενικό άτομο *T. urticae*
(Πηγή: Σταθάκης Θεόδωρος)

4.3.2 Βιολογία-Οικολογία

Το είδος *T. urticae* διαχειμάζει ως γονιμοποιημένο θηλυκό σε προστατευμένες θέσεις στο έδαφος και σπανιότερα σε ρωγμές του φλοιού των δένδρων. Τα διαχειμάζοντα ακάρεα δεν τρέφονται και είναι αρνητικώς φωτοτροπικά, σε αντίθεση με τα μη διαχειμάζοντα. Ο βιολογικός κύκλος περιλαμβάνει τα εξής στάδια ωό, λάρβα, πρωτονύμφη, δευτερονύμφη, ενήλικο και διαρκεί 8-12 ημέρες στους 30°C. Κάθε ενήλικο έχει διάρκεια ζωής περίπου 30 ημέρες και εναποθέτει 3 έως 4 ωά την ημέρα (Κωβαίος, 2010).

Προτιμά την κάτω επιφάνεια των φύλλων, αλλά σε έντονη προσβολή συναντάται και στην άνω επιφάνεια. Σε θερμοκηπιακές και άλλες καλλιέργειες καθώς ο πληθυσμός των ακάρεων αυξάνεται, ο ανταγωνισμός για τροφή είναι μεγάλος και τα νεαρά θηλυκά άτομα συγκεντρώνονται στο άνω άκρο του φυτού και από εκεί με την βοήθεια του ιστού διασπείρονται (Εμμανουήλ, 2004).

4.3.3 Ζημιογόνος δράση

Με την εγκατάσταση του ακάρεως στην καλλιέργεια τα κύρια συμπτώματα είναι ο μεταχρωματισμός των φύλλων και η παραγωγή ιστού σε έντονες προσβολές. Ενήλικα και ατελή στάδια νύσσουν και μυζούν φυτικό χυμό, προκαλώντας χλωρωτικές περιοχές στα φύλλα και νεκρωτικές κηλίδες σε προχωρημένο στάδιο προσβολής που οδηγούν σε ξήρανση και φυλλόπτωση (Attia *et al.*, 2013). Στα κηπευτικά και θερμοκηπιακά φυτά η ζημιά μπορεί να είναι καθολική επιφέροντας την ξήρανση ολόκληρου του φυτού.

Στα άνθη μπορεί να προκαλέσει μεταχρωματισμούς, μαρασμό των πετάλων και χλωρωτικές κηλίδες στις θέσεις διατροφής. Ακόμη, μπορεί να προσβάλλει τους καρπούς προκαλώντας κηλιδώσεις (Κωβαίος, 2010).

4.4 Σκοπός της μελέτης

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη είχε ως σκοπό: α) την διερεύνηση των ποιοτικών και ποσοτικών χαρακτηριστικών δύο αιθερίων ελαίων και των αντίστοιχων υδρολυμάτων τους, που παραλήφθηκαν με υδροαπόσταξη από τα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά *Ocimum basilicum*, Lamiaceae (βασιλικός) και *Ruta chalepensis*, Rutaceae (απήγανος), β) τον έλεγχο της τοξικής δράσης των αιθερίων ελαίων και των υδρολυμάτων τους, επί των εχθρών κηπευτικών καλλιεργειών *Aphis gossypii* και *Myzus persicae*, (Hemiptera: Aphididae) και *Tetranychus urticae*, (Acari: Tetranychidae) και την επίδραση στο αναπαραγωγικό δυναμικό αυτών, γ) την εκτίμηση της δραστηριότητας των αιθερίων ελαίων στο αναπαραγωγικό δυναμικό των απογόνων των ψεκασμένων αφίδων και δ) την επίδραση των αιθερίων ελαίων στην εκκολαψιμότητα των ωών του τετράνυχου

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5. Υλικά και Μέθοδοι

5.1 Φυτικά υλικά και μέθοδοι απομόνωσης, διαχωρισμού και ταυτοποίησης των συστατικών

Η παραλαβή των αιθερίων ελαίων και των υδρολυμάτων τους, που πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της υδροαπόσταξης, έγινε ούτως ώστε να χρησιμοποιηθούν υπό μορφή διαλυμάτων (ή γαλακτωμάτων) διαφόρων συγκεντρώσεων στα βιολογικά πειράματα καθώς και για να μελετηθεί η χημική σύσταση των πτητικών ενώσεων που περιέχουν. Ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των ενώσεων αυτών έλαβε χώρα ακολουθώντας την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών (GC-MS).

Στην συνέχεια αναφέρονται τα αρωματικά φυτικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ως πρώτη ύλη και γίνεται λεπτομερής παράθεση των μεθοδολογιών υδροαπόσταξης και χρωματογραφικής ανάλυσης που πραγματοποιήθηκαν.

5.1.1 Φυτικά υλικά

Τα αρωματικά φυτά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το *Ocimum basilicum* L. ‘Genovese’, κοινώς Βασιλικός πλατύφυλλος και το *Ruta chalepensis* L., κοινώς Απήγανος.

Ο βασιλικός συλλέχθηκε τον Ιούνιο του 2012, λίγο πριν την περίοδο ανθοφορίας του από την περιοχή των Βαΐων Θήβας του νομού Βοιωτίας (Περιφέρεια Στερεάς Ελλάδας).

Ο απήγανος συλλέχθηκε τον μήνα Απρίλιο του 2014, κατά την περίοδο ανθοφορίας του, από την περιοχή Λευκοχώρα του νομού Μεσσηνίας (Περιφέρεια Πελοποννήσου).

Στην περίπτωση του βασιλικού επιλέχθηκαν τα φύλλα, ενώ στην περίπτωση του απήγανου χρησιμοποιήθηκαν τα φύλλα και τα άνθη. Τα φυτικά δείγματα ξηράθηκαν υπό σκιά με έκθεση στον αέρα (φυσική ξήρανση) προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για απόσταξη (Εικ. 14 α, β).



(α)



(β)

Εικόνα 14.α) Φυτικό δείγμα πλατύφυλλου βασιλικού, **β)** Φυτικό δείγμα απήγανου
(Πηγή: Τράκα Χρυσοβαλάντη)

5.1.2 Μεθοδολογία Υδροαπόσταξης

Για την παραλαβή των αιθερίων ελαίων των φυτικών δειγμάτων του βασιλικού και του απήγανου επιλέχθηκε η μέθοδος της υδροαπόσταξης με χρήση της συσκευής Clevenger.

Στην κλασική αυτή τεχνική υδροαπόσταξης χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά:

- ❖ θερμομανδύας, ως πηγή θέρμανσης του φυτικού υλικού
- ❖ σφαιρική φιάλη, των 5 L
- ❖ χωνί από tephlon, για τα δείγματα
- ❖ ομογενοποιητής (blender), για λειοτρίβηση των δειγμάτων
- ❖ βαθμονομημένη συσκευή Clevenger, για παραλαβή αιθέριου ελαίου και υδρολύματος
- ❖ ψυκτήρας διπλών τοιχωμάτων τύπου Davies
- ❖ 2 προσαρμοζόμενα στον ψυκτήρα λάστιχα, για διέλευση του νερού
- ❖ 1 βάση, για την σφαιρική φιάλη

- ❖ 1 στατό, για στερέωση της συσκευής Clevenger και του ψυκτήρα
- ❖ 1 μεταλλικό στήριγμα εφαρμοζόμενο στην σφαιρική φιάλη, για ασφάλεια
- ❖ φυτικά δείγματα
- ❖ απιονισμένο νερό

Τα αποξηραμένα φυτικά δείγματα λειοτριβήθηκαν με την χρήση ομογενοποιητή (blender). Ζυγίστηκε ποσότητα κονιορτοποιημένου βασιλικού ίση με 250 g και τοποθετήθηκε εντός εσφυρισμένης φιάλης 5 L. Προστέθηκε ποσότητα απιονισμένου μέχρι καλύψεως του δείγματος και ακολούθησε επισταμένη ανάδευση (Εικ. 15 α). Η σφαιρική φιάλη μεταφέρθηκε σε θερμομανδύα συγκεκριμένης διαμέτρου ώστε αυτή να εφαρμόζει απολύτως (Εικ. 15 β). Κατόπιν προσαρμόστηκε ένα κατάλληλο μεταλλικό στήριγμα μεταξύ της φιάλης και της συσκευής Clevenger, πάνω στην οποία είχε προσαρμοστεί ο ψυκτήρας Davies. Το αποστακτικό συγκρότημα φαίνεται στην εικόνα 16.

Το δείγμα θερμάνθηκε και η έναρξη της απόσταξης σημειώθηκε την χρονική στιγμή που άρχισαν να συμπυκνώνονται οι υδρατμοί στον ψυκτήρα. Η απόσταξη διήρκησε 4 ώρες και ως χρόνος τερματισμού θεωρήθηκε ο χρόνος στον οποίο δεν παρατηρήθηκε περαιτέρω αύξηση του συλλεγόμενου αιθέριου ελαίου. Η διαδικασία επαναλήφθηκε συνολικά δύο φορές και για τα δύο φυτικά είδη.



(α)



(β)

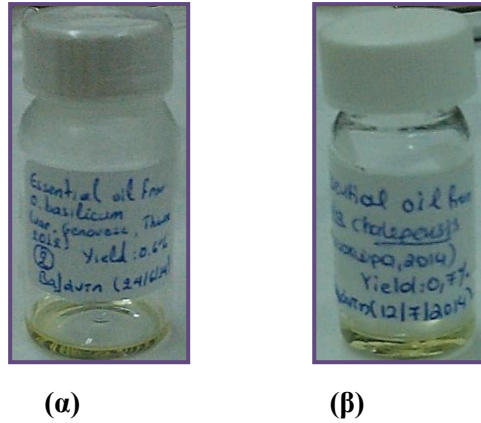
Εικόνα 15.α) Σφαιρική φιάλη με κονιορτοποιημένο δείγμα και απιονισμένο νερό

β) Θερμομανδύας για σφαιρική φιάλη 5 L (Πηγή: Τράκα Χρυσοβαλάντη)



Εικόνα 16. Αποστακτικό συγκρότημα
(Πηγή: Τράκα Χρυσοβαλάντη)

Πρώτα ξεκίνησε η παραλαβή του υδρολύματος του βασιλικού και του απήγανου, το οποίο αφού ογκομετρήθηκε τοποθετήθηκε σε ειδικό περιέκτη, σφραγίστηκε και συντηρήθηκε στους 4°C στο ψυγείο. Εν συνεχεία, μετρήθηκε ο όγκος του αιθέριου ελαίου στην βαθμονομημένη κλίμακα της συσκευής Clevenger, και ακολούθησε η παραλαβή και η ξήρανσή του με άνυδρο θεικό μαγνήσιο ($MgSO_4$). Το αιθέριο έλαιο τοποθετήθηκε στην κατάψυξη στους -20°C, μέχρι την ανάλυση του και την περαιτέρω χρήση του για τα βιολογικά πειράματα. Η απόδοση του βασιλικού σε αιθέριο έλαιο ήταν 0,6%, ενώ του απήγανου 0,7% (κατ' όγκο προς βάρος, v/w) (Εικ. 17.α,β).



Εικόνα 17.α) Αιθέριο έλαιο βασιλικού, **β)** Αιθέριο έλαιο απήγανου
(Πηγή: Τράκα Χρυσοβαλάντη)

5.1.3 Διαχωρισμός και ταυτοποίηση συστατικών με GC-MS

Τα υδρολύματα υπέστησαν επεξεργασία, ώστε να προσδιοριστούν ποιοτικά με GC-MS οι πτητικές ενώσεις που περιήλθαν στην υδατική φάση κατά την απόσταξη. Ποσότητα ίση με 15mL κάθε επιμέρους υδρολύματος εκχυλίστηκε με διαιθυλαιθέρα (Et₂O) για τον διαχωρισμό και την απομόνωση των πτητικών ουσιών τους. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν τρεις εκχυλίσεις για κάθε δείγμα, χρησιμοποιώντας 7mL εκχυλιστή διαλύτη κάθε φορά. Προκειμένου να επιταχυνθεί ο διαχωρισμός των δύο φάσεων και να παρεμποδιστεί ο σχηματισμός γαλακτώματος κατά τη πρώτη εκχύλιση, προστέθηκε κορεσμένο υδατικό διάλυμα άλατος 7mL. Ακολούθησε ξήρανση της οργανικής φάσης, η οποία επιτεύχθηκε με άνυδρο MgSO₄ και έπειτα από διήθηση με ειδικό φίλτρο, έγινε συμπύκνωση του διηθήματος μέχρις ότου να απομακρυνθεί πλήρως ο διαλύτης με ρεύμα αζώτου (N₂) (Pettrakis *et.al* 2014).

Όσον αφορά τον ποιοτικό προσδιορισμό των πτητικών ενώσεων των αιθερίων ελαίων και των αντίστοιχων υδρολυμάτων τους διενεργήθηκαν τα εξής βήματα (Pettrakis *et.al* 2014; Pettrakis *et al.* 2015). Αρχικά, κάθε αιθέριο έλαιο και τα πτητικά συστατικά του υδρολύματος σε ποσότητα 10 μL αραιώθηκαν επιμέρους με διαιθυλαιθέρα, σε αναλογία 1:100 (v/v). Στην συνέχεια με την βοήθεια μικροσύριγγας εισήχθη ποσότητα 1 μL από κάθε αραιωμένο δείγμα με την τεχνική “splitless” στο σύστημα έγχυσης του αέριου χρωματογράφου 5890II της Hewlett-Packard, ο οποίος ήταν εφοδιασμένος με τριχοειδή στήλη HP-5ms (30m x 0,25mm, i.d.: 0,25μm) και

φασματομέτρο μαζών HP 5972. Οι θερμοκρασίες του συστήματος εισαγωγής του δείγματος και του ανιχνευτή ρυθμίστηκαν στους 220°C και 290°C αντίστοιχα. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα ξεκίνησε από τους 60°C, φθάνοντας σταδιακά στους 240°C με ρυθμό μεταβολής 3°C ανά λεπτό (3°C/min), όπου και παρέμεινε για 10 λεπτά. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο (He) με ροή 1 mL/min. Η ταυτοποίηση των συστατικών έγινε συγκρίνοντας τα φάσματα μαζών τους με τα αντίστοιχα φάσματα που εμπερικλείονται στις ηλεκτρονικές βιβλιοθήκες NIST 98, Wiley 275 και στην διεθνή βιβλιογραφία (Adams, 2007), καθώς επίσης και με την σύγκριση των φασμάτων μαζών με τους χρόνους έκλυσης πρότυπων διαλυμάτων

5.2 Προετοιμασία υλικών για τις βιολογικές δοκιμές

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν μελετήθηκε η βιολογική δράση δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών *O. basilicum* και *R. chalepensis* επί των *A. gossypii*, *M. persicae* και *T. urticae*. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η τοξική δράση των αιθερίων ελαίων και υδρολυμάτων των παραπάνω φυτών καθώς και η επίδραση τους στο αναπαραγωγικό δυναμικό των εχθρών. Ακόμη, ερευνήθηκε τυχόν επίδραση των αιθερίων ελαίων στους απογόνους και στο αναπαραγωγικό δυναμικό των *A. gossypii* και *M. persicae* και στην εκκολαψιμότητα των ωών του *T. urticae*.

5.2.1 Ανάπτυξη του φυτικού υλικού

Για τα βιολογικά πειράματα χρησιμοποιήθηκαν φυτά αγγουριού (*Cucumis sativus* L., Cucurbitaceae) ποικιλίας Vertigo F1 και μελιτζάνας (*Solanum melongena* L., Solanaceae) ποικιλίας Bonica F1 τα οποία χορηγήθηκαν από την εταιρεία Σπύρου.

Η ανάπτυξη των φυτών πραγματοποιήθηκε με προβλάστηση σπόρων σε πλαστικές παλέτες. Οι παλέτες (Εικ. 18, 19) εναποθέτονταν σε πλαστικούς δίσκους και τοποθετούνταν εντός ειδικών εντομοστεγών κλωβών, διαστάσεων 81cm x70cm x 80cm, στο θερμοκήπιο με θερμοκρασία 25±1°C (Εικ. 20). Ο σκελετός των κλωβών ήταν ξύλινος και έφερε κατάλληλα προσαρμοσμένη λεπτή μουσελίνα.



Εικόνα 18. Πλαστικός δίσκος (παλέτα)
(Πηγή: Τράκα Χρυσοβαλάντη)



Εικόνα 19. Σπορόφυτα
(Πηγή: Τράκα Χρυσοβαλάντη)



Εικόνα 20. Ξύλινος κλωβός (Πηγή: Τράκα Χρυσοβαλάντη)

5.2.2 Διατήρηση των φυτών

Όταν τα φυτάρια εντός των δίσκων είχαν δύο πραγματικά φύλλα, μεταφυτεύονταν σε πλαστικές γλάστρες διαμέτρου 7.5cm και ύψους 9cm, τοποθετούνταν σε πλαστικούς δίσκους και μεταφέρονταν σε εντομοστεγείς κλωβούς στο θερμοκήπιο. Τα φυτά ελέγχονταν και ποτίζονταν καθημερινά μέχρι να φθάσουν στο στάδιο πέμπτου ή έκτου πραγματικού φύλλου ώστε να χρησιμοποιηθούν για τις εκτροφές ή τα πειράματα (Εικ. 21 α, β). Καθ' όλη την διάρκεια ανάπτυξης των φυτών δεν εφαρμόστηκε λίπανση ούτε έγινε χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβανόταν και για τα δύο είδη κηπευτικών.



α)



β)

Εικόνα 21. α) Φυτάρια μελιτζάνας, β) Φυτάρια αγγουριού (Πηγή: Τράκα Χρυσοβαλάντη)

5.2.3 Εκτροφή των *A. gossypii*, *M. persicae* και *T. urticae*

Όταν τα φυτά έφταναν στο κατάλληλο στάδιο ανάπτυξης μεταφέρονταν εντός δίσκων σε ξύλινους κλωβούς όπου διατηρούνταν οι εκτροφές. Το *A. gossypii* εκτρεφόταν σε φυτά αγγουριού (Εικ. 22, 23) και το *M. persicae* σε φυτά μελιτζάνας (Εικ. 24, 25). Προσβεβλημένα με αφίδες φύλλα αποκόπτονταν και τοποθετούνταν στα ‘καθαρά’ φυτά ώστε να επιταχύνεται η εγκατάστασή τους στα νέα φυτά. Η ίδια διαδικασία λάμβανε χώρα και για το άκαρι *T. urticae* (Εικ. 26) που εκτρεφόταν σε φυτά αγγουριού.



Εικόνα 22. Εκτροφή *A. gossypii* (Πηγή: Τράκα Χρυσοβαλάντη)



Εικόνα 23. Ενήλικο και νύμφες *A. gossypii* σε φύλλο αγγουριού
(Πηγή: Τράκα Χρυσοβαλάντη)



Εικόνα 24. Εκτροφή *M. persicae* (Πηγή: Τράκα Χρυσοβαλάντη)



Εικόνα 25. Ενήλικο και νύμφες *M. persicae* σε φύλλο μελιτζάνας
(Πηγή: Τράκα Χρυσοβαλάντη)



Εικόνα 26. Διάφορα στάδια *T. urticae* σε φύλλο αγγουριού
(Πηγή: Τράκα Χρυσοβαλάντη)

Τα φυτά ελέγχονταν καθημερινά για τυχόν προσβολές από παρασιτοειδή ή αρπακτικά, ενώ ποτίζονταν κάθε δύο ή και τρεις ημέρες, ανάλογα με το είδος του φυτού. Οι εκτροφές διατηρούνταν σε χώρο ελεγχόμενων συνθηκών (εντομοτροφείο)

με θερμοκρασία $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, σχετική υγρασία $65\pm 5\%$ και φωτοπερίοδο 16 ώρες φως: 8 ώρες σκότος.

5.2.4 Ατομικοί κλωβοί

Ατομικοί κλωβοί χρησιμοποιήθηκαν για τον περιορισμό των αφίδων πάνω σε φύλλα φυτών αγγουριού ή μελιτζάνας (Εικ. 27). Το υλικό κατασκευής του ατομικού κλωβού ήταν οργαντίνια και οι διαστάσεις αυτού $22.5\text{cm} \times 13.5\text{cm}$. Στο άνω μέρος υπήρχε ενσωματωμένη κορδέλα μήκους 21cm η οποία βοηθούσε στο κλείσιμο του κλωβού, ώστε να αποτρέπεται η έξοδος των εντόμων.

Κάθε φύλλο αγγουριού ή μελιτζάνας καλυπτόταν από έναν ατομικό κλωβό, αφού προηγουμένως είχαν τοποθετηθεί στην κάτω επιφάνεια του φύλλου τα έντομα και είχε γίνει η κατάλληλη επέμβαση.



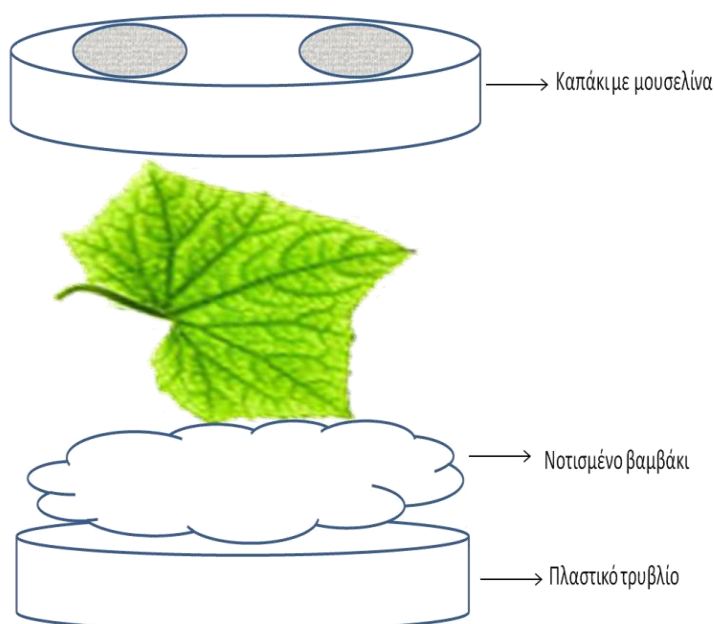
Εικόνα 27. Ατομικοί κλωβοί
(Πηγή: Τράκα Χρυσοβαλάντη)

5.2.5 Τρυβλία και ειδικές κατασκευές

Έγινε χρήση ειδικά διαμορφωμένων τρυβλίων Petri διαμέτρου 14cm και ύψους 1.5cm στην άνω επιφάνεια των οποίων είχαν διανοιχθεί δύο οπές διαμέτρου

4cm (Εικ. 28). Οι οπές καλύπτονταν με λεπτή μουσελίνα για την εξασφάλιση ικανοποιητικού αερισμού στο εσωτερικό του τρυβλίου. Τα τρυβλία χρησιμοποιήθηκαν για τα παρακάτω:

1. μεταφορά φύλλων, που περιείχαν μεγάλο αριθμό ατόμων, από τις εκτροφές στον εργαστηριακό χώρο,
2. τοποθέτηση ενηλίκων από όλα τα είδη εχθρών με σκοπό τον συγχρονισμό τους και
3. τοποθέτηση νυμφών 1ης ηλικίας από τις επεμβάσεις για διερεύνηση της επίδρασης των αιθερίων ελαίων σε αυτές και στο αναπαραγωγικό δυναμικό τους.

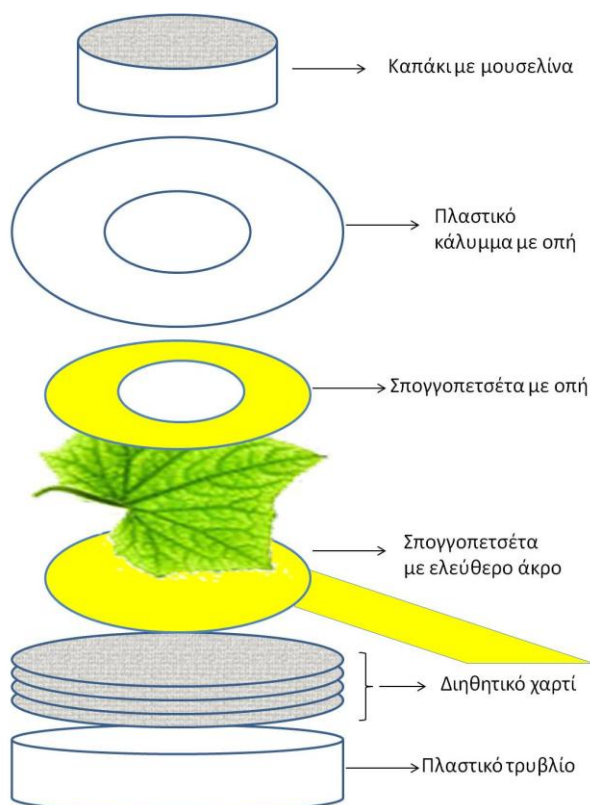


Εικόνα 28. Ειδικά διαμορφωμένο τρυβλίο Petri (Πηγή: Τράκα Χρυσοβαλάντη)

Επίσης, χρησιμοποιήθηκε ειδική κατασκευή για την διεξαγωγή των πειραμάτων που αφορούσαν το άκαρι *T. urticae*. Στην εικόνα 29 αναπαριστάται η κατασκευή αυτή, η οποία απαρτίζεται από πλαστικό τρυβλίο Petri διαμέτρου 8cm και ύψους 1.5cm, γεμισμένο με φύλλα διηθητικού χαρτιού επάνω στα οποία τοποθετείτο δίσκος σπογγοπετσέτας (vetex) ίσης διαμέτρου με ελεύθερο άκρο. Εν συνεχεία, τοποθετείτο ανεστραμμένο το φύλλο αγγουριού, δίσκος σπογγοπετσέτας (vetex) με οπή διαμέτρου 2.5cm, πλαστικό κάλυμμα με οπή ίσης διαμέτρου για την στήριξη της

κατασκευής και τέλος πλαστικό καπάκι διαμέτρου 5cm και ύψους 1.5cm με μουσελίνα για τον αερισμό του εσωτερικού.

Οι κατασκευές μεταφέρονταν εντός λευκού πλαστικού δίσκου διαστάσεων 43cm x 32cm x 3cm ο οποίος πληρωνόταν με νερό. Με την απορρόφηση νερού από το ελεύθερο άκρο της σπογγοπετσέτας επιτυγχάνονταν η διατήρηση της σπαργής του φύλλου.



Εικόνα 29. Ειδική κατασκευή για την διεξαγωγή των πειραμάτων του *T. urticae* (Πηγή: Τράκα Χρυσοβαλάντη)

5.3 Διεξαγωγή πειραμάτων

Για τον έλεγχο της τοξικότητας των αιθερίων ελαίων και των υδρολυμάτων τους επί των *A. gossypii*, *M. persicae* και *T. urticae*, η σειρά των ενεργειών περιελάμβανε τον συγχρονισμό των εντόμων και ακάρεων με σκοπό την ανάπτυξη ικανοποιητικού αριθμού ατόμων ίδιας ηλικίας, την παρασκευή των γαλακτωμάτων και τέλος τις επεμβάσεις.

5.3.1 Συγχρονισμός ενήλικων εντόμων και ακάρεων

Η συλλογή των αφίδων και του τετράνυχου που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα έγιναν από φύλλα φυτών αγγουριού και μελιτζάνας των εκτροφών, στα οποία είχαν αναπτυχθεί μεγάλοι πληθυσμοί. Με την χρήση λεπτού πινέλου και την βοήθεια στερεοσκοπίου μεταφέρονταν 10-15 ενήλικα άπτερα θηλυκά άτομα αφίδων και 20-25 ενήλικα θηλυκά άτομα τετράνυχου, σε κάθε ένα από τα ειδικά διαμορφωμένα τρυβλία.

Η βάση των τρυβλίων είχε επικαλυφθεί με λεπτή στρώση κατάλληλα διαβρεγμένου με νερό βάμβακος, επί της οποίας είχε τοποθετηθεί τεμάχιο φύλλου αγγουριού στην περίπτωση των *A. gossypii* και *T. urticae* (Εικ. 30), ενώ στην περίπτωση του *M. persicae* φύλλο μελιτζάνας. Στο σημείο κοπής του μίσχου του φύλλου τοποθετείτο κομμάτι διαβρεγμένου βάμβακος, ώστε το φύλλο να διατηρείται στην καλύτερη δυνατή κατάσταση.

Μετά την εισαγωγή των εντόμων και ακάρεων ακολουθούσε κλείσιμο των τρυβλίων με φιλμ παραφίνης (παραφίλμ) και μεταφορά τους σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών με θερμοκρασία $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, σχετική υγρασία $65\pm 5\%$ και φωτοπερίοδο 16 ώρες φως: 8 ώρες σκότος. Μετά την παρέλευση ενός 24ώρου τα ενήλικα αφαιρούνταν και τα τρυβλία με τις νύμφες 1ης ηλικίας των αφίδων ή με τα ωά του τετράνυχου επανατοποθετούνταν στον θάλαμο όπου και διατηρούνταν μέχρι την εμφάνιση των ενηλίκων τους. Κατά τον τρόπο αυτό λαμβάνονταν ενήλικα άτομα 1ης ημέρας και από τα τρία είδη εχθρών που χρησιμοποιήθηκαν στα βιολογικά πειράματα.



Εικόνα 30. Τρυβλία Petri εντός των οποίων τοποθετείτο το φύλλο με ενήλικα θηλυκά με σκοπό την απόκτηση ενηλίκων ίδιας ηλικίας (συγχρονισμός) (Πηγή: Τράκα Χρυσοβαλάντη)

5.3.2 Παρασκευή γαλακτώματων

Για να μελετηθεί η επίδραση των αιθερίων ελαίων των *O. basilicum* και *R. chalepensis* στους εχθρούς *A. gossypii*, *M. persicae* και *T. urticae*, παρασκευάζονταν γαλακτώματα που περιείχαν ξεχωριστά το κάθε έλαιο το οποίο είχε παραληφθεί όπως αναφέρεται στο 5.1.2.

Μετά από προκαταρκτικά πειράματα και με βάση προηγούμενες μελέτες (Pettrakis *et al.*, 2014; Pettrakis *et al.*, 2015) δοκιμάστηκαν πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις από κάθε έλαιο και στους τρεις εχθρούς. Οι συγκεντρώσεις ήταν: 0.05% (v/v), 0.1% (v/v), 0.25% (v/v), 0.5% (v/v) και 1% (v/v). Συνολικά παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν 1200mL γαλακτώματος. Η αραίωση των αιθερίων ελαίων πραγματοποιούνταν σε απιονισμένο νερό με την προσθήκη δύο γαλακτωματοποιητών του Tween 80 και του Triton X-100.

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- ❖ θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας
- ❖ κρυσταλλωτήριο
- ❖ στατό

- ❖ ογκομετρικός κύλινδρος
- ❖ κωνική φιάλη
- ❖ πώμα από Terphon
- ❖ υδατόλουτρο υπερήχων
- ❖ γυάλινη χοάνη
- ❖ ψεκαστήρας των 50mL
- ❖ πιπέτες διαφόρων όγκων
- ❖ γαλακτωματοποιητές, αιθέρια έλαια, απιονισμένο νερό

Αρχικά, το κρυσταλλωτήριο, αφού πληρωνόταν με απιονισμένο νερό μέχρι το μέσον του, τοποθετείτο στον μαγνητικό αναδευτήρα ο οποίος είχε ρυθμιστεί σε θερμοκρασία 90°C περίπου. Έπειτα, εισάγονταν διαδοχικά στο εσωτερικό του τα φιαλίδια με τους γαλακτωματοποιητές και αφήνονταν εκεί μέχρι να θερμανθούν τόσο, ώστε το περιεχόμενο να είναι πιο ρευστό και έτοιμο προς χρήση. Δευτερευόντως, ποσότητα απιονισμένου νερού ίση με 40mL τοποθετείτο στην κωνική φιάλη και στην συνέχεια προστίθεντο ανάλογος όγκος από τους γαλακτωματοποιητές σε συγκέντρωση 0.2 % (v/v) και το κάθε αιθέριο έλαιο (με την βοήθεια πιπέτας), προκειμένου να ληφθεί κάθε μία από τις συγκεντρώσεις. Για να πραγματοποιηθεί η γαλακτωματοποίηση, η κωνική φιάλη σφραγίζονταν με πώμα από Terphon και εμβαπτιζόταν στο υδατόλουτρο υπερήχων, συχνότητας 35 kHz, σε θερμοκρασία 25°C για 30 λεπτά. Σε περίπτωση δημιουργίας φυσαλίδων ακολούθησε μηχανική ανάδευση μέχρι κατάρρευσης αυτών.

Τέλος, το γαλάκτωμα που προέκυπτε ενσωματωνόταν με την βοήθεια χοάνης στον ψεκαστήρα και χρησιμοποιούνταν αμέσως μετά στα βιολογικά πειράματα. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνονταν και για τα δύο έλαια όλων των συγκεντρώσεων.

5.3.3 Προετοιμασία υδρολυμάτων

Όσον αφορά τα υδρολύματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αυτούσια, όπως παραλήφθηκαν κατά την διαδικασία της υδροαπόσταξης και χωρίς να υποστούν περαιτέρω επεξεργασία. Συλλέγονταν περίπου 40mL υδρολύματος έπειτα από κάθε μία εκ των δύο αποστάξεων που πραγματοποιήθηκαν για κάθε φυτό. Συνολικά, προέκυψαν ύστερα από συνένωση δύο υδρολύματα, βασιλικού και

απήγανου, όγκου 80mL. Μέχρι την εφαρμογή τους αυτά συντηρήθηκαν στο ψυγείο στους 4°C.

Επισημαίνεται ότι η επίδραση των υδρολυμάτων ελέγχθηκε στο ένα εκ των δύο ειδών αφίδων, συγκεκριμένα στο *A. gossypii*, λόγω της μεγαλύτερης ευαισθησίας που παρουσίασε στα πειράματα των γαλακτωμάτων σε σύγκριση με το *M. persicae* και στο άκαρι *T. urticae*.

5.3.4 Διαδικασία επεμβάσεων

Βιοδοκιμές για έλεγχο της τοξικής δράσης (πρόκλησης θνησιμότητας) και επίδρασης στο αναπαραγωγικό δυναμικό του *A. gossypii*, *M. persicae* και *T. urticae*, των αιθερίων ελαίων και των υδρολυμάτων τους

Στα πειράματα έγινε έλεγχος της αποτελεσματικότητας της δράσης των αιθερίων ελαίων και των υδρολυμάτων τους, στις αφίδες και στον τετράνυχο.

A) Επεμβάσεις στο *A. gossypii* και στο *M. persicae*

Πραγματοποιήθηκαν ψεκασμοί φύλλων σε φυτά αγγουριού και μελιτζάνας με γαλακτώματα αιθερίων ελαίων ορισμένων συγκεντρώσεων. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν απιονισμένο νερό, γαλάκτωμα που στερούταν αιθέριου ελαίου και εντομοκτόνα σκευάσματα. Τα φυτά που επιλέχθηκαν για κάθε μεταχείριση βρίσκονταν στο ίδιο στάδιο ανάπτυξης των 5-6 πραγματικών φύλλων. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε και για τα δύο είδη αφίδων ήταν η παρακάτω.

Αρχικά 5 ενήλικα θηλυκά άπτερα άτομα αφίδων ηλικίας μικρότερης των 24h, τοποθετούνταν στην κάτω επιφάνεια ενός φύλλου και στην συνέχεια ψεκάζονταν με γαλάκτωμα αιθέριου ελαίου από απόσταση 20cm μέχρι απορροής (15-17 ψεκασμοί) με ψεκαστήρα χωρητικότητας 50mL. Στην περίπτωση του μάρτυρα λάμβαναν χώρα ψεκασμοί με απιονισμένο νερό, ενώ των εντομοκτόνων ψεκασμοί με σκευάσματα που είχαν έγκριση για το κάθε είδος και καλλιέργεια, συγκεκριμένα σκευάσματα της δραστικής ουσίας pymetrozine (Plenum 50WG) για το *A. gossypii* και της δραστικής ουσίας deltamethrin (Decis 2.5EC) για το *M. persicae*, στις συνιστώμενες δόσεις 20g

σκευάσματος ανά 100L ψεκαστικού υγρού και 50mL σκευάσματος ανά 100L ψεκαστικού υγρού αντίστοιχα. Ακολούθως, το ψεκασμένο φύλλο καλυπτόταν από ατομικό κλωβό (βλ. παράγραφο 5.2.4) μετά από διάστημα 1 λεπτού από τον ψεκασμό. Σε κάθε φυτό ψεκάζονταν 2 φύλλα. Πραγματοποιούνταν 10 επαναλήψεις, οπότε συνολικά χρησιμοποιούνταν 50 άτομα αφίδων και κατ' επέκταση 5 φυτά για κάθε συγκέντρωση, μάρτυρα και εντομοκτόνο σκεύασμα (Εικ. 31).

Μετά το τέλος των ψεκασμών τα φυτά με τους ατομικούς κλωβούς τοποθετούνταν σε πλαστικό δίσκο και μεταφέρονταν στον θάλαμο. Οι συνθήκες που διατηρούνταν μέχρι το πέρας των πειραμάτων ήταν: θερμοκρασία $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, σχετική υγρασία $65\pm 5\%$ και φωτοπερίοδο 16 ώρες φως: 8 ώρες σκότος. Η επιβίωση και οι απόγονοι των αφίδων καταγράφονταν κάθε 24 ώρες για 7 ημέρες. Σε κάθε περίπτωση τα νεαρά άτομα απομακρύνονταν. Οι ίδιες ενέργειες ακολουθήθηκαν και για τα υδρόλύματα που εφαρμόστηκαν επί του *A. gossypii*.



Εικόνα 31. Φυτό αγγουριού (αριστερά) και μελιτζάνας (δεξιά), φύλλα με αφίδες τα οποία είχαν ψεκαστεί και καλυφθεί με ατομικό κλωβό (Πηγή: Τράκα Χρυσοβαλάντη)

B) *T. urticae*

Έλαβαν χώρα ψεκασμοί φυλλικών δίσκων αγγουριού με γαλακτώματα αιθερίων ελαίων ορισμένων συγκεντρώσεων. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν απιονισμένο νερό, γαλάκτωμα που στερούνταν αιθέριου ελαίου και εντομοκτόνο-ακαρεοκτόνο σκεύασμα.

Αρχικά 5 ενήλικα θηλυκά άτομα τετράνυχου τοποθετούνταν στην ανεστραμμένη επιφάνεια του φύλλου αγγουριού εντός της ειδικής κατασκευής που περιγράφηκε παραπάνω (βλ. παράγραφο 5.2.5) και ακολουθούσε ψεκασμός του φυλλικού δίσκου (3 ψεκασμοί) με ψεκαστήρα χωρητικότητας 50mL. Στην περίπτωση του μάρτυρα πραγματοποιούνταν ψεκασμοί με απιονισμένο νερό, ενώ του εντομοκτόνου-ακαρεοκτόνου ψεκασμοί με σκεύασμα της δραστικής ουσίας abamectin (Abamectin 1.8EC), στην συνιστώμενη δόση 80mL σκευάσματος ανά 100L ψεκαστικού υγρού.

Εν συνεχεία, κλείνονταν οι κατασκευές με το καπάκι και λάστιχο εφαρμοζόταν περιμετρικά για περαιτέρω στήριξη (Εικ. 32). Οι κατασκευές τοποθετούνταν εντός πλαστικού δίσκου πληρωμένου με νερό και μεταφέρονταν στον θάλαμο, σε συνθήκες θερμοκρασίας $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, σχετικής υγρασίας $65\pm 5\%$ και φωτοπεριόδου 16 ώρες φως: 8 ώρες σκότος. Συνολικά 10 επαναλήψεις λάμβαναν χώρα και 50 άτομα τετράνυχου χρησιμοποιούνταν για κάθε συγκέντρωση, μάρτυρα και σκεύασμα. Η επιβίωση και το ωοπαραγωγικό δυναμικό του τετράνυχου καταγράφονταν κάθε 24 ώρες για 7 ημέρες. Σε κάθε παρατήρηση απομακρύνονταν τα ωά του τετράνυχου. Η ίδια σειρά ενεργειών πραγματοποιούνταν και για τα υδρολύματα επί του *T. urticae*.



Εικόνα 32. Ειδικά τροποποιημένα τρυβλία Petri που χρησιμοποιούνται για την μελέτη της επίδρασης αιθερίων ελαίων και υδρολυμάτων σε άτομα (Πηγή: Τράκα Χρυσοβαλάντη)

Επίδραση αιθερίων ελαίων στους απογόνους των ψεκασμένων αφίδων και στο αναπαραγωγικό δυναμικό αυτών

Για την μελέτη της πιθανής συνέχισης ύπαρξης επίδρασης του αιθερίου ελαίου στην αναπαραγωγή των απογόνων των ψεκασμένων αφίδων και του τετρανύχου διεξήχθη το παρακάτω πείραμα. Κατά την παρατήρηση της 1ης, 3ης και 5ης ημέρας, νύμφες 1ης ηλικίας συλλέγονταν από τις επαναλήψεις κάθε συγκέντρωσης και τοποθετούνταν εντός ειδικά διαμορφωμένων τρυβλίων (βλ. παράγραφο 5.2.5). Αφήνονταν μέχρι να ενηλικιωθούν και στην συνέχεια λαμβάνονταν μετρήσεις επί των απογόνων τους. Η διεξαγωγή της δεύτερης αυτής φάσης των πειραμάτων γινόταν ως εξής.

Νύμφες (απόγονοι) που βρίσκονταν στα ψεκασμένα φύλλα την 1η, 3η ή 5η ημέρα από την επέμβαση μεταφέρονταν και τοποθετούνταν ξεχωριστά σε τρυβλία με ψεκασμένο (είχε ψεκαστεί με γαλάκτωμα αιθερίου ελαίου ταυτόχρονα με την αρχική επέμβαση) και απέκαστο φύλλο. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ψεκασμένα με απιονισμένο νερό φύλλα και απέκαστα φύλλα αγγουριού ή μελιτζάνας, ανάλογα με το είδος της αφίδας. Σε κάθε περίπτωση ο αριθμός των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν περίπου 15. Τα τρυβλία μεταφέρονταν στον θάλαμο και παρέμεναν εκεί εντός πλαστικού δίσκου σε συνθήκες θερμοκρασίας $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, σχετικής υγρασίας $65\pm 5\%$ και φωτοπεριόδου 16 ώρες φως: 8 ώρες σκότος. Μέχρι την ενηλικίωση των αφίδων γινόταν καθημερινός έλεγχος της επιβίωσης τους και εν συνεχεία, καταγραφόταν ο αριθμός των απογόνων τους κάθε 24 ώρες για 7 ημέρες.

Επίδραση των αιθερίων ελαίων στην εκκόλαπιμότητα των ωών του τετρανύχου

Κατά αντιστοιχία με την μελέτη της επίδρασης των επεμβάσεων στους απογόνους των αφίδων, κατά τις παρατηρήσεις της 1ης, 3ης και 5ης, ωά τετρανύχου συλλέγονταν από τις επαναλήψεις κάθε συγκέντρωσης και τοποθετούνταν εντός ειδικής κατασκευής (βλ. παράγραφο 5.2.5). Στην συνέχεια, λαμβάνονταν μετρήσεις επί της εκκόλαψης των ωών. Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιούνταν ως παρακάτω.

Αρχικά 20 ωά 1ης ημέρας (και αντίστοιχα 3ης και 5ης ημέρας) από τις επεμβάσεις τοποθετούνταν στην κάτω επιφάνεια ψεκασμένου φύλλου αγγουριού που

είχε δεχθεί την ίδια μεταχείριση με τις επεμβάσεις, την ίδια χρονική στιγμή. Κατόπιν το φύλλο τοποθετείτο ανεστραμμένο εντός των ειδικά τροποποιημένων τρυβλίων. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν φύλλα ψεκασμένα με απιονισμένο νερό. Οι ειδικές κατασκευές μεταφέρονταν εντός πληρωμένου με νερό πλαστικού δίσκου στον θάλαμο σε συνθήκες θερμοκρασίας $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, σχετικής υγρασίας $65\pm 5\%$ και φωτοπεριόδου 16 ώρες φως: 8 ώρες σκότος και ακολουθούσε καταγραφή της εκκόλαψης των ωών κάθε 24 ώρες για 7 ημέρες από την πρώτη εκκόλαψη.

5.4 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Τα δεδομένα που αφορούσαν την θνησιμότητα και τον αριθμό απογόνων των *A. gossypii*, *M. persicae* και *T. urticae* για κάθε μεταχείριση αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας την ανάλυση διασποράς με έναν, δύο ή τρεις παράγοντες (Two-way&Three-way ANOVA). Οι συγκρίσεις των μέσων πραγματοποιήθηκαν με την δοκιμασία Tukey-KramerHSD ($\alpha=0.05$). Οι αναλύσεις έλαβαν χώρα με την βοήθεια του στατιστικού λογισμικού JMP 8 (S.A.S. Institute). Τα δεδομένα θνησιμότητας υπέστησαν την γωνιακή μετατροπή και των απογόνων τη λογαριθμική.

Επιπρόσθετα, η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων του ποσοστού της εκκολαψιμότητας των ωών του τετράνυχου έγινε με την χρήση της δοκιμασίας χ^2 ($\alpha=0.05$).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 Απόδοση σε αιθέριο έλαιο

Τα αιθέρια έλαια των φυτών *O. basilicum* και *R. chalepensis* απομονώθηκαν με την τεχνική της υδροαπόσταξης και η ποσότητά τους εκφράστηκε σε mL/100g ξηρού φυτικού υλικού. Οι τιμές των αποδόσεων του βασιλικού και του απήγανου ήταν 0.6% (v/w) και 0.7% (v/w) αντίστοιχα.

6.2 Συγκέντρωση υδρολυμάτων σε πτητικά συστατικά

Τα υδρολύματα του βασιλικού και του απήγανου ελήφθησαν μετά το πέρας της υδροαπόσταξης. Με την τεχνική που αναφέρθηκε στο πειραματικό μέρος (βλ. 5.1.3) υπολογίστηκε η συγκέντρωση των υδρολυμάτων σε πτητικά συστατικά και εκφράστηκε σε g/100mL. Οι τιμές των αποδόσεων για τον βασιλικό και τον απήγανο ήταν 0.24 g/100mL και 0.22 g/100mL αντίστοιχα.

6.3 Αποτελέσματα GC-MS

Η ανάλυση των αιθερίων ελαίων και των αντίστοιχων υδρολυμάτων τους, που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε με αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματόμετρο μαζών (GC-MS). Με την τεχνική αυτή έλαβε χώρα ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των πτητικών συστατικών που περιέχονταν στα αιθέρια έλαια και υδρολύματα που απομονώθηκαν με υδροαπόσταξη.

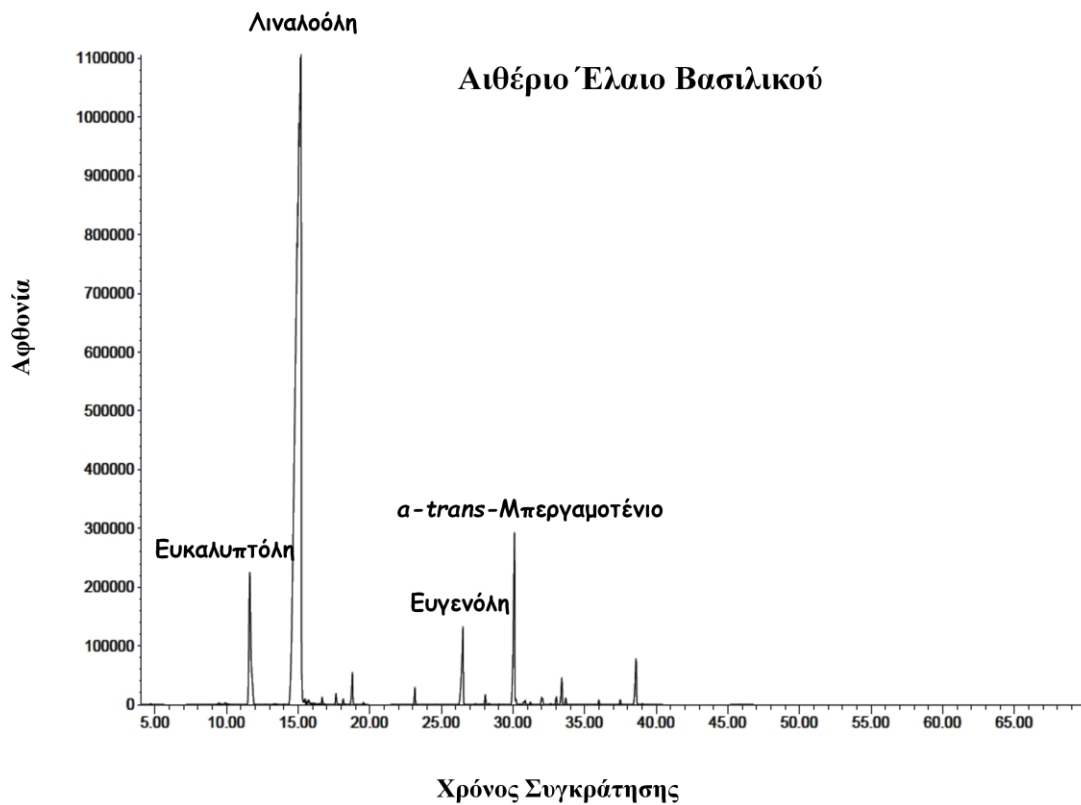
6.3.1 Χημική σύσταση αιθερίου ελαίου και υδρολύματος βασιλικού

Κατά την χρωματογραφική ανάλυση του αιθερίου ελαίου και του υδρολύματος του βασιλικού ελήφθησαν τα παρακάτω χρωματογραφήματα (Σχήμα 1, 2). Στο αιθέριο έλαιο του βασιλικού ως κύριο συστατικό βρέθηκε ότι είναι η λιναλοόλη σε ποσοστό 80%, ενώ σε μικρότερα ποσοστά απαντούν η ευκαλυπτόλη (6.4%), το *a-trans*-μπεργαμοτένιο (5.4%) και η ευγενόλη (3%).

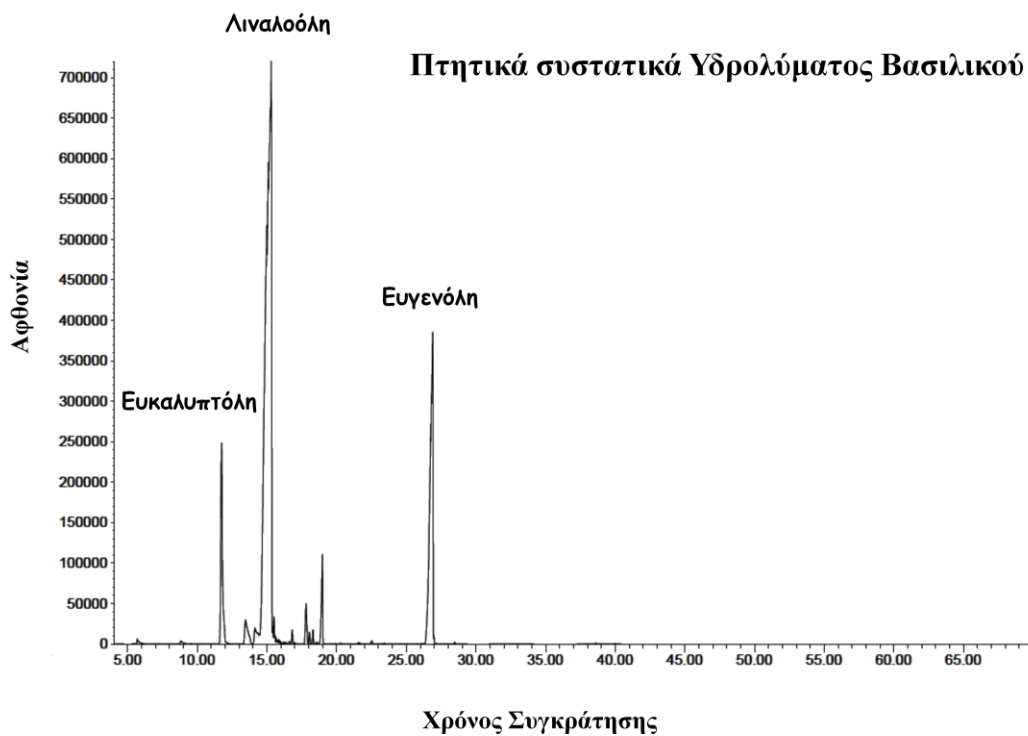
Όσον αφορά το υδρόλυμα του βασιλικού, το κύριο συστατικό βρέθηκε επίσης, ότι είναι η λιναλοόλη σε ποσοστό 66.5% και ακολούθησαν η ευγενόλη και η ευκαλυπτόλη σε ποσοστά 18.9% και 7.1% αντίστοιχα. Οι δομές των τριών κοινών συστατικών απεικονίζονται στο σχήμα 3.

Συνολικά ταυτοποιήθηκε το 99.4% των συστατικών του αιθερίου ελαίου και το 99.9% των συστατικών του υδρολύματος του βασιλικού, τα οποία υπάρχουν μαζί με τα αντίστοιχα ποσοστά τους στον πίνακα 2.

Συγκριτικά με το αιθέριο έλαιο αναφέρεται ότι το υδρόλυμα δεν περιείχε τερπενοειδείς υδρογονάνθρακες, αλλά μόνο οξυγονούχες ενώσεις οι οποίες είναι και πιο πολικές. Ως παράδειγμα σημειώνεται η περίπτωση του *a-trans*-μπεργαμοτένιου, το οποίο είναι ένας σεσκιτερπενικός υδρογονάνθρακας που περιλαμβανόταν στο αιθέριο έλαιο, ενώ απουσίαζε από το υδρόλυμα.



Σχήμα 1. Χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου του βασιλικού



Σχήμα 2. Χρωματογράφημα του κλάσματος των πτητικών συστατικών του υδρολύματος του βασιλικού

Πίνακας 2: Χημική σύσταση του αιθερίου ελαίου και του αντίστοιχου υδρολύματος που παραλήφθηκαν με υδροαπόσταξη από τον βασιλικό (*O. basilicum*)

| RT ^a | Συστατικά ^β | Χημική σύσταση (%) ^γ | |
|------------------------------|--|---------------------------------|-------------|
| | | Αιθέριο έλαιο | Υδρόλυμα |
| 11.7 | Ευκαλυπτόλη (1,8-κινέολη) | 6.4 | 7.1 |
| 13.4 | <i>cis</i> -Οξείδιο λιναλοόλης (φουρανικό) | - | 1.6 |
| 14.1 | <i>trans</i> -Οξείδιο λιναλοόλης (φουρανικό) | - | 1.1 |
| 15.1 | Λιναλοόλη | 80.0 | 66.5 |
| 15.5 | 2-Φαινυλοαιθανόλη | - | 0.5 |
| 16.7 | Καμφορά | 0.2 | 0.3 |
| 17.8 | <i>cis</i> -Οξείδιο λιναλοόλης (πυρανικό) | - | 1.2 |
| 18.1 | <i>trans</i> -Οξείδιο λιναλοόλης (πυρανικό) | - | 0.2 |
| 18.2 | Τερπινεν-4-όλη | 0.1 | 0.3 |
| 18.9 | α -Τερπινεόλη | 0.8 | 2.2 |
| 23.1 | Οξικό βορνύλιο | 0.4 | - |
| 26.7 | Ευγενόλη | 3.0 | 18.9 |
| 28.1 | β -Ελεμένιο | 0.2 | - |
| 30.1 | <i>a-trans</i> -Μπεργαμοτένιο | 5.4 | - |
| 30.2 | α -Γουαϊένιο | 0.1 | - |
| 32.0 | Γερμακρένιο D | 0.3 | - |
| 33.0 | α -Μπουλνεσένιο | 0.2 | - |
| 33.4 | γ -Καδινένιο | 0.7 | - |
| 37.5 | 1,10-δι-επι-Κουβενόλη | 0.1 | - |
| 38.6 | επι- α -Καδινόλη | 1.5 | - |
| Κατηγορίες Συστατικών | | | |
| | Οξυγονούχες ενώσεις | 92.5 | 99.9 |
| | Μη οξυγονούχες ενώσεις | 6.9 | - |
| | Συνολικά ταυτοποιήθηκαν (%) | 99.4 | 99.9 |

^a RT: Χρόνος συγκράτησης (retention time).

^β Τα συστατικά που εκλούνται από τη στήλη HP-5ms παρατίθενται με βάση το χρόνο συγκράτησής τους. Η ταυτοποίησή τους πραγματοποιήθηκε συγκρίνοντας τα φάσματα μάζας τους με τα αντίστοιχα φάσματα που περιλαμβάνονται στις ηλεκτρονικές βιβλιοθήκες NIST 98, Wiley 275 και στη βιβλιογραφία (Adams, 2007), όπως επίσης και με τη σύγκριση με τα φάσματα μαζών και τους χρόνους συγκράτησης προτύπων ουσιών.

^γ Εκατοστιαία περιεκτικότητα σύμφωνα με τα αποτελέσματα του GC-MS.

α)

β)

γ)

Σχήμα 3. Δομές α) λιναλοόλης, β) ευκαλυπτόλης (1,8-κινεόλης) και γ) ευγενόλης

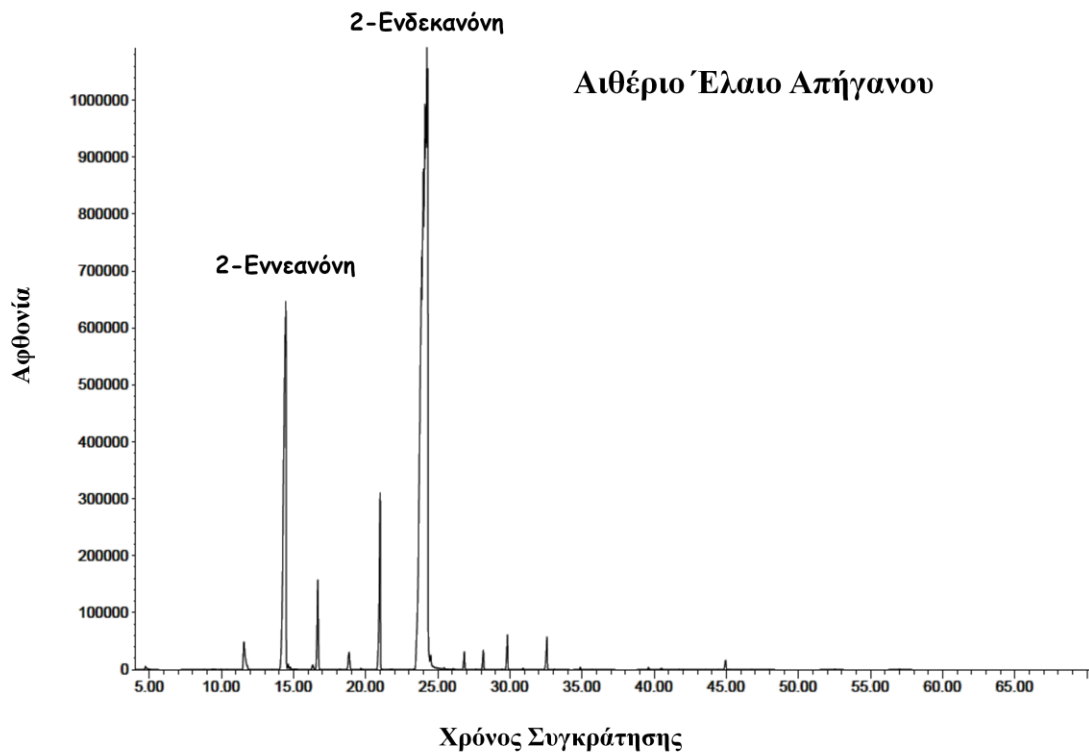
6.3.2 Χημική σύσταση αιθερίου ελαίου και υδρολύματος απήγανου

Κατά την χρωματογραφική ανάλυση του αιθερίου ελαίου και του υδρολύματος του απήγανου ελήφθησαν τα παρακάτω χρωματογραφήματα (Σχήμα 4, 5). Στο αιθέριο έλαιο του απήγανου ως κύριο συστατικό βρέθηκε ότι είναι η 2-ενδεκανόνη σε ποσοστό 72%, ενώ σε μικρότερο ποσοστό απαντά η 2-εννεανόνη (17.1%).

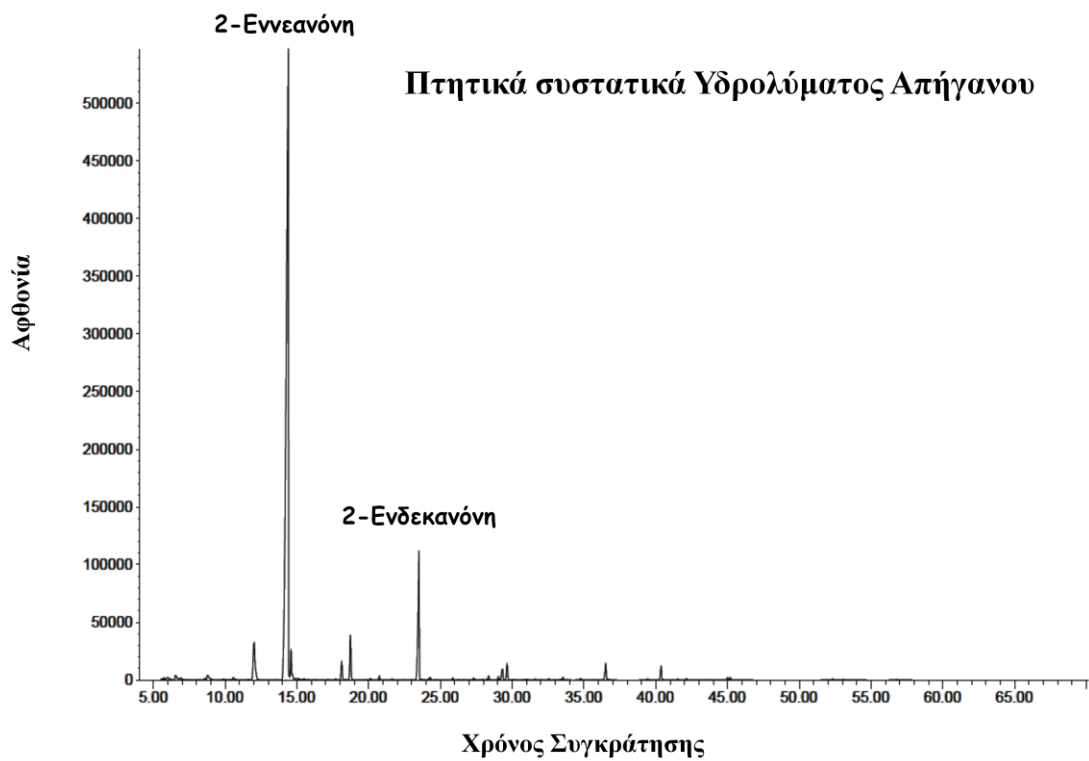
Όσον αφορά το υδρόλυμα του απήγανου το κύριο συστατικό βρέθηκε ότι είναι η 2-εννεανόνη σε ποσοστό 77% και ακολούθησε η 2-ενδεκανόνη σε ποσοστό 8.9%. Οι δομές των δύο κοινών συστατικών απεικονίζονται στο σχήμα 6.

Συνολικά ταυτοποιήθηκε το 94.7% των συστατικών του αιθερίου ελαίου και το 98.4% των συστατικών του υδρολύματος του απήγανου, τα οποία υπάρχουν μαζί με τα αντίστοιχα ποσοστά τους στον πίνακα 3.

Συγκριτικά με το αιθέριο έλαιο αναφέρεται ότι και στην περίπτωση του απήγανου το υδρόλυμα δεν περιείχε τερπενοειδείς υδρογονάνθρακες, αλλά μόνο οξυγονούχες ενώσεις. Το γεγονός ότι η 2-εννεανόνη βρέθηκε σε υψηλότερο ποσοστό στο υδρόλυμα οφείλεται στο ότι είναι πιο πολική ένωση από την 2-ενδεκανόνη και για τον λόγο αυτό καθίσταται πιο υδρόφιλη, με αυξημένη την συγκέντρωσή της στην υδατική φάση κατά την απόσταξη.



Σχήμα 4. Χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου του απήγανου



Σχήμα 5. Χρωματογράφημα του κλάσματος των πτητικών συστατικών του υδρολύματος του απήγανου

Πίνακας 3: Χημική σύσταση των υδρολυμάτων που παραλήφθηκαν με υδροαπόσταξη από τον βασιλικό (*O. basilicum*) και απήγανο (*R. chalepensis*).

| RT ^α | Συστατικά ^β | Χημική σύσταση (%) ^γ | |
|------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|-------------------|
| | | Υδρόλυμα Βασιλικού | Υδρόλυμα Απήγανου |
| 11.6 | Λιμονένιο | 1.1 | - |
| 12.0 | 2-Φαινυλοακεταλδεΐδη | - | 4.2 |
| 14.5 | 2-Εννεανόνη | 17.1 | 77.0 |
| 14.6 | 2-Εννεανόλη | 0.1 | 1.8 |
| 14.8 | <i>n</i> -Εννεανάλη | 0.1 | - |
| 16.7 | Γεϊχερένιο | 2.2 | - |
| 18.1 | Τερπινεν-4-όλη | - | 1.3 |
| 18.7 | α -Τερπινεόλη | - | 2.9 |
| 18.8 | 2-Δεκανόνη | 0.5 | - |
| 19.7 | Οξικό οκτύλιο | 0.1 | - |
| 23.8 | 2-Ενδεκανόνη | 72.0 | 8.9 |
| 24.5 | 2-Ενδεκανόλη | 0.4 | - |
| 28.2 | 2-Δωδεκανόνη | 0.4 | - |
| 29.6 | Δικταμινόλη | - | 1.1 |
| 32.6 | 2-Δεκατριανόνη | 0.7 | - |
| 36.5 | 3,4-Μεθυλενοδιοξυβενζυλική ακετόνη | - | 1.2 |
| Κατηγορίες Συστατικών | | | |
| | Οξυγονούχες ενώσεις | 91.4 | 98.4 |
| | Μη οξυγονούχες ενώσεις | 3.3 | - |
| | Συνολικά ταυτοποιήθηκαν (%) | 94.7 | 98.4 |

^α RT: Χρόνος συγκράτησης (retention time).

^β Τα συστατικά που εκλύονται από τη στήλη HP-5ms παρατίθενται με βάση το χρόνο συγκράτησής τους. Η ταυτοποίησή τους πραγματοποιήθηκε συγκρίνοντας τα φάσματα μάζας τους με τα αντίστοιχα φάσματα που περιλαμβάνονται στις ηλεκτρονικές βιβλιοθήκες NIST 98, Wiley 275 και στη βιβλιογραφία (Adams, 2007), όπως επίσης και με τη σύγκριση με τα φάσματα μαζών και τους χρόνους συγκράτησης προτύπων ουσιών.

^γ Εκατοστιαία περιεκτικότητα σύμφωνα με τα αποτελέσματα του GC-MS.

α)

β)

Σχήμα 6. Δομές α) 2-ενδεκανόνης και β) 2-εννεανόνης

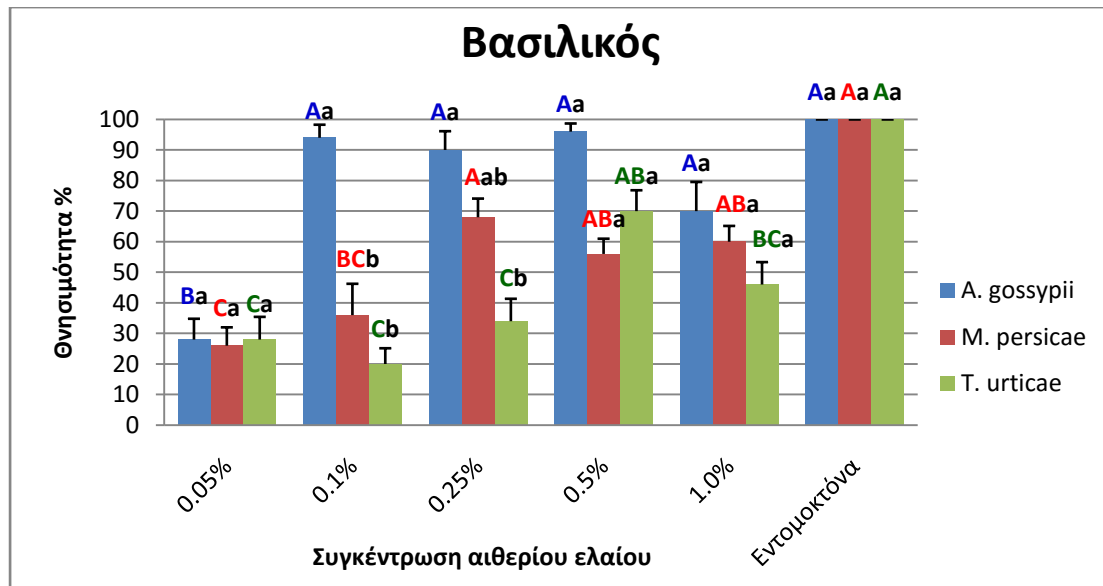
6.4 Αποτελέσματα Βιοδοκιμών

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν ώστε να γίνει έλεγχος της τοξικότητας των αιθερίων ελαίων και υδρολυμάτων των φυτών *O. basilicum* και *R. chalepensis*, ερευνήθηκε η επίδραση των ως άνω στην θνησιμότητα των εντόμων και ακάρεων καθώς και η επίδραση αυτών στο αναπαραγωγικό δυναμικό τους

6.4.1 Βιοδοκιμές με αιθέρια έλαια

α) Επίδραση στην θνησιμότητα

Πραγματοποιήθηκαν ψεκασμοί με γαλακτώματα και των δύο αιθερίων ελαίων στις εξής συγκεντρώσεις: 0.05% , 0.1%, 0.25%, 0.5% και 1%. Με το γαλάκτωμα του αιθερίου ελαίου του βασιλικού (Ιστόγραμμα 1.1) βρέθηκαν σημαντικές διαφορές ως προς την θνησιμότητα μεταξύ των διάφορων συγκεντρώσεων και των εχθρών σε σχέση με τους μάρτυρες και τα εντομοκτόνα. Η επίδραση της συγκέντρωσης του αιθερίου ελαίου ήταν σημαντική ($F_{5,162}=32.05$, $P<0.0001$). Η επίδραση του είδους του εχθρού ήταν σημαντική ($F_{2,162}=23.50$, $P<0.0001$). Επίσης, υπήρχε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ της συγκέντρωσης και του είδους του εχθρού ($F_{10,162}=5.24$, $P<0.0001$).



Ιστόγραμμα 1.1 Συνολικό ποσοστό θνησιμότητας ενηλίκων του *A. gossypii*, *M. persicae* και *T. urticae* μετά από 7 ημέρες από τον ψεκασμό τους με διάφορες συγκεντρώσεις γαλακτώματος αιθερίου ελαίου του βασιλικού καθώς και με εντομοκτόνο ή ακαρεοκτόνο. Τα κεφαλαία γράμματα του ίδιου χρώματος παρουσιάζουν τις διαφορές του ίδιου εχθρού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, ενώ τα μικρά τις διαφορές μεταξύ των τριών ειδών στην ίδια συγκέντρωση. Στην περίπτωση του μάρτυρα (απιονισμένο νερό και απιονισμένο νερό με γαλακτωματοποιητές) βρέθηκε μηδενική θνησιμότητα και για αυτό τα αποτελέσματα δεν εμφανίζονται στο ιστόγραμμα.

Σύμφωνα με το ιστόγραμμα 1.1 τα υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας εμφανίστηκαν στο *A. gossypii*, χαμηλότερα ποσοστά βρέθηκαν στο *T. urticae* σχεδόν σε όλες τις συγκεντρώσεις, ενώ το *M. persicae* έφερε ενδιάμεσες τιμές. Τα ποσοστά θνησιμότητας ήταν υψηλότερα στο *A. gossypii* στις συγκεντρώσεις 0.1%, 0.25% και 0.5% ($\geq 90\%$) και ακολούθησε η συγκέντρωση 1%, σε όλες αυτές τις συγκεντρώσεις η επίδραση δεν διέφερε σημαντικά από αυτή του εντομοκτόνου. Στην περίπτωση του *M. persicae* δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές με το εντομοκτόνο στις συγκεντρώσεις 0.25%, 0.5% και 1%, ενώ για το *T. urticae* μόνο στην συγκέντρωση 0.5%. Μεταξύ των ειδών στην ίδια συγκέντρωση υπήρξαν σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις 0.1% και 0.25% όπου το *A. gossypii* εμφάνισε σημαντικά μεγαλύτερη θνησιμότητα σε σχέση με τα άλλα δύο είδη, και σε σχέση με το *T. urticae*, σε κάθε

συγκέντρωση, αντίστοιχα. Οι δύο μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν περιείχαν απιονισμένο νερό και απιονισμένο νερό με γαλακτωματοποιητές και είχαν μηδενική θνησιμότητα. Στις εικόνες 33, α, β και γ φαίνονται τα νεκρά ενήλικα των τριών εχθρών.



α)



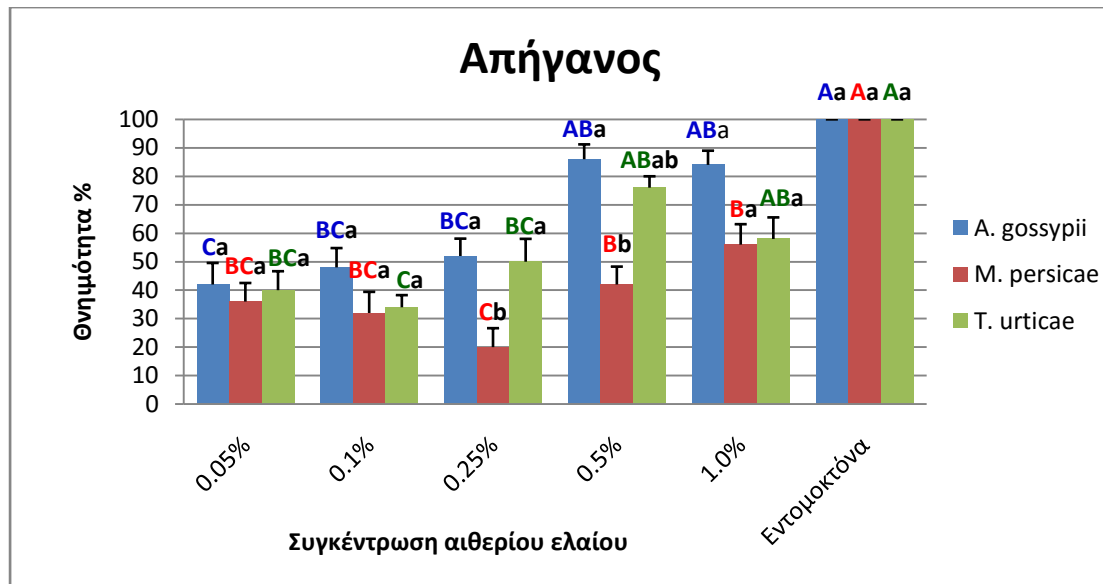
β)



γ)

Εικόνα 33. Νεκρό ενήλικο θηλυκό άτομο α) *A. gossypii*, β) *M. persicae*, γ) *T. urticae*
(Πηγή: Τράκα Χρυσοβαλάντη)

Η επίδραση του αιθερίου ελαίου του απήγανου (Ιστόγραμμα 1.2) επηρεάστηκε σημαντικά από την συγκέντρωση του ($F_{5,162}=31.66, P<0.0001$), το είδος του εχθρού ($F_{2,162}=16.45, P<0.0001$), ενώ και η αλληλεπίδρασή τους ήταν σημαντική ($F_{10,162}=2.30, P<0.0147$).



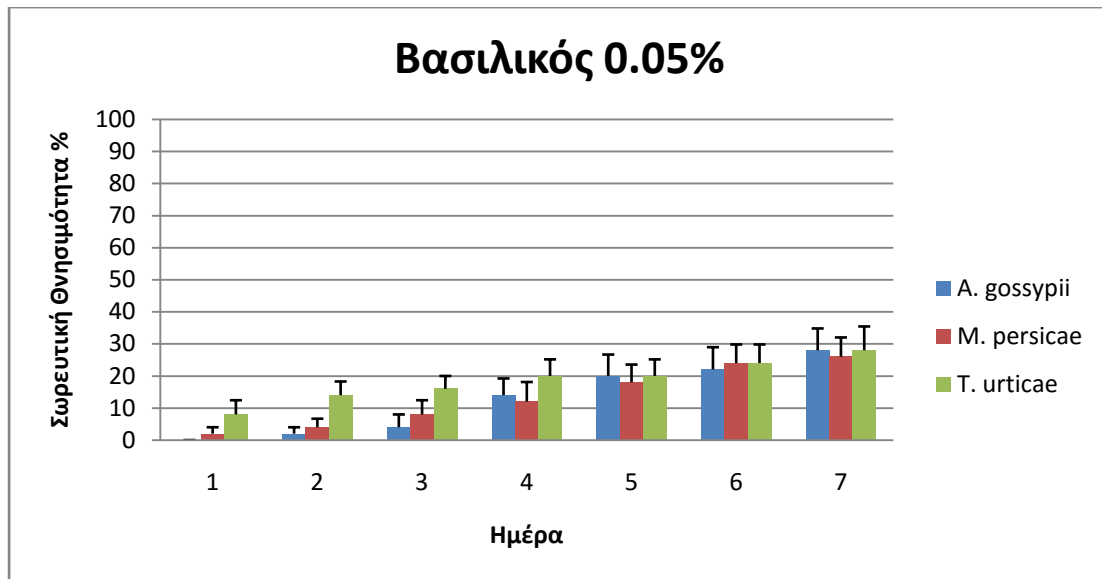
Ιστόγραμμα 1.2 Συνολικό ποσοστό θνησιμότητας ενηλίκων του *A. gossypii*, *M. persicae* και *T. urticae* μετά από 7 ημέρες από τον ψεκασμό τους με διάφορες συγκεντρώσεις γαλακτώματος αιθερίου ελαίου του απήγανου καθώς και με εντομοκτόνο ή ακαρεοκτόνο. Τα κεφαλαία γράμματα του ίδιου χρώματος παρουσιάζουν τις διαφορές του ίδιου εχθρού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, ενώ τα μικρά τις διαφορές μεταξύ των τριών ειδών στην ίδια συγκέντρωση. Στην περίπτωση του μάρτυρα (απιονισμένο νερό και απιονισμένο νερό με γαλακτωματοποιητές) βρέθηκε μηδενική θνησιμότητα και για αυτό τα αποτελέσματα δεν εμφανίζονται στο ιστόγραμμα.

Σύμφωνα με το ιστόγραμμα 1.2 το *A. gossypii* εμφάνισε τα υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας που δεν διέφεραν από το εντομοκτόνο στις συγκεντρώσεις 0,5% και 1%. Αντίθετα, η επίδραση στους άλλους δύο εχθρούς ήταν σημαντικά μικρότερη από αυτή του εντομοκτόνου, αν και οριακά μη σημαντική στην περίπτωση του *T. urticae* στην συγκέντρωση του 1% και μη σημαντική στην συγκέντρωση 0.5%. Μεταξύ των ειδών στην ίδια συγκέντρωση διαφορές υπήρξαν στη συγκέντρωση 0.25% όπου η επίδραση στο *M. persicae* ήταν σημαντικά μικρότερη, καθώς και στην συγκέντρωση 0.5% με το *M. persicae* να παίρνει μικρότερη τιμή αν και μη σημαντικά διαφορετική από το *T. urticae*. Αξίζει να σημειωθεί ότι η θνησιμότητα δεν αυξανόταν σημαντικά με την αύξηση της συγκέντρωσης στην περίπτωση του *M. persicae*, αλλά σημαντικά μικρότερη θνησιμότητα βρέθηκε στην συγκέντρωση 0.25%. Οι μάρτυρες προκάλεσαν μηδενική θνησιμότητα.

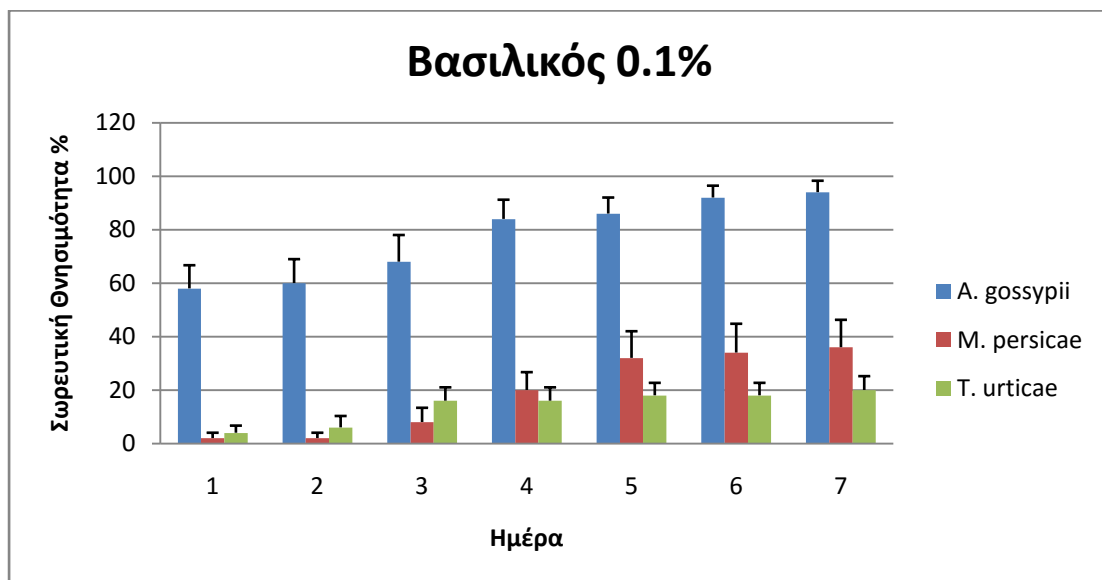
Γενικά ο παράγοντας ‘φυτό’, δηλαδή το φυτό προέλευσης του αιθερίου ελαίου (βασιλικός ή απήγανος) δεν είχε σημαντική επίδραση στην θνησιμότητα ($F_{1,270}=0.63$, $P>0.428$), ενώ η συγκέντρωση είχε σημαντική επίδραση ($F_{4,270}=24.50$, $P<0.0001$), όπως και η αλληλεπίδραση του φυτού με την συγκέντρωση ($F_{4,270}=6.00$, $P<0.0001$). Ο παράγοντας είδος εχθρού παρουσίασε σημαντική επίδραση ($F_{2,270}=30.15$, $P<0.0001$) με το *A. gossypii* να είναι περισσότερο ευαίσθητο καθώς και η αλληλεπίδραση μεταξύ του φυτού και του είδους είχε σημαντική επίδραση ($F_{2,270}=10.24$, $P<0.0001$). Ακόμη, η συγκέντρωση με το είδος έφεραν σημαντική αλληλεπίδραση ($F_{8,270}=3.50$, $P<0.0008$) και το φυτό με την συγκέντρωση και το είδος είχαν σημαντική αλληλεπίδραση ($F_{8,270}=2.91$, $P<0.004$).

Από τα ιστογράμματα 1.1 και 1.2 τα γαλακτώματα των δύο αιθερίων ελαίων φαίνεται να έχουν ισχυρότερη δράση στην θνησιμότητα της αφίδας *A. gossypii*, ενώ τα είδη *M. persicae* και *T. urticae* εμφανίζουν αντίστροφη εικόνα, με το γαλάκτωμα του βασιλικού να δρα περισσότερο στο *M. persicae* και του απήγανου στο *T. urticae*.

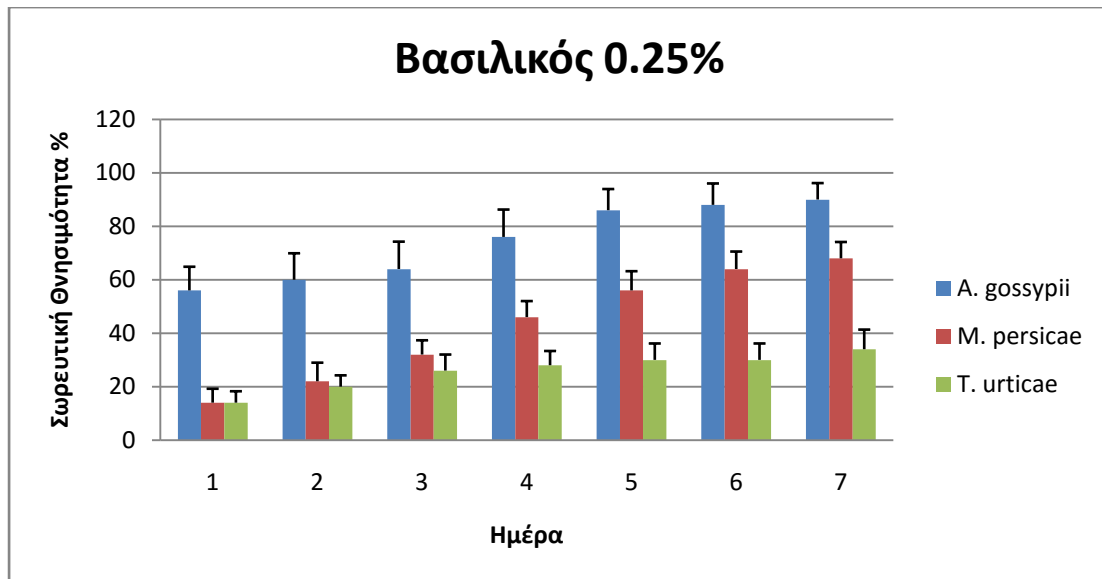
Εν συνεχεία, ακολουθούν τα ιστογράμματα (Ιστόγραμμα 1.3-1.12) του ποσοστού της σφρευτικής (ή αθροισόμενης κάθε φορά) θνησιμότητας των εχθρών και για τα δύο αιθέρια έλαια, για κάθε συγκέντρωση ξεχωριστά (ανά ημέρα για 7 ημέρες). Όσον αφορά το γαλάκτωμα του αιθερίου ελαίου του βασιλικού η επίδραση της ημέρας βρέθηκε ότι είναι σημαντική ($F_{6,945}=49.20$, $P<0.0001$). Η συγκέντρωση του αιθερίου ελαίου εμφανίζεται εξίσου σημαντική ($F_{14,945}=67.05$, $P<0.0001$), ενώ μεταξύ της ημέρας και της συγκέντρωσης δεν υπήρχε σημαντική αλληλεπίδραση ($F_{84,945}=0.68$, $P>0.9879$). Στο αντίστοιχο γαλάκτωμα του αιθερίου ελαίου του απήγανου βρέθηκε επίσης ότι η επίδραση της ημέρας ήταν σημαντική ($F_{6,945}=56.40$, $P<0.0001$), η επίδραση της συγκέντρωσης ήταν σημαντική ($F_{14,945}=42.40$, $P<0.0001$), ενώ η αλληλεπίδραση μεταξύ της ημέρας και της συγκέντρωσης δεν ήταν σημαντική ($F_{84,945}=0.57$, $P>0.9994$).



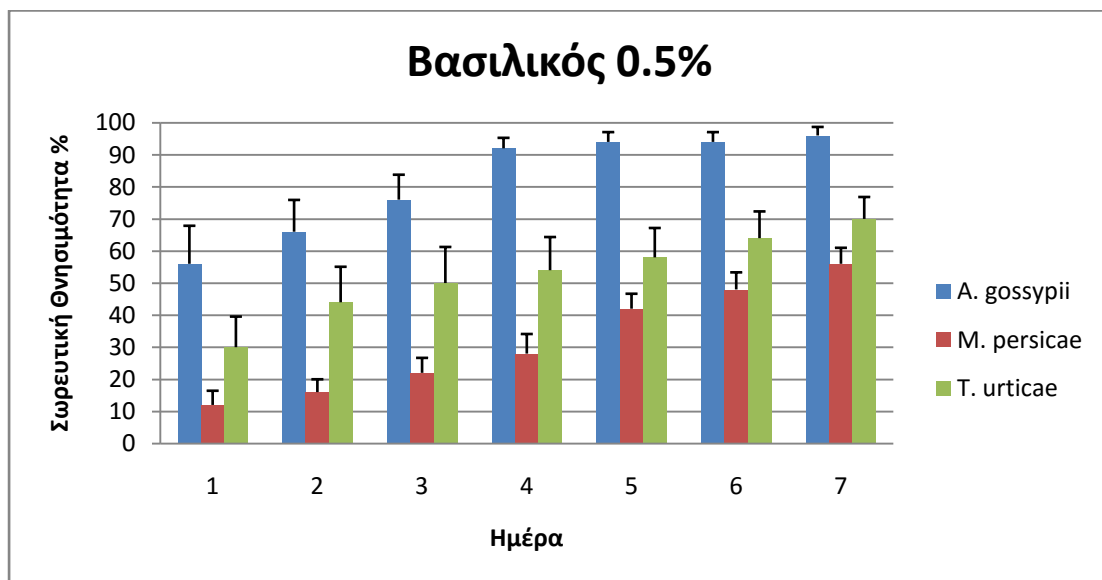
Ιστόγραμμα 1.3 Σωρευτικό ποσοστό θνησιμότητας ανά εχθρό και ανά ημέρα για επτά ημέρες από την επέμβαση με γαλάκτωμα αιθερίου ελαίου του βασιλικού συγκέντρωσης 0.05%. ΑΞΟΝΑΣ X : Ημέρα από την επέμβαση



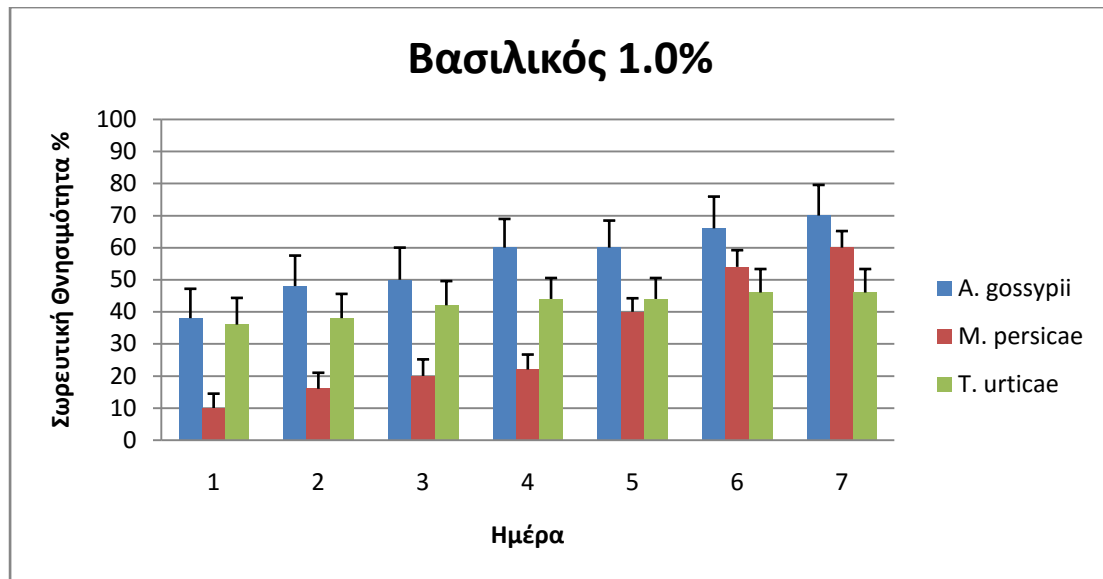
Ιστόγραμμα 1.4 Σωρευτικό ποσοστό θνησιμότητας ανά εχθρό και ανά ημέρα για επτά ημέρες από την επέμβαση με γαλάκτωμα αιθερίου ελαίου του βασιλικού συγκέντρωσης 0.1%. ΑΞΟΝΑΣ X : Ημέρα από την επέμβαση



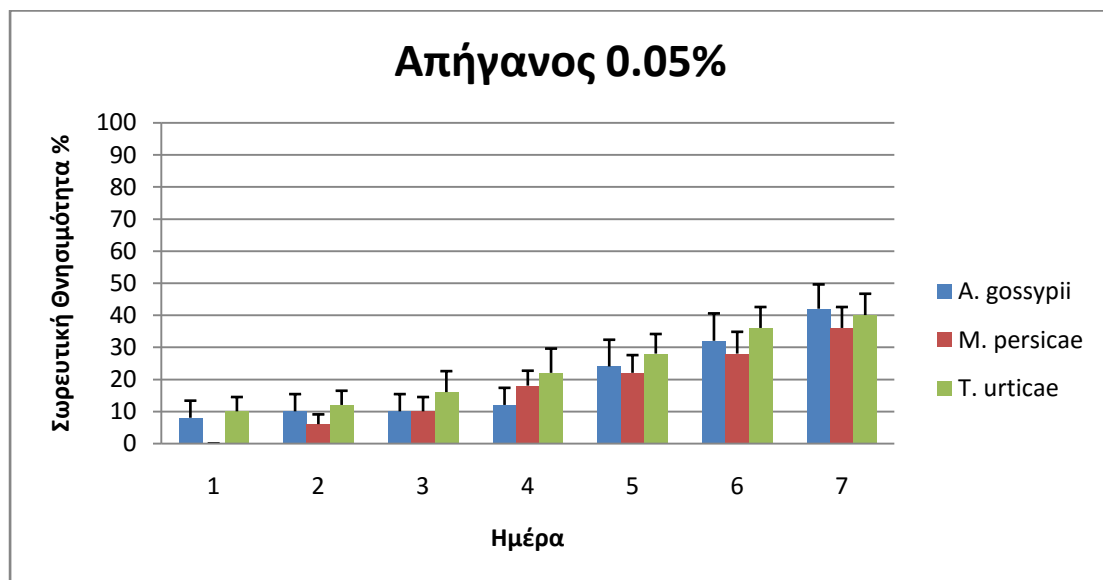
Ιστόγραμμα 1.5 Σωρευτικό ποσοστό θνησιμότητας ανά εχθρό και ανά ημέρα για επτά ημέρες από την επέμβαση με γαλάκτωμα αιθερίου ελαίου του βασιλικού συγκέντρωσης 0.25%. ΑΞΟΝΑΣ X : Ημέρα από την επέμβαση



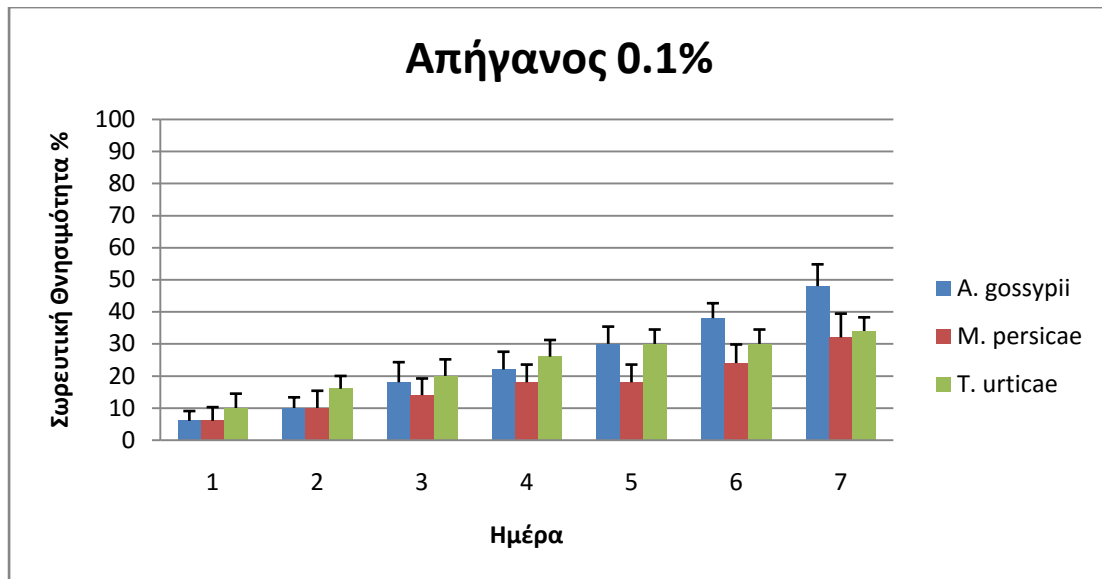
Ιστόγραμμα 1.6 Σωρευτικό ποσοστό θνησιμότητας ανά εχθρό και ανά ημέρα για επτά ημέρες από την επέμβαση με γαλάκτωμα αιθερίου ελαίου του βασιλικού συγκέντρωσης 0.5%. ΑΞΟΝΑΣ X : Ημέρα από την επέμβαση



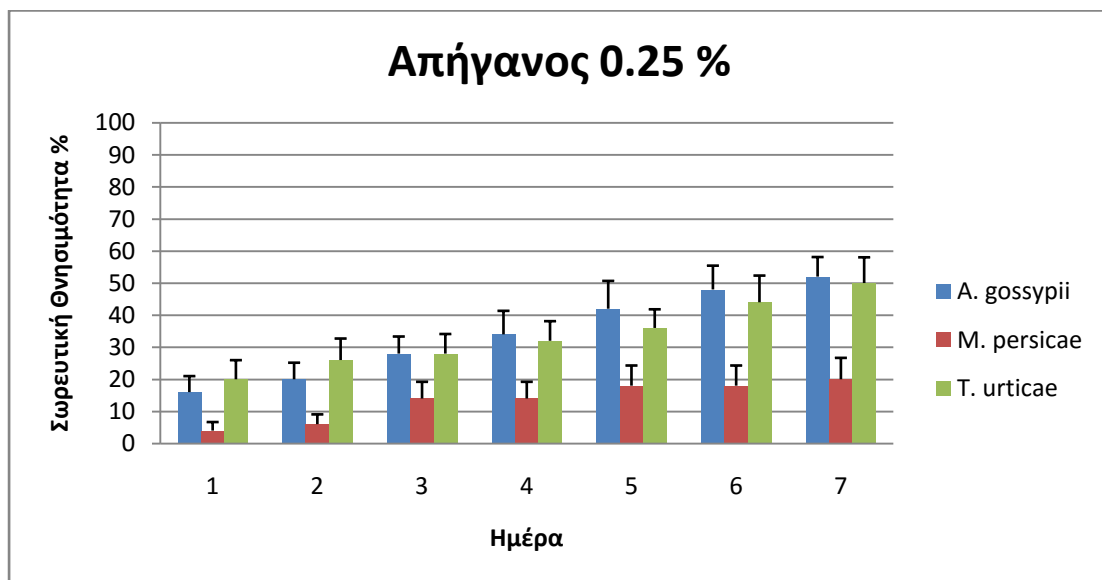
Ιστόγραμμα 1.7 Σωρευτικό ποσοστό θνησιμότητας ανά εχθρό και ανά ημέρα για επτά ημέρες από την επέμβαση με γαλάκτωμα αιθερίου ελαίου του βασιλικού συγκέντρωσης 1%. ΑΞΟΝΑΣ X : Ημέρα από την επέμβαση



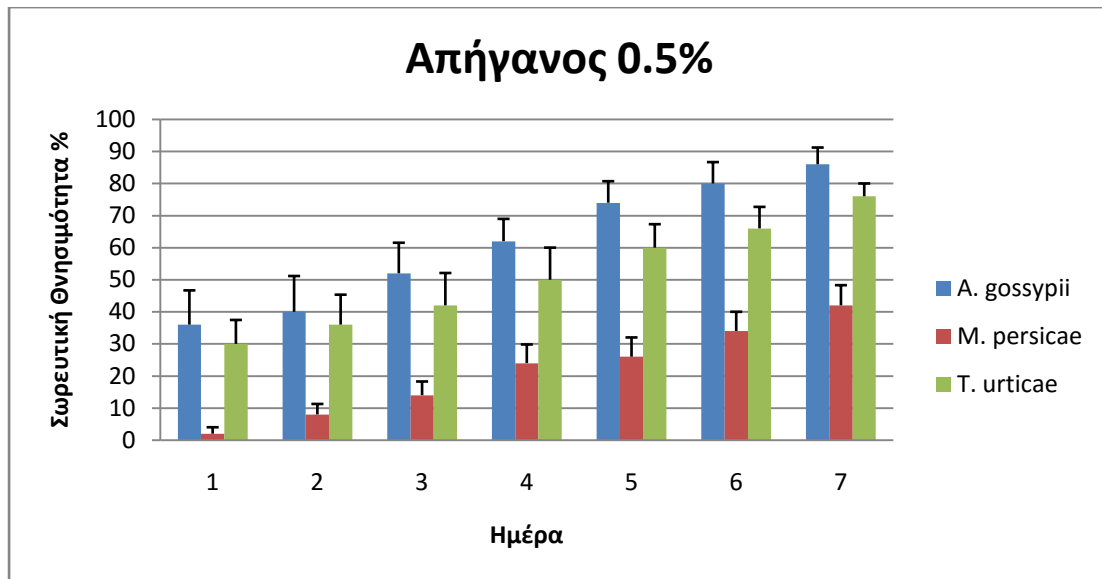
Ιστόγραμμα 1.8 Σωρευτικό ποσοστό θνησιμότητας ανά εχθρό και ανά ημέρα για επτά ημέρες από την επέμβαση με γαλάκτωμα αιθερίου ελαίου του απήγανου συγκέντρωσης 0.05%. ΑΞΟΝΑΣ X : Ημέρα από την επέμβαση



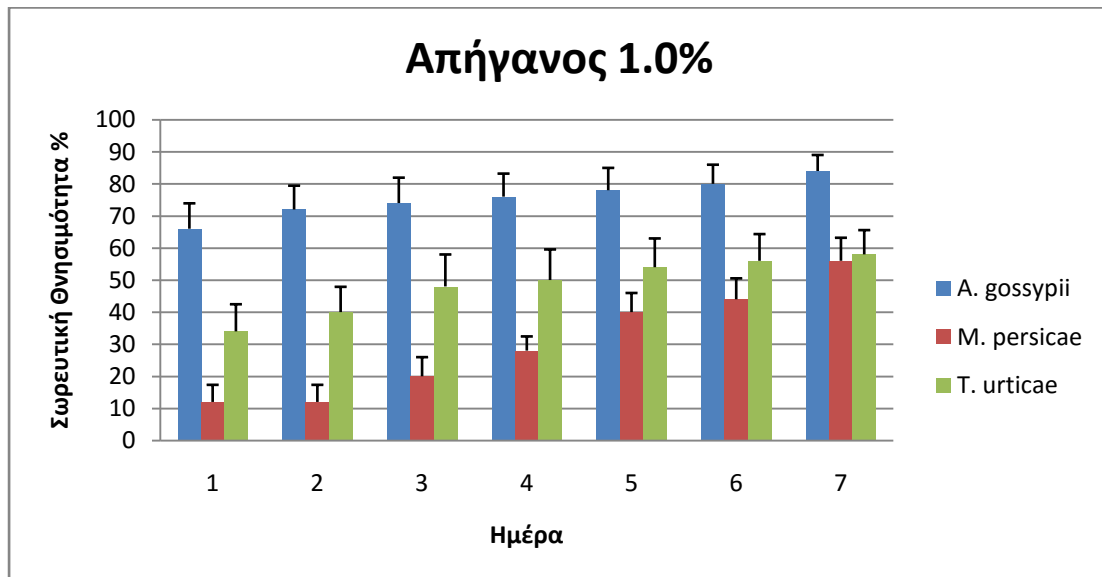
Ιστόγραμμα 1.9 Σωρευτικό ποσοστό θνησιμότητας ανά εχθρό και ανά ημέρα για επτά ημέρες από την επέμβαση με γαλάκτωμα αιθερίου ελαίου του απήγανου συγκέντρωσης 0.1%. ΑΞΟΝΑΣ X : Ημέρα από την επέμβαση



Ιστόγραμμα 1.10 Σωρευτικό ποσοστό θνησιμότητας ανά εχθρό και ανά ημέρα για επτά ημέρες από την επέμβαση με γαλάκτωμα αιθερίου ελαίου του απήγανου συγκέντρωσης 0.25%. ΑΞΟΝΑΣ X : Ημέρα από την επέμβαση



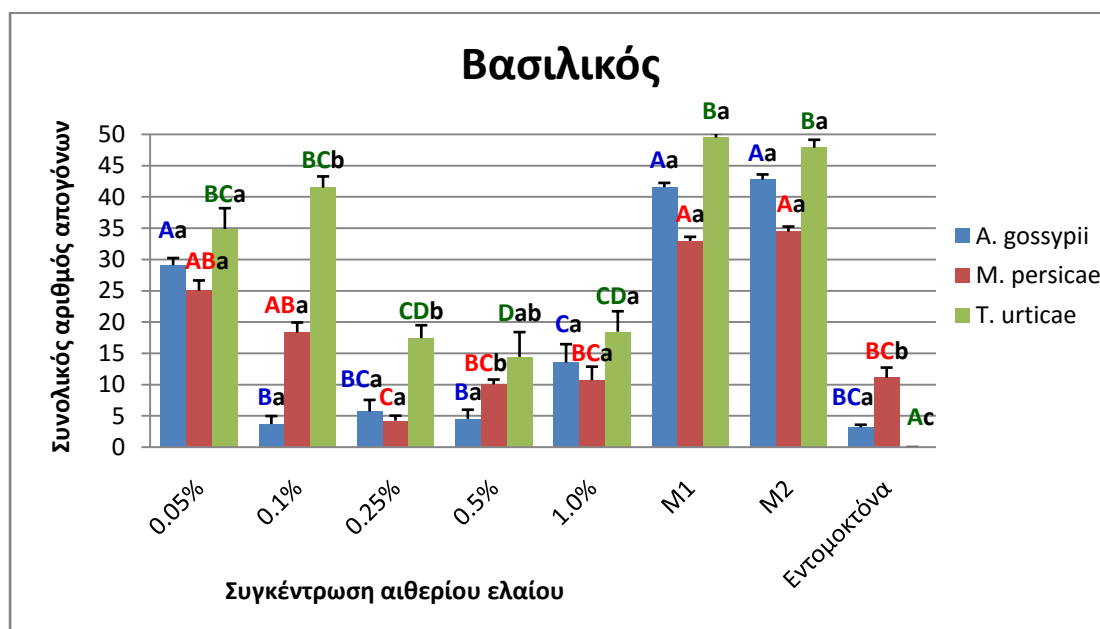
Ιστόγραμμα 1.11 Σωρευτικό ποσοστό θνησιμότητας ανά εχθρό και ανά ημέρα για επτά ημέρες από την επέμβαση με γαλάκτωμα αιθερίου ελαίου του απήγανου συγκέντρωσης 0.5%. ΑΞΟΝΑΣ Χ : Ημέρα από την επέμβαση



Ιστόγραμμα 1.12 Σωρευτικό ποσοστό θνησιμότητας ανά εχθρό και ανά ημέρα για επτά ημέρες από την επέμβαση με γαλάκτωμα αιθερίου ελαίου του απήγανου συγκέντρωσης 1%. ΑΞΟΝΑΣ Χ : Ημέρα από την επέμβαση

β) Επίδραση στο αναπαραγωγικό δυναμικό

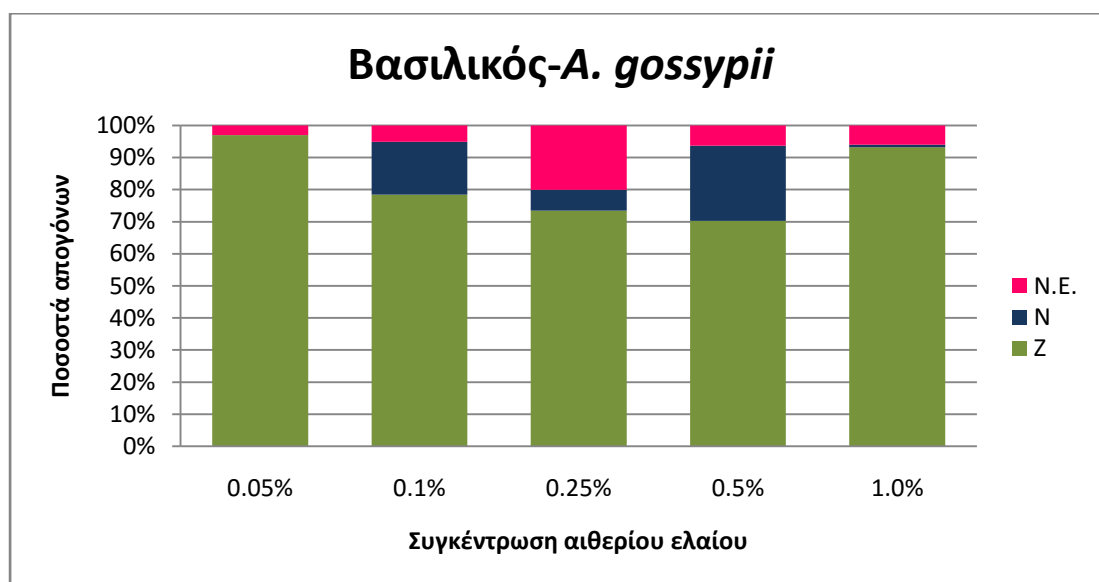
Όσον αφορά τις επεμβάσεις με το γαλάκτωμα του αιθερίου ελαίου του βασιλικού (Ιστόγραμμα 2.1) βρέθηκε ότι η συγκέντρωση του αιθερίου ελαίου είχε σημαντική επίδραση στον συνολικό αριθμό των απογόνων ($F_{7,216}=76.18, P<0.0001$). Επίσης, το είδος του εχθρού φαίνεται ότι έχει σημαντική επίδραση στον συνολικό αριθμό των απογόνων ($F_{2,216}=17.09, P<0.0001$). Ακόμη, η αλληλεπίδραση μεταξύ της συγκέντρωσης και του είδους ήταν σημαντική ($F_{14,216}=17.61, P<0.0001$).



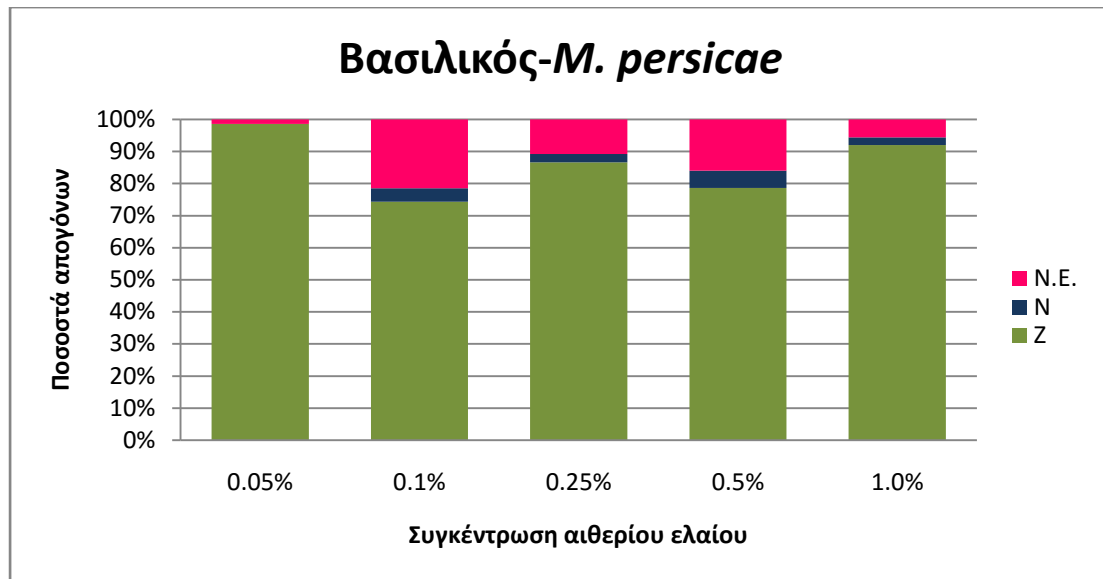
Ιστόγραμμα 2.1 Συνολικός αριθμός απογόνων ανά άτομο *A. gossypii*, *M. persicae* και *T. urticae* για διάστημα 7 ημερών από τον ψεκασμό με διάφορες συγκεντρώσεις γαλακτώματος αιθερίου ελαίου του βασιλικού καθώς και με εντομοκτόνο ή ακαρεοκτόνο. Τα κεφαλαία γράμματα του ίδιου χρώματος παρουσιάζουν τις διαφορές του ίδιου εχθρού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, ενώ τα μικρά τις διαφορές μεταξύ των τριών ειδών στην ίδια συγκέντρωση. M1 είναι οι μάρτυρες με απιονισμένο νερό και M2 οι μάρτυρες με απιονισμένο νερό και γαλακτωματοποιητές.

Σύμφωνα με το ιστόγραμμα 2.1 η επίδραση του αιθερίου ελαίου σε σχέση με τους μάρτυρες (απιονισμένο νερό και απιονισμένο νερό με γαλακτωματοποιητές), ήταν σημαντική σε όλες τις συγκεντρώσεις εκτός του 0.05% για το *A. gossypii*, και των 0.05% και 0.1% για τους άλλους δύο εχθρούς. Σε σύγκριση με την επίδραση των εντομοκτόνων, για το *A. gossypii* και το *M. persicae* η επίδραση δεν διέφερε από αυτή των συγκεντρώσεων 0.05% έως και 1%. Για το *T. urticae* η επίδραση του εντομοκτόνου-ακαρεοκτόνου ήταν σημαντικά εντονότερη από όλες τις συγκεντρώσεις, καθώς έδωσε μηδενικό αριθμό απογόνων. Μεταξύ των ειδών στην ίδια συγκέντρωση παρουσιάστηκαν διαφορές στις συγκεντρώσεις 0.1% και 0.25% με τον τετράνυχο να έχει σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό απογόνων ενώ στην συγκέντρωση 0.5% το *M. persicae* είχε σημαντικά περισσότερους απογόνους από το *A. gossypii* και παρόμοιο αριθμό με το *T. urticae*.

Στην συνέχεια ακολουθούν τα ιστογράμματα 2.2 και 2.3 στα οποία απεικονίζεται το ποσοστό των ζωντανών απογόνων, των νεκρών απογόνων (δηλαδή ατόμων που γεννήθηκαν αλλά νεκρώθηκαν λίγο αργότερα) καθώς και των νεκρών εμβρύων (δηλαδή ατόμων που γεννήθηκαν νεκρά) και για τα δύο είδη αφίδων όταν είχαν δεχθεί μεταχειρίσεις με διάφορες συγκεντρώσεις γαλακτώματος αιθερίου ελαίου του βασιλικού.



Ιστόγραμμα 2.2 Ποσοστό απογόνων ζωντανών (Z), νεκρών νυμφών (N) και νεκρών εμβρύων (N.E) ενηλίκων του *A. gossypii* που είχαν δεχθεί επέμβαση με διάφορες συγκεντρώσεις του αιθερίου ελαίου του βασιλικού



Ιστογράμμο 2.3 Ποσοστό απογόνων ζωντανών (Z), νεκρών νυμφών (N) και νεκρών εμβρύων (N.E) ενηλίκων του *M. persicae* που είχαν δεχθεί επέμβαση με διάφορες συγκεντρώσεις του αιθερίου ελαίου του βασιλικού.

Από τα ιστογράμματα 2.2 και 2.3 παρατηρείται ότι για κάθε συγκέντρωση και στα δύο είδη αφίδων ένα ποσοστό των απογόνων ήταν ήδη νεκρό ή δεν επιβίωσε. Για το *A. gossypii* το μεγαλύτερο ποσοστό νεκρών εμβρύων σημειώνεται στη συγκέντρωση 0.25% (20%) ενώ αυτό των νεκρών απογόνων ήταν μεγαλύτερο στη συγκέντρωση 0.1% και 0.5% (16.4% και 23.5% στην κάθε συγκέντρωση αντίστοιχα). Για το *M. persicae* το μεγαλύτερο ποσοστό νεκρών εμβρύων παρατηρείται στη συγκεντρώσεις 0.1% και 0.5% (21.5% και 16% στην κάθε συγκέντρωση αντίστοιχα).

Στις εικόνες 34. α, β και γ φαίνονται οι νεκροί απόγονοι και τα νεκρά έμβρυα των ειδών *A. gossypii* και *M. persicae*.



α)



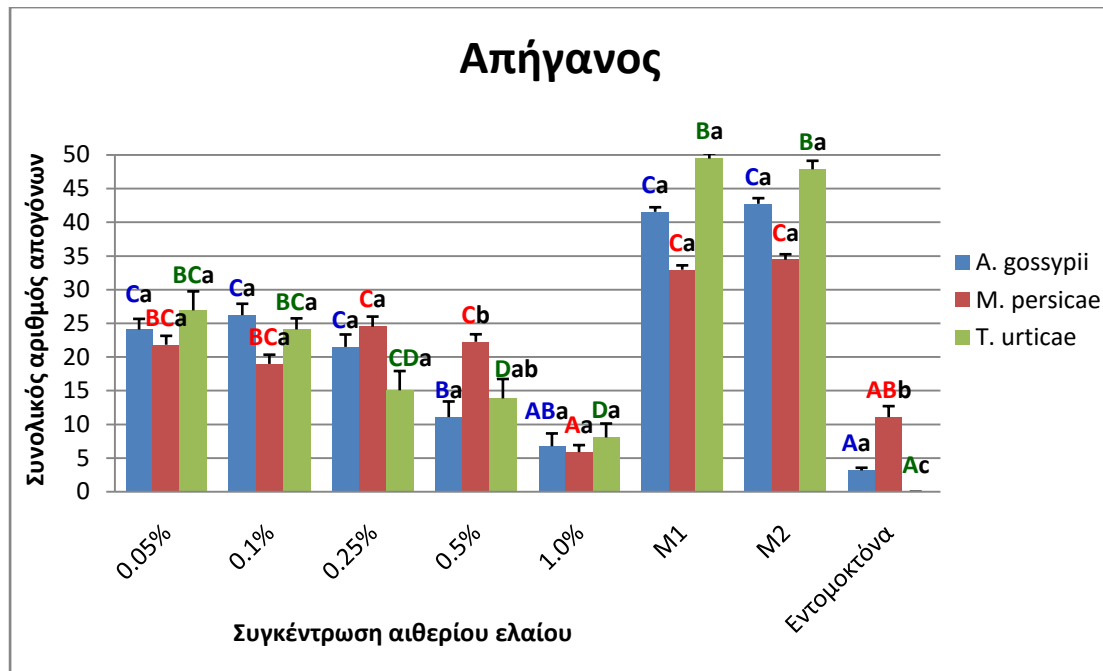
β)



γ)

Εικόνα 34. α) Νεκρή νύμφη *A.gossypii*, β) Νεκρά έμβρυα *A.gossypii*, γ) Νεκρό έμβρυο *M.persicae* (Πηγή: Τράκα Χρυσοβαλάντη)

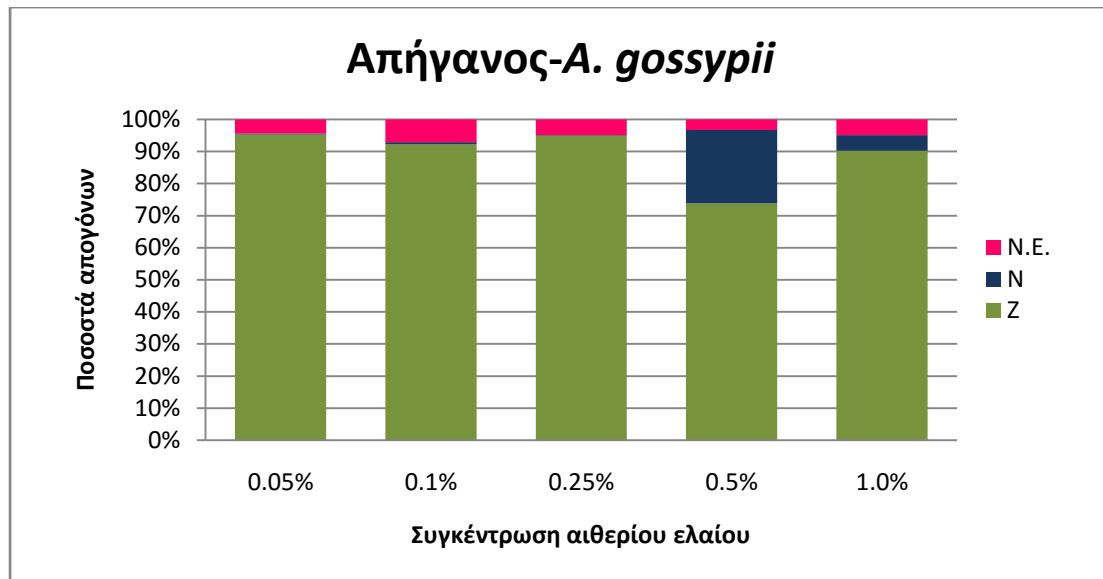
Όσον αφορά τις επεμβάσεις με αιθέριο έλαιο του απήγανου (Ιστόγραμμα 2.4) βρέθηκε ότι η συγκέντρωση του αιθερίου ελαίου είχε σημαντική επίδραση στον συνολικό αριθμό των απογόνων ($F_{7,216}=113,46$, $P<0.0001$). Επίσης, το είδος του εχθρού είχε σημαντική επίδραση ($F_{2,216}=9.13$, $P<0.0002$). Ακόμη, η αλληλεπίδραση μεταξύ της συγκέντρωσης και του είδους ήταν σημαντική ($F_{14,216}=11.46$, $P<0.0001$).



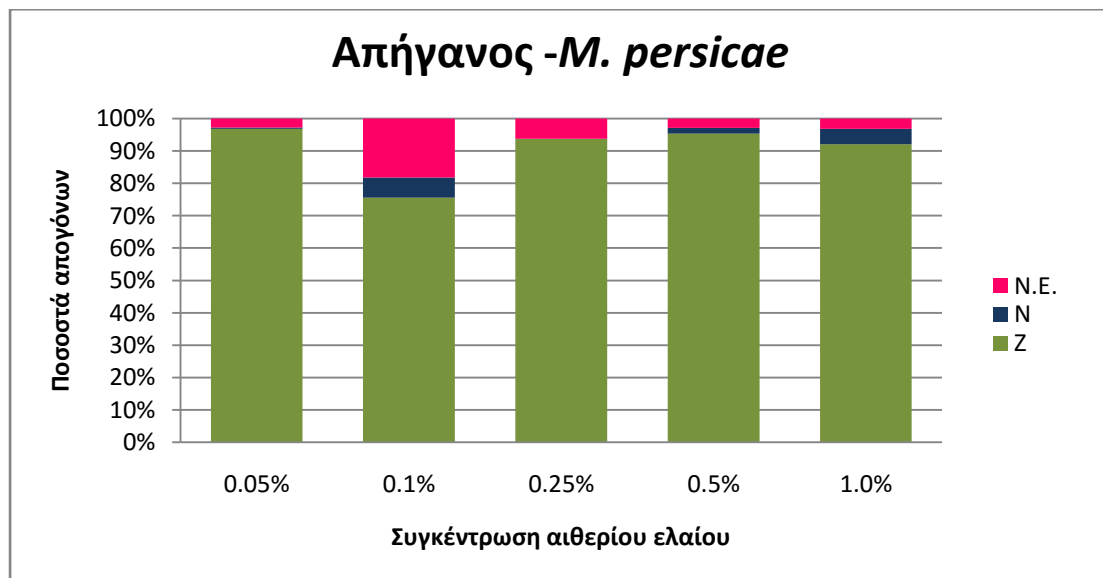
Ιστογράμμα 2.4 Συνολικός αριθμός απογόνων ανά άτομο *A. gossypii*, *M. persicae* και *T. urticae* για διάστημα 7 ημερών από τον ψεκασμό με διάφορες συγκεντρώσεις γαλακτώματος αιθερίου ελαίου του απήγανου καθώς και με εντομοκτόνο ή ακαρεοκτόνο. Τα κεφαλαία γράμματα του ίδιου χρώματος παρουσιάζουν τις διαφορές του ίδιου εχθρού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, ενώ τα μικρά τις διαφορές μεταξύ των τριών ειδών στην ίδια συγκέντρωση. M1 είναι οι μάρτυρες με απιονισμένο νερό και M2 οι μάρτυρες με απιονισμένο νερό και γαλακτωματοποιητές.

Ο συνολικός αριθμός απογόνων ήταν σημαντικά μικρότερος σε σχέση με αυτόν που παρατηρήθηκε στον μάρτυρα (απιονισμένο νερό με ή χωρίς γαλακτωματοποιητές) στις συγκεντρώσεις 0.5% και 1% για το *A. gossypii*, 1% για το *M. persicae* και 0.25%, 0.5% και 1% για το *T. urticae*. Σε σχέση με τα εντομοκτόνα η επίδρασή τους ήταν παρόμοια με την επίδραση του αιθερίου ελαίου της συγκέντρωσης 1% για τα δύο είδη αφίδων, ενώ ήταν σημαντικά μικρότερη για το *T. urticae*, όπου ο χημικός μάρτυρας προκάλεσε μηδενική θνησιμότητα. Διαφορές μεταξύ των τριών ειδών παρατηρήθηκαν μόνο στην συγκέντρωση 0.5% όπου το *A. gossypii* παρουσίασε μικρότερες τιμές από τους άλλους δύο εχθρούς.

Στην συνέχεια ακολουθούν τα ιστογράμματα 2.5 και 2.6 στα οποία απεικονίζονται το ποσοστό των ζωντανών και νεκρών απογόνων καθώς και το ποσοστό των νεκρών εμβρύων και για τα δύο είδη αφίδων που είχαν δεχθεί μεταχειρίσεις με γαλάκτωμα αιθερίου ελαίου του απήγανου.



Ιστόγραμμα 2.5 Ποσοστό απογόνων ζωντανών (Z), νεκρών νυμφών (N) και νεκρών εμβρύων (N.E) ενηλίκων του *A. gossypii* που είχαν δεχθεί επέμβαση με διάφορες συγκεντρώσεις του αιθερίου ελαίου του απήγανου



Ιστόγραμμα 2.6 Ποσοστό απογόνων ζωντανών (Z), νεκρών νυμφών (N) και νεκρών εμβρύων (N.E) ενηλίκων του *M. persicae* που είχαν δεχθεί επέμβαση με διάφορες συγκεντρώσεις του αιθερίου ελαίου του απήγανου.

Από τα ιστογράμματα 2.5 και 2.6 παρατηρείται ότι σε κάθε συγκέντρωση και στα δύο είδη αφίδων υπάρχει ένα ποσοστό νεκρών εμβρύων που για το *A. gossypii* κυμάνθηκε σε χαμηλά επίπεδα (μικρότερα του 10%) όπως και για το *M. persicae*, όπου όμως στη συγκέντρωση 0.1% το ποσοστό τους έφθασε στο 18%. Νεκροί απόγονοι σημειώθηκαν για το *A. gossypii* στις συγκεντρώσεις 0.5% και 1% με το μεγαλύτερο ποσοστό στην συγκέντρωση 0.5% (22.9%). Το ποσοστό των νεκρών απογόνων για το *M. persicae* κυμάνθηκε σε χαμηλά επίπεδα.

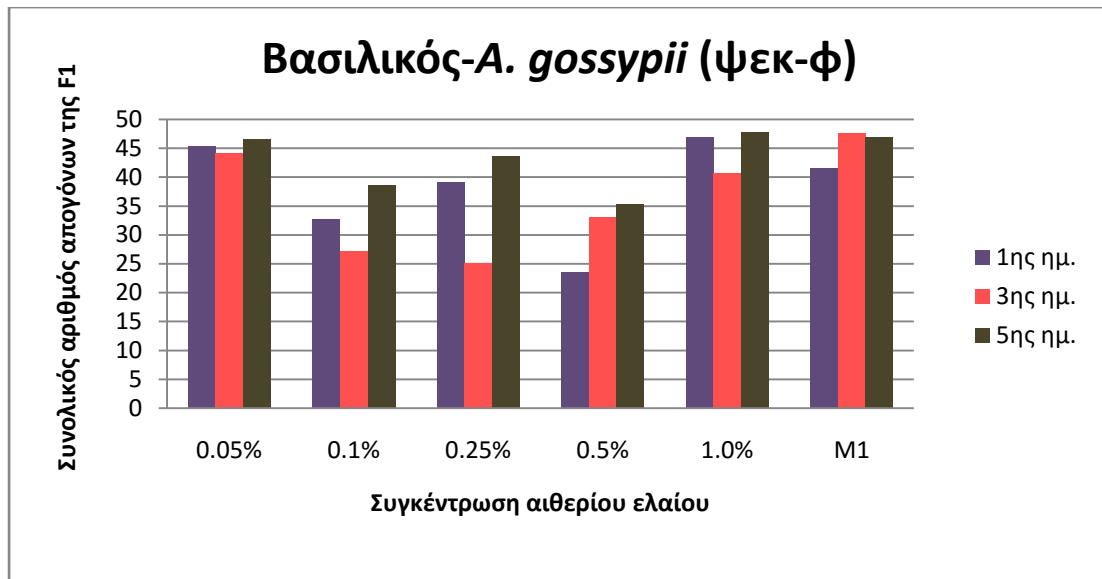
Τα δύο αιθέρια έλαια σε συνδυασμό, μετά την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων τους έδειξαν ότι ο παράγοντας 'φυτό', δηλαδή το φυτό προέλευσης του αιθερίου ελαίου είχε σημαντική επίδραση στον συνολικό αριθμό απογόνων ($F_{1,270}=18.89$, $P>0.0001$), η συγκέντρωση είχε σημαντική επίδραση ($F_{4,270}=31.70$, $P<0.0001$) και η αλληλεπίδραση του φυτού με την συγκέντρωση είχε σημαντική επίδραση ($F_{4,270}=17.93$, $P<0.0001$). Ο παράγοντας είδος παρουσίασε σημαντική επίδραση ($F_{2,270}=20.21$, $P<0.0001$) καθώς και η αλληλεπίδραση μεταξύ του φυτού και του είδους είχε σημαντική επίδραση ($F_{2,270}=20.10$, $P<0.0001$). Ακόμη, η συγκέντρωση με το είδος έφεραν σημαντική αλληλεπίδραση ($F_{8,270}=4.53$, $P<0.0001$) και το φυτό με την συγκέντρωση και το είδος είχαν σημαντική αλληλεπίδραση ($F_{8,270}=5.29$, $P<0.0001$).

Από τα ιστογράμματα 2.1 και 2.4 τα γαλακτώματα των δύο αιθερίων ελαίων φαίνεται ότι μείωσαν τον αριθμό των απογόνων και των τριών εχθρών, με το αιθέριο έλαιο του βασιλικού να έχει εντονότερη επίδραση σε σχέση με αυτό του απήγανου. Μεταξύ των τριών ειδών μεγαλύτερη επίδραση βρέθηκε στο *A. gossypii* και ακολούθησαν το *M. persicae* και το *T. urticae*.

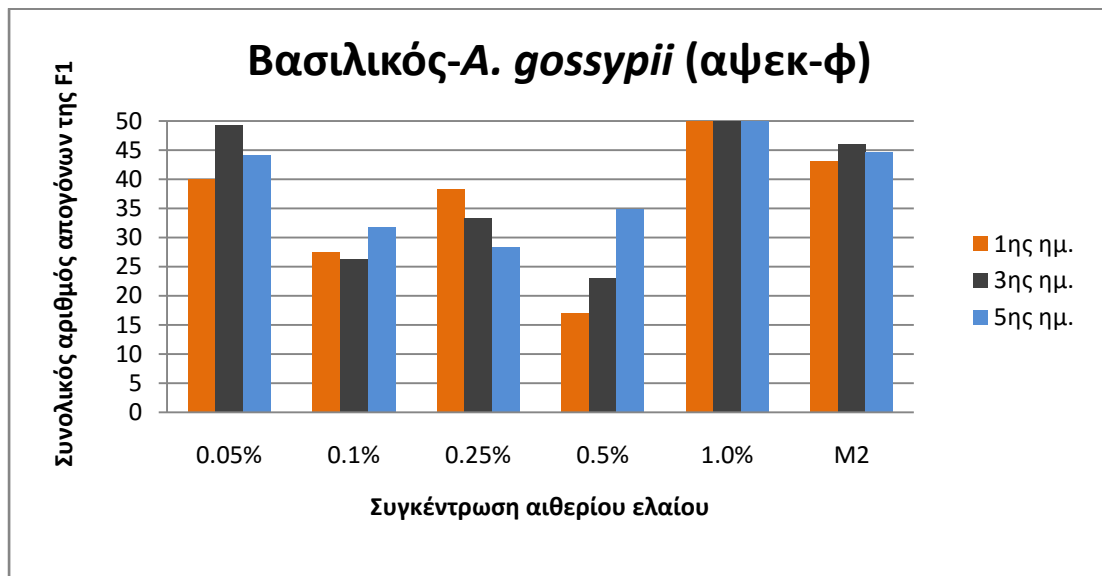
γ) Επίδραση στους απογόνους των ψεκασμένων αφίδων και στο αναπαραγωγικό δυναμικό αυτών

Τα ιστογράμματα 3.1-3.8 παρουσιάζουν τον αριθμό των απογόνων που έδωσαν οι απόγονοι των ψεκασμένων στην έναρξη του πειράματος αφίδων, οι οποίοι γεννήθηκαν την 1η, 3η και 5η ημέρα από τον ψεκασμό των αφίδων με τα γαλακτώματα των αιθερίων ελαίων. Οι απόγονοι μεταφέρονταν σε φύλλο ψεκασμένο, το οποίο ψεκαζόταν την ίδια χρονική στιγμή με την επέμβαση ή απέκαστο φύλλο όπου και διατηρούνταν μέχρι την ενηλικίωσή τους και κατόπιν καταγραφόταν ο αριθμός των απογόνων τους για διάστημα 7 ημερών.

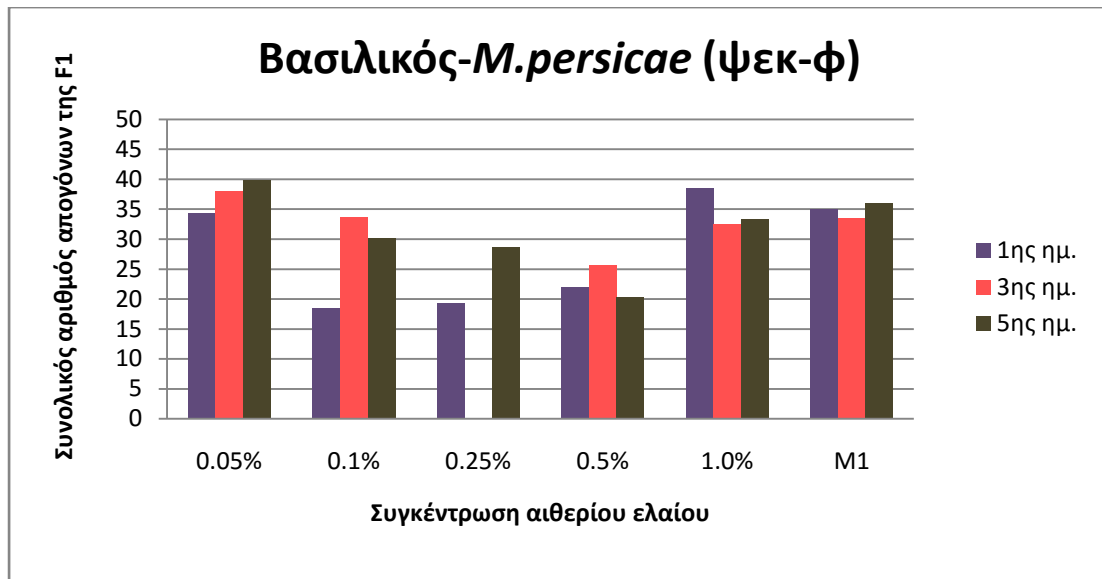
Γενικά, φαίνεται ότι ο αριθμός των απογόνων τους δεν διέφερε κατά πολύ σε σχέση με τους μάρτυρες. Ωστόσο, δύο τιμές εμφανίζονται μηδενικές στα ιστογράμματα 3.3 και 3.4 (μεταχείριση με γαλάκτωμα αιθερίου ελαίου του βασιλικού σε συγκέντρωση 0.25% στο *M. persicae*, σε ψεκασμένο φύλλο με απογόνους 3ης ημέρας και σε απέκαστο με απογόνους 1ης ημέρας αντίστοιχα), όπου οι νύμφες 1ης ηλικίας που τοποθετήθηκαν στα τρυβλία δεν κατόρθωσαν να ενηλικιωθούν καθώς επιβίωσαν μόνο για μία ημέρα ακόμη. Ως μάρτυρες M1 και M2 χρησιμοποιούνται ψεκασμένα με απιονισμένο νερό φύλλα και απέκαστα φύλλα, αντίστοιχα.



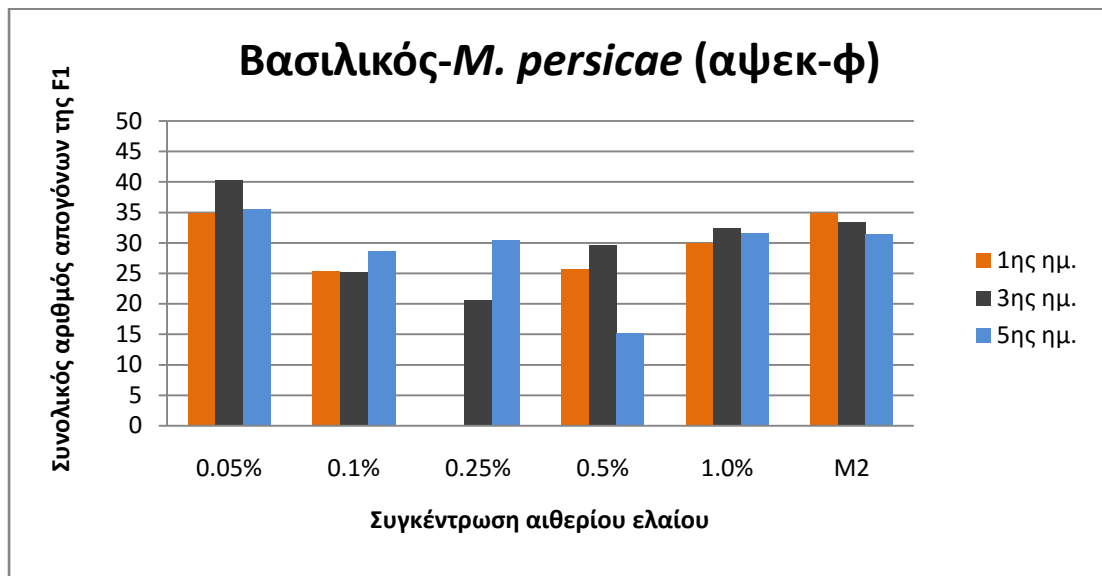
Ιστόγραμμα 3.1 Συνολικός αριθμός απογόνων της F1 (απόγονοι ενήλικων ατόμων από τις επεμβάσεις, που λαμβάνονταν κατά την διάρκεια των μετρήσεων της 1ης, 3ης και 5ης ημέρας των πειραμάτων) του *A. gossypii* για κάθε συγκέντρωση με γαλάκτωμα αιθερίου ελαίου του βασιλικού, σε ψεκασμένο φύλλο με την ίδια μεταχείριση την ίδια ημέρα της επέμβασης. M1:μάρτυρας σε ψεκασμένο με απιονισμένο νερό φύλλο.



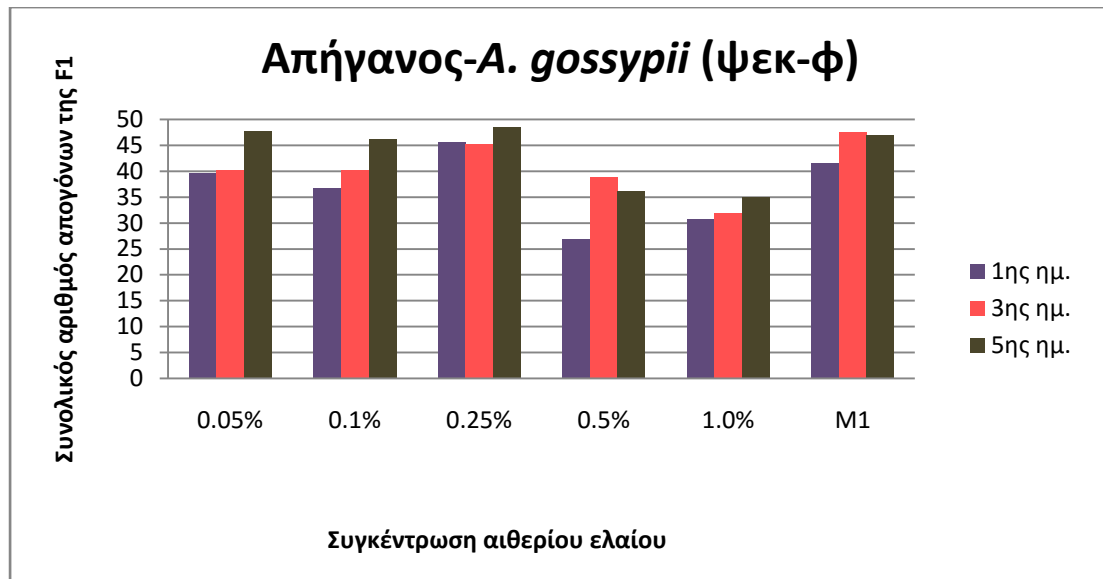
Ιστόγραμμα 3.2 Συνολικός αριθμός απογόνων της F1 (απόγονοι ενήλικων ατόμων από τις επεμβάσεις, που λαμβάνονταν κατά την διάρκεια των μετρήσεων της 1ης, 3ης και 5ης ημέρας των πειραμάτων) του *A. gossypii* για κάθε συγκέντρωση με γαλάκτωμα αιθερίου ελαίου του βασιλικού, σε αφέκαστο φύλλο. M2:μάρτυρας σε αφέκαστο φύλλο.



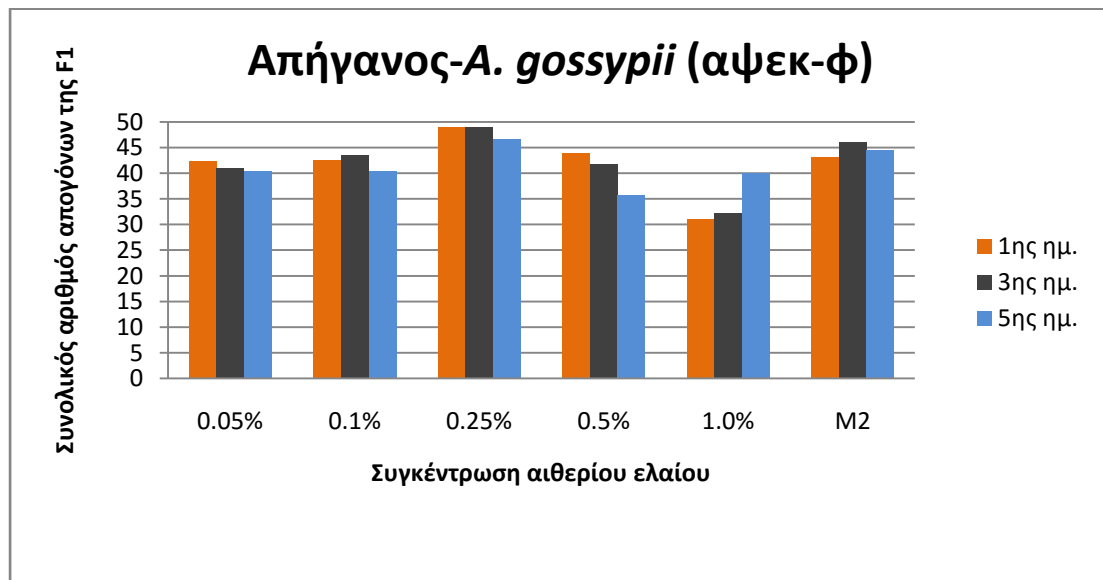
Ιστόγραμμα 3.3 Συνολικός αριθμός απογόνων της F1 (απόγονοι ενήλικων ατόμων από τις επεμβάσεις, που λαμβάνονταν κατά την διάρκεια των μετρήσεων της 1ης, 3ης και 5ης ημέρας των πειραμάτων) του *M. persicae* για κάθε συγκέντρωση με γαλάκτωμα αιθερίου ελαίου του βασιλικού, σε ψεκασμένο φύλλο με την ίδια μεταχείριση την ίδια ημέρα της επέμβασης. M1:μάρτυρας σε ψεκασμένο με απιονισμένο νερό φύλλο.



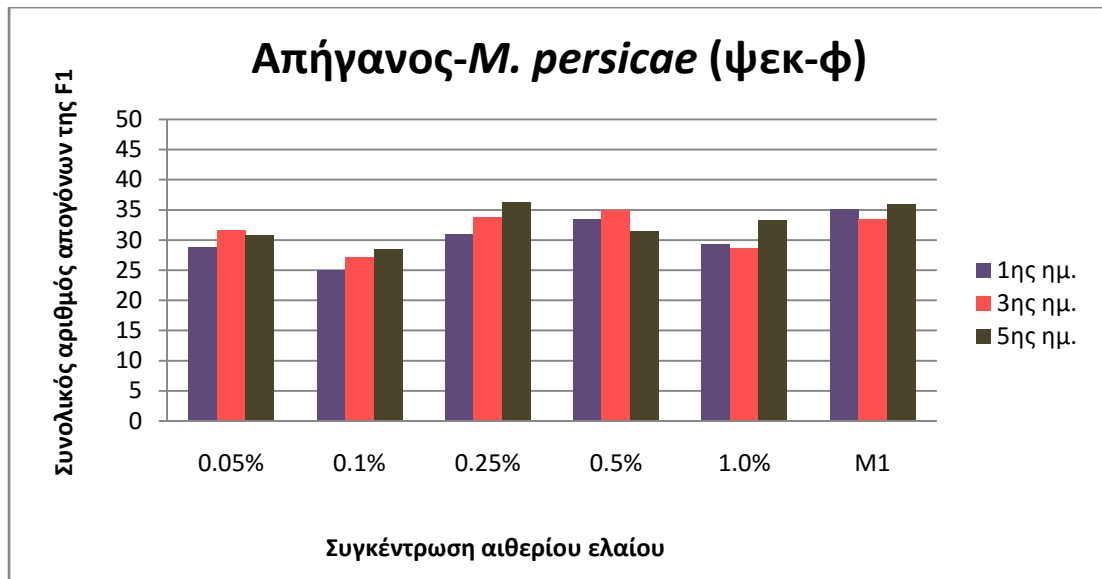
Ιστόγραμμα 3.4 Συνολικός αριθμός απογόνων της F1 (απόγονοι ενήλικων ατόμων από τις επεμβάσεις, που λαμβάνονταν κατά την διάρκεια των μετρήσεων της 1ης, 3ης και 5ης ημέρας των πειραμάτων) του *M. persicae* για κάθε συγκέντρωση με γαλάκτωμα αιθερίου ελαίου του βασιλικού, σε αφέκαστο φύλλο. M2:μάρτυρας σε αφέκαστο φύλλο.



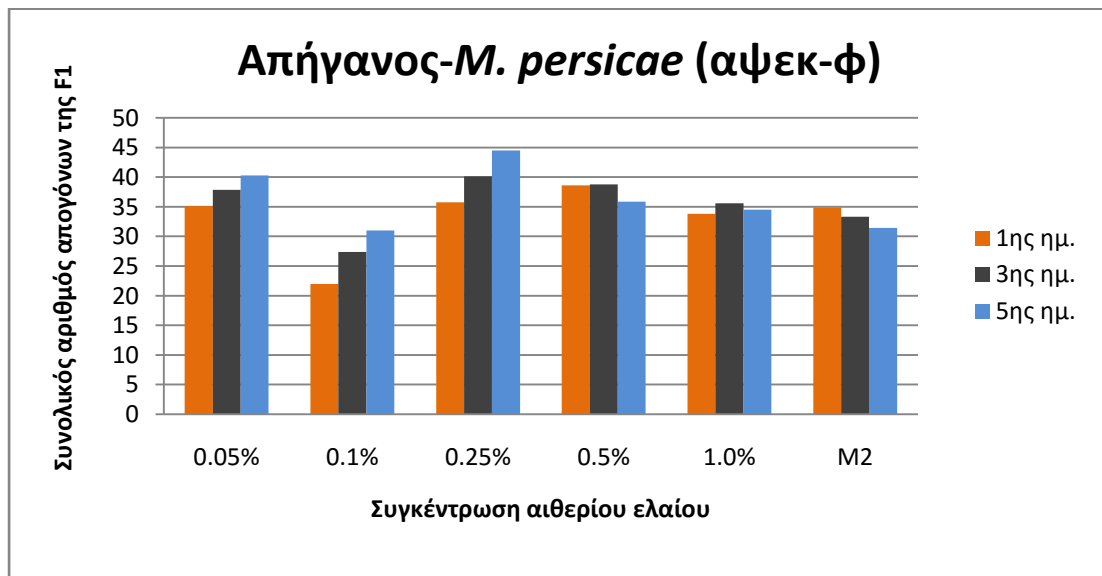
Ιστόγραμμα 3.5 Συνολικός αριθμός απογόνων της F1 (απόγονοι ενήλικων ατόμων από τις επεμβάσεις, που λαμβάνονταν κατά την διάρκεια των μετρήσεων της 1ης, 3ης και 5ης ημέρας των πειραμάτων) του *A. gossypii* για κάθε συγκέντρωση με γαλάκτωμα αιθερίου ελαίου του απήγανου, σε ψεκασμένο φύλλο με την ίδια μεταχείριση την ίδια ημέρα της επέμβασης. M1:μάρτυρας σε ψεκασμένο με απιονισμένο νερό φύλλο.



Ιστόγραμμα 3.6 Συνολικός αριθμός απογόνων της F1 (απόγονοι ενήλικων ατόμων από τις επεμβάσεις, που λαμβάνονταν κατά την διάρκεια των μετρήσεων της 1ης, 3ης και 5ης ημέρας των πειραμάτων) του *A. gossypii* για κάθε συγκέντρωση με γαλάκτωμα αιθερίου ελαίου του απήγανου, σε αφέκαστο φύλλο. M2:μάρτυρας σε αφέκαστο φύλλο.



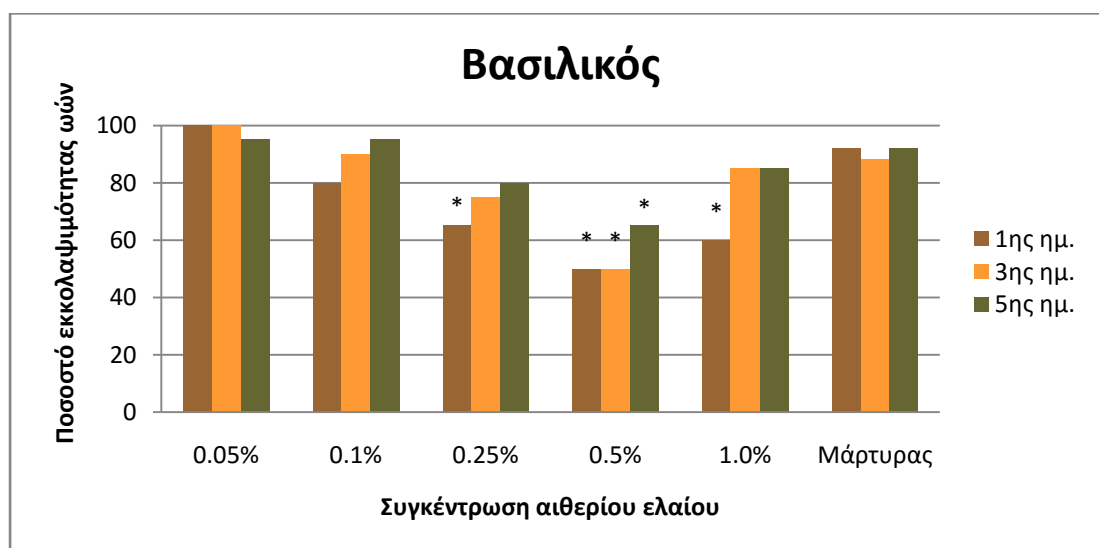
Ιστόγραμμα 3.7 Συνολικός αριθμός απογόνων της F1 (απόγονοι ενήλικων ατόμων από τις επεμβάσεις, που λαμβάνονταν κατά την διάρκεια των μετρήσεων της 1ης, 3ης και 5ης ημέρας των πειραμάτων) του *M. persicae* για κάθε συγκέντρωση με γαλάκτωμα αιθερίου ελαίου του απήγανου, σε ψεκασμένο φύλλο με την ίδια μεταχείριση την ίδια ημέρα της επέμβασης. M1:μάρτυρας σε ψεκασμένο με απιονισμένο νερό φύλλο.



Ιστόγραμμα 3.8 Συνολικός αριθμός απογόνων της F1 (απόγονοι ενήλικων ατόμων από τις επεμβάσεις, που λαμβάνονταν κατά την διάρκεια των μετρήσεων της 1ης, 3ης και 5ης ημέρας των πειραμάτων) του *M. persicae* για κάθε συγκέντρωση με γαλάκτωμα αιθερίου ελαίου του απήγανου, σε αψέκαστο φύλλο. M2:μάρτυρας σε αψέκαστο φύλλο.

δ) Επίδραση στην εκκολαψιμότητα των ωών του τετράνυχου

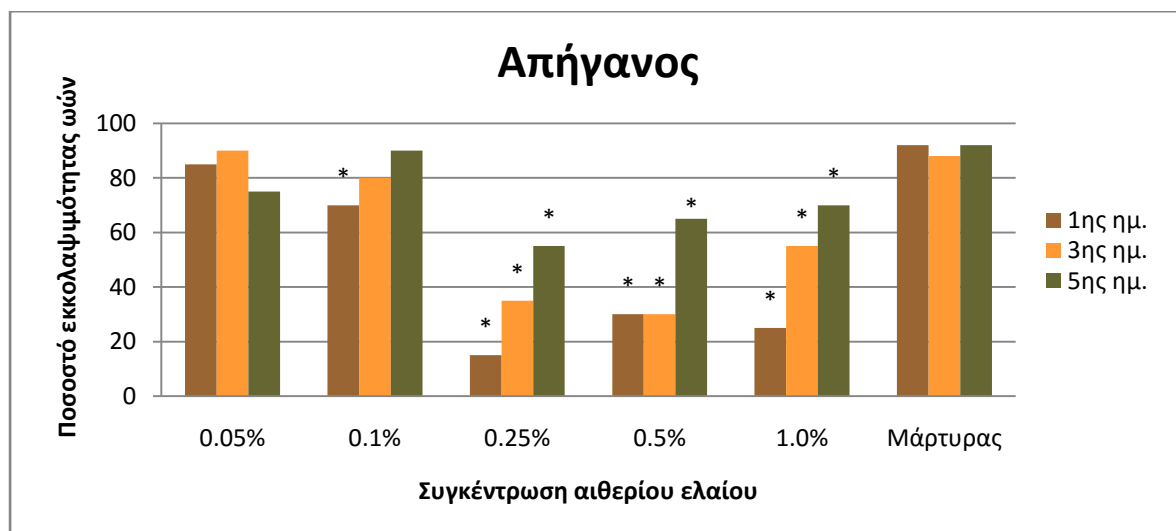
Όσον αφορά την επίδραση στην εκκολαψιμότητα των ωών του τετράνυχου που ελήφθησαν κατά την 1η, 3η και 5η ημέρα από τον ψεκασμό των θηλυκών και τοποθετήθηκαν σε ψεκασμένο φύλλο, αυτή εξετάστηκε χρησιμοποιώντας την δοκιμασία χ^2 ($\alpha=0.05$). Στα ιστογράμματα 4.1 και 4.2 που ακολουθούν με γαλακτώματα αιθερίου ελαίου του βασιλικού και του απήγανου αντίστοιχα, εμφανίστηκε σημαντική διαφορά στο ποσοστό εκκολαψιμότητας των ωών των επεμβάσεων σε σχέση με τον μάρτυρα. Η διαφορά αυτή υποδηλώνεται με αστερίσκο (*) στην εκάστοτε μεταχείριση. Στις περιπτώσεις αυτές οι τιμές χ^2 ήταν μεγαλύτερες του 3.84 (d.f.=1, $\alpha=0.05$). Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε φύλλο ψεκασμένο με απιονισμένο νερό.



Ιστόγραμμα 4.1 Ποσοστό εκκολαψιμότητας των ωών του τετράνυχου (ωά ενήλικων ατόμων από τις επεμβάσεις, που λαμβάνονταν κατά την διάρκεια των μετρήσεων της 1ης, 3ης και 5ης ημέρας των πειραμάτων και τοποθετούνταν σε ψεκασμένο φύλλο με την ίδια μεταχείριση την ίδια ημέρα της επέμβασης) για κάθε συγκέντρωση με γαλακτώμα αιθερίου ελαίου του βασιλικού. Ο μάρτυρας έχει δεχθεί την ίδια μεταχείριση με απιονισμένο νερό.

Στο ιστογράμμα 4.1, σημειώνεται ότι υπήρξε σημαντική διαφορά στο ποσοστό εκκόλαψης σε σύγκριση με τον μάρτυρα στην συγκέντρωση 0.5% του

αιθερίου ελαίου του βασιλικού, για τα ωά που συλλέχθηκαν και στις τρεις χρονικές στιγμές, ενώ στις συγκεντρώσεις 0.25% και 1% η διαφορά ήταν σημαντική μόνο για τους απογόνους που συλλέχθηκαν την πρώτη ημέρα από την επέμβαση.



Ιστόγραμμα 4.2 Ποσοστό εκκολαψιμότητας των ωών του τετράνυχου (ωά ενήλικων ατόμων από τις επεμβάσεις, που λαμβάνονταν κατά την διάρκεια των μετρήσεων της 1ης, 3ης και 5ης ημέρας των πειραμάτων και τοποθετούνταν σε ψεκασμένο φύλλο με την ίδια μεταχείριση την ίδια ημέρα της επέμβασης) για κάθε συγκέντρωση με γαλάκτωμα αιθερίου ελαίου του απήγανου. Ο μάρτυρας έχει δεχθεί την ίδια μεταχείριση με απιονισμένο νερό.

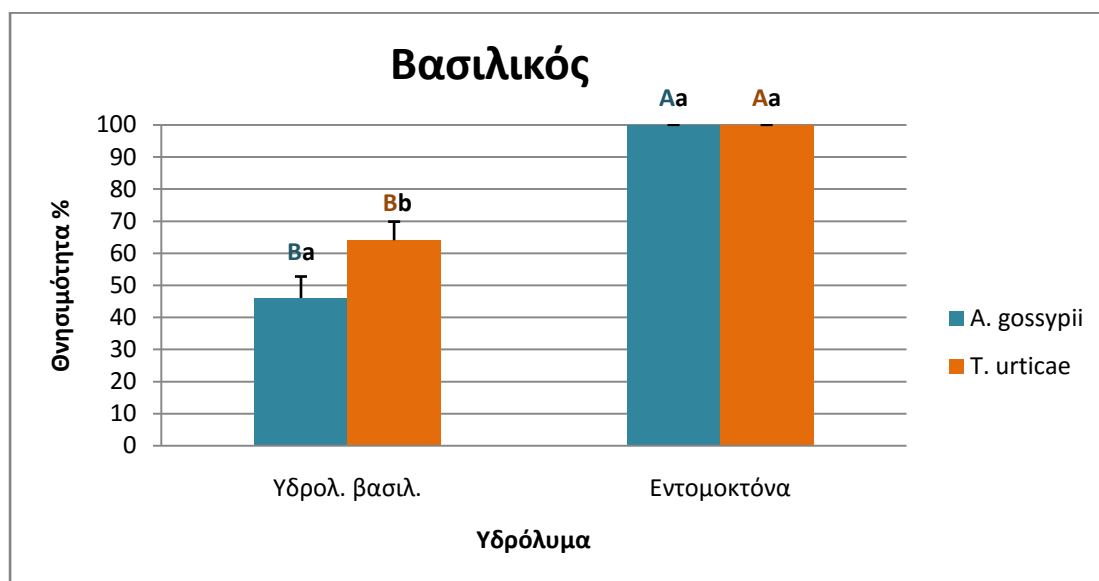
Στο ιστόγραμμα 4.2, φάνηκε ότι υπήρχε σημαντική διαφορά στην εκκολαψιμότητα των ωών σε σύγκριση με τον μάρτυρα στις συγκεντρώσεις 0.25%, 0.5% και 1% του αιθερίου ελαίου του απήγανου για τα ωά που συλλέχθηκαν και τις τρεις χρονικές στιγμές, ενώ στην συγκέντρωση 0.1% η διαφορά ήταν σημαντική μόνο για τα ωά που συλλέχθηκαν την πρώτη ημέρα. Γενικά μικρότερα ποσοστά βρέθηκαν για τα ωά που εναποτέθηκαν την 1η ημέρα από την επέμβαση.

Από τα ιστογράμματα 4.1 και 4.2 το γαλάκτωμα του αιθερίου ελαίου του απήγανου φαίνεται ότι είναι ισχυρότερο από αυτό του βασιλικού, μειώνοντας σημαντικότερα το ποσοστό της εκκολαψιμότητας των ωών του τετράνυχου στις συγκεντρώσεις 0.25%, 0.5% και 1%.

6.4.2 Βιοδοκιμές με υδρολύματα

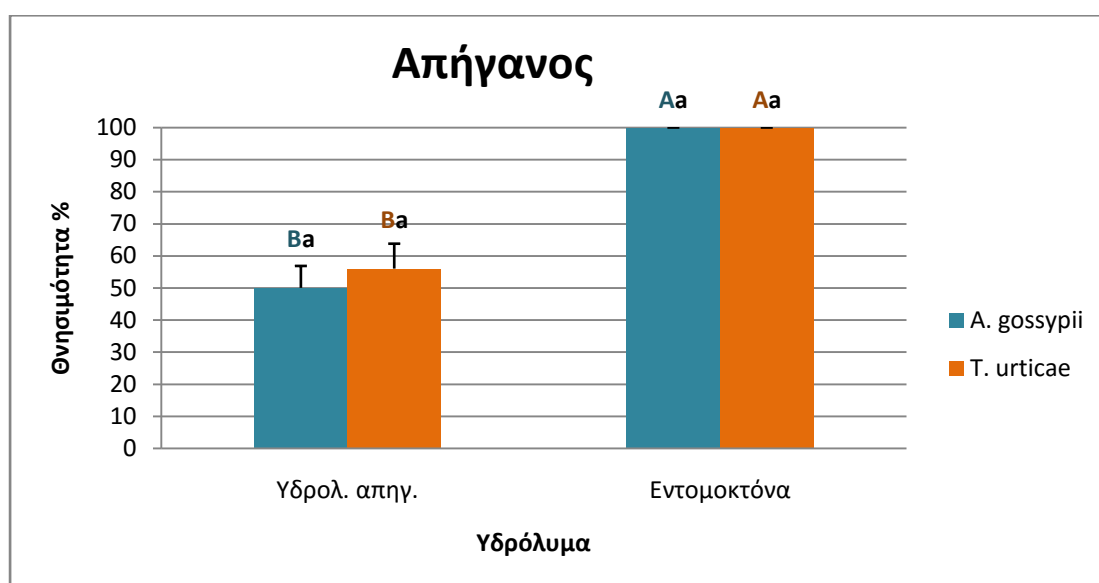
α) Επίδραση στην θνησιμότητα

Πραγματοποιήθηκαν ψεκασμοί με υδρολύματα βασιλικού και απήγανου όπως παραλήφθηκαν από την υδροαπόσταξη. Με το υδρόλυμα του βασιλικού (Ιστόγραμμα 5.1) βρέθηκε σημαντικά μικρότερη επίδραση σε σχέση με τους χημικούς μάρτυρες, ωστόσο το ποσοστό θνησιμότητας έφθασε το 46% και το 64% για το *A. gossypii* και *T. urticae*, αντίστοιχα.. Η επίδραση του είδους του εχθρού ήταν σημαντική ($F_{7,72}=388.22$, $P<0.0001$). Οι δύο ακόμη μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν περιείχαν απιονισμένο νερό και απιονισμένο νερό με γαλακτωματοποιητές και είχαν μηδενική θνησιμότητα.



Ιστόγραμμα 5.1 Συνολικό ποσοστό θνησιμότητας ενηλίκων του *A. gossypii* και του *T. urticae* μετά από 7 ημέρες από τον ψεκασμό τους με υδρόλυμα βασιλικού καθώς και με εντομοκτόνο ή ακαρεοκτόνο. Τα κεφαλαία γράμματα του ίδιου χρώματος παρουσιάζουν τις διαφορές του ίδιου εχθρού σε διαφορετικές επεμβάσεις, ενώ τα μικρά τις διαφορές μεταξύ των δύο ειδών στην ίδια επέμβαση. Στην περίπτωση του μάρτυρα (απιονισμένο νερό και απιονισμένο νερό με γαλακτωματοποιητές) βρέθηκε μηδενική θνησιμότητα και για αυτό τα αποτελέσματα δεν εμφανίζονται στο ιστόγραμμα.

Με το υδρόλυμα του απήγανου (Ιστόγραμμα 5.2) βρέθηκε επίσης σημαντικά μικρότερη θνησιμότητα σε σχέση με τα εντομοκτόνα. Η επίδραση του είδους του εχθρού ήταν σημαντική ($F_{7,72}=263.03$, $P<0.0001$). Με βάση το Ιστόγραμμα 5.2 το ποσοστό θνησιμότητας του *T. urticae* είναι ελάχιστα υψηλότερο και φθάνει στο 56%, ενώ το ποσοστό του *A. gossypii* φθάνει το 50%. Οι δύο ακόμη μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν περιείχαν απιονισμένο νερό και απιονισμένο νερό με γαλακτωματοποιητές και είχαν μηδενική θνησιμότητα.



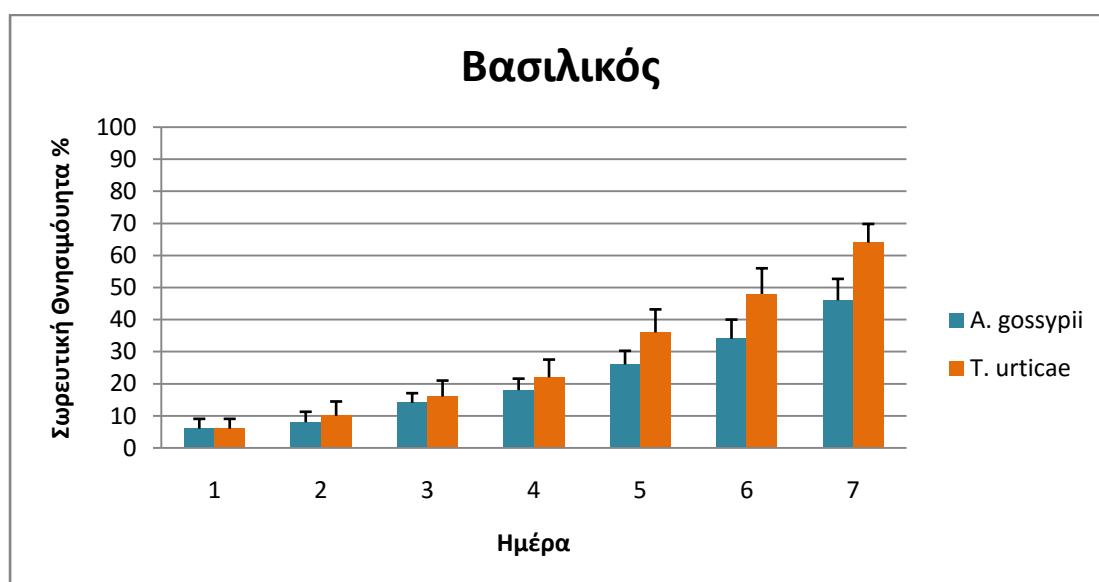
Ιστόγραμμα 5.2 Συνολικό ποσοστό θνησιμότητας ενηλίκων του *A. gossypii* και του *T. urticae* μετά από 7 ημέρες από τον ψεκασμό τους με υδρόλυμα απήγανου καθώς και με εντομοκτόνο ή ακαρεοκτόνο. Τα κεφαλαία γράμματα του ίδιου χρώματος παρουσιάζουν τις διαφορές του ίδιου εχθρού σε διαφορετικές επεμβάσεις, ενώ τα μικρά τις διαφορές μεταξύ των δύο ειδών στην ίδια επέμβαση. Στην περίπτωση του μάρτυρα (απιονισμένο νερό και απιονισμένο νερό με γαλακτωματοποιητές) βρέθηκε μηδενική θνησιμότητα και για αυτό τα αποτελέσματα δεν εμφανίζονται στο ιστόγραμμα.

Τα δύο γαλακτώματα μετά την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων τους, έδειξαν ότι ο παράγοντας 'φυτό', δηλαδή το είδος του φυτού από το οποίο προήλθε το γαλάκτωμα δεν είχε σημαντική επίδραση στην θνησιμότητα ($F_{1,36}=0.11$,

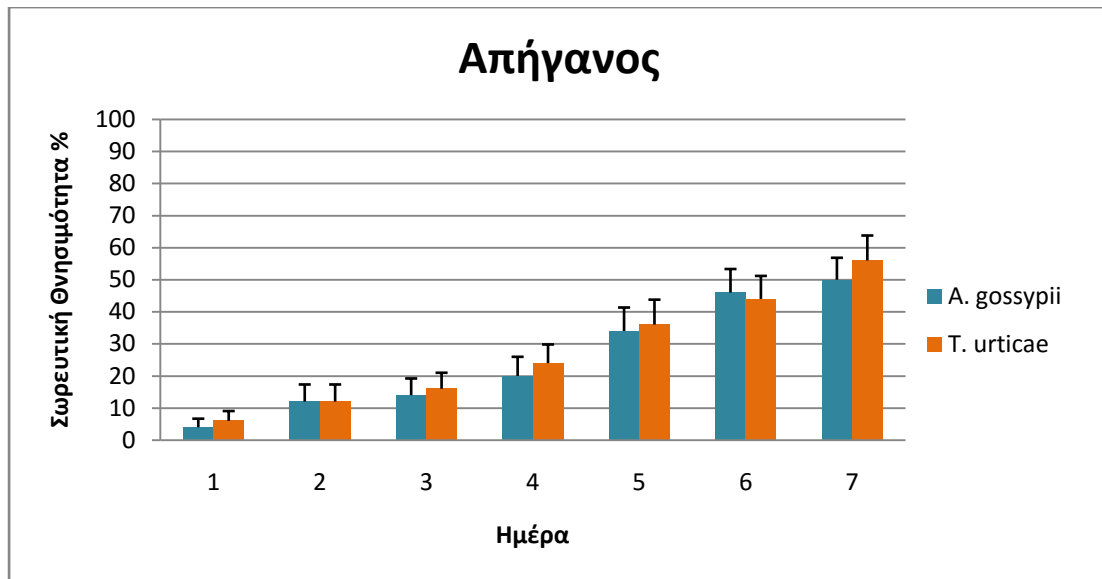
$P > 0.7376$). Επίσης, το είδος του εχθρού δεν είχε σημαντική επίδραση ($F_{1,36} = 2.97$, $P > 0.0934$) και η αλληλεπίδραση του φυτού με το είδος του εχθρού δεν ήταν σημαντική ($F_{1,36} = 0.91$, $P > 0.3473$).

Από τα ιστογράμματα 5.1 και 5.2 τα υδρόλυμα και των δύο φυτών φαίνεται ότι έχουν παρόμοια δράση στην θνησιμότητα της αφίδας *A. gossypii* και του ακάρεως *T. urticae*.

Εν συνεχεία, ακολουθούν τα ιστογράμματα (Ιστόγραμμα 5.3-5.4) του ποσοστού της σωρευτικής θνησιμότητας των εχθρών και για τα δύο υδρόλυμα, για κάθε φυτό ξεχωριστά (ανά ημέρα για 7 ημέρες).



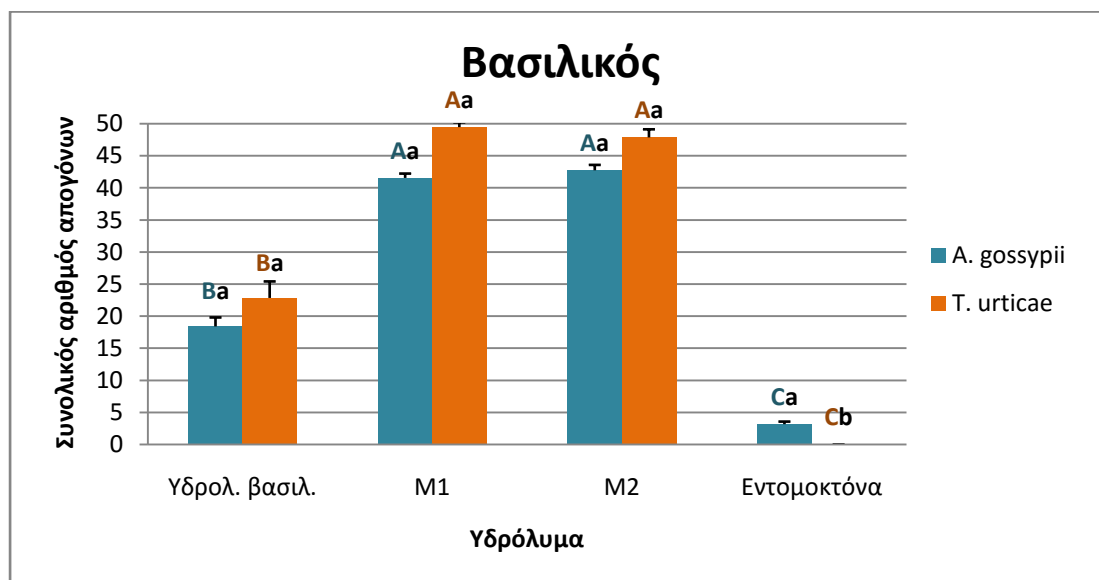
Ιστόγραμμα 5.3 Σωρευτικό ποσοστό θνησιμότητας ανά εχθρό και ανά ημέρα για επτά ημέρες από την επέμβαση με υδρόλυμα βασιλικού. ΑΞΟΝΑΣ X : Ημέρα από την επέμβαση



Ιστόγραμμα 5.4 Σωρευτικό ποσοστό θνησιμότητας ανά εχθρό και ανά ημέρα για επτά ημέρες από την επέμβαση με υδρόλυμα απήγανου. ΑΞΟΝΑΣ Χ : Ημέρα από την επέμβαση.

β) Επίδραση στο αναπαραγωγικό δυναμικό

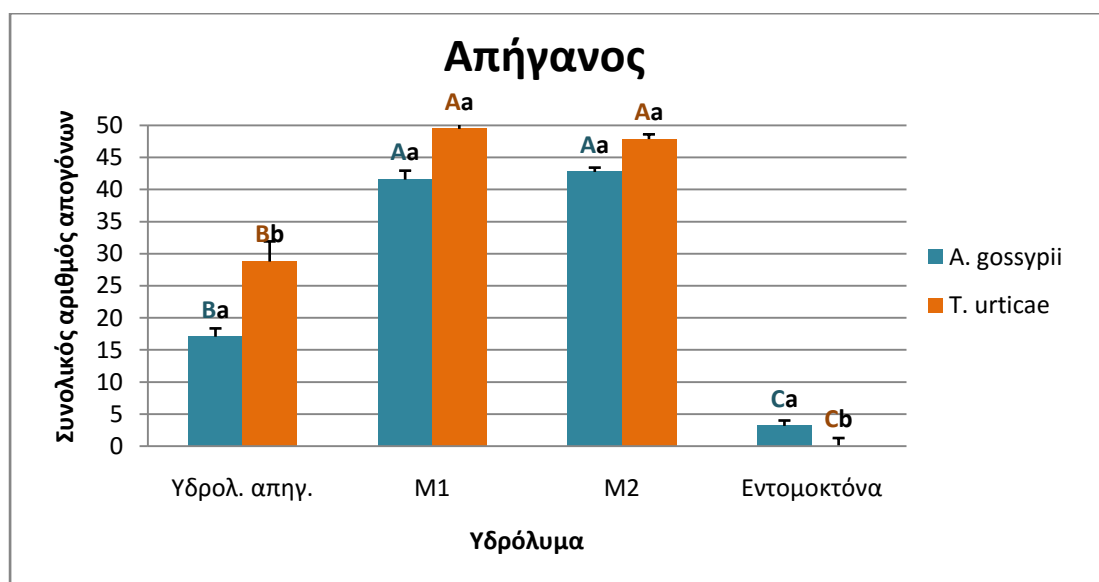
Όσον αφορά τις επεμβάσεις με το υδρόλυμα του βασιλικού (Ιστόγραμμα 6.1) βρέθηκε ότι η επίδραση του είδους του εχθρού ήταν σημαντική ($F_{7,72}=590.47$, $P<0.0001$). Ο συνολικός αριθμός απογόνων του *T. urticae* ήταν λίγο υψηλότερος σε σχέση με του *A. gossypii*. Σε σχέση με τους χημικούς μάρτυρες σημαντικά μεγαλύτερος αριθμός απογόνων βρέθηκε μετά από τον ψεκασμό με το υδρόλυμα. Το εντομοκτόνο που εφαρμόστηκε στον τετράνυχο έφερε μηδενικούς απογόνους.



Ιστόγραμμα 6.1 Συνολικός αριθμός απογόνων ανά άτομο για 7 ημέρες των δύο εχθρών με υδρόλυμα βασιλικού (τα κεφαλαία γράμματα του ίδιου χρώματος παρουσιάζουν τις διαφορές του ίδιου εχθρού σε διαφορετικές επεμβάσεις, ενώ τα μικρά τις διαφορές μεταξύ των δύο ειδών στην ίδια επέμβαση). M1 είναι οι μάρτυρες με απιονισμένο νερό και M2 οι μάρτυρες με απιονισμένο νερό και γαλακτωματοποιητές.

Για τις επεμβάσεις με το υδρόλυμα του απήγανου (Ιστόγραμμα 6.2) βρέθηκε ότι η επίδραση του είδους του εχθρού ήταν σημαντική ($F_{7,72}=539.32$, $P<0.0001$). Ο συνολικός αριθμός απογόνων του *A. gossypii* διέφερε σημαντικά και η τιμή του ήταν μικρότερη σε σχέση με αυτή του *T. urticae*. Σε σχέση με τους χημικούς μάρτυρες

σημαντικά μεγαλύτερος αριθμός απογόνων βρέθηκε μετά από τον ψεκάσμο με το υδρόλυμα. Το εντομοκτόνο που εφαρμόστηκε στον τετράνυχο έφερε μηδενικούς απογόνους.



Ιστογράμμο 6.2 Συνολικός αριθμός απογόνων ανά άτομο για 7 ημέρες των δύο εχθρών με υδρόλυμα απήγανου (τα κεφαλαία γράμματα του ίδιου χρώματος παρουσιάζουν τις διαφορές του ίδιου εχθρού σε διαφορετικές επεμβάσεις, ενώ τα μικρά τις διαφορές μεταξύ των δύο ειδών στην ίδια επέμβαση). M1 είναι οι μάρτυρες με απιονισμένο νερό και M2 οι μάρτυρες με απιονισμένο νερό και γαλακτωματοποιητές.

Τα δύο γαλακτώματα μετά την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων τους, έδειξαν ότι ο παράγοντας ‘φυτό’, δηλαδή το είδος του φυτού από το οποίο προήλθε το γαλάκτωμα δεν είχε σημαντική επίδραση ($F_{1,36}=0.58$, $P>0.4523$). Αντίθετα, το είδος του εχθρού είχε σημαντική επίδραση ($F_{1,36}=11.77$, $P<0.0015$), ενώ η αλληλεπίδραση του φυτού με το είδος του εχθρού δεν ήταν σημαντική ($F_{1,36}=2.50$, $P>0.1228$).

Από τα ιστογράμματα 6.1 και 6.2 τα υδρόλύματα και των δύο φυτών φαίνεται ότι έχουν παρόμοια δράση στον συνολικό αριθμό απογόνων του *A. gossypii* και του *T. urticae*.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της επίδρασης δύο αιθερίων ελαίων και των υδρολυμάτων τους από αποξηραμένα φυτικά δείγματα των *Ocimum basilicum* και *Ruta chalepensis* με την μέθοδο της υδροαπόσταξης, σε ενήλικα άτομα των εχθρών *Aphis gossypii*, *Myzus persicae* και *Tetranychus urticae* στις κηπευτικές καλλιέργειες αγγουριού και μελιτζάνας.

Η απόδοση του αιθερίου ελαίου των ξηρών φύλλων του βασιλικού ήταν 0.6%. Σύμφωνα με τους Blank *et al.* (2012), χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο και το ίδιο τμήμα του φυτού αποξηραμένο (συλλογή σε πλήρη άνθιση), η απόδοση των υβριδίων βασιλικού από θερμοκηπιακή καλλιέργεια της ποικιλίας Genovese ήταν 0.4%. Αντίθετα, απόσταξη νωπών φύλλων (συλλογή οριακά πριν την άνθιση) από βελτιωμένες και μη βελτιωμένες ποικιλίες βασιλικού στον αγρό έδωσε απόδοση από 0.1% έως 0.5% (Koutsos *et al.*, 2009). Επίσης, κατά τους Marotti *et al.* (1996) η απόσταξη νωπών φύλλων από τον αγρό (συλλογή στην αρχή της άνθισης) ποικιλιών Genovese είχε απόδοση από 0.5% έως 0.6%. Ακόμη, αποξηραμένα φυτικά δείγματα φύλλων μαζί με ταξιανθίες (συλλογή στην αρχή της άνθισης) και ολόκληρου του φυτού (συλλογή στην αρχή της άνθισης) από αγροτεμάχια απέδωσαν 2.1% και 0.5%-1.5% αντίστοιχα (στην δεύτερη περίπτωση οι αποδόσεις ήταν από φυτά όπου έγινε διαφυλλική λίπανση με άζωτο και φυτά χωρίς λίπανση) (Wogiatzi *et al.*, 2011; Nurzyńska-Wierdak, 2012).

Όσον αφορά τα κύρια συστατικά του αιθερίου ελαίου του βασιλικού, αυτά βρέθηκαν ότι ήταν η λιναλοόλη σε ποσοστό 80%, η ευκαλυπτόλη 6.4%, το *a-trans*-μπεργαμοτένιο 5.4% και η ευγενόλη 3%. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές πηγές αναφέρονται τα αντίστοιχα μέγιστα και ελάχιστα ποσοστά των ουσιών αυτών. Το μεγαλύτερο ποσοστό της λιναλοόλης ήταν 75.9% και το μικρότερο 36.8% (Nurzyńska-Wierdak, 2012; Koutsos *et al.*, 2009), της ευκαλυπτόλης 10.3% και 2.4% (Blank *et al.* 2012; Nurzyńska-Wierdak, 2012), του *a-trans*-μπεργαμοτένιου 5.2% και 0.3% (Blank *et al.* 2012; Koutsos *et al.*, 2009) και της ευγενόλης 20.9% και 8.6% αντίστοιχα (Sifola & Barbieri, 2006; Koutsos *et al.*, 2009). Συγκριτικά με τις ως άνω αναφορές η λιναλοόλη και το *a-trans*-μπεργαμοτένιο στην παρούσα μελέτη,

βρέθηκαν σε υψηλότερα ποσοστά από τα μέγιστα, ενώ η ευγενόλη σε χαμηλότερα ποσοστά και από το ελάχιστο.

Η απόδοση του αιθερίου ελαίου των αποξηραμένων φύλλων και ταξιανθιών του απήγανου ήταν 0.7%. Σύμφωνα με τους Saidani Tounsi *et al.* (2011) η απόδοση καλλιεργούμενων και αυτοφυών φυτών απήγανου από την Τυνησία, χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο υδροαπόσταξης, από διάφορα αποξηραμένα τμήματα του φυτού όπως φύλλα, βλαστούς, άνθη και καρπούς (συλλογή σε πλήρη άνθιση) κυμαινόταν από 0.4% έως 2.5%. Τα υψηλότερα ποσοστά ελήφθησαν από τους καρπούς είτε των καλλιεργούμενων είτε των αυτοφυών φυτών και ακολούθησαν τα υπόλοιπα τμήματα του φυτού με χαμηλότερα ποσοστά. Επίσης από άλλες περιοχές της Τυνησίας, απόσταξη αποξηραμένων υπέργειων τμημάτων και νωπών φύλλων από αυτοφυή φυτά (συλλογή κατά την περίοδο της άνθιση) έδωσε ποσοστό 5.5% και 0.7% αντίστοιχα (Mejri *et al.*, 2010; Bouabidi *et al.*, 2015). Από την περιοχή του Λιβάνου η απόδοση νωπών φύλλων και αναμεμειγμένων νωπών φύλλων με βλαστούς από αυτοφυή φυτά ήταν 0.1% χρησιμοποιώντας την τεχνική free solvent microwave extraction (εκχύλιση με μικροκύματα χωρίς διαλύτη) (Khoury *et al.*, 2014). Ακόμη, νωπά υπέργεια τμήματα και νωπά φύλλα αυτοφυών από περιοχές της Αλγερίας και του Μαρόκο έδωσαν αιθέριο έλαιο σε ποσοστό 0.8% και 0.6% αντίστοιχα (Boudiar *et al.*, 2011; Bouajaj *et al.*, 2014).

Όσον αφορά τα κύρια συστατικά του αιθερίου ελαίου του απήγανου αυτά βρέθηκαν ότι ήταν η 2-ενδεκανόνη σε ποσοστό 72% και η 2-εννεανόνη 17.1%. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές παρατίθενται τα αντίστοιχα μέγιστα και ελάχιστα ποσοστά των ουσιών αυτών. Το μεγαλύτερο ποσοστό της 2-ενδεκανόνης ήταν 83.4% και το μικρότερο σε βλαστούς αυτοφυών φυτών 26.7% (Boudiar *et al.*, 2011; Saidani-Tounsi *et al.*, 2011) και της 2-εννεανόνης 41.4% και σε φύλλα καλλιεργούμενων φυτών 1% αντίστοιχα (Khoury *et al.*, 2014; Saidani-Tounsi *et al.*, 2011). Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι κατά τους Tzakou & Couladis (2001) η 2-ενδεκανόνη βρέθηκε σε ίχνη, ενώ ως κύριο συστατικό του αιθερίου ελαίου εμφανίζεται το οξικό 2-μεθυλοοκτύλιο σε ποσοστό 44% σε φυτικό δείγμα από την περιοχή της Πάρνηθας. Για πιο ολοκληρωμένη εικόνα, αναφέρονται ενδεικτικά τα ποσοστά των δύο κύριων ουσιών και από άλλες περιοχές των χωρών όπως η Τουρκία 2-ενδεκανόνη 66.5% και 2-εννεανόνη 16.2%, Βόρεια Ινδία 41.3% έως 67.8% και 5.2% έως 33.6% και τέλος το Ιράν 52.5% και 24.1% αντίστοιχα (Baser *et al.*, 1996; Bagchi *et al.*, 2003; Rustaiyan *et al.*, 2002).. Συγκριτικά με τα παραπάνω οι δύο

κύριες ουσίες 2-ενδεκανόνη και 2-εννεανόνη της παρούσας μελέτης, βρέθηκαν σε χαμηλότερα ποσοστά.

Οι τιμές των αποδόσεων για τα υδρολύματα του βασιλικού και του απήγανου ήταν 0.24 g/100mL και 0.22 g/100mL αντίστοιχα. Σύμφωνα με τις βιβλιογραφικές αναφορές το κλάσμα των πτητικών συστατικών του υδρολύματος ενδέχεται να είναι της τάξης του 0.02% κ. ό. περίπου (με την τεχνική της απόσταξης με υδρατμούς) και να φθάνει το 7% της συνολικής απόδοσης σε αιθέριο έλαιο (Schorr, 2004; Rajeswara-Rao *et al.*, 2002). Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη σύμφωνα με τους Petrakis *et al.* (2015) με την τεχνική της υδροαπόσταξης, το κλάσμα των πτητικών συστατικών τριών διαφορετικών υδρολυμάτων έπαιρνε τιμές από 0.25% έως 0.40%.

Από τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών φαίνεται ότι η επίδραση του αιθερίου ελαίου του βασιλικού στο ποσοστό θνησιμότητας δεν διέφερε από αυτή του εντομοκτόνου στην περίπτωση του *A. gossypii* στις συγκεντρώσεις από 0.1% έως και 1%. Στην περίπτωση του *M. persicae* δεν διέφεραν οι συγκεντρώσεις 0.25% έως και 1% ενώ στον τετράνυχχο μόνο η συγκέντρωση 0.5%. Όταν χρησιμοποιήθηκε αιθέριο έλαιο απήγανου δεν διέφεραν οι συγκεντρώσεις 0.5% και 1% για το *A. gossypii* και το *T. urticae*, ενώ για το *M. persicae*, η επίδραση ήταν πάντοτε μειωμένη σε σχέση με αυτή του εντομοκτόνου. Η επίδραση του εντομοκτόνου στον αριθμό των απογόνων δεν διέφερε από αυτή των συγκεντρώσεων 0.1% έως και 1% του αιθερίου ελαίου του βασιλικού και στην συγκέντρωση 1% του απήγανου, για το *A. gossypii*, στις συγκεντρώσεις από 0.05% έως 1% του αιθερίου ελαίου του βασιλικού και 0.05%, 0.1% και 1% του αιθερίου ελαίου του απήγανου για το *M. persicae*. Για το *T. urticae* η επίδραση του εντομοκτόνου-ακαρεοκτόνου έδωσε μηδενικό αριθμό απογόνων και ήταν σημαντικά εντονότερη από όλες τις συγκεντρώσεις του αιθερίων ελαίων. Ωστόσο, όταν χρησιμοποιήθηκε το αιθέριο έλαιο του απήγανου στη συγκέντρωση 1% είχαμε επίσης πολύ σημαντική μείωση του αριθμού των απογόνων, ανάλογη με αυτή που βρέθηκε στην περίπτωση των αφίδων.

Επομένως, η επίδραση των αιθερίων ελαίων ήταν σημαντική και συγκρίσιμη με αυτή των εντομοκτόνων σε ορισμένες συγκεντρώσεις. Αυτό το εύρημα υποδεικνύει ότι θα πρέπει να εξεταστεί περαιτέρω η πιθανή αποτελεσματικότητά τους στην αντιμετώπιση των *A. gossypii*, *M. persicae* και *T. urticae*.

Σύμφωνα με τους Sammour *et al.* (2011), οι οποίοι χρησιμοποίησαν γαλάκτωμα αιθερίου ελαίου του βασιλικού σε διάφορες συγκεντρώσεις επί του συγγενούς είδους με την *A. gossypii*, *Aphis craccivora*, βρήκαν τα αποτελέσματα που

αναφέρονται στους πίνακες 4 και 5 και συγκρίνονται με τα αντίστοιχα (για το *A. gossypii*) της παρούσας μελέτης. Το ποσοστό θνησιμότητας μεταξύ των δύο ειδών διαφέρει αρκετά στις μικρές παραπλήσιες συγκεντρώσεις (0.06%/0.05%), ενώ διαφορά υπάρχει και στην μεγαλύτερη συγκέντρωση 1%. Αξιοσημείωτο δε είναι και το γεγονός ότι ο μάρτυρας του *A. craccivora* έφερε ποσοστό θνησιμότητας 36%. Όσον αφορά τους απογόνους μεγάλες διαφορές υπήρχαν σε όλες τις συγκεντρώσεις, εκτός από τις παραπλήσιες 0.125% και 0.1%.

Πίνακας 4. Συνολικά ποσοστά θνησιμότητας των δύο ειδών αφίδων (δεδομένα *A. craccivora* από τη μελέτη των Sammour *et al.* (2011))

| | | ΠΟΣΟΣΤΟ ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑΣ % | | | | |
|----------------------|-----------------|------------------------|------------------|-------------|------------|------------|
| | | ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (%) | | | | |
| Εχθρός | Ξενιστής | 0.06/0.05 | 0.125/0.1 | 0.25 | 0.5 | 1 |
| <i>A. craccivora</i> | Φασόλι | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% |
| <i>A. gossypii</i> | Αγγούρι | 28% | 94% | 90% | 96% | 70% |

Πίνακας 5. Αριθμός απογόνων των δύο ειδών αφίδων (δεδομένα *A. craccivora* από τη μελέτη των Sammour *et al.* (2011))

| | | ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΠΟΓΟΝΩΝ | | | | |
|----------------------|-----------------|------------------|------------------|-------------|-------------|--------------|
| | | ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (%) | | | | |
| Εχθρός | Ξενιστής | 0.06/0.05 | 0.125/0.1 | 0.25 | 0.5 | 1 |
| <i>A. craccivora</i> | Φασόλι | 2.25 | 1.25 | 0.33 | 0 | 0 |
| <i>A. gossypii</i> | Αγγούρι | 29.06 | 3.68 | 5.7 | 4.52 | 13.52 |

Σε ένα άλλο συγγενές είδος, το *Aphis fabae*, μετά από πειράματα για τη δράση ατμών του αιθερίου ελαίου του βασιλικού σε συγκεντρώσεις από 0.1μL/L έως 2.8μL/L σε φυτά κουκιών, βρέθηκε ότι η θανατηφόρα συγκέντρωση του 50% και του 99% του πληθυσμού ήταν 0.65μL/L και 2.79μL/L αντίστοιχα (Kimparris *et al.*, 2010).

Επί του *M. persicae*, οι Petrakis *et al.* (2014) μελέτησαν την επίδραση τριών αιθερίων ελαίων των φυτών μαντζουράνα, φλισκούνι και μελισσόχορτο, στη συγκέντρωση 0.05% και το ποσοστό θνησιμότητας ήταν 100% και για τα τρία γαλακτώματα, ανεξάρτητα του τρόπου απόσταξης. Αντίθετα, στην παρούσα εργασία

στην ίδια συγκέντρωση τα ποσοστά θνησιμότητας ήταν 26% για το γαλάκτωμα του βασιλικού και 36% για του απήγανου. Επίσης, ο αριθμός των απογόνων στην ίδια συγκέντρωση σύμφωνα με τους Petrakis *et al.* (2014), ήταν αρκετά μικρότερος σε όλες τις περιπτώσεις (και με τους δύο τρόπους απόσταξης) εν συγκρίσει με τις τιμές 25 και 21.82 του γαλακτώματος του βασιλικού και του απήγανου, αντίστοιχα.

Επίσης στο *M. persicae* σε πειράματα για την δράση ατμών του αιθερίου ελαίου του βασιλικού σε συγκεντρώσεις από 0.1μL/L έως 2.8μL/L σε φυτά μελιτζάνας, βρέθηκε ότι η θανατηφόρα συγκέντρωση του 50% και του 99% του πληθυσμού ήταν 1.20μL/L και 2.79μL/L αντίστοιχα (Kimparis *et al.*, 2010). Επιπρόσθετα, σε ίδιου τύπου πειράματα με αιθέριο έλαιο βασιλικού και δόσεις από 3.37μL έως και 27μL σε φυτά πιπεριάς τα ποσοστά θνησιμότητας κυμάνθηκαν από 10% έως 96.15% στην μεγαλύτερη δόση (Digilio *et al.*, 2008). Ως συμπληρωματική αναφορά, σημειώνεται ότι συστατικά από διάφορα φυτικά είδη του γένους *Senecio* επέφεραν αντιτροφική δράση επί του *M. persicae* (Portero *et al.*, 2012).

Οι Refaat *et al.* (2002) χρησιμοποίησαν γαλάκτωμα αιθερίου ελαίου του βασιλικού επί του *T. urticae* και οι Mansour *et al.* (1986) ακετονικό διάλυμα αιθερίου ελαίου του βασιλικού επί του συγγενούς είδους *Tetranychus cinnabarinus*, σε διάφορες συγκεντρώσεις, και βρήκαν τα αποτελέσματα που αναφέρονται στον πίνακα 6 και 7, τα οποία συγκρίνονται με τα αντίστοιχα της παρούσας μελέτης. Το ποσοστό θνησιμότητας μεταξύ των ειδών διαφέρει αρκετά σε όλες τις συγκεντρώσεις, ενώ μεγάλη διαφορά υπάρχει και στον αριθμό των ωών, όπου ήταν μεγαλύτερος στην παρούσα μελέτη, σε όλες τις συγκεντρώσεις.

Πίνακας 6. Συνολικά % ποσοστά θνησιμότητας των δύο ειδών ακάρεων (δεδομένα *T. urticae* και *T. cinnabarinus* (σε φασόλι) από τη μελέτη των Refaat *et al.* (2002) και Mansour *et al.* (1986))

| ΠΟΣΟΣΤΟ ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑΣ% | | | | | |
|------------------------|-----------------|------------------|-------------|------------|------------|
| ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (%) | | | | | |
| Εχθρός | Ξενιστής | 0.125/0.1 | 0.25 | 0.5 | 1 |
| <i>T. urticae</i> | Φασόλι | 8% | 26% | 52% | 100% |
| <i>T. cinnabarinus</i> | Φασόλι | 11% | - | 13% | 17% |
| <i>T. urticae</i> | Αγγούρι | 20% | 34% | 70% | 46% |

Πίνακας 7. Αριθμός ωών του ίδιου είδους ακάρεων (δεδομένα *T. urticae* (σε φασόλι) από τη μελέτη των Refaat *et al.* (2002))

| ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΠΟΓΟΝΩΝ (ΩΑ) | | | | | |
|-----------------------|-----------------|------------------|-------------|--------------|--------------|
| ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (%) | | | | | |
| Εχθρός | Ξενιστής | 0.125/0.1 | 0.25 | 0.5 | 1 |
| <i>T. urticae</i> | Φασόλι | 12.70 | 5.7 | 4.0 | 0.3 |
| <i>T. urticae</i> | Αγγούρι | 41.48 | 17.4 | 14.42 | 18.44 |

Επίσης, στο είδος *T. urticae* μετά από πειράματα ατμών αιθερίου ελαίου του βασιλικού σε συγκεντρώσεις από 0.39 μ L/Lair έως 3.125 μ L/Lair και 19*10⁻³ μ L/mLair έως 7.1*10⁻³ μ L/mLair σε φυτά φασολιού, βρέθηκε ότι το ποσοστό της θνησιμότητας ήταν από 20% έως 60% και από 0% έως και 88% αντίστοιχα (Aslan *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2004). Τέλος κατά τους Attia *et al.* (2012) σε πειράματα που έγιναν ψεκάζοντας φύλλα φασολιού, με αιθέριο έλαιο απήγανου αραιωμένο σε αιθανόλη (100 φορές) και νερό (άλλες 100 φορές) βρέθηκε ποσοστό θνησιμότητας 61% σε ενήλικα θηλυκά άτομα τετράνυχου.

Γενικά, η τοξική δράση των αιθερίων ελαίων διέφερε σε σχέση με το είδος του εχθρού. Ισχυρότερη φαίνεται να είναι επί της αφίδας *A. gossypii*, ενώ μόνο το αιθέριο έλαιο του βασιλικού εμφάνισε σημαντική δράση επί του *M. persicae*. Στο *T. urticae* είχαμε σχεδόν παρόμοια επίδραση μεταξύ των δύο αιθερίων ελαίων. Οι διαφορές στην επίδραση μεταξύ των ειδών των εντόμων ή ακάρεων μπορεί να οφείλονται σε παράγοντες όπως η σύσταση ή δομή του εξωσκελετού, ή φυσιολογία του κάθε είδους ή και η κινητικότητα του.

Σε σχέση με την επίδραση των δύο αιθερίων ελαίων στον αριθμό των απογόνων, η επίδραση του αιθερίου ελαίου του βασιλικού ήταν περισσότερο έντονη σε σύγκριση με αυτή του απήγανου και για τα δύο είδη αφίδων. Η επίδραση αυτή φαίνεται επίσης και από το σημαντικό ποσοστό νεκρών απογόνων στις αφίδες που είχαν ψεκάσει με το αιθέριο έλαιο του βασιλικού. Η σημαντική αυτή διαφορά στη δράση των δύο αιθερίων ελαίων πιθανώς οφείλεται στη διαφορετική σύστασή τους.

Ωστόσο θα πρέπει να σημειωθεί ότι και το αιθέριο έλαιο του απήγανου έδειξε σημαντική επίδραση στη συγκέντρωση 1% στον αριθμό των απογόνων και των τριών ειδών. Στην περίπτωση της μελέτης της εκκολαψιμότητας των ωών του τετράνυχου,

το αιθέριο έλαιο του απήγανου έδειξε σημαντικότερη σχετικά επίδραση από αυτή του αιθερίου ελαίου του βασιλικού.

Τα υδρολύματα και των δύο φυτών είχαν σημαντικά πιο έντονη επίδραση από τον μάρτυρα όμως είχαν μικρότερη επίδραση σε σχέση με τα εντομοκτόνα. Σε σχέση με προηγούμενη μελέτη των Petrakis *et al.* (2014) τα υδρολύματα των *Origanum majorana*, *Mentha pulegium* και *Melissa officinalis* έδειξαν αρκετά μικρότερη τοξική δράση (10% έως 15% θνησιμότητα) σε ενήλικα μίας ημέρας του *M. persicae* σε σχέση με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

A guide to medicinal plants in North Africa (2005) IUCN Centre of Mediterranean Cooperation, 256 pp.

Adams, R.P. (2007) *Identification of essential oil components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry, fourth ed.* Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA, 804 pp.

Al-mazra'awi, M.S. & Ateyyat, M. (2009) Insecticidal and repellent activities of medicinal plant extracts against the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci* (Hom.: Aleyrodidae) and its parasitoid *Eretmocerus mundus* (Hym.: Aphelinidae). *Journal of Pest Science*, 82, 149–154.

Al-Said, M.S., Tariq, M., Al-Yahya, M.A., Rafatullah, S., Ginnawi, O.T. & Ageel, A.M. (1990) Studies on *Ruta chalepensis*, an ancient medicinal herb still used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 28, 305–312.

Aslan, İ., Özbek, H., Çalmaşur, Ö. & ŞahİN, F. (2004) Toxicity of essential oil vapours to two greenhouse pests, *Tetranychus urticae* Koch and *Bemisia tabaci* Genn. *Industrial Crops and Products*, 19, 167–173.

Attia, S., Grissa, K.L., Ghrabi, Z.G., Maillieux, A.C., Lognay, G. & Hance, T. (2012) Acaricidal activity of 31 essential oils extracted from plants collected in Tunisia. *Journal of Essential Oil Research*, 24(3), 279–288.

Attia, S., Grissa, K.L., Lognay, G., Bitume, E., Hance, T. & Maillieux, A.C. (2013) A review of the major biological approaches to control the worldwide pest *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) with special references to natural pesticides. *Journal of Pest Science*, 86, 361–386.

Bagchi, G.D., Dwivedi, P.D., Singh, A., Haider, F. & Naqvi, A.A. (2003) Variations in essential oil constituents at different growth stages of *Ruta chalepensis* on cultivation at North Indian Plains. *Journal of Essential Oil Research*, 15(4), 263–264.

Baser, K.H.C., Özek, T. & Beis, S.H. (1996) Constituents of the essential oil of *Ruta chalepensis* L. from Turkey. *Journal of Essential Oil Research*, 8(4), 413–414.

Blackman, R.L. & Eastop, V.F. (1984) *Aphids on the world's crops: An identification guide.* Wiley, Chichester, UK.

- Blank A.F., Santa Rosa, Y.R., Carvalho Filho, J.L.S., Santos, C.A., Arrigoni-Blank, M.F., Santos Niculau, E. & Alves, P.B. (2012)** A diallel study of yield components and essential oil constituents in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Industrial Crops and Products*, 38, 93–98.
- Bouabidi, W., Hanana, M., Gargouri, S., Amri, I., Fezzani, T., Ksontini, M., Jamoussi, B. & Hamrouni, L. (2015)** Chemical composition, phytotoxic and antifungal properties of *Ruta chalepensis* L. essential oils. *Natural Product Research*, 29(9), 864–868.
- Bouajaj, S., Romane, A., Benyamna, A., Amri, I., Hanana, M., Hamrouni, L. & Romdhane, M. (2014)** Essential oil composition, phytotoxic and antifungal activities of *Ruta chalepensis* L. leaves from High Atlas Mountains (Morocco). *Natural Product Research*, 28(21), 1910–1914.
- Boudiar, T., Labeled, I., Safaei-Ghomi, J., Kabouche, A. & Kabouche, Z. (2011)** Analysis of the essential oil of *Ruta chalepensis* subsp. *angustifolia* from Algeria. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 14(6), 792–795.
- Boutoumi, H., Moulay, S. & Khodja, M. (2009)** Essential oil from *Ruta montana* L. (Rutaceae). Chemical composition, insecticidal and larvicidal activities. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 12(6), 714–721.
- Choi, W.-I., Lee, S.-G., Park, H.-M. & Ahn, Y.-J. (2004)** Toxicity of plant essential oils to *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae). *Journal of Economic Entomology*, 97(2), 553–558.
- Craker, L.E. & Simon, J.E. (1986)** *Herbs, spices and medicinal plants. Recent advances in Botany, Horticulture and Pharmacology, Volume I.* Food Product Press.
- Denny, E.F.K. (2001)** *Field distillation for herbaceous oils.* 3ème edition, Denny, McKenzie Ass, Lilydale, Tasmania, Australia.
- Digilio, M.C., Mancini, E., Voto, E. & De Feo, V. (2008)** Insecticide activity of Mediterranean essential oils. *Journal of Plant Interactions*, 3(1), 17–23.
- Dob, T., Dahmane, D. & Benedicte, G.D. (2008)** Volatile constituents of the essential oil of *Ruta chalepensis* subsp. *angustifolia* (Pers.). *Journal of Essential Oil Research*. 20(4), 306–309.
- Emden, H.F.V., Eastop, V.F., Hughes, R.D. & Way, M.J. (1969)** The ecology of *Myzus persicae*. *Annual Review of Entomology*, 14, 197–270.
- Fakhfakh, N., Zouari, S., Zouari, M., Loussayef, C. & Zouari, N. (2012)** Chemical composition of volatile compounds and antioxidant activities of essential oil, aqueous

and ethanol extracts of wild Tunisian *Ruta chalepensis* L. (Rutaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(4), 593–600.

Gahukar, R.T. (2012) Evaluation of plant-derived products against pests and diseases of medicinal plants: A review. *Crop Protection*, 42, 202–209.

Gerwing, M. (2011) Arnaldus de Villanova. In: Lagerlund, H. (Ed.), *Encyclopedia of Medieval Philosophy*. Springer Dordrecht, Heidelberg, London, New York, pp. 119–121.

Holm, Y. (1999) Bioactivity of Basil. In: Raimo, H. & Holm, Y. (Eds.), *Basil the genus Ocimum vol. 10*. Gordon & Breach Publishing, pp 113–136.

Isman, M.B. (2000) Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19, 603–608.

Jeon, J.-H., Kim, M.-G. & Lee, H.-S. (2013) Insecticidal activities of *Ruta chalepensis* leaves-isolated constituent and structure-relationships of its analogues against *Sitophilus oryzae*. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 56, 591–596.

Khoury, M., Stien, D., Ouaini, N., Eparvier, V., Apostolides, N.A. & El Beyrouthy, M. (2014) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ruta chalepensis* L. growing Wild in Lebanon. *Chemistry and Biodiversity*, 11, 1990–1997.

Kimbaris, A.C., Papachristos, D.P., Michaelakis, A., Martinou, A.F. & Polissiou, G. (2010) Toxicity of plant essential oil vapours to aphid pests and their coccinellid predators. *Biocontrol Science and Technology*, 20(4), 411–422.

Koutsos, T.V., Chatzopoulou, P.S. & Katsiotis, S.T. (2009) Effect of individual selection on agronomical and morphological traits and essential oil of a “Greek basil” population. *Euphytica*, 170, 365–370.

López, M.D. & Pascual-Villalobos, M.J. (2010) Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. *Industrial Crops and Products*, 31, 284–288.

Lubbe, A. & Verpoorte, R. (2011) Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. *Industrial Crops and Products*, 34, 785–801.

Mansour, F., Ravid, U. & Putievsky, E. (1986) Studies of the effects of essential oils isolated from 14 species of Labiatae on the carmine spider mite, *Tetranychus cinnabarinus*. *Phytoparasitica*, 14(2), 137–142.

- Margaritopoulos, J.T., Tzortzi, M., Zarpas, K.D., Tsitsipis, J.A. & Blackman, R.L. (2006)** Morphological discrimination of *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) populations feeding on Compositae. *Bulletin of Entomological Research*, 96(2), 153–165.
- Marotti, M., Piccaglia, R. & Giovanelli, E. (1996)** Differences in essential oil composition of basil (*Ocimum basilicum* L.) Italian cultivars related to morphological characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(12), 3926–3929.
- Mejri, J., Abderrabba, M. & Mejri, M. (2010)** Chemical composition of the essential oil of *Ruta chalepensis* L.: Influence of drying, hydro-distillation duration and plant parts. *Industrial Crops and Products*, 32, 671–673.
- Ntalli, N.G., Manconi, F., Leonti, M., Maxia, A. & Caboni, P. (2011)** Aliphatic ketones from *Ruta chalepensis* (Rutaceae) induce paralysis on root knot nematodes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 7098–7103.
- Nurzyńska-Wierdak, R. (2012)** Sweet basil essential oil composition: relationship between cultivar, foliar feeding with nitrogen and oil content. *Journal of Essential Oil Research*, 24(3), 217–227.
- Petrakis, E.A., Kimbaris, A.C., Lykouressis, D.P., Polissiou, M.G. & Perdikis, D.Ch. (2015)** Hydrosols evaluation in pest control: insecticidal and settling inhibition potential against *Myzus persicae* (Sulzer). *Journal of Applied Entomology*, 139(4), 260–267.
- Petrakis, E.A., Kimbaris, A.C., Perdikis, D.Ch., Lykouressis, D.P., Tarantilis, P.A. & Polissiou, M.G. (2014)** Responses of *Myzus persicae* (Sulzer) to three Lamiaceae essential oils obtained by microwave-assisted and conventional hydrodistillation. *Industrial Crops and Products*, 62, 272–279.
- Pollio, A., De Natale, A., Appetiti, E., Aliotta, G. & Touwaide, A. (2008)** Continuity and change in the Mediterranean medicinal tradition: *Ruta* spp. (Rutaceae) in Hippocratic medicine and present practices. *Journal of Ethnopharmacology*, 116, 496–482.
- Portero, A.G., González-Coloma, A., Reina, M. & Díaz, C.E. (2012)** Plant-defensive sesquiterpenoids from *Senecio* species with biopesticide potential. *Phytochemistry Reviews*, 11, 391–403.
- Rajeswara-Rao, B.R., Kaul, P.N., Syamasundar, K.V. & Ramesh, S. (2002)** Water soluble fractions of rose-scented geranium (*Pelargonium* species) essential oil. *Bioresource Technology*, 84(3), 243–246.

- Rattan, R.S. (2010)** Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection*, 29, 913–920.
- Refaat, A.M., Momen, F.M. & Amer, S.A.A. (2002)** Acaricidal activity of sweet basil and French lavender essential oils against two species of mites of the family Tetranychidae (Acari: Tetranychidae). *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 37(1–3), 287–298.
- Regnault-Roger, C. & Philogéne, B.J.R. (2008)** Past and current Prospects for the use of botanicals and plant allelochemicals in integrated pest management. *Pharmaceutical Biology*, 46(1–2), 42–52.
- Regnault-Roger, C. (1997)** The potential of botanical essential oils for insect pest control. *Integrated Pest Management Reviews*, 2, 25–34.
- Regnault-Roger, C. (2013)** Essential oils in insect control. In: Ramawat K.G. & Mérillon, J.M. (Eds.), *Natural Products*, . Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 4087–4107. pp.
- Rustaiyan, A., Khossravi, M., Sultani-Lotfabadi, F., Yari, M., Masoudi, S. & Monfared, A. (2002)** Constituents of the essential oil of *Ruta chalepensis* L. from Iran. *Journal of Essential Oil Research*, 14(5), 378–379.
- Ruzicka, L., Eschenmoser, A. & Heusser, H. (1953)** The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*, 9, 357–396.
- Saidani Tounsi, M., Wannes, W.A., Ouerghemmi, I., Msaada, K., Smaoui, A. & Marzouk, B. (2011)** Variation in essential oil and fatty acid composition in different organs of cultivated and growing wild *Ruta chalepensis* L. *Industrial Crops and Products*, 33, 617–623.
- Sammour, E.A., El-Hawary, F.M.A & Abdel-Aziz, N.F. (2011)** Comparative study on the efficacy of neemix and basil oil formulations on the cowpea aphid *Aphis craccivora* Koch. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 44(7), 655–670.
- Samuelsson, G. (2004)** Φαρμακευτικά προϊόντα φυτικής προέλευσης. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 484 σελ.
- Schorr, S.M. (2004)** *Bioresonance and phytotherapeutic hydrosols in healing*. Bioponic Phytoceuticals, 21 pp.
- Shaaya, E. & Rafaeli, A. (2007)** Essential oils as biorational insecticides – Potency and mode of action. In: Ishaaya, I., Nauen, R. & Rami Horowitz, A. (Eds.), *Insecticides design using advanced technologies*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 249–261.

- Sifola, M.I. & Barbieri, G. (2006)** Growth, yield and essential oil content of three cultivars of basil grown under different levels of nitrogen in the field. *Scientia Horticulturae*, 108, 408–413.
- Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M. & Webb, D.A. (1968)** *Flora Europaea. Volume 2. Rosaceae to Umbelliferae*. Cambridge University Press.
- Tzakou, O. & Couladis, M. (2001)** Essential oil of *Ruta chalepensis* L. from Greece. *Journal of Essential Oil Research*, 13(4), 258–259.
- Wogiatzi, E., Papachatzis, A., Kalorizou, H., Chouliara, A. & Chouliaras, N. (2011)** Evaluation of essential oil yield and chemical components of selected basil cultivars. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 25(3), 2525–2527.
- Zellagui, A., Belkassam, A., Belaidi, A. & Gherraf, N. (2012)** Environmental impact on the chemical composition and yield of essential oils of Algerian *Ruta montana* (Clus.) L and their antioxidant and antibacterial activities. *Advances in Environmental Biology*, 6(10), 2684–2688.
- Εμμανουήλ, Ν.Γ. (2004)** *Γεωργική Ζωολογία*. Πανεπιστημιακές Σημειώσεις. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 315 σελ.
- Καββαδάς, Δ.Σ. (1956)** *Εικονογραφημένον βοτανικόν-φυτολογικόν Λεξικόν. Τόμος Ζ'*. Εκδόσεις Γ.Π. Ξένου, Αθήναι.
- Κατσιώτης, Σ.Θ. & Χατζοπούλου, Π.Σ. (2010)** *Αρωματικά φυτά και αιθέρια έλαια*. Εκδόσεις Αδελφών Κυριακίδη Α.Ε, 976 σελ.
- Κουκ, Κ.Μ. (2003)** Ελληνικά αρωματικά φυτά: Χρήσεις και έρευνα. *ΕΘΙΑΓΕ*, 14, 22–25.
- Κουτσός, Θ.Β. (2006)** *Αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά. Βοτανική ταξινόμηση, οικολογία, καλλιεργητικές οδηγίες, χρήσεις*. Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη.
- Κωβαίος, Δ.Σ. (2010)** *Ακαρολογία*. Εκδόσεις Αγροτύπος, Αθήνα, 224 σελ.
- Πολυσίου, Μ. Π. & Ταραντίλης, Π.Α. (2008)** *Ενόργανη Ανάλυση*. Πανεπιστημιακές Σημειώσεις, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 134 σελ.
- Σκρουμπής, Β.Γ. (1985)** *Αρωματικά φυτά και αιθέρια έλαια*. Γιαχούδη-Γιαπούλη Ο.Ε. Θεσσαλονίκη.
- Σκρουμπής, Β.Γ. (1990)** *Αρωματικά – Μελισσοτροφικά, φαρμακευτικά φυτά της Ελλάδας*. Έκδοση Γεωτεχνικού Επιμελητηρίου Ελλάδας, Θεσσαλονίκη.
- Σπύρου, Α.Π. (1984)** *Τα βότανα και θεραπευτικές τους ιδιότητες*. Αγροτικός Εκδοτικός Οίκος Σπύρος Σπύρου Ε.Ε., Αθήνα.

Στεφανάκη-Νικηφοράκη, Μ. (1999a) *Συστηματική Βοτανική. Αγγειόσπερμα. Τόμος Α*. Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα, 224 σελ.

Στεφανάκη-Νικηφοράκη, Μ. (1999b) *Συστηματική Βοτανική. Κλείδες. Τόμος Β*. Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα, 375 σελ.

Τζανακάκης, Μ.Ε. & Κατσόγιαννος, Β.Ι. (2003) *Έντομα καρποφόρων δένδρων και αμπέλου*. Εκδόσεις Αγροτύπος, Αθήνα, 360 σελ.

Τόλης, Ι.Δ. (1986) *Βαμβάκι – Εχθροί, ασθένειες, ζιζάνια*. Τόλης, Ι., Θεσσαλονίκη.