

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ & ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Διερεύνηση της δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων από σπόρους φυτικών ειδών *Cannabis sativa*, *Eruca sativa*, *Raphanus sativus* κατά του νηματώδη *Meloidogyne javanica*

ΣΤΕΦΑΝΟΣ Γ. ΚΑΜΑΡΑΣ

ΑΘΗΝΑ 2016

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΙΩΑΝΝΗΣ ΓΙΑΝΝΑΚΟΥ
(ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ)

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Διερεύνηση της δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων από σπόρους φυτικών ειδών *Cannabis sativa*, *Eruca sativa*, *Raphanus sativus* κατά του νηματώδη *Meloidogyne javanica*

ΣΤΕΦΑΝΟΣ Γ. ΚΑΜΑΡΑΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΙΩΑΝΝΗΣ ΓΙΑΝΝΑΚΟΥ
(ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ)

Εξεταστική επιτροπή

Γιαννακού Ιωάννης, Επ. καθηγητής ΓΠΑ, επιβλέπων

Μενκίσογλου - Σπυρούδη Ουρανία, Καθηγήτρια ΑΠΘ

Περδίκης Διονύσιος, Επ. καθηγητής ΓΠΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η νηματοδοκτόνος δράση των φυτικών εκχυλισμάτων από τους σπόρους των φυτικών ειδών *Cannabis sativa*, *Eruca sativa*, *Raphanus sativus* κατά του νηματώδη *Meloidogyne javanica*. Οι βιοδοκιμές που πραγματοποιήθηκαν αφορούσαν i) στην πρόκληση παράλυσης σε προνύμφες δευτέρου σταδίου (J2), ii) στην πρόκληση της θνησιμότητας των προνυμφών στο έδαφος σε ελεγχόμενες θερμοκρασίες, iii) στην παρεμπόδιση εκκόλαψης των ωών των νηματωδών και iv) στην παρεμπόδιση της διαφοροποίησης των ωών.

Συγκεκριμένα μελετήθηκε η νηματοδοκτόνος δράση των παραπάνω εκχυλισμάτων στα πειράματα παράλυσης σε τέσσερις χρόνους εμβάπτισης των προνυμφών (12, 24, 48 και 96 ώρες). Η βιοδοκιμή παράλυσης των επαναλήφθηκε τρεις φορές α) μόνο με τα υδατικά εκχυλίσματα, β) υδατικά εκχυλίσματα με προσθήκη γαλακτικού οξέος και γ) υδατικά εκχυλίσματα με προσθήκη μεθανόλης. Οι συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν ήταν έξης (100, 40, 20, 10, 4, 2 mg/ml). Τα αποτελέσματα έδειξαν ισχυρή νηματοδοκτόνο δράση σε όλα τα εκχυλίσματα με επικρατέστερα τα *Eruca sativa* και *Cannabis sativa*. Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές των εκχυλισμάτων στην παρεμπόδιση διαφοροποίησης των ωών σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων (40, 10 και 4 mg/ml). Σημαντική δράση παρουσιάζουν τα εκχυλίσματα *E. Sativa* και *R. sativus* στην υψηλότερη συγκέντρωση.

Επίσης διερευνήθηκε η δράση των εκχυλισμάτων στην πρόκληση θνησιμότητας των προνυμφών στο έδαφος σε δύο επίπεδα θερμοκρασίας (22-25°C, 30°C). Οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν ήταν (100, 40, 20, 10, 4, 2 mg/ml). Τα αποτελέσματα απέδειξαν πως το εκχύλισμα *E. sativa* προκάλεσε τα υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας και στα δύο επίπεδα θερμοκρασίας ενώ ακολούθως το *C. Sativa* παρουσίασε θετικά αποτελέσματα μόνο στους 30°C.

Τέλος μελετήθηκε η επίδραση των εκχυλισμάτων στην παρεμπόδιση εκκόλαψης των ωών στις συγκεντρώσεις (100, 40, 20, 10, 4, 2 mg/ml) η οποία όμως δεν παρουσίασε σημαντική δράση στην παρεμπόδιση εκκόλαψης των προνυμφών. Τα αποτελέσματα δείχνουν πως τα φυτικά εκχυλίσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ικανοποιητικά στην πρόκληση παράλυσης και θανάτωσης των προνυμφών και με την κατάλληλη μεταχείριση να αποτελέσουν εναλλακτικά μέσα για τη διαχείριση και αντιμετώπιση του κομβονηματώδη *M. javanica*.

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ (ΑΘΗΝΑ 2016)

ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ: Ρόκα, ραφανίδα, κάνναβις, κομβονηματώδεις, γλυκοσινολικά, ισοθειοκυανιούχες ενώσεις

ABSTRACT

This study investigated the nematicidal activity of plant extracts by the seeds of *Cannabis sativa*, *Eruca sativa* and *Raphanus sativus* against to *Meloidogyne javanica*. The bioassays were tested i) on J2 motility, ii) on the J2 mortality into the soil under controlled temperature, iii) the inhibition of egg (J2) hatching and iv) the inhibition of egg differentiation.

Specially studied the nematicidal activity of these extracts in paralysis experiments in four immersion times of J2 (12, 24, 48 and 96 hours). The bioassay paralysis was repeated three times a) only with aqueous extracts, b) aqueous extracts with galactic acid and c) aqueous extracts with methanol. The concentrations of extracts were tested are (100, 40, 20, 10, 4, 2 mg/ml). The results showed strong nematicidal activity in all extracts and mainly at *Eruca sativa* and *Cannabis sativa*. The bioassays of extracts in the inhibition of egg differentiation were tested in three concentrations (40, 10 και 4 mg/ml). The extracts of *E. Sativa* and *R. Sativus* had nematicidal activity at the highest concentration.

Also investigated the nematicidal activity of the extracts on the mortality of nematodes (J2) in soil at two temperature levels (22-25°C, 30°C). The concentrations tested were (100, 40, 20, 10, 4, 2 mg/ml). The results showed that the extracts of *E. sativa* caused the highest mortality rates in both temperatures and then the *C. sativa* showed positive results only at 30°C.

Finally studied the effect of the extracts on inhibition of hatching of the eggs in the concentrations (100, 40, 20, 10, 4, 2 mg/ml). which had no effect in inhibiting hatching of J2. The results show that the plant extracts can be used effectively in causing paralysis and death of (J2) nematode and with the appropriate treatment as alternative for the management and control of the *M. javanica* nematode.

Title of Master

The investigation of action of plants extracts from seeds of plant species *Cannabis sativa*, *Eruca sativa*, *Raphanus sativus* against to root-knot nematode *M. javanica*.

AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS (ATHENS 2016)

KEY-WORDS: *Eruca sativa*, *Raphanus sativus*, *Cannabis sativa*, root-knot nematodes, glycosinolates, isothiocyanates

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία ανατέθηκε ως μεταπτυχιακή μελέτη από τον Επίκουρο Καθηγητή Νηματωδολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών Γιαννακού Ιωάννη, τον οποίο επιθυμώ να ευχαριστήσω θερμά για τη διόρθωση αυτής και για την πληροφόρησή μου σε θέματα διαχείρισης νηματωδών. Ιδιαίτερος όμως τον ευχαριστώ για τη συνεχή καθοδήγηση, βοήθεια και εν γένει συνδρομή του τόσο κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας, όσο και καθ' όλη τη διάρκεια της προπτυχιακής και μεταπτυχιακής μου πορείας.

Επιθυμώ να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην Καθηγήτρια της Γεωπονικής σχολής του ΑΠΘ Μενκίσογλου-Σπυρούδη Ουρανία και στον Επίκουρο Καθηγητή Εντομολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών Περδίκη Διονύσιο, μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, για την ανάγνωση της παρούσας μελέτης και των υποδείξεών τους για την βελτίωση αυτής.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τη Γεωπόνο και Υπ. Διδάκτωρ του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών Νάσιου Ελένη για την καθοδήγησή της στην εκτέλεση της πειραματικής διαδικασίας αλλά κυρίως για την αμέριστη βοήθεια καθ' όλη την διάρκεια ολοκλήρωσης της παρούσας μελέτης. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Μεταπτυχιακό φοιτητή Μπιρμπίλη Ιωάννη για την βοήθεια του όποτε τη χρειάστηκα καθώς και τους υπολοίπους φοιτητές του εργαστηρίου για την βοήθεια τους όποτε ήταν αναγκαία.

Αφιερωμένο στην Κωνσταντίνα

Περιεχόμενα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Κομβοηματοώδεις.....	9
1.2 Σημαντικότερα είδη, γεωγραφική εξάπλωση και οικονομική σημασία της προσβολής τους.....	9
1.3 Βιολογικός κύκλος.....	10
1.4 Συμπτωματολογία.....	12
1.5 Μέθοδοι αντιμετώπισης των κομβοηματοωδών.....	14
1.5.1 Καλλιεργητικά μέτρα.....	14
1.6 Φυσικές μέθοδοι αντιμετώπισης.....	15
1.7 Χημικές μέθοδοι αντιμετώπισης.....	17
1.8 Βιολογική αντιμετώπιση.....	19
1.9 Φυτικά εκχυλίσματα ως προϊόντα δράσης στην αντιμετώπιση των νηματωδών.....	22
1.10 Γλυκοσινολικά οξέα.....	22
1.11 Υδρολύση των γλυκοσινολικών.....	24
1.12 Φαινολικά οξέα.....	25
1.13 Φλαβονοειδή.....	25
1.14 Αλκαλοειδή.....	26
1.15 Αιθέρια έλαια.....	26
1.16 Τερπένια.....	26
1.17 <i>Cannabis sativa</i> (Linnaeus 1753) (Cannabaceae).....	27
1.18 <i>Eruca sativa</i> Mill. (Brassicaceae).....	29
1.19 <i>Raphanus sativus</i> (Brassicaceae).....	31
2. Σκοπός της εργασίας.....	33
3. Υλικά και μέθοδοι.....	34
3.1 Υλικά και μέθοδοι παρασκευής υδατικών εκχυλισμάτων από τους σπόρους των φυτικών ειδών.....	34
3.2 Ανάπτυξη, απομόνωση και διατήρηση των πληθυσμών <i>M. javanica</i>	35
4. Δοκιμές δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων.....	37
4.1 Δοκιμές δράσης στην παράλυση των προνυμφών <i>M. javanica</i>	37
4.2 Μέθοδος παραλαβής των μεθανολικών εκχυλισμάτων.....	38
4.3 Δοκιμές επίδρασης των εκχυλισμάτων στην εκκόλαψη των ωών του <i>M. javanica</i>	39
4.4 Δοκιμές επίδρασης των υδατικών εκχυλισμάτων σε προνύμφες (J2) στο έδαφος.....	41
4.5 Δοκιμές επίδρασης των υδατικών εκχυλισμάτων στην εκκόλαψη και διαφοροποίηση των ωών.....	42
4.6 Στατιστική ανάλυση.....	43
5. Αποτελέσματα.....	44
5.1 Επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων στην παράλυση των προνυμφών <i>M. javanica</i> (J2).....	44
5.2 Παράλυση των προνυμφών με τη προσθήκη γαλακτικού οξέος στα υδατικά εκχυλίσματα.....	48
5.3 Επίδραση των μεθανολικών εκχυλισμάτων στην παράλυση των προνυμφών.....	52
5.4 Αδιαφοροποίητα – Διαφοροποιημένα – Προνύμφες (J2).....	55
5.5 Πείραμα θνησιμότητας προνυμφών (J2) με την επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων στο έδαφος σε δύο θερμοκρασίες.....	58
5.6 Επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων στην εκκόλαψη των ωών από τους ωόσακους του <i>M. javanica</i>	62
6. Συζήτηση.....	65
6.1 Επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων στην κινητικότητα και παράλυση των προνυμφών (J2) του κομβοηματοώδη <i>M. javanica</i>	66
6.2 Επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων στη διαφοροποίηση των ωών και την εκκόλαψη των προνυμφών.....	68
6.3 Επίδραση των εκχυλισμάτων στην θνησιμότητα των προνυμφών εντός του εδάφους σε δύο επίπεδα θερμοκρασίας.....	68

6.4 Επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων στην εκκόλαψη των ωών του <i>M. javanica</i>	70
7. Συμπεράσματα.....	71
8. Βιβλιογραφία	74

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Κομβονηματώδεις

Οι νηματώδεις είναι μέλη του ζωικού βασιλείου που ανήκουν στο φύλο NEMATODA (NEMATATA). Είναι πολύπλοκοι, ευκαρυωτικοί ασπόνδυλοι οργανισμοί. Έχουν πάρει το όνομα τους από την ελληνική λέξη νήμα η οποία περιγράφει το σχήμα και τη μορφή του νηματώδη. Το σώμα τους είναι κυλινδρικό επίμηκες και σε εγκάρσια τομή κυκλικό. Είναι ιδιαίτερα επιζήμιοι στις καλλιέργειες διότι διαβιούν στο έδαφος και προσβάλλουν όλα τα μέρη του φυτού, με το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών να προσβάλλει τα υπόγεια τμήματα. Πολλά από τα είδη είναι ενδοπαράσιτα, άλλα είναι εκτοπαράσιτα και άλλα εισβάλλουν στο φυτό και συμπληρώνουν κάποιο στάδιο του βιολογικού κύκλου τους μέσα σε αυτό. Ένα από τα περισσότερο διαδεδομένα και επιζήμια γένη είναι το *Meloidogyne* (κν. κομβονηματώδεις) το οποίο πήρε την ονομασία του από τον Goeldi το 1887 και προέρχεται από τις λέξεις "μήλο" και "γυνή" περιγράφοντας το σχήμα του θηλυκού ατόμου κατά τη διάρκεια του ενήλικου σταδίου (Γιαννακού και Προφήτου, 2001). Τα είδη των κομβονηματωδών του γένους *Meloidogyne* ανήκουν στην οικογένεια *Heteroderidae* της τάξης *Tylenchida* (Chitwood, 1949).

1.2 Σημαντικότερα είδη, γεωγραφική εξάπλωση και οικονομική σημασία της προσβολής τους

Οι κομβονηματώδεις θεωρούνται ένα από τα περισσότερο διαδεδομένα παράσιτα σε όλο τον κόσμο και το αίτιο για σημαντικές ζημιές στην αγροτική παραγωγή. Παρότι πάνω από 90 είδη *Meloidogyne* έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα, τέσσερα χρήζουν ιδιαίτερης οικονομικής σημασίας. Πρόκειται για τα *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* και *M. halpa*. Τα είδη αυτά διαθέτουν το μεγαλύτερο εύρος ξενιστών καθώς και το σημαντικότερο αρνητικό οικονομικό αντίκτυπο στην γεωργική παραγωγή. Η κατανομή των κυριότερων ειδών που απαντώνται στις τροπικές και υποτροπικές ζώνες καλλιέργειας καθορίζεται από τη θερμοκρασία. Τα

M. incognita και *M. javanica* είναι διαδεδομένα στις τροπικές περιοχές ενώ το *M. arenaria* απαντάται κυρίως στις υποτροπικές περιοχές. Το *M. halpa* είναι κοινό είδος στις τροπικές περιοχές αλλά μπορεί να βρεθεί και σε ψυχρότερες περιοχές της τροπικής ζώνης (Luc et al., 2005). Σε δείγμα 1000 πληθυσμών από 75 χώρες το 53% ήταν *M. incognita*, το 30% *M. javanica*, το 8% *M. arenaria* και το 8% *M. halpa* ενώ το υπόλοιπο 2% να ανήκει σε άλλα είδη (Luc et al., 2005).

Το γένος *Meloidogyne* προσβάλλει πάνω από 3000 είδη φυτών παγκοσμίως, συμπεριλαμβανομένων λαχανικών, ψυχανθών, δημητριακών, θαμνώδεις και δενδρώδεις καλλιέργειες (Surtleff and Averre, 2000). Αποτελεί τον πιο σοβαρό εχθρό της αγροτικής παραγωγής και είναι η αιτία σοβαρών ποσοτικών και ποιοτικών απωλειών. Οι απώλειες παγκοσμίως σε καλλιέργειες κηπευτικών είναι αξίας 100 δις δολαρίων (Sasser et al., 1987). Σύμφωνα με τον Κύρου (2004) διαπιστώθηκαν τα 4 προαναφερθέντα είδη νηματωδών σε πολλά φυτά ξενιστές στον ελληνικό χώρο. Το είδος *M. incognita* διαπιστώθηκε ότι προσβάλλει πολλά είδη καλλιεργειών όπως: τομάτα, αγγούρι, πιπεριά, κολοκύθι, πεπόνι, καρότο, λάχανο, μαιντανό, μελιτζάνα, καπνού, βαμβάκι, ζαχαρότευτλα, σπυρώνες πυρηνοκάρπων, ροδάκινα, αμυγδαλιές και κεράσια. Το είδος *M. javanica* διαπιστώθηκε σε προσβολή τομάτας, αγγουριού, μελιτζάνας, σέλινου, καπνού, ζαχαρότευτλων και ανθοκομικών φυτών. Τα *M. halpa* και *M. arenaria* διαπιστώθηκαν σε μικρότερη κλίμακα κυρίως σε είδη κηπευτικών: τομάτας, αγγουριού, μελιτζάνας, πατάτας, φασολιού, κολοκύθι.

1.3 Βιολογικός κύκλος

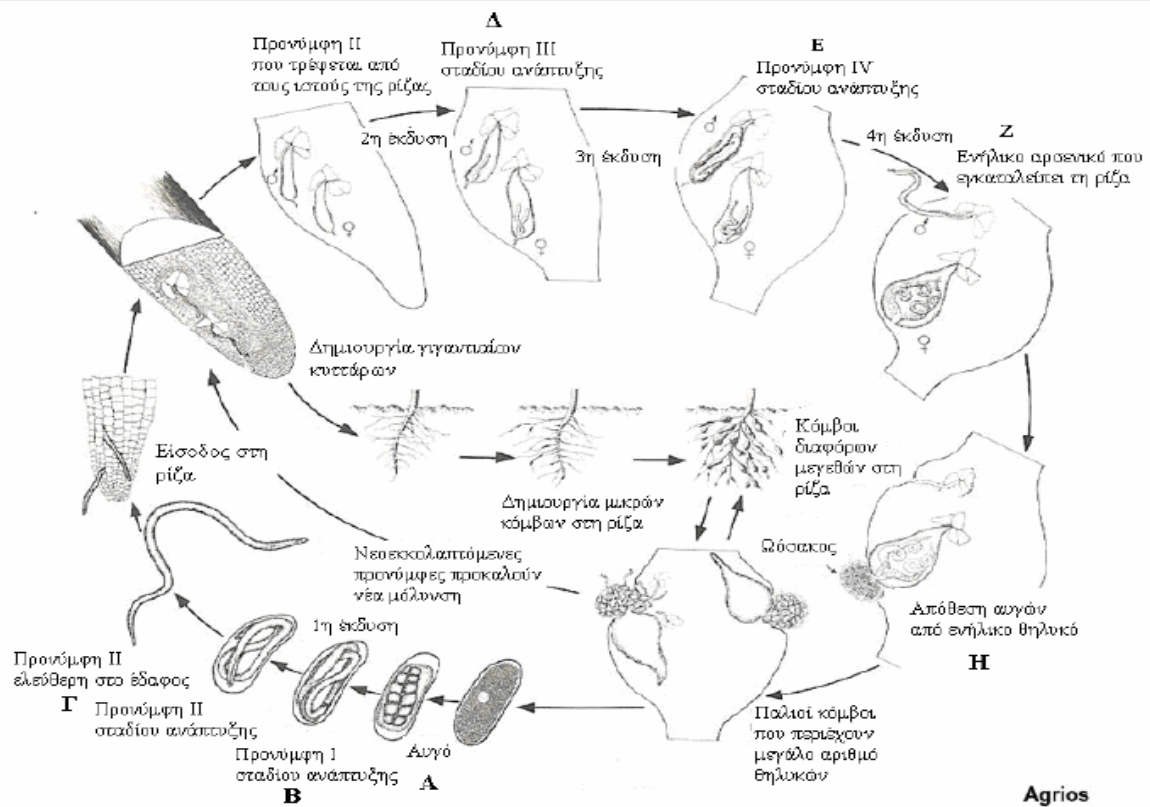
Οι φυτοπαρασιτικοί νηματώδεις είναι υποχρεωτικά παράσιτα και τρέφονται από τα φυτικά κύτταρα. Τόσο οι προνύμφες όσο και τα ενήλικα στάδια είναι ενεργά για την εύρεση τροφής στην επιφάνεια ή στο εσωτερικό των φυτικών ιστών. Από το ωό εκκολάπτεται η σκωληκόμορφη προνύμφη, που μοιάζει με το ενήλικο αρσενικό και παρουσιάζει 4 νυμφικά στάδια. Μετά την εκκόλαψη η προνύμφη έχει πλήρως ανεπτυγμένα όλα τα οργανικά συστήματα πλην του αναπαραγωγικού που εμφανίζεται κατά την μετεμβρυακή ανάπτυξη των νηματωδών.

Μπορούν να διαχειμάζουν είτε ως ωά είτε ως προνύμφες 2^{ου} σταδίου (J2) αλλά ο συνηθέστερος τρόπος είναι υπό τη μορφή ωοσάκων που σχηματίζονται από το

θηλυκό. Εντός αυτής της κατασκευής τα ωά προφυλάσσονται από την αφυδάτωση, τους εχθρούς και παθογόνους μικροοργανισμούς. Τα ωά περιέχουν κυρίως προνύμφες 1^{ου} σταδίου οι οποίες υφίστανται την πρώτη τους έκδυση και σχηματίζονται οι προνύμφες 2^{ου} σταδίου (J2). Το στάδιο αυτό αναφέρεται ως μολυσματικό εξαιτίας του ότι είναι αυτό που εισέρχεται εντός του φυτού και προκαλεί τον παρασιτισμό. Κατά την παρουσία του φυτού-ξενιστή οι προνύμφες μετακινούνται προς αυτό λόγω των ουσιών που εκκρίνονται από τις ρίζες του. Όταν έρθουν σε επαφή με τη ρίζα, με γρήγορες κινήσεις του σπιλέτου καθώς και με τη βοήθεια των εκκρίσεων των οισοφαγικών αδένων, που περιέχουν πηκτινολυτικά ένζυμα, διαρρηγνύουν τους φυτικούς ιστούς και διεισδύουν εντός της ρίζας. Μέχρι να εγκατασταθούν στη μόνιμη θέση διατροφής τρέφονται με τη βοήθεια του σπιλέτου. Με την εγκατάσταση στη μόνιμη θέση προκαλούν τη δημιουργία γιγαντιαίων κυττάρων (giant cells). Οι προνύμφες υπόκεινται στη δεύτερη έκδυση και αναπτύσσονται οι 3^{ου} σταδίου προνύμφες δύο εβδομάδες μετά από κατάλληλες συνθήκες. Ακολουθεί η τρίτη έκδυση και η ανάπτυξη του 4^{ου} σταδίου όπου και γίνεται ο διαχωρισμός μεταξύ αρσενικού και θηλυκού.

Χαρακτηριστικό του βιολογικού κύκλου των ειδών του γένους *Meloidogyne* είναι ότι τα θηλυκά άτομα δεν χρειάζεται να συζευχθούν με τα αρσενικά αλλά μπορούν να παράγουν ωά παρθενογενετικώς. Η κατασκευή του ωοσάκου βοηθά ώστε να συγκρατεί όλα τα ωά μαζί και αποτελείται από υδατάνθρακες, ένζυμα και γλυκοπρωτεΐνες. Στην αρχή ο ωοσάκος είναι μαλακός, κολλώδης και διάφανος και με το πέρασμα του χρόνου γίνεται σκληρός και σκουροκίτρινος. Τα θηλυκά σχηματίζονται μετά από 15 ημέρες στους 29°C ενώ η αναπαραγωγική τους ωρίμανση ολοκληρώνεται 6 ημέρες αργότερα. Το διάστημα αυτό εξαρτάται από την θερμοκρασία, την εδαφική υγρασία, την πυκνότητα του πληθυσμού καθώς και την κατάσταση του φυτού-ξενιστή. Επίσης ο αριθμός των ωών που παράγει το θηλυκό εξαρτάται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος, τη φυσική κατάσταση του νηματώδη κατά τη μόλυνση αλλά και από το φυτό-ξενιστή. Τα παραγόμενα ωά μπορούν να φθάσουν σε αριθμό τα 2.000 και η εκκόλαψή τους ξεκινά σε 7 ημέρες μετά την δημιουργία τους. Ωστόσο επειδή μέσα στον ωοσάκο υπάρχουν ωά διαφορετικού βιολογικού σταδίου, η επώασή τους συνεχίζεται για πολλές ημέρες (Εικόνα 1). Η διάρκεια του βιολογικού κύκλου εκφράζεται ως το άθροισμα των ημεροβαθμών πάνω από την κατώτερη θερμοκρασία ανάπτυξης. Ο Κύρου (2004) αναφέρει ότι για τα είδη του γένους *Meloidogyne* χρειάζονται 11500 έως 13000

μονάδες θερμότητας (ημεροβαθμοί) για την ολοκλήρωση του βιολογικού τους κύκλου όταν η θερμοκρασία του εδάφους κυμαίνεται μεταξύ 14 έως 32°C με άριστη τους 27°C. Μία μονάδα θερμότητας ορίζεται ως η επικράτηση ενός βαθμού της κλίμακας Celsius πάνω από το κατώτερο όριο (10°C) για μία ώρα.



Εικόνα 1. Βιολογικός κύκλος των κομβοηματωδών *Meloidogyne* spp. A. Διαφοροποιημένο αυγό (πέντε κυττάρων), B. Αυγό που εμπεριέχει προνύμφη πρώτου σταδίου ανάπτυξης, Γ. Προνύμφη δευτέρου σταδίου ανάπτυξης (μολυσματικό στάδιο), Δ. Προνύμφη τρίτου σταδίου ανάπτυξης, E. Προνύμφες τετάρτου σταδίου ανάπτυξης (έναρξη διαφοροποίησης φύλου), Z. Προνύμφες τέταρτου σταδίου ανάπτυξης πλήρως διαφοροποιημένες φυλετικά, H. Ενήλικο θηλυκό με ωόσακκο στον οποίο έχει ωοτοκήσει και ενήλικο αρσενικό (Agrios, 1997)

1.4 Συμπτωματολογία

Οι νηματώδεις προσβάλλουν το ριζικό σύστημα των φυτών. Η παρουσία ακανόνιστων διογκωμένων κόμβων αποτελεί το κύριο παθογνωμονικό σύμπτωμα της προσβολής (Εικόνα 3). Αυτοί οι κόμβοι δημιουργούνται από το σχηματισμό ασθενικών διογκωμένων κυττάρων εντός της ρίζας τα οποία λόγω του μεγέθους τους ονομάζονται "γιγαντιαία κύτταρα" ή giant cells στην διεθνή βιβλιογραφία. Το

μέγεθος, το σχήμα των όγκων και το μέγεθος της προσβολής εξαρτάται από το είδος του νηματώδη, τον πληθυσμό, την ευαισθησία και την ηλικία του φυτού ξενιστή. Για παράδειγμα οι κόμβοι που προκαλεί το είδος *M. incognita* σε ρίζες τομάτας είναι μεγάλοι ενώ οι κόμβοι σε φυτά πατάτας από τον *M. halpa* είναι μικρότεροι. Στα κολοκυνθοειδή οι ρίζες σχηματίζουν ευμεγέθεις και σαρκώδεις κόμβους ενώ στα λαχανικά οι κόμβοι είναι μικρότερου μεγέθους και πιο σκληροί. Σε καλλιέργειες μονοκοτυλήδων φυτών όπως το κρεμμύδι και το πράσο, τα συμπτώματα είναι περισσότερο εμφανή με την παρουσία των ωοσάκων στην επιφάνεια των ριζών (Luc et al., 2005). Εκτός των υπερπλασιών και της ανώμαλης ανάπτυξης των ριζών παρατηρούνται επίσης συμπτώματα όπως η μείωση του ριζικού συστήματος, νεκρώσεις των ιστών της ρίζας, διακοπή της αγγειακής συνέχειας της ρίζας λόγω καταστροφής των κυττάρων και μείωση των διαθέσιμων συστατικών για το φυτό (Εικόνα 2).

Τα συμπτώματα στο υπέργειο τμήμα των φυτών δεν εμφανίζουν καμία τυπική μορφή που να προδίδει την παρουσία των νηματωδών. Χαρακτηριστικά όπως η μάρανση των φύλλων, η χλώρωση και περιφερειακή ξήρανση των φύλλων αλλά και συμπτώματα έλλειψης ιχνοστοιχείων ή αζώτου (Εικόνα 3).



Εικόνα 2 και 3. Υπόγεια συμπτώματα προσβολής *M. javanica* στο ριζικό σύστημα και υπέργεια συμπτώματα σε καλλιέργεια τομάτας.

1.5 Μέθοδοι αντιμετώπισης των κομβονηματοδών

1.5.1 Καλλιεργητικά μέτρα

Αμειψισπορά

Αφορά στην εναλλαγή φυτικών ειδών τα οποία παρουσιάζουν διαφορετική ευπάθεια στους νηματώδεις ώστε να συγκρατηθεί ο πληθυσμός τους σε επίπεδα κάτω από το όριο ανεκτής πυκνότητας πληθυσμού. Τα περισσότερα κομποπολίτικα είδη κομβονηματοδών είναι πολυφάγα και είναι δύσκολο να εφαρμοστεί ένα πρόγραμμα αμειψισποράς το οποίο θα είναι αποτελεσματικό για τον έλεγχο τους. Τα είδη *M. incognita* και *M. javanica* είναι δύσκολο να αντιμετωπιστούν διότι αναπαράγονται σε πλήθος ζιζανίων αλλά και άλλων καλλιεργειών. Παρόλα αυτά υπάρχουν και περιπτώσεις όπου η εφαρμογή της αμειψισποράς παρουσίασε εξίσου καλή ή καλύτερη αποτελεσματικότητα σε σύγκριση με τη χημική. Η εναλλαγή ανθεκτικής ποικιλίας τομάτας και αγγουριού σε πρόγραμμα αμειψισποράς είναι πιο αποτελεσματική για τον έλεγχο του κομβονηματοδού *M. incognita* σε σύγκριση με τη χρησιμοποίηση του χημικού ethoprophos (Colyer et al., 1998). Επίσης η χρησιμοποίηση ταυτόχρονα με την εγκατάσταση της καλλιέργειας, φυτικών ειδών που δρουν ανταγωνιστικά ως προς τους νηματώδεις, όπως το γένος *Tagetes* αλλά και η χρήση υπολειμμάτων φυτικών ειδών που ανήκουν στο γένος *Brassica* αποτελεί συνδυασμό προστασίας προς την καλλιέργεια (Hidalgo-Diaz and Kerry, 2008).

Προσθετικά εδάφους

Είναι οργανικά και ανόργανα υλικά τα οποία ενσωματώνονται στο έδαφος και έχουν ως αποτέλεσμα την αλλαγή των φυσικοχημικών του ιδιοτήτων. Πρόκειται για ζωική κοπριά, πριονίδι, σκόνη ζαχαροκάλαμου, χιτίνη, οργανικά και ανόργανα λιπάσματα, παραπροϊόντα ελαιούχων σπόρων. Με μη τοξικές ενώσεις όπως κατάλοιπα ζάχαρης ή σκόνη ζαχαροκάλαμου μπορεί να επιτευχθεί ο έλεγχος των κομβονηματοδών (Luc et al., 2005, Stirling, 1991, Sikora, 1992). Η χρήση κομποστοποιημένων λυμάτων δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα ενάντια στο *M. javanica* (Barbosa et al., 2004). Εκτός όμως από τη δράση τους εναντίον των κομβονηματοδών βελτιώνουν τη δομή του

εδάφους, την υδατοχωρητικότητα, μειώνουν τις εδαφογενείς ασθένειες και περιορίζουν την ανάπτυξη των ζιζανίων.

Ανθεκτικές ποικιλίες

Η χρησιμοποίηση των ανθεκτικών ποικιλιών είναι μία οικονομική και φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος ελέγχου των κομβονηματωδών. Η ανθεκτικότητα των φυτών στην προσβολή των νηματωδών μπορεί να επιτευχθεί σε μικρό ή μεγάλο βαθμό με φυσική ή τεχνητή επιλογή. Η πιο χαρακτηριστική περίπτωση είναι το γονίδιο "Mi" που προσδίδει ανθεκτικότητα στην τομάτα ενάντια στα *M. incognita*, *M. javanica*, και *M. arenaria*. Έχει εισαχθεί σε πολλές ποικιλίες, ύστερα από εύρεση στα υβρίδια των διασταυρώσεων τομάτας καλλιεργούμενης με άγρια τομάτα (Fassuliotis, 1979). Το 2004 το 90% της καλλιεργούμενης τομάτας στην Καλιφόρνια είχε το γονίδιο "Mi" (Luc et al., 2005).

Μία άλλη μέθοδος αντιμετώπισης των κομβονηματωδών είναι ο εμβολιασμός των επιθυμητών ποικιλιών σε ανθεκτικά υποκείμενα. Το κόστος της μεθόδου είναι χαμηλότερο από εκείνο της χημικής απολύμανσης του εδάφους. Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η μείωση της ανθεκτικότητας μακροπρόθεσμα.

Φυτά-παγίδες

Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο αυτή ο πληθυσμός των κομβονηματωδών μειώνεται λόγω της ευπάθειας των φυτών στους νηματώδεις. Η ανάπτυξη των φυτών διαρκεί όσο απαιτείται για την είσοδο των νηματωδών στο ριζικό σύστημα. Εν συνεχεία ακολουθεί η καταστροφή της καλλιέργειας, πριν την ολοκλήρωση του βιολογικού κύκλου των νηματωδών.

1.6 Φυσικές μέθοδοι αντιμετώπισης

Η πρακτική αυτή περιλαμβάνει μεθόδους όπως η θερμότητα, το κάψιμο υπολειμμάτων, η εμβάπτιση σε θερμόλουτρα, η κατάκλιση με νερό, η χρήση ατμού και η ηλιοαπολύμανση (οι δύο τελευταίες εφαρμόζονται στην πράξη). Οι περισσότεροι νηματώδεις θανατώνονται σε θερμοκρασίες 44-48°C.

Χρήση ατμού

Η μέθοδος βασίζεται στην άνοδο της θερμοκρασίας του εδάφους με τη χρήση ατμού σε θερμοκρασία 100°C, ο οποίος διοχετεύεται στο έδαφος του θερμοκηπίου. Είναι ιδιαίτερα φιλική προς το περιβάλλον και τον άνθρωπο όμως τα σημαντικά μειονεκτήματα όπως ο εξειδικευμένος και ακριβός εξοπλισμός, η διάσπαση της οργανικής ουσίας του εδάφους και η δημιουργία φυτοτοξικότητας στα πρώτα στάδια ανάπτυξης των φυτών, καθιστά την μέθοδο δύσκολη στην εφαρμογή.

Ηλιοαπολύμανση

Αποτελεί μία νέα μέθοδο η οποία περιλαμβάνει την κάλυψη του εδάφους με διαφανές πλαστικό πολυαιθυλενίου το καλοκαίρι μετά από κατεργασία και πότισμα ενώ είναι ιδιαίτερα φιλική προς το περιβάλλον και τον χρήστη. Με την μέθοδο αυτή το έδαφος υφίσταται θερμικές, χημικές και βιολογικές μεταβολές οι οποίες καταλήγουν σε μείωση της δράσης των παθογόνων, των εχθρών και των ζιζανίων. Επίσης με τη μέθοδο αυτή βελτιώνεται η γονιμότητα του εδάφους.

Για την κάλυψη του εδάφους του θερμοκηπίου χρησιμοποιείται ειδικό διαφανές πλαστικό πολυαιθυλενίου πάχους 0,025-0,75 mm. Η διάρκεια κάλυψης πρέπει να είναι τουλάχιστον για 4 εβδομάδες. Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι η παραμονή του εδάφους χωρίς καλλιέργεια για ένα μήνα. Η αποτελεσματικότητα εφαρμογής της μεθόδου στον πληθυσμό των νηματωδών, σε παθογόνα αλλά και σε ζιζάνια είναι μικρότερη στα κατώτερα στρώματα εδάφους (κάτω από τα 10cm), λόγω της χαμηλότερης θερμοκρασίας σε σύγκριση με αυτήν στην επιφάνεια. Εφαρμογή της μεθόδου σε θερμοκήπιο στο Μαρόκο όπου καλλιεργήθηκε τομάτα προκάλεσε 99% μείωση της πυκνότητας του πληθυσμού των κομβονηματωδών *M. javanica* σε σύγκριση με τον μάρτυρα (Luc et al., 2005).

Ο συνδυασμός της μεθόδου με την εφαρμογή προσθετικών εδάφους ήταν πιο αποτελεσματικός στην αντιμετώπιση του *M. javanica*, από την εφαρμογή της κάθε μεθόδου ξεχωριστά (Oka et al., 2007).

1.7 Χημικές μέθοδοι αντιμετώπισης

Τα νηματωδοκτόνα τα οποία χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των κομβονηματωδών ανήκουν σε δύο κατηγορίες τα καπνιστικά και τα μη-καπνιστικά.

Καπνιστικά

Είναι πτητικές ουσίες οι οποίες εφαρμόζονται στο έδαφος, πριν την εγκατάσταση της καλλιέργειας, σε γραμμές, σε λωρίδες, σε λεκάνες αρδεύσεων ή σε ολόκληρη την έκταση του αγρού. Η αποτελεσματικότητά τους εξαρτάται από τη θερμοκρασία, την υγρασία, την διαπερατότητα του εδάφους και τις συνθήκες υποκαπνισμού. Αναλόγως του τρόπου δράσης της δραστικής ουσίας διακρίνονται σε δύο κατηγορίες. Στην πρώτη ανήκουν αυτά τα οποία για να ενεργοποιηθεί η δραστική τους ουσία χρειάζονται νερό. Συγκεκριμένα είναι το metham sodium (Varam®) το οποίο εφαρμόζεται σε υγρή μορφή και ενσωματώνεται στο έδαφος με πότισμα. Με την εφαρμογή στο έδαφος αποικοδομείται και εκλύει ισοθειοκυανιούχο μεθύλιο. Στην ίδια κατηγορία ανήκει το 3,5- διμεθυλο- 1,3,5- θειαδιάζινο -2-θειόνη (Dazomet), η αποτελεσματικότητά του οποίου είναι υψηλή όταν η υγρασία του εδάφους είναι υψηλή ώστε να υδρολυθούν τα συστατικά τα οποία είναι τοξικά στους νηματώδεις.

Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν το βρωμιούχο μεθύλιο και το 1,3- διχλωροπροπένιο τα οποία δρουν απευθείας στις αντιδράσεις νουκλεοφιλικής αντικατάστασης, όπως και της πρώτης κατηγορίας, διαπερνώντας απ' ευθείας το δερμάτιο των νηματωδών.

Τα καπνιστικά νηματωδοκτόνα είναι αποτελεσματικά εναντίον όλων των σταδίων του βιολογικού κύκλου των νηματωδών σε αντίθεση με τα μη καπνιστικά τα οποία δεν θανατώνουν απευθείας τους νηματώδεις (Wright, 1981).

Μη καπνιστικά

Τα μη καπνιστικά νηματωδοκτόνα δεν είναι αποτελεσματικά εναντίον των ωών των νηματωδών και σε πολλές περιπτώσεις δε σκοτώνουν τις προνύμφες (Luc et al., 2005). Δρουν εξ' επαφής ή με διασυστηματική δράση μέσα στο φυτό και η εφαρμογή τους γίνεται μετά τη φύτευση. Η δράση τους εντοπίζεται στη διείδυση απευθείας στο δερμάτιο του νηματώδη και στην αναστολή της

ακετυλοχολινεστεράσης. Ο θάνατος των νηματωδών επέρχεται λόγω της αδυναμίας μετακίνησής των προς το ριζικό σύστημα.

Η εφαρμογή τους πραγματοποιείται μετά την εγκατάσταση της καλλιέργειας και πρέπει να παραμείνουν για 6 έως 8 εβδομάδες για να θανατώσουν τους νηματώδεις. Τα μη καπνιστικά ανήκουν στην ομάδα των οργανοφωσφορικών και στην ομάδα των καρβαμιδικών. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν τα fenamiphos (Nemacur®), ethoprophos (Mocap®), cadusafos (Rugby®), thionazin ενώ στα καρβαμιδικά ανήκουν τα aldicarb (Temic®) και το oxamyl (Vydate®).

Πολλά από τα χημικά νηματωδοκτόνα αποσύρθηκαν μετά την αξιολόγησή τους σύμφωνα με την Κοινοτική Οδηγία 91/414/EEC εξαιτίας των δυσμενών επιπτώσεων στο περιβάλλον, τον υπόγειο υδροφόρο ορίζοντα και την ανθρώπινη υγεία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το βρωμιούχο μεθύλιο που ήταν το πλέον αποτελεσματικό απολυμαντικό εδάφους ευρέως φάσματος έναντι νηματωδών, εντόμων, παθογόνων και ζιζανίων. Τα νηματωδοκτόνα που έχουν έγκριση μέχρι σήμερα και χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση των νηματωδών καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1).

Εγκεκριμένα Νηματωδοκτόνα		
Εμπορικό όνομα	Μορφή σκευάσματος	Εγγραμμένη σύνθεση
NEMATHORIN 10 G	GR	Fosthiazate
NEMATHORIN 150 EC	EC	Fosthiazate
DEVGUARD 500 SC	SC	Iprodione
VYDATE 5 G	GR	Oxamyl
VYDATE 10 G	GR	Oxamyl
VYDATE 10 SL	SL	Oxamyl
FLOCTER 5 WP	WP	Bacillus firmus i-1582
NEMguard granules	GR	Garlic extract

VELUM PRIME	SC	Fluopyram
-------------	----	-----------

Πίνακας 1. Εγκεκριμένα νηματωδοκτόνα στην Ελλάδα

1.8 Βιολογική αντιμετώπιση

Βακτήρια και μύκητες

Η βιολογική αντιμετώπιση των κομβονηματωδών βασίζεται στην εφαρμογή παθογόνων μυκήτων, παρασίτων που προσβάλλουν ωά, προνύμφες ή ενήλικα άτομα στο έδαφος ή στην επιφάνεια των ριζών (Stirling, 1991, Jatala, 1986). Ο εμβολιασμός του εδάφους με το βακτήριο *Pasteuria penetrans*, τα σπόρια του οποίου αντέχουν στην ξηρασία και στην έκθεσή τους σε μη καπνιστικά νηματωδοκτόνα. Η εφαρμογή του πληθυσμού των σπορίων πρέπει να είναι τουλάχιστον 40.000 σπόρια ανά γραμμάριο εδάφους (Γιαννακού και Προφήτου, 2001).

Ο μύκητας *Pochonia chlamydosporia* ο οποίος παρασιτεί τα ωά προκάλεσε μείωση του πληθυσμού των *M. javanica* σε καλλιέργεια λαχανικών στην Κρήτη (Tzortzakakis and Petsas, 2003). Επίσης η εφαρμογή του μύκητα *Paecilomyces lilacinus* παρασίτησε περισσότερο τα ωά των *M. incognita* και *M. halpa* (Siddiqui and Akhtar, 2009) από τις προνύμφες 2^{ου} σταδίου. Ο μύκητας *Trichoderma harzianum* είναι αποτελεσματικός εναντίον μυκητολογικών ασθενειών και έχει αυξημένη αποτελεσματικότητα εναντίον των κομβονηματωδών. Δύο φυλές του μύκητα εφαρμόστηκαν σε φυτάρια μία εβδομάδα πριν τη μεταφύτευση και παρατηρήθηκε μείωση των *M. javanica* κατά 20-30% σε καλλιέργειες τομάτας, μελιτζάνας και πιπεριάς (Shurtleff and Averge, 2000). Σε μικρότερη κλίμακα έχει μελετηθεί η αποτελεσματικότητα του μύκητα *Paenicillium chrysogenum*, ο οποίος μείωσε το σχηματισμό όγκων προκαλούμενων από *M. javanica* σε φυτά αγγουριού και τομάτας.

Τέλος, η ενίσχυση των φυτών με ενδομυκóριζες εκτός από τις τροφοδοσία των φυτών με θρεπτικά στοιχεία, μειώνει τη διείσδυση και την εξέλιξη της προσβολής ενός μεγάλου αριθμού κομβονηματωδών σε μεγάλο εύρος καλλιεργειών (Sikora, 1995, Smith, 1987).

Βιο-απολύμανση

Είναι ένας όρος για να περιγραφεί η απολύμανση του εδάφους με στόχο την αντιμετώπιση των εδαφογενών εχθρών (νηματώδεις) και παθογόνων μικροοργανισμών (Kirkegaard et al., 1993, Angus et al., 1994) η οποία στη πράξη γίνεται με την εφαρμογή φυτικών υπολειμμάτων στο έδαφος. Λόγω της παρουσίας των γλυκοσινολικών οξέων που περιέχουν, κατά την εφαρμογή τους στο έδαφος υδρολύονται και παράγονται ισοθιοκυανιούχες ενώσεις. Οι τελευταίες έχουν την ιδιότητα να είναι πτητικές και δρουν ως βιοκτόνα κατά των παθογόνων και παρασίτων. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε λόγω της απαγόρευσης, στην Ευρωπαϊκή Ένωση, εφαρμογής συνθετικών φυτοφαρμάκων και καπνιστικών όπως το βρωμιούχο μεθύλιο και το διβρωμιούχο αιθυλένιο. Τα φυτικά είδη που χρησιμοποιούνται ως βιομάζα για τη βιοαπολύμανση είναι αυτά της οικογένειας Brassicaceae, με τα οποία έχουν γίνει αρκετές εφαρμογές κυρίως για την αντιμετώπιση των κομβονηματοδών (*Meloidogyne* sp.). Επίσης στην λεκάνη της Μεσογείου έχουν γίνει αρκετές εφαρμογές για την αντιμετώπιση των νηματωδών σε καλλιέργειες σολανωδών (*Solanaceae*). Τα είδη της οικογένειας Brassicaceae, τα οποία διαθέτουν τις γλυκοσινολικές ουσίες μετατρέπονται σε ισοθιοκυανιούχες ενώσεις μετά τη μηχανική ρήξη των κυττάρων (Kirkegaard et al., 1993). Οι ουσίες αυτές είναι ιδιαίτερα τοξικές για τους νηματώδεις και αποτελούν έναν εναλλακτικό τρόπο αντιμετώπισής τους. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση αλειφατικών και αρωματικών γλυκοσινολικών ενώσεων τόσο μεγαλύτερο είναι και το δυναμικό της βιοαπολύμανσης. Η συγκέντρωση τους μειώνεται κατά το στάδιο της βλαστικής ανάπτυξης και αυξάνει κατά την άνθηση ενώ η μέγιστη συγκέντρωσή τους είναι στο στάδιο της παραγωγής των σπόρων (Bellostas et al., 2007, Kirkegaard and Sarwr 1998, Rangkadilok et al., 2004). Επιπλέον, στο υπόγειο τμήμα των φυτών κυριαρχούν τα αρωματικά γλυκοσινολικά οξέα ενώ στο υπέργειο τα ινδολικά και αλειφατικά. Σε περιοχή της Ιταλίας εφαρμόστηκε ποσότητα βιομάζας από τα είδη *Brassica juncea* και *Eruca sativa*. Τα αποτελέσματα της εφαρμογής ήταν αρκετά αποτελεσματικά καθώς μειώθηκε σημαντικά ο πληθυσμός των κομβονηματοδών (*M. incognita*) ενώ παράλληλα αυξήθηκε η απόδοση του καρότου και της τομάτας. Επιπλέον παρατηρήθηκε μείωση στην επιβίωση του πληθυσμού των *M. javanica* (Wesemael et al.,

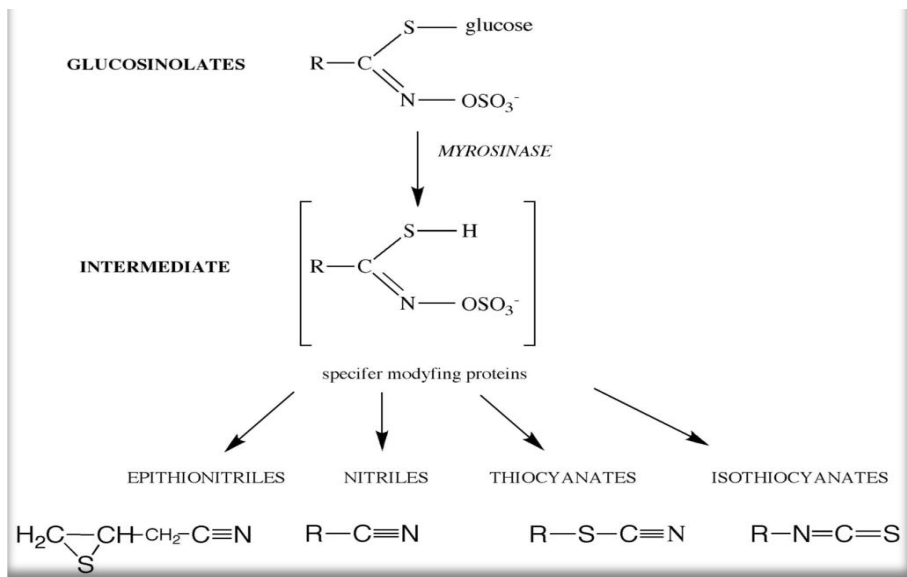
2011). Ο τύπος του εδάφους και η περιεκτικότητα του σε οργανική ουσία επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα των ισοθιοκυανιούχων καθώς και την επίδρασή τους στην αντιμετώπιση των εδαφογενών παθογόνων. Η χρήση των φυτικών υπολειμμάτων που διαθέτουν βιοκτόνες ουσίες αποτελεί εναλλακτική μέθοδο αντιμετώπισης αντί των χημικών δραστικών ουσιών.

1.9 Φυτικά εκχυλίσματα ως προϊόντα δράσης στην αντιμετώπιση των νηματωδών.

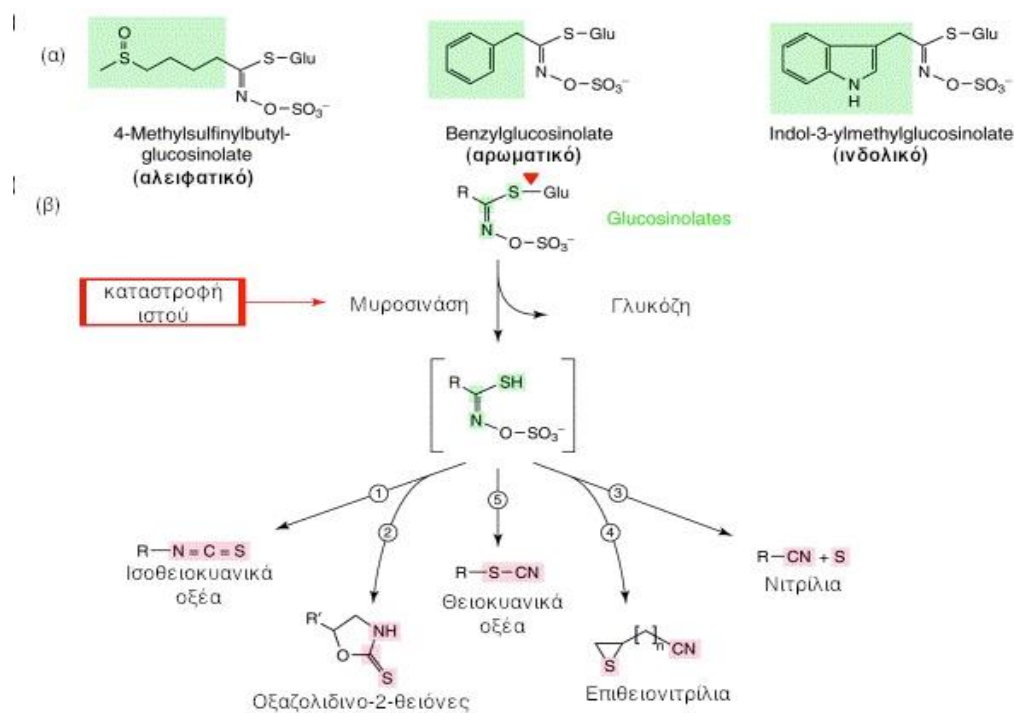
Τα στοιχεία που παράγονται από τα φυτά επηρεάζουν το βιολογικό κύκλο των οργανισμών (Whittaker et al., 1971). Αυτό οφείλεται στη δράση των δευτερογενών μεταβολιτών. Τα φυτά λόγω της πίεσης που δέχονται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες όπως τις ακραίες θερμοκρασίες, το φως, CO₂, H₂O αλλά και τους βιοτικούς παράγοντες (μύκητες, βακτήρια, ιοί, μικροοργανισμοί, ακάρεα, νηματώδεις, έντομα εδάφους) αντιδρούν και παράγουν ουσίες. Οι ουσίες αυτές είναι τοξικές και λειτουργούν θετικά ως προς την δράση τους ενάντια στους οργανισμούς αυτούς (Καραμπουρνιώτης, 2003). Οι δευτερογενείς μεταβολίτες κατηγοριοποιούνται σε 3 μεγάλες ομάδες ουσιών: τις φαινόλες, τα τερπενοειδή και τις αζωτούχες ενώσεις. Υπάρχουν ποικίλα παραδείγματα και από τις τρεις ομάδες, που στοιχειοθετούν τη δράση τους ενάντια στους οργανισμούς.

1.10 Γλυκοσινολικά οξέα

Τα γλυκοσινολικά παράγωγα είναι δευτερογενείς μεταβολίτες (Kliebenstein et al., 2005) και ανευρίσκονται στην οικογένεια των Σταυρανθών (*Brassicaceae*). Η βιοκτόνος δράση τους οφείλεται στην παρουσία της γλυκοσινόλης και μυροσινάσης. Κατά την διάσπασή τους, έπειτα από την καταστροφή των κυττάρων, παράγονται διάφορες ενώσεις όπως τα ισοθειοκυανικά, νιτρίλια, επιθειονιτρίλια και θειοκυανικά (Fahey et al., 2001) (Εικόνα 4). Η συγκέντρωσή τους στα όργανα του φυτού διαφέρει (Fahey et al., 2001) και αλλάζει ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες και το στρες (καταπόνηση) (Herr et al., 2010). Σημαντικό ρόλο στο προφίλ τους επιδεικνύει η ηλικία του φυτού, το στάδιο ανάπτυξης (De Villena et al., 2007, Cartea et al., 2008), η θερμοκρασία του περιβάλλοντος, η ποσότητα του νερού, η φωτοπερίοδος, το όργανο του φυτού (σπόρος, φύλλα) καθώς και η γεωγραφική προέλευση (Rosa et al., 1996, Kushad et al., 1999, Barlet et al., 1999, Hasegawa et al., 2000, Agerbirk et al., 2001, Coogan et al., 2001, Rangkadilok et al., 2002., Ahuja et al., 2010). Η πορεία βιοσύνθεσης (Εικόνα 4α.4β), είναι γνωστή στο φυτό *Arabidopsis thaliana* το οποίο ανήκει στην οικογένεια των *Brassicaceae*.



Εικόνα 4α. Γλυκοσινολικά οξέα



Εικόνα 4β. (α) αντιπροσωπευτικά γλυκοσινολικά οξέα της κάθε κατηγορίας (αλειφατικά, αρωματικά, ινδολικά) και (β) Η υδρόλυσή τους σε 1) ισοθειοκυανικά οξέα, 2) οξαζολιδινο-2-θειόνες, 3) νιτρίλια, 4) επιθειονιτρίλια και 5) θειοκυανικά οξέα

Τα γλυκοσινολικά παράγωγα ανευρίσκονται σε όλα τα είδη που ανήκουν στην οικογένεια των σταυρανθών. Η περιεκτικότητα των σπόρων σε γλυκοσινολικά είναι 5% ενώ στα φύλλα 0,1% (νωπού βάρους). Η δομή τους είναι (Z)---(ή cis)---N---υδροξυαμινοθειικοί εστέρες με μία πλευρική αλυσίδα (R) που ποικίλει και ένα

τμήμα β-D-γλυκοπυρανόζης που συνδέεται στο μόριο με ένα άτομο θείου. Η πλευρική αλυσίδα έχει αμινοξική προέλευση και αποτελεί τον πυρήνα των γλυκοσινολικών οξέων. (Fahey et al., 2001).

Η καταγραφή των γλυκοσινολικών οξέων έχει αναφερθεί σε περισσότερα από 120 διαφορετικά φυτικά είδη τα οποία ανήκουν στην ίδια τάξη (Capparales) (Fahey et al., 2001). Τα γλυκοσινολικά οξέα, τα οποία προέρχονται από τα αμινοξέα και ξεκινά η βιοσύνθεσή τους, διαχωρίζονται σε κατηγορίες. Συγκεκριμένα:

- I. Αλειφατικά αμινοξέα, τα οποία προέρχονται κυρίως από μεθειονίνη, αλανίνη, βαλίνη, λευκίνη και ισολευκίνη.
- II. Αρωματικά αμινοξέα τα οποία προέρχονται από τυροσίνη και φαινυλαλανίνη
- III. Ινδολικά αμινοξέα τα οποία προέρχονται από την τρυπτοφάνη.

Το φυτικό είδος *Arabidopsis thaliana* χαρακτηρίζεται ως φυτό μοντέλο καθώς περιέχει τα αμινοξέα και των τριών κατηγοριών.

1.11 Υδρόλυση των γλυκοσινολικών

Τα γλυκοσινολικά οξέα υδρολύονται στο έδαφος και σχηματίζονται οι ισοθειοκυανιούχες ενώσεις. Η υδρόλυση οφείλεται κυρίως στην παρουσία της μυροσινάσης που υπάρχει στο φυτό αλλά και στην παραγωγή της από την παρουσία μικροοργανισμών αλλά και μυκήτων (Sakorn et al., 2002, Rakariyatham et al., 2005). Τα γλυκοσινολικά προστίθενται στο έδαφος είτε ως μέρος του φυτού είτε μέσω των σπόρων. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε προστέθηκε στο έδαφος 2-προπενύλιο γλυκοσινολικών και μυροσινάση. Το 90% των γλυκοσινολικών ανακτήθηκε ως ισοθειοκυανικό-2-προπενύλιο (Boker et al., 1994). Για να επιτευχθεί η υδρόλυση των γλυκοσινολικών θα πρέπει να έρθει σε επαφή με τη μυροσινάση μέσω της διάσπασης των φυτικών κυττάρων. Σε αυτό βασίζεται η έννοια της βιοαπολύμανσης, στη μεγιστοποίηση της υδρόλυσης των γλυκοσινολικών και ως εκ τούτου την αύξηση της συγκέντρωσης των ισοθειοκυανιούχων. Ωστόσο κατά την υδρόλυση, τα προϊόντα διάσπασης που σχηματίζονται, αδυνατούν να συγκρατηθούν στο έδαφος και χάνονται κατά την

έκπλυση ή προσκολλούνται στην οργανική ύλη εμποδίζοντας την έκπλυσή τους αλλά και τη μείωση της βιο-διαθεσιμότητάς τους. Επίσης τα προϊόντα διάσπασης μπορούν να διασπαστούν από τους μικροοργανισμούς του εδάφους (μύκητες, βακτήρια) καθώς και να διαφύγουν από το έδαφος μέσω της εξαέρωσης.

1.12 Φαινολικά οξέα

Οι φαινόλες συμβάλλουν στην ανάπτυξη των φυτών και παράγονται λόγω της αντίδρασης των φυτών σε διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες (θερμοκρασία, φως) ενώ παράλληλα συμβάλλουν στην άμυνα των φυτών κατά των παθογόνων οργανισμών. Η χημική τους δομή αποτελείται από έναν αρωματικό δακτύλιο στο μόριό τους με έξι άτομα άνθρακα (C6). Χαρακτηριστικά παραδείγματα φαινολικών οξέων αποτελούν η φαινόλη, η κατεχόλη και η υδροκινόνη. Η βιοσύνθεση των αρωματικών αμινοξέων των φυτών, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα αμινοξέα τυροσίνη, τρυπτοφάνη και φαιτυλαανίνη έχει ως πρόδρομη ουσία το σικιμικό οξύ. Τα αμινοξέα αυτά αποτελούν πρόδρομες ενώσεις για την παραγωγή στη συνέχεια άλλων δευτερογενών μεταβολιτών όπως τα φλαβονοειδή, τα αλκαλοειδή και οι κουμαρίνες (Wink 2010).

1.13 Φλαβονοειδή

Αποτελούν σημαντική ομάδα χημικών ουσιών που ανευρίσκονται στα φυτικά μέρη των σταυρανθών σε μεγάλες ποσότητες (Podsedek 2007). Είναι δευτερογενείς μεταβολίτες με τη δομή πολυφαινολικών ενώσεων. Η χημική τους κατάταξη είναι δι-φαιτυλοπροπανοειδή και η δομή τους περιέχει δύο αρωματικούς δακτυλίους με 15 άτομα άνθρακα (C6-C3-C6). Ενδεικτικά στα φλαβονοειδή ανήκουν οι χημικές ενώσεις: kaempferol, quercetin, isorhamnetin, myricetin (Martinez-Sanchez, 2008). Φλαβονοειδή από τα φυτά που έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα φθάνουν τις 6.000 και συγκεντρώνονται στα χυμοτόπια των φυτικών κυττάρων με τη μορφή των γλυκοζιτών.

1.14 Αλκαλοειδή

Είναι μία κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών τα οποία περιέχουν ένα ή περισσότερα άτομα αζώτου και είναι πρόδρομες ουσίες των αμινοξέων. Ανευρίσκονται κυρίως στα αγγειόσπερμα (20-30% φυτών) και λιγότερο σε γυμνόσπερμα, πτεριδόφυτα, βακτήρια και μύκητες. Παράγονται σε προσβεβλημένα φυτά από εχθρούς και παθογόνα. Η χρήση τους εντοπίζεται κυρίως στην φαρμακολογία ως θεραπευτικά, διεγερτικά ή ως τοξίνες. Πολλές από τις ναρκωτικές ουσίες περιέχουν στη σύνθεσή τους αλκαλοειδή όπως η ηρωίνη, μορφίνη, κοκαΐνη, καφεΐνη.

1.15 Αιθέρια έλαια


Τα αιθέρια έλαια είναι φυτικά εκχυλίσματα των αρωματικών φυτών που έχουν ως βασικά χαρακτηριστικά τους την πτητικότητα, την χαρακτηριστική οσμή, την πολύπλοκη χημική σύνθεση και την μη διαλυτότητα στο νερό. Αποτελούν μίγματα οργανικών πτητικών ενώσεων και χαρακτηρίζουν τα φυτά για το ιδιαίτερο άρωμα που έχουν. Παραλαμβάνονται με τη μέθοδο απόσταξης με υδρατμούς (hydro-distillation). Οι ουσίες που περιέχονται στα αιθέρια έλαια είναι τα τερπένια, τα οποία είναι χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις. Ανήκουν στην κατηγορία των δευτερογενών μεταβολιτών και μια ή δύο ουσίες που παράγουν ευθύνονται για το άρωμα των φυτών. Πέραν όμως των αρωματικών τους ιδιοτήτων οι παραγόμενες ουσίες εμφανίζουν και βιολογική δράση σε ποικίλους οργανισμούς. Ωστόσο, η δράση τους μπορεί να μην περιορίζεται αποκλειστικά στο παραγόμενο αιθέριο έλαιο αλλά στο συστατικό του (Ντάλλη, 2010).

1.16 Τερπένια

Τα τερπένια περιλαμβάνουν πολυάριθμες ενώσεις οι οποίες ανήκουν στις φυσικές ουσίες που προέρχονται από φυτικά εκχυλίσματα. Τα περισσότερα τερπένια σχετίζονται μεταξύ τους ενώ τα κύρια τερπένια είναι τα μονοτερπένια (C10) και τα σесκιτερπένια (C15). Τα αιθέρια έλαια περιλαμβάνουν έναν μεγάλο αριθμό μονό και σесκιτερπενίων.

1.17 *Cannabis sativa* (Linnaeus 1753) (Cannabaceae)

Η κάνναβις αναπτύσσεται σε τροπικές και υποτροπικές χώρες και περιλαμβάνει 3 είδη: *Cannabis sativa*, *C. indica*, *C. ruderalis*. Το πρώτο είναι ετήσιο δίοικο φυτό και καλλιεργείται την άνοιξη. Το ριζικό σύστημα του είναι πασσαλώδες με πολλές πλευρικές ρίζες το οποίο φθάνει περίπου τα 2 μέτρα βάθος. Τα φύλλα είναι σύνθετα και αποτελούνται από 5-11 άνισα επιμήκη φυλλάρια, που εκφύονται από το ανώτερο άκρο του μίσχου ακτινωτά.

<u>Συστηματική κατάταξη</u>	
Βασίλειο: Plantae	
Διαίρεση: Magnoliophyta	
Κλάση: Magnoliopsida	
Τάξη: Urticales	
Οικογένεια: Cannabaceae	
Γένος: <i>Cannabis</i>	
Είδος: <i>C. sativa</i> L.	

Φαρμακευτική χρήση

Από την αρχαιότητα χρησιμοποιείται ως πηγή ενέργειας, διατροφής, ένδυσης και θεραπευτικό μέσο. Η κάνναβη περιέχει τουλάχιστον 426 χημικές ενώσεις και περισσότερα από 60 αλκαλοειδή το οποία ονομάζονται κανναβινοειδή. Δύο από τις κύριες ουσίες, η Δ9-τετραϋδροκανναβινόλη ή THC και η Δ8-τετραϋδροκανναβινόλη επιδρούν στην ψυχική και σωματική υγεία του ανθρώπου. Τα κυριότερα προϊόντα της κάνναβης είναι η μαριχουάνα, το χασίς και το χασισέλαιο. Η κάνναβη ως φάρμακο έχει 4 σημαντικά πλεονεκτήματα που την καθιστούν μοναδική από θεραπευτική άποψη: α) είναι το πιο ατοξικό από τα διαθέσιμα φάρμακα, β) έχει ευρύτατο πεδίο θεραπευτικών εφαρμογών, γ) δρα μέσω μηχανισμών που διαφέρουν απ' αυτούς των άλλων φαρμάκων και δ) μπορεί

να συνδυαστεί αποτελεσματικά και με ασφάλεια με οποιοδήποτε φάρμακο. Σήμερα, η θεραπευτική χρησιμότητα της κάνναβης και των παραγώγων της είναι αποδεδειγμένη και αποδεκτή για το ακόλουθο ευρύ φάσμα παθολογικών καταστάσεων: γλαύκωμα (ενδοφθάλμια υπέρταση), παρενέργειες της χημειοθεραπείας (ναυτία και έμετοι), άσθμα, επιληψία και σπασμοί, κατάθλιψη, άγχος, ανορεξία, άλγη διαφόρου αιτιολογίας, κακοήθεις νεοπλασίες, εξάρτηση από οπιούχα και αλκοόλ. Ενώ παλαιότερα τα κανναβινοειδή συγκαταλέγονταν στα ήπια κατασταλτικά-υπνωτικά ή στα ψευδαισθησιογόνα, σήμερα έχει γίνει κατανοητό ότι η κάνναβη και οι σχετικές ουσίες (κανναβινοειδή) αποτελούν μια ξεχωριστή κατηγορία ουσιών που συνδυάζει δράσεις διαφόρων ουσιών κατάχρησης (Julien, 2003).


Φυτοπροστατευτική χρήση

Στο έδαφος μπορεί να λειτουργήσει ως νηματωδοκτόνο και να περιορίσει την δράση των ριζόκομβων νηματωδών, αντικαθιστώντας τις παραδοσιακές χημικές μεθόδους και αποτρέποντας την άσκοπη μόλυνση του περιβάλλοντος. Η κάνναβης προκαλεί μείωση των πληγών από νηματώδεις στα φυτά καθώς και μείωση του πληθυσμού των αυγών των νηματωδών, της ανάπτυξής τους και της γονιμότητάς τους. Σε πείραμα με υδατικά εκχυλίσματα από σπόρους, η εκκόλαψη των ωών των *M. javanica* και *M. incognita*, μειώθηκε σημαντικά (Khurma, 1997). Επίσης παρατηρήθηκε μείωση του αριθμού των ωοσάκων έπειτα από προσθήκη φύλλων κάνναβης σε καλλιέργεια αγγουριού (Kayani et al., 2011). Επίσης υδατικά εκχυλίσματα του *Cannabis sativa* δρουν εναντίον των προνυμφών 2^{ου} σταδίου των νηματωδών *Heterodera cajani* (Mojumder et al., 1989) και πολλών άλλων φυτοπαθογόνων νηματωδών όπως *Tylenchorhynchus brassicae*, *Hoplolaimus indicus*, *Rotylenchulus reniformis* (Haseeb et al., 1978). Τα εκχυλίσματα και τα αιθέρια έλαια της κάνναβης εμπεριέχουν χημικές ενώσεις (αλκοόλες, αλδεΐδες, παράγωγα λιπαρών οξέων, τερπενοειδή και φαινολικές ενώσεις) που αυτοτελώς ή από κοινού συμβάλλουν σε πολλές βιολογικές διεργασίες και έχουν επηρεάσει δραστηριότητες όπως η έλξη και η απώθηση των νηματωδών, διέγερση ή αναστολή της εκκόλαψης των αυγών καθώς βρέθηκε να έχουν νηματωδοκτόνες ιδιότητες (Chitwood, 2002). Νηματωδοκτόνα βρέθηκαν να είναι, ύστερα από πειράματα, οι ενώσεις: αλκαλοειδή της πυρρολιζιδίνης (Kinghorn and Smolenski, 1981), *trans*-ανηθόλη (Oka et al., 2000b), *p*-ανισαλδεΐδη, *trans*-κινναμαλδεΐδη, 2-

φουραλδεΐδη και βενζαλδεΐδη (Oka, 2001). Επίσης, το είδος *C. sativa* χρησιμοποιείται σε συγκαλλιέργεια, εναντίον των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών, των ζιζανίων και των εντόμων-παρασίτων (Stratii, 1976; Mateeva, 1995). Αποξηραμένα άνθη και φύλλα κάνναβης χρησιμοποιούνται αποτελεσματικά για την εξόντωση ή την απώθηση παθογόνων νηματωδών, ακάρεων, εντόμων-παρασίτων, ζιζανίων κτλ. (Grewal, 1989; Kashyap et al., 1992). Τα εκχυλίσματα της κάνναβης μειώνουν τους πληθυσμούς των φυτοπαθογόνων νηματωδών, βακτηρίων (Vijai et al., 1993), μυκήτων (Singh and Pathak, 1984; Upandhyaya and Gupta, 1990; Kaushal and Paul, 1989), πρωτόζωων, εντόμων (Stratii, 1976; Bajpai and Sharma, 1992; Jalees et al., 1993), ακάρεων (Fenili and Pegazzano, 1974) και ζιζανίων. Μελέτες έδειξαν πως τα κανναβινοειδή θανατώνουν ή περιορίζουν τα έντομα, τους μύκητες και τα παθογόνα βακτήρια.

1.18 *Eruca sativa* Mill. (Brassicaceae)

Είναι το πιο γνωστό είδος του γένους και καλλιεργείται σε όλη τη λεκάνη της Μεσογείου, την κεντρική Ευρώπη, το Αφγανιστάν, τη βόρεια Ινδία, την βόρεια Αμερική, τη νότια Αφρική και την Αυστραλία (Pratap and Gupta 2009). Είναι πώδες φυτό, χαμηλής βλάστησης ύψους 40 εκατοστών. Το ριζικό του σύστημα είναι λεπτό ενώ τα φύλλα του έχουν σκούρο χρώμα. Τα σπέρματά του είναι χρώματος καφέ ή καφέ-κίτρινου έως πράσινου (De Leonardis et al., 1997). Είναι χειμερινό φυτό και ανθίζει από τον Μάρτιο έως τον Ιούνιο. Ευδοκίμει σε εδάφη με pH 6-7. Ο πολλαπλασιασμός του γίνεται με σπόρο και από το ίδιο λαμβάνεται ένα καυστικό έλαιο το οποίο χρησιμοποιείται στη φαρμακοβιομηχανία. Για να χρησιμοποιηθεί ως θεραπευτικό η συγκομιδή του πρέπει να γίνει στο στάδιο της ανθοφορίας.

Συστηματική κατάταξη	
Βασίλειο: Plantae	
Υποβασίλειο: Tracheobionta	
Υπερδιαίρεση: Spermatophyta	
Διαίρεση: Magnoliophyta	
Κλάση: Magnoliopsida	
Υποκλάση: Rosidae	
Τάξη: Brassicales	
Οικογένεια: Brassicaceae	
Γένος: <i>Eruca</i>	
Είδος: <i>E. sativa</i> Mill.	

Φαρμακευτική χρήση

Από την αρχαιότητα, εποχή του Μεσαίωνα μέχρι και σήμερα χρησιμοποιείται λόγω των αφροδισιακών ιδιοτήτων της. Οι θεραπευτικές της ιδιότητες οφείλονται σε ενώσεις που διαθέτουν διουρητική, στυπτική, ενυδατική, αποτοξινωτική, αφροδισιακή και διεγερτική δράση (Urhof, 1968; Perry & Metzger, 1978; Yaniv et al., 1998). Αποτελεί σημαντική πηγή φλαβονοειδών, πολυφαινολών και ασκορβικού οξέως, ενώσεων με χημειοπροστατευτική δράση (Bennett et al., 2002, 2006, 2007; Barillari et al., 2005; Kim & Ishii, 2006; Heimler et al., 2007; Sarwar Alam et al., 2007). Η επεξεργασία των σπόρων και του ελαίου του αποδίδει ιδιότητες αντιφλεγμονώδεις και αντιβακτηριδιακές (Khoobhandani et al., 2010; Gulfranz et al., 2011) που οφείλονται στις ισοθειοκυανιούχες ενώσεις (Yehuda et al., 2009) και το ερουκικό οξύ (Alam et al., 2007).


Φυτοπροστατευτική χρήση

Η ρόκα λόγω των γλυκοσινολικών ενώσεων που παράγει έχει εντομοαπωθητική και εντομοκτόνο δράση κατά των εντόμων των αποθηκευμένων προϊόντων όπως το *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) και το *Rhizopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) (Shaaya et al., 2003). Οι ακατέργαστοι χυμοί του *E. sativa* δρουν εναντίον των *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* και *Bacillus subtilis*. Όλα τα φυτοχημικά που υπάρχουν σε δείγματα σπόρων είναι υπεύθυνα για διάφορες βιο-δραστικότητες όπως αντιμικροβιακή δράση εναντίον πολλών παθογόνων μικροοργανισμών (μυκήτων, βακτηρίων, νηματωδών) (Etebong and Nwafor, 2009). Πειράματα έχουν δείξει ότι η χρήση σπόρων χωρίς το λίπος της *Eruca sativa* περιορίζουν την προσβολή του *M. incognita* σε ρίζες καλλιέργειας αγγουριών και αυξάνουν την παραγωγή κατά 9% λόγω μείωσης της προσβολής (Lazzeri et al., 2009). Πειράματα αποδεικνύουν πως οι πτητικές ενώσεις ερουκίνη, πεντύλο ισοθειοκυανικό, εξύλο, ισοθειοκυανικό, (E) -2 - εξενάλη, 2 - αιθυλοφουράνιο, και μεθυλο θειοκυανιούχα εμφανίζουν δράση κατά την επώαση προνυμφών μετά από 24 ώρες. Επίσης ενσωμάτωση νωπής ρόκας σε καλλιέργεια τομάτας μείωσε την προσβολή από νηματώδεις και αύξησε την απόδοσή της (Aissani et al, 2015). Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο ανέδειξαν σημαντική νηματωδοκτόνο δράση των γλυκοσινολικών σε προνύμφες (J2) *M. incognita* (Lazzeri et al., 2004). Στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού των προνυμφών (J2) σε ποσοστό 57% έως 80%, με εφαρμογή νωπού ιστού *B. oleraceae* (μπρόκολο). Ενδιαφέρουσα μείωση 80% της παραγωγής των ωσάκων και των αυγών *M. halpa*, που παρατηρήθηκε σε φυτά ρόκας δείχνει πως μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φυτά παγίδα για τη διαχείριση των νηματωδών (Melakeberhan et al. 2006).

1.19 *Raphanus sativus* (Brassicaceae)

Είναι μονοετές ή διετές φυτό του γένους *Raphanus*, το οποίο ανήκει στην οικογένεια των Σταυρανθών (*Brassicaceae*). Η προέλευσή του εντοπίζεται στην Νοτιοανατολική Ασία ενώ στην αρχαιότητα ήταν γνωστό ως ραφανίδα (Θεόφραστος). Καλλιεργείται για τη σαρκώδη του ρίζα η οποία έχει σχήμα σφαιρικό

ή κωνικό. Η σπορά του ξεκινάει την Άνοιξη και επαναλαμβάνεται κάθε 10 ημέρες για να υπάρχει συνεχής παραγωγή. Καλλιεργούνται κυρίως σε αμμώδη εδάφη, με pH 6-7 και είναι ανθεκτικά στις χαμηλές θερμοκρασίες. Κάποιες καλλιέργειες στην Ελλάδα καλλιεργούνται για τα φύλλα και τους σπόρους τους.

Συστηματική κατάταξη	 <p>Pl. 26. <i>Radix cultiva</i>. <i>Raphanus sativus</i> L.</p>
Βασίλειο: Plantae	
Υποβασίλειο: Tracheobionta	
Υπερδιαίρεση: Spermatophyta	
Διαίρεση: Magnoliophyta	
Κλάση: Equisetopsida	
Υποκλάση: Magnoliidae	
Τάξη: Brassicales	
Οικογένεια: Brassicaceae	
Γένος: <i>Raphanus</i>	
Είδος: <i>R. sativus</i> L.	

Φαρμακευτική - Φυτοπροστατευτική χρήση

Το ρεπάνι είναι πλούσιο σε βιταμίνη C, ασκορβικό οξύ, φολικό οξύ και κάλιο. Είναι καλή πηγή βιταμίνης B6, ριβοφλαβίνης, μαγνησίου, χαλκού και ασβεστίου. Συνιστάται σαν ορεκτικό, αντιβηχικό, για τη διάλυση νεφρόλιθων, χολόλιθων, σαν φάρμακο κατά της υδρωπικίας, του ερυσιπέλατος, της αρθρίτιδας, των ηπατικών παθήσεων. Έρευνες έχουν δείξει πως το ρεπάνι έχει και αντιμικροβιακή δράση. Οι ακατέργαστοι χυμοί παρουσιάζουν αντιμικροβιακές δραστηριότητες έναντι των *Escherichia coli*, *Pseudomonas pyocyanus*, *Salmonella typhi* και *Bacillus subtilis*. Τέλος, έχουν γίνει πειράματα τα οποία είχαν ως αποτέλεσμα οι σπόροι του *R. sativus* να περιορίσουν την προσβολή του *M. incognita* σε ρίζες καλλιέργειας αγγουριών (Lazzeri et al., 2009).

2. Σκοπός της εργασίας

Κύριος σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της δράσης συγκεκριμένων εκχυλισμάτων από σπόρους φυτών, στο πλαίσιο της ανεύρεσης νέων ουσιών με νηματωδοκτόνο δράση. Τα φυτικά είδη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα *Cannabis sativa*, *Raphanus sativus*, *Eruca sativa*, ενώ ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το είδος *Zea mays* με σκοπό να μελετηθεί η δράση τους σε διαφορετικά βιολογικά στάδια του κομβονηματώδη *M. javanica*. Η παραλαβή των εκχυλισμάτων προήλθε από τους σπόρους μετά από σύνθλιψη, εκχύλιση με το κατάλληλο εκχυλιστικό μέσο σε υδατόλουτρο με υπερήχους και παραλαβή του διηθήματος. Συγκεκριμένα μελετήθηκε:

1. Η αξιολόγηση της δράσης των εκχυλισμάτων με την πραγματοποίηση βιοδοκιμών σε μικροπλάκες πολλαπλών πηγαδιών για τον υπολογισμό του ποσοστού παράλυσης των προνυμφών (J2) και του ποσοστού παρεμπόδισης διαφοροποίησης των ωών.
2. Η διερεύνηση της δράσης των εκχυλισμάτων στο έδαφος, με την επίδραση της θερμοκρασίας, και καταγραφή του ποσοστού θνησιμότητας των προνυμφών. Για την επίτευξη αυτού του στόχου χρησιμοποιήθηκαν πλαστικά δοχεία με αποστειρωμένο έδαφος μολυσμένο με προνύμφες.
3. Τέλος, αξιολογήθηκε η δράση των εκχυλισμάτων στην εκκόλαψη των ωών των νηματωδών σε τροποποιημένα τρυβλία.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Υλικά και μέθοδοι παρασκευής υδατικών εκχυλισμάτων από τους σπόρους των φυτικών ειδών.

Για την παρασκευή των υδατικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν σπόροι των φυτικών ειδών *Cannabis sativa*, *Raphanus sativus*, *Eruca sativa* ενώ χρησιμοποιήθηκε και το είδος *Zea mays* ώστε να διερευνηθεί η επίδραση της οργανικής ύλης από τους αλεσμένους σπόρους στην επιβίωση των νηματωδών. Όλα τα είδη αλέστηκαν σε χειροκίνητο μύλο (αλεστικό το οποίο χρησιμοποιείται για ερασιτεχνική χρήση παρασκευής σιτηρεσίου πτηνών) (Εικόνα 5) και διατηρήθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματικών εργασιών αεροστεγώς κλεισμένα σε γυάλινα δοχεία. Μετά την άλεση από κάθε φυτικό είδος, ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας 20g σπόρου και τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη (Erlenmeyer) των 500ml. Εν συνεχεία προστέθηκε 100ml αποσταγμένου νερού και το στόμιο της κωνικής φιάλης σφραγίστηκε με ειδικό πώμα. Η κωνική φιάλη τοποθετήθηκε για 30' σε συσκευή υπερήχων (Ultrasonic Bath, Grant UK) (Εικόνα 6), η οποία περιείχε απιονισμένο νερό και με τη δημιουργία των υπερήχων επιταχύνθηκε η διαδικασία της εκχύλισης από τα μόρια των αλεσμένων σπόρων. Μετά την ολοκλήρωση της εκχύλισης ακολούθησε η διαδικασία παραλαβής του εκχυλίσματος μέσω της διήθησης. Αυτό πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μιας κωνικής φιάλης, όπου τοποθετήθηκε γυάλινο χωνί με διηθητικό χαρτί. Στη συνέχεια μεταφέρθηκε το περιεχόμενο της κωνικής φιάλης από το λουτρό υπερήχων έτσι ώστε να παραμείνει στο διηθητικό φίλτρο το στερεό υλικό και στην κωνική φιάλη να διηθηθεί το εκχύλισμα. Μετά την ολοκλήρωση της διήθησης το εκχύλισμα τοποθετήθηκε σε πλαστικά σωληνάρια (Falcon) των 50ml τα οποία διατηρήθηκαν στον καταψύκτη σε θερμοκρασία -20°C έως το τέλος του πειράματος.



Εικόνα 5. Χειροκίνητος μύλος



Εικόνα 6. Ultrasonic Bath (Grant UK)

3.2 Ανάπτυξη, απομόνωση και διατήρηση των πληθυσμών *M. javanica*

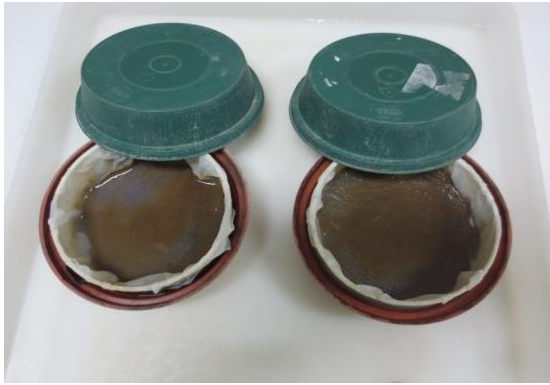
Νεαρά φυτάρια τομάτας (*Solanum lycopersicum* L.) ποικιλίας Belladonna, η οποία θεωρείται ευαίσθητη ως προς την προσβολή από κομβονηματώδεις μεταφυτεύθηκαν σε γλαστράκια διαστάσεων 9 x 9 x 15 cm (π χ υ). Τα φυτά διατηρήθηκαν σε κλωβούς, στο θερμοκήπιο, με θερμοκρασία 25-27°C (Μάιο έως Σεπτέμβριο) και 22-25°C (Οκτώβριο έως Απρίλιο). Οι συνθήκες αυτές διατηρήθηκαν καθ όλη την διάρκεια των πειραμάτων. Η μόλυνση των φυτών με προνύμφες (J2) πραγματοποιήθηκε 5 εβδομάδες μετά την μεταφύτευση και όταν τα φυτά είχαν αναπτύξει το 5^ο πραγματικό φύλλο. Σε αυτό το βλαστικό στάδιο τα φυτά έχουν αναπτύξει επαρκές ριζικό σύστημα έτσι ώστε να μπορούν να αναπαραχθούν οι νηματώδεις. Μετά την πάροδο 50-60 ημερών οι ρίζες των φυτών πλύθηκαν προσεκτικά με άφθονο νερό ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα του εδάφους και να παραμείνουν οι ωσάκοι στις ρίζες των φυτών. Εν συνεχεία τοποθετήθηκαν σε στερεοσκόπιο και ακολούθησε η πρόσληψη των ωσάκων με εργαστηριακή λαβίδα και η τοποθέτησή τους σε τρυβλίο υπενδεδυμένο με υγρό χαρτί διήθησης. Μετά την απομόνωση ικανού αριθμού ωσάκων πραγματοποιήθηκε η μεταφορά τους σε τροποποιημένους δίσκους Baermann, τα οποία αποτελούνται από ένα κόσκινο (μεγέθους οπών 2mm) καλυμμένο από διηθητικό χαρτί και ένα πλαστικό δίσκο στον οποίο εφάπτεται το κόσκινο. Μέσα στο δίσκο τοποθετήθηκε αποσταγμένο νερό έτσι ώστε η άνω επιφάνεια του νερού να είναι σε επαφή με την κάτω επιφάνεια του κόσκινου. Τέλος τοποθετήθηκε ένας

δεύτερος δίσκος, ο οποίος λειτούργησε ως καπάκι για την αποφυγή εξάτμισης του νερού (Εικόνα 7). Οι ωόσακοι παρέμειναν στη διάταξη Baermann για 3 ημέρες στους 25°C. Οι πρώτες προνύμφες (J2) που εκκολάφθηκαν στο δίσκο με το νερό δεν χρησιμοποιήθηκαν παρά μόνον για τη μόλυνση νέων φυτών τομάτας για διατήρηση του πληθυσμού των κομβονηματοδών για μεταγενέστερα πειράματα. Οι δίσκοι ανανεώθηκαν με αποσταγμένο νερό και μετά από 2 ημέρες συλλέχθηκε το νερό με τις νέο-εκκολαφθείσες προνύμφες, οι οποίες και χρησιμοποιήθηκαν για τις βιολογικές δοκιμές.



Εικόνα 7. Δίσκος Baermann εξαγωγής προνυμφών.

Οι προνύμφες (J2) που δεν χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές εφαρμογές, χρησιμοποιήθηκαν όπως προαναφέρθηκε ως μόλυσμα σε νέα φυτά. Έτσι υπήρχε ένας συνεχής κύκλος διατήρησης του πληθυσμού των νηματωδών και εξασφάλισης των για τη σειρά των πειραμάτων. Για την απομόνωση και παραλαβή των ωών και προνυμφών η διαδικασία διαφοροποιήθηκε ως εξής: μετά το πλύσιμο τους οι ρίζες τεμαχίστηκαν σε μικρά κομμάτια και τοποθετήθηκαν σε δοχείο που περιείχε διάλυμα υποχλωριώδες νατρίου και νερό (1% NaOCL και 1lt νερό). Ακολούθησε δυνατή ανάδευση για 5' και στη συνέχεια το διάλυμα του υποχλωριώδες νατρίου στο οποίο υπήρχαν τα ωά από τους ωόσακους μεταφέρθηκε σε κόσκινο διατομής οπών 250 μm το οποίο ήταν στερεωμένο σε κόσκινο διατομής οπών 38 μm. Το διάλυμα στο οποίο περιέχονταν τα ωά από τους σπασμένους ωόσακους ξεπλύθηκε με άφθονο νερό βρύσης για περίπου 5-6 λεπτά (Hussey and Barker 1973). Τα ωά από το κόσκινο των 38 μm συλλέχθηκαν σε ποτήρι ζέσεως και ανάλογα με τις απαιτήσεις των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν αμέσως μετά την διαδικασία που προαναφέρθηκε ή τοποθετήθηκαν σε διάταξη Baermann για την εξαγωγή προνυμφών δευτέρου σταδίου.



Εικόνα 8. Εξαγωγή νηματωδών από τα ωά

4. Δοκιμές δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων

4.1 Δοκιμές δράσης στην παράλυση των προνυμφών *M. javanica*.

Για τις ανάγκες του πειράματος που στόχο είχε την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας των φυτικών εκχυλισμάτων στην παράλυση των προνυμφών δευτέρου σταδίου παρασκευάστηκαν τα κάτωθι διαλύματα: 1/2, 1/5, 1/10, 1/20, 1/50, 1/100 (100mg/ml, 40 mg/ml, 20 mg/ml, 10 mg/ml, 4 mg/ml, 2 mg/ml). Για την παρασκευή των συγκεντρώσεων προστέθηκε στο πυκνό διάλυμα αποσταγμένο νερό ώστε να επιτευχθεί η απαιτούμενη αραίωση του διαλύματος και εν συνεχεία προστέθηκε το αιώρημα νηματωδών (H₂O + προνύμφες δευτέρου σταδίου J₂) σε αναλογία 1:1, η οποία συνυπολογίστηκε στην τελική παρασκευή των συγκεντρώσεων. Χρησιμοποιήθηκαν πλάκες πολυστυρενίου Cellstar® 24-πηγαδιών. Μετά την προσθήκη των διαλυμάτων προστέθηκε η απαιτούμενη συγκέντρωση αιωρήματος με νηματώδεις και νερό, η οποία συνυπολογίστηκε στην τελική παρασκευή των δόσεων. Το αιώρημα νηματωδών και το διάλυμα του εκχυλίσματος στα πηγάδια της πλάκας πολυστυρενίου ήταν σε αναλογία 1:1. Η αντιστοιχία ήταν 1 ml (0.5 ml υδατικό εκχύλισμα και 0.5 ml προνυμφών) σε κάθε πηγάδι ενώ ο αριθμός των προνυμφών (J₂) για κάθε επανάληψη ήταν 20. Ο τελικός όγκος για κάθε μεταχείριση ήταν 6 ml (στο σύνολο των 6 επαναλήψεων).

Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αποσταγμένο νερό και προνύμφες (J2). Επίσης ως χημικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το νηματωδοκτόνο Vydate® 10 SL σε συγκέντρωση 30ml σε 500 ml νερό. Οι πλάκες καλύφθηκαν με καπάκι ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση των διαλυμάτων το οποίο θα προκαλούσε πιθανές επιμολύνσεις σε γεινιάζοντα πηγάδια. Οι πλάκες σκεπάστηκαν με αλουμινόχαρτο ώστε να μην εκτίθενται τα διαλύματα στο φυσικό φως και τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία 22-25°C. Οι μετρήσεις για την παράλυση ή μη των προνυμφών διεξήχθησαν μετά την πάροδο 12, 24, 48 και 96 ωρών από την έναρξη του πειράματος. Για τη μέτρηση και καταγραφή τους χρησιμοποιήθηκε ανάστροφο μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 40x.

Όλες οι μεταχειρίσεις επαναλήφθηκαν 6 φορές και το πείραμα πραγματοποιήθηκε 2 φορές στο χρόνο. Κατά την 2^η μεταχείριση προστέθηκε στα διαλύματα γαλακτικό οξύ (25%) ($C_3H_6O_3$) (2-υδροξυπροπανικό οξύ), 10ml γ.ο σε κάθε πηγάδι.

4.2 Μέθοδος παραλαβής των μεθανολικών εκχυλισμάτων

Για την παραλαβή του μεθανολικού κλάσματος εκχύλισης από τα τέσσερα διαφορετικά φυτικά είδη χρησιμοποιήθηκαν δύο τεχνικές. Ζυγίστηκαν 50 gr φυτικού υλικού (αλεσμένοι σπόροι) και πραγματοποιήθηκε εκχύλιση για 30 λεπτά σε συσκευή υπερήχων (Ultrasonic Bath). Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε η μεθανόλη σε αναλογία 1:10 (w/v) δηλαδή 500ml μεθανόλη. Μετά το πέρας της εκχύλισης προστέθηκαν επιπλέον 50 ml μεθανόλης και η διαδικασία επαναλήφθηκε. Στο τέλος της κάθε εκχύλισης ακολούθησε διήθηση υπό κενό σε συσκευή Millipore glass filter holder φίλτρου-whatman no.42 καλυμμένο με άνυδρο Na_2SO_4 . Η απομάκρυνση της μεθανόλης πραγματοποιήθηκε σε περιστροφικό συμπυκνωτή κενού μέχρι ξηρού. Η απόδοση κάθε εκχυλίσματος υπολογίσθηκε ως μέσος όρος δύο εκχυλισμάτων. Οι αποδόσεις υπολογίσθηκαν ως ποσοστά επί του ξηρού φυτικού υλικού και εκφράστηκαν σε gr στα 100 gr ξηρού φυτικού βάρους που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση ως μέσος όρος δύο εκχυλισμάτων. Η ζύγιση της στρογγυλής φιάλης πραγματοποιήθηκε δύο φορές, πριν και μετά την συμπύκνωση και τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στο πίνακα (A) που ακολουθεί.

Αποδόσεις μεθανολικών εκχυλισμάτων

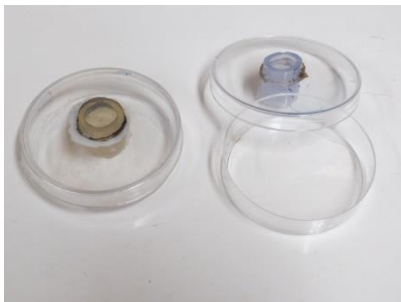
	Φιάλη	Φιάλη με μεθανολικά
Cannabis sativa	177,21 gr	177,90 gr
Eruca sativa	64,53 gr	65,30
Raphanus sativus	75,61 gr	77,16 gr
Zea mays	63,17gr	63,38 gr

Πίνακας (Α). Βάρη των μεθανολικών εκχυλισμάτων των σπόρων από τα 4 φυτικά είδη.

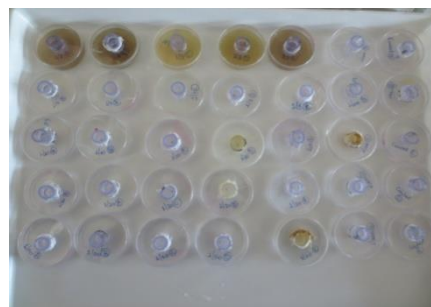
4.3 Δοκιμές επίδρασης των εκχυλισμάτων στην εκκόλαψη των ωών του *M. javanica*

Τα ωά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τις δοκιμές επίδρασης των φυτικών εκχυλισμάτων παραλήφθηκαν από τις μολυσμένες ρίζες των φυτών. Οι ρίζες πλύθηκαν πολύ καλά με άφθονο καθαρό νερό και τοποθετήθηκαν σε χαρτί κουζίνας ώστε να απορροφηθεί το μεγαλύτερο ποσοστό υγρασίας. Οι ώριμοι ωόσακοι συλλέχθηκαν με λαβίδες και τοποθετήθηκαν σε μικρά πλαστικά τρυβλία φτιαγμένα από τρυβλία Petri των 6 εκατοστών. Στο καπάκι του τρυβλίου είχε ανοιχθεί τρύπα και είχε εφαρμοστεί πλαστικό σωληνάριο (ύψους 4 cm και διαμέτρου 1 cm) στην κάτω άκρη του οποίου είχε τοποθετηθεί τούλι με μέγεθος οπών 500 μm (Εικόνα 9). Η χρησιμότητά του ήταν να συγκρατεί τον ωόσακο αλλά ταυτόχρονα να επιτρέπει στις προνύμφες να το διαπερνούν. Όλα τα καπάκια των τρυβλίων αποτελούνταν από αυτά τα πλαστικά σωληνάρια, της ίδιας διαμέτρου και ύψους. Τα καπάκια τοποθετήθηκαν στα τρυβλία Petri αφού πρώτα σε αυτά προστέθηκαν τα υπό διερεύνηση διαλύματα (Εικόνα 10). Κατά αυτόν τον τρόπο το πλαστικό σωληνάριο το οποίο συγκρατούνταν στο καπάκι του τρυβλίου βυθιζόταν εντός του διαλύματος. Η ποσότητα του διαλύματος σε κάθε τρυβλίο όπου βυθίστηκε ο κάθε ωόσακος ήταν 10 ml και διατηρήθηκαν στους 25°C για 7 ημέρες.

Μετά το πέρας της 1^{ης} εβδομάδας τα διαλύματα αδειάστηκαν σε Falcon των 50 ml όπου και παρέμειναν σε ηρεμία για 2 ώρες ώστε να καθιζάνουν οι νηματώδεις στο πυθμένα για να ακολουθήσει η συμπύκνωσή τους. Τα τρυβλία επανεμπλουτίστηκαν με αποσταγμένο νερό και διατηρήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία. Η επόμενη μέτρηση έγινε μετά από 7 ημέρες κατά όμοιο τρόπο όπως και στην αρχική μέτρηση. Η διαδικασία επαναλήφθηκε τόσες φορές μέχρις ότου στο μάρτυρα σταμάτησε η εκκόλαψη των ωών. Οι μεταχειρίσεις ήταν 7 μαζί με τον μάρτυρα και οι επαναλήψεις 5. Η καταμέτρηση των προνυμφών έγινε σε πλάκα πολυστυρενίου. Κάθε φορά καταμετρούνταν ο αριθμός των προνυμφών οι οποίες εκκολάφθηκαν και γινόταν διάκριση μεταξύ κινητών και ακίνητων προνυμφών. Οι συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν ήταν οι εξής: 1/2, 1/5, 1/10, 1/20, 1/50, 1/100 (100mg/ml, 40 mg/ml, 20 mg/ml, 10 mg/ml, 4 mg/ml, 2 mg/ml). Όταν στο μάρτυρα σταμάτησε η εκκόλαψη των ωών, μετά την αρχική εφαρμογή των εκχυλισμάτων) οι ωόσακοι αφαιρέθηκαν από τα τρυβλία και καθένας ξεχωριστά τοποθετήθηκε σε αντικειμενοφόρο πλάκα με μια σταγόνα νερού. Ο ωόσακος καλύφθηκε με καλυπτρίδα και πιέστηκε ώστε να σπάσει και να ελευθερωθούν τα ωά. Ακολούθησε η μέτρηση των ωών (διαφοροποιημένα και αδιαφοροποίητα) και των προνυμφών δευτέρου σταδίου (J2). Οι μεταχειρίσεις επαναλήφθηκαν πέντε φορές σε πειραματικό σχέδιο πλήρως τυχαιοποιημένων ομάδων και το πείραμα πραγματοποιήθηκε στο χρόνο μία φορά.



Εικόνα 9. Δισκία Petri



Εικόνα 10. Δισκία Petri με το εκχύλισμα

4.4 Δοκιμές επίδρασης των υδατικών εκχυλισμάτων σε προνύμφες (J2) στο έδαφος.

Έδαφος το οποίο συλλέχθηκε από πειραματικό αγρό στην περιοχή των Γαργαλιάνων, κοσκινίστηκε από κόσκινο 2 οπών και αποστειρώθηκε σε κλίβανο. Εν συνεχεία αφού ξηράθηκε σε φούρνο στους 50°C για 24 ώρες κατανεμήθηκε σε ίση ποσότητα (40 gr) σε πλαστικά δοχεία. Οι μεταχειρίσεις ήταν 7: 1/2, 1/5, 1/10, 1/20, 1/50, 1/100 και οι επαναλήψεις 5. Ο αριθμός των προνυμφών, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την μόλυνση της κάθε επανάληψης ήταν 1000-1200 (J2). Η δράση των εκχυλισμάτων ενάντια στους νηματώδεις δοκιμάστηκε σε 2 επίπεδα θερμοκρασίας, στους 20-22°C και 30°C. Στην πρώτη περίπτωση τα δοχεία παρέμειναν στον εργαστηριακό χώρο σε ελεγχόμενη θερμοκρασία ενώ στη δεύτερη περίπτωση τοποθετήθηκαν σε μεταλλικό δίσκο διαστάσεων 60x40x8 εκατοστά (ΜxΠxΥ) στον πυθμένα του οποίου είχε εγκατασταθεί πλέγμα εύκαμπτης αντίστασης σιλικόνης συνδεδεμένη με θερμοστάτη. Τα δοχεία τοποθετήθηκαν εντός του δίσκου βυθισμένα σε υγρή άμμο (Εικόνα 11). Η παραμονή των εκχυλισμάτων και των προνυμφών εντός των δοχείων διήρκεσε 3 ημέρες και για τα δύο επίπεδα θερμοκρασίας. Με την ολοκλήρωση των 72 ωρών παραμονής, ακολούθησε απομόνωση των προνυμφών δευτέρου σταδίου από το έδαφος. Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε με μια σειρά από εργαστηριακά κόσκινα διατομής οπών 150, 90, 75, 53 και 38 μm. Οι προνύμφες που παρελήφθησαν μεταφέρθηκαν σε δισκάκια Baermann σε θερμοκρασία 25-27 °C όπου και παρέμειναν για 48 ώρες. Το εναιώρημα νηματωδών παραλήφθηκε και έγινε καταμέτρηση των νηματωδών, σε ανάστροφο μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 10x, και οι καταμετρημένες προνύμφες χωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες: κινητές και ακίνητες. Κινητές θεωρούνται οι προνύμφες οι οποίες κατά τη στιγμή της παρατήρησης παρουσίαζαν έστω και την ελάχιστη κίνηση ενώ ως ακίνητες αυτές οι οποίες μετά από συνεχή παρατήρηση 3 δευτερολέπτων δεν παρουσίαζαν καμία κίνηση.



Εικόνα 11. Δοχεία τοποθετημένα εντός της υγρής άμμου

4.5 Δοκιμές επίδρασης των υδατικών εκχυλισμάτων στην εκκόλαψη και διαφοροποίηση των ωών.

Η παραλαβή των ωών πραγματοποιήθηκε από μολυσμένα φυτά τομάτας που είχαν μολυνθεί με προνύμφες (J2). Μετά την πάροδο 50-60 ημερών οι ρίζες των φυτών πλύθηκαν με άφθονο νερό ώστε να ξεπλυθεί πλήρως το έδαφος. Εν συνεχεία τεμαχίστηκαν σε μικρά κομμάτια και τοποθετήθηκαν σε γυάλινο δοχείο το οποίο περιείχε διάλυμα υποχλωριώδες νατρίου και νερό (100ml NaOCl και 1lt νερό). Το αιώρημα ανακινήθηκε για 5 λεπτά ώστε να σπάσουν οι ωόσακοι και να εξέλθουν τα ωά. Έπειτα το διάλυμα πλύθηκε σε κόσκινα διατομής 250 και 38 μm . Το τελευταίο κόσκινο με το διάλυμα ωών τοποθετήθηκε σε ποτήρι ζέσεως 100 ml, όπου και παρέμεινε για να γίνει η αραίωση ή συμπύκνωση ώστε να επιτευχθεί ο επιθυμητός αριθμός ωών.

Οι συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων που ελέγχθηκαν ήταν οι εξής: 0.2, 0,05 και 0.02 v/v. Χρησιμοποιήθηκαν πλάκες πολυστυρενίου Cellstar® 24-πηγαδιών στις οποίες προστέθηκε σε αναλογία 1:1 (v/v), δηλαδή 0.5 ml διαλύματος υδατικού εκχυλίσματος από την κάθε συγκέντρωση (δόση) και 0.5 ml υδατικού αιωρήματος το οποίο περιείχε τον επιθυμητό αριθμό ωών. Ο αριθμός των ωών που προστέθηκε σε κάθε πηγάδι ήταν 20. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε απεσταγμένο νερό και διάλυμα ωών. Κατά την καταμέτρηση τα ωά διαχωρίστηκαν σε i)

αδιαφοροποίητα, ii) διαφοροποιημένα και iii) προνύμφες (J2) δευτέρου σταδίου. Οι πλάκες σκεπάστηκαν με αλουμινόχαρτο ώστε να μην εκτίθενται στο φως και διατηρήθηκαν για 4 ημέρες σε σταθερή θερμοκρασία 25-27°C. Η καταμέτρηση πραγματοποιήθηκε στις 12, 24, 48 και 96 h σε ανάστροφο μικροσκόπιο (Zeiss, Germany) σε μεγέθυνση 10x.

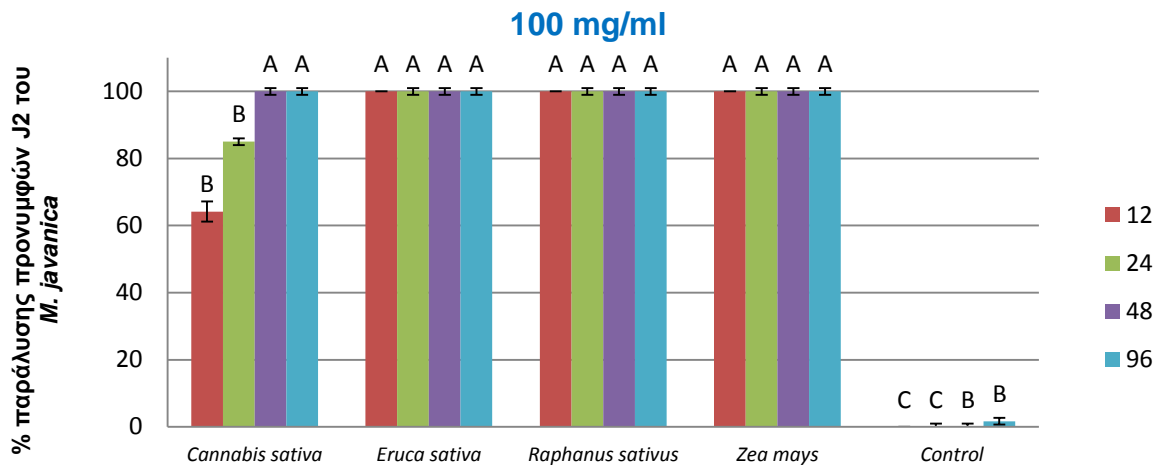
4.6 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε χρησιμοποιώντας την ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) με διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Τα δείγματα που συμμετείχαν στις εκάστοτε δοκιμές εξετάζονταν και είχαν ίσες διασπορές. Στα πειράματα παράλυσης των νεαρών προνυμφών των νηματωδών παρουσία υδατικών εκχυλισμάτων είτε αυτούσιων είτε με την προσθήκη γαλακτικού οξέος, έγιναν μονοπαραγοντικές δοκιμές με παράγοντα την συγκέντρωση τον χρόνο έκθεσης για κάθε δόση ξεχωριστά. Για τα μεθανολικά εκχυλίσματα ο παράγοντας που επιλέχθηκε είναι η συγκέντρωση για το κάθε εκχύλισμα. Στα πειράματα επίδρασης σε ωά και νεαρές προνύμφες έγιναν δυο μονοπαραγοντικές δοκιμές ως προς τον χρόνο και την συγκέντρωση, για κάθε εκχύλισμα ξεχωριστά. Στις δοκιμασίες όπου ερευνήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας έγιναν μονοπαραγοντικές δοκιμές για την θερμοκρασία και την συγκέντρωση. Ο παράγοντας της συγκέντρωσης ανά εκχύλισμα εξετάστηκε και στην περίπτωση της επίδρασης σε ωόσακους των νηματωδών. Το τεστ που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις παραπάνω δοκιμές είναι το Tukey's HSD και έγινε με την βοήθεια του πακέτου JMP 8 (SAS Institute).

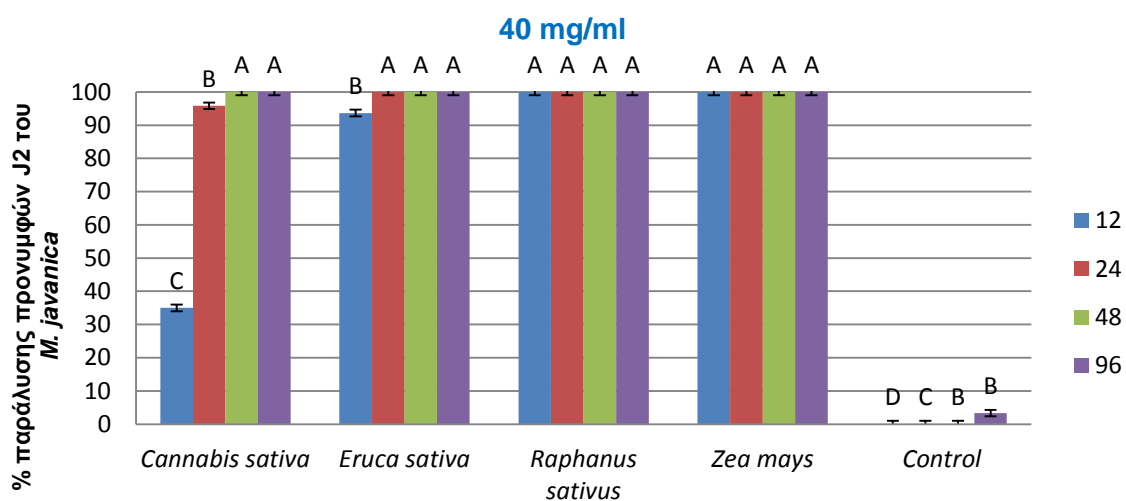
5. Αποτελέσματα

5.1 Επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων στην παράλυση των προνυμφών *M. javanica* (J2)

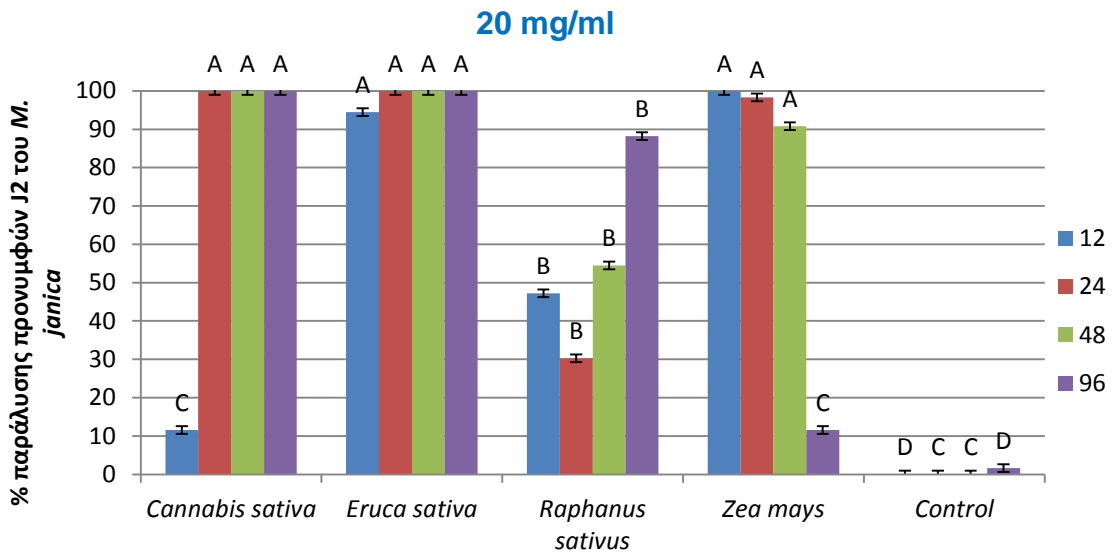
Η δράση των υδατικών εκχυλισμάτων στην ανώτερη δόση (1/2) , ήταν τοξική και αποτελεσματική στην παράλυση των προνυμφών *M. javanica* (Γράφημα 1.) Όπως προκύπτει από το Γράφημα 1 όλα τα εκχυλίσματα εμφανίζουν δράση από την πρώτη μέτρηση στις 12 ώρες έως τις 96 ώρες σε σύγκριση με τον μάρτυρα ($F_{5,143} = 939,0628$, $P < 0,0001$). Εξαίρεση αποτελεί το εκχύλισμα *Cannabis sativa* το οποίο στις 12 και 24 ώρες διαφέρει σημαντικά σε σύγκριση με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα. Η δόση των 0,2 v/v (Γράφημα 2) εμφανίζει εξίσου σημαντική νηματωδοκτόνο δράση από τις πρώτες 12 ώρες έως τις 96 ώρες σε σύγκριση με τον μάρτυρα ($F_{5,143} = 268,8353$ $P < 0,0001$). Σημαντική είναι η διαφορά στο *Cannabis sativa*, στις πρώτες 12 ώρες όπου η νηματωδοκτόνος δράση του εκχυλίσματος είναι σημαντικά μικρότερη σε σύγκριση με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα. Σημαντική διαφορά παρατηρείται στην δόση 0,1 v/v (Γράφημα 3) κατά την οποία το *Raphanus sativus* παρουσιάζει σημαντικά χαμηλότερη νηματωδοκτόνο δράση μέχρι τις 48 ώρες, ενώ το *Cannabis sativa* και η *Eruca sativa* εμφανίζουν παρόμοια νηματωδοκτόνο δράση όπως και στις δύο ανώτερες δόσεις ($F_{5,143} = 51,5759$ $P < 0,0001$). Αντιθέτως το *Zea mays* μετά το πέρας των 96 ωρών εμφανίζει αναστολή της παράλυσης των προνυμφών. Ακολούθως στις υπόλοιπες δόσεις (0,05 v/v, 0,02 v/v, 0.01 v/v) (Γραφήματα 4, 5, 6) εμφανίζουν σταθερή νηματωδοκτόνο δράση το *Eruca sativa* και το *Cannabis sativa* ενώ το *Raphanus sativus* και *Zea mays* ($F_{5,143} = 100,5663$, $F_{5,143} = 338,318$, $F_{5,143} = 1028,466$ $P < 0,0001$ αντίστοιχα)



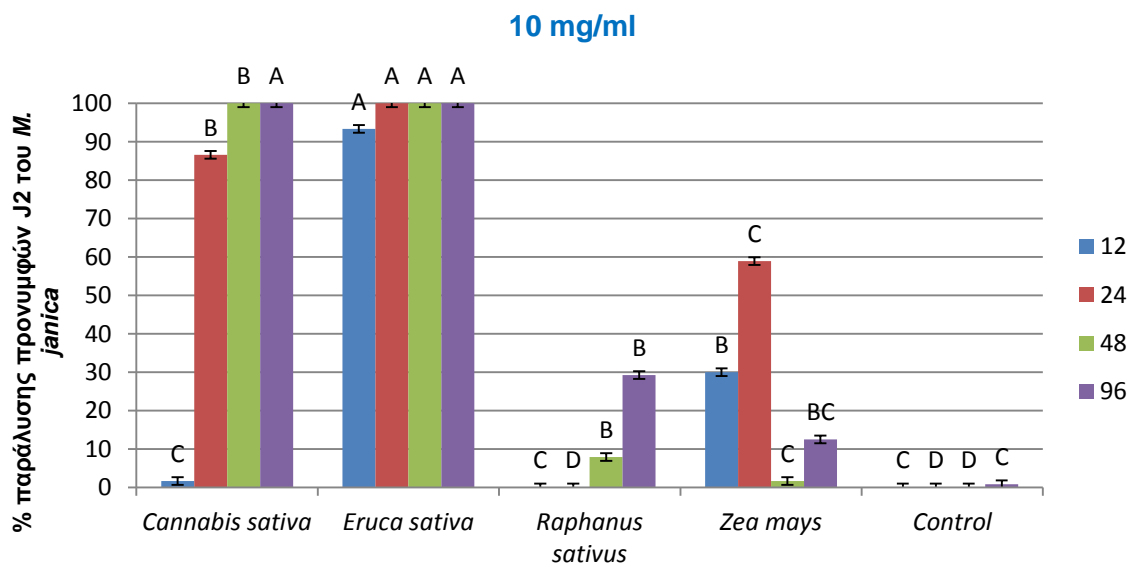
Γράφημα 1. Το ποσοστό παράλυσης των προνυμφών (J2) μετά από 12, 24, 48 και 96 ωρών υπό την επίδραση υδατικών εκχυλισμάτων συγκέντρωσης 100 mg/ml διαφόρων σπόρων, στους 22-25°C. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε απεσταγμένο νερό. Στήλες που ακολουθούνται από ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά ($P < 0.05$, ANOVA, Tukey's test).



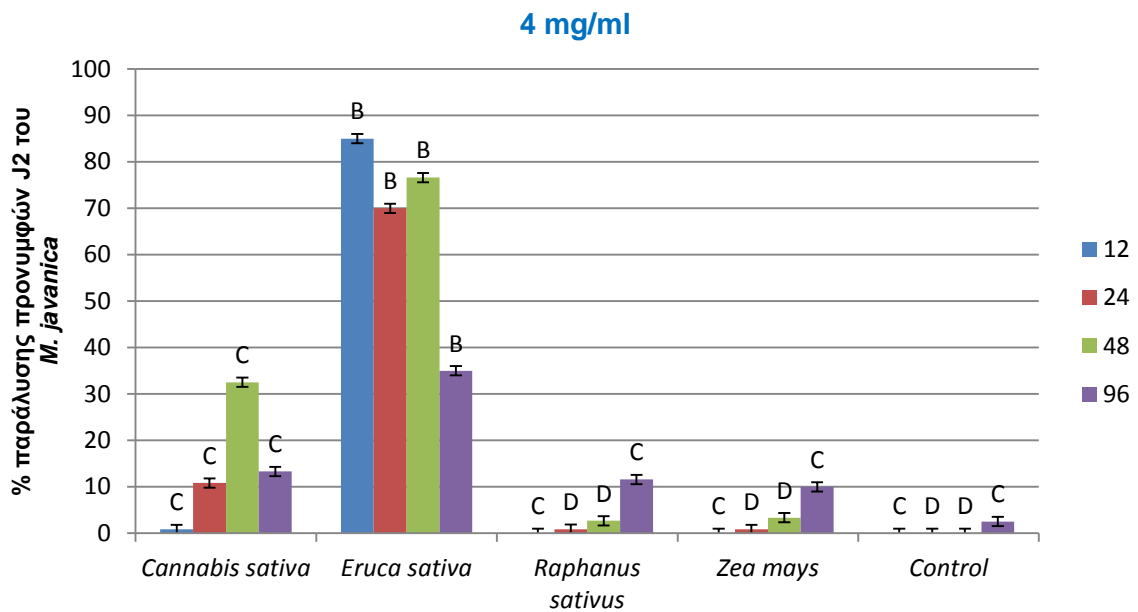
Γράφημα 2. Το ποσοστό παράλυσης των προνυμφών (J2) μετά από 12, 24, 48 και 96 ωρών υπό την επίδραση υδατικών εκχυλισμάτων συγκέντρωσης 40 mg/ml διαφόρων σπόρων, στους 22-25°C. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αποσταγμένο νερό. Στήλες που ακολουθούνται από ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά ($P < 0.05$, ANOVA, Tukey's test).



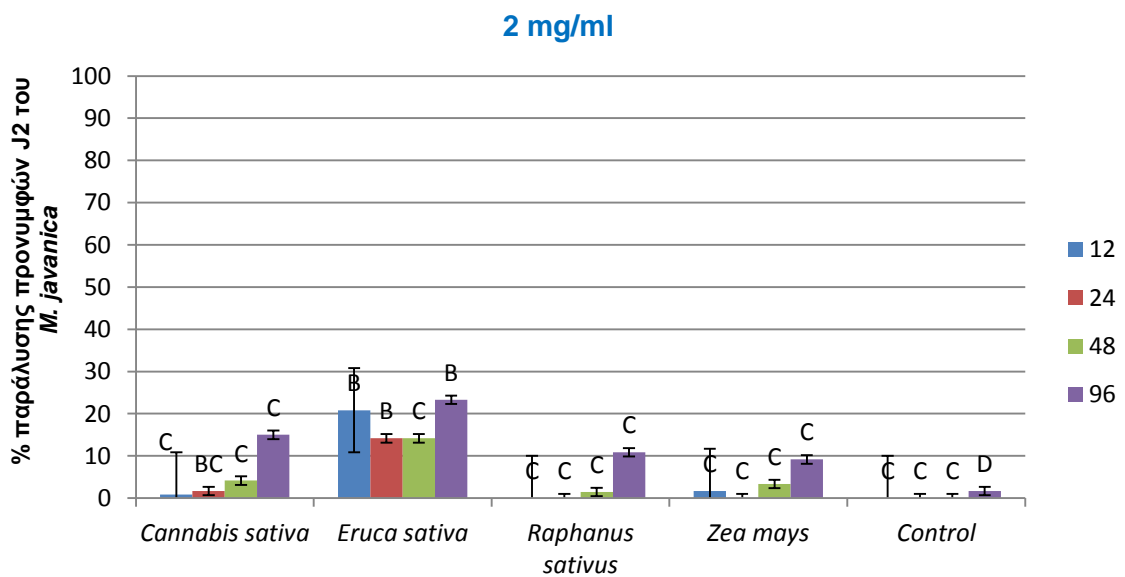
Γράφημα 3. Το ποσοστό παράλυσης των προνυμφών (J2) μετά από 12, 24, 48 και 96 ωρών υπό την επίδραση υδατικών εκχυλισμάτων συγκέντρωσης 20 mg/ml διαφόρων σπόρων, στους 22-25°C. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αποσταγμένο νερό. Στήλες που ακολουθούνται από ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά ($P < 0.05$, ANOVA, Tukey's test).



Γράφημα 4. Το ποσοστό παράλυσης των προνυμφών (J2) μετά από 12, 24, 48 και 96 ωρών υπό την επίδραση υδατικών εκχυλισμάτων συγκέντρωσης 10 mg/ml διαφόρων σπόρων, στους 22-25°C. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αποσταγμένο νερό. Στήλες που ακολουθούνται από ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά ($P < 0.05$, ANOVA, Tukey's test).



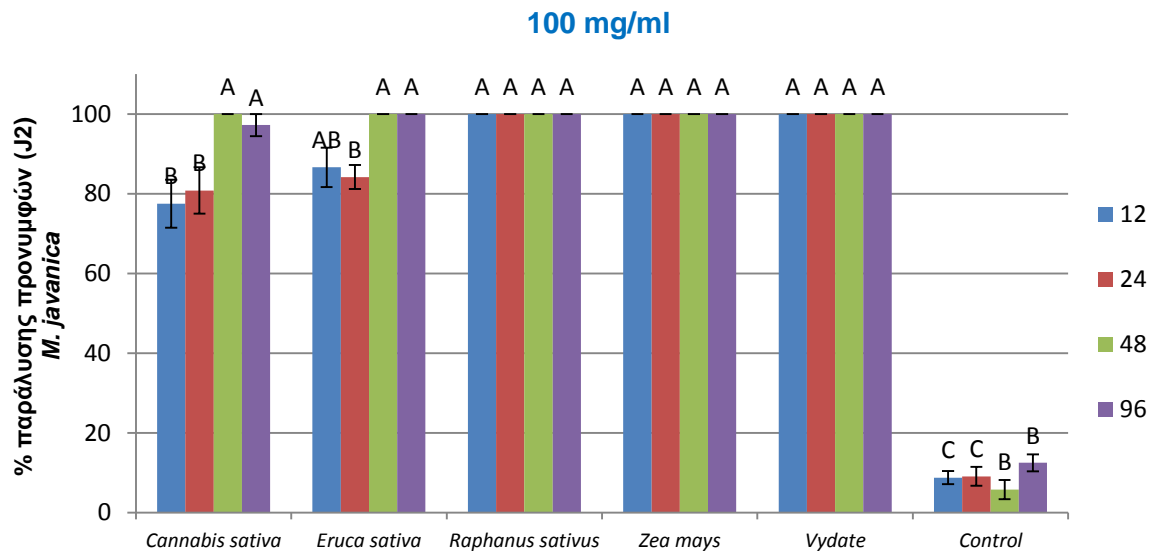
Γράφημα 5. Το ποσοστό παράλυσης των προνυμφών (J2) μετά από 12, 24, 48 και 96 ωρών υπό την επίδραση υδατικών εκχυλισμάτων συγκέντρωσης 4 mg/ml διαφόρων σπόρων, στους 22-25°C. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αποσταγμένο νερό. Στήλες που ακολουθούνται από ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά ($P < 0.05$, ANOVA, Tukey's test).



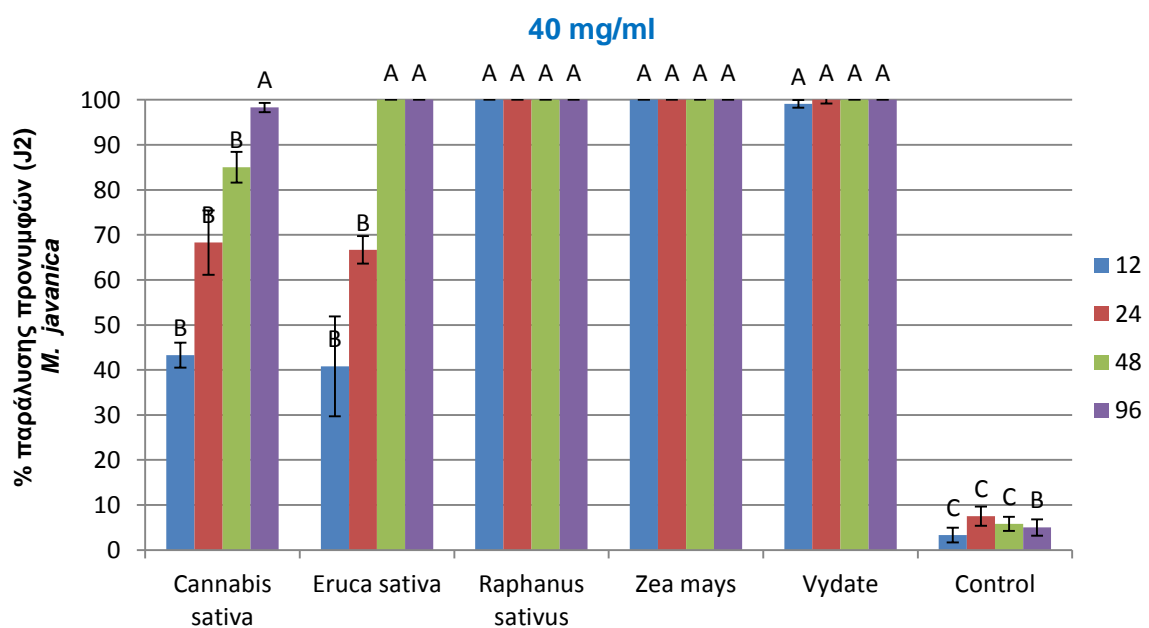
Γράφημα 6. Το ποσοστό παράλυσης των προνυμφών (J2) μετά από 12, 24, 48 και 96 ωρών υπό την επίδραση υδατικών εκχυλισμάτων συγκέντρωσης 2 mg/ml διαφόρων σπόρων, στους 22-25°C. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αποσταγμένο νερό. Στήλες που ακολουθούνται από ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά ($P < 0.05$, ANOVA, Tukey's test).

5.2 Παράλυση των προνυμφών με τη προσθήκη γαλακτικού οξέος στα υδατικά εκχυλίσματα.

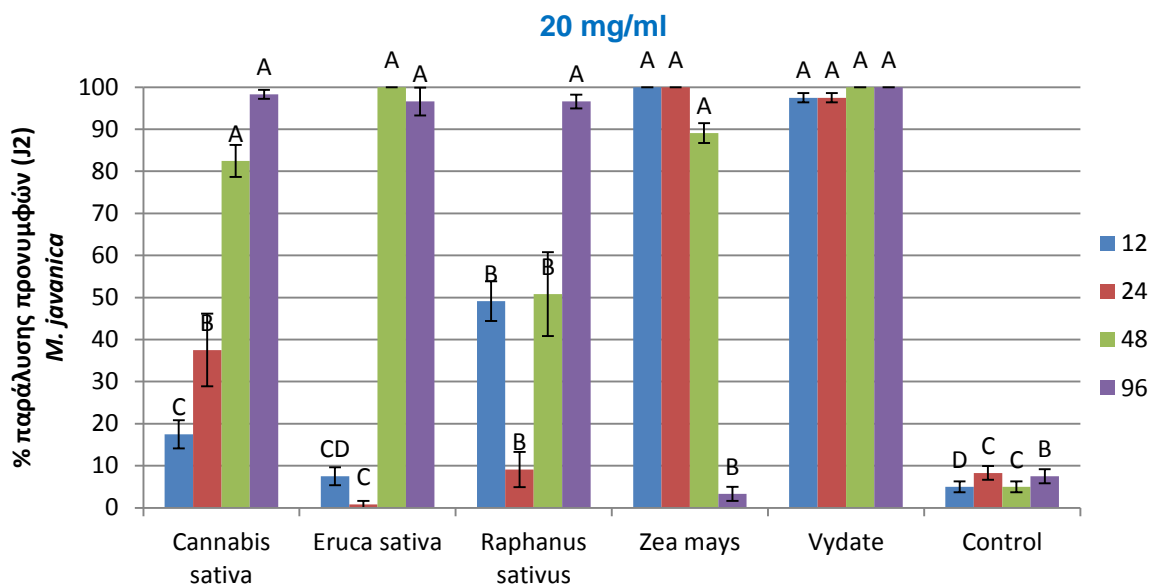
Από τα αποτελέσματα προκύπτει πως η δράση των υδατικών εκχυλισμάτων στη συγκέντρωση 100 mg/ml (Γράφημα 7), με την επίδραση του γαλακτικού οξέος καθώς και ο χημικός παράγοντας (Vydate®), παρουσιάζει σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Η παράλυση των προνυμφών είναι μεγαλύτερη του 80%. Η έκθεση των προνυμφών στη συγκέντρωση 40 mg/ml (Γράφημα 8) παρουσιάζει παρόμοια δράση σε ποσοστό παράλυσης μεγαλύτερο του 40%, σε σύγκριση με τον μάρτυρα ($F_{5,143} = 559,1967$, $P < 0,0001$). Στη συγκέντρωση 20 mg/ml (Γράφημα 9) παρατηρείται σταδιακή παράλυση των προνυμφών για την κάνναβη, ρόκα και ραφανίδα (*Cannabis sativa*, *Eruca sativa*, *Raphanus sativus*) στις 12 και 24 ώρες σε ποσοστό 2% έως 50% ενώ για το *Zea mays* και το Vydate παρατηρείται υψηλό ποσοστό παράλυσης προνυμφών από τις πρώτες 12 ώρες ($F_{5,143} = 21,5915$, $P < 0,0001$). Κατά τη συγκέντρωση 10 mg/ml (Γράφημα 10) παρατηρείται υψηλό ποσοστό παράλυσης 80% έως 100% για τα εκχυλίσματα *Cannabis sativa* και *Eruca sativa*. Το *Raphanus sativus* βάσει των αποτελεσμάτων έχει σχετικά χαμηλή αποτελεσματικότητα (40%) ενώ το *Zea mays* παρουσιάζει ανάκτηση της παράλυσης μετά τις 48 ώρες ($F_{5,143} = 22,6529$, $P < 0,0001$). Στη συγκέντρωση 4 mg/ml (Γράφημα 11) απεικονίζεται μεγαλύτερη δράση των υδατικών εκχυλισμάτων στο *Cannabis sativa* και *Eruca sativa* μετά τις 48 ώρες σε ποσοστό άνω του 40%. Ο χημικός παράγοντας δρα εντονότερα στην παράλυση των προνυμφών ξεπερνώντας το 50% μετά το πέρας των 24 ωρών. Το *Raphanus sativus* και το *Zea mays* δεν εμφανίζουν τοξική δράση και δε διαφέρουν σημαντικά σε σύγκριση με τον μάρτυρα ($F_{5,143} = 23,1983$, $P < 0,0001$). Τέλος η μικρότερη δόση 2 mg/ml (Γράφημα 12) παρουσιάζει μικρή θνησιμότητα μετά τις 96 ώρες στα *Cannabis sativa* και *Eruca sativa* σε ποσοστό μικρότερο του 40%. Τα υπόλοιπα εκχυλίσματα έχουν μικρή αποτελεσματικότητα και δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σε σύγκριση με τον μάρτυρα ($F_{5,143} = 29.5247$, $P < 0.0001$)



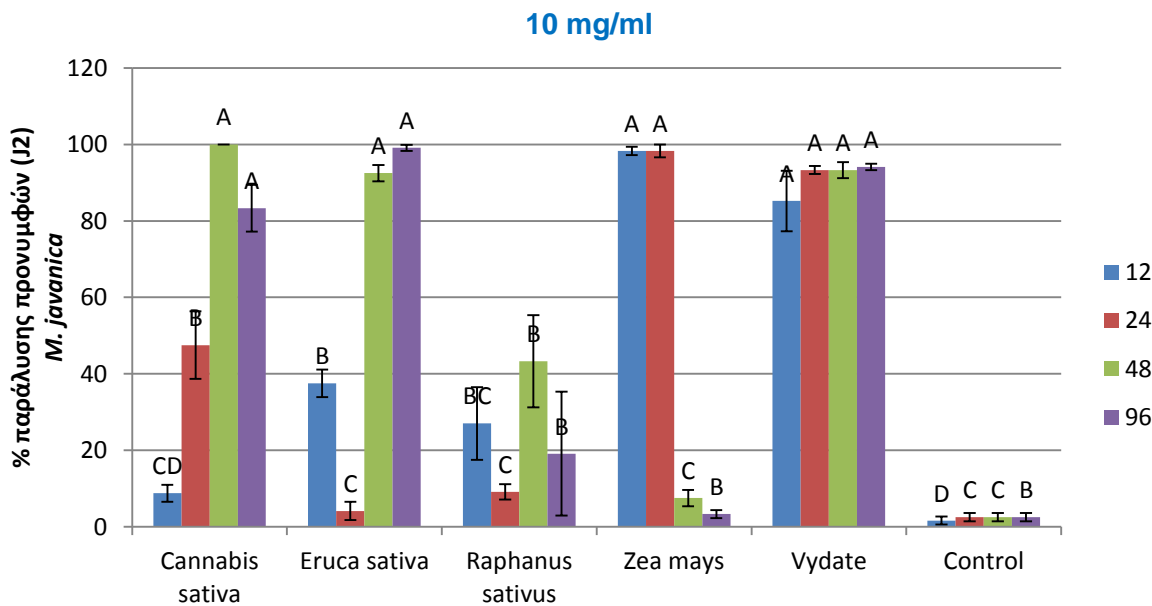
Γράφημα 7. Το ποσοστό παράλυσης των προνυμφών (J2) μετά από 12, 24, 48 και 96 ωρών υπό την επίδραση υδατικών εκχυλισμάτων με προσθήκη γαλακτικού οξέος συγκέντρωσης 100 mg/ml διαφόρων σπόρων, στους 22-25°C. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αποσταγμένο νερό. Στήλες που ακολουθούνται από ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά ($P < 0.05$, ANOVA, Tukey's test).



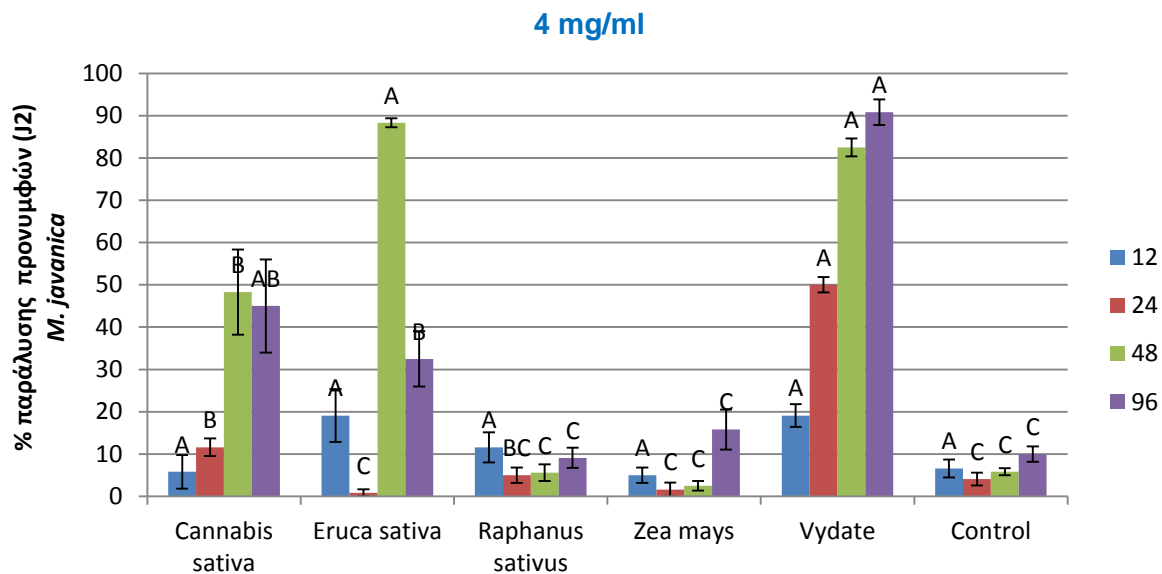
Γράφημα 8. Το ποσοστό παράλυσης των προνυμφών (J2) μετά από 12, 24, 48 και 96 ωρών υπό την επίδραση υδατικών εκχυλισμάτων με προσθήκη γαλακτικού οξέος συγκέντρωσης 40 mg/ml διαφόρων σπόρων, στους 22-25°C. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αποσταγμένο νερό. Στήλες που ακολουθούνται από ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά ($P < 0.05$, ANOVA, Tukey's test).



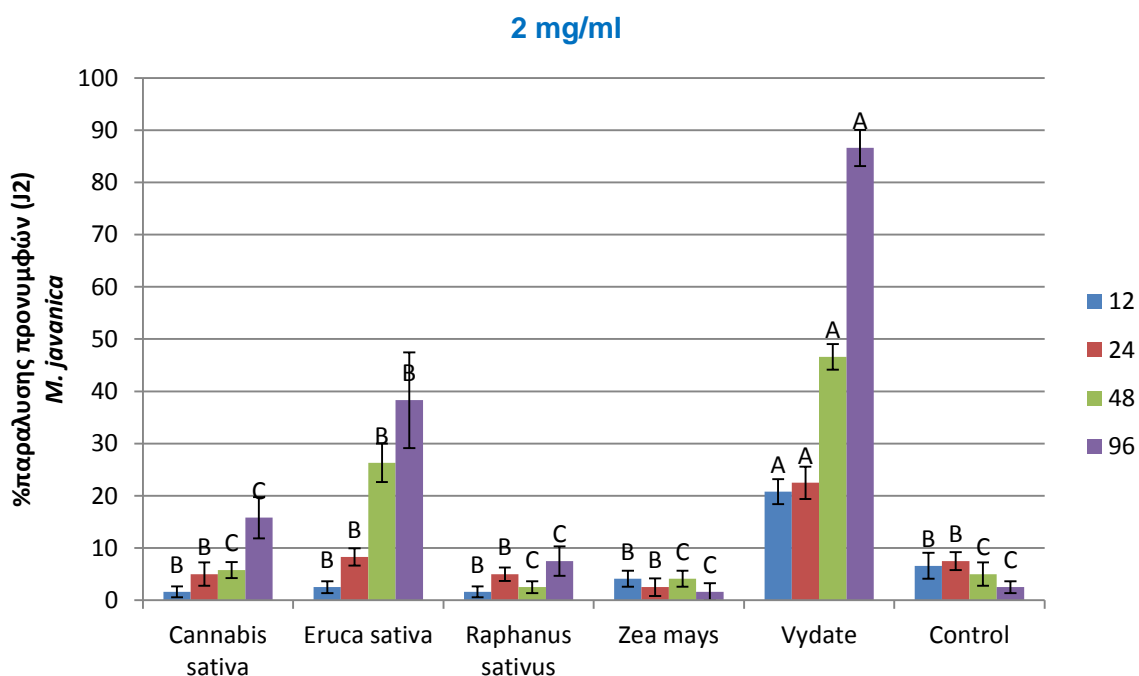
Γράφημα 9. Το ποσοστό παράλυσης των προνυμφών (J2) μετά από 12, 24, 48 και 96 ωρών υπό την επίδραση υδατικών εκχυλισμάτων με προσθήκη γαλακτικού οξέος συγκέντρωσης 20 mg/ml διαφόρων σπόρων, στους 22-25°C. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αποσταγμένο νερό. Στήλες που ακολουθούνται από ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά ($P < 0.05$, ANOVA, Tukey's test).



Γράφημα 10. Το ποσοστό παράλυσης των προνυμφών (J2) μετά από 12, 24, 48 και 96 ωρών υπό την επίδραση υδατικών εκχυλισμάτων με προσθήκη γαλακτικού οξέος συγκέντρωσης 10 mg/ml διαφόρων σπόρων, στους 22-25°C. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε απεσταγμένο νερό. Στήλες που ακολουθούνται από ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά ($P < 0.05$, ANOVA, Tukey's test).



Γράφημα 11 . Το ποσοστό παράλυσης των προνυμφών (J2) μετά από 12, 24, 48 και 96 ωρών υπό την επίδραση υδατικών εκχυλισμάτων με προσθήκη γαλακτικού οξέος συγκέντρωσης 4 mg/ml διαφόρων σπόρων, στους 22-25°C. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αποσταγμένο νερό. Στήλες που ακολουθούνται από ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά ($P < 0.05$, ANOVA, Tukey's test).

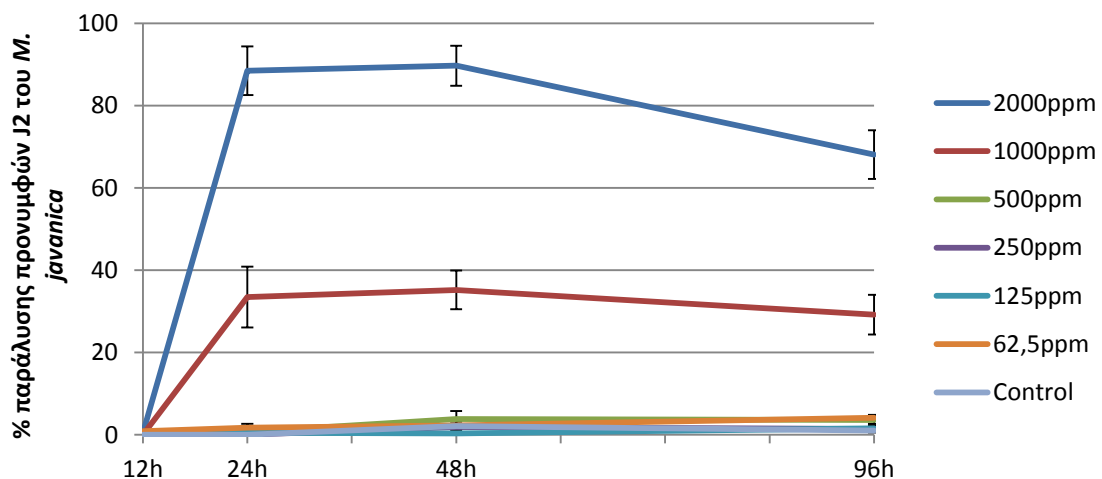


Γράφημα 12. Το ποσοστό παράλυσης των προνυμφών (J2) μετά από 12, 24, 48 και 96 ωρών υπό την επίδραση υδατικών εκχυλισμάτων με προσθήκη γαλακτικού οξέος συγκέντρωσης 2 mg/ml διαφόρων σπόρων, στους 22-25°C. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε απεσταγμένο νερό. Στήλες που ακολουθούνται από ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά ($P < 0.05$, ANOVA, Tukey's test).

5.3 Επίδραση των μεθανολικών εκχυλισμάτων στην παράλυση των προνυμφών.

Σημαντική είναι η δράση της μεθανόλης στην παράλυση των προνυμφών (J2) *M. javanica* στις δύο ανώτερες δόσεις, 2000 και 1000 ppm. Η κάνναβη (*Cannabis sativa*) με βάση τα αποτελέσματα (Γράφημα 13) παρουσιάζει υψηλή αποτελεσματικότητα στην ανώτερη δόση των 2000 ppm σε ποσοστό 80%, τις πρώτες 48 ώρες ενώ παρατηρείται μείωση της αποτελεσματικότητας (10%) στις 96 ώρες. Στη δόση των 1000 ppm η παράλυση των προνυμφών κυμαίνεται σε ποσοστό 30-35% και σταθεροποιείται μέχρι το πέρας των 96 ωρών. Οι δύο ανώτερες δόσεις διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σε σύγκριση με τον μάρτυρα αλλά και με τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις, οι οποίες δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους όπως επίσης και με τον μάρτυρα ($F_{9,167} = 45,2789$, $P < 0.0001$).

Cannabis sativa

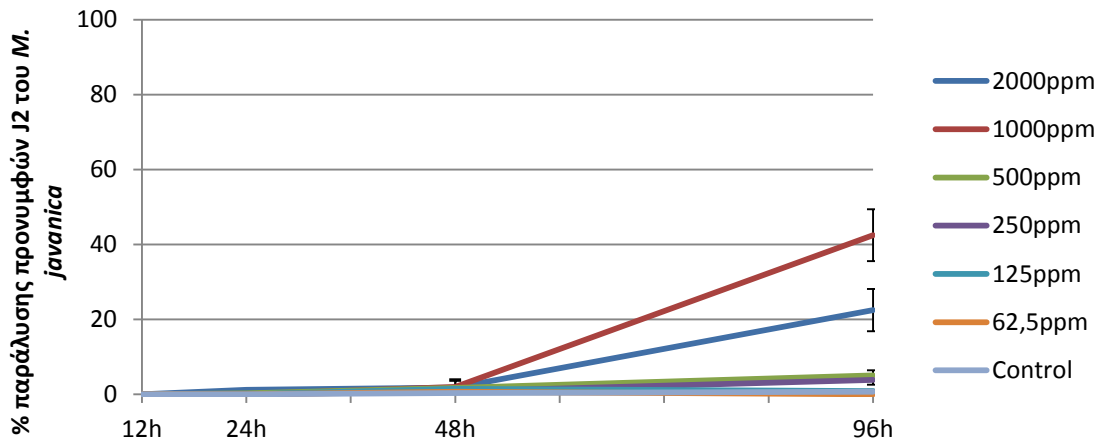


Γράφημα 13 . Το ποσοστό παράλυσης των προνυμφών (J2) μετά από 12, 24, 48 και 96 ωρών υπό την επίδραση υδατικών εκχυλισμάτων με προσθήκη μεθανόλης συγκέντρωσης 1:10 (w/v) διαφόρων σπόρων, στους 22-25°C. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε απεσταγμένο νερό.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η δράση της ραφανίδας (*Raphanus sativus*) καθότι με βάση τα αποτελέσματα (Γράφημα 14) προκύπτει στην ανώτερη δόση των 2000 ppm, παράλυση των προνυμφών μόνο μετά τις 48 ώρες και το ποσοστό να κυμαίνεται στο 40% μέχρι τις 96 ώρες. Στην ίδια κλίμακα δράσης κυμαίνεται και η δόση των 1000 ppm αλλά το ποσοστό καταγράφεται στο 20%. Οι δύο ανώτερες δόσεις διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σε σύγκριση με τον μάρτυρα αλλά και με

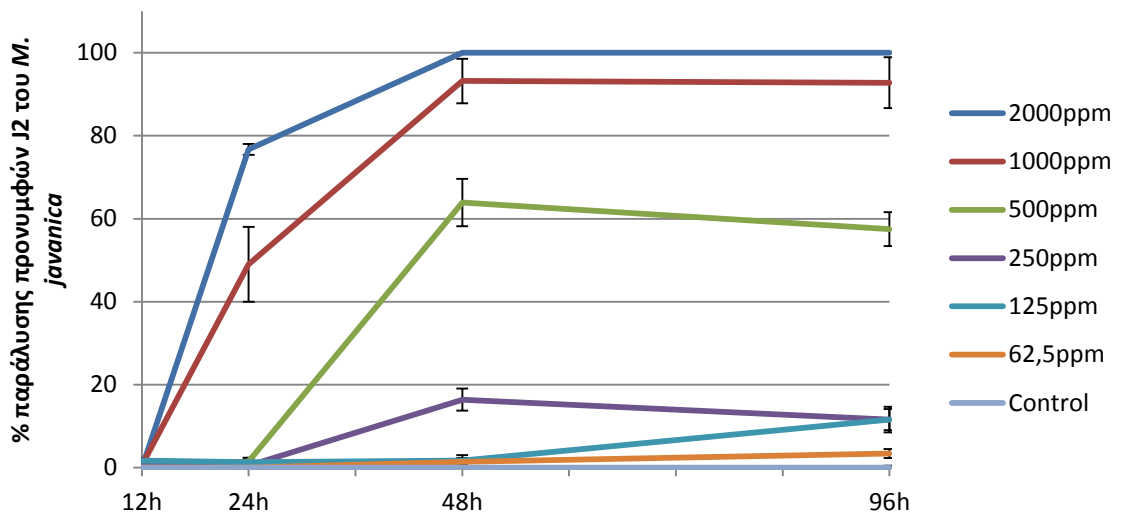
τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις, οι οποίες δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους όπως επίσης και με τον μάρτυρα ($F_{9.167} = 10,4614$, $P < 0.0001$).

Raphanus sativus



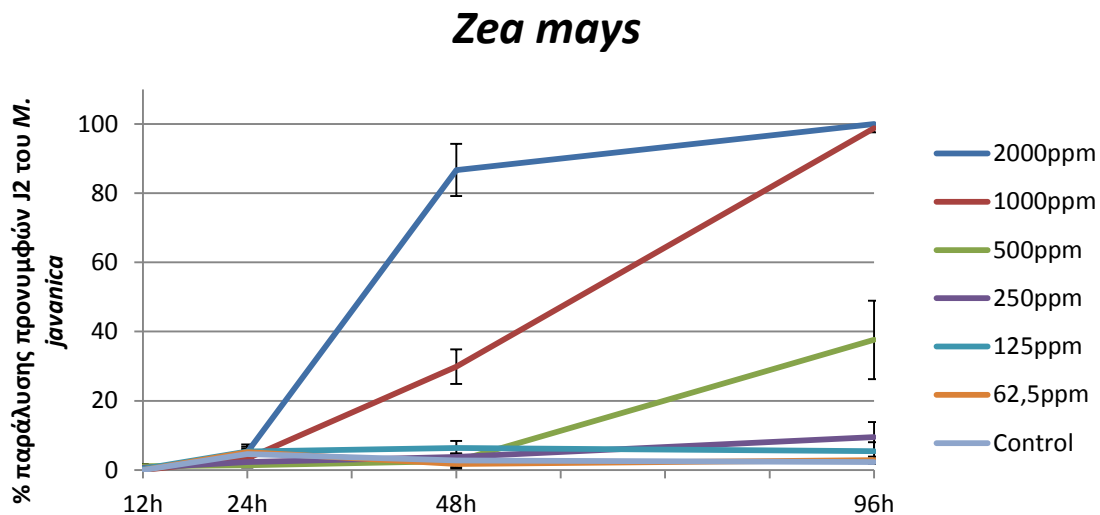
Γράφημα 14. Το ποσοστό παράλυσης των προνυμφών (J2) μετά από 12, 24, 48 και 96 ωρών υπό την επίδραση υδατικών εκχυλισμάτων με προσθήκη μεθανολικού οξέος συγκέντρωσης 1:10 (w/v) διαφόρων σπόρων, στους 22-25°C. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε απεσταγμένο νερό.

Το μεθανολικό εκχύλισμα της ρόκας (*Eruca sativa*) (Γράφημα 15) εμφανίζει υψηλότερη αποτελεσματικότητα στις υψηλότερες συγκεντρώσεις (2000 και 1000 ppm). Συγκεκριμένα στη δόση των 2000 ppm το ποσοστό παράλυσης αυξάνεται μέχρι το 80% στις 24 ώρες και σταθεροποιείται στο 100% στις 96 ώρες. Παρόμοια δράση εμφανίζει και η δόση των 1000 ppm με το ποσοστό παράλυσης να σταθεροποιείται στο 90% στις 96 ώρες. Στη δόση των 500 ppm παρουσιάζεται τοξικότητα του εκχυλίσματος μετά τις 24 ώρες και το ποσοστό παράλυσης κυμαίνεται σταθερά στο 60% έως τις 96 ώρες. Μετά τις 24 ώρες παρουσιάζει επίσης δράση η δόση των 250 ppm με ποσοστό παράλυσης 18% ενώ η δόση των 125 ppm παρουσιάζει το ίδιο ποσοστό στις 96 ώρες. Οι τέσσερις ανώτερες δόσεις διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σε σύγκριση με τον μάρτυρα ($F_{9.167} = 48.0787$, $P < 0.0001$)

Eruca sativa

Γράφημα 15. Το ποσοστό παράλυσης των προνυμφών (J2) μετά από 12, 24, 48 και 96 ωρών υπό την επίδραση υδατικών εκχυλισμάτων με προσθήκη μεθανολικού οξέος συγκέντρωσης 1:10 (w/v) διαφόρων σπόρων, στους 22-25°C. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αποσταγμένο νερό.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο αραβόσιτος (*Zea mays*) (Γράφημα 16) καθώς παρουσιάζει υψηλή αποτελεσματικότητα στην δόση των 2000 ppm μετά τις 24 ώρες σε ποσοστό 80% έως τις 96 ώρες ενώ το ποσοστό 100% κατά τη μέτρηση μετά από 96 ώρες. Η συγκέντρωση των 1000 ppm προκαλεί παράλυση των προνυμφών μετά τις 24 ώρες με ποσοστό 30% στις 48 ώρες και σταδιακή αύξηση του ποσοστού παράλυσης στο 100% στη μέτρηση των 96 ωρών. Η δόση των 500 ppm παρουσιάζει αύξηση της παράλυσης των προνυμφών μετά τις 48 ώρες και το ποσοστό παράλυσης σταθεροποιείται στο 40% μετά τις 96 ώρες. Οι υπόλοιπες δόσεις δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σε σύγκριση με τον μάρτυρα, ενώ οι τρεις υψηλότερες συγκεντρώσεις διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σε σύγκριση με τον μάρτυρα ($F_{9.167} = 53.9300$, $P < 0.0001$).

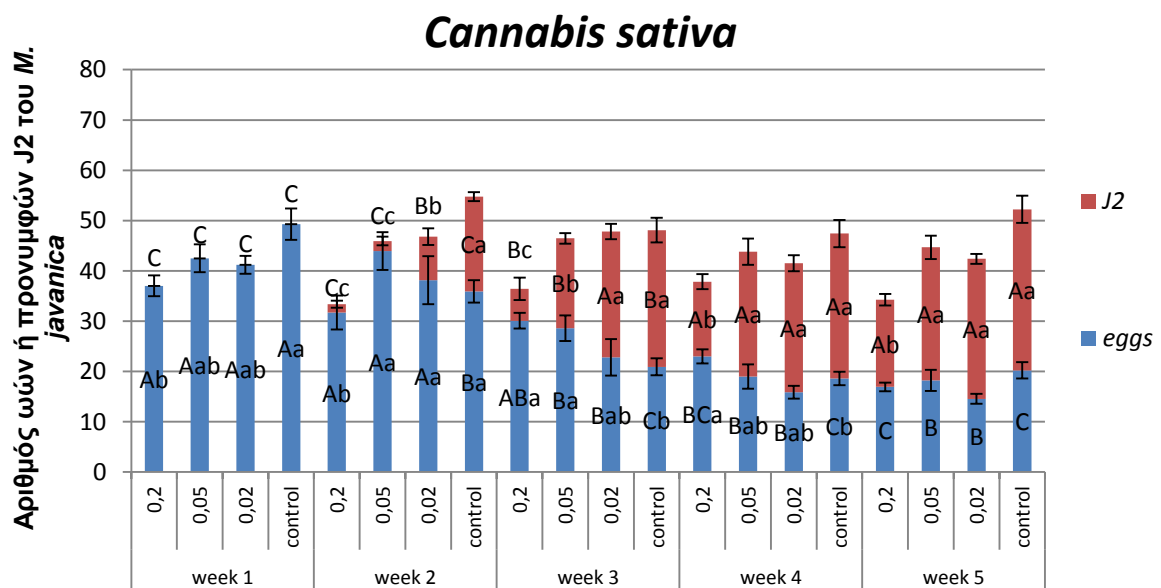


Γράφημα 16. Το ποσοστό παράλυσης των προνυμφών (J2) μετά από 12, 24, 48 και 96 ωρών υπό την επίδραση υδατικών εκχυλισμάτων με προσθήκη μεθανολικού οξέος συγκέντρωσης 1:10 (w/v) διαφόρων σπόρων, στους 22-25°C. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αποσταγμένο νερό.

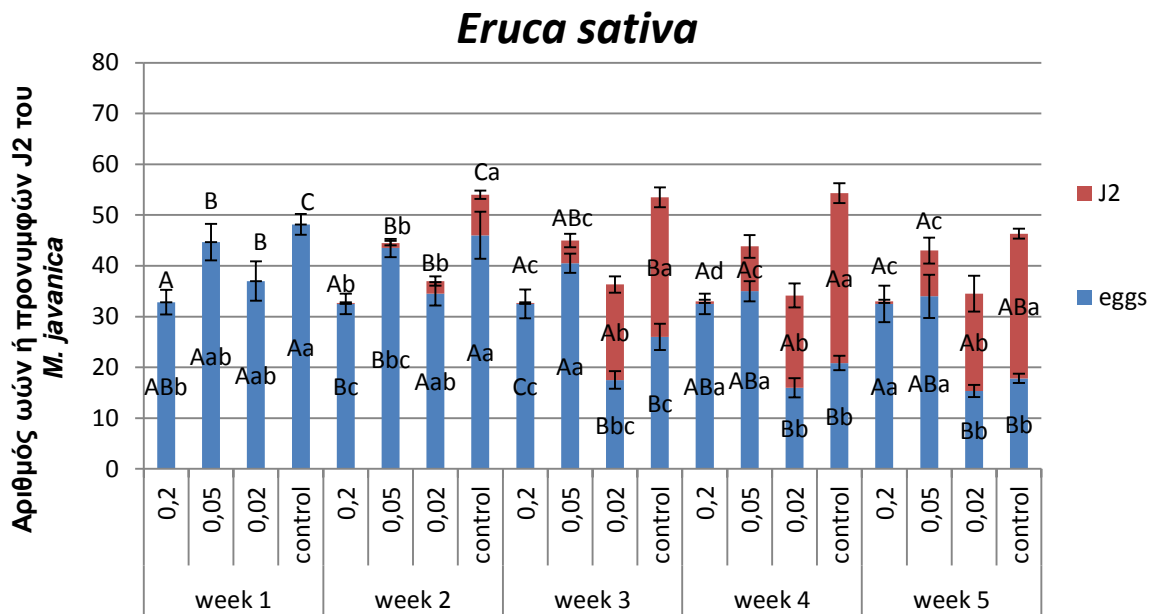
5.4 Αδιαφοροποίητα – Διαφοροποιημένα – Προνύμφες(J2)

Κατά την εμβάπτιση των ωών στα υδατικά εκχυλίσματα μελετήθηκε η επίδραση τους στη διαφοροποίηση των ωών σε προνύμφες (J2), στις αντίστοιχες δόσεις και σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Η μέτρηση διήρκεσε 5 εβδομάδες (συμπεριλαμβανομένου της αρχικής μέτρησης) ενώ οι δόσεις των εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν είναι 40 mg/ml, 10 mg/ml και 4mg/ml. Βάσει των αποτελεσμάτων στο *Cannabis sativa* (Γράφημα 17) παρατηρήθηκε σημαντική παρεμπόδιση διαφοροποίησης των ωών και εκκόλαψης των προνυμφών στην υψηλότερη δόση (0,2 v/v) σε σύγκριση με μάρτυρα. Παρατηρείται επίσης μείωση της εκκόλαψης των ωών στη συγκέντρωση 0,05 v/v ενώ δεν παρατηρείται καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στη χαμηλότερη δόση (0,02 v/v) σε σύγκριση με το μάρτυρα (J2-Week ($F_{4.119}=115.3134$, $P<0.0001$), J2-Doses ($F_{3.119}= 37.7295$, $P<0.0001$)) , (Eggs-Week ($F_{4.119}=66.3142$, $P,0.0001$), Eggs-Doses ($F_{3.119}=1.8987$, $P=0.1335$)). Το υδατικό εκχύλισμα *Eruca sativa* (ρόκα) (Γράφημα 18) παρουσιάζει θετικά αποτελέσματα καθώς η επίδραση του εκχυλίσματος παρεμπόδισε την εκκόλαψη των προνυμφών στις δύο ανώτερες συγκεντρώσεις σε σχέση με το μάρτυρα (J2-Week ($F_{4.119}=30,9487$, $P<0.0001$), J2-Doses ($F_{3.119}= 55,1098$, $P<0.0001$)) , (Eggs-Week ($F_{4.119}=13,0451$, $P<0.0001$), Eggs-Doses ($F_{3.119}=9,1522$,

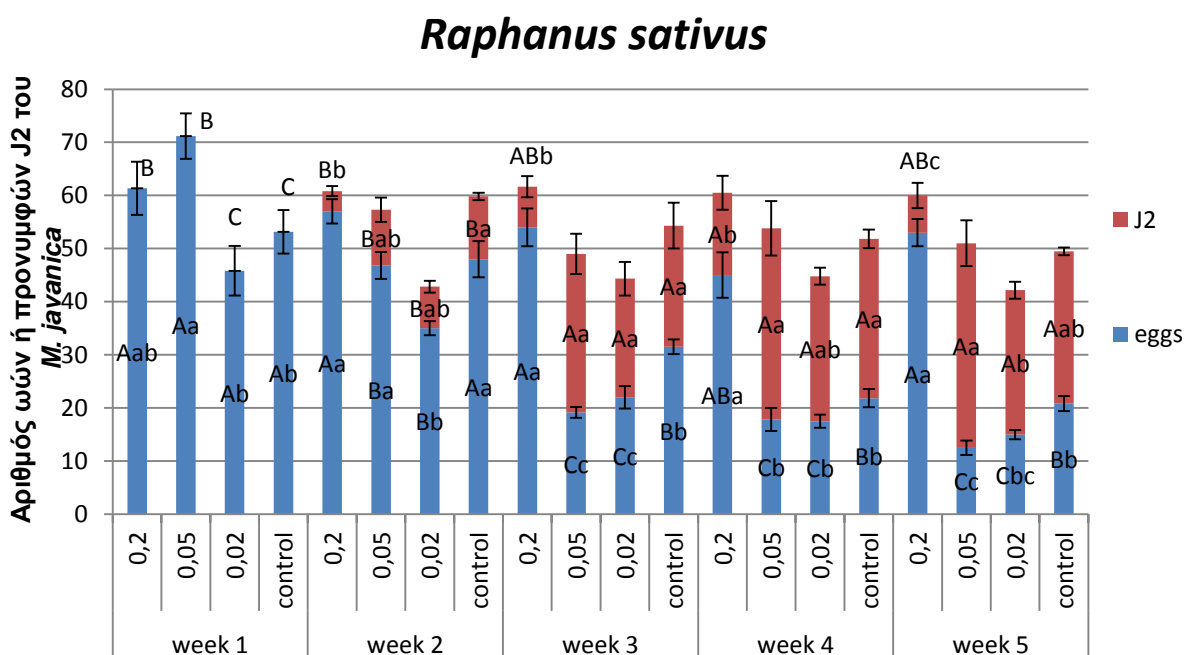
P=0.1335)). Το εκχύλισμα *Raphanus sativus* (ραφανίδα) (Γράφημα 19) παρουσιάζει σημαντική νηματωδοκτόνο δράση μέχρι την 5^η εβδομάδα μόνο στην υψηλότερη συγκέντρωση ενώ πολύ μικρότερη είναι η δράση του στις υπόλοιπες δόσεις μετά το πέρας των 5 εβδομάδων όπου η δράση του εκχυλίσματος δεν ήταν τοξική και δεν παρεμπόδισε σε σημαντικό ποσοστό την εκκόλαψη των προνυμφών. Η υψηλότερη δόση διαφέρει στατιστικά σημαντικά με το μάρτυρα (J2-Week ($F_{4.119}=63,0163$, $P<0.0001$), J2-Doses ($F_{3.119}=27,0445$ $P<0.0001$)), (Eggs-Week ($F_{4.119}=53,8320$, $P<0.0001$), Eggs-Doses ($F_{3.119}=48,3816$, $P=0.1335$)). Τέλος δεν προκύπτει καμία διαφορά στην παρεμπόδιση της εκκόλαψης των προνυμφών από τη δράση του εκχυλίσματος *Zea mays* (αραβόσιτος) (Γράφημα 20), σε καμία από τις συγκεντρώσεις και δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά με τον μάρτυρα (J2-Week ($F_{4.119}=42,7223$, $P<0.0001$), J2-Doses ($F_{3.119}=17,3597$, $P<0.0001$)), (Eggs-Week ($F_{4.119}=28,6282$, $P<0.0001$), Eggs-Doses ($F_{3.119}=12,4552$, $P=0.1335$))



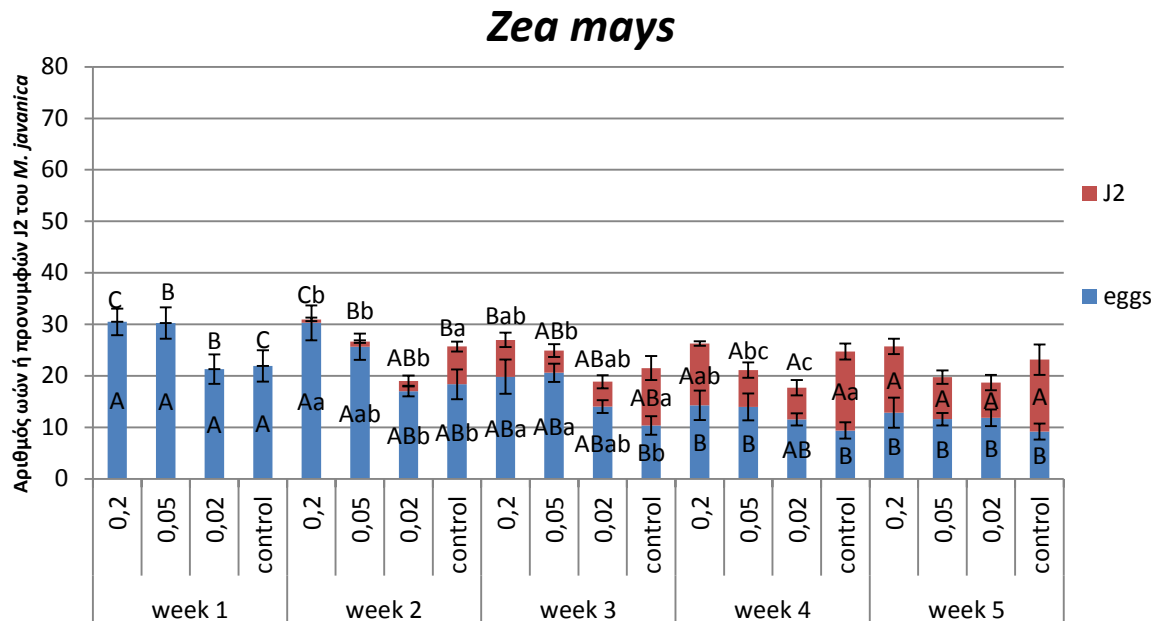
Γράφημα 17. Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος *Cannabis sativa* στην επώαση των ωών του κομβονηματώδη *M. javanica* στις συγκεντρώσεις 0,2, 0,05 και 0,02 v/v. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αποσταγμένο νερό. Στήλες που ακολουθούνται από το ίδιο κεφαλαίο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά σε σχέση με τον χρόνο. Στήλες που ακολουθούνται από το ίδιο μικρό γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά ανάμεσα στις διάφορες δόσεις ($P<0.05$, ANOVA, Tukey's).



Γράφημα 18. Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος *Eruca sativa* στην επώαση των ωών του κομβοηματώδη *M. javanica* στις συγκεντρώσεις 0,2, 0,05 και 0,02 v/v. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αποσταγμένο νερό. Στήλες που ακολουθούνται από το ίδιο κεφαλαίο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά σε σχέση με τον χρόνο. Στήλες που ακολουθούνται από το ίδιο μικρό γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά ανάμεσα στις διάφορες δόσεις (P<0.05, ANOVA, Tukey's).



Γράφημα 19. Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος *Raphanus sativus* στην επώαση των ωών του κομβοηματώδη *M. javanica* στις συγκεντρώσεις 0,2, 0,05 και 0,02 v/v. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αποσταγμένο νερό. Στήλες που ακολουθούνται από το ίδιο κεφαλαίο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά σε σχέση με τον χρόνο. Στήλες που ακολουθούνται από το ίδιο μικρό γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά ανάμεσα στις διάφορες δόσεις (P<0.05, ANOVA, Tukey's).



Γράφημα 20. Επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος *Zea mays* στην επώαση των ωών του κομβονηματώδη *M. javanica* στις συγκεντρώσεις 0,2, 0,05 και 0,02 v/v. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αποσταγμένο νερό. Στήλες που ακολουθούνται από το ίδιο κεφαλαίο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά σε σχέση με τον χρόνο. Στήλες που ακολουθούνται από το ίδιο μικρό γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά ανάμεσα στις διάφορες δόσεις ($P < 0.05$, ANOVA, Tukey's).

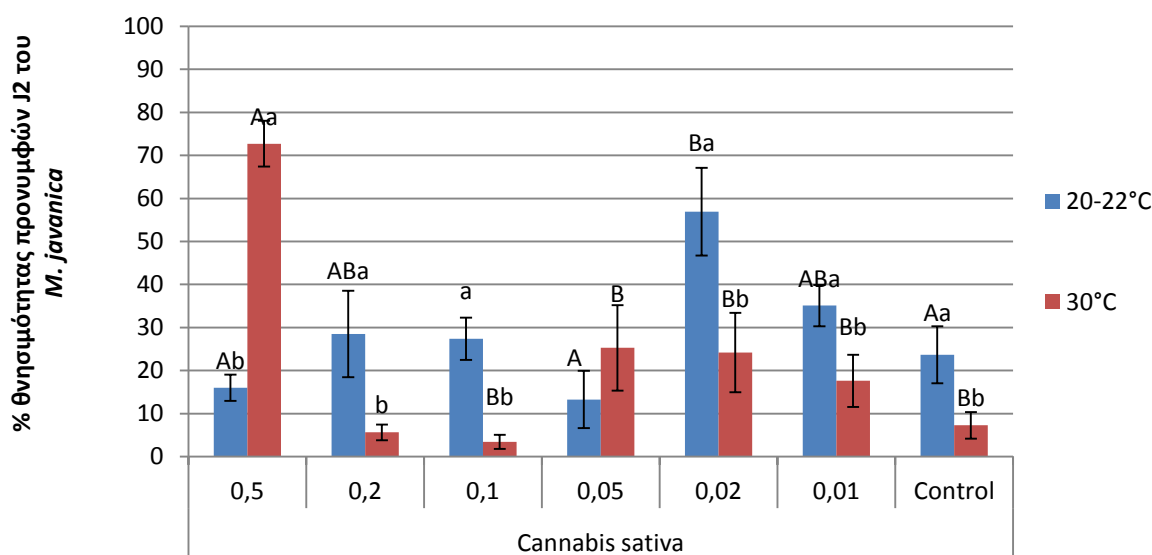
5.5 Πείραμα θνησιμότητας προνυμφών (J2) με την επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων στο έδαφος σε δύο θερμοκρασίες

Διερευνήθηκε η δράση του υδατικού εκχυλίσματος *Cannabis sativa* και η επίδραση του στην θνησιμότητα των όπως αυτά παρουσιάζονται στο Γράφημα 21. Η υψηλότερη θνησιμότητα καταγράφηκε στους 30°C και στην ανώτερη συγκέντρωση 0,5 v/v η οποία ήταν ίση με ποσοστό 70% και η οποία διαφέρει στατιστικώς σημαντικά σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Οι υπόλοιπες δόσεις παρουσιάζουν χαμηλά ποσοστά θνησιμότητας και δεν διαφέρουν σημαντικά είτε μεταξύ τους είτε με τον μάρτυρα. Τα ποσοστά θνησιμότητας στη θερμοκρασία των 20-22°C στις ανώτερες δόσεις δεν παρουσιάζουν σημαντική δράση. Αντιθέτως παρατηρείται από τα αποτελέσματα αύξηση της θνησιμότητας των προνυμφών στις δύο μικρότερες συγκεντρώσεις 0,02 v/v και 0,01 v/v σε ποσοστό 55% και 35% αντίστοιχα ($F_{1.62} = 1.9093$, $P = 0.1720$).

Στο υδατικό εκχύλισμα *Raphanus sativus* (Γράφημα 22) δεν παρατηρείται καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των συγκεντρώσεων ($F_{6,62} = 1.1624$, $P < 0.3380$) και του μάρτυρα και στις δύο θερμοκρασίες ($F_{1,62} = 54.9022$, $P < 0.0001$). Σημαντική διαφορά παρατηρείται μεταξύ των θερμοκρασιών, κατά τις οποίες στους 30°C παρουσιάζεται μεγαλύτερη θνησιμότητα σε σύγκριση με τους 20-22°C.

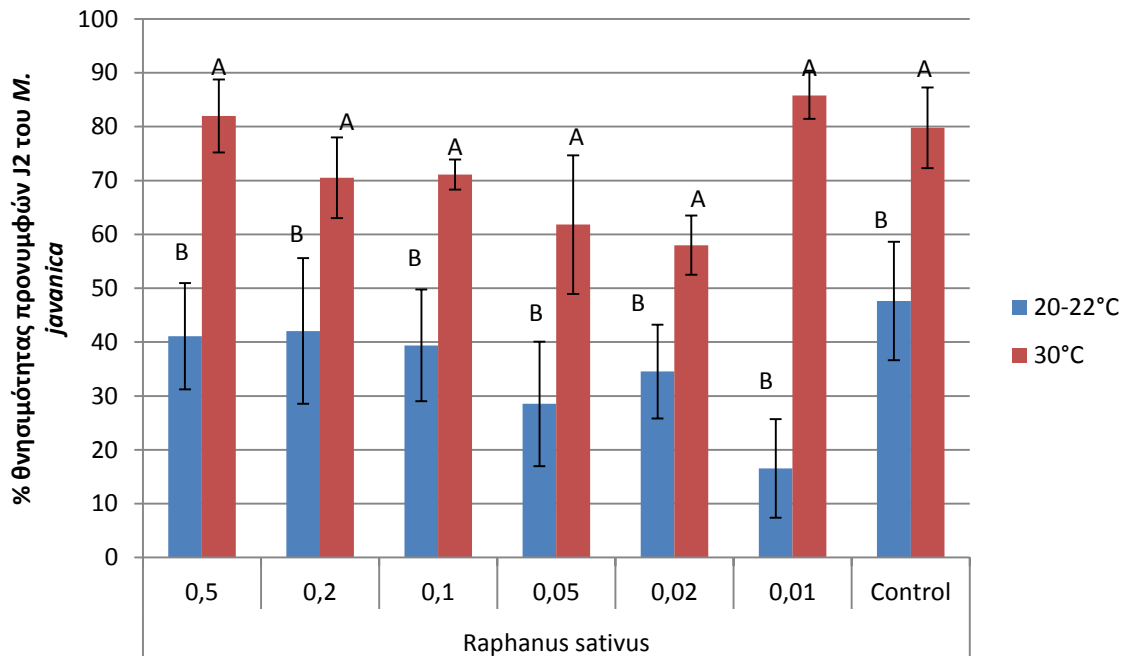
Η θνησιμότητα των προνυμφών (J2) στο υδατικό εκχύλισμα της ρόκας (*ErUCA sativa*) (Γράφημα 23) εμφανίζει υψηλά ποσοστά (>60 %) και στα δύο επίπεδα θερμοκρασίας. Βάσει των αποτελεσμάτων όλων των συγκεντρώσεων και σε σύγκριση με τον μάρτυρα προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο θερμοκρασιών ($F_{1,62}=0,2103$, $P=0.6257$) αλλά και μεταξύ των δόσεων ($F_{6,62}=19.5644$, $P < 0.0001$).

Τέλος στο υδατικό εκχύλισμα του αραβοσίτου (*Zea mays*) (Γράφημα 24) δεν παρατηρείται στατιστικά καμία σημαντική διαφορά μεταξύ δόσεων και μάρτυρα ($F_{1,62}=18.4276$, $P < 0.0001$). Η ίδια παρατήρηση σημειώνεται και στα δύο επίπεδα θερμοκρασίας. Ωστόσο σημειώνεται σημαντική διαφορά θνησιμότητας μεταξύ των δύο θερμοκρασιών όπου υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας παρατηρούνται στη θερμοκρασία των 20-22°C ($F_{6,62}=1.229$, $P=0.2605$).

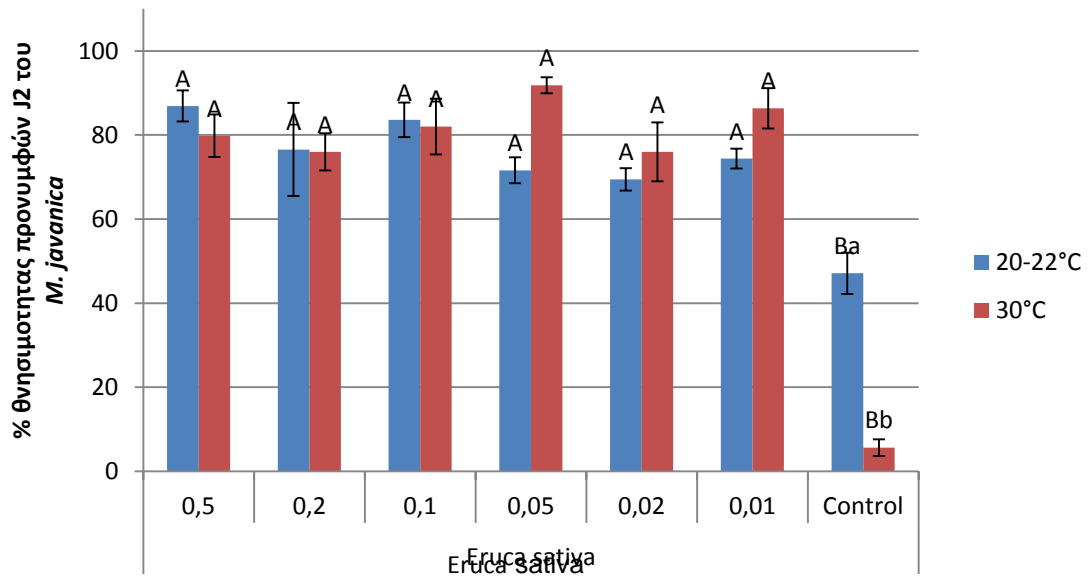


Γράφημα 21. Το ποσοστό θνησιμότητας των προνυμφών (J2) του *M. javanica* υπό την επίδραση υδατικού εκχυλίσματος του *Cannabis sativa* στο έδαφος, στους 22-25°C και 30°C. Χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις 0,5, 0,2, 0,1, 0,05, 0,02 και 0,01 v/v (100mg/ml, 40 mg/ml, 20

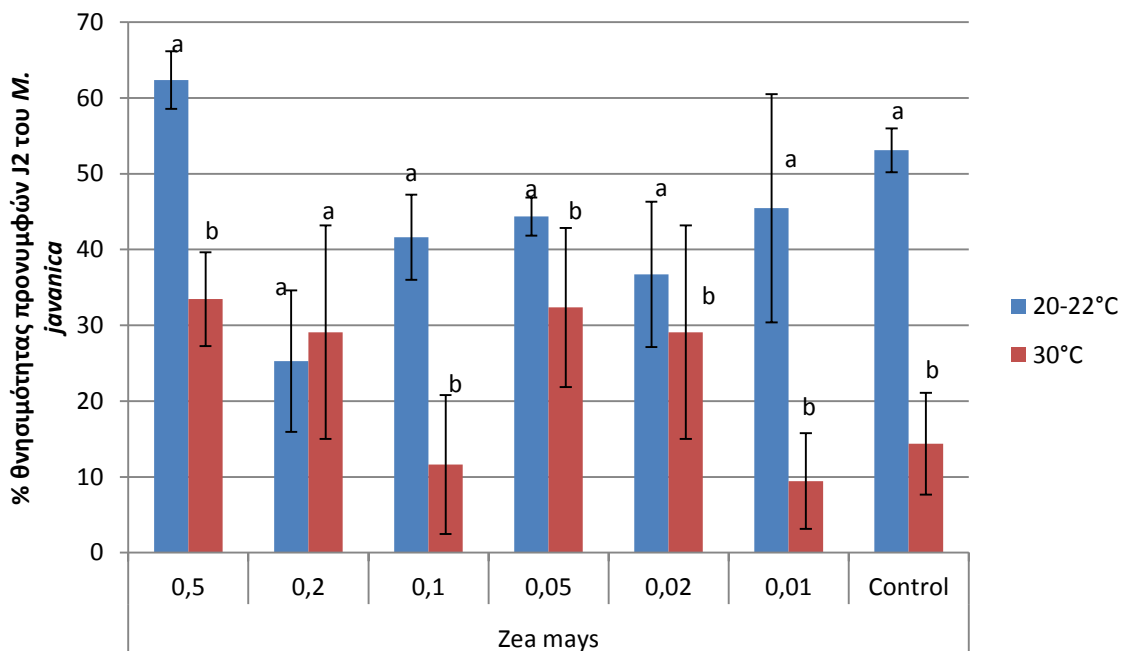
mg/ml, 10 mg/ml, 4 mg/ml, 2 mg/ml), ενώ ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αποσταγμένο νερό. Στήλες που ακολουθούνται από το ίδιο κεφαλαίο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά σε σχέση με την θερμοκρασία. Στήλες που ακολουθούνται από το ίδιο μικρό γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά ανάμεσα στις διάφορες δόσεις ($P < 0.05$, ANOVA, Tukey' s).



Γράφημα 22. Το ποσοστό θνησιμότητας των προνυμφών (J2) του *M. javanica* υπό την επίδραση υδατικού εκχυλίσματος του *Raphanus sativus* στο έδαφος, στους 22-25°C και 30°C. Χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις 0,5, 0,2, 0,1, 0,05, 0,02 και 0,01 v/v (100mg/ml, 40 mg/ml, 20 mg/ml, 10 mg/ml, 4 mg/ml, 2 mg/ml), ενώ ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αποσταγμένο νερό. Στήλες που ακολουθούνται από το ίδιο κεφαλαίο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά σε σχέση με την θερμοκρασία. Στήλες που ακολουθούνται από το ίδιο μικρό γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά ανάμεσα στις διάφορες δόσεις ($P < 0.05$, ANOVA, Tukey' s).



Γράφημα 23. Το ποσοστό θνησιμότητας των προνυμφών (J2) του *M. javanica* υπό την επίδραση υδατικού εκχυλίσματος του *Eruca sativa* στο έδαφος, στους 22-25 °C και 30° C. Χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις 0,5, 0,2, 0,1, 0,05, 0,02 και 0,01 ν/ν (100mg/ml, 40 mg/ml, 20 mg/ml, 10 mg/ml, 4 mg/ml, 2 mg/ml), ενώ ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αποσταγμένο νερό. Στήλες που ακολουθούνται από το ίδιο κεφαλαίο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά σε σχέση με την θερμοκρασία. Στήλες που ακολουθούνται από το ίδιο μικρό γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά ανάμεσα στις διάφορες δόσεις (P<0.05, ANOVA, Tukey' s).

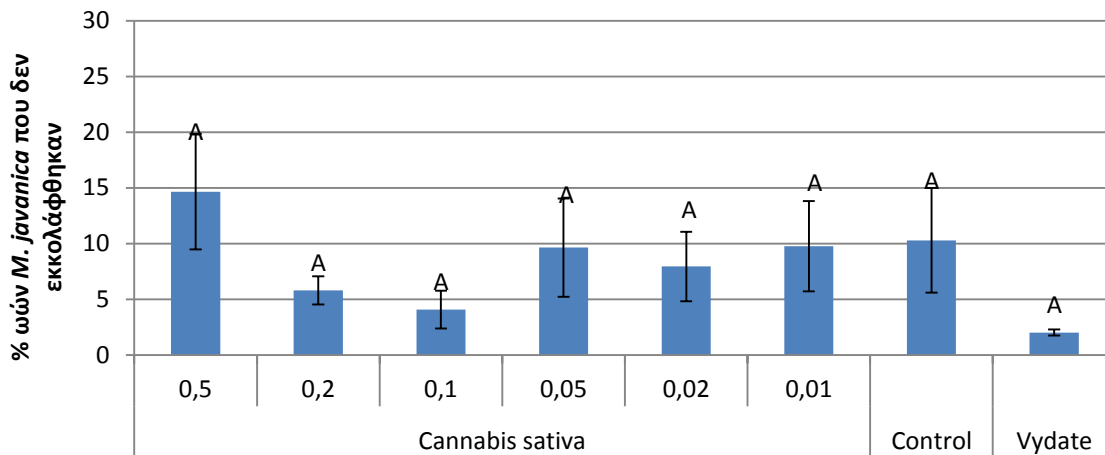


Γράφημα 24. Το ποσοστό θνησιμότητας των προνυμφών (J2) του *M. javanica* υπό την επίδραση υδατικού εκχυλίσματος του *Zea mays* στο έδαφος, στους 22-25 °C και 30°C. Χρησιμοποιήθηκαν οι

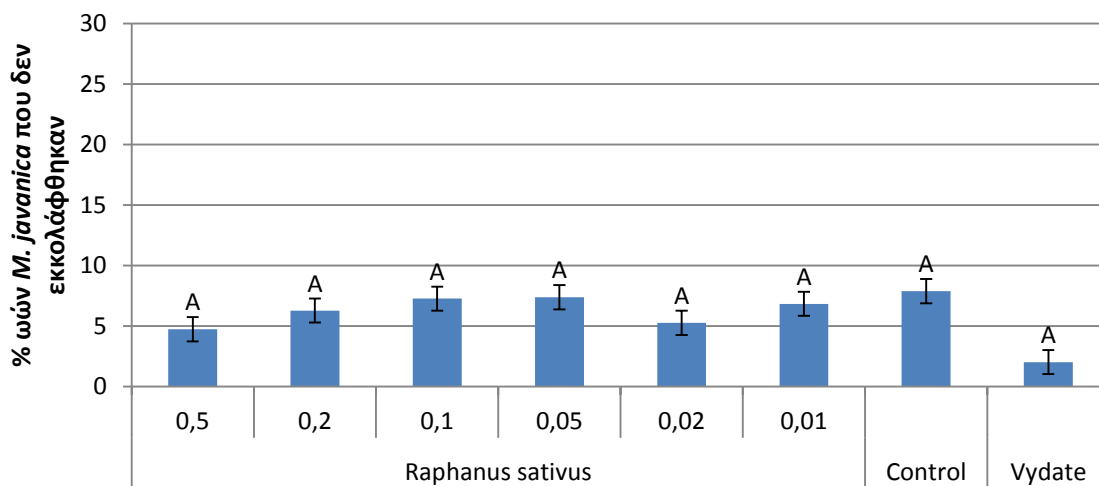
συγκεντρώσεις 0,5, 0,2, 0,1, 0,05, 0,02 και 0,01 v/v (100mg/ml, 40 mg/ml, 20 mg/ml, 10 mg/ml, 4 mg/ml, 2 mg/ml), ενώ ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αποσταγμένο νερό. Στήλες που ακολουθούνται από το ίδιο κεφαλαίο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά σε σχέση με την θερμοκρασία. Στήλες που ακολουθούνται από το ίδιο μικρό γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά ανάμεσα στις διάφορες δόσεις ($P < 0.05$, ANOVA, Tukey' s).

5.6 Επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων στην εκκόλαψη των ωών από τους ωόσακους του *M. javanica*.

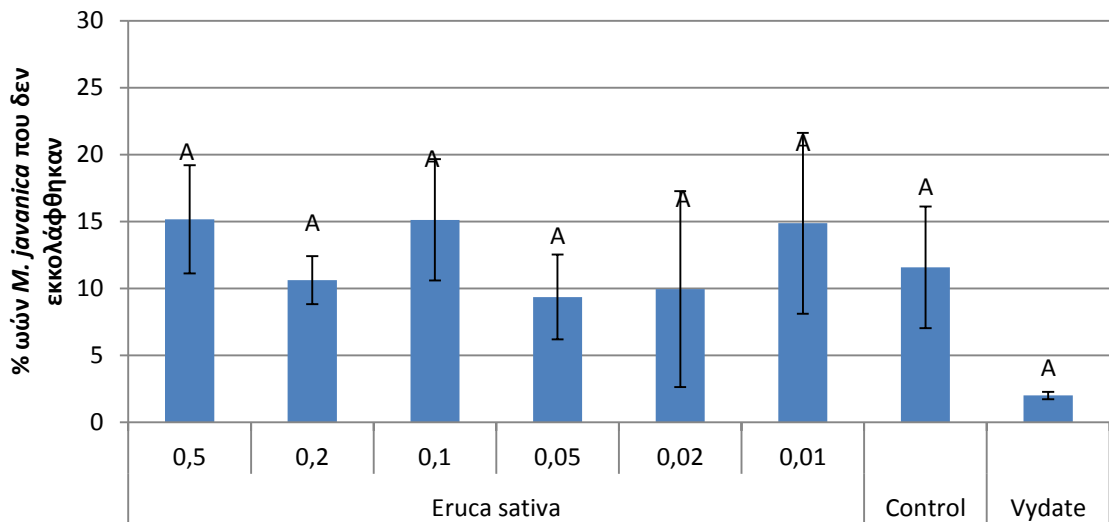
Η επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων στην επώαση των ωών *M. javanica* μελετήθηκε με την εμβάπτιση των ωοσάκων στα διαλύματα και τις ανάλογες συγκεντρώσεις 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01 v/v (100mg/ml, 40 mg/ml, 20 mg/ml, 10 mg/ml, 4 mg/ml, 2 mg/ml). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν υπό την επίδραση των φυτικών εκχυλισμάτων, του μάρτυρα (H_2O) και χημικού παράγοντα (Vydate®) απεικονίζονται στα Γραφήματα (25, 26, 27, 28). Στα τρία πρώτα εκχυλίσματα (Γραφήματα 25, 26, 27) ενώ προκύπτει μικρή νηματωδοκτόνος δράση στις προς εξέταση συγκεντρώσεις, τα ποσοστά των ωών που δεν εκκολάφθηκαν δεν διαφέρουν σημαντικά με τον μάρτυρα (αποσταγμένο νερό) αλλά και με τον χημικό παράγοντα (Vydate®). ($F_{7,64}=1.1101$, $P=0.3695$), ($F_{7,71}=0.9906$, $P=0.4462$), ($F_{7,70}=1.4896$, $P=0.1873$). Η επίδραση του αραβοσίτου (Γράφημα 28) στην παρεμπόδιση εκκόλαψης των ωών κυμαίνεται σε μικρό ποσοστό, το οποίο δεν διαφέρει σημαντικά με τον μάρτυρα και τον χημικό παράγοντα ($F_{7,72}= 0.5415$, $P=0,7999$).



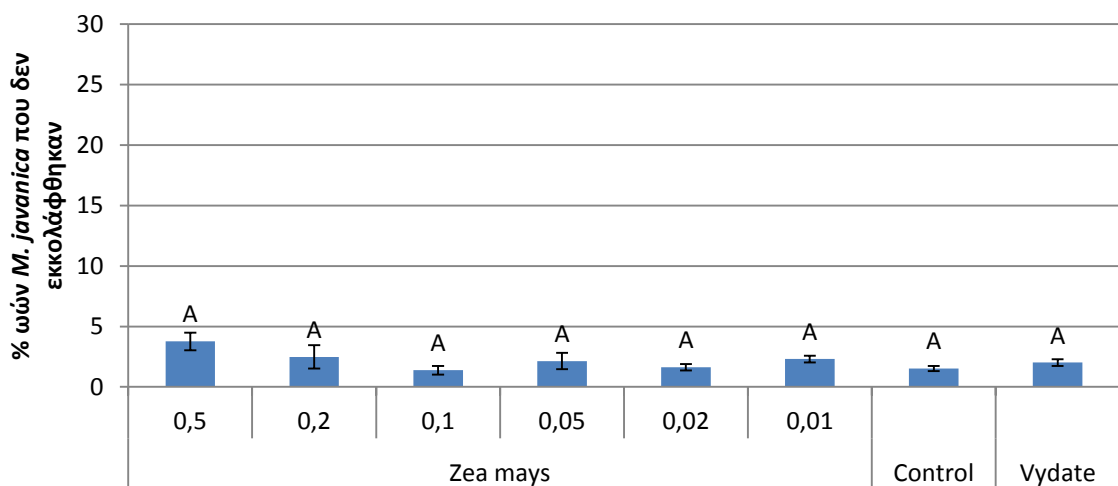
Γράφημα 25. Το ποσοστό ωών του *M. javanica* που δεν εκκολάφθηκαν υπό την επίδραση υδατικού εκχυλίσματος του *Cannabis sativa*. Χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02 και 0.01 v/v (100mg/ml, 40 mg/ml, 20 mg/ml, 10 mg/ml, 4 mg/ml, 2 mg/ml), ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αποσταγμένο νερό και ως χημικός μάρτυρας το Vydate. Στήλες που ακολουθούνται από το ίδιο κεφαλαίο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά ανάμεσα στις διάφορες δόσεις και σε σχέση με τον μάρτυρα ($P < 0.05$, ANOVA, Tukey's).



Γράφημα 26. Το ποσοστό ωών του *M. javanica* που δεν εκκολάφθηκαν υπό την επίδραση υδατικού εκχυλίσματος του *Raphanus sativus*. Χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02 και 0.01 v/v (100mg/ml, 40 mg/ml, 20 mg/ml, 10 mg/ml, 4 mg/ml, 2 mg/ml), ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε απεσταγμένο νερό και ως χημικός μάρτυρας το Vydate. Στήλες που ακολουθούνται από το ίδιο κεφαλαίο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά ανάμεσα στις διάφορες δόσεις και σε σχέση με τον μάρτυρα ($P < 0.05$, ANOVA, Tukey's).



Γράφημα 27. Το ποσοστό ωών του *M. javanica* που δεν εκκολάφθηκαν υπό την επίδραση υδατικού εκχυλίσματος του *Eruca sativa*. Χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις 0,5, 0,2, 0,1, 0,05, 0,02 και 0,01 v/v (100mg/ml, 40 mg/ml, 20 mg/ml, 10 mg/ml, 4 mg/ml, 2 mg/ml), ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αποσταγμένο νερό και ως χημικός μάρτυρας το Vydate. Στήλες που ακολουθούνται από το ίδιο κεφαλαίο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά ανάμεσα στις διάφορες δόσεις και σε σχέση με τον μάρτυρα ($P < 0.05$, ANOVA, Tukey's).



Γράφημα 28. Το ποσοστό ωών του *M. javanica* που δεν εκκολάφθηκαν υπό την επίδραση υδατικού εκχυλίσματος του *Zea mays*. Χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις 0,5, 0,2, 0,1, 0,05, 0,02 και 0,01 v/v (100mg/ml, 40 mg/ml, 20 mg/ml, 10 mg/ml, 4 mg/ml, 2 mg/ml), ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε αποσταγμένο νερό και ως χημικός μάρτυρας το Vydate. Στήλες που ακολουθούνται από το ίδιο κεφαλαίο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά ανάμεσα στις διάφορες δόσεις και σε σχέση με τον μάρτυρα ($P < 0.05$, ANOVA, Tukey's).

6. Συζήτηση

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η ενδεχόμενη νηματωδοκτόνος δράση ουσιών που προέρχονται από φυτικά είδη. Πολλά από τα φυτικά είδη που καλλιεργούνται για τις διατροφικές μας ανάγκες αποτελούν παράλληλα όπλο διαχείρισης και αντιμετώπισης των νηματωδών. Συγκεκριμένα, διερευνήθηκε η δράση των εκχυλισμάτων από τους σπόρους τεσσάρων φυτικών ειδών: *Cannabis sativa* (κανναβούρι), *Raphanus sativus* (ραφανίδα), *Eruca sativa* (ρόκα), *Zea mays* (αραβόσιτος). Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα βιοδοκιμών ώστε να μελετηθεί η επίδρασή τους στην κινητικότητα των προνυμφών (J2) *M. javanica*, στην εκκόλαψη των ωών, στη θνησιμότητά των προνυμφών εντός του εδάφους και στην διαφοροποίηση των ωών σε προνύμφες (J2). Για τις βιοδοκιμές χρησιμοποιήθηκαν υδατικά εκχυλίσματα από σπόρους τεσσάρων φυτικών ειδών: *Cannabis sativa* (κανναβούρι), *Raphanus sativus* (ραφανίδα), *Eruca sativa* (ρόκα) και *Zea mays* (αραβόσιτος). Σχετικές μελέτες για τη δράση των σπόρων του *Cannabis sativa*, στην θνησιμότητα των προνυμφών (J2) και στην παρεμπόδιση της εκκόλαψης των ωών των *M. incognita* και *M. javanica* έχει αναφερθεί απ τον (Khurma 1997). Επίσης υπάρχουν αναφορές σχετικά με την επίδραση του *Cannabis sativa* στους πόσακους του *M. incognita*, χρησιμοποιώντας τα φύλλα του στο έδαφος (Kayani et al. 2012). Στην παρούσα μελέτη γίνεται για πρώτη φορά προσπάθεια να διερευνηθεί η χρήση των μεθανολικών εκχυλισμάτων, μόνα τους ή με την παρουσία γαλακτικού οξέος και να καταγραφεί η επίδραση τους στην θνησιμότητα των προνυμφών. Πρόσφατα έχει δημοσιευτεί η χημική σύσταση του νωπού φυλλώματος και η νηματωδοκτόνος δράση του (Aissani et al., 2015). Εφαρμογές του *Raphanus sativus* (ραφανίδα) και του *Eruca sativa* (ρόκα) έχουν πραγματοποιηθεί σε κυστογόνους νηματώδεις (*Globodera pallida*) της πατάτας (Ngala et al., 2014). Η αναζήτηση νέων εναλλακτικών ουσιών φυσικής προέλευσης, για την αντιμετώπιση των νηματωδών δικαιολογεί την αυξανόμενη έρευνα και μελέτη πολλών φυτικών ειδών.

7.1 Επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων στην κινητικότητα και παράλυση των προνυμφών (J2) του κομβονηματώδη *M. javanica*

Όσον αφορά την πρόκληση παράλυσης των J2 έπειτα από εμφάνισή τους στα διαλύματα των υδατικών εκχυλισμάτων παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση της αύξησης της συγκέντρωσης με την αύξηση της παράλυσης. Η παράλυση των προνυμφών ήταν μη αναστρέψιμη μετά από 96 ώρες στις δύο υψηλότερες συγκεντρώσεις 100mg/ml και 40 mg/ml για όλα τα εκχυλίσματα σε ποσοστό 100%. Η παράλυση των προνυμφών με την επίδραση του *Cannabis sativa* και του *Eruca sativa* ήταν μη αναστρέψιμη και η δράση τους ήταν τοξική μέχρι την δόση 10 mg/ml σε ποσοστό 100%. Στη δόση 0,02 v/v η δράση του *Cannabis sativa* ήταν μειωμένη σε ποσοστό 30%, ενώ του *Eruca sativa* σε ποσοστό 80%. Σε αντίστοιχο πείραμα (Khumra 1997) παρατηρήθηκε σημαντική δράση, του υδατικού εκχυλίσματος των σπόρων του *Cannabis sativa*, σε προνύμφες του *M. javanica* και *M. incognita* στις συγκεντρώσεις 0,1 v/v, 0,05 v/v, 0,025 v/v. Στην βιβλιογραφία γίνεται αναφορά για το τεράστιο πλήθος ενώσεων που περιέχει η κάνναβη, όπως αλκοόλες, αλδεΐδες, λιπαρά οξέα, τερπενοειδή και φαινόλες (Oka 2001). Τα κανναβινοειδή όπως η κανναβινόλη, η κανναβιδιόλη, η D-9 τετραυδροκανναβινόλη, το τετραυδροκανναβινολικό οξύ (McPartland, 1997) είναι συστατικά τα οποία έχουν ανιχνευθεί. Ωστόσο η δράση των κανναβινοειδών κατά των νηματωδών δεν έχει προσδιοριστεί ακόμη. Επίσης σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε με καρπούς του *Eruca sativa* απεδείχθη πως έχει σημαντική νηματωδοκτόνο δράση προκαλώντας παράλυση σε σημαντικό ποσοστό (Banna et al., 2003). Τα υπόλοιπα δύο εκχυλίσματα (*Raphanus sativus*, *Zea mays*) εμφανίζουν σημαντική νηματωδοκτόνο δράση σε ποσοστό 50 έως 100% για τις συγκεντρώσεις 0,5 v/v, 0,2 v/v, 0,1 v/v ενώ οι υπόλοιπες δόσεις δεν παρουσιάζουν αξιοσημείωτη δράση. Στη μεταχείριση που περιείχε μόνο νερό (μάρτυρας) παρατηρήθηκε πως το 90% των προνυμφών παρέμειναν ζωντανές σε όλες τις προς εξέταση συγκεντρώσεις ακόμη και μετά την παρέλευση των 96 ωρών. Αυτό επιβεβαιώνει τη δραστηριότητα των φυτικών εκχυλισμάτων στην πρόκληση παράλυσης των προνυμφών.

Το πείραμα παράλυσης επαναλήφθηκε με την προσθήκη στο διάλυμα προνυμφών γαλακτικού οξέος σε αντίστοιχη αναλογία δόσεων με το πρώτο πείραμα

παράλυσης των προνυμφών. Όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν υψηλά ποσοστά παράλυσης μετά το πέρας των 96 ωρών σε ποσοστό 100%, στις δύο υψηλότερες συγκεντρώσεις 100 και 40 mg/ml. Τα υδατικά εκχυλίσματα *Cannabis sativa*, *Eruca sativa*, *Raphanus sativus* στις δόσεις 0,1 και 0,05 v/v προκαλούν παράλυση μικρότερη από 50% των προνυμφών μέχρι τις 24 ώρες. Μετά από 48 ώρες η δράση των εκχυλισμάτων γίνεται εντονότερη και παραλύει τις προνύμφες μέχρι τις 96 ώρες σε ποσοστό 100%. Το *Raphanus sativus* παρουσιάζει στις 24 ώρες αναστολή της παράλυσης ενώ τελικά στις 48 και 96 ώρες η δράση του εκχυλίσματος επανέρχεται και παραλύει τις προνύμφες σε ποσοστό 95%. Αυτό όμως δεν ισχύει για τη δόση 0,05 v/v καθώς μετά τις 48 ώρες οι προνύμφες επαναδραστηριοποιούνται και τελικώς το ποσοστό αγγίζει το 20%. Παρόμοια δράση παρατηρήθηκε και στο *Zea mays* καθώς στις δόσεις 0,1 και 0,05 v/v αρχικά προκλήθηκε παράλυση των προνυμφών μέχρι τις 24 ώρες σε ποσοστό 100%, ενώ μετά τις 48 ώρες παρατηρείται αναστολή της δράσης και το ποσοστό μειώνεται στο 5%. Τέλος στις δύο χαμηλότερες δόσεις τα αποτελέσματα που προέκυψαν δίνουν χαμηλά ποσοστά παράλυσης μικρότερα από 50% αποδεικνύοντας πως στις μικρές συγκεντρώσεις η επίδραση των εκχυλισμάτων στις προνύμφες των νηματωδών δεν επιδρά σημαντικά. Η παράλυση των προνυμφών ήταν επίσης αποτελεσματική στο χημικό μάρτυρα (Vydate®) σε όλες τις συγκεντρώσεις μέχρι τις 96 ώρες.

Όσον αφορά την χρησιμοποίηση των μεθανολικών εκχυλισμάτων η δράση τους στην παράλυση των προνυμφών εμφανίζει περισσότερο ξεκάθαρα αποτελέσματα σε σύγκριση με τα υδατικά εκχυλίσματα. Αρχικά στο *Cannabis sativa* καταγράφηκε το μέγιστο ποσοστό παράλυσης, μετά την εμβάπτιση των προνυμφών στις 24 ώρες, στην υψηλότερη δόση των 2000 ppm με ποσοστό 80%. Η επόμενη δόση των 1000 ppm κατέγραψε επίσης επίδραση στην παράλυση των προνυμφών σε ποσοστό που κυμάνθηκε στο 30%, μετά τις 24 ώρες. Οι υπόλοιπες δόσεις δεν παρουσίασαν δράση και καταγράφηκαν αποτελέσματα παρόμοια με τον μάρτυρα. Από τα τέσσερα εκχυλίσματα το *Eruca sativa* κατάφερε να προκαλέσει παράλυση στο 100% του πληθυσμού των νηματωδών. Η δράση του εκχυλίσματος επέδρασε μετά τις 12 ώρες με ανοδική πορεία στις δύο υψηλότερες συγκεντρώσεις (2000 και 1000 ppm) με ποσοστό 80 και 45% αντίστοιχα. Η επίδραση του εκχυλίσματος μετά τις 48 ώρες και μέχρι τις 96 ώρες ανήλθε σε ποσοστό >95%. Σημαντική επίδραση κατέγραψε το εκχύλισμα και στην δόση των 500 ppm το οποίο παράλυσε τους νηματώδεις σε ποσοστό >50% μετά τις 48 ώρες. Ακολούθως η δράση του *Zea*

mays παρέλυσε τις προνύμφες σε ποσοστό 80 έως 100% από τις 48 μέχρι τις 96 ώρες στην δόση των 2000 ppm. Η παράλυση επετεύχθη και στη δόση των 1000 ppm όπου το ποσοστό άγγιξε το 100% στις 96 ώρες. Στον αντίποδα με τα προαναφερθέντα εκχυλίσματα, το *Raphanus sativus* παρέλυσε τις προνύμφες σε ποσοστό 40% μετά τις 96 ώρες. Σε αντίστοιχο πείραμα με μεθανολικά εκχυλίσματα καταγράφηκε παράλυση των προνυμφών *M. incognita* σε ποσοστό 100% μετά από 24 ώρες (Akyazi 2014).

6.2 Επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων στη διαφοροποίηση των ωών και την εκκόλαψη των προνυμφών

Ο μέγιστος αριθμός παρεμπόδισης εκκόλαψης των ωών καταγράφηκε κυρίως στα εκχυλίσματα *Eruca sativa* και *Raphanus sativus* με επικρατέστερη τη δόση των 0,2 v/v (ανώτερη δόση). Η βιολογική δράση των εκχυλισμάτων, όπως καταγράφηκε στα αποτελέσματα, προκαλεί παρεμπόδιση εκκόλαψης των προνυμφών 7 ημέρες μετά την εμβάπτιση των ωών εντός των εκχυλισμάτων. Οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις 0,05 και 0,02 v/v δεν προκαλούν παρεμπόδιση διαφοροποίησης και εκκόλαψης. Τα υδατικά εκχυλίσματα *Cannabis sativa* και *Zea mays* που δοκιμάστηκαν απέδειξαν πως δεν συμβάλλουν δραστικά στην παρεμπόδιση εκκόλαψης των προνυμφών. Η μικρή δραστηριότητά τους περιορίζεται προσωρινά στη μέτρηση των 7 ημερών.

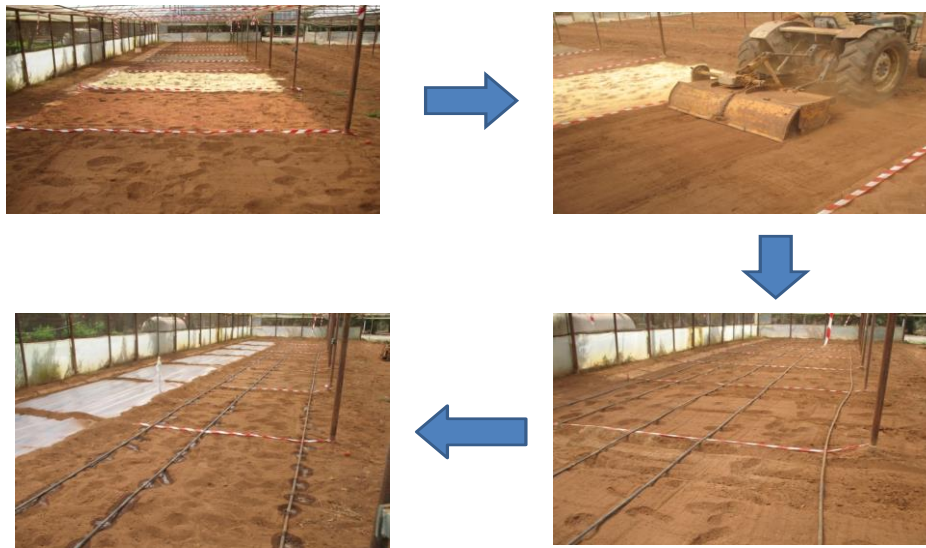
6.3 Επίδραση των εκχυλισμάτων στην θνησιμότητα των προνυμφών εντός του εδάφους σε δύο επίπεδα θερμοκρασίας

Η εφαρμογή των υδατικών εκχυλισμάτων στο έδαφος και στην θνησιμότητα των προνυμφών σε δύο επίπεδα θερμοκρασίας (20-22°C και 30°C) έδειξαν σημαντική νηματωδοκτόνο δράση. Όσον αφορά το πρώτο εκχύλισμα *Cannabis sativa* προκλήθηκε θνησιμότητα των προνυμφών στην υψηλότερη συγκέντρωση 0,5 v/v σε ποσοστό >70%, σε θερμοκρασία εδάφους 30°C. Η συγκέντρωση αυτή έδειξε υψηλότερη νηματωδοκτόνο δράση σε συνδυασμό με τη θερμοκρασία. Οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις δεν παρουσίασαν ιδιαίτερη νηματωδοκτόνο δράση

καθώς τα ποσοστά θνησιμότητας ήταν < 25% και σε σύγκριση με τον μάρτυρα δεν διέφεραν σημαντικά. Αντίθετα στη θερμοκρασία των 20-22°C οι τέσσερις πρώτες συγκεντρώσεις δεν παρουσίασαν νηματωδοκτόνο δράση αφού ήταν παρόμοια με τον μάρτυρα 25-30%. Όμως οι συγκεντρώσεις που ανέδειξαν δράση ήταν οι δύο μικρότερες (0,02 και 0,01 v/v). Η δόση 0,02 v/v ξεπέρασε το 50% της θνησιμότητας και η 0,01% το 30% αντίστοιχα. Το εκχύλισμα *Raphanus sativus* ερμηνεύοντας τα αποτελέσματα δεν παρουσίασε καμία δράση ενάντια των νηματωδών καθώς και στις δύο θερμοκρασίες τα ποσοστά θνησιμότητας ήταν ίδια ή μικρότερα από τον μάρτυρα. Μετά το *Cannabis sativa* το οποίο έδειξε μικρή δράση, το *Eruca sativa* αποτέλεσε έναν ισχυρό δείκτη αποτελεσματικότητας των υδατικών εκχυλισμάτων. Βάσει των αποτελεσμάτων τα ποσοστά θνησιμότητας σε όλες τις συγκεντρώσεις και στα δύο επίπεδα θερμοκρασίας, ξεπέρασαν το 70% αποδεικνύοντας την δραστικότητα του και στις δύο θερμοκρασίες. Ωστόσο πιο ισχυρή δράση σε σύγκριση με τον μάρτυρα είχε το εκχύλισμα στην ανώτερη θερμοκρασία των 30°C. Τέλος το υδατικό εκχύλισμα *Zea mays* προκάλεσε θνησιμότητα >30% στις δόσεις 0,5 και 0,05 v/v στο ανώτερο επίπεδο θερμοκρασίας (30°C). Οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις 0,2 και 0,02 v/v προκάλεσαν θνησιμότητα σε ποσοστό 28% ενώ οι δόσεις 0,1 και 0,01 v/v δεν παρουσίασαν καμία αξιόλογη δράση αφού το ποσοστό τους ήταν στο ίδιο επίπεδο με τον μάρτυρα (13%).

Οι αλεσμένοι σπόροι όλων των φυτικών ειδών διασκορπίστηκαν χύδην στο έδαφος και ενσωματώθηκαν με επιφανειακή αναμόχλευση του εδάφους σε διαμορφωμένα τεμάχια. Τα τεμάχια καλύφθηκαν κατά το ήμισυ με διαφανές πλαστικό με σκοπό την αύξηση της θερμοκρασίας στο σημείο αυτό. (Παράρτημα 1). Ωστόσο λόγω αδυναμιών ελέγχου των δειγμάτων εδάφους (δειγματοληψίες) τα αποτελέσματα δεν προσφέρονται προς αξιολόγηση.

Παράρτημα 1



6.4 Επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων στην εκκόλαψη των ωών του *M. javanica*

Η επίδραση των εκχυλισμάτων στην παρεμπόδιση εκκόλαψης των ωών του *M. javanica* μελετήθηκε με εμβάπτιση των ωοσάκων σε διαλύματα σε 6 επίπεδα συγκεντρώσεων και από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε μικρή συσχέτιση μεταξύ της αύξησης της συγκέντρωσης και του χρόνου εμβάπτισης. Η νηματωδοκτόνος δράση η οποία κυμάνθηκε σε χαμηλά επίπεδα σε σχέση με τον μάρτυρα, καταγράφηκε μόνο στο *Cannabis sativa* και στο *Eruca sativa*. Σε αντίστοιχα πειράματα όπου δοκιμάστηκε το εκχύλισμα από τα φύλλα του *Cannabis sativa* παρουσιάστηκε σημαντική νηματωδοκτόνος δράση (Kayani et al. 2012). Στην παρούσα μελέτη η δράση του εκχυλίσματος *Cannabis sativa* περιορίστηκε στην υψηλότερη συγκέντρωση 0,5 v/v η οποία προκάλεσε παρεμπόδιση εκκόλαψης των ωών σε ποσοστό 15%. Σε σύγκριση όμως με τον μάρτυρα η διαφορά αυτή μειώνεται στο 5% καθώς και στον μάρτυρα υπήρξε παρεμπόδιση εκκόλαψης. Οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις 0,2 v/v, 0,1 v/v, 0,05 v/v, 0,02 v/v, 0,01 v/v δεν είχαν τοξική δράση καθώς τα ποσοστά ήταν παρόμοια με τον μάρτυρα. Αντιθέτως ο

χημικός παράγοντας στην συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε, δεν παρουσίασε παρεμποδιστική δράση. Τα ίδια επίπεδα παρεμπόδισης καταγράφηκαν μετά από 35 ημέρες και στο *Eruca sativa*. Οι συγκεντρώσεις 0,5 v/v, 0.1v/v και 0.01 v/v που δοκιμάστηκαν κατέγραψαν τα ίδια ποσοστά παρεμπόδισης (15%), τα οποία δεν διαφέρουν όμως με τον μάρτυρα όπου το ποσοστό ήταν 12%. Οι υπόλοιπες δόσεις δεν παρουσιάζουν νηματωδοκτόνο δράση καθώς οι τιμές των ποσοστών τους είναι μικρότερες από τον μάρτυρα. Τα υδατικά εκχυλίσματα *Raphanus sativus* και *Zea mays* αποδεικνύουν από τα αποτελέσματα πως δεν επέδρασαν στην παρεμπόδιση εκκόλαψης των ωών αφού ο μάρτυρας ήταν ίσος ή ξεπέρασε το ποσοστό παρεμπόδισης των αντίστοιχων συγκεντρώσεων. Αναφορές άλλων ειδών τα οποία ανήκουν στην ίδια οικογένεια με τα *Raphanus sativus* και *Eruca sativa* (Brassicaceae) έχουν δείξει ικανοποιητικά αποτελέσματα ενάντια στον νηματώδη που προσβάλλει τα ζαχαρότευτλα (*Heterodera schachtii*) (Curto 2008).

7. Συμπεράσματα

Η παρούσα μελέτη αποτέλεσε την προσπάθεια αξιολόγησης και διερεύνησης της δράσης εκχυλισμάτων των σπόρων *Cannabis sativa* (Cannabiaceae), *Eruca sativa* (Brassicaceae), *Raphanus sativus* (Brassicaceae) σε προνύμφες και ωά του *M. javanica*. Υπάρχει μεγάλος αριθμός φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων που κυκλοφορούν στην αγορά και χρησιμοποιούνται για την άμεση αντιμετώπιση των κομβονηματωδών. Εξαιτίας όμως της τοξικότητας που προκαλούν στο περιβάλλον και κατ' επέκταση στον άνθρωπο, η ανεύρεση νέων ουσιών με νηματωδοκτόνες ιδιότητες ήταν επιτακτική ανάγκη για την γεωργία. Οι μελέτες βασίστηκαν σε φυτικά είδη τα συστατικά των οποίων περιέχουν ουσίες τοξικές και παράλληλα δραστικές ενάντια των νηματωδών. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται μεγάλος αριθμός φυτικών ειδών που έχουν νηματωδοκτόνες ιδιότητες (*Zanthoxylum alatum*, *Acacia eburnea*, *Azadirachta indica*, *Melia azedarach*, *Origanum vulgare* κ.α.). Πολλά από αυτά έχουν μελετηθεί είτε χρησιμοποιώντας τα εκχυλίσματα των σπόρων, φύλλων, ριζών αλλά και αυτούσια με τη μορφή ενσωμάτωσης φυτικών μερών και υπολειμμάτων τους. Λόγω της μικρής αναφοράς των εκχυλισμάτων των σπόρων επιλέχθηκαν να μελετηθούν τα 3 φυτικά είδη και να αξιολογηθεί η επίδραση τους

ως υδατικά εκχυλίσματα σε διαφορετικά βιολογικά στάδια των νηματωδών *M. javanica*.

Αναλύοντας και αξιολογώντας τα αποτελέσματα προέκυψαν τα κάτωθι συμπεράσματα:

- ❖ Απεδείχθη πως όλα τα υπό μελέτη υδατικά εκχυλίσματα προκάλεσαν παράλυση των προνυμφών του *M. javanica*. Η παράλυση βέβαια ήταν ανάλογη της συγκέντρωσης ξεχωριστά αλλά και του χρόνου έκθεσης των προνυμφών στα εκχυλίσματα. Συγκεκριμένα το *Cannabis sativa* και το *Eruca sativa* επέδειξαν ισχυρή νηματωδοκτόνο δράση και ακολουθούν το *Raphanus sativus* και το *Zea mays*. Τα αποτελέσματα κατέγραψαν αντίστοιχη αποτελεσματικότητα και στα τρία είδη πειραμάτων (υδατικά εκχυλίσματα, υδατικά εκχυλίσματα με προσθήκη γαλακτικού οξέος, μεθανολικά εκχυλίσματα). Μεταξύ των δύο πρώτων εκχυλισμάτων το *Eruca sativa* έδειξε σημαντικότερη δράση σε σύγκριση με το *Cannabis sativa*. Τελευταίο στη σειρά αποτελεσματικότητας είναι το *Raphanus sativus*. Επομένως με φθίνουσα σειρά η δραστηριότητα των εκχυλισμάτων καταγράφηκε ως εξής: *Eruca sativa* > *Cannabis sativa* > *Raphanus sativus*.
- ❖ Στο πείραμα που μελετήθηκε η δράση των εκχυλισμάτων στην παρεμπόδιση διαφοροποίησης των ωών και εκκόλαψης των προνυμφών, μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα έδειξαν τα εκχυλίσματα της οικογένειας Brassicaceae (*Eruca sativa*, *Raphanus sativus*). Η παρεμποδιστική δράση των γλυκοσινολικών οξέων και των παραγώγων τους (ισοθειοκυανιούχα, φλαβανόλες) ήταν σημαντική ενώ μικρότερη δράση είχαν τα αλκαλοειδή-κανναβινοειδή (*Cannabis sativa*).
- ❖ Η νηματωδοκτόνος δράση των εκχυλισμάτων στο έδαφος και στην θνησιμότητα των προνυμφών (στο έδαφος), ανέδειξε το *Eruca sativa* και *Cannabis sativa* ως τα περισσότερο αποτελεσματικά. Συγκεκριμένα τα εκχυλίσματα έδρασαν σε μεγαλύτερο βαθμό αποτελεσματικότητας στο υψηλότερο επίπεδο θερμοκρασίας (30°C). Το *Eruca sativa* προκάλεσε υψηλά ποσοστά θνησιμότητας 75 έως 90% σε όλες τις συγκεντρώσεις ενώ το *Cannabis sativa* μόνο στην υψηλότερη συγκέντρωση 0,5 v/v σε ποσοστό 70%. Σημαντική ήταν εξίσου και η επίδραση των προαναφερθέντων εκχυλισμάτων στη θερμοκρασία των 20-22°C όπου τα ποσοστά ήταν 75 έως 90% και 5% αντίστοιχα. Τέλος το *Raphanus sativus* αξιολογείται

αρνητικά καθότι δεν παρουσίασε δραστηριότητα στις προνύμφες και στα δύο επίπεδα θερμοκρασίας. Το *Zea mays* ως μάρτυρας παρουσίασε μικρή δράση σε ποσοστό 15% στη ανώτερη θερμοκρασία (30°C). Το εκχύλισμα στη θερμοκρασία των 20-22°C δεν παρουσίασε καμία δράση.

- ❖ Η αξιολόγηση της δράσης των εκχυλισμάτων ενάντια στην εκκόλαψη των ωών από τους βόσκακους είχε τη μικρότερη αποτελεσματικότητα απ' όλα τα πειράματα. Όμως τα αποτελέσματα αναδεικνύουν το *Eruca sativa* και το *Cannabis sativa* ως τα εκχυλίσματα που εμφανίζουν ισχυρή νηματωδοκτόνο δράση. Τα ποσοστά παρεμπόδισης εκκόλαψης των ωών καταγράφηκαν στο 5% (σε σχέση με τον μάρτυρα) και για τα δύο εκχυλίσματα, ενώ τα άλλα δύο εκχυλίσματα δεν παρουσίασαν καμία αποτελεσματική δράση.
- ❖ Βάσει όλων των πειραμάτων και των αποτελεσμάτων τους διακρίνεται πως το εκχύλισμα της ρόκας εμφανίζει μια σταθερή αποτελεσματικότητα στην αντιμετώπιση του κομβοηματώδη *M. javanica*. Τη σειρά αποτελεσματικότητας ακολουθεί η κάνναβις με μεγάλο ποσοστό αποτελεσματικότητας τουλάχιστον στα 5 από τα 6 πειράματα. Η ραφανίδα δεν παρουσιάζει αξιόλογη δράση σε σύγκριση με τα υπόλοιπα φυτικά εκχυλίσματα. Επομένως από τα φυτικά είδη που μελετήθηκαν, η ρόκα και η κάνναβις με κατάλληλη μεταχείριση των συστατικών τους, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτικά προϊόντα ελέγχου και διαχείρισης του κομβοηματώδη *M. javanica*.

8. Βιβλιογραφία

- ✚ Agerbirk, N. Olsen, C. E. Nielsen, J. K. Seasonal variation in leaf glucosinolates and insect resistance in two types of *Barbarea vulgaris* ssp. *Arcuata* *Phytochemistry* 2001, 58, 91–100.
- ✚ Ahuja, I.; de Vos, R. C. H.; Bones, A. M.; Hall, R. D. Plant molecular stress responses face climate change *Trends Plant Sci.* 2010, 15, 664–674.
- ✚ Akyazi Faruk 2014. Effect of Some Plant Methanol Extracts on Egg Hatching and Juvenile Mortality of Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita* *American Journal of Experimental Agriculture*, 4(11): 1471-1479, 2014
- ✚ Angus J F, Gardner P A, Kirkegaard J A and Desmarchelier J M 1994 Biofumigation: Isothiocyanates released from *Brassica* roots inhibit the growth of the take-all fungus. *Plant Soil* 162,107–112.
- ✚ Banna Al Luma , Rula M. Darwish and Talal Aburjai. Effect of plant extracts and essential oils on root-knot nematode *Phytopathol. Mediterr.* (2003) 42, 123–128
- ✚ Barbosa G.M.D.C., Mendes M.L., Tavares-Filho J., Rodriguez P.B.N., Vizoni E. 2004. Effect of sewage sludge compost on *Meloidogyne javanica* on tomato. *Nematropica*, 34 (1), pp. 13-21
- ✚ Bartlet, E.; Kiddle, G.; Williams, I.; Wallsgrove, R. *Entomol. Exp. Appl.* 1999, 91, 16Rakariyatham N, Butrindr B, Niamsup H, Shank L (2005) Screening of filamentous fungi for production of myrosinase. *Braz J Microbiol* 36:242–245.3–167
- ✚ Borek V, Morra MJ, Brown PD, McCaffrey JP (1994) Allelochemicals produced during sinigrin decomposition in soil. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 42:1030–103
- ✚ Bruno M Ngala, Patrick PJ Haydock, SimonWoods and Matthew A Back 2014. Biofumigation with *Brassica juncea*, *Raphanus sativus* and *Eruca sativa* for the management of field populations of the potato cyst nematode *Globodera pallida* *Pest Management Science* 2015 71: 759–769
- ✚ Cartea, M.E., Velasco, P., Obrégon, S., Padilla, G., and A. de Haro (2008). Seasonal variation in glucosinolate content in *Brassica oleracea* crops grown in northwestern Spain. *Phytochemistry*. 69, 403-416

- ✚ Colyer P.D., Kirkpatrick T.L., Vernon P.R., Barham J.D., Bateria R.J. 1998. Reducing *Meloidogyne incognita* injury to cucumber in a tomato-cucumber double-cropping system. *Journal of Nematology*, 30 (2), pp. 226-231
- ✚ Coogan, R. C.; Wills, R. B. H.; Nguyen, V. Q. Pungency levels of white radish (*Raphanus sativus* L.) in different seasons in Australia. *Food Chem.* 2001, 72, 1-3.
- ✚ Curto G (2008) Sustainable methods for management of cyst nematodes. *Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops nematodes*. pp 221-237
- ✚ Ciancio A, Mukerji KG (eds) *Integrated management and biocontrol of vegetable and grain crops nematodes*. Springer, Berlin, pp 221-237
- ✚ De Villena, F.A., Fritz, V.A., Cohen, J.D., and V.D. Hutchison (2007). Changes in gluconasturtiin concentrations in chinese cabbage with increasing cabbage looper density. *HortSci.* 42, 1337-1340.
- ✚ Fahey, J.W., A.T. Zalcmann, and P. Talalay. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56: 5-51
- ✚ Fassuliotis G. 1979. Plant breeding for root-knot nematode resistance. In: Lamberti, F. and Taylor, C.E. (eds) *Root-knot Nematodes (Meloidogyne species) Systemics, Biology and Control*. Academic Press. London pp. 425-453
- ✚ Hasegawa, T. Yamada, K. Kosemura, S. Yamamura, S. Hasegawa, K. Phototropic stimulation induces the conversion of glucosinolate to phototropism-regulating substances of radish hypocotyls *Phytochemistry* 2000, 54, 275-279
- ✚ Herr, I. Buchler, M. W. Dietary constituents of broccoli and other cruciferous vegetables: Implications for prevention and therapy of cancer *Cancer Treat. Rev.* 2010, 36, 377-383
- ✚ Hildago-Diaz L. and Kerry B.R. 2008. Integration of Biological control with other methods of Management. *Integrated Management of plant pests and diseases* pp 29-49
- ✚ J.A. Kirkegaard and M. Sarwar (1998). Biofumigation potential of brassicas *Plant and Soil* 201: 71-89, 1998

- ✚ Jatala, P. 1986. Biological control of plant parasitic nematodes. Annual Reviews of phytopathology 24, pp 453-489
- ✚ Jeffery, E. H. J. Agric. Food Chem. 1999, 47, 1541– 1548.
- ✚ Khurma Uma R., Archana Singh. Nematicidal potential of seed extracts: in vitro effects of juvenile mortality end egg hatch of *M. incognita* and *M. javanica*. Nematol. Medit. 1997 25: 49-54.
- ✚ Kirkegaard J A, Gardner P A, Desmarchelier J M and Angus J F 1993 Biofumigation – using *Brassica* species to control pests and diseases in horticulture and agriculture. In 9th Australian Research Assembly on Brassicas Eds. N Wratten and R J Mailer. pp 77–82. Agricultural Research Institute, Wagga
- ✚ Kliebenstein, D. J., Kroyman, J., and T. Mitchell-Olds (2005). The glucosinolate myrosinase system in an ecological and evolutionary context. Curr. Opin Plant Biol. 8, 264-271.
- ✚ Kushad, M. M.; Brown, A. F.; Kurilich, A. C.; Juvik, J. A.; Klein, B. P.; Wallig, M. variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica oleracea* J Agric Food Chemistry 1999 Apr.47(4):1541-8.
- ✚ L. Hildago-Diaz and B. R. Kerry. Integration of biological control with other methods of nematode management.
- ✚ Luc M., R. A. Sikora, J Bridge, 2005. (eds) Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture, CTA HH GABI Publishing. pp.323-332
- ✚ Luca Lazzeri , Giovanna Curto , Onofrio Leoni , and Elisabetta Dallavalle (2004). Effects of Glucosinolates and Their Enzymatic Hydrolysis Products via Myrosinase on the Root-knot Nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White) Chitw. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52 (22), pp 6703–6707
- ✚ Martinez-Sanchez, A. Gil-Izquierdo, A.; Gil, M. I.; Ferreres, F. A comparative study of flavonoid compounds, vitamin C, and antioxidant properties of baby leaf Brassicaceae species. J. Agric. Food Chem. 2008, 56, 2330–2340.
- ✚ McPartland, J.M., 1997. *Cannabis* as repellent and pesticide. J. Int. Hemp Assoc. 4, pp 87-92.
- ✚ Melakeberhan, H., Xu, A., Kravchenko, A., Mennan, S., and Riga, E. 2006. Potential use of arugula (*Eruca sativa* L.) as a trap crop for *Meloidogyne hapla*. Nematology, Volume 8, No. 5, pp. 793-799.

- ✚ Muhammad Zameer Kayani, Tariq Mukhtar , Muhammad Arshad Hussain. Evaluation of nematicidal effects of *Cannabis sativa* L. and *Zanthoxylum alatum* Roxb. against root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*. *Crop Protection* (2012) 52-56
- ✚ Nadhem Aissani, Pietro Paolo Urgeghe, Chrisostomos Oplos, Marco Saba, Graziella Tocco, Giacomo Luigi Petretto, Kodjo Eloho, Urania Menkissoglu-Spiroudi, Nikoletta Ntalli, and Pierluigi Cabon (2015). Nematicidal Activity of the Volatilome of *Eruca sativa* on *Meloidogyne incognita*. *Journal of agricultural and food chemistry* 2015
- ✚ Natalia Bellostas, Piotr Kachlicki, Jens C. Sørensen, Hilmer Sørensen (2007). Glucosinolate profiling of seeds and sprouts of *B. oleracea* varieties used for food.
- ✚ Oka Y., Shapina N., Fine P. 2007. Control of root-knot nematodes in organic farming systems by organic amendments and soil solarization *Crop protection*, 26 (10), pp. 1556-1565
- ✚ Oka Y., 2001. Nematicidal activity of essential oil components against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Nematology* 3, 159e164
- ✚ Podsedek, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables *LWT-Food Sci. Technol.* 2007, 40, 1–11.
- ✚ Rangkadilok N, Nicolas ME, Bennett RN, Eagling DR, Premier RR, Taylor PW (2004) The effect of sulfur fertilizer on glucoraphanin levels in broccoli (*B. oleracea* L. var. *italica*) at different growth stages.
- ✚ Rosa, E.; Heaney, R. Seasonal variation in protein, mineral and glucosinolate composition of Portuguese Anim. *Feed Sci. Technol.* 1996, 57, 111– 127.
- ✚ Sakorn P, Rakariyatham N, Niamsup H, Nongkunsarn P (2002) Rapid detection of myrosinase-producing fungi: a plate method based on opaque barium sulphate formation. *World J Microbiol Biotechnol* 18:73–74.
- ✚ Sasser N. J. and Taylor L. A. (1987). *Biology, Identification and Control of Root-Knot Nematodes*. Department of Plant Pathology, North Carolina State University U.S.A.
- ✚ Shurtleff, M.C. Averre, C.W. III, 2000. *Diagnosing plant diseases caused by Nematodes*. Publisher: The American Phytopathological, Minnesota
- ✚ Siddiqui Z. A., Akhtar M.S. 2009. Effects of antagonistic fungi and plant growth-promoting rhizobacteria on growth of tomato and reproduction of the root-knot

- nematode *Meloidogyne incognita*. Australian Plant Pathology, 38 (1), pp. 22-28.
- ✚ Sikora R. A., 1992. Management of the Antagonistic Potential in Agricultural Ecosystems for the Biological Control of Plant Parasitic Nematodes. Annual Review of phytopathology. Vol. 30, pp. 245-270
 - ✚ Smith G. S., 1987. Interactions of nematodes with mycorrhizal fungi. Society of Nematologists. Pp 292-300.
 - ✚ Stirling, G. R., 1991. Biological control of plant parasitic nematodes. Wallingford. C. A. B International pp 263
 - ✚ Tzortzakakis A. Emmanouel and Petsas E. Serafim (2003). Investigation of alternatives to methyl bromide for management of *Meloidogyne javanica* on greenhouse grown tomato. Pest Management Science vol 59 pp 1311-1320
 - ✚ Velasco, P., Cartea, M.E., Gonzalez, C., Vilar, M., and A. Ordas (2007). Factors affecting the glucosinolate content of kale (*Brassica oleracea acephala* group). J. Agric. Food Chem. 55, 955-962
 - ✚ Whittaker, R. H.; Feeny, P. P. Allelochemicals: chemical interactions between species. Science 1971, 171, 757-770.
 - ✚ Wim M.L. WESEMAEL, Nicole VIAENE and Maurice MOENS 2001. Life cycle and damage of the root-knot nematode *Meloidogyne minor* on potato *Solanum tuberosum* Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Europe pp 185-192
 - ✚ Winde, I., and U. Wittstock (2011). Insect herbivore counteradaptions to the plant glucosinolate-myrosinase system. Phytochemistry. 72, 1566-1575.
 - ✚ Wink M (2010). Biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites. In Biochemistry of Plant Secondary Metabolism (second edition), ed. M. Wink, pp. 1-17.
 - ✚ Wright J. Denis 1981 Nematicides: Mode of action and new approaches to chemical control. Plant parasitic nematodes III pp 421-445
 - ✚ Γιαννακού Ιωάννης και Προφήτου-Αθανασιάδου Δήμητρα, 2001. Νηματωδολογία. Πανεπιστημιακές σημειώσεις.
 - ✚ Καραμπουρνιώτης, Γ. Α., 2003. Φυσιολογία καταπονήσεων των φυτών. Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα.