

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

## ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Διερεύνηση της αναλογίας ειδών κομβονηματωδών (*Meloidogyne*) σε θερμοκήπια της ευρύτερης περιοχής της Κυπαρισσίας με τη χρήση μοριακών μεθόδων και μελέτη της παθογένειάς τους σε ανθεκτικά υβρίδια τομάτας και της ανθεκτικότητάς τους σε νηματωδοκτόνα»



**Επιβλέπων Καθηγητής**

Ιωάννης Γιαννακού

Ιωάννης Γ. Μπιρμπίλης

Αθήνα 2017

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ &  
ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ & ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

## **ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**«Διερεύνηση της αναλογίας ειδών κομβοηματοδών  
(*Meloidogyne*) σε θερμοκήπια της ευρύτερης περιοχής της  
Κυπαρισσίας με τη χρήση μοριακών μεθόδων και μελέτη της  
παθογένειάς τους σε ανθεκτικά υβρίδια τομάτας και της  
ανθεκτικότητάς τους σε νηματοδοκτόνα»**

**Μπιρμπίλης Γ. Ιωάννης**

Επιβλέπων Καθηγητής

**Ιωάννης Γιαννακού**

Αθήνα 2017

# ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«Διερεύνηση της αναλογίας ειδών κομβοηματοδών  
(*Meloidogyne*) σε θερμοκήπια της ευρύτερης περιοχής της  
Κυπαρισσίας με τη χρήση μοριακών μεθόδων και μελέτη της  
παθογένειάς τους σε ανθεκτικά υβρίδια τομάτας και της  
ανθεκτικότητάς τους σε νηματοδοκτόνα»**

**Μπιρμπίλης Γ. Ιωάννης**

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:**

---

**Επιβλέπων:** Ιωάννης Γιαννακού, Αναπληρωτής Καθηγητής

---

**1<sup>ο</sup> Μέλος:** Εμμανουήλ Τζωρτζακάκης, Τακτικός Ερευνητής ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ.

---

**2<sup>ο</sup> Μέλος:** Σωτήριος Τζάμος, Επίκουρος Καθηγητής

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν με τον δικό τους τρόπο στη διεξαγωγή της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης.

Καταρχάς, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στον επιβλέποντα Καθηγητή μου και Αναπληρωτή Καθηγητή του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Ιωάννη Γιαννακού, για τη σημαντική καθοδήγηση και υποστήριξη του καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Τακτικό Ερευνητή ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ κ. Εμμανουήλ Τζωρτζακάκη για τον χρόνο που αφιέρωσε στη εξέταση της εργασίας μου και τις πολύτιμες συμβουλές του κατά την εκπόνηση και συγγραφή της παρούσας μελέτης. Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Σωτήριο Τζάμο για την καθοδήγηση που μου προσέφερε στον τομέα των μοριακών αναλύσεων.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Διευθυντή της Διεύθυνσης Αγροτικής Οικονομίας και Κτηνιατρικής Τριφυλίας κ. Αντώνιο Παρασκευόπουλο για τη βοήθεια του κατά τη διαδικασία των δειγματοληψιών στην περιοχή της Κυπαρισσίας.

Ευχαριστώ θερμά τον MSc κ. Στέφανο Καμάρα και την υποψήφια διδάκτορα ΓΠΑ κ. Δανάη Γκίζη για την πολύτιμη βοήθεια τους κατά την εκπόνηση της παρούσας μελέτης. Ευχαριστώ επίσης την μεταπτυχιακή φοιτήτρια ΓΠΑ κ. Ηρώ Παρδαβέλλα και τους συναδέλφους κ. Μάρκο Καρρά και κ. Έλλη Σταυροπούλου για τη προθυμία τους να με βοηθήσουν όποτε χρειαζόταν.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Εντομολογική Εταιρεία Ελλάδος για την χορήγηση υποτροφίας για την παρούσα μελέτη.

Θα ήθελα να απευθύνω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα ΓΠΑ και αγαπημένη φίλη κ. Ελένη Νάσιου για την ουσιαστική βοήθεια και τη συνεχή ενθάρρυνσή της.

Τέλος, ευχαριστώ βαθύτατα την οικογένεια μου και την υποψήφια διδάκτορα ΓΠΑ Νικολίνα Χειμώνα για τη συνεχή στήριξη τους σε όποιον δρόμο διαλέγω στη ζωή μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες εδάφους από υπό κάλυψη καλλιέργειες στην ευρύτερη περιοχή της Κυπαρισσίας. Από τα δείγματα που συλλέχθηκαν έγινε εξαγωγή προνυμφών κομβονηματωδών και εκτιμήθηκαν τα επίπεδα της πυκνότητάς τους στο έδαφος.

Αναπτύχθηκε μοριακή μέθοδος ταυτοποίησης για το είδος κάθε πληθυσμού. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα τρία ζεύγη εξειδικευμένων εκκινητών Fjav/Rjav, Far/Rar και Mi2F4/Mi1R1 σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την ανίχνευση των ειδών *Meloidogyne javanica*, *M. arenaria* και *M. incognita* αντίστοιχα.

Μέσω τεχνητής μόλυνσης σε ευαίσθητο και ανθεκτικό υβρίδιο τομάτας αξιολογήθηκε η παθογένεια 21 πληθυσμών για το γόνο *Mi*, ο οποίος προσδίδει ανθεκτικότητα σε φυτά τομάτας για τα τρία τροπικά είδη *M. javanica*, *M. incognita* και *M. arenaria*. Για κάθε υβρίδιο μολύνθηκαν 4 φυτά και μετά από χρονικό διάστημα επτά εβδομάδων μετρήθηκαν οι ωόσακκοι στις ρίζες των φυτών. Επιπλέον, με τεχνητή μόλυνση σε φυτά πιπεριάς εκτιμήθηκε η ικανότητα των πληθυσμών να αναπαράγονται σε αυτήν.

Μέσω βιοδοκιμών σε πλάκες των 24 πηγαδιών ελέγχθηκε η ευαισθησία 13 πληθυσμών στις δραστικές ουσίες oxamyl και fosthiazate με στόχο τη λήψη ένδειξης για ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε μη καπνιστικά νηματωδοκτόνα. Μετά από έκθεση 24h προνυμφών δευτέρου σταδίου σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις κάθε δραστικής, μετρήθηκαν οι κινητές και οι παράλυτες προνύμφες και υπολογίστηκε το ποσοστό παράλυσης.

Από τα 45 δείγματα εδάφους, που συλλέχθηκαν, ανιχνεύθηκαν προνύμφες κομβονηματωδών σε 44. Σε 38 από τα 44 παρατηρήθηκε υψηλή πυκνότητα προνυμφών δευτέρου σταδίου, γεγονός που επισημαίνει το πρόβλημα των κομβονηματωδών στην περιοχή. Συνολικά 32 πληθυσμοί διατηρήθηκαν στο εργαστήριο. Το είδος *M. javanica* ανιχνεύθηκε σε 29 και το *M. incognita* σε 4 από αυτούς.

Ο έλεγχος παθογένειας 21 πληθυσμών σε ανθεκτικό υβρίδιο τομάτας είχε ως αποτέλεσμα την εύρεση 15 παθότυπων πληθυσμών. Οι πληθυσμοί αυτοί παρατηρούνται σε ποσοστό 47% των 32 πληθυσμών που διατηρήθηκαν και σε ποσοστό 34% των 44 δειγμάτων εδάφους, όπου ανιχνεύθηκαν κομβονηματώδεις. Στις ρίζες φυτών πιπεριάς, ωόσακκοι παρατηρήθηκαν μόνο για τους πληθυσμούς, οι οποίοι ταυτοποιήθηκαν ως *M. incognita*.

Από τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών δεν προκύπτει σαφής ένδειξη ανάπτυξης ανθεκτικότητας στις δύο δραστικές, παρά τη συχνή χρήση των αντίστοιχων σκευασμάτων στα εδάφη από τα οποία προέρχονται οι πληθυσμοί. Οι συλλεγόμενοι πληθυσμοί δεν παρουσίασαν μειωμένη ευαισθησία σε σχέση με δύο πληθυσμούς, οι οποίοι διατηρούνται σε εργαστηριακές συνθήκες για 12 και 18 χρόνια.

Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας επιδεικνύουν το πρόβλημα των κομβονηματωδών στην περιοχή της Κυπαρισσίας. Το είδος που κυριαρχεί είναι το *M. javanica*, ενώ ορισμένοι πληθυσμοί χρήζουν ιδιαίτερης μεταχείρισης λόγω της ανάπτυξης παθογένειας σε ανθεκτικά υβρίδια τομάτας. Τέλος, η αναποτελεσματικότητα των μη καπνιστικών νηματωδοκτόνων στην αντιμετώπιση των κομβονηματωδών, φαίνεται να μην οφείλεται σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας των τελευταίων στις αντίστοιχες δραστικές ουσίες.

**Λέξεις κλειδιά:** *Meloidogyne*, ανθεκτικές ποικιλίες, γόνος *Mi*, μοριακή ταυτοποίηση, νηματωδοκτόνα.

## SUMMARY

Soil samples were collected from greenhouses in the region of Kyparissia. Root-knot nematode second stage juveniles were extracted from soil and the density levels were estimated.

The collected populations were identified with molecular markers. PCR amplification with specific primer sets Fjav/Rjav, Far/Rar and Mi2F4/Mi1R1 was used for the detection of *Meloidogyne javanica*, *M. arenaria* and *M. incognita* respectively.

Second stage juveniles were used to inoculate susceptible and resistant tomato plants to evaluate the virulence of 21 populations against hybrids of tomato with resistance to *M. javanica*, *M. arenaria* and *M. incognita*, which is conferred by the *Mi* gene. Plants were maintained in a growth room for seven weeks and the number of visible egg masses on roots was assessed under a stereoscope. Furthermore the reproduction of the populations on pepper was estimated by inoculation of susceptible pepper plants with second age juveniles.

Through bioassays the susceptibility of 13 populations to oxamyl and fosthiazate was tested in 24-well plates. The objective was to obtain indication of possible resistance of the populations in non-fumigants nematicides. After 24h exposure to three concentrations of each nematicide the percentage of immotile juveniles was estimated.

Root-knot juveniles were detected in 44 of the 45 collected soil samples. In 38 of them was observed a high density of second stage juveniles in soil. This observation indicates the problem of root-knot nematodes in the area. A total of 32 populations were maintained in the laboratory. *M. javanica* was detected in 29 and *M. incognita* in 4 of them.

Virulence tests of the 21 populations revealed the existence of 15 resistant-breaking populations. These virulent populations are observed in a percentage of 47% of the 32 populations that were maintained in the laboratory and 34% of the 44 soil samples, in which had been found root-knot juveniles.

From the bioassays there is not clear indication of development of a mechanism for resistance of populations to nematicides. The susceptibility of the collected populations did not differ from that of two populations maintained in pots for 12 and 18 years.

The results of the current research demonstrate the problem of root-knot nematodes in the region of Kyparissia. The most abundant species is *M. javanica*. Some populations need

special treatment, because of the development of virulence against resistant tomato hybrids. Finally, it looks likely that there is not a possible development of nematicide-resistance. Other factors may be responsible for the ineffectiveness of non-fumigants nematicides for the control of *Meloidogyne*.

**Keywords:** *Meloidogyne*, resistant varieties, *Mi* gene, molecular identification, nematicides.



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	iv
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	v
SUMMARY .....	vii
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ .....	ix
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ.....	xi
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ .....	xii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ .....	xiv
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 ΤΟ ΓΕΝΟΣ <i>MELOIDOGYNE</i> .....	1
1.1.1 Κομβονηματώδεις .....	1
1.1.2 Ιστορία του γένους <i>Meloidogyne</i> .....	2
1.1.3 Γεωγραφική εξάπλωση , εύρος ξενιστών και οικονομική σημασία της προσβολής .....	2
1.1.4 Μέθοδοι ταυτοποίησης των κομβονηματωδών.....	4
1.1.5 Βιολογικός κύκλος .....	5
1.1.6 Συμπτωματολογία.....	9
1.2 ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΤΩΝ ΚΟΜΒΟΝΗΜΑΤΩΔΩΝ .....	12
1.2.1 Χημική αντιμετώπιση .....	14
1.2.2 Καλλιεργητικά μέτρα .....	17
1.2.3 Βιολογική αντιμετώπιση.....	22
1.2.4 Φυσικές ουσίες φυτικής προέλευσης .....	25
1.2.5 Ανθεκτικές ποικιλίες .....	25
1.2.6 Ολοκληρωμένη αντιμετώπιση κομβονηματωδών .....	27
2 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ .....	29
3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	30
3.1 Δειγματοληψία.....	30
3.2 Προσδιορισμός επιπέδων πυκνότητας πληθυσμών .....	35

3.3	Διατήρηση πληθυσμών .....	37
3.4	Έλεγχος παθογένειας πληθυσμών σε ανθεκτικό υβρίδιο τομάτας .....	38
3.4.1	Προκαταρκτικός έλεγχος της παθογένειας σε ανθεκτικό υβρίδιο τομάτας και ευαίσθητης ποικιλίας πιπεριάς .....	39
3.4.2	Αξιολόγηση της παθογένειας σε ανθεκτικό υβρίδιο τομάτας .....	41
3.5	Διερεύνηση της αναλογίας των ειδών <i>M. javanica</i> , <i>M. incognita</i> , <i>M. arenaria</i> μεταξύ των πληθυσμών με χρήση μοριακών τεχνικών .....	42
3.5.1	Προκαταρκτικές δοκιμές για μοριακή ανίχνευση των ειδών <i>M. javanica</i> , <i>M. incognita</i> , <i>M. arenaria</i> .....	42
3.5.2	Ανίχνευση των τριών τροπικών ειδών <i>M. javanica</i> , <i>M. incognita</i> , <i>M. arenaria</i> με χρήση μοριακής μεθόδου.....	43
3.6	<i>In vitro</i> αξιολόγηση της ανθεκτικότητας σε νηματωδοκτόνα .....	45
3.7	Στατιστική ανάλυση.....	48
4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	49
4.1	Προσδιορισμός επιπέδων πυκνότητας πληθυσμών .....	49
4.2	Ανίχνευση των τριών τροπικών ειδών <i>M. javanica</i> , <i>M. incognita</i> , <i>M. arenaria</i> με χρήση μοριακής μεθόδου.....	51
4.3	Προκαταρκτικός έλεγχος της παθογένειας σε ανθεκτικό υβρίδιο τομάτας και ευαίσθητης ποικιλίας πιπεριάς .....	60
4.4	Αξιολόγηση της παθογένειας σε ανθεκτικό υβρίδιο τομάτας .....	62
4.5	<i>In vitro</i> αξιολόγηση της ανθεκτικότητας σε νηματωδοκτόνα .....	64
5	ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	70
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	76

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 4.1 Μέσοι όροι αριθμού ωόσακκων στις ρίζες 2 φυτών cv. Belladonna και cv. Silvana επτά εβδομάδες μετά από μόλυνση με 400 J2s.....	60
Γράφημα 4.2 Αριθμός ωόσακκων στις ρίζες φυτών πιπεριάς επτά εβδομάδες μετά από μόλυνση με 400 J2s.....	62
Γράφημα 4.3 Μέσοι όροι των ωόσακκων που παρατηρήθηκαν επτά εβδομάδες μετά από τεχνητή μόλυνση με 400 J2s 4 φυτών cv. Belladonna και 4 φυτών cv. Silvana. Τα γράμματα a, b επισημαίνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$ . .....	63
Γράφημα 4.4 Μέσος αριθμός ωών ανά ωόσακκο σε κάθε υβρίδιο και για κάθε πληθυσμό..	64
Γράφημα 4.5 Μέσο ποσοστό παράλυσης προνυμφών στη συγκέντρωση 4 ppm oxamyl. Τα γράμματα A, B, C, D, E, F, G επισημαίνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$ .....	65
Γράφημα 4.6 Μέσο ποσοστό παράλυσης προνυμφών στη συγκέντρωση 8 ppm oxamyl. Τα γράμματα A, B, C, D, E, F, G επισημαίνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$ .....	65
Γράφημα 4.7 Μέσο ποσοστό παράλυσης προνυμφών στη συγκέντρωση 16 ppm oxamyl. Τα γράμματα A, B, C, D, E, F επισημαίνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$ .....	66
Γράφημα 4.8 Μέσο ποσοστό παράλυσης προνυμφών στη συγκέντρωση 3 ppm fosthiazate. Τα γράμματα A, B, C, D, E, F επισημαίνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$ .....	67
Γράφημα 4.9 Μέσο ποσοστό παράλυσης προνυμφών στη συγκέντρωση 6 ppm fosthiazate. Τα γράμματα A, B, C, D, E, F επισημαίνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$ .....	68
Γράφημα 4.10 Μέσο ποσοστό παράλυσης προνυμφών στη συγκέντρωση 12 ppm fosthiazate. Τα γράμματα A, B, C, D, E επισημαίνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$ . ....	68

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1 Βιολογικός κύκλος του γένους <i>Meloidogyne</i> (Agrios et al., 2004). .....	6
Εικόνα 1.2 Μέγεθος νηματωδών του γένους <i>Meloidogyne</i> κατά τα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του βιολογικού κύκλου (Perry et al., 2009).....	7
Εικόνα 1.3 Είσοδος προνυμφών δευτέρου σταδίου στη ζώνη επιμήκυνσης της ρίζας (Wang et al., 2009).....	7
Εικόνα 1.4 Νηματώδης του γένους <i>Meloidogyne</i> τρέφεται από γιγαντιαία κύτταρα (Karssen et al., 2013).....	8
Εικόνα 1.5 Διάρκεια βιολογικού κύκλου των ειδών <i>M. arenaria</i> , <i>M. hapla</i> , <i>M. incognita</i> και <i>M. javanica</i> ανάλογα με τη θερμοκρασία εδάφους (Ploeg and Maris, 1999). .....	9
Εικόνα 1.6 Κόμβοι μικρού μεγέθους με ένα έως λίγα θηλυκά εντός αυτών (Perry et al., 2009).....	10
Εικόνα 1.7 Παραμόρφωση της ρίζας σε υψηλή πυκνότητα κομβονηματωδών στο έδαφος..	11
Εικόνα 1.8 Εμφάνιση φυτών πιπεριάς με μειωμένη ανάπτυξη, λόγω προσβολής από κομβονηματώδεις, κατά κηλίδες. ....	12
Εικόνα 3.1 a) Η θέση της Κυπαρισσίας στην περιοχή της Πελοποννήσου, b) η θέση της Κυπαρισσίας στο Νομό της Μεσσηνίας.....	31
Εικόνα 3.2 a) Η περιοχή των δειγματοληψιών χωρισμένη σε 4 υποπεριοχές, b) Περιοχή Έλαια, c) Περιοχή Κυπαρισσία, d) Περιοχή Φιλιατρά, e) Περιοχή Γαργαλιάνοι .....	32
Εικόνα 3.3 Σχέδιο δειγματοληψίας εδάφους σε υπό κάλυψη καλλιέργειας κηπευτικών συνολικής έκτασης ενός στρέμματος. Οι θέσεις δειγματοληψίας επιλέγονταν επί των γραμμών φύτευσης κατά "ζικ-ζακ" κίνηση (κόκκινη γραμμή) εντός του θερμοκηπίου όπως παρουσιάζεται στην εικόνα. ....	33
Εικόνα 3.4 Ο δειγματολήπτης εδάφους που χρησιμοποιήθηκε. Η συλλογή εδάφους έγινε σε βάθος 0-40 cm και 2-4 cm απόσταση από το λαιμό του φυτού. ....	33
Εικόνα 3.5 Θάλαμος ελεγχόμενων συνθηκών, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για την αποθήκευση των δειγμάτων εδάφους. Η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 8 °C.....	34
Εικόνα 3.6 Εξαγωγή προνυμφών δευτέρου σταδίου με χρήση κοσκίνων. ....	36
Εικόνα 3.7 Τροποποιημένη μέθοδος Baermann.....	36
Εικόνα 3.8 Ανάστροφο μικροσκόπιο(Zeiss). ....	37
Εικόνα 3.9 Απομόνωση ωόσακκων με λαβίδα και τοποθέτηση τους σε δίσκο Baermann....	39
Εικόνα 3.10 Εξαγωγή προνυμφών από ωόσακκους μέσω τροποποιημένης μεθόδου Baermann.....	40

Εικόνα 3.11	Τεχνητή μόλυνση φυτών τομάτας.....	40
Εικόνα 3.12	Ανάπτυξη φυτών σε δωμάτιο ελεγχόμενων συνθηκών. ....	41
Εικόνα 3.13	Πλάκα πολυστυρενίου Cellstar® 24 πηγαδιών.....	47
Εικόνα 4.1	Ανίχνευση <i>M. javanica</i> χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους εκκινητές Fjav/Rjav (προϊόν 670 bp).....	51
Εικόνα 4.2	Ανίχνευση <i>M. javanica</i> χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους εκκινητές Fjav/Rjav (προϊόν 670 bp).....	52
Εικόνα 4.3	Ανίχνευση <i>M. javanica</i> χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους εκκινητές Fjav/Rjav (προϊόν 670 bp).....	52
Εικόνα 4.4	Ανίχνευση <i>M. javanica</i> χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους εκκινητές Fjav/Rjav (προϊόν 670 bp).....	53
Εικόνα 4.5	Ανίχνευση <i>M. javanica</i> χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους εκκινητές Fjav/Rjav (προϊόν 670 bp).....	53
Εικόνα 4.6	Ανίχνευση <i>M. incognita</i> χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους εκκινητές Mi2F4/Mi1R1 (προϊόν 300 bp). ....	54
Εικόνα 4.7	Ανίχνευση <i>M. incognita</i> χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους εκκινητές Mi2F4/Mi1R1 (προϊόν 300 bp). ....	54
Εικόνα 4.8	Ανίχνευση <i>M. incognita</i> χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους εκκινητές Mi2F4/Mi1R1 (προϊόν 300 bp). ....	55
Εικόνα 4.9	Ανίχνευση <i>M. incognita</i> χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους εκκινητές Mi2F4/Mi1R1 (προϊόν 300 bp). ....	55
Εικόνα 4.10	Ανίχνευση <i>M. incognita</i> χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους εκκινητές Mi2F4/Mi1R1 (προϊόν 300 bp). ....	56
Εικόνα 4.11	Ανίχνευση <i>M. arenaria</i> χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους εκκινητές Far/Rar (προϊόν 420 bp). ....	56
Εικόνα 4.12	Ανίχνευση <i>M. arenaria</i> χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους εκκινητές Far/Rar (προϊόν 420 bp). ....	57
Εικόνα 4.13	Ανίχνευση <i>M. arenaria</i> χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους εκκινητές Far/Rar (προϊόν 420 bp). ....	57
Εικόνα 4.14	Ανίχνευση <i>M. arenaria</i> χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους εκκινητές Far/Rar (προϊόν 420 bp). ....	58
Εικόνα 4.15	Ανίχνευση <i>M. arenaria</i> χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους εκκινητές Far/Rar (προϊόν 420 bp). ....	58

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1	Επίδραση βακτηρίων σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης νηματωδών του γένους <i>Meloidogyne</i> (Hallmann et al., 2009). .....	23
Πίνακας 3.1	Πληθυσμοί που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη παθογένειας ανθεκτικής ποικιλίας τομάτας. ....	38
Πίνακας 3.2	Ζεύγη εκκινητών PCR που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των τριών ειδών. ....	43
Πίνακας 3.3	Συνθήκες PCR για τα τρία διαφορετικά ζεύγη εκκινητών. ....	44
Πίνακας 3.4	Πληθυσμοί που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση ανάπτυξης ανθεκτικότητας σε μη καπνιστικά νηματοδοκτόνα. ....	45
Πίνακας 3.5	Συγκεντρώσεις δραστικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε βιοδοκιμή. ....	46
Πίνακας 4.1	Επίπεδα πυκνότητας κομβονηματωδών από 45 θερμοκηπιακές καλλιέργειες στην ευρύτερη περιοχή της Κυπαρισσίας. ....	49
Πίνακας 4.2	Εμφάνιση ωόσακκων σε ρίζες φυτών τομάτας cv. <i>Belladonna</i> και cv. <i>Silvana</i> , επτά εβδομάδες μετά τη μεταφύτευση τους σε δοχεία με έδαφος από τα συλλεγόμενα δείγματα. Όπου X: παρατηρήθηκαν ωόσακκοι. Όπου -: δεν παρατηρήθηκαν ωόσακκοι.....	50
Πίνακας 4.3	Αποτελέσματα μοριακής ταυτοποίησης των πληθυσμών που συλλέχθηκαν. Όπου X: το είδος ανιχνεύθηκε. Όπου -: το είδος δεν ανιχνεύθηκε. ....	59
Πίνακας 4.4	Σχέση αριθμού ωόσακκων στις ρίζες φυτών cv. <i>Silvana</i> ως προς τον αντίστοιχο αριθμό σε φυτά cv. <i>Belladonna</i> επτά εβδομάδες μετά από μόλυνση με 400 J2s.....	61

# 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 ΤΟ ΓΕΝΟΣ *MELOIDOGYNE*

### 1.1.1 Κομβοηματοώδεις

Οι κομβοηματοώδεις ανήκουν στο γένος *Meloidogyne* (Goeldi, 1887). Το όνομα του γένους προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις «μήλο» και «γυνή» και περιγράφει το σχήμα του ενήλικου θηλυκού. Αποτελείται από είδη, τα οποία είναι υποχρεωτικά παράσιτα, έχουν μεγάλο εύρος ξενιστών και προκαλούν σοβαρές οικονομικές ζημιές στις καλλιέργειες παγκοσμίως. Τα *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* και *M. hapla* θεωρούνται τα επικρατέστερα είδη. Τα τρία πρώτα συναντώνται σε μέσες ετήσιες θερμοκρασίες από 15°C έως 33°C, ενώ το τέταρτο αναπτύσσεται ευνοϊκότερα σε περιοχές με μέση ετήσια θερμοκρασία μικρότερη των 15°C. Μπορούν να αποικίσουν εδάφη, τα οποία ανήκουν σε ένα ευρύ φάσμα εδαφολογικής σύστασης, αλλά αναπτύσσουν μεγαλύτερους πληθυσμούς σε εδάφη με μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε άμμο και λιγότερο από 10% σε άργιλο επί της συνολικής περιεκτικότητας (Γιαννακού & Προφήτου-Αθανασιάδου, 2001).

Τρέφονται και πολλαπλασιάζονται στο εσωτερικό ζωντανών φυτικών ιστών του ριζικού συστήματος, όπου προκαλούν μικρού έως μεγάλου μεγέθους κόμβους. Τα υπέργεια συμπτώματα δεν είναι πάντα εμφανή και είναι παρόμοια με αυτά οποιασδήποτε προσβολής του ριζικού συστήματος των φυτών. Τα επίπεδα προσβολής των φυτών μπορεί να είναι αυξημένα, χωρίς να είναι ορατά εξωτερικά συμπτώματα στα συγκομιζόμενα προϊόντα. Καλλιέργεια φυτών, στα οποία παρατηρείται αυξημένη ανάπτυξη και αναπαραγωγή κομβοηματοωδών, μπορεί να οδηγήσει σε πολλές γενεές σε μια καλλιεργητική περίοδο και αυτό με τη σειρά του σε σοβαρές οικονομικές απώλειες. Με την προσβολή του ριζικού συστήματος μειώνεται η απορρόφηση θρεπτικών στοιχείων και νερού και παρεμποδίζεται η ανοδική μετακίνηση τους. Τα προσβεβλημένα φυτά εμφανίζουν νανισμό, απώλεια της ευρωστίας και μάρανση. Επιπρόσθετα, λόγω της αποσύνθεσης των ιστών της ρίζας, ευνοείται η δευτερογενής προσβολή από άλλα παθογόνα. Η φυσιολογία των φυτών διαταράσσεται και η απόδοση της καλλιέργειας μειώνεται, ενώ επηρεάζονται και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των προϊόντων (π.χ. πατάτες, καρότα) (Moens et al., 2009).

### 1.1.2 Ιστορία του γένους *Meloidogyne*

Όσο αφορά το γένος *Meloidogyne* Goeldi, 1887 ιστορικά διακρίνονται τρεις βασικές περίοδοι. Αρχικά (1855-1878) παρατηρήθηκε απλά μια συσχέτιση μεταξύ των κόμβων και των νηματωδών. Ακολούθησε μία μακριά περίοδος (1879-1948) γενικότερης σύγχυσης, καθώς οι κομβονηματώδεις είχαν καταταχθεί στο γένος των κυστογόνων νηματωδών *Heterodera*. Τελικά με τον (Chitwood, 1949), εντάχθηκαν για πρώτη φορά σε ξεχωριστό γένος το *Meloidogyne*, του οποίου πολλά είδη περιγράφηκαν και ταξινομήθηκαν (Karssen, 2002).

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

### 1.1.3 Γεωγραφική εξάπλωση , εύρος ξενιστών και οικονομική σημασία της προσβολής

Η θερμοκρασία, η σύσταση του εδάφους και οι περιβαλλοντικές συνθήκες καθορίζουν κατά κύριο λόγο την γεωγραφική εξάπλωση των κομβονηματωδών (Sasser and Carter, 1985). Το γένος *Meloidogyne* περιέχει περισσότερα από 90 είδη, με 23 από αυτά να έχουν αναγνωρισθεί στην Ευρώπη (Wesemael et al., 2011).



Όπως αναφέρθηκε τα είδη *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* και *M. halpa* είναι τα πλέον διαδεδομένα σε παγκόσμια κλίμακα και έχουν μεγάλο εύρος ξενιστών συμπεριλαμβανομένου πολλών κηπευτικών καλλιεργειών. Στις Μεσογειακές χώρες αντιπροσωπεύουν το κύριο παθογόνο εδάφους των θερμοκηπιακών καλλιεργειών. Άλλα είδη *Meloidogyne* που έχουν εντοπιστεί στη Μεσογειακή λεκάνη είναι το *M. artiella* που προσβάλλει καλλιέργειες ψυχάνθων και σιτηρών στη Νότια Ευρώπη, καθώς και τα *M. lusitanica*, *M. baetica* και *M. hispanica* που προσβάλλουν δενδρώδεις καλλιέργειες σε Πορτογαλία και Ισπανία. Το *M. hispanica* έχει βρεθεί και στην Ελλάδα σε καλλιέργεια ηλιάνθου (Tzortzakakis et al., 2013). Επίσης, στην Ελλάδα έχει βρεθεί το *M. ethiopica* σε καλλιέργειες καλαμποκιού και ακτινιδίου, με την αναφορά του αυτή να είναι η δεύτερη στην Ευρώπη (Conceição et al., 2012). Τέλος, το *M. chitwoodi* έχει αναφερθεί σε κάποιες μόνο περιπτώσεις σε Ευρώπη και Ν. Αφρική (Ornat and Sorribas, 2008).

Το εύρος ξενιστών των κομβονηματωδών ανέρχεται στα 5500 φυτικά είδη, μονοκοτυλήδονα και δικοτυλήδονα, αντιπροσωπεύοντας το οικονομικά πιο καταστρεπτικό γένος φυτοπαρασιτικών νηματωδών στην αγροτική παραγωγή σε παγκόσμια κλίμακα (Trudgill and Blok, 2001).

Η προσβολή κηπευτικών καλλιεργειών από κομβονηματώδεις μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της τελικής απόδοσης άνω του 30% (Sikora and Fernandez, 2005). Σε καλλιέργεια μελιτζάνας προσβεβλημένη από *M. incognita* παρατηρήθηκε μείωση ύψους 80% στην τελική απόδοση (Di Vito et al., 1986). Σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες στην βορειοανατολική Ισπανία, με αρχικό μόλυσμα 4750 προνύμφες δευτέρου σταδίου (J2s) *M. javanica* σε 250 cm<sup>3</sup>εδάφους, παρατηρήθηκαν 36% και 61% απώλειες σε καλλιέργεια μαρουλιού και τομάτας αντίστοιχα (Verdejo Lucas et al., 1994). Αρχική πυκνότητα πληθυσμού 1100 J2s *M. javanica* σε 250 cm<sup>3</sup> προκάλεσε μείωση ύψους 60% σε καλλιέργεια αγγουριού (Ornat et al., 1997). Η τελική μείωση στην απόδοση της καλλιέργειας επηρεάζεται από τα αρχικά επίπεδα και τα είδη των πληθυσμών, τις περιβαλλοντικές συνθήκες και την διαχείριση της καλλιέργειας. Επίσης, ο συνεργισμός των κομβονηματωδών με μύκητες του εδάφους, όπως *Fusarium oxysporum* και *Rhizoctonia solani*, αυξάνει τις απώλειες, μειώνοντας την ανθεκτικότητα του φυτού ξενιστή (Back et al., 2002). Σε έρευνα στη βορειοανατολική Ισπανία ανιχνεύθηκε παρουσία κομβονηματωδών σε ποσοστό 50% και 27% από 66 θερμοκηπιακές και 59 υπαίθριες καλλιέργειες αντίστοιχα. Ο *M. javanica* επικρατούσε στις θερμοκηπιακές (41%) και ο *M. incognita* στις υπαίθριες (50%). Η πυκνότητα των πληθυσμών κατά τη μεταφύτευση βρέθηκε να κυμαίνεται από 1 έως 590 J2s / 250 cm<sup>3</sup>εδάφους και 1 έως 2100 J2s / 250 cm<sup>3</sup>την άνοιξη και το καλοκαίρι αντίστοιχα. Το επίπεδο ανεκτικότητας (μέγιστη πυκνότητα όπου δεν

παρατηρείται μείωση στην απόδοση της καλλιέργειας), σε θερμοκηπιακή καλλιέργεια τομάτας, υπολογίστηκε ως 2 J2s / 250 cm<sup>3</sup>εδάφους (Ornat and Sorribas, 2008). *In vitro* τα όρια ανεκτικότητας στο *M. incognita* για τις καλλιέργειες μελιτζάνας, τομάτας, αγκινάρας, πιπεριάς και λάχανου υπολογίστηκαν ως 0.054, 0.55, 1.1, 0.3 και 0.5 αυγά και J2s / cm<sup>3</sup>εδάφους αντίστοιχα (Di Vito et al., 1992, 1986; Sasanelli et al., 1992). Τα όρια ανεκτικότητας διαφέρουν ανά περιοχή και καλλιέργεια, καθώς επηρεάζονται από την αλληλεπίδραση μεταξύ φυτού και νηματώδη, τη σύσταση του εδάφους, τις περιβαλλοντικές συνθήκες και την διαχείριση της καλλιέργειας.

#### 1.1.4 Μέθοδοι ταυτοποίησης των κομβονηματωδών

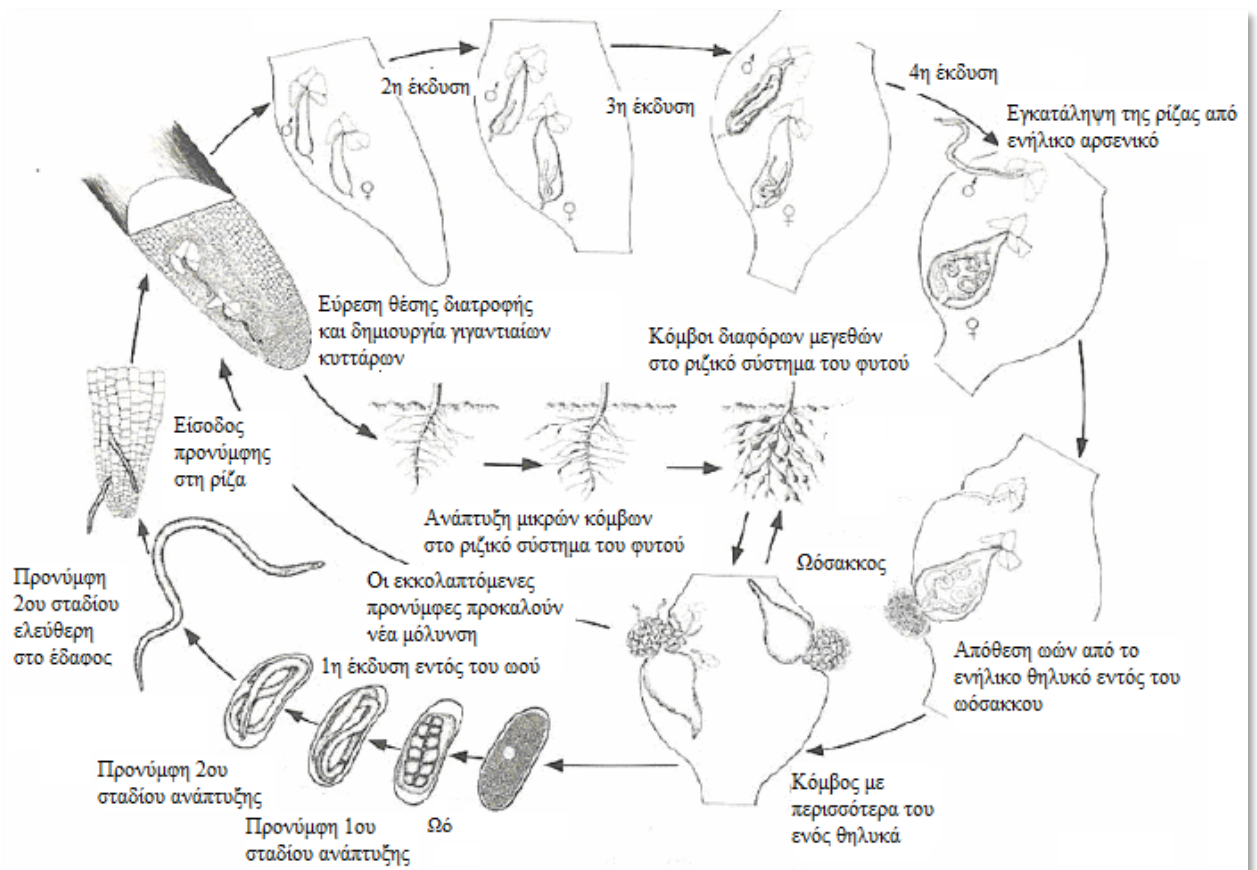
Η ταυτοποίηση των ειδών για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα γινόταν αποκλειστικά με χρήση του οπτικού μικροσκοπίου. Το 1952 ο Sasser, 1952 εισήγαγε μια νέα μέθοδο που βασιζόταν στην αντίδραση του φυτού ξενιστή σε προσβολή από κομβονηματώδεις των τεσσάρων κύριων ειδών. Το 1977 χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά η ηλεκτρονική μικροσκοπία για σκοπούς ταυτοποίησης του κομβονηματώδη *M. propora* από τον Spraul (Karssen, 2002).

Με την αύξηση της έρευνας γύρω από τα ισοένζυμα και το γονιδίωμα του γένους *Meloidogyne* (κυρίως μετά το 1970), άρχισε να αποκαλύπτεται ο μεγάλος αριθμός διαφορετικών ειδών. Αναπτύχθηκαν πολλές νέες μέθοδοι ταυτοποίησης ειδών κομβονηματωδών. Μία από τις σημαντικότερες αποτελεί η χρήση πηκτής πολυακρυλαμίδης για τον διαχωρισμό ισοενζύμων. Χρησιμοποιούνται εστεράσες, η δισμουτάση του υπεροξειδίου, η μηλική αφυδρογονάση και η γλουταμινική οξαλοξική τρανσαμινάση (Esbenshade and Triantaphyllou, 1990) με τις εστεράσες και την μηλική αφυδρογονάση να επικρατούν για την διάκριση των τεσσάρων πιο κοινών ειδών: *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* και *M. hapla*. Βέβαια, τα ένζυμα αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί και για λιγότερο διαδεδομένα είδη όπως το *M. enterolobii* (= *M. mayaguensis*) (Brito et al., 2004), *M. partityla* (Starr et al., 1996) και *M. trifoliophila* (Mercer et al., 1997). Με τον κατάλληλο εξοπλισμό, μετά από εξαγωγή ώριμων θηλυκών από κόμβους στις ρίζες, πραγματοποιείται ταυτοποίηση του είδους με χρήση εστερασών (Ibrahim and Perry, 1993). Μένει να διευκρινιστεί, αν αυτή η μέθοδος ταυτοποίησης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διάκριση όλων των μέχρι τώρα αναγνωρισμένων ειδών.

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί αρκετά ζεύγη εξειδικευμένων εκκινητών για διάφορα είδη του γένους *Meloidogyne* και είναι δυνατή η ταυτοποίηση τους με χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Υπάρχουν αρκετά πρωτόκολλα για τη διάκριση των διαφόρων ειδών, χρησιμοποιώντας εξειδικευμένους εκκινητές, οι οποίοι προέρχονται είτε από το πυρηνικό (Adam et al., 2007) είτε από το μιτοχονδριακό DNA (Powers and Harris, 1993). Μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι πως η ταυτοποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί με χρήση DNA μεμονωμένων προνυμφών δευτέρου σταδίου, στο οποίο εντοπίζονται οι νηματώδεις στο έδαφος. Έτσι, δεν υπάρχει η ανάγκη εύρεσης προσβεβλημένων ριζών και εξαγωγή ώριμων θηλυκών από αυτές (καθώς είναι πιθανόν τη στιγμή της δειγματοληψίας να μην καλλιεργείται φυτό-ξενιστής ή η προσβολή να βρίσκεται στα πρώτα στάδια του βιολογικού κύκλου των νηματωδών) ή μόλυνσης των φυτών και αναμονή για την ανάπτυξη των θηλυκών στις ρίζες. Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η απουσία ζευγών εκκινητών για αρκετά είδη, καθώς και η χρησιμοποίηση πολλαπλών αναλύσεων με διαφορετικά ζεύγη για την ταυτοποίηση ορισμένων ειδών. Επίσης, για κάποια είδη είναι απαραίτητο να γίνει πέψη των προϊόντων της PCR με περιοριστικά ένζυμα για να ολοκληρωθεί η ανάλυση (Powers and Harris, 1993). Για την εφαρμογή μοριακών μεθόδων απαιτούνται ακριβός εργαστηριακός εξοπλισμός και αναλώσιμα και η ύπαρξη καθαρού εργαστηριακού χώρου. Ωστόσο, τα εργαστήρια που υιοθετούν αυτές τις μεθόδους αυξάνονται συνεχώς, καθώς αποτελούν γρήγορο, αξιόπιστο και αποτελεσματικό τρόπο για την αναγνώριση των διάφορων ειδών νηματωδών σε σχέση με τις κλασικές μορφομετρικές μεθόδους.

### 1.1.5 Βιολογικός κύκλος

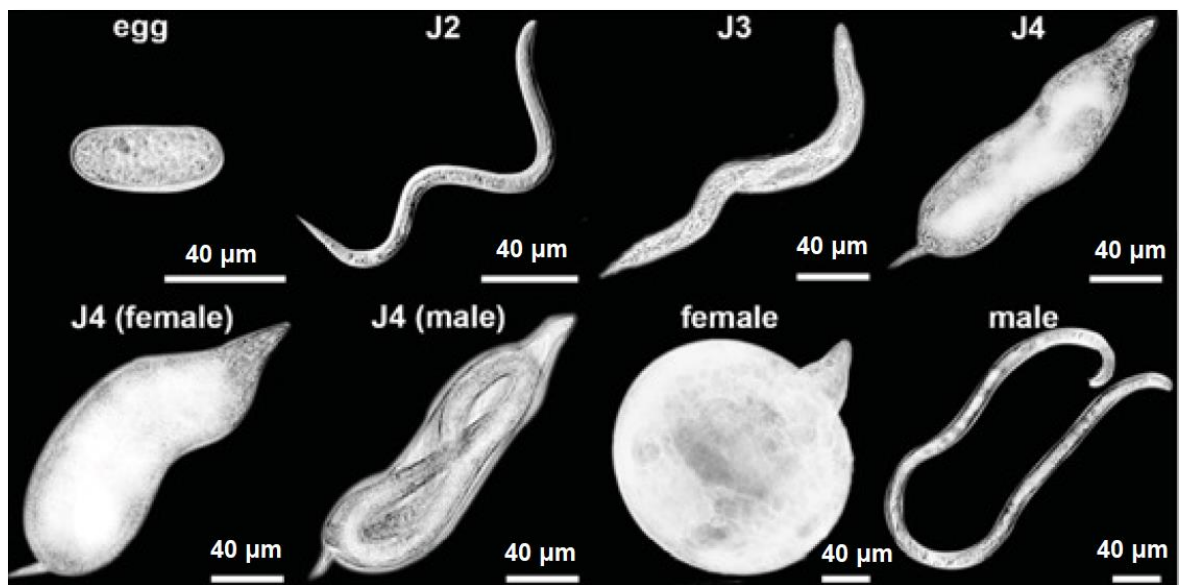
Ο βιολογικός κύκλος των νηματωδών (Εικόνα 1.1) του γένους *Meloidogyne* αποτελείται από 3 στάδια: το εμβρυικό, τα τέσσερα προνυμφικά (J1-J4) και το ενήλικο. Η διαχείμαση γίνεται κυρίως στο στάδιο του ωού (Starr and Jeger, 1985). Αρχικά τα ωά είναι αδιαφοροποίητα, στη συνέχεια μετά από κυτταροδιαιρέσεις και επιμήκυνση προκύπτει η προνύμφη πρώτου σταδίου, η οποία είναι τετραπλάσια σχεδόν του ωού ως προς το μήκος (Εικόνα 1.2). Σε αντίθεση με άλλα γένη (*Globodera*) η παρουσία ξενιστή δεν είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την εκκόλαψη των ωών. Απαραίτητη, όμως, είναι η παρουσία κατάλληλης υγρασίας και θερμοκρασίας, ενώ τα ωά δεν εκκολάπτονται όλα ταυτόχρονα, αλλά σταδιακά. Παράγοντες, όπως η ύπαρξη αμμωνιακών ιόντων στο έδαφος βρέθηκαν να λειτουργούν ανασταλτικά στην εκκόλαψη των ωών του *M. incognita* (Sudirman, 1995).



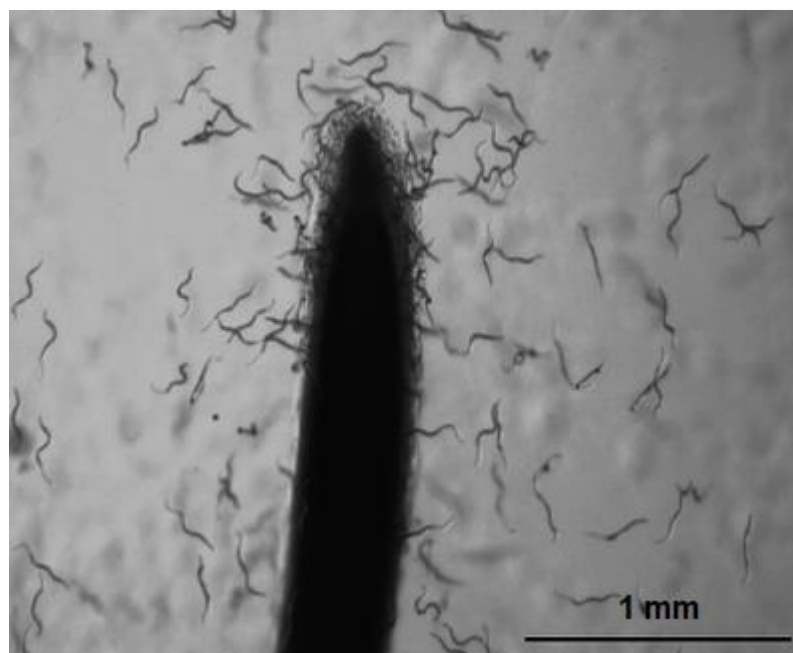
**Εικόνα 1.1 Βιολογικός κύκλος του γένους *Meloidogyne* (Agrios et al., 2004).**

Η πρώτη έκδυση πραγματοποιείται εντός του ωού και η pronύμφη πρώτου σταδίου ανάπτυξης (J1) μετατρέπεται σε δευτέρου (J2), στάδιο στο οποίο πραγματοποιείται η εκκόλαψη. Οι εκκολαφθείσες J2 περνούν ένα μικρό χρονικό διάστημα της ζωής τους, μετακινούμενες ελεύθερα στο έδαφος στην περιοχή της ριζόσφαιρας, χωρίς να τρέφονται, αλλά χρησιμοποιώντας τα λιπίδια του στομάχου τους για να επιβιώσουν (Eisenback and Triantaphyllou, 1991). Στη συνέχεια είτε εισέρχονται στην ίδια ρίζα είτε παρασιτούν γειτονικές ρίζες, ελκνόμενες από τις ουσίες που εκκρίνουν (Bais et al., 2006).

Με κινήσεις του στυλέτου τους και χρήση πηκτινολυτικών και κυτταρολυτικών ενζύμων εισβάλουν στη ρίζα στο σημείο της επιμήκυνσης της (Εικόνα 1.3), όταν υπάρχει έντονη μεριστωματική δραστηριότητα. Αφού εισέλθουν μετακινούνται ενδοκυτταρικά μέχρι να φθάσουν κοντά στο περικύκλιο της ρίζας, όπου χρησιμοποιούν μια ομάδα 5-10 κυττάρων σαν μόνιμη θέση διατροφής. Εκεί παραμένουν έως και την ανάπτυξη του ενήλικου (Eisenback and Triantaphyllou, 1991).



**Εικόνα 1.2** Μέγεθος νηματωδών του γένους *Meloidogyne* κατά τα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του βιολογικού κύκλου (Perry et al., 2009).

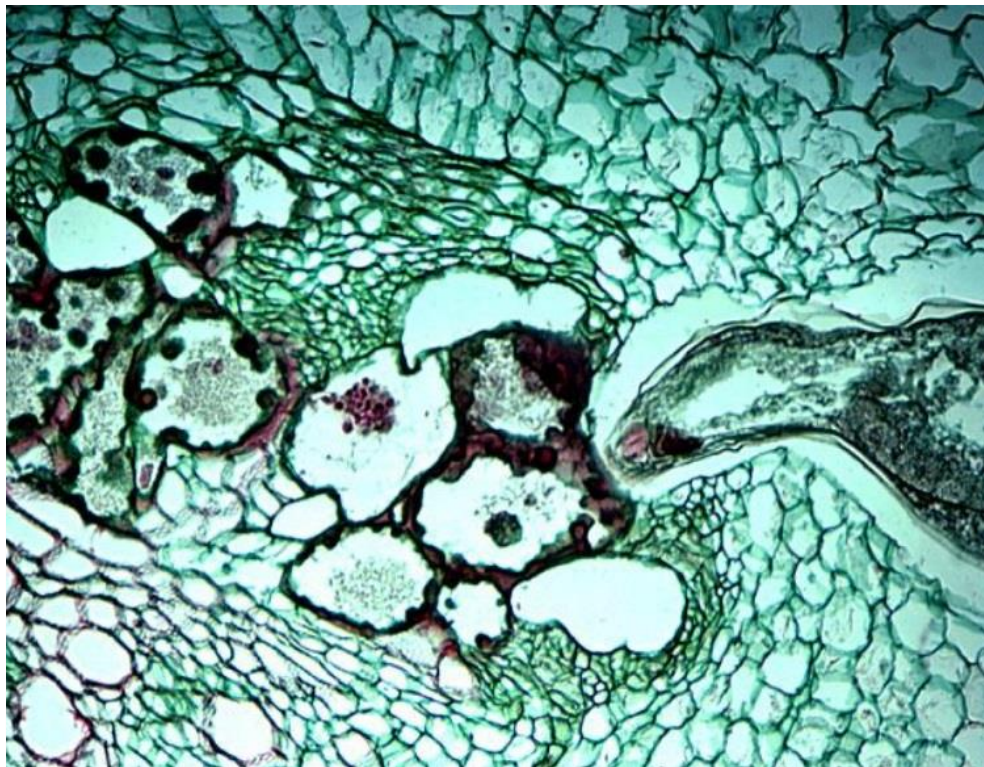


**Εικόνα 1.3** Είσοδος προνυμφών δευτέρου σταδίου στη ζώνη επιμήκυνσης της ρίζας (Wang et al., 2009).

Τα παρεγχυματικά κύτταρα των ιστών του ξενιστή από τα οποία τρέφεται η προνύμφη και βρίσκονται κοντά στην κεφαλή της, μετατρέπονται σε πολυπύρρηνα και γιγαντιαία (Εικόνα 1.4) (Sijmons et al., 1994). Ως αποτέλεσμα της δημιουργίας των γιγαντιαίων κυττάρων ο ιστός της ρίζας, που τα περιβάλλει, σχηματίζει έναν κόμβο μέσα στον οποίο πραγματοποιείται



η ανάπτυξη της προνύμφης. Οι προνύμφες δευτέρου σταδίου τρέφονται από τα γιγαντιαία κύτταρα για περίπου 24 ώρες. Στη συνέχεια υφίστανται μορφολογικές αλλαγές και αποκτούν σακοειδή μορφή. Χωρίς πλέον να τρέφονται, μετά από τρεις εκδύσεις μετατρέπονται σε ενήλικα άτομα (Eisenback and Triantaphyllou, 1991).



**Εικόνα 1.4** Νηματώδης του γένους *Meloidogyne* τρέφεται από γιγαντιαία κύτταρα (Karszen et al., 2013).

Χαρακτηριστικό του βιολογικού κύκλου των περισσότερων ειδών του γένους *Meloidogyne* αποτελεί το ότι τα θηλυκά άτομα δεν είναι απαραίτητο να συζευχθούν με τα αρσενικά, αλλά μπορούν να παράγουν αυγά παρθενογενετικά. Σε συνθήκες που δεν ευνοούν την υψηλή πυκνότητα των νηματωδών, οι προνύμφες μετατρέπονται σε ενήλικα αρσενικά τα οποία δεν τρέφονται από το φυτό, για την αποφυγή του ενδοειδικού ανταγωνισμού (Davide and Triantaphyllou, 1968).

Τα θηλυκά άτομα έχουν ανεπτυγμένο αναπαραγωγικό σύστημα (Eisenback and Triantaphyllou, 1991) και η διάρκεια ζωής τους φτάνει τους τρεις μήνες. Αποθέτουν έως 2000 αυγά μέσα σε μία ζελατινώδη ουσία την οποία παράγουν με τους αδένες του ορθού και ονομάζεται ωόσακκος. Ο ωόσακκος προστατεύει τα αυγά από την απώλεια υγρασίας και από τις αντίξοες συνθήκες του περιβάλλοντος (Wallace, 1968), ενώ διαθέτει και αντιμικροβιακή

δράση. Με το πέρασ του χρόνου αλλάζει το χρώμα του από διάφανο σε σκούρο κίτρινο (Bird, 1958).

Η διάρκεια του βιολογικού κύκλου εξαρτάται από τη θερμοκρασία (Madulu and Trudgill, 1994; Trudgill, 1995). Η συσχέτιση του ρυθμού ανάπτυξης με τη θερμοκρασία είναι γραμμική για το μεγαλύτερο μέρος του βιολογικού κύκλου του κομβονηματώδη, αν και το κάθε στάδιο ανάπτυξης έχει διαφορετικό άριστο θερμοκρασίας. Μεταξύ των ειδών του γένους *Meloidogyne* υπάρχει παραλλακτικότητα ως προς το άριστο της θερμοκρασίας ανάπτυξης. Συγκεκριμένα για το είδος *M. javanica* η ανάπτυξη ευνοείται σε θερμοκρασίες μεταξύ 13 και 34°C, με άριστη τη θερμοκρασία των 29°C. Η σχέση μεταξύ της θερμοκρασίας εδάφους και της διάρκειας του βιολογικού κύκλου για τα τέσσερα πιο κοινά είδη παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.5.

<i>Meloidogyne</i> species	Soil temperature				Minimum temperature (° C)
	18° C	21° C	24° C	27° C	
<i>M. arenaria</i>	54	36	27	21	12.1
<i>M. hapla</i>	56	43	35	29	8.3
<i>M. incognita</i>	51	37	29	24	10.1
<i>M. javanica</i>	69	43	32	25	12.8

**Εικόνα 1.5** Διάρκεια βιολογικού κύκλου των ειδών *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita* και *M. javanica* ανάλογα με τη θερμοκρασία εδάφους (Ploeg and Maris, 1999).

### 1.1.6 Συμπτωματολογία

Το πλέον χαρακτηριστικό σύμπτωμα της προσβολής από κομβονηματώδεις είναι ο σχηματισμός κόμβων στο ριζικό σύστημα των φυτών, το μέγεθος των οποίων διαφοροποιείται ανάλογα με το επίπεδο μόλυσματος και το ξενιστή. Σε χαμηλά επίπεδα μόλυσματος παρατηρείται σχηματισμός κόμβων μικρού μεγέθους με ένα έως λίγα θηλυκά εντός αυτών (Εικόνα 1.6). Μεγαλύτερες πυκνότητες πληθυσμών οδηγούν στην ανάπτυξη κόμβων μεγαλύτερου μεγέθους με αποτέλεσμα την παραμόρφωση της ρίζας (Εικόνα 1.7). Το

συνηθέστερο υπέργειο σύμπτωμα είναι η μάρανση του φυτού και η έλλειψη σπαργής της φυλλικής επιφάνειας, τα οποία είναι εντονότερα σε περιόδους έλλειψης εδαφικής υγρασίας.



**Εικόνα 1.6** Κόμβοι μικρού μεγέθους με ένα έως λίγα θηλυκά εντός αυτών (Perry et al., 2009).

Η ένταση των συμπτωμάτων στο υπέργειο τμήμα της καλλιέργειας ποικίλει από μηδενική, σε συνθήκες επιπέδου μόλυσματος χαμηλότερου του ορίου οικονομικής ζημιάς, έως και πλήρης νέκρωση σε περίπτωση ιδιαίτερα υψηλού επιπέδου πληθυσμού του μόλυσματος κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης της καλλιέργειας. Το μέγεθος των κόμβων διαφέρει ανάλογα με τη βοτανική οικογένεια του ξενιστή με σειρά αυξανόμενης ευπάθειας ως εξής: *Alliaceae*, *Cruciferae*, *Asteraceae*, *Chenopodiaceae*, *Apiaceae*, *Fabaceae*, *Curcubitaceae* και *Solanaceae*. Επίσης το είδος του φυτού ξενιστή επηρεάζει τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου του νηματώδη καθώς και τη διάρκεια της εμβρυογένεσης. Μεταξύ των ειδών που ανήκουν στην ίδια βοτανική οικογένεια δεν υπάρχει το ίδιο επίπεδο ευπάθειας στην προσβολή από κομβονηματώδεις. Για παράδειγμα, οι κόμβοι σε προσβεβλημένα φυτά πιπεριάς είναι μικρότεροι από τους αντίστοιχους σε μελιτζάνα και τομάτα, ή αντίστοιχα, κόμβοι σε προσβεβλημένες ρίζες καρότου είναι μικρότεροι από εκείνους σε σέλινο (Ornat and Sorribas, 2008).





**Εικόνα 1.7 Παραμόρφωση της ρίζας σε υψηλή πυκνότητα κομβοηματοδών στο έδαφος.**

Το στάδιο ανάπτυξης και η καλλιεργητική περίοδος μπορούν επίσης να επηρεάσουν τη σοβαρότητα της ασθένειας για το ίδιο φυτό ξενιστή. Για παράδειγμα, τα φυτά μαρουλιού είναι πιο ευπαθή ως καλοκαιρινή καλλιέργεια παρά ως φθινοπωρινή, ενώ η μόλυνση των φυτών από κομβοηματοδείς σε νεαρό στάδιο ανάπτυξης μπορεί να προκαλέσει θάνατο, σε αντίθεση με την μόλυνση σε μεταγενέστερα στάδια που μειώνει απλά την παραγωγή της καλλιέργειας (Ornat and Sorribas, 2008).

Οι σχηματιζόμενοι κόμβοι στο ριζικό σύστημα δεν επιτρέπουν την καλή πρόσληψη και κυκλοφορία του νερού και των θρεπτικών συστατικών, τα οποία είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του φυτού. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης, την εμφάνιση συμπτωμάτων ανεπαρκούς θρέψης και μάρανσης στα φύλλα, κιτρίνισμα, νέκρωση και μείωση της άνθισης, της καρποφορίας και του μεγέθους των καρπών. Τα συμπτώματα του υπέργειου τμήματος, στον αγρό εμφανίζονται κατά κηλίδες, κατά την πορεία του αρδευτικού νερού, κατά την φορά των καλλιεργητικών εργασιών, κατά θέσεις ή ακανόνιστα (Εικόνα 1.8).



**Εικόνα 1.8** Εμφάνιση φυτών πιπεριάς με μειωμένη ανάπτυξη, λόγω προσβολής από κομβονηματώδεις, κατά κηλίδες.

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

## **1.2 ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΤΩΝ ΚΟΜΒΟΝΗΜΑΤΩΔΩΝ**

Το γένος *Meloidogyne* θεωρείται το γένος φυτοпараσιτικών νηματωδών με τις σημαντικότερες οικονομικές ζημιές σε καλλιέργειες. Η μεγάλη εξάπλωση των κομβονηματωδών παγκοσμίως, οι πολλές γενεές ανά καλλιεργητική περίοδο, ο υψηλός ρυθμός αναπαραγωγής, το μεγάλο εύρος ξενιστών και η δράση τους ως ενδοπαράσιτα είναι μερικοί από τους λόγους, που καθιστούν την αντιμετώπιση τους πολλή δύσκολη. Χωρίς τη σωστή διαχείριση, η πυκνότητα των πληθυσμών τους μπορεί να φτάσει σε επίπεδα, στα οποία

προκαλείται μείωση της απόδοσης και απώλεια της ευρωστίας των καλλιεργούμενων φυτών. Επιπρόσθετα, τα προσβεβλημένα φυτά γίνονται ευάλωτα σε προσβολές από εχθρούς και παθογόνους μικροοργανισμούς, αλλά και μη παρασιτικές ασθένειες, που μπορεί να οδηγήσουν σε ολική νέκρωση τους.

Η αντιμετώπιση των κομβονηματωδών θα μπορούσε να χωριστεί σε μεμονωμένες ενέργειες με στόχο έναν προσωρινό έλεγχο τους σε επίπεδα, στα οποία δεν προκαλείται σοβαρή οικονομική ζημιά και σε στρατηγικές ολοκληρωμένης αντιμετώπισης με στόχο τη μείωση των πληθυσμών σε πυκνότητες, στις οποίες δεν παρατηρείται απώλεια στην απόδοση της καλλιέργειας (Nyczepir and Thomas, 2009). Κατά τη σχεδίαση ενός προγράμματος ολοκληρωμένης αντιμετώπισης, πρέπει να ληφθούν υπόψη τα χαρακτηριστικά και η οικονομική αξία της καλλιέργειας, οι πρακτικές αντιμετώπισης, οι οποίες είναι διαθέσιμες και το επίπεδο γνώσης σχετικά με τους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες, που επηρεάζουν τη σχέση νηματώδη – καλλιέργειας. Η έλλειψη αυτής της γνώσης και ως επακόλουθο η μη σωστή ενημέρωση των παραγωγών, τους οδηγεί στη λήψη μέτρων προσωρινής διαχείρισης του προβλήματος, αντί της εφαρμογής στρατηγικής διαχείρισης των κομβονηματωδών στις εκτάσεις τους με στόχο την αύξηση της απόδοσης της καλλιέργειας και της βελτίωσης της ποιότητας των παραγόμενων προϊόντων.

Η διαχείριση των κομβονηματωδών ξεκινά από την επιλογή της καλλιεργούμενης έκτασης. Βασικό κριτήριο επιλογής αποτελεί η απουσία ιστορικού καλλιεργειών προσβεβλημένων από κομβονηματώδεις. Συνήθως, αυτό δεν είναι εφικτό και η λήψη μέτρων αντιμετώπισης είναι απαραίτητη. Επικρατεί η εφαρμογή χημικού νηματοδοκτόνου, πριν και μετά τη μεταφύτευση, ειδικά σε καλλιέργειες υψηλής οικονομικής αξίας, οι οποίες μπορούν να υποστηρίξουν πιο δαπανηρές πρακτικές. Η ανάκληση των αδειών έγκρισης πολλών δραστικών, λόγω των επιπτώσεων στην υγεία του ανθρώπου και στο περιβάλλον, έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη και εφαρμογή εναλλακτικών λύσεων, οι οποίες είναι πιθανόν να επικρατήσουν στο μέλλον (Batchelor, 2002). Σε αυτές τις πρακτικές συμπεριλαμβάνονται η χρησιμοποίηση ανθεκτικών ποικιλιών και η βιολογική αντιμετώπιση. Επίσης απαραίτητη είναι η τήρηση των κανόνων υγιεινής και η χρησιμοποίηση καθαρού πολλαπλασιαστικού υλικού για την αποφυγή είτε επιμολύνσεως με κομβονηματώδεις είτε της εισαγωγής νέου είδους του γένους *Meloidogyne* στην καλλιεργούμενη έκταση.

Το είδος της καλλιέργειας και το είδος του νηματώδη επηρεάζουν κατά κύριο λόγο τον τρόπο αντιμετώπισης που θα επιλεγεί. Οι περισσότερες πρακτικές χρειάζεται να επαναλαμβάνονται κάθε φορά που καλλιεργείται μια ευαίσθητη σε κομβονηματώδεις καλλιέργεια. Οι μέθοδοι

που ακολουθούνται για την αντιμετώπιση του γένους *Meloidogyne* χωρίζονται σε τέσσερις βασικές κατηγορίες: α) Χημική αντιμετώπιση, β) Καλλιεργητικές πρακτικές, γ) Βιολογική αντιμετώπιση, δ) Ανθεκτικές ποικιλίες.

### **1.2.1 Χημική αντιμετώπιση**

Η χημική αντιμετώπιση αποτέλεσε τη συνηθέστερη μέθοδο για τη διαχείριση των κομβονηματωδών στην εντατική γεωργία, κατά τη μεγαλύτερη διάρκεια του εικοστού αιώνα (Johnson, 1985; Halbrecht and LaMondia, 2004; Luc et al., 2005). Από το 1979 και έπειτα οι λύσεις, που πρόσφερε η χημική αντιμετώπιση, άρχισαν να μειώνονται λόγω των επιπτώσεων στο περιβάλλον και την υγεία του ανθρώπου. Η αρχή έγινε με την ανάκληση της έγκρισης του καπνιστικού εδάφους DBCP (1,2-δι-βρώμο-3-γλωροπροπάνιο) από τις ΗΠΑ το 1981. Την ίδια τύχη είχαν και άλλα νηματωδοκτόνα όπως το βρωμιούχο μεθύλιο, το οποίο αποσύρθηκε από την αγορά των ΗΠΑ και της Ευρωπαϊκής Ένωσης το 2005, λόγω της καταστροφής που προκαλεί στο όζον της στρατόσφαιρας. Παρά τις μεγάλες μειώσεις όμως στα προϊόντα της, η χημική αντιμετώπιση παραμένει μία από τις κύριες μεθόδους για τον έλεγχο των κομβονηματωδών. Στην Βόρεια Αμερική μαζί με τις ανθεκτικές ποικιλίες αποτελούν τις κύριες μεθόδους καταπολέμησης των νηματωδών του γένους *Meloidogyne* (Roberts, 1993; Starr et al., 2002; Bridge and Starr, 2007).

Τα σκευάσματα που χρησιμοποιούνται στην χημική αντιμετώπιση των κομβονηματωδών θα μπορούσαν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες: α) Καπνιστικά νηματωδοκτόνα, β) Μη καπνιστικά νηματωδοκτόνα, γ) Ουσίες που προέρχονται από μικροοργανισμούς.

#### **1.2.1.1 Καπνιστικά νηματωδοκτόνα**

Η ανακάλυψη χημικών ουσιών που καταστέλλουν τους νηματώδεις και η χρησιμοποίησή τους στην γεωργία από τα τέλη του δέκατου ένατου αιώνα, βελτίωσε την απόδοση και την ποιότητα πολλών καλλιεργειών. Μια κατηγορία αυτών των ουσιών αποτελούν τα καπνιστικά νηματωδοκτόνα, η εφαρμογή των οποίων γίνεται πριν την εγκατάσταση της καλλιέργειας για λόγους φυτοτοξικότητας. Συνήθως ενσωματώνονται στο έδαφος σε υγρή μορφή και ακολουθεί απελευθέρωση υδρατμών, οι οποίοι επηρεάζουν την επιβίωση εδαφόβιων οργανισμών. Διακρίνονται δύο κατηγορίες: αυτά που παρουσιάζουν μόνο νηματωδοκτόνο

δράση και αυτά που έχουν ευρύτερο φάσμα δράσης (Lembright, 1990), στοχεύοντας, πέρα από νηματώδεις και μύκητες, ζιζάνια και έντομα εδάφους. Τα ευρέως φάσματος, λόγω υψηλότερου κόστους, χρησιμοποιούνται κυρίως σε καλλιέργειες υψηλής οικονομικής αξίας. Ένα παράδειγμα ευρέως φάσματος καπνιστικού αποτελούσε το βρωμιούχο μεθύλιο, το οποίο αποσύρθηκε από την αγορά το 2005. Από τότε έχει γίνει προσπάθεια ανάπτυξης νέου προϊόντος, το οποίο να είναι εξίσου αποτελεσματικό, χωρίς να έχει παραχθεί προϊόν που να παρουσιάζει εφάμιλλα αποτελέσματα με το βρωμιούχο μεθύλιο.

### **1.2.1.2 Μη καπνιστικά νηματωδοκτόνα**

Τα μη καπνιστικά νηματωδοκτόνα δεν καταστέλλουν τους πληθυσμούς των νηματωδών στον ίδιο βαθμό με τα καπνιστικά (Luc et al., 2005). Εφαρμόζονται είτε ως κοκκώδη είτε σε υγρή μορφή στο έδαφος. Στις διάφορες δραστικές μη καπνιστικών ανήκουν οι: aldicarb, oxamyl, ethoprophos, fenamiphos, carbofuran, fosthiazate και fluopyram. Από τις παραπάνω μόνο οι oxamyl, ethoprophos, fenamiphos, fosthiazate και fluopyram διαθέτουν έγκριση στην Ελλάδα. Οι δραστικές αυτές παρουσιάζουν αποτελεσματικότητα εναντίον νηματωδών του γένους *Meloidogyne* τόσο σε υπαίθριες όσο και σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες. Ως μη πτητικές χρειάζεται να διαλυθούν στο εδαφικό νερό για να είναι ενεργές εναντίον των κομβονηματωδών. Διαχωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμιδικά.

Τα μη καπνιστικά νηματωδοκτόνα δρουν κυρίως ως παρεμποδιστές της ακετυλοχολινεστεράσης. Σε συνθήκες αγρού, η επίδραση των καρβαμιδικών και οργανοφωσφορικών νηματωδοκτόνων στους νηματώδεις φαίνεται να είναι αναστρέψιμη, με αποτέλεσμα η δράση τους να αναφέρεται ως νηματωστατική και όχι ως νηματωδοκτόνος (Haydock et al., 2006). Είναι απαραίτητο η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας στο εδαφικό διάλυμα, να βρίσκεται σε επίπεδα, στα οποία επιτυγχάνεται η παράλυση των νηματωδών για 4-8 εβδομάδες, διάστημα το οποίο απαιτείται για την εκκόλαψη του μεγαλύτερου ποσοστού των ωών (Wright, 1981; Rich et al., 2004). Τα παραπάνω χαρακτηριστικά των μη καπνιστικών νηματωδοκτόνων τα καθιστούν αποτελεσματικά μόνο μετά από επαναλαμβανόμενες εφαρμογές. Αυτές με τη σειρά τους οδηγούν σε προβλήματα, όπως αυξημένο κόστος για τον παραγωγό και μείωση της αποτελεσματικότητας λόγω επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης από μικροοργανισμούς (Davis et al., 1993; Smelt et al., 1996; Lawrence et al., 2005; Giannakou et al., 2005). Επιπρόσθετα, πιθανή διασυστηματική

δράση της δραστικής μπορεί να περιορίσει το εύρος καλλιεργειών, στις οποίες διαθέτει έγκριση (Rich et al., 2004).

#### **1.2.1.2.1 Ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε μη καπνιστικά νηματωδοκτόνα**

Η κατάργηση του βρωμιούχου μεθυλίου το 2005 εντατικοποίησε την χρήση καρβαμιδικών και οργανοφωσφορικών νηματωδοκτόνων. Σε καλλιέργειες όπου η πυκνότητα των νηματωδών είναι υψηλή, η χρήση τους πραγματοποιείται τουλάχιστον μία φορά ανά καλλιεργητική περίοδο. Στις περιπτώσεις των εντομοκτόνων, των ζιζανιοκτόνων και των μυκητοκτόνων υπάρχουν πολλές αναφορές τις τελευταίες δεκαετίες για ανάπτυξη ανθεκτικότητας των οργανισμών-στόχων σε αυτά. (Sparks and Nauen, 2015). Αντίθετα, τόσο οι αναφορές όσο και η μελέτη γύρω από την ανάπτυξη ανθεκτικότητας φυτοπαρασιτικών νηματωδών σε νηματωδοκτόνα είναι ελάχιστες.

Πληθυσμοί *M. incognita*, οι οποίοι είχαν εκτεθεί σε μη θανατηφόρες δόσεις των δραστικών ουσιών carbofuran, oxamyl και fenamiphos, παρουσίασαν αυξημένη ανοχή σε μετέπειτα εφαρμογές τους. Το φαινόμενο σε ορισμένες περιπτώσεις φάνηκε να διατηρείται για χρονική περίοδο δύο ετών (Yamashita and Viglierchio, 1986). Πληθυσμός κομβονηματωδών, ο οποίος συλλέχθηκε από έκταση αμπέλου, μετά από εφαρμογή carbofuran για 4 έτη, παρουσίασε ανοχή σε έκθεση στις δραστικές carbofuran, oxamyl και fenamiphos (Yamashita and Viglierchio, 1987). Επίσης έκθεση κομβονηματωδών σε μη θανατηφόρες δόσεις των παραπάνω δραστικών, φάνηκε να επηρεάζει και την αναπαραγωγή τους (Yamashita and Viglierchio, 1986; Yamashita et al., 1986). Η ευαισθησία φυσικών πληθυσμών κομβονηματωδών – οι οποίοι προέρχονταν από υπό κάλυψη καλλιέργειες κηπευτικών, στις οποίες εφαρμόζονταν συχνά καρβαμιδικά και οργανοφωσφορικά νηματωδοκτόνα – εξετάστηκε με *in vitro* βιοδοκιμές στις δραστικές ουσίες oxamyl και fenamiphos και συγκρίθηκε με αυτήν πληθυσμών, οι οποίοι διατηρούνταν σε εργαστηριακές συνθήκες για 3, 18 και 20 χρόνια (Tzortzakakis, 2017). Από τα αποτελέσματα δεν προέκυψε ένδειξη για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας των πληθυσμών στις δύο δραστικές. Τέλος, μετά από έκθεση 5 ετών, πληθυσμού *M. incognita* σε μη θανατηφόρες δόσεις των carbofuran, carbosulfan και triazophos, παρατηρήθηκε αύξηση της παθογένειας του πληθυσμού εναντίον ανθεκτικών ποικιλιών τομάτας (Meher et al., 2009).

### 1.2.1.3 Ουσίες που προέρχονται από μικροοργανισμούς

Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν οι αβερμεκτίνες, οι οποίες είναι ουσίες, που παράγονται από τον μύκητα *Streptomyces avermitilis*. Έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως ανθελμινθικά σε θηλαστικά και ως εντομοκτόνα (Jansson and Dybas, 1998). Ωστόσο, η χαμηλή υδατοδιαλυτότητα τους και η τάση τους να αλληλεπιδρούν με σωματίδια του εδάφους μειώνουν την αποτελεσματικότητά τους μετά από εφαρμογή στο έδαφος (Nyczerpir and Thomas, 2009). Η επίδραση της αμπαμεκτίνης – η οποία αποτελεί ένωση αβερμεκτινών – στην επιβίωση του *M. incognita* εξετάστηκε από τους Becker et al., 2003 και Monfort et al., 2006. Η μεταχείριση σπόρων λαχανικών με αμπαμεκτίνη μείωσε τα επίπεδα προσβολής από τις προνύμφες του *M. incognita* στα αρχικά στάδια ανάπτυξης των σποροφύτων. Επιπρόσθετα, σε αντίθεση με τα μη καπνιστικά νηματωδοκτόνα η επίδραση της αμπαμεκτίνης φαίνεται να μην είναι αναστρέψιμη (Faske and Starr, 2006). Στην Ελλάδα, από τον Αύγουστο του 2017 κυκλοφορεί το προϊόν αμπαμεκτίνης Tervigo ως νηματωδοκτόνο. Το σκεύασμα (TERVIGO 020 SC) εφαρμόζεται στο έδαφος κατά την άρδευση σε υπό κάλυψη καλλιέργειες κηπευτικών.

## 1.2.2 Καλλιεργητικά μέτρα

### 1.2.2.1 Αμειψισπορά

Αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα μέτρα αντιμετώπισης των κομβονηματωδών. Η ένταξη φυτών μη ξενιστών σε συστήματα εντατικής καλλιέργειας μειώνει τα επίπεδα των πληθυσμών των κομβονηματωδών, οι οποίοι ως υποχρεωτικά παράσιτα δεν μπορούν να επιβιώσουν σε απουσία φυτού ξενιστή. Ένα από τα πλεονεκτήματα της μεθόδου, σε σχέση με άλλες πρακτικές (π.χ. αγρανάπαυση, ηλιοαπολύμανση), όπου η έκταση πρέπει να παραμείνει ακαλλιέργητη για ένα χρονικό διάστημα, είναι πως υπάρχει άμεσο κέρδος για τον παραγωγό από τη διάθεση των προϊόντων της καλλιέργειας μη ξενιστή στην αγορά. Κατά την επιλογή των καλλιεργειών, που θα χρησιμοποιηθούν, πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή:

α) Στην ακριβή ταυτοποίηση του προς αντιμετώπιση είδους και του εύρους ξενιστών του

β) Στην επιλογή καλλιέργειας, η οποία ευδοκιμεί στη συγκεκριμένη περιοχή και μπορεί να διατεθεί στην αγορά

γ) Στην διασφάλιση πως άλλα παθογόνα και εχθροί δεν θα ευνοηθούν από την καλλιέργεια του συγκεκριμένου φυτού.

Ένα πρόβλημα που παρουσιάζεται στη διαχείριση των επικρατέστερων ειδών (*M. javanica*, *M. incognita* και *M. arenaria*), μέσω της αμειψισποράς, είναι πως διαθέτουν μεγάλο εύρος ξενιστών. Επίσης, πολλοί φυσικοί πληθυσμοί αποτελούνται από παραπάνω του ενός είδη και η καλλιέργεια φυτών μη ξενιστών για το ένα μόνο είδος δεν είναι αποτελεσματική. Για παράδειγμα, το είδος *M. javanica* αναπαράγεται σε πολύ χαμηλά έως μηδενικά επίπεδα στην πιπεριά, η οποία αποτελεί καλό ξενιστή του είδους *M. incognita* (Tzortzakakis, 1997). Πολλές φορές, είναι απαραίτητη η διεύρυνση του φάσματος των καλλιεργειών, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ένα σύστημα αμειψισποράς. Αυτό επιτυγχάνεται με την ένταξη ανθεκτικών ποικιλιών ευαίσθητων φυτών σε συστήματα αμειψισποράς, συνδυάζοντας τις δυο πρακτικές αντιμετώπισης (Tzortzakakis et al., 2000). Η αμειψισπορά δύναται να συνδυαστεί και με την βιολογική αντιμετώπιση, καθώς επιλογή φυτών που φιλοξενούν νηματώβρους μύκητες και βακτήρια, αυξάνει την αποτελεσματικότητα (Hidalgo-Diaz and Kerry, 2008). Επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν καλλιέργειες που δρουν ανταγωνιστικά για τους νηματώδεις, μετά από ενσωμάτωση της φυτικής μάζας στο έδαφος, όπως είδη των γενών *Tagetes* και *Brassica*, συνδυάζοντας και την βιοαπολύμανση για επιτυχέστερη αντιμετώπιση (Hidalgo-Diaz and Kerry, 2008). Κατά την εφαρμογή σχεδίου αμειψισποράς και ειδικότερα κατά την καλλιέργεια του φυτού μη ξενιστή, απαραίτητη είναι η αντιμετώπιση των ζιζανίων, τα οποία μπορούν να αποτελέσουν εναλλακτικό ξενιστή των νηματωδών.

### **1.2.2.2 Αγρανάπαυση**

Η απουσία ξενιστή, για ορισμένο χρονικό διάστημα, οδηγεί στη μείωση της πυκνότητας των πληθυσμών των κομβονηματωδών λόγω της μη εύρεσης τροφής και της μεγαλύτερης έκθεσης τους σε ακραίες τιμές θερμοκρασίας και υγρασίας (Goodell and Ferris, 1989). Βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι πως η αναγνώριση του είδους *Meloidogyne* δεν είναι απαραίτητη, καθώς όλα σχεδόν τα είδη καταστέλλονται στον ίδιο βαθμό (Nyczepir and Thomas, 2009). Ταυτόχρονη απομάκρυνση ζιζανίων είναι απαραίτητη, καθώς μπορούν να αποτελέσουν εναλλακτική πηγή τροφής για τους νηματώδεις. Επίσης, η άρδευση κατά την



αγρανάπαυση λειτουργεί θετικά, αφού δημιουργούνται ιδανικότερες συνθήκες για την εκκόλαψη των ωών.

Παρά το γεγονός του ότι αποτελεί μια αποτελεσματική μέθοδο για τη διαχείριση των κομβοηματοδών, η αγρανάπαυση δεν επιλέγεται σε συστήματα εντατικής γεωργίας. Βασικοί λόγοι είναι η μη ύπαρξη άμεσου κέρδους για τον παραγωγό, αλλά αντίθετα αυξημένο κόστος λόγω απώλειας μίας καλλιεργητικής περιόδου και της ανάγκης για ζιζανιοκτονία.

### **1.2.2.3 Φυτά παγίδες, χλωρή λίπανση και προσθετικά εδάφους**

Η καλλιέργεια συγκεκριμένων φυτών έχει αποδειχθεί, πως επηρεάζει την επιβίωση των κομβοηματοδών με άμεσο (φυτά παγίδες) ή με έμμεσο τρόπο (χλωρή λίπανση). Η διαφορά τους με τις καλλιέργειες, που χρησιμοποιούνται στην αμειψισπορά, είναι πως συνήθως δεν υπάρχει άμεσο οικονομικό κέρδος από τη διάθεση του προϊόντος στην αγορά. Τα οικονομικά οφέλη προκύπτουν λόγω της μείωσης της χρήσης νηματωδοκτόνων και της αυξημένης απόδοσης της επακόλουθης καλλιέργειας.

#### Φυτά παγίδες

Οι ρίζες αυτών των φυτών, προσβάλλονται κανονικά από τις προνύμφες δευτέρου σταδίου. Λόγω αλληλεπίδρασης με τον ξενιστή, όμως, οι προνύμφες αποτυγχάνουν να ολοκληρώσουν τον βιολογικό τους κύκλο. Παράδειγμα αποτελεί η ρόκα (*Eruca sativa*), η οποία ως φυτό παγίδα έχει αποδειχθεί αποτελεσματική εναντίον του *M. hapla* (Melakeberhan et al., 2006).

#### Χλωρή λίπανση

Πρόκειται για φυτά που καλλιεργούνται ανάμεσα σε δύο καλλιεργητικές περιόδους με σκοπό την αποφυγή διάβρωσης του εδάφους και την βελτίωση των χαρακτηριστικών του. Ως αποτέλεσμα, πολλές φορές, ασκούν πίεση στους πληθυσμούς *Meloidogyne*. Η καλύτερη επιλογή είναι φυτά, τα οποία αποτελούν κακούς ή μη ξενιστές των κομβοηματοδών, ώστε να μην συνεισφέρουν στην αύξηση του μολύσματος (Timper et al., 2006). Η χλωρή λίπανση έχει χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για τον έλεγχο των *M. arenaria*, *M. incognita* και *M. chitwoodi* (Mojtahedi et al., 1993; McSorley, 1999; Zasada and Ferris, 2004).

## Προσθετικά εδάφους

Η χρήση ζωικής κοπριάς και compost στην εντατική γεωργία είναι αρκετά διαδεδομένη. Αποτελώντας οικονομική και φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο λίπανσης, πρωταρχικός στόχος είναι η βελτίωση των χαρακτηριστικών του εδάφους. Ωστόσο, φαίνεται να αναστέλλουν και την δράση των νηματωδών. Η προσθήκη compost και ζωικής κοπριάς αύξησε τις αποδόσεις κηπευτικών καλλιεργειών και μείωσε την πυκνότητα πληθυσμών του *M. incognita* (McSorley and Gallaher, 1995; Riegel and Noe, 2000). Επιπρόσθετα, βοηθούν στην ανάπτυξη μικροοργανισμών, οι οποίοι δρουν ανταγωνιστικά στους νηματώδεις (Widmer et al., 2002).

### **1.2.2.4 Προληπτικά μέτρα**

Για την αποφυγή επιμολύνσεως του εδάφους με κομβονηματώδεις, διάδοσης τους και διατήρησης του μολύσματος πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα παρακάτω μέτρα:

- Απομάκρυνση υπολειμμάτων του προσβεβλημένου ριζικού συστήματος των προηγούμενων καλλιεργειών
- Χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού
- Καλός καθαρισμός γεωργικών εργαλείων και μηχανημάτων.

Η τήρηση των παραπάνω κανόνων μπορεί να παίξει καθοριστικό ρόλο στον έλεγχο των κομβονηματωδών. Με το πέρας μιας καλλιεργητικής περιόδου, το μεγαλύτερο ποσοστό του μολύσματος βρίσκεται στο ριζικό σύστημα των προσβεβλημένων φυτών. Η απομάκρυνση και καταστροφή τους λοιπόν, οδηγεί σε σημαντική μείωση της πυκνότητας του πληθυσμού. Με την χρήση καθαρού πολλαπλασιαστικού υλικού και τον καθαρισμό των καλλιεργητικών εργαλείων και μηχανημάτων αποφεύγεται η εισαγωγή νέου μολύσματος και η μετάδοση του σε νέα σημεία αντίστοιχα. Δυστυχώς οι περισσότεροι παραγωγοί δεν λαμβάνουν τα απαραίτητα μέτρα με αποτέλεσμα την διατήρηση του μολύσματος σε υψηλά επίπεδα και την διάδοση του είτε και στην υπόλοιπη έκταση είτε σε νέες καλλιεργούμενες εκτάσεις.

### **1.2.2.5 Απολύμανση του εδάφους με θερμότητα**

Η αύξηση της θερμότητας του εδάφους, με χρήση ατμού και τη μέθοδο της ηλιοαπολύμανσης, έχει χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση των κομβονηματωδών. Για τα

βακτήρια και τους μύκητες εδάφους η θνησιγόνος θερμοκρασία βρίσκεται στο εύρος των 60- 100°C. Οι φυτοπαρασιτικοί νηματώδεις φαίνεται να μην επιβιώνουν σε θερμοκρασίες εδάφους άνω των 45°C (Sikora and Fernandez, 2005).

### Με ατμό

Η μέθοδος στηρίζεται στη θέρμανση του εδάφους σε βάθος 20 – 30 cm, μέχρι 80°C, με κυκλοφορία εντός αυτού υπέρθερμου ατμού. Ως αποτέλεσμα, προκαλείται θάνατος όλων των εδαφόβιων μικροοργανισμών (Collange et al., 2011). Η εφαρμογή της μεθόδου εναντίον φυτοπαρασιτικών νηματωδών δεν είναι πάντα αποτελεσματική λόγω της εξάπλωσης τους σε βαθύτερα στρώματα εδάφους (Karssen et al., 2013). Επίσης, σε άλλα μειονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγονται το υψηλό κόστος εφαρμογής, η αλλαγή του pH του εδάφους και η θανάτωση ωφέλιμων εδαφόβιων οργανισμών (Nyczepir and Thomas, 2009).

### Ηλιοαπολύμανση

Πρόκειται για μία τεχνική αύξησης της θερμοκρασίας εδάφους, μέσω της ηλιακής ενέργειας. Χρησιμοποιείται σε περιοχές με έντονη ηλιοφάνεια. Η θερμότητα της ηλιακής ακτινοβολίας απορροφάται από το υγρό έδαφος, το οποίο είναι καλυμμένο με φύλλο λεπτού και διαφανούς πλαστικού πολυαιθυλενίου (Katan, 1980, 1981). Χρήση ηλιοαπολύμανσης επηρέασε αρνητικά την επιβίωση ωών και προνυμφών δευτέρου σταδίου του *M. incognita*, μετά από έκθεση τους, για επαρκές χρονικό διάστημα, σε θερμοκρασίες χαμηλότερες και των 45°C (Wang and McSorley, 2008). Στην Ελλάδα, συνδυασμός της ηλιοαπολύμανσης με σκεύασμα βιολογικής προέλευσης, το οποίο περιέχει σπόρια του βακτηρίου *Bacillus firmus*, οδήγησε στον έλεγχο ειδών του γένους *Meloidogyne* (Giannakou et al., 2007).

Το βασικότερο μειονέκτημα, της χρήσης ηλιοαπολύμανσης για τον έλεγχο των κομβονηματωδών, βρίσκεται στην αδυναμία αύξησης της θερμοκρασίας στα βαθύτερα στρώματα του εδάφους (15-30 cm), όπου βρίσκεται σημαντικό ποσοστό του μολύσματος. Άρδευση ανά τακτά διαστήματα, κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, είναι απαραίτητη για τη εκκόλαψη των ωών στο έδαφος και την εξέλιξη τους στο πιο ευαίσθητο στάδιο των προνυμφών δευτέρου σταδίου. Επίσης σε εφαρμογή σε μεγάλες εκτάσεις, η χρησιμοποίηση μεγάλων ποσοτήτων πλαστικού αυξάνει το οικονομικό κόστος. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά καθιστούν την ηλιοαπολύμανση ως δευτερεύουσα λύση, σε περιπτώσεις, όπου άλλες μέθοδοι δεν είναι διαθέσιμες.

## 1.2.3 Βιολογική αντιμετώπιση

### 1.2.3.1 Χρησιμοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών

Τα τελευταία 50 χρόνια υπήρξε αρκετή δραστηριότητα γύρω από παθογόνους και ανταγωνιστές μικροοργανισμούς των κομβονηματωδών, που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην βιολογική αντιμετώπιση τους. Τα κύρια πεδία της έρευνας είναι:

- Η απομόνωση και ταυτοποίηση των οργανισμών, οι οποίοι επηρεάζουν άμεσα ή έμμεσα φυτοпараσιτικούς νηματώδεις
- Η διαχείριση του εδαφικού περιβάλλοντος με στόχο τη βελτίωση του ανταγωνισμού
- Η διεκρίνιση των μηχανισμών του παρασιτισμού νηματωδών από μικροοργανισμούς
- Η ανάπτυξη και διάθεση προϊόντων στο εμπόριο

Ωστόσο, η χρησιμοποίηση της βιολογικής αντιμετώπισης από τους παραγωγούς είναι σπάνια (Hallmann et al., 2009).

Στο εδαφικό περιβάλλον αναπτύσσεται ένα ευρύ φάσμα βακτηρίων, η αύξηση των οποίων κατά τον παρασιτισμό των φυτών από κομβονηματώδεις, υποδηλώνει πιθανή αλληλεπίδραση (Hallmann et al., 2009). Ενώ πολλά είδη βακτηρίων δεν έχουν ταυτοποιηθεί και χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω μελέτη, ένας σημαντικός αριθμός τους έχει καλλιεργηθεί σε συνθήκες εργαστηρίου και μελετηθεί σχετικά με την επίδραση τους στην συμπεριφορά, διατροφή και αναπαραγωγή των νηματωδών (Πίνακας 1.1). Ο μεγαλύτερος όγκος της έρευνας είναι γύρω από το υποχρεωτικό ενδοπαράσιτο *Pausteria penetrans*. Όσο αφορά προϊόντα του εμπορίου στην Ελλάδα κυκλοφορεί σκεύασμα, που περιέχει το βάκιλο *Bacillus firmus* I-1582.

Επιτυχή παραδείγματα βιολογικής διαχείρισης των *M. incognita*, *M. javanica* και *M. hapla* αποτελούν και οι ανταγωνιστικοί μύκητες *Paecilomyces lilacinus* και *Pochonia chlamydosporia*. Εφαρμογή του *P. lilacinus* (στέλεχος 251) περιόρισε σε μεγάλο βαθμό τους πληθυσμούς των *M. incognita* και *M. hapla* σε καλλιέργεια τομάτας (Kiewnick and Sikora, 2006). Επίσης, εφαρμογές του *P. chlamydosporia* στο έδαφος, έχουν παρουσιάσει αποτελέσματα στην αντιμετώπιση των κομβονηματωδών σε καλλιέργειες κηπευτικών σε τροπικές περιοχές (Viaene et al., 2013). Στην Ελλάδα είναι διαθέσιμο στην αγορά σκεύασμα, το οποίο περιέχει τον μύκητα *P. lilacinus* (στέλεχος 251).

Μία άλλη κατηγορία μυκήτων, των οποίων έχει αξιολογηθεί ο ανταγωνισμός τους ως προς φυτοπαρασιτικούς νηματώδεις είναι οι ενδομυκόρριζες. Πρόκειται για οργανισμούς που συμβιώνουν με το φυτό, εφοδιάζοντας το με νερό και θρεπτικά στοιχεία από το έδαφος, ως αντάλλαγμα της λήψης οργανικών συστατικών από αυτό. Οι ενδομυκόρριζες φαίνεται να βελτιώνουν την άμυνα του φυτού εναντίον φυτοπαρασιτικών νηματωδών μέσω διάφορων μηχανισμών. Ορισμένοι από αυτούς είναι η ενίσχυση της αντοχής του φυτού, ο απευθείας ανταγωνισμός των μυκορριζών με τους νηματώδεις, η επαγωγή της άμυνας του φυτού και η αλλαγή των ιδιοτήτων της ριζόσφαιρας του φυτού (Schouteden et al., 2015). Υπάρχουν διάφορες μελέτες γύρω από τη χρησιμοποίησή τους στην αντιμετώπιση των κομβονηματωδών. Ρίζες στις οποίες έγινε εφαρμογή με *Glomus mosseae* παρατηρήθηκε χαμηλότερη προσβολή από προνύμφες του *M. incognita*, σε σχέση με ρίζες όπου δεν έγινε εισαγωγή του μύκητα (Vos et al., 2013).

**Πίνακας 1.1 Επίδραση βακτηρίων σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης νηματωδών του γένους *Meloidogyne* (Hallmann et al., 2009).**

Στάδιο ανάπτυξης	Παρεμπόδιση	Τρόπος δράσης βακτηρίου	Σημείο δράσης	Είδη βακτηρίων	Αναφορές
<b>Ωό ή Ωόσακκος</b>	Ανάπτυξη, εκκόλαψη	Τοξίνες, λυτικά ένζυμα	Έδαφος	<i>Telluria chitinolytica</i>	(Spiegel et al., 1991)
<b>Προνύμφη δευτέρου σταδίου εκτός του φυτού</b>	Επιβίωση, εύρεση και αναγνώριση του ξενιστή, διείσδυση στη ρίζα	Τοξίνες, λεκτίνες, αποικοδόμηση εκκρίσεων της ρίζας, παρασιτισμός	Έδαφος, ριζόσφαιρα	<i>Pasteuria penetrans</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Rhizobium etli</i>	(Krechel et al., 2002; Siddiqui and Shaukat, 2005, 2004; Siddiqui et al., 2006; Sikora et al., 2007; Oliveira et al., 2007)
<b>Προνύμφη εντός του φυτού</b>	Σχηματισμός θέσης διατροφής, ανάπτυξη	Τοξίνες, επαγωγή ανθεκτικότητας, παρασιτισμός	Εντός της ρίζας	<i>Pasteuria penetrans</i> , <i>Rhizobium etli</i>	(Davies et al., 1991; Munif et al., 2000)
<b>Ενήλικο θηλυκό</b>	Γονιμότητα	Τοξίνες	Εντός της ρίζας, ριζόσφαιρα	<i>Pasteuria penetrans</i>	(Davies et al., 2008)

Η εφαρμογή ορισμένων καλλιεργητικών πρακτικών (π.χ. προσθετικά εδάφους) αυξάνει την οργανική ύλη στο έδαφος και ενισχύει την ποικιλότητα και δραστηριότητα των

μικροοργανισμών. Ο συνδυασμός τους λοιπόν, με τη βιολογική αντιμετώπιση δύναται να αυξήσει την αποτελεσματικότητα της (Viaene et al., 2013).

### 1.2.3.2 Βιοαπολύμανση

Αναφέρεται στην απελευθέρωση τοξικών πτητικών ουσιών, κατά τη διαδικασία αποσύνθεσης οργανικών υλικών, φυτικών υπολειμμάτων και ιστών, με σκοπό τον έλεγχο των ασθeneιών, των νηματωδών και των ζιζανίων (Kirkegaard and Sarwar, 1998). Ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί στα είδη του γένους *Brassica* (Σταυρανθή), η χρησιμοποίηση των οποίων ως χλωρής λίπανσης και καλλιέργειας σχεδίου αμεινισποράς έχει μελετηθεί για την αντιμετώπιση φυτοπαρασιτικών νηματωδών. Τα σταυρανθή (μπρόκολο, λάχανο, κουνουπίδι, γογγύλι, ραπανάκι, ελαιοκράμβη, σινάπι, ρόκα κ.α.) παράγουν συγκεκριμένες ενώσεις του θείου, που ονομάζονται γλυκοσινολικές. Μέσω της βιοαπολύμανσης πραγματοποιείται η ενσωμάτωση στο έδαφος των υπολειμμάτων καλλιέργειας σταυρανθών. Η μηχανική ρήξη των κυττάρων τους οδηγεί στην απελευθέρωση των γλυκοσινολικών οξέων, τα οποία υδρολύονται σε αντίστοιχες ισοθειοκυανιούχες ουσίες, οι οποίες είναι τοξικές για πολλούς οργανισμούς του εδάφους. Τα σταυρανθή έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την μείωση πολλών εδαφογενών πληθυσμών μυκήτων, νηματωδών και ζιζανίων, καθώς επίσης και για την βελτίωση των εδαφικών χαρακτηριστικών και της απόδοσης της καλλιέργειας (Larkin and Griffin, 2007). Καθώς προσβάλλονται και τα ίδια από τους κομβονηματώδεις, προβλέπεται να καλλιεργούνται το χειμώνα, ώστε να αποφεύγεται η προσβολή (άρα και η διατήρηση των νηματωδών στον αγρό) και την άνοιξη να ενσωματώνονται στο έδαφος πριν την εγκατάσταση της καλλιέργειας υπό προστασία. Ταυτόχρονη προσθήκη νερού κατά την ενσωμάτωση ή πραγματοποίηση ηλιοαπολύμανσης αυξάνει την αποτελεσματικότητα. Τα είδη *Brassica* καταπολεμούν αποτελεσματικά τις προνύμφες των νηματωδών αλλά δεν αναστέλλουν την εκκόλαψη των αυγών. Εφαρμόζονται σε δόσεις 5-20 % w/w (φυτική μάζα/έδαφος) και η χρήση τους έχει αποδειχθεί από οικονομικές μελέτες πως μειώνει το κόστος της αντιμετώπισης των κομβονηματωδών στο 50 %, αυξάνοντας παράλληλα τη γονιμότητα του εδάφους (PiedraBuena et al., 2006; Ploeg, 2008).

Τέλος, άλλες μελέτες έχουν αναφέρει πως μηχανισμοί διαφορετικοί από την παραγωγή ισοθειοκυανιούχων ουσιών μπορεί να είναι υπεύθυνοι για την μείωση των πληθυσμών των οργανισμών του εδάφους. Για παράδειγμα, αποδείχθηκε πως η προσθήκη αλεσμένων σπόρων ελαιοκράμβης στο έδαφος συνοδεύτηκε από αλλαγές στους πληθυσμούς των παθογόνων

εδάφους, οι οποίες δεν είχαν σχέση με τα επίπεδα των γλυκοσινολικών ουσιών (Mazzola et al., 2001; Cohen et al., 2005).

#### **1.2.4 Φυσικές ουσίες φυτικής προέλευσης**

Έντονη εκδήλωση ενδιαφέροντος έχει παρατηρηθεί για τη χρησιμοποίηση φυσικών ουσιών φυτικής προέλευσης και προϊόντων του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών, ως μέτρο καταπολέμησης των νηματωδών. Ένα παράδειγμα τέτοιων ουσιών είναι τα αιθέρια έλαια. Πρόκειται για πτητικές ουσίες, οι οποίες εξάγονται από μεγάλη ποικιλία φυτών. Αιθέρια έλαια έχουν εξαχθεί από φυτά διαφόρων βοτανικών οικογενειών με σκοπό την *in vitro* αξιολόγηση της νηματωδοκτόνου δράσης τους. Στις οικογένειες αυτές περιλαμβάνονται οι *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Myrtaceae*, *Rutaceae*, *Lauraceae* και *Poaceae* (Andrés et al., 2012).

Συγκεκριμένα για τους κομβονηματώδεις έχει μελετηθεί η νηματωδοκτόνος δράση αιθέριων ελαίων, τα οποία έχουν ληφθεί από τα βοτανικά γένη: *Citrus* (Ntalli et al., 2013), *Chenopodium* (Bai et al., 2011), *Cymbopogon* (Sangwan et al., 1985), *Eucalyptus* (Gupta et al., 2011), *Eugenia* (Sangwan et al., 1990), *Eupatorium* (Sosa et al., 2012), *Lavandula* (Sosa et al., 2012), *Mentha* (Oka et al., 2000), *Oreganum* (Al-Banna et al., 2003; Oka et al., 2000), *Rosmarinus* (Ntalli et al., 2013), *Ruta* (Ntalli et al., 2011), *Thymus* (Oka et al., 2000).

#### **1.2.5 Ανθεκτικές ποικιλίες**

Η χρησιμοποίηση ανθεκτικών ποικιλιών, θεωρείται από πολλούς ως η καλύτερη επιλογή για την διαχείριση φυτοπαρασιτικών νηματωδών, καθώς έχει μικρό οικονομικό κόστος, μπορεί να συνδυαστεί με άλλες μεθόδους αντιμετώπισης και αποτελεί φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο (Starr et al., 2002). Η ανθεκτικότητα στους νηματώδεις συνήθως καθορίζεται από τη μείωση της αναπαραγωγής τους, καθώς στα ανθεκτικά φυτά τα επίπεδα αναπαραγωγής είναι μικρότερα από ότι στα ευαίσθητα (Roberts, 2002; Cook and Starr, 2006). Η μείωση της αναπαραγωγής, μακροχρόνια, οδηγεί σε χαμηλότερες πυκνότητες νηματωδών στο έδαφος με αποτέλεσμα την αύξηση της απόδοσης των καλλιεργειών. Η χρησιμοποίηση ανθεκτικών ποικιλιών λοιπόν αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο στην αντιμετώπιση των φυτοπαρασιτικών νηματωδών. Επιπρόσθετα, το οικονομικό κόστος της καλλιέργειας δεν αυξάνεται, καθώς οι

σπόροι των ανθεκτικών ποικιλιών κοστολογούνται σε παρόμοια επίπεδα με αυτούς των ευαίσθητων.

Υπάρχουν, ωστόσο, χαρακτηριστικά της ανθεκτικότητας των ποικιλιών, τα οποία μπορεί να περιορίσουν την χρησιμότητα τους. Για παράδειγμα πολλές φορές η ανθεκτικότητα παρουσιάζει εξειδίκευση σε επίπεδο είδους ή ακόμα και σε επίπεδο φυλής (Starr and Mercer, 2009). Αν και κάποιες μορφές ανθεκτικότητας σε κομβονηματώδεις, όπως αυτή που οφείλεται στο γόνο *Mi* (Williamson, 1998) στην τομάτα, είναι αποτελεσματικές σε περισσότερα του ενός είδη, οι περισσότερες στοχεύουν σε ένα είδος. Ένας άλλος πολύ σημαντικός παράγοντας της μείωσης της αποτελεσματικότητας των ανθεκτικών ποικιλιών είναι η παρουσία παθότυπων πληθυσμών, οι οποίοι πολλαπλασιάζονται σε αυτές στον ίδιο βαθμό με τις ευαίσθητες. Φαινόμενο αναμενόμενο, καθώς με την εξάπλωση ενός γονιδίου ανθεκτικότητας και συνεχή καλλιέργεια των φυτών στα οποία έχει ενσωματωθεί, είναι αρκετά πιθανή η ανάπτυξη παθότυπων πληθυσμών για αυτό το γονίδιο (Starr and Mercer, 2009). Βέβαια η ύπαρξη αυτών των πληθυσμών δεν είναι απαραίτητο πως καθιστά την χρησιμοποίησή τους απόλυτα αναποτελεσματική. Με συγκεκριμένες πρακτικές η παρουσία τους μπορεί να περιορισθεί σε ορισμένες περιοχές και να ελεγχθεί ο ρυθμός εξάπλωσης τους. Επίσης μπορεί να υπάρξει έλεγχος της πυκνότητας των παθότυπων ατόμων μέσα σε έναν πληθυσμό. Για παράδειγμα, εναλλάσσοντας την καλλιέργεια ανθεκτικών με ευαίσθητες ποικιλίες και φυτά μη ξενιστές, η ανάπτυξη των παθότυπων ατόμων ευνοείται μόνο κατά την χρησιμοποίηση των ανθεκτικών ποικιλιών (Starr and Mercer, 2009). Έτσι, περιστασιακή χρησιμοποίηση ευαίσθητης ποικιλίας, διατηρεί χαμηλά το ποσοστό της παθογένειας μέσα στον πληθυσμό.

Η υιοθέτηση μίας ανθεκτικής ποικιλίας από τους παραγωγούς μίας περιοχής, προϋποθέτει πως η απόδοση της σε τελικό προϊόν θα είναι αντίστοιχη αυτής της ευαίσθητης ή υψηλότερη. Σίγουρα στην περίπτωση που δεν προσβληθεί από κομβονηματώδεις στον ίδιο βαθμό με μία ευαίσθητη, η τελική απόδοση της καλλιέργειας θα είναι υψηλότερη. Η αυξημένη απόδοση όμως κάτω από αυτές τις συνθήκες δεν εξασφαλίζει την επιτυχία της. Η νέα ποικιλία θα πρέπει να είναι σε θέση να ανταγωνιστεί τις ήδη υπάρχουσες αποδοτικότερες ποικιλίες. Η αξιολόγηση, λοιπόν, της απόδοσης μιας ανθεκτικής ποικιλίας και των ποιοτικών χαρακτηριστικών των συγκομιζόμενων προϊόντων της είναι απαραίτητη και δεν θα πρέπει να υποτιμάται.

Υπάρχουν πολλά παραδείγματα ανάπτυξης ανθεκτικών ποικιλιών σε ένα ή περισσότερα είδη του γένους *Meloidogyne*. Γονίδια ανθεκτικότητας έχουν απομονωθεί από πολλά αυτοφυή



φυτά και έχουν μεταφερθεί σε εμπορικές ποικιλίες. Από τα πιο γνωστά παραδείγματα είναι ο γόνος *Mi*, ο οποίος απομονώθηκε από το είδος *Lycopersicon peruvianum* (Abad et al., 2003). Σε όλες τις διαθέσιμες ανθεκτικές ποικιλίες τομάτας στους κομβοηματώδεις, έχει εισαχθεί ο γόνος *Mi*, ο οποίος προσδίδει ανθεκτικότητα στα είδη *M.javanica*, *M. incognita* και *M. arenaria* σε μέτριες θερμοκρασίες εδάφους (Starr and Mercer, 2009). Σε διάφορες χώρες, μεταξύ των οποίων και η Ελλάδα, έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη παθότυπων πληθυσμών για τις παραπάνω ποικιλίες (Tzortzakakis et al., 2016). Η παθογένεια των πληθυσμών αυτών μπορεί να δημιουργηθεί είτε με φυσικό τρόπο (Williamson, 1998) είτε μετά από συνεχή έκθεση τους σε φυτά τομάτας με το γόνο *Mi* (Castagnone-Sereno et al., 1994). Βασικό μειονέκτημα του γόνου *Mi* αποτελεί και η ανατροπή της έκφρασης του σε θερμοκρασίες εδάφους άνω των 28°C (Cortada et al., 2009). Στη συνέχεια γονίδια ανθεκτικότητας έχουν προστεθεί και σε άλλα είδη φυτών. Στην πιπεριά, για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ο κυρίαρχος γόνος N (Thies and Fery, 2000) και οι πέντε κυρίαρχοι γόνοι Me (Me1 – Me5) (Djian-Caporalino et al., 1999).

Γενικότερα, όμως, μέχρι σήμερα δεν έχει δοθεί μεγάλη βάση στην ανάπτυξη ανθεκτικών ποικιλιών στους κομβοηματώδεις. Πιθανοί λόγοι είναι η έλλειψη γνώσης της οικονομικής απώλειας, που προκαλεί η προσβολή κομβοηματωδών και η μεγάλη διαθεσιμότητα σε νηματωδοκτόνα κατά τα προηγούμενα χρόνια. Μεγαλύτερη έρευνα μπορεί να οδηγήσει στην εύρεση περισσότερων γόνων, καθώς υπάρχουν ενδείξεις διαφόρων πηγών ανθεκτικότητας για ένα μεγάλο εύρος καλλιεργειών σε τροπικές, υποτροπικές και εύκρατες περιοχές (Evans et al., 1993; Luc et al., 2005). Τέλος, ιδιαίτερη έμφαση κατά την ανάπτυξη ανθεκτικών ποικιλιών, πρέπει να δίνεται στην τελική απόδοση παραγωγής. Είναι απαραίτητη η συνεργασία του τομέα της νηματωδολογίας με αυτόν της βελτίωσης των φυτών, με σκοπό την εισαγωγή της ανθεκτικότητας σε ανταγωνιστικές ποικιλίες φυτών.

### **1.2.6 Ολοκληρωμένη αντιμετώπιση κομβοηματωδών**

Οι παραγωγοί συνεχώς αποζητούν λύσεις εναντίον εχθρών και ασθενειών, με στόχο τη βελτίωση της απόδοσης των καλλιεργειών τους και της ποιότητας των συγκομιζόμενων προϊόντων. Στην περίπτωση των φυτοπαρασιτικών νηματωδών, η αντιμετώπιση μπορεί να αφορά την εφαρμογή μίας μεμονωμένης πρακτικής (π.χ. προφυτρωτική εφαρμογή νηματωδοκτόνου) ή τον συνδυασμό δύο ή περισσότερων μεθόδων (π.χ. περιστασιακή χρήση νηματωδοκτόνου σε συστήματα εναλλαγής ευαίσθητων, ανθεκτικών και μη ξενιστών

καλλιεργειών). Η μείωση στη διαθεσιμότητα των νηματωδοκτόνων έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων τρόπων αντιμετώπισης των κομβονηματωδών, όπως διάφορες καλλιεργητικές πρακτικές (π.χ. προσθετικά εδάφους), βιοαπολύμανση, ανθεκτικές ποικιλίες κ.α.. Ο συνδυασμός αυτών των μεθόδων μέσα σε ένα σύστημα ολοκληρωμένης αντιμετώπισης, αποτελεί την καλύτερη και πολλές φορές μόνη λύση στη διαχείριση τους. Έτσι λοιπόν, απαραίτητη είναι η διοχέτευση των αποτελεσμάτων της έρευνας στους παραγωγούς, ώστε να ενημερώνονται για τις νέες πρακτικές, που έχουν στη διάθεση τους.

Η χρησιμοποίηση ανθεκτικών ποικιλιών και υποκειμένων, σε συνδυασμό με προγράμματα αμειψισποράς και χημική αντιμετώπιση, έχει αποδειχθεί αποτελεσματική για τη διαχείριση πληθυσμών του γένους *Meloidogyne* (Nyczerpir and Thomas, 2009). Αντίθετα, η βιολογική αντιμετώπιση δεν έχει παρουσιάσει επαρκή αποτελέσματα μέχρι στιγμής. Πιθανός λόγος μπορεί να είναι η προσδοκία αποτελεσμάτων ισάξιων αυτών της χημικής. Η ενσωμάτωση της σε προγράμματα ολοκληρωμένης αντιμετώπισης πιθανά να αυξήσει την αποτελεσματικότητά της, καθώς ο συνδυασμός πρακτικών συχνά παρουσιάζει θετική αλληλεπίδραση [π.χ. προσθετικά εδάφους και βιολογική αντιμετώπιση (Viaene et al., 2013)]. Η συνέχεια της έρευνας γύρω από την βιολογία των νηματωδών του γένους *Meloidogyne* και της αλληλεπίδρασης τους με τους διάφορους ξενιστές είναι απαραίτητη, ώστε να υπάρξει πρόοδος στην εύρεση εναλλακτικών τρόπων αντιμετώπισης και βελτίωσης των ήδη υπάρχόντων.

## 2 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες εδάφους σε υπό κάλυψη καλλιέργειες κηπευτικών στην ευρύτερη περιοχή της Κυπαρισσίας, όπου οι κομβονηματώδεις αποτελούν έναν από τους σημαντικότερους εχθρούς. Σκοπός ήταν η απομόνωση των διαφόρων πληθυσμών κομβονηματωδών και η συλλογή πληροφοριών, οι οποίες θα συνεισφέρουν στην αποτελεσματικότερη διαχείριση τους στην περιοχή. Συγκεκριμένα τέθηκαν οι εξής επιμέρους στόχοι:

1. Εξαγωγή προνυμφών κομβονηματωδών δευτέρου σταδίου ανάπτυξης και προσδιορισμός των επιπέδων της πυκνότητας τους στο έδαφος κάθε υπό κάλυψης καλλιέργειας, στην οποία πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία εδάφους.
2. Διερεύνηση της αναλογίας των τριών κύριων ειδών κομβονηματωδών *M. javanica*, *M. incognita* και *M. arenaria* στους πληθυσμούς που απομονώθηκαν με μοριακές τεχνικές.
3. Αξιολόγηση της παθογένειας των συλλεγόμενων πληθυσμών σε ανθεκτικά υβρίδια τομάτας, στα οποία έχει ενσωματωθεί ο γόνος *Mi*, ο οποίος προσδίδει ανθεκτικότητα στα τρία κύρια είδη κομβονηματωδών (*M. javanica*, *M. incognita* και *M. arenaria*). Ο έλεγχος επιτεύχθηκε με τεχνητή μόλυνση φυτών ευαίσθητου υβριδίου τομάτας και φυτών ανθεκτικού υβριδίου τομάτας και σύγκριση της προσβολής μεταξύ των δύο υβριδίων.
4. Η *in vitro* εξέταση πιθανής ανάπτυξης ανθεκτικότητας των πληθυσμών στις δραστικές ουσίες oxamyl και fosthiazate μέσω βιοδοκιμών σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις τους.

### 3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες εδάφους σε υπό κάλυψη καλλιέργειες στην ευρύτερη περιοχή της Κυπαρισσίας. Τα δείγματα εδάφους μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο Γεωργικής Ζωολογίας και Εντομολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, όπου αποθηκεύτηκαν και ακολούθησαν ο προσδιορισμός της πυκνότητας προνυμφών κομβονηματοδών δευτέρου σταδίου ανάπτυξης (J2s) και οι πειραματικές διαδικασίες για την αξιολόγηση της παθογένειας των συλλεγόμενων πληθυσμών κομβονηματοδών σε ανθεκτικά υβρίδια τομάτας και την αξιολόγηση της ευαισθησίας τους σε μη καπνιστικά νηματοδοκτόνα. Οι μοριακές τεχνικές για την ταυτοποίηση το είδους των πληθυσμών κομβονηματοδών πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

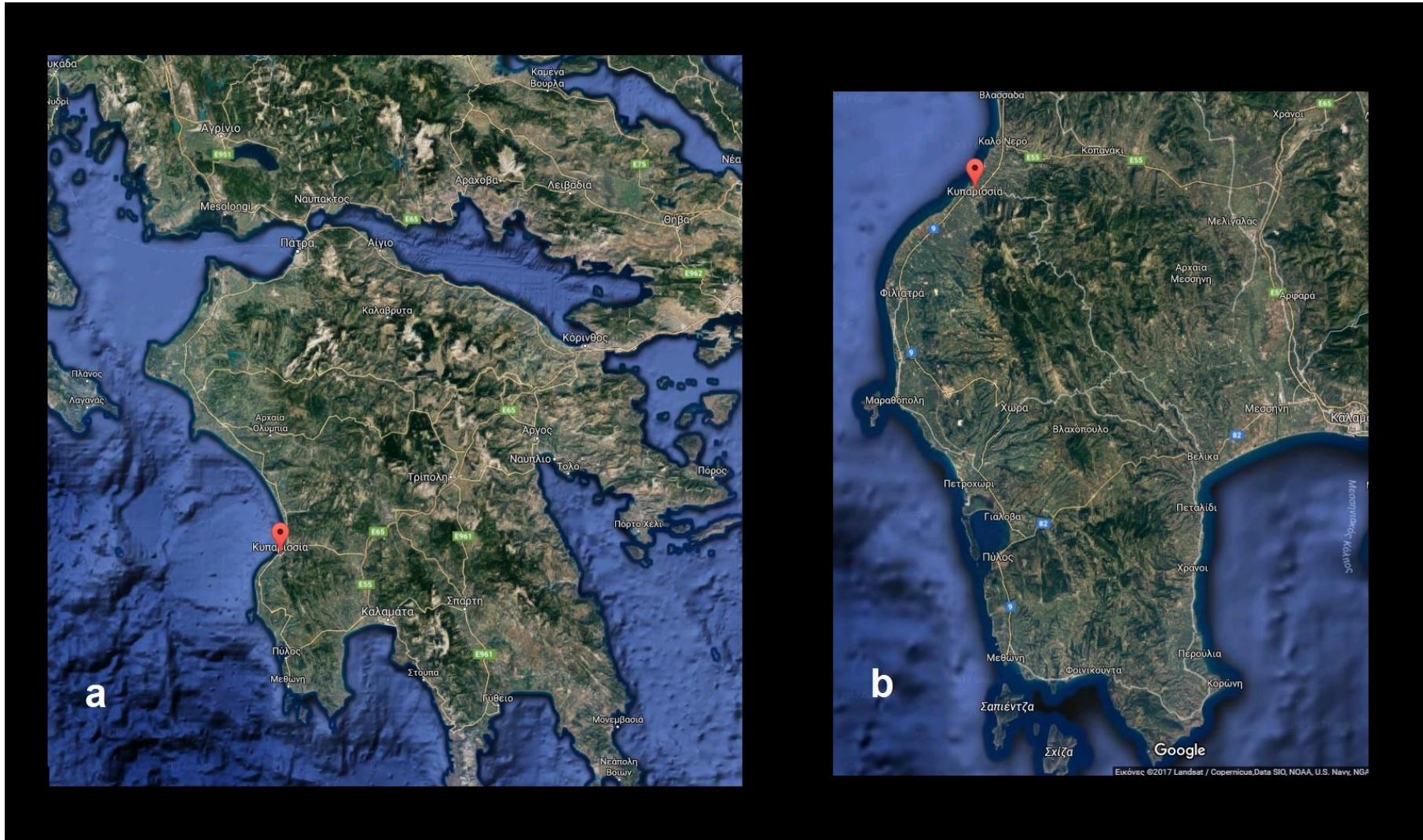
#### 3.1 Δειγματοληψία

Η Κυπαρισσία βρίσκεται στο νομό Μεσσηνίας στη νοτιοδυτική Πελοπόννησο (Εικόνα 3.1). Στην ευρύτερη περιοχή (Τριφυλία) η έκταση των θερμοκηπιακών εγκαταστάσεων υπολογίζεται περίπου ως 3000 στρέμματα. Η περιοχή χωρίστηκε σε τέσσερις υποπεριοχές (Εικόνα 3.2):

- α) Περιοχή Έλαια
- β) Περιοχή Κυπαρισσία
- γ) Περιοχή Φιλιατρά
- δ) Περιοχή Γαργαλιάνοι

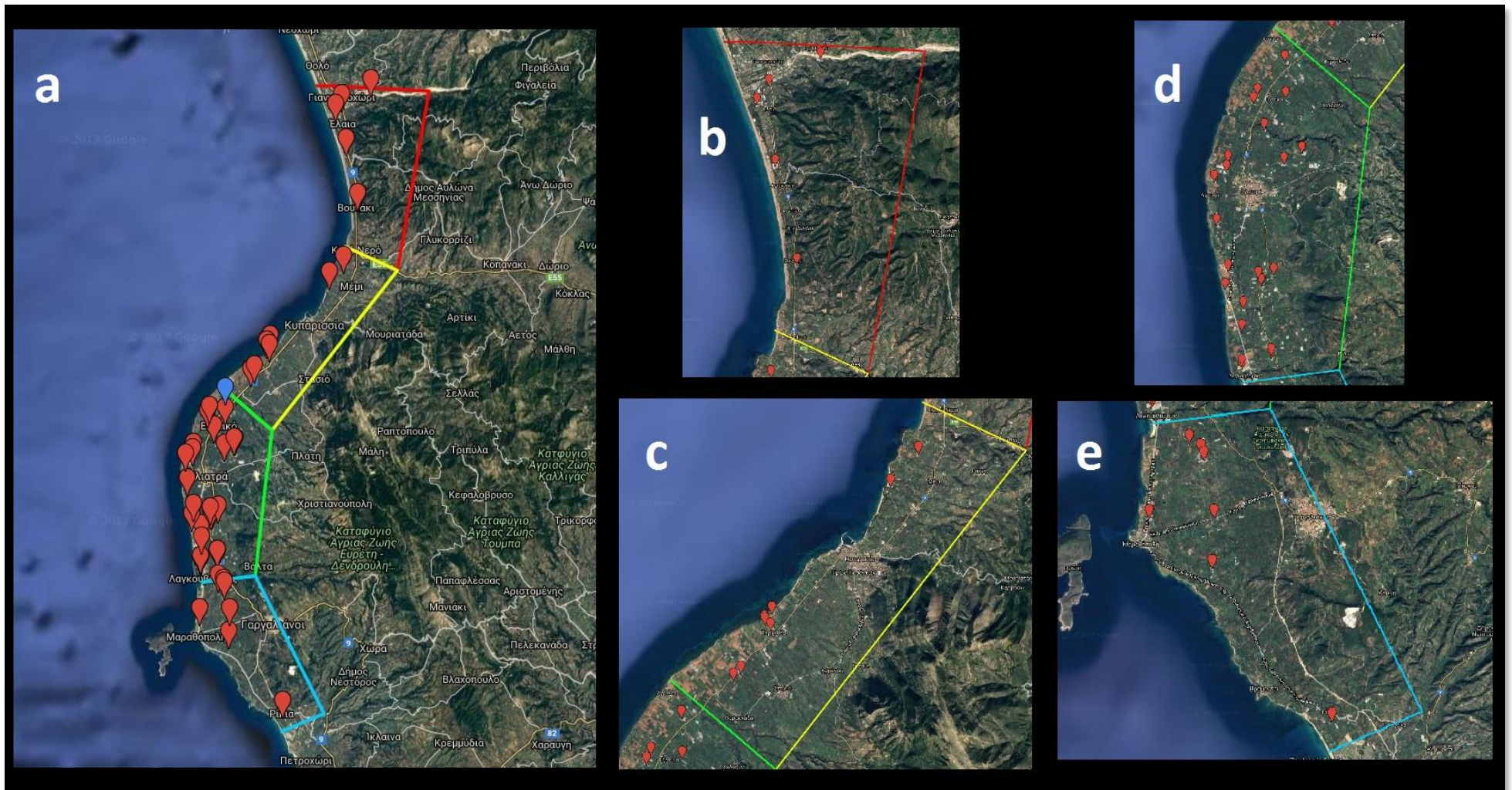
Ο αριθμός δειγμάτων κάθε υποπεριοχής ήταν ανάλογος της συνολικής έκτασης των θερμοκηπιακών καλλιεργειών στην περιοχή. Συγκεκριμένα συλλέχθηκαν 5 δείγματα από την περιοχή της Ελαίας, 8 δείγματα από την περιοχή της Κυπαρισσίας, 25 δείγματα από την περιοχή των Φιλιατρών και 7 δείγματα από την περιοχή των Γαργαλιάνων (Εικόνα 3.2).

Για κάθε θερμοκηπιακή καλλιέργεια λήφθηκαν δείγματα από συνολική έκταση ενός στρέμματος. Κάθε δείγμα αποτελούταν από έδαφος, το οποίο λήφθηκε από  $64 \pm 2$  θέσεις



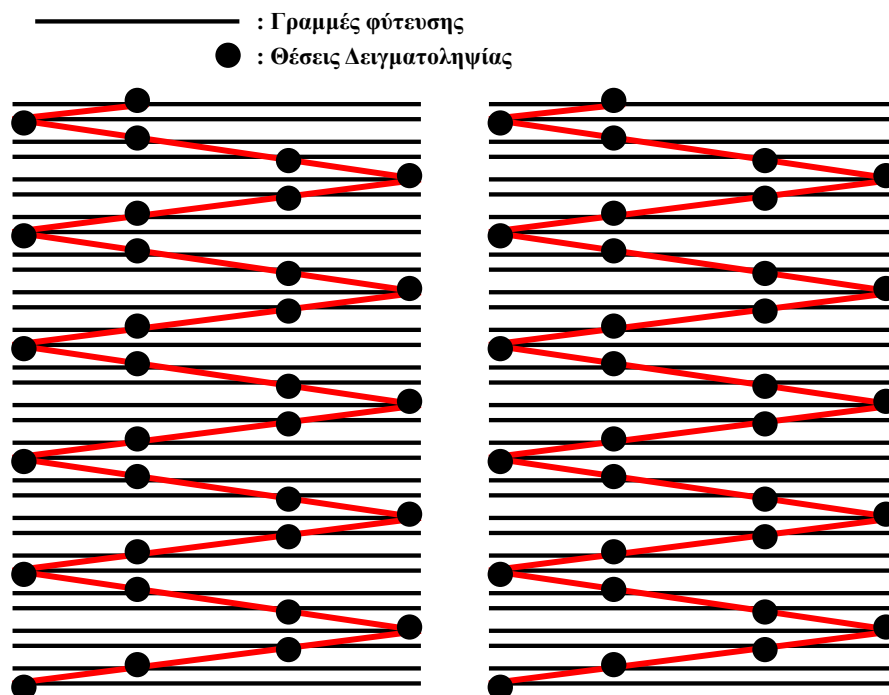
Εικόνα 3.1 α) Η θέση της Κυπαρισσίας στην περιοχή της Πελοποννήσου, β) η θέση της Κυπαρισσίας στο Νομό της Μεσσηνίας.





**Εικόνα 3.2** α) Η περιοχή των δειγματοληψιών χωρισμένη σε 4 υποπεριοχές, β) Περιοχή Έλαια, γ) Περιοχή Κυπαρισσία, δ) Περιοχή Φιλιατρά, ε) Περιοχή Γαργαλιάνοι

εντός της έκτασης του ενός στρέμματος. Το σχέδιο της δειγματοληψίας («ζικ-ζακ») παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.3. Οι δειγματοληψίες έγιναν σε βάθος 0-40 cm και σε απόσταση 2-4 cm από το λαιμό του φυτού. Από κάθε θέση λήφθηκε ποσότητα εδάφους 50-80 cm<sup>3</sup>, χρησιμοποιώντας δειγματολήπτη εδάφους, ο οποίος απεικονίζεται στην Εικόνα 3.4. Το έδαφος για κάθε δείγμα συλλεγόταν αρχικά σε πλαστικό κουβά και στη συνέχεια μεταφερόταν σε πλαστική σακούλα.



**Εικόνα 3.3** Σχέδιο δειγματοληψίας εδάφους σε υπό κάλυψη καλλιέργειας κηπευτικών συνολικής έκτασης ενός στρέμματος. Οι θέσεις δειγματοληψίας επιλέγονταν επί των γραμμών φύτευσης κατά "ζικ-ζακ" κίνηση (κόκκινη γραμμή) εντός του θερμοκηπίου όπως παρουσιάζεται στην εικόνα.



**Εικόνα 3.4** Ο δειγματολήπτης εδάφους που χρησιμοποιήθηκε. Η συλλογή εδάφους έγινε σε βάθος 0-40 cm και 2-4 cm απόσταση από το λαιμό του φυτού.



Τα συλλεγόμενα δείγματα μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο Γεωργικής Ζωολογίας και Εντομολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και αποθηκεύτηκαν στους  $8 \pm 1$  °C εντός θαλάμου ελεγχόμενων συνθηκών (Εικόνα 3.5).



**Εικόνα 3.5** Θάλαμος ελεγχόμενων συνθηκών, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για την αποθήκευση των δειγμάτων εδάφους. Η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 8 °C.

Εντός επτά ημερών από τη στιγμή της αποθήκευσης πραγματοποιήθηκε εξαγωγή J2s από 500 cm<sup>3</sup> εδάφους με σκοπό τον προσδιορισμό της πυκνότητάς τους στο έδαφος των εκτάσεων, στις οποίες πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία. Άμεσα ακολούθησε ανάμιξη του εδάφους κάθε δείγματος με φυτόχωμα εμπορίου, ελεύθερο από φυτοπαρασιτικούς νηματώδεις, σε αναλογία 1:1 και χρησιμοποίηση του μίγματος για μεταφύτευση, σε πλαστικές γλάστρες των 500 cm<sup>3</sup>, φυτών τομάτας με σκοπό την μόλυνση τους από τους κομβονηματώδεις που περιέχονται εντός του εδάφους κάθε δείγματος και την διατήρηση των πληθυσμών για περαιτέρω μελέτη.



## 3.2 Προσδιορισμός επιπέδων πυκνότητας πληθυσμών

### 3.2.1.1 Εξαγωγή προνυμφών δευτέρου σταδίου από δείγμα εδάφους

Η παρακάτω διαδικασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γεωργικής Ζωολογίας και Εντομολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Για την απομόνωση προνυμφών δευτέρου σταδίου ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Σε νερό εντός πλαστικού κουβά 10L διαλύθηκαν 500 cm<sup>3</sup> εδάφους από κάθε δείγμα. Το εδαφικό διάλυμα μεταφέρθηκε σε άλλον πλαστικό κουβά μέσα από κόσκινο 2 mm και στη συνέχεια από κόσκινο 250 μm με σκοπό την απομάκρυνση μεγάλων σωματιδίων (Εικόνα 3.6).
- Η διαδικασία επαναλήφθηκε για κόσκινα διαστάσεων 90 μm, 75 μm, 53 μm και 38 μm (Εικόνα 3.6). Το υλικό που συγκρατούταν σε αυτά τα κόσκινα, συλλεγόταν με χρήση υδροβολέα σε πλαστικό ποτήρι ζέσεως. Στη συνέχεια το εδαφικό διάλυμα μεταφερόταν σε φύλλο χαρτιού εντός μικρότερου κόσκινου (μεγέθους οπών 2mm), το οποίο βρισκόταν εντός πλαστικού δίσκου (τροποποιημένη μέθοδος Baermann) (Εικόνα 3.7). Ο πλαστικός δίσκος περιείχε απεσταγμένο νερό, η ελεύθερη επιφάνεια του οποίου εφαιπτόταν με την κάτω επιφάνεια του κόσκινου. Ο πλαστικός δίσκος καλύφθηκε με δίσκο ίδιων διαστάσεων, ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση του νερού. Οι προνύμφες των νηματωδών μετακινούμενες διαπέρασαν τους πόρους του φύλλου χαρτιού και του κόσκινου και εισήλθαν στο νερό. Στη συνέχεια συλλέχθηκαν με το νερό ως αιώρημα.
- Οι δίσκοι Baermann παρέμειναν σε θερμοκρασία 25±2 °C για τέσσερις ημέρες. Το αιώρημα προνυμφών που συλλέχθηκε, αναδεύτηκε και με πιπέτα λήφθηκε ποσότητα αιωρήματος 1 mL, η οποία μεταφέρθηκε σε πηγάδι πλάκας πολυστυρενίου Cellstar® 24 πηγαδιών. Με τη βοήθεια ανάστροφου μικροσκοπίου (Zeiss) (Εικόνα 3.8) σε μεγέθυνση 40x μετρήθηκε ο αριθμός των J2s σε ποσότητα 1 mL αιωρήματος. Η διαδικασία επαναλήφθηκε δύο φορές και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των δύο μετρήσεων. Με αναγωγή στο συνολικό όγκο του αιωρήματος υπολογίστηκε ο αριθμός προνυμφών σε 500 cm<sup>3</sup> εδάφους.



**Εικόνα 3.6** Εξαγωγή προνυμφών δευτέρου σταδίου με χρήση κοσκίνων.



**Εικόνα 3.7** Τροποποιημένη μέθοδος Baermann.



Εικόνα 3.8 Ανάστροφο μικροσκόπιο(Zeiss).

### 3.3 Διατήρηση πληθυσμών

Με σκοπό την απομόνωση και διατήρηση των πληθυσμών κομβονηματωδών, πραγματοποιήθηκαν μεταφυτεύσεις σποροφύτων τομάτας σε έδαφος από τα συλλεγόμενα δείγματα. Έδαφος από κάθε δείγμα αναμειχθηκε με φυτόχωμα σε αναλογία 1:1. Το μίγμα μεταφέρθηκε σε πλαστικές γλάστρες όγκου 500 cm<sup>3</sup>. Για κάθε πληθυσμό χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις πλαστικές γλάστρες. Στις δύο μεταφυτεύτηκε σπορόφυτο ευαίσθητου, στους κομβονηματώδεις, υβριδίου τομάτας cv. Belladonna και στις άλλες δύο μεταφυτεύτηκε σπορόφυτο ανθεκτικού (γόνος *Mi*) υβριδίου τομάτας cv. Silvana. Τα φυτά διατηρήθηκαν σε δωμάτιο ανάπτυξης ελεγχόμενων συνθηκών σε 16h φωτοπερίοδο και θερμοκρασία 24-26°C. Η άρδευση και λίπανση πραγματοποιούνταν όποτε χρειαζόταν. Με το πέρας επτά εβδομάδων – διάστημα στο οποίο είχε ολοκληρωθεί ο βιολογικός κύκλος των κομβονηματωδών – το ριζικό σύστημα των φυτών πλύθηκε με νερό ώστε να απομακρυνθεί το έδαφος. Στη συνέχεια

οι ρίζες των φυτών παρατηρήθηκαν σε στερεοσκόπιο και εξετάστηκε η ύπαρξη ωόσακκων στην επιφάνεια τους.

### 3.4 Έλεγχος παθογένειας πληθυσμών σε ανθεκτικό υβρίδιο τομάτας

Οι παρακάτω πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Γεωργικής Ζωολογίας και Εντομολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Πραγματοποιήθηκαν τεχνητές μολύνσεις φυτών του ευαίσθητου υβριδίου τομάτας cv. Belladonna και του ανθεκτικού υβριδίου τομάτας cv. Silvana με J2s, για την αξιολόγηση της παθογένειας των συλλεγόμενων πληθυσμών σε ανθεκτικά υβρίδια τομάτας, στα οποία έχει ενσωματωθεί ο γόνος *Mi*. Φυτά του ανθεκτικού υβριδίου τομάτας cv. Silvana, τα οποία αναπτύχθηκαν σε έδαφος από κάθε δείγμα αναμειγμένο με φυτόχωμα, εμφάνισαν ωόσακκους στην επιφάνεια των ριζών τους στην περίπτωση δεκαεννέα δειγμάτων. Οι αντίστοιχοι δεκαεννέα πληθυσμοί επιλέχθηκαν για αξιολόγηση της παθογένειας τους σε ανθεκτικά υβρίδια τομάτας. Επίσης, επιλέχθηκαν δύο πληθυσμοί, οι οποίοι δεν εμφάνισαν ωόσακκους στο ριζικό σύστημα των φυτών cv. Silvana. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις πληθυσμοί γνωστής παθογένειας, οι οποίοι διατηρούνταν στο Εργαστήριο Νηματωδολογίας του Ινστιτούτου Ελιάς, Υποτροπικών Φυτών και Αμπέλου στο Ηράκλειο Κρήτης (ΕΛΓΟ - ΔΗΜΗΤΡΑ). Ένας από αυτούς είναι μη παθότυπος για υβρίδια τομάτας με το γόνο *Mi* και τρεις από αυτούς είναι παθότυποι (Tzortzakakis et al., 1999, 2014).

**Πίνακας 3.1** Πληθυσμοί που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη παθογένειας ανθεκτικής ποικιλίας τομάτας.

19 πληθυσμοί που παρουσίασαν ωόσακκους σε φυτά cv. Silvana	P-1, P-7, P-11, P-14, P-16, P-18, P-19, P-21, P-23, P-24, P-27, P-28, P-29, P-33, P-36, P-40, P-41, P-44, P-45
2 πληθυσμοί που δεν παρουσίασαν ωόσακκους σε φυτά cv. Silvana	P-5, P-25
4 πληθυσμοί μάρτυρες	1 πληθυσμός μη παθότυπος: P-3 avir ( <i>M. javanica</i> )
	3 πληθυσμοί παθότυποι: P-16 vir ( <i>M. javanica</i> ), P-4/2 vir ( <i>M. javanica</i> ), P-Mi NG vir ( <i>M. incognita</i> )

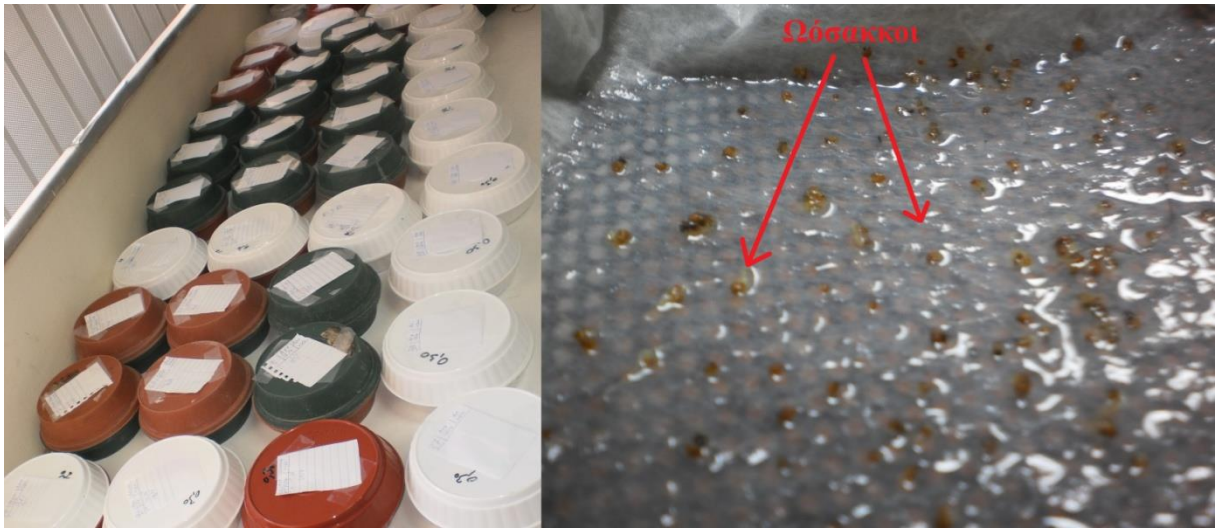
### 3.4.1 Προκαταρκτικός έλεγχος της παθογένειας σε ανθεκτικό υβρίδιο τομάτας και ευαίσθητης ποικιλίας πιπεριάς

Ωόσακκοι από τις ρίζες ευαίσθητων υβριδίων τομάτας cv. Belladonna κάθε πληθυσμού απομονώθηκαν με λαβίδα (Εικόνα 3.9) και τοποθετήθηκαν εντός δίσκων Baermann (Εικόνα 3.10). Οι εκκολαφθείσες J2s συγκεντρώνονταν στο νερό εντός του δίσκου, όπως περιγράφεται παραπάνω (Υποκεφάλαιο 3.2.1.1). Σε καθημερινή βάση και για διάρκεια τεσσάρων ημερών πραγματοποιούνταν συλλογή του αιωρήματος προνυμφών και αντικατάσταση του νερού εντός του δίσκου. Το αιώρημα προνυμφών, το οποίο συλλέχθηκε εντός τεσσάρων ημερών, χρησιμοποιήθηκε για τις τεχνητές μολύνσεις.



Εικόνα 3.9 Απομόνωση ωόσακκων με λαβίδα και τοποθέτηση τους σε δίσκο Baermann.





**Εικόνα 3.10** Εξαγωγή προνυμφών από ωόσακκους μέσω τροποποιημένης μεθόδου Baermann.

Σε πλαστικά δοχεία όγκου 250 cm<sup>3</sup> μεταφυτεύθηκαν 2 σπορόφυτα ευαίσθητου υβριδίου τομάτας cv. Belladonna, 2 σπορόφυτα ανθεκτικού υβριδίου τομάτας cv. Silvana και 1 σπορόφυτο ευαίσθητης σε κομβοηματώδεις πιπεριάς cv. Denver για κάθε πληθυσμό. Για τις μεταφυτεύσεις χρησιμοποιήθηκε φυτόχωμα εμπορίου. Τα σπορόφυτα παρέμειναν σε δωμάτιο ανάπτυξης για 2 εβδομάδες, ώστε να αναπτυχθεί επαρκώς το ριζικό τους σύστημα. Στη συνέχεια με χρήση πιπέτας πραγματοποιήθηκε τεχνητή μόλυνση κάθε φυτού με 400 J2s. Η μόλυνση έγινε περιμετρικά του βλαστού των φυτών σε απόσταση 2 cm από αυτόν σε τέσσερις τρύπες βάθους 2cm (Εικόνα 3.11).



**Εικόνα 3.11** Τεχνητή μόλυνση φυτών τομάτας.

Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε δωμάτιο ελεγχόμενων συνθηκών όπως περιγράφεται παραπάνω (Υποκεφάλαιο 3.3) (Εικόνα 3.12). Η θερμοκρασία ανάπτυξης των φυτών διατηρούνταν κάτω των 28°C, καθώς σε θερμοκρασίες υψηλότερες αυτής ο γόνος *Mi* δεν εκφράζεται (Williamson, 1998). Με το πέρας επτά εβδομάδων το ριζικό σύστημα των φυτών πλύθηκε και με τη χρήση στερεοσκοπίου μετρήθηκαν οι ωόσακκοι στην επιφάνεια της ρίζας κάθε φυτού.



Εικόνα 3.12 Ανάπτυξη φυτών σε δωμάτιο ελεγχόμενων συνθηκών.

### 3.4.2 Αξιολόγηση της παθογένειας σε ανθεκτικό υβρίδιο τομάτας

Σε πλαστικά δοχεία όγκου 250 cm<sup>3</sup> μεταφυτεύθηκαν 4 σπορόφυτα ευαίσθητης τομάτας cv. *Belladonna* και 4 σπορόφυτα ανθεκτικής τομάτας cv. *Silvana* για κάθε πληθυσμό. Η τεχνητή μόλυνση με 400 J2s και η ανάπτυξη των φυτών πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται παραπάνω (Υποκεφάλαιο 3.4.1). Με το πέρας των επτά εβδομάδων διατήρησης των φυτών, οι ρίζες πλύθηκαν και με τη χρήση στερεοσκοπίου μετρήθηκαν οι ωόσακκοι στην επιφάνεια της κάθε μίας. Από κάθε φυτό συλλέχθηκαν με λαβίδα 10 ωόσακκοι για την αξιολόγηση του αριθμού των ωών μέσα σε αυτούς. Συγκεκριμένα, για κάθε φυτό των δύο υβριδίων, 10 ωόσακκοι (σύνολο 40 για τα τέσσερα φυτά) μεταφέρθηκαν σε erpendorf 1,5 mL, το οποίο περιείχε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 1% για διάλυση των ωόσακκων και απελευθέρωση των ωών (Hussey and Barker, 1973). Τα σωληνάρια αναδεύθηκαν για 10 min με χρήση

vortex. Στη συνέχεια μετρήθηκε ο αριθμός των ωών στα 100  $\mu\text{L}$ , υπολογίστηκε ο συνολικός αριθμός τους στο erpendorf και με αναγωγή στη μονάδα υπολογίστηκε ο μέσος αριθμός ωών ενός ώσασακκου για κάθε συνδυασμό υβριδίου και πληθυσμού. Αυτός ο αριθμός χρησιμοποιήθηκε για την σύγκριση του δυναμικού αναπαραγωγής κάθε πληθυσμού στο ευαίσθητο και στο ανθεκτικό υβρίδιο τομάτας.

### **3.5 Διερεύνηση της αναλογίας των ειδών *M. javanica*, *M. incognita*, *M. arenaria* μεταξύ των πληθυσμών με χρήση μοριακών τεχνικών**

#### **3.5.1 Προκαταρκτικές δοκιμές για μοριακή ανίχνευση των ειδών *M. javanica*, *M. incognita*, *M. arenaria***

Πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικές δοκιμές για μοριακή ανίχνευση των τριών ειδών κομβονηματωδών *M. javanica*, *M. incognita* και *M. arenaria*. Για τις δοκιμές χρησιμοποιήθηκαν ταυτοποιημένοι πληθυσμοί των τριών ειδών, οι οποίοι διατηρούνταν στο Εργαστήριο Γεωργικής Ζωολογίας και Εντομολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και προέρχονταν από το Εργαστήριο Νηματωδολογίας του Ινστιτούτου Ελιάς, Υποτροπικών Φυτών και Αμπέλου στο Ηράκλειο Κρήτης (ΕΛΓΟ - ΔΗΜΗΤΡΑ). Η μοριακή ανίχνευση έγινε με χρήση εξειδικευμένων εκκινητών σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με βάση τους Adam et al., 2007 και τους Kiewnick et al., 2013. Χρησιμοποιήθηκε πρωτόκολλο εξαγωγής DNA από 100 προνύμφες δευτέρου σταδίου (Adam et al., 2007), αντίδρασης PCR για ανίχνευση των τριών ειδών με εξειδικευμένους εκκινητές, ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR σε πηκτή αгарόζης και ανάλυσης αποτελεσμάτων σε φωτισμό UV. Προϊόντα ηλεκτροφόρησης 670, 420 και 300 ζευγών βάσεων (bp) αντιστοιχούν στα είδη *M. javanica*, *M. arenaria* και *M. incognita* (Adam et al., 2007; Kiewnick et al., 2013). Οι μοριακές τεχνικές πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.



### 3.5.2 Ανίχνευση των τριών τροπικών ειδών *M. javanica*, *M. incognita*, *M. arenaria* με χρήση μοριακής μεθόδου

#### ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΕΞΑΓΩΓΗ DNA

Αιώρημα με περίπου 100 J2s κάθε πληθυσμού μεταφέρθηκε σε eppendorf 1,5 mL. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 2 min, ώστε οι προνύμφες να κατευθυνθούν στον πυθμένα του eppendorf. Το υπερκείμενο νερό αφαιρέθηκε με χρήση πιπέτας.

#### ΕΞΑΓΩΓΗ DNA

Σε κάθε δείγμα 100 J2s προστέθηκαν 10 µL Worm Lysis Buffer (WLB: 50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8.2, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 60 µg/L proteinase K, 0.45% NP40, 0.45% Tween 20 και 0.01% gelatin) (Adam et al., 2007). Ακολούθησε πολτοποίηση των προνυμφών και προσθήκη 90 µL WLB.

Ακολούθησαν:

- Φυγοκέντρηση σε 13,500 rpm για 2 min
- Παραμονή για 15 min σε θερμοκρασία -80°C
- Παραμονή για 60 min σε θερμοκρασία 60°C
- Παραμονή για 10 min σε θερμοκρασία 90°C
- Άμεση χρήση για PCR ή αποθήκευση σε θερμοκρασία -20°C (Adam et al., 2007).

#### PCR

Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω ζεύγη SCAR εκκινητών.

**Πίνακας 3.2** Ζεύγη εκκινητών PCR που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των τριών ειδών.

Είδος προς ανίχνευση	Κωδικός εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητών 5'-3'	Πηγή
<i>M. javanica</i>	F jav	GGTGC GCGATTGAACTGAGC	(Zijlstra et al., 2000)
	Rjav	CAGGCCCTTCAGTGGA ACTATAC	
<i>M. arenaria</i>	F ar	TCGGCGATAGAGGTA AATGAC	(Zijlstra et al., 2000)
	R ar	TCGGCGATAGACACTACAACT	
<i>M. incognita</i>	Mi2F4	ATGAAGCTAAGACTTTGGGCT	(Kiewnick et al., 2013)
	Mi1R1	TCCCGCTACACCCTCAACTTC	

Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν:

- 5μL PCR buffer 5x (KAPA Biosystems)
- 2.5 μL dNTPs 2mM (Jena Bioscience)
- 0.5 μL κάθε εκκινητή αρχικής συγκέντρωσης 25 μM
- 3μL MgCl<sub>2</sub> 25 mM
- 0.2μL Taq polymerase (KAPA Biosystems)
- 2μL DNA
- 11.3 μL dd H<sub>2</sub>O

Η αντίδραση PCR για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε τρεις φορές με τρία διαφορετικά Master Mix (ένα για κάθε διαφορετικό ζεύγος εκκινητών). Οι συνθήκες κάθε αντίδρασης παρουσιάζονται παρακάτω:

**Πίνακας 3.3 Συνθήκες PCR για τα τρία διαφορετικά ζεύγη εκκινητών.**

F jav, R jav		F ar, R ar		Mi2F4, Mi1R1	
95 °C: 3 min		95 °C: 3 min		95 °C: 3 min	
95°C: 30 sec	35 κύκλοι	95°C: 30 sec	35 κύκλοι	95°C: 30 sec	35 κύκλοι
64 °C: 30 sec		59 °C: 30 sec		59 °C: 30 sec	
72 °C: 2 min		72 °C: 2 min		72 °C: 2 min	
72 °C: 7 min		72 °C: 7 min		72 °C: 7 min	
8 °C: ∞		8 °C: ∞		8 °C: ∞	

Με το τέλος της αντίδρασης τα δείγματα είτε αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -20°C είτε προετοιμάστηκαν για ηλεκτροφόρηση.

### ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

- Έγινε προσθήκη 2.5 μL χρωστικής 10x σε 25 μL προϊόντος PCR
- Ο διαχωρισμός των προϊόντων της PCR έγινε σε πήγμα αγαρόζης 1% σε TAE 1x στα 100V
- Ακολούθησε χρώση του πηγματος αγαρόζης σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου για 15-20 min και ανάλυση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Για κάθε πληθυσμό η αντίδραση πραγματοποιήθηκε δύο φορές και κάθε φορά χρησιμοποιούταν ως θετικός μάρτυρας το DNA ταυτοποιημένων πληθυσμών για τα τρία είδη.

### 3.6 *In vitro* αξιολόγηση της ανθεκτικότητας σε νηματωδοκτόνα

Οι παρακάτω πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Γεωργικής Ζωολογίας και Εντομολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

#### Πληθυσμοί κομβονηματωδών

Δεκατρείς πληθυσμοί κομβονηματωδών χρησιμοποιήθηκαν για αξιολόγηση της πιθανής ανάπτυξης ανθεκτικότητας σε μη καπνιστικά νηματωδοκτόνα. Οι πληθυσμοί προέρχονταν από θερμοκήπια κηπευτικών με υψηλά επίπεδα πυκνότητας κομβονηματωδών, στα οποία η εφαρμογή μη καπνιστικού νηματωδοκτόνου πραγματοποιούνταν 1-3 φορές ανά καλλιεργητική περίοδο. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δύο πληθυσμοί, οι οποίοι διατηρούνταν στο Εργαστήριο Νηματωδολογίας του Ινστιτούτου Ελιάς, Υποτροπικών Φυτών και Αμπέλου στο Ηράκλειο Κρήτης (ΕΛΓΟ - ΔΗΜΗΤΡΑ). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε ένας πληθυσμός *M. javanica*, ο οποίος διατηρείται σε εργαστηριακές συνθήκες για περισσότερα από δεκαοκτώ χρόνια και ένας πληθυσμός *M. incognita*, ο οποίος διατηρείται σε εργαστηριακές συνθήκες για περισσότερα από δώδεκα χρόνια (Tzortzakakis et al., 1999, 2014). Οι πληθυσμοί παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.4.

**Πίνακας 3.4** Πληθυσμοί που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση ανάπτυξης ανθεκτικότητας σε μη καπνιστικά νηματωδοκτόνα.

13 πληθυσμοί από θερμοκηπιακές καλλιέργειες στην περιοχή της Κυπαρισσίας	<b>P-5, P-7, P-9, P-10, P-12, P-14, P-15, P-18, P-25, P-27, P-31, P-42, P-45</b>
2 πληθυσμοί μάρτυρες	<b>1 πληθυσμός <i>M. incognita</i>: P-C-Mi K1</b>
	<b>1 πληθυσμός <i>M. javanica</i>: P-C-4/2</b>

Οι πληθυσμοί χρησιμοποιήθηκαν για βιοδοκιμές μετά από δύο τεχνητές μολύνσεις σε φυτά, τα οποία αναπτύχθηκαν σε δωμάτιο ελεγχόμενων συνθηκών. Οι προνύμφες δευτέρου σταδίου συλλέχθηκαν από ωόσακκους, οι οποίοι απομονώθηκαν από ρίζες του ευαίσθητου υβριδίου τομάτας cv. Belladonna.

## Νηματωδοκτόνα

Χρησιμοποιήθηκαν τα σκευάσματα Nemathorin 150 EC (fosthiazate 15%) και Vydate 10 SL (oxamyl 10%). Οι συνιστώμενες δόσεις σε συνθήκες αγρού είναι 1L/στρέμμα και 2L/στρέμμα για το Nemathorin (Minagric, 2012) και το Vydate (Minagric, 2014) αντίστοιχα. Ο υπολογισμός των δόσεων που χρησιμοποιήθηκαν έγινε κάνοντας τις παρακάτω υποθέσεις, όπως παρουσιάζεται από τους Giannakou et al., 2005:

- Η ενσωμάτωση του νηματωδοκτόνου γίνεται σε βάθος 0,1 m
- Το έδαφος είναι αμμώδες που αντιστοιχεί σε πυκνότητα εδάφους  $d=1,3$
- Η περιεκτικότητα του εδάφους σε υγρασία αντιστοιχεί σε 20% της συνολικής μάζας του.

Με βάση τις παραπάνω υποθέσεις οι αντίστοιχες, των συνιστώμενων στον αγρό, δόσεις υπολογίστηκαν ως 6 ppm για το fosthiazate και 8 ppm για το oxamyl. Για την κάθε δραστική χρησιμοποιήθηκαν δύο ακόμα δόσεις, οι οποίες υπολογίστηκαν υποδιπλασιάζοντας και διπλασιάζοντας τις παραπάνω. Οι τελικές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.5.

**Πίνακας 3.5 Συγκεντρώσεις δραστικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε βιοδοκιμή.**

<b>fosthiazate</b>	<b>3 ppm</b>
	<b>6 ppm</b>
	<b>12 ppm</b>
<b>oxamyl</b>	<b>4 ppm</b>
	<b>8 ppm</b>
	<b>16 ppm</b>

## Βιοδοκιμές με προνύμφες δευτέρου σταδίου

Οι βιοδοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε πλάκες πολυστυρενίου Cellstar® των 24 πηγαδιών (Εικόνα 3.13). Για κάθε μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν 6 πηγάρια των 30 προνυμφών δευτέρου σταδίου (6 επαναλήψεις). Σε κάθε βιοδοκιμή χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας μεταχείριση με απεσταγμένο νερό, τρεις μεταχειρίσεις με τη δραστική fosthiazate (3 ppm, 6 ppm, 12 ppm) και τρεις μεταχειρίσεις με τη δραστική oxamyl (4 ppm, 8 ppm, 16 ppm).



**Εικόνα 3.13** Πλάκα πολυστυρενίου Cellstar® 24 πηγαδιών.

Οι πλάκες παρέμειναν σε σκοτεινό χώρο και θερμοκρασία 25°C για 24h. Στη συνέχεια οι προνύμφες παρατηρήθηκαν σε μεγέθυνση 40x με χρήση ανάστροφου μικροσκοπίου (Zeiss) (Εικόνα 3.6) και αξιολογήθηκαν ως κινητές ή παράλυτες. Το ποσοστό παράλυσης των προνυμφών για κάθε μεταχείριση διορθώθηκε ως προς το ποσοστό παράλυσης του μάρτυρα κατά Abbott, 1925 με τον παρακάτω τύπο:

$$A\% = \frac{\text{ποσοστό παράλυσης μεταχείρισης} - \text{ποσοστό παράλυσης μάρτυρα}}{100 - \text{ποσοστό παράλυσης μάρτυρα}} \times 100\%$$

όπου το A% δηλώνει το διορθωμένο ποσοστό παράλυσης.

### 3.7 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το στατιστικό πακέτο SAS<sup>2</sup>. Τα αποτελέσματα μετατράπηκαν σε  $\log(x+1)$  λόγω της μεγάλης απόκλισης κάποιων τιμών. Στη συνέχεια τα δεδομένα υποβλήθηκαν στη διαδικασία ανάλυσης της παραλλακτικότητας (ANOVA). Οι μέσοι όροι των αποτελεσμάτων συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας το LSD test (Μέθοδος Ελάχιστης Σημαντικής Διαφοράς). Χρησιμοποιώντας την εντολή glm του στατιστικού πακέτου υπολογίστηκε η σημαντικότητα της επίδρασης κάθε παράγοντα σε όλα του τα επίπεδα. Όλες οι συγκρίσεις έγιναν σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0.05$ .

## 4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Προσδιορισμός επιπέδων πυκνότητας πληθυσμών

Στον Πίνακα 4.1 παρουσιάζεται η πυκνότητα προνυμφών δευτέρου σταδίου ανά  $\text{cm}^3$  εδάφους, όπως υπολογίστηκε από δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν από 45 θερμοκηπιακές καλλιέργειες στην ευρύτερη περιοχή της Κυπαρισσίας. Ανιχνεύθηκαν J2s σε 44 από τα 45 δείγματα. Η μικρότερη πυκνότητα, που παρατηρήθηκε, ήταν  $0,04 \text{ J2s/cm}^3$  και η μεγαλύτερη  $22,57 \text{ J2s/cm}^3$ .

**Πίνακας 4.1** Επίπεδα πυκνότητας κομβοηματοδών από 45 θερμοκηπιακές καλλιέργειες στην ευρύτερη περιοχή της Κυπαρισσίας.

Πληθυσμός	J2s/cm <sup>3</sup>	Πληθυσμός	J2s/cm <sup>3</sup>
P-1	1,48	P-24	9,04
P-2	0,36	P-25	5,47
P-3	0,18	P-26	3,56
P-4	6,79	P-27	25,59
P-5	3,3	P-28	2,24
P-6	0,9	P-29	4,41
P-7	3,28	P-30	0,77
P-8	0,08	P-31	3,47
P-9	8,66	P-32	2,86
P-10	0,42	P-33	12,40
P-11	4,16	P-34	2,58
P-12	0,04	P-35	0,59
P-13	2,53	P-36	4,87
P-14	4,21	P-37	7,51
P-15	15,56	P-38	0
P-16	0,36	P-39	5,64
P-17	7,54	P-40	2,64
P-18	20,65	P-41	4,06
P-19	13,23	P-42	12,93
P-20	8,63	P-43	3,91
P-21	22,57	P-44	3,4
P-22	1,82	P-45	5,4
P-23	5,34		

Στον Πίνακα 4.2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα παρατήρησης για εμφάνιση ωόσακκων στις ρίζες φυτών τομάτας cv. Belladonna και cv. Silvana, επτά εβδομάδες μετά τη μεταφύτευση τους σε πλαστικά δοχεία με έδαφος από τα συλλεγόμενα δείγματα. Σε 32 από

**Πίνακας 4.2** Εμφάνιση ωόσακκων σε ρίζες φυτών τομάτας cv. Belladonna και cv. Silvana, επτά εβδομάδες μετά τη μεταφύτευση τους σε δοχεία με έδαφος από τα συλλεγόμενα δείγματα. Όπου X: παρατηρήθηκαν ωόσακκοι. Όπου -: δεν παρατηρήθηκαν ωόσακκοι.

Πληθυσμός	Εμφάνιση ωόσακκων		Πληθυσμός	Εμφάνιση ωόσακκων	
	Belladonna	Silvana		Belladonna	Silvana
P-1	X	X	P-24	X	X
P-2	X	-	P-25	X	-
P-3	-	-	P-26	X	-
P-4	-	-	P-27	X	X
P-5	X	-	P-28	X	X
P-6	-	-	P-29	X	X
P-7	X	X	P-30	-	-
P-8	-	-	P-31	X	-
P-9	X	-	P-32	-	-
P-10	X	-	P-33	X	X
P-11	X	X	P-34	-	-
P-12	X	-	P-35	-	-
P-13	-	-	P-36	X	X
P-14	X	X	P-37	X	-
P-15	X	-	P-38	-	-
P-16	X	X	P-39	X	-
P-17	X	-	P-40	X	X
P-18	X	X	P-41	X	X
P-19	X	X	P-42	X	-
P-20	-	-	P-43	-	-
P-21	X	X	P-44	X	X
P-22	-	-	P-45	X	X
P-23	X	X			

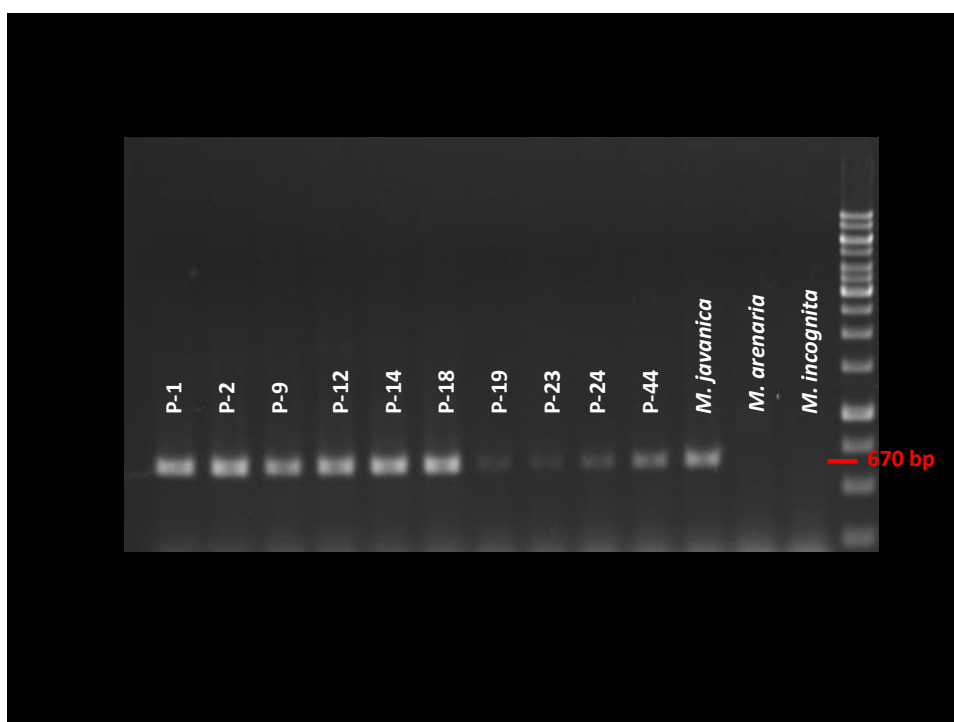
τα 45 δείγματα εμφανίστηκαν ωόσακκοι στις ρίζες των φυτών cv. Belladonna. Οι 32 πληθυσμοί, που απομονώθηκαν, διατηρήθηκαν στο εργαστήριο και ταυτοποιήθηκαν με μοριακές τεχνικές. Για αξιολόγηση της παθογένειας τους σε ανθεκτικά υβρίδια τομάτας



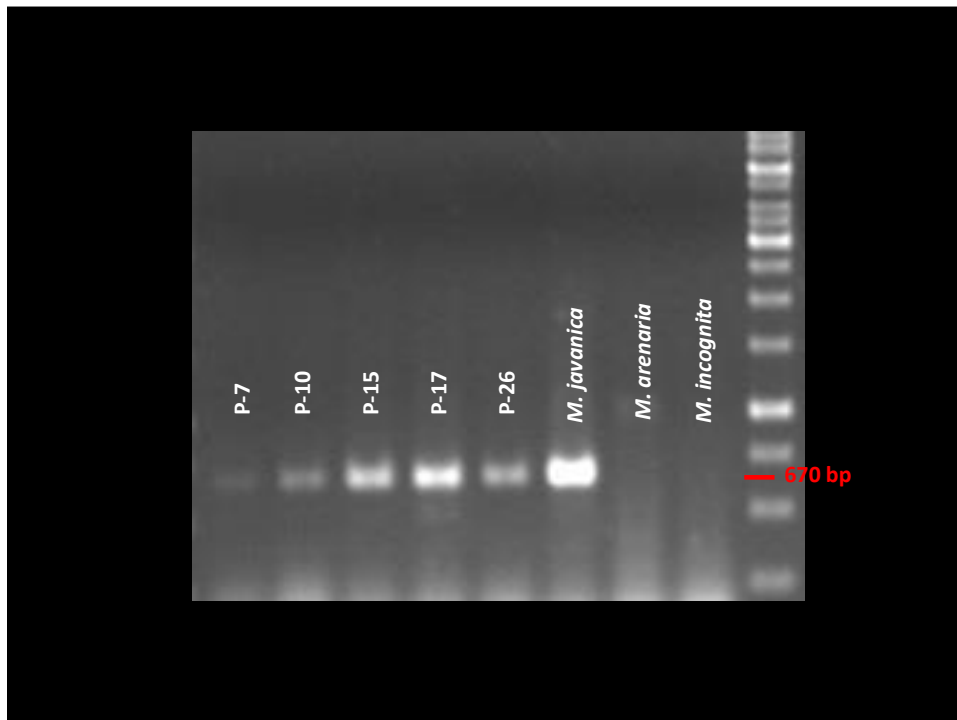
(γόνος *Mi*) επιλέχθηκαν 19 πληθυσμοί, για τους οποίους παρατηρήθηκαν ωόσακκοι στα δύο φυτά ανθεκτικού υβριδίου τομάτας cv. Silvana, τα οποία είχαν μεταφτυευθεί σε έδαφος από τα αντίστοιχα δείγματα.

## 4.2 Ανίχνευση των τριών τροπικών ειδών *M. javanica*, *M. incognita*, *M. arenaria* με χρήση μοριακής μεθόδου

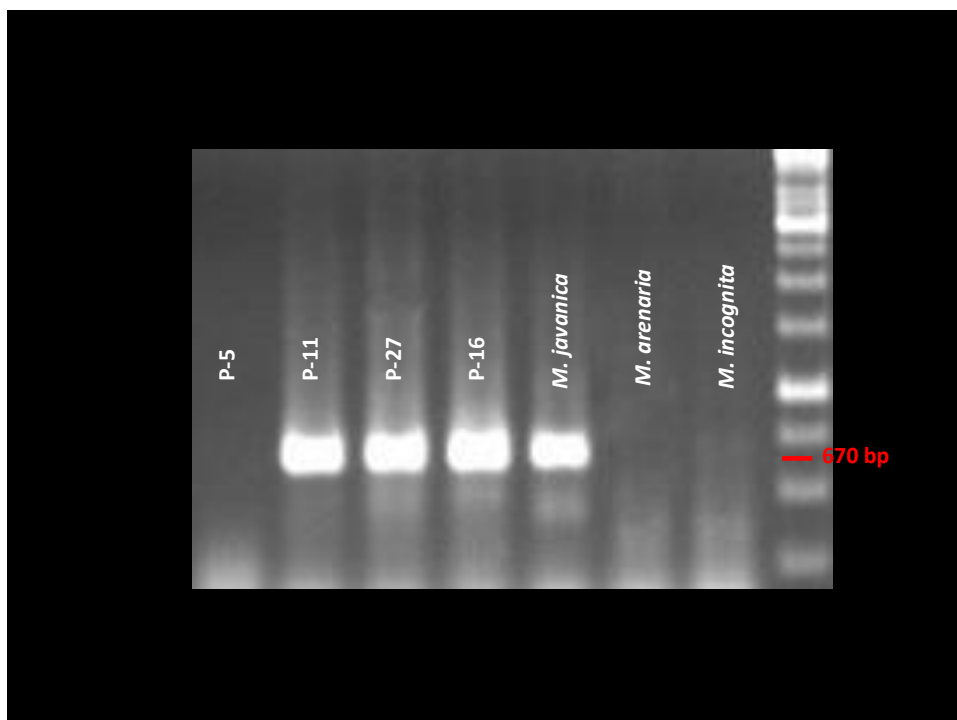
Εξετάστηκαν 32 πληθυσμοί με μοριακές μεθόδους για ανίχνευση των ειδών *M. javanica*, *M. incognita*, *M. arenaria*. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρουσιάζονται στις Εικόνες 4.1-4.15.



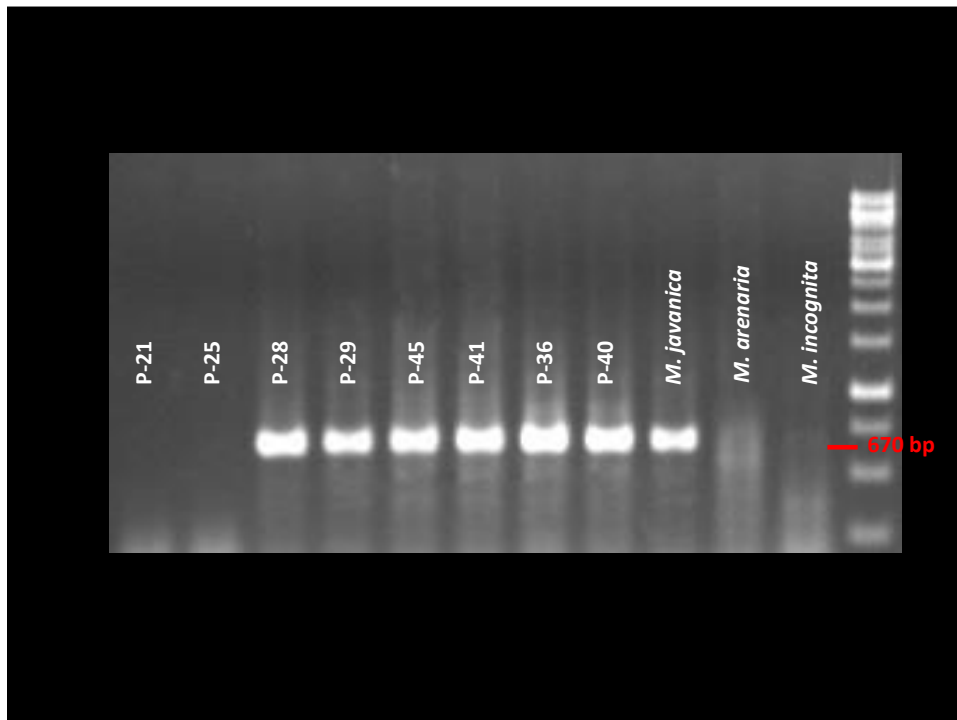
Εικόνα 4.1 Ανίχνευση *M. javanica* χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους εκκινητές Fjav/Rjav (προϊόν 670 bp).



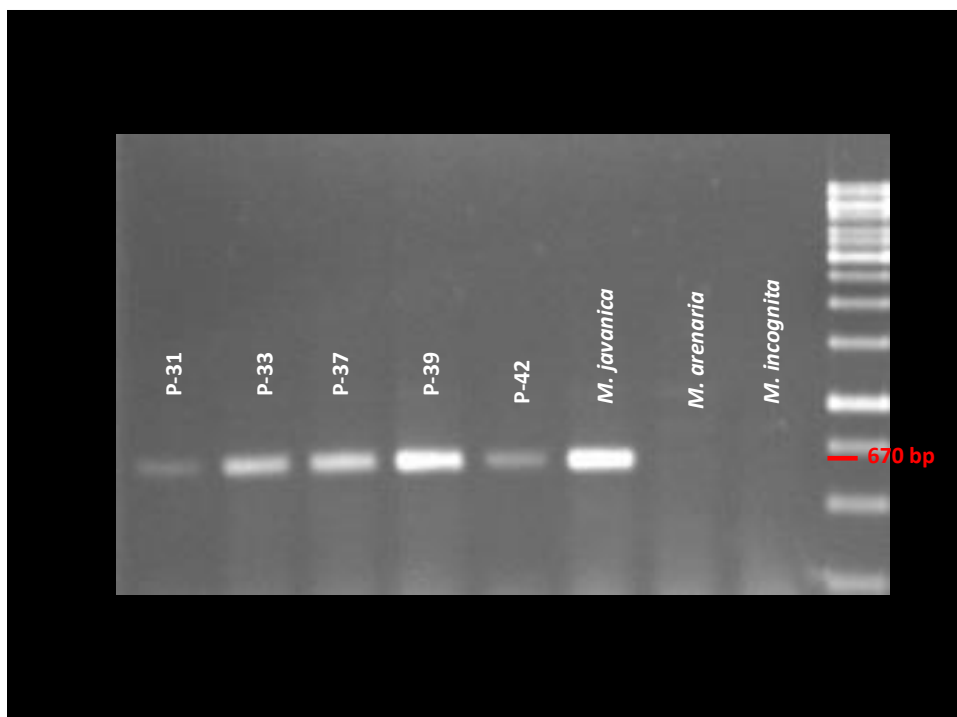
**Εικόνα 4.2** Ανίχνευση *M. javanica* χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους εκκινητές Fjav/Rjav (προϊόν 670 bp).



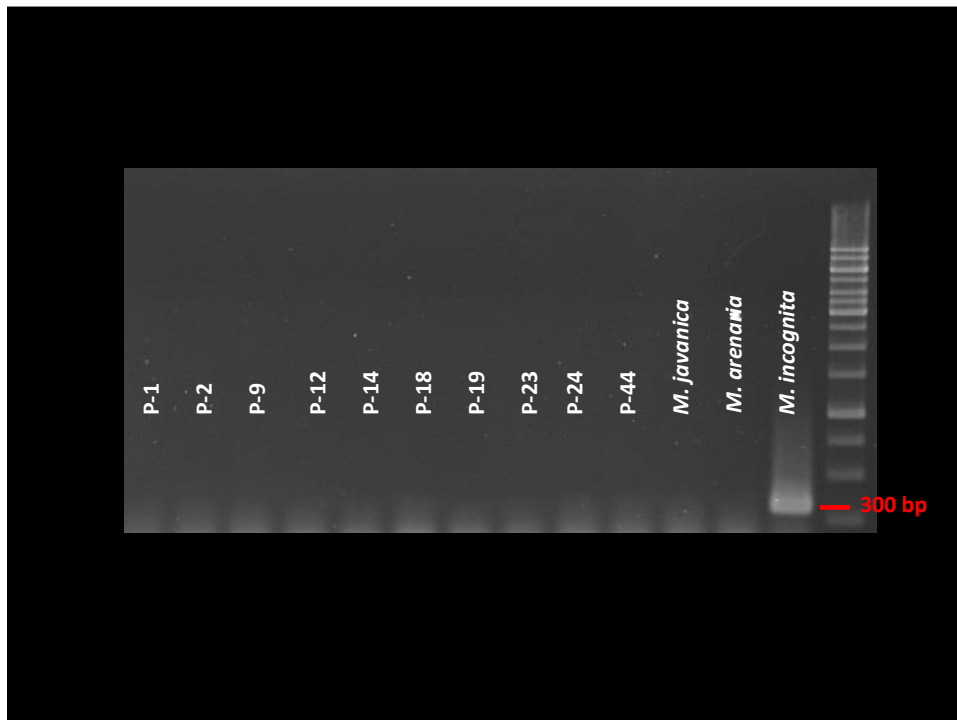
**Εικόνα 4.3** Ανίχνευση *M. javanica* χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους εκκινητές Fjav/Rjav (προϊόν 670 bp).



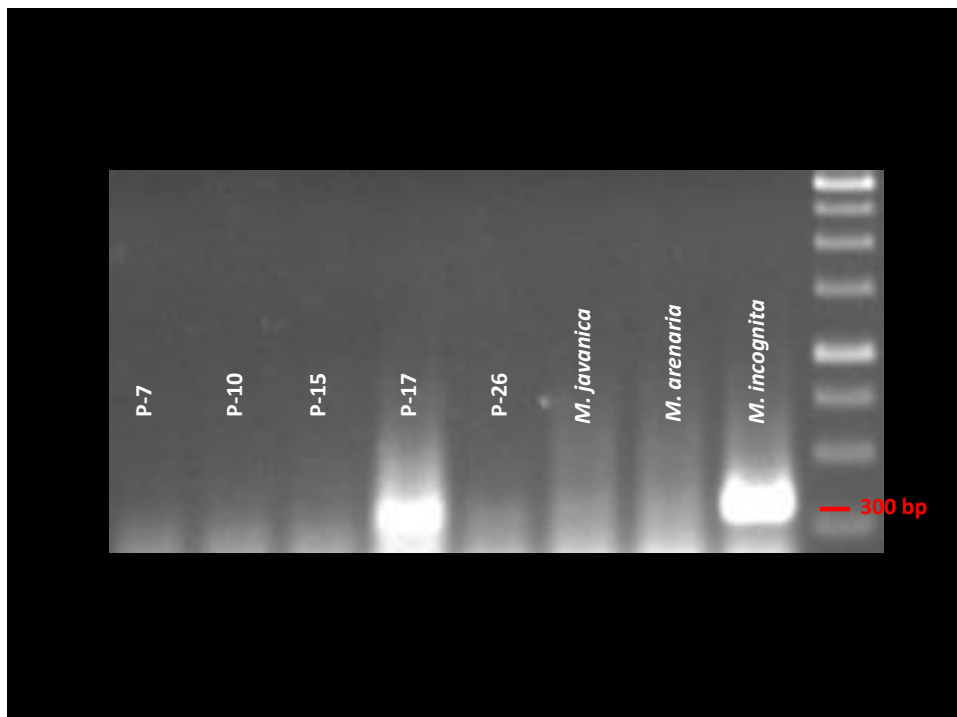
**Εικόνα 4.4** Ανίχνευση *M. javanica* χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους εκκινητές Fjav/Rjav (προϊόν 670 bp).



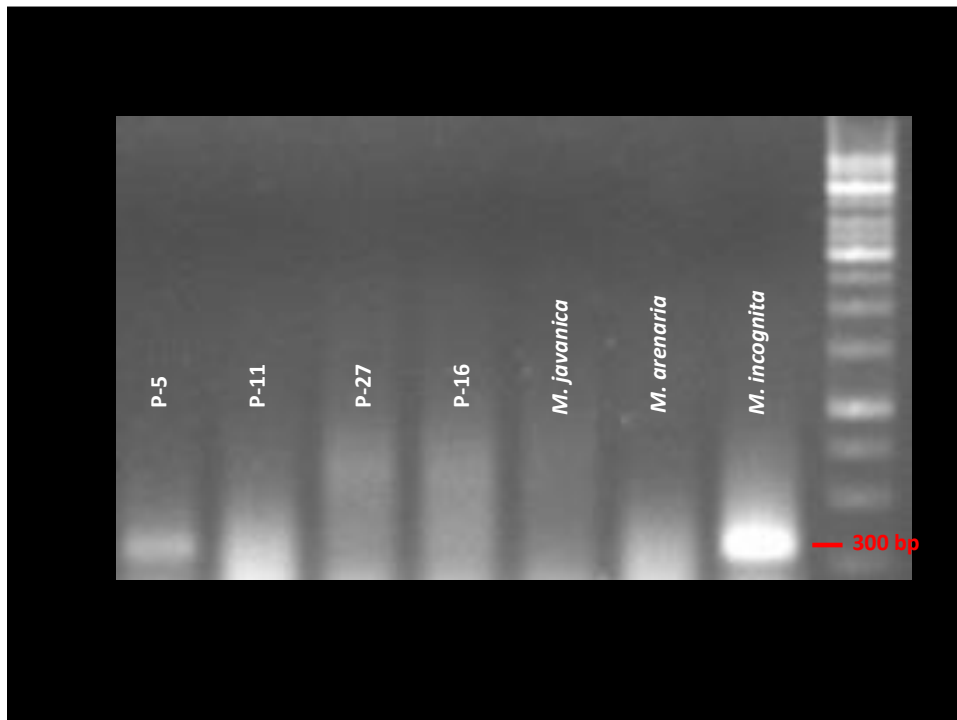
**Εικόνα 4.5** Ανίχνευση *M. javanica* χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους εκκινητές Fjav/Rjav (προϊόν 670 bp).



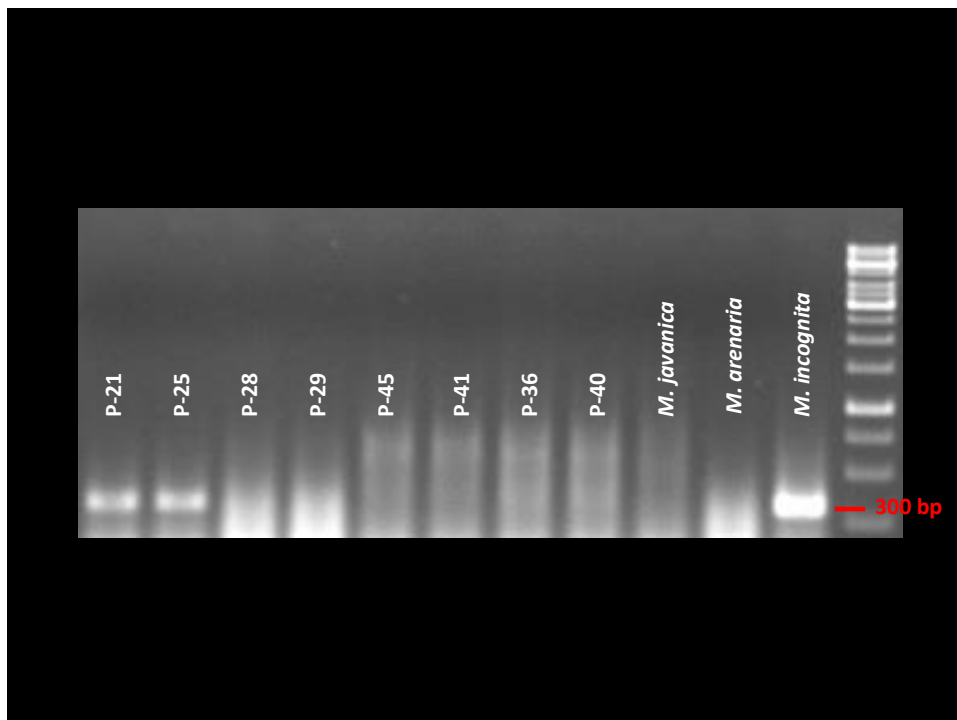
**Εικόνα 4.6** Ανίχνευση *M. incognita* χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους εκκινητές Mi2F4/Mi1R1 (προϊόν 300 bp).



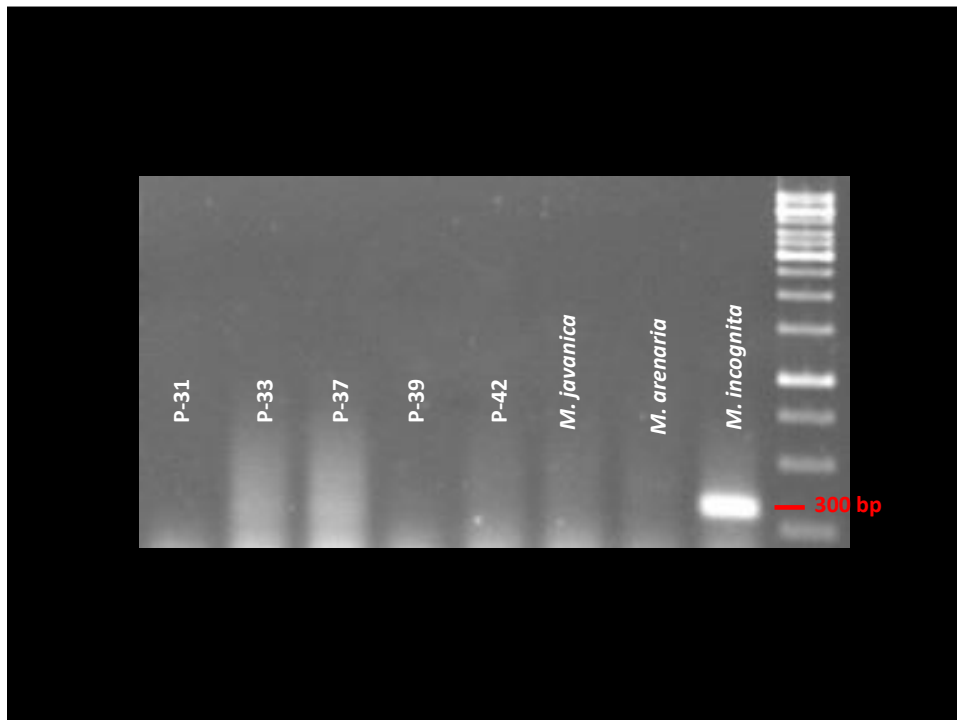
**Εικόνα 4.7** Ανίχνευση *M. incognita* χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους εκκινητές Mi2F4/Mi1R1 (προϊόν 300 bp).



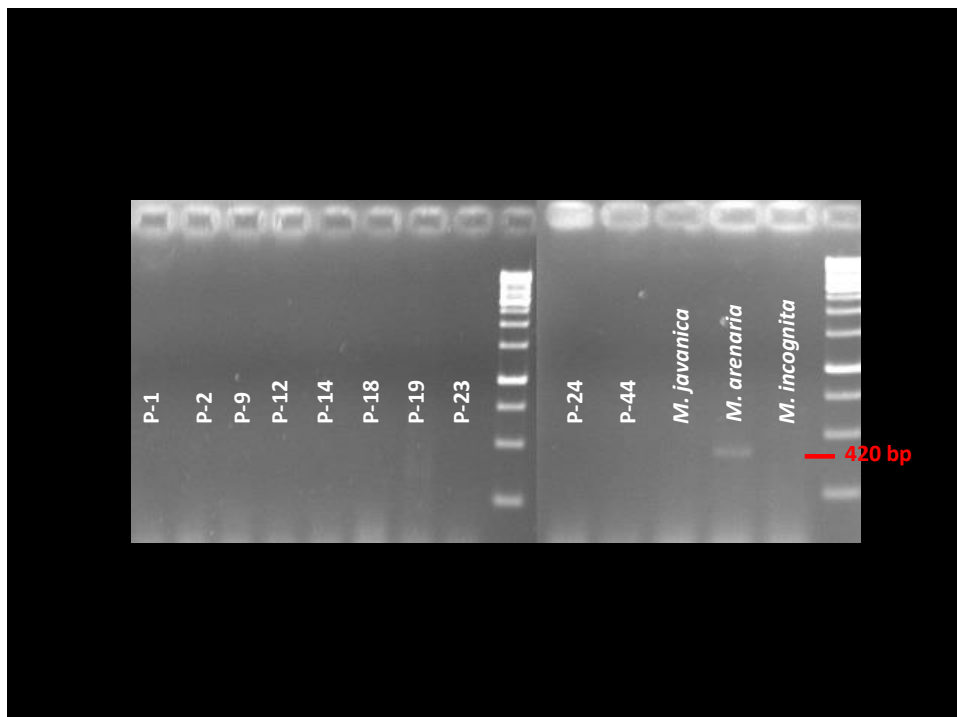
**Εικόνα 4.8** Ανίχνευση *M. incognita* χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους εκκινητές Mi2F4/Mi1R1 (προϊόν 300 bp).



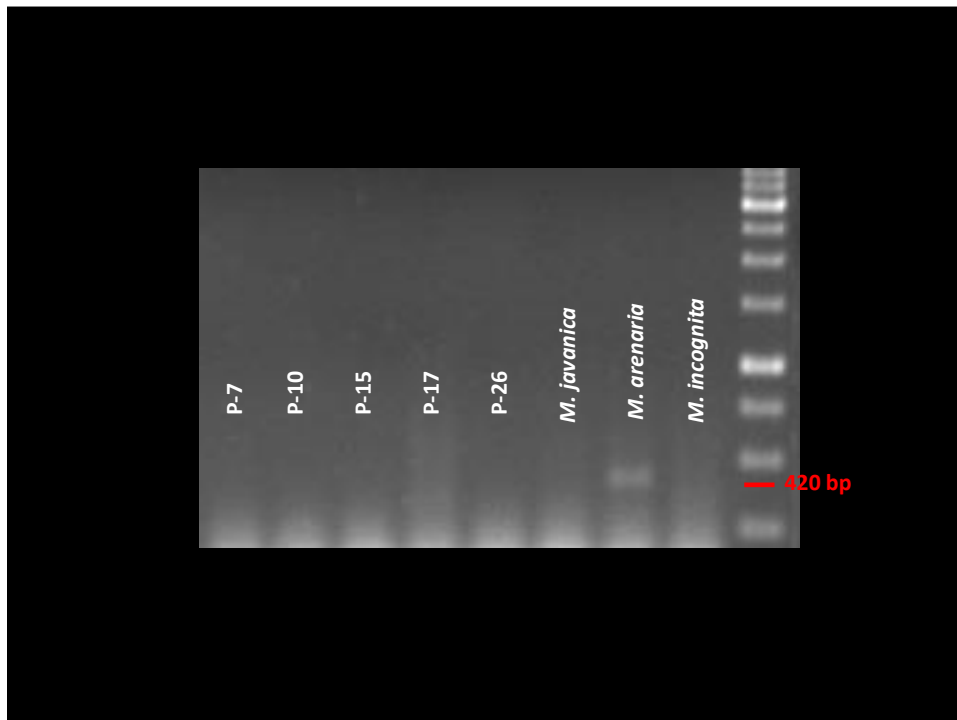
**Εικόνα 4.9** Ανίχνευση *M. incognita* χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους εκκινητές Mi2F4/Mi1R1 (προϊόν 300 bp).



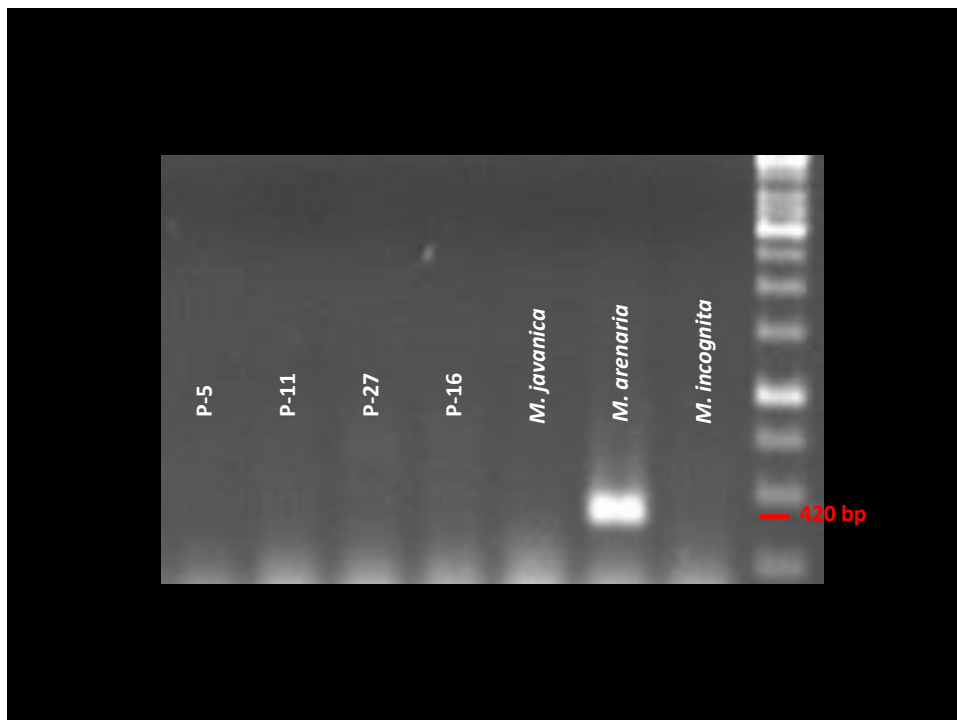
**Εικόνα 4.10** Ανίχνευση *M. incognita* χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους εκκινητές Mi2F4/Mi1R1 (προϊόν 300 bp).



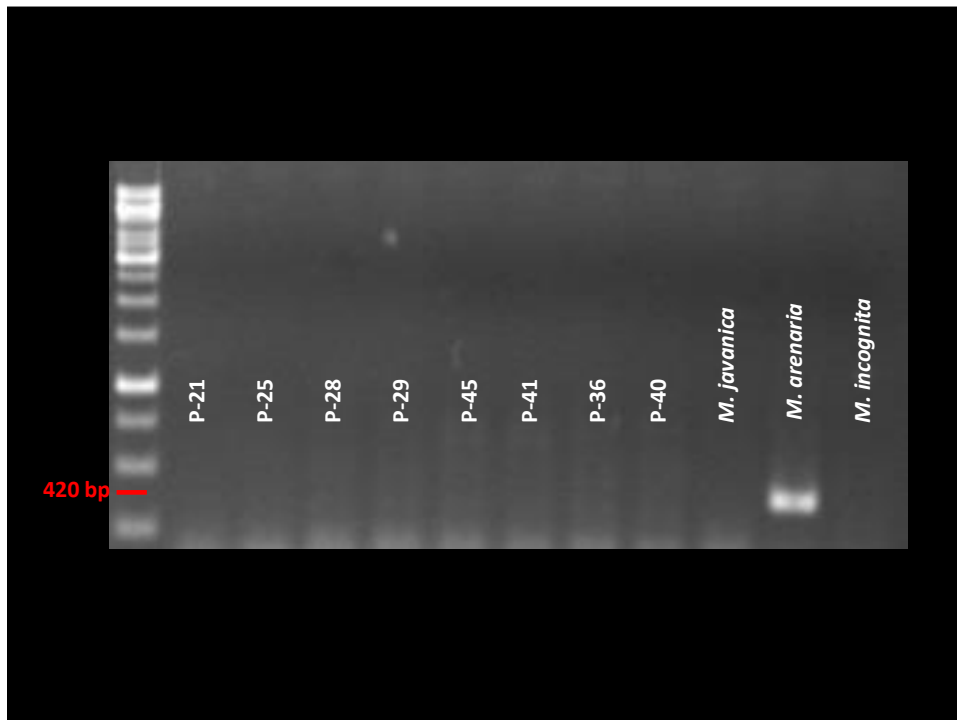
**Εικόνα 4.11** Ανίχνευση *M. arenaria* χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους εκκινητές Far/Rar (προϊόν 420 bp).



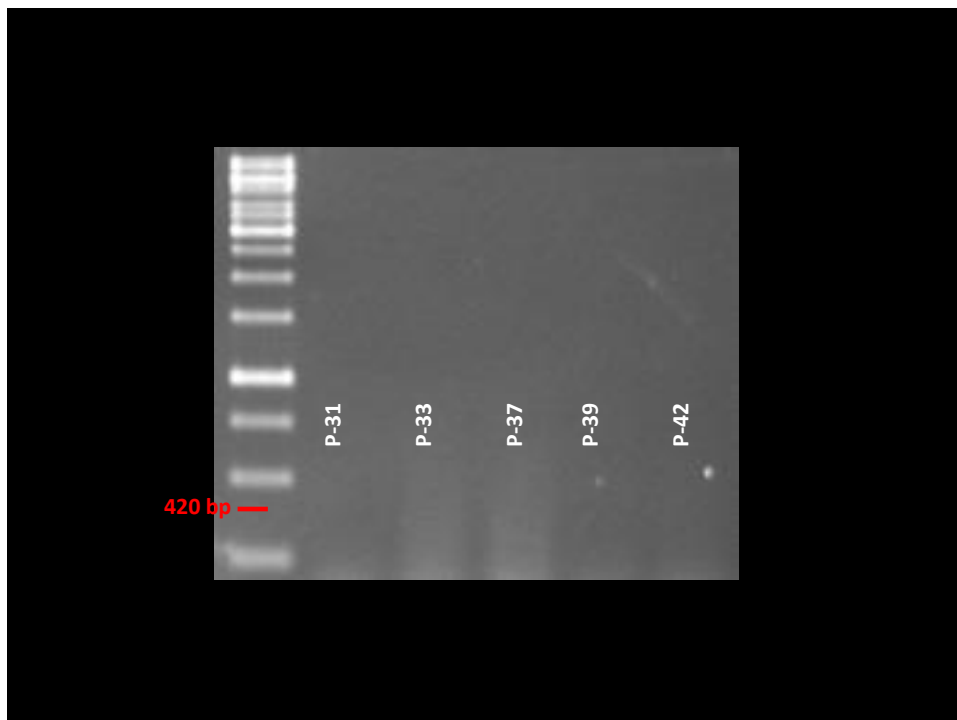
**Εικόνα 4.12** Ανίχνευση *M. arenaria* χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους εκκινητές Far/Rar (προϊόν 420 bp).



**Εικόνα 4.13** Ανίχνευση *M. arenaria* χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους εκκινητές Far/Rar (προϊόν 420 bp).



**Εικόνα 4.14** Ανίχνευση *M. arenaria* χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους εκκινητές Far/Rar (προϊόν 420 bp).



**Εικόνα 4.15** Ανίχνευση *M. arenaria* χρησιμοποιώντας τους εξειδικευμένους εκκινητές Far/Rar (προϊόν 420 bp).



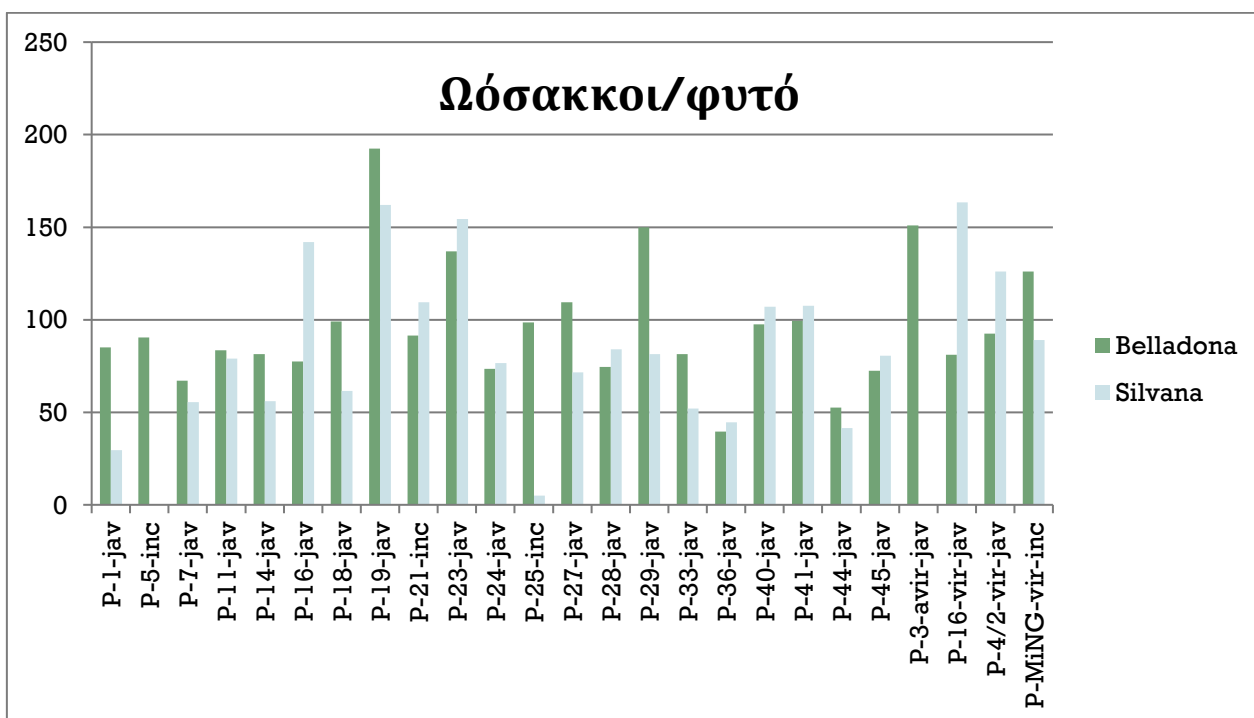
**Πίνακας 4.3** Αποτελέσματα μοριακής ταυτοποίησης των πληθυσμών που συλλέχθηκαν. Όπου X: το είδος ανιχνεύθηκε. Όπου -: το είδος δεν ανιχνεύθηκε.

Πληθυσμός	<i>M. javanica</i>	<i>M. incognita</i>	<i>M. arenaria</i>
P-1	X	-	-
P-2	X	-	-
P-5	-	X	-
P-7	X	-	-
P-9	X	-	-
P-10	X	-	-
P-11	X	-	-
P-12	X	-	-
P-14	X	-	-
P-15	X	-	-
P-16	X	-	-
P-17	X	X	-
P-18	X	-	-
P-19	X	-	-
P-21	-	X	-
P-23	X	-	-
P-24	X	-	-
P-25	-	X	-
P-26	X	-	-
P-27	X	-	-
P-28	X	-	-
P-29	X	-	-
P-31	X	-	-
P-33	X	-	-
P-36	X	-	-
P-37	X	-	-
P-39	X	-	-
P-40	X	-	-
P-41	X	-	-
P-42	X	-	-
P-44	X	-	-
P-45	X	-	-

Στον Πίνακα 4.3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μοριακής ταυτοποίησης των πληθυσμών, που συλλέχθηκαν. Το είδος *M. javanica* ανιχνεύθηκε σε 28 πληθυσμούς, το είδος *M. incognita* ανιχνεύθηκε σε 3 πληθυσμούς και το είδος *M. arenaria* δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα πληθυσμό. Σε έναν πληθυσμό ανιχνεύθηκαν και τα δύο είδη *M. javanica* και *M. incognita*.

### 4.3 Προκαταρκτικός έλεγχος της παθογένειας σε ανθεκτικό υβρίδιο τομάτας και ευαίσθητης ποικιλίας πιπεριάς

Στο Γράφημα 4.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του προκαταρκτικού ελέγχου παθογένειας των πληθυσμών σε ανθεκτικά υβρίδια τομάτας μετά από τεχνητή μόλυνση με 400 J2s σε δύο φυτά ευαίσθητου υβριδίου τομάτας cv. Belladonna και δύο φυτά ανθεκτικού υβριδίου cv. Silvana. Σε 19 πληθυσμούς και τους 3 παθότυπους πληθυσμούς μάρτυρες μετρήθηκε αριθμός ωόσακκων στις ρίζες των φυτών cv.Silvana ανώτερος του 35% του αριθμού ωόσακκων στις ρίζες των φυτών cv. Belladonna. Σε ορισμένους πληθυσμούς μάλιστα η προσβολή των φυτών cv. Silvana ήταν υψηλότερη από αυτήν των φυτών cv. Belladonna. Για τον πληθυσμό P-25 το αντίστοιχο ποσοστό είναι 5%, ενώ στον πληθυσμό P-5 και στον μη παθότυπο πληθυσμό μάρτυρα δεν παρατηρήθηκαν ωόσακκοι στις ρίζες των



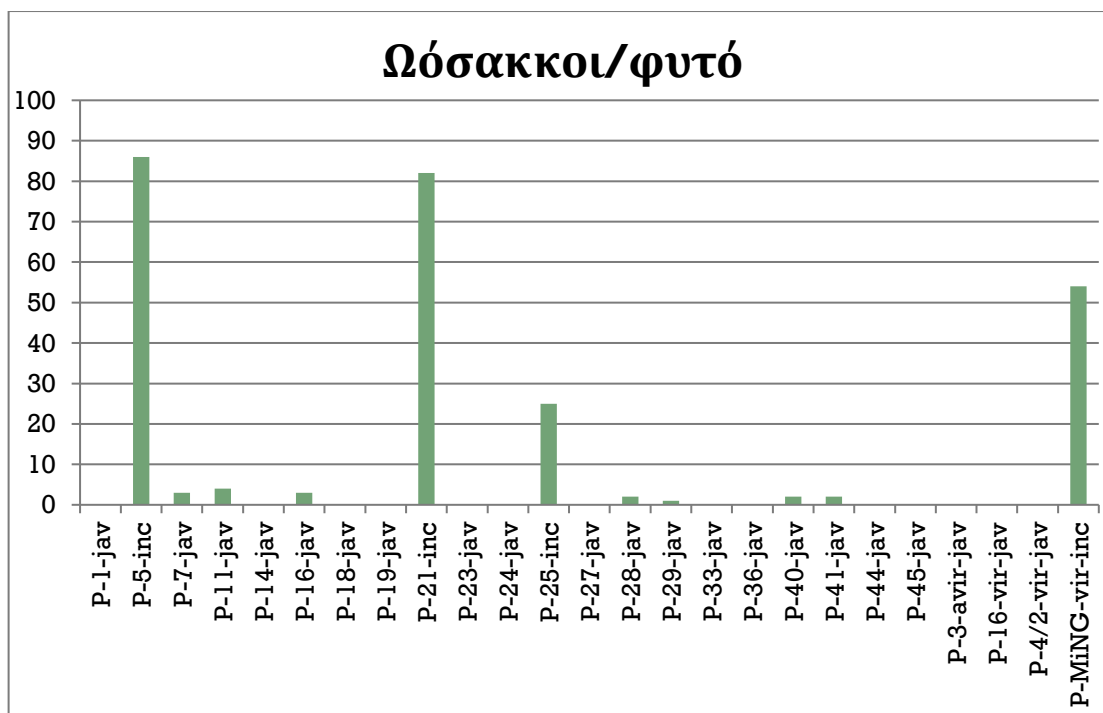
Γράφημα 4.1 Μέσοι όροι αριθμού ωόσακκων στις ρίζες 2 φυτών cv. Belladonna και cv. Silvana εφτά εβδομάδες μετά από μόλυνση με 400 J2s.

φυτών cv. Silvana. Η σχέση των ωόσακκων που μετρήθηκαν στις ρίζες φυτών cv. Silvana ως προς τον αντίστοιχο αριθμό ωόσακκων στα φυτά cv. Belladonna δίνεται στον Πίνακα 4.4.

**Πίνακας 4.4** Σχέση αριθμού ωόσακκων στις ρίζες φυτών cv. Silvana ως προς τον αντίστοιχο αριθμό σε φυτά cv. Belladonna επτά εβδομάδες μετά από μόλυνση με 400 J2s.

Πληθυσμός	$\frac{\text{Αριθμός ωόσακκων cv Silvana}}{\text{Αριθμός ωόσακκων cv.Belladonna}} \cdot 100\%$	Πληθυσμός	$\frac{\text{Αριθμός ωόσακκων cv Silvana}}{\text{Αριθμός ωόσακκων cv.Belladonna}} \cdot 100\%$
P-1-jav	35	P-28-jav	113
P-5-inc	0	P-29-jav	54
P-7-jav	83	P-33-jav	64
P-11-jav	95	P-36-jav	113
P-14-jav	69	P-40-jav	110
P-16-jav	183	P-41-jav	108
P-18-jav	62	P-44-jav	79
P-19-jav	84	P-45-jav	111
P-21-inc	120	P-3-avir-jav	0
P-23-jav	113	P-16-vir-jav	202
P-24-jav	104	P-4/2-vir-jav	136
P-25-inc	5	P-MiNG-vir-inc	71
P-27-jav	65		

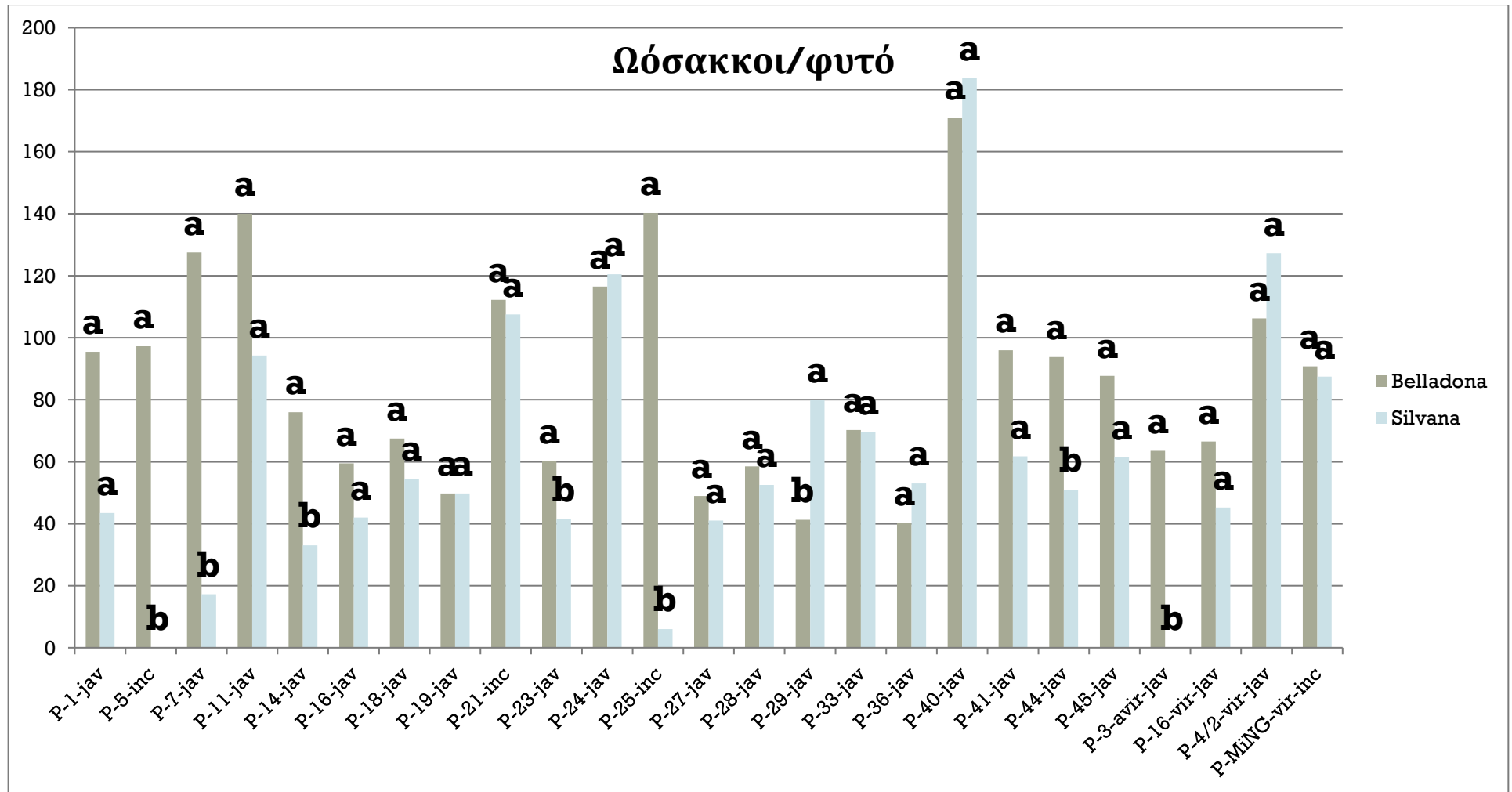
Στο Γράφημα 4.2 παρουσιάζεται ο αριθμός ωόσακκων σε ρίζες φυτών ευαίσθητης πιπεριάς cv. Denver επτά εβδομάδες μετά από τεχνητή μόλυνση με 400 J2s. Στους 3 πληθυσμούς P-5, P-21, P-25, που ταυτοποιήθηκαν ως *M. incognita* και στον πληθυσμό μάρτυρα *M. incognita* μετρήθηκε αριθμός ωόσακκων 86, 82, 25 και 54 αντίστοιχα. Σε 7 πληθυσμούς *M. javanica* παρατηρήθηκε πολύ μικρός αριθμός ωόσακκων (1-4 ωόσακκοι). Στους υπόλοιπους πληθυσμούς που ταυτοποιήθηκαν ως *M. javanica* και στους 3 μάρτυρες πληθυσμούς *M. javanica* δεν παρατηρήθηκαν ωόσακκοι στις ρίζες των φυτών της πιπεριάς.



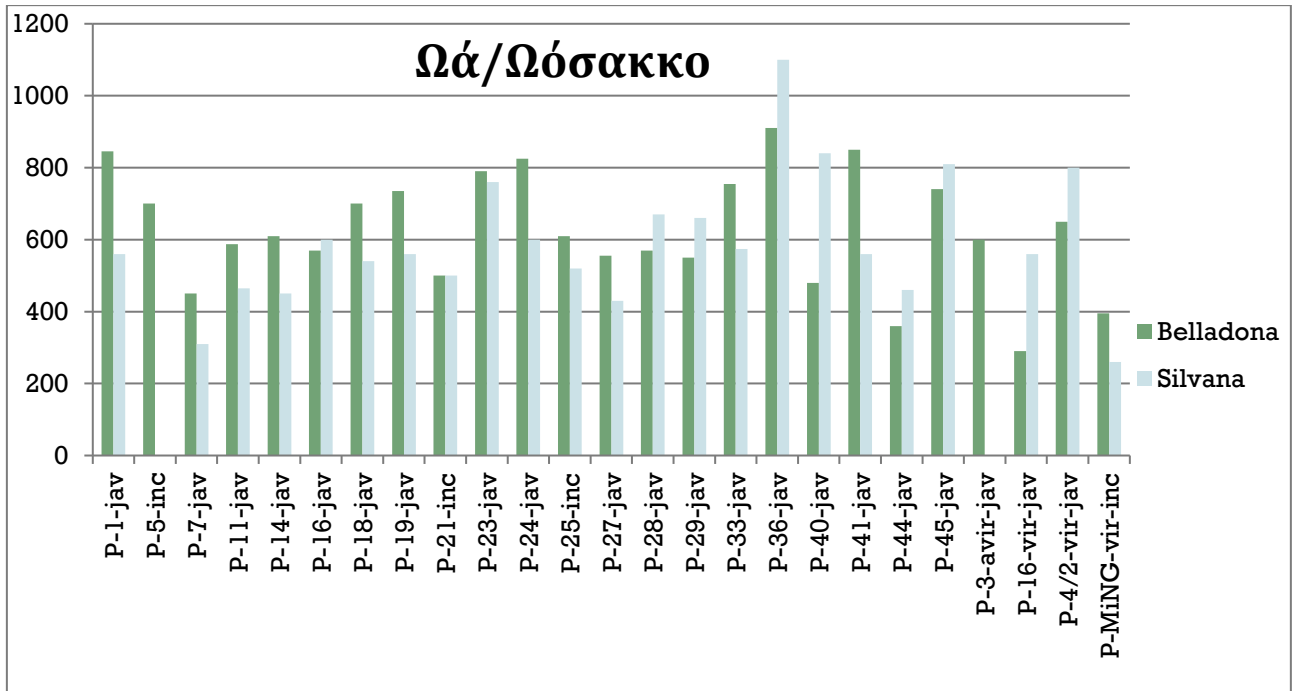
Γράφημα 4.2 Αριθμός ώόσακκων στις ρίζες φυτών πιπεριάς επτά εβδομάδες μετά από μόλυνση με 400 J2s.

#### 4.4 Αξιολόγηση της παθογένειας σε ανθεκτικό υβρίδιο τομάτας

Στο Γράφημα 4.3 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των ώόσακκων που παρατηρήθηκαν επτά εβδομάδες μετά από τεχνητή μόλυνση με 400 J2s 4 φυτών cv Belladonna και 4 φυτών cv. Silvana. Ο αριθμός ώόσακκων ανάμεσα στα υβρίδια δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $\alpha = 0.05$ ) για 14 από τους πληθυσμούς που συλλέχθηκαν και για τους 3 παθότυπους μάρτυρες πληθυσμούς. Αντίθετα στατιστικά σημαντικές διαφορές παρουσιάστηκαν για τους πληθυσμούς P-7, P-14, P-23, P-25, P-44. Τέλος, ο πληθυσμός P-29 παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα δύο υβρίδια, με την προσβολή των φυτών cv. Silvana να είναι μεγαλύτερη κατά 94%.



**Γράφημα 4.3** Μέσοι όροι των ωόσακκων που παρατηρήθηκαν επτά εβδομάδες μετά από τεχνητή μόλυνση με 400 J2s 4 φυτών cv. Belladonna και 4 φυτών cv. Silvana. Τα γράμματα a, b επισημαίνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$ .



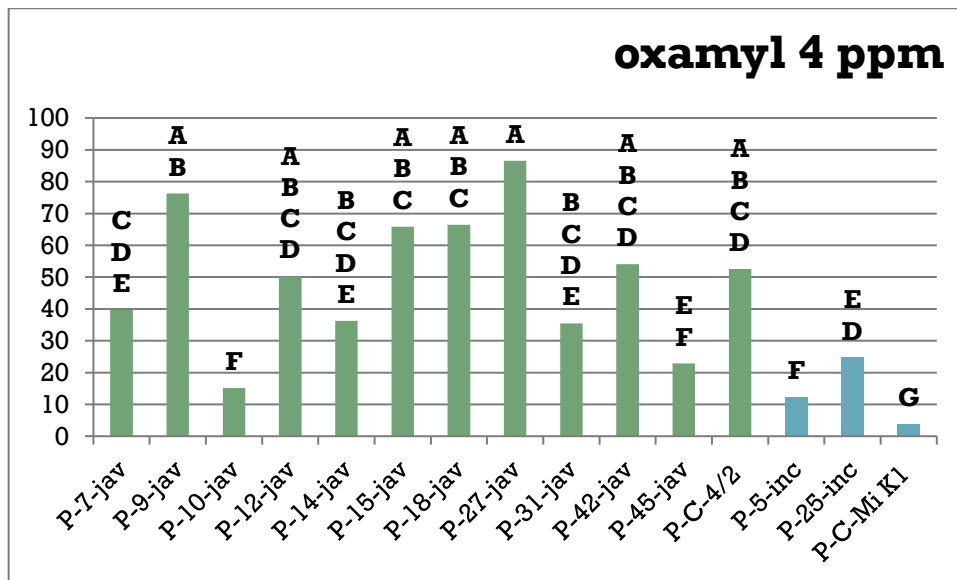
**Γράφημα 4.4** Μέσος αριθμός ωών ανά ωόσακκο σε κάθε υβρίδιο και για κάθε πληθυσμό.

Στο Γράφημα 4.4 παρουσιάζεται ο μέσος αριθμός ωών ανά ωόσακκο σε κάθε υβρίδιο και για κάθε πληθυσμό. Ο αριθμός των ωών ανά ωόσακκο των φυτών cv. Silvana κυμαίνεται από 66% (P-41) έως 128% (P-44) σε σχέση με τον αντίστοιχο σε φυτά cv. Belladonna για τους πληθυσμούς που συλλέχθηκαν. Στους 3 παθότυπους μάρτυρες πληθυσμούς οι αντίστοιχες τιμές είναι 66%, 123% και 193%.

## 4.5 *In vitro* αξιολόγηση της ανθεκτικότητας σε νηματοδοκτόνα

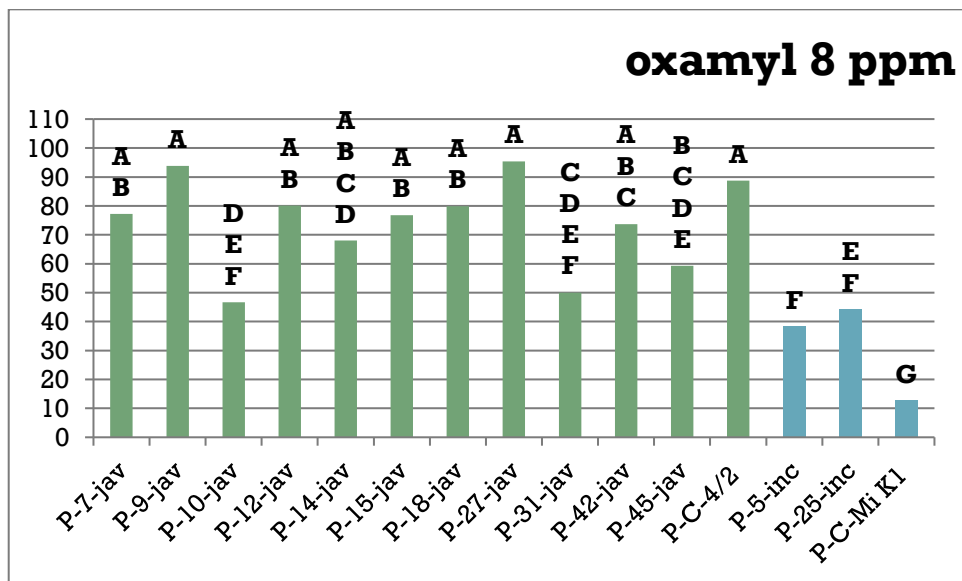
### oxamyl

Στη συγκέντρωση 4 ppm της δραστικής ουσίας oxamyl παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους δύο μάρτυρες πληθυσμούς P-C-4/2 και P-C-Mi K1. Ο P-C-Mi K1 παρουσίασε το μικρότερο ποσοστό παράλυσης (4%) και διαφέρει στατιστικά με όλους τους πληθυσμούς. Αντίθετα, ο P-C-4/2 δεν διαφέρει στατιστικά με 10 πληθυσμούς, ενώ παρουσιάζει αυξημένο ποσοστό παράλυσης (53%), που διαφέρει στατιστικώς σημαντικά σε σχέση με τους πληθυσμούς P-10 (15%), P-45 (23%) και P-5 (12%) (Γράφημα 4.5).



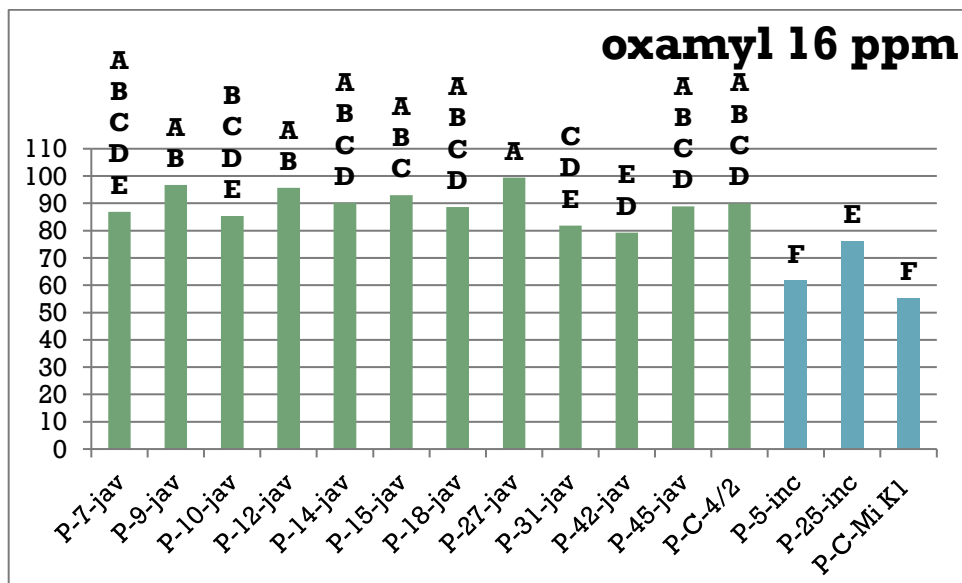
Γράφημα 4.5 Μέσο ποσοστό παράλυσης προνυμφών στη συγκέντρωση 4 ppm oxamyl. Τα γράμματα A, B, C, D, E, F, G επισημαίνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$ .

Στη συγκέντρωση των 8 ppm παρατηρείται επίσης στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους δύο μάρτυρες. Ο πληθυσμός P-C-Mi K1 παρουσιάζει ξανά το μικρότερο ποσοστό παράλυσης 13% και διαφέρει στατιστικά από όλους τους πληθυσμούς. Ο P-C-4/2 με ποσοστό παράλυσης 88% δεν διαφέρει στατιστικά με 8 πληθυσμούς. Οι πληθυσμοί P-10, P-31, P-45, P-5 και P-25 παρουσιάζουν ποσοστό παράλυσης 47%, 50%, 59%, 38% και 44% αντίστοιχα και διαφέρουν στατιστικά και από τους 2 μάρτυρες (Γράφημα 4.6).



Γράφημα 4.6 Μέσο ποσοστό παράλυσης προνυμφών στη συγκέντρωση 8 ppm oxamyl. Τα γράμματα A, B, C, D, E, F, G επισημαίνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$ .

Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μαρτύρων πληθυσμών παρατηρείται και στη συγκέντρωση των 16 ppm. Ο πληθυσμός P-C-Mi K1 παρουσιάζει το μικρότερο ποσοστό παράλυσης (55%) και δεν διαφέρει στατιστικά μόνο με τον πληθυσμό P-5 (62%). Ο P-C-4/2 (90% παράλυση) παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές διαφορές μόνο με τους δύο *M. incognita* πληθυσμούς P-5 (62% παράλυση) και P-25 (75% παράλυση) (Γράφημα 4.7).



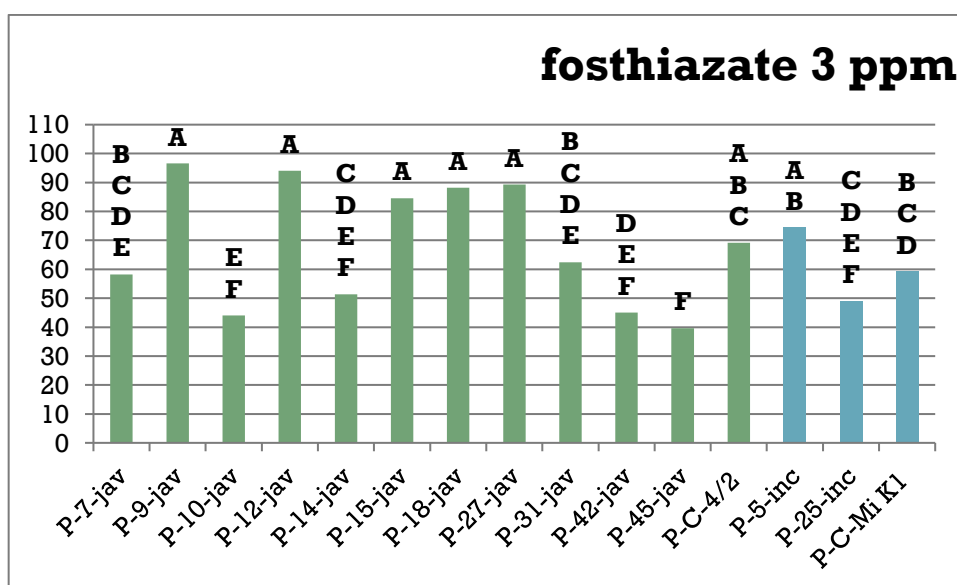
Γράφημα 4.7 Μέσο ποσοστό παράλυσης προνυμφών στη συγκέντρωση 16 ppm oxamyl. Τα γράμματα A, B, C, D, E, F επισημαίνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$ .

Με την αύξηση της συγκέντρωσης της δραστικής παρατηρείται μείωση των στατιστικά σημαντικών διαφορών ανάμεσα στους πληθυσμούς. Σε επίπεδο είδους οι τρεις πληθυσμοί *M. incognita* εμφανίζουν χαμηλότερα ποσοστά παράλυσης σε σχέση με τους δώδεκα πληθυσμούς *M. javanica* σε όλες τις συγκεντρώσεις oxamyl. Συγκεκριμένα στη συγκέντρωση των 4 ppm το μέσο ποσοστό παράλυσης για το *M. javanica* είναι 50% και για το *M. incognita* 14%. Στις συγκεντρώσεις 8 και 16 ppm τα αντίστοιχα ποσοστά είναι 74% και 90% για το *M. javanica* και 31% και 64% για το *M. incognita*.



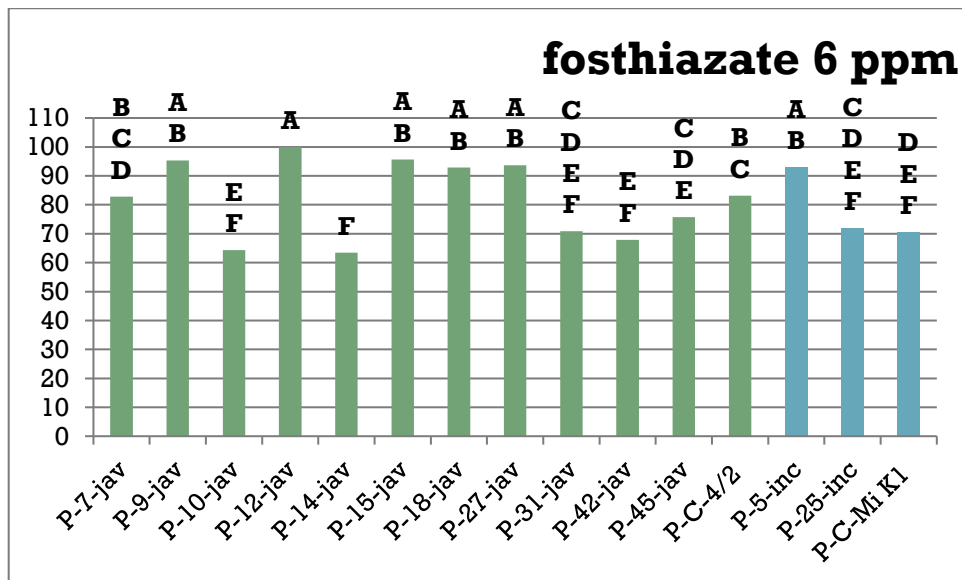
## fosthiazate

Δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο πληθυσμών μαρτύρων στη συγκέντρωση των 3 ppm της δραστικής ουσίας fosthiazate. Ο P-C-4/2 (69% παράλυση) παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές διαφορές με τους πληθυσμούς P-10 (43% παράλυση), P-42 (45% παράλυση) και P-45 (40% παράλυση). Ο P-C-Mi K1 (59% παράλυση) διαφέρει στατιστικά με τους πληθυσμούς P-10 (43% παράλυση) και P-45 (40% παράλυση) (Γράφημα 4.8).



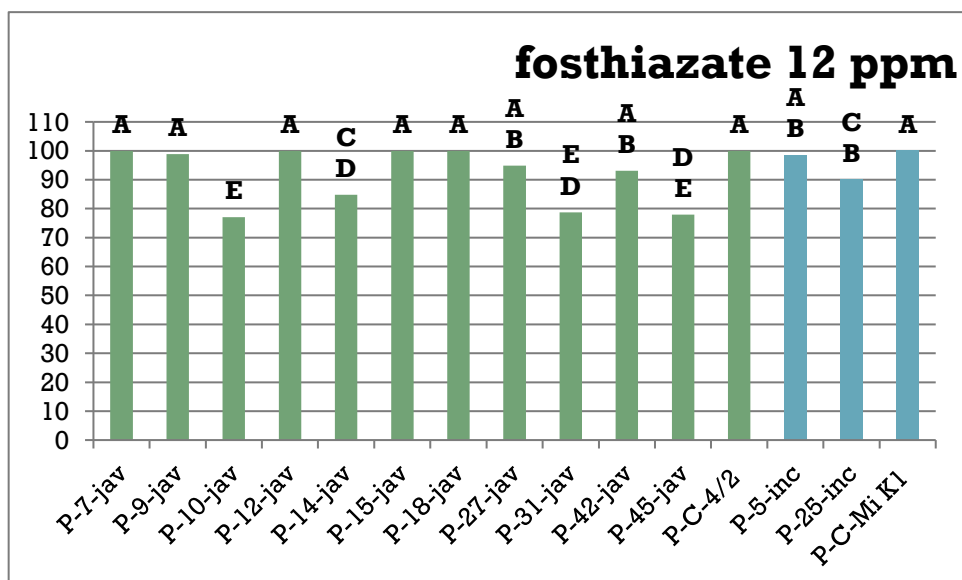
**Γράφημα 4.8** Μέσο ποσοστό παράλυσης προνυμφών στη συγκέντρωση 3 ppm fosthiazate. Τα γράμματα A, B, C, D, E, F επισημαίνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$ .

Στη συγκέντρωση των 6 ppm παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μαρτύρων πληθυσμών. Οι πληθυσμοί P-10, P-14, P-31, P-42, P-45 και P-25 εμφανίζουν χαμηλότερα ποσοστά παράλυσης από τους άλλους πληθυσμούς, αλλά δε διαφέρουν στατιστικά με τον μάρτυρα πληθυσμό P-C-Mi K1 (Γράφημα 4.9).



Γράφημα 4.9 Μέσο ποσοστό παράλυσης προνυμφών στη συγκέντρωση 6 ppm fosthiazate. Τα γράμματα A, B, C, D, E, F επισημαίνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$ .

Δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των περισσότερων πληθυσμών, που συλλέχθηκαν και των πληθυσμών μαρτύρων στη συγκέντρωση των 12 ppm. Οι μάρτυρες παρουσιάζουν παράλυση 100% και διαφέρουν στατιστικά με τους πληθυσμούς P-10, P-14, P-31, P-45 και P-25, οι οποίοι εμφανίζουν ποσοστά παράλυσης 77%, 85%, 79%, 78% και 90% αντίστοιχα (Γράφημα 4.10).



Γράφημα 4.10 Μέσο ποσοστό παράλυσης προνυμφών στη συγκέντρωση 12 ppm fosthiazate. Τα γράμματα A, B, C, D, E επισημαίνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$ .

Σε αντίθεση με του oxamyl, στις βιοδοκιμές με fosthiazate δεν παρατηρήθηκε μειωμένο ποσοστό παράλυσης στους πληθυσμούς *M. incognita* σε σχέση με τους πληθυσμούς *M. javanica*. Συγκεκριμένα τα ποσοστά παράλυσης είναι 68% και 61% στη συγκέντρωση των 3 ppm, 82% και 79% στα 6 ppm και 92% και 96% στα 12 ppm για τους *M. javanica* και *M. incognita* αντίστοιχα.

## 5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ευρύτερη περιοχή της Κυπαρισσίας επιλέχθηκε για διερεύνηση των επιπέδων και των ειδών νηματωδών του γένους *Meloidogyne*, καθώς αποτελούν έναν από τους σημαντικότερους εχθρούς στις υπό κάλυψη καλλιέργειες κηπευτικών της περιοχής. Στις αναλύσεις δειγμάτων εδάφους από 45 θερμοκηπιακές καλλιέργειες, ανιχνεύθηκε η παρουσία κομβονηματωδών σε 44 από αυτές. Η κύρια καλλιέργεια στα θερμοκήπια της περιοχής είναι αυτή της τομάτας, στην οποία το κατώτερο όριο προσβολής, όπου δεν παρατηρείται οικονομική απώλεια, έχει υπολογιστεί – σε πειράματα *in vitro* που πραγματοποιήθηκαν στην Ισπανία – για το *M. incognita* ως 0,55 J2s/cm<sup>3</sup> εδάφους (Ornat and Sorribas, 2008). Για την Ελλάδα δεν υπάρχουν αντίστοιχα δεδομένα. Η εξαγωγή προνυμφών από τα δείγματα εδάφους, που συλλέχθηκαν, έδειξε πως σε 38 από τα 45 εδάφη η πυκνότητα των πληθυσμών ήταν ανώτερη του παραπάνω ορίου (Πίνακας 4.1), γεγονός που επισημαίνει το πρόβλημα των κομβονηματωδών στην περιοχή και την απουσία αποτελεσματικής αντιμετώπισης τους.

Σύμφωνα με τους παραγωγούς ο κύριος τρόπος αντιμετώπισης των κομβονηματωδών στην περιοχή είναι η επέμβαση με μη καπνιστικά νηματωδοκτόνα πριν την εγκατάσταση της καλλιέργειας. Η εφαρμογή τους οδηγεί σε μια προσωρινή μείωση της πυκνότητας των πληθυσμών μέχρι την καλή εγκατάσταση των σποροφύτων στο έδαφος. Σε προχωρημένο στάδιο της καλλιέργειας όμως, η πυκνότητα των πληθυσμών αυξάνεται και παρουσιάζεται έντονη προσβολή του ριζικού συστήματος των φυτών. Η υψηλή προσβολή των φυτών σε αυτό το στάδιο της καλλιέργειας οδηγεί στη μείωση της απόδοσης της και σε ορισμένες περιπτώσεις την ολική νέκρωση των φυτών. Υπάρχει ανάγκη λοιπόν εύρεσης και συνδυασμού εναλλακτικών πρακτικών στο πλαίσιο της ολοκληρωμένης αντιμετώπισης.

Βασικό πρώτο βήμα της ολοκληρωμένης αντιμετώπισης είναι η ταυτοποίηση του προς αντιμετώπιση είδους. Η ταυτοποίηση με μορφομετρικές μεθόδους για το γένος *Meloidogyne* χρειάζεται υψηλή εξειδίκευση, ενώ ταυτόχρονα είναι χρονοβόρα και αναξιόπιστη (Blok and Powers, 2009). Για τον λόγο αυτό, υπήρξε ανάγκη χρησιμοποίησης μοριακής μεθόδου ταυτοποίησης των πληθυσμών. Το άμεσα διαθέσιμο στάδιο ανάπτυξης των κομβονηματωδών στο έδαφος είναι αυτό της προνύμφης δευτέρου σταδίου. Χρησιμοποιήθηκε πρωτόκολλο εξαγωγής DNA από 100 J2s και χρήσης εξειδικευμένων εκκινητών για ανίχνευση των τριών ειδών *M. javanica*, *M. incognita* και *M. arenaria*. Από τους 32 πληθυσμούς, που ταυτοποιήθηκαν, προκύπτει πως το είδος *M. javanica*, το οποίο ανιχνεύθηκε σε 29 από αυτούς, επικρατεί στην περιοχή. Το είδος *M. incognita* ανιχνεύθηκε σε τέσσερις

πληθυσμούς, ενώ σε κανέναν δεν ανιχνεύθηκε το είδος *M. arenaria* (Πίνακας 4.3). Για το είδος *M. javanica* υπάρχουν αναφορές (Netscher et al., 1990; Ogbuji and Okafor, 1984; Tzortzakakis, 1997; Tzortzakakis et al., 1999), ότι αδυνατεί να πολλαπλασιαστεί σε φυτά πιπεριάς. Αδυναμία αναπαραγωγής σε φυτά πιπεριάς για το *M. javanica* παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη, καθώς δεν εμφανίστηκαν ωόσακκοι στις ρίζες φυτών πιπεριάς μετά από τεχνητή μόλυνση με 400 J2s δεκατεσσάρων πληθυσμών *M. javanica*. Αντίθετα μετά από τεχνητή μόλυνση με 400 J2s τεσσάρων πληθυσμών *M. incognita* παρουσιάστηκαν 86, 82, 25 και 54 ωόσακκοι (Γράφημα 4.2). Σε επτά πληθυσμούς *M. javanica* παρατηρήθηκε πολύ μικρός αριθμός (1-4) ωόσακκων. Πιθανός λόγος είναι η ύπαρξη δεύτερου είδους μέσα στον πληθυσμό σε πολύ μικρό ποσοστό, του οποίου η ανίχνευση δεν ήταν δυνατή. Η παρουσία περισσότερων του ενός ειδών μέσα σε ένα πληθυσμό κατά αυτόν τον τρόπο έχει παρατηρηθεί ξανά. Σε προηγούμενη μελέτη ανιχνεύθηκε η παρουσία *M. javanica* σε μικρό ποσοστό σε πληθυσμούς, οι οποίοι είχαν αρχικά ταυτοποιηθεί ως *M. arenaria* και *M. incognita* (Tzortzakakis et al., 2008). Συμπερασματικά η ενσωμάτωση καλλιέργειας πιπεριάς σε συστήματα εναλλαγής καλλιεργειών, μπορεί να αποδειχθεί αποτελεσματική για τον έλεγχο του μεγαλύτερου μέρους των πληθυσμών της περιοχής.

Η αμειψισπορά αποτελεί μια από τις βασικότερες πρακτικές για τον έλεγχο των κομβοηματοδών (Nyczepir and Thomas, 2009; Karssen et al., 2013). Λόγω του μεγάλου εύρους ξενιστών του γένους *Meloidogyne*, η εύρεση φυτών μη ξενιστών και η ενσωμάτωση τους σε συστήματα εναλλαγής καλλιεργειών είναι δύσκολη. Η πιπεριά, όπως αναφέρθηκε, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο πληθυσμών *M. javanica* αλλά όχι στην περίπτωση παρουσίας άλλων ειδών. Η ένταξη ανθεκτικών ποικιλιών σε προγράμματα αμειψισποράς μπορεί να αποτελέσει λύση στο πρόβλημα. Στο εμπόριο είναι διαθέσιμα υβρίδια τομάτας, στα οποία έχει ενσωματωθεί ο γόνος *Mi*, που προσδίδει ανθεκτικότητα ενάντια στα τρία τροπικά είδη *M. javanica*, *M. incognita* και *M. arenaria*. Ωστόσο, σε πολλές χώρες της Μεσογείου, συμπεριλαμβανομένου και της Ελλάδας, έχουν ανιχνευθεί παθότυποι πληθυσμοί κομβοηματοδών, οι οποίοι πολλαπλασιάζονται στα ανθεκτικά υβρίδια στον ίδιο βαθμό με τα ευαίσθητα (Devran and Söğüt, 2010; Robertson et al., 2006; Omat et al., 2001; Eddaoudi et al., 1997; Molinari et al., 1997; Castagnone-Sereno et al., 1994; Philis and Vakis, 1977). Συγκεκριμένα στην Ελλάδα την περίοδο 1994-2016 έχουν βρεθεί 19 παθότυποι πληθυσμοί και γενικότερα παρατηρείται μια εικόνα αύξησης των παθότυπων στο σύνολο των συλλεγόμενων μέχρι τώρα πληθυσμών, όσον αφορά την περιοχή της Κρήτης (Tzortzakakis et al., 2016). Όπως αναφέρθηκε η παθογένεια σε ανθεκτικά υβρίδια τομάτας μπορεί να εμφανιστεί είτε με φυσικό τρόπο (Williamson, 1998) είτε μετά από συνεχόμενη επιλογή σε

φυτά τομάτας με το γόνο *Mi* (Castagnone-Sereno et al., 1994). Καθώς στην περιοχή της Κυπαρισσίας οι παραγωγοί συνηθίζουν να καλλιεργούν το ανθεκτικό υβρίδιο cv. Elpida (γόνος *Mi*) κατά τη χειμερινή καλλιεργητική περίοδο (Αύγουστος – Δεκέμβριος), θεωρήθηκε σημαντικός ο έλεγχος των συλλεγόμενων πληθυσμών για ύπαρξη παθογένειας σε ανθεκτικά υβρίδια τομάτας. Από τους 32 πληθυσμούς που διατηρήθηκαν στο εργαστήριο 19 εμφάνισαν ωσάκκους στο ανθεκτικό υβρίδιο τομάτας cv. Silvana (Πίνακας 4.2) και επιλέχθηκαν για μελέτη της παθογένειας τους. Στον προκαταρκτικό έλεγχο της παθογένειας οι 19 παραπάνω πληθυσμοί και 3 πληθυσμοί αναγνωρισμένοι ως παθότυποι (μάρτυρες) εμφάνισαν ωσάκκους στις ρίζες του ανθεκτικού υβριδίου σε αριθμούς ανώτερους του 35% των ωσάκκων, οι οποίοι μετρήθηκαν στις ρίζες του ευαίσθητου υβριδίου cv. Belladonna. Η απουσία ωσάκκων στις ρίζες του ανθεκτικού υβριδίου για έναν πληθυσμό αναγνωρισμένο ως μη παθότυπο και για έναν πληθυσμό ο οποίος δεν είχε εμφανίσει αρχικά ωσάκκους σε αυτό, αποδεικνύουν την αξιοπιστία του ελέγχου. Οι πληθυσμοί χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω αξιολόγηση. Μετά από μέτρηση ωσάκκων σε 4 φυτά cv Belladonna και 4 φυτά cv. Silvana, 14 πληθυσμοί και οι 3 παθότυποι μάρτυρες πληθυσμοί δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $\alpha = 0.05$ ) στην προσβολή των δύο υβριδίων, ενώ ένας πληθυσμός παρουσίασε υψηλότερη προσβολή του ανθεκτικού υβριδίου, η οποία διέφερε στατιστικά από αυτή του ευαίσθητου (Γράφημα 4.3). Ο μέσος αριθμός ωών ανά ωσάκκο για όλους τους πληθυσμούς ήταν ανώτερος των 200 και στα δύο υβρίδια (Γράφημα 4.4). Συμπερασματικά λοιπόν, 15 πληθυσμοί αξιολογούνται ως παθότυποι, οι οποίοι στο σύνολο των 32 πληθυσμών παρατηρούνται σε ποσοστό 47%. Στο σύνολο των 44 δειγμάτων, στα οποία ανιχνεύθηκαν κομβοηματοώδεις το ποσοστό παθότυπων είναι τουλάχιστον 34%. Επίσης σε 4 πληθυσμούς παρατηρήθηκε προσβολή του ανθεκτικού υβριδίου σε αριθμούς χαμηλότερους από αυτών του ευαίσθητου, οι οποίοι διέφεραν στατιστικά σημαντικά. Πιθανή αιτία είναι η ανάπτυξη παθογένειας ενός μόνο μέρους των ατόμων των συγκεκριμένων πληθυσμών. Γενικότερα η αξιολόγηση ενός πληθυσμού ως παθότυπου δεν καθιστά απαραίτητα απόλυτα αναποτελεσματική την χρησιμοποίηση των ανθεκτικών ποικιλιών. Καθώς η παθογένεια ενός πληθυσμού μπορεί να είναι χαρακτηριστικό ορισμένων ατόμων του πληθυσμού, η μη εντατική χρησιμοποίηση ανθεκτικής ποικιλίας, αλλά η εναλλαγή της με ευαίσθητη και καλλιέργεια μη ξενιστή δύναται να αυξήσει το ποσοστό των μη παθότυπων ατόμων προς το σύνολο του πληθυσμού (Starr and Mercer, 2009). Επιπρόθετα, μέριμνα πρέπει να ληφθεί για την αποφυγή μετάδοσης παθότυπων πληθυσμών σε νέες εκτάσεις.

Στο πλαίσιο συλλογής πληροφοριών λοιπόν για έναν πληθυσμό, αρκετά σημαντικός είναι ο έλεγχος της παθογένειας του σε ανθεκτικά υβρίδια τομάτας. Ωστόσο, ο έλεγχος της

παθογένειας μέσω μόλυνσης φυτών ανθεκτικού υβριδίου και αξιολόγησης της προσβολής είναι αρκετά χρονοβόρος. Έτσι, δημιουργείται η ανάγκη για έρευνα ανάπτυξης νέων τεχνικών (π.χ. μοριακών) για ανίχνευση της παθογένειας ενός πληθυσμού σε ανθεκτικά υβρίδια.

Από τους πληθυσμούς που αξιολογήθηκαν ως παθότυποι, οι 14 ταυτοποιήθηκαν ως *M. javanica* και ένας πληθυσμός ως *M. incognita*. Ο παθότυπος πληθυσμός *M. incognita* παρουσίασε επίσης ένδειξη ικανότητας αναπαραγωγής σε ευαίσθητη ποικιλία πιπεριάς μετά από τεχνητή μόλυνση με 400 J2s (Γράφημα 4.2). Σύμφωνα με τους (Castagnone-Sereno et al., 1992) ανάπτυξη παθογένειας του *M. incognita* στο γόνιο *Mi* συνοδεύεται με απώλεια της ικανότητας αναπαραγωγής σε ευαίσθητη πιπεριά. Γεγονός, που έρχεται σε αντίθεση με νεότερη έρευνα, σύμφωνα με την οποία πληθυσμοί του *M. incognita* στη Ισπανία αναπαράχθηκαν σε ανθεκτικές ποικιλίες τομάτας (γόνος *Mi*), αλλά και σε ευαίσθητες και ανθεκτικές ποικιλίες πιπεριάς (Robertson et al., 2006). Επιπλέον, σε έρευνα των (Djian-Caporalino et al., 2011) δύο παθότυποι πληθυσμοί *M. incognita* για το γόνιο *Mi*, ήταν ικανοί να αναπαραχθούν σε ευαίσθητη πιπεριά. Στην Ελλάδα έχουν αναφερθεί δύο παθότυποι πληθυσμοί *M. incognita* για το γόνιο *Mi*, από τους οποίους μόνο ο ένας αναπαράγεται σε ευαίσθητη ποικιλία πιπεριάς (Tzortzakakis et al., 2014). Ο πληθυσμός αυτός χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας (P-Mi NG-vir-inc) στην παρούσα μελέτη και η παθογένεια του σε ανθεκτικό υβρίδιο τομάτας και ευαίσθητης πιπεριάς επιβεβαιώθηκε. Η ικανότητα πληθυσμών *M. incognita* να αναπαράγονται σε ανθεκτικά υβρίδια τομάτας και φυτά πιπεριάς είναι μεγάλης σημασίας, εφόσον καθιστά την αντιμετώπιση τους ιδιαίτερα δύσκολη.

Με την κατάργηση του βρωμιούχου μεθυλίου έχει παρατηρηθεί αύξηση της χρησιμοποίησης μη καπνιστικών νηματωδοκτόνων για τον έλεγχο των κομβονηματωδών. Αντίστοιχη αύξηση στη χρήση συγκεκριμένων εντομοκτόνων, λόγω της κατάργησης πολλών δραστικών ουσιών, έχει προκαλέσει την ανάπτυξη ανθεκτικότητας πολλών ειδών σε αυτά (Sparks and Nauen, 2015). Γεννάται το ερώτημα αν με την αυξημένη πλέον χρήση των μη καπνιστικών νηματωδοκτόνων παρουσιάζεται το ίδιο φαινόμενο. Επιπρόσθετα, οι (Meher et al., 2009) κάνουν λόγο για ανάπτυξη παθογένειας πληθυσμού *M. incognita* στο γόνιο *Mi*, μετά από συνεχή του έκθεση σε μη θανατηφόρες δόσεις νηματωδοκτόνου. Για τη λήψη ένδειξης παρουσίας ανθεκτικότητας σε μη καπνιστικά νηματωδοκτόνα, πραγματοποιήθηκαν βιοδοκιμές με χρήση τριών συγκεντρώσεων της δραστικής oxamyl και τριών συγκεντρώσεων της δραστικής fosthiazate. Από τα αποτελέσματα φαίνεται να υπάρχει διαφοροποίηση μεταξύ ορισμένων πληθυσμών, συμπεριλαμβανομένου και των μαρτύρων, ως προς τη συμπεριφορά τους στις διάφορες συγκεντρώσεις των δραστικών. Σε ορισμένους πληθυσμούς το ποσοστό παράλυσης είναι μικρότερο από ότι σε άλλους, αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις

βρίσκεται μέσα στο εύρος τιμών των δύο μαρτύρων χωρίς να διαφέρει στατιστικά σημαντικά ( $\alpha = 0.05$ ) και από τους δύο. Εξαίρεση αποτελεί η συγκέντρωση των 3 ppm fosthiazate (Γράφημα 4.8), όπου δύο πληθυσμοί παρουσιάζουν χαμηλότερο ποσοστό παράλυσης και διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από τους δύο μάρτυρες. Επίσης, στη συγκέντρωση των 12 ppm fosthiazate (Γράφημα 4.10) πέντε πληθυσμοί παρουσιάζουν χαμηλότερο ποσοστό παράλυσης και διαφέρουν στατιστικά σημαντικά και από τους δύο μάρτυρες. Ωστόσο, το ποσοστό παράλυσης είναι αρκετά υψηλό, καθώς και στις πέντε περιπτώσεις ξεπερνάει το 77%. Διαφοροποίηση μεταξύ ποσοστών παράλυσης, πληθυσμών κομβονηματοδών, σε μη καπνιστικά νηματωδοκτόνα υπήρξε και σε παρόμοια πρόσφατη έρευνα. Ωστόσο η διαφορετική αντίδραση των πληθυσμών αξιολογήθηκε ως φυσιολογική και ως μη ικανή να δικαιολογήσει ανάπτυξη μηχανισμού ανθεκτικότητας σε καπνιστικά νηματωδοκτόνα (Tzortzakakis, 2017). Μία παρατήρηση, που αξίζει να σημειωθεί, είναι το μικρότερο μέσο ποσοστό παράλυσης των πληθυσμών *M. incognita* σε σχέση με τους πληθυσμούς *M. javanica* και για τις 3 συγκεντρώσεις του oxamyl.

Από τις παραπάνω παρατηρήσεις δεν προκύπτει σαφής ένδειξη ανάπτυξης ανθεκτικότητας, στις δύο δραστικές, παρά τη συχνή χρήση των αντίστοιχων σκευασμάτων στα εδάφη από τα οποία προέρχονται οι πληθυσμοί. Στο συμπέρασμα αυτό συνεισφέρει και ο πολύ μικρός αριθμός άλλων μελετών γύρω από το φαινόμενο. Προσπάθεια τεχνητής ανάπτυξης ανθεκτικότητας σε μη καπνιστικά νηματωδοκτόνα έχει γίνει από τους (Yamashita and Viglierchio, 1986) και τους (Yamashita et al., 1986) με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται να μην προσφέρουν αξιόπιστη απάντηση στην ύπαρξη ή όχι του φαινομένου.

Η απουσία εμφανούς ένδειξης ανάπτυξης ανθεκτικότητας των κομβονηματοδών σε νηματωδοκτόνα, δεν οδηγεί απαραίτητα στο συμπέρασμα πως είναι αδύνατο να δημιουργηθεί. Η μη εμφάνιση της μέχρι στιγμής, είναι πιθανό να οφείλεται στον τρόπο εφαρμογής των νηματωδοκτόνων και σε βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες, που επηρεάζουν τη συγκέντρωσή τους στο έδαφος (Rousidou et al., 2016; Pantelelis et al., 2006). Τα νηματωδοκτόνα δεν εφαρμόζονται τόσο συχνά όσο τα εντομοκτόνα. Η επέμβαση πραγματοποιείται μία έως τρεις φορές ανά καλλιεργητική περίοδο. Επιπρόσθετα, για τις δύο δραστικές ουσίες υπάρχουν αναφορές επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης από μικροοργανισμούς του εδάφους (Papadopoulou et al., 2016; Osborn et al., 2010). Ως συνέπεια ορισμένες προνύμφες είτε δεν εκτίθενται στις δραστικές αυτές ουσίες είτε εκτίθενται για μικρό χρονικό διάστημα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις αυτών. Έτσι, η ανάπτυξη ανθεκτικότητας είναι δύσκολη κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες. Η



αναποτελεσματικότητα που παρουσιάζεται στον έλεγχο των κομβοηματοδών, μέσω μόνο της χρήσης μη καπνιστικών νηματοδοκτών, πιθανότατα να οφείλεται στους ίδιους λόγους.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανάδειξη του προβλήματος των κομβοηματοδών στην ευρύτερη περιοχή της Κυπαρισσίας και ορισμένων χαρακτηριστικών των πληθυσμών, τα οποία χρειάζεται να ληφθούν υπόψη στην προσπάθεια αντιμετώπισης τους. Οι πρακτικές αντιμετώπισης, που ακολουθούνται μετά την κατάργηση του βρωμιούχου μεθυλίου, δεν παρουσιάζουν αποτελεσματική μείωση των επιπέδων των πληθυσμών στην περιοχή. Κρίνεται απαραίτητη λοιπόν, η ένταξη των καλλιεργειών σε προγράμματα ολοκληρωμένης αντιμετώπισης των κομβοηματοδών. Ιδανικότερη όμως είναι η εφαρμογή προγραμμάτων ολοκληρωμένης διαχείρισης των καλλιεργειών με στόχο την αντιμετώπιση περισσότερων εχθρών και παθογόνων μικροοργανισμών και αύξηση της τελικής αποδόσεως. Είναι αναγκαία η συνεργασία μεταξύ των διάφορων τομέων της Γεωπονίας και η μετάδοση των αποτελεσμάτων της έρευνας στους παραγωγούς. Τέλος, οι παραγωγοί χρειάζεται να είναι δεκτικοί και έτοιμοι να λάβουν τα απαραίτητα μέτρα για τη βελτίωση των καλλιεργειών τους.

## 6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abad, P., Favery, B., Rosso, M.-N., Castagnone-Sereno, P., 2003. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. *Mol. Plant Pathol.* 4, 217–224.
- Abbott, W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* 18, 265–267.
- Adam, M. a. M., Phillips, M.S., Blok, V.C., 2007. Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). *Plant Pathol.* 56, 190–197. doi:10.1111/j.1365-3059.2006.01455.x
- Agrios, G.N., Trejos, F., Eugenia, M., Menjivar Barahona, R.D., Descamps, P., Castro, R., Muñoz, R.S., Piedrahita, G., OA Rivillas Osorio, C.A., Ardila, C., others, 2004. Plant pathology. Universidad Nacional, Heredia (Costa Rica).
- Al-Banna, L., Darwish, R.M., Aburjai, T., 2003. Effect of plant extracts and essential oils on root-knot nematode. *Phytopathol. Mediterr.* 42, 123–128.
- Andrés, M.F., González-Coloma, A., Sanz, J., Burillo, J., Sainz, P., 2012. Nematicidal activity of essential oils: a review. *Phytochem. Rev.* 11, 371–390.
- Back, M.A., Haydock, P.P.J., Jenkinson, P., 2002. Disease complexes involving plant parasitic nematodes and soilborne pathogens. *Plant Pathol.* 51, 683–697.
- Bai, C.Q., Liu, Z.L., Liu, Q.Z., 2011. Nematicidal constituents from the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* aerial parts. *J. Chem.* 8, S143–S148.
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M., 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol* 57, 233–266.
- Batchelor, T.A., 2002. International and European community controls on methyl bromide & the status of methyl bromide use and alternatives in the European Community, in: *Proceedings of International Conference on Alternatives to Methyl Bromide* Ø E. p. 37.
- Becker, J.O., Morton, H.V., Hofer, D., 2003. Abamectin seed coating: A new nematicide plant protection tool. *J. Nematol.* 35, 324.
- Berkeley, M.J., 1855. Vibrio forming excrescences on the roots of cucumber plants. *Gard. Chron.* Abril 220.
- Bird, A.F., 1958. The adult female cuticle and egg sac of the genus *Meloidogyne* Goeldi, 1887. *Nematologica* 3, 205–212.
- Blok, V.C., Powers, T.O., 2009. Biochemical and molecular identification. *Root-Knot Nematodes* 98–118.
- Bridge, J., Starr, J.L., 2007. *Plant nematodes of agricultural importance*. Academic Press.
- Brito, J., Powers, T.O., Mullin, P.G., Inerra, R.N., Dickson, D.W., 2004. Morphological and molecular characterization of *Meloidogyne mayaguensis* isolates from Florida. *J. Nematol.* 36, 232.
- Castagnone-Sereno, P., Bongiovanni, M., Dalmaso, A., 1994. Reproduction of virulent isolates of *Meloidogyne incognita* on susceptible and Mi-resistant tomato. *J. Nematol.* 26, 324.
- Castagnone-Sereno, P., Bongiovanni, M., Dalmaso, A., 1992. Differential expression of root-knot nematode resistance genes in tomato and pepper: evidence with *Meloidogyne incognita* virulent and avirulent near-isogenic lineages. *Ann. Appl. Biol.* 120, 487–492.
- Chitwood, B.G., 1949. Root-knot nematodes, part I. A revision of the genus *Meloidogyne* Goeldi, 1887. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 16, 317329.

- Cohen, M.F., Yamasaki, H., Mazzola, M., 2005. Brassica napus seed meal soil amendment modifies microbial community structure, nitric oxide production and incidence of *Rhizoctonia* root rot. *Soil Biol. Biochem.* 37, 1215–1227.
- Collange, B., Navarrete, M., Peyre, G., Mateille, T., Tchamitchian, M., 2011. Root-knot nematode (*Meloidogyne*) management in vegetable crop production: The challenge of an agronomic system analysis. *Crop Prot.* 30, 1251–1262.
- Conceição, I.L., Tzortzakakis, E.A., Gomes, P., Abrantes, I., Da Cunha, M.J., 2012. Detection of the root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica* in Greece. *Eur. J. Plant Pathol.* 134, 451–457.
- Cook, R., Starr, J.L., 2006. Resistant cultivars. *Plant Nematol.* 370–389.
- Cortada, L., Sorribas, F.J., Ornat, C., Andrés, M.F., Verdejo-Lucas, S., 2009. Response of tomato rootstocks carrying the Mi-resistance gene to populations of *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* and *M. javanica*. *Eur. J. Plant Pathol.* 124, 337–343.
- Davide, R.G., Triantaphyllou, A.C., 1968. Influence of the environment on development and sex differentiation of root-knot nematodes. *Nematologica* 14, 37–46.
- Davies, K.G., Laird, V., Kerry, B.R., others, 1991. The motility, development and infection of *Meloidogyne incognita* encumbered with spores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. *Rev. Nématologie* 14, 611–618.
- Davies, K.G., Rowe, J., Williamson, V.M., 2008. Cuticle variation amongst amphimictic and parthenogenetic populations of nematode (*Meloidogyne* spp.) as exhibited by a bacterial parasite (*Pasteuria penetrans*). *Int J Parasitol* 38, 851–859.
- Davis, R.F., Johnson, A.W., Wauchope, R.D., 1993. Accelerated degradation of fenamiphos and its metabolites in soil previously treated with fenamiphos. *J. Nematol.* 25, 679.
- Devran, Z., Söğüt, M.A., 2010. Occurrence of virulent root-knot nematode populations on tomatoes bearing the Mi gene in protected vegetable-growing areas of Turkey. *Phytoparasitica* 38, 245–251.
- Di Vito, M., Cianciotta, V., Zaccheo, G., 1992. Yield of susceptible and resistant pepper in microplots infested with *Meloidogyne incognita*. *Nematopica* 22, 1–6.
- Di Vito, M., Greco, N., Carella, A., 1986. Effect of *Meloidogyne incognita* and importance of the inoculum on the yield of eggplant. *J. Nematol.* 18, 487.
- Djian-Caporalino, C., Molinari, S., Palloix, A., Ciancio, A., Fazari, A., Marteu, N., Ris, N., Castagnone-Sereno, P., 2011. The reproductive potential of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* is affected by selection for virulence against major resistance genes from tomato and pepper. *Eur. J. Plant Pathol.* 131, 431.
- Djian-Caporalino, C., Pijarowski, L., Januel, A., Lefebvre, V., Daubeze, A., Palloix, A., Dalmasso, A., Abad, P., 1999. Spectrum of resistance to root-knot nematodes and inheritance of heat-stable resistance in in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 99, 496–502.
- Eddaoudi, M., Ammati, M., Rammah, A., 1997. Identification of the resistance breaking populations of *Meloidogyne* on tomatoes in Morocco and their effect on new sources of resistance. *Fundam. Appl. Nematol.* 20, 285–290.
- Eisenback, J.D., Triantaphyllou, H.H., 1991. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. *Man. Agric. Nematol.* 191–274.
- Esbenshade, P.R., Triantaphyllou, A.C., 1990. Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. *J. Nematol.* 22, 10.
- Evans, K., Trudgill, D.L., Webster, J.M., 1993. Plant parasitic nematodes in temperate agriculture. CAB international.
- Faske, T.R., Starr, J.L., 2006. Sensitivity of *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis* to abamectin. *J. Nematol.* 38, 240–244.
- Giannakou, I.O., Anastasiadis, I.A., Gowen, S.R., Prophetou-Athanasiadou, D.A., 2007. Effects of a non-chemical nematicide combined with soil solarization for the control of root-knot nematodes. *Crop Prot.* 26, 1644–1654.

- Giannakou, I.O., Karpouzas, D.G., Anastasiades, I., Tsiropoulos, N.G., Georgiadou, A., 2005. Factors affecting the efficacy of non-fumigant nematicides for controlling root-knot nematodes. *Pest Manag. Sci.* 61, 961–972.
- Goeldi, E.A., 1887. Relatório sobre a moléstia do cafeeiro na Província do Rio de Janeiro.
- Goodell, P.B., Ferris, H., 1989. Influence of environmental factors on the hatch and survival of *Meloidogyne incognita*. *J. Nematol.* 21, 328.
- Gupta, A., Sharma, S., Naik, S.N., 2011. Biopesticidal value of selected essential oils against pathogenic fungus, termites, and nematodes. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 65, 703–707.
- Halbrendt, J.M., LaMondia, J.A., 2004. Crop rotation and other cultural practices., in: *Nematology: Advances and Perspectives*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 909–930.
- Hallmann, J., Davies, K.G., Sikora, R., 2009. Biological Control Using Microbial Pathogens, Endophytes and Antagonists, in: *Root-Knot Nematodes*. p. 380.
- Haydock, P.P.J., Woods, S.R., Grove, I.G., Hare, M.C., 2006. Chemical control of nematodes. *Plant Nematol.* 392–410.
- Hidalgo-Diaz, L., Kerry, B.R., 2008. Integration of biological control with other methods of nematode management, in: *Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes*. Springer, pp. 29–49.
- Hussey, R.S., Barker, K.R., 1973. Comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Dis. Report*.
- Ibrahim, S.K., Perry, R.N., 1993. Use of esterase patterns of females and galled roots for the identification of species of *Meloidogyne*. *Fundam. Appl. Nematol.*
- Jansson, R.K., Dybas, R.A., 1998. Avermectins: biochemical mode of action, biological activity and agricultural importance, in: *Insecticides with Novel Modes of Action*. Springer, pp. 152–170.
- Johnson, A.W., 1985. The role of nematicides in nematode management. *Adv. Treatise Meloidogyne Vol Biol. Control* 269–267.
- Karssen, G., 2002. The plant parasitic nematode genus *Meloidogyne* Goeldi, 1892 (Tylenchida) in Europe. Brill.
- Karssen, G., Wesemael, W.M.L., Moens, M., 2013. Root-knot nematodes, in: *Plant Nematology*. CABI, pp. 73–108.
- Katan, J., 1981. Solar heating (solarization) of soil for control of soilborne pests. *Annu. Rev. Phytopathol.* 19, 211–236.
- Katan, J., 1980. Solar pasteurization of soils for disease control: status and prospects. *Plant Dis.* 64, 450–454.
- Kiewnick, S., Sikora, R.A., 2006. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* strain 251. *Biol. Control* 38, 179–187.
- Kiewnick, S., Wolf, S., Willareth, M., Frey, J.-E., 2013. Identification of the tropical root-knot nematode species *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using a multiplex PCR assay. *Nematology* 15, 891–894.
- Kirkegaard, J.A., Sarwar, M., 1998. Biofumigation potential of brassicas. *Plant Soil* 201, 71–89.
- Krechel, A., Faupel, A., Hallmann, J., Ulrich, A., Berg, G., 2002. Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. *Can. J. Microbiol.* 48, 772–786.
- Larkin, R.P., Griffin, T.S., 2007. Control of soilborne potato diseases using Brassica green manures. *Crop Prot.* 26, 1067–1077.
- Lawrence, K.S., Feng, Y., Lawrence, G.W., Burmester, C.H., Norwood, S.H., 2005. Accelerated degradation of aldicarb and its metabolites in cotton field soils. *J. Nematol.* 37, 190.

- Lembright, H.W., 1990. Soil fumigation: Principles and application technology. *J. Nematol.* 22, 632.
- Luc, M., Bridge, J., Sikora, R.A., 2005. Reflections on Nematology in Subtropical and Tropical Agriculture. *Plant Parasit. Nematodes Subtrop. Trop. Agric.*
- Madulu, J.D., Trudgill, D.L., 1994. Influence of temperature on the development and survival of *Meloidogyne javanica*. *Nematologica* 40, 230–243.
- Mazzola, M., Granatstein, D.M., Elfving, D.C., Mullinix, K., 2001. Suppression of specific apple root pathogens by *Brassica napus* seed meal amendment regardless of glucosinolate content. *Phytopathology* 91, 673–679.
- McSorley, R., 1999. Host suitability of potential cover crops for root-knot nematodes. *J. Nematol.* 31, 619.
- McSorley, R., Gallaher, R.N., 1995. Cultural practices improve crop tolerance to nematodes. *Nematropica* 25, 53–60.
- Meher, H.C., Gajbhiye, V.T., Chawla, G., Singh, G., 2009. Virulence development and genetic polymorphism in *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood after prolonged exposure to sublethal concentrations of nematicides and continuous growing of resistant tomato cultivars. *Pest Manag. Sci.* 65, 1201–1207.
- Melakeberhan, H., Xu, A., Kravchenko, A., Mennan, S., Riga, E., 2006. Potential use of arugula (*Eruca sativa* L.) as a trap crop for *Meloidogyne hapla*. *Nematology* 8, 793–799.
- Mercer, C.F., Starr, J.L., Miller, K.J., 1997. Host-parasite relationships of *Meloidogyne trifoliophila* isolates from New Zealand. *J. Nematol.* 29, 55.
- Minagric, 2012. *Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων*. [Online] Available at: <http://www.minagric.gr/greek/data/nemathorin-150-3050.pdf> [Accessed 8 2017].
- Minagric, 2014. *Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων*. [Online] Available at: <http://www.minagric.gr/greek/data/VYDATE-10SL-tr14-fasma-imerominia-lixis-clp-3054.pdf#http://www.minagric.gr/greek/data/VYDATE-10SL-tr14-fasma-imerominia-lixis-clp-3054.pdf> [Accessed 8 2017].
- Moens, M., Perry, R.N., Starr, J.L., others, 2009. *Meloidogyne* species—a diverse group of novel and important plant parasites. *Root-Knot Nematodes* 1, 1–17.
- Mojtahedi, H., Santo, G.S., Ingham, R.E., 1993. Suppression of *Meloidogyne chitwoodi* with sudangrass cultivars as green manure. *J. Nematol.* 25, 303.
- Molinari, S., Miacola, C., others, 1997. Interactions between resistant tomato cvs and *Meloidogyne* spp. in vitro. *Nematol. Mediterr.* 25, 63–72.
- Monfort, W.S., Kirkpatrick, T.L., Long, D.L., Rideout, S., 2006. Efficacy of a novel nematicidal seed treatment against *Meloidogyne incognita* on cotton. *J. Nematol.* 38, 245–249.
- Munif, A., Hallmann, J., Sikora, R.A., 2000. Evaluation of the biocontrol activity of endophytic bacteria from tomato against *Meloidogyne incognita*.
- Netscher, C., Sikora, R.A., others, 1990. Nematode parasites of vegetables. *Plant Parasit. Nematodes Subtrop. Trop. Agric.* 237–283.
- Ntalli, N.G., Manconi, F., Leonti, M., Maxia, A., Caboni, P., 2011. Aliphatic ketones from *Ruta chalepensis* (Rutaceae) induce paralysis on root knot nematodes. *J. Agric. Food Chem.* 59, 7098–7103.
- Ntalli, N.G., Nasiou, E., Menkissoglu-Spiroudi, U., 2013. Evaluation of essential oils from rosemary, orange, lavender and false yellowhead on hatching and motility of root-knot nematode. *J. Agric. Sci. Technol.* A 3.
- Nyczepir, A.P., Thomas, S.H., 2009. Current and future management strategies in intensive crop production systems, p 412–443, in: *Root Knot Nematodes*. CAB International, Wallingford, United Kingdom. pp. 412–443.

- Ogboji, R.O., Okafor, M.O., 1984. Comparative resistance of nine pepper (*Capsicum annum* L.) cultivars to three root-knot nematode (*Meloidogyne*) species and their related use in traditional cropping systems. *Beitr. Trop. Landwirtsch. Veterinarmed.*
- Oka, Y., Nacar, S., Putievsky, E., Ravid, U., Yaniv, Z., Spiegel, Y., 2000. Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. *Phytopathology* 90, 710–715.
- Oliveira, D.F., Campos, V.P., Amaral, D.R., Nunes, A.S., Pantaleão, J.A., Costa, D.A., 2007. Selection of rhizobacteria able to produce metabolites active against *Meloidogyne exigua*. *Eur. J. Plant Pathol.* 119, 477–479.
- Ornat, C., Sorribas, F.J., 2008. Integrated management of root-knot nematodes in mediterranean horticultural crops, in: *Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes*. Springer, pp. 295–319.
- Ornat, C., Verdejo-Lucas, S., Sorribas, F.J., 2001. A population of *Meloidogyne javanica* in Spain virulent to the Mi resistance gene in tomato. *Plant Dis.* 85, 271–276.
- Ornat, C., Verdejo-Lucas, S., Sorribas, F.J., others, 1997. Effect of the Previous Crop on Population Densities of *Meloidogyne javanica* and Yield of Cucumber. *Nematropica* 27, 85–90.
- Osborn, R.K., Edwards, S.G., Wilcox, A., Haydock, P.P., 2010. Potential enhancement of degradation of the nematicides aldicarb, oxamyl and fosthiazate in UK agricultural soils through repeated applications. *Pest Manag. Sci.* 66, 253–261. doi:10.1002/ps.1866
- Pantelelis, I., Karpouzas, D.G., Menkissoglu-Spiroudi, U., Tsiropoulos, N., 2006. Influence of Soil Physicochemical and Biological Properties on the Degradation and Adsorption of the Nematicide Fosthiazate. *J. Agric. Food Chem.* 54, 6783–6789. doi:10.1021/jf061098p
- Papadopoulou, E.S., Lagos, S., Spentza, F., Vidiadakis, E., Karas, P.A., Klitsinaris, T., Karpouzas, D.G., 2016. The dissipation of fipronil, chlorpyrifos, fosthiazate and ethoprophos in soils from potato monoculture areas: first evidence for the enhanced biodegradation of fosthiazate. *Pest Manag. Sci.* 72, 1040–1050. doi:10.1002/ps.4092
- Perry, R.N., Moens, M., Starr, J.L., 2009. *Root-knot Nematodes*. CABI.
- Philis, J., Vakis, N., 1977. Resistance of tomato varieties to the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in Cyprus. *Nematol. Mediterr.* 5.
- PiedraBuena, A., García-Álvarez, A., Díez-Rojo, M.Á., Bello, A., 2006. Use of crop residues for the control of *Meloidogyne incognita* under laboratory conditions. *Pest Manag. Sci.* 62, 919–926.
- Ploeg, A., 2008. Biofumigation to manage plant-parasitic nematodes, in: *Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes*. Springer, pp. 239–248.
- Ploeg, A.T., Maris, P.C., 1999. Effects of temperature on the duration of the life cycle of a *Meloidogyne incognita* population. *Nematology* 1, 389–393.
- Powers, T.O., Harris, T.S., 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. *J. Nematol.* 25, 1.
- Rich, J.R., Dunn, R.A., Noling, J.W., 2004. Nematicides: past and present uses., in: *Nematology: Advances and Perspectives*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 1179–1200.
- Riegel, C., Noe, J.P., 2000. Chicken litter soil amendment effects on soilborne microbes and *Meloidogyne incognita* on cotton. *Plant Dis.* 84, 1275–1281.
- Roberts, P.A., 2002. Concepts and consequences of resistance. *Plant Resist. Parasit. Nematodes* CAB Int. Wallingford 23–41.
- Roberts, P.A., 1993. The future of nematology: integration of new and improved management strategies. *J. Nematol.* 25, 383.

- Robertson, L., López-Pérez, J.A., Bello, A., Díez-Rojo, M.A., Escuer, M., Piedra-Buena, A., Ros, C., Martínez, C., 2006. Characterization of *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria* and *M. hapla* populations from Spain and Uruguay parasitizing pepper (*Capsicum annuum* L.). *Crop Prot.* 25, 440–445.
- Rousidou, C., Karaiskos, D., Myti, D., Karanasios, E., Karas, P.A., Tourna, M., Tzortzakakis, E.A., Karpouzias, D.G., 2016. Distribution and function of carbamate hydrolase genes *cehA* and *mcd* in soils: the distinct role of soil pH. *FEMS Microbiol. Ecol.* 93. doi:10.1093/femsec/fiw219
- Sangwan, N.K., Verma, B.S., Verma, K.K., Dhindsa, K.S., 1990. Nematicidal activity of some essential plant oils. *Pestic. Sci.* 28, 331–335.
- Sangwan, N.K., Verma, K.K., Verma, B.S., Malik, M.S., Dhindsa, K.S., 1985. Nematicidal activity of essential oils of *Cymbopogon* grasses. *Nematologica* 31, 93–99.
- Sasanelli, N., Di Vito, M., Zaccheo, G., others, 1992. Population densities of *Meloidogyne incognita* and growth of cabbage in pots. *Nematol. Mediterr.* 20, 21–23.
- Sasser, J.N., 1952. Identification of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) by host reaction. *Plant Dis. Report.* 36, 84–86.
- Sasser, J.N., Carter, C.C., 1985. Overview of the International *Meloidogyne* Project 1975–1984.
- Schouteden, N., De Waele, D., Panis, B., Vos, C.M., 2015. Arbuscular mycorrhizal fungi for the biocontrol of plant-parasitic nematodes: a review of the mechanisms involved. *Front. Microbiol.* 6.
- Siddiqui, I.A., Shaukat, S.S., 2005. *Pseudomonas aeruginosa*-mediated Induction of Systemic Resistance in Tomato Against Root-knot Nematode. *Plant Pathol. J.* 4, 21–25.
- Siddiqui, I.A., Shaukat, S.S., 2004. Systemic resistance in tomato induced by biocontrol bacteria against the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* is independent of salicylic acid production. *J. Phytopathol.* 152, 48–54.
- Siddiqui, I.A., Shaukat, S.S., Sheikh, I.H., Khan, A., 2006. Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the suppression of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in tomato. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 641–650.
- Sijmons, P.C., Atkinson, H.J., Wyss, U., 1994. Parasitic strategies of root nematodes and associated host cell responses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32, 235–259.
- Sikora, R.A., Fernandez, E., 2005. Nematode parasites of vegetables, in: *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. pp. 319–392.
- Sikora, R.A., Schäfer, K., Dababat, A.A., 2007. Modes of action associated with microbially induced in planta suppression of plant-parasitic nematodes. *Australas. Plant Pathol.* 36, 124–134.
- Smelt, J.H., Van De Peppel-Groen, A.E., Van Der Pas, L.J., Dijksterhuis, A., 1996. Development and duration of accelerated degradation of nematicides in different soils. *Soil Biol. Biochem.* 28, 1757–1765.
- Sosa, M.E., Lancelle, H.G., Tonn, C.E., Andres, M.F., Gonzalez-Coloma, A., 2012. Insecticidal and nematicidal essential oils from Argentinean *Eupatorium* and *Baccharis* spp. *Biochem. Syst. Ecol.* 43, 132–138.
- Sparks, T.C., Nauen, R., 2015. Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pestic. Biochem. Physiol.* 121, 122–128.
- Spiegel, Y., Cohn, E., Galper, S., Sharon, E., Chet, I., 1991. Evaluation of a newly isolated bacterium, *Pseudomonas chitinolytica* sp. nov., for controlling the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*\*. *Biocontrol Sci. Technol.* 1, 115–125.
- Starr, J.L., Cook, R., Bridge, J., 2002. Resistance to plant-parasitic nematodes: History, current use and future potential, in: *Plant Resistance to Parasitic Nematodes*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 1–22.
- Starr, J.L., Jeger, M.J., 1985. Dynamics of Winter Survival of Eggs and Juveniles of *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. *J. Nematol.* 17, 252–256.

- Starr, J.L., Mercer, C.F., 2009. Development of Resistant Varieties, in: Root-Knot Nematodes. pp. 326–337.
- Starr, J.L., Tomaszewski, E.K., Mundo-Ocampo, M., Baldwin, J.G., 1996. Meloidogyne partityla on Pecan Isozyme Phenotypes and Other Host. J. Nematol. 28, 565.
- Sudirman, J.M., 1995. Effect of ammonium ions on egg hatching and second-stage juveniles of Meloidogyne incognita in axenic tomato root culture. J. Nematol. 27, 346.
- Thies, J.A., Fery, R.L., 2000. Characterization of Resistance Conferred by the N gene to Meloidogyne arenaria Races 1 and 2, M. hapla, and M. javanica in Two Sets of Isogenic Lines of Capsicum annuum L. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 125, 71–75.
- Timper, P., Davis, R.F., Tillman, P.G., 2006. Reproduction of Meloidogyne incognita on winter cover crops used in cotton production. J. Nematol. 38, 83–89.
- Trudgill, D.L., 1995. An assessment of the relevance of thermal time relationships to nematology. Fundam. Appl. Nematol. 18, 407–417.
- Trudgill, D.L., Blok, V.C., 2001. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 39, 53–77.
- Tzortzakakis, E.A., 2017. In vitro susceptibility of root-knot nematode populations (Meloidogyne spp.) from Crete, Greece to oxamyl and fenamiphos. J. Plant Dis. Prot. 1–6.
- Tzortzakakis, E.A., 1997. Variability in reproduction of Meloidogyne javanica and M. incognita on tomato and pepper. Nematologica 27, 91–97.
- Tzortzakakis, E.A., Anastasiadis, A.I., Simoglou, K.B., Cantalapiedra-Navarrete, C., Palomares-Rius, J.E., Castillo, P., 2013. First Report of the Root-Knot Nematode, Meloidogyne hispanica, Infecting Sunflower in Greece. Plant Dis. 98, 703–703. doi:10.1094/PDIS-08-13-0833-PDN
- Tzortzakakis, E.A., Blok, V.C., Phillips, M.S., Trudgill, D.L., 1999. Variation in root-knot nematode (Meloidogyne spp.) in Crete in relation to control with resistant tomato and pepper. Nematology 1, 499–506.
- Tzortzakakis, E.A., Conceição, I., Dias, A.M., Simoglou, K.B., Abrantes, I., 2014. Occurrence of a new resistant breaking pathotype of Meloidogyne incognita on tomato in Greece. J. Plant Dis. Prot. 121, 184–186.
- Tzortzakakis, E.A., da Conceição, I., dos Santos, M.C.V., de Abrantes, I.M.O., 2008. Selection of virulent Meloidogyne individuals within mixed isolates by continuous cultivation on a Mi gene resistant tomato genotype. J. Plant Dis. Prot. 115, 234–237.
- Tzortzakakis, E.A., Phillips, M.S., Trudgill, D.L., 2000. Rotational management of Meloidogyne javanica in a small scale greenhouse trial in Crete, Greece. Nematologica 30, 167–176.
- Tzortzakakis, E.A., Vieira dos Santos, M.-C., Conceição, I., 2016. An update on the occurrence of resistance-breaking populations of root-knot nematodes (Meloidogyne spp.) on resistant tomato in Greece with six new records from Crete. Hell. Plant Prot. J. 9, 60–65.
- Verdejo Lucas, S., Sorribas, J., Puigdomènech, P., 1994. Perdidas de producción en lechuga y tomate causadas por meloidogyne javanica en invernadero. Instituto Nacional de Investigacion y Tecnologia Agraria y Alimentaria, Madrid (España).
- Viaene, N., Coyne, D.L., Davies, K., 2013. Biological and cultural management, in: Plant Nematology. CABI Wallingford.
- Vos, C., Schouteden, N., Van Tuinen, D., Chatagnier, O., Elsen, A., De Waele, D., Panis, B., Gianinazzi-Pearson, V., 2013. Mycorrhiza-induced resistance against the root-knot nematode Meloidogyne incognita involves priming of defense gene responses in tomato. Soil Biol. Biochem. 60, 45–54.
- Wallace, H.R., 1968. The influence of soil moisture on survival and hatch of Meloidogyne javanica. Nematologica 14, 231–242.



- Wang, C., Lower, S., Williamson, V.M., 2009. Application of Pluronic gel to the study of root-knot nematode behaviour. *Nematology* 11, 453–464.
- Wang, K.-H., McSorley, R., 2008. Exposure time to lethal temperatures for *Meloidogyne incognita* suppression and its implication for soil solarization. *J. Nematol.* 40, 7–12.
- Wesemael, W.M., Viaene, N., Moens, M., 2011. Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Europe. *Nematology* 13, 3–16.
- Widmer, T.L., Mitkowski, N.A., Abawi, G.S., 2002. Soil organic matter and management of plant-parasitic nematodes. *J. Nematol.* 34, 289.
- Williamson, V.M., 1998. Root-knot nematode resistance genes in tomato and their potential for future use. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36, 277–293.
- Wright, D.J., 1981. Nematicides: mode of action and new approaches to chemical control. *Plant Parasit. Nematodes* 3, 421–449.
- Yamashita, T.T., Viglierchio, D.R., 1987. Field resistance to nonfumigant nematicides in *Xiphinema index* and *Meloidogyne incognita*. *Rev. Nématologie* 3, 327–332.
- Yamashita, T.T., Viglierchio, D.R., 1986. In vitro testing for nonfumigant nematicide resistance in *Meloidogyne incognita* and *Pratylenchus vulnus*. *Revue de Nematologie* 9, 385–390.
- Yamashita, T.T., Viglierchio, D.R., Schmitt, R.V., others, 1986. Responses of nematodes to nematicidal applications following extended exposures to subnematicidal stress. *Rev. Nématologie* 9, 49–60.
- Zasada, I.A., Ferris, H., 2004. Nematode suppression with brassicaceous amendments: application based upon glucosinolate profiles. *Soil Biol. Biochem.* 36, 1017–1024.
- Zijlstra, C., Donkers-Venne, D.T., Fargette, M., 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterised amplified region (SCAR) based PCR assays. *Nematology* 2, 847–853.
- Γιαννακού, Ι. & Προφήτου-Αθανασιάδου, Δ., 2001. *ΝΗΜΑΤΩΔΟΛΟΓΙΑ (Πανεπιστημιακές Σημειώσεις)*, Θεσσαλονίκη: Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.