

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΥΠΟΔΟΜΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ  
Π.Μ.Σ: ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΑΠΟ ΦΥΤΑ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ  
ΧΛΩΡΙΔΑΣ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΕΝΤΟΜΩΝ ΚΑΙ ΑΚΑΡΕΩΝ  
ΕΠΙΒΛΑΒΩΝ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΗΠΕΥΤΙΚΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΔΗΜΗΤΡΑΚΗΣ Α. ΚΑΡΑΓΙΑΝΝΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΔΙΟΝΥΣΙΟΣ ΠΕΡΔΙΚΗΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Γ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ 2017

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΥΠΟΔΟΜΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ**  
**Π.Μ.Σ: ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΑΠΟ ΦΥΤΑ ΤΗΣ**  
**ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΧΛΩΡΙΔΑΣ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΕΝΤΟΜΩΝ ΚΑΙ**  
**ΑΚΑΡΕΩΝ ΕΠΙΒΛΑΒΩΝ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΗΠΕΥΤΙΚΩΝ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΔΗΜΗΤΡΑΚΗΣ Α. ΚΑΡΑΓΙΑΝΝΗΣ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΔΙΟΝΥΣΙΟΣ ΠΕΡΔΙΚΗΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Γ.Π.Α.**

**ΑΘΗΝΑ 2017**

## **ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

### **ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΑΠΟ ΦΥΤΑ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΧΛΩΡΙΔΑΣ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΕΝΤΟΜΩΝ ΚΑΙ ΑΚΑΡΕΩΝ ΕΠΙΒΛΑΒΩΝ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΗΠΕΥΤΙΚΩΝ**

**ΔΗΜΗΤΡΑΚΗΣ Α. ΚΑΡΑΓΙΑΝΝΗΣ**

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή**

**Επιβλέπων :** Διονύσιος Περδίκης, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.

**Μέλη :** Πέτρος Ταραντίλης, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Αθανάσιος Κυμπάρης, Αναπληρωτής Καθηγητής Δ.Π.Θ.

Στην οικογένειά μου,  
στη σύντροφό μου  
και στη θεία μου Ελεωνόρα

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η επίδραση δυο αιθέριων ελαίων προερχόμενων από τα αρωματικά φυτά *Melissa officinalis* L. (κν. μελισσόχορτο) και *Mentha pulegium* L. (κν. φλισκούνη) στα έντομα *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hemiptera: Aleyrodidae), *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) και στο άκαρι *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). Πραγματοποιήθηκε επίσης εγκλεισμός του αιθέριου ελαίου του φλισκουνιού σε μικροσωματίδια ζυμομύκητα (*Saccharomyces cerevisiae*) με στόχο την προστασία των πτητικών συστατικών του και τη βελτίωση της διάρκειας δράσης του.

Η παραλαβή των αιθέριων ελαίων έγινε με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης με χρήση συσκευής Clevenger ενώ για το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση των συστατικών τους χρησιμοποιήθηκε σύστημα αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών (GC-MS).

Τα αιθέρια έλαια κατά τις πειραματικές διαδικασίες εφαρμόστηκαν δια ψεκασμού και με τη μορφή γαλακτωμάτων. Αξιολογήθηκε η τοξική δράση και των δυο ελαίων επί των ωών του *T. vaporariorum*, του *M. pulegium* επί των νυμφών του καθώς επίσης και η απωθητική δράση και των δύο ελαίων επί των ενηλίκων του εντόμου. Εξετάστηκε επίσης η τοξική δράση των δύο αιθέριων ελαίων επί των ωών και των προνυμφών του εντόμου *T. absoluta*. Το έλαιο του *M. pulegium* μελετήθηκε για την τοξική του δράση επί των ενηλίκων άπτερων ατόμων του *M. persicae* καθώς επίσης και για την επίδρασή του στο αναπαραγωγικό δυναμικό τους. Επίσης, για την τοξική του δράση στα ωά και τα ενήλικα άτομα του *T. urticae* καθώς και για την επίδρασή του στο αναπαραγωγικό δυναμικό του ακάρεως και στην εκκολαπτικότητα των ωών του. Η πειραματική διαδικασία δοκιμής του εγκλεισμένου αιθέριου ελαίου του φλισκουνιού διεξήχθη σε ενήλικα άπτερα άτομα του *M. persicae* και ελήφθησαν παρατηρήσεις σχετικά με τη θνησιμότητα και το αναπαραγωγικό τους δυναμικό. Η δράση του αξιολογήθηκε τόσο υπολειμματικά όσο και με την απευθείας επαφή του με το έντομο.

Η απόδοση των αρωματικών φυτών σε αιθέριο έλαιο ήταν 0,2% (v/w) για το μελισσόχορτο και 4% (v/w) για το φλισκούνη. Ο προσδιορισμός των συστατικών τους έδειξε για το μελισσόχορτο να περιέχει δυο βασικά συστατικά, τη γερανιάλη η οποία

μετείχε σε ποσοστό 38% επί της ολικής σύστασης του ελαίου και τη νεράλη η οποία μετείχε σε ποσοστό 26,88 % ενώ το φλισκούνι περιείχε κυρίως πουλεγόνη σε ποσοστό 43,07% και πιπεριτενόνη σε ποσοστό 37,45%.

Το γαλάκτωμα του αιθέριου ελαίου του μελισσόχορτου επέφερε αξιόλογη θνησιμότητα στα ωά του *T. vaporariorum* ενώ ήταν εκείνο το οποίο είχε και τη μεγαλύτερη απωθητική δράση στα ενήλικα του εντόμου. Θνησιμότητα επίσης φάνηκε να παρουσιάζεται και σε ορισμένο ποσοστό των ωών του *T. absoluta* ενώ η τοξική του δράση κατά των προνυμφών ήταν πιο περιορισμένη. Το γαλάκτωμα του αιθέριου ελαίου του φλισκουνιού επέφερε σημαντική θνησιμότητα στα ωά και στις νύμφες του *T. vaporariorum* ενώ έδρασε απωθητικά κατά των ενηλίκων του. Τοξική δράση σημειώθηκε επίσης κατά των ωών του *T. absoluta* με τις προνύμφες του όμως να παρουσιάζουν μεγαλύτερη σχετικά ανθεκτικότητα. Τα ενήλικα άπτερα άτομα του *M. persicae* βρέθηκε να επηρεάζονται από το γαλάκτωμα του ελαίου καθώς παρατηρήθηκε νέκρωση ενός μέρους του πληθυσμού τους όπως επίσης και μείωση του αριθμού των απογόνων τους. Τέλος, έντονη δράση του ελαίου παρατηρήθηκε κατά του ακάρεως *T. urticae*. Σημειώθηκε υψηλό ποσοστό θνησιμότητας των ωών ενώ η αποτελεσματικότητα επί των ενηλίκων ατόμων ήταν συγκριτικά πιο περιορισμένη. Το έλαιο φάνηκε να δρα στα ενήλικα άτομα περισσότερο στο αναπαραγωγικό τους δυναμικό όπου ο αριθμός των ωών τους διέφερε σημαντικά σε σχέση με αυτό των μαρτύρων όπου ήταν χαρακτηριστικά υψηλότερος. Παρακολούθηθηκε επίσης η εκκολαπτικότητα των ωών προερχόμενων από ψεκασμένα ενήλικα άτομα η οποία όμως φάνηκε να μην επηρεάζεται ιδιαίτερα.

Η μελέτη της υπολειμματικής δράσης του εγκλεισμένου αιθέριου ελαίου έδειξε χαμηλά ποσοστά θνησιμότητας των ενηλίκων άπτερων ατόμων του *M. persicae* κατά τις δυο πρώτες ημέρες η οποία όμως κατά την τρίτη ημέρα διπλασιάστηκε, πιθανολογώντας ότι η θνησιμότητα προήλθε από την σταδιακή απελευθέρωση του ενθυλακωμένου ελαίου. Τα ενήλικα άτομα δεν φάνηκε να επηρεάζονται από την απευθείας επαφή με το εγκλεισμένο έλαιο όπως επίσης και το αναπαραγωγικό δυναμικό και από τις δυο διαδικασίες.

**Επιστημονική περιοχή διατριβής:** Γεωργική εντομολογία, Βιολογικές και άλλες μέθοδοι αντιμετώπισης

**Λέξεις κλειδιά:** Δευτερογενείς μεταβολίτες, αιθέρια έλαια, εγκλεισμός, *Trialeurodes vaporariorum*, *Tuta absoluta*, *Myzus persicae*, *Tetranychus urticae*

## SUMMARY

The purpose of the current study was to investigate the effects of the essential oils of the aromatic plants *Melissa officinalis* L. (lemon balm) and *Mentha pulegium* L. (pennyroyal) on the greenhouse pests *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hemiptera: Aleyrodidae), *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) and the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). In addition, encapsulation of the essential oil of pennyroyal in yeast cells of *Saccharomyces cerevisiae* was performed aiming to prolong the release of its volatile compounds and thus improving its residual effect.

Extraction of the essential oils was performed by hydrodistillation using Clevenger apparatus while Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC-MS) were used for the separation and identification of their substances.

Toxic effects of both essential oils through spraying were assessed on the eggs of *T. vaporariorum* and the effect of *M. pulegium* oil was further examined on its nymphs. In addition, repellence of both essential oils on the adults was evaluated. The toxicity of both essential oils on the eggs and larvae of *T. absoluta* was also investigated. The essential oil of *M. pulegium* was examined for its toxicity on the apterous adults of *M. persicae* as well for its effect on their fecundity. Finally, its toxic effect was investigated on the eggs and adults of *T. urticae*. Encapsulated essential oil of pennyroyal was tested on the survival and fecundity of *M. persicae* adults and the both routes of exposure were accomplished (residual effect and direct exposure).

The yield of essential oils was 0,2% (v/w) for lemon balm and 4% (v/w) for pennyroyal. The chromatographic analysis of the essential oils showed two main constituents, geranial (38%) and neral (26,88%) for lemon balm while pennyroyal contained mainly pulegone (43,07%) and piperitenone (37,45%).

Emulsified lemon balm essential oil induced considerable mortality in the eggs of *T. vaporariorum* and produced the greatest repelling effect on the adults. A percentage of mortality was also observed in the eggs of *T. absoluta* whereas the toxic effect on the larvae was more limited. The emulsion of pennyroyal essential oil presented significant mortality

to both eggs and nymphs of *T. vaporariorum* and also repelled the adults of the pest. Toxicity was noted also on the eggs of *T. absoluta*, however, greater relevant resilience was found in the larvae stage. The wingless adults of *M. persicae* was found sensitive to the essential oil emulsion as a portion of the population was eliminated and the number of offspring was reduced. Lastly, a strong effect of the emulsion was shown on the twospotted spider mite *T. urticae*. High percentage of mortality occurred in the eggs with the effectiveness on adults being relatively more restricted. The oil seemed to have more effect on the reproductive capability where the number of eggs differed significantly in relation to the blank solutions which was characteristically higher. The hatching of the eggs seemed largely unaffected as was noted.

The study of residual effect of the encapsulated essential oil showed low mortality rates in the apterous adults of *M. persicae* in the first two days which however was doubled during the third day, indicating that the activity of the oil was extended.

**Scientific research area:** Agricultural entomology, Biological control and other control methods

**Keywords:** Secondary metabolites, essential oils, encapsulation, *Trialeurodes vaporariorum*, *Tuta absoluta*, *Myzus persicae*, *Tetranychus urticae*



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γεωργικής Ζωολογίας και Εντομολογίας καθώς και στο Εργαστήριο Γενικής Χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Μέρος της μελέτης, αυτό του εγκλεισμού των αιθέριων ελαίων, υλοποιήθηκε σε συνεργασία με τη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου. Η διατριβή πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής με τίτλο “Επιστήμες και Συστήματα Φυτικής Παραγωγής” της Σχολής Αγροτικής Παραγωγής, Υποδομών και Περιβάλλοντος για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης (Μ.Δ.Ε.) στο γνωστικό αντικείμενο Φυτοπροστασία και Περιβάλλον.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές και ειλικρινείς ευχαριστίες μου στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Διονύσιο Περδίκη για την ανάθεση του θέματος, την επιστημονική του καθοδήγηση, την άψογη συνεργασία καθώς επίσης και για τη βοήθεια και το ειλικρινές του ενδιαφέρον σε όλα τα στάδια και καθ’ όλη τη διάρκεια της μελέτης αυτής.

Ευχαριστώ τον κ. Πέτρο Ταραντίλη, Καθηγητή του Γ.Π.Α. και τον κ. Αθανάσιο Κυμπάρη, Αναπληρωτή Καθηγητή του Δ.Π.Θ. για την αποδοχή και συμμετοχή τους στην Τριμελή Εξεταστική Επιτροπή καθώς επίσης και για την αξιολόγηση και εξέταση της παρούσας μελέτης.

Ευχαριστώ τον Ομότιμο Καθηγητή κ. Μόσχο Πολυσίου για την καθοδήγηση στα αντικείμενα της μελέτης, για τη φιλοξενία στο Εργαστήριο Γενικής Χημείας όπως επίσης και για τη διάθεση του φυτικού υλικού και του εργαστηριακού εξοπλισμού.

Ευχαριστώ θερμά τη Δρ. Δήμητρα Δαφερέρα μέλος ΕΔΙΠ, για την υπόδειξη, καθοδήγηση και επίβλεψή της κατά τη διαδικασία των αποστάξεων, της παρασκευής των γαλακτωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα, κατά τη χρωματογραφική ανάλυση των αιθέριων ελαίων, στην ταυτοποίηση των συστατικών τους καθώς επίσης και για τις διορθώσεις επί του κειμένου.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω την Επίκουρο Καθηγήτρια κα. Αναστασία Δέτση, της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου για την αποδοχή της συνεργασίας καθώς επίσης και την υποψήφια Διδάκτορα κα. Ελένη Καβέτσου όπως και όλους όσους εργάστηκαν για τον εγκλεισμό του αιθέριου ελαίου του φλισκουιού.

Οφείλω επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Αναστάσιο Γάτσιο, Γεωπόνο στη Διεύθυνση Αγροτικής Οικονομίας και Κτηνιατρικής Περιφερειακής Ενότητας Πρέβεζας, του Τμήματος Ποιοτικού και Φυτοϋγειονομικού Ελέγχου, για την εύρεση και αποστολή προσβεβλημένων φυτών τομάτας από το έντομο *Tuta absoluta* όπου ο πληθυσμός του αξιοποιήθηκε για τη δημιουργία εκτροφής του εντόμου με σκοπό τη διενέργεια των μετέπειτα πειραμάτων.

Ευχαριστώ την κα. Πολύμνια Αντωνίου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Γ.Π.Α. για τη διάθεση του θερμοκηπίου του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας από όπου συλλέχθηκαν άτομα αλευρώδους.

Ευχαριστίες επίσης εκφράζονται στην εταιρία "Αγροτικός Οίκος Σπύρου Α.Ε.Β.Ε." για τη δωρεάν χορήγηση των σπόρων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη του φυτικού υλικού των πειραματικών διαδικασιών.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω και να μην ευχαριστήσω το προσωπικό του Εργαστηρίου Γεωργικής Ζωολογίας και Εντομολογίας όπως επίσης και τους μεταπτυχιακούς και προπτυχιακούς φοιτητές του Εργαστηρίου για τη δημιουργία φιλικού κλίματος και την έμπρακτη και πολύτιμη πολλές φορές βοήθειά τους την οποία εκτιμώ ιδιαίτερα.

Τέλος, θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου και το μεγαλύτερο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, ιδιαιτέρως στη μητέρα μου, και τη σύντροφό μου, για την αγάπη, την ενθάρρυνση, την κατανόηση και τη στήριξή τους. Θερμές ευχαριστίες εκ βάθους καρδιάς εκφράζονται και στη θεία μου Ελεωνόρα για την αγάπη και τη φιλοξενία της καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Δευτερογενείς Μεταβολίτες.....	1
1.1.1 Τερπένια.....	2
1.1.2 Αιθέρια έλαια.....	3
1.1.2.1 Γενικά.....	3
1.1.2.2 Χρήση των αιθέριων ελαίων στην αντιμετώπιση εντόμων και ακάρεων.....	5
1.1.2.3 Τρόπος και μηχανισμός δράσης .....	8
1.2 Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά.....	9
1.2.1 Η οικογένεια Lamiaceae.....	9
1.2.1.1 <i>Melissa officinalis</i> L., κν. μελισσόχορτο.....	9
1.2.1.2 <i>Mentha pulegium</i> L., κν. φλισκούνη.....	11
1.2.2 Χρήση των επιλεγμένων φυτικών ειδών για την αντιμετώπιση εντόμων και ακάρεων.....	13
1.3 Έντομα και Ακάρεα Κηπευτικών Καλλιεργειών.....	15
1.3.1 <i>Trialeurodes vaporariorum</i> Westwood (Hemiptera: Aleyrodidae).....	15
1.3.1.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά.....	15
1.3.1.2 Βιολογία.....	16
1.3.1.3 Ζημιογόνος δράση.....	17
1.3.2 <i>Tuta absoluta</i> (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae).....	19
1.3.2.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά.....	19
1.3.2.2 Βιολογία.....	20
1.3.2.3 Ζημιογόνος δράση.....	21
1.3.3 <i>Myzus persicae</i> (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae).....	24
1.3.3.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά.....	24
1.3.3.2 Βιολογία.....	25
1.3.3.3 Ζημιογόνος δράση.....	25

1.3.4 <i>Tetranychus urticae</i> Koch (Acari: Tetranychidae).....	27
1.3.4.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά.....	27
1.3.4.2 Βιολογία.....	28
1.3.4.3 Ζημιογόνος δράση.....	29
1.4 Παραλαβή, Διαχωρισμός και Ταυτοποίηση των Συστατικών των Αιθέριων Ελαίων.....	31
1.4.1 Παραλαβή των συστατικών.....	31
1.4.1.1 Μέθοδοι παραλαβής δευτερογενών μεταβολιτών.....	31
1.4.1.2 Παραλαβή με υδροαπόσταξη.....	32
1.4.2 Διαχωρισμός και ταυτοποίηση των συστατικών.....	34
1.4.2.1 Αέρια χρωματογραφία.....	34
1.4.2.2 Φασματομετρία μαζών.....	37
1.5 Εγκλεισμός Αιθέριων Ελαίων.....	39
1.5.1 Γενικά.....	39
1.5.2 Εγκλεισμός αιθέριων ελαίων σε μικροσωματίδια ζυμομύκητα ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ).....	41
1.6 Σκοπός της Μελέτης.....	43

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Φυτικό Υλικό και Εκτροφές.....	44
2.1.1 Μέθοδος ανάπτυξης του φυτικού υλικού.....	44
2.1.2 Μέθοδος ανάπτυξης των εκτροφών των εντόμων.....	45
2.1.3 Διατήρηση φυτών και εκτροφών.....	46
2.2 Παραλαβή, Διαχωρισμός και Ταυτοποίηση των Συστατικών.....	47
2.2.1 Προετοιμασία των αρωματικών φυτών.....	47
2.2.2 Μεθοδολογία απόσταξης των αιθέριων ελαίων.....	48
2.2.3 Προσδιορισμός της σύστασης των αιθέριων ελαίων με σύστημα αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών (GC-MS).....	50
2.3 Εγκλεισμός Αιθέριων Ελαίων σε Μικροσωματίδια Ζυμομύκητα ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ).....	51

2.4 Παρασκευή Γαλακτωμάτων.....	52
2.5 Μεθοδολογία Επεμβάσεων Ψεκασμού.....	54
2.6 Δοκιμές Δράσης των Αιθέριων Ελαίων επί του <i>T. vaporariorum</i> ...	54
2.6.1 Επέμβαση στα ωά.....	54
2.6.2 Επέμβαση στις νύμφες.....	56
2.6.3 Έλεγχος αποθηκικότητας των ενηλίκων ατόμων.....	56
2.7 Δοκιμές Δράσης των Αιθέριων Ελαίων επί του <i>T. absoluta</i> .....	58
2.7.1 Επέμβαση στα ωά.....	58
2.7.2 Επέμβαση στις προνύμφες.....	59
2.8 Δοκιμές Δράσης των Αιθέριων Ελαίων επί του <i>M. persicae</i> .....	61
2.8.1 Συγχρονισμός ενηλίκων ατόμων <i>M. persicae</i> .....	61
2.8.2 Επέμβαση στα ενήλικα άτομα.....	61
2.9 Δοκιμές Δράσης των Αιθέριων Ελαίων επί του <i>T. urticae</i> .....	62
2.9.1 Συγχρονισμός ενηλίκων ατόμων <i>T. urticae</i> .....	62
2.9.2 Επέμβαση στα ωά.....	63
2.9.3 Επέμβαση στα ενήλικα άτομα.....	63
2.10 Παρασκευή Διαλύματος Εγκλεισμένου Αιθέριου Ελαίου.....	64
2.11 Δοκιμή Δράσης του Εγκλεισμένου Αιθέριου Ελαίου.....	65
2.12 Στατιστική Ανάλυση των Αποτελεσμάτων.....	68

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Απόδοση Αρωματικών Φυτών σε Αιθέριο Έλαιο.....	70
3.1.1 Απόδοση του <i>M. officinalis</i> .....	70
3.1.2 Απόδοση του <i>M. pulegium</i> .....	70
3.2 Χημική Σύσταση Αιθέριων Ελαίων.....	71
3.2.1 Χημική σύσταση αιθέριου ελαίου του <i>M. officinalis</i> .....	71
3.2.2 Χημική σύσταση αιθέριου ελαίου του <i>M. pulegium</i> .....	73
3.3 Εντομοκτόνος και Ακαρεοκτόνος Δράση των Αιθέριων Ελαίων...	75
3.3.1 Αποτελεσματικότητα επί του <i>T. vaporariorum</i> .....	75
3.3.1.1 Επίδραση στα ωά.....	75
3.3.1.2 Θνησιμότητα νυμφών.....	78

3.3.1.3 Απωθητικότητα ενηλίκων ατόμων.....	79
3.3.2 Αποτελεσματικότητα επί του <i>T. absoluta</i> .....	81
3.3.2.1 Επίδραση στα ωά.....	81
3.3.2.2 Θνησιμότητα προνυμφών.....	84
3.3.3 Αποτελεσματικότητα επί του <i>M. persicae</i> .....	87
3.3.3.1 Θνησιμότητα ενηλίκων ατόμων.....	87
3.3.3.2 Επίδραση στο αναπαραγωγικό δυναμικό.....	89
3.3.4 Αποτελεσματικότητα επί του <i>T. urticae</i> .....	91
3.3.4.1 Επίδραση στα ωά.....	91
3.3.4.2 Θνησιμότητα ενηλίκων ατόμων.....	93
3.3.4.3 Επίδραση στο αναπαραγωγικό δυναμικό.....	97
3.3.4.4 Επίδραση στην εκκολαπτικότητα των ωών.....	99
3.4 Αποτελεσματικότητα Εγκλεισμένου Αιθέριου Ελαίου.....	101
3.4.1 Θνησιμότητα ενηλίκων ατόμων <i>M. persicae</i> .....	101
3.4.2 Επίδραση στο αναπαραγωγικό δυναμικό.....	106
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>109</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>115</b>

# Κεφάλαιο 1

## Εισαγωγή

### 1.1 Δευτερογενείς Μεταβολίτες

#### Γενικά

Τα φυτά ευρισκόμενα κάτω από συνθήκες έντονης περιβαλλοντικής πίεσης (υψηλές θερμοκρασίες, υψηλά ποσοστά CO<sub>2</sub>, έντονη ξηρασία, ακραίες συνθήκες φωτός) ή σε συνθήκες προσβολής από παράσιτα (έντομα, μύκητες, βακτήρια, ιούς), αντιδρούν και προστατεύονται συνθέτοντας διάφορες ουσίες-ενώσεις οι οποίες ονομάζονται δευτερογενείς μεταβολίτες (Olivoto et al., 2017).

Σε αντίθεση με τους ζωτικής σημασίας για τα φυτά πρωτογενείς μεταβολίτες (υδατάνθρακες, λιπίδια, πρωτεΐνες) οι οποίοι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξή τους καθώς εμπλέκονται σε διαδικασίες όπως αυτή της φωτοσύνθεσης και της αναπνοής, η απουσία των δευτερογενών μεταβολιτών δεν συμβάλει στην άμεση νέκρωση των φυτών καθώς επιτελούν περισσότερο ρόλο επιβίωσης σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις (Agostini-Costa et al., 2012).

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες προσδίδουν προστασία στα φυτά έχοντας αποθητική ή και τοξική δράση εναντίον φυτοφάγων ζώων και εντόμων ενώ σε προσβολές από παθογόνους μικροοργανισμούς όπως π.χ. μύκητες συμβάλουν στην αναστολή της εξάπλωσής τους επεμβαίνοντας στην ανάπτυξη του μυκηλίου τους (Pagare et al., 2015). Μπορούν επίσης να έχουν δράση εναντίον των ζιζανίων τα οποία φέρονται ως

ανταγωνιστές των θρεπτικών τους συστατικών συμβάλλοντας στην αναστολή της βλάστησης και της ανάπτυξής τους (Anulika et al., 2016).

Εκτός της προστατευτικής δράσης, συμβάλλουν στην επικοινωνία και στη διασπορά των σπόρων με την προσέλκυση επικονιαστών και ζώων μέσω των χρωμάτων και των έντονων οσμών που προσδίδουν στα φυτά. Επομένως η γνώση τους αποτελεί σημαντικό εργαλείο για τη βελτίωση των καλλιεργούμενων φυτών με στόχο την αντοχή τους σε συνθήκες περιβαλλοντικής πίεσης και προσβολής (Wink, 1988).

Έχουν ταυτοποιηθεί τουλάχιστον 100.000 δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι ταξινομούνται με βάση τη χημική τους δομή, τη διαλυτότητά τους σε διάφορους διαλύτες και την οδό βιοσύνθεσής τους. Κατατάσσονται σε τρεις μεγάλες ομάδες, στις φαινολικές ενώσεις, με την ίδια σειρά που αναφέρονται παρακάτω τα τερπένια και στις αζωτούχες ενώσεις (Mazid et al., 2011; Tiwari and Rana, 2015).

### **1.1.1 Τερπένια**

Τα τερπένια αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα των δευτερογενών μεταβολιτών περιέχοντας πάνω από 40.000 ταυτοποιημένες ενώσεις (Du Fall and Solomon, 2011).

Ο όρος τερπένια υποδηλώνει ενώσεις οι οποίες αποτελούνται από δομικές μονάδες των 5 μονάδων άνθρακα και προέρχονται από τη συνένωση δύο ή περισσότερων μορίων του ισοπρενίου (2-μεθυλο-βουταδιένιο-1,3) (Las Heras et al., 2003). Η ταξινόμησή τους γίνεται με βάση τον αριθμό των μορίων του ισοπρενίου που σχηματίζουν το μόριό τους. Έτσι διακρίνονται τα Μονοτερπένια (με 10 άτομα άνθρακα, δηλαδή 2 μόρια ισοπρενίου), τα Σεσκιτερπένια (με 15 άτομα άνθρακα, 3 μόρια ισοπρενίου), τα Διτερπένια (με 20 άτομα άνθρακα, 4 μόρια ισοπρενίου), τα Σεστερτερπένια (με 25 άτομα άνθρακα, 5 μόρια ισοπρενίου), τα Τριτερπένια (με 30 άτομα άνθρακα, 6 μόρια ισοπρενίου), τα Τετρατερπένια (με 40 άτομα άνθρακα, 8 μονάδες ισοπρενίου) και τα Πολυτερπένια με πάνω από 40 άτομα άνθρακα (Kandi et al., 2015).

Τα τερπένια προέρχονται από οξυγονούχα παράγωγα και υδρογονάνθρακες ενώ ανευρίσκονται σε όλα τα μέρη ενός φυτού (φύλλα, καρπούς, κορμό, ρίζες, σπέρματα) (Bhargava et al., 2013). Εμπλέκονται άμεσα και έμμεσα στους μηχανισμούς άμυνας των φυτών και απελευθερώνονται από τους ειδικούς αδένες όπου παράγονται και είναι



αποθηκευμένοι όταν τα φυτά βρίσκονται σε συνθήκες βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων (Clancy et al., 2016). Τα Μονοτερπένια και τα Σεσκιτερπένια αποτελούν στην πλειοψηφία τις ενώσεις οι οποίες απελευθερώνονται από τα φυτά μετά τη βλάβη τους από φυτοφάγα ζώα ή έντομα (Cheng et al., 2007).

Χρησιμοποιούνται σε πολλά φαρμακευτικά προϊόντα, σε προϊόντα περιποίησης και οικιακής χρήσης, στην αρωματοβιομηχανία, στη βιομηχανία τροφίμων, σε παρασιτοκτόνα σκευάσματα ενώ τελευταία υπάρχει πολύ αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις ενώσεις αυτές καθώς δείχνουν να έχουν θεραπευτικές ιδιότητες σε απειλητικές για τη ζωή ασθένειες και καρδιακές παθήσεις (Sell, 2003; El Shoubaky and Salem, 2014).

Μερικά είδη φυτών διαθέτουν ένα μείγμα τερπενίων με πτητικές ενώσεις οι οποίες έχουν μια χαρακτηριστική, ευχάριστη οσμή και οι οποίες είναι ευρέως γνωστές ως αιθέρια έλαια (Olivoto et al., 2017).

## **1.1.2 Αιθέρια έλαια**

### **1.1.2.1 Γενικά**

Η πλειοψηφία των αρωματικών φυτών περιέχει ένα μίγμα ενώσεων με ιδιαίτερη και ευχάριστη οσμή οι οποίες παραλαμβάνονται από αυτά ως αιθέρια έλαια. Ορισμένα μπορεί να αποτελούνται από 20-60 διαφορετικές ενώσεις ενώ υπάρχουν και άλλα τα οποία περιέχουν πάνω από 100 διαφορετικές ουσίες (Djilani and Dicko, 2012). Αποτελούν πτητικές, υδρόφοβες ενώσεις οι οποίες απαντώνται σε όλα τα μέρη ενός φυτού (Pandey et al., 2017) και συγκεκριμένα εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων τους (Dhifi et al., 2016).

Χρησιμοποιούνται από τα φυτά για την άμυνά τους απέναντι σε μικροοργανισμούς, έντομα, φυτοφάγα ζώα καθώς επίσης και για την προσέλκυση επικονιαστών μέσω της έντονης οσμής τους (Zuzarte and Salgueiro, 2015).

Η πρώτη συστηματική έρευνα περί των συστατικών των αιθέριων ελαίων μπορεί να αποδοθεί στο Γάλλο χημικό M. J. Dumas ο οποίος ανέλυσε μερικές ενώσεις (οξυγονούχες, αζωτούχες, θειούχες, υδρογονάνθρακες) και δημοσίευσε τα αποτελέσματά του το 1833. Ωστόσο, η πιο σημαντική μελέτη διεξήχθη από τον O. Wallach ο οποίος προσπάθησε να

απομονώσει τα επιμέρους συστατικά των ελαίων και να μελετήσει τις βασικές τους ιδιότητες (Kubeczka, 2010).

Τα αιθέρια έλαια προέρχονται από πλήθος αρωματικών φυτών τα οποία ανήκουν σε διάφορες οικογένειες. Οι πιο σημαντικές από τα δικοτυλήδονα είναι οι οικογένειες *Ariaceae*, *Asteraceae* (χαμομήλι), *Geraniaceae*, *Illiciaceae* (γλυκάνισος), *Lamiaceae* (μέντα, λεβάντα, ρίγανη και πλήθος άλλων), *Lauraceae* (κανέλα), *Myristicaceae* (μοσχοκάρυδο), *Myrtaceae* (γαρίφαλο), *Oleaceae* (γιασεμί), *Rosaceae* (τριαντάφυλλο), *Rutaceae* και *Santalaceae*. Από τα μονοκοτυλήδονα ξεχωρίζουν οι οικογένειες *Acoraceae*, *Roaceae* και *Zingiberaceae* (πιπερόριζα, κάρδαμο) (Franz and Novak, 2010).

Η απόδοση των φυτών σε αιθέριο έλαιο και η χημική σύσταση των ελαίων αποτελεί συνισταμένη πολλών παραγόντων. Η σύσταση του ελαίου μπορεί να αλλάζει όταν αυτό προέρχεται από διαφορετικά μέρη ακόμη και του ίδιου φυτού όπως επίσης όταν ίδια φυτικά είδη διαφέρουν ως προς το στάδιο ανάπτυξής τους ή όταν έχουν αναπτυχθεί σε διαφορετικές περιοχές (Chamorro et al., 2012). Σημαντικό επίσης ρόλο παίζει η περίοδος συγκομιδής των φυτών όπως επίσης και η μέθοδος που έχει χρησιμοποιηθεί για την παραλαβή των αιθέρων ελαίων (Hyldgaard et al., 2012). Επιπροσθέτως, οι περιβαλλοντικές συνθήκες (διάρκεια ημέρας, ηλιακή ακτινοβολία, θερμοκρασία, ξηρασία), τα καλλιεργητικά μέτρα (άρδευση, λίπανση), η πίεση που έχουν δεχτεί τα φυτά από μολύνσεις και προσβολές εντόμων και τα υπολείμματα των φυτοπροστατευτικών προϊόντων συμβάλουν στην ποικιλομορφία της χημικής σύστασης των αιθέρων ελαίων (Franz and Novak, 2010).

Η παραγωγή τους σε βιομηχανικό επίπεδο ξεκίνησε το πρώτο μισό του 19<sup>ου</sup> αιώνα λόγω της μεγάλης τους ζήτησης ως αρώματα στη βιομηχανία τροφίμων (Zellner et al., 2010). Σήμερα η χρήση τους αυξάνεται συνεχώς εξαιτίας της ισχυρής ζήτησης όλο και περισσότερων φυσικών προϊόντων σε όλους τους τομείς (Do et al., 2015). Χρησιμοποιούνται σε φαρμακευτικά προϊόντα, σε προϊόντα περιποίησης, σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα και για την αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών χάρη στις αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες (Zengin and Baysal, 2014).

Η βιομηχανία των αιθέρων ελαίων είναι αρκετά περίπλοκη και κατακερματισμένη καθώς αριθμεί τουλάχιστον 100 χώρες παραγωγής (Bovill, 2010). Στην Ευρώπη η κύρια παραγωγή προέρχεται από χώρες που συνορεύουν με τη Μεσόγειο θάλασσα όπως η

Πορτογαλία, Ισπανία, Γαλλία, Ιταλία και Ελλάδα. Η Ασιατική ήπειρος με την ποικιλομορφία κλιμάτων φαίνεται να είναι ο πιο σημαντικός παραγωγός αιθέριων ελαίων σε χώρες όπως η Κίνα, η Ινδία, Ινδονησία και Βιετνάμ. Η Αμερικανική ήπειρος επίσης παίζει σημαντικό ρόλο στην αγορά με χώρες όπως οι Η.Π.Α., Καναδάς και Μεξικό. Στην Αφρικανική ήπειρο πολλές είναι οι χώρες που ασχολούνται με την παραγωγή αιθέριων ελαίων όμως το μερίδιό τους στην αγορά δεν είναι ιδιαίτερα σημαντικό (Schmidt, 2010).

### 1.1.2.2 Χρήση των αιθέριων ελαίων στην αντιμετώπιση εντόμων και ακάρεων

Η εφαρμογή συνθετικών παρασιτοκτόνων αποτελεί την κύρια μέθοδο αντιμετώπισης εντόμων και ακάρεων που προσβάλουν τις καλλιέργειες. Τα προβλήματα όμως που δημιουργούνται από τη χρήση τους όπως η μόλυνση του περιβάλλοντος, οι επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία, η επίδρασή τους σε οργανισμούς μη στόχους, τα υπολείμματα που αφήνουν καθώς επίσης και το κύριο θέμα της ανάπτυξης ανθεκτικότητας έχουν οδηγήσει στην ανάγκη για ανεύρεση εναλλακτικών λύσεων φυτοπροστασίας ασφαλέστερων και φιλικότερων προς το περιβάλλον. Τα αιθέρια έλαια θα μπορούσαν να είναι μια τέτοια εναλλακτική λύση καθώς αποτελούν μια πλούσια πηγή πολλών και διαφορετικών βιοδραστικών ενώσεων (Koul et al., 2008; Ebadollahi, 2013).

Αποτελούν προϊόντα τα οποία γίνονται πιο εύκολα αποδεκτά από το ευρύ κοινό ως φυσικά ενώ εξαιτίας της σύνθεσής τους ως μίγμα πολλών ενώσεων είναι λιγότερο πιθανό να αναπτυχθεί ανθεκτικότητα των εντόμων σε αυτά (Pavela, 2007). Έχει διεξαχθεί μεγάλος αριθμός μελετών οι οποίες έχουν δείξει ότι περισσότερα από 2000 φυτικά είδη διαθέτουν εντομοκτόνο ιδιότητα (Sarwar and Salman, 2015) και για το λόγο αυτό υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για τη χρήση τους σε καλλιέργειες (Isman, 2006).

Σε μελέτη των Choi et al. (2003) τα 23 από τα 53 αιθέρια έλαια που δοκιμάστηκαν με τη μορφή ατμών επέφεραν μετά από 24 ώρες θνησιμότητα από 80-100% σε όλα τα στάδια του *Trialeurodes vaporariorum* (ωά, νύμφες, ενήλικα), με σημαντικότερα τα έλαια των *Eugenia caryophyllata* (γαρίφαλο), *Carum carvi* (άγριο κύμινο), *Mentha pulegium* (φλισκούνη), *Mentha piperita*, *Mentha spicata* (δύσμος), *Origanum vulgare* (ρίγανη), *Citrus aurantifolia*, και *Eucalyptus citriodora*. Το αιθέριο έλαιο του *Thymus vulgaris* (θυμάρι) όταν εφαρμόστηκε ως εντομοκτόνο μέσω συστήματος υδρονέφωσης σε

συγκέντρωση 8 ppm προκάλεσε 100% θνησιμότητα του ίδιου εντόμου σε συνθήκες θερμοκηπίου ενώ το έλαιο του *Foeniculum vulgare* (μάραθο) και του *Rosmarinus officinalis* (δενδρολίβανο) σε συγκέντρωση 7,5 και 5 ppm προκάλεσαν 89,82 και 72,7 % θνησιμότητα αντίστοιχα (Aroiee et al., 2005a, 2005b).

Το διάλυμα αιθέριου ελαίου του *Cinnamomum zeylanicum* (κανέλα Κεϋλάνης) εφαρμοζόμενο σε διηθητικό φίλτρο και ερχόμενο σε επαφή με τις προνύμφες του *Tuta absoluta* σε δόση 0.054μL/cm<sup>2</sup> προκάλεσε τη θνησιμότητά τους σε ποσοστό 100% μετά από 4 ώρες έκθεσης ενώ σε άλλο πείραμα απώθησης διαπιστώθηκε αποτελεσματικότητα σε ποσοστό 96,25% (Adil et al., 2015). Τα έλαια των *Ocimum basilicum* (βασιλικός), *Pimpinella anisum* (γλυκάνισος), *Ruta graveolens* (απήγανος) και *Eucalyptus spp.* (ευκάλυπτος) εφαρμοζόμενα δια ψεκασμού σε συγκέντρωση 0,5% και σε συνθήκες αγρού κατάφεραν να μειώσουν την προσβολή από το *Tuta absoluta* κατά 67,15, 67,97, 65,36 και 57,11% αντίστοιχα με τρεις ψεκασμούς σε διάστημα δυο εβδομάδων με τον πρώτο ψεκασμό να λαμβάνει χώρα 40 ημέρες μετά τη μεταφύτευση των φυτών τομάτας (Nehal et al., 2014). Τα έλαια επίσης των *Citrus aurantium* (νεραντζιά) και *Syzygium aromaticum* επέφεραν μείωση των προσβολών του ίδιου εντόμου κατά 58,3 και 62,5% αντίστοιχα και θνησιμότητα των προνυμφών του κατά 26,3 και 87,3% εφαρμοζόμενα δια ψεκασμού σε συνθήκες όπως αναφέρουν οι συγγραφείς ημι-αγρού όπου φυτά τομάτας σε πλαστικές γλάστρες εκτιθέμενα σε εξωτερικές συνθήκες έφεραν από πάνω τους κάλυψη με διαφανές πλαστικό για την προστασία τους από τη βροχή. Ο ίδιος τρόπος εφαρμογής του ελαίου του *Syzygium aromaticum* και υπό τις ίδιες συνθήκες επέφερε θνησιμότητα της τάξεως του 60,5% στις προνύμφες του *Liriomyza trifolii* και μείωσε την προσβολή του στα φυτά τομάτας κατά 48,7% (Ebadah et al., 2016).

Οι ατμοί των αιθέριων ελαίων των *Lavandula angustifolia* (λεβάντα), *Melissa officinalis* (μελισσόχορτο), *Foeniculum vulgare*, *Origanum vulgare* και *Thymus vulgaris* προκάλεσαν 100% θνησιμότητα των νυμφών του *Myzus persicae* ηλικίας μέχρι 3 ημερών σε δόση 2 μL/L αέρα και έκθεσή τους για 24 ώρες σε αεροστεγή πλαστικά δοχεία (Digilio et al., 2008).

Μελέτη 53 αιθέριων ελαίων για την ακαρεοκτόνο δράση τους υπό τη μορφή ατμών εναντίον των ωών και των ενηλίκων ατόμων του *Tetranychus urticae* έδειξε ότι τα 16 από αυτά επέφεραν θνησιμότητα άνω του 90% μετά από 24 ώρες με σημαντικότερα τα έλαια

των *Salvia officinalis* (φασκόμηλο), *Carum carvi*, *Mentha pulegium*, *Mentha piperita*, *Mentha spicata*, *Eucalyptus citriodora* και *Cymbopogon nardus* (Choi et al., 2004). Το έλαιο του *Chamomilla recutita* (χαμομήλι) εφαρμοζόμενο δια ψεκασμού επέφερε 100% θνησιμότητα σε ενήλικα θηλυκά άτομα του ακάρεως μετά από 24 ώρες σε συγκέντρωση 4% και 90% μείωση της εκκολαπτικότητας των ωών μετά από 6 ημέρες (Afify et al., 2012). Τα έλαια επίσης των *Thymus vulgaris*, *Lavandula officinalis* και *Eucalyptus camaldulensis* στις ίδιες συγκεντρώσεις και ημέρες επέφεραν 85, 100 και 80% θνησιμότητα και 42,5, 90 και 32,5% μείωση της εκκολαπτικότητας αντίστοιχα (Modarres-Najafabadi, 2012). Οι Motazedian et al. (2012) αναφέρουν το αιθέριο έλαιο του *Myrtus communis* (μυρτιά) να έχει ακαρεοκτόνο δράση μέσω ατμών στα ενήλικα σε ποσοστό 94% μετά από 24 ώρες ενώ οι Salman and Erbas (2014) αναφέρουν το έλαιο του *Rosa damascena* (τριανταφυλλιά δαμασκηνή) να παρέχει 72,22% θνησιμότητα στα ωά, 83,25% στις νύμφες και 70,14% στα ενήλικα άτομα σε συγκέντρωση 20 mL/L μέσω ψεκασμού τους.

Το αιθέριο έλαιο του φυτικού είδους *Achillea millefolium* προκάλεσε 94,19% θνησιμότητα σε πληθυσμό του *Aphis gossypii* μετά από 5 ημέρες σε συγκέντρωση 1%, σε συνθήκες θερμοκηπίου σε φυτά αγγουριού (Yankova et al., 2014) ενώ το έλαιο του *Eucalyptus globulus* επέφερε στα ενήλικα άτομα 100% θνησιμότητα μέσω της επαφής τους σε εμποτισμένο με έλαιο διηθητικό φίλτρο μετά από δυο ώρες και σε συγκέντρωση 12000 ppm (Mareggiani et al., 2008).

Η επαφή του ελαίου του *Tagetes rupestris* με τα ενήλικα άτομα του *Ceratitis capitata* προκάλεσε τη θνησιμότητά τους σε ποσοστό έως και 99% (López et al., 2011), ενώ τα αιθέρια έλαια των *Citrus sinensis* (πορτοκαλιά) και *Citrus aurantium* (νεραντζιά) όταν προστίθονταν στην τροφή των προνυμφών επέφεραν το θάνατο στο 99% του πληθυσμού (Papachristos et al., 2009).

Οι ατμοί του ελαίου του *Syzygium aromaticum* προκάλεσαν 95% θνησιμότητα στα ενήλικα άτομα του *Frankliniella schultzei* και 87,3% στις προνύμφες του *Pseudococcus jackbeardsleyi* σε γυάλινα κλειστά δοχεία όγκου 25 L (Pumnuan and Insung, 2016).

Τέλος, οι Yang et al. (2010) σημειώνουν ότι εμβάπτιση φύλλων τομάτας με ωά και νύμφες του *Bemisia tabaci* σε διάλυμα με αιθέριο έλαιο του *Thymus vulgaris* για 5 δευτερόλεπτα είχε ως αποτέλεσμα τη θνησιμότητά τους κατά 73,4 και 79% αντίστοιχα ενώ οι Çakir et al. (2016) αναφέρουν τα έλαια των φυτικών ειδών *Achillea (biserrata)*,

*wilhelmsii*, *biebersteinii*) ως τοξικά με το ποσοστό θνησιμότητας να φτάνει έως και 100% έναντι των ενηλίκων ατόμων του *Leptinotarsa decemlineata* όταν αυτά εκτέθηκαν σε εμποτισμένα με έλαιο διηθητικά φίλτρα εντός γυάλινου τρυβλίου Petri.

### 1.1.2.3 Τρόπος και μηχανισμός δράσης

Ο τρόπος και μηχανισμός δράσης των αιθέριων ελαίων και γενικά των εντομοκτόνων αναφέρεται σε κάποια συγκεκριμένη βιοχημική παρέμβασή τους κατά την οποία διακόπτουν μια βιολογική λειτουργία του εντόμου με αποτέλεσμα να επέρχεται ο θάνατος, η απόθεση ή να δημιουργείται μια δυσλειτουργία στον οργανισμό τους πχ στο αναπαραγωγικό σύστημα (El-Wakeil, 2013).

Πολλά αιθέρια έλαια δρουν απωθητικά έναντι των εντόμων διεγείροντας τα οσφρητικά τους όργανα και απομακρύνοντάς τα από τα μεταχειρισμένα με έλαια φυτά. Μπορούν επίσης να έχουν αντιδιατροφικές ιδιότητες με αποτέλεσμα το έντομο να μη πεθαίνει άμεσα αλλά ο θάνατος να επέρχεται από ασιλία ή αφυδάτωση (Ebadollahi, 2013).

Μελέτες διαφόρων ελαίων έχουν δείξει ότι έχουν σημαντική επίδραση στην ωτοκία των εντόμων, στην εκκολαπτικότητα των ωών τους, στον αριθμό των απογόνων και ότι διαθέτουν ιδιότητες αναστολής της ανάπτυξής τους. Επίσης, τα πτητικά συστατικά των ελαίων μπορούν να διαταράσσουν την επικοινωνία μεταξύ των εντόμων κατά τη διαδικασία συνεύρεσης των δύο φύλων εμποδίζοντας τη λειτουργία των αισθητήριων οργάνων με αποτέλεσμα τη μείωση του πληθυσμού (Sendi and Ebadollahi, 2014).

Τα περισσότερα αιθέρια έλαια που διαθέτουν εντομοκτόνο δράση φαίνεται να δρουν επί του νευρικού συστήματος των εντόμων. Μερικά έχουν την ιδιότητα να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) προκαλώντας συσσώρευση της ακετυλοχολίνης στις νευρικές συνάψεις το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τη συνεχή διέγερση του εντόμου και το μετέπειτα θάνατό του (Rattan, 2010). Άλλα πάλι, έχουν αναφερθεί να έχουν δράση κατά της οκτοπαμίνης, μίας νευροορμόνης και νευροδιαβιβαστή των εντόμων η οποία δεν συναντάται στα θηλαστικά. Αναστολή της λειτουργίας της οκτοπαμίνης έχει ως αποτέλεσμα την ολική κατάρρευση του νευρικού συστήματος των εντόμων και τον άμεσο θάνατό τους (Tripathi et al., 2009).

## 1.2 Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά

### 1.2.1 Η οικογένεια Lamiaceae

Η οικογένεια Lamiaceae αποτελεί μία από τις μεγαλύτερες οικογένειες φυτών η οποία περιλαμβάνει περίπου 220 γένη με πάνω από 3500 φυτικά είδη τα οποία εξαπλώνονται σε όλο σχεδόν τον κόσμο. Στην Ευρώπη τα περισσότερα από τα είδη αυτά συναντώνται κυρίως στη λεκάνη της Μεσογείου (Suthar and Patel, 2014). Στην Ελλάδα θα μπορούσε να θεωρηθεί ως η πιο σημαντική οικογένεια των αρωματικών φυτών καθώς τα είδη της βρίσκονται σε όλες σχεδόν τις περιοχές της χώρας ανεξαρτήτως των εδαφικών και κλιματολογικών συνθηκών ενώ τα περισσότερα από αυτά είναι κυρίως ενδημικά (Kokkini et al., 1988).

Περιλαμβάνει φυτά ποώδη, θαμνώδη ή ημι-θαμνώδη, ετήσια ή και πολυετή. Τα φύλλα τους είναι κυρίως απλά, έμμισχα ή άμισχα τα οποία βρίσκονται διατεταγμένα στο βλαστό αντίθετα ή σταυροειδώς ενώ τα άνθη είναι ζυγόμορφα με έντονη αρωματική οσμή (Agostini et al., 2009).

Τα φυτικά είδη της οικογένειας Lamiaceae είναι ευρέως γνωστά για την πλούσια σύστασή τους σε αιθέρια έλαια (Naghibi et al., 2005) και για το λόγο αυτό αρκετά είδη καλλιεργούνται εντατικά και σε μεγάλες εκτάσεις (Raja, 2012).

#### 1.2.1.1 *Melissa officinalis* L., κν. μελισσόχορτο

Το φυτικό είδος *Melissa officinalis* (Εικ. 1.1) ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae και προέρχεται από τις περιοχές της Νοτίου Ευρώπης όπου διανέμεται κατά μήκος όλων των χωρών της Μεσογειακής λεκάνης. Σήμερα το φυτό έχει προσαρμοστεί στις διάφορες κλιματικές συνθήκες και συναντάται πλέον σε όλες τις περιοχές του κόσμου (Miraj et al., 2016).

Είναι πολυετής πόα, με θαμνώδη εμφάνιση και μπορεί να φτάσει σε ύψος έως και το ένα μέτρο. Έχει τριχοειδή, οδοντωτά φύλλα σε σχήμα καρδιάς που φτάνουν σε μήκος έως και 8 cm. Τα άνθη του είναι μικρά, χρώματος λευκού ή απαλού ροζ ενώ οι σπόροι του βάρους 0,5-0,7 g έχουν χρώμα σκούρο καστανό προς μαύρο. Διαθέτει ανθεκτικό ριζικό

σύστημα το οποίο το βοηθά να ανταποκρίνεται γρήγορα στις διαφορετικές συνθήκες ενώ είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στις χαμηλές θερμοκρασίες (Seidler-Lożykowska et al., 2015). Αναπτύσσεται εξίσου καλά σε πλήρη ηλιοφάνεια αλλά και σε μερική σκιά ενώ οι καταλληλότερες θερμοκρασίες για γρήγορη ανάπτυξη κυμαίνονται από 15-35 °C. Εκτός των χαμηλών θερμοκρασιών είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο και στην ξηρασία κυρίως κατά το πρώτο έτος ανάπτυξης και για το λόγο αυτό σε περιοχές με μειωμένες βροχοπτώσεις θα πρέπει να αρδεύεται. Μόλις αποκτήσει γερό και βαθύ ριζικό σύστημα οι απαιτήσεις σε νερό μειώνονται (Moradkhani et al., 2010). Προτιμάει και αναπτύσσεται καλύτερα σε αμμοαργιλόδη εδάφη, καλά στραγγιζόμενα, με pH από 5-7,5 και πλούσια σε οργανική ουσία. Αναπαράγεται με σπόρους και με μοσχεύματα μαλακού ξύλου το οποίο προτιμάται όταν πρόκειται για παραγωγή εμπορικής κλίμακας. Η κατάλληλη θερμοκρασία βλάστησης των σπόρων του είναι 18-20 °C (Verma et al., 2015; Winiarczyk et al., 2016).

Το αιθέριο έλαιο του μελισσόχορτου προερχόμενο από τα φύλλα και τα άνθη του έχει χαρακτηριστική οσμή λεμονιού και ελαφρύ κίτρινο χρώμα (Bagdat and Cosge, 2006). Η απόδοση του φυτού σε αιθέριο έλαιο κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα (0,02-0,3%) σε σύγκριση με άλλα είδη της οικογένειας Lamiaceae, λόγος που εξηγεί και την υψηλή τιμή του στην αγορά (Moradkhani et al., 2010). Τα υψηλότερα επίπεδα ελαίου του μελισσόχορου συγκεντρώνονται κυρίως στα τέλη του καλοκαιριού με βασικά συστατικά τη γερανιόλη, κιτρονελλόλη, κιτρονελλάλη, λιναλοόλη και νερόλη (Farahani et al., 2009).

Το μελισσόχορτο χρησιμοποιούνταν εντατικά ως φαρμακευτικό φυτό κατά την αρχαιότητα από τους Έλληνες και τους Ρωμαίους για την αντιμετώπιση των διαταραχών του νευρικού συστήματος και της μελαγχολίας (Ondrejonič et al., 2012). Σήμερα χρησιμοποιείται στην φαρμακευτική καθώς μελέτες έχουν δείξει να διαθέτει δράση αντιβακτηριακή, αντική, αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντισηπτική, αντικαρκινική και αντιδιαβητική (Abdellatif et al., 2014). Η αντιοξειδωτική δράση του μελισσόχορτου έχει βρεθεί να είναι δέκα φορές μεγαλύτερη σε σύγκριση με αυτή των βιταμινών B και C (Porona et al., 2016). Παραδοσιακά, το τσάι προερχόμενο από τα φύλλα του φυτού χρησιμοποιείται για κρυολογήματα, γαστρεντερικές διαταραχές, πυρετό, πονοκέφαλο, ρευματισμούς, αϋπνία καθώς επίσης ως ηρεμιστικό και αγχολυτικό (Singh et al., 2014).





### Συστηματική Κατάταξη

**Βασίλειο:** Plantae

**Διαίρεση:** Magnoliophyta

**Κλάση:** Magnoliopsida

**Τάξη:** Lamiales

**Οικογένεια:** Lamiaceae

**Γένος:** *Melissa*

**Είδος:** *M. officinalis*

**Εικόνα 1.1** Ταξινόμηση του φυτικού είδους *Melissa officinalis* L. (Verma et al., 2015).

([http://biolib.mpiiz.mpg.de/thome/band4/tafel\\_058.html](http://biolib.mpiiz.mpg.de/thome/band4/tafel_058.html)).

(Όλες οι εικόνες της μελέτης εκτός των 1.1, 1.2, 1.15, 1.19 και 3.2-3.6 αποτελούν πηγές του συγγραφέα).

#### **1.2.1.2 *Mentha pulegium* L., κν. φλισκούνι**

Το φυτικό είδος *Mentha pulegium* (Εικ. 1.2) είναι ένα αυτοφύες αρωματικό φυτό το οποίο προέρχεται και συναντάται σε όλες τις χώρες της Ευρώπης, κυρίως της Μεσογείου, στα παράλια της Μικράς Ασίας, στη Βόρειο Αφρική καθώς επίσης και σε πολλά μέρη της Ανατολής (Derwich et al., 2010).

Είναι ένα πολυετές, ποώδες φυτό του οποίου οι βλαστοί κατά την αρχή της άνοιξης έρπουν στο έδαφος. Όταν η θερμοκρασία στις αρχές του καλοκαιριού ανεβαίνει, εκπύσσονται τα ανθοφόρα στελέχη τα οποία μπορούν να φτάσουν σε ύψος μέχρι και τα 40 cm. Τα άνθη απαντώνται σε πολυάριθμες ταξιανθίες και είναι χρώματος ρόδινου ή ιώδες. Τα φύλλα είναι μικρά και ωοειδή τα οποία εκφύονται αντίθετα ανά δυο και εναλλάσσονται στα γόνατα σταυροειδώς. Το ριζικό του σύστημα είναι ευαίσθητο στις χαμηλές θερμοκρασίες ενώ ο πολλαπλασιασμός του γίνεται κυρίως με σπόρους (Κουτσός, 2006). Το φλισκούνι αυτοφύεται κυρίως σε υγρά μέρη όπως όχθες λιμνών, ρυακιών (Ouakouak et al., 2015) και αναπτύσσεται καλύτερα σε εδάφη γόνιμα, με μερική σκιά και με το pH τους να κυμαίνεται από 4,8-8,3 (Hassanpouraghdam et al., 2011).

Το αιθέριο έλαιο του φλισκουνιού έχει εξετασθεί σε πολλές μελέτες οι οποίες έχουν δείξει σχετικές διαφοροποιήσεις όσον αφορά τα επιμέρους συστατικά αλλά και την εκατοστιαία περιεκτικότητά τους επί της ολικής σύστασης του ελαίου. Η ποικιλομορφία αυτή φαίνεται να οφείλεται στο στάδιο ανάπτυξης του φυτού, στις διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες της κάθε περιοχής όπως επίσης και στη διαφορετική σύσταση του εκάστοτε εδάφους (Abdelli et al., 2016). Σύμφωνα με τις μελέτες, το βασικό συστατικό του φλισκουνιού το οποίο καθορίζει και το χημειότυπό του είναι είτε πουλεγόνη κατά κύριο λόγο, είτε πιπεριτενόνη ή πιπεριτόνη, είτε ισομινθόνη (Boukhebt et al., 2011). Σε μελέτη που διεξήχθη για τη διερεύνηση της χημικής σύστασης των αιθέριων ελαίων του φλισκουνιού από 10 διαφορετικές περιοχές της Ελλάδος φάνηκαν διαφοροποιήσεις στην εκατοστιαία περιεκτικότητα της πουλεγόνης οι οποίες ποίκιλαν από 0,1-90,7% επί της ολικής σύστασης του ελαίου (Kokkini et al., 2002).

Το φλισκούνι περιέχει συστατικά τα οποία διαθέτουν αντιβακτηριακή, αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση (Teixeira et al., 2012; Miraj and Kiani, 2016). Διαθέτει ιδιότητες αντισηπτικές, αντισπασμωδικές, τονωτικές, αναζωογονητικές, ηρεμιστικές ενώ χρησιμοποιείται για την ανακούφιση του πεπτικού συστήματος, του στομάχου, για ζαλάδες και για γενική αδυναμία, για τη χρόνια βρογχίτιδα και τον επίμονο βήχα (Khadraoui et al., 2015).

Εκτός όμως των ευεργετικών ιδιοτήτων που προσδίδονται στο φλισκούνι έχει φανεί ότι λήψη λανθασμένων και μεγαλύτερων δοσολογιών του αιθέριου ελαίου μπορεί να προκαλέσει μέχρι και θάνατο καθώς φαίνεται να έχει άκρως ηπατοτοξική δράση. Η τοξικότητα οφείλεται κυρίως στην πουλεγόνη η οποία σε μικρές ποσότητες μπορεί να προκαλέσει μια μέτριας μορφής δηλητηρίαση ενώ σε μεγαλύτερες μπορεί να αποβεί μοιραία προκαλώντας μέχρι και νέκρωση του ήπατος (Zekri et al., 2013).



### Συστηματική Κατάταξη

**Βασίλειο:** Plantae

**Διαίρεση:** Tracheophyta

**Κλάση:** Magnoliopsida

**Τάξη:** Lamiales

**Οικογένεια:** Lamiaceae

**Γένος:** *Mentha*

**Είδος:** *M. pulegium*

**Εικόνα 1.2** Ταξινόμηση του φυτικού είδους *Mentha pulegium* L.

([https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=32270#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=32270#null)).

([http://www.meemelink.com/prints\\_pages/16761.Mentha.htm](http://www.meemelink.com/prints_pages/16761.Mentha.htm)).

#### **1.2.2 Χρήση των επιλεγμένων φυτικών ειδών για την αντιμετώπιση εντόμων και ακάρεων.**

Τα αιθέρια έλαια των φυτικών ειδών *M. officinalis* και *M. pulegium* εκτός των φαρμακευτικών ιδιοτήτων που διαθέτουν και οι οποίες αναφέρθηκαν παραπάνω, έχουν μελετηθεί εκτενώς και για τη δράση τους εναντίον πολλών εντομολογικών εχθρών και ακάρεων.

Χαρακτηριστικά, σε μελέτη των Digilio et al. (2008) αναφέρεται ότι οι ατμοί από το έλαιο του μελισσόχορτου προκάλεσαν 100% θνησιμότητα των νυμφών του *Myzus persicae* μετά από 24 ώρες ενώ οι Kim et al. (2012) σημειώνουν ότι η εφαρμογή του ελαίου με την ίδια μορφή και χρονική διάρκεια προκάλεσε το θάνατο σε ποσοστό 80% σε προνύμφες 3<sup>ου</sup> σταδίου του είδους *Camptomyia corticalis*.

Ατμοί του ελαίου προκάλεσαν 100% θνησιμότητα μετά από 24 ώρες στα ενήλικα άτομα του *Acanthoscelides obtectus* σε δοσολογία 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  αέρα (Sertkaya, 2013) ενώ σε άλλη μελέτη επετεύχθη απόθνηξη των ενηλίκων ατόμων του *Plodia interpunctella* σε ποσοστό 40% με το έλαιο να είναι ενσωματωμένο στη τροφή του εντόμου (Karahoodi et al., 2009).

Το αιθέριο έλαιο του μελισσόχορτου έχει επιδείξει επίσης ωοκτόνο, προνυμφοκτόνο και απωθητική δράση εναντίον του κουνουπιού *Anopheles stephensi* το οποίο αποτελεί έναν από τους φορείς της ελονοσίας (Oshaghi et al., 2003; Baranitharan et al., 2016).

Όσον αφορά το αιθέριο έλαιο του φλισκουνιού οι Choi et al. (2003) αναφέρουν ότι οι ατμοί του είχαν τοξική δράση εναντίον όλων των σταδίων του *Trialeurodes vaporariorum* μετά από 24 ώρες με το ποσοστό θνησιμότητας να φτάνει το 100% για τα ενήλικα άτομα και τις νύμφες και το 91% για τα ωά.

Ατμοί επίσης του ελαίου προκάλεσαν τη μείωση του αναπαραγωγικού δυναμικού του ακάρεως *Tetranychus urticae* κατά 83,2% και θνησιμότητα των ωών του σε ποσοστό 91,5% (Pavela et al., 2016) ενώ δοσολογία 5,73  $\mu\text{L L}^{-1}$  αέρα θανάτωσε το 90% του πληθυσμού των ενηλίκων ατόμων (Mozaffari et al., 2013).

Ψεκάσμος των ενηλίκων ατόμων του *M. persicae* ηλικίας κάτω των 24 ωρών και σε συγκέντρωση 500  $\mu\text{L/L}$  είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της διάρκειας ζωής του εντόμου κατά 87% ενώ υπήρξε μεγάλη επίδραση και στο αναπαραγωγικό δυναμικό του με τα ενήλικα άτομα να επιδεικνύουν σχεδόν μηδενική γονιμότητα (Petraakis et al., 2014).

Επαφή των προνυμφών του δάκου της ελιάς *Bactrocera oleae* σε εμποτισμένα διηθητικά φίλτρα με το γαλάκτωμα αιθέριου ελαίου είχε ως αποτέλεσμα να θανατωθεί το 50% του πληθυσμού στην πολύ χαμηλή συγκέντρωση του 0,22  $\mu\text{L/mL}$  (Pavlidou et al., 2004) ενώ οι Landolt et al. (1999) σε μελέτη τους για τη δράση του ελαίου στις προνύμφες της καρπόκαψας της μηλιάς *Cydia pomonella* παρατήρησαν ότι το έλαιο φαίνεται να τις προσελκύει. Έτσι συμπέραναν ότι το έλαιο θα μπορούσε να δράσει ως ουσία προσέλκυσης και σύλληψης των προνυμφών με ταυτόχρονη απομάκρυνσή τους από τους καρπούς όπου προκαλούν και τη μεγαλύτερη ζημιά.

Τέλος, οι ατμοί του αιθέριου ελαίου του φλισκουνιού έχουν μελετηθεί σε πλήθος εντόμων τα οποία προσβάλουν τα αποθηκευμένα προϊόντα. Η θνησιμότητα των ενηλίκων ατόμων των ειδών *Sitophilus zeamais*, *Sitophilus oryzae*, *Sitophilus granarius*, *Callosobruchus maculatus*, *Tribolium castaneum*, *Lasioderma serricorne*, *Plodia interpunctella* άγγιξε τις περισσότερες φορές το 100% (Lamiri et al., 2001; Mahmoudvand et al., 2011; Esmaili et al., 2013; Barros et al., 2015).

## 1.3 Έντομα και Ακάρεα Κηπευτικών Καλλιεργειών

### 1.3.1 *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hemiptera: Aleyrodidae)

Το έντομο *Trialeurodes vaporariorum* (αλευρώδης των θερμοκηπίων) είναι ένα κοσμοπολίτικο και εξαιρετικά πολυφάγο είδος το οποίο προσβάλλει πλήθος καλλιεργειών κυρίως θερμοκηπιακών (Prižovic et al., 2013).

Στην Ευρώπη εμφανίστηκε για πρώτη φορά το 1856 σε θερμοκήπια του Ηνωμένου Βασιλείου και περιγράφηκε το ίδιο έτος από τον Westwood ο οποίος υπέθεσε ότι η εισαγωγή του μπορεί να έγινε από φυτά της οικογένειας Orchidaceae προερχόμενα από το Μεξικό (Van Lenteren et al., 1996).

Τρέφεται με περισσότερα από 250 είδη φυτών και κυρίως με αυτά των οικογενειών Solanaceae, Fabaceae, και Cucurbitaceae. Οι καλλιέργειες οι οποίες προσβάλλονται συνηθέστερα είναι αυτές της τομάτας, της μελιτζάνας, του αγγουριού, του κολοκυθιού, της πιπεριάς, της πατάτας, του μπιζελιού, του φασολιού και του βαμβακιού (Hilje and Morales, 2008).

#### 1.3.1.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Τα ωά του *T. vaporariorum* ανευρίσκονται στην κάτω επιφάνεια των φύλλων, καθέτως προς το έλασμα του φύλλου και συνήθως σε κύκλους. Είναι μικρά σε μέγεθος, ωοειδή με κίτρινο ανοικτό χρώμα (Εικ. 1.4.α) το οποίο αλλάζει σε σκούρο γκριζο-ιώδες όταν αρχίζουν και ωριμάζουν (Εικ. 1.4.β) (Kerruish and Unger, 2010).

Οι νεαρές νύμφες είναι μικρές και κινητές οι οποίες μετά την πρώτη έκδυση αποβάλλουν τα πόδια τους και σταθεροποιούνται στο φυτικό υπόστρωμα από όπου και τρέφονται. Στη συνέχεια το σώμα τους αναπτύσσεται και λαμβάνει σχήμα ωοειδές και πεπλατυσμένο το οποίο μοιάζει με κοκκοειδές χωρίς όμως να καλύπτεται από ασπίδιο ή άλλο προστατευτικό κάλυμμα (Εικ. 1.5.α,β). Το τελευταίο νυμφικό στάδιο είναι αδρανές, ογκωδέστερο, με διαφανή νημάτια, εμφανή πλευρικά τοιχώματα και είναι θαμπού κίτρινου χρώματος. Από τη νύμφη τελευταίας ηλικίας (pupae) εξέρχεται το ενήλικο άτομο (Εικ. 1.6.α,β) (Mahr et al., 2001).

Τα ενήλικα άτομα είναι μικρού μεγέθους (1-3 mm) και λευκού χρώματος (Εικ. 1.3). Διαθέτουν 4 πτέρυγες με πτωχή νεύρωση, κεραίες με 7 άρθρα και νύσσοντα στοματικά μόρια με τα οποία μυζούν τους φυτικούς ιστούς. Το σώμα τους και οι πτέρυγες καλύπτονται από μια λευκή κηρώδη σκόνη ενώ ανευρίσκονται κυρίως στην κάτω επιφάνεια των νεαρών ως επί των πλείστον φύλλων όπου και εναποθέτουν τα ωά τους (Πελεκάσης, 1984).

### 1.3.1.2 Βιολογία

Όπως προαναφέρθηκε και στην προηγούμενη παράγραφο τα ενήλικα άτομα του *T. varoatiorum* ανευρίσκονται στην κάτω επιφάνεια των νεαρών κυρίως φύλλων όπου τρέφονται και εναποθέτουν τα ωά τους. Σε κανονικές συνθήκες θερμοκηπίου μπορούν να γεννήσουν από 150-300 ωά. Από τα ωά τα οποία εκκολάπτονται μετά από 7-9 ημέρες εξέρχεται η νύμφη πρώτης ηλικίας η οποία διαθέτει ικανότητα βιάδισης. Αφού περιφερθεί για ορισμένες ώρες πάνω στο φύλλωμα διαλέγει ένα σημείο όπου πλέον εγκαθίσταται και αρχίζει να τρέφεται. Η ανάπτυξη της συνεχίζεται πλέον στο ίδιο σημείο περνώντας από τρεις επιπλέον νυμφικές ηλικίες. Το ενήλικο άτομο εξέρχεται από τη νύμφη τελευταίας ηλικίας μέσω μιας σχισμής σχήματος T (Howard et al., 1994; Alford, 1999).

Ο συνολικός χρόνος που απαιτείται για την ολοκλήρωση μίας γενιάς διαφέρει και εξαρτάται από τη θερμοκρασία και τις συνθήκες που επικρατούν. Έτσι, η συνολική διάρκεια ανάπτυξης από το ωό έως το ενήλικο ποικίλει από 25-30 ημέρες στους 21 °C και 22-25 ημέρες στους 24 °C. Η κατώτατη θερμοκρασία στην οποία μπορούν να επιβιώσουν όλα τα στάδια του εντόμου είναι περίπου 8,5 °C (Laznik et al., 2011).

Τα ενήλικα άτομα παρουσιάζουν αρρενοτόκο παρθενογένεση όπου τα αρσενικά άτομα προέρχονται από αγονιμοποίητα ωά ενώ τα θηλυκά άτομα προέρχονται από ωά γονιμοποιημένα (Van Nieuwenhove et al., 2016).

Μελέτες έχουν δείξει επίσης ότι τα ενήλικα άτομα προσελκύονται έντονα από το κιτρινοπράσινο χρώμα το οποίο αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς παράγοντες σύμφωνα με τον οποίο επιλέγουν τον ξενιστή τους (Seddigh and Kiani, 2012).

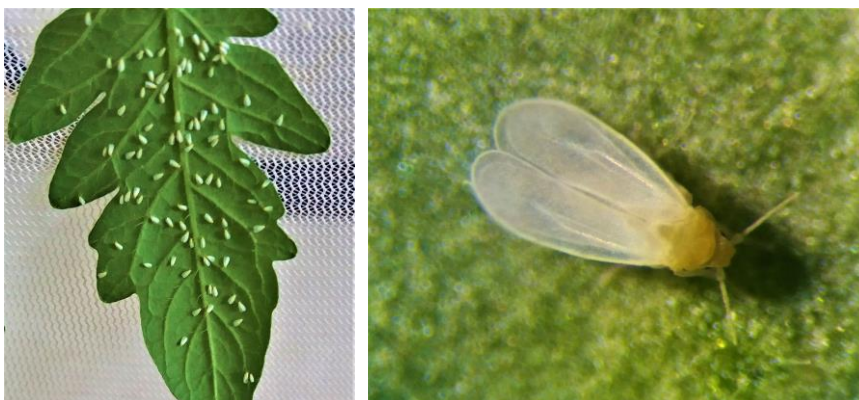
### 1.3.1.3 Ζημιογόνος δράση

Ο αλευρώδης των θερμοκηπίων αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς εχθρούς των καλλιεργειών ο οποίος μπορεί να προκαλέσει ζημιά και μείωση της παραγωγής με άμεσους και έμμεσους τρόπους. Η διατροφή των ενηλίκων ατόμων και των νυμφών με τους φυτικούς χυμούς προκαλεί χλώρωση των φύλλων και γενική εξασθένηση του φυτού (Mahmoodi et al., 2014).

Τα άφθονα επίσης μελιτώματα που εκκρίνουν ευνοούν την ανάπτυξη του μύκητα της καπνιάς πάνω στα φύλλα με αποτέλεσμα να μειώνεται η φωτοσυνθετική τους ικανότητα και ως εκ τούτου να μειώνεται και η παραγωγή και ποιότητα των καρπών (Manzano and Van Lenteren, 2009; McLeod and Rashid, 2014).

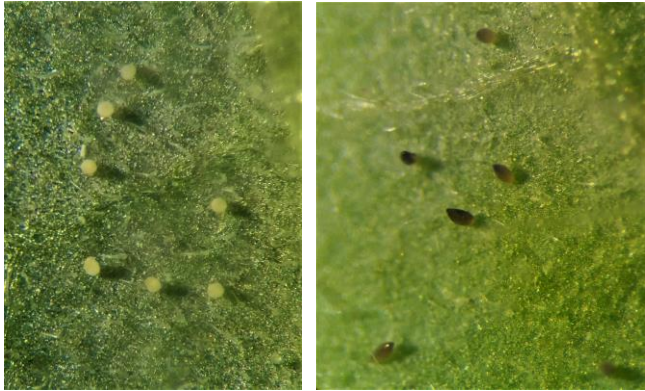
Το *T. vaporariorum* αποτελεί φορέας ορισμένων ιών όπως του TICV (Tomato Infectious Chlorosis Virus) στην τομάτα και του PYVV (Potato Yellow Vein Virus) στην πατάτα (Nasruddin and Mound, 2016).

Τέλος, αναφέρεται ότι ευθύνεται για τη διασπορά του φυτοφάγου ακάρεως *Polyphagotarsonemus latus* και πως αποτελεί φορέα επίσης ορισμένων βακτηρίων όπως του *Xanthomonas pelargonii* (Brown) (Prijović et al., 2014).



Εικόνα 1.3 Ενήλικα άτομα του *Trialeurodes vaporariorum*.



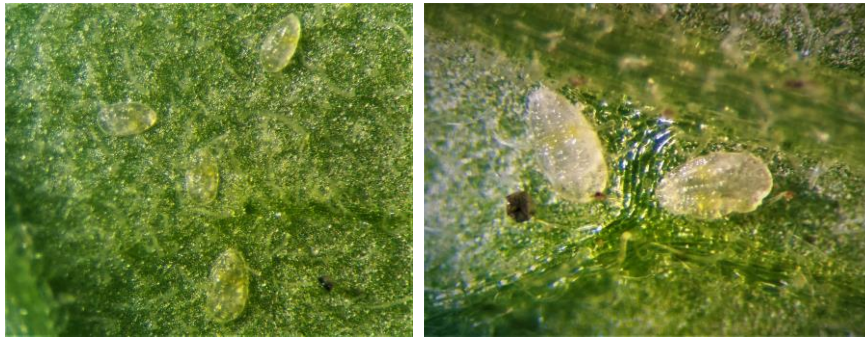


(α)

(β)

**Εικόνα 1.4 α)** Ωά του *T. vaporariorum*.

β) Ωριμα ωά του *T. vaporariorum* λίγο πριν την εκκόλαψη.

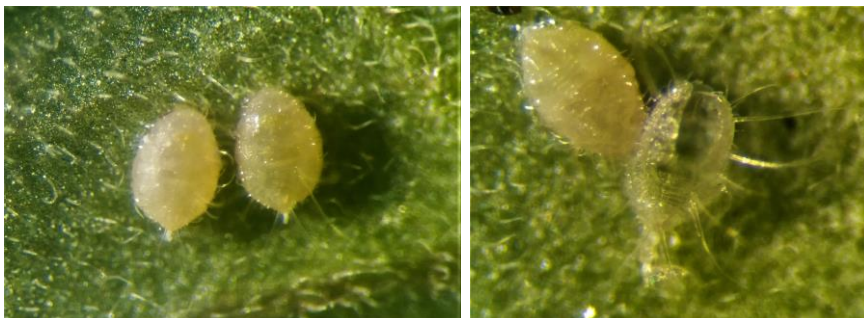


(α)

(β)

**Εικόνα 1.5 α)** Νύμφες 2<sup>ης</sup> ηλικίας του *T. vaporariorum*.

β) Νύμφες 3<sup>ης</sup> ηλικίας του *T. vaporariorum*.



(α)

(β)

**Εικόνα 1.6 α)** Νύμφες τελευταίας ηλικίας του *T. vaporariorum*.

β) Κλειστή (αριστερά) και ανοικτή (δεξιά) νύμφη τελευταίας ηλικίας του *T. vaporariorum* από όπου έχει εξέλθει το ενήλικο άτομο.



### 1.3.2 *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)

Το έντομο *Tuta absoluta* (φυλλορύκτης της τομάτας) αποτελεί ένα ολιγοφάγο είδος το οποίο προσβάλλει κυρίως καλλιέργειες της οικογένειας Solanaceae (Taha et al., 2012).

Περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1917 από τον Meyrick ως *Phthorimaea absoluta* από άτομα τα οποία είχε συλλέξει από την περιοχή Huancayo στο Περού. Αργότερα αναφέρθηκε ως *Gnorimoschema absoluta*, *Scrobipalpula absoluta* ή *Scrobipalpuloides absoluta* και τελικώς εισήχθη στο γένος *Tuta* και περιγράφηκε ως *T. absoluta* το 1994 από τον Rovolny (Desneux et al., 2010).

Πρόκειται για ένα είδος το οποίο προέρχεται από τη Νότιο Αμερική και το οποίο αποτελεί εκεί τον κύριο εχθρό της τομάτας από το 1960 (Allache et al., 2015). Στην Ευρώπη το έντομο εντοπίστηκε για πρώτη φορά στην ανατολική Ισπανία το 2006 και εξαπλώθηκε ταχύτατα αρχικά στις χώρες της Μεσογειακής λεκάνης και αργότερα στις υπόλοιπες Ευρωπαϊκές χώρες (Adil et al., 2015). Η εξάπλωσή του συνεχίστηκε στην Αφρική και στην Ασία με 63 τουλάχιστον κράτη να έχουν αναφέρει τον εντοπισμό του (Luna et al., 2015). Στην Ελλάδα εντοπίστηκε για πρώτη φορά τον Ιούνιο του 2009 σε θερμοκηπιακή καλλιέργεια τομάτας στην περιοχή Πλάτανος στα Χανιά της Κρήτης με ταυτόχρονες αναφορές του εντόμου σε Ηράκλειο, Τριφυλία, Πάτρα και Πρέβεζα γεγονός που υποδηλώνει την πολλαπλή εισαγωγή του εντόμου στη χώρα και όχι την εξάπλωσή του (Roditakis et al., 2010).

Ο κύριος ξενιστής του εντόμου είναι η τομάτα αλλά έχει αναφερθεί και σε άλλες καλλιέργειες όπως αυτή της μελιτζάνας, της πατάτας, της πιπεριάς, του καπνού και του φασολιού. Απαντάται επίσης και σε ορισμένα αυτοφυή είδη της οικογένειας Solanaceae, όπως στην αγριοτοματιά (*Solanum nigrum*) και στον τάτουλα (*Datura stramonium*) (Cocco et al., 2013; Bajracharya et al., 2016).

#### 1.3.2.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Τα ωά του *T. absoluta* έχουν σχήμα ωοειδές-κυλινδρικό, μεγέθους περίπου 0,4 mm και χρώματος υπόλευκου (Εικ. 1.8) (Tosevski et al., 2011). Οι νέο-εκκολαφθείσες προνύμφες είναι κιτρινωπές (Εικ. 1.9.α) ενώ καθώς αναπτύσσονται αποκτούν χρώμα

πράσινο και αργότερα ελαφρώς ρόδινο με μία χαρακτηριστική μαύρη ζώνη πίσω από την κεφαλή (Εικ. 1.9.β) (Harizanova et al., 2009). Η νύμφη (χρυσάλιδα) έχει μήκος περίπου 4 mm και αρχικά έχει χρώμα πρασινοκίτρινο το οποίο αργότερα αλλάζει σε ανοικτό καφέ (Εικ. 1.10) (Nayana and Kalleshwaraswamy, 2015). Τα ενήλικα άτομα έχουν χρώμα γκρι-καστανό, μήκους 6-7 mm και άνοιγμα πτερύγων 10 mm (Adamou et al., 2016). Έχουν μακριές, νηματοειδείς κεραίες με εναλλασσόμενες περιοχές μαύρου και ασημένιου-γκρίζου χρώματος οι οποίες αποτελούν ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά αναγνώρισης του είδους στο στάδιο του ενηλίκου (Εικ. 1.7) (Retta and Berhe, 2015).

### 1.3.2.2 Βιολογία

Η διάρκεια που απαιτείται για την ολοκλήρωση του βιολογικού κύκλου του εντόμου ποικίλει από 24-40 ημέρες και εξαρτάται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν και κυρίως από τη θερμοκρασία. Μπορεί να έχει 10-12 γενιές το έτος ενώ σε συνθήκες όπως αυτές της Μεσογείου τα ενήλικα άτομα μπορούν να συναντώνται καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου (Desneux et al., 2010).

Τα θηλυκά άτομα του *T. absoluta* εναποθέτουν τα ωά τους στα φύλλα και τα στελέχη των φυτών ξενιστών (Rostami et al., 2017). Είναι δραστήρια κατά τη διάρκεια της νύχτας ενώ την ημέρα κρύβονται ανάμεσα από τα φύλλα. Μπορούν να εναποθέσουν κατά τη διάρκεια της ζωής τους έως και 260 ωά. Μετά την εκκόλαψη των ωών ακολουθούν τέσσερα προνυμφικά στάδια και μετέπειτα η νύμφωση (OEPP/EPPO, 2005).

Στους 25±2 °C τα ωά εκκολάπτονται συνήθως μετά από 4 ημέρες ενώ η προνυμφική ηλικία διαρκεί περίπου 12 ημέρες. Η διάρκεια της νύμφωσης ποικίλει από 6-12 ημέρες με μέσο όρο τις 9 ημέρες (Nayana and Kalleshwaraswamy, 2015).

Οι προνύμφες μπορούν να είναι συνεχώς δραστήριες εφόσον υπάρχει διαθεσιμότητα τροφής. Νυμφώνονται στο έδαφος, στην επιφάνεια των φύλλων ή ακόμη και εντός των στοών που δημιουργούν σε αυτά. Το έντομο διαχειμάζει στο στάδιο του ωού, της νύμφης ή του ενηλίκου αναλόγως των συνθηκών που επικρατούν (Retta and Berhe, 2015).

Έχει την ικανότητα να προσαρμόζεται και να επιβιώνει σε αντίξοες συνθήκες υψηλών (49 °C) αλλά και χαμηλών (5 °C) θερμοκρασιών όπως επίσης και σε συνθήκες έντονης ξηρασίας (Zekeya et al., 2017).

### 1.3.2.3 Ζημιογόνος δράση

Το *T. absoluta* είναι ένα εξαιρετικά ζημιογόνο έντομο το οποίο μειώνει την ποιότητα των καρπών της τομάτας και είναι ικανό να επιφέρει απώλειες στην παραγωγή που μπορούν να φτάσουν μέχρι και το 100 %, τόσο στις υπαίθριες όσο και στις θερμοκηπιακές καλλιέργειες (Duarte et al., 2015). Οι απώλειες προέρχονται από τις ζημιές που προκαλούν οι προνύμφες στα φύλλα, στους βλαστούς, στους μίσχους των ανθέων, στα άνθη και στους καρπούς (Cuthbertson et al., 2013).

Οι προνύμφες κατά τις δυο πρώτες προνυμφικές ηλικίες ορύσσουν στοές στα φύλλα και τρέφονται με το μεσόφυλλο αφήνοντας άθικτη την επιδερμίδα (Εικ. 1.11). Οι στοές αυτές αρχικά είναι μικρές και μειώνουν τη φωτοσυνθετική ικανότητα των φύλλων ενώ αργότερα μετατρέπονται σε εκτεταμένους θαλάμους (Εικ. 1.12,1.13). Σε έντονες προσβολές τα φύλλα και αργότερα τα στελέχη νεκρώνονται εντελώς προκαλώντας καθολική ξήρανση των φυτών (Chidege et al., 2016). Οι στοές αρχικά μοιάζουν με αυτές της *Liriomyza trifolii* (λυριόμυζα) ωστόσο μετέπειτα ξεχωρίζουν καθώς γίνονται πλατιές και ακανόνιστες ενώ τα αποχωρήματα της προνύμφης ανευρίσκονται σε μια άκρη της στοάς ή και έξω από αυτήν ενώ οι προνύμφες των ειδών του γένους *Lyriomyza* τοποθετούν τα αποχωρήματά τους κατά μήκος στο κέντρο της επιμήκους στοάς τους (Ναβροζίδης και Ανδρεάδης, 2012).

Η είσοδος των προνυμφών στους βλαστούς γίνεται συνήθως από την κορυφή και η διάνοιξη της στοάς προκαλεί αρχικά μάρανση και στη συνέχεια ξήρανσή τους. Οι καρποί προσβάλλονται όταν είναι ακόμη πράσινοι και η είσοδος των προνυμφών γίνεται με τη διάνοιξη μιας οπής προς τη πλευρά του κάλυκα. Τα αποχωρήματα των προνυμφών στις οπές είναι εμφανή και οι καρποί καθίστανται μη εμπορεύσιμοι. Οι πληγές στους καρπούς αποτελούν εστίες δευτερογενών μολύνσεων από μύκητες οι οποίοι οδηγούν στη σήψη τους πριν ή μετά τη συγκομιδή (Χαραντώνης και Γιαννοπολίτης, 2009).

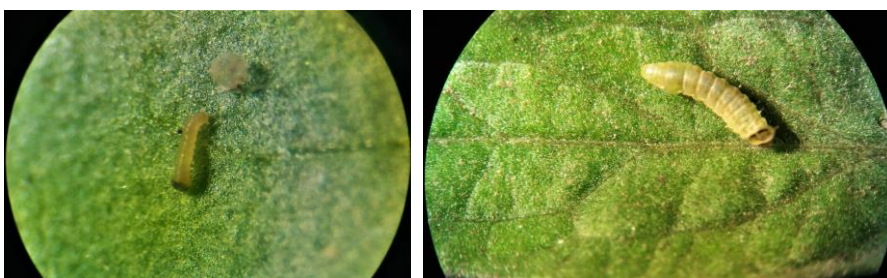
Η ταχεία εξάπλωση και παγκόσμια κατανομή του εντόμου τα τελευταία χρόνια καθώς επίσης και το μέγεθος της ζημιάς που προκαλεί έχει κατατάξει το *T. absoluta* ως την κύρια απειλή της παγκόσμιας παραγωγής τομάτας (Desneux et al., 2011).



Εικόνα 1.7 Ενήλικα άτομα του *Tuta absoluta*.



Εικόνα 1.8 Ωά του *T. absoluta*.



(α)

(β)

Εικόνα 1.9 α) Νέο-εκκολαφθείσα προνύμφη του *T. absoluta*. Διακρίνεται το ωό από το οποίο έχει εξέλθει.

β) Ανεπτυγμένη προνύμφη του *T. absoluta*.



Εικόνα 1.10 Νύμφες του *T. absoluta*. Δεξιά διακρίνεται μια πιο ώριμη.



**Εικόνα 1.11** Προνύμφη του *T. absoluta* τη στιγμή που εισέρχεται εντός του φύλλου τομάτας για να τραφεί.



**Εικόνα 1.12** Εκτεταμένες στοές από προνύμφες του *T. absoluta*.



**Εικόνα 1.13** Ζημιές στο φύλλωμα από προνύμφες του *T. absoluta*.

### 1.3.3 *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae)

Το είδος *Myzus persicae* (πράσινη αφίδα της ροδακινιάς) είναι ένα εξαιρετικά πολυφάγο είδος το οποίο έχει ως κύριο ξενιστή τη ροδακινιά (*Prunus persica* L.) ενώ προσβάλλει πάνω από 400 είδη φυτών ως δευτερεύοντες ξενιστές (Mdellel and Ben Halima Kamel, 2014). Θεωρείται από τους πιο σημαντικούς εχθρούς των θερμοκηπιακών και όχι μόνο καλλιεργειών (Gavkare et al., 2013). Έχει βρεθεί σε πάνω από 40 οικογένειες καλλιεργούμενων φυτικών ειδών ανάμεσά τους και αυτών των Brassicaceae, Solanaceae, και Fabaceae (Ji et al., 2016). Ανάμεσα στα είδη τα οποία προσβάλλει είναι η τομάτα, η μελιτζάνα, το αγγούρι, η πιπεριά, η πατάτα, το λάχανο, το παντζάρι, το μαρούλι, το βαμβάκι και ο καπνός (Alford, 1999; Vieira et al., 2016).

#### 1.3.3.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Τα ωά του *M. persicae* τα οποία εναποθέτονται στον κύριο ξενιστή του (ροδακινιά) είναι ελλειπτικού σχήματος και μήκους περίπου 0,6 mm. Στην αρχή έχουν χρώμα κίτρινο ή πράσινο το οποίο στη συνέχεια μεταβάλλεται σε μαύρο. Οι νύμφες είναι μικρές, πράσινου χρώματος το οποίο αργότερα γίνεται κιτρινωπό (Carinera, 2001). Το ενήλικο άπτερο άτομο έχει σχήμα ωοειδές, είναι μήκους 1,2-2,5 mm και χρώματος ανοιχτού πράσινου (Εικ. 1.14). Έχει μακριές κεραίες, λίγο μικρότερες του σώματός του οι οποίες περιλαμβάνουν πολλά αισθητήρια οργανίδια. Τα σιφώνια είναι πράσινα και ελαφρώς διογκωμένα στο μέσον ενώ το προεξέχον άκρο της κοιλιάς (ουρά) είναι μικρό και στενόμακρο. Τα πτερωτά άτομα διαθέτουν δυο ζεύγη πτερύγων, κεραίες χρώματος σκούρου καφέ οι οποίες είναι σχεδόν ισομεγέθεις με το σώμα, καστανά σιφώνια ελαφρώς διογκωμένα στο μέσο, σκοτεινή ουρά, ενώ η κεφαλή και ο θώρακας έχουν χρώμα σκοτεινό καφέ προς μαύρο (Εικ. 1.15) (Πελεκάσης, 1984; Howard et al., 1994).

### 1.3.3.2 Βιολογία

Το *M. persicae* διαχειμάζει στο στάδιο του χειμερινού ωού που εναποτίθεται στο φλοιό ή στη βάση των οφθαλμών του κύριου ξενιστή του (ροδακινιά) ή ενίοτε και άλλων πυρηνοκάρπων. Αρχές της άνοιξης τα ωά αυτά εκκολάπτονται και εμφανίζονται άπτερα παρθενογενετικά θηλυκά, τα λεγόμενα και ως θεμελιωτικά. Τα άτομα αυτά τρέφονται στη ροδακινιά και συνεχίζουν να αναπαράγονται παρθενογενετικά για 2-3 γενεές ακόμη (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος, 2003). Κατά τον Μάιο, μεταξύ των άπτερων θηλυκών ατόμων εμφανίζονται και πολλά πτερωτά τα αποκαλούμενα και ως μεταναστευτικά τα οποία μεταναστεύουν από τον κύριο ξενιστή τους σε διάφορα ποώδη φυτά (καλλιεργούμενα και μη). Σε αυτούς του ξενιστές, τους λεγόμενους και ως δευτερεύοντες, θα ακολουθήσουν καθ' όλη τη διάρκεια του καλοκαιριού σειρές παρθενογενετικών γενεών (Πελεκάσης, 1991). Στις αρχές του φθινοπώρου εμφανίζονται και πάλι πτερωτά άτομα τα οποία επιστρέφουν στους πρωτεύοντες ξενιστές τους όπου γεννούν παρθενογενετικά τα έμφυλα άτομα (αρσενικά και θηλυκά). Τα θηλυκά από τα άτομα αυτά αφού συζευχθούν θα δώσουν τα χειμερινά ωά τα οποία θα διαχειμάσουν μέχρι την επόμενη άνοιξη. Σε περιοχές με ζεστό χειμώνα το έντομο μπορεί να υπάρχει και να πολλαπλασιάζεται παρθενογενετικά καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου χωρίς να διαπαύει (Ναβροζίδης και Ανδρεάδης, 2012).

Το *M. persicae* δεν μπορεί να επιβιώσει σε περιοχές με εύκρατο και τροπικό κλίμα όπου επικρατούν συνθήκες έντονης ζέστης και ξηρασίας. Έχει φανεί ότι θερμοκρασίες άνω των 28 °C είναι ανασταλτικές για την ανάπτυξη του εντόμου (Khan et al., 2015).

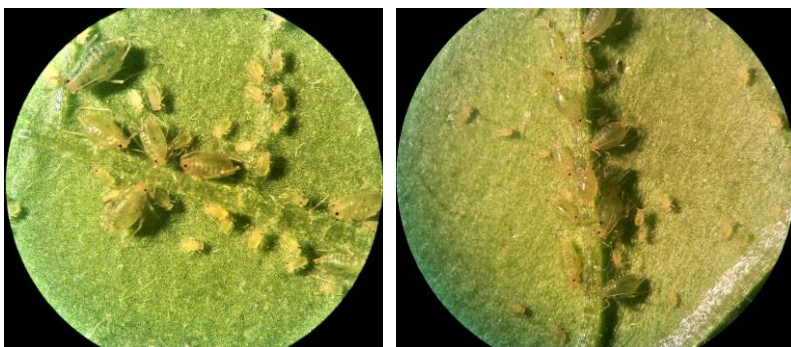
### 1.3.3.3 Ζημιογόνος δράση

Οι νύμφες και τα ενήλικα άτομα του *M. persicae* προσβάλλουν κυρίως τις τρυφερές κορυφές των βλαστών και τα τρυφερά φύλλα των ξενιστών από όπου τρέφονται απομυζώντας τους χυμούς τους. Ανευρίσκονται κυρίως στην κάτω επιφάνεια των φύλλων τους και προκαλούν συστροφή, χλώρωση και μετέπειτα πρόωρη πτώση τους (Salam et al., 2009). Σε εκτεταμένες προσβολές παρατηρείται γενική εξασθένηση των φυτών η οποία συνοδεύεται από πτώση ανθέων και καρπών (Verdugo et al., 2016).



Τα άτομα του *M. persicae* εκκρίνουν επίσης άφθονα μελιτώδη αποχωρήματα τα οποία ρυπαίνουν το φύλλωμα και τους καρπούς ενώ ταυτόχρονα ευνοούν την ανάπτυξη των μυκήτων της καπνιάς. Δευτερευόντως, προσελκύουν μεγάλους πληθυσμούς μυρμηγκιών τα οποία τρέφονται από αυτά ενώ παράλληλα εμποδίζουν τη δράση των αρπακτικών και παρασιτοειδών των αφίδων (Kerruish and Unger, 2010).

Τέλος, το *M. persicae* αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς φορείς ιώσεων των φυτών, γεγονός το οποίο και το κατατάσσει στα πιο επιβλαβή έντομα. Έχει φανεί ότι μπορεί να μεταδώσει περισσότερους από 150 ιούς μεταξύ αυτών τους PLRV (Potato Leaf Roll Virus), PVY (Potato Virus Y), BLRV (Bean Leafroll Virus), CMV (Cucumber Mosaic Virus), BWYV (Beet Western Yellows Virus) και TYVV (Tobacco Yellow Vein Virus) (Musa et al., 2004; Blackman and Eastop, 2007). Οι απώλειες στην παραγωγή οφειλόμενες σε ιώσεις των φυτών μπορούν να αγγίξουν μέχρι και το 90% εξαρτώμενες από την καλλιέργεια και το μέγεθος της προσβολής (Saljoqi, 2009).



**Εικόνα 1.14** Αποικίες του *Myzus persicae* σε φύλλο μελιτζάνας.

Διακρίνονται τα ενήλικα θηλυκά άπτερα άτομα και μικρές νύμφες ηλικίας μίας ημέρας.



**Εικόνα 1.15** Πτερωτά άτομα του *M. persicae*.

(Τροπ. από Whitney Cranshaw, Colorado State University).

(<https://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=2200053>).



### 1.3.4 *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)

Το άκαρι *Tetranychus urticae* (κοινός ή δίστικτος τετράνυχος) αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς εχθρούς των καλλιεργειών παγκοσμίως (Razmjou et al., 2009). Είναι ένα πολυφάγο είδος το οποίο μπορεί να προκαλέσει ζημιές σε πλήθος καλλιεργειών συμπεριλαμβανομένων των κηπευτικών, δενδρωδών, καλλωπιστικών και φυτών μεγάλης καλλιέργειας. Έχει αναφερθεί σε περίπου 1200 είδη φυτών από τα οποία περισσότερα από 150 είναι οικονομικής σημασίας (Abo-Taka et al., 2015). Ανάμεσα στα είδη αυτά περιλαμβάνονται η τομάτα, η μελιτζάνα, το αγγούρι, το κολοκύθι, το φασόλι, η φράουλα και διάφορα εσπεριδοειδή (Fasulo and Denmark, 2000). Μπορεί να μεταφερθεί και να εξαπλωθεί ταχύτατα μετακινούμενο μόνο του, μέσω κάποιου άλλου οργανισμού ή ακόμη και με τον αέρα (Tehri, 2014).

#### 1.3.4.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Τα ωά του *T. urticae* είναι μικρά, μήκους 0,13 mm, λεία, στρογγυλά και υαλώδους χρώματος το οποίο αργότερα μεταβάλλεται σε καστανό (Εικ. 1.16). Εναποτίθενται μεμονωμένα ενώ όταν αρχίζουν και ωριμάζουν τα έμβρυα στο εσωτερικό τους γίνονται εύκολα διακριτά. Η νεοεκκολαφθείσα προνύμφη, γνωστή και ως λάρβα είναι σφαιρική, έχει τρία ζεύγη ποδιών, χρώμα υπόλευκο το οποίο αφού τραφεί γίνεται σκούρο πράσινο και μήκος 0,14 mm. Η πρωτονύμφη διαθέτει τέσσερα ζεύγη ποδιών και είναι χρώματος ανοιχτού καστανού το οποίο αφού τραφεί γίνεται πρασινωπό. Στο στάδιο αυτό τα αρσενικά άτομα παρουσιάζουν στενό σώμα με το οπισθόσωμά τους να είναι τριγωνικό ενώ τα θηλυκά άτομα έχουν σώμα ωοειδές με πιο στρογγυλεμένο οπισθόσωμα. Το μήκος τους είναι περίπου 0,19 mm. Η δευτερονύμφη είναι μεγαλύτερου μεγέθους, μήκους 0,30 mm με το αρσενικό άτομο να παρουσιάζει ορισμένα στίγματα ανοιχτού κίτρινου χρώματος και το θηλυκό στίγματα χρώματος σκούρου γκρι. Τέλος, τα ενήλικα θηλυκά άτομα είναι μεγέθους περίπου 0,48 mm και σχήματος ωοειδούς. Τα διαπαύοντα άτομα έχουν χρώμα πορτοκαλί-κόκκινο ενώ τα μη διαπαύοντα πράσινο-κίτρινο με δυο σκοτεινόχρωμες κηλίδες στη ραχιαία πλευρά του σώματός τους. Τα αρσενικά άτομα έχουν στενό σώμα με τριγωνική απόληξη και είναι μεγέθους 0,41 mm (Κωβαίος, 2010; Patil et al., 2014).

### 1.3.4.2 Βιολογία

Το *T. urticae* είναι ένα είδος με μεγάλη και γρήγορη πληθυσμιακή ανάπτυξη ενώ τα ενήλικά του παρουσιάζουν υψηλή γονιμότητα με μακρά διάρκεια ζωής και επιβίωσης (Tehri et al., 2014a). Διαχειμάζει στο στάδιο του ενήλικου θηλυκού σε προφυλαγμένες θέσεις όπως κάτω από ξερά φύλλα στο έδαφος, πέτρες, ξύλα ή ακόμη και σε ρωγμές του φλοιού των δέντρων. Η δραστηριότητα των θηλυκών ατόμων ξεκινάει αρχές της άνοιξης όταν και αρχίζουν να προσβάλλουν τους ξενιστές τους εναποθέτοντας πλήθος ωών στην κάτω επιφάνεια των φύλλων. Σύντομα σχηματίζονται αποικίες με το άκαρι μετά την εκκόλαψη των ωών να περνά από τα στάδια της λάρβας, πρωτονύμφης, δευτερονύμφης και τέλος στην ενηλικίωση. Η δραστηριότητα συνεχίζεται κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού όσο οι συνθήκες είναι ευνοϊκές με πάνω από επτά αλληλοκαλυπτόμενες γενεές ενώ το φθινόπωρο με την ελάττωση και της διάρκειας της ημέρας η ανάπτυξη σταματάει και σχηματίζονται θηλυκά άτομα τα οποία και θα διαχειμάσουν (Alford, 1999). Στα θερμοκήπια όπου οι συνθήκες είναι περισσότερο ευνοϊκές μπορεί να αναπαράγεται καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου. Κάθε θηλυκό εναποθέτει κατά μέσο όρο 70 ωά και ζει για περίπου 30 ημέρες (Davidson and Lyon, 1987).

Στους 24-26 °C τα ωά εκκολάπτονται μετά από 5 ημέρες περίπου ενώ η συνολική χρονική διάρκεια μέχρι την ενηλικίωση είναι περίπου 12 ημέρες για τα θηλυκά και 11 ημέρες για τα αρσενικά άτομα. Θερμοκρασίες 27-30 °C είναι οι ιδανικότερες για την ανάπτυξη, επιβίωση και αναπαραγωγή του *T. urticae* (Maula and Khan, 2016).

Η θερμοκρασία αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς παράγοντες καθώς έχει φανεί ότι τα άτομα του *T. urticae* προτιμούν και ευνοούνται από συνθήκες ζέστης και περιβαλλοντικής ξηρασίας (Cloyd, 2007). Συνθήκες υγρασίας άνω του 50% για μεγάλο χρονικό διάστημα είναι αποτρεπτικές της αναπαραγωγής και ανάπτυξης του ακάρεως (Bush et al., 2006).

### 1.3.4.3 Ζημιογόνος δράση

Τα άτομα του *T. urticae* ανευρίσκονται κυρίως στην κάτω επιφάνεια των φύλλων κατά μήκος των νευρώσεων ενώ όταν ο πληθυσμός τους αυξάνεται εντοπίζονται σε όλο το φύλλο (Numa et al., 2015).

Η διατροφή του ακάρεως προκαλεί χλωρωτικές-νεκρωτικές κηλίδες σε όλο το έλασμα του φύλλου το οποίο αποκτά χρώμα κιτρινωπό ή γκριζωπό (Εικ. 1.17). Προσβολή των ανοιχτών ανθέων προκαλεί νέκρωση των πετάλων (Attia et al., 2013). Μικρή προσβολή στα φύλλα μειώνει τη φωτοσυνθετική ικανότητα ενώ σε περίπτωση πιο έντονων προσβολών τα φύλλα ξεραίνονται και τελικά πέφτουν συμβάλλοντας στη γενική εξασθένηση του φυτού (Εικ. 1.18) (Riahi et al., 2013). Οι πρωτονύμφες, δευτερονύμφες και τα ενήλικα άτομα υφαίνουν πολυάριθμους ιστούς μέσα στους οποίους ζουν και οι οποίοι μπορούν να καλύψουν ολόκληρο το φυτό (Tehri et al., 2014b).

Οι καρποί μπορούν να υποστούν εγκαύματα από την υπερβολική έκθεση στον ήλιο εξαιτίας της φυλλόπτωσης καθώς επίσης να μην αποκτήσουν ομοιόμορφο μέγεθος και χρώμα. Εγκαύματα μπορεί να υποστούν επίσης και οι κλάδοι οι οποίοι στα εσπεριδοειδή αποκτούν και ορισμένες κίτρινες κηλίδες. Τα ποώδη φυτά επηρεάζονται άμεσα από την προσβολή και ξεραίνονται την ίδια καλλιεργητική περίοδο. Στις δενδρώδεις καλλιέργειες οι επαναλαμβανόμενες προσβολές κάθε χρόνο εξασθενούν τα δέντρα και επηρεάζουν το ριζικό τους σύστημα (Kerruish and Unger, 2010).



Εικόνα 1.16 Ωά και ενήλικα θηλυκά άτομα του *Tetranychus urticae*.



**Εικόνα 1.17** Συμπτώματα από προσβολή του *T. urticae*.



**Εικόνα 1.18** Νέκρωση φύλλων τομάτας από προσβολή του *T. urticae*.

## **1.4 Παραλαβή, Διαχωρισμός και Ταυτοποίηση των Συστατικών των Αιθέριων Ελαίων**

### **1.4.1 Παραλαβή των συστατικών**

Η παραλαβή των αιθέριων ελαίων και εμμέσως των συστατικών τους αποτελεί το αρχικό και πιο σημαντικό βήμα για τη μετέπειτα μελέτη τους. Η επιτυχής ανάλυση με κάποια σύγχρονη μέθοδο χρωματογραφίας εξαρτάται άμεσα από την επιλογή της σωστής μεθόδου παραλαβής (Azmir et al., 2013). Μια λανθασμένη και ακατάλληλη μέθοδος μπορεί να βλάψει και να αλλοιώσει τη χημική σύσταση του ελαίου με αποτέλεσμα την απώλεια της βιοδραστικότητάς του και των φυσικών του χαρακτηριστικών (Tongnuanchan and Benjakul, 2014).

#### **1.4.1.1 Μέθοδοι παραλαβής δευτερογενών μεταβολιτών**

Για την παραλαβή των συστατικών των αιθέριων ελαίων από τα αρωματικά φυτά χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές απόσταξης, εκχύλισης και μηχανικής παραλαβής, άλλες πιο απλές και άλλες πιο σύγχρονες. Για την επιλογή της κατάλληλης μεθόδου λαμβάνονται υπόψιν παράγοντες όπως το είδος και το τμήμα του φυτού που θα χρησιμοποιηθεί (φύλλα, άνθη, βλαστοί, σπέρματα), η περιεκτικότητα και η συνήθης απόδοση του φυτού σε αιθέριο έλαιο, η αξία του αιθέριου ελαίου καθώς επίσης και η χημική σύνθεση των διαφόρων συστατικών του (Σκρουμπής, 1985).

Στις πιο απλές και παραδοσιακές μεθόδους περιλαμβάνονται τεχνικές απόσταξης όπως η υδροαπόσταξη (Water Distillation) όπου το χαρακτηριστικό είναι ότι το νερό και το φυτικό υλικό έρχονται σε άμεση επαφή και βράζουν μαζί. Χρησιμοποιείται επίσης η υδρο-ατμοαπόσταξη (Water and Steam Distillation) όπου το φυτικό υλικό δεν έρχεται σε επαφή με το νερό αλλά τοποθετείται πάνω από την επιφάνειά του αφήνοντας τους ατμούς να παρασέρνουν τα συστατικά του καθώς και η απόσταξη με υδρατμούς (Steam Distillation) όπου η λειτουργία της είναι ίδια με αυτή της υδρο-ατμοαπόσταξης με τη

διαφορά ότι ο ατμός πλέον παράγεται σε εξωτερικό ατμοπαραγωγό και στη συνέχεια διοχετεύεται στο φυτικό υλικό (Σκρουμπής, 1998).

Εκτός των τεχνικών απόσταξης χρησιμοποιούνται μέθοδοι μηχανικής παραλαβής για τη συλλογή ελαίων προερχόμενων από σπέρματα ή καρπούς εσπεριδοειδών. Τα σπέρματα ή οι φλοιοί των καρπών δέχονται πίεση με ειδικά μηχανήματα τα οποία τα αναγκάζουν να απελευθερώσουν το έλαιο το οποίο στη συνέχεια με ειδική κατεργασία διαχωρίζεται από το στερεό υπόλειμμα (Κατσιώτης και Χατζοπούλου, 2013).

Στις απλές μεθόδους εκχύλισης περιλαμβάνεται η εκχύλιση με διαλύτες ή αλλιώς υγρού-υγρού και η εκχύλιση με συσκευή Soxhlet στην περίπτωση που τα συστατικά που θέλουμε να παραλάβουμε έχουν περιορισμένη διαλυτότητα σε κάποιο διαλύτη (Rassem et al., 2016).

Οι τεχνικές οι οποίες προαναφέρθηκαν αν και απλές στη πράξη απαιτούν πολλές φορές αρκετό χρόνο, διαλύτες υψηλής καθαρότητας και σε μεγάλο όγκο, γεγονός που αυξάνει το κόστος, έχουν χαμηλή επιλεκτικότητα και πολλές φορές συμβάλουν στην αλλοίωση των θερμοευαίσθητων ενώσεων. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί τεχνικές εκχύλισης οι οποίες ξεπερνούν αυτούς τους φραγμούς όπως η εκχύλιση με υγρό υπό πίεση (Pressurized Liquid Extraction, **PLE**) (Azmir et al., 2013), η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (Microwave-Assisted Extraction, **MAE**) και εκχύλιση με μικροκύματα απουσία διαλύτη (Solvent-Free Microwave Extraction, **SFME**) (Li et al., 2014), η υπερκρίσιμη εκχύλιση (Supercritical Fluid Extraction, **SFE**) (Doughari, 2012) και η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (Ultrasound-Assisted Extraction, **UAE**) (Stratakos and Koidis, 2016).

#### 1.4.1.2 Παραλαβή με υδροαπόσταξη

Η τεχνική της υδροαπόσταξης (Water Distillation ή Hydrodistillation, **HD**) αποτελεί την πιο απλή και παλαιότερη μέθοδο παραλαβής των αιθέριων ελαίων. Έχει ως κύριο χαρακτηριστικό του ότι το φυτικό υλικό έρχεται σε άμεση επαφή με το νερό και καλύπτεται εξ ολοκλήρου από αυτό (Tandon, 2008).

Οι πρώτες επίσημες αναφορές σχετικά με τη μέθοδο την υδροαπόσταξης για την παραλαβή αιθέριων ελαίων εκφράστηκαν από τον Arnald de Villanova περίπου στα τέλη

του 12<sup>ου</sup> με αρχές του 13<sup>ου</sup> αιώνα. Αν και υπήρχαν προηγούμενες αναφορές κατά την αρχαιότητα από τους Ρωμαίους και τους Έλληνες καθώς επίσης και από τους Άραβες τον 9<sup>ο</sup> αιώνα, είναι ασαφές αν χρησιμοποιούσαν την υδροαπόσταξη για παραγωγή αιθέριων ελαίων ή επικεντρώνονταν στην παραλαβή των υδρολυμάτων η οποία επιτυγχάνονταν χωρίς ιδιαίτερη δυσκολία (Sadgrove and Jones, 2015).

Σε εργαστηριακό επίπεδο η παραλαβή αιθέριων ελαίων με υδροαπόσταξη πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας μια γυάλινη συσκευή τύπου Clevenger. Το συγκρότημα απόσταξης περιλαμβάνει μία φιάλη μέσα στην οποία τοποθετείται το φυτικό υλικό το οποίο πρόκειται να αποσταχθεί μαζί με την απαιτούμενη ποσότητα νερού. Στη συνέχεια η φιάλη μεταφέρεται εντός θερμαινόμενου μανδύα ο οποίος αποτελεί το μέσο θέρμανσης του μείγματος και από πάνω της συνδέεται η αποστακτική συσκευή τύπου Clevenger η οποία καταλήγει στο κάτω μέρος της σε ένα βαθμονομημένο κυλινδρικό σωλήνα όπου συλλέγεται το αιθέριο έλαιο διαχωριζόμενο από το νερό. Πάνω από τη συσκευή τοποθετείται ο ψυκτήρας όπου γίνεται η συμπύκνωση των υδρατμών και ο οποίος φέρει 2 λάστιχα για τη διέλευση του νερού (Κατσιώτης και Χατζοπούλου, 2013).

Το φυτικό υλικό στη φιάλη απορροφά το νερό και όταν αυτό αρχίζει και βράζει το έλαιο που περιέχεται στα κύτταρά του απελευθερώνεται εξαιτίας της θερμότητας και συμπαρασύρεται από το ρεύμα των υδρατμών (Schmidt, 2010). Οι εμπλουτισμένοι αυτοί υδρατμοί έχοντας ανοδική πορεία φτάνουν στον ψυκτήρα όπου ψύχονται και επιστρέφουν στην υγρή μορφή. Το υγρό αυτό το οποίο αποτελεί ένα μείγμα νερού και ελαίου κατέρχεται και καταλήγει στο βαθμονομημένο κυλινδρικό σωλήνα. Εκεί, επειδή το αιθέριο έλαιο δεν είναι υδατοδιαλυτό σχηματίζεται μια διπλή στοιβάδα όπου το έλαιο ως ελαφρύτερο του νερού εντοπίζεται στην άνω επιφάνεια (Ahmad et al., 2015).

Τα έλαια τα οποία παραλαμβάνονται με υδροαπόσταξη είναι συνήθως πιο σκουρόχρωμα σε σύγκριση όταν λαμβάνονται με κάποια άλλη μέθοδο (Lawrence, 1995). Επίσης, αν και η μέθοδος είναι απλή και οικονομική περιέχει μειονεκτήματα διότι είναι αρκετά χρονοβόρα το οποίο σε συνδυασμό και με τη συνεχή θέρμανση του φυτικού υλικού μπορεί να αλλοιώσει τα συστατικά του ελαίου και τα περισσότερα πτητικά από αυτά να χαθούν και άλλα να διαλυθούν στο νερό (Handa, 2008; Mohamadi et al., 2013).

## 1.4.2 Διαχωρισμός και ταυτοποίηση των συστατικών

Ο προσδιορισμός των συστατικών των αιθέριων ελαίων έχει μεγάλη σημασία καθώς με αυτόν τον τρόπο μπορούμε να έχουμε γνώση της ποιότητας του εκάστοτε ελαίου. Ο προσδιορισμός αυτός παλαιότερα γινόταν με διάφορες χημικές αντιδράσεις, διαδικασία η οποία απαιτούσε μεγάλες ποσότητες αιθέριων ελαίων και πολύ χρόνο (Σκρουμπής, 1998). Σήμερα χρησιμοποιούνται διάφορες χρωματογραφικές μέθοδοι οι οποίες επιτρέπουν τον ακριβή προσδιορισμό των συστατικών με ελάχιστες ποσότητες ελαίου και σε πολύ πιο σύντομο χρόνο (Zellner et al, 2010).

### 1.4.2.1 Αέρια χρωματογραφία

Η αέρια χρωματογραφία αποτελεί την πιο διαδεδομένη και κατάλληλη μέθοδο διαχωρισμού των συστατικών των αιθέριων ελαίων. Διαθέτει μεγάλη ταχύτητα, υψηλή ευαισθησία και ικανότητα ανάλυσης ενός ευρύτατου φάσματος ουσιών. Η συνεχής ανάπτυξη και βελτίωσή της σε συνδυασμό με φασματοσκοπικές μεθόδους όπως αυτή της φασματομετρίας μαζών έχει διευκολύνει πλήρως τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών των αιθέριων ελαίων (Κατσιώτης και Χατζοπούλου, 2013).

Κατά τη διαδικασία ανάλυσης το δείγμα εισάγεται με ειδική μικροσύριγγα στο σύστημα έγχυσης του χρωματογράφου όπου και εξαερώνεται αμέσως εξαιτίας της υψηλής θερμοκρασίας που επικρατεί (200-300 °C) (Εικ. 1.19). Εκεί τα συστατικά του δείγματος αναμιγνύονται και παρασύρονται από το ρεύμα ενός φέροντος αερίου κατά μήκος της χρωματογραφικής στήλης η οποία βρίσκεται στο εσωτερικό του συστήματος σε κατάλληλα θερμαινόμενο κλίβανο. Τα συστατικά αφού διαπεράσουν τη στήλη εξέρχονται από αυτή και φτάνουν σε έναν ανιχνευτή ο οποίος αντιλαμβάνεται το κάθε συστατικό σύμφωνα με κάποια φυσική του ιδιότητα (π.χ. θερμική αγωγιμότητα). Ο ανιχνευτής στέλνει το κατάλληλο σήμα στον ενισχυτή και αυτός εν συνεχεία στον καταγραφέα όπου παράγεται ένα γράφημα από κορυφές (χρωματογράφημα) στο οποίο κάθε κορυφή αντιπροσωπεύει κάποιο συστατικό (Stashenko and Martínez, 2014).



Το φέρον αέριο που χρησιμοποιείται εξαρτάται κυρίως από τον τύπο του χρησιμοποιούμενου ανιχνευτή, το είδος της χρωματογραφικής στήλης και την ικανότητά του να ρέει ταχύτερα με αποτέλεσμα τη μείωση του χρόνου ανάλυσης. Τα βασικά αέρια που χρησιμοποιούνται είναι το άζωτο, το υδρογόνο και το ήλιο το οποίο αποτελεί και το κυρίως χρησιμοποιούμενο (Günzler and Williams, 2001). Η ποιότητά του είναι ένας σημαντικός παράγοντας ο οποίος επηρεάζει την ανάλυση. Η κακή ποιότητα του αερίου μπορεί να προκαλέσει την εμφάνιση κορυφών στο χρωματογράφημα χωρίς αυτές να αντιπροσωπεύονται από κάποια ουσία. Επιπλέον, τα υπολείμματά του είναι ικανά να φθείρουν τη στήλη. Για το λόγο αυτό η καθαρότητά του θα πρέπει να φτάνει το 99,9995% (Xue et al., 2015).

Η μέτρηση και ο έλεγχος της σταθερής ροής του φέροντος αερίου είναι επίσης μεγίστης σημασίας τόσο για την αποδοτικότητα της στήλης όσο και για την ποιότητα της ανάλυσης. Η ακριβής μέτρηση της ταχύτητας ροής είναι πολύ σημαντική καθώς για να γίνει η ταυτοποίηση των ενώσεων χρησιμοποιούνται οι χρόνοι κατακρατήσεώς τους οι οποίοι εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την ταχύτητα. Το φέρον αέριο το οποίο βρίσκεται στη φιάλη με πίεση έως και 175 ατμοσφαιρών διαβιβάζεται στον ρυθμιστή πίεσεως ο οποίος με σύστημα βαλβίδων τη μειώνει σε 1,4 - 4 ατμόσφαιρες και έπειτα στο ροόμετρο με το οποίο και γίνεται η ακριβής μέτρηση της ταχύτητας (McNair and Miller, 1998).

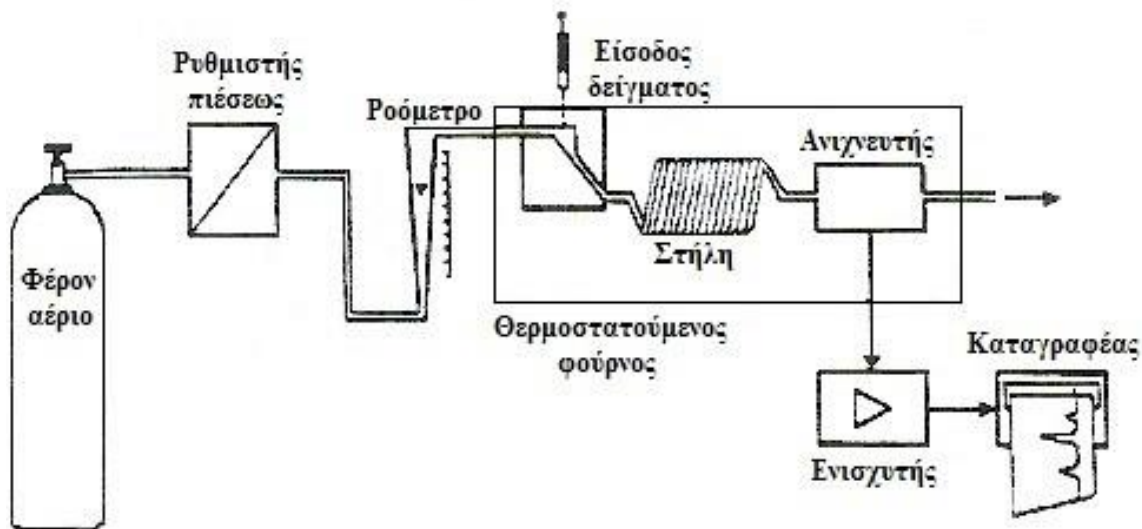
Η εισαγωγή του δείγματος όπως προαναφέρθηκε γίνεται με μικροσύριγγα μέσα από ένα κατάλληλο στόμιο εισαγωγής το οποίο φράσσεται με παχύ διάφραγμα από θερμοανθεκτικό ελαστικό το οποίο δρα ως βαλβίδα. Επιτρέπει την είσοδο του δείγματος όχι όμως την έξοδό του και του φέροντος αερίου. Είναι πολύ σημαντικό η εισαγωγή του δείγματος να γίνεται ακαριαία, ο όγκος του να είναι όσο το δυνατόν μικρότερος και η θερμοκρασία του χώρου εισαγωγής να είναι πολύ υψηλή ώστε να επιτυγχάνεται άμεση εξαέρωση του δείγματος και παραλαβή των ατμών από το φέρον αέριο. Συνήθως οι ποσότητες των δειγμάτων που χρησιμοποιούνται είναι 0,1-10  $\mu\text{L}$  για τα υγρά και 1-10 mL για τα αέρια (Χατζηγιάννου και Κουμπάρης, 1997).

Ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος πραγματοποιείται στη στήλη του αερίου χρωματογράφου και για το λόγο αυτό αποτελεί και το πιο σημαντικό του τμήμα. Γενικά χρησιμοποιούνται δυο τύποι στηλών, οι πληρωμένες στήλες (packed columns) και οι τριχοειδείς (capillary columns). Οι πληρωμένες κατασκευάζονται από υάλινους και

μεταλλικούς (χαλκό, αλουμίνιο, ανοξείδωτο χάλυβα) σωλήνες και έχουν μήκος 2-3 m με εσωτερική διάμετρο 2-4 mm. Οι τριχοειδείς μπορούν να φτάσουν σε μήκος μέχρι και τα 100 m ενώ κατασκευάζονται από πυρίτιο κυρίως, ανοξείδωτο χάλυβα και γυαλί. Προτιμώνται έναντι των πληρωμένων στηλών καθώς διαθέτουν υψηλότερη διαχωριστική ικανότητα και μικρότερο χρόνο ανάλυσης. Η στήλη βρίσκεται εντός φούρνου όπου είναι δυνατή η ρύθμιση της επιθυμητής θερμοκρασίας η οποία αποτελεί πολύ σημαντική παράμετρο για την ποιότητα των αποτελεσμάτων. Για να επιτευχθεί η τοποθέτηση εντός του φούρνου η στήλη έχει τη μορφή σπειράματος διαμέτρου 10-30 cm (Baser, 1995; Skoog et al., 2007).

Τα συστατικά μετά τη έξοδό τους από τη στήλη περνούν από έναν ανιχνευτή ο οποίος προσδιορίζει την συγκέντρωσή τους στο φέρον αέριο. Οι ανιχνευτές της αέριας χρωματογραφίας διακρίνονται σε ανιχνευτές γενικής χρήσης όπως ο ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (Flame Ionization Detector, **FID**), ο ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας (Thermal Conductivity Detector, **TCD**) και σε ειδικής χρήσης όπως είναι ο ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (Electron Capture Detector, **ECD**). Διακρίνονται επίσης ο φλογοφωτομετρικός ανιχνευτής (Flame Photometric Detector, **FPD**), ο ανιχνευτής φωτοϊονισμού (Photoionisation Detector, **PID**) και το φασματοόμετρο μάζας (Mass Spectrometry, **MS**) το οποίο αποτελεί και τον ιδανικό ανιχνευτή για την αέρια χρωματογραφία καθώς αξιοποιεί τη μεγάλη του εκλεκτικότητα και τη γενική του χρήση (Λιοδάκης, 2001).

Το σήμα το οποίο προέρχεται από τον ανιχνευτή είναι συνήθως πολύ ασθενές και θα πρέπει να ενισχύεται πριν την καταγραφή του, διαδικασία η οποία πραγματοποιείται από τον ενισχυτή. Η λήψη του χρωματογραφήματος γίνεται είτε από τον καταγραφέα ο οποίος αποτελεί μια ξεχωριστή εξωτερική μονάδα είτε πλέον από ένα σύστημα ηλεκτρονικού υπολογιστή με εκτυπωτή (Χατζηιωάννου και Κουμπάρης, 2010).



**Εικόνα 1.19** Σχηματική απεικόνιση συστήματος αέριας χρωματογραφίας.

(Τροπ. από Χατζηγιάννου και Κουπάρης, 2010).

#### 1.4.2.2 Φασματομετρία μαζών

Η φασματομετρία μαζών αποτελεί μια αναλυτική τεχνική η οποία σε συνδυασμό με την αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση των συστατικών των αιθέριων ελαίων. Το φασματόμετρο μάζας διακρίνεται για την υψηλή επιλεκτικότητα και την ιδιαίτερη ευαισθησία του (Clench and Tetler, 2000). Τα τμήματα από τα οποία απαρτίζεται είναι το σύστημα εισαγωγής του δείγματος, το σύστημα ιονισμού, ο αναλυτής μαζών, ο ανιχνευτής ιόντων και ο ηλεκτρονικός υπολογιστής όπου γίνεται η καταγραφή και επεξεργασία των αποτελεσμάτων (Niessen and Falck, 2015).

Τα συστατικά τα οποία διαχωρίζονται από τον αέριο χρωματογράφο όταν εξέρχονται από τη στήλη μεταφέρονται στο σύστημα ιονισμού. Εκεί βομβαρδίζονται από ηλεκτρόνια υψηλής κινητικής ενέργειας τα οποία προκαλούν τον ιονισμό τους και τη διάσπασή τους σε ιόντα μικρότερης μάζας γνωστών και ως θραύσματα. Κατά την εισαγωγή τους στον αναλυτή μαζών και υπό την επίδραση του μαγνητικού πεδίου το κάθε ιόν λαμβάνει διαφορετική πορεία σύμφωνα με το λόγο μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ) που διαθέτει το καθένα. Η εκτροπή της πορείας των ιόντων μετρείται κατά την έξοδό τους από τον ανιχνευτή ο

οποίος στέλνει το σήμα σε έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή. Έτσι προκύπτει ένα διάγραμμα το οποίο αποτελεί το φάσμα μαζών το οποίο είναι χαρακτηριστικό για κάθε συστατικό (Neetu et al., 2012).

Ο ιονισμός των συστατικών επιτυγχάνεται με διάφορες τεχνικές. Ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος τρόπος είναι με την πρόσκρουση ηλεκτρονίων (Electron Ionisation, **EI**) (Hajslova and Cajka, 2007). Χρησιμοποιούνται επίσης ο χημικός ιονισμός (Chemical Ionisation, **CI**), ο ιονισμός με γρήγορο βομβαρδισμό ατόμων (Fast Atom Bombardment, **FAB**), ο ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionisation, **ESI**) και ο ιονισμός με λέιζερ (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation, **MALDI**) (Przybylski et al., 2003).

Ο διαχωρισμός των ιόντων σύμφωνα με το λόγο μάζα προς φορτίο γίνεται στον αναλυτή μαζών. Αποτελεί το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό σύγκρισης της ποιότητας μεταξύ των φασματομέτρων μάζας καθώς καθορίζει τη διαχωριστική ικανότητα του κάθε οργάνου. Διακρίνονται ο μαγνητικός αναλυτής απλής εστίασης (single magnetic focusing analyser), ο αναλυτής διπλής εστίασης (double electrostatic magnetic focusing analyser), οι τετραπολικοί αναλυτές μάζας και οι αναλυτές χρόνου πτήσεως (Time-Of-Flight, **TOF**) (Λιοδάκης, 2001; Lavagnini et al., 2006).

Οι ανιχνευτές οι οποίοι δέχονται τα ιόντα μετά τον αναλυτή μαζών είναι σε θέση να παράγουν ένα ηλεκτρικό σήμα το οποίο αντιπροσωπεύει το εκάστοτε θραύσμα. Όσο μεγαλύτερη είναι η ένταση του ηλεκτρικού σήματος τόσο μεγαλύτερη είναι και η αφθονία του θραύσματος. Υπάρχουν διάφοροι τύποι ανιχνευτών η επιλογή των οποίων εξαρτάται από τη φύση των αναλύσεων που πρόκειται να πραγματοποιηθούν. Οι βασικοί τύποι είναι η φωτογραφική πλάκα (Photographic Plate), το κύπελλο Faraday (Faraday Cup) και ο ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής (Electron Multiplier) (Hoffmann and Stroobant, 2007).

Το σήμα το οποίο προέρχεται από τον ανιχνευτή ψηφιοποιείται και μεταφέρεται σε ένα σύστημα ηλεκτρονικού υπολογιστή με εκτυπωτή όπου με τη χρήση του κατάλληλου λογισμικού γίνεται η ταυτοποίηση των συστατικών συγκρίνοντας τα φάσματά τους με τα αντίστοιχα φάσματα των ηλεκτρονικών βιβλιοθηκών (Smith, 2004; Χατζηγιάννου και Κουπάρης, 2010).

## 1.5 Εγκλεισμός Αιθέριων Ελαίων

### 1.5.1 Γενικά

Όπως σημειώθηκε και στην παράγραφο 1.1.2 τα αιθέρια έλαια περιέχουν ενώσεις οι οποίες διαθέτουν πλήθος ευεργετικών ιδιοτήτων και για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται σε πολλούς και διαφορετικούς κλάδους. Η μεγάλη όμως πτητικότητα των αιθέριων ελαίων κάτω από συνθήκες θερμοκρασίας, φωτός, ηλιακής ακτινοβολίας, αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα μειονεκτήματα τους καθώς προσδίδει στις ενώσεις αυτές μικρή διάρκεια ζωής καθιστώντας τη χρήση τους πολλές φορές μη πρακτική. Για το λόγο αυτό γίνεται προσπάθεια για τον εγκλεισμό των συστατικών των αιθέριων ελαίων σε διάφορα μικροσωματίδια με στόχο την ελεγχόμενη απελευθέρωσή τους και την προστασία τους από το εξωτερικό περιβάλλον αυξάνοντας κατ' αυτό το τρόπο τη διάρκεια ζωής και δράσης τους (Cevallos et al., 2010; AbdManaf et al., 2015).

Ο εγκλεισμός (μικροεγκλεισμός, μικροενθυλάκωση, microencapsulation) αποτελεί μια μέθοδο κατά την οποία μια ουσία ή ένα μίγμα ουσιών (αιθέριο έλαιο) το οποίο αποτελεί τον πυρήνα περιβάλλεται από ένα υλικό το οποίο αποτελεί το τοίχωμα και το μέσο εγκλεισμού ή ενσωματώνεται σε μία ομοιογενή ή ετερογενή μήτρα καταλήγοντας στο σχηματισμό καψουλών. Τα συστατικά του πυρήνα διαχέονται σταδιακά μέσω του τοιχώματος της κάψουλας προσφέροντας έτσι ελεγχόμενη απελευθέρωση και κάτω από τις επιθυμητές συνθήκες (Bakry et al., 2016). Η θραύση του τοιχώματος μπορεί να προκληθεί εξαιτίας κάποιας χημικής αντίδρασης, από υδρόλυση ή από τη σταδιακή του αποσύνθεση. Η ρυθμός απελευθέρωσης των συστατικών μπορεί να είναι διακοπτόμενος και σταδιακός ή να είναι συνεχής μέχρι εξαντλήσεως του εγκλεισμένου υλικού (Riyajan, 2011). Το υλικό εντός των καψουλών μπορεί να είναι είτε ενιαίο και συμπαγές είτε διαμορφωμένο σε μικρά διάσπαρτα μέρη (Devi and Maji, 2011).

Χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι ενθυλάκωσης οι οποίες εξαρτώνται από το είδος του εγκλεισμένου υλικού, το είδος και την αντοχή του τοιχώματος, το μέγεθος των καψουλών και τον επιθυμητό ρυθμό απελευθέρωσης των συστατικών (Martins et al., 2014). Διακρίνονται οι ξήρανση με ψεκασμό (Spray-drying), ξήρανση με κατάψυξη (Freeze-drying), ρευστοποιημένη κλίνη (Fluidized-bed-coating), εξώθηση (Extrusion),

κροκίδωση (Coacervation), μέθοδος γαλακτωματοποίησης με εξάτμιση οργανικού διαλύτη (Solvent evaporation) και τεχνολογία υπερκρίσιμων ρευστών (Supercritical fluid technology) (Das et al., 2011; Bakry et al., 2016).

Ως μέσα εγκλεισμού έχουν μελετηθεί, δοκιμασθεί και χρησιμοποιηθεί διάφορα υλικά. Η σωστή επιλογή τους είναι πολύ σημαντική καθώς επηρεάζει τις μετέπειτα φυσικοχημικές ιδιότητες των μικροσωματιδίων. Καθορίζει τις ιδιότητες του εγκλεισμένου υλικού, τη σταθερότητα και το ρυθμό διάχυσής του. Θα πρέπει να είναι χημικώς συμβατό και να μην αντιδρά με αυτό, να το προστατεύει από τις αντίξοες συνθήκες του περιβάλλοντος (φως, οξυγόνο, θερμότητα, pH) και να είναι εύκολα διαχειρίσιμο (Carvalho et al., 2016). Χρησιμοποιούνται κυρίως υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λιπίδια και συνθετικά πολυμερή. Μερικά από αυτά είναι οι κυκλοδεξτρίνες, οι μαλτοδεξτρίνες, το άμυλο, διάφορα κόμμεα, η ζελατίνη, πρωτεΐνες γάλακτος και πρωτεΐνες σόγιας (Chan, 2011; Sherry et al., 2013; Martins et al., 2014).

Ο εγκλεισμός των αιθέριων ελαίων είναι μια τεχνική η οποία έχει βρει μεγάλη εφαρμογή στη βιομηχανία φαρμάκων όπου αυξάνει τη σταθερότητα της ουσίας κάτω από τη παρουσία φωτός, θερμότητας και οξειδωτικών συνθηκών, στη βιομηχανία τροφίμων όπου σταθεροποιεί τα ευαίσθητα συστατικά (γεύσεις, αρωματικά μέσα) και στη βιομηχανία καλλυντικών όπου παρέχει ελεγχόμενη απελευθέρωση των ουσιών και μειώνει τους ερεθισμούς του δέρματος (Marques, 2010). Στη γεωργία χρησιμοποιείται στα συνθετικά παρασιτοκτόνα όπου επιτυγχάνεται η σταθερότητα και η ελεγχόμενη ροή της εκάστοτε δραστικής ουσίας. Προσφέρει αύξηση της αποτελεσματικότητας, υψηλή εκλεκτικότητα, καλύτερη κατανομή της δραστικής ουσίας στο ψεκασμένο φυτό και μικρότερη έκθεση του εργατικού προσωπικού σε αυτή (Sahayaraj, 2014).

Σε μελέτη των Lai et al. (2006) επετεύχθη εγκλεισμός του αιθέριου ελαίου του *Artemisia arborescens* σε στερεά λιπίδια. Το παρασκεύασμα επέδειξε σταθερότητα σε διάφορες θερμοκρασίες αποθήκευσης και για διάστημα δυο μηνών. Βιοδοκιμές οι οποίες διεξήχθησαν στο *Bemisia tabaci* έδειξαν ότι ο εγκλεισμός μείωσε την πτητικότητα του ελαίου σε σχέση με το γαλάκτωμα του μάρτυρα φτάνοντας στο συμπέρασμα ότι η χρήση στερεών λιπιδίων θα μπορούσε να αξιοποιηθεί ως μέσο εγκλεισμού των αιθέριων ελαίων για τη χρήση τους στη γεωργία.

Εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο σκόρδου σε πολυαιθυλενογλυκόλη (polyethylene glycol, PEG) επέφερε σε δοκιμή του μετά από πέντε μήνες θνησιμότητα της τάξεως του 80% σε ενήλικα άτομα του *Tribolium castaneum* έναντι του 11% που επέφερε το αιθέριο έλαιο μόνο του. Η διαφορά αυτή αποδόθηκε στη βραδεία και σταθερή ροή του αιθέριου ελαίου που προσφέρει ο εγκλεισμός του (Yang et al., 2009). Εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο θυμαριού σε μελαμίνη με φορμαλδεΰδη (melamine–formaldehyde) ενσωματωμένο στη διατροφή των προνυμφών του *Plodia interpunctella* επέφερε απόθνηση του 90% του πληθυσμού για χρονικό διάστημα τεσσάρων εβδομάδων (Chung et al., 2013). Σε παρόμοιες μελέτες (Moretti et al., 2002; Varona et al., 2010; Abreu et al., 2012; Fernandes et al., 2014; Souza et al., 2014) δοκιμάστηκαν διάφορα υλικά ως μέσα εγκλεισμού (χιτοζάνη, αραβικό κόμμι, άμυλο, μαλτοδεξτρίνη) με ποικίλα αιθέρια έλαια (δενδρολίβανο, λεβάντα) όπου φαίνεται ότι η μέθοδος του εγκλεισμού προσδίδει μεγαλύτερη διάρκεια ζωής και δράσης στο έλαιο, προστατεύοντάς το από τις εξωτερικές συνθήκες και επιτρέποντας τη σταθερή και ελεγχόμενη απελευθέρωσή του. Φαίνεται έτσι να υπάρχει ένας πρακτικός τρόπος εκμετάλλευσης των συστατικών των αιθέριων ελαίων και πιθανότητες μελλοντικής εμπορικής αξιοποίησής τους για την ευρεία χρήση τους στην φυτοπροστασία (Oliveira et al., 2014).

### **1.5.2 Εγκλεισμός αιθέριων ελαίων σε μικροσωματίδια ζυμομύκητα (*Saccharomyces cerevisiae*)**

Η σύνδεση και η σημασία του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* (μαγιά) για τον άνθρωπο προέρχεται από αρχαιοτάτων χρόνων. Αποτελεί έναν από τους αρχαιότερους οργανισμούς που χρησιμοποίησε ο άνθρωπος και τον εξυπηρετεί για χιλιάδες έτη μέχρι και σήμερα στην αρτοποιία, ζυθοποιία και στην παραγωγή κρασιού. Είναι μονοκύτταρος, ευκαρυωτικός μικροοργανισμός ο οποίος πολλαπλασιάζεται με εκβλάστηση ενώ το κύτταρό του είναι ελλειψοειδές με διάμετρο 5-10 μm (Feldmann, 2012).

Ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* πρωτοαναγνωρίστηκε ως κατάλληλος για εγκλεισμό όταν παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρά του ώντας προκατεργασμένα με κάποιο πλασμολυτικό ήταν ικανά να απορροφήσουν και να συγκρατήσουν μέσα τους υδατοδιαλυτές ουσίες. Στη συνέχεια, επιτεύχθηκε εγκλεισμός λιποδιαλυτών ουσιών σε

κύτταρα τα οποία διέθεταν υψηλό ποσοστό λιπιδίων (>40% w/w) όπου και υποστηρίχθηκε ότι ουσίες όπως τα αιθέρια έλαια είναι δυνατόν να εισχωρούν εντός του κυττάρου ανεξάρτητα αν αυτό είναι ζωντανό ή νεκρό. Αργότερα, αναγνωρίστηκε πως ο εγκλεισμός είναι δυνατός και σε κύτταρα με μικρή περιεκτικότητα σε λιπίδια (<5%) χωρίς τη χρήση ουσιών για εμπλουτισμό της λιπιδικής στιβάδας ή την προκατεργασία τους με κάποιο πλασμολυτικό. Σύμφωνα με αυτή τη διεργασία, τα κύτταρα επωάζονται σε διάλυμα ή διασπορά της ενδιαφερόμενης ουσίας η οποία δύναται να διαχυθεί μέσα από το κυτταρικό τοίχωμα χωρίς να το καταστρέφει και να διατηρείται παθητικά μέσα σε αυτό (Bishop et al., 1998).

Ένα από τα βασικά πλεονεκτήματα του ζυμομύκητα ως φορέα εγκλεισμού είναι η απλή και χαμηλού κόστους διεργασία εγκλεισμού η οποία στην απλούστερη μορφή της μπορεί να επιτευχθεί χωρίς πρόσθετα, μόνο με την ανάμιξη νερού, μαγιάς και της επιθυμητής ουσίας. Κατά τη διαδικασία του εγκλεισμού τα κύτταρα χάνουν τη βιωσιμότητά τους συνήθως κατά τη διάρκεια των 2 πρώτων ωρών ενώ το κυτταρικό τοίχωμα και η πλασματική μεμβράνη παραμένουν ανέπαφα. Η μη-βιωσιμότητα των κυττάρων είναι επιθυμητή ώστε να αποφευχθεί πιθανή ανάπτυξή τους. Επίσης, η απώλεια της βιωσιμότητας των κυττάρων δεν επηρεάζει την ικανότητά τους ως φορείς εγκλεισμού καθώς η διαδικασία εγκλεισμού βασίζεται κατά κύριο λόγο στην παθητική διάχυση ενώ η ενεργή μεταφορά είναι αμελητέας σημασίας (Paramera et al., 2014).

Η δομή και οι φυσικές ιδιότητες του κυτταρικού τοιχώματος αποτελούν σημαντικά χαρακτηριστικά και καθιστούν το κύτταρο του ζυμομύκητα ως ένα από τα καλύτερα μέσα ενθυλάκωσης. Το κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από β-γλυκάνες, μια μικρή ποσότητα χιτίνης και ένα στρώμα από μαννοπρωτεΐνες τα οποία επιτρέπουν την ομαλή διάχυση της ουσίας (Salari et al., 2015).

Τα κύτταρα του ζυμομύκητα έχουν χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία τροφίμων για την ενθυλάκωση τόσο υδρόφιλων όσο και υδρόφοβων ουσιών όπως αιθέρια έλαια, ένζυμα και κουρκουμίνη, βελτιώνοντας τη σταθερότητα και δραστηκότητά τους (Paramera et al., 2011; Sultana et al., 2017).



## 1.6 Σκοπός της Μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να αξιολογηθεί η επίδραση δύο αιθέριων ελαίων προερχόμενων από αρωματικά-φαρμακευτικά φυτά της οικογένειας Lamiaceae σε επιβλαβή έντομα και ακάρεα κηπευτικών καλλιεργειών. Επίσης, επειδή τα αιθέρια έλαια ως πτητικές ενώσεις μειονεκτούν, έγινε προσπάθεια βελτίωσης της υπολειμματικής τους διάρκειας με τον εγκλεισμό τους σε μικροσωματίδια ζυμομύκητα.

Συγκεκριμένα, σκοπός ήταν να διερευνηθεί:

- η τοξική δράση των αιθέριων ελαίων του *Melissa officinalis* L. (κν. μελισσόχορτο) και του *Mentha pulegium* L. (κν. φλισκούνη) επί των ωών του *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hemiptera: Aleyrodidae), του *M. pulegium* επί των νυμφών του καθώς επίσης και η αποθητική δράση και των δύο ελαίων επί των ενηλίκων του εντόμου
- η τοξική δράση των δύο αιθέριων ελαίων επί των ωών και των προνυμφών του εντόμου *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)
- η τοξική δράση του αιθέριου ελαίου του *M. pulegium* επί των ενηλίκων άπτερων ατόμων του *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) καθώς επίσης και η επίδρασή του στο αναπαραγωγικό δυναμικό τους
- η τοξική δράση του αιθέριου ελαίου του *M. pulegium* επί των ωών και των ενηλίκων ατόμων του *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) καθώς επίσης και η επίδρασή του στο αναπαραγωγικό δυναμικό του ακάρεως και στην εκκολαπτικότητα των ωών του
- η βελτίωση της υπολειμματικής διάρκειας και δράσης του αιθέριου ελαίου του *M. pulegium* με τον εγκλεισμό του σε μικροσωματίδια ζυμομύκητα (*Saccharomyces cerevisiae*)
- η χημική σύσταση των δύο αιθέριων ελαίων με σύστημα αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών (GC-MS)

# Κεφάλαιο 2

## Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1 Φυτικό Υλικό και Εκτροφές

#### 2.1.1 Μέθοδος ανάπτυξης του φυτικού υλικού

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν φυτά τομάτας (*Lycopersicon esculentum* Mill) (Elpida F1) και φυτά μελιτζάνας (*Solanum melongena* L.) (Bonica F1). Η μέθοδος που ακολουθούνταν ήταν αυτή της προβλάστησης των σπόρων. Εντός πλαστικών λεκανών τοποθετούνταν 3 μέρη φυτοχώματος και 1 μέρος περλίτη τα οποία αναμιγνύονταν καλά. Το μίγμα αυτό αφού διαβρεχόταν ελαφρώς και αναμιγνύονταν πάλι, αποτελούσε το υπόστρωμα ανάπτυξης των φυτών. Στη συνέχεια, πλαστικοί δίσκοι σποράς διαστάσεων 24 x 28 cm και ύψους 6 cm καλύπτονταν έως το μισό του ύψους τους με το μείγμα και σε κάθε διαχωριζόμενη θέση του δίσκου τοποθετούνταν ένας σπόρος. Κατόπιν, οι σπόροι καλύπτονταν με το υπόστρωμα ανάπτυξης των φυτών και στη συνέχεια ακολουθούσε καλή συμπίεσή του με σκοπό την επίτευξη καλής πρόσφυσης των σπόρων στο υπόστρωμα, καλής βλάστησης και σταθερού μετέπειτα ριζικού συστήματος.

Με το πέρας της διαδικασίας, οι πλαστικοί δίσκοι σποράς (Εικ. 2.1) αφού τοποθετούνταν σε πλαστικούς λευκούς δίσκους διαστάσεων 35 x 45 cm, ποτίζονταν καλά και μεταφέρονταν εντός εντομοστεγών κλωβών. Οι κλωβοί διατήρησης των φυτών ήταν είτε ξύλινοι (Εικ. 2.2) αποτελούμενοι από ξύλινο σκελετό και κάλυψη από λεπτή μουσελίνα διαστάσεων 100 x 80 x 70 cm είτε κλωβοί αποτελούμενοι από μουσελίνα που επέτρεπε τον επαρκή αερισμό του εσωτερικού τους, διαστάσεων 96 x 59 x 59 cm. Οι

κλωβοί βρίσκονταν εντός του θερμοκηπίου του Εργαστηρίου Γεωργικής Ζωολογίας και Εντομολογίας του Γ.Π.Α. επάνω σε ξύλινους ή μεταλλικούς πάγκους.

Το θερμοκήπιο ήταν υαλόφρακτο και εξοπλισμένο με κλιματιστικό μηχάνημα για τη ρύθμιση της θερμοκρασίας ( $22,5 \pm 2,5$  °C).



**Εικόνα 2.1** Πλαστικός δίσκος σποράς με νεαρά σπορόφυτα.

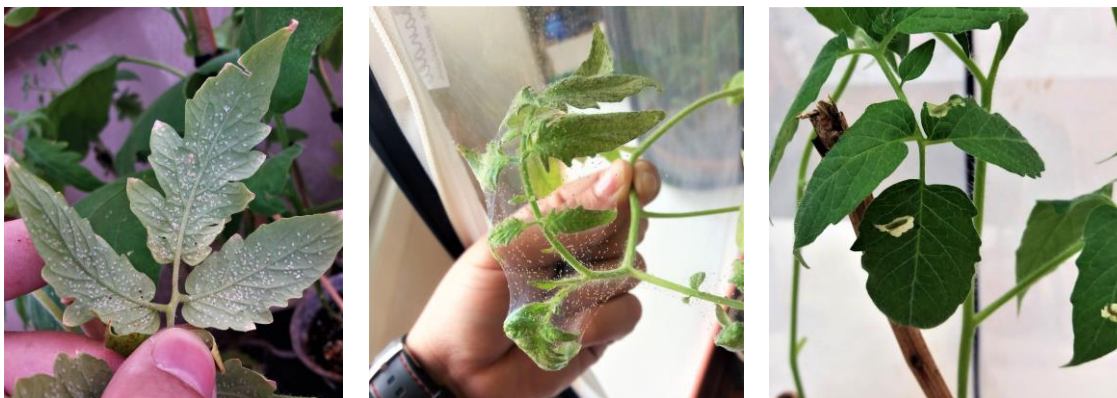


**Εικόνα 2.2** Ξύλινος κλωβός διατήρησης φυτών.

### 2.1.2 Μέθοδος ανάπτυξης των εκτροφών των εντόμων

Όλες οι εκτροφές των εντόμων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα όπως επίσης και του ακάρεως *T. urticae* διατηρούνταν εντός κλωβών όμοιων με αυτούς που περιεγράφηκαν στην παραπάνω παράγραφο (Εικ. 2.3). Το *T. vaporariorum* και το *T. urticae* εκτρέφονταν σε φυτά τομάτας ενώ το *M. persicae* σε φυτά μελιτζάνας. Όλες οι εκτροφές προϋπήρχαν στο Εργ. Γεωργ. Ζωολογίας και Εντομολογίας, εκτός αυτής του *T. absoluta* που ξεκίνησε από άτομα που συλλέχθηκαν από δείγματα τομάτας που ελήφθησαν από το Τμήμα Ποιοτικού και Φυτοϋγειονομικού Ελέγχου, της Διεύθυνσης Αγροτικής Οικονομίας και Κτηνιατρικής Περιφερειακής Ενότητας Πρέβεζας. Με τη βοήθεια πινέλου μεταφέρθηκε μεγάλος αριθμός ωών του εντόμου σε εύρωστα φυτά τομάτας και με τον τρόπο αυτό αναπτύχθηκε η εκτροφή του *T. absoluta*.

Οι κλωβοί που περιείχαν τις εκτροφές βρίσκονταν και αυτοί εντός του χώρου του θερμοκηπίου που αναφέρθηκε στην παραπάνω παράγραφο με στόχο την ύπαρξη όσο το δυνατόν ιδανικότερων συνθηκών διαβίωσης για τα έντομα.



Εικόνα 2.3 Εκτροφή του *T. vaporariorum* (αριστερά), *T. urticae* (κέντρο) και *T. absoluta* (δεξιά).

### 2.1.3 Διατήρηση φυτών και εκτροφών

Όταν τα νεαρά φυτά έφταναν στο στάδιο των 2-3 πραγματικών φύλλων μεταφυτεύονταν σε πλαστικές γλάστρες διαμέτρου 11 cm και ύψους 10 cm. Το υπόστρωμα ανάπτυξης αποτελούνταν πάλι από 3 μέρη φυτοχώματος και 1 μέρος περλίτη. Μετά τη μεταφύτευση οι γλάστρες με τα φυτά τοποθετούνταν σε πλαστικούς δίσκους, ποτίζονταν καλά και μεταφέρονταν στους κλωβούς.

Το πότισμα των φυτών στη συνέχεια γινόταν ανά 2 κατά βάση ημέρες όπως επίσης και ο έλεγχός τους για τυχόν προσβολές από έντομα ή ακάρεα. Τα φυτά έπρεπε να διατηρηθούν υγιή, γερά και εντελώς απαλλαγμένα από κάθε είδος επιβλαβούς εντόμου.

Οι κλωβοί που περιείχαν τις εκτροφές των εντόμων παρακολουθούνταν επίσης ανά τακτά χρονικά διαστήματα για την αποφυγή ύπαρξης παρασιτοειδών ή αρπακτικών εντόμων που θα μπορούσαν να μειώσουν ή και να εξαλείψουν ολόκληρη την εκτροφή αν δεν γινόταν έγκαιρη διαπίστωση της παρουσίας τους. Επίσης, δινόταν ιδιαίτερη προσοχή στα φυτά ώστε να μην έχουν προσβολή από άλλα έντομα εκτός του εντόμου που εκτρέφονταν. Σε περίπτωση που ανευρίσκονταν άλλα είδη εντόμων και ήταν μικρού αριθμού αυτά απομακρύνονταν και ακολουθούσε καλός έλεγχος της εκτροφής.

## 2.2 Παραλαβή, Διαχωρισμός και Ταυτοποίηση των Συστατικών

### 2.2.1 Προετοιμασία των αρωματικών φυτών

Τα αρωματικά φυτά από τα οποία έγινε η παραλαβή των αιθέριων ελαίων ήταν το *Melissa officinalis* L. (κν. μελισσόχορτο) και το *Mentha pulegium* L. (κν. φλισκούνι). Τα δείγματα είχαν προμηθευτεί από παραγωγούς σε αποξηραμένη μορφή (Εικ. 2.4.α). Το μελισσόχορτο με προέλευση την Κωπαΐδα είχε συλλεχθεί το 2015. Το φλισκούνι είχε συλλεχθεί επίσης το ίδιο έτος από το νομό Θεσπρωτίας. Για την απόσταξη του μελισσόχορτου χρησιμοποιήθηκαν τα φύλλα του φυτού ενώ για το φλισκούνι χρησιμοποιήθηκαν τα φύλλα και τα άνθη του.

Το δείγμα του μελισσόχορτου αποτελούνταν μόνο από τα φύλλα του φυτού ενώ στο φλισκούνι κατεβλήθη προσπάθεια ολικής αποφυγής του ξυλώδους ιστού του φυτού στο δείγμα προς παραλαβή του αιθέριου ελαίου με στόχο την όσο το δυνατόν μεγαλύτερη απόδοση του τελικού δείγματος σε αιθέριο έλαιο. Στη συνέχεια, το αποξηραμένο δείγμα του μελισσόχορτου λειοτριβήθηκε με τη βοήθεια ομογενοποιητή, ενώ το δείγμα του φλισκουνιού εξαιτίας των μικρών του φύλλων και ανθέων χρησιμοποιήθηκε αυτούσιο για τη μετέπειτα απόσταξη (Εικ. 2.4.β).



(α)



(β)

**Εικόνα 2.4 α)** Αποξηραμένο φυτικό δείγμα φλισκουνιού.

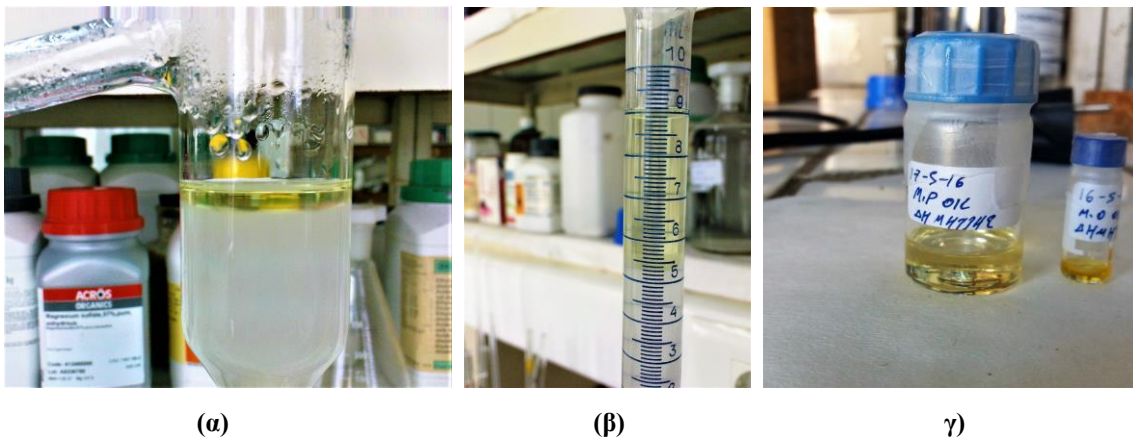
**β)** Δείγμα φλισκουνιού έτοιμο προς απόσταξη, χωρίς ξυλώδη ιστό.

### 2.2.2 Μεθοδολογία απόσταξης των αιθέριων ελαίων

Για την απόσταξη των αιθέριων ελαίων εφαρμόστηκε η μέθοδος της υδροαπόσταξης με συσκευή Clevenger, με θερμαντική πηγή τη χρήση θερμαντικού μανδύα (Εικ. 2.6).

Για το μελισσόχορτο ζυγίσθηκε 200 g φυτικού υλικού, λειοτριβήθηκε με τη βοήθεια ομογενοποιητή και μεταφέρθηκε εντός σφαιρικής φιάλης χωρητικότητας 5000 mL. Για το φλισκούνι ζυγίσθηκε 100 g τελικού φυτικού δείγματος και όπως προαναφέρθηκε μεταφέρθηκε αυτούσιο, χωρίς λειοτρίβηση εντός της φιάλης. Στη συνέχεια, προστέθηκε ποσότητα απιονισμένου νερού μέχρι καλύψεως του δείγματος και ακολούθησε καλή ανάδευση με στόχο την ολική του ενυδάτωση. Και στα δύο φυτικά είδη χρειάστηκαν 2500 mL νερού. Εν συνεχεία, η φιάλη μεταφέρθηκε στο θερμαντικό μανδύα και εντός της προστέθηκαν μικρά κομμάτια πορσελάνης για την αποφυγή αφρισμού. Η συσκευή Clevenger προσαρμόστηκε στη σφαιρική φιάλη ενώ από πάνω της τοποθετήθηκε ο ψυκτήρας ο οποίος έφερε 2 λάστιχα για τη διέλευση του νερού. Η συσκευή μαζί με τον ψυκτήρα στερεώθηκαν σε κατάλληλη μεταλλική βάση για μέγιστη ασφάλεια. Η φιάλη και μέρος του σκελετού της συσκευής καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο με στόχο την ελάχιστη απώλεια θερμοκρασίας. Το δείγμα άρχισε να θερμαίνεται ενώ ως χρόνος έναρξης της απόσταξης θεωρήθηκε η στιγμή που ξεκίνησε η συμπύκνωση των υδρατμών στον ψυκτήρα. Το φυτικό υλικό αφέθηκε για απόσταξη μέχρι τη στιγμή που δεν παρατηρούνταν περαιτέρω αύξηση του συλλεγόμενου αιθέριου ελαίου. Η συνολική διάρκειά της ήταν 3 ώρες και για τα δύο φυτικά είδη. Στη συνέχεια, η συσκευή αφέθηκε για 45 λεπτά σε ηρεμία με στόχο το σαφή διαχωρισμό του αιθέριου ελαίου και του υδρολύματος (Εικ. 2.5.α). Αφού έγινε ο διαχωρισμός, απομακρύνθηκε η ποσότητα του υδρολύματος και έγινε μέτρηση του όγκου του ελαίου στη βαθμονομημένη κλίμακα της συσκευής Clevenger (Εικ. 2.5.β). Η παραλαβή του ελαίου έγινε σε υάλινα φιαλίδια και με πολύ προσοχή ούτως ώστε να μην υπάρξει κάποια απώλεια. Το αιθέριο έλαιο του μελισσόχορτου αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη για τη μετέπειτα χρήση του. Το έλαιο του φλισκουνιού (Εικ. 2.5.γ) κατόπιν επεξεργασίας του με άνυδρο θειικό μαγνήσιο ( $MgSO_4$ ) για την απαλλαγή του από την υγρασία αποθηκεύτηκε και αυτό στην κατάψυξη.





**Εικόνα 2.5 α)** Αιθέριο έλαιο φλισκουνιού (επάνω) και το υδρόλυμά του (κάτω).

**β)** Μέτρηση του όγκου του ελαίου σε βαθμονομημένη κλίμακα της συσκευής Clevenger.

**γ)** Αιθέριο έλαιο φλισκουνιού και μελισσόχορτον.



**Εικόνα 2.6** Συσκευή απόσταξης Clevenger.

### 2.2.3 Προσδιορισμός της σύστασης των αιθέριων ελαίων με σύστημα αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών (GC-MS)

Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών των αιθέριων ελαίων πραγματοποιήθηκε με σύστημα αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών (Εικ. 2.7). Χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος Trace GC ULTRA, εφοδιασμένος με ανιχνευτή φασματόμετρο μάζας DSQ II της εταιρίας Thermo Scientific και αναλυτική στήλη Thermo-5MS (30 m x 0,25 mm, ID, πάχος φιλμ 0,25 μm). Η επεξεργασία των χρωματογραφημάτων έγινε με το πρόγραμμα Xcalibur.

Κάθε δείγμα αιθέριου ελαίου αφού αραιώθηκε σε ακετόνη 1:1000 (v/v) εισήχθη στο σύστημα έγχυσης με τη βοήθεια μικροσύριγγας και με την τεχνική splitless σε όγκο 1 μl. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα και του ανιχνευτή ήταν 220 °C και 240 °C αντίστοιχα. Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε για το διαχωρισμό των συστατικών ξεκίνησε από τους 60°C και είχε σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας μέχρι τους 250 °C με ρυθμό μεταβολής 3°C ανά λεπτό. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο (He) με ροή 1 mL/min. Η ταυτοποίηση των συστατικών των αιθέριων ελαίων πραγματοποιήθηκε με σύγκριση των χρόνων συγκράτησης και των φασμάτων μαζών τους με τα αντίστοιχα δεδομένα των ηλεκτρονικών βιβλιοθηκών Adams07 και Xcalibur που υπάρχουν στο λογισμικό Xcalibur του οργάνου και με δεδομένα της βιβλιογραφίας (Adams, 2007).



Εικόνα 2.7 Σύστημα αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών (GC-MS).



## 2.3 Εγκλεισμός Αιθέριων Ελαίων σε Μικροσωματίδια Ζυμομύκητα (*Saccharomyces cerevisiae*)

### Μεθοδολογία εγκλεισμού

Για την πειραματική διαδικασία εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου επιλέχθηκε το έλαιο του φλισκουνιού και ως μέσο ενθυλάκωσης χρησιμοποιήθηκε εμπορική ξηρή μαγιά. Αρχικά πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των κυττάρων με διάλυμα χλωριούχου νατρίου με στόχο την εξαγωγή των ενδοκυτταρικών συστατικών (πλασμόλυση) και στη συνέχεια τα τροποποιημένα κύτταρα αναμείχθηκαν με το έλαιο προκειμένου να επιτευχθεί ο εγκλεισμός. Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου (υπεύθυνη Επίκ. Καθηγήτρια Αναστασία Δέτση).

Για την πλασμόλυση των κυττάρων ακολουθήθηκε η μέθοδος που περιγράφεται από τους Shi et al. (2016). Αρχικά παρασκευάστηκε υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου (NaCl) 2% w/v το οποίο αναμείχθηκε με τη μαγιά σε αναλογία 1:2 (κατά βάρος). Το διάλυμα αναδεύθηκε για 48 ώρες στους 40 °C, στα 170 rpm και έπειτα για 15 λεπτά στους 85 °C με στόχο την αδρανοποίηση των ενζύμων των κυττάρων. Στη συνέχεια, το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε για 15 λεπτά στα 12000 rpm, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το στερεό επαναδιασπάρθηκε σε καθαρό νερό. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε 5 φορές με στόχο την απομάκρυνση όλων των ανεπιθύμητων ουσιών. Παρατηρήθηκε πώς μετά από κάθε επανάληψη το υπερκείμενο ήταν πιο διαυγές. Τέλος, ακολούθησε λυοφιλοποίηση των κυττάρων για 48 ώρες. Ο εγκλεισμός σε μαγιά ακολουθεί κατά βάση το μοντέλο διάχυσης μέσα από τους πόρους της κυτταρικής μεμβράνης οπότε το έλαιο θα πρέπει να υπάρχει σε περίσσεια για να επιτευχθεί μεγάλο ποσοστό εγκλεισμού. Ακολουθήθηκε η διαδικασία που προτείνεται από τους Bishop et al. (1998). Σε κωνική φιάλη τοποθετήθηκε η μαγιά, το έλαιο και το νερό με αναλογία μαζών 1:1 και 5:6 αντίστοιχα. Το διάλυμα διατηρήθηκε στους 40 °C και στα 100 rpm για 24 ώρες. Έπειτα φυγοκεντρήθηκε για 15 λεπτά στα 12000 rpm, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το στερεό επαναδιασπάρθηκε σε καθαρό νερό. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές και στη συνέχεια ακολούθησε λυοφιλοποίηση των κυττάρων για 48 ώρες.

## 2.4 Παρασκευή Γαλακτωμάτων

### Μεθοδολογία παρασκευής

Τα αιθέρια έλαια του *M. officinalis* και του *M. pulegium* μετά τη διαδικασία παραλαβής τους εφαρμόστηκαν επί των εντόμων *T. vaporariorum*, *T. absoluta*, *M. persicae* και του ακάρεως *T. urticae* με τη μορφή γαλακτωμάτων.

Για την παρασκευή των γαλακτωμάτων χρησιμοποιήθηκε γαλακτωματοποιητής Tween 80 και απιονισμένο νερό ως μέσο αραίωσης. Η περιεκτικότητα των ελαίων ήταν πάντοτε 0,1% (v/v). Ο γαλακτωματοποιητής χρησιμοποιήθηκε σε δυο επίπεδα περιεκτικότητας διότι ενώ το έλαιο του μελισσόχορτου απαιτούσε 1% (v/v) Tween 80 για να αναμειχθεί με το νερό και να γίνει ένα ομοιογενές γαλάκτωμα, το αιθέριο έλαιο του φλισκουνιού μπορούσε να αναμειχθεί και με 0,1 % (v/v) και επομένως να διαχωριστεί καλύτερα η δράση του ελαίου σε σχέση με αυτή του γαλακτωματοποιητή. Επομένως, οι επεμβάσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν:

- Το αιθέριο έλαιο του φλισκουνιού με τις δυο περιεκτικότητες γαλακτωματοποιητή 1% και 0,1% (v/v)
- Το έλαιο του μελισσόχορτου μόνο με την περιεκτικότητα 1% (v/v)
- Εντομοκτόνο
- Απιονισμένο νερό

Σε ορισμένες περιπτώσεις δεν έγιναν επεμβάσεις με το έλαιο του μελισσόχορτου και με το έλαιο του φλισκουνιού περιεκτικότητας γαλακτωματοποιητή 1% (v/v), όπως θα αναλυθεί στις περιπτώσεις των νυμφών του *T. vaporariorum*, της επέμβασης επί του *M. persicae* και της επέμβασης επί του *T. urticae*.

Μετά την παραλαβή τους τα αιθέρια έλαια χρησιμοποιούνταν όσο το δυνατό συντομότερα και διατηρούνταν σε ψυγείο μέχρι τη χρήση τους. Τα γαλακτώματα παρασκευάζονταν συνήθως την ίδια ημέρα ή το πολύ έως 3 ημέρες μετά. Πριν την παρασκευή των γαλακτωμάτων τα φιαλίδια που περιείχαν τα έλαια έβγαιναν από το ψυγείο από όπου ήταν αποθηκευμένα και αφήνονταν σε ηρεμία μέχρι την απόκτηση θερμοκρασίας δωματίου. Ένα ποτήρι ζέσεως πληρωνόταν έως τα 3/4 του ύψους του με νερό και αφού τοποθετούνταν σε θερμαινόμενο μαγνητικό αναδευτήρα εμβαιπίζονταν

εντός του το φιαλίδιο με το γαλακτωματοποιητή το οποίο ήταν στερεωμένο σε μεταλλική βάση. Η θερμοκρασία ρυθμιζόταν στους 85-90 °C και σκοπός της διαδικασίας ήταν η ρευστοποίηση του γαλακτωματοποιητή για τη μετέπειτα ακριβή μέτρηση του όγκου που θα χρησιμοποιούνταν για τα γαλακτώματα. Στη συνέχεια, 100 mL απιονισμένο νερό τοποθετούνταν με τη βοήθεια ογκομετρικού κυλίνδρου εντός καθεμίας εκ τριών κωνικών φιαλών όγκου 250 mL η καθεμία. Η 1<sup>η</sup> κωνική φιάλη ήταν για την παρασκευή του γαλακτώματος του μελισσόχορτου, η 2<sup>η</sup> για το γαλάκτωμα του φλισκουιού και η 3<sup>η</sup> για το διάλυμα γαλακτωματοποιητή και νερού που χρησιμοποιούνταν στα πειράματα ως μάρτυρας. Κατόπιν, με χρήση πιπέτας μεταβλητού όγκου γινόταν προσθήκη του υπολογισθέντος όγκου ελαίου και γαλακτωματοποιητή εντός των κωνικών φιαλών. Οι φιάλες σφραγίζονταν με πώματα από τεφλόν και αναδεύονταν μερικώς με το χέρι. Έπειτα, αφού στερεώνονταν σε μεταλλικές βάσεις, εμβαπτιζόνταν εντός υδατόλουτρου υπερήχων συχνότητας 35 kHz, σε θερμοκρασία 25 °C για 30 λεπτά με στόχο την πλήρη γαλακτωματοποίηση (Εικ. 2.8). Μετά το πέρας των 30 λεπτών οι φιάλες με τα γαλακτώματα αποσύρονταν από το υδατόλουτρο και στη συνέχεια με τη βοήθεια υάλινης χοάνης μεταφέρονταν εντός υάλινων ψεκαστήρων όγκου 100 mL και χρησιμοποιούνταν άμεσα στα πειράματα. Τα φιαλίδια με τα αιθέρια έλαια αφού κλείνονταν καλά και με χρήση λεπτής ταινίας παραφίνης αποθηκεύονταν ξανά εντός ψυγείου ενώ το φιαλίδιο με το Tween 80 κλεινόταν και διατηρούνταν σε συνθήκες δωματίου.



Εικόνα 2.8 Υδατόλουτρο υπερήχων.

## 2.5 Μεθοδολογία Επεμβάσεων Ψεκασμού

Η μεθοδολογία των επεμβάσεων του ψεκασμού που ακολουθήθηκε όπως επίσης και οι συνθήκες διατήρησης των δειγμάτων μετά τις επεμβάσεις ήταν πάντοτε οι ίδιες σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες. Όλοι οι ψεκασμοί λάμβαναν μέρος στην κάτω επιφάνεια των ανεστραμμένων φυλλαρίων τομάτας ή τεμαχίων φύλλου μελιτζάνας με υάλινο ψεκαστήρα χωρητικότητας 100 mL. Πραγματοποιούνταν 3 ψεκασμοί από απόσταση 15 cm. Μετά τον ψεκασμό τα φυλλάκια μεταφέρονταν σε ειδικά διαμορφωμένα πλαστικά τρυβλία Petri (Εικ. 2.9.α) διαμέτρου 9 cm και ύψους 1,5 cm των οποίων η βάση είχε καλυφθεί με στρώση διαβρεγμένου με νερό βάμβακος. Στο καπάκι των τρυβλίων είχε ανοιχθεί οπή διαμέτρου 3 cm με χρήση πυρωμένου σωλήνα η οποία καλυπτόταν με λεπτή μουσελίνα. Σκοπός της ήταν ο επαρκής αερισμός του εσωτερικού τους. Ο μίσχος των φυλλαρίων και οι τομές των τεμαχίων των φύλλων καλύπτονταν επίσης με λωρίδες διαβρεγμένου με νερό βάμβακος με στόχο την καλύτερη διατήρησή τους. Στη συνέχεια, τα τρυβλία αφού κλείνονταν με χρήση ταινίας παραφίνης μεταφέρονταν εντός πλαστικών δίσκων σε θαλάμους σταθερών συνθηκών, θερμοκρασίας  $25\pm 1$  °C, σχετικής υγρασίας  $65\pm 5\%$  και φωτοπεριόδου 16 ώρες φως: 8 ώρες σκοτάδι.

## 2.6 Δοκιμές Δράσης των Αιθέριων Ελαίων επί του *T. vaporariorum*

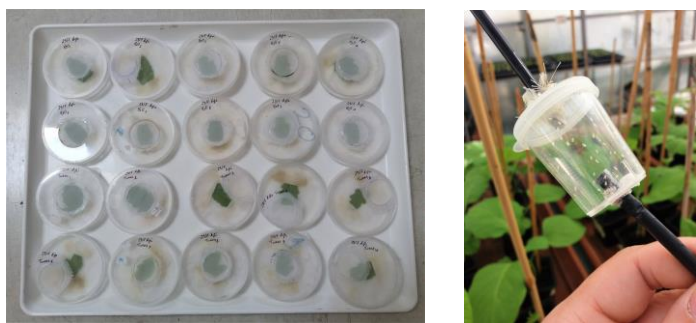
### 2.6.1 Επέμβαση στα ωά

Για τον έλεγχο της δράσης των αιθέριων ελαίων στα ωά του *T. vaporariorum* χρησιμοποιήθηκαν τα ειδικά διαμορφωμένα πλαστικά τρυβλία Petri που αναφέρθηκαν παραπάνω. Η πειραματική διαδικασία για όλα τα στάδια του *T. vaporariorum* διεξήχθη σε φυτά τομάτας (Elrida F1). Για την απόκτηση ωών του εντόμου και χρήση τους στα πειράματα 4 ανεπτυγμένα και εύρωστα φυτά τομάτας ύψους 50 cm και με 15 φυλλάκια το καθένα τοποθετούνταν εντός εντομοστεγούς κλωβού διαστάσεων 62 x 39 x 37 cm. Στη συνέχεια, γινόταν συλλογή μεγάλου αριθμού ενηλίκων (περίπου 150) από την εκτροφή του εντόμου με κατασκευασμένο και ειδικά διαμορφωμένο αναρροφητήρα (Εικ. 2.9.β) και ακολουθούσε μεταφορά τους εντός του κλωβού με τα φυτά. Έπειτα, ο κλωβός

τοποθετούνταν στο εντομοτροφείο του Εργαστηρίου Γεωργικής Ζωολογίας και Εντομολογίας σε συνθήκες θερμοκρασίας  $25\pm 1$  °C, σχετικής υγρασίας  $65\pm 5\%$  και φωτοπεριόδου 16 ώρες φως: 8 ώρες σκοτάδι. Τα ενήλικα άτομα αφήνονταν στο κλωβό για 48 ώρες με σκοπό να ωστοκήσουν και κατόπιν απομακρύνονταν. Με τον τρόπο αυτό ήταν δυνατή η απόκτηση πλήθους ωών συγκεκριμένης ηλικίας στην κάτω επιφάνεια των φύλλων. Κάθε φυλλάριο αποτελούσε ένα ξεχωριστό δείγμα και μία ξεχωριστή επανάληψη της πειραματικής διαδικασίας. Έτσι, αφού γινόταν αποκοπή του από το φυτό ακολουθούσε ψεκασμός της κάτω επιφάνειας όπου βρίσκονταν τα ωά. Αφού αφηνόταν να εξατμιστεί η περίσσεια του γαλακτώματος, το ψεκασμένο φυλλάριο τοποθετούνταν εντός του τρυβλίου και στη συνέχεια στους θαλάμους σταθερών συνθηκών. Η εκκόλαψη των ωών ελέγχονταν κάθε 24 ώρες για 10 ημέρες.

Εφαρμόστηκαν συνολικά από 10 επαναλήψεις για το κάθε γαλάκτωμα αιθέριου ελαίου με συγκέντρωση γαλακτωματοποιητή 1% και 0,1% (v/v), για το αντίστοιχο γαλάκτωμα που στερούνταν αιθέριου ελαίου, για το απιονισμένο νερό και για το εντομοκτόνο που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Το εντομοκτόνο σκεύασμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ADMIRAL 10EC (Pyriproxyfen 10%) καθώς ανέφερε στην ετικέτα την επίδρασή του στην εκκόλαψη των νυμφών από ωά ηλικίας 1-3 ημερών. Η δόση εφαρμογής τηρήθηκε σύμφωνα με την ετικέτα, 5 mL/10 L νερού.

Για τη μέτρηση της αποτελεσματικότητας 10 ημέρες μετά την κάθε επέμβαση εξετάζονταν προσεκτικά μια τυχαία περιοχή διαμέτρου 9 mm από το κάθε φυλλάριο με τη χρήση στερεοσκοπίου και καταμετρούνταν ο αριθμός των ωών από τα οποία είχαν ή δεν είχαν εκκολαφθεί οι νύμφες του εντόμου.



(α)

(β)

**Εικόνα 2.9** α) Ειδικά διαμορφωμένα τρυβλία Petri.

β) Αναρροφητήρας συλλογής ενήλικων ατόμων του *T. vaporariorum*.

### 2.6.2 Επέμβαση στις νύμφες

Για τον έλεγχο της δράσης των αιθέριων ελαίων στις νύμφες του *T. vaporariorum* χρησιμοποιήθηκαν τα πλαστικά τρυβλία Petri που αναφέρθηκαν. Για την απόκτηση νυμφών του εντόμου και χρήση τους στα πειράματα τηρήθηκε διαδικασία όμοια με αυτήν των ωών.

Ως στάδιο επέμβασης επιλέχθηκε το στάδιο της 3<sup>ης</sup> νυμφικής ηλικίας. Όπως και στην περίπτωση των ωών κάθε προσβεβλημένο φυλλάριο με νύμφες 3<sup>ης</sup> ηλικίας αποτελούσε ένα ξεχωριστό δείγμα και επανάληψη. Έτσι, μετά την αποκοπή του φυλλαρίου ακολουθούσε ο ψεκασμός του όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Τα τρυβλία ελέγχονταν κάθε 48 ώρες για διάστημα 14 ημερών μετά την επέμβαση και όσα ενήλικα είχαν εμφανιστεί αφαιρούνταν από το κάθε τρυβλίο. Κατόπιν, έγινε ακριβής καταμέτρηση από όλο το φυλλάριο με τη βοήθεια στερεοσκοπίου του αριθμού των νυμφών τελευταίας ηλικίας (pupa) από τις οποίες είχαν είτε εμφανιστεί ενήλικα είτε όχι. Στην πρώτη περίπτωση οι νύμφες δεν είχαν επηρεαστεί ενώ στην δεύτερη είχαν επηρεαστεί από την επέμβαση.

Έγινε εφαρμογή 10 επαναλήψεων με το γαλάκτωμα που περιείχε το αιθέριο έλαιο του φλισκουνιού με περιεκτικότητα γαλακτωματοποιητή 0,1% (v/v), με το γαλάκτωμα που στερούνταν ελαίου και για τους μάρτυρες, απιονισμένο νερό και εντομοκτόνο (Pyriproxyfen 10%, όπως αναφέρθηκε στην περίπτωση των ωών και στην ίδια δόση εφαρμογής καθώς αναφερόταν στην ετικέτα ότι διαθέτει ιδιότητες αναστολής της μεταμόρφωσης των νυμφών).

### 2.6.3 Έλεγχος απωθητικότητας των ενηλίκων ατόμων

Τα γαλακτώματα των αιθέριων ελαίων δοκιμάσθηκαν για την απωθητική τους δράση μέσω της μέτρησης του αριθμού των ωών που εναποθέτουν τα θηλυκά του *T. vaporariorum* σε ψεκασμένα και απέκαστα φυτά τομάτας.

Για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν ειδικά κατασκευασμένοι πλαστικοί κλωβοί κυλινδρικού σχήματος, διαμέτρου 30 cm και ύψους 33 cm. Η βάση των κλωβών ήταν διαμορφωμένη με φελιζόλ πάχους 3 cm και καλυμμένη με χαρτόνι καστανού

χρώματος ενώ το τοίχωμά τους αποτελούνταν από διαφανές πλαστικό φύλλο PCV πάχους 0,4 mm. Ο κάθε κλωβός έφερε πλευρικός από δυο τετράγωνα ανοίγματα διαστάσεων 16 x 16 cm τα οποία καλύπτονταν με λεπτή μουσελίνα. Με μουσελίνα καλυπτόταν επίσης και η οροφή τους. Τα ανοίγματα μαζί με την οροφή βοηθούσαν στον καλύτερο αερισμό του εσωτερικού των κλωβών.

Στη διαδικασία χρησιμοποιούνταν φυτά τομάτας με 10 συνολικά φύλλα το καθένα. Εντός κάθε κλωβού τοποθετούνταν δύο φυτά από τα οποία το ένα ήταν ψεκασμένο με απιονισμένο νερό (μάρτυρας) και το άλλο με ένα από τα γαλακτώματα ή το εντομοκτόνο (Εικ. 2.10). Ο ψεκασμός λάμβανε χώρα από την άνω και την κάτω επιφάνεια των φύλλων μέχρι διαβροχής ολόκληρης της φυλλικής επιφάνειας. Τα φυτά στη συνέχεια αφήνονταν να στεγνώσουν σε συνθήκες δωματίου για διάστημα 45-60 λεπτών. Κατόπιν, με έναν αναρροφητήρα γινόταν συλλογή από την εκτροφή με πολύ προσοχή και τοποθέτηση 30 ενηλίκων ατόμων σε κάθε κλωβό. Μετέπειτα, οι κλωβοί μεταφέρονταν στους θαλάμους ελεγχόμενων σταθερών συνθηκών και αφήνονταν εκεί για 48 ώρες. Μετά το πέρας των 48 ωρών τα φυτά αφαιρούνταν από τους κλωβούς και γινόταν προσεκτική καταμέτρηση με τη βοήθεια στερεοσκοπίου του αριθμού των ωών που είχαν εναποτεθεί στα φύλλα του κάθε φυτού.

Εφαρμόστηκαν συνολικά από εννέα επαναλήψεις για το κάθε γαλάκτωμα αιθέριου ελαίου με περιεκτικότητα γαλακτωματοποιητή 1% (v/v), για το γαλάκτωμα που στερούνταν ελαίου και για τους μάρτυρες, απιονισμένο νερό και εντομοκτόνο. Ως εντομοκτόνο (αρνητικός μάρτυρας) εφαρμόστηκε το ADMIRAL 10EC (Pyriproxyfen 10%) στην ίδια δόση όπως και προηγουμένως καθώς στην ετικέτα αναφερόταν ότι διαθέτει στείρωτικές ιδιότητες στα θηλυκά με αποτέλεσμα τη μειωμένη ωοτοκία τους.



**Εικόνα 2.10** Ειδικά κατασκευασμένοι πλαστικοί κλωβοί για τον έλεγχο της απωθητικότητας των ενηλίκων ατόμων του *T. vaporariorum*.

## 2.7 Δοκιμές Δράσης των Αιθέριων Ελαίων επί του *T. absoluta*

### 2.7.1 Επέμβαση στα ωά

Τα γαλακτώματα των αιθέριων ελαίων του *M. officinalis* και του *M. pulegium* δοκιμάστηκαν για την επίδρασή τους στην εκκόλαψη των προνυμφών του *T. absoluta*. Για την παραλαβή συγκεντρωμένης ηλικίας και μεγάλου αριθμού ωών του *T. absoluta* ακολουθούνταν συγκεκριμένη διαδικασία. Όταν το μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού του εντόμου βρισκόταν στο στάδιο της νύμφωσης η εκτροφή του παρακολουθούνταν επισταμένως μέχρι την έξοδο των ενηλίκων ατόμων. Με την εμφάνιση των πρώτων ακμαίων γινόταν εισαγωγή στην εκτροφή 3 ανεπτυγμένων και υγιών φυτών τομάτας. Αφού πραγματοποιούνταν η σύζευξη των εντόμων εντός των επομένων 2 ημερών τα θηλυκά εναπόθεταν τα ωά τους πάνω στα φυτά, στελέχη και φύλλα. Ένα από τα τρία φυτά λαμβάνονταν για την παραλαβή ωών (ηλικίας 1 ημέρας) (Εικ. 2.11) ενώ τα άλλα δυο αφήνονταν για τη διατήρηση της εκτροφής.

Στη συνέχεια, με τη βοήθεια πινέλου και χρήση στερεοσκοπίου γινόταν μεταφορά 5 ωών του εντόμου στην ανεστραμμένη κάτω επιφάνεια φυλλαρίου τομάτας και ακολουθούσε ψεκασμός τους. Κατόπιν, το κάθε φυλλάριο με τη βοήθεια λαβίδας μεταφερόταν στο τρυβλίο Petri με βάση από διαβρεγμένο με νερό βαμβάκι. Αφού καλυπτόταν και ο μίσχος του φύλλου με βρεγμένο βαμβάκι τα τρυβλία κλείνονταν με παραφίλμ και μεταφέρονταν εντός πλαστικών δίσκων στους θαλάμους σταθερών συνθηκών, θερμοκρασίας  $25\pm 1^\circ\text{C}$ , σχετικής υγρασίας  $65\pm 5\%$  και φωτοπεριόδου 16 ώρες φως: 8 ώρες σκοτάδι. Η εκκολαπτικότητα των ωών ή κάποια άλλη εμφανή διαφορά τους σε σύγκριση με τα ωά του μάρτυρα (απιονισμένο νερό) παρακολουθούνταν κάθε 24 ώρες για 7 ημέρες.

Συνολικά έγιναν από 15 επαναλήψεις για τα γαλακτώματα των αιθέριων ελαίων με συγκέντρωση γαλακτωματοποιητή 1% και 0,1% (v/v), για το αντίστοιχο γαλάκτωμα που στερούνταν ελαίου, και τους μάρτυρες, απιονισμένο νερό και εντομοκτόνο. Το εντομοκτόνο σκεύασμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Laser 480SC (spinosad 48%) στη μέγιστη συνιστώμενη δόση για το *T. absoluta*, 25 mL/100 L νερού.





**Εικόνα 2.11** Φυλλάριο τομάτας με ωά του *T. absoluta*.

### 2.7.2 Επέμβαση στις προνύμφες

Τα γαλακτώματα των αιθέριων ελαίων δοκιμάστηκαν στις προνύμφες του *T. absoluta*. Ακολουθήθηκαν δυο διαδικασίες επέμβασης: άμεση και υπολειμματική. Στην πρώτη εφαρμόστηκε ψεκάσμος των προνυμφών με τα γαλακτώματα ενώ κατά τη δεύτερη οι προνύμφες τοποθετούνταν σε φύλλα τομάτας τα οποία είχαν προηγουμένως ψεκάσει και στεγνώσει.

Σε κάθε φυλλάριο τοποθετήθηκαν από 5 ωά και τα τρυβλία αφού κλείστηκαν με λεπτή ταινία παραφίνης μεταφέρθηκαν σε σταθερές συνθήκες. Σύμφωνα με τους Krechmer and Foerster (2015) η διάρκεια της προνυμφικής ηλικίας του *T. absoluta* στους 25 °C είναι 11±0,1 ημέρες. Μετά την εκκόλαψη των ωών στα τρυβλία οι προνύμφες αφέθηκαν να τραφούν από το φύλλο για τρεις ημέρες και την τέταρτη ημέρα λήφθηκαν για τη χρήση τους στις δοκιμές. Δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή ούτως ώστε όλες οι προνύμφες που χρησιμοποιήθηκαν να είναι περίπου ίδιου μεγέθους.

Για τη διαδικασία επαφής τους με τα γαλακτώματα 5 προνύμφες αφαιρούνταν από τις στοές των φύλλων (Εικ. 2.12.α) με πολύ προσοχή για να μη τραυματισθούν και μεταφέρονταν με τη βοήθεια πινέλου σε ένα άλλο φύλλο τομάτας (Εικ. 2.12.β). Στη συνέχεια, ακολουθούσε ψεκάσμος τους και μεταφορά του φύλλου με μια λαβίδα εντός άλλων ήδη προετοιμασμένων τρυβλίων.

Για τη δεύτερη διαδικασία, νεαρά φυτά τομάτας ύψους 30 cm τα οποία αποτελούνταν από 10 φυλλάρια, αφού ψεκάζονταν αφήνονταν να στεγνώσουν σε

συνθήκες δωματίου. Κατόπιν, τα φυλλάρια αποκόπτονταν, μεταφέρονταν εντός των τρυβλίων και σε κάθε ένα τοποθετούνταν 4 προνύμφες του εντόμου. Τα τρυβλία κλείνονταν με ταινία παραφίνης και όλα μαζί και από τις δυο διαδικασίες μεταφέρονταν εντός πλαστικών δίσκων σε σταθερές συνθήκες. Η επιβίωση των προνυμφών εξετάζονταν κάθε 24 ώρες για 7 ημέρες και ο υπολογισμός της αποτελεσματικότητας των ελαίων έγινε σύμφωνα με τον συνολικό αριθμό των νεκρών προνυμφών που βρέθηκαν ανά εφαρμογή. Η αναγνώριση των νεκρών προνυμφών γινόταν εύκολα καθώς είτε ανευρίσκονταν ακίνητες επάνω στο φύλλο είτε μετά από προσεκτικό άνοιγμα των στοών ανευρίσκονταν εντός τους, πάλι σε ακινησία. Με το πέρασμα των ημερών το σώμα των προνυμφών αφυδατωνόταν πλήρως.

Πραγματοποιήθηκαν από 10 επαναλήψεις για τη δοκιμή άμεσης δράσης των ελαίων με τις προνύμφες και από 8 για τη δοκιμή επαφής τους με προηγουμένως ψεκασμένα φύλλα και μετέπειτα βρώση τους. Γενικά εφαρμόστηκαν τα γαλακτώματα από τα δύο έλαια, το γαλάκτωμα που στερούνταν ελαίου, απιονισμένο νερό και εντομοκτόνο. Το εντομοκτόνο σκεύασμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Laser 480SC (spinosad 48%) όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.



**Εικόνα 2.12 α)** Φύλλο τομάτας με προνύμφες του *T. absoluta*.

**β)** Προνύμφες του *T. absoluta* πριν το ψεκασμό τους με τα γαλακτώματα.

## 2.8 Δοκιμές Δράσης των Αιθέριων Ελαίων επί του *M. persicae*

### 2.8.1 Συγχρονισμός ενηλίκων ατόμων *M. persicae*

Οι δοκιμές επίδρασης του αιθέριου ελαίου του *M. pulegium* επί του *M. persicae* διεξήχθησαν όλες σε φυτά μελιτζάνας (Bonica F1). Τα ενήλικα άτομα που χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα ήταν όλα ηλικίας μίας ημέρας και για την παραλαβή τους ακολουθήθηκε συγκεκριμένη μεθοδολογία, αυτή του συγχρονισμού.

Για τη διαδικασία συγχρονισμού χρησιμοποιήθηκαν 4 πλαστικά τρυβλία Petri διαμέτρου 15 cm και ύψους 1,5 cm τα οποία είχαν στην επάνω επιφάνειά τους 2 οπές διαμέτρου 3 cm οι οποίες καλύπτονταν με λεπτή μουσελίνα και χρησίμευαν στον επαρκή αερισμό του εσωτερικού τους. Η βάση τους ήταν καλυμμένη με μια στρώση διαβρεγμένου με νερό βάμβακος και πάνω της τοποθετούνταν ανεστραμμένο ένα φύλλο μελιτζάνας από φυτό ύψους 40 cm με 6 συνολικά φύλλα. Ο μίσχος του φύλλου καλυπτόταν επίσης με βρεγμένο βαμβάκι για καλύτερη διατήρηση.

Από φυτά μελιτζάνας προσβεβλημένα από το *M. persicae* τα οποία προέρχονταν από την εκτροφή του εντόμου γινόταν μεταφορά με τη βοήθεια πινέλου και χρήση στερεοσκοπίου 20 ενηλίκων άπτερων ατόμων σε κάθε τρυβλίο. Ακολουθούσε κλείσιμο τους με ταινία παραφίνης και μεταφορά τους στο εντομοτροφείο. Μετά το πέρασμα 24 ωρών γινόταν απομάκρυνση όλων των ενηλίκων ατόμων και έμεναν μόνο οι νύμφες 1<sup>ης</sup> ηλικίας. Τα τρυβλία κλείνονταν και πάλι και οι νύμφες παρακολουθούνταν μέχρι την 1<sup>η</sup> ημέρα της ενηλικίωσής τους οπότε και λαμβάνονταν για τα πειράματα. Με αυτό τον τρόπο γινόταν παραλαβή μεγάλου αριθμού και ίδιας ηλικίας (1 ημέρας) ενηλίκων του *M. persicae*.

### 2.8.2 Επέμβαση στα ενήλικα άτομα

Η δοκιμή επίδρασης του αιθέριου ελαίου του φλισκουνιού στο *M. persicae* έγινε σε ενήλικα άπτερα άτομα μίας ημέρας τα οποία παραλήφθηκαν με τη διαδικασία του συγχρονισμού όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Φύλλα από ανεπτυγμένα φυτά μελιτζάνας κόβονταν σε τεμάχια μήκους 8 cm. Εν συνεχεία, με τη βοήθεια πινέλου και με χρήση στερεοσκοπίου γινόταν μεταφορά 4 ατόμων *M. persicae* από τα τρυβλία του συγχρονισμού στο κατάλληλα διαμορφωμένο και ανεστραμμένο τεμάχιο φύλλου. Ακολουθούσε ο ψεκασμός και στη συνέχεια τα τρυβλία κλείνονταν και μεταφέρονταν εντός του εντομοτροφείου. Η επιβίωση και ο αριθμός των απογόνων του *M. persicae* καταγράφονταν κάθε 24 ώρες για 4 ημέρες. Τα νεκρά ενήλικα άτομα εντοπίζονταν εύκολα καθώς βρίσκονταν σε ακινησία ενώ το σώμα τους αποκτούσε στην αρχή χρώμα σκούρο καστανό και στη συνέχεια μαύρο.

Εφαρμόστηκαν 6 επαναλήψεις για το γαλάκτωμα με το αιθέριο έλαιο του φλισκουινίου με περιεκτικότητα γαλακτωματοποιητή 0,1% (v/v), για το γαλάκτωμα που στερούνταν ελαίου και από 6 επαναλήψεις για τους μάρτυρες, απιονισμένο νερό και εντομοκτόνο. Ως εντομοκτόνο σκεύασμα χρησιμοποιήθηκε το decis 2,5 EC (deltamethrin 2,5%) στη συνιστώμενη δόση για το *M. persicae* στη μελιτζάνα, 50 mL/100 L νερού.

## 2.9 Δοκιμές Δράσης των Αιθέριων Ελαίων επί του *T. urticae*

### 2.9.1 Συγχρονισμός ενηλίκων ατόμων *T. urticae*

Ο έλεγχος της επίδρασης του ελαίου του *M. pulegium* επί του *T. urticae* διεξήχθη σε ενήλικα θηλυκά άτομα μίας ημέρας και επί των ωών τους, μίας ημέρας επίσης. Για την παραλαβή τους ακολουθήθηκε διαδικασία όμοια με αυτήν που περιγράφεται στην παράγραφο 2.8.1.

Χρησιμοποιήθηκαν 4 τρυβλία ιδίων διαστάσεων και σύνθεσης τα οποία περιείχαν 4 φυλλάρια τομάτας. Σε κάθε τρυβλίο γινόταν μεταφορά 30 ενηλίκων θηλυκών ατόμων από την εκτροφή του ακάρεως και μετά από 24 ώρες ακολουθούσε η απομάκρυνσή τους. Με το τρόπο αυτό ήταν δυνατή η παραλαβή ωών μίας ημέρας τα οποία αφού εκκολάπτονταν παρακολουθούνταν ανά 24 ώρες μέχρι την 1<sup>η</sup> ημέρα της ενηλικίωσης των θηλυκών οπότε και λαμβάνονταν για το πείραμα. Πραγματοποιήθηκαν συνολικά 2 συντονισμοί, ένας για την πειραματική διαδικασία επέμβασης στα ενήλικα θηλυκά άτομα και ένας για τη διαδικασία επέμβασης στα ωά.

### 2.9.2 Επέμβαση στα ωά

Ελέγχθηκε η επίδραση του αιθέριου ελαίου του *M. pulegium* επί των ωών μίας ημέρας του *T. urticae*. Στην ανεστραμμένη επιφάνεια φυλλαρίου τομάτας γινόταν μεταφορά με τη βοήθεια πινέλου και χρήση στερεοσκοπίου 6 ωών και στη συνέχεια ακολουθούσε ψεκασμός τους με τα γαλακτώματα. Στη συνέχεια το φυλλάριο μεταφερόταν στο τρυβλίο Petri και έπειτα στους θαλάμους σταθερών συνθηκών. Η εκκόλαψη των ωών όπως επίσης και οποιαδήποτε διαφορά στην εικόνα τους σε σύγκριση με τα ωά του μάρτυρα (απιονισμένο νερό) παρακολουθούνταν κάθε 24 ώρες για 7 ημέρες.

Έγινε εφαρμογή 8 επαναλήψεων με το γαλάκτωμα του αιθέριου ελαίου του φλισκουνιού περιεκτικότητας γαλακτωματοποιητή 0,1% και 5 για 1% (v/v), 8 για το γαλάκτωμα που στερούνταν ελαίου και από 8 επαναλήψεις για τους μάρτυρες, απιονισμένο νερό και εντομοκτόνο-ακαρεοκτόνο. Το σκεύασμα που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ήταν το Oberon 240 SC (spiromesifen 24%) στη μέγιστη συνιστώμενη από την ετικέτα δόση για το *T. urticae* στην τομάτα, 60 mL/100 L νερού.

### 2.9.3 Επέμβαση στα ενήλικα άτομα

Η πειραματική διαδικασία επέμβασης των ενηλίκων ατόμων του *T. urticae* με το αιθέριο έλαιο του φλισκουνιού στόχευε σε παρατηρήσεις όσον αφορά την επίδραση του ελαίου στην επιβίωσή τους, στο αναπαραγωγικό τους δυναμικό και στην εκκολαπτικότητα των ωών τους.

Η εφαρμογή έγινε σε ενήλικα θηλυκά άτομα μίας ημέρας τα οποία ελήφθησαν με τη μεθοδολογία του συγχρονισμού. Στην ανεστραμμένη επιφάνεια φυλλαρίου τομάτας τοποθετούνταν 5 άτομα τα οποία ψεκάζονταν με τα γαλακτώματα. Ακολουθούσε μεταφορά του φύλλου σε τρυβλίο και τοποθέτηση στους θαλάμους σταθερών συνθηκών.

Η επιβίωση των ενηλίκων ατόμων και ο αριθμός των ωών που εναπόθεταν καταμετρούνταν κάθε 24 ώρες για 5 ημέρες. Εξαιτίας του μικρού μεγέθους των ωών και του υαλώδους χρώματός τους γινόταν πολύ προσεκτική καταμέτρηση και ταυτόχρονα απομάκρυνσή τους από τα δείγματα με τη χρήση πινέλου για αποφυγή καταγραφής λανθασμένου αριθμού ωών την επόμενη ημέρα. Από τα ωά της κάθε ημέρας από κάθε

επέμβαση επιλέγονταν 30, τα οποία μοιράζονταν ανά 6 σε 5 τρυβλία. Στόχος ήταν όπως προαναφέρθηκε να διαπιστωθεί η τυχόν επίδραση των γαλακτωμάτων στην εκκολαπτικότητα ανά ημέρα μετά τον ψεκασμό. Η εκκολαπτικότητα ελέγχονταν κάθε 24 ώρες για 10 ημέρες. Τα ενήλικα άτομα τα οποία είχαν νεκρωθεί διακρίνονταν εύκολα καθώς βρίσκονταν σε πλήρη ακινησία ακόμη και όταν ενοχλούνταν ισχυρώς με την άκρη ενός πινέλου.

Έγιναν 8 επαναλήψεις με το γαλάκτωμα αιθέριου ελαίου περιεκτικότητας γαλακτωματοποιητή 0,1% και 10 για 1% (v/v), 8 με το γαλάκτωμα που στερούνταν ελαίου και από 8 επαναλήψεις για τους μάρτυρες, απιονισμένο νερό και εντομοκτόνο-ακαρεοκτόνο. Ως ακαρεοκτόνο σκεύασμα χρησιμοποιήθηκε το Oberon 240 SC (spiromesifen 24%) όπως αναφέρθηκε.

## 2.10 Παρασκευή Διαλύματος Εγκλεισμένου Αιθέριου Ελαίου

### Μεθοδολογία παρασκευής

Μετά τον εγκλεισμό του αιθέριου ελαίου του *Mentha pulegium* σε μικροσωματίδια ζυμομύκητα όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.3 ακολούθησε η παρασκευή του προς ψεκασμό διαλύματος. Το υλικό μικροκάψουλας με το εγκλεισμένο έλαιο (Εικ. 2.13.α) υπέστη αραίωση σε απιονισμένο νερό και χρησιμοποιήθηκε άμεσα για την πειραματική διαδικασία.

Γνωρίζοντας την τελική συγκέντρωση του εγκλεισμένου αιθέριου ελαίου η οποία ήταν 34% (w/w) έγινε υπολογισμός της μάζας του υλικού που έπρεπε να ζυγισθεί και του όγκου του νερού που έπρεπε να αραιωθεί ούτως ώστε το τελικό προς ψεκασμό διάλυμα να περιείχε 0,1% (v/v) αιθέριο έλαιο η οποία ήταν η περιεκτικότητα με την οποία έγιναν όλα τα πειράματα που περιγράφονται στις προηγούμενες παραγράφους.

Έτσι, το δείγμα του υλικού αρχικά λειοτριβήθηκε προσεκτικά με τη βοήθεια πορσελάνινου γουδιού και εν συνεχεία ζυγίστηκε με ηλεκτρονικό ζυγό υψηλής ακριβείας. Σε κωνική φιάλη όγκου 100 mL μεταφέρθηκαν με τη βοήθεια ογκομετρικών κυλίνδρων ο υπολογισμένος όγκος του απιονισμένου νερού και κατόπιν προστέθηκε το υλικό

μικροκάψουλας. Η κωνική φιάλη αφού κλείστηκε με πώμα, αναδεύτηκε για 2 λεπτά με το χέρι. Στη συνέχεια στερεώθηκε σε μεταλλική βάση και εμβαπτίστηκε εντός υδατόλουτρου υπερήχων συχνότητας 35 kHz, σε θερμοκρασία 25 °C για 45 λεπτά με στόχο την πλήρη διάλυση του υλικού στο νερό.

Μετά το πέρασμα των 45 λεπτών το διάλυμα μεταφέρθηκε με τη βοήθεια υάλινης χοάνης εντός υάλινου ψεκαστήρα όγκου 100 mL για άμεση χρήση στα πειράματα (Εικ. 2.13.β).



(α)

(β)

**Εικόνα 2.13** α) Υλικό μικροκάψουλας με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο φλισκουνιού.

β) Διάλυμα υλικού μικροκάψουλας-απιονισμένου νερού έτοιμο προς χρήση στα πειράματα.

## 2.11 Δοκιμή Δράσης του Εγκλεισμένου Αιθέριου Ελαίου

### Διαδικασία επέμβασης

Η πειραματική διαδικασία δοκιμής του εγκλεισμένου αιθέριου ελαίου του *M. pulegium* σε μικροσωματίδια ζυμομύκητα είχε ως σκοπό τη βελτίωση της υπολειμματικής διάρκειας του ελαίου. Οι επεμβάσεις διεξήχθησαν επί του *Myzus persicae* σε φυτά μελιτζάνας Bonica F1. Όλη η διαδικασία έγινε σε πλαστικά τρυβλία Petri, διαμέτρου 9 cm και ύψους 1,5 cm.

Χρησιμοποιήθηκε γαλάκτωμα αιθέριου ελαίου του φλισκουνιού το οποίο παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφεται στη παράγραφο 2.4, διάλυμα μικροκαψουλών με εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο φλισκουνιού το οποίο παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη μεθοδολογία της παραπάνω παραγράφου, απιονισμένο

νερό και διάλυμα εντομοκτόνου (decis 2,5 EC (deltamethrin 2,5%) στη συνιστώμενη δόση για το *M. persicae* στη μελιτζάνα, 50 mL/100 L νερού).

Οι επεμβάσεις αφορούσαν σε ενήλικα θηλυκά άπτερα άτομα *M. persicae* μίας ημέρας τα οποία παραλήφθηκαν με τη μεθοδολογία του συγχρονισμού όπως αυτή περιγράφεται στην παράγραφο 2.8.1. Για την ολοκλήρωση του πειράματος χρειάστηκαν συνολικά 5 συγχρονισμοί του εντόμου οι οποίοι τοποθετούνταν ένας ανά ημέρα για 5 συνολικά ημέρες. Στόχος ήταν όπως θα περιγραφεί παρακάτω η διάθεση κάθε ημέρα ενηλίκων θηλυκών άπτερων ατόμων *M. persicae* μίας ημέρας κατά τη μετέπειτα πειραματική διαδικασία.

Ακολουθήθηκαν δυο διαδικασίες επέμβασης. Κατά την πρώτη εξετάστηκε η υπολειμματική δράση και διάρκεια του διαλύματος του εγκλεισμένου αιθέριου ελαίου ενώ κατά τη δεύτερη εξετάστηκε η απευθείας επίδραση του διαλύματος όταν έρχεται σε επαφή με το έντομο.

Έτσι, για την πρώτη διαδικασία, 3 ανεπτυγμένα και εύρωστα φυτά μελιτζάνας ψεκάστηκαν με κάθε ένα από τα διαλύματα, το γαλάκτωμα αιθέριου ελαίου και το απιονισμένο νερό, δηλαδή 12 φυτά συνολικά. Ο ψεκασμός πραγματοποιήθηκε με υάλινο ψεκαστήρα όγκου 100 mL και από τις δυο επιφάνειες των φύλλων μέχρι την πλήρη διαβροχή τους. Εν συνεχεία, τα φυτά κάθε επέμβασης μεταφέρονταν εντός κλωβών διαστάσεων 62 x 39 x 37 cm όπου αφήνονταν να στεγνώσουν σε συνθήκες δωματίου (Εικ. 2.14). Αφού είχαν στεγνώσει πλήρως, επιλέγονταν ένα φύλλο μελιτζάνας από κάθε κλωβό το οποίο αφού κόπτονταν σε 5 τεμάχια, το κάθε ένα τοποθετούνταν εντός τρυβλίου με βάση από διαβρεγμένο με νερό βαμβάκι. Κάθε τομή των τεμαχίων καλύπτονταν επίσης με λωρίδες βρεγμένου βαμβακιού για την καλύτερη διατήρησή τους. Κατόπιν, με τη βοήθεια πινέλου και με χρήση στερεοσκοπίου γινόταν μεταφορά 4 ενηλίκων ατόμων από το τρυβλίο του συγχρονισμού για την ημέρα επέμβασης στο τρυβλίο με το τεμάχιο φύλλου (Εικ. 2.15). Τα τρυβλία αφού κλείνονταν και με ταινία παραφίνης μεταφέρονταν στο εντομοτροφείο, θερμοκρασίας  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , σχετικής υγρασίας  $40\pm 5\%$  και φωτοπεριόδου 16 ώρες φως: 8 ώρες σκοτάδι. Οι κλωβοί με τα φυτά διατηρούνταν σε συνθήκες δωματίου.

Μετά το πέρασμα 24 ωρών, από τα ψεκασμένα φυτά επιλέγονταν πάλι ένα φύλλο από κάθε κλωβό το οποίο αφού κόπτονταν και μοιραζόταν σε 5 τρυβλία όπως



προηγουμένως, τοποθετούνταν πάνω τους 4 ενήλικα άτομα από το τρυβλίο του δεύτερου συγχρονισμό που περιείχε θηλυκά άτομα *M. persicae* μίας ημέρας.

Η συγκεκριμένη διαδικασία εκτελέστηκε 4 φορές, την ημέρα της επέμβασης, 1 ημέρα μετά την επέμβαση, 2 ημέρες μετά την επέμβαση και 3 ημέρες μετά την επέμβαση. Συνοπτικά, στόχος ήταν να διαπιστωθεί αν υπήρχε κάποια υπολειμματική δράση του εγκλεισμένου αιθέριου ελαίου την ημέρα της επέμβασης, καθώς επίσης και 1, 2 και 3 ημέρες μετά την επέμβαση. Μετά το πέρασμα 24 ωρών και για συνολικά 4 ημέρες σε κάθε περίπτωση ελεγχόταν η επιβίωση των ατόμων και ο αριθμός των απογόνων τους.

Για την περάτωση της δεύτερης διαδικασίας και του ελέγχου της δράσης του εγκλεισμένου αιθέριου ελαίου στο *M. persicae* με άμεση έκθεση (ψεκασμός και των ατόμων της αφίδας) γινόταν ψεκασμός των ατόμων από απόσταση 15 cm με το διάλυμα μικροκαψουλών, μεταφορά του φύλλου στα τρυβλία με βάση από διαβρεγμένο βαμβάκι και στη συνέχεια μεταφορά τους στο εντομοτροφείο. Η επιβίωση και ο αριθμός των απογόνων του *M. persicae* καταγράφονταν κάθε 24 ώρες για 4 ημέρες μετά την επέμβαση.



**Εικόνα 2.14** Ψεκασμένα φυτά μελιτζάνας με απιονισμένο νερό, γαλάκτωμα αιθέριου ελαίου, διάλυμα εγκλεισμένου αιθέριου ελαίου και διάλυμα εντομοκτόνου.



**Εικόνα 2.15** Ψεκασμένο τεμάχιο φύλλου μελιτζάνας με 4 ενήλικα θηλυκά άπτερα άτομα *M. persicae* (ηλικίας 1 ημέρας) σε κατάλληλα διαμορφωμένο τρυβλίο Petri.

## 2.12 Στατιστική Ανάλυση των Αποτελεσμάτων

Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με την μέθοδο της ανάλυσης διασποράς (ANOVA) και οι μέσοι διαχωρίστηκαν με την δοκιμασία Tukey-Kramer HSD test. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το στατιστικό πακέτο JMP10.0.0 (SAS Institute, 2012).

Πίνακας 2.1 Συνοπτικός πίνακας επεμβάσεων

Επιβλαβές Έντομο / Άκαρι	Στάδιο Επέμβασης	Αιθέριο Έλαιο	Περιεκτικότητα Γαλακτωματοποιητή
<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Ωά	<i>Melissa officinalis</i>	1% (v/v)
		<i>Mentha pulegium</i>	1% (v/v)
			0,1% (v/v)
	Νύμφες	<i>Mentha pulegium</i>	0,1% (v/v)
	Ενήλικα	<i>Melissa officinalis</i>	1% (v/v)
		<i>Mentha pulegium</i>	
<i>Tuta absoluta</i>	Ωά	<i>Melissa officinalis</i>	1% (v/v)
		<i>Mentha pulegium</i>	1% (v/v)
			0,1% (v/v)
	Ψεκασμένες προνύμφες	<i>Melissa officinalis</i>	1% (v/v)
		<i>Mentha pulegium</i>	1% (v/v)
			0,1% (v/v)
	Αψέκαστες προνύμφες	<i>Melissa officinalis</i>	1% (v/v)
		<i>Mentha pulegium</i>	
<i>Myzus persicae</i>	Ενήλικα	<i>Mentha pulegium</i>	0,1% (v/v)
	Αναπαραγωγικό δυναμικό		
<i>Tetranychus urticae</i>	Ωά	<i>Mentha pulegium</i>	1% (v/v)
			0,1% (v/v)
	Ενήλικα		1% (v/v)
			0,1% (v/v)
			1% (v/v)
	Αναπαραγωγικό δυναμικό		0,1% (v/v)
	Εκκολαπτικότητα ωών		0,1% (v/v)

# Κεφάλαιο 3

## Αποτελέσματα

### 3.1 Απόδοση Αρωματικών Φυτών σε Αιθέριο Έλαιο

#### 3.1.1 Απόδοση του *M. officinalis*

Για την παραλαβή του συνολικού όγκου του αιθέριου ελαίου του *M. officinalis* πραγματοποιήθηκαν 5 αποστάξεις με την τεχνική της υδροαπόσταξης χρησιμοποιώντας τα φύλλα του φυτού. Η απόδοση του αιθέριου ελαίου εκφράζεται σε mL ανά 100 g ξηρής φυτικής μάζας. Έτσι, η απόδοση του μελισσόχορτου ήταν κατά μέσο όρο (κ.μ.ο.) 0,2% (v/w).

#### 3.1.2 Απόδοση του *M. pulegium*

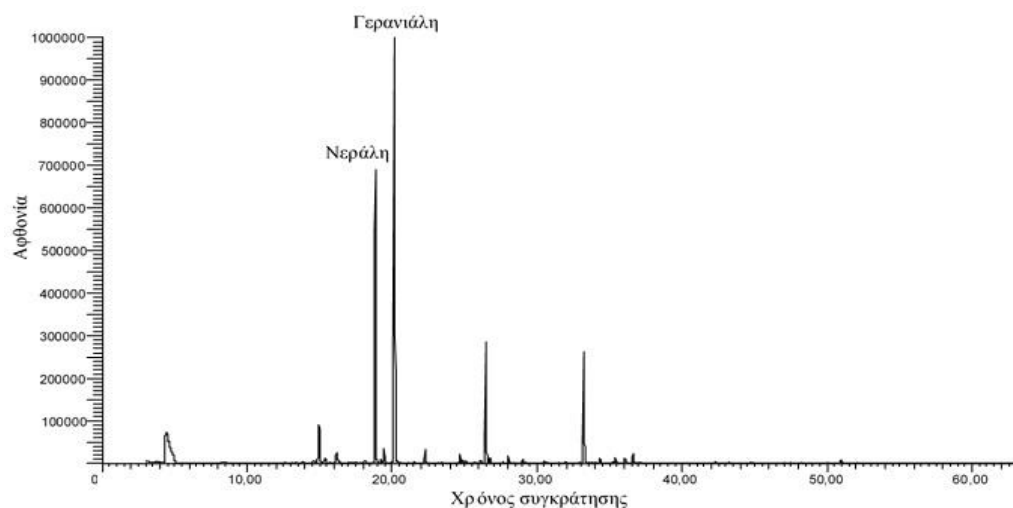
Η απόδοση του αιθέριου ελαίου του φλισκουνιού (φύλλα και άνθη, από συνολικά 5 αποστάξεις) ήταν κ.μ.ο. 4% (v/w).

## 3.2 Χημική Σύσταση Αιθέριων Ελαίων

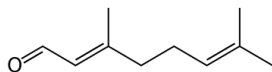
### 3.2.1 Χημική σύσταση αιθέριου ελαίου του *M. officinalis*

Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών του αιθέριου ελαίου του *M. officinalis* πραγματοποιήθηκε σε σύστημα αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών όπως αυτός περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.3.

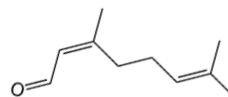
Το αέριο χρωματογράφημα του αιθέριου ελαίου που παρελήφθη (Εικ. 3.1) έδειξε 2 συστατικά ως βασικά τα οποία βρίσκονταν σε ποσοστό μεγαλύτερο του 10%. Αυτά ήταν η γερανιάλη (Εικ. 3.2) η οποία μετείχε σε ποσοστό 38% επί της ολικής σύστασης του ελαίου και η νεράλη (Εικ. 3.3) η οποία μετείχε σε ποσοστό 26,88%. Σε μικρότερα ποσοστά συμμετείχαν το trans-καρνοφυλλένιο (9,05%), το οξείδιο καρνοφυλλενίου (8,59%) και η κιτρονελλάλη (5,33%). Η πλειονότητα των συστατικών ήταν οξυγονούχες ενώσεις σε ποσοστό 84,94% ενώ οι μη οξυγονούχες απάρτιζαν το 9,05%. Συνολικά ταυτοποιήθηκαν 17 συστατικά τα οποία αντιστοιχούν σε ποσοστό 93,99% της ολικής σύστασης του ελαίου και τα οποία παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1.



**Εικόνα 3.1** Αέριο χρωματογράφημα του αιθέριου ελαίου του *M. officinalis*.



**Εικόνα 3.2** Δομή γερανιάλης.



**Εικόνα 3.3** Δομή νεράλης.

Πίνακας 3.1 Χημική σύσταση αιθέριου ελαίου του *M. officinalis*

No <sup>a</sup>	Συστατικά <sup>β</sup>	Rt (min) <sup>γ</sup>	Περιεκ/τητα % <sup>δ</sup>
1	6-methyl-5-Hepten-2-one	8,26	0,25
2	exo-Isocitral	14,61	0,28
3	Citronellal	14,95	5,33
4	Rosefuran epoxide	15,72	0,09
5	(E)-Isocitral	16,19	1,37
6	Citronellol	18,16	0,30
7	Neral	18,86	<b>26,88</b>
8	Geraniol	19,23	0,28
9	Methyl citronellate	19,43	1,20
10	Geranial	20,20	<b>38,00</b>
11	Thymol	21,54	0,11
12	Methyl geranate	22,30	0,94
13	Geranyl acetate	24,68	0,67
14	(E)-β-Damascenone	24,88	0,29
15	(E)-Caryophyllene	26,48	9,05
16	Caryophyllene oxide	33,23	8,59
17	Humulene epoxide II	34,34	0,36
<b>Κατηγορίες Συστατικών</b>			
	Οξυγονούχες ενώσεις		84,94
	Μη οξυγονούχες ενώσεις		9,05
<b>Σύνολο</b>			<b>93,99</b>

<sup>a</sup>Αριθμός ταυτοποιημένων συστατικών.

<sup>β</sup> Η ταυτοποίηση των συστατικών πραγματοποιήθηκε με σύγκριση των χρόνων συγκράτησης και των φασμάτων μαζών τους με τα αντίστοιχα δεδομένα των ηλεκτρονικών βιβλιοθηκών Adams07 και Xcalibur που υπάρχουν στο λογισμικό Xcalibur του οργάνου και με δεδομένα της βιβλιογραφίας (Adams, 2007).

<sup>γ</sup> Rt: Χρόνος συγκράτησης (Retention time).

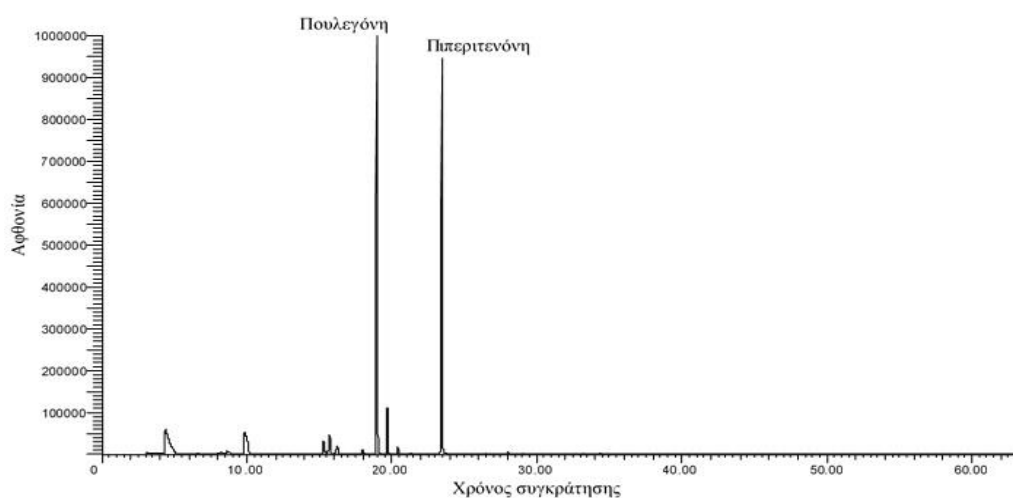
<sup>δ</sup>Εκατοστιαία περιεκτικότητα των συστατικών επί της ολικής σύστασης του αιθέριου ελαίου του *M. officinalis*.

### 3.2.2 Χημική σύσταση αιθέριου ελαίου του *M. pulegium*

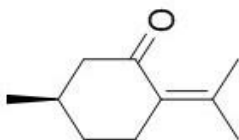
Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών του αιθέριου ελαίου του *M. pulegium* πραγματοποιήθηκε σε σύστημα αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών.

Στο αέριο χρωματογράφημα του ελαίου (Εικ. 3.4) τα συστατικά που βρέθηκαν σε ποσοστό μεγαλύτερο του 10% και θεωρούνται ως βασικά ήταν δύο. Το πρώτο συστατικό ήταν η πουλεγόνη (Εικ. 3.5) η οποία μετείχε σε ποσοστό 43,07% επί της ολικής σύστασης του ελαίου και το δεύτερο ήταν η πιπεριτενόνη (Εικ. 3.6) με 37,45%. Σε μικρότερα ποσοστά συμμετείχαν το λιμονένιο (6,77%), η πιπεριτόνη (4,31%) και η ισομινθόνη (2,76%).

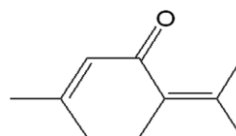
Η πλειονότητα των συστατικών ήταν οξυγονούχες ενώσεις σε ποσοστό 90,22% ενώ οι μη οξυγονούχες απάρτιζαν το 7,06%. Συνολικά ταυτοποιήθηκαν 10 συστατικά τα οποία αντιστοιχούν σε ποσοστό 97,28% της ολικής σύστασης του ελαίου και τα οποία παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2.



Εικόνα 3.4 Αέριο χρωματογράφημα του αιθέριου ελαίου του *M. pulegium*.



Εικόνα 3.5 Δομή πουλεγόνης.



Εικόνα 3.6 Δομή πιπεριτενόνης.

Πίνακας 3.2 Χημική σύσταση αιθέριου ελαίου του *M. pulegium*

No <sup>a</sup>	Συστατικά <sup>β</sup>	Rt (min) <sup>γ</sup>	Περιεκ/τητα % <sup>δ</sup>
1	3-Octanol	8,63	0,57
2	Limonene	9,85	6,77
3	Menthone	15,30	1,95
4	Isomenthone	15,69	2,76
5	Pulegone	18,99	<b>43,07</b>
6	Piperitone	19,69	4,31
7	Piperitenone	23,48	<b>37,45</b>
8	(E)-Caryophyllene	26,48	0,09
9	$\alpha$ -Humulene	28,01	0,20
10	Humulene epoxide II	34,33	0,11
<b>Κατηγορίες Συστατικών</b>			
	Οξυγονούχες ενώσεις		90,22
	Μη οξυγονούχες ενώσεις		7,06
<b>Σύνολο</b>			<b>97,28</b>

<sup>a</sup>Αριθμός ταυτοποιημένων συστατικών.

<sup>β</sup> Η ταυτοποίηση των συστατικών πραγματοποιήθηκε με σύγκριση των χρόνων συγκράτησης και των φασμάτων μαζών τους με τα αντίστοιχα δεδομένα των ηλεκτρονικών βιβλιοθηκών Adams07 και Xcalibur που υπάρχουν στο λογισμικό Xcalibur του οργάνου και με δεδομένα της βιβλιογραφίας (Adams, 2007).

<sup>γ</sup> Rt: Χρόνος συγκράτησης (Retention time).

<sup>δ</sup>Εκατοστιαία περιεκτικότητα των συστατικών επί της ολικής σύστασης του αιθέριου ελαίου του *M. pulegium*.



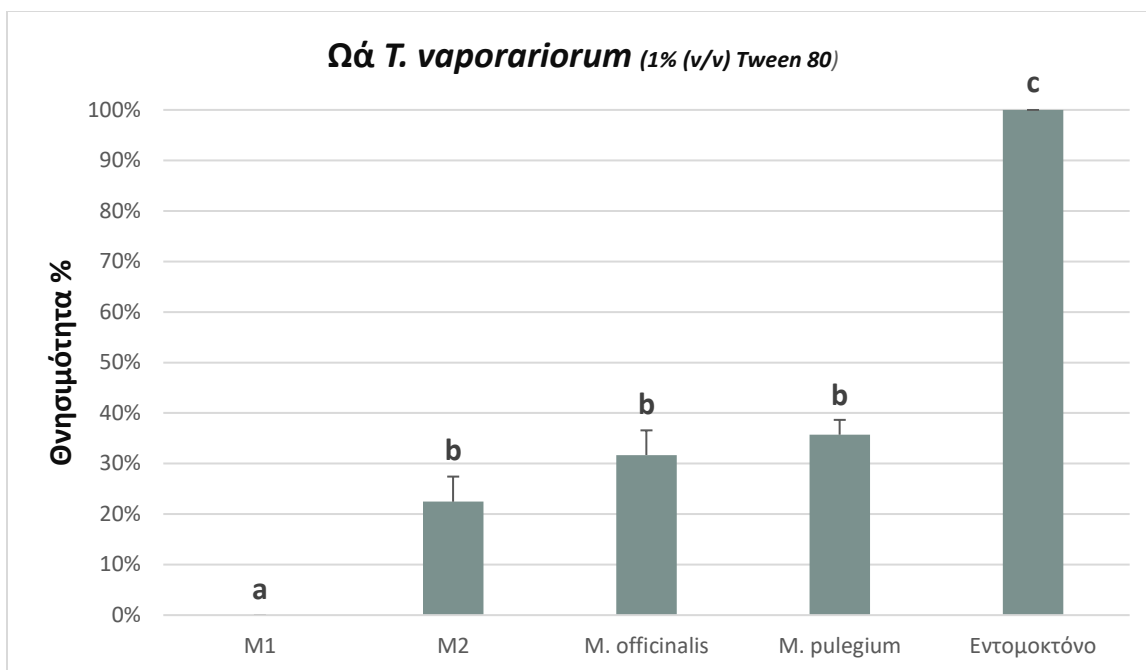
### 3.3 Εντομοκτόνος και Ακαρεοκτόνος Δράση των Αιθέριων Ελαίων.

#### 3.3.1 Αποτελεσματικότητα επί του *T. vaporariorum*

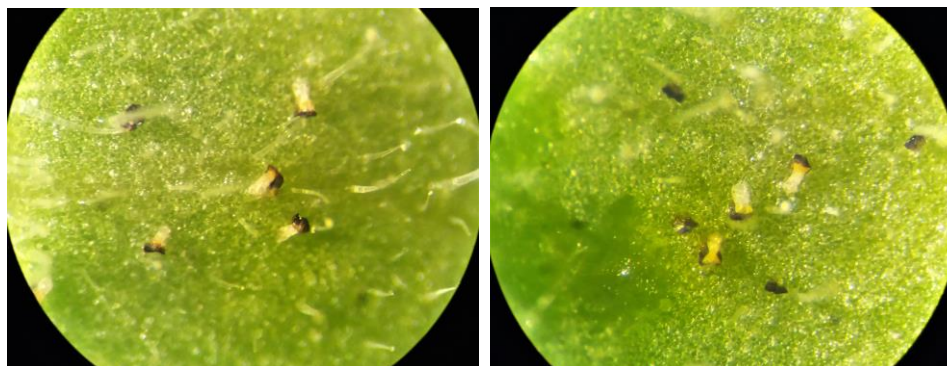
##### 3.3.1.1 Επίδραση στα ωά

Μετά από 10 ημέρες από τον ψεκασμό τα ωά του μάρτυρα (απιονισμένο νερό) είχαν εκκολαφθεί σε ποσοστό 100% ενώ στα ωά που είχαν δεχτεί τα γαλακτώματα των αιθέριων ελαίων και το γαλάκτωμα του γαλακτωματοποιητή σε μεγάλο ποσοστό διακρίνονταν οι νεκρές νύμφες που βρίσκονταν σε διαδικασία εκκόλαψης αλλά δεν είχαν καταφέρει να την ολοκληρώσουν. Τα συμπτώματα αυτά παρατηρούνταν ήδη 4 ημέρες μετά την επέμβαση σε μικρότερα ποσοστά. Στην περίπτωση του εντομοκτόνου από τα ωά δεν εμφανίζονταν νύμφες ενώ στην περίπτωση των ελαίων νύμφες εμφανίζονταν αλλά δεν επιβίωναν και παρέμεναν πάνω στο ωό.

Όπως φαίνεται από τα ιστογράμματα (3.1, 3.2) η μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα επήλθε από το συνδυασμό των αιθέριων ελαίων με γαλακτωματοποιητή περιεκτικότητας 1% (v/v). Την εντονότερη δράση είχε το έλαιο του φλισκουιού με 35,71% (Ιστόγραμμα 3.1) και στη συνέχεια αυτό του μελισσόχορτου με 31,69%. Η δράση του γαλακτώματος που στερούνταν ελαίου έφτασε στο 22,45% ενώ του απιονισμένου νερού και του εντομοκτόνου ήταν 0 και 100% αντίστοιχα. Η ανάλυση των δεδομένων έδειξε ότι δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ του γαλακτώματος και των δύο ελαίων ( $F=8,36$ ,  $\beta.ε.=2,36$ ,  $P>0,11$ ). Στην εικόνα 3.7 απεικονίζονται οι νεκρές νύμφες από τις επεμβάσεις με τα γαλακτώματα των αιθέριων ελαίων.

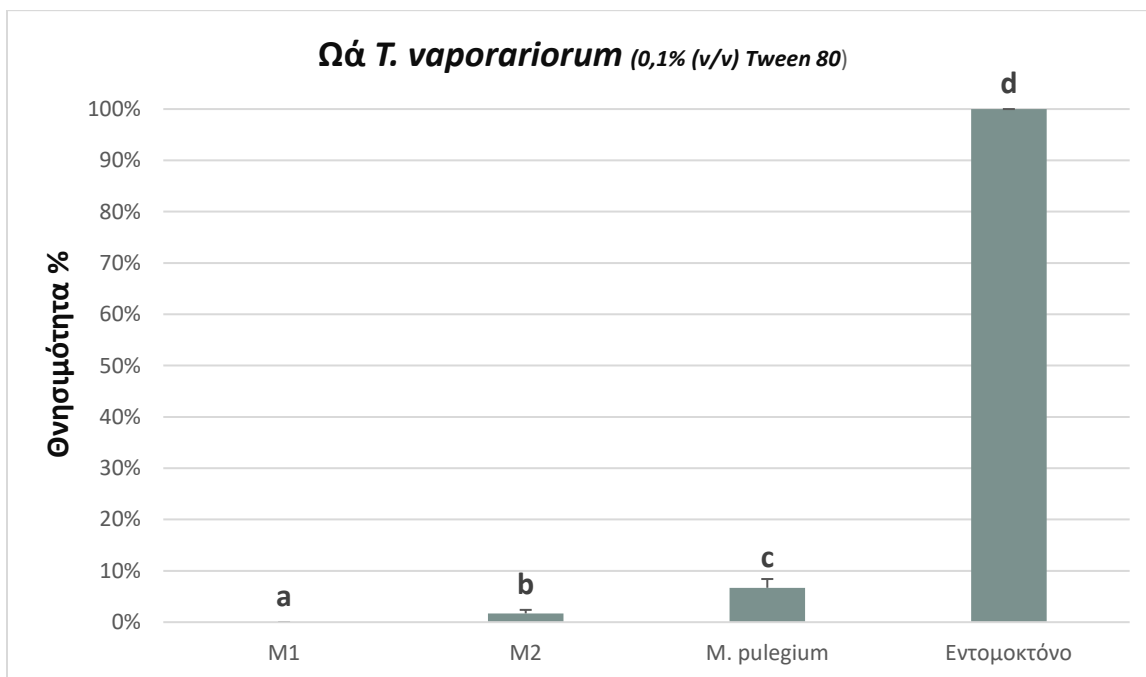


**Ιστόγραμμα 3.1** Συνολικό ποσοστό θνησιμότητας των ωών του *T. vaporariorum* από την επέμβαση με τα γαλακτώματα αιθέριων ελαίων περιεκτικότητας 1% (v/v) Tween 80. Το M1 αντιπροσωπεύει το μάρτυρα απιονισμένο νερό ενώ το M2 το μάρτυρα γαλακτωματοποιητή με απιονισμένο νερό.



**Εικόνα 3.7** Νεκρές νύμφες *T. vaporariorum* προερχόμενες από τα ψεκασμένα με τα γαλακτώματα ωά.

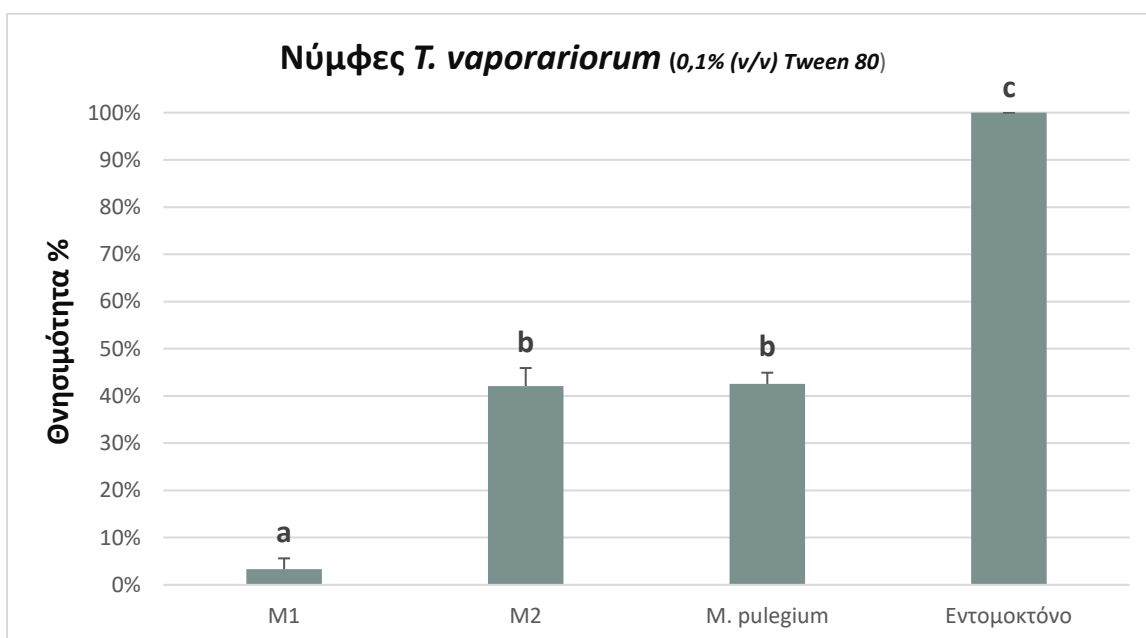
Η επέμβαση με περιεκτικότητα γαλακτωματοποιητή 0,1% (v/v) (Ιστόγραμμα 3.2) έδειξε μια διαφορετική εικόνα με το ποσοστό αποτελεσματικότητας του ελαίου του φλισκουνιού να μειώνεται στο 6,7%, όπως επίσης και του γαλακτώματος χωρίς έλαιο όπου το ποσοστό μειώθηκε σε 1,71%. Η ανάλυση των δεδομένων έδειξε ότι υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ του γαλακτώματος και του ελαίου του φλισκουνιού ( $F=8,36$ ,  $\beta.ε.=1,16$ ,  $P<0,01$ ).



**Ιστόγραμμα 3.2** Συνολικό ποσοστό θνησιμότητας των ωών του *T. vaporariorum* από την επέμβαση με το γαλακτώματα αιθέριου ελαίου του φλισκουνιού περιεκτικότητας 0,1% (v/v) Tween 80. Το M1 αντιπροσωπεύει το μάρτυρα απιονισμένο νερό ενώ το M2 το μάρτυρα γαλακτωματοποιητή με απιονισμένο νερό.

### 3.3.1.2 Θνησιμότητα νυμφών

Τα αποτελέσματα από την επέμβαση με το γαλάκτωμα του αιθέριου ελαίου του φλισκουνιού περιεκτικότητας γαλακτωματοποιητή 0,1% (v/v) σε νύμφες του *T. vaporariorum* απεικονίζονται στο ιστόγραμμα 3.3. Το ποσοστό θνησιμότητας του αιθέριου ελαίου του φλισκουνιού (42,55%) διέφερε χαρακτηριστικά με αυτό του μάρτυρα (απιονισμένο νερό) (3,31%) ενώ το γαλάκτωμα που στερούνταν ελαίου είχε παρόμοια δράση (42,1%). Οι επεμβάσεις δεν διέφεραν μεταξύ τους αλλά μόνο με τους μάρτυρες ( $F=48,61$ , β.ε.=2,26,  $P<0,01$ ).



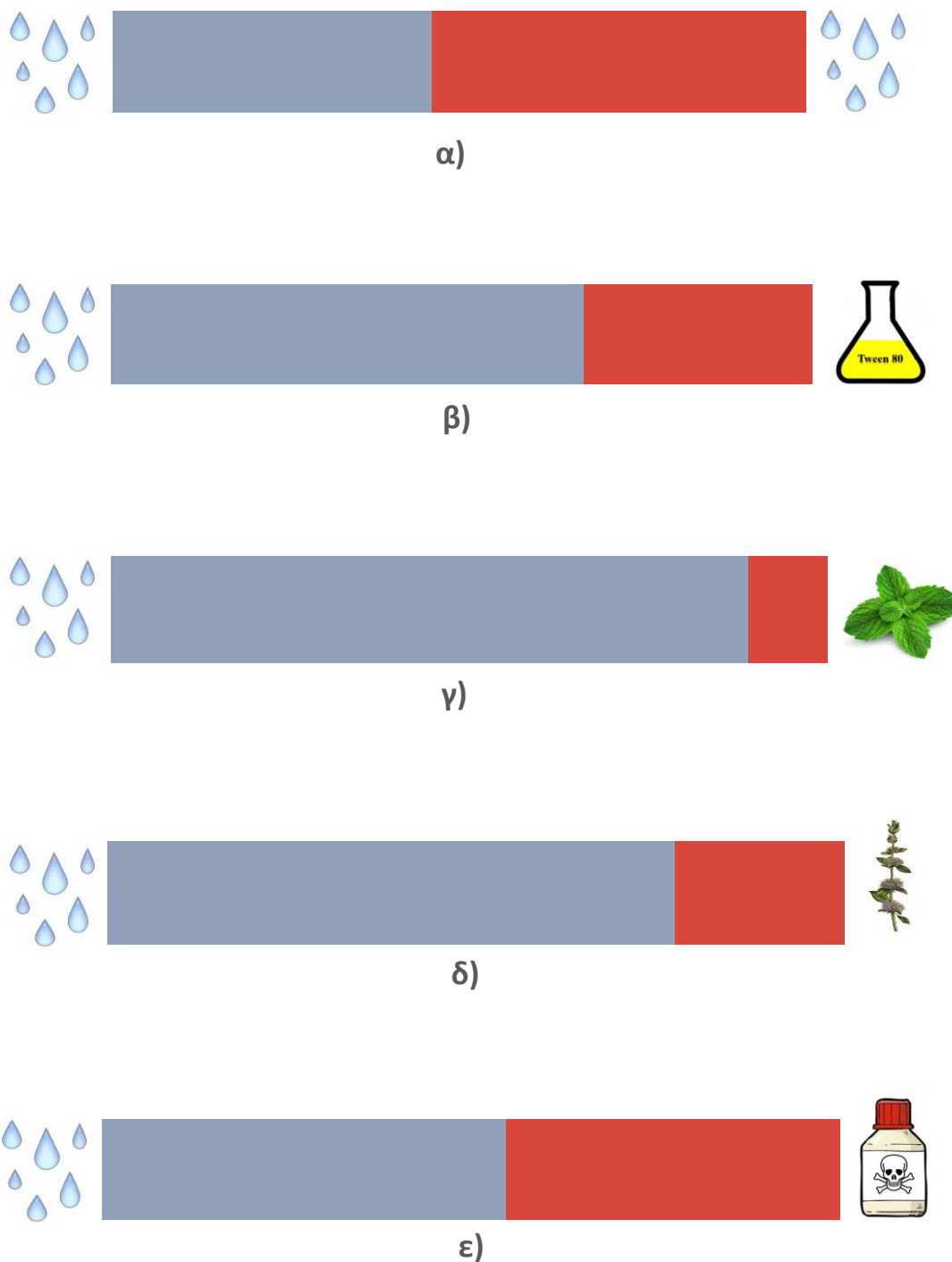
**Ιστόγραμμα 3.3** Συνολικό ποσοστό θνησιμότητας των νυμφών του *T. vaporariorum* από την επέμβαση με το γαλάκτωμα του αιθέριου ελαίου του φλισκουνιού περιεκτικότητας 0,1% (v/v) Tween 80. Το M1 αντιπροσωπεύει το μάρτυρα απιονισμένο νερό ενώ το M2 το μάρτυρα γαλακτωματοποιητή με απιονισμένο νερό.

### 3.3.1.3 Απωθητικότητα ενηλίκων ατόμων

Το ποσοστό των ωών του *T. varovariorum* που σημειώνονταν σε κάθε φυτό φαίνεται στο ιστόγραμμα 3.4 όπου τα γαλακτώματα και των δυο αιθέριων ελαίων με περιεκτικότητα γαλακτωματοποιητή 1% (v/v) επέφεραν αξιόλογη απωθητική δράση σε σύγκριση με τους μάρτυρες.

Ο αριθμός των ωών που ανευρίσκονταν στα φυτά του κλωβού τα οποία ήταν και τα δύο ψεκασμένα με απιονισμένο νερό δεν είχε κάποια μεταξύ τους διαφορά (κ.μ.ό. το 51% των ενηλίκων βρέθηκε στο ένα και 49% στο άλλο φυτό).

Σημαντική διαφορά σε σχέση με το αναμενόμενο (50%) βρέθηκε μόνο στην περίπτωση του αιθέριου ελαίου του μελισσόχορτου ( $\chi^2=5,51$ , β.ε.=1,  $P<0,05$ ) όπου σημαντικά μικρότερο ποσοστό (13%) των ωών του αλευρώδους σημειώθηκαν στο ψεκασμένο με το έλαιο φυτό τομάτας. Γενικά ο αριθμός των ωών που ανευρίσκονταν στα φυτά τα οποία ήταν ψεκασμένα με το γαλάκτωμα σε όλες τις επαναλήψεις ήταν πάντοτε μικρότερος σε σχέση με τον αριθμό των ωών στα ψεκασμένα με απιονισμένο νερό φυτά-μάρτυρες. Ικανοποιητική δράση φάνηκε να προσδίδει και το γαλάκτωμα του αιθέριου ελαίου του φλισκουγιού (29%), το γαλάκτωμα που στερούνταν ελαίου (33%), ενώ το εντομοκτόνο διάλυμα άγγιξε το 34% στο ένα πάντα εκ των δύο φυτών κ.μ.ο.



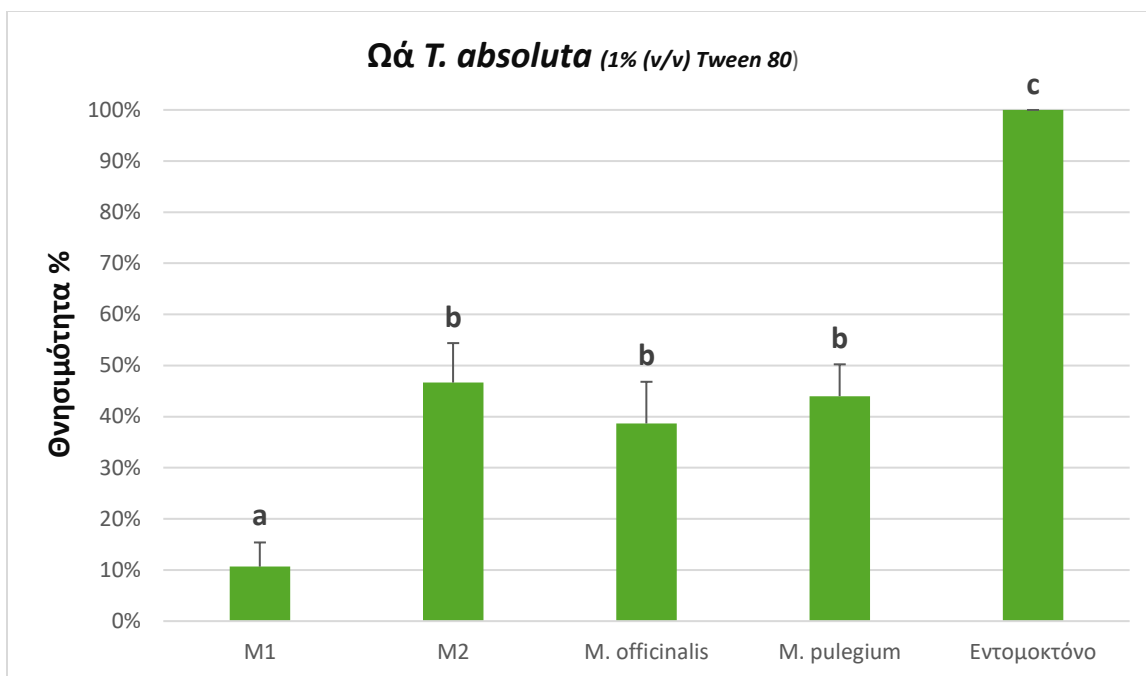
**Ιστόγραμμα 3.4** Ποσοστό ωών του *T. vaporariorum* στα ψεκασμένα φυτά με **α)** απιονισμένο νερό, **β)** απιονισμένο νερό και γαλάκτωμα χωρίς έλαιο, **γ)** απιονισμένο νερό και γαλάκτωμα αιθέριου ελαίου μελισσόχορτου περιεκ. γαλακτωματοποιητή 1% (v/v) **δ)** απιονισμένο νερό και γαλάκτωμα αιθέριου ελαίου φλισκουνιού περιεκ. γαλακτωματοποιητή 1% (v/v) και **ε)** απιονισμένο νερό και εντομοκτόνο διάλυμα.

### 3.3.2 Αποτελεσματικότητα επί του *T. absoluta*

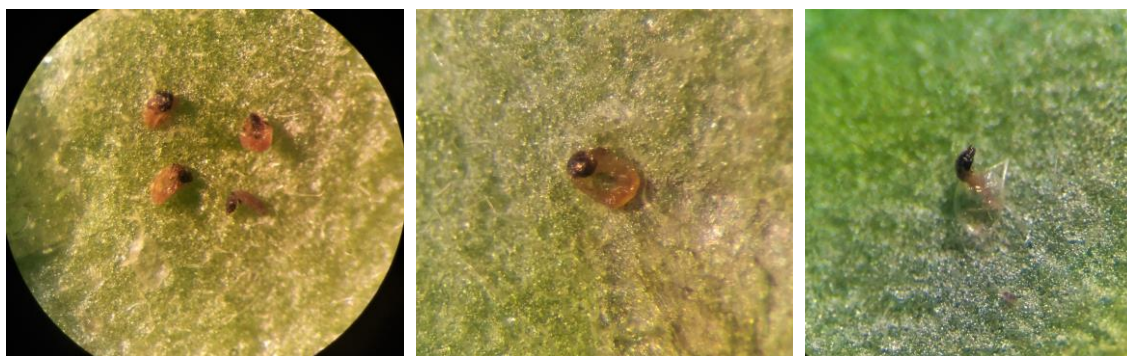
#### 3.3.2.1 Επίδραση στα ωά

Μετά από 4 ημέρες από την επέμβαση μεγάλος αριθμός των ωών που είχαν δεχτεί τα έλαια παρουσίαζαν μια εικόνα αφυδάτωσης ενώ κατά την 6<sup>η</sup> με 7<sup>η</sup> ημέρα η εικόνα ήταν πιο ξεκάθαρη. Εντός των ωών διακρίνονταν πλέον καθαρά οι νεκρές προνύμφες οι οποίες ήταν πλήρως αφυδατωμένες και σκούρου καστανού χρώματος. Ορισμένες προνύμφες ανευρίσκονταν νεκρωμένες πάνω στα ωά με το αφυδατωμένο τους σώμα μέσα και τη κεφαλή τους έξω από αυτά. Ανάλογα συμπτώματα με αυτά των ελαίων είχαν και αρκετά ωά τα οποία είχαν ψεκαστεί με το διάλυμα γαλακτωματοποιητή και νερού όπως επίσης και με το διάλυμα του εντομοκτόνου. Ακολούθησε προσεκτική μέτρηση του αριθμού των ωών με τα συμπτώματα σε κάθε επέμβαση καθώς επίσης και προαιρετικός έλεγχος των επιτυχώς εκκολαυθέντων προνυμφών.

Όπως φαίνεται από τα ιστογράμματα (3.5, 3.6) συγκριτικά υπήρχε μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα των ελαίων όταν συνδυάζονταν με γαλακτωματοποιητή περιεκτικότητας 1% (v/v). Χαρακτηριστικά, η θνησιμότητα που προήλθε από το έλαιο του φλισκουιού άγγιξε το 44% ενώ από το έλαιο του μελισσόχορτου το 38,66% (Ιστόγραμμα 3.5). Το διάλυμα του γαλακτωματοποιητή με το απιονισμένο νερό είχε δράση ανάλογη με αυτό των ελαίων με το ποσοστό της θνησιμότητάς του να φτάνει το 46,66%. Στα δείγματα του μάρτυρα (απιονισμένο νερό) εντοπίστηκαν ορισμένα αφυδατωμένα-ξερά ωά τα οποία άγγιξαν σε ποσοστό το 10,66% ενώ στα ωά τα οποία είχαν ψεκαστεί με εντομοκτόνο οι προνύμφες βρέθηκαν όλες νεκρές με τη θνησιμότητα να φτάνει το 100%. Οι επεμβάσεις δεν διέφεραν μεταξύ τους αλλά μόνο με τους μάρτυρες ( $F=5,85$ ,  $\beta.ε.=3,56$ ,  $P<0,01$ ). Στην εικόνα 3.8 διακρίνονται νεκρές προνύμφες οι οποίες προήλθαν από τον ψεκασμό των ωών με τα γαλακτώματα.



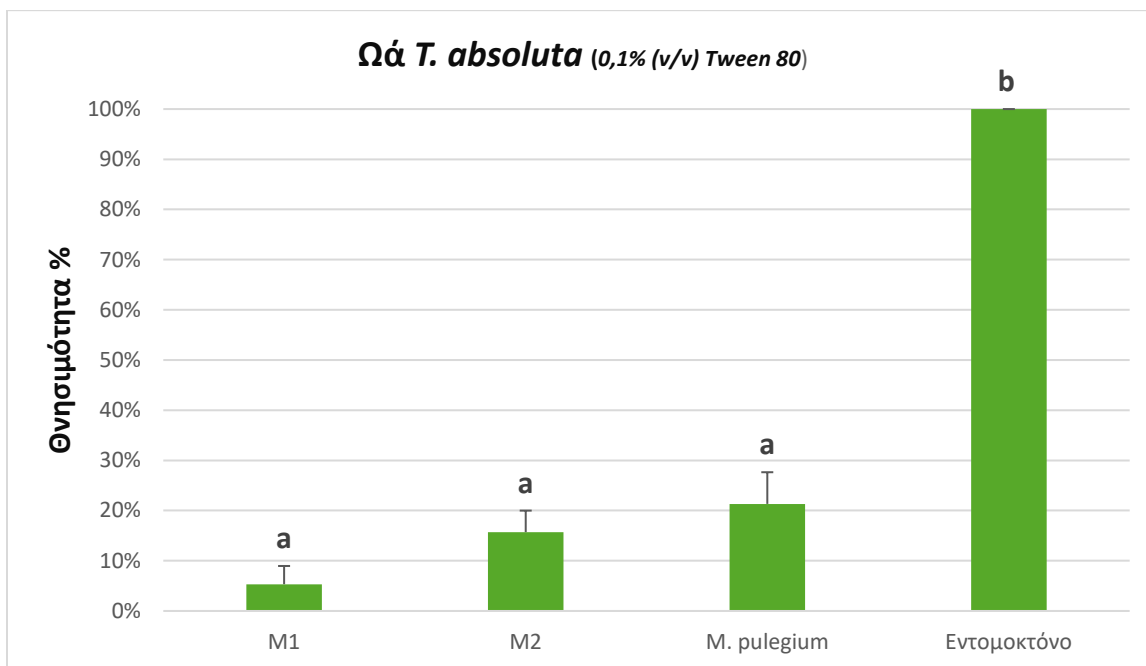
**Ιστόγραμμα 3.5** Συνολικό ποσοστό θνησιμότητας των ωών του *T. absoluta* από την επέμβαση με τα γαλακτώματα αιθέριων ελαίων περιεκτικότητας 1% (v/v) Tween 80. Το M1 αντιπροσωπεύει το μάρτυρα απιονισμένο νερό ενώ το M2 το μάρτυρα γαλακτωματοποιητή με απιονισμένο νερό.



**Εικόνα 3.8** Νεκρές προνύμφες *T. absoluta* ως αποτέλεσμα της επέμβασης των ωών με τα γαλακτώματα των αιθέριων ελαίων του *M. officinalis* και *M. pulegium*.



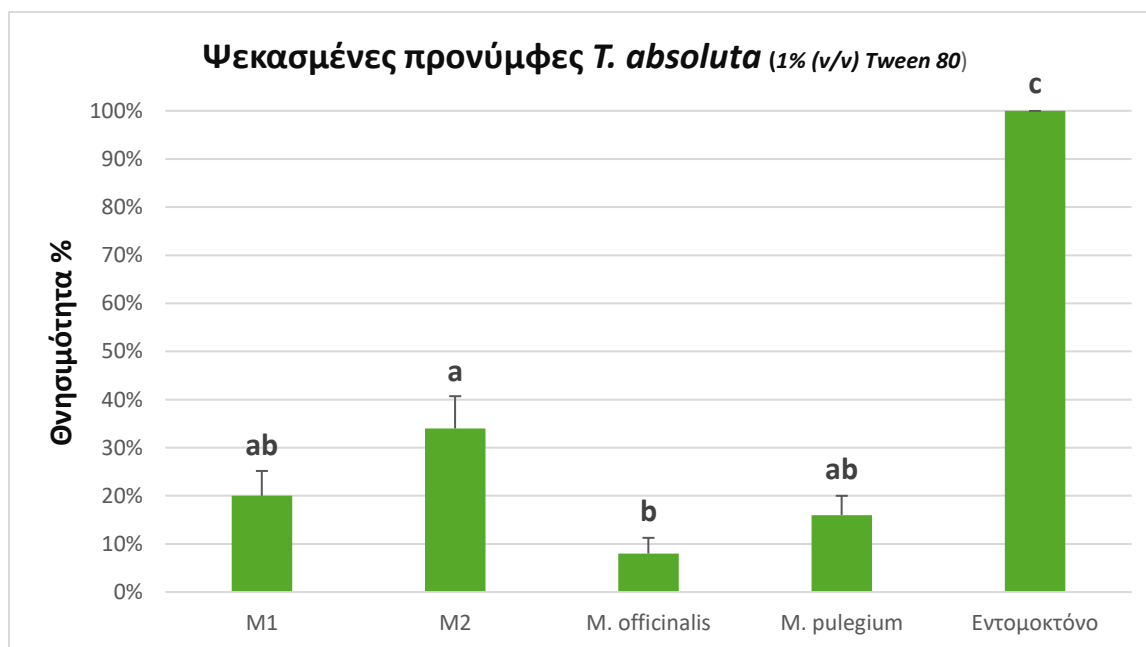
Στη δεύτερη επέμβαση κατά την οποία δοκιμάστηκε μόνο το αιθέριο έλαιο του φλισκουνιού με περιεκτικότητα γαλακτωματοποιητή 0,1% (v/v) (Ιστόγραμμα 3.6) τα ποσοστά θνησιμότητας ελαττώθηκαν σχεδόν κατά το ήμισυ. Το έλαιο του φλισκουνιού επέφερε 21,33% θνησιμότητα ενώ το διάλυμα γαλακτωματοποιητή και νερού 15,71%. Οι επεμβάσεις δεν διέφεραν μεταξύ τους αλλά ούτε και με το μάρτυρα (απιονισμένο νερό, 5,33%) ( $F=2,72$ , β.ε.=2,41,  $P>0,05$ ).



**Ιστόγραμμα 3.6** Συνολικό ποσοστό θνησιμότητας των ωών του *T. absoluta* από την επέμβαση με το γαλάκτωμα αιθέριου ελαίου του φλισκουνιού περιεκτικότητας 0,1% (v/v) Tween 80. Το M1 αντιπροσωπεύει το μάρτυρα απιονισμένο νερό ενώ το M2 το μάρτυρα γαλακτωματοποιητή με απιονισμένο νερό.

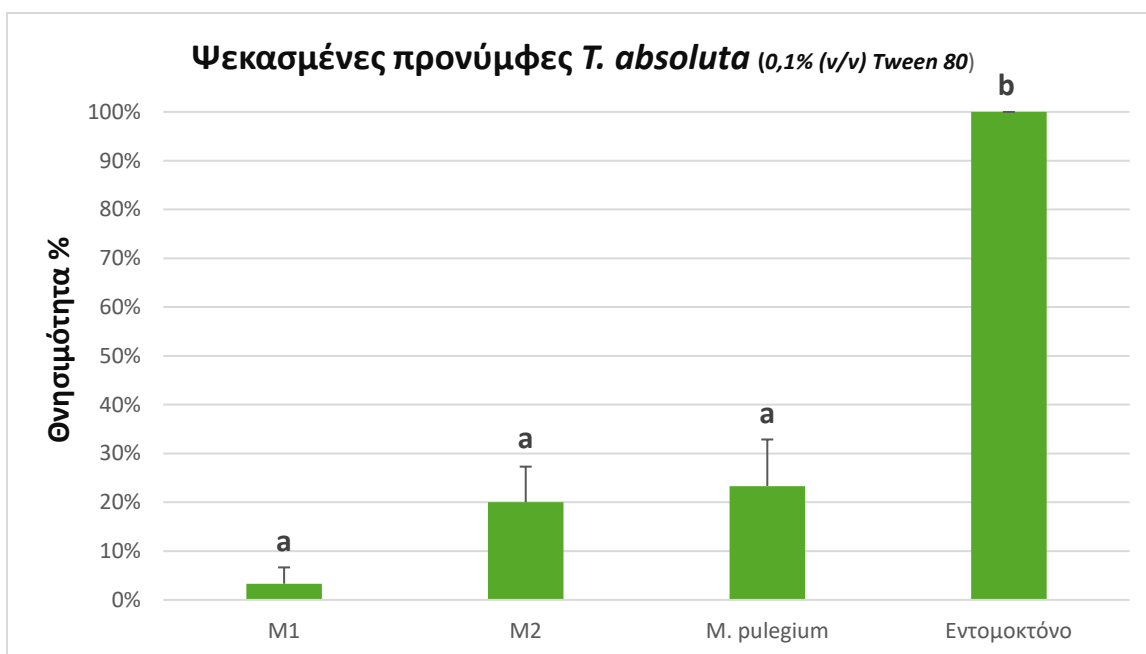
### 3.3.2.2 Θνησιμότητα προνυμφών

Τα αποτελέσματα από την πειραματική διαδικασία επαφής των αιθέριων ελαίων με τις προνύμφες (ψεκασμένες προνύμφες) απεικονίζονται στα ιστογράμματα 3.7 και 3.8 ενώ στο ιστόγραμμα 3.9 απεικονίζονται τα αποτελέσματα από τη δεύτερη διαδικασία επέμβασης (αψέκαστες προνύμφες, υπολειμματική δράση). Το διάλυμα γαλακτωματοποιητή και απιονισμένου νερού φάνηκε όταν εφαρμόστηκε εξ επαφής και σε περιεκτικότητα 1% (v/v) να έχει δράση εναντίον των προνυμφών του *T. absoluta* (34%) (Ιστόγραμμα 3.7). Αντιθέτως, τα ποσοστά αποτελεσματικότητας των ελαίων ήταν 16% για το φλισκούνη και 8% για το μελισσόχορτο. Μεγάλο επίσης ήταν το ποσοστό των νεκρών προνυμφών οι οποίες εντοπίστηκαν στον μάρτυρα (απιονισμένο νερό) και το οποίο έφτασε το 20%. Οι προνύμφες οι οποίες είχαν ψεκαστεί με το διάλυμα του εντομοκτόνου βρέθηκαν όλες νεκρές. Οι επεμβάσεις διέφεραν μεταξύ τους αλλά σημαντική διαφορά βρέθηκε μόνο μεταξύ του γαλακτώματος που στερούνταν ελαίου και του γαλακτώματος του μελισσόχορτου ( $F=4,81$ ,  $\beta.ε.=3,36$ ,  $P<0,01$ ).



**Ιστόγραμμα 3.7** Συνολικό ποσοστό θνησιμότητας των προνυμφών του *T. absoluta* από τα γαλακτώματα αιθέριων ελαίων περιεκτικότητας 1% (v/v) Tween 80. Στο ιστόγραμμα απεικονίζονται τα αποτελέσματα από τη διαδικασία της άμεσης επαφής των ελαίων με τις προνύμφες. Το M1 αντιπροσωπεύει το μάρτυρα απιονισμένο νερό ενώ το M2 το μάρτυρα γαλακτωματοποιητή με απιονισμένο νερό.

Όταν η περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή ελαττώθηκε σε 0,1% (v/v) (Ιστόγραμμα 3.8) το έλαιο του φλισκουινού επέφερε θνησιμότητα της τάξεως του 23,33% ενώ το γαλάκτωμα που στερούνταν ελαίου 20%. Οι επεμβάσεις δεν διέφεραν μεταξύ τους ( $F=2,22$ , β.ε.=2,15,  $P>0,05$ ). Στην εικόνα 3.9 απεικονίζεται μία νεκρή προνύμφη ως αποτέλεσμα του ψεκασμού της με το γαλάκτωμα του αιθέριου ελαίου του φλισκουινού.

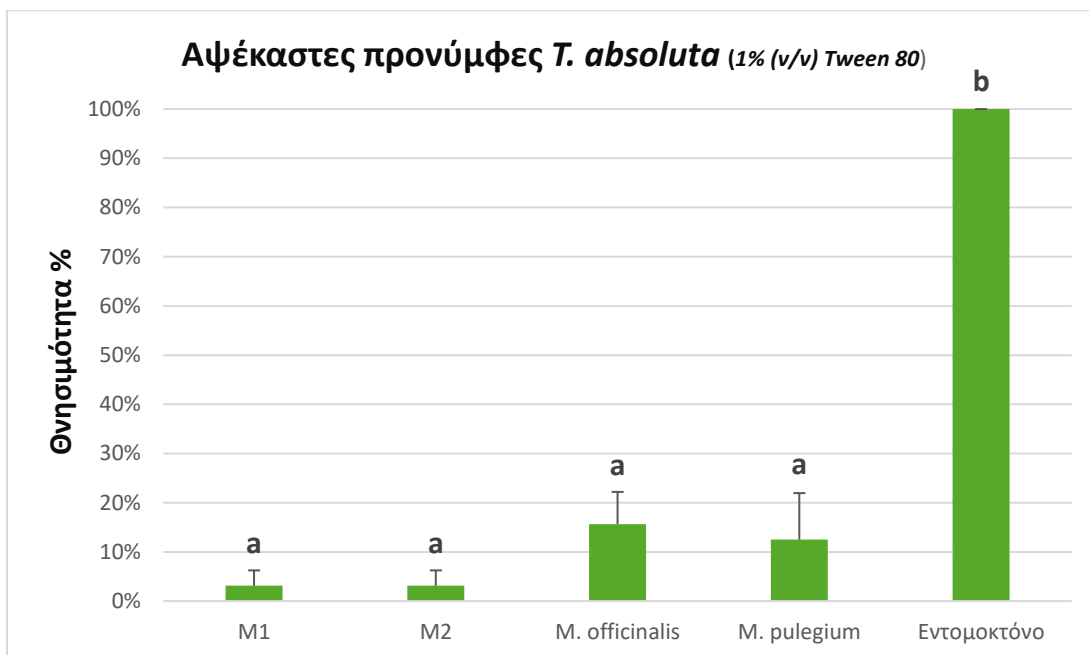


**Ιστόγραμμα 3.8** Συνολικό ποσοστό θνησιμότητας των προνυμφών του *T. absoluta* από το γαλάκτωμα του αιθέριου ελαίου του φλισκουινού περιεκτικότητας 0,1% (v/v) Tween 80. Τα αποτελέσματα του ιστογράμματος προέρχονται από τη διαδικασία της άμεσης επαφής του ελαίου με τις προνύμφες. Το M1 αντιπροσωπεύει το μάρτυρα απιονισμένο νερό ενώ το M2 το μάρτυρα γαλακτωματοποιητή με απιον. νερό.



**Εικόνα 3.9** Νεκρή προνύμφη *T. absoluta* μετά τον ψεκασμό της με το γαλάκτωμα αιθέριου ελαίου του *M. pulegium*.

Η πειραματική διαδικασία των ψεκασμένων από πριν φύλλων και της μετέπειτα τοποθέτησης των προνυμφών του *T. absoluta* (Ιστόγραμμα 3.9) έδειξε ότι το έλαιο του μελισσόχορτου επέφερε μία θνησιμότητα της τάξεως του 15,62% και στη συνέχεια ακολούθησε το έλαιο του φλισκουνιού με ποσοστό 12,5%. Το γαλάκτωμα που στερούνταν ελαίου επέφερε ένα χαμηλό ποσοστό (3,12%). Οι επεμβάσεις διέφεραν μεταξύ τους ( $F=1.09$ , β.ε.=55,96,  $P<0,0001$ ).

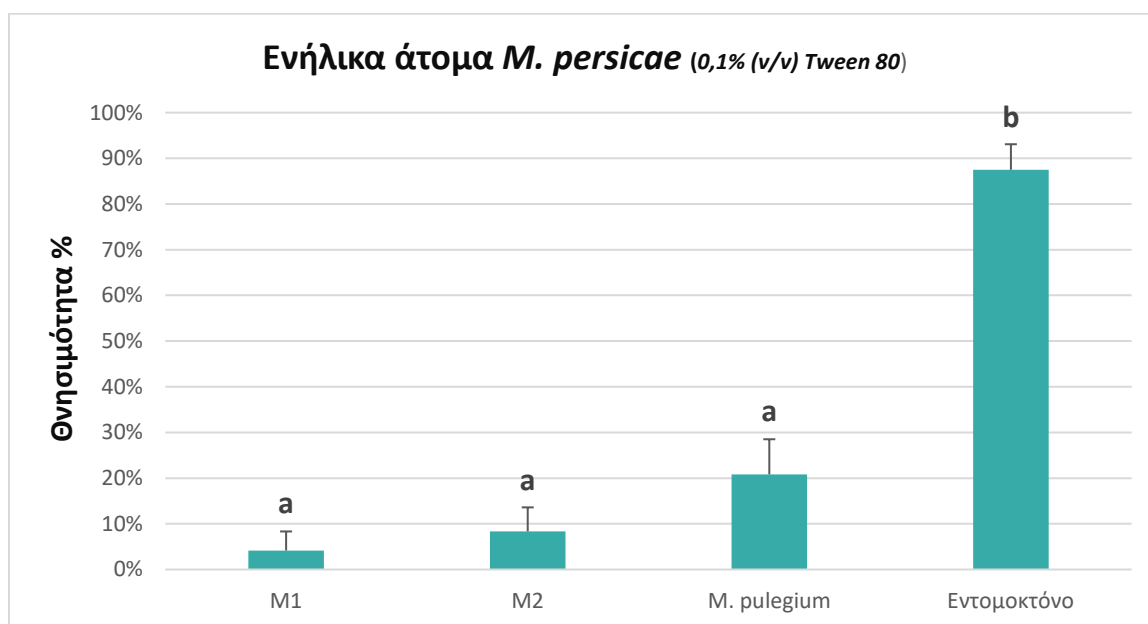


**Ιστόγραμμα 3.9** Συνολικό ποσοστό θνησιμότητας των προνυμφών του *T. absoluta* από την πειραματική διαδικασία ψεκασμένων με γαλακτώματα αιθέριων ελαίων φύλλων και μετέπειτα τοποθέτηση των προνυμφών του εντόμου. Το M1 αντιπροσωπεύει το μάρτυρα απιονισμένο νερό ενώ το M2 το μάρτυρα γαλακτωματοποιητή με απιονισμένο νερό.

### 3.3.3 Αποτελεσματικότητα επί του *M. persicae*

#### 3.3.3.1 Θνησιμότητα ενηλίκων ατόμων

Το γαλάκτωμα του αιθέριου ελαίου επέφερε συνολική θνησιμότητα 20,83% και του μάρτυρα γαλακτώματος που στερούνταν ελαίου 8,33% αντίστοιχα (Ιστόγραμμα 3.10). Το εντομοκτόνο διάλυμα επέφερε 87,5% θνησιμότητα. Οι επεμβάσεις δεν διέφεραν μεταξύ τους ( $F=44.57$ ,  $\beta.ε.=3.20$ ,  $P<0,0001$ ). Στην εικόνα 3.10 απεικονίζεται ένα νεκρό ενήλικο άτομο του *M. persicae* ως αποτέλεσμα των ψεκασμών με τα γαλακτώματα.

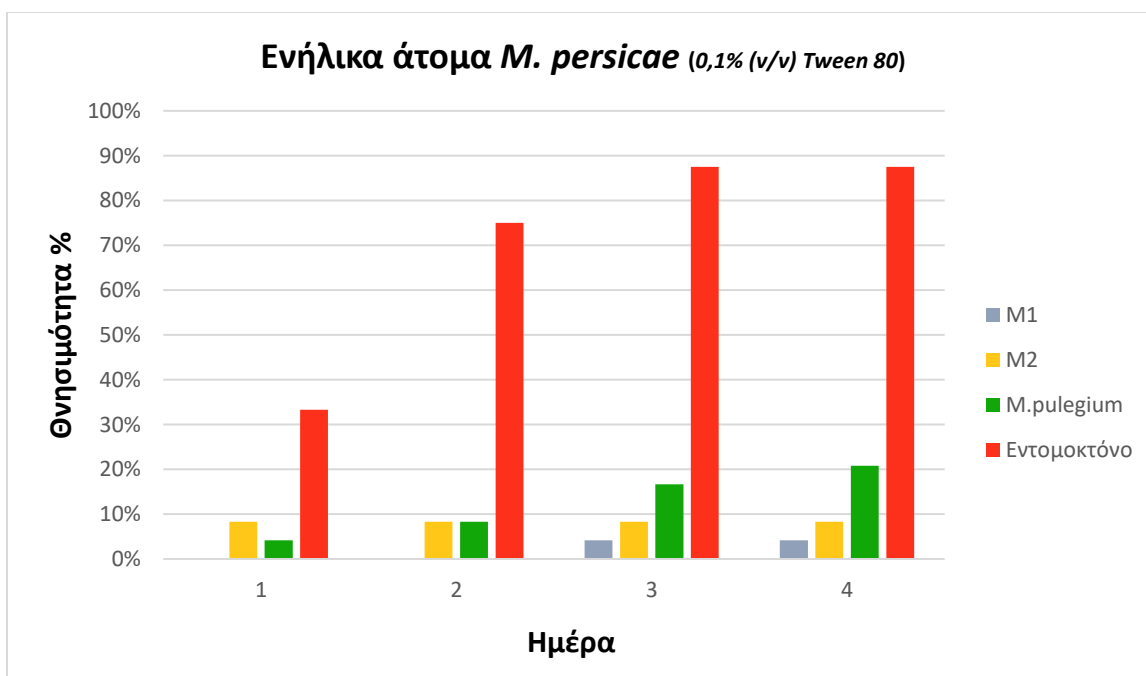


**Ιστόγραμμα 3.10** Συνολικό ποσοστό θνησιμότητας των ενηλίκων ατόμων *M. persicae* από την πειραματική διαδικασία επέμβασης με το γαλάκτωμα αιθέριου ελαίου του φλισκουνιού περιεκτικότητας 0,1% (v/v) Tween 80. Με M1 δηλώνεται ο μάρτυρας απιονισμένο νερό και με M2 ο μάρτυρας γαλακτωματοποιητή με απιονισμένο νερό.



**Εικόνα 3.10** Νεκρό ενήλικο άπτερο άτομο *M. persicae* αποτέλεσμα της επέμβασης με το γαλάκτωμα του αιθέριου ελαίου του *M. pulegium*.

Η θνησιμότητα των ατόμων του μάρτυρα τα οποία είχαν ψεκαστεί με απιονισμένο νερό ξεκίνησε την 3<sup>η</sup> μέρα φτάνοντας το 4,16% και παρέμεινε εκεί και την επόμενη (Ιστόγραμμα 3.11). Το γαλάκτωμα που στερούνταν ελαίου επέφερε μετά από 24 ώρες θνησιμότητα της τάξεως του 8,33% η οποία παρέμεινε σταθερή μέχρι και την τελευταία ημέρα. Το γαλάκτωμα του αιθέριου ελαίου του *M. persicae* κατά την πρώτη μέρα επέφερε θνησιμότητα 4,16% η οποία τις επόμενες ημέρες αυξανόταν με αποτέλεσμα τη δεύτερη να φτάσει το 8,33%, την τρίτη 16,66% και να καταλήγει με συνολικό ποσοστό θνησιμότητας 20,83%. Το εντομοκτόνο διάλυμα 24 ώρες μετά την επέμβαση δεν φάνηκε να έχει πάρα πολύ ισχυρή δράση (33,33%) η οποία όμως αυξήθηκε και έφτασε το 87,5% την 3<sup>η</sup> μέρα.

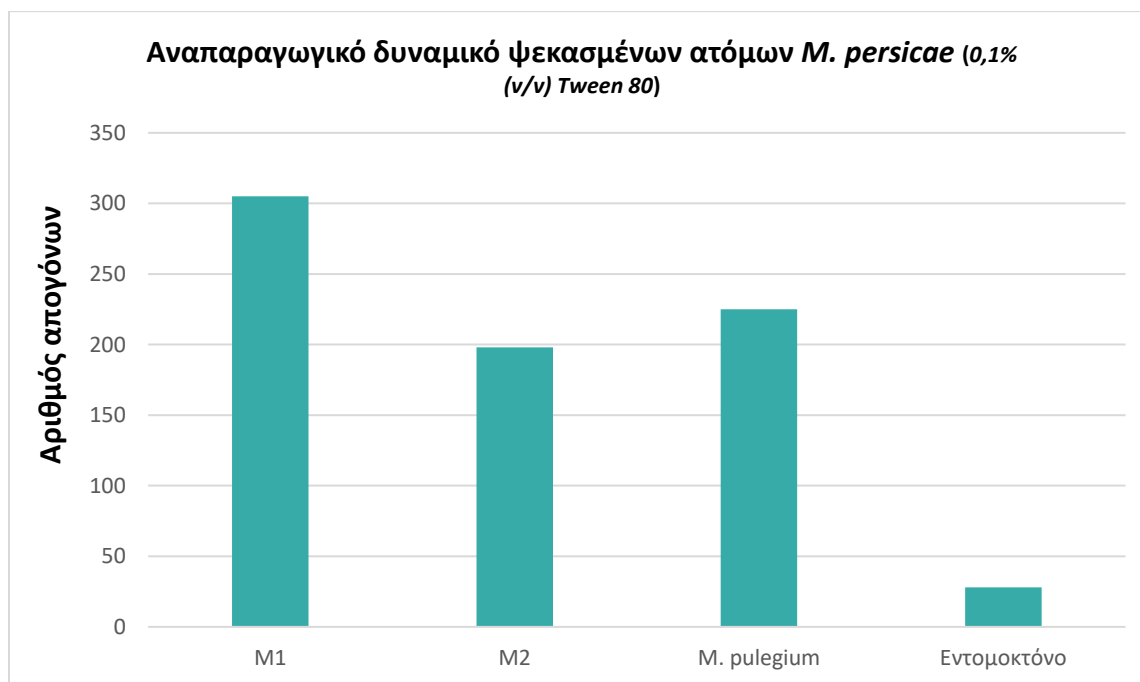


**Ιστόγραμμα 3.11** Συνολικό ποσοστό θνησιμότητας ανά ημέρα των ενηλίκων ατόμων *M. persicae* από την πειραματική διαδικασία επέμβασης με το γαλάκτωμα αιθέριου ελαίου του φλισκουινίου περιεκτικότητας 0,1% (v/v) Tween 80. Με M1 δηλώνεται ο μάρτυρας απιονισμένο νερό και με M2 ο μάρτυρας γαλακτωματοποιητή με απιονισμένο νερό.

### 3.3.3.2 Επίδραση στο αναπαραγωγικό δυναμικό

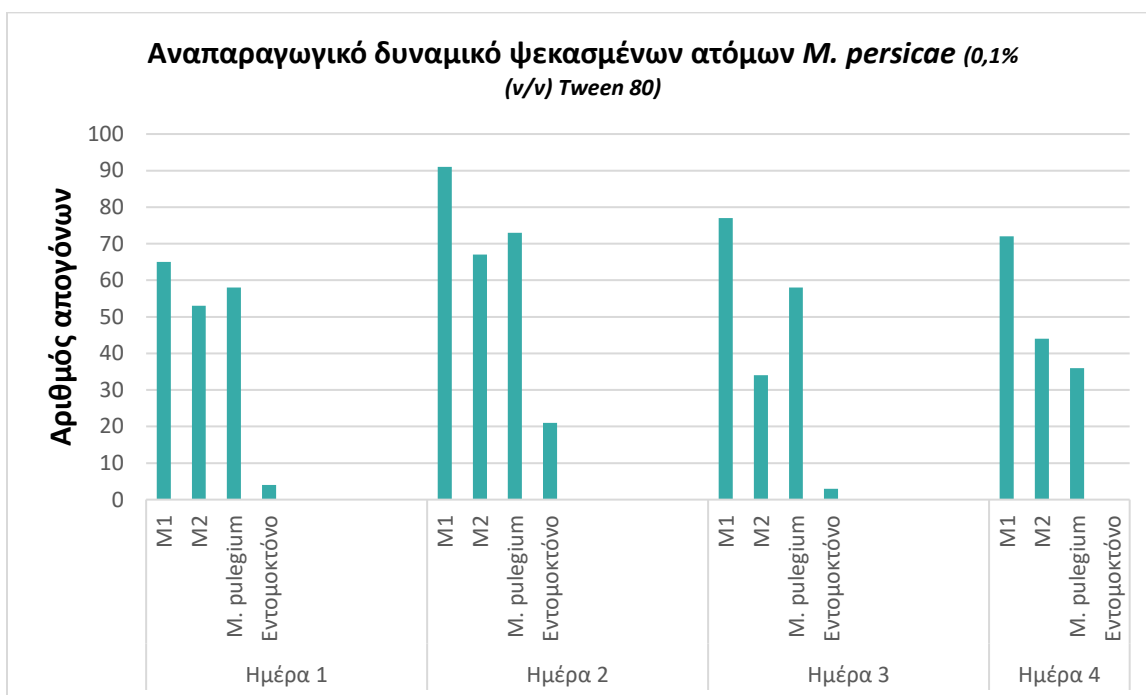
Η επίδραση του γαλακτώματος του αιθέριου ελαίου του φλισκουιού στο αναπαραγωγικό δυναμικό ψεκασμένων ατόμων *M. persicae* παρουσιάζεται στα ιστογράμματα 3.12 και 3.13 (με γαλακτωματοποιητή 0,1%, συνολικά και ανά ημέρα, αντίστοιχα).

Ο συνολικός αριθμός των απογόνων όλων των επαναλήψεων από τις επεμβάσεις με το έλαιο (Ιστόγραμμα 3.12) δεν διέφερε σημαντικά με αυτών των μαρτύρων: «απιονισμένο νερό» και «γαλάκτωμα που στερούνταν ελαίου». Ο μικρότερος αριθμός απογόνων προήλθε από το εντομοκτόνο διάλυμα καθότι είχε νεκρώσει και το μεγαλύτερο ποσοστό των ενηλίκων ατόμων.



**Ιστόγραμμα 3.12** Συνολικός αριθμός απογόνων προερχόμενων από ψεκασμένα άτομα του *M. persicae*. Το M1 δηλώνει το μάρτυρα απιονισμένο νερό ενώ το M2 το μάρτυρα γαλακτωματοποιητή με απιονισμένο νερό.

Ο αριθμός των απογόνων στις επεμβάσεις με το έλαιο άρχισε να ελαττώνεται δυο ημέρες μετά τον ψεκασμό τους και είχε πτωτική πορεία και τις επόμενες δυο σε σύγκριση με το μάρτυρα (απιονισμένο νερό) (Ιστόγραμμα 3.13). Στα δείγματα του γαλακτώματος που στερούνταν ελαίου ο αριθμός των απογόνων κυμαινόταν στα ίδια πλαίσια περίπου με αυτό του ελαίου. Το εντομοκτόνο διάλυμα επέφερε τον μικρότερο αριθμό απογόνων καθώς το μεγαλύτερο μέρος των ενηλίκων ατόμων είχαν νεκρωθεί ήδη από τον ψεκασμό τους με αυτό.



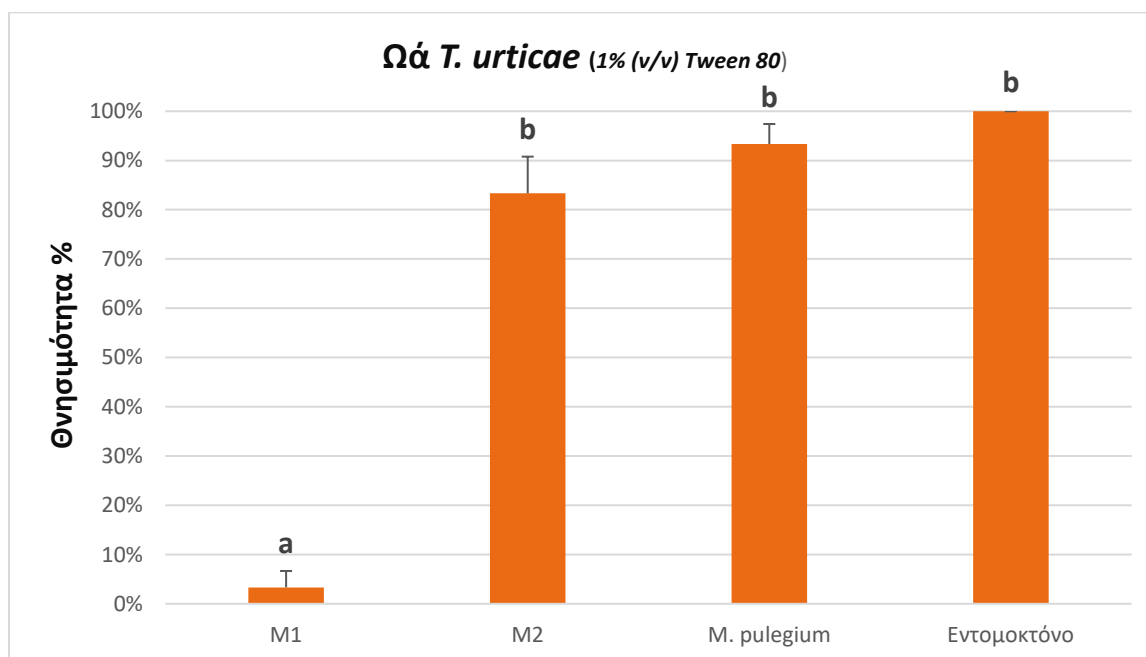
**Ιστόγραμμα 3.13** Αριθμός απογόνων ανά ημέρα και ανά επέμβαση προερχόμενων από ψεκασμένα άτομα του *M. persicae*. Το M1 δηλώνει το μάρτυρα απιονισμένο νερό ενώ το M2 το μάρτυρα γαλακτωματοποιητή με απιονισμένο νερό.



### 3.3.4 Αποτελεσματικότητα επί του *T. urticae*

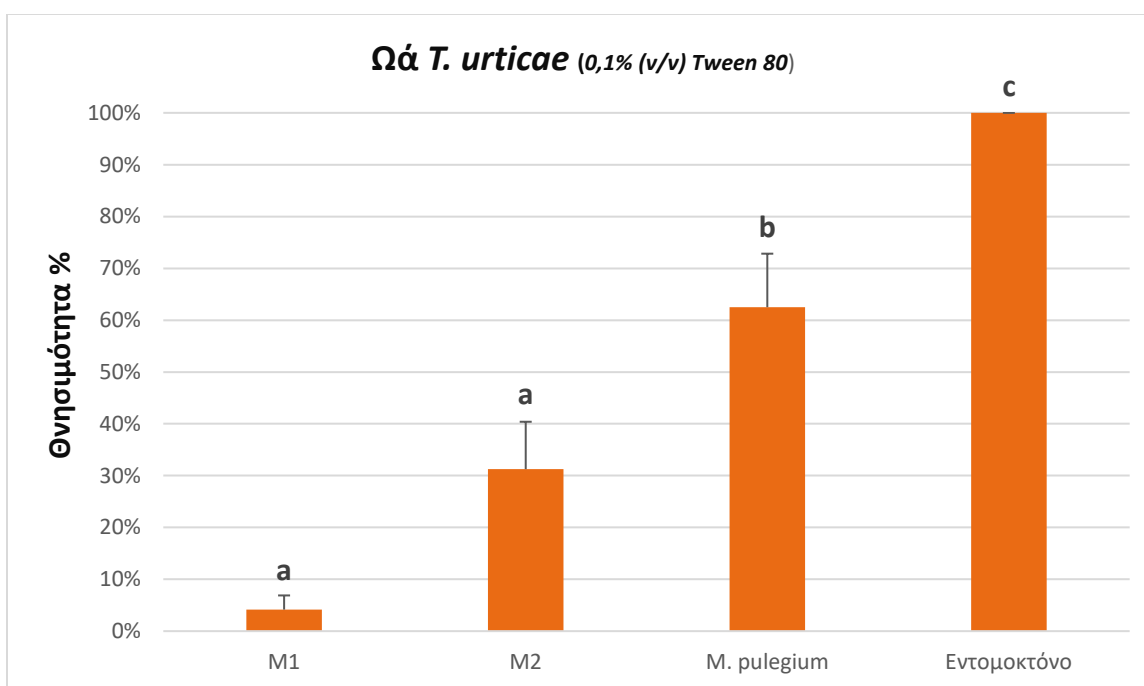
#### 3.3.4.1 Επίδραση στα ωά

Κατά την πρώτη διαδικασία επέμβασης σε ωά του *T. urticae* με το γαλάκτωμα αιθέριου ελαίου του φλισκουνιού περιεκτικότητας 1% (v/v) Tween 80 (Ιστόγραμμα 3.14) η θνησιμότητα που επέφερε το έλαιο άγγιξε το 93,33% σε σύγκριση με το μάρτυρα (απιονισμένο νερό) όπου το ποσοστό ήταν μόλις 3,33%. Εκτός όμως του ελαίου εξίσου σημαντική θνησιμότητα επέφερε και το γαλάκτωμα του γαλακτωματοποιητή με το απιονισμένο νερό με το ποσοστό του να φτάνει το 83,33%. Το διάλυμα του εντομοκτόνου επέφερε 100% θνησιμότητα. Οι επεμβάσεις διέφεραν μεταξύ τους ( $F=97,06$ , β.ε.=3,16,  $P<0,001$ ). Ο μάρτυρας απιονισμένο νερό είχε σημαντικά μικρότερη επίδραση, μεταξύ των άλλων επεμβάσεων δεν υπήρχε διαφορά.

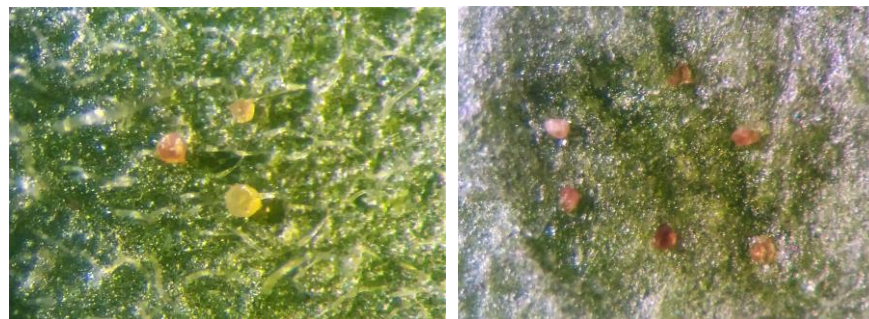


**Ιστόγραμμα 3.14** Συνολικό ποσοστό θνησιμότητας των ωών του *T. urticae* από τη διαδικασία επέμβασης με το αιθέριο έλαιο του φλισκουνιού περιεκτικότητας 1% (v/v) Tween 80. Το M1 αντιπροσωπεύει το μάρτυρα απιονισμένο νερό και το M2 το μάρτυρα γαλακτωματοποιητή με απιονισμένο νερό.

Διαφορετική εικόνα παρουσιάστηκε όταν η περιεκτικότητα του γαλακτωματοποιητή ελαττώθηκε σε 0,1% (v/v) (Ιστόγραμμα 3.15) όπου υπήρξε μία εμφανής και διακριτή διαφορά της αποτελεσματικότητας ανάμεσα στο γαλάκτωμα με το έλαιο και σε αυτό που στερούνταν ελαίου. Χαρακτηριστικά, το έλαιο του φλισκουνιού επέφερε 62,5% θνησιμότητα σε σύγκριση με το 4,16% του μάρτυρα απιονισμένου νερού καθώς και διπλάσιο ποσοστό αποτελεσματικότητας σε σχέση με το 31,25% του γαλακτώματος χωρίς έλαιο. Η δράση του εντομοκτόνου επαληθεύτηκε επιφέροντας ξανά 100% θνησιμότητα. Οι επεμβάσεις διέφεραν μεταξύ τους ( $F=34.01$ ,  $\beta.ε.=3,28$ ,  $P<0,001$ ). Στην εικόνα 3.11 απεικονίζονται ωά του *T. urticae* μετά την επέμβασή τους με το γαλάκτωμα του αιθέριου ελαίου του φλισκουνιού.



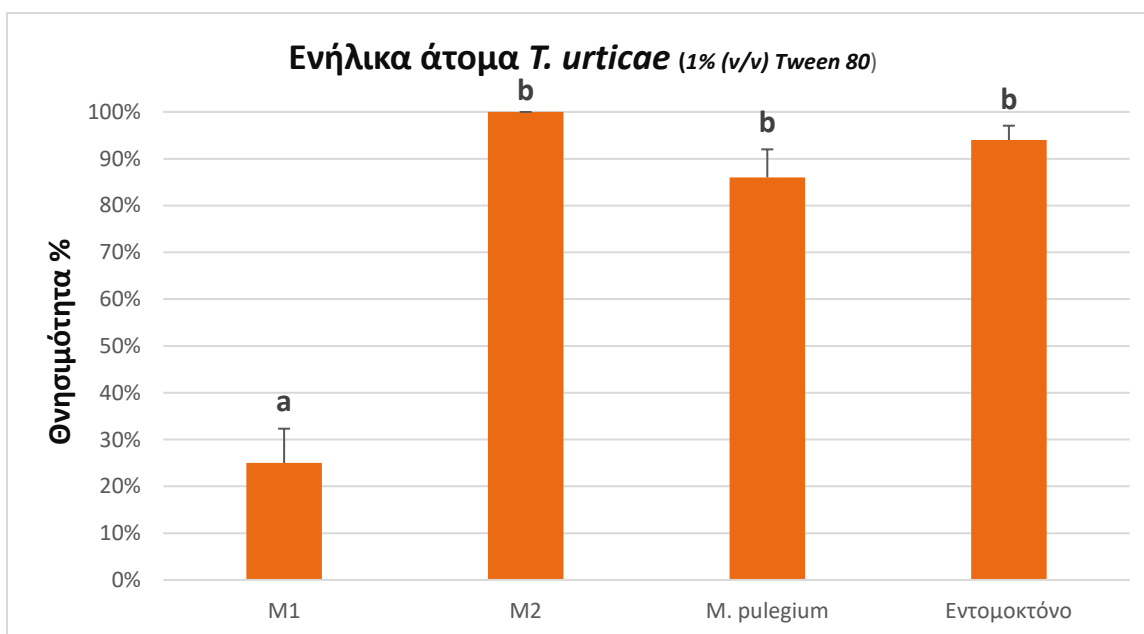
**Ιστόγραμμα 3.15** Συνολικό ποσοστό θνησιμότητας των ωών του *T. urticae* από τη διαδικασία επέμβασης με το αιθέριο έλαιο του φλισκουνιού περιεκτικότητας 0,1% (v/v) Tween 80. Με M1 δηλώνεται ο μάρτυρας απιονισμένο νερό και με M2 ο μάρτυρας γαλακτωματοποιητή με απιονισμένο νερό.



**Εικόνα 3.11** Αφυδατωμένα και ξερά ωά του *T. urticae* ως αποτέλεσμα του ψεκασμού τους με το γαλάκτωμα του αιθέριου ελαίου του *M. pulegium*.

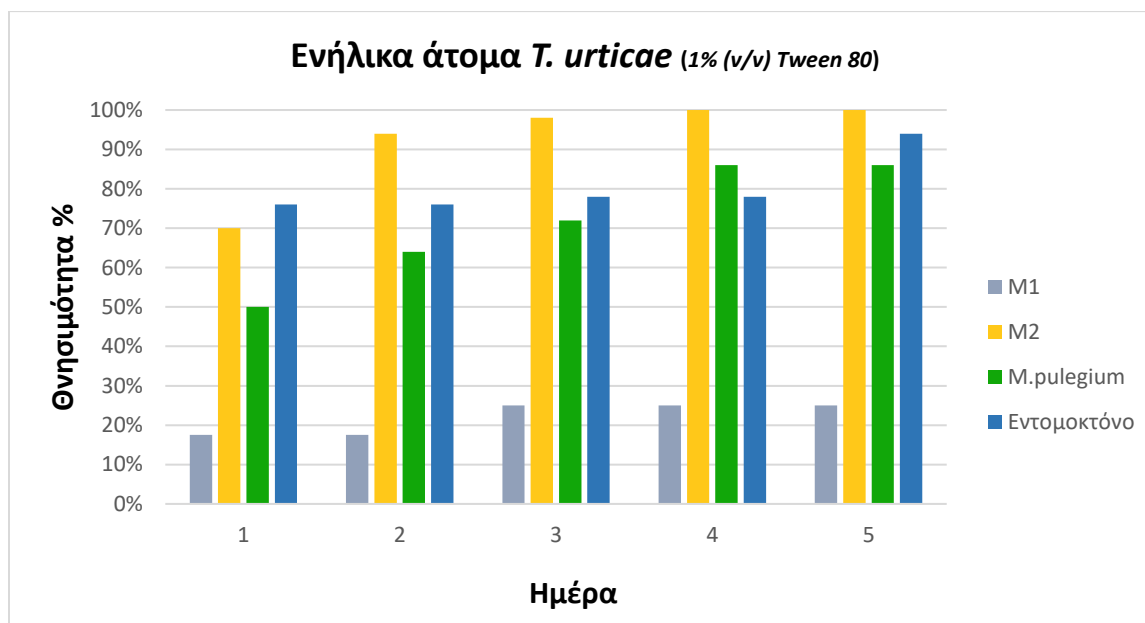
### 3.3.4.2 Θνησιμότητα ενηλίκων ατόμων

Κατά την πειραματική διαδικασία επέμβασης σε ενήλικα άτομα του *T. urticae* με το έλαιο του φλισκουνιού περιεκτικότητας γαλακτωματοποιητή 1% (v/v) το γαλάκτωμα που επέδειξε τα υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας ήταν αυτό του γαλακτωματοποιητή με το νερό (Ιστόγραμμα 3.16). Στη συνέχεια ακολούθησε το διάλυμα του εντομοκτόνου και έπειτα το γαλάκτωμα του αιθέριου ελαίου.

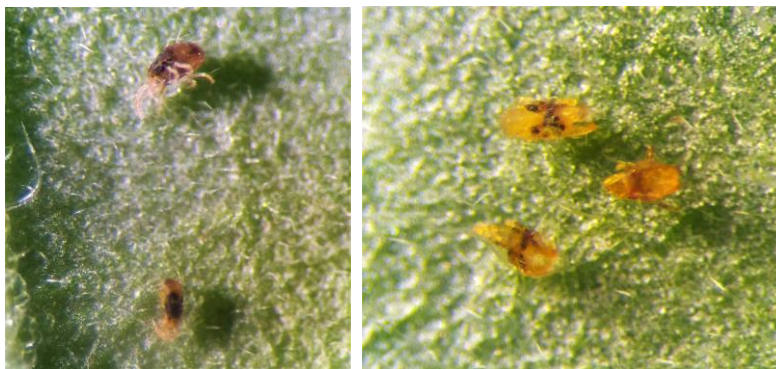


**Ιστόγραμμα 3.16** Συνολικό ποσοστό θνησιμότητας των ενηλίκων ατόμων *T. urticae* από την πειραματική διαδικασία επέμβασης με το γαλάκτωμα αιθέριου ελαίου του φλισκουνιού περιεκτικότητας 1% (v/v) Tween 80. Με M1 δηλώνεται ο μάρτυρας απιονισμένο νερό και με M2 ο μάρτυρας γαλακτωματοποιητή με απ. νερό.

Χαρακτηριστικά, η θνησιμότητα στα δείγματα του γαλακτωματοποιητή με το νερό έφτασε από την πρώτη κιόλας ημέρα το 70% ανεβαίνοντας τη δεύτερη στο 94%. Τρεις ημέρες μετά την επέμβαση είχε θανατωθεί το 98% των ενηλίκων ατόμων ενώ την τέταρτη μέρα το ποσοστό έφτασε το 100% (Ιστόγραμμα 3.17). Η θνησιμότητα των ατόμων που είχαν ψεκαστεί με το γαλάκτωμα του ελαίου είχε και αυτή ανοδική πορεία ξεκινώντας από 50% την πρώτη μέρα, 64% τη δεύτερη, 72% την τρίτη και καταλήγοντας τέσσερις ημέρες μετά την επέμβαση να σταθεροποιηθεί και να έχει θανατωθεί το 86% του αρχικού πληθυσμού. Αριθμός νεκρών ατόμων βρέθηκε και στα δείγματα του μάρτυρα (απιονισμένο νερό) με το ποσοστό να ξεκινάει την πρώτη μέρα από 17,5% και να σταθεροποιείται την τρίτη στο 25%. Το εντομοκτόνο επέφερε θνησιμότητα 76% τις δυο πρώτες ημέρες, τις επόμενες δυο 78% και κατά την τελευταία μέρα είχε θανατώσει το 94% του αρχικού πληθυσμού. Σε συνολικό ποσοστό θνησιμότητας ο μάρτυρας απιονισμένο νερό είχε μικρότερη επίδραση, μεταξύ των άλλων επεμβάσεων δεν υπήρχε διαφορά ( $F=48,78$ , β.ε.=3,34,  $P<0,001$ ). Στην εικόνα 3.12 απεικονίζονται νεκρά ενήλικα άτομα του *T. urticae* μετά την επέμβασή τους με το γαλάκτωμα του αιθέριου ελαίου του φλισκουιού.

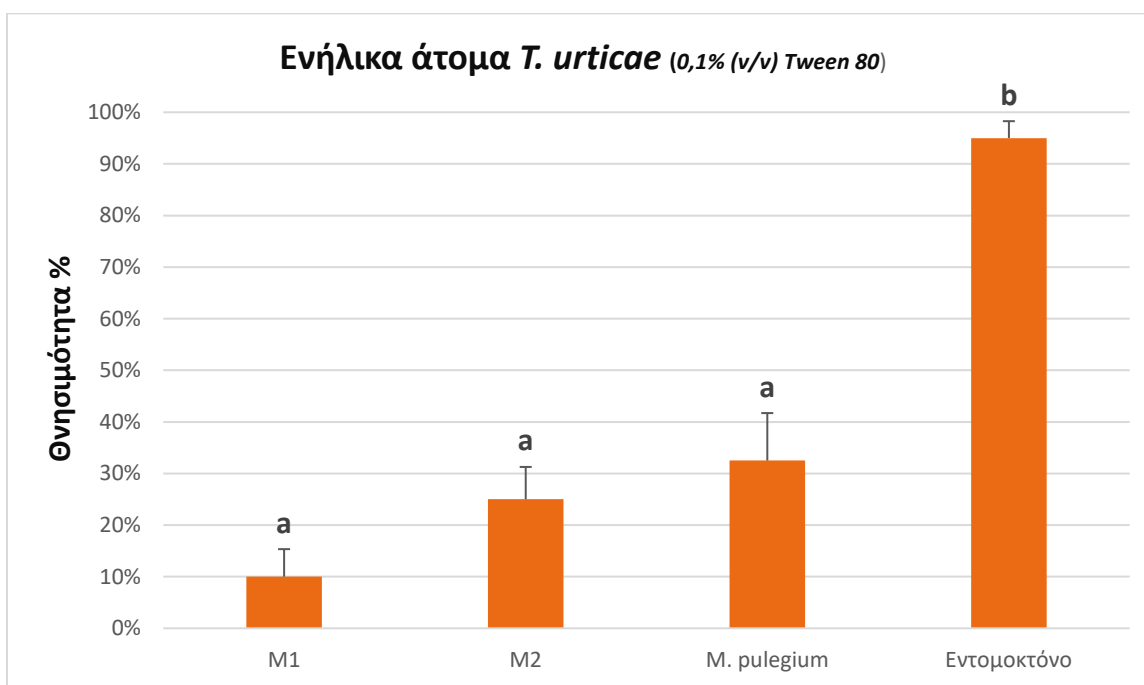


**Ιστόγραμμα 3.17** Συνολικό ποσοστό θνησιμότητας ανά ημέρα των ενηλίκων ατόμων *T. urticae* από την πειραματική διαδικασία επέμβασης με το γαλάκτωμα αιθέριου ελαίου του φλισκουιού περιεκτικότητας 1% (v/v) Tween 80. Με M1 δηλώνεται ο μάρτυρας απιονισμένο νερό και με M2 ο μάρτυρας γαλακτωματοποιητή με απιονισμένο νερό.



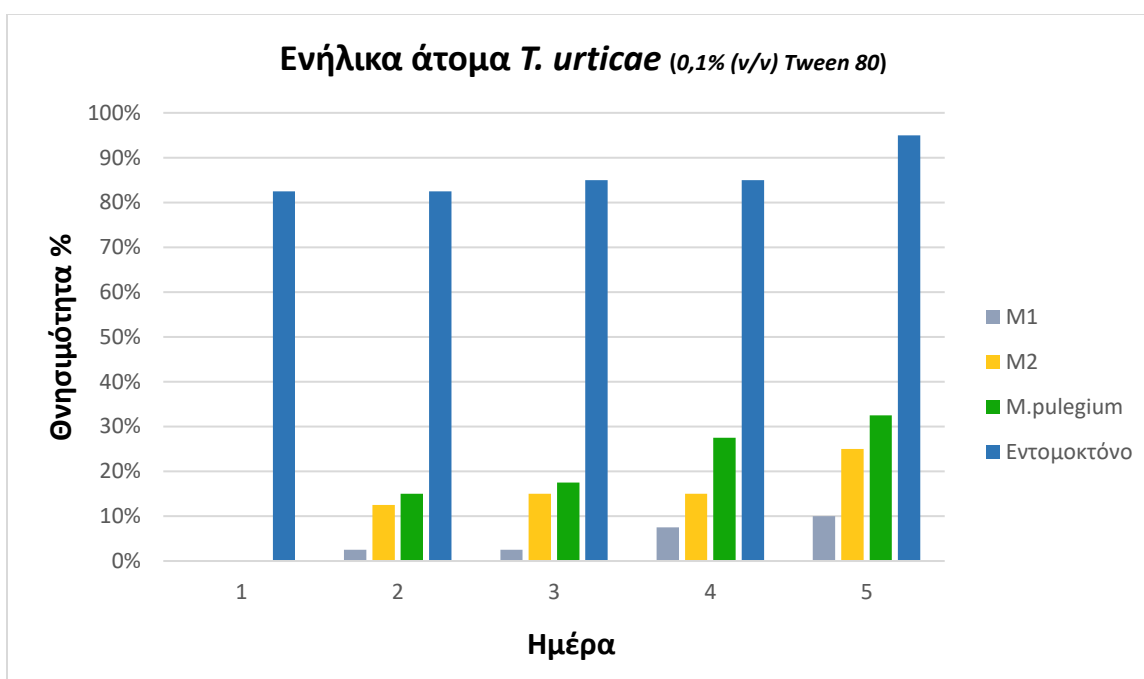
**Εικόνα 3.12** Νεκρά άτομα *T. urticae* από την επέμβαση με το γαλάκτωμα αιθέριου ελαίου του *M. pulegium*.

Όταν το έλαιο δοκιμάστηκε με περιεκτικότητα γαλακτωματοποιητή 0,1% (v/v) τα ποσοστά θνησιμότητας είχαν ελαττωθεί (εκτός του εντομοκτόνου) με αυτό του αιθέριου ελαίου να έχει λίγο μεγαλύτερη συγκριτικά δράση (Ιστόγραμμα 3.18).



**Ιστόγραμμα 3.18** Συνολικό ποσοστό θνησιμότητας των ενηλίκων ατόμων *T. urticae* από την πειραματική διαδικασία επέμβασης με το γαλάκτωμα αιθέριου ελαίου του φλισκουνιού περιεκτικότητας 0,1% (v/v) Tween 80. Το M1 δηλώνει το μάρτυρα απιονισμένο νερό και το M2 το μάρτυρα γαλακτωματοποιητή με απιονισμένο νερό.

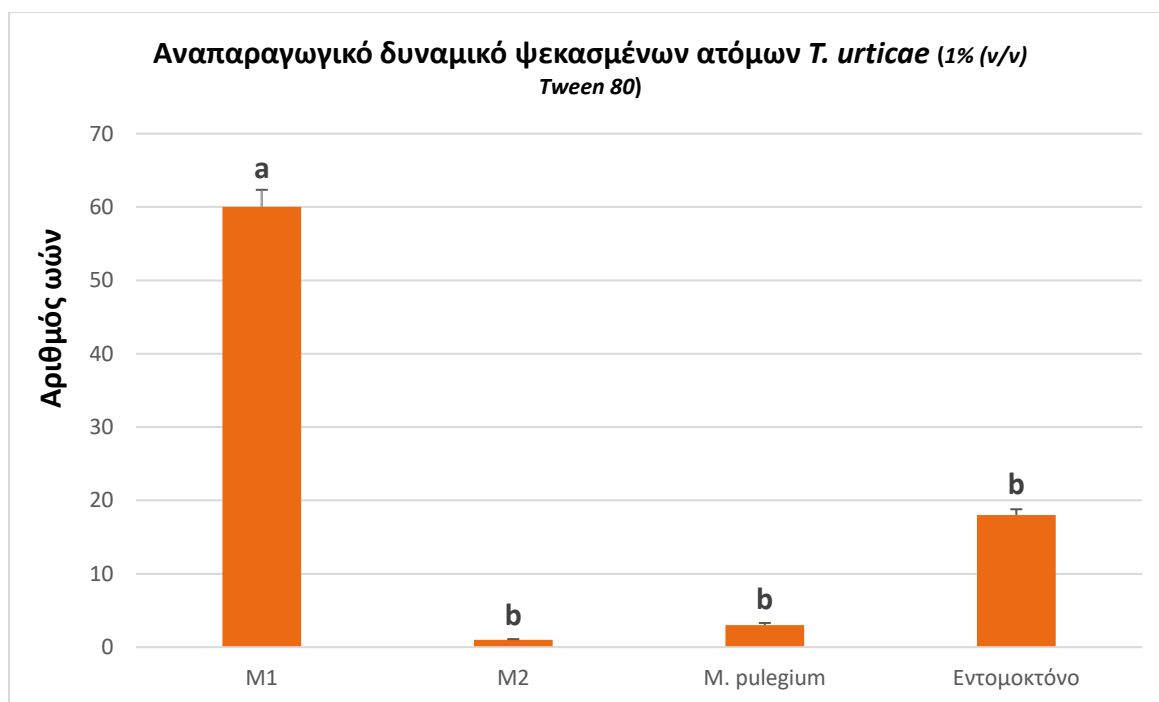
Η επίδρασή του ξεκίνησε δυο ημέρες μετά τον ψεκάσμο θανατώνοντας το 15% του αρχικού πληθυσμού και είχε ανοδική πορεία φτάνοντας την πέμπτη ημέρα στο 32,5% (Ιστόγραμμα 3.19). Το γαλάκτωμα που στερούνταν ελαίου συνέχισε να έχει δράση ξεκινώντας από τη δεύτερη μέρα με 12,5% θνησιμότητα, φτάνοντας τις επόμενες δυο στο 15% και καταλήγοντας την τελευταία μέρα στο 25%. Στον μάρτυρα (απιονισμένο νερό) βρέθηκαν ορισμένα νεκρά άτομα τα οποία δεν ξεπέρασαν το 10% του συνολικού πληθυσμού ενώ το διάλυμα του εντομοκτόνου συνέχισε να επιφέρει θνησιμότητα από την πρώτη μέρα (82,5%) η οποία κατέληξε την τελευταία να φτάνει το 95%. Οι επεμβάσεις διέφεραν μεταξύ τους ( $F=34.31$ , β.ε.=3,28,  $P<0,01$ ). Το εντομοκτόνο διέφερε με όλα ενώ τα υπόλοιπα δεν διέφεραν μεταξύ τους.



**Ιστόγραμμα 3.19** Συνολικό ποσοστό θνησιμότητας ανά ημέρα των ενηλίκων ατόμων *T. urticae* από την πειραματική διαδικασία επέμβασης με το γαλάκτωμα αιθέριου ελαίου του φλισκουνιού περιεκτικότητας 0,1% (v/v) Tween 80. Το M1 δηλώνει το μάρτυρα απιονισμένο νερό και το M2 το μάρτυρα γαλακτωματοποιητή με απιονισμένο νερό.

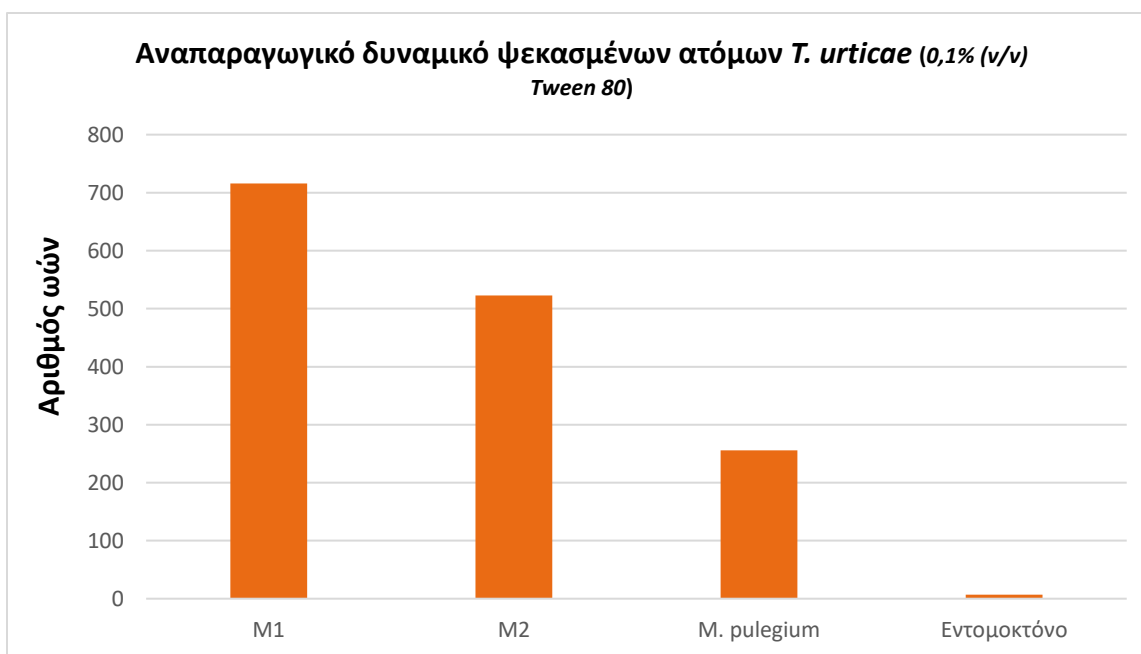
### 3.3.4.3 Επίδραση στο αναπαραγωγικό δυναμικό

Μία ημέρα μετά την επέμβαση με το γαλάκτωμα αιθέριου ελαίου του φλισκουιού περιεκτικότητας γαλακτωματοποιητή 1% (v/v) (Ιστόγραμμα 3.20) τα εναπομείναντα θηλυκά άτομα του *T. urticae* εναπόθεσαν στο σύνολο των επαναλήψεων πολύ μικρότερο αριθμό ωών (3) σε σύγκριση με αυτά του μάρτυρα (60) (απιονισμένο νερό) ( $F=9,27$ ,  $\beta.ε.=3,34$ ,  $P<0,001$ ). Ακόμη λιγότερα ήταν τα ωά που βρέθηκαν στα δείγματα του μάρτυρα γαλακτωματοποιητή και νερό (1) ως αποτέλεσμα και του μεγάλου ποσοστού θνησιμότητας που είχε επιφέρει στα ενήλικα άτομα. Τα άτομα που κατάφεραν και επιβίωσαν του εντομοκτόνου διαλύματος εναπόθεσαν 18 ωά.



**Ιστόγραμμα 3.20** Αριθμός ωών προερχόμενων από ψεκασμένα θηλυκά άτομα του *T. urticae* 24 ώρες μετά την επέμβαση με το γαλάκτωμα αιθέριου ελαίου του φλισκουιού περιεκτικότητας 1% (v/v) Tween 80. Με M1 δηλώνεται ο μάρτυρας απιονισμένο νερό και με M2 ο μάρτυρας γαλακτωματοποιητή με απιονισμένο νερό.

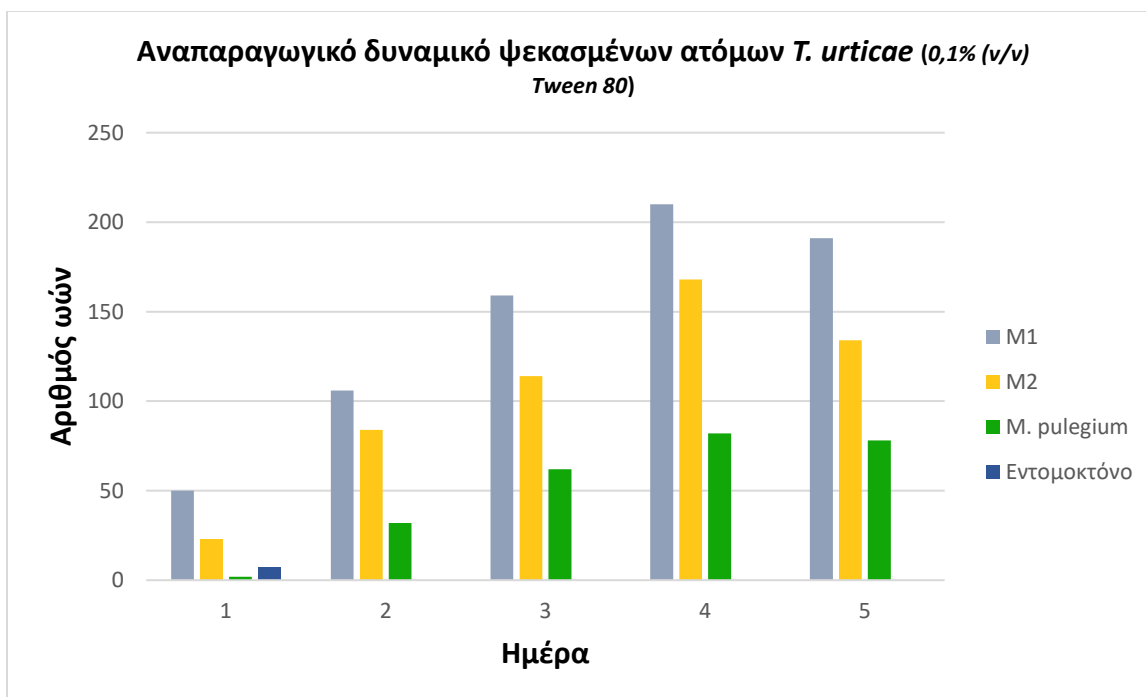
Κατά τη δεύτερη δοκιμή του ελαίου με περιεκτικότητα γαλακτωματοποιητή 0,1% (v/v) το έλαιο φάνηκε να δρα σημαντικά επί του αριθμού των ωών που εναποτέθηκαν. Ο συνολικός αριθμός των ωών στα δείγματα του ελαίου διέφερε σημαντικά με τον αριθμό των ωών του μάρτυρα απιονισμένο νερό και του μάρτυρα γαλακτωματοποιητή με απιονισμένο νερό (Ιστόγραμμα 3.21).



**Ιστόγραμμα 3.21** Συνολικός αριθμός ωών προερχόμενων από ψεκασμένα θηλυκά άτομα του *T. urticae* με το γαλάκτωμα του αιθέριου ελαίου του φλισκουριού περιεκτικότητας 0,1% (v/v) Tween 80. Το M1 απεικονίζει το μάρτυρα απιονισμένο νερό και το M2 το μάρτυρα γαλακτωματοποιητή με απιονισμένο νερό.

Η διαφορά ήταν εμφανής από την πρώτη ημέρα όπου ανευρέθηκαν μόλις 2 ωά σε σύγκριση με τα 50 του απιονισμένου νερού και τα 23 του γαλακτώματος χωρίς έλαιο (Ιστόγραμμα 3.22). Πρέπει να σημειωθεί ότι ο αριθμός των ωών προήλθε από ίσο αριθμό θηλυκών ατόμων καθώς την πρώτη ημέρα μετά τον ψεκασμό τους καμία από τις επεμβάσεις (εκτός του εντομοκτόνου διαλύματος) δεν επέφερε θνησιμότητα (βλ. Ιστόγραμμα 3.19). Τις επόμενες ημέρες αυτή η διαφορά του αριθμού των ωών συνεχίστηκε μέχρι και την τελευταία. Το γαλάκτωμα που στερούνταν ελαίου επέφερε κάποια μείωση των ωών σε σύγκριση με το μάρτυρα απιονισμένο νερό ενώ τα εναπομείναντα άτομα τα οποία είχαν ψεκαστεί με το εντομοκτόνο διάλυμα κατάφεραν να εναποθέσουν ένα μικρό αριθμό ωών μόνο κατά την πρώτη ημέρα.

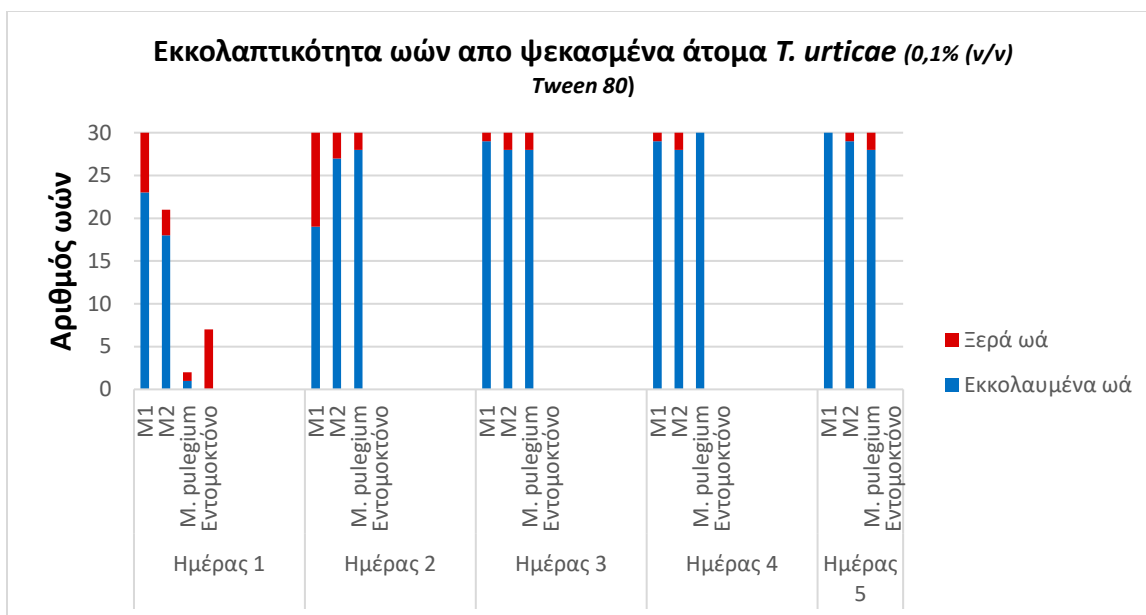




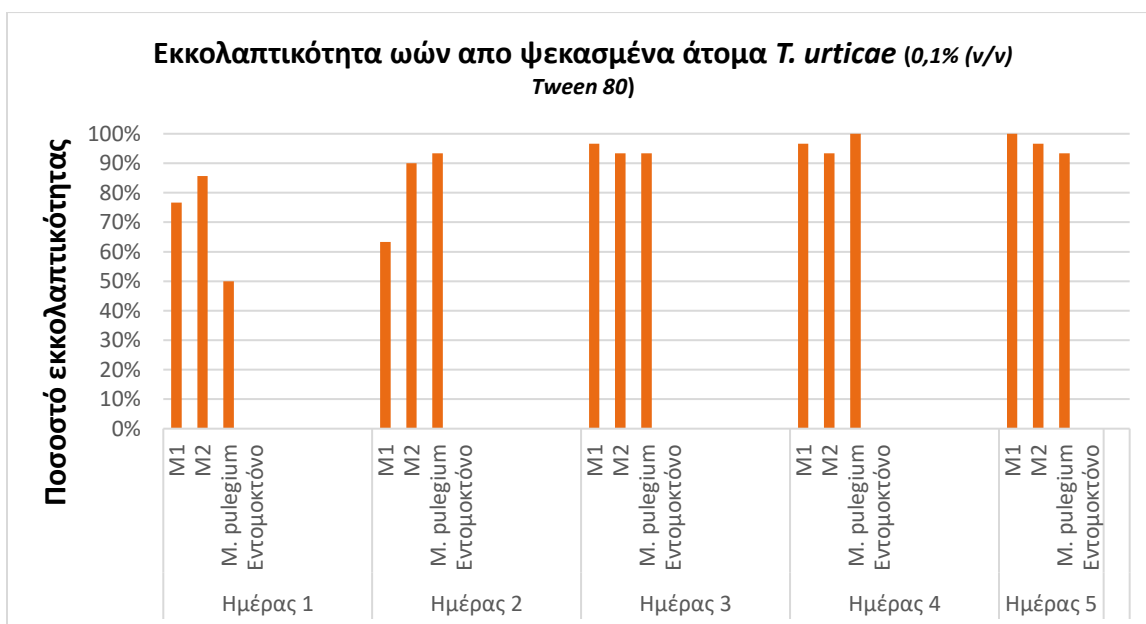
**Ιστόγραμμα 3.22** Αριθμός ωών ανά ημέρα προερχόμενων από ψεκασμένα θηλυκά άτομα του *T. urticae* με το γαλάκτωμα του αιθέριου ελαίου του φλισκουινίου περιεκτικότητας 0,1% (v/v) Tween 80. Το M1 απεικονίζει το μάρτυρα απιονισμένο νερό και το M2 το μάρτυρα γαλακτωματοποιητή με απιονισμένο νερό.

#### 3.3.4.4 Επίδραση στην εκκολαπτικότητα των ωών

Όπως φαίνεται και από τα ιστογράμματα 3.23 και 3.24 το γαλάκτωμα του ελαίου του φλισκουινίου δεν φάνηκε να παρουσιάζει κάποιου είδους επίδραση στην εκκολαπτικότητα των ωών προερχόμενων από ψεκασμένα άτομα του *T. urticae*. Τα ποσοστά εκκόλαψης των περισσότερων ημερών συμβαδίζουν με αυτά των μαρτύρων (απιονισμένο νερό και γαλάκτωμα χωρίς έλαιο) (Ιστόγραμμα 3.24).



**Ιστόγραμμα 3.23** Αριθμός ωών (επιτυχώς εκκολαπτόμενων και μη) προερχόμενων από ψεκασμένα θηλυκά άτομα του *T. urticae* με το γαλάκτωμα αιθέριου ελαίου του φλισκουνιού περιεκτικότητας γαλακτωματοποιητή 0,1% (v/v). Ο άξονας x απεικονίζει την ημέρα συλλογής των ωών. Με M1 δηλώνεται ο μάρτυρας απιονισμένο νερό και με M2 ο μάρτυρας γαλακτωματοποιητή με απιονισμένο νερό.



**Ιστόγραμμα 3.24** Ποσοστό εκκολαπτικότητας ωών προερχόμενων από ψεκασμένα θηλυκά άτομα του *T. urticae* με το γαλάκτωμα αιθέριου ελαίου του φλισκουνιού περιεκτικότητας γαλακτωματοποιητή 0,1% (v/v). Ο άξονας x απεικονίζει την ημέρα συλλογής των ωών. Με M1 δηλώνεται ο μάρτυρας απιονισμένο νερό και με M2 ο μάρτυρας γαλακτωματοποιητή με απιονισμένο νερό.

### 3.4 Αποτελεσματικότητα Εγκλεισμένου Αιθέριου Ελαίου

#### 3.4.1 Θνησιμότητα ενηλίκων ατόμων *M. persicae*

Η διάρκεια δράσης και τα ποσοστά θνησιμότητας του εγκλεισμένου αιθέριου ελαίου από την κάθε ημέρα ξεχωριστά όταν δοκιμάσθηκε υπολειμματικά απεικονίζονται στα ιστογράμματα 3.25-3.28. Όσες επεμβάσεις είχαν μηδενική θνησιμότητα δεν εμφανίζονται.

Σε όλα τα ιστογράμματα της παραγράφου 3.4 έγινε χρήση των παρακάτω συντομεύσεων:

**Μ1:** μάρτυρας απιονισμένο νερό

**ΕΦΛ:** γαλάκτωμα αιθέριου ελαίου του φλισκουνιού (έλαιο από φλισκούνη)

**ΕΕΦΛ:** διάλυμα εγκλεισμένου αιθέριου ελαίου του φλισκουνιού

**ΕΝΤ:** διάλυμα εντομοκτόνου.

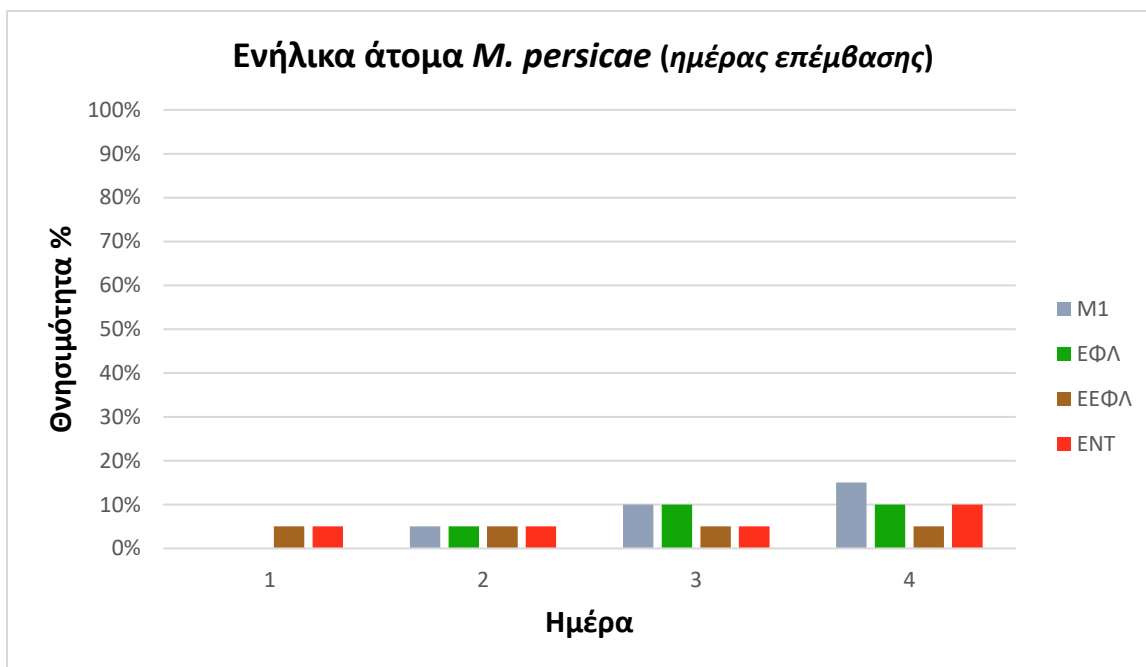
Τα ποσοστά θνησιμότητας των ατόμων του *M. persicae* τα οποία τοποθετήθηκαν την ίδια ημέρα της επέμβασης στα ψεκασμένα τεμάχια φύλλων δεν ξεπέρασαν μέχρι και την τελευταία ημέρα των παρατηρήσεων το 10% ακόμη και σε αυτά του εντομοκτόνου διαλύματος (Ιστόγραμμα 3.25). Η θνησιμότητα επίσης του μάρτυρα (απιονισμένο νερό) κυμαίνονταν στα ίδια επίπεδα, με την τελευταία ημέρα να ανεβαίνει κατά 5%.

Στα άτομα που τοποθετήθηκαν μία ημέρα μετά την επέμβαση φάνηκε ένα ποσοστό θνησιμότητας της τάξεως του 5% μόνο στα δείγματα τα οποία είχαν ψεκαστεί με το διάλυμα εγκλεισμένου ελαίου (Ιστόγραμμα 3.26). Το ποσοστό θνησιμότητας ξεκίνησε από την πρώτη ημέρα και παρέμεινε σταθερό μέχρι και την τελευταία.

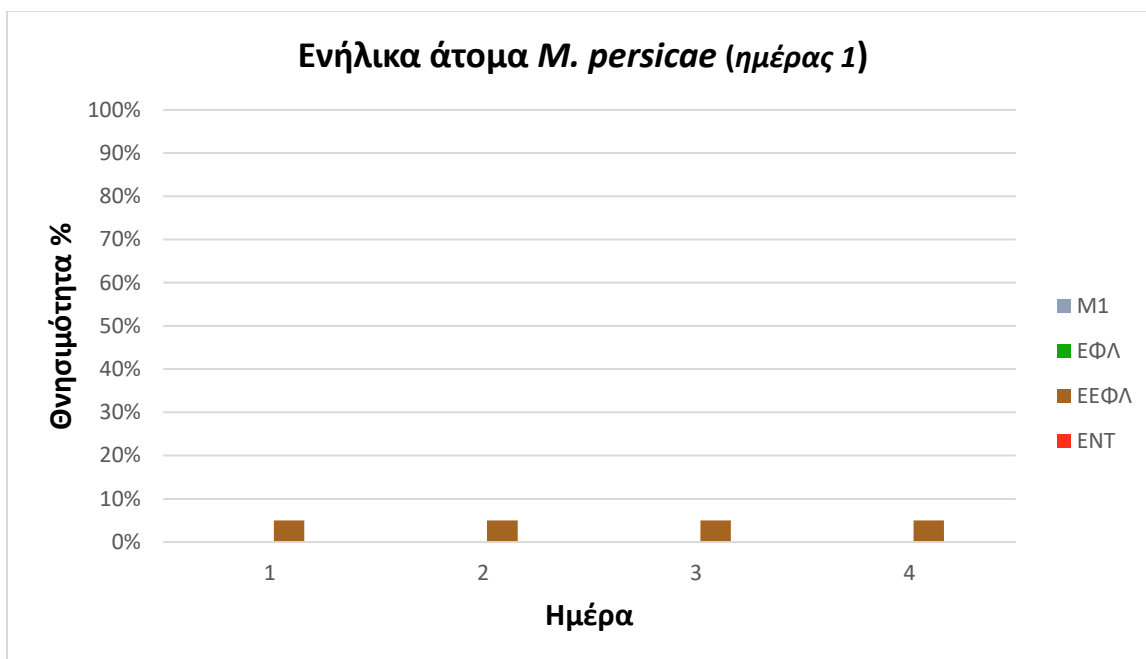
Η θνησιμότητα των ατόμων που τοποθετήθηκαν δύο ημέρες μετά την επέμβαση παρέμεινε σε όμοια επίπεδα (5%) για όλα τα διαλύματα μετά από δύο ημέρες. Την τρίτη ημέρα το ποσοστό του γαλακτώματος αιθέριου ελαίου διέφερε σε σχέση με τα υπόλοιπα (10%) ενώ κατά την τέταρτη και τελευταία το ποσοστό του εγκλεισμένου ελαίου ανέβηκε και αυτό στα ίδια επίπεδα (Ιστόγραμμα 3.27).

Η θνησιμότητα των ατόμων που τοποθετήθηκαν τρεις ημέρες μετά την επέμβαση, μετά από μία ημέρα ήταν 15% για το εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο και 12,5% για το διάλυμα εντομοκτόνου (Ιστόγραμμα 3.28). Την τρίτη ημέρα το ποσοστό του εγκλεισμένου ελαίου ανήλθε στο 20% και του μάρτυρα (απιονισμένο νερό) σε 12,5%. Τελικώς, την τελευταία

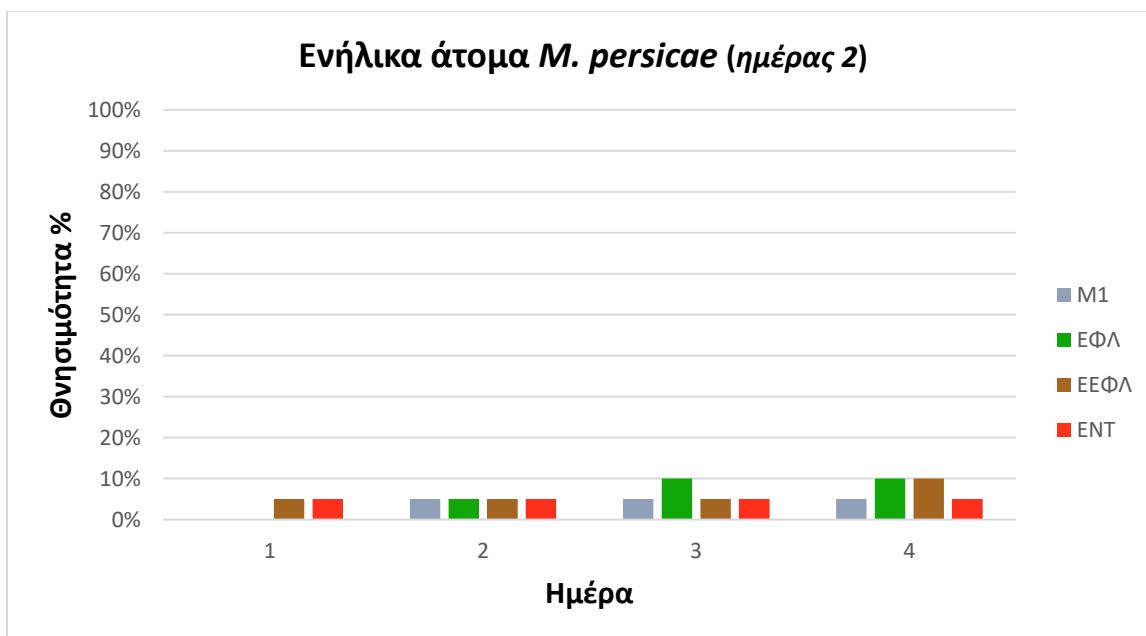
ημέρα στα δείγματα του μάρτυρα είχε νεκρωθεί το 12,5% του αρχικού πληθυσμού, σε αυτά του εγκλεισμένου ελαίου το 20% και σε αυτά του εντομοκτόνου διαλύματος το 25%. Το γαλάκτωμα του αιθέριου ελαίου του φλισκουνιού δεν είχε επιφέρει δράση σε καμία από τις ημέρες.



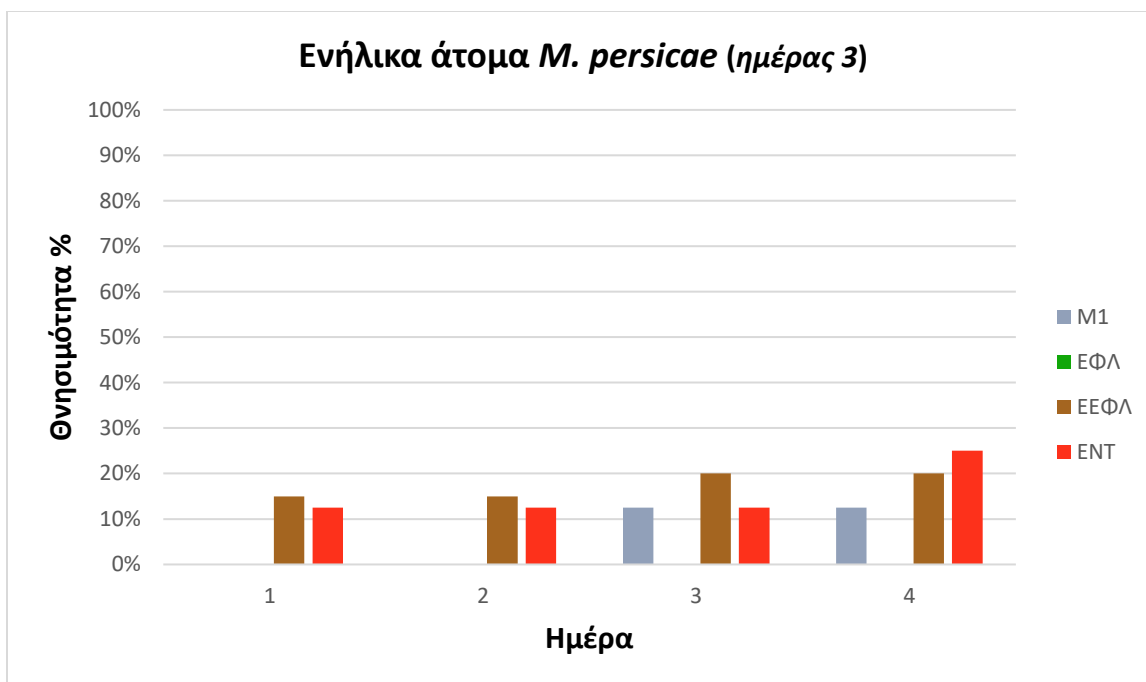
**Ιστόγραμμα 3.25** Συνολικό ποσοστό θνησιμότητας ανά ημέρα των ενηλίκων ατόμων του *M. persicae* από την πειραματική διαδικασία ελέγχου της υπολειμματικής δράσης του εγκλεισμένου αιθέριου ελαίου. Το ιστόγραμμα απεικονίζει την πορεία θνησιμότητας των ατόμων που τοποθετήθηκαν στα ψεκασμένα τεμάχια φύλλων την ημέρα της επέμβασης.



**Ιστόγραμμα 3.26** Συνολικό ποσοστό θνησιμότητας ανά ημέρα των ενηλίκων ατόμων του *M. persicae* από την πειραματική διαδικασία ελέγχου της υπολειμματικής δράσης του εγκλεισμένου αιθέριου ελαίου. Το ιστόγραμμα απεικονίζει την πορεία θνησιμότητας των ατόμων που τοποθετήθηκαν στα ψεκασμένα τεμάχια φύλλων μία ημέρα μετά την επέμβαση.

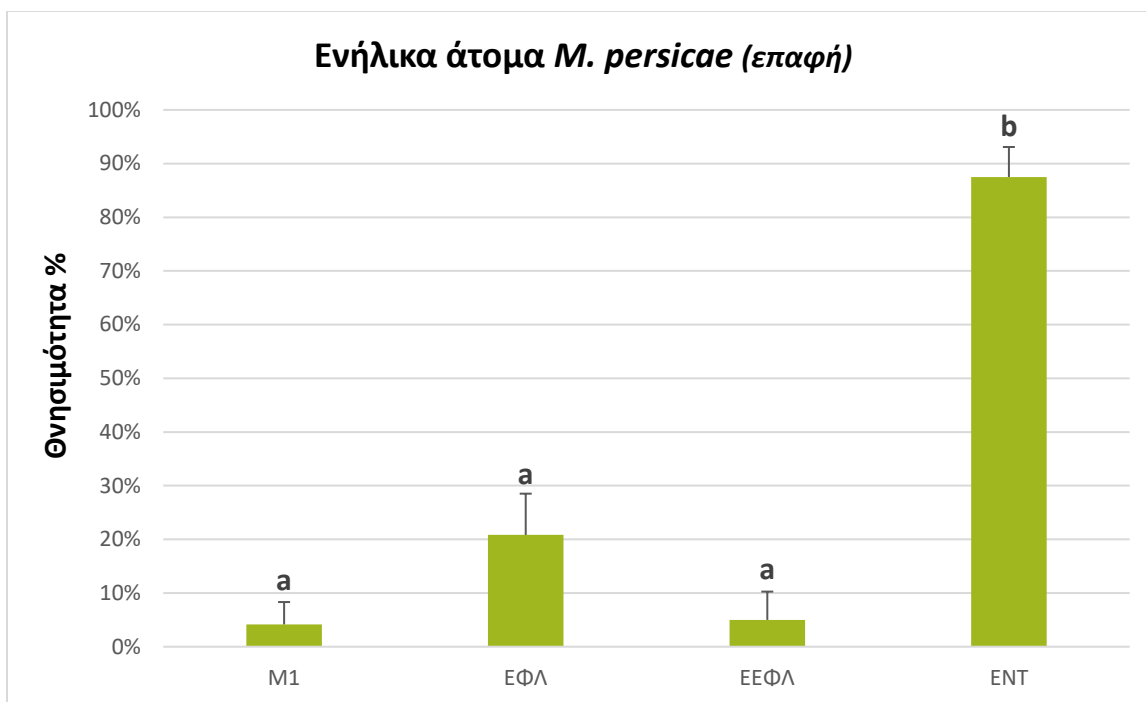


**Ιστόγραμμα 3.27** Συνολικό ποσοστό θνησιμότητας ανά ημέρα των ενηλίκων ατόμων του *M. persicae* από την πειραματική διαδικασία ελέγχου της υπολειμματικής δράσης του εγκλεισμένου αιθέριου ελαίου. Το ιστόγραμμα απεικονίζει την πορεία θνησιμότητας των ατόμων που τοποθετήθηκαν στα ψεκασμένα τεμάχια φύλλων δυο ημέρες μετά την επέμβαση.

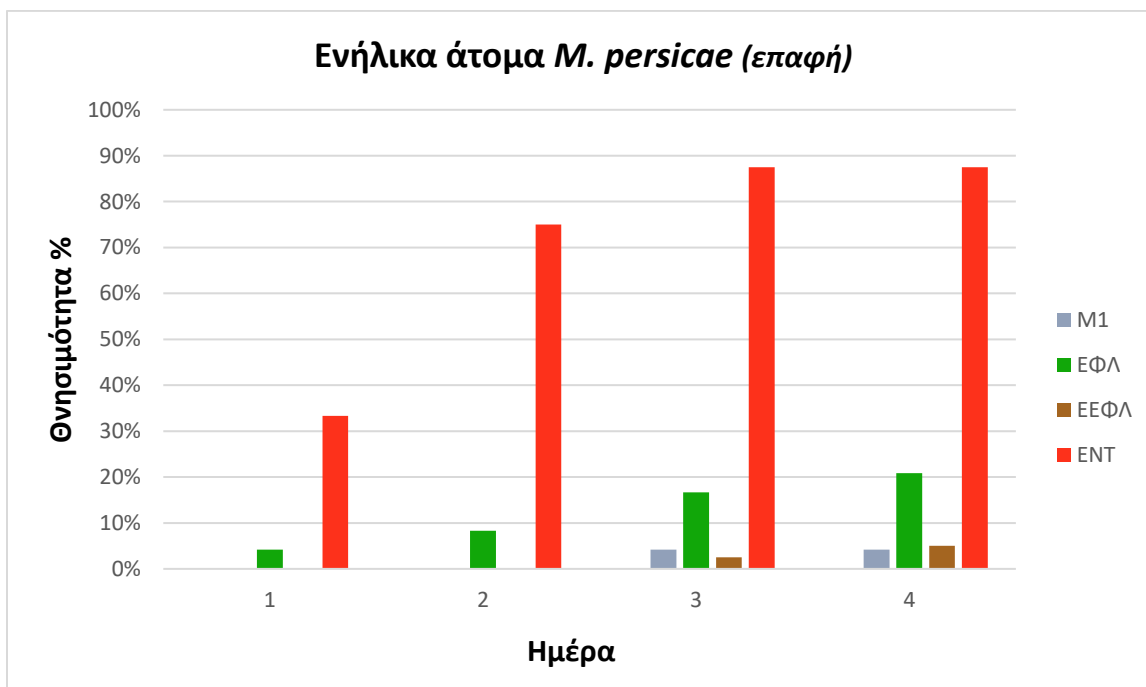


**Ιστόγραμμα 3.28** Συνολικό ποσοστό θνησιμότητας ανά ημέρα των ενηλίκων ατόμων του *M. persicae* από την πειραματική διαδικασία ελέγχου της υπολειμματικής δράσης του εγκλεισμένου αιθέριου ελαίου. Το ιστόγραμμα απεικονίζει την πορεία θνησιμότητας των ατόμων που τοποθετήθηκαν στα ψεκασμένα τεμάχια φύλλων τρεις ημέρες μετά την επέμβαση.

Το συνολικό ποσοστό θνησιμότητας των ενηλίκων του *M. persicae* μετά από τον απευθείας ψεκασμό τους με το διάλυμα εγκλεισμένου ελαίου δεν ξεπέρασε το 5%, ήταν μικρότερο αλλά δεν διέφερε από την επίδραση του ελαίου ( $F=37,60$ , β.ε.=4,24,  $P<0,001$ ) (Ιστόγραμμα 3.29). Τις δυο πρώτες ημέρες μετά την επέμβαση η θνησιμότητα ήταν μηδενική (Ιστόγραμμα 3.30), την τρίτη μέρα παρουσίασε ένα ποσοστό της τάξεως του 2,5% και κατά την τέταρτη και τελευταία έφτασε όπως προαναφέρθηκε το 5%.



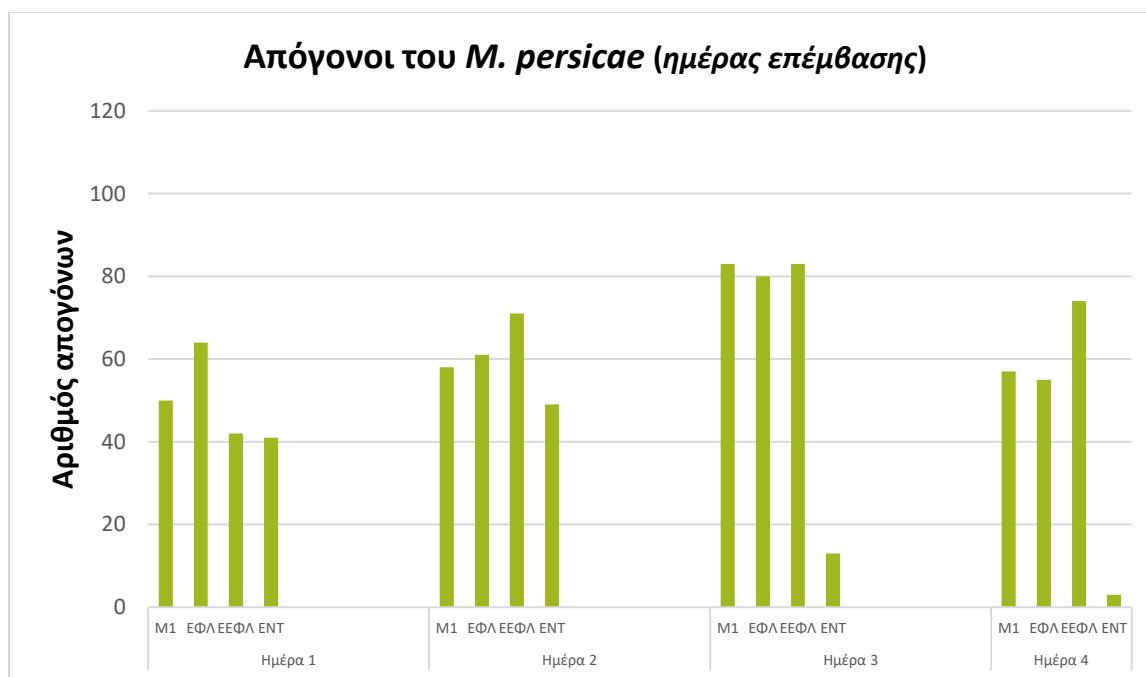
**Ιστόγραμμα 3.29** Συνολικό ποσοστό θνησιμότητας των ψεκασμένων ενηλίκων ατόμων του *M. persicae* με το διάλυμα του εγκλεισμένου αιθέριου ελαίου του φλισκουνιού.



**Ιστόγραμμα 3.30** Ποσοστό θνησιμότητας ανά ημέρα των ψεκασμένων ενηλίκων ατόμων του *M. persicae* με το διάλυμα του εγκλεισμένου αιθέριου ελαίου του φλισκουνιού.

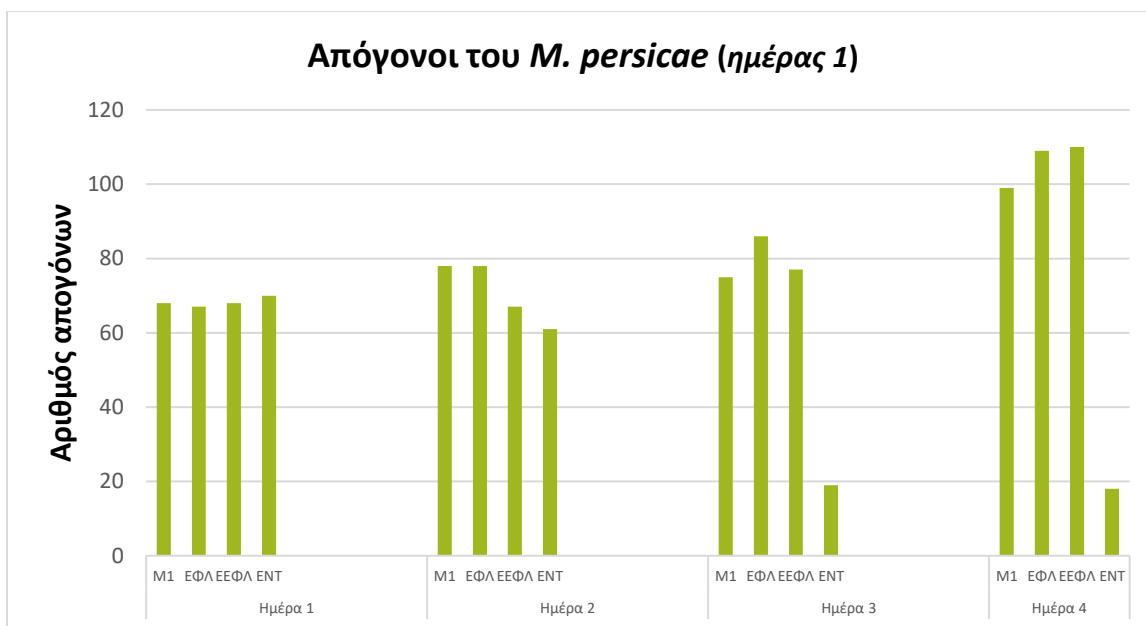
### 3.4.2 Επίδραση στο αναπαραγωγικό δυναμικό

Η επίδραση του διαλύματος του εγκλεισμένου αιθέριου ελαίου του φλισκουνιού στο αναπαραγωγικό δυναμικό του *M. persicae* από την πειραματική διαδικασία της υπολειμματικής δράσης παρουσιάζεται στα ιστογράμματα 3.31-3.34. Το διάλυμα του εγκλεισμένου ελαίου δεν επηρέασε σημαντικά τον αριθμό των απογόνων σε σύγκριση με αυτό του μάρτυρα απιονισμένο νερό. Η μόνη διαφορά έγκειται στο ιστόγραμμα 3.34 που απεικονίζει το αναπαραγωγικό δυναμικό των ατόμων που τοποθετήθηκαν στα ψεκασμένα τεμάχια φύλλων τρεις ημέρες μετά την επέμβαση όπου ο αριθμός των απογόνων αν και φαίνεται συγκριτικά πολύ μικρότερος προέρχεται όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο από μικρότερο αριθμό ενηλίκων ατόμων.

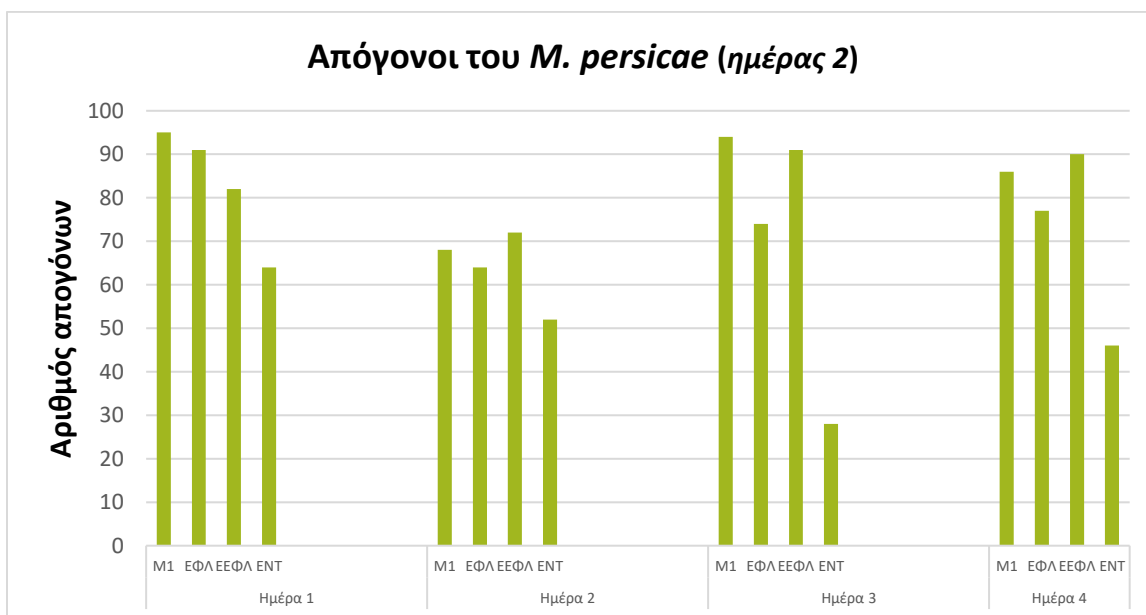


**Ιστόγραμμα 3.31** Αριθμός απογόνων ανά ημέρα των ενηλίκων ατόμων του *M. persicae* από την πειραματική διαδικασία ελέγχου της υπολειμματικής δράσης του εγκλεισμένου αιθέριου ελαίου. Το ιστόγραμμα απεικονίζει το αναπαραγωγικό δυναμικό των ατόμων που τοποθετήθηκαν στα ψεκασμένα τεμάχια φύλλων την ημέρα της επέμβασης.

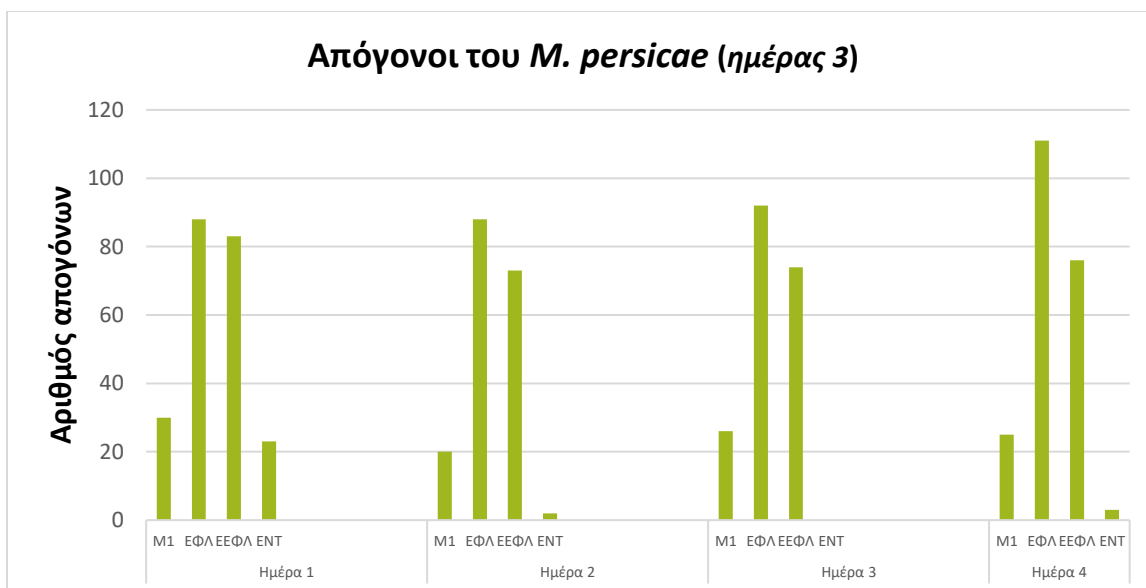




**Ιστόγραμμα 3.32** Αριθμός απογόνων ανά ημέρα των ενηλίκων ατόμων του *M. persicae* από την πειραματική διαδικασία ελέγχου της υπολειμματικής δράσης του εγκλεισμένου αιθέριου ελαίου. Το ιστόγραμμα απεικονίζει το αναπαραγωγικό δυναμικό των ατόμων που τοποθετήθηκαν στα ψεκασμένα τεμάχια φύλλων μία ημέρα μετά την επέμβαση.

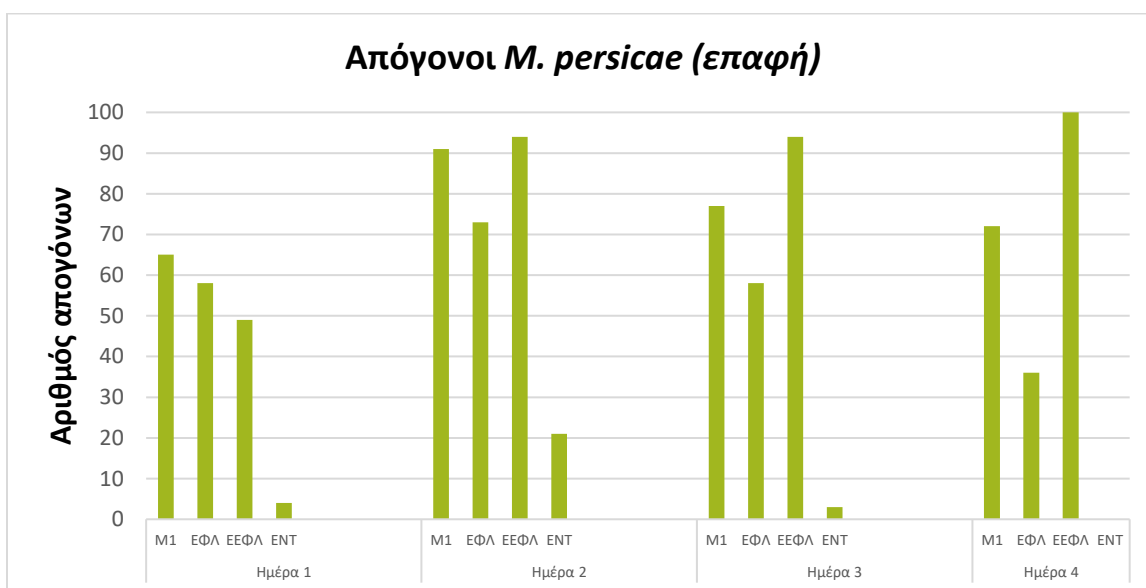


**Ιστόγραμμα 3.33** Αριθμός απογόνων ανά ημέρα των ενηλίκων ατόμων του *M. persicae* από την πειραματική διαδικασία ελέγχου της υπολειμματικής δράσης του εγκλεισμένου αιθέριου ελαίου. Το ιστόγραμμα απεικονίζει το αναπαραγωγικό δυναμικό των ατόμων που τοποθετήθηκαν στα ψεκασμένα τεμάχια φύλλων δυο ημέρες μετά την επέμβαση.



**Ιστόγραμμα 3.34** Αριθμός απογόνων ανά ημέρα των ενηλίκων ατόμων του *M. persicae* από την πειραματική διαδικασία ελέγχου της υπολειμματικής δράσης του εγκλεισμένου αιθέριου ελαίου. Το ιστόγραμμα απεικονίζει το αναπαραγωγικό δυναμικό των ατόμων που τοποθετήθηκαν στα ψεκασμένα τεμάχια φύλλων τρεις ημέρες μετά την επέμβαση.

Όπως και στην προηγούμενη πειραματική διαδικασία της υπολειμματικότητας έτσι και στην επαφή του εγκλεισμένου ελαίου με το *M. persicae* δεν φάνηκε να παρουσιάζεται κάποια δράση του στον αριθμό των απογόνων (Ιστόγραμμα 3.35).



**Ιστόγραμμα 3.35** Αριθμός απογόνων ανά ημέρα των ψεκασμένων ενηλίκων ατόμων του *M. persicae* με το διάλυμα του εγκλεισμένου αιθέριου ελαίου του φλισκουνιού.

## Κεφάλαιο 4

### Συζήτηση - Συμπεράσματα

Τα προβλήματα που έχουν παρουσιαστεί από τη χρήση των συνθετικών παρασιτοκτόνων όπως η μόλυνση του περιβάλλοντος, οι επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία, η επίδρασή τους σε οργανισμούς μη στόχους, τα υπολείμματα που αφήνουν καθώς επίσης και το κύριο θέμα της ανάπτυξης ανθεκτικότητας έχουν στρέψει την προσοχή και το ενδιαφέρον των ερευνητών στην προσπάθεια για ανεύρεση εναλλακτικών λύσεων φυτοπροστασία ασφαλέστερων και φιλικότερων προς το περιβάλλον. Πλήθος μελετών, όπως παρουσιάστηκαν και στις παραγράφους 1.1.2.2 και 1.2.2 έχουν διερευνήσει τη δράση πολλών αιθέριων ελαίων προερχόμενων από αρωματικά φυτά εναντίον επιβλαβών εντόμων και ακάρεων ως μια τέτοια πιθανή εναλλακτική λύση. Τα τελευταία έτη γίνεται επίσης προσπάθεια να ξεπεραστούν ορισμένα μειονεκτήματα που παρουσιάζουν τα αιθέρια έλαια ως πτητικές ουσίες με τον εγκλεισμό τους σε διάφορα μικροσωματίδια με στόχο να τους παρέχεται μεγαλύτερη σταθερότητα, προστασία και ελεγχόμενη απελευθέρωση των συστατικών τους.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η επίδραση δυο αιθέριων ελαίων προερχόμενων από αρωματικά φυτά της ελληνικής χλωρίδας (μελισσόχορτο και φλισκούνη) σε επιβλαβή έντομα (*Trialeurodes vaporariorum*, *Tuta absoluta*, *Myzus persicae*) και ακάρεια (*Tetranychus urticae*) κηπευτικών καλλιεργειών. Διερευνήθηκε επίσης η πιθανή βελτίωση της υπολειμματικής διάρκειας και δράσης του αιθέριου ελαίου του φλισκουνιού με τον εγκλεισμό του σε μικροσωματίδια του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*.

Η απόδοση του μελισσόχορτου σε αιθέριο έλαιο ως μέσος όρος των 5 αποστάξεων που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τα φύλλα του ήταν 0,2% (v/w). Η εκατοστιαία αυτή απόδοση συμπίπτει με σχετικές μελέτες οι οποίες αναφέρουν τη μικρή γενικά απόδοση του μελισσόχορτου σε έλαιο. Χαρακτηριστικά, οι Moradkhani et al. (2010) σημειώνουν ότι οι συνήθεις αποδόσεις του μελισσόχορτου κυμαίνονται από 0,02% (v/w) έως 0,3% (v/w). Μελέτη επίσης των Adinee et al. (2009) σχετικά με τη χημική του σύσταση έδειξε την απόδοσή του σε έλαιο να κυμαίνεται στο 0,32% (v/w) χρησιμοποιώντας τα φύλλα του φυτού και ως μέθοδο παραλαβής υδροαπόσταξη με συσκευή Clevenger για διάστημα 3 ωρών.

Σε αντίθεση με το μελισσόχορτο η απόδοση του φλισκουριού χρησιμοποιώντας τα φύλλα και τα άνθη του ήταν 4% (v/w) ως μέσος όρος 5 αποστάξεων. Οι μεγάλες αυτές αποδόσεις του φλισκουριού σε αιθέριο έλαιο συμφωνούν με αυτές από προηγούμενες μελέτες όπως των Zantar et al. (2015) οι οποίοι αποστάζοντας τα φύλλα και τα άνθη του φυτού με υδροαπόσταξη είχαν απόδοση σε έλαιο 3,5% (v/w) ενώ οι Zekri et al. (2013) σημείωσαν αποδόσεις που έφτασαν μέχρι και το 6,2% (v/w) χρησιμοποιώντας αποξηραμένα φύλλα και άνθη και εφαρμόζοντας υδροαπόσταξη με συσκευή Clevenger για διάστημα 3 ωρών.

Η μελέτη της χημικής σύστασης έδειξε ότι το έλαιο του μελισσόχορτου είχε δυο κύρια συστατικά, τη γερανιάλη η οποία συμμετείχε σε ποσοστό 38% και τη νεράλη σε ποσοστό 26,88%. Σε αρκετές μελέτες εντοπίζονται τα δύο αυτά συστατικά ως βασικά. Στη μελέτη των Abdellatif et al. (2014) και Abdellatif and Hassani (2015) σε δείγματα μελισσόχορτου από την Αλγερία η γερανιάλη και η νεράλη ήταν τα κύρια συστατικά με ποσοστά 44,2% - 30,2% και 33,79% - 24,04% αντίστοιχα. Σε αντίστοιχη μελέτη των Wierdak et al. (2014) σε δείγμα μελισσόχορτου από την Πολωνία, η γερανιάλη και η νεράλη ήταν τα βασικά του συστατικά με ποσοστό συμμετοχής 45,2% και 32,8% αντίστοιχα.

Στο αιθέριο έλαιο του φλισκουριού τα βασικά συστατικά βρέθηκαν να είναι επίσης δύο, η πουλεγόνη (43,07%) και η πιπεριτενόνη (37,45%). Η πουλεγόνη σύμφωνα με τους Boukhebt et al. (2011) αποτελεί το πρωτεύον και κύριο συστατικό των περισσότερων δειγμάτων φλισκουριού το οποίο χαρακτηρίζει και το χημειότυπό του ακολουθούμενο από πιπεριτενόνη ή πιπεριτόνη και εν συνεχεία από ισομινθόνη. Ο συνδυασμός πουλεγόνης και

πιπεριτενόνης ως των δυο βασικών συστατικών του ελαίου του φλισκουνιού εμφανίζεται σε αρκετές μελέτες. Οι Ouakouak et al. (2015) μελέτησαν τη χημική σύσταση του ελαίου του φλισκουνιού από την Αλγερία και βρήκαν την πουλεγόνη να μετέχει ως κύριο συστατικό σε ποσοστό 46,41% και την πιπεριτενόνη να ακολουθεί με ποσοστό 23,3%. Οι Zekri et al. (2013) σε δείγματα από το Μαρόκο ανέφεραν την πουλεγόνη να μετέχει ως βασικό συστατικό σε ποσοστά από 68,86-71,97% και την πιπεριτενόνη να ακολουθεί με ποσοστά από 24,81-26,04% ενώ οι Foganholi et al. (2015) σε δείγματα από τη Βραζιλία ανέφεραν την πουλεγόνη και πιπεριτενόνη σε ποσοστά 26,65% και 20,41% αντίστοιχα. Τέλος, οι Kokkini et al. (2002) σε μελέτη τους για την περιεκτικότητα δειγμάτων φλισκουνιού σε πουλεγόνη από 10 διαφορετικές περιοχές της Ελλάδος ανέφεραν σε δείγμα από την Εύβοια την πουλεγόνη να μετέχει ως κύριο συστατικό σε ποσοστό 42,9% και να ακολουθούν η ισομινθόνη με την πιπεριτενόνη με ποσοστά 13,3% και 12,4% αντίστοιχα.

Οι περισσότερες μελέτες για την εντομοκτόνο-ακαρεοκτόνο και απωθητική δράση των αιθέριων των αιθέριων ελαίων του μελισσόχορτου και του φλισκουνιού όπως σημειώθηκαν στην παράγραφο 1.2.2 αναφέρονται κυρίως για τη δράση τους υπό τη μορφή ατμών, είτε σε έντομα επιβλαβή για τις καλλιέργειες είτε σε έντομα τα οποία προσβάλλουν αποθηκευμένα προϊόντα. Στην παρούσα μελέτη η δράση τους αξιολογήθηκε μέσω ψεκασμού τους υπό τη μορφή γαλακτωμάτων προσπαθώντας για μια εύκολη και πρακτική εφαρμογή των ελαίων.

Και τα δυο έλαια κατά την πειραματική διαδικασία επί των ωών του *T. vaporariorum* φάνηκαν να προσδίδουν μια αξιόλογη αποτελεσματικότητα όταν συνδυάστηκαν με περιεκτικότητα γαλακτωματοποιητή 1% (v/v) η οποία για το φλισκούνι συγκεκριμένα έφτασε μέχρι 35,71% ωστόσο παρόμοια αποτελεσματικότητα βρέθηκε και για τον γαλακτωματοποιητή. Σε μικρή συγκέντρωση γαλακτωματοποιητή η δράση του ελαίου μειώθηκε αρκετά (7%) αλλά ήταν σημαντικά υψηλότερη από τον γαλακτωματοποιητή. Σημαντική επίσης ήταν η δράση του γαλακτώματος του ελαίου του φλισκουνιού επί των νυμφών του εντόμου που όμως ήταν παρόμοια με αυτή του γαλακτωματοποιητή. Ωστόσο, ισχυρή απωθητική δράση στα ενήλικα του αλευρώδους βρέθηκε να διαθέτει το έλαιο του μελισσόχορτου που ήταν σημαντικά εντονότερη από αυτή του γαλακτωματοποιητή.

Αναζητήθηκαν μελέτες για τη δράση των αιθέριων ελαίων των επιλεγόμενων φυτικών ειδών υπό την ίδια μορφή επέμβασης κατά του *T. vaporariorum* όμως η εφαρμογή

τους ήταν κυρίως υπό τη μορφή ατμών. Χαρακτηριστικά, οι Choi et al. (2003) αναφέρουν ότι οι ατμοί του ελαίου του φλισκουνιού είχαν τοξική δράση εναντίον όλων των σταδίων του *T. vaporariorum* μετά από 24 ώρες με το ποσοστό θνησιμότητας να φτάνει το 100% για τα ενήλικα άτομα και τις νύμφες και το 91% για τα ωά.

Η τοξική δράση και των δυο αιθέριων ελαίων στα ωά και στις προνύμφες του *T. absoluta* δεν διέφερε σημαντικά από αυτή του γαλακτωματοποιητή στις συγκεντρώσεις 1% και 0,1% (v/v). Ωστόσο, σημαντικά μεγαλύτερα ποσοστά θνησιμότητας προκάλεσαν τα έλαια σε σχέση με τον γαλακτωματοποιητή σε προνύμφες του εντόμου που τοποθετήθηκαν σε ψεκασμένα φύλλα. Αν και το ποσοστό θνησιμότητας ήταν χαμηλό (12-15%) αυτή η δράση των ελαίων θα μπορούσε να αξιολογηθεί περαιτέρω. Δεν αναφέρονται μελέτες για τη δράση των ελαίων του μελισσόχορτου και του φλισκουνιού επί του *T. absoluta* όμως έχουν μελετηθεί άλλα αιθέρια έλαια, με διαφορετικό τρόπο εφαρμογής και σε διαφορετικές συνθήκες. Οι Adil et al. (2015) αναφέρουν ότι το διάλυμα αιθέριου ελαίου του *Cinnamomum zeylanicum* εφαρμοζόμενο σε διηθητικό φίλτρο και ερχόμενο σε επαφή με τις προνύμφες του *T. absoluta* σε δόση 0.054  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$  προκάλεσε τη θνησιμότητά τους σε ποσοστό 100% μετά από 4 ώρες έκθεσης. Επίσης, οι Nehal et al. (2014) σημειώνουν ότι τα έλαια των *Ocimum basilicum* (βασιλικός), *Pimpinella anisum* (γλυκάνισος), *Ruta graveolens* (απήγανος) και *Eucalyptus* spp. (ευκάλυπτος) εφαρμοζόμενα δια ψεκασμού σε συγκέντρωση 0,5% και σε συνθήκες αγρού κατάφεραν να μειώσουν την προσβολή από το *T. absoluta* κατά 67,15, 67,97, 65,36 και 57,11% αντίστοιχα με τρεις ψεκασμούς σε διάστημα δυο εβδομάδων με τον πρώτο ψεκασμό να λαμβάνει χώρα 40 ημέρες μετά τη μεταφύτευση των φυτών τομάτας.

Το αιθέριο έλαιο του φλισκουνιού εξετάστηκε για την τοξική του δράση εναντίον του *M. persicae* καθώς επίσης και για την επίδρασή του στο αναπαραγωγικό του δυναμικό. Το έλαιο επέφερε μεγαλύτερη συγκριτικά θνησιμότητα (20,83%) στα ενήλικα άπτερα άτομα του εντόμου σε σχέση με τον γαλακτωματοποιητή (0,1% v/v) που προκάλεσε θνησιμότητα 8,3%. Οι Petrakis et al. (2014) αναφέρουν ότι το γαλάκτωμα του αιθέριου ελαίου του φλισκουνιού το οποίο είχε παραληφθεί με υδροαπόσταξη και το οποίο είχε ως βασικό συστατικό την πιπεριτόνη σε ποσοστό 90,4% επέφερε 87% θνησιμότητα κατά του *M. persicae* στη συγκέντρωση 500  $\mu\text{L}/\text{L}$ . Σημειώνουν επίσης ότι το αναπαραγωγικό δυναμικό του εντόμου μηδενίστηκε. Φαίνεται καθαυτό τον τρόπο η πολύ μεγάλη σημασία

και το μεγάλο ρόλο που διαδραματίζει η χημική σύσταση του εκάστοτε αιθέριου ελαίου ακόμη και όταν αυτό προέχεται από το ίδιο φυτικό είδος και εφαρμόζεται στον ίδιο εχθρό. Οι Digilio et al. (2008) αναφέρουν επίσης ότι οι ατμοί από το έλαιο του μελισσόχορτου προκάλεσαν 100% θνησιμότητα των νυμφών του *M. persicae* μετά από 24 ώρες.

Η πειραματική διαδικασία ελέγχου της δράσης του αιθέριου ελαίου του φλισκουνιού περιεκτικότητας γαλακτωματοποιητή 0,1% (v/v) στο *T. urticae* επέφερε σημαντικά αποτελέσματα σε όλα τα στάδια του ακάρεως όπου δοκιμάστηκε. Το γαλάκτωμα του ελαίου επέφερε το μεγαλύτερο ποσοστό θνησιμότητας (62,5%) στα ωά του ακάρεως και διέφερε σημαντικά από τον γαλακτωματοποιητή (31%). Το έλαιο φάνηκε να δρα πολύ σημαντικά επίσης επί του αναπαραγωγικού τους δυναμικού όπου ο αριθμός των ωών τα οποία εναποθέτονταν ήταν πολύ μικρότερος σε σύγκριση με αυτού των μαρτύρων (απιονισμένου νερού και γαλακτωματοποιητή). Σύμφωνα με τα παραπάνω, συμπεραίνεται ότι η υψηλή δράση του ελαίου στα ωά και τα ενήλικα θηλυκά άτομα του ακάρεως θα μπορούσε να αξιοποιηθεί ως ένας περιοριστικός παράγοντας της ανάπτυξης των προσβολών του πολυφάγου αυτού ακάρεως. Το έλαιο του φλισκουνιού μελετήθηκε υπό τη μορφή ατμών κατά του *T. urticae* όπου επετεύχθη μείωση του αναπαραγωγικού δυναμικού του ακάρεως κατά 83,2% και θνησιμότητα των ωών του σε ποσοστό 91,5% (Pavela et al., 2016) ενώ δοσολογία 5,73  $\mu\text{L L}^{-1}$  αέρα θανάτωσε το 90% του πληθυσμού των ενηλίκων ατόμων (Mozaffari et al., 2013). Όσων αφορά μελέτες διαφορετικών αιθέριων ελαίων, οι Afify et al. (2012) αναφέρουν ότι το έλαιο του *Chamomilla recutita* (χαμομήλι) εφαρμοζόμενο δια ψεκασμού επέφερε 100% θνησιμότητα σε ενήλικα θηλυκά άτομα του ακάρεως μετά από 24 ώρες σε συγκέντρωση 4% και 90% μείωση της εκκολαπτικότητας των ωών μετά από 6 ημέρες. Τα έλαια επίσης των *Thymus vulgaris*, *Lavandula officinalis* και *Eucalyptus camaldulensis* στις ίδιες συγκεντρώσεις, ημέρες και τρόπο εφαρμογής επέφεραν 85, 100 και 80% θνησιμότητα και 42,5, 90 και 32,5% μείωση της εκκολαπτικότητας αντίστοιχα (Modarres-Najafabadi, 2012). Τέλος, οι Salman and Erbas (2014) αναφέρουν το έλαιο του *Rosa damascena* να παρέχει 72,22% θνησιμότητα στα ωά, 83,25% στις νύμφες και 70,14% στα ενήλικα άτομα του *T. urticae* σε συγκέντρωση 20 mL/L μέσω ψεκασμού τους.

Κατά την πειραματική διαδικασία της υπολειμματικής δράσης του εγκλεισμένου αιθέριου ελαίου του φλισκουνιού τα ποσοστά θνησιμότητας του *M. persicae* από την ημέρα επέμβασης, πρώτης και δεύτερης ήταν χαμηλά (5%-10%) και συμβάδιζαν με αυτά των μαρτύρων. Το ποσοστό όμως αυτό διπλασιάστηκε (20%) στα ενήλικα άπτερα άτομα του *M. persicae* τα οποία είχαν τοποθετηθεί στα ψεκασμένα τεμάχια φύλλων τρεις ημέρες μετά την επέμβαση πιθανολογώντας ότι η θνησιμότητα αυτή μπορεί να προέρχεται από τη σταδιακή απελευθέρωση του εγκλεισμένου αιθέριου ελαίου καθιστώντας την τεχνική αυτή λειτουργική.

Ο εγκλεισμός του αιθέριου ελαίου του φλισκουνιού σε μικροσωματίδια ζυμομύκητα έδειξε ότι αποτελεί μια διαδικασία η οποία γενικά είναι εφικτή ενώ τα αποτελέσματα των πρώτων βιοδοκιμών ήταν αρκετά ενθαρρυντικά. Προτείνεται για μελλοντική μελέτη ο εγκλεισμός αιθέριων ελαίων γνωστής χημικής σύστασης η οποία αποφέρει υψηλή βιολογική δράση εναντίον συγκεκριμένου επιβλαβούς εντόμου ή ακάρεως με στόχο τη λήψη σαφέστερων αποτελεσμάτων και παρατηρήσεων σχετικά με το ποσοστό λειτουργικότητας το οποίο μπορεί να επιφέρει η συγκεκριμένη τεχνική.



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdellatif, F., Boudjella, H., Zitouni, A. and Hassani, A., 2014. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from leaves of Algerian *Melissa officinalis* L. *EXCLI Journal*, 13: 772-781.
- Abdellatif, F. and Hassani, A., 2015. Chemical composition of the essential oils from leaves of *Melissa officinalis* extracted by hydrodistillation, steam distillation, organic solvent and microwave hydrodistillation. *J. Mater. Environ. Sci.*, 6(1): 207-213.
- Abdelli, M., Moghrani, H., Aboun, A. and Maachi, R., 2016. Algerian *Mentha pulegium* L. leaves essential oil: Chemical composition, antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*, 94: 197–205.
- AbdManaf, M., Jai, J., Raslan, R., Subuki, I. and Mustapa, A.N., 2015. Microencapsulation methods of volatile essential oils - a review. *Advanced Materials Research*, 1113: 679–683.
- Abo-Taka, S.M., Mohamed, A.S., Hany, M.H. and Iman, H.W., 2015. Toxicity and biological activity of five plant extracts to the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* and predatory mite *Amblyseius swirskii* (Acarina: Tetranychidae and Phytoseiidae). *Scholarly Journal of Agricultural Science*, 5(3): 76-83.
- Abreu, F.O.M.S., Oliveira, E.F., Paula, H.C.B. and De Paula, R.C.M., 2012. Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. *Carbohydrate Polymers*, 89: 1277–1282.
- Adamou, H., Adamou, B., Garba, M., Oumarou, S., Gougari, B., Abou, M., Kimba, A. and Delmas, P., 2016. Confirmation of the presence of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in Niger (West Africa). *International Journal of Science, Environment and Technology*, 5(6): 4481 – 4486.
- Adams, R.P., 2007. *Identification of Essential Oil Components by Gas-Chromatography/Mass Spectroscopy*. Fourth edition. Allured Publishing Corporation, Illinois. 804 pp.

- Adil, B., Tarik, A., Abderrahim, K. and Khadija, O., 2015. Evaluation of the insecticidal effect of the essential oil of *Cinnamomum zeylanicum* against *Tuta absoluta* (Meyrick). *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 4(9): 8033–8037.
- Adinee, J., Piri, K. and Karami, O., 2009. Essential oil composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) leaves grown in Hamadan Province, Iran. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 3(1): 58-60.
- Afify, A.E.-M.M., Ali, F.S. and Turky, A., 2012. Control of *Tetranychus urticae* Koch by extracts of three essential oils of chamomile, marjoram and *Eucalyptus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(1): 24–30.
- Agostini, F., dos Santos, A.C.A., Rossato, M., Pansera, M.R., dos Santos, P.L., Serafini, L.A., Molon, R. and Moyna, P., 2009. Essential oil yield and composition of Lamiaceae species growing in Southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(2): 473–478.
- Agostini-Costa, T., Vieira, R.F., Bizzo, H.R., Silveira, D. and Gimenes M.A., 2012. Secondary metabolites. In: Dhanarasu, S. (ed.). *Chromatography and Its Applications*. InTech, Rijeka, Croatia. 224 pp.
- Ahmad, Z.A.B., Yusoff, Z.B., Awang, A.F.B., Rubin, M.A.F.B.M.N., Zait, M.S.H.B.M., Roslan, M.H.B. and Zaid, M.Z.I.B.M., 2015. Hydro-distillation process in extracting of agarwood essential oil. *Technology and Innovation National Conference (TECHON 2015)*, Kuching Sarawak, 203-211.
- Allache, F., Bouta, Y. and Demnati, F., 2015. Population development of the tomato moth *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) in greenhouse tomato in Biskra, Algeria. *J. Crop Prot.*, 4(4): 509–517.
- Alford, D.V., 1999. *A Textbook of Agricultural Entomology*. Blackwell Science Ltd, Oxford. 320 pp.
- Anulika, N.P., Ignatius, E.O., Raymond, E.S., Osasere, O. and Abiola, A.H., 2016. The chemistry of natural product: plant secondary metabolites. *International Journal of Technology Enhancements and Emerging Engineering Research*, 4(8). ISSN 2347-4289.

- Aroiee, H., Mosapoor, S. and Hosainy, M., 2005a. Effect of essential oils of fennel, caraway and rosemary on greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*). *KMITL Sci. J.*, 5(2): 506–510.
- Aroiee, H., Mosapoor, S. and Karimzadeh, H., 2005b. Control of greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) by thyme and peppermint. *KMITL Sci. J.*, 5(2): 511–514.
- Attia, S., Grissa, K.L., Lognay, G., Bitume, E., Hance, T. and Mailleux, A.C., 2013. A review of the major biological approaches to control the worldwide pest *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) with special reference to natural pesticides. Biological approaches to control *Tetranychus urticae*. *J. Pest Sci.*, 86(3): 361–386.
- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N. and Omar, A.K.M., 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117: 426–436.
- Bagdat, R.B. and Cosge, B., 2006. The essential oil of lemon balm (*Melissa officinalis* L.), its components and using fields. *J. of Fac. of Agric.*, 21(1): 116–121.
- Bajracharya, A.S.R., Mainali, R.P., Bhat, B., Bista, S., Shashank, P.R. and Meshram, N.M., 2016. The first record of South American tomato leaf miner, *Tuta absoluta* (Meyrick 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) in Nepal. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4(4): 1359–1363.
- Bakry, A.M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M.Y., Mousa, A. and Liang, L., 2016. Microencapsulation of oils: A comprehensive review of benefits, techniques, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15: 143–182.
- Baranitharan, M., Dhansekaran, S., Murugan, K., Kovendan, K. and Gokulakrishnan, J., 2016. Chemical composition and laboratory investigation of *Melissa officinalis* essential oil against human malarial vector mosquito, *Anopheles stephensi* L. (Diptera: Culicidae). *Journal of Coastal Life Medicine*, 4(12): 969–973.
- Barros, G., Magro, A., Conceicao, C., Matos, O., Barbosa, A., Bastos, M.M.S.M. and Mexia, A., 2015. The use of *Laurus nobilis* and *Mentha pulegium* essential oils against *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) on stored maize. *Revista de Ciencias Agrarias*, 38(2): 191–195.

- Baser, K.H.C., 1995. Analysis and quality assessment of essential oils. In: De Silva, K.T. (ed.). *A Manual on the Essential Oil Industry*. United Nations Industrial Development Organization, Vienna, Austria. 232 pp.
- Bhargava, V.V., Patel, S.C. and Desai, K.S., 2013. Importance of terpenoids and essential oils in chemotaxonomic approach. *International Journal of Herbal Medicine*, 1(2): 14-21.
- Bishop, J.R.P., Nelson, G. and Lamb, J., 1998. Microencapsulation in yeast cells. *J. Microencapsulation*, 15(6): 761–773.
- Blackman, R.L. and Eastop, V.F., 2007. Taxonomic issues. In: Van Emden, H.F. and Harrington, R. (eds.). *Aphids as Crop Pests*. CAB International, Wallingford, UK. 717 pp.
- Boukhebti, H., Chaker, A.N., Belhadj, H., Sahli, F., Ramdhani, M., Laouer, H. and Harzallah, D., 2011. Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils. *Der Pharmacia Lettre*, 3(4): 267–275.
- Bovill, H., 2010. Trade of essential oils. In: Baser, K.H.C. and Buchbauer, G. (eds.). *Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications*. CRC Press, Boca Raton, United States of America. 991 pp.
- Bush, J., Jander, G. and Ausubel, F.M., 2006. Prevention and control of pests and diseases. In: Salinas, J. and Sanchez-Serrano, J.J. (eds.). *Arabidopsis Protocols*. Humana Press, Totowa, New Jersey. 496 pp.
- Cakir, A., Ozer, H., Aydin, T., Kordali, S., Cavusoglu, A.T., Akcin, T., Mete, E. and Akcin, A., 2016. Phytotoxic and insecticidal properties of essential oils and extracts of four *Achillea* species. *Records of Natural Products*, 10(2): 154-167.
- Capinera, J.L., 2001. Green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Insecta: Hemiptera: Aphididae). *University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences*.
- Carvalho, I.T., Estevinho, B.N. and Santos, L., 2016. Application of microencapsulated essential oils in cosmetic and personal healthcare products - a review. *International Journal of Cosmetic Science*, 38: 109–119.
- Cevallos, P.A.P., Buera, M.P. and Elizalde, B.E., 2010. Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and thymol) in  $\beta$ -cyclodextrin: Effect

- of interactions with water on complex stability. *Journal of Food Engineering*, 99: 70–75.
- Chamorro, E.R., Zambón, S.N., Morales, W.G., Sequeira, A.F. and Velasco, G.A., 2012. Study of the chemical composition of essential oils by gas chromatography. In: Salih, B. and Celikbicak, O. (eds.). *Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications*. InTech, Rijeka, Croatia. 346 pp.
- Chan, E.-S., 2011. Preparation of Ca-alginate beads containing high oil content: Influence of process variables on encapsulation efficiency and bead properties. *Carbohydrate Polymers*, 84: 1267–1275.
- Cheng, A.-X., Lou, Y.-G., Mao, Y.-B., Lu, S., Wang, L.-J. and Chen, X.-Y., 2007. Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(2): 179–186.
- Chidege, M., Al-zaidi, S., Hassan, N., Julie, A., Kaaya, E. and Mrogoro, S., 2016. First record of tomato leaf miner *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in Tanzania. *Agriculture & Food Security*, 5:17.
- Choi, W.-I., Lee, E.-H., Choi, B.-R., Park, H.-M. and Ahn, Y.-J., 2003. Toxicity of plant essential oils to *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of Economic Entomology*, 96(5): 1479–1484.
- Choi, W.-I., Lee, S.-G., Park, H.-M. and Ahn, Y.-J., 2004. Toxicity of plant essential oils to *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae). *Journal of Economic Entomology*, 97(2): 553–558.
- Chung, S.K., Seo, J.Y., Lim, J.H., Park, H.H., Yea, M.J. and Park, H.J., 2013. Microencapsulation of essential oil for insect repellent in food packaging system. *Journal of Food Science*, 78(5): 709–714.
- Clancy, M.V., Zytynska, S.E., Senft, M., Weisser, W.W. and Schnitzler, J.-P., 2016. Chemotypic variation in terpenes emitted from storage pools influences early aphid colonisation on tansy. *Scientific Reports*, 6: 38087.
- Clench, M.R. and Tetler, L.W., 2000. Detectors: Mass Spectrometry. In: Wilson, I., Poole, C. and Cooke, M. (eds.). *Encyclopedia of Separation Science*. Academic Press, San Diego, California. 4502 pp.

- Cloyd, R.A., 2007. Management of plant-feeding mites in interior plantscapes. *Pest Technology*, 1(1): 27–32.
- Cocco, A., Deliperi, S. and Delrio, G., 2013. Control of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in greenhouse tomato crops using the mating disruption technique. *Journal of Applied Entomology*, 137: 16–28.
- Cuthbertson, A.G.S., Mathers, J.J., Blackburn, L.F., Korycinska, A., Luo, W., Jacobson, R.J. and Northing, P., 2013. Population development of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) under simulated UK glasshouse conditions. *Insects*, 4: 185–197.
- Das, S.K., David, S.R.N., Rajabalaya, R., Mukhopadhyay, H.K., Halder, T., Palanisamy, M., Khanam, J. and Nanda, A., 2011. Microencapsulation techniques and its practice. *Int. J. Pharma. Sci. Tech.*, 6(2).
- Davidson, R.H. and Lyon, W.F., 1987. *Insect Pests of Farm, Garden and Orchard*. Eighth edition. John Wiley & Sons, New York. 640 pp.
- Derwich, E., Benziane, Z. and Taouil, R., 2010. GC/MS analysis of volatile compounds of the essential oil of the leaves of *Mentha pulegium* growing in Morocco. *Chemical Bulletin of "Politehnica" University of Timisoara*, 55(2): 103–106.
- Desneux, N., Luna, M.G., Guillemaud, T. and Urbaneja, A., 2011. The invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: the new threat to tomato world production. *J. Pest Sci.*, 84: 403–408.
- Desneux, N., Wajnberg, E., Wyckhuys, K.A.G., Burgio, G., Arpaia, S., Narvaez-Vasquez, C.A., Gonzalez-Cabrera, J., Catalan Ruescas, D., Tabone, E., Frandon, J., Pizzol, J., Poncet, C., Cabello, T. and Urbaneja, A., 2010. Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *J. Pest Sci.*, 83: 197–215.
- Devi, N. and Maji, T.K., 2011. Neem seed oil: Encapsulation and controlled release - search for a greener alternative for pest control. In: Stoytcheva, M. (ed.). *Pesticides in the Modern World – Pesticides Use and Management*. InTech, Rijeka, Croatia. 520 pp.
- Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N. and Mnif, W., 2016. Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: a critical review. *Medicines*, 3: 25.

- Digilio, M.C., Mancini, E., Voto, E. and De Feo, V., 2008. Insecticide activity of Mediterranean essential oils. *Journal of Plant Interactions*, 3(1): 17–23.
- Djilani, A. and Dicko, A., 2012. The therapeutic benefits of essential oils. In: Bouayed, J. and Bohn, T. (eds.). *Nutrition, Well-Being and Health*. InTech, Rijeka, Croatia. 234 pp.
- Do, T.K.T., Hadji-Minaglou, F., Antoniotti, S. and Fernandez, X., 2015. Authenticity of essential oils. *Trends in Analytical Chemistry*, 66: 146–157.
- Doughari, J.H., 2012. Phytochemicals: Extraction methods, basic structures and mode of action as potential chemotherapeutic agents. In: Venketeshwer, R. (ed.). *Phytochemicals- A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*. InTech, Rijeka, Croatia. 548 pp.
- Duarte, L., Martinez, M.A. and Bueno, V.H.P., 2015. Biology and population parameters of *Tuta absoluta* (Meyrick) under laboratory conditions. *Rev. Proteccion Veg.*, 30(1): 19-29.
- Du Fall, L.A. and Solomon, P.S., 2011. Role of cereal secondary metabolites involved in mediating the outcome of plant-pathogen interactions. *Metabolites*, 1: 64–78.
- Ebadah, I.M., Shalaby, S.E.M. and Moawad, S.S., 2016. Impact of certain natural plant oils and chemical insecticides against tomato insect pests. *Journal of Entomology*, 13(3): 84–90.
- Ebadollahi, A., 2013. Plant essential oils from Apiaceae family as alternatives to conventional insecticides. *Ecologia Balkanica*, 5(1): 149-172.
- El Shoubaky, G.A. and Salem, E.A., 2014. Terpenes and sterols composition of marine brown algae *Padina pavonica* (Dictyotales) and *Hormophysa triquetra* (Fucales). *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 6(4): 894–900.
- El-Wakeil, N.E., 2013. Botanical pesticides and their mode of action. *Gesunde Pflanzen*, 65: 125–149.
- Esmaili, M., Vojoudi, S. and Parsaeyan, E., 2013. Fumigant toxicity of essential oils of *Mentha pulegium* L. on adults of *Callosobruchus maculatus*, *Tribolium castaneum*, *Lasioderma serricorne* and *Sitophilus oryzae* in laboratory conditions. *Technical Journal of Engineering and Applied Sciences*, 3(9): 732-735.

- Farahani, H.A., Valadabadi, S.A., Daneshian, J. and Khalvati, M.A., 2009. Evaluation changing of essential oil of balm (*Melissa officinalis* L.) under water deficit stress conditions. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(5): 329–333.
- Fasulo, T.R. and Denmark, H.A., 2000. Twospotted Spider Mite, *Tetranychus urticae* Koch (Arachnida: Acari: Tetranychidae). *University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences*.
- Feldmann, H., 2012. *Yeast, Molecular and Cell Biology*. Wiley-VCH, Weinheim. 464 pp.
- Fernandes, R.V.B., Borges, S.V. and Botrel, D.A., 2014. Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. *Carbohydrate Polymers*, 101: 524–532.
- Foganholi, A.P.A.M., Daniel, J.F.S., Santiago, D.C., Orives, J.R., Pereira, J.P. and Faria, T.J., 2015. Chemical composition and antifungal activity of pennyroyal essential oil in different stages of development. *Ciências Agrárias, Londrina*, 36(5): 3091-3100.
- Franz, C. and Novak, J., 2010. Sources of essential oils. In: Baser, K.H.C. and Buchbauer, G. (eds.). *Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications*. CRC Press, Boca Raton, United States of America. 991 pp.
- Gavkare, O., Kumar, S., Sharma, N. and Sharma, P.L., 2013. Evaluation of some novel insecticides against *Myzus persicae* (Sulzer). *The Bioscan*, 8(3): 1119–1121.
- Günzler, H. and Williams, A., 2001. *Handbook of Analytical Techniques*. Wiley-VCH, Weinheim. 1182 pp.
- Hajslová, J. and Cajka, T., 2007. Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). In: Pico, Y. (ed.). *Food Toxicants Analysis. Techniques, Strategies and Developments*. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands. 786 pp.
- Handa, S.S., 2008. An overview of extraction techniques for medicinal and aromatic plants. In: Handa, S.S., Khanuja, S.P.S., Longo, G. and Rakesh, D.D. (eds.). *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. International Centre for Science and High Technology, Trieste, Italy. 260 pp
- Harizanova, V., Stoeva, A. and Mohamedova, M., 2009. Tomato leaf miner, *Tuta absoluta* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae)—first record in Bulgaria. *Agricultural Science and Technology*, 1(3): 95–98.



- Hassanpouraghdam, M.B., Akhgari, A.B., Aazami, M.A. and Emarat-Pardaz, J., 2011. New menthone type of *Mentha pulegium* L. volatile oil from Northwest Iran. *Czech J. Food Sci.*, 29(3): 285–290.
- Hilje, L. and Morales, F.J., 2008. Whitefly bioecology and management in Latin America. In: Capinera, J.L. (ed.). *Encyclopedia of Entomology*. Springer, Netherlands. 4346 pp.
- Hoffmann, E. and Stroobant, V., 2007. *Mass Spectrometry, Principles and Applications*. Third edition. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. 502 pp.
- Howard, R.J., Garland, J.A. and Seaman, W.L., 1994. *Diseases and Pests of Vegetable Crops in Canada*. The Canadian Phytopathological Society and Entomological Society of Canada, Ottawa. 554 pp.
- Hyldgaard, M., Mygind, T. and Meyer, R.L., 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3(12).
- Isman, M.B., 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.*, 51: 45–66.
- Ji, R., Wang, Y., Cheng, Y., Zhang, M., Zhang, H.-B., Zhu, L., Fang, J. and Zhu-Salzman, K., 2016. Transcriptome analysis of green peach aphid (*Myzus persicae*): Insight into developmental regulation and inter-species divergence. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1562.
- Kandi, S., Godishala, V., Rao, P. and Ramana, K.V., 2015. Biomedical significance of terpenes: an insight. *Biomedicine and Biotechnology*, 3(1): 8–10.
- Karahroodi, Z.R., Moharramipour, S. and Rahbarpour, A., 2009. Investigated repellency effect of some essential oils of 17 native medicinal plants on adults *Plodia interpunctella*. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 3(2): 181-184.
- Κατσιώτης, Σ.Θ. και Χατζοπούλου, Π.Σ., 2013. *Αρωματικά-Φαρμακευτικά Φυτά και Αιθέρια Έλαια*. Δεύτερη έκδοση. Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη Α.Ε., Θεσσαλονίκη. 973 σελ.
- Kerruish, R.M. and Unger, P.W., 2010. *Plant Protection I. Pests, Diseases and Weeds*. Fourth edition. RootRot Press, Hughes. 484 pp.
- Khadraoui, A., Hachama, K., Khodja, M., Khelifa, A., Mehdaoui, R., Harti, H., Abid, S., Najda, B.A. and Chahboun, N., 2015. Extraction study and the antibacterial activity of

- phenol and flavonoid contents in *Mentha pulegium* L. from Algeria. *J. Mater. Environ. Sci.*, 6(9): 2501–2508.
- Khan, H., Ali, A. and Khan, M.S., 2015. Population dynamics of *Myzus persicae* (Sulzer) in spring potatoes at Swabi. *International Journal of Agricultural and Environmental Research*. ISSN: 2414-8245.
- Kim, J.-R., Haribalan, P., Son, B.-K. and Ahn, Y.-J., 2012. Fumigant toxicity of plant essential oils against *Camptomyia corticalis* (Diptera: Cecidomyiidae). *Journal of Economic Entomology*, 105(4): 1329–1334.
- Kokkini, S., Hanlidou, E., Karousou, R. and Lanaras, T., 2002. Variation of pulegone content in pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) plants growing wild in Greece. *Journal of Essential Oil Research*, 14: 224–227.
- Kokkini, S., Karagiannakidou, V., Hanlidou, E. and Vokou, D., 1988. Geographical and altitudinal distribution of the Lamiaceae in Greece. *Phyton*, 28: 215–228.
- Koul, O., Walia, S. and Dhaliwal, G.S., 2008. Essential oils as green pesticides: potential and constraints. *Biopesticides International*, 4(1): 63–84.
- Κωβαίος, Δ.Σ., 2010. *Ακαρολογία*. Εκδόσεις ΑγροΤύπος, Αθήνα. 224 σελ.
- Κουτσός, Θ.Β., 2006. *Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά*. Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη. 349 σελ.
- Krechemer, F.D.S. and Foerster, L.A., 2015. *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae): Thermal requirements and effect of temperature on development, survival, reproduction and longevity. *Eur. J. Entomol.*, 112(4): 658–663.
- Kubeczka, K-H., 2010. History and sources of essential oil research. In: Baser, K.H.C. and Buchbauer, G. (eds.). *Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications*. CRC Press, Boca Raton, United States of America. 991 pp.
- Lai, F., Wissing, S.A., Müller, R.H. and Fadda, A.M., 2006. *Artemisia arborescens* L essential oil-loaded solid lipid nanoparticles for potential agricultural application: preparation and characterization. *AAPS PharmSciTech*, 7(1).
- Lamiri, A., Lhaloui, S., Benjilali, B. and Berrada, M., 2001. Fumigant toxic activity of essential oils on *Sitophilus granarius* (Linné). *Phys. Chem. News*, 1: 101–105.

- Landolt, P.J., Hofstetter, R.W. and Biddick, L.L., 1999. Plant essential oils as arrestants and repellents for neonate larvae of the codling moth (Lepidoptera: Tortricidae). *Environmental Entomology*, 28(6): 954–960.
- Las Heras, B., Rodriguez, B., Bosca, L. and Villar, A.M., 2003. Terpenoids: sources, structure elucidation and therapeutic potential in inflammation. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 3: 53–67.
- Lavagnini, I., Magno, F., Seraglia, R. and Traldi, P., 2006. *Quantitative Applications of Mass Spectrometry*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 152 pp.
- Lawrence, B.M., 1995. The isolation of aromatic materials from natural plant products. In: De Silva, K.T. (ed.). *A Manual on the Essential Oil Industry*. United Nations Industrial Development Organization, Vienna, Austria. 232 pp.
- Laznik, Z., Znidarcic, D. and Trdan, S., 2011. Control of *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) adults on glasshouse-grown cucumbers in four different growth substrates: an efficacy comparison of foliar application of *Steinernema feltiae* (Filipjev) and spraying with thiamethoxam. *Turk. J. Agric. For.*, 35: 631–640.
- Li, Y., Fabiano-Tixier, A.-S. and Chemat, F., 2014. Essential oils: from conventional to green extraction. In: Li, Y., Fabiano-Tixier, A.-S. and Chemat, F. (eds.). *Essential Oils as Reagents in Green Chemistry*. Springer International Publishing. 71 pp.
- Λιοδάκης, Σ., 2001. *Αναλυτική Χημεία, Θέματα και Προβλήματα*. Εκδόσεις Παπασωτηρίου, Αθήνα. 416 σελ.
- López, S.B., López, M.L., Aragón, L.M., Tereschuk, M.L., Slanis, A.C., Feresin, G.E., Zygodlo, J.A. and Tapia, A.A., 2011. Composition and anti-insect activity of essential oils from *Tagetes* L. species (Asteraceae, Helenieae) on *Ceratitis capitata* Wiedemann and *Triatoma infestans* Klug. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10): 5286–5292.
- Luna, M.G., Pereyra, P.C., Coviella, C.E., Nieves, E., Savino, V., Gervasio, N.G.S., Luft, E., Virla, E. and Sanchez, N.E., 2015. Potential of biological control agents against *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae): current knowledge in Argentina. *Florida Entomologist*, 98(2): 489–494.
- Mahmoodi, L., Valizadegan, O. and Mahdavi, V., 2014. Fumigant toxicity of *Petroselinum crispum* L. (Apiaceae) essential oil on *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood)

- (Hemiptera: Aleyrodidae) adults under greenhouse conditions. *Journal of Plant Protection Research*, 54(3): 294-299.
- Mahmoudvand, M., Abbasipour, H., Basij, M., Hosseinpour, M.H., Rastegar, F. and Nasiri, M.B., 2011. Fumigant toxicity of some essential oils on adults of some stored-product pests. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 71(1): 83-89.
- Mahr, S.E.R., Cloyd, R.A., Mahr, D.L. and Sadof, C.S., 2001. *Biological Control of Insects and Other Pests of Greenhouse Crops*. Cooperative Extension Publishing, Wisconsin. 100 pp.
- Manzano, M.R. and Van Lenteren, J.C., 2009. Life history parameters of *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae) at different environmental conditions on two bean cultivars. *Neotropical Entomology*, 38(4): 452–458.
- Mareggiani, G., Russo, S. and Rocca, M., 2008. *Eucalyptus globulus* (Mirtaceae) essential oil: efficacy against *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae), an agricultural pest. *Rev. Latinoamer. Quím.*, 36(1): 16–21.
- Marques, H.M.C., 2010. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour and Fragrance Journal*, 25: 313–326.
- Martins, I.M., Barreiro, M.F., Coelho, M. and Rodrigues, A.E., 2014. Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. *Chemical Engineering Journal*, 245: 191–200.
- Maula, F. and Khan, I.A., 2016. Effect of temperature variation on the developmental stages of *Tetranychus urticae* Koch and *Panonychus ulmi* Koch (Tetranychidae: Acarina) under laboratory conditions in Swat valley of Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4(1): 279-283.
- Mazid, M., Khan, T.A. and Mohammad, F., 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine*, 3(2): 232-249.
- McLeod, P. and Rashid, T., 2014. Toxicity of pyrifluquinazon against greenhouse whitefly on tomato produced in greenhouses. *Advances in Entomology*, 2: 115–119.
- McNair, H.M. and Miller, J.M., 1998. *Basic Gas Chromatography, Techniques in Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, New York. 224 pp.
- Mdellel, L. and Ben Halima Kamel, M., 2014. Effects of different varieties of pepper (*Capsicum annum* L.) on the biological parameters of the green peach aphid *Myzus*

- persicae* Sulzer (Hemiptera, Aphididae) in Tunisia. *European Journal of Environmental Sciences*, 4(2): 102–105.
- Miraj, S. and Kiani, S., 2016. Study of pharmacological effect of *Mentha pulegium*: A review. *Der Pharmacia Lettre*, 8(9): 242-245.
- Miraj, S., Kopae, M.R. and Kiani, S., 2016. *Melissa officinalis* L: a review study with an antioxidant prospective. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 1-10.
- Modarres-Najafabadi, S.S., 2012. Control of *Tetranychus urticae* Koch by thyme, lavender and eucalyptus essential oils. *Journal of Medicinal Plants and By-products*, 1: 43–47.
- Mohamadi, M., Shamspur, T. and Mostafavi, A., 2013. Comparison of microwave-assisted distillation and conventional hydrodistillation in the essential oil extraction of flowers *Rosa damascena* Mill. *The Journal of Essential Oil Research*, 25(1): 55–61.
- Moradkhani, H., Sargsyan, E., Bibak, H., Naseri, B., Sadat-Hosseini, M., Fayazi-Barjin, A. and Meftahizade, H., 2010. *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant: A review. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(25): 2753-2759.
- Moretti, M.D.L., Sanna-Passino, G., Demontis, S. and Bazzoni, E., 2002. Essential oil formulations useful as a new tool for insect pest control. *AAPS PharmSciTech*, 3(2): 64–74.
- Motazedian, N., Ravan, S. and Bandani, A.R., 2012. Toxicity and repellency effects of three essential oils against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *J. Agr. Sci. Tech.*, 14: 275–284.
- Mozaffari, F., Abbasipour, H., Garjan, A.S., Saboori, A. and Mahmoudvand, M., 2013. Toxicity and oviposition deterrence and repellency of *Mentha pulegium* (Lamiaceae) essential oils against *Tetranychus urticae* Koch (Tetranychidae). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 16(5): 575–581.
- Musa, F.M., Carli, C., Susuri, L.R. and Pireva, I.M., 2004. Monitoring of *Myzus persicae* (Sulzer) in potato fields in Kosovo. *Acta Agriculturae Slovenica*, 83: 379–385.
- Naghibi, F., Mosaddegh, M., Motamed, S.M. and Ghorbani, A., 2005. Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2: 63–79.

- Nasruddin, A. and Mound, L.A., 2016. First record of *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hemiptera: Aleyrodidae) severely damaging field grown potato crops in South Sulawesi, Indonesia. *Journal of Plant Protection Research*, 56(2): 199–202.
- Nayana, B.P. and Kalleshwaraswamy, C.M., 2015. Biology and external morphology of invasive tomato leaf miner, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Pest Management in Horticultural Ecosystems*, 21(2): 169–174.
- Ναβροζίδης, Ε.Ι. και Ανδρεάδης, Σ.Σ., 2012. *Ειδική Γεωργική Εντομολογία*. Εκδόσεις Copy City, Θεσσαλονίκη. 523 σελ.
- Neetu, K., Ankit, G., Ruchi, T., Ajay, B. and Prashant, B., 2012. A review on mass spectrometry detectors. *International Research Journal of Pharmacy*, 3(10): 33-42.
- Nehal, H., Hussein, M.I., Gadel Hak, S.H. and Hammad, M.A., 2014. Effect of two plant extracts and four aromatic oils on *Tuta absoluta* population and productivity of tomato cultivar Gold Stone. *Nature and Science*, 12(7): 108-118.
- Niessen, W.M.A. and Falck, D., 2015. Introduction to mass spectrometry, a tutorial. In: Kool, J. and Niessen, W.M.A. (eds.). *Analyzing Biomolecular Interactions by Mass Spectrometry*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany. 400 pp.
- Numa, S., Rodríguez, L., Rodríguez, D. and Coy-Barrera, E., 2015. Susceptibility of *Tetranychus urticae* Koch to an ethanol extract of *Cnidoscolus aconitifolius* leaves under laboratory conditions. *SpringerPlus*, 4: 338.
- OEPP/EPPO., 2005. Data sheets on quarantine pests: *Tuta absoluta*. *Bulletin*, 35: 434-435.
- Oliveira, J.L., Campos, E.V.R., Bakshi, M., Abhilash, P.C. and Fraceto, L.F., 2014. Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: Prospects and promises. *Biotechnology Advances*, 32: 1550–1561.
- Olivoto, T., Nardino, M., Carvalho, I.R., Follmann, D.N., Szarecki, V.J., Ferrari, M., de Pelegrin, A. J. and de Souza, V. Q., 2017. Plant secondary metabolites and its dynamical systems of induction in response to environmental factors: A review. *African Journal of Agricultural Research*, 12(2): 71–84.
- Ondrejovic, M., Kraic, F., Benkovicova, H. and Silhar, S., 2012. Optimisation of antioxidant extraction from lemon balm (*Melissa officinalis*). *Czech J. Food Sci.*, 30(4): 385–393.

- Oshaghi, M.A., Ghalandari, R., Vatandoost, H., Shayeghi, M., Kamali-Nejad, M., Tourabi-Khaledi, H., Abolhassani, M. and Hashemzadeh, M., 2003. Repellent effect of extracts and essential oil of *Citrus limon* (Rutaceae) and *Melissa officinalis* (Labiatae) against main malaria vector, *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Iranian J. Publ. Health*, 32(4): 47–52.
- Ouakouak, H., Chohra, M. and Denane, M., 2015. Chemical composition, antioxidant activities of the essential oil of *Mentha pulegium* L, South East of Algeria. *International Letters of Natural Sciences*, 39: 49–55.
- Pagare, S., Bhatia, M., Tripathi, N., Pagare, S. and Bansal, Y.K., 2015. Secondary metabolites of plants and their role: overview. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 9(3): 293–304.
- Pandey, A.K., Kumar, P., Singh, P., Tripathi, N.N. and Bajpai, V.K., 2017. Essential oils: sources of antimicrobials and food preservatives. *Frontiers in Microbiology*, 7:2161.
- Papachristos, D.P., Kimbaris, A.C., Papadopoulos, N.T. and Polissiou, M.G., 2009. Toxicity of citrus essential oils against *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) larvae. *Annals of Applied Biology*, 155(3): 381–389.
- Paramera, E.I., Karathanos, V.T. and Konteles, S.J., 2014. Yeast cells and yeast-based materials for microencapsulation. In: Gaonkar, A.G., Vasisht, N., Khare, A. R. and Sobel, R. (eds.). *Microencapsulation in the Food Industry. A Practical Implementation Guide*. Academic Press-Elsevier, United States of America. 590 pp.
- Paramera, E.I., Konteles, S.J. and Karathanos, V.T., 2011. Microencapsulation of curcumin in cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry*, 125: 892–902.
- Patil, D.L., Patel, K.A., Toke, N.R. and Ambule, A.T., 2014. Biology of *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae) on carnation under laboratory conditions. *International Journal of Plant Protection*, 7(2): 334–338.
- Pavela, R., 2007. Possibilities of botanical insecticide exploitation in plant protection. *Pest Technology*, 1(1): 47–52.
- Pavela, R., Stepanycheva, E., Shchenikova, A., Chermenskaya, T. and Petrova, M., 2016. Essential oils as prospective fumigants against *Tetranychus urticae* Koch. *Industrial Crops and Products*, 94: 755–761.

- Pavlidou, V., Karpouhtsis, I., Franzios, G., Zambetaki, A., Scouras, Z. and Mavragani-Tsipidou, P., 2004. Insecticidal and genotoxic effects of essential oils of Greek sage, *Salvia fruticosa*, and mint, *Mentha pulegium*, on *Drosophila melanogaster* and *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *J. Agric. Urban Entomol.*, 21(1): 39–49.
- Petrakis, E.A., Kimbaris, A.C., Perdikis, D.Ch., Lykouressis, D.P., Tarantilis, P.A. and Polissiou, M.G., 2014. Responses of *Myzus persicae* (Sulzer) to three Lamiaceae essential oils obtained by microwave-assisted and conventional hydrodistillation. *Industrial Crops and Products*, 62: 272–279.
- Πελεκάσης, Κ.Ε.Δ., 1984. *Μαθήματα Γεωργικής Εντομολογίας. Ειδική Εντομολογία*. Πέμπτη έκδοση. Αθήνα. 554 σελ.
- Πελεκάσης, Κ.Ε.Δ., 1991. *Μαθήματα Γεωργικής Εντομολογίας. Ειδική Εντομολογία*. Αθήνα. 554 σελ.
- Popova, A., Dalemska, Z., Mihaylova, D., Hristova, I. and Alexieva, I., 2016. *Melissa officinalis* L.-GC profile and antioxidant activity. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8(4): 634-638.
- Prijovic, M., Marcic, D., Drobnjakovic, T., Medo, I. and Peric, P., 2013. Life history traits and population growth of greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum* Westwood) on different tomato genotypes. *Pestic. Phytomed.*, 28(4): 239–245.
- Prijovic, M., Skaljic, M., Drobnjakovic, T., Zanic, K., Peric, P., Marcic, D. and Puizina, J., 2014. Genetic variation of the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae), among populations from Serbia and neighbouring countries, as inferred from *COI* sequence variability. *Bulletin of Entomological Research*, 104: 357–366.
- Przybylski, M., Weinmann, W. and Fligge, T.A., 2003. Mass spectrometry. In: Gauglitz, G. and Vo-Dinh, T. (eds.). *Handbook of Spectroscopy*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany. 538 pp.
- Pumnuan, J. and Insung, A., 2016. Fumigant toxicity of plant essential oils in controlling thrips, *Frankliniella schultzei* (Thysanoptera: Thripidae) and mealybug, *Pseudococcus jackbeardsleyi* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Journal of Entomological Research*, 40(1): 1-10.



- Raja, R.R., 2012. Medicinally potential plants of Labiatae (Lamiaceae) family: an overview. *Research Journal of Medicinal Plants*, 6(3): 203-213.
- Rassem, H.H.A., Nour, A.H. and Yunus, R.M., 2016. Techniques for extraction of essential oils from plants: A review. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 10(16): 117-127.
- Rattan, R.S., 2010. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection*, 29: 913–920.
- Razmjou, J., Tavakkoli, H. and Nemati, M., 2009. Life history traits of *Tetranychus urticae* Koch on three legumes (Acari: Tetranychidae). *Mun. Ent. Zool.*, 4(1): 204–211.
- Retta, A.N. and Berhe, D.H., 2015. Tomato leaf miner–*Tuta absoluta* (Meyrick), a devastating pest of tomatoes in the highlands of Northern Ethiopia: A call for attention and action. *Research Journal of Agriculture and Environmental Management*, 4(6): 264–269.
- Riahi, E., Shishehbor, P., Nemati, A.R. and Saeidi, Z., 2013. Temperature effects on development and life table parameters of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *J. Agr. Sci. Tech.*, 15: 661–672.
- Riyajan, S.A., 2011. Development of Neem capsule via biopolymer and natural rubber for its controlled release. In: Stoytchena, M. (ed.). *Pesticides in the Modern World – Pesticides Use and Management*. InTech, Rijeka, Croatia. 520 pp.
- Roditakis, E., Papachristos, D. and Roditakis, N.E., 2010. Current status of the tomato leafminer *Tuta absoluta* in Greece. *Bulletin*, 40: 163–166.
- Rostami, E., Madadi, H., Abbasipour, H., Allahyari, H. and Cuthbertson, A.G.S., 2017. Life table parameters of the tomato leaf miner *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) on different tomato cultivars. *Journal of Applied Entomology*, 141: 88–96.
- Sadgrove, N. and Jones, G., 2015. A contemporary introduction to essential oils: Chemistry, bioactivity and prospects for Australian agriculture. *Agriculture*, 5: 48–102.
- Sahayaraj, K., 2014. Nanotechnology and plant biopesticides: An overview. In: Singh, D. (ed.). *Advances in Plant Biopesticides*. Springer, New Delhi, India. 401 pp.
- Salam, A.A.H., Ghanim, A.A., El-Serafi, H.A.K., El-Heneidy, A.H. and El-Sherbeni, M.K., 2009. Biological and life table parameters of *Myzus persicae* (Salz.) (Hemiptera:

- Aphididae) in relation to host plants and thermal requirements. *J. Agric. Sci.*, 34(7): 8251-8262.
- Salari, R., Rajabi, O., Khashyarmanesh, Z., Najafi, M.F. and Bazzaz, B.S.F., 2015. Characterization of encapsulated berberine in yeast cells of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 14(4): 1247-1256.
- Saljoqi, A.-U.-R., 2009. Population dynamics of *Myzus persicae* (Sulzer) and its associated natural enemies in spring potato crop, Peshawar- Pakistan. *Sarhad J. Agric.*, 25(3): 451–456.
- Salman, S.Y. and Erbas, S., 2014. Contact and repellency effects of *Rosa damascena* Mill. essential oil and its two major constituents against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Turk. Entomol. Derg.*, 38(4): 365–376.
- Sarwar, M. and Salman, M., 2015. Toxicity of oils formulation as a new useful tool in crop protection for insect pests control. *International Journal of Chemical and Biomolecular Science*, 1(4): 297–302.
- SAS Institute, 2012. JMP version 10.0.0 SAS Institute Inc.
- Schmidt, E., 2010. Production of essential oils. In: Baser, K.H.C. and Buchbauer, G. (eds.). *Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications*. CRC Press, Boca Raton, United States of America. 991 pp.
- Seddigh, S. and Kiani, L., 2012. Greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum* Westwood) control by *Encarsia formosa* Gahan and its color preference in commercial gerbera greenhouses in Iran. *Annals of Biological Research*, 3(5): 2414-2418.
- Seidler-Lozykowska, K., Mordalski, R., Kucharski, W., Kedzia, E., Nowosad, K., and Bocianowski, J., 2015. Effect of organic cultivation on yield and quality of lemon balm herb (*Melissa officinalis* L.). *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*, 14(5): 55–67.
- Sell, C.S., 2003. *A Fragrant Introduction to Terpenoid Chemistry*. Royal Society of Chemistry, Cambridge. 410 pp.
- Sendi, J.J. and Ebadollahi, A., 2014. Biological activities of essential oils on insects. In: Govil, J.N. and Bhattacharya, S. (eds.). *Recent Progress in Medicinal Plants: Essential Oils II*. Studium Press, India. 129–150.

- Sertkaya, E., 2013. Fumigant toxicity of the essential oils from medicinal plants against bean weevil, *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *Asian Journal of Chemistry*, 25(1): 553–555.
- Sherry, M., Charcosset, C., Fessi, H. and Greige-Gerges, H., 2013. Essential oils encapsulated in liposomes: a review. *Journal of Liposome Research*, 23(4): 268–275.
- Shi, G., Liu, Y., He, Z. and Zhou, J., 2016. Chemical treatment and chitosan coating of yeast cells to improve the encapsulation and controlled release of bovine serum albumin. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, 10: 1-9.
- Singh, S., Haider, S.Z., Chauhan, N.K., Lohani, H., Sah, S. and Yadav, R.K., 2014. Effect of time of harvesting on yield and quality of *Melissa officinalis* L. in Doon Valley, India. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 76(5): 449-452.
- Skoog, D.A., Holler, F.J. and Crouch, S.R., 2007. *Principles of Instrumental Analysis*. Thomson Brooks/Cole. 1039 pp.
- Σκρουμπής, Β.Γ., 1985. *Αρωματικά Φυτά και Αιθέρια Έλαια*. Θεσσαλονίκη. 204 σελ.
- Σκρουμπής, Β.Γ., 1998. *Αρωματικά, Φαρμακευτικά και Μελισσοτροφικά Φυτά της Ελλάδας*. Εκδόσεις ΑγροΤύπος, Αθήνα. 256 σελ.
- Smith, R.M., 2004. *Understanding Mass Spectra: A Basic Approach*. Second edition. John Wiley & Sons, Hoboken. 372 pp.
- Souza, J.M., Caldas, A.L., Tohidi, S.D., Molina, J., Souto, A.P., Fangueiro, R. and Zille, A., 2014. Properties and controlled release of chitosan microencapsulated limonene oil. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 24: 691–698.
- Stashenko, E. and Martinez, J.R., 2014. Gas chromatography-Mass spectrometry. In: Guo, Xinghua. (ed.). *Advances in Gas Chromatography*. InTech. 222 pp.
- Stratakos, A.Ch. and Koidis, A., 2016. Methods for extracting essential oils. In: Preedy, V.R. (ed.). *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Academic Press-Elsevier, United States of America. 930 pp.
- Sultana, A., Miyamoto, A., Lan Hy, Q., Tanaka, Y., Fushimi, Y. and Yoshii, H., 2017. Microencapsulation of flavors by spray drying using *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Food Engineering*, 199: 36–41.
- Suthar, B.A. and Patel, R.S., 2014. A taxonomic study of Lamiaceae (mint family) in Rajpipla (Gujarat, India). *World Applied Sciences Journal*, 32(5): 766-768.

- Taha, A.M., Homam, B.H., Afsah, A.F.E. and EL-Sharkawy, F.M., 2012. Effect of trap color on captures of *Tuta absoluta* moths (Lepidoptera: Gelechiidae). *International Journal of Environmental Science and Engineering*, 3: 43–48.
- Tandon, S., 2008. Distillation technology for essential oils. In: Handa, S.S., Khanuja, S.P.S., Longo, G. and Rakesh, D.D. (eds.). *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. International Centre for Science and High Technology, Trieste, Italy. 260 pp.
- Tehri, K., 2014. A review on reproductive strategies in two spotted spider mite, *Tetranychus Urticae* Koch 1836 (Acari: Tetranychidae). *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 2(5): 35-39.
- Tehri, K., Gulati, R. and Geroh, M., 2014a. Damage potential of *Tetranychus urticae* Koch to cucumber fruit and foliage: Effect of initial infestation density. *Journal of Applied and Natural Science*, 6(1): 170-176.
- Tehri, K., Gulati, R., Geroh, M. and Madan, S., 2014b. Biochemical responses of cucumber to *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) mediated biotic stress. *Journal of Applied and Natural Science*, 6(2): 687-692.
- Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Batista, I., Serrano, C., Matos, O., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Saraiva, J.A. and Nunes, M.L., 2012. European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Industrial Crops and Products*, 36: 81–87.
- Tiwari, R. and Rana, C.S., 2015. Plant secondary metabolites: a review. *International Journal of Engineering Research and General Science*, 3(5): 661-670.
- Tongnuanchan, P. and Benjakul, S., 2014. Essential oils: Extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of Food Science*, 79(7): 1231–1249.
- Tosevski, I., Jovic, J., Mitrovic, M., Cvrkovic, T., Krstic, O. and Krnjajic, S., 2011. *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera, Gelechiidae): a new pest of tomato in Serbia. *Pestic. Phytomed.*, 26(3): 197–204.
- Tripathi, A.K., Upadhyay, S., Bhuiyan, M. and Bhattacharya, P.R., 2009. A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 1(5): 52-63.

- Τζανακάκης, Μ.Ε. και Κατσόγιαννος, Β.Ι., 2003. *Έντομα Καρποφόρων Δέντρων και Αμπέλου*. Εκδόσεις ΑγροΤύπος, Αθήνα. 360 σελ.
- Van Lenteren, J.C., Van Roermund, H.J.W. and Sutterlin, S., 1996. Biological control of greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) with the parasitoid *Encarsia formosa*: How does it work?. *Biological Control*, 6: 1–10.
- Van Nieuwenhove, G.A., Oviedo, A.V.F., Dalto, Y.M., Perez, J., Horak, C.I., Gastaminza, G.A., Willink, E. and Hallman, G.J., 2016. Gamma radiation phytosanitary treatment against *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Florida Entomologist*, 99(2): 130–133.
- Varona, S., Kareth, S., Martín, A. and Cocero, M.J., 2010. Formulation of lavandin essential oil with biopolymers by PGSS for application as biocide in ecological agriculture. *The Journal of Supercritical Fluids*, 54: 369–377.
- Verdugo, J.A., Francis, F. and Ramirez, C.C., 2016. A review on the complexity of insect-plant interactions under varying levels of resources and host resistance: the case of *Myzus persicae*-*Prunus persica*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 20(4).
- Verma, P.P.S., Singh, A., Rahaman, L. and Bahl, J.R., 2015. Lemon balm (*Melissa officinalis* L.) an herbal medicinal plant with broad therapeutic uses and cultivation practices: A review. *International Journal of Recent Advances in Multidisciplinary Research*, 2(11): 928–933.
- Vieira, E.R.D., Soares, M.A., Silva, E. de B., Assis Junior, S.L. and Barroso, G.A., 2016. First record of *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) in *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake. *Arq. Inst. Biol.*, 83: 1-2.
- Wierdak, R.N., Kocka, A.B. and Szymczak, G., 2014. Volatile constituents of *Melissa officinalis* leaves determined by plant age. *Natural Product Communications*, 9(5): 703-706.
- Winiarczyk, K., Seidler-Lozykowska, K., Gebura, J. and Bocianowski, J., 2016. Vitality and germination of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) seeds. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 89: 156 - 162.
- Wink, M., 1988. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theor. Appl. Genet.*, 75: 225-233.

- Xue, Z., Duan, L.-X. and Qi, X., 2015. Gas chromatography Mass spectrometry coupling techniques. In: Qi, X., Chen, X. and Wang, Y. (eds.). *Plant Metabolomics, Methods and Applications*. Chemical Industry Press-Springer Netherlands, Dordrecht. 319 pp.
- Χαραντώνης, Δ. και Γιαννοπολίτης, Κ.Ν., 2009. Ο φυλλορύκτης της τομάτας *Tuta absoluta*. Ένα μικρολεπιδόπτερο πολύ απειλητικό για τις καλλιέργειες τομάτας και άλλων σολανωδών. *Γεωργία - Κτηνοτροφία*, 5: 31-34.
- Χατζηιωάννου, Θ.Π. και Κουμπάρης, Μ.Α., 1997. *Ενόργανη Ανάλυση*. Εκδόσεις Δ. Μαυρομαμάτη, Αθήνα. 588 σελ.
- Χατζηιωάννου, Θ.Π. και Κουμπάρης, Μ.Α., 2010. *Ενόργανη Ανάλυση*. Εκδόσεις Δ. Μαυρομαμάτη, Αθήνα. 588 σελ.
- Yang, F.-L., Li, X.-G., Zhu, F. and Lei, C.-L., 2009. Structural characterization of nanoparticles loaded with garlic essential oil and their insecticidal activity against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 10156–10162.
- Yang, N.-W., Li, A.-L., Wan, F.-H., Liu, W.-X. and Johnson, D., 2010. Effects of plant essential oils on immature and adult sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* biotype B. *Crop Protection*, 29: 1200–1207.
- Yankova, V., Markova, D., Velichkov, G. and Velkov, N., 2014. Plant oils for control of cotton aphid (*Aphis gossypii* Glov.) in greenhouse cucumbers. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences*, (2): 1565-1568.
- Zantar, S., El Garrouj, D., Pagan, R., Chabi, M., Laglaoui, A., Bakkali, M. and Zerrouk, M.H., 2015. Effect of harvest time on yield, chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Thymus vulgaris* and *Mentha pulegium* essential oils. *European Journal of Medicinal Plants*, 8(2): 69-77.
- Zekeya, N., Ndakidemi, P.A., Chacha, M. and Mbega, E., 2017. Tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Meyrick 1917), an emerging agricultural pest in Sub-Saharan Africa: Current and prospective management strategies. *African Journal of Agricultural Research*, 12(6): 389–396.
- Zekri, N., Amalich, S., Boughdad, A., Alaoui El Belghiti, M. and Zair, T., 2013. Phytochemical study and insecticidal activity of *Mentha pulegium* L. oils from Morocco against *Sitophilus Oryzae*. *Mediterranean Journal of Chemistry*, 2(4): 607–619.

- Zellner, B.d'A., Dugo, P., Dugo, G. and Mondello, L., 2010. Analysis of essential oils. In: Baser, K.H.C. and Buchbauer, G. (eds.). *Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications*. CRC Press, Boca Raton, United States of America. 991 pp.
- Zengin, H. and Baysal, A.H., 2014. Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy. *Molecules*, 19: 17773–17798.
- Zuzarte, M. and Salgueiro, L., 2015. Essential oils chemistry. In: de Sousa, D.P. (ed.). *Bioactive Essential Oils and Cancer*. Springer International Publishing, Switzerland. 292 pp.