

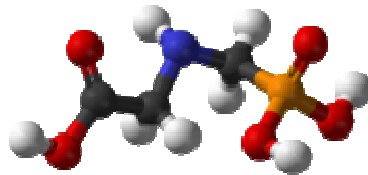


**ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ
ΚΑΙ ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη της συμπεριφοράς του ζιζανιοκτόνου glyphosate
στο έδαφος και της δράσης του στα φυτά μετά από
απορρόφηση από τις ρίζες**

Μάριος Βουλγαρίδης



Επιβλέπων καθηγητής : Δρ. Ευάγγελος Α. Πασπάτης

Ηράκλειο, 2014

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΡΗΤΗΣ	1
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ	1
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ..	1
1 ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	6
1.1 ΖΙΖΑΝΙΑ.....	6
1.1.1 Γενικά	6
1.1.2 Κατάταξη ζιζανίων.....	6
1.1.3 Προβλήματα που προκαλούν τα ζιζάνια.....	7
1.1.4 Τρόποι αντιμετώπισης	7
1.2 ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΑ	8
1.2.1 Γενικά	8
1.2.2 Κατάταξη των ζιζανιοκτόνων	11
1.2.3 Ορθολογική χρήση ζιζανιοκτόνων	14
1.3 ΤΟ ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΟ GLYPHOSATE	15
1.3.1 Γενικά στοιχεία.....	15
1.3.2 Χημική ταυτότητα - Ιδιότητες.....	16
1.3.3 Απορρόφηση από τα φυτά και τρόπος δράσης	17
1.3.4 Χρήσεις και τρόπος εφαρμογής	19
1.3.5 Μεταβολισμός, αποικοδόμηση και συμπεριφορά στο περιβάλλον.....	21
1.3.5.1 Μεταβολισμός και αποικοδόμηση του glyphosate	21
1.3.5.2 Κινητικότητα στο έδαφος	22
1.3.5.3 Παρουσία του glyphosate στα επιφανειακά και υπόγεια ύδατα	23
1.3.5.4 Μεταφορά στην ατμόσφαιρα.....	24
1.3.6 Προβλήματα από την κακή χρήση του glyphosate	24
1.3.6.1 Εμφάνιση ανθεκτικότητας των ζιζανίων στο glyphosate.....	25
1.3.6.2 Φυτοτοξικότητα.....	25
2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	28
2.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΦΩΣΦΟΡΟΥ ΣΤΗΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ GLYPHOSATE ΚΑΙ ΑΜΡΑ ΣΤΟ ΕΔΑΦΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ	28
2.1.1 Εισαγωγή.....	28
2.1.2 Υλικά και Μέθοδοι.....	29
2.1.2.1 Προετοιμασία χώματος	29
2.1.2.2 Εφαρμογή φωσφόρου	30
2.1.2.3 Εφαρμογή glyphosate.....	31
2.1.2.4 Μέθοδος χρωματογραφικής ανάλυσης	31
2.1.2.5 Στατιστική ανάλυση.....	32

2.1.3	Αποτελέσματα.....	32
2.1.4	Συζήτηση.....	37
2.2	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΦΥΤΩΝ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ GLYPHOSATE ΑΠΟ ΤΟ ΡΙΖΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ .	38
2.2.1	Εισαγωγή.....	38
2.2.2	Υλικά και Μέθοδοι.....	38
2.2.2.1	Προετοιμασία φυτών	38
2.2.2.2	Εφαρμογή glyphosate.....	39
2.2.2.3	Μετρήσεις παραμέτρων ανάπτυξης.....	40
2.2.2.4	Στατιστική ανάλυση.....	41
2.2.3	Αποτελέσματα.....	41
2.2.4	Συζήτηση.....	46
3	ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	48
4	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	50
5	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	60

Στην μητέρα μου για την υπομονή της...

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε από τον φοιτητή Βουλγαρίδη Μάριο του Τμήματος Βιολογικών Θερμοκηπιακών Καλλιεργειών και Ανθοκομίας της σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας του Τ.Ε.Ι. Κρήτης. Το βιβλιογραφικό καθώς και το εργαστηριακό κομμάτι της μελέτης πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Ζιζανιολογίας του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου κατά το ακαδημαϊκό έτος 2011 – 2012 κάτω από την επίβλεψη της ερευνήτριας του τμήματος Δρ. Βάγιας Κατή και του συνταξιούχου πλέον (από το 2011) ερευνητή του τμήματος και καθηγητή του μαθήματος ζιζανιολογίας στη Σ.Τ.Ε.Γ. του ΤΕΙ Κρήτης Δρ. Ευάγγελου Α. Πασπάτη. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην Διεύθυνση του Μ.Φ.Ι. για την διάθεση του εργαστηριακού χώρου και την παραχώρηση των οργάνων και υλικών που ήταν απαραίτητα για την πραγματοποίηση του πειραματικού μέρους της παρούσας μελέτης.

Στην Δρ. Βάγια Κατή οφείλω τις θερμές μου ευχαριστίες για την πολύτιμη καθοδήγηση και υποστήριξη της καθ' όλη την διάρκεια διεκπεραίωσης της παρούσας πτυχιακής μελέτης. Χωρίς την βοήθειά της η ολοκλήρωση αυτής της μελέτης θα ήταν αδύνατη. Επίσης ευχαριστώ θερμά τον Δρ. Ευάγγελο Α. Πασπάτη για την σημαντική βοήθειά του, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε δίνοντας μου τη δυνατότητα να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στον χώρο του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου καθώς και στην εκτίμηση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων και στην παρουσίαση της όλης εργασίας.

Τέλος ευχαριστώ θερμά όλο το προσωπικό του τμήματος Ζιζανιολογίας, τον κύριο Χάχαλη Δημοσθένη, την κυρία Τριβέλλα Ειρήνη καθώς την φίλη μου Λυμπεροπούλου Σοφία που ήταν πρόθυμο να με βοηθήσει σε ότι πρόβλημα προέκυπτε.

1 ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Ζιζάνια

1.1.1 Γενικά

Ως ζιζάνια χαρακτηρίζονται εκείνα τα φυτά τα οποία αναπτύσσονται σε θέσεις όπου δεν είναι επιθυμητά (Λόλας, 1990; Ελευθεροχωρινός, 1996). Κατά αυτή την έννοια ζιζάνια μπορεί να είναι τόσο αυτοφυή όσο και καλλιεργούμενα φυτά.

Οι παράγοντες που εξασφαλίζουν την επιτυχία επικράτησης των ζιζανίων σε ένα περιβάλλον συμπεριλαμβάνουν τα εξής (Ελευθεροχωρινός, 1996):

- Πολύ αποτελεσματικούς μηχανισμούς πολλαπλασιασμού και διασποράς
- Ευρεία προσαρμοστική και μεγάλη ανταγωνιστική ικανότητα
- Ικανότητα να επωφελούνται από τις περιποιήσεις του ανθρώπου στα καλλιεργούμενα φυτά
- Δυσκολία να εξαλειφτούν μετά την εγκατάστασή τους.

1.1.2 Κατάταξη ζιζανίων

Η κατάταξη των ζιζανίων μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους ανάλογα με ορισμένα χαρακτηριστικά τους :

- 1) Ανάλογα με τον τρόπο ανάπτυξής τους διακρίνονται σε **ποώδη, θαμνώδη, δενδρώδη**
- 2) Ανάλογα με την μορφολογία των φύλλων διακρίνονται σε **στενόφυλλα και πλατύφυλλα**
- 3) Σύμφωνα με το οικολογικό τους περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσονται χωρίζονται σε **καλλιεργειών, βοσκών και δασών**
- 4) Ανάλογα με τα βοτανικά τους χαρακτηριστικά κατατάσσονται σε **οικογένειες, γένη, είδη κ.ά.**
- 5) Ανάλογα με την διάρκεια του βιολογικού τους κύκλου χωρίζονται σε **ετήσια** (χρονική διάρκεια βιολογικού κύκλου μικρότερη από ένα

έτος), **διετή** (χρονική διάρκεια βιολογικού κύκλου δύο έτη), **πολυετή** (χρονική διάρκεια βιολογικού κύκλου μεγαλύτερη από δύο έτη).

1.1.3 Προβλήματα που προκαλούν τα ζιζάνια

Ο κύριος λόγος για τον οποίο τα ζιζάνια πρέπει να καταπολεμούνται σε μια καλλιέργεια είναι το γεγονός ότι αναστέλλουν την ανάπτυξη και μειώνουν την απόδοση των φυτών της καλλιέργειας ανάμεσα στη οποία αναπτύσσονται. Η επίδραση αυτή οφείλεται στον ανταγωνισμό για νερό, θρεπτικά στοιχεία, φως και χώρο μεταξύ των ζιζανίων και των φυτών της καλλιέργειας. Στις ΗΠΑ υπολογίζεται ότι τα ζιζάνια αποτελούν το μεγαλύτερο πρόβλημα στη γεωργία σε αντίθεση με τα έντομα και τις αρρώστιες (Λόλας, 2003). Επίσης τα ζιζάνια μπορεί να αποτελέσουν ξενιστές επιβλαβών εντόμων και παθογόνων μικροοργανισμών, μπορεί να προκαλέσουν δηλητηριάσεις σε ανθρώπους και ζώα (δηλητηριώδεις ουσίες εμπεριεχόμενες σε σπόρους και βλαστικά τμήματα), να μειώσουν την ταχύτητα ροής του νερού αρδεύσεως (υδροχαρή ζιζάνια) να μειώσουν την ορατότητα (παρουσία υψηλών ζιζανίων) στις πλευρές των δρόμων σε στροφές, διασταυρώσεις κ.ά. (Ελευθεροχωρινός, 1996).

1.1.4 Τρόποι αντιμετώπισης

Για την αντιμετώπισή των ζιζανίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες αρχές και μέθοδοι. Οι πιο συνηθισμένοι μέθοδοι αντιμετώπισης ζιζανίων είναι (Γιαννοπολίτης κ.ά. 1985; Ελευθεροχωρινός, 1996; Πασπάτης, 2003):

- Αφαίρεση ζιζανίων με το χέρι (βοτάνισμα)
- Καταστροφή των ζιζανίων με μηχανικά μέσα (σκάλισμα, οργώματα κ.ά.)
- Αμειψισπορά
- Καταστροφή ζιζανίων με φυσικά μέσα (φωτιά, κατάκλυση κ.ά.)
- Βιολογικά καταπολέμηση
- Χημική αντιμετώπιση

1.2 Ζιζανιοκτόνα

1.2.1 Γενικά

Η χημική αντιμετώπιση των ζιζανίων έχει σημειώσει τεράστια πρόοδο τα τελευταία χρόνια διότι υπερτερεί σε πολλούς τομείς σε σχέση με τις άλλες μεθόδους αντιμετώπισης ζιζανίων. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην χρήση σκευασμάτων που ονομάζονται ζιζανιοκτόνα.

Ανάλογα με τη φύση τους τα ζιζανιοκτόνα μπορούν να διακριθούν σε **χημικώς συντιθέμενα** τα οποία περιέχουν ανόργανες ή οργανικές ενώσεις που ανακαλύφθηκαν και συντέθηκαν στο εργαστήριο και σε **φυσικά ζιζανιοκτόνα** (naturally occurring herbicides) που περιέχουν φυσικές τοξίνες ανωτέρων φυτών ή οργανισμών (Ελευθεροχωρινός, 1996).

Ανάλογα με το φάσμα δράσης τους, δηλαδή το εύρος των φυτών που επηρεάζουν, διακρίνονται σε **εκλεκτικά** τα οποία καταπολεμούν επιλεκτικά συγκεκριμένα είδη ζιζανίων χωρίς να επηρεάζουν τα φυτά της καλλιέργειας και σε **καθολικά** τα οποία καταπολεμούν μεγάλο εύρος φυτών (και μπορεί να προκαλέσουν φυτοτοξικότητα και σε καλλιεργούμενα είδη).

Με βάση τον τρόπο πρόσληψης και μετακίνησης στα φυτά διακρίνονται σε **επαφής** και **διασυστηματικά** (Γιαννοπολίτης κ.α., 1985; Πασπάτης, 2003). Τα ζιζανιοκτόνα επαφής, εφαρμοσμένα στην φυλλική επιφάνεια, νεκρώνουν μόνο τα φυτικά μέρη με τα οποία έρχονται σε επαφή. Τα διασυστηματικά απορροφούνται μέσω του φυλλώματος ή των ριζών και μετακινούνται σε όλους τους ιστούς του φυτού επηρεάζοντας και τα αψέκαστα μέρη του φυτού. Έτσι, τα διασυστηματικά ζιζανιοκτόνα είναι τα μόνα που μπορούν να φτάσουν στα υπόγεια αναπαραγωγικά όργανα των πολυετών ζιζανίων καταστρέφοντας τα.

Τα ζιζανιοκτόνα μπορούν επίσης να διακριθούν σε **εδάφους** ή **φυλλώματος**, ανάλογα με το αν εφαρμόζονται στο έδαφος ή στο φύλλωμα των ζιζανίων αντίστοιχα. Λαμβάνοντας υπόψη τα στάδια ανάπτυξης της καλλιέργειας, οι επεμβάσεις που γίνονται μπορούν να χωριστούν σε **προσπαρτικές** ή **προφυτευτικές**, σε **προφυτρωτικές** και σε **μεταφυτρωτικές**. Προσπαρτικές ή προφυτευτικές είναι οι εφαρμογές που γίνονται πριν η καλλιέργεια σπαρθεί ή φυτευτεί και μπορούν να γίνουν είτε με ζιζανιοκτόνα εδάφους, σε περίπτωση που τα ζιζάνια δεν έχουν εμφανιστεί, είτε με ζιζανιοκτόνα φυλλώματος, όταν τα ζιζάνια έχουν εμφανιστεί.

Προφυτρωτικές είναι οι εφαρμογές που γίνονται σε καλλιέργεια που, ενώ έχει σπαρθεί, δεν έχει ακόμα φυτρώσει. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε αυτή την περίπτωση ζιζανιοκτόνα εδάφους ή φυλλώματος, ανάλογα με την ανάπτυξη των ζιζανίων όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Οι μεταφυτρωτικές εφαρμογές γίνονται όταν η καλλιέργεια έχει φυτρώσει, χρησιμοποιώντας ζιζανιοκτόνα εδάφους ή φυλλώματος ανάλογα πάλι με την ανάπτυξη των ζιζανίων (Ελευθεροχωρινός, 1996).

Οι επεμβάσεις των ζιζανιοκτόνων διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τον τρόπο που γίνεται η εφαρμογή:

- I. **Γενικές ή καθολικές** επεμβάσεις που γίνονται σε ολόκληρη την επιφάνεια του αγρού και μπορεί να είναι προσπαρτικές, προφυτρωτικές ή μεταφυτρωτικές με ζιζανιοκτόνα εδάφους ή φυλλώματος,
- II. **Κατευθυνόμενες** επεμβάσεις που γίνονται μόνο πάνω στην επιφάνεια του αγρού που υπάρχουν ζιζάνια και μπορεί να είναι μόνο μεταφυτρωτικές με ζιζανιοκτόνα εδάφους ή φυλλώματος και
- III. **Επεμβάσεις κατά λωρίδες** οι οποίες έχουν νόημα μόνο στις γραμμικές καλλιέργειες εφόσον γίνονται πάνω στην γραμμή σποράς. Αυτές μπορούν να γίνουν μόνο προφυτρωτικά χρησιμοποιώντας ζιζανιοκτόνα εδάφους.

Η **υπολειμματική δράση** δηλαδή η χρονική διάρκεια που παραμένει δραστικό ένα ζιζανιοκτόνο και η οποία καθορίζεται από την αρχική δόση καθώς και από την ταχύτητα απομάκρυνσης του από αυτό, έχει μεγάλη σημασία διότι σχετίζεται με την διάρκεια καταπολέμησης των ζιζανίων, με τις πιθανές ζημιές σε επόμενες ευαίσθητες καλλιέργειες και με τις τυχόν επιβλαβείς επιπτώσεις σε ανθρώπους και ζώα. Οι τρόποι με τους οποίους ένα ζιζανιοκτόνο απομακρύνεται από το εδαφικό διάλυμα είναι είτε με **φυσική απομάκρυνση** των μορίων του είτε με την **διάσπαση – αποσύνθεση** του (Εικόνα 1.1).

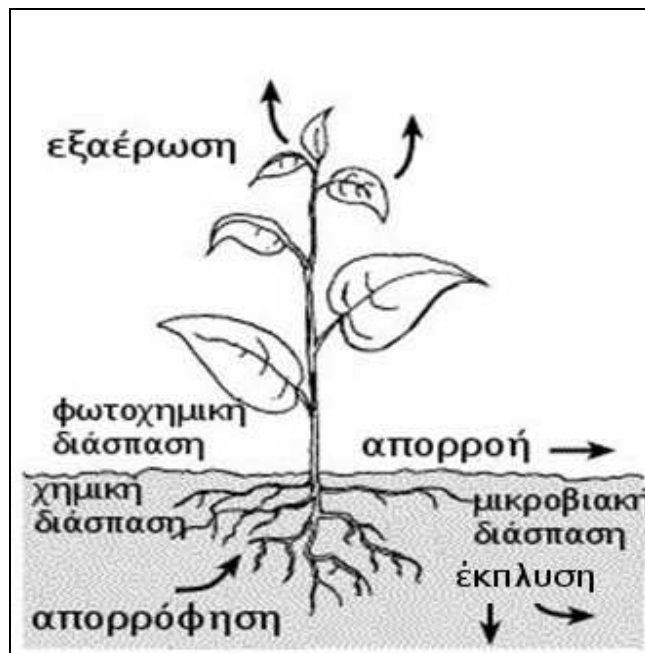
Στα πλαίσια της φυσικής απομάκρυνσης, ένα ζιζανιοκτόνο μπορεί να απομακρυνθεί από το έδαφος με διάφορους τρόπους όπως με προσρόφηση, με έκπλυση, με εξάτμιση και με την απορρόφηση του από τα φυτά.

Η **προσρόφηση** αφορά τη κατάσταση εκείνη κατά την οποία τα ιόντα αλλά και τα μη ιονισμένα μόρια των ζιζανιοκτόνων συγκρατούνται από τις επιφάνειες των ανόργανων ή οργανικών κolloειδών του εδάφους. (Ελευθεροχωρινός, 1996). Αποτελεί την σπουδαιότερη διεργασία φυσικής απομάκρυνσης ενός ζιζανιοκτόνου από το έδαφος και θεωρείται μια από της ταχύτερες (από λίγα λεπτά της ώρας έως 3

μέρες). Η **έκπλυση** είναι η απομάκρυνση ενός ζιζανιοκτόνου με την ροή του νερού και η οποία είναι δυνατόν να γίνει προς όλες τις κατευθύνσεις (καθοδική, ανοδική, οριζόντια επιφανειακή) ενώ **εξάτμιση** ή εξάχνωση καλείται η απομάκρυνση ζιζανιοκτόνων ως αέρια στην ατμόσφαιρα. Η ποσότητα των ζιζανιοκτόνων που απομακρύνεται από το έδαφος μέσω της **απορρόφησης** των ζιζανιοκτόνων από τα φυτά κυμαίνεται από 2,5-25% της αρχικής δόσης του ζιζανιοκτόνου (Ελευθεροχωρινός, 2008).

Τέλος, ένα ζιζανιοκτόνο στο έδαφος μπορεί να υποστεί **φωτοχημική, χημική ή μικροβιακή διάσπαση**. Η φωτοχημική διάσπαση γίνεται κάτω από την επίδραση του φωτός και ιδιαίτερος του υπεριώδους. Στη χημική διάσπαση λαμβάνουν χώρα αντιδράσεις όπως υδρόλυση, οξειδωση, αναγωγή και για ορισμένα ζιζανιοκτόνα θεωρείται ως η σπουδαιότερη διαδικασία απομάκρυνσης. Ορισμένοι μικροοργανισμοί του εδάφους (*Agrobacterium Clonostachys, Pseudomonas Penicillium* κ.α.), χρησιμοποιώντας ως τροφή οργανικά ζιζανιοκτόνα που εφαρμόζονται στο έδαφος, συμβάλουν στη μικροβιακή διάσπαση των ζιζανιοκτόνων στο εδαφικό διάλυμα. Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών και άρα η συγκεκριμένη διάσπαση εξαρτάται από παράγοντες όπως η υγρασία, η θερμοκρασία, το οξυγόνο, το pH, η οργανική ουσία και τα ανόργανα στοιχεία του εδάφους.

Πολλοί είναι οι παράγοντες που επηρεάζουν τον χρόνο παραμονής ενός ζιζανιοκτόνου στο έδαφος. Αυτοί έχουν να κάνουν με **το έδαφος** (θερμοκρασία, υγρασία, τύπος εδάφους, οργανική ουσία, pH, μικροβιακή χλωρίδα, βελτιωτικά εδάφους), **το κλίμα** (βροχόπτωση, θερμοκρασία, σχετική υγρασία, φως), **το ζιζανιοκτόνο** (φυσικές και χημικές ιδιότητες, τύπος σκευάσματος, δόση, μέθοδος και συχνότητα εφαρμογής, συνδυασμός ζιζανιοκτόνων).



Εικόνα 1.1: Η απομάκρυνση ενός ζιζανιοκτόνου από το εδαφικό διάλυμα
(Πηγή : Fishel, 1997)

1.2.2 Κατάταξη των ζιζανιοκτόνων

Για να γίνει αναφορά στην κατάταξη των ζιζανιοκτόνων, πρέπει πρώτα να κατανοηθούν οι όροι: δραστική ουσία, τρόπος δράσης και μηχανισμός δράσης των ζιζανιοκτόνων. Έτσι:

Δραστική ουσία ενός ζιζανιοκτόνου και γενικότερα ενός φυτοπροστατευτικού σκευάσματος είναι το βασικό συστατικό που είναι υπεύθυνο για την καταπολέμηση των οργανισμών στόχων. Είναι δηλαδή το βιολογικώς ενεργό συστατικό του σκευάσματος, που προκαλεί το θάνατο των φυτών αναστέλλοντας την κανονική τους ανάπτυξη (Ελευθεροχωρινός, 1996). Η δραστική ουσία μαζί με διάφορες άλλες ουσίες (διαλύτες, φορείς, προσκολλητικά κ.τ.λ.) αποτελούν τα συστατικά κάθε σκευάσματος.

Τρόπος δράσης (Mode of action) ενός ζιζανιοκτόνου είναι όλες οι επιδράσεις με την σειρά που παρατηρούνται σε ένα φυτό από την στιγμή που το ζιζανιοκτόνο έρχεται σε επαφή με το φυτό μέχρι που το φυτό αυτό εκδηλώνει την συνολική επίδραση του ζιζανιοκτόνου, δηλαδή το ορατό αποτέλεσμα (Λόλας, 2003).

Μηχανισμός δράσης (Mechanism of action) ενός ζιζανιοκτόνου είναι η πρωταρχική, φυσιολογική, βιοχημική ή μοριακή επίδραση στο φυτό (Λόλας, 2003).

Ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης τους τα ζιζανιοκτόνα έχουν διακριθεί σε ανάλογες ομάδες. Οι κυριότερες από αυτές είναι (Moreland, 1980; Ashton and Crafts, 1981; Kishore and Shah, 1988; and Gruys, 1997):

Ρυθμιστές αύξησης (*Growth Regulators*)

Στους ρυθμιστές αύξησης περιλαμβάνονται τα φαινοξυοξέα (Phenoxy Acids), τα βενζοϊκά οξέα (Benzoic Acids), τα κινολινοκαρβοξυλικά (Quinoline carboxylic acids) και τα πυριδινοκαρβοξυλικά (Pyridinocarboxylic acids). Τα ζιζανιοκτόνα αυτά δρουν σε πολλαπλές θέσεις μέσα στο φυτό και διαταράζουν την ορμονική ισορροπία και την σύνθεση πρωτεϊνών προκαλώντας ποικίλες ανωμαλίες στην ανάπτυξη των φυτών. Χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο ετησίων και πολυετών πλατύφυλλων ζιζανίων.

Αναστολείς της αύξησης φυταρίων (*Seedling Growth Inhibitors*)

Εδώ περιλαμβάνονται οι ακετανιλίδες (Acetanilides), οι δινιτροανιλίνες (Dinitroanilines) και τα θειοκαρβαμικά (Thiocarbamates). Αυτά τα ζιζανιοκτόνα είναι απαραίτητο να εφαρμόζονται προφυτρωτικά και μειώνουν την ικανότητα των σποροφύτων να αναπτυχθούν κανονικά στο έδαφος. Εφαρμόζονται σε σπορόφυτα ετησίων και πολυετών ζιζανίων. Τα ζιζανιοκτόνα αυτής της ομάδας δρουν στην ανάπτυξη του βλαστού (Dinitroanilines) και της ρίζας (Acetanilides, Thiocarbamates). Αυτά που δρουν στην ρίζα σταματάνε την διαίρεση των φυτικών κυττάρων και έτσι αναστέλλεται η επιμήκυνση των βλαστών και ο σχηματισμός της ρίζας. Εφόσον η κίνηση τους μέσα στο φυτό είναι περιορισμένη, οι ζημιές εμφανίζονται αρχικά σε βλαστούς και ρίζες. Τα ζιζανιοκτόνα που δρουν στους βλαστούς μεταφέρονται δια μέσου των ξυλωδών αγγείων στις περιοχές του φυτού που υπάρχει νέα βλάστηση.

Αναστολείς βιοσύνθεσης αμινοξέων (*Amino Acid Synthesis Inhibitors*)

Σε αυτή την ομάδα ανήκουν οι σουλφονυλουρίες (Sulfonylurea), οι γλυκίνες (Glycines) και οι ιμιδαζολινόλες (Imidazolinoles). Αυτά τα ζιζανιοκτόνα εμποδίζουν την δράση ειδικών ένζυμων στις αντιδράσεις σύνθεσης αμινοξέων, βασικών δομικών στοιχείων για την κανονική αύξηση και ανάπτυξη των φυτών. Τα κυριότερα από αυτά τα ένζυμα είναι το ένζυμο **EPSP synthase**, το οποίο συμβάλει στο σχηματισμό

αρωματικών οξέων στα φυτά, το **ένζυμο οξεικογαλακτική συνθετάση (ALS)** που συμβάλει στην βιοσύνθεση διακλαδισμένων αμινοξέων στους χλωροπλάστες και το **ένζυμο γλουταμινική συνθετάση (GS)** το οποίο παίζει ρόλο στον μεταβολισμό του N και στον σχηματισμό της γλουταμίνης κ.α.

Καταστροφείς κυτταρικών μεμβρανών (*Cell Membrane Disruptors*)

Εδώ ανήκουν τα διπυριδύλια (Bipyridylium), οι διφαινυλαιθέρες (Difenylethers), τα N-φαινυλφλαμίδια (N-phenylphthalamides) και οι τριαζολινόνες (Triazolinones). Τα ζιζανιοκτόνα αυτής της ομάδας είναι επαφής και καταστρέφουν τους ιστούς των φυτών διαρρηγνύοντας τις μεμβράνες των κυττάρων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ταχεία νέκρωση των φυτών. Χρησιμοποιούνται κυρίως για τον έλεγχο ετησίων ζιζανίων. Τα πολυετή ζιζάνια συνήθως αναβλαστάνουν διότι τα συγκεκριμένα ζιζανιοκτόνα δεν μετακινούνται στα υπόγεια αναπαραγωγικά όργανα των φυτών. Ακόμα, τέτοιου είδους ζιζανιοκτόνα έχουν χαμηλή τοξικότητα στο εδαφικό διάλυμα.

Παρεμποδιστές βιοσύνθεσης λιπιδίων (*Lipid Synthesis Inhibitors*)

Στην ομάδα αυτή περιλαμβάνονται τα αρυλοξυφαινοξυπροπιονικά (Aryloxyphenoxypropionates), οι κυκλοεξανδιόνες (Cyclohexandiones) και τα θειοκαρβαμικά (Thiocarbamates). Τα ζιζανιοκτόνα αυτά εμποδίζουν την παραγωγή λιπαρών οξέων τα οποία αποτελούν σημαντικά στοιχεία για την σύνθεση λιπιδίων στους χλωροπλάστες και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Τα λιπίδια αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο στην ακεραιότητα των κυτταρικών μεμβρανών και στην αύξηση των φυτών.

Αναστολείς της φωτοσύνθεσης (*Photosynthesis Inhibitors*)

Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν οι τριαζίνες (Triazines), τα ουρακίλια (Uracils), οι βενζοθειαδιαζινόνες (Benzothiazoles), τα νιτρίλια (Nitriles), τα καρβαμικά (Carbamates), οι ουρίες (Ureas), οι πυριδαζίνες (Pyridazines) και οι πυριδαζινόνες (Pyridazinones). Τα συγκεκριμένα ζιζανιοκτόνα σταματούν την φωτοσυνθετική δραστηριότητα με το να προσκολλούνται σε συγκεκριμένες θέσεις μέσα στον χλωροπλάστη. Τα συμπτώματα που προκαλούνται από την δράση αυτών των ζιζανιοκτόνων είναι η εμφάνιση χλώρωσης στα φύλλα που ακολουθείται από νέκρωση των ιστών που εμφανίζεται αρχικά στα παλαιότερα φύλλα και κατά μήκος της περιφέρειάς τους.

Αναστολείς βιοσύνθεσης χρωστικών (*Pigment Inhibitors*)

Εδώ ανήκουν οι ισοξαζόλες (Isoxazoles), οι ισοξαζολιδινόλες (Isoxazolidinoles), οι οξαδιαζόλες (Oxadiazoles), οι πυριδαζινόλες (Pyridazinoles) και οι τρικετόνες (Triketones). Η δράση αυτών των ζιζανιοκτόνων εμποδίζει την σύνθεση χρωστικών ή προκαλεί την καταστροφή τους. Όπως είναι γνωστό οι 2 σημαντικότερες χρωστικές των φυτών που είναι απαραίτητες για την φωτοσύνθεση και παίζουν σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό των φυτών είναι τα καροτενοειδή και η χλωροφύλλη. Χαρακτηριστικό σύμπτωμα της δράσης αυτών των ζιζανιοκτόνων είναι η λεύκανση (bleaching) των φύλλων.

1.2.3 Ορθολογική χρήση ζιζανιοκτόνων

Εξαιτίας της γρήγορης και μεγάλης αποτελεσματικότητά τους, της εύκολης και οικονομικής εφαρμογής τους καθώς και της δυνατότητας ελέγχου και καταπολέμησης ζιζανίων εκεί όπου οι άλλες μέθοδοι δεν μπορούν (πολυετή ζιζάνια, καταπολέμηση σε μη γραμμικές καλλιέργειες κ.τ.λ.), τα ζιζανιοκτόνα έχουν επιφέρει επανάσταση στην αντιμετώπιση των ζιζανίων παγκοσμίως (Λόλας, 2003). Για αυτούς τους λόγους η χημική μέθοδος έχει επικρατήσει έναντι των άλλων μεθόδων καταπολέμησης ζιζανίων (καλλιεργητικές, μηχανικές, βιολογικές).

Η εφαρμογή της χημικής καταπολέμησης των ζιζανίων όμως εγκυμονεί κινδύνους αν δεν γίνει με τον ενδεδειγμένο τρόπο. Οι κίνδυνοι μπορεί να αφορούν στην υγεία του χρήστη (χειριστή ψεκαστικού μηχανήματος - παραγωγού) αλλά και του καταναλωτή. Επιπλέον η συνεχής και μη ορθολογική χρήση των ζιζανιοκτόνων οδηγεί συχνά σε προβλήματα και στην καλλιέργεια. Σε αυτά ανήκουν φαινόμενα εκδήλωσης φυτοτοξικότητας, λόγω ψεκαστικού νέφους που εφαρμόστηκε με πίεση υψηλότερη της ενδεδειγμένης, ή λόγω υπολειμμάτων ζιζανιοκτόνων στο έδαφος. Επιπλέον, η μη ορθολογική χρήση των ζιζανιοκτόνων (π.χ. συνεχής χρήση ζιζανιοκτόνων με τον ίδιο τρόπο δράσης) μπορεί να οδηγήσει στην απώλεια της αποτελεσματικότητάς τους λόγω ανάπτυξης ανθεκτικών ζιζανίων (Λόλας, 2003; Ελευθεροχωρινός, 1996). Η εμφάνιση και η επικράτηση βιοτύπων ζιζανίων με μειωμένη ευαισθησία στα ζιζανιοκτόνα, έχουν επιφέρει σοβαρά προβλήματα στην αντιμετώπισή τους παγκοσμίως (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007).

Ακολουθώντας τους κανόνες ορθής εφαρμογής των ζιζανιοκτόνων περιορίζονται οι πιθανοί κίνδυνοι για τον άνθρωπο, τα ζώα, το περιβάλλον και τις ευαίσθητες καλλιέργειες. Έτσι λοιπόν είναι σημαντικό να παίρνονται ορισμένες προφυλάξεις κατά την διάρκεια εφαρμογής των ζιζανιοκτόνων. Σύμφωνα με τους Γιαννοπολίτη κ.α. (1985) μερικές ενδεικτικές προφυλάξεις που αφορούν την **προστασία των ανθρώπων** είναι:

- Πιστή τήρηση των οδηγιών της ετικέτας των χρησιμοποιούμενων σκευασμάτων
- Χρήση προστατευτικού εξοπλισμού
- Ψεκασμός όταν δεν φυσάει
- Πλύσιμο χεριών και προσώπου μετά την εφαρμογή

Όσον αφορά την **προστασία της κτηνοτροφίας** θα πρέπει να αποφεύγεται:

- η βόσκηση των ζώων κοντά σε ψεκασμένες περιοχές
- η απόρριψη κενών ή γεμάτων συσκευασιών σε χώρους που βοσκούν ελεύθερα ζώα

Τέλος για την **προστασία του περιβάλλοντος** θα πρέπει να:

- Τηρούνται οι αποστάσεις ασφαλείας κατά τον ψεκασμό από κανάλια άρδευσης, ποτάμια ή άλλες πηγές νερού
- Ξεπλένεται το δοχείο του σκευάσματος με νερό και το ξέπλυμα να επιστρέφεται στο δοχείο ψεκασμού
- Απορρίπτονται τα άδεια και ξεπλυμένα δοχεία σκευασμάτων σε ειδικούς κάδους.

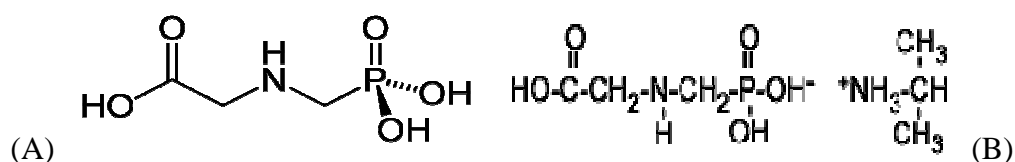
1.3 Το ζιζανιοκτόνο glyphosate

1.3.1 Γενικά στοιχεία

Η σύνθεση του **glyphosate** έγινε για πρώτη φορά σε μια μικρή Ελβετική, φαρμακευτική εταιρία από τον Henri Martin, χωρίς όμως η χρήση του να προορίζεται για την καταπολέμηση ζιζανίων. Ο πρώτος που συνέθεσε και δοκίμασε το glyphosate

ως ζιζανιοκτόνο ήταν ο John E. Franz της εταιρίας **Monsanto**, στις αρχές της δεκαετίας του 1970 (Franz *et al.*, 1997; Duke and Powles, 2008). Το 1974 το glyphosate διατέθηκε στην αγορά ως άλας ισοπροπυλαμίνης με την επωνυμία Roundup ως ένα μη εκλεκτικό ζιζανιοκτόνο φυλλώματος (Εικόνα 1.2). Από τότε η χρήση του ακολούθησε κατακόρυφη ανοδική πορεία και η δημοτικότητα του αυξήθηκε σταθερά για πολλούς λόγους που έχουν να κάνουν κυρίως με τον τρόπο δράσης του, την μεγάλη αποτελεσματικότητά του, το περιβαλλοντικό του προφίλ κ.α. (Duke and Powles, 2008). Σήμερα το glyphosate διατίθεται στην αγορά από διάφορες εταιρείες. Τα σκευάσματα που περιέχουν glyphosate είναι εγκεκριμένα σε περισσότερες από 130 χώρες για τον έλεγχο ζιζανίων σε περισσότερες από 100 καλλιέργειες. Κανένα άλλο ζιζανιοκτόνο δεν έχει τόσες εγκεκριμένες χρήσεις (Monsanto, 2002).

Ένας κοινός τύπος σκευάσματος glyphosate που χρησιμοποιείται ευρέως είναι το glyphosate 36% SL, το οποίο είναι πυκνό διάλυμα, που περιέχει 36% β/ο σε δραστική ουσία (glyphosate υπό μορφή άλατος ισοπροπυλαμίνης) και 67,6% β/β βοηθητικές ουσίες.



Εικόνα 1.2: (A) Χημική δομή του glyphosate και (B) του ισοπροπυλαμινικού άλατος του glyphosate (Πηγή : Wikipedia <http://en.wikipedia.org/wiki/Glyphosate>).

1.3.2 Χημική ταυτότητα - Ιδιότητες

Το glyphosate είναι παράγωγο φωσφονικού οξέως και γλυκίνης (N-φωσφονομεθύλο-γλυκίνη) με μεγάλη διαλυτότητα στο νερό (12 gr/l), αδιάλυτο σε πολλούς οργανικούς διαλύτες, είναι ασθενές οξύ που τυποποιείται υπό μορφή αλάτων και δεν είναι πτητικό (Μουρκίδου, 2008). Στην παρακάτω εικόνα (1.3) αναφέρονται ορισμένες από τις ιδιότητες του glyphosate.

Όνομα δραστικής ουσίας	Glyphosate
Μοριακός τύπος	C ₃ H ₈ NO ₅ P
Μοριακό βάρος	169,07
Φυσική κατάσταση	Κρυσταλλική σκόνη
Χρώμα	Λευκό
Οσμή	Καμία
Σημείο τήξης	184,5
Σημείο βρασμού	Decomposition (EC)
Ειδική πυκνότητα	1,704
Πίεση ατμών	<1*10 ⁻⁵ Pa
Διαλυτότητα στο νερό	10g/l
Αναφλεξιμότητα	Μη εύφλεκτο
Εκρηκτικότητα	Μη εκρηκτικό

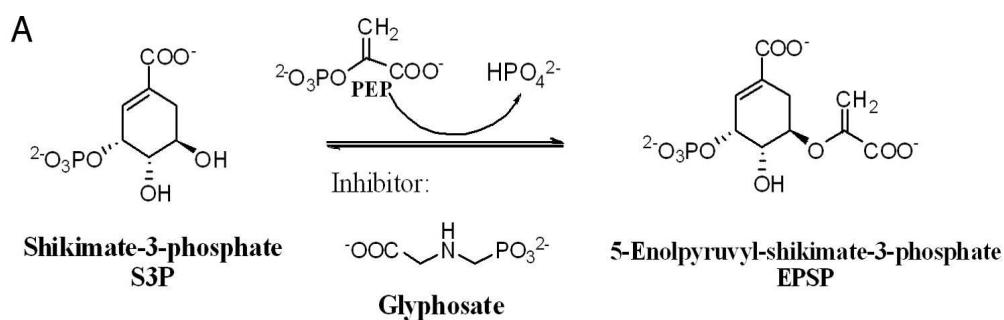
Εικόνα 1.3 : Φυσικές και χημικές ιδιότητες του glyphosate (Πηγές: World Health Organisation (WHO), 1994 - Προσαρμοσμένο από Φουντούλη, 2005).

1.3.3 Απορρόφηση από τα φυτά και τρόπος δράσης

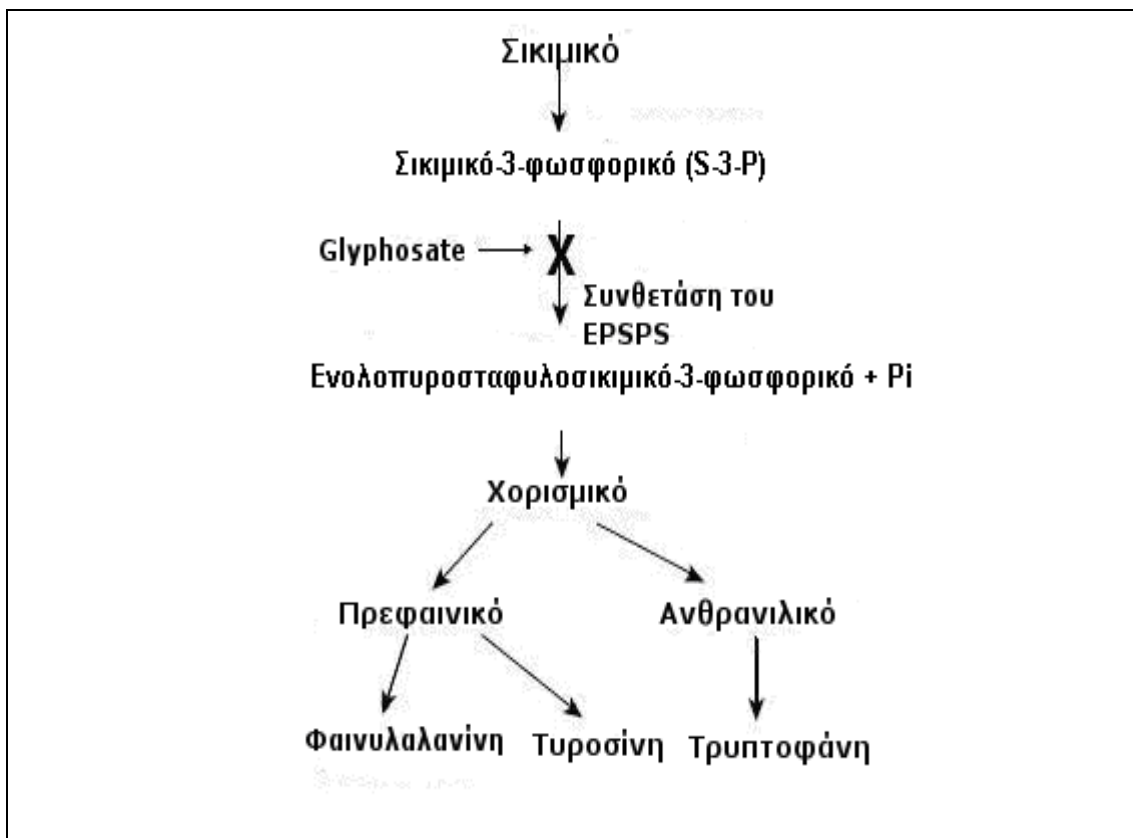
Το glyphosate χαρακτηρίζεται ως ένα **διασυστηματικό** και **μη εκλεκτικό** ζιζανιοκτόνο με σχετική γρήγορη απορρόφηση από τα φύλλα (σημείο εισόδου) και μετακίνηση προς όλα τα αναπτυσσόμενα μέρη του φυτού (μερίστωμα βλαστών και ριζών). Η μετακίνηση του γίνεται προς τους μερισματικούς ιστούς, κυρίως μέσω του συμπλάστη και δευτερεύοντος μέσω του αποπλάστη. Η είσοδος του glyphosate στο κύτταρο γίνεται μέσω της κυτταρικής μεμβράνης με τον παθητικό μηχανισμό της διάχυσης. Επίσης, η διαφορά του pH μεταξύ κυτταροπλάσματος και μεμβράνης δρα ενισχυτικά στην είσοδο του glyphosate στο κύτταρο, ενώ θεωρείται ακόμη ότι η

διέλευση αυτή υποβοηθείται από έναν μεταφορέα φωσφόρου (Ελευθεροχωρινός, 2008). Ακόμα είναι δυνατόν να μπορεί να απορροφηθεί και από τις ρίζες των φυτών με την προϋπόθεση όμως να είναι βιολογικά διαθέσιμο στο έδαφος (Ashton and Crafts, 1981). Αυτή η περίπτωση όμως θεωρείται αρκετά σπάνια εξαιτίας της ισχυρής δέσμευσης του glyphosate από τα κolloειδή του εδάφους. Έτσι η απορρόφηση του από τις ρίζες των φυτών είναι πολύ δύσκολη και ως εκ τούτου από εδάφους είναι σχεδόν μη φυτοτοξικό (Ελευθεροχωρινός, 2008).

Το glyphosate ανήκει στην ομάδα των **παρεμποδιστών της βιοσύνθεσης αρωματικών οξέων** της οικογένειας των **γλυκινών (Glycines)** (Ελευθεροχωρινός, 2008). Η δράση του βασίζεται στη αναστολή της σύνθεσης αρωματικών αμινοξέων. Πιο συγκεκριμένα απενεργοποιεί το ένζυμο Σύνθετάση του 5-ενολοπυρουβιλσικιμικού-3-φωσφορικού οξέως (**EPSP Synthase**) με την προσκόλληση του στο ένζυμο αυτό (Moreland, 1980; Sikorski and Gruys, 1997). Η απενεργοποίηση του ενζύμου EPSPS (Εικόνα 1.4) έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της σύνθεσης EPSP (χορισμικό οξύ), το οποίο αποτελεί πρόδρομη ουσία σε πολλά μονοπάτια βιοσύνθεσης συστατικών των κυττάρων όπως των αρωματικών αμινοξέων **τρυπτοφάνη, τυροσίνη και φαινυλανίνη** (Εικόνα 1.5) (Devine *et al.*, 1993; Μουρκίδου, 2008). Το glyphosate δεν αναστέλλει απλώς τη βιοσύνθεση των αρωματικών αμινοξέων αλλά και μιας πληθώρας άλλων σημαντικών ουσιών για την λειτουργία και επιβίωση των κυττάρων (Μουρκίδου, 2008). Ακόμα παρεμβαίνει στη αναπνοή, την φωτοσύνθεση και στην βιοσύνθεση της χλωροφύλλης. Το σικιμικό μονοπάτι βιοσύνθεσης ανήκει μόνο στα φυτά και στους μικροοργανισμούς. Επομένως αυτός είναι ο λόγος που το glyphosate επηρεάζει μόνο φυτά, ορισμένα βακτήρια και μύκητες και θεωρείται σχετικά ασφαλές για τα θηλαστικά και τα ψάρια, δεδομένου ότι ο μηχανισμός στον οποίο παρεμβαίνει δεν απαντάται σε αυτά.



Εικόνα 1.4 : Η απενεργοποίηση του ενζύμου EPSPS (Προσαρμοσμένο από: Ελευθεροχωρινός, 2008)



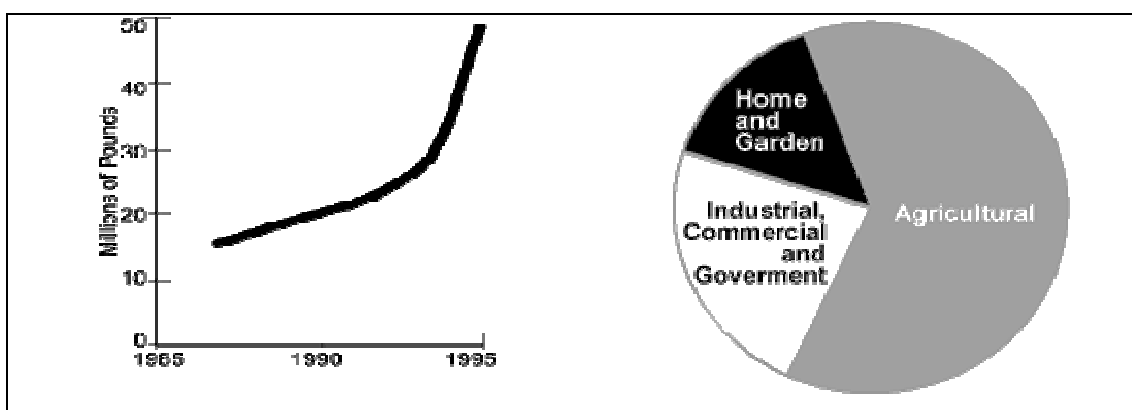
Εικόνα 1.5 : Τρόπος δράσης του glyphosate. Σχηματική απεικόνιση της μεταβολικής οδού του σικιμικού στην βιοσύνθεση των αρωματικών αμινοξέων τρυπτοφάνη, τυροσίνη και φαινυλαλανίνη και των σημείων παρεμποδισής της (Πηγή: Μουρκίδου, 2008).

1.3.4 Χρήσεις και τρόπος εφαρμογής

Το glyphosate πωλείται σε όλον τον κόσμο, σε δεκάδες εμπορικά σκευάσματα από πολλές εταιρίες φυτοφαρμάκων (Εικόνα 1.6). Ελέγχει ένα ευρύ φάσμα ζιζανίων με οικονομικά αποδοτικό και σχετικά ευνοϊκό προς το περιβάλλον τρόπο ενώ η χρήση του αυξάνεται με γοργούς ρυθμούς. Βρίσκει εφαρμογές στον τομέα της γεωργίας αλλά και της δασοπονίας (Εικόνα 1.6). Εφαρμόζεται σε διάφορα είδη φυτών όπως πλατύφυλλα, βαθύρριζα και βρύα. Μπορεί ακόμα να εφαρμοστεί σε αμπελώνες, οπωρώνες, σε γραμμικές καλλιέργειες μεταξύ των γραμμών, σε ακαλλιέργητες εκτάσεις καθώς και σε μη αγροτικές περιοχές όπως κήπους, πάρκα κ.τ.λ. Μερικά από τα πιο γνωστά ζιζάνια που καταπολεμά το glyphosate είναι: περικοκλάδα

(*Convolvulus arvensis*), βέλιουρας (*Sorghum halepense*), πολυετής τσουκνίδα (*Urtica dioica*), φτέρη (*Pteridium aquilinum*), πορφυρή κύπερη (*Cyperus rotundus*), κοινή πόα (*Poa annua*), ακακία (*Robinia pseudacacia*) κ.α. ενώ ανθεκτικά σε αυτό ζιζάνια είναι αλογοουρά (*Equisetum arvense*), κισσός (*Hedera helix*), ποταμόχορτο (*Potamogeton* spp.), φραγκοσυκιά (*Opuntia ficus-indica*) κ.α. (Γιαννοπολίτης κ.α., 1985). Στην αύξηση της χρήσης του glyphosate συνέβαλλε και σημαντική μείωση του κόστους του. Ακόμα μέσω της γενετικής μηχανικής επετεύχθη η δημιουργία γενετικώς τροποποιημένων φυτών σόγιας, βαμβακιού, ελαιοκράμβης, μηδικής και ποικιλιών αραβόσιτου με ανθεκτικότητα στο glyphosate (Castle et al. 2004; Plin-Srnica, 2006; James, 2006; Green, 2007). Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την αυξανόμενη χρήση του glyphosate σε χώρες που υιοθέτησαν γενετικώς τροποποιημένα φυτά (ΗΠΑ, Λατινική Αμερική, Ινδία κ.α.) (Κατή, 2010). Ανάλογα με το είδος της καλλιέργειας εφαρμόζεται με κατευθυνόμενο ψεκασμό σε λωρίδες ή κατά κηλίδες. Για μεγάλες εκτάσεις η εφαρμογή μπορεί να γίνει από αέρος με ειδικά διαμορφωμένα ψεκαστικά αεροπλάνα. Όμως σε ορισμένες περιπτώσεις είναι δυνατό να οδηγήσει στην πρόκληση ζημιών σε καλλιέργειες εξαιτίας της διασποράς του ψεκαστικού νέφους.

Ο χρόνος της εφαρμογής του glyphosate εξαρτάται από την ανάπτυξη των ζιζανίων. Γενικώς εφαρμόζεται όταν τα ζιζάνια βρίσκονται σε στάδιο ταχείας ανάπτυξης. Για την καταπολέμηση πολυετών ειδών ζιζανίων, όπως είναι για παράδειγμα η κύπερη, η εφαρμογή γίνεται στο στάδιο της άνθισης γιατί έτσι επιτυγχάνεται η βέλτιστη μετακίνηση του ζιζανιοκτόνου στα υπόγεια αναπαραγωγικά όργανα του ζιζανίου.

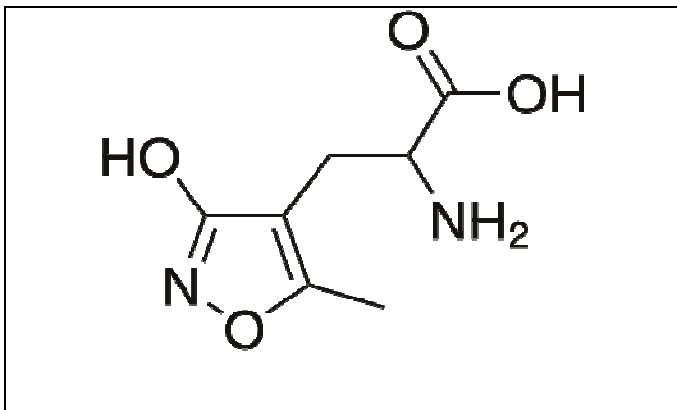


Εικόνα 1.6 : Η χρήση του glyphosate στις Η.Π.Α (πηγή: Journal of Pesticide Reform, 1998)

1.3.5 Μεταβολισμός, αποικοδόμηση και συμπεριφορά στο περιβάλλον

1.3.5.1 Μεταβολισμός και αποικοδόμηση του glyphosate

Ο κύριος μεταβολίτης του glyphosate είναι το AMPA (Εικόνα 1.7) (αμινομεθυλο-φωσφονικό οξύ).



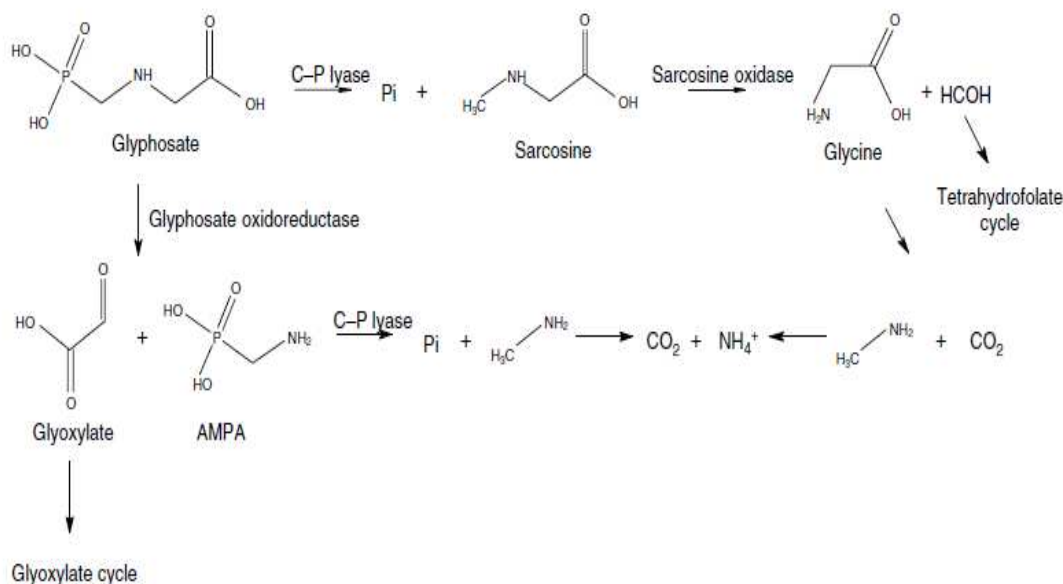
Εικόνα 1.7: Χημική δομή του AMPA (Πηγή: Wikipedia <http://en.wikipedia.org/wiki/AMPA>)

Πολλοί ερευνητές υποστηρίζουν την άποψη ότι η αποικοδόμηση του glyphosate στο έδαφος θεωρείται κατά βάση μια καθαρά μικροβιακή διαδικασία (Sprankle *et al.*, 1975b; Rueppel *et al.*, 1977; Gimsing *et al.*, 2004). Ακόμα πολλοί εδαφικοί παράγοντες (τύπος εδάφους, pH, θερμοκρασία) επηρεάζουν την αποικοδόμηση και τον ρυθμό της (Heinonen-Tanski, 1989; Grunewald *et al.*, 2001; Borggaard and Gimsing, 2008).

Το glyphosate είναι δυνατόν να αποικοδομηθεί στο έδαφος από διάφορα είδη βακτηρίων με δύο τρόπους (Εικόνα 1.10). Η μία διαδρομή είναι μέσω του σχηματισμού του AMPA, κατά την οποία το πρώτο βήμα αποτελεί η διάσπαση του δεσμού C–N (Balthazor and Hellas, 1986; Jacob *et al.*, 1988; Franz *et al.*, 1997; Barry *et al.*, 1998;). Η άλλη διαδρομή είναι μέσω του σχηματισμού μεθυλιωμένης γλυκίνης (N-methyl-glycine) γνωστής με το όνομα σαρκοσίνη και ορθοφωσφορικού οξέως και

στην συνέχεια ο σχηματισμός γλυκίνης και μιας μονο-ανθρακικής ομάδας, που τελικά μπορεί να σχηματίσει CO₂. Σε αυτή την διαδρομή το πρώτο βήμα είναι η διάσπαση του δεσμού C-P (Shinabarger and Braymer, 1986; Kishore and Jacob, 1987; Dick and Quinn, 1995).

Μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 1980 υπήρχε η αντίληψη ότι το AMPA είναι ο κύριος μεταβολίτης του glyphosate (Rueppel *et al.*, 1977; Carlisle and Trevors, 1988). Ωστόσο το 1986 έγινε η απομόνωση ενός βακτηρίου *Pseudomonas* το οποίο είχε την ικανότητα να διασπάσει το glyphosate μέσω της διαδρομής σχηματισμού της σαρκosίνης, η οποία διαδρομή προτάθηκε ως μοναδική σε αυτό το βακτήριο (Shinabarger and Braymer, 1986). Σήμερα είναι γνωστό ότι υπάρχουν πολυάριθμα είδη μικροοργανισμών του εδάφους όπως διάφορα βακτήρια, ορισμένοι μύκητες (actinomycetes) και μικροοργανισμοί αγνώστων στοιχείων που είναι σε θέση να διασπάσουν το glyphosate.



Εικόνα 1.10: Το μονοπάτι της αποικοδόμησης του glyphosate στο έδαφος (Πηγή Borggaard and Gimsing, 2008).

1.3.5.2 Κινητικότητα στο έδαφος

Η κινητικότητα και ως εκ τούτου η έκπλυση ενός ζιζανιοκτόνου και γενικά ενός φυτοπροστατευτικού προϊόντος από το έδαφος εξαρτάται από τον βαθμό

προσρόφησής του στο έδαφος (Borggaard and Gimsing, 2008). Η ισχυρή προσρόφηση στο έδαφος έχει ως αποτέλεσμα την αδρανοποίησή του. Αντίθετα μια ασθενής εδαφική προσρόφηση μπορεί να προκαλέσει εύκολα την έκπλυση από το έδαφος.

Το glyphosate **δεσμεύεται εύκολα** στα περισσότερα εδάφη και **αδρανοποιείται γρήγορα** μέσω της ισχυρής προσρόφησής του από τα κολλοειδή της αργίλου και από τα οργανικά συστατικά του εδάφους (Gevao *et al.*, 2000; Gimsing and Borggaard, 2002; Mamy and Barriuso, 2005; Sprankle *et al.*, 1975a; Hance, 1976; Glass, 1987). Επομένως η πιθανότητα έκπλυσής του είναι πολύ μικρή (Ελευθεροχωρινός, 2008). Η προσρόφηση του glyphosate είναι δυνατόν να αυξηθεί με την μείωση του εδαφικού pH εφόσον το glyphosate από πλευράς ιονισμού συμπεριφέρεται ως ασθενές οξύ. Επίσης, η προσρόφησή του αυξάνεται και με την προσθήκη κατιόντων Na^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} και Al^{3+} στο έδαφος εξαιτίας του σχηματισμού συμπλόκων του glyphosate με τα προαναφερθέντα στοιχεία (Ελευθεροχωρινός, 2008). Τα αργιλώδη εδάφη, με τη λεπτή δομή τους και τη μεγάλη επιφάνεια προσρόφησης έχουν μεγάλη ικανότητα συγκράτησης του glyphosate. Αντίθετα, τα αμμώδη εδάφη είναι πιο χοντρόκοκκα και έχουν μικρότερη επιφάνεια προσρόφησης, επομένως συγκρατούν μικρότερη ποσότητα glyphosate (Spankle *et al.*, 1975b). Το glyphosate, λόγω της χημικής δομής του ανταγωνίζεται με τον φωσφόρο για τις ίδιες θέσεις προσρόφησης στο έδαφος (Torrent, 1997; Hance, 1976; Dideriksen and Stipp, 2003; Kati and Giannopolitis, 2010). Έτσι, η παρουσία φωσφόρου στο έδαφος μπορεί να αναστείλει την προσρόφηση του glyphosate από αυτό (Hance, 1976).

Σύμφωνα με τον Vereecken (2006), έχει βρεθεί ότι περισσότερα εδάφη ο συντελεστής προσρόφησης Freundlich (k_f) του glyphosate είναι υψηλός και κυμαίνεται από 30 έως 303. Από την άλλη, ο συντελεστής κατανομής προσρόφησης (k_d) έχει βρεθεί επίσης υψηλός και κυμαίνεται από 324 έως 600 mL/g (WSSA, 2007). Έτσι γίνεται κατανοητό το γεγονός ότι το glyphosate προσροφάται ισχυρά από τα περισσότερα εδάφη.

1.3.5.3 Παρουσία του glyphosate στα επιφανειακά και υπόγεια ύδατα

Διεθνή δεδομένα αναφέρουν ότι υπολείμματα glyphosate σε συγκεντρώσεις ανώτερες των αποδεχτών (0.1μg/1) έχουν ανιχνευθεί σε 7 μόνον από 27.877 δείγματα υπογείων νερών στις ΗΠΑ ενώ δεν ανιχνεύτηκαν καθόλου υπολείμματα σε υπόγεια

νερά των χωρών Γαλλία, Αυστρία, Δανία, Νορβηγία και Ολλανδία (Vereecken, 2006).

Από την άλλη πλευρά τα επιφανειακά ύδατα είναι εντελώς εκτεθειμένα και ως εκ τούτου είναι περισσότερο ευάλωτα στην είσοδο φυτοπροστατευτικών προϊόντων συμπεριλαμβανομένου και του glyphosate. Στοχευμένες μελέτες παρακολούθησης της παρουσίας του glyphosate σε διάφορα ευρωπαϊκά ύδατα δείχνουν ότι οι υψηλότερες συγκεντρώσεις που παρατηρούνται είναι της τάξεως του 1-2μg/l για τα συστήματα των επιφανειακών υδάτων που θα μπορούσαν ενδεχομένως να χρησιμοποιηθούν ως πηγή πόσιμου νερού (Kolpin *et al.*, 2006; Thomson *et al.*, 2006; Relyea, 2006).

Ωστόσο δεν έχουν ανιχνευθεί ποσότητες σε πόσιμο νερό επειδή απομακρύνεται από αυτό μέσω των διαδικασιών καθαρισμού του πόσιμου νερού οπότε δεν θέτει σε κίνδυνο την ποιότητα του (Coyette *et al.*, 2002).

1.3.5.4 Μεταφορά στην ατμόσφαιρα

Ο άνεμος και η βροχή είναι δυνατόν να παρασύρουν ορισμένες ποσότητες ζιζανιοκτόνων τόσο κατά την διάρκεια εφαρμογής τους όσο και μετά από αυτή. Σύμφωνα με τον Ελευθεροχωρινό (2008), το glyphosate χαρακτηρίζεται από χαμηλή τάση υδρατμών (δεν είναι πτητικό) και έτσι ο κίνδυνός μεταφοράς τοξικών ατμών σε γειτονικές ευαίσθητες καλλιέργειες είναι μειωμένος. Επομένως η μεταφορά στην ατμόσφαιρα του ζιζανιοκτόνου αυτού μέσω εξάτμισης είναι ουσιαστικά ανύπαρκτη.

1.3.6 Προβλήματα από την κακή χρήση του glyphosate

Παρά το γεγονός ότι το glyphosate έχει χαρακτηριστεί ως το ζιζανιοκτόνο του αιώνα (Duke and Powels, 2008), η συνεχώς εντεινόμενη αλλά και πολλές φορές αλόγιστη και εσφαλμένη χρήση του έχει οδηγήσει στην εμφάνιση αρκετών και δυσεπίλυτων προβλημάτων. Τα προβλήματα αυτά παρουσιάζονται τόσο σε επίπεδο διαχείρισης ζιζανίων όσο και σε επίπεδο προστασίας των καλλιεργούμενων φυτών (Κατή, 2010).

1.3.6.1 Εμφάνιση ανθεκτικότητας των ζιζανίων στο glyphosate

Κατά την επικρατέστερη άποψη διεθνώς (De Prado and Franco, 2004), ο όρος **ανθεκτικότητα (resistance)** αναφέρεται «στην επιλεγμένη κληρονομική ικανότητα μερικών βιοτύπων ενός ζιζανίου να επιβιώνουν μετά από εφαρμογή της συνιστώμενης δόσης ενός ζιζανιοκτόνου, στο οποίο ο αρχικός πληθυσμός του ζιζανίου ήταν ευαίσθητος». Όπως αναφέρει και ο Ελευθεροχωρινός (2008), σύμφωνα με τον όρο της ανθεκτικότητας, «οι ανθεκτικοί βιότυποι (γενότυποι) ενός ζιζανίου προϋπάρχουν μαζί με τους ευαίσθητους βιοτύπους στον αρχικό πληθυσμό και επιλέγονται φυσικά ως αντίδραση του ζιζανίου (με ταυτόχρονη μείωση της παραλλακτικότητας) στην επαναλαμβανόμενη εφαρμογή του ζιζανιοκτόνου (πίεση επιλογής)». Σε αυτό το σημείο αξίζει να γίνει μια αναφορά του όρου **αντοχή (tolerance)**. Ο όρος αυτός αναφέρεται «στην αρχική διαβαθμισμένη ή κλιμακούμενη (λόγω παραλλακτικότητας) μη ευαισθησία ενός ζιζανίου στην συνιστώμενη δόση ενός ζιζανιοκτόνου» (Devine *et al.*, 1993). Επομένως, βάσει αυτού του ορισμού γίνεται κατανοητό ότι ο αρχικός πληθυσμός του ζιζανίου δεν ήταν ευαίσθητος στην συνιστώμενη δόση του ζιζανιοκτόνου, έτσι είναι δυνατή η κατάταξη του συγκεκριμένου ζιζανίου στα μη ευαίσθητα ζιζάνια. Έτσι, η διαφοροποίηση των όρων της ανθεκτικότητας και της αντοχής, είναι πάνω στην ένταση του φαινομένου ευαισθησίας ενός ζιζανίου σε ένα ζιζανιοκτόνο (De Prado and Franco, 2004). Χαρακτηριστικά, οι Holt και Le Baron (1990) αναφέρουν ότι η αντοχή μπορεί να χαρακτηριστεί ως μικρής έντασης ανθεκτικότητα η οποία εξαρτάται από τη δόση εφαρμογής του ζιζανιοκτόνου.

Μπορεί να υπάρξει **φυσική** ανθεκτικότητα ή αυτή να δημιουργηθεί μέσω κάποιας μεθοδολογίας (γενετική μηχανική, επιλογή, βιότυποι από ιστοκαλλιέργεια, ή μετάλλαξη) (Λόλας, 2003).

1.3.6.2 Φυτοτοξικότητα

Κατά τη χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων στην γεωργική πράξη, είναι δυνατόν να εμφανιστούν δευτερογενείς επιδράσεις (φυτοτοξικότητα) στα φυτά της καλλιέργειας που δέχονται την επέμβαση του σκευάσματος. Με τον όρο φυτοτοξικότητα από ζιζανιοκτόνα εννοούνται κυρίως οι ζημιές φυτικών οργάνων (φύλλων, καρπών, κλαδιών) που προκαλούνται σε φυτά αυτοφυή ή καλλιεργούμενα

(Λόλας, 2003). Η φυτοτοξικότητα δεν σχετίζεται πάντα με την δραστική ουσία, αλλά και με τις βοηθητικές ουσίες που είναι απαραίτητες για την παρασκευή του προϊόντος (Πολυράκης, 2003). Αξίζει πάντως να σημειωθεί ότι φυτοτοξικότητες μπορούν να παρατηρηθούν ως αποτελέσματα και άλλων παραγόντων όπως λιπάσματα, εντομοκτόνα, ρυθμιστές αύξησης, χαμηλές θερμοκρασίες, παγετούς, ατμοσφαιρική λίπανση κ.α. (Λόλας, 2003).

Το glyphosate, εξαιτίας της μη εκλεκτικής του δράσης θεωρείται ιδιαίτερα επικίνδυνο για τα καλλιεργούμενα φυτά προκαλώντας σοβαρά φυτοτοξικά προβλήματα (Rodney and Calvin, 1981). Τα φυτοτοξικά φαινόμενα από την χρήση του glyphosate, υπό κανονικές συνθήκες, εμφανίζονται με σχετικά αργό ρυθμό στα φυτά, συνήθως σε διάστημα μίας ή δύο εβδομάδων μετά την εφαρμογή (Ashton and Crafts 1981). Ωστόσο φαινόμενα φυτοτοξικότητας έχουν παρατηρηθεί και σε πιο γρήγορο χρονικό διάστημα.

Χαρακτηριστικά συμπτώματα φυτοτοξικότητας από το glyphosate είναι η χλώρωση και παραμόρφωση του φυλλώματος (μικροφυλλία, και κύρτωση του ελάσματος)(Εικόνα 1.11). τα οποία έχουν παρατηρηθεί σε διάφορα είδη τόσο καλλιεργούμενων φυτών όσο και ζιζανίων, όπως στο *Agropyron repens* (Campbell et al., 1976), στο *Cynodon dactylon* (Fernandez and Bayer, 1977), στο *Cyperus rotundus* (Abu-Irmaileh and Jordan, 1977; Suwunnamek and Parker, 1975) στο ροδάκινο (Marriage and Khan, 1978), στην πατάτα (Lutman and Richardson, 1978) και σε άλλα.. Αυτά τα συμπτώματα του φυλλώματος συνήθως παρατηρούνται έντονα στο νέο φύλλωμα του φυτού. Το glyphosate αναστέλλει ακόμα την ανάπτυξη πολλών φυτών. Σε πολυετή αγρωστώδη φυτά αναστέλλει την ανάπτυξη σε ρίζες και στόλωνες και επίσης έχει αναφερθεί και νέκρωση των οφθαλμών των ριζωμάτων. Ακόμα έχει παρατηρηθεί και μείωση της ανάπτυξης των βλαστών και του ύψους των φυτών μετά από εφαρμογή με glyphosate (Moshier et al., 1976; Segura et al., 1978; Moshier and Penner, 1978; Wyrill and Burnside, 1977; Moosavi-Nia and Dore, 1979 a,b; Suwunnamek and Parker, 1975; Haderlie et al., 1978). Στις περιπτώσεις που το ψεκαστικό νέφος μετά από εφαρμογή glyphosate ήρθε σε επαφή με το φύλλωμα δενδρωδών καλλιεργειών, προκλήθηκε χλώρωση της κορυφής των βλαστών, φτωχή ανάπτυξη νέου φυλλώματος, νανισμός του φυτού, ακόμα και θάνατος (Clay, 1972; Curtis, 1974; Lange et al. 1975; Rom, 1975; Putman, 1976; Marriage and Khan, 1978).



A



B

Εικόνα 1.11 Χλώρωση σε φύλλα τομάτας (A), μικροφυλλία, στένωση και καρούλιασμα σε φύλλα αχλαδιάς (B), ως αποτέλεσμα φυτοτοξικής δράσης του glyphosate (Φωτογραφίες δειγμάτων που προσκομίστηκαν για εξέταση στο Τμήμα Ζιζανιολογίας του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου)

2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Το glyphosate είναι ζιζανιοκτόνο φυλλώματος. Παρόλα αυτά, ένα σημαντικό μέρος από την εφαρμοζόμενη ποσότητα μπορεί να καταλήξει τελικά στο έδαφος. Αυτό μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους όπως με την έκπλυση από το νερό της βροχής (φυσικής ή τεχνητής) της φυλλικής επιφάνειας στην οποία εφαρμόστηκε, με την διασπορά του ψεκαστικού νέφους (drift) όταν ο ψεκασμός δεν γίνεται σωστά (Al-Kathib and Peterson, 1999), καθώς και μέσω της απελευθέρωσης του από τα υπολείμματα φυτών, που δέχτηκαν εφαρμογή με glyphosate στο παρελθόν και έχουν παραμείνει στο χωράφι (von Wiren-Lehr *et al.*, 1997; Neumann *et al.*, 2006; Laitinen *et al.*, 2007; Tesfamariam *et al.*, 2009). Επίσης, η ηλικία των ζιζανίων και η πυκνότητά τους στο χωράφι επηρεάζει την ποσότητα του glyphosate που φτάνει στο έδαφος. Έτσι, αν η εφαρμογή γίνει σε χωράφι που έχει λίγα ζιζάνια και αυτά βρίσκονται σε νεαρό στάδιο, έχουν επομένως μικρή φυλλική επιφάνεια, τότε ένα σημαντικό μέρος του ψεκαζόμενου glyphosate θα πέσει στο έδαφος. Για τους παραπάνω λόγους μελετήθηκε σε πειράματα στο εργαστήριο τα οποία παρουσιάζονται παρακάτω, η συμπεριφορά του glyphosate .

2.1 Επίδραση της θερμοκρασίας και του φωσφόρου στην συγκέντρωση glyphosate και AMPA στο εδαφικό διάλυμα

2.1.1 Εισαγωγή

Όταν το glyphosate φτάσει το έδαφος, δεσμεύεται ισχυρά μέσω ενός μηχανισμού προσρόφησης παρόμοιο με εκείνο του φωσφόρου (Kati and Giannopolitis, 2010). Η κινητικότητα του glyphosate στο έδαφος είναι σχετικά περιορισμένη και επηρεάζεται από το pH, τα επίπεδα φωσφόρου που υπάρχουν στο έδαφος και από τον τύπο του εδάφους (Laitinen *et al.*, 2008). Ο φώσφορος και το glyphosate ανταγωνίζονται μεταξύ τους όσον αφορά τις θέσεις προσρόφησης τους στο έδαφος λόγω παρόμοιου μηχανισμού προσρόφησης (Yu-jun Wang, *et al.*, 2005). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να επηρεάζεται η προσρόφηση του glyphosate στο έδαφος από την παρουσία φωσφόρου, όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο.

Ένας ακόμα παράγοντας που επηρεάζει την συγκέντρωση του glyphosate στο εδαφικό διάλυμα είναι και η παρουσία και δραστηριότητα των μικροοργανισμών (Sprankle *et al.*, 1975b; Giesy *et al.*, 2000). Έχει αναφερθεί ότι η κύρια οδός διάσπασης του glyphosate στο περιβάλλον είναι μέσω της μικροβιακής αποικοδόμησης του στο έδαφος (Franz *et al.* 1997). Το glyphosate αδρανοποιείται και διασπάται από τους μικροοργανισμούς του εδάφους ανάλογα με την μικροβιακή δραστηριότητα που υπάρχει στο έδαφος και τους παράγοντες που την επηρεάζουν (Eriksson, 1975). Η θερμοκρασία και η υγρασία του εδάφους επηρεάζουν σημαντικά πολλές βιολογικές διεργασίες και ως εκ τούτου την δραστηριότητα των μικροοργανισμών στο έδαφος (Weber *et al.*, 1993). Δεδομένου λοιπόν ότι η δραστηριότητα των μικροοργανισμών επηρεάζεται από την θερμοκρασία είναι πιθανόν αυτή να επηρεάζει κατά συνέπεια και την ποσότητα του glyphosate στο εδαφικό διάλυμα.

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τον χειμώνα του 2011 στο Εργαστήριο Βιολογίας Ζιζανίων του Τμήματος Ζιζανιολογίας του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου. Ο σκοπός του πειράματος ήταν να μελετηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας και του φωσφόρου στο έδαφος στην συγκέντρωση του glyphosate και του μεταβολίτη του AMPA στο εδαφικό διάλυμα.

2.1.2 Υλικά και Μέθοδοι

2.1.2.1 Προετοιμασία χώματος

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε χώμα από την αγροτική περιοχή Σκάλας Λακωνίας που επιλέχθηκε λόγω της εκτεταμένης χρήσης glyphosate στις καλλιέργειες. Η μηχανική σύσταση του χώματος παρουσιάζεται στον πίνακα 2.1. Η προετοιμασία του χώματος πριν τις αναλύσεις περιελάμβανε ξήρανση στον αέρα και στη συνέχεια κοσκίνισμα. Για την ξήρανση το χώμα απλώθηκε σε δίσκους, σε λεπτό στρώμα και παρέμεινε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 24 ώρες. Όταν το χώμα ήταν εντελώς στεγνό περάστηκε από κόσκινο οπών 1mm².

Το ειδικό βάρος του χώματος υπολογίστηκε στο εργαστήριο και ήταν 1,21g/cm³.

Η μηχανική σύσταση του χώματος παρουσιάζονται στον πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1: Μηχανική σύσταση χώματος αγροτικής περιοχής Σκάλας Λακωνίας.

Κοκκομετρική σύσταση	Άμμος (%)	36
	Άργιλος (%)	12
	ΐλύς (%)	52
	Χαρακτηρισμός εδάφους	Silt
	pH (H ₂ O 1:1)	7,6
	Ηλ. Αγωγιμότητα στους 25°C (μS/cm)	426
	Ισοδύναμο CaCO ₃ (%)	8,4
	Οργανική ουσία (%)	1,9
	Φώσφορος (Olsen) (mg/kg)	44
Ανταλλάξιμα κατιόντα	I.A.K. (meq/100gr)	14.9
Ιχνοστοιχεία (DTPA)	Διαθέσιμος σίδηρος Fe (mg/kg)	8,7

Μετά την προετοιμασία του χώματος (ξήρανση και κοσκίνισμα) αυτό τοποθετήθηκε σε μικρά πλαστικά ποτήρια (επαναλήψεις κάθε μεταχείρισης με 65g χώματος/επανάληψη). Κάθε μεταχείριση είχε 4 επαναλήψεις. Συνοπτική περιγραφή πειραματικού σχεδίου δίδεται στον Πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2 Εφαρμογές φωσφόρου και glyphosate και επίπεδα θερμοκρασίας

Θερμοκρασία χώρου (24°C)				Ψύξη (4°C)			
+P		-P		+P		-P	
+g	-g	+g	-g	+g	-g	+g	-g

Το χώμα στο οποίο δεν έγινε εφαρμογή glyphosate (-g) αναλύθηκε για πιθανά υπολείμματα από προηγούμενες εφαρμογές που έγιναν στον αγρό.

2.1.2.2 Εφαρμογή φωσφόρου

Η προσθήκη του φωσφόρου στο έδαφος έγινε με την μορφή του άλατος διφωσφορικού ασβεστίου [Ca(H₂O₄P)₂·H₂O] (Merck) σε αναλογία 0,454 g άλατος/Kg χώματος, ποσότητα που αντιστοιχεί σε 112 mg φωσφόρου/Kg χώματος. Η εφαρμογή έγινε με ψεκάσμο υδατικού διαλύματος της απαιτούμενης ποσότητας του άλατος σε

προζυγισμένη ποσότητα χώματος. Στη συνέχεια το χώμα ομογενοποιήθηκε και έμεινε σε θερμοκρασία χώρου για 24 ώρες προκειμένου να επιτευχθεί ισορροπία.

2.1.2.3 Εφαρμογή glyphosate

Στην γεωργική πρακτική η κατώτερη ενδεδειγμένη δόση του glyphosate ως σκεύασμα περιεκτικότητας 36% σε δραστική ουσία, κυμαίνεται από 150 ως 200 ml/στρέμμα (ιστοσελίδα Υπ.Α.Α.Τ. <http://www.minagric.gr/syspest/> 26-3-2013). Ένα μέσο βάθος επιφανειακής κατεργασίας του εδάφους στα 10cm, συνεπάγεται την ανάμιξη του glyphosate που εφαρμόζεται σε ένα στρέμμα, σε συνολικό όγκο $1000\text{m}^2 \cdot 0.1\text{m} = 100\text{m}^3$. Λαμβάνοντας υπόψη την παραδοχή αυτή και το ειδικό βάρος του χώματος που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμμα ($1,21\text{g}/\text{cm}^3$), υπολογίστηκε η δόση εφαρμογής του glyphosate για την κλίμακα του πειράματος, η οποία αντιστοιχεί στην προαναφερθείσα ενδεδειγμένη δόση εφαρμογής (200 ml σκευάσματος/στρέμμα).

Στη συνέχεια τα δοχεία των επεμβάσεων με το έδαφος (πλαστικά ποτήρια) τοποθετήθηκαν σε δύο επίπεδα θερμοκρασίας σύμφωνα με σχέδιο του πειράματος (Πίνακας 2.2).

Μετά την πάροδο 7 ημερών έγινε χρωματογραφική ανάλυση σε όλες τις επεμβάσεις για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του glyphosate και του μεταβολίτη του AMPA στο εδαφικό διάλυμα.

2.1.2.4 Μέθοδος χρωματογραφικής ανάλυσης

Η μέτρηση του glyphosate και η μεταβολή του AMPA στο εδαφικό διάλυμα έγινε με μέθοδο υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) μετά από παραγωγοποίηση μετά τη στήλη. Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας ήταν Shimadzu με ανιχνευτή φθορισμού και στήλη εναλλαγής κατιόντων 4x150 mm (K^+ form) και το σύστημα παραγωγοποίησης μετά τη στήλη ήταν Pickering Laboratories (PCX5200). Ο όγκος έγχυσης ήταν 50 μl και η ροή της κινητής φάσης 1 ml/min. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του glyphosate και του AMPA έγιναν οι αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς.

2.1.2.5 Στατιστική ανάλυση.

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 9.0 για Windows. Η σύγκριση των μέσων όρων έγινε με το Duncan test (One-way ANOVA) σε επίπεδο σημαντικότητας $p \leq 0.05$.

2.1.3 Αποτελέσματα

Επίδραση του φωσφόρου

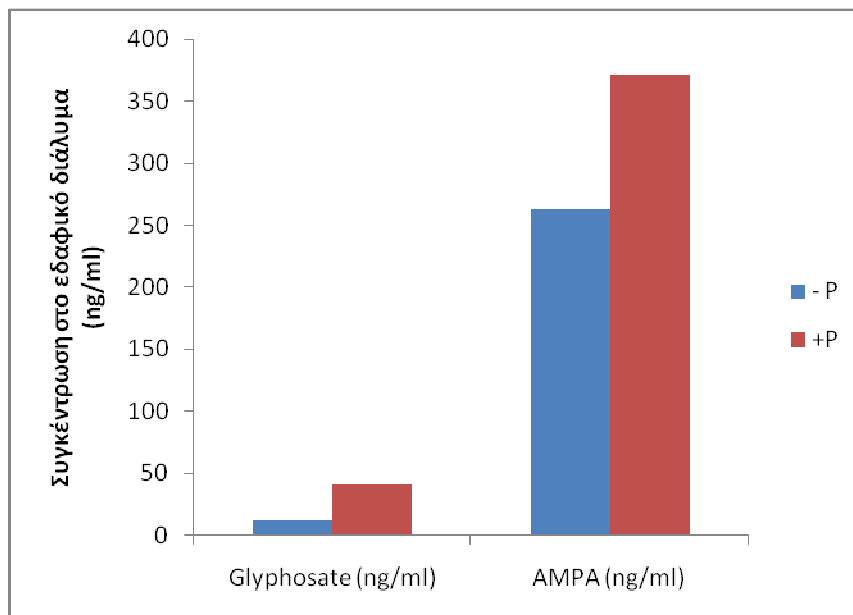
Η κύρια επίδραση του παράγοντα του φωσφόρου στην διαθέσιμη ποσότητα του glyphosate στο εδαφικό διάλυμα ήταν στατιστικώς σημαντική ($p < 0.05$). Συγκεκριμένα, η ποσότητα του glyphosate στο εδαφικό διάλυμα των δειγμάτων χώματος στα οποία έγινε εφαρμογή φωσφόρου, ήταν στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερη (κατά μέσο όρο τετραπλάσια) από την αντίστοιχη ποσότητα που ανιχνεύτηκε στα δείγματα εδάφους όπου δεν έγινε εφαρμογή φωσφόρου (Πίνακας 2.3, Γράφημα 2.3).

Η κύρια επίδραση του φωσφόρου στην συγκέντρωση του AMPA ήταν επίσης στατιστικώς σημαντική ($p < 0.05$). Η συγκέντρωση AMPA στο εδαφικό διάλυμα των δειγμάτων ήταν στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερη, από την αντίστοιχη ποσότητα που ανιχνεύτηκε στα δείγματα εδάφους όπου δεν έγινε εφαρμογή φωσφόρου (Πίνακας 2.3, Γράφημα 2.3).

Πίνακας 2.3 Κύρια επίδραση του φωσφόρου (P) στην συγκέντρωση του glyphosate και του μεταβολίτη του AMPA στο εδαφικό διάλυμα.

	Glyphosate (ng/ml)*	AMPA (ng/ml)*
Χωρίς P	11.1	262.1
Προσθήκη P	40.4	370.6
ΕΣΔ (0.05)	15.21	89.55

* Μέσος όρος 8 επαναλήψεων



Γράφημα 2.3: Κύρια επίδραση του φωσφόρου στην συγκέντρωση του glyphosate και του AMPA στο εδαφικό διάλυμα.

Επίδραση της θερμοκρασίας

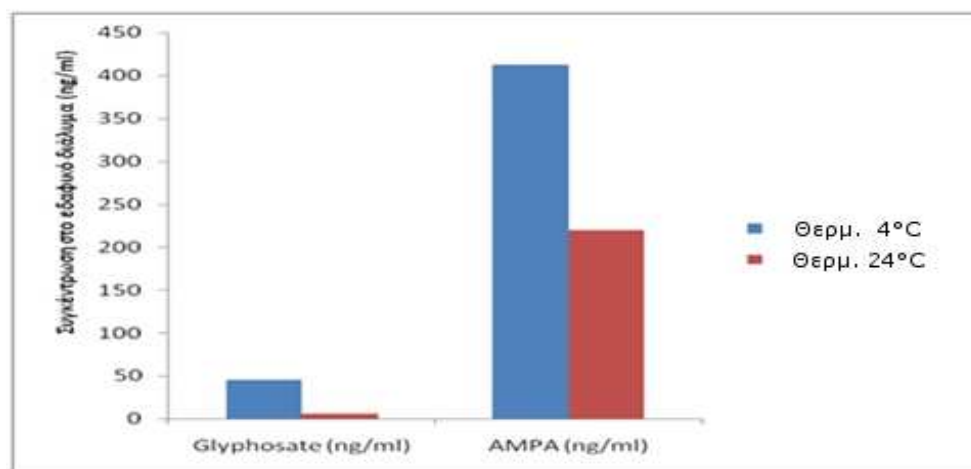
Η κύρια επίδραση του παράγοντα της θερμοκρασίας στην διαθέσιμη ποσότητα του glyphosate στο εδαφικό διάλυμα ήταν στατιστικώς σημαντική ($p < 0.05$). Συγκεκριμένα, το εδαφικό διάλυμα των δειγμάτων εδάφους που τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία 4°C για μία εβδομάδα μετά την εφαρμογή του glyphosate, περιείχαν σημαντικά μεγαλύτερη ποσότητα (σχεδόν οχταπλάσια) της εν' λόγω δραστικής ουσίας σε σχέση με τα δείγματα εδάφους που έμειναν σε θερμοκρασία 24°C, για το ίδιο διάστημα (Πίνακας 5.3.2, Γράφημα 5.3.2).

Η κύρια επίδραση της θερμοκρασίας στην συγκέντρωση του AMPA ήταν επίσης στατιστικώς σημαντική ($p < 0.05$). Τα δείγματα εδάφους που τοποθετήθηκαν για μία εβδομάδα σε θερμοκρασία 4°C μετά την εφαρμογή του glyphosate είχαν σχεδόν την διπλάσια συγκέντρωση AMPA σε σχέση με εκείνα που παρέμειναν σε θερμοκρασία 24°C για επίσης μία εβδομάδα (Πίνακας 2.4, Γράφημα 2.4).

Πίνακας 2.4 Κύρια επίδραση της θερμοκρασίας στην συγκέντρωση του glyphosate και του AMPA στο εδαφικό διάλυμα.

	Glyphosate (ng/ml)*	AMPA (ng/ml)*
Ψύξη (4°C)	45.6	412.6
Θ. χώρου (24°C)	5.9	220.1
ΕΣΔ (0.05)	15.21	89.55

* Μέσος όρος 8 επαναλήψεων



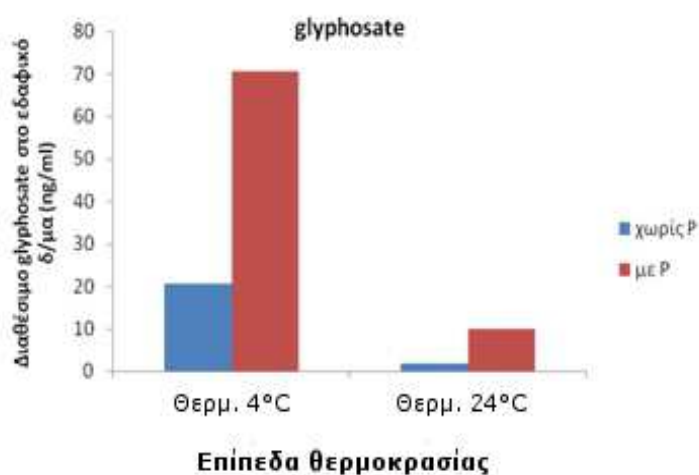
Γράφημα 2.4: Κύρια επίδραση της θερμοκρασίας στην συγκέντρωση του glyphosate και του AMPA στο εδαφικό διάλυμα.

Αλληλεπίδραση φωσφόρου - θερμοκρασίας

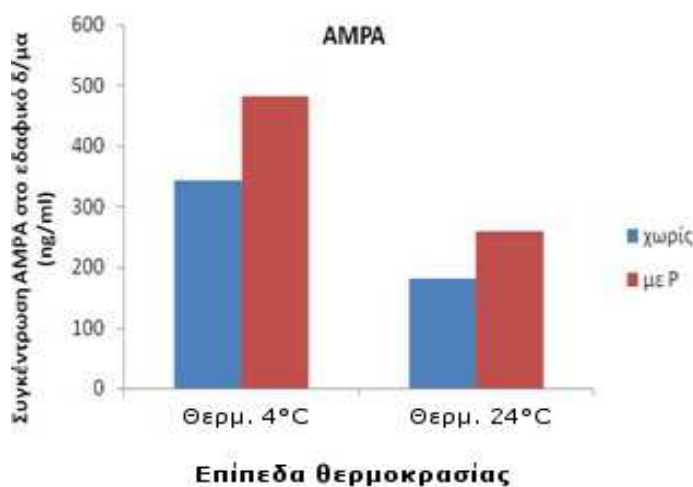
Εκτός από την κύρια επίδραση των παραγόντων του φωσφόρου και της θερμοκρασίας που αναφέρθηκαν προηγουμένως, διαπιστώθηκε επίσης και αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο αυτών παραγόντων. Η αλληλεπίδραση ήταν στατιστικώς σημαντική μόνο για το glyphosate ενώ δεν βρέθηκε να είναι σημαντική για το AMPA. Συγκεκριμένα, ο συνδυασμός συνθηκών θερμοκρασίας 24°C και απουσίας φωσφόρου έδωσαν την μικρότερη συγκέντρωση glyphosate στο εδαφικό διάλυμα, ενώ αντίθετα αυτή ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στα δείγματα που δέχθηκαν την επίδραση του συνδυασμού χαμηλής θερμοκρασίας και προσθήκης φωσφόρου (Πίνακας 2.5, Γράφημα 2.5, Γράφημα 2.6).

Πίνακας 2.5 Αλληλεπίδραση των παραγόντων του φωσφόρου και της θερμοκρασίας στην συγκέντρωση του glyphosate και του AMPA στο εδαφικό διάλυμα.

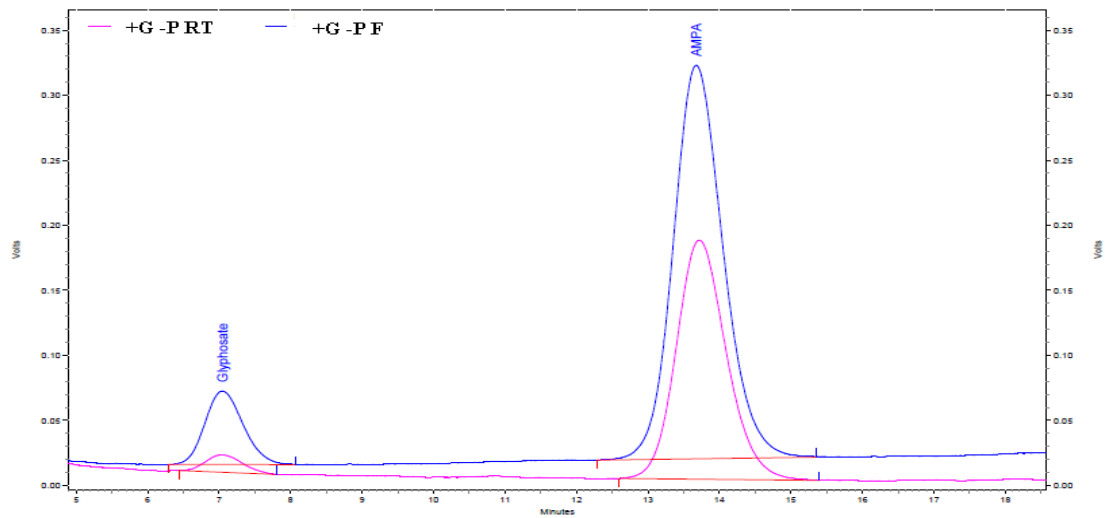
	Glyphosate (ng/ml)		AMPA (ng/ml)	
	4°C	24°C	4°C	24°C
Χωρίς P	20.5	1.8	343.5	180.8
Προσθήκη P	70.7	10.0	481.8	259.4
ΕΣΔ (0.05)	21.51		126.64	



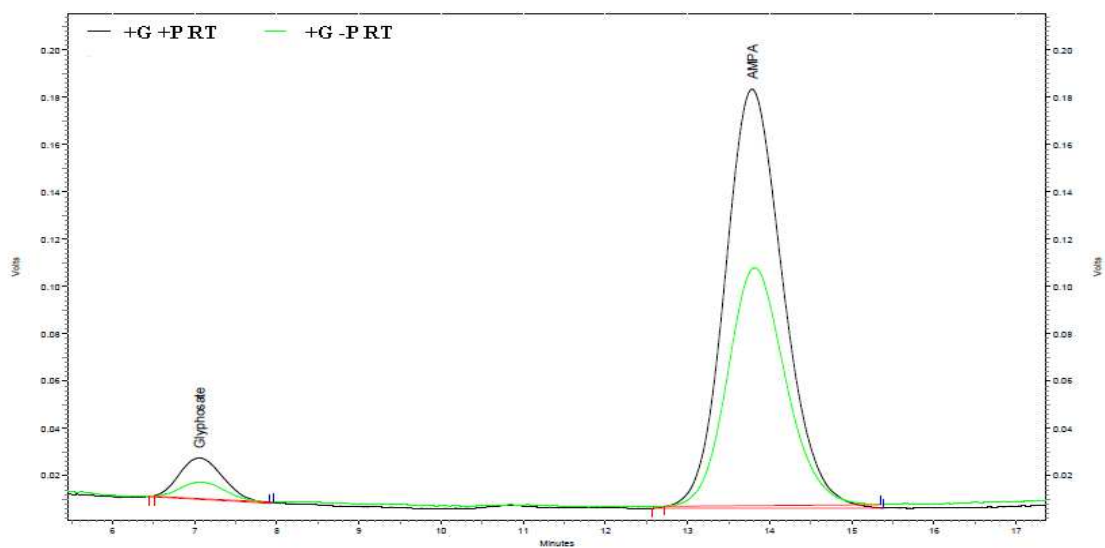
Γράφημα 2.5 Επίδραση της θερμοκρασίας και της προσθήκης φωσφόρου στην συγκέντρωση glyphosate στο εδαφικό διάλυμα.



Γράφημα 2.6 Επίδραση της θερμοκρασίας και της προσθήκης φωσφόρου στην συγκέντρωση του AMPA στο εδαφικό διάλυμα.



Εικόνα 2.7 Χρωματογράφημα της συγκέντρωσης glyphosate και AMPA στο εδαφικό διάλυμα χόματος που παρέμεινε σε θερμοκρασία 24°C (μωβ γραμμή) και 4°C (μπλε γραμμή) για 7 ημέρες (χωρίς την προσθήκη φωσφόρου).



Εικόνα 2.7 Χρωματογράφημα της συγκέντρωσης glyphosate και AMPA στο εδαφικό διάλυμα, χόματος με προσθήκη φωσφόρου (μαύρη γραμμή) ή χωρίς την προσθήκη φωσφόρου (πράσινη γραμμή), που παρέμεινε σε θερμοκρασία 24°C για 7 ημέρες μετά την εφαρμογή.

2.1.4 Συζήτηση

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα των πειραμάτων, η επίδραση του φωσφόρου στην διαθεσιμότητα του ελεύθερου glyphosate στο εδαφικό διάλυμα ήταν στατιστικώς σημαντική. Παρόμοια αποτελέσματα αυξημένης συγκέντρωσης του glyphosate στο εδαφικό διάλυμα, ως συνέπεια της φωσφορικής λίπανσης, έχουν αναφερθεί και σε παλιότερα πειράματα (Gimsing, 2004) όπου η προσθήκη φωσφόρου στο έδαφος μείωσε σημαντικά την προσρόφηση του ζιζανιοκτόνου glyphosate που είχε προηγουμένως εφαρμοστεί. Επιπλέον, αποτελέσματα πειράματος (Dion, 2001) κατά το οποίο έγινε εφαρμογή glyphosate σε εδάφη με διαφορετικές συγκεντρώσεις φωσφόρου έδειξαν ότι η προσρόφηση του ζιζανιοκτόνου μειωνόταν καθώς αυξάνονταν τα επίπεδα φωσφόρου στο έδαφος. Αυτό εξηγείται από την προκαλούμενη μείωση των θέσεων προσρόφησης του glyphosate λόγω της παρουσίας φωσφόρου ο οποίος ανταγωνίζεται με το glyphosate για τις θέσεις αυτές στα κolloειδή του εδάφους (Hance, 1976).

Ένας άλλος επίσης παράγοντας που επηρέασε τα αποτελέσματα του πειράματος ήταν και ο τύπος του χώματος (ιλύς) που χρησιμοποιήθηκε. Σε παλαιότερα πειράματα (Kati and Giannopolitis, 2010) διαπιστώθηκε ότι ορισμένοι τύποι εδαφών (ιλύς και αργιλοαμμώδες) παρουσιάζουν μεγαλύτερο κίνδυνο αυξημένης παρουσίας του glyphosate στο έδαφος όταν αυτή συνδυαστεί με προσθήκη φωσφόρου.

Επιπλέον, η κύρια επίδραση του παράγοντα της θερμοκρασίας στην διαθέσιμη ποσότητα του glyphosate στο εδαφικό διάλυμα ήταν επίσης στατιστικώς σημαντική. Είναι πιθανόν αυτό να οφείλεται στην μειωμένη δραστηριότητα των μικροοργανισμών του εδάφους που διασπών το glyphosate με αποτέλεσμα η διαθέσιμη ποσότητά του στο έδαφος να είναι σημαντικά αυξημένη σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Οι μικροοργανισμοί, για την βέλτιστη λειτουργία τους, θα πρέπει να βρίσκονται σε κατάλληλο για αυτούς περιβάλλον. Οποιαδήποτε ακραία αλλαγή συμβεί στις περιβαλλοντικές τους συνθήκες προκαλεί την καταπόνησή τους με αποτέλεσμα την ανασχεση της ανάπτυξής τους (Beales, 2004).

Γενικά, τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας και της προσθήκης φωσφόρου στην παρουσία του ελεύθερου glyphosate στο εδαφικό διάλυμα, δείχνουν ότι εάν επικρατήσουν χαμηλές θερμοκρασίες περιβάλλοντος μετά την εφαρμογή του συγκεκριμένου ζιζανιοκτόνου και την εφαρμογή φωσφορικής λίπανσης, υπάρχει μεγαλύτερος κίνδυνος παρουσίας ελεύθερου glyphosate στο εδαφικό διάλυμα (Πίνακας 5.3.3, Γράφημα 5.3.3.). Οι

συνθήκες αυτές θα μπορούσαν εν δυνάμει να προκαλέσουν πρόβλημα φυτοτοξικότητας σε φυτά μη στόχους λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης του glyphosate στο έδαφος.

2.2 Μελέτη της ανάπτυξης φυτών μετά την απορρόφηση glyphosate από το ριζικό σύστημα

2.2.1 Εισαγωγή

Ολοένα και περισσότερες αναφορές γίνονται για την πιθανότητα πρόκλησης ζημιάς σε φυτά μη-στόχους από την παρουσία glyphosate στο έδαφος (Penn and Lynch, 1982; Cornish, 1992; Smiley *et al.*, 1992; King *et al.*, 2001; Kremer *et al.*, 2001; Charlson *et al.*, 2004; Fernandez *et al.*, 2005; Huber *et al.*, 2005; Neumann, 2006; Johal and Huber, 2009). Η έρευνα στο αντικείμενο αυτό αφορά την άμεση επίπτωση του glyphosate στα καλλιεργούμενα φυτά, μέσω της πρόκλησης φυτοτοξικότητας όσο και την έμμεση επίδραση στην γενική ευρωστία του φυτού και στην ευπάθειά του σε διάφορους παθογόνους οργανισμούς. Η μελέτη της επίδρασης του glyphosate από τις ρίζες φυτών έχει ιδιαίτερη σημασία στα κηπευτικά διότι αφενός τα είδη αυτά είναι ιδιαίτερα ευπαθή στο συγκεκριμένο ζιζανιοκτόνο και αφετέρου η εφαρμογή του glyphosate είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη στην γεωργική πρακτική της Χώρας (Κατή, 2010).

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε το χειμώνα 2011 στο Εργαστήριο Βιολογίας Ζιζανίων του Τμήματος Ζιζανιολογίας του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου. Ο σκοπός του πειράματος ήταν να διερευνηθεί η επίδραση της απορρόφησης του glyphosate από το ριζικό σύστημα στην ανάπτυξη των φυτών.

2.2.2 Υλικά και Μέθοδοι

2.2.2.1 Προετοιμασία φυτών

Στις 14 Ιανουαρίου 2011 ξεκίνησε η προβλάστηση σπόρων μπιζελιού σε δοχεία με περλίτη τα οποία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (ελάχιστη θερμοκρασία 15°C, μέγιστη θερμοκρασία 25°C και φωτοπερίοδο 12 ωρών). Μετά από έξι ημέρες, όταν τα φυτά βρίσκονταν στο στάδιο των κοτυληδόνων έγινε η

μεταφύτευσή τους σε πλαστικά ποτήρια τα οποία περιείχαν 50ml θρεπτικού διαλύματος Hoagland αραιωμένου ένα προς τέσσερα (Hoagland και Arnon, 1950) και έφεραν στο χείλος τους δίσκο από σφουγγάρι με κατάλληλα τοποθετημένες εγκοπές για την στήριξη των φυτών (Εικ. 2.8). Στην συνέχεια τα ποτήρια τοποθετήθηκαν στον θάλαμο στις παραπάνω συνθήκες, προκειμένου τα νεαρά φυτά να αναπτυχθούν περισσότερο και να ακολουθήσει η εφαρμογή του glyphosate.

2.2.2.2 Εφαρμογή glyphosate

Για την εφαρμογή του glyphosate παρασκευάστηκε μία σειρά διαλυμάτων του σε διάφορες συγκεντρώσεις (0, 4.5, 9, 18, 36, 54, 72 μg δ.ο./ml) χρησιμοποιώντας το εμπορικό σκεύασμα Touchdown 36% SL (glyphosate σε μορφή αμμωνιακού άλατος 36% β/ο).

Η εφαρμογή του glyphosate έγινε μετά την πάροδο πέντε ημερών από την μεταφορά των φυτών στο θρεπτικό διάλυμα, όταν τα φυτά βρίσκονταν στο στάδιο των 3 πραγματικών φύλλων (μέσο ύψος βλαστού περίπου 10 cm). Για το σκοπό αυτό τοποθετήθηκαν 50 ml διαλύματος glyphosate από κάθε συγκέντρωση σε 8 πλαστικά ποτήρια. Ακολούθησε η μεταφορά των φυτών από τα ποτήρια με το θρεπτικό διάλυμα στα ποτήρια με το glyphosate δημιουργώντας έτσι 8 επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση (Εικ. 1). Η μεταφορά των φυτών από το θρεπτικό διάλυμα στο διάλυμα glyphosate, γινόταν προσεκτικά προκειμένου να μην τραυματιστούν οι ρίζες των φυτών. Πριν την εμφύτευση των ριζών στο διάλυμα glyphosate αυτές ξεπλένονταν με απιονισμένο νερό και στεγνώνονταν ακουμπώντας τες προσεκτικά σε διηθητικό χαρτί, για την απομάκρυνση της περίσσειας νερού. Η εμφύτευση των ριζών των φυτών γινόταν με τρόπο ώστε να μην έρθει σε επαφή το υποκοτύλιο με το διάλυμα του glyphosate. Τα φυτά παρέμειναν σε αυτή την κατάσταση για 3 ώρες προκειμένου οι ρίζες να απορροφήσουν το glyphosate. Μετά το πέρας των 3 ωρών τα φυτά απομακρύνθηκαν προσεκτικά και ογκομετρήθηκε το διάλυμα που έμεινε στο ποτήρι ώστε να υπολογιστεί η ποσότητα του glyphosate που απορρόφησαν. Αυτό έγινε με τη βοήθεια της εξίσωσης 1:

$$\Pi_{\alpha} = (O_1 - O_2) * \sum \quad (\text{εξίσωση 1})$$

Όπου:

P_a : ποσότητα του glyphosate (δ.ο.) που απορροφήθηκε σε κάθε συγκέντρωση

O_1 : αρχικός όγκος διαλύματος glyphosate (50ml)

O_2 : τελικός όγκος διαλύματος μετά τις 3 ώρες εμβάπτισης των φυτών

Σ : συγκέντρωση του διαλύματος glyphosate κάθε εφαρμογής



Εικόνα 2.8 Φυτά μπιζελιού σε πλαστικά ποτήρια με δ/μα glyphosate σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Μετά την διακοπή της απορρόφησης glyphosate από τις ρίζες των φυτών, αυτά μεταφτεύθηκαν σε γλάστρες προκειμένου να συνεχίσουν στην ανάπτυξή τους. Το υπόστρωμα στις γλάστρες ήταν φυτόχωμα με περλίτη σε αναλογία 4/1. Οι γλάστρες τοποθετήθηκαν στον θάλαμο με τις συνθήκες που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Τα φυτά ποτίζονταν ανάλογα με τις ανάγκες τους και παρέμειναν στον θάλαμο για διάστημα τριών εβδομάδων.

2.2.2.3 Μετρήσεις παραμέτρων ανάπτυξης

Μετά την πάροδο των τριών εβδομάδων καταγράφηκε το ύψος, το νωπό βάρος (NB) και το ξηρό βάρος (ΞΒ) των φυτών. Η κοπή έγινε στην επιφάνεια του εδάφους και η μέτρηση του ύψους έγινε μέχρι το κορυφαίο μερίστωμα. Τα κομμένα φυτά ζυγίστηκαν για το NB, τοποθετήθηκαν σε χάρτινες σακούλες και μεταφέρθηκαν σε κλίβανο ξήρανσης (θερμοκρασία 80°C) όπου παρέμειναν για 48 ώρες. Μετά την ξήρανσή τους ακολούθησε η ζύγιση του ΞΒ των φυτών.

2.2.2.4 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 9.0 για Windows. Η σύγκριση των μέσων όρων έγινε με το Duncan test (One-way ANOVA) σε επίπεδο σημαντικότητας $p \leq 0.05$.

2.2.3 Αποτελέσματα

Η ποσότητα της δραστικής ουσίας του glyphosate που απορρόφησαν τα φυτά καθώς και τα αποτελέσματα των μετρίσεων του ύψους, του NB και του ΞB παρουσιάζονται στον πίνακα 1.

Μία εβδομάδα μετά από την εφαρμογή του glyphosate, έγινε μια πρώτη παρατήρηση της γενικής κατάστασης των φυτών, κατά την οποία διαπιστώθηκαν διάφορα συμπτώματα (Εικ. 2.9 έως 2.13) όπως:

- Μείωση ύψους (νανισμός, μειωμένη ανάπτυξη)
- Μικροφυλλία
- Χαρακτηριστική μεσονεύρια χλώρωση
- Κύρτωση φύλλων

} Τα συμπτώματα παρατηρήθηκαν στα φύλλα κορυφής



Εικόνα 2.9 Σύμπτωμα νανισμού



Εικόνα 2.10 Σύμπτωμα μικροφυλλίας νεαρών φύλλων



Εικόνα 2.11 Σύμπτωμα μεσονευρίας χλώρωσης νεαρών φύλλων

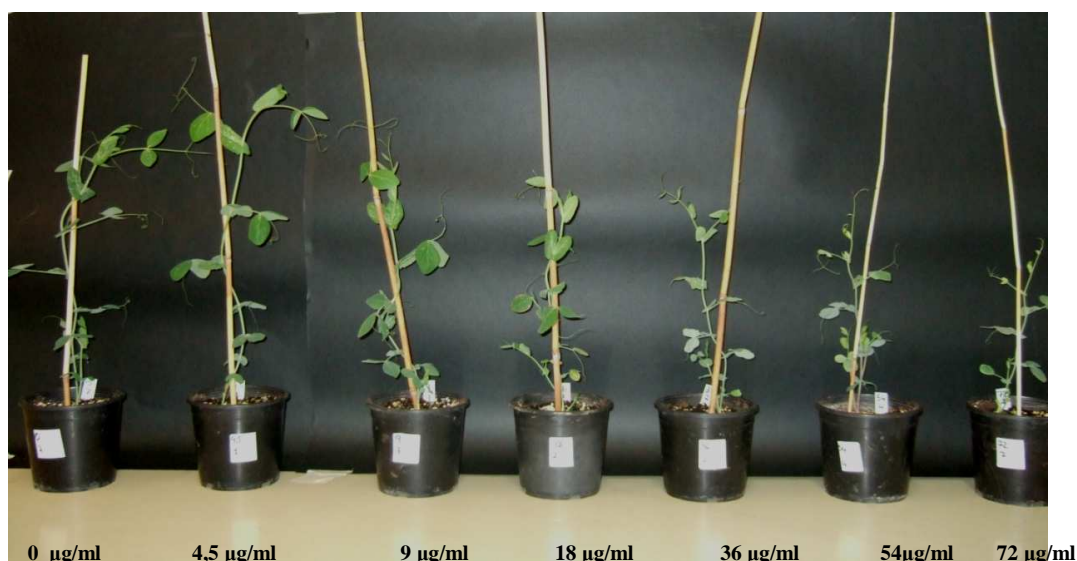


Εικόνα 2.13 Σύμπτωμα κύρτωσης σε νεαρά φύλλα φυτών μπιζελιού.

Κατά την οπτική παρατήρηση διαπιστώθηκε επίσης μια διαβάθμιση των συμπτωμάτων με μεγαλύτερη ένταση όσο αυξάνονταν η δόση (Εικ. 6). Η εκδήλωση των συμπτωμάτων ήταν εμφανής από την δόση 18 $\mu\text{g/ml}$ και η έντασή τους αυξάνονταν σταδιακά μέχρι την μεγαλύτερη δόση (72 $\mu\text{g/ml}$).

Ακόμα παρατηρήθηκε ότι στην χαμηλότερη δόση glyphosate (4.5 $\mu\text{g/ml}$) η ανάπτυξη των φυτών ήταν καλύτερη σε σχέση με τον μάρτυρα (Εικ. 6). Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε αργότερα και με τις μετρήσεις χλωρού και ξηρού βάρους (Πίνακας 1). Επίσης, παρατηρήθηκε ότι τα φυτά στη δόση 18 $\mu\text{g/ml}$,

παρουσίαζαν μεγαλύτερο ύψος σε σχέση με τις υπόλοιπες δόσεις, κάτι που επίσης επιβεβαιώθηκε από την τελική μέτρηση (Πίνακας 1).

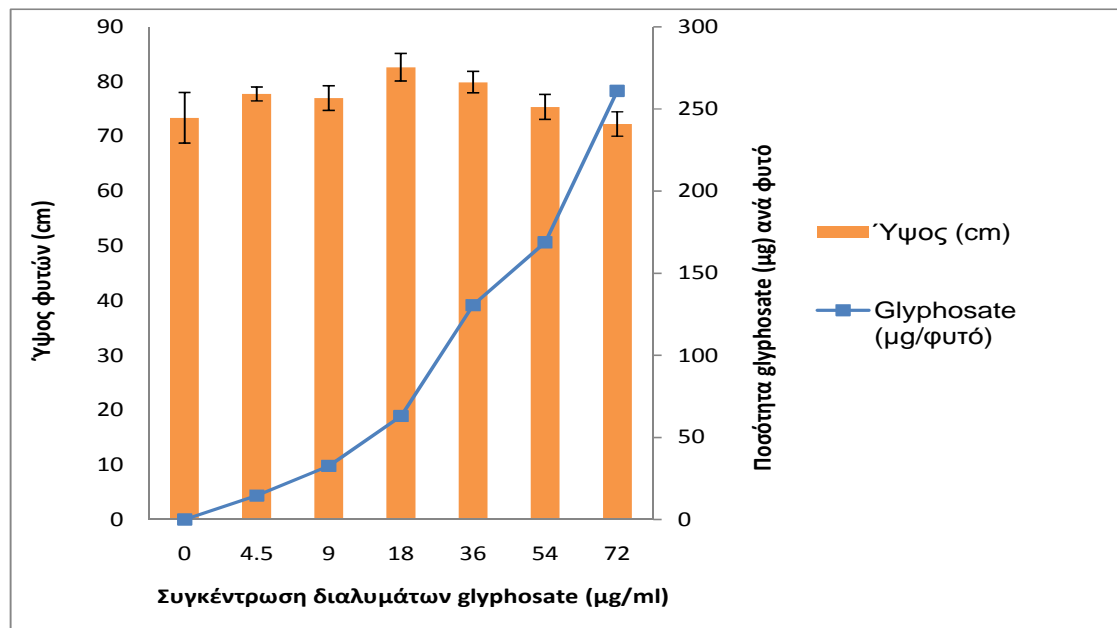


Εικόνα 6 Επίδραση των διαφόρων δόσεων glyphosate στην ανάπτυξη φυτών μπιζελιού, μία εβδομάδα μετά την εφαρμογή.

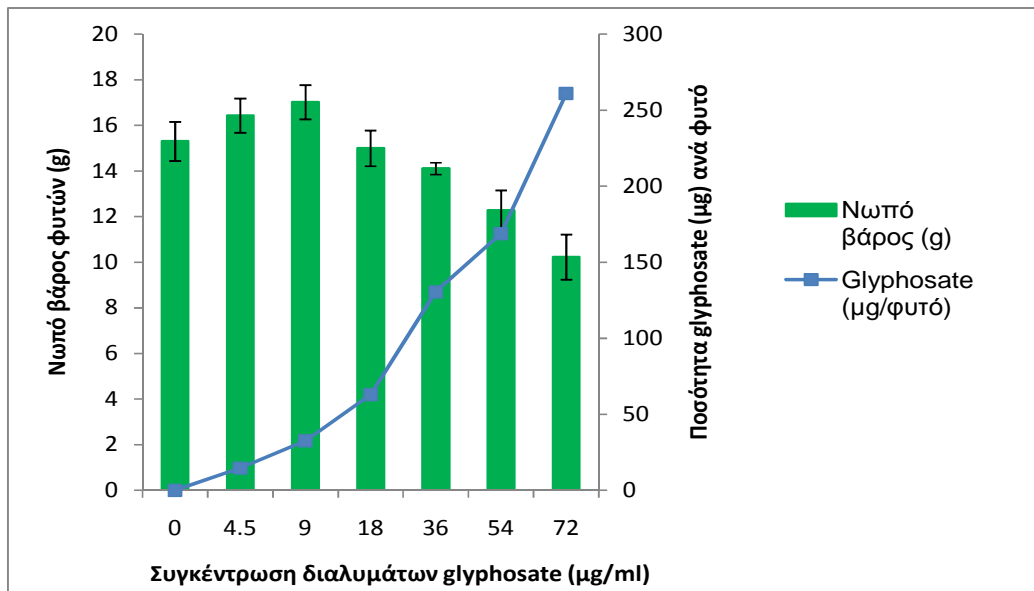
Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι, όσον αφορά το ύψος γενικά δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική επίδραση της μεταχείρισης με glyphosate, σε επίπεδο σημαντικότητας $p \leq 0.05$. Παρόλα αυτά, σύγκριση του **ύψους** των φυτών στην ενδιάμεση δόση glyphosate των 18 $\mu\text{g/ml}$, με τα φυτά του μάρτυρα και αυτά της μέγιστης δόσης (72 $\mu\text{g/ml}$), έδειξε ότι αυτά διέφεραν στατιστικώς σημαντικά (Πίνακας 1, Διάγραμμα 1). Η μέγιστη δόση glyphosate (72 $\mu\text{g/ml}$) προκάλεσε την μεγαλύτερη μείωση στο **νωπό βάρος** των φυτών, η οποία ήταν στατιστικώς σημαντική σε σχέση με τον μάρτυρα και τις δόσεις 4.5 έως 36 $\mu\text{g/ml}$. Επίσης δεν παρουσιάστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές του νωπού βάρους του μάρτυρα σε σύγκριση με τις δόσεις 4.5 έως 36 $\mu\text{g/ml}$. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και κατά την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων του **ξηρού βάρους** των φυτών, όπου και εδώ ο μάρτυρας δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε σχέση με τις δόσεις 4.5 έως 36 $\mu\text{g/ml}$. Η μεγαλύτερη μείωση του ξηρού βάρους των φυτών παρατηρήθηκε στην μέγιστη δόση glyphosate (72 $\mu\text{g/ml}$). Η διαφορά του ξηρού βάρους στη δόση αυτή, σε σχέση με το ξηρό βάρος του μάρτυρα και αυτό των δόσεων 4.5 έως 36 $\mu\text{g/ml}$, ήταν στατιστικώς σημαντική.

Πίνακας 1 Μέσος όρος ύψους, νωπού βάρους και ξηρού βάρους φυτών μπιζελιού, σε σχέση με την μέση εκτιμώμενη ποσότητα glyphosate, που απορροφήθηκε από αυτά. Οι μέσοι όροι που φέρουν διαφορετικό γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους ($p \leq 0.05$).

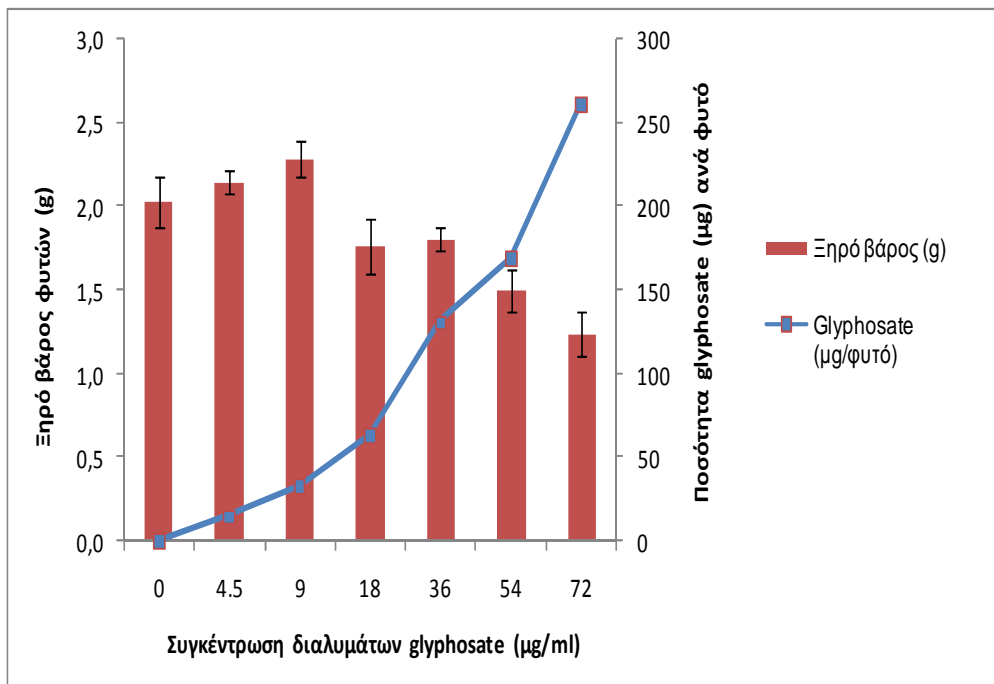
Συγκέντρωση διαλ/τος glyphosate (μg/ml)	Απορρόφηση glyphosate (μg/φυτό)	ΥΨΟΣ ΦΥΤΩΝ (cm)	ΝΩΠΟ ΒΑΡΟΣ ΦΥΤΩΝ (g)	ΞΗΡΟ ΒΑΡΟΣ ΦΥΤΩΝ (g)
0	0	73.38 ^a	15.3 ^{cd}	2.03 ^{cde}
4.5	15	75.75 ^{ab}	16.43 ^{cd}	2.14 ^{de}
9	33	77.00 ^{ab}	17.02 ^d	2.29 ^e
18	63	88.63 ^b	15.00 ^{cd}	1.76 ^{bc}
36	131	79.88 ^{ab}	14.10 ^{bc}	1.80 ^{bcd}
54	169	75.38 ^{ab}	12.28 ^{ab}	1.49 ^{ab}
72	261	72.25 ^a	10.22 ^a	1.23 ^a



Διάγραμμα 1 Επίδραση της απορρόφησης glyphosate στο ύψος των φυτών. Οι μπάρες αντιστοιχούν στο τυπικό σφάλμα ($p \leq 0.05$).



Διάγραμμα 2 Επίδραση της απορρόφησης glyphosate στο νωπό βάρος των φυτών. Οι μπάρες αντιστοιχούν στο τυπικό σφάλμα ($p \leq 0.05$).



Διάγραμμα 3 Επίδραση της απορρόφησης glyphosate στο ξηρό βάρος των φυτών. Οι μπάρες αντιστοιχούν στο τυπικό σφάλμα ($p \leq 0.05$).

2.2.4 Συζήτηση

Το πείραμα απορρόφησης glyphosate από τις ρίζες φυτών μπιζελιού, έδειξε ότι η απορρόφηση του ζιζανιοκτόνου αυτού είχε σημαντική επίπτωση στην ανάπτυξη των φυτών. Η πρώτη οπτική παρατήρηση που έγινε στα φυτά μία εβδομάδα μετά την εφαρμογή, έδειξε ότι αυτά έφεραν εμφανή συμπτώματα φυτοτοξικότητας από glyphosate (μικροφυλλία, παραμόρφωση φύλλων, νανισμός). Τα συμπτώματα αυτά ήταν παρόμοια με εκείνα που παρουσιάζονται μετά από ψεκάσμο φυλλώματος, παρά το γεγονός ότι τα φυτά στην παρούσα μελέτη δεν δέχθηκαν ποτέ ψεκάσμο φυλλώματος με το συγκεκριμένο ζιζανιοκτόνο. Ανάλογες παρατηρήσεις έγιναν στο παρελθόν και από άλλους ερευνητές (Cornish και Burgin, 2005). Σε μία από τις πρώτες μελέτες για το θέμα αυτό, ο Cornish (1992) διαπίστωσε ότι φυτά τομάτας που μεταφυτεύθηκαν σε αμμώδες έδαφος 15 ημέρες μετά την εφαρμογή glyphosate, υπέστησαν 57% μείωση του ξηρού βάρους σε σχέση με τον μάρτυρα. Επίσης οι Κατή και Γιαννοπολίτης (2008), σε μελέτη που είχε ως στόχο να εξεταστεί αν η απορρόφηση του glyphosate από το ριζικό σύστημα φυτών μπορεί να προκαλέσει φυτοτοξικότητα, αναφέρουν παρόμοια συμπτώματα φυτοτοξικότητας από glyphosate (νανισμός, χλώρωση των νεότερων φύλλων) σε είδη φασολιού και τομάτας. Επιπλέον, η επίπτωση της απορρόφησης glyphosate από τις ρίζες ήταν σημαντική και στο τελικό νωπό και ξηρό βάρος που μετρήθηκε. Στην παρούσα εργασία βρέθηκε ότι η φυτοτοξική δράση του glyphosate στην μέγιστη δόση που εφαρμόστηκε (72 mg/ml) προκάλεσε σημαντική μείωση του βάρους τους που έφτασε το 33% για το νωπό και το 39% για το ξηρό βάρος, αντίστοιχα. Οι Penn και Lynch (1982) σε μελέτη που έκαναν με σπορόφυτα κριθαριού που αναπτύσσονταν σε υδροπονικό σύστημα καλλιέργειας, παρατήρησαν μείωση του ξηρού βάρους των ριζών κατά 23%, μετά από εφαρμογή διαλύματος glyphosate 3 mg δ.ο./L στο ριζικό τους σύστημα. Πειράματα μελέτης της ευαισθησίας διαφόρων φυτικών ειδών στην φυτοτοξική δράση του glyphosate μετά από απορρόφηση από τις ρίζες, έδειξαν ότι συγκεντρώσεις του ζιζανιοκτόνου αυτού στο εδαφικό διάλυμα, της τάξης των 18 mg δ.ο./L, προκάλεσαν εμφανή συμπτώματα στα φύλλα των φυτών καθώς και σημαντική μείωση της ανάπτυξης του ριζικού τους συστήματος (Cornish και Burgin, 2005). Στην σχετικά χαμηλή αυτή συγκέντρωση διαπιστώθηκε ότι οι ρίζες ήταν γενικά πιο ευαίσθητες από το υπέργειο μέρος των φυτών. Διαπιστώθηκαν επίσης διαφορές στην ανθεκτικότητα των ειδών που μελετήθηκαν, με μεγάλη διακύμανση μεταξύ των ειδών. Οι Κατή και Γιαννοπολίτης (2008) βρήκαν ότι η απορρόφηση 85 και 55

μg/φυτό glyphosate από τις ρίζες φυτών φασολιού και τομάτας αντίστοιχα, προκάλεσαν την μείωση του νωπού βάρους των φυτών αυτών κατά 36 και 59% αντίστοιχα.

Σε αντίθεση με τα παραπάνω, έρευνα των Wibawa *et al.* (2009) έδειξε ότι δεν υπήρξε πρόβλημα φυτοτοξικότητας στην βλάστηση σπόρων αγγουριού και καλαμποκιού καθώς και στην περαιτέρω ανάπτυξη των φυτών, λόγω της εφαρμογής glyphosate στο έδαφος. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι δεν υπήρξε καμία αρνητική επίπτωση στην βλάστηση σπόρων κατά την βιοδοκιμή που έγινε σε χώμα το οποίο συλλέχθηκε μία μέρα μετά την εφαρμογή glyphosate σε αυτό. Οι δόσεις που εφαρμόστηκαν στο χώμα ήταν 400-1600 g δ.ο./ha. Παρόλα αυτά, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι το συνιστώμενο εύρος δόσεων του glyphosate στην Ελλάδα κυμαίνεται από 540-3600 g δ.ο./ha. Επομένως, είναι πιθανόν ανάλογη μελέτη στο εύρος δόσεων του glyphosate που ισχύουν για την Ελλάδα να είχε διαφορετικά αποτελέσματα ως προς την επικινδυνότητα των υπολειμμάτων μετά την εφαρμογή.

Στην παρούσα μελέτη, η συγκέντρωση των 18 mg δραστικής ουσίας /L είχε θετική επίδραση στην ανάπτυξη των φυτών μπιζελιού, ως προς το ύψος (προκάλεσε κατά μέσο αύξηση τους ύψους κατά 21% περίπου, σε σχέση με τον μάρτυρα). Επίσης, στις συγκεντρώσεις 4.5 και 9 mg δ.ο. /L βρέθηκε ότι το νωπό και ξηρό βάρος των φυτών αυξήθηκε περίπου κατά 5 και 13% αντίστοιχα, σε σχέση με τον μάρτυρα. Η θετική αυτή επίδραση του glyphosate στα φυτά μπιζελιού δεν ήταν στατιστικώς σημαντική, όμως συμφωνεί με ανάλογες παρατηρήσεις που έχουν γίνει και σε άλλες μελέτες για την θετική επίδραση χαμηλών δόσεων του glyphosate στην ανάπτυξη των φυτών (Cedergreen, 2008b; Velini *et al.* 2008). Η θετική επίδραση στην ανάπτυξη ενός φυτού από χαμηλές υποθανατηφόρες συγκεντρώσεις ενός φυτοτοξικού παράγοντα, ορίζεται ως όρμιση ή hormesis (Stebbing, 1982). Αρκετές μελέτες που έχουν γίνει τόσο σε επίπεδο εργαστηρίου όσο και στο χωράφι, έδειξαν ότι χαμηλές δόσεις ζιζανιοκτόνων μπορεί να ενισχύσουν την ανάπτυξη σε πολλά είδη φυτών (Wiedman *et al.* 1972; Belz *et al.* 2005; Cedergreen *et al.*, 2007; Cedergreen, 2008a; Cedergreen *et al.* 2009). Η εκδήλωση του φαινομένου της όρμισης από χαμηλές συγκεντρώσεις του glyphosate απασχόλησε πολλούς ερευνητές (Cedergreen 2008b; Cedergreen *et al.* 2009; Velini *et al.* 2008; El-Shahawy, 2011). Μελέτη των Cedergreen και Olesen (2010) σε φυτά κριθαριού, πάνω στον μηχανισμό που διέπει το φαινόμενο σε σχέση με το glyphosate έδειξε ότι οι χαμηλές δόσεις glyphosate είναι

δυνατόν να αυξήσουν τον ρυθμό φωτοσύνθεσης καθώς και την ανάπτυξη των συγκεκριμένων φυτών.

3 ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στο πείραμα μέτρησης ελεύθερου glyphosate στο έδαφος διερευνήθηκε η συμπεριφορά του glyphosate σε χώμα που προέρχονταν από καλλιεργούμενο αγρό και διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη φωσφόρου οδήγησε σε μεγαλύτερη ποσότητα διαθέσιμου glyphosate στο εδαφικό διάλυμα. Επιπλέον, ο παράγοντας θερμοκρασία έπαιξε σημαντικό ρόλο σε αυτή την ποσότητα. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι υπό συνθήκες ψύχους η ποσότητα του glyphosate που υπάρχει στο εδαφικό διάλυμα είναι μεγαλύτερη, σε σχέση με αυτή υπό υψηλότερες θερμοκρασίες.

Χρονικά, μία από τις εφαρμογές του glyphosate στον αγρό ενδέχεται να γίνει νωρίς την άνοιξη, για την καταπολέμηση των ζιζανίων πριν τη σπορά ή τη μεταφύτευση καλλιεργειών, όπως τα κηπευτικά. Κατά την εποχή αυτή είναι πιθανό να επικρατήσουν χαμηλές θερμοκρασίες περιβάλλοντος. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την ενδεχόμενη υψηλή παρουσία φωσφόρου στο έδαφος (π.χ. λόγω λίπανσης) μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο ύπαρξης φυτοτοξικής συγκέντρωσης glyphosate στο εδαφικό διάλυμα και κατά συνέπεια την απορρόφηση του ζιζανιοκτόνου από τις ρίζες των καλλιεργούμενων φυτών, κατά την μεταφύτευση ή σπορά της καλλιέργειας.

Όπως διαπιστώθηκε στο πείραμα με τα φυτά μιτζελιού, η απορρόφηση glyphosate από το ριζικό σύστημα είναι πιθανό να προκαλέσει προβλήματα σε ευπαθή φυτά, όπως είναι τα κηπευτικά. Η πιθανότητα πρόκλησης ζημιάς από υπολείμματα του glyphosate στο εδαφικό διάλυμα σε φυτά μη στόχους, δεν έχει μελετηθεί επαρκώς. Όμως, δεδομένου ότι η χρήση του glyphosate στην γεωργική πρακτική αυξάνεται με γρήγορους ρυθμούς, οι πιθανότητες πρόκλησης ζημιάς από την συσσώρευση του glyphosate στο έδαφος και την πιθανή παρουσία του στο εδαφικό διάλυμα, είναι σημαντικές. Έτσι, θα πρέπει να μελετηθεί περισσότερο η επίδραση που έχει η παρουσία του glyphosate στο εδαφικό διάλυμα, στην ανάπτυξη και γενική ευρωστία των φυτών. Μελλοντική έρευνα θα πρέπει να συμπεριλάβει περισσότερα είδη φυτών, διότι αναμένεται να έχουν διαφορετική αντοχή και συμπεριφορά μετά την απορρόφηση υπολειμμάτων glyphosate από το ριζικό τους σύστημα. Επίσης, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη και άλλοι παράγοντες όπως περιβαλλοντικές συνθήκες

(θερμοκρασία, υγρασία, ποσότητα, τρόπος και είδος λίπανσης) και τύπος εδάφους, καθώς επηρεάζουν σημαντικά την διαθεσιμότητα του glyphosate στο εδαφικό διάλυμα, αλλά και γενικά τον μεταβολισμό των φυτών.

4 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abu-Irmaileh, B.E. and Jordan, 1977. Some aspects of the mechanism of action of glyphosate., *Western Society of Weed Science*, **30**:57-63.
- Al-Kathib, K. and D., Peterson, 1999. Soybean (Glycine max) response to simulated drift from selected dufonylurea herbicides, dicamba, glyphosate and glufosinate. *Weed Technol*, **13**: 264-270.
- Ashton F.M. and A.S. Crafts, 1981. *Mode of action of herbicides*, 2nd ed. John Wiley and Sons, Inc. New York. 525 p.
- Balthazor, T.M. and L.E. Hallas, 1986. Glyphosate-degrading microorganisms from industrial activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, **51**:432–434.
- Barry, G.F. and G.M. Kishore, 1998. *Glyphosate tolerant plant. US Patent 5,776,760*.
- Baucom, R.S. and R. Mauricio, 2004. Fitness costs and benefits of novel herbicide tolerance in a noxious weed. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101**:136–139.
- Baylis, A.D., 2000. Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. *Pest Management Science*, **56**:299-308.
- Beales, N., 2004. Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress: A Review, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **3**:1-20.
- Belz, R., Velini E. and Duke, S., 2005. Dose/response relationships in allelopath research, in: Fujii, Y., Hiradate, S. (Eds.), *Allelopathy. New Concepts and Methodology*. *Science Publishers*, New Hampshire, USA, pp. 3–29.
- Borggaard O.K. and A.L. Gimsing, 2008, Review Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest Management Science* , **64**:441–456.\
- Bradshaw, L.D., S.R. Padgett, S.L. Kimball and B.H. Well, 1997. Perspectives on glyphosate resistance. *Weed Technology*, **11**:189–198.
- Bromilow, R.H., A.A. Evans, P.H. Nicholls and A.D. Todd, 1996. The effect on soil fertility of repeated applications of pesticides over 20 years. *Pesticide Science*, **48**:63-72,

- Bryson C.T. and G.D. Will, 1985. Susceptibility of bermudagrass (*Cynodon dactylon*) biotypes to several herbicides. *Weed Science*, **33**:848–852
- Carlisle, S.M. and J.T. Trevors, 1988. Glyphosate in the environment. *Water, Air and Soil Pollution*, **39**:409–420.
- Castle, L.A., D.L. Siehl, R. Gorton, P.A. Patten, Y.H. Chen, S. Bertain, H.J. Cho, N. Duck, J. Wong, D. Liu and M.W. Lassner, 2004. Discovery and directed evolution of a glyphosate tolerance gene. *Science*, **304**:1151-1154.
- Cedergreen N., Felby C., Porter J.R. and Streibig J.C., 2009. Chemical Stress can increase crop yield. *Field Crops Research*, **10**:10-16
- Cedergreen, N. and Olesen C.F., 2010. Can glyphosate stimulate photosynthesis? *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **96**:140–148
- Cedergreen, N., 2008a. Herbicides can stimulate plant growth. *Weed Research*, **48**:1–10.
- Cedergreen, N., 2008b. Is the growth stimulation by low doses of glyphosate sustained over time?, *Environmental Pollution*, **156**:1099–1104.
- Cedergreen, N., Streibig, J., Kudsk, P., Mathiassen, K. and Duke, S., 2007. The occurrence of hormesis in plants and algae. *Dose–Response*, **5**:150–162.
- Charlson, D.V., T.B. Baly, S.R. Cianzio and R.C. Shoemaker, 2004. Breeding soy beans for resistance to iron-deficiency chlorosis and soybean cyst nematodes. *Soil Science and Plant Nutrition*, **50**:1055-1062.
- Clay, D.V., 1972. Response of various fruit crops to glyphosate. *Weed Control*, **11**:451-457
- Cornish, P.S. and S. Burgin, 2005. Residual effects of glyphosate herbicide in ecological restoration. *Restoration Ecology* vol.13, **4**:695-702.
- Cornish, P.S., 1992. Glyphosate residues in a sandy soil affect tomato transplants. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, **32**:395-399.
- Cox, C. 1995, Glyphosate Factsheet: Part 1 and Part 2. *Journal of Pesticide Reform*, Vol. 15, No. 3.
- Coyette, B., F. Tencalla, I. Brants, Y. Fichet and D. Rouchouze, 2002. Effect of introducing glyphosate – tolerant sugar beet on pesticide usage in Europe. *Pesticide Outlook*, **13**:219-223.
- Curtis, O.F., 1974. Apple response to local application of glyphosate in foliage and wounds. *Weed Science* , **28**:219

- De Prado, R.A. and A.R. Franco, 2004. Cross-resistance and herbicide metabolism in grass weeds in Europe: biochemical and physiological aspects. *Weed Science*, **52**:441-447.
- Devine, M.D., S.O. Duke and C. Fedtke, 1993. *Physiology of Herbicide Action*. PTR Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ. p. 441.
- Dick, R.E. and J.P. Quinn, 1995. Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, **43**:545-550.
- Dideriksen K. and S.L., Stipp, 2003. The adsorption of glyphosate and phosphate to goethite: a molecular-scale atomic force microscopy study. *Geochim Cosmochim Acta*, **67**:3313-3327.
- Dion, H.M., J.B. Harsh, and J.R. Hill, 2001. Competitive sorption between glyphosate and inorganic phosphate on clay minerals and low organic matter soils. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*, **249**:385-390.
- Duke, S.O. and S.B. Powles, 2008. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, **64**:319-325.
- El-Shahawy, T.A. and A.A. Faida, 2011. Hormesis influence of glyphosate in between increasing growth, yield and controlling weeds in Faba Bean. *Journal of American Science*, **7**:139-144.
- Eriksson, K.E., 1975. Roundup. *Weeds and Weed Control*. **16**:5-6.
- European glyphosate environmental information source (EGEIS), *Environmental Fate of Glyphosate a Summary*. Διαθέσιμο στον δικτυακό τόπο: http://www.egeis.org/home/glyph_info/monograph.html?action=showOption&optionSelected (τελευταία πρόσβαση στις 28/12/2010).
- Fernandez, C.H. and D.E. Bayer, 1977. Penetration, translocation and toxicity of glyphosate in bermudagrass (*Cynodon dactylon*). *Weed Science*, **25**:396-400.
- Fernandez, M.R., F. Sellers, D. Gehl, R.M. Depaw and R.P. Zentner, 2005. Crop production factors associated with Fusarium head blight in spring wheat in Eastern Saskatchewan. *Crop Science*, **45**:1908-1916.
- Fishel, F., 1997. Pesticides and environment. *Department of agronomy*. Διαθέσιμο στον δικτυακό τόπο: <http://extension.missouri.edu/p/G7520>

- Franz, J.E., M.K. Mao and J.A. Sikorski, 1997. Glyphosate: A Unique and Global Herbicide. ACS Monograph No. 189. *American Chemical Society*, Washington, DC, pp. 653.
- Gevao, B., K.T. Sample, K.C. Jones, 2000. Bound pesticide residues in soils: a review. *Environmental Pollutans*, **108**:3-14.
- Giesy, J.P., Dobson, S. and Solomon. K.R., 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, **167**:35-120.
- Gimsing, A.L., O.K. Borggaard, 2002. Competitive adsorption and desorption of glyphosate and phosphate on clay silicates and oxides. *Clay Miner*, **37**:509–515
- Gimsing, A.L., O.K. Borggaard, M. Bang, 2004. Influence of soil composition on adsorption of glyphosate and phosphate by contrasting Danish surface soils. *European Journal of Soil Science*, **55**:183-191.
- Glass, R.L., 1987. Adsorption of glyphosate by soils and clay minerals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **35**:497-500.
- Green JM, 2007. Review of glyphosate and ALS-inhibiting herbicide crop resistance and resistant weed management. *Weed Technology*, **21**:547–558.
- Grossbard, E. and D. Atkinson, 1985. *The Herbicide Glyphosate*, Butterworths, London. pp. 490
- Grunewald, K., W. Schmidt, C. Unger, G. Hanschemann, 2001. Behavior of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in soils and water of reservoir Radeburg II catchment (Saxony / Germany). *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **164**:65-70.
- Haderlie, L.C., F.W. Slife, and H.S. Butler, 1978. ¹⁴C-glyphosate absorption and translocation in germinating maize (*Zea mays*) and soybean (*Glycine max*) seeds and in soybean plants. *Weed Research*, **18**:269-273.
- Hance, R. J., 1976. Adsorption of glyphosate by soils. *Pesticide Science*, **7**:363-366.
- Heap, I., 2008. International survey of herbicide resistance weeds. Available at web site : <http://www.weedsearch.com/in.asp> (last access 14/10/2010).
- Heinonen-Tanski, H., 1989. The effect of temperature and liming on degradation of glyphosate in two arctic forest soils. *Soil Biology*, **46**:1217-1223.
- Holt, J.S. and H.M. Le Baron, 1990. Significance and distribution of herbicide resistance. *Weed Technology*, **4**:141-155.

- Huber, D.M., M.W. Cheng and B.A. Winsor, 2005. Association of serve *Corynespora* root rot of soybean with glyphosate-killed giant ragweed. *Phytopathology* 95 S45.
- Jacob, G.S., J.R. Garbow, L.E Hallas, M.N. Kimack, G.M. Kishore and J, Schaefer, 1988. Metabolism of glyphosate in *Pseudomonas* sp. strain LBr. *Applied and Environmental Microbiology*, **54**:2953–2958.
- James, C., 2006. Global status of commercialized biotech/GM crops. ISAAA *Briefs* No. 35.
- Johal, G.S. And D.M. Huber, 2009. Glyphosate effects on diseases of plants. *European Journal of Agronomy*, **31**:144–152.
- Kati V. and C.N. Giannopolitis, 2010. Phosphate influence on glyphosate desorption after repeated applications in four contrasting Greek agricultural soils. *15th Syppocium EWRS Proceedings*, Kaposvar Hungary 12-15 July 2010, p. 312.
- King, C.A., C.C. Purcell and E.D. Vories, 2001. Plant growth and nitrogenase activity of glyphosate tolerant soybean in response to foliar glyphosate application. *Agronomy Journal*, **93**:179-180.
- Kishore G.M. and D.M. Shah, 1988. Amino Acid Biosynthesis Inhibitors as Herbicides. *Annual Review of Biochemistry*, **57**: 627-663.
- Kishore, G.M. and G.S. Jacob, 1987. Degradation of glyphosate by *Pseudomonas* sp. strain PG2982 via a sarcosine intermediate. *The Journal of Biological Chemistry*, **262**:12164–12168.
- Kolpin D.W., E.M. Thurman, E.A. Lee, M.T. Meyer, E.T. Furlong and S.T. Glassmeyer, 2006. Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States. *Science of the Total Environment*, **354**:191–197.
- Kremer, R.J., P.A. Donald, A.J. Klaser and H.C. Minor, 2001. Herbicide impact of *Fusarium* ssp and soybean cyst nematode in glyphosate “toleran” soybean. *American Society of Agronomy* (title summary: 503-104D).
- Laitinen, P., K. Siimes, S. Rämö, L. Jauhiainen, L. Eronen, S Oinonen and H. Hartikainen, 2008. *Technical Reports Organic Compounds in the Enviroment*, **37**:830-838.
- Laitinen, P., Sari Rämö, S. and Siimes, K., 2007. Glyphosate translocation from plants to soil - does this constitute a significant proportion of residues in soil? *Plant Soil*. **300**:51-61.

- Lange, A.H., B.B. Fisher, C.L. Elmore, H.M. Kempen, and J. Schesselman, 1975. Roundup The end of perennial weeds in tree and vine crops? *California Agriculture*, **19**:6-7.
- Lutman, P.J. W. and W.G. Richardson, 1978. The activity of glyphosate and aminotriazole against volunteer potato plants and their daughter tubers. *Weed Research*, **18**:65-70.
- Mamy, L. and E. Barriuso, 2005. Glyphosate adsorption in soils compared to herbicides replaced with the introduction of glyphosate resistance. *Chemosphere*, **61**:844-855.
- Marriage, P.B. and S.U. Khan, 1978. Differential varietal tolerance of peach (*Prunus persica*) seedlings to glyphosate. *Weed Science*, **26**:374-378.
- Michitte, P., R. De Prado, N. Espinoza, J.P. Ruiz-Santaella and C. Gauvrit, 2007. Mechanisms of resistance to glyphosate in ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotype from Chile. *Weed Science*, **55**:435-440.
- Monaco, T.J., S.C. Weller, and F.M. Ashton, 2002. Weed biology and ecology. *Weed Science*, **4**:13-43.
- Monsato, 2002. *History of Monsanto's Glyphosate herbicides*. Διαθέσιμο στον δικτυακό τόπο: <http://www.monsanto.com> (τελευταία πρόσβαση: 13/3/2010)
- Moosavi-Nia, H. and J. Done, 1979a. Factors affecting glyphosate activity in *Imperata cylindrical* (L.) Beau. and *Cyperus rotundus* L. II. Effects of shade. *Weed Research*, **19**:321-327.
- Moosavi-Nia, H. and J. Dore, 1979b. Factors affecting glyphosate activity in *Imperata cylindrical* (L.) Beau. and *Cyperus rotundus* L. II. Effect of shade. *Weed Resistance*, **19**:137-143.
- Moreland D.E., 1980. Mechanisms of Action of Herbicides. *Annual Review of Plant Physiology*, **31**:597-638.
- Moshier, L. and D. Penner, 1978. Use of glyphosate in sod seeding alfalfa (*Medicago sativa*) establishment. *Weed Science*, **16**:162-166.
- Moshier, L., A.J. Turgeon and D. Penner, 1976. Effects of glyphosate and siduron on turfgrass establishment. *Weed Science*, **24**:445-448.
- Neumann, G., Kohls, S., Landesberg, E., Stoch-Oliveira Souza, K., Yamda, T., and Römheld, V. 2006. Relevance of glyphosate transfer to non-target plants via the rhizosphere. *Journal of Plant Diseases and Protection*, **20**: 963-969.

- Penn, D. and Lynch, J., 1982. Toxicity of glyphosate applied to roots of barley seedlings. *New Phytologist*, **28**:13-20.
- Plincic, W., 2006. Physiological mechanisms of glyphosate resistance. *Weed Technology*, **20**:290-300.
- Powles S.B., 2008. Review Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. *Pest Management Science*, **64**:360–365.
- Putman, A. R., 1976. Fate of glyphosate in deciduous fruit trees. *Weed Science*. **4**:425-430.
- Relyea R.A., 2006. Letter to the Editor. *Applied Ecology*, **16**:2027–2034.
- Rodney G.L. and G.M. Calvin, 1981. Leafy spurge control with picloram and glyphosate under trees. *Great Plants Agricultural Committee*. pp. 34-35.
- Rom, R.C., 1975. Field evaluation of herbicides in fruit trees, 1974. *Ark. Agric. Expt. Stn., Mimeogr. Ser. 232*. Pp. 22.
- Rueppel, M.L., B.B. Brightwell, J., Schaefer and J., Marvel, 1977. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **25**:517–528.
- Segura, J., S.W. Bingham and C.L. Foy, 1978. Phytotoxicity of glyphosate to Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) and red clover (*Trifolium pratense*). *Weed Science*, **26**:32-36.
- Shinabarger, D.L. and H.D. Braymer, 1986. Glyphosate catabolism by *Pseudomonas* sp. strain PG2982. *Journal of Bacteriology*, **168**:702–707.
- Sikorski J.A. and K.J. Gruys, 1997. Understanding Glyphosate's Molecular Mode of Action with EPSP Synthase : Evidence Favoring on Allosteric Inhibitor Model. *Accounts of Chemical Research*, **30**:2-8.
- Smiley, R.W., Jr. A.G. Ogg and R.J. Cook, 1992. Influence of glyphosate on Rhizoctonia root rot, growth and yield of barley. *Plant Disease*, **76**:937-942.
- Sprankle, P., W.F. Meggitt, and Penner, D. 1975a. Rapid inactivation of glyphosate in soil. *Weed Science*, **28**:224-228.
- Sprankle, P., W.F. Meggitt, and Penner, D. 1975b. Adsorption, mobility and microbial degradation of glyphosate in the soil. *Weed Science*, **23**:229-234.
- Stebbing, A.R.D., 1982. Hormesis: The stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Science of the Total Environment*, **22**:213-234

- Suwunnamek, U. and C. Parker. 1975. Control of *Cyperusrotundus* with glyphosate: the influence of ammonium sulfate and other additives. *Weed Research*, **15**:13-19.
- Tesfamariam, T., Bott, S., Cakmak, I., Römheld, V. and Neumann, G. 2009. Glyphosate in the rhizosphere-Role of waiting times and different glyphosate binding forms in soils for phytotoxicity to non-target plants. *European Journal of Agronomy*, **31**: 126-132.
- Thomson D.G., K.R. Solomon and B.F. Wojtaszek, 2006. Letter to the Editor. *Applied Ecology*, **16**:2022–2027.
- Torrent J, 1997. *Interaction between phosphate and iron oxide, in Soil and Environment – Soil Processes from Mineral to Landscape Scale*, ed. by Auerswald K, H. Stanjek and J.M. Bigham, Catena-Verlag, Reiskirchen, Germany, pp. 321–344.
- Velini E.D., Alves E., Godoy M.C., Meschede D.K., Souza R.T. and Duke S.O., 2008. Glyphosate applied at low doses can stimulate plant growth. *Pest Management Science*, **64**:489–496.
- Vereecken, H., 2006. Mobility and leaching of glyphosate: a review. *Pest Management Science*, **61**:1139-1151.
- von Wiren-Lehr, S., Komoßa, D., Glaesgen, W. E., Sandermann Jr., H. and Scheunert, I. 1997. Mineralization of [14C] glyphosate and its plant-associated residues in arable soils originating from different farming systems. *Pesticide Science*, **54**:436-442.
- Wakelin, A.M., D.F. Lorraine-Colwill and C. Preston, 2004. Glyphosate resistance in four populations of *Lolium multiflorum* in associated with reduced translocation of glyphosate to meristomatic zones. *Weed Research*, **44**:432-440.
- Weber, J. B., A. Best, and J. U. Gonese, 1993. Bioavailability and bioactivity of sorber organic chemicals. in D. M. Linn et al., eds. Sorption and Degradation of Pesticides and Organic Chemicals in Soil. Madison, WI: *American Society of Agronomy And Soil Science Society of America*. p. 153-196
- Westwood J.H. and S.C. Weller, 1997. Cellular mechanisms influence differential glyphosate sensitivity in field bindweed (*Convolvulu sarvensis*) biotypes. *Weed Science*, **45**:2–11

- Wibawa, W., R.B. Mohamad, A.B. Puteh, D. Omar, A.S Juraimi and S.A. Abdullah, 2009. Residual phytotoxicity effects of paraquat, glyphosate and glufosinate-ammonium herbicides in soils from field-treated plots. *International Journal of Agriculture and Biology*, **11**: 214–216
- Wiedman, S. and Appleby, A., 1972. Plant growth stimulation by sublethal concentrations of herbicides. *Weed Research*, **12**:65–74.
- Woodburn, A.T., 2000. Glyphosate: production, pricing and use worldwide. *Pest Management Science*, **56**:309–312.
- World Health Organisation, (WHO), 1994. Glyphosate. Environment Health Criteria. Geneva United Nations Environment Programme, the International Labour Organization. Switzerland. www.who.org
- Wyrill, J.B. III and O.C. Burnside, 1977. Absorption, translocation and metabolism of 2,4-D and glyphosate in common milkweed and hemp dogbane. *Weed Science*, **24**:557-566.
- Yu-jun W., Z. Dong-mei, and S. Rui-juan, 2005. Effects of phosphate on the adsorption of glyphosate on three different types of Chinese soils, *Journal of Environmental Sciences*, **17**: 711-715.
- Γιαννοπολίτης, Κ.Ν., Ε.Α. Πασπάτης και Σ. Βυζαντινόπουλος, 1985. Συστάσεις για τη χρήση Ζιζανιοκτόνων, *Οδηγός Αντιμετώπισης Ζιζανίων*, Ελληνική Ζιζανιολογική Εταιρεία. Αθήνα, σελ. 112.
- Ελευθεροχωρινός, ΗΓ., 1996. *Ζιζανιολογία*. Εκδόσεις ΑγρόΤυπος, Αθήνα 1996, σελ. 325.
- Ελευθεροχωρινός, ΗΓ., 2008. *Ζιζάνια και ζιζανιοκτόνα*. Εκδόσεις Αγρότυπος, Αθήνα 2008, σελ 408.
- Ζιώγας Β. και Α. Μαρκόγλου, 200. Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί δράσης και Χρήσεις των Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων (1^η Έκδοση). *Γεωργική Φαρμακολογία*. Αθήνα, σελ 870.
- Κατή Β. και Κ. Ν. Γιαννοπολίτης. 2008. Φυτοτοξική δράση του ζιζανιοκτόνου glyphosate σε φυτά αμπελοφάσουλου (*Dolichos melanophthalmus* DC.) και τομάτας (*Lycopersicon esculentum* Mill.) μετά από απορρόφηση από τις ρίζες. 15ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Ζιζανιολογικής Εταιρείας, Περίληψεις ανακοινώσεων, σελ. 54.
- Κατή Β., 2010. Προβλήματα από την κακή χρήση του glyphosate στις καλλιέργειες. *Πρακτικά 5^{ης} Πανελληνίας Συνάντησης Φυτοπροστασίας: Ποιότητα και*

*Ασφάλεια των Γεωργικών Προϊόντων – Τροφίμων. Λάρισα 23-25
Φεβρουαρίου 2010, σελ 111-119.*

Λόλας, Π.Χ., 1990. Φυτοτοξικότητα ζιζανιοκτόνων. *Γεωργική Τεχνολογία*. **90**(4):64-71.

Λόλας, Π.Χ., 2003. Ζιζάνια-Ζιζανιοκτόνα, Τύχη και Συμπεριφορά στο περιβάλλον. *Ζιζανιολογία* Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη 2003, σελ 587

Μουρκίδου, Ε.Π., 2008. *Χημεία, Φαρμακολογία (Φαρμακοκινητική / Μεταβολισμός / Τρόπος δράσης), Τοξικολογία, Οικοτοξικολογία και Συμπεριφορά στο περιβάλλον*. Εκδόσεις Μέθεξης, Θεσσαλονίκη 2008, σελ 569.

Πασπάτης, Ε.Α., 2003. *Ζιζανιολογία, (Ζιζάνια – ζιζανιοκτόνα – φυτορρυθμιστικές ουσίες)*. Σημειώσεις των παραδόσεων του μαθήματος της Ζιζανιολογίας για τους φοιτητές του Β' εξαμήνου των τμημάτων ΘΕ.Κ.Α και της φυτικής παραγωγής του Τ.Ε.Ι. Κρήτης. Μάιος, 2003.

Πολυράκης Ι., 2003. *Σημειώσεις Περιβαλλοντικής Γεωργίας*. Πολυτεχνείο Κρήτης, Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Χανιά.

5 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Στατιστική Ανάλυση

Πείραμα 2.1

Επίδραση της θερμοκρασίας και του φωσφόρου στην συγκέντρωση glyphosate και AMPA στο εδαφικό διάλυμα

Estimated Marginal Means

1. Temperature (Θερμοκρασία)

Estimates

Dependent Variable: AMPA

Θερμοκρασία	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
4C	399.231	13.784	369.198	429.264
24C	210.181	13.784	180.148	240.214

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: AMPA

(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
					Lower Bound	Upper Bound
4C	24C	189.050 [*]	19.494	.000	146.577	231.523
24C	4C	-189.050 [*]	19.494	.000	-231.523	-146.577

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Univariate Tests

Dependent Variable: AMPA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Contrast	142959.610	1	142959.610	94.052	.000
Error	18240.011	12	1520.001		

The F tests the effect of Θερμοκρασία. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

2. Phosphorus (Φωσφόρος)

Estimates

Dependent Variable: AMPA

Φωσφόρος	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
P added	356.463	13.784	326.430	386.495
No P added	252.950	13.784	222.917	282.983

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: AMPA

(I) Φωσφόρος	(J) Φωσφόρος	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
					Lower Bound	Upper Bound
P added	N P added	103.513 [*]	19.494	.000	61.040	145.985
No P added	P added	-103.513 [*]	19.494	.000	-145.985	-61.040

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Univariate Tests

Dependent Variable: AMPA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Contrast	42859.351	1	42859.351	28.197	.000
Error	18240.011	12	1520.001		

The F tests the effect of Phosphorus. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

3. Temperature * Phosphorus (Θερμοκρασία * Φωσφόρος)

Estimates

Dependent Variable: AMPA

Θερμοκρασία	Φωσφόρος	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
4C	P added	465.875	19.494	423.402	508.348
	No P added	332.588	19.494	290.115	375.060
24C	P added	247.050	19.494	204.577	289.523
	No P added	173.313	19.494	130.840	215.785

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: AMPA

Θερμοκρασία (I)	Φωσφόρος	(J)	Φωσφόρος	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
							Lower Bound	Upper Bound
4C	P added	No P added		133.288 [*]	27.568	.000	73.222	193.353
	No P added	P added		-133.288 [*]	27.568	.000	-193.353	-73.222
24C	P added	No P added		73.738 [*]	27.568	.020	13.672	133.803
	No P added	P added		-73.738 [*]	27.568	.020	-133.803	-13.672

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Univariate Tests

Dependent Variable: AMPA

Θερμοκρασία		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
4C	Contrast	35531.115	1	35531.115	23.376	.000
	Error	18240.011	12	1520.001		
24C	Contrast	10874.438	1	10874.438	7.154	.020
	Error	18240.011	12	1520.001		

Each F tests the simple effects of Phosphorus within each level combination of the other effects shown. These tests are based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Univariate Analysis of Variance - AMPA

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Temperature	1	4C	8
	2	24C	8
Phosphorus	1	P added	8
	2	No P added	8

Descriptive Statistics

Dependent Variable: AMPA

Temperature	Phosphorus	Mean	Std. Deviation	N
4C	P added	465.8750	62.56535	4
	No P added	332.5875	24.26968	4
	Total	399.2313	83.70137	8
24C	P added	247.0500	24.86477	4
	No P added	173.3125	30.95654	4
	Total	210.1813	47.21400	8
Total	P added	356.4625	124.99531	8
	No P added	252.9500	88.94543	8
	Total	304.7063	117.64500	16

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: AMPA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	189365.163 ^a	3	63121.721	41.527	.000001297
Intercept	1485534.381	1	1485534.381	977.325	.000000000
Temperature	142959.610	1	142959.610	94.052	.000000498
Phosphorus	42859.351	1	42859.351	28.197	.000185270
Temperature * Phosphorus	3546.202	1	3546.202	2.333	.152574621
Error	18240.011	12	1520.001		
Total	1693139.555	16			
Corrected Total	207605.174	15			

a. R Squared = .912 (Adjusted R Squared = .890)

Πείραμα 2.2

Επίδραση της απορρόφησης glyphosate από τις ρίζες στην ανάπτυξη φυτών μπιζελιού

Oneway

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
						Lower Bound	Upper Bound
HEIGHT	.00	8	73.3750	13.0706	4.6211	62.4477	84.3023
	4.50	8	77.7500	3.6154	1.2783	74.7274	80.7726
	9.00	8	76.0000	4.5981	1.6257	72.1559	79.8441
	18.00	8	82.6250	7.1900	2.5421	76.6140	88.6360
	36.00	8	79.8750	5.5146	1.9497	75.2647	84.4853
	54.00	8	75.3750	6.4129	2.2673	70.0137	80.7363
	72.00	8	72.2500	6.3415	2.2420	66.9484	77.5516
	Total	56	76.7500	7.6450	1.0216	74.7027	78.7973
FW	.00	8	15.3013	2.4200	.8556	13.2780	17.3245
	4.50	8	16.4300	2.1332	.7542	14.6466	18.2134
	9.00	8	17.0175	2.1436	.7579	15.2254	18.8096
	18.00	8	14.9975	2.2257	.7869	13.1368	16.8582
	36.00	8	14.1012	.7261	.2567	13.4943	14.7082
	54.00	8	12.2813	2.4563	.8684	10.2277	14.3348
	72.00	8	10.2200	2.8083	.9929	7.8722	12.5678
	Total	56	14.3355	3.0574	.4086	13.5168	15.1543
DW	.00	8	2.0275	.4438	.1569	1.6565	2.3985
	4.50	8	2.1450	.2069	7.314E-02	1.9720	2.3180
	9.00	8	2.2863	.2958	.1046	2.0390	2.5335
	18.00	8	1.7625	.4659	.1647	1.3730	2.1520
	36.00	8	1.8025	.1905	6.737E-02	1.6432	1.9618
	54.00	8	1.4962	.3460	.1223	1.2070	1.7855
	72.00	8	1.2350	.3780	.1336	.9190	1.5510
	Total	56	1.8221	.4755	6.354E-02	1.6948	1.9495

Descriptives

		Minimum	Maximum
HEIGHT	.00	46.00	90.00
	4.50	70.00	81.00
	9.00	68.00	81.00
	18.00	71.00	91.00
	36.00	69.00	87.00
	54.00	66.00	88.00
	72.00	62.00	80.00
	Total	46.00	91.00
FW	.00	10.42	17.86
	4.50	12.48	19.46
	9.00	13.92	19.70
	18.00	11.36	17.82
	36.00	12.98	14.98
	54.00	8.79	15.94
	72.00	4.60	13.81
	Total	4.60	19.70
DW	.00	1.01	2.33
	4.50	1.78	2.38
	9.00	1.70	2.66
	18.00	.90	2.27
	36.00	1.53	2.10
	54.00	1.16	2.04
	72.00	.48	1.74
	Total	.48	2.66

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
HEIGHT	Between Groups	635.000	6	105.833	2.010	.082
	Within Groups	2579.500	49	52.643		
	Total	3214.500	55			
FW	Between Groups	273.305	6	45.551	9.268	.000
	Within Groups	240.822	49	4.915		
	Total	514.127	55			
DW	Between Groups	6.534	6	1.089	9.040	.000
	Within Groups	5.902	49	.120		
	Total	12.436	55			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

HEIGHT

Duncan^a

DOSE	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
72.00	8	72.2500	
.00	8	73.3750	
54.00	8	75.3750	75.3750
9.00	8	76.0000	76.0000
4.50	8	77.7500	77.7500
36.00	8	79.8750	79.8750
18.00	8		82.6250
Sig.		.070	.079

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 8.000.

FW

Duncan^a

DOSE	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
72.00	8	10.2200			
54.00	8	12.2813	12.2813		
36.00	8		14.1012	14.1012	
18.00	8			14.9975	14.9975
.00	8			15.3013	15.3013
4.50	8			16.4300	16.4300
9.00	8				17.0175
Sig.		.069	.107	.059	.102

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 8.000.

DW

Duncan^a

DOSE	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
72.00	8	1.2350				
54.00	8	1.4962	1.4962			
18.00	8		1.7625	1.7625		
36.00	8		1.8025	1.8025	1.8025	
.00	8			2.0275	2.0275	2.0275
4.50	8				2.1450	2.1450
9.00	8					2.2863
Sig.		.139	.101	.156	.067	.166

Means for groups in homogeneous subsets

are displayed. a. Uses Harmonic Mean

Sample Size = 8.000.