

**Α.Τ.Ε.Ι. ΚΡΗΤΗΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ**

**ΠΣΕ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ**

**Πτυχιακή μελέτη**

**Βιολογική αντιμετώπιση του νηματώδη  
*Meloidogyne incognita* με τον μύκητα  
*Pochonia chlamydosporia***

**Σπουδάστρια: Πολυξένη Κιτσιοπούλου**

**Εισηγητής: Δρ. Ε. Α. Τζωρτζακάκης**

**Ηράκλειο 2003**

Ευχαριστώ τον καθηγητή μου κύριο Τζωρτζακάκη Μανώλη για την συμπαράσταση και την καθοδήγηση που μου παρείχε καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης τους Συλλιγάρδο Γιώργο και McClurkin David για την βοήθεια που μου πρόσφεραν.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### Περίληψη

#### Γενικό μέρος

1. Η οικονομική σημασία των φυτοπαρασιτικών νηματωδών στην αγροτική παραγωγή.....(σελ. 5)
2. Βιολογία νηματωδών του γένους *Meloidogyne*.....(σελ. 6)
3. Βιολογική αντιμετώπιση των φυτοπαρασιτικών νηματωδών.....(σελ. 10)
4. Βιολογία του μύκητα *Pochonia chlamydosporia*.....(σελ. 13)

#### Πειραματικό μέρος

1. Σκοπός.....(σελ. 16)
2. Υλικά και Μέθοδοι..... (σελ. 16)
3. Αποτελέσματα..... (σελ. 22)
4. Συζήτηση-Συμπεράσματα..... (σελ. 30)

#### Βιβλιογραφία

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στο ακόλουθο πείραμα έγινε προσπάθεια αξιολόγησης της αποτελεσματικότητας του μύκητα *Pochonia chlamydosporia* (στέλεχος 10, IACR Rothamsted UK) στην μείωση του πληθυσμού του νηματώδη *Meloidogyne incognita* σε φυτά ντομάτας και πιπεριάς. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε ποτηράκια σε δωμάτιο με ελεγχόμενη θερμοκρασία στο Εργαστήριο Νηματωδολογίας του Ινστιτούτου Προστασίας Φυτών Ηρακλείου, ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.

Δοκιμάσθηκαν δύο συγκεντρώσεις του μύκητα (5.000 και 60.000 χλαμυδοσπόρια/gr εδάφους) και νηματωδών (450 και 1.400 J<sub>2</sub>s / φυτό) σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς. Μετά από 7 εβδομάδες εκτιμήθηκαν η πυκνότητα των νηματωδών, οι όγκοι στις ρίζες και η πυκνότητα του μύκητα στη ρίζα και το έδαφος. Επιπλέον υπολογίστηκε ο παρασιτισμός των αυγών του νηματώδη από τον μύκητα.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ενώ ο μύκητας εγκαταστάθηκε ικανοποιητικά στο έδαφος και την ρίζα, το ποσοστό παρασιτισμού των αυγών ήταν χαμηλό και δεν μειώθηκε ο πληθυσμός του νηματώδη. Επομένως το συγκεκριμένο στέλεχος του μύκητα δεν μπορεί να θεωρηθεί σημαντικός παράγοντας για την ολοκληρωμένη αντιμετώπιση του κομβονηματώδη *Meloidogyne incognita* σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες ντομάτας και πιπεριάς στην Κρήτη.

**Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* with the fungus *Pochonia chlamydosporia***

The effect of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* (isolate 10, IACR Rothamsted, UK) on the densities of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infecting tomato or pepper was investigated in a pot experiment at the Nematology Laboratory, Plant Protection Institute, N.AG.RE.F, Heraklion, Crete. The experiments conducted in a temperature controlled room with artificial lighting. Two concentrations of the fungus (5,000 and 60,000 chlamydospores / gr of soil) and the nematode (450 and 1,400 juveniles /plant) were tested in all combinations. The fungus effect on the nematode was evaluated by counting the root galling index, egg production, egg parasitism and juvenile density in soil while its survival and multiplication by estimation of cfu (colony forming units) per soil weight and root surface. Despite fungus was successfully established in soil and root, egg parasitism was low and there was not any reduction on nematode densities. Therefore, the certain fungal isolate, can not be considered as a potential agent for integrated control of *Meloidogyne incognita* in tomato and pepper crops in Crete.

## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **1. Η ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΦΥΤΟΠΑΡΑΣΙΤΙΚΩΝ ΝΗΜΑΤΩΔΩΝ ΣΤΗΝ ΑΓΡΟΤΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ**

Η ανησυχητική αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού οδηγεί σε επείγουσα ανάγκη για αύξηση παραγωγής εδώδιμων προϊόντων. Αφού το 99% των διατροφικών απαιτήσεων του ανθρώπου και των κατοικίδιων ζώων προέρχεται από χερσαία φυτά, η κάλυψη των τροφικών αναγκών του αυξανόμενου πληθυσμού είναι σχεδόν ολοκληρωτικά εξαρτώμενη από την διαθεσιμότητα της γης για καλλιέργεια. Επιπλέον γη για την αύξηση της γεωργικής παραγωγής θα μπορούσε να βρεθεί στην Αφρική και Λατινική Αμερική αλλά η διαδικασία αυτή έχει μεγάλο οικονομικό και χρονικό κόστος. Επομένως, η αύξηση της απόδοσης της ήδη καλλιεργούμενης γης αποτελεί την μοναδική επιλογή για την αντιμετώπιση της έλλειψης τροφής και του υποσιτισμού. Σε περιοχές που δεν υπάρχουν περιοριστικοί παράγοντες (νερό, θρεπτικά στοιχεία) για την ανάπτυξη των φυτών και το περιβάλλον είναι ευνοϊκό, αύξηση της απόδοσης της καλλιεργούμενης γης επιτυγχάνεται με την αντιμετώπιση των εχθρών και των ασθενειών (Brady, 1985).

Οι φυτοπαρασιτικοί νηματώδεις αποτελούν αναμφίβολα έναν από τους πιο σημαντικούς εχθρούς της παγκόσμιας αγροτικής παραγωγής. Συχνά γίνονται αιτία εγκατάλειψης της καλλιεργούμενης γης κυρίως στις τροπικές περιοχές όπου “κουρασμένα” εδάφη καλλιεργούνται για μεγάλα χρονικά διαστήματα με φυτά ευαίσθητα στους νηματώδεις. Από εκτιμήσεις 371 νηματωδολόγων που αντιπροσώπευαν 75 χώρες υπολογίστηκαν οι απώλειες στις καλλιέργειες σε 14,6% στις αναπτυσσόμενες χώρες και 8,8% στις αναπτυγμένες χώρες. Οι οικονομικές απώλειες υπερβαίνουν τα 100 δισεκατομμύρια δολάρια ανά έτος και περισσότερα από 225 εκατομμύρια δολάρια ξοδεύονται ετησίως για την αντιμετώπιση των νηματωδών σε καλλιέργειες υψηλού κέρδους (στοιχεία του 1984) (Webster, 1980, Brady, 1985).

Σε παγκόσμια βάση, το γένος *Meloidogyne* είναι το σημαντικότερο θεωρώντας τις ζημιές που προκαλεί στην αγροτική παραγωγή. Αυτό είναι το συμπέρασμα της εκτίμησης 371 νηματωδολόγων που αντιπροσώπευαν 75 χώρες. Περισσότερα από 2.000 διαφορετικά είδη φυτών συμπεριλαμβανομένων μονοκότυλων, δικότυλων, φυλλωδών και ξυλωδών φυτών παρασιτίζονται από είδη του γένους *Meloidogyne*. Οι αγρότες στις αναπτυσσόμενες χώρες αντιμετωπίζουν σημαντικές απώλειες και οι όγκοι που σχηματίζονται από τον νηματώδη στις ρίζες των προσβεβλημένων φυτών θεωρούνται συχνά λανθασμένα ως “φυσιολογικοί” (Sasser, 1989).

Από τα περισσότερα των 40 ειδών του γένους *Meloidogyne* που έχουν περιγραφεί, 4 έχουν θεωρηθεί ως τα πιο σημαντικά και βρέθηκαν στα ακόλουθα ποσοστά: *M. incognita* 47%, *M. javanica* 40%, *M. arenaria* 7% και *M. hapla* 6% (σύμφωνα με την αναγνώριση 662 πληθυσμών από 76 χώρες με βάση το International *Meloidogyne* Project) (Sasser, 1980).

## 2. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΝΗΜΑΤΩΔΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *MELOIDOGYNE*

Οι φυτοπαρασιτικοί νηματώδεις είναι υποχρεωτικά παράσιτα και τρέφονται από τα φυτικά κύτταρα. Τα προνυμφικά και ενήλικα στάδια πολλών νηματωδών είναι ενεργά (κινούμενα) για την εύρεση τροφής στην επιφάνεια ή στο εσωτερικό των φυτικών ιστών.

Από το αυγό εκκολάπτεται η προνύμφη που μοιάζει με το ενήλικο και υφίσταται 4 εκδύσεις. Κατά την στιγμή της εκκόλαψής της, η προνύμφη έχει πλήρως ανεπτυγμένα όλα τα οργανικά συστήματα, εκτός από το αναπαραγωγικό. Οι μόνες επομένως μεταβολές που εμφανίζονται κατά την μετεμβρυακή εξέλιξη σε ακμαίο είναι η μικρή αύξηση του μεγέθους του σώματός τους και η ανάπτυξη του αναπαραγωγικού συστήματος.

Υπάρχουν όμως ορισμένα γένη νηματωδών τα οποία κατά το τέλος της ανάπτυξης των προνυμφικών σταδίων εμφανίζουν ουσιώδεις μορφολογικές διαφορές μεταξύ των δύο φύλων. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα θηλυκά άτομα του γένους *Meloidogyne*, τα οποία στο τέλος της ανάπτυξής τους παίρνουν σχήμα λεμονοειδές, απιόμορφο ή σφαιρικό ενώ τα αρσενικά διατηρούν το επίμηκες κυλινδρικό σχήμα τους (φυλετικός σεξουαλικός διμορφισμός).

Τα διάφορα είδη του γένους *Meloidogyne*, αν και διαφέρουν μεταξύ τους, κυρίως στις σχέσεις τους με τους ξενιστές, έχουν όλα τον ίδιο βιολογικό κύκλο.

Οι προνύμφες που ελευθερώνονται από τα αυγά μέσα στο έδαφος, είναι μικρού μεγέθους και 2<sup>ου</sup> σταδίου επειδή έχουν ήδη υποστεί μια έκδυση μέσα στο αυγό (Εικ. 1). Η προνύμφη μετακινείται προς τις ρίζες από ερεθίσματα προερχόμενα από τα φυτά και εισέρχεται σχεδόν σε όλα τα μέρη του φυτού-ξενιστή που έρχονται σε επαφή με το υγρό έδαφος και κυρίως στο



ακραίο και τρυφερό μέρος των ριζιδίων, τρέφεται εις βάρος τους και αυξάνει σε μέγεθος. Μετά από την διείσδυση μεταναστεύει ανάμεσα στα κύτταρα, στο παρέγχυμα στην περιοχή της διαφοροποίησης των κυττάρων και εγκαθιστά μόνιμη θέση θρέψεως στην περιφέρεια του αγγειακού ιστού. Η θρέψη μετασχηματίζει κανονικά κύτταρα σε πολυσύνθετα θρεπτικά γιγαντιαία κύτταρα και οι ιστοί γύρω από τον νηματώδη και το σημείο θρέψεως υφίσταται υπερπλασία και υπερτροφία προκαλώντας όγκους (Εικ. 2). Η φυσιολογία των μολυσμένων φυτών μεταβάλλεται δραστικά εξαιτίας της θρέψης των νηματωδών με συνέπειες δυσμενείς στην διατροφή, φωτοσύνθεση και ικανότητα προσρόφησης νερού.

Από τις προνύμφες άλλες θα εξελιχθούν σε αρσενικά και άλλες σε θηλυκά άτομα. Τα μεν αρσενικά αποκτούν το σκωληκόμορφο σχήμα, εγκαταλείπουν τις ρίζες και κινούνται ελεύθερα μέσα στο έδαφος. Τα δε θηλυκά παραμένουν καθ' όλη την υπόλοιπη ζωή τους μέσα στους φυτικούς ιστούς (Εικ. 3). Θα πρέπει να αναφέρουμε ότι ο σεξουαλικός διαχωρισμός δεν είναι προκαθορισμένος αλλά εξαρτάται κυρίως από την διαθεσιμότητα τροφής. Στα περισσότερα είδη η αναπαραγωγή γίνεται παρθενογενετικά. Η ανάπτυξη του γένους *Meloidogyne* και η συμπλήρωση του βιολογικού του κύκλου εξαρτάται από την θρεπτική κατάσταση του ξενιστή και τις συνθήκες του περιβάλλοντος, κυρίως την θερμοκρασία.

Το ώριμο αναπαραγωγικά θηλυκό εκκρίνει μια ζελατινώδη ουσία μέσα στην οποία τοποθετεί στην συνέχεια τα αυγά του. Η ουσία αυτή χρησιμεύει για



**Εικ. 1** Προνύμφη 2<sup>ου</sup> σταδίου του νηματώδη *M.incognita*.



**Εικ. 2** Ρίζα με έντονη προσβολή κομβοηματοδών.



**Εικ. 3** Ακμαίο θηλυκό του νηματώδη *M. incognita*.



**Εικ. 4** Ωόσακκος του νηματώδη *M. incognita*.

να συγκρατεί τα αυγά σε ομάδα, σχηματίζει δε ένα προστατευτικό περίβλημα τον ωόσακκο, με τον οποίο προστατεύονται τα αυγά από δυσμενείς συνθήκες και κυρίως από την ξηρασία (Εικ. 4). Ο βιολογικός κύκλος διαρκεί από 3 εβδομάδες έως και πολλούς μήνες εξαρτώμενος από την θερμοκρασία εδάφους, το είδος και την καταλληλότητα των φυτών-ξενιστών. Το θηλυκό μπορεί να γεννήσει μέχρι και 2.000 αυγά με μέσο όρο 300-500.

Τα είδη *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* και *M. arenaria*, αναπαράγονται αποκλειστικά με μιτωτική παρθενογένεση. Η θερμοκρασία είναι ο κύριος παράγοντας για την ανάπτυξη των εμβρύων, την εκκόλαψη, την είσοδο στα φυτά, την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή. Εκτός από την θερμοκρασία αρκετοί άλλοι παράγοντες όπως η υγρασία, το φως, η ποιότητα του φυτού ξενιστή, η σύσταση του εδάφους και η ωσμωτική πίεση επηρεάζουν επίσης την βιολογία του νηματώδη και την σοβαρότητα της ασθένειας των φυτών που προσβάλλονται (Hussey, 1985, Van Gundy, 1985).

### **3. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΩΝ ΦΥΤΟΠΑΡΑΣΙΤΙΚΩΝ ΝΗΜΑΤΩΔΩΝ**

Ο ερευνητής νηματωδολόγος εστιάζει την δραστηριότητά του κυρίως στην ανάπτυξη μεθόδων “διαχείρισης” των πληθυσμών των νηματωδών ενώ ο αγρότης απαιτεί άμεση “καταπολέμηση” με σκοπό την αποφυγή της ζημιάς. Ενώ η “καταπολέμηση” των νηματωδών αποβλέπει στην εξάλειψή τους, η διαχείριση καθορίζεται από το σύνολο των “επεμβάσεων” που γίνονται για την μείωσή τους σε επίπεδα που δεν προκαλούν οικονομική ζημιά. Η πρωταρχική αιτία μείωσης των πληθυσμών των νηματωδών είναι το οικονομικό όφελος της καλλιέργειας και η ποικιλομορφία των αγροοικοσυστημάτων δεν επιτρέπει την εφαρμογή μιας κοινής στρατηγικής διαχείρισης των νηματωδών σε όλες τις περιπτώσεις (Thomason and Caswell, 1987).

Η ανάγκη για την αύξηση της αγροτικής παραγωγής και η εισαγωγή διαφορετικών καλλιεργειών σε νέες αγροοικολογικές ζώνες στο παρελθόν αύξησαν την χρήση των χημικών για την αντιμετώπιση των εχθρών και των ασθενειών. Ο χημικός έλεγχος των νηματωδών αν και ήταν αποτελεσματικός,

κατέληξε να είναι μια συνηθισμένη εφαρμογή “βιοκτόνων” τοξικών και επικίνδυνων για τους ωφέλιμους οργανισμούς και τα θερμόαιμα. Οι απολυμάνσεις με EDB έχουν ήδη απαγορευθεί σε πολλές χώρες. Η χρήση του βρωμιούχου μεθυλίου και 1,3-dichloropropane αναθεωρείται ενώ το μέλλον των μη πτητικών νηματωδοκτόνων είναι αβέβαιο μετά την ανακάλυψη υπολειμμάτων σε υπόγεια νερά. Η αμειψισπορά η οποία έχει ιστορικά αποτελέσει την βάση των περισσότερων προγραμμάτων ελέγχου παθογόνων εδάφους, έχει περιορισμένη εφαρμογή για οικονομικούς λόγους. Ο χρόνος που απαιτείται για την δημιουργία ανθεκτικών ποικιλιών και η περιορισμένη τους χρήση όταν επιλεγούν μολυσματικοί παθότυποι του παθογόνου, έχει εστιάσει την έρευνα στην διαχείριση των νηματωδών με βιολογικούς παράγοντες.

Οι προσπάθειες βιολογικού ελέγχου των νηματωδών συζητιούνται για περισσότερο από έναν αιώνα, αλλά μέχρι τώρα οι δυνατότητες που υπάρχουν για μια περαιτέρω πρακτική εφαρμογή στον αγρό είναι περιορισμένες. Δυστυχώς μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν βιολογικά σκευάσματα στο εμπόριο με δυνατότητες πρακτικής εφαρμογής σε ευρεία κλίμακα.

Στον τομέα της βιολογικής αντιμετώπισης των νηματωδών οι εξελίξεις ήταν σχετικά αργές λόγω της καθυστέρησης στην αναγνώριση της σπουδαιότητάς τους, της έλλειψης πληροφοριών σχετικών με την ταξινόμηση, φυσιολογία, βιολογία και οικολογία τους, την πολυπλοκότητα του εδάφους και την διαθεσιμότητα αποτελεσματικών νηματωδοκτόνων. Επίσης οι περιορισμένες πειραματικές εφαρμογές στον αγρό καθώς και οι ανεπαρκείς χρηματοδοτήσεις για έρευνα από τις κυβερνήσεις και τις βιομηχανίες υπήρξαν περιοριστικοί παράγοντες.

Με βάση τον ορισμό των Baker και Cook ο βιολογικός έλεγχος των νηματωδών αποβλέπει σε: “Μείωση της ζημιάς των νηματωδών από οργανισμούς ανταγωνιστές, μέσω της ρύθμισης του πληθυσμού του νηματώδη σε χαμηλά επίπεδα και / ή την μείωση της ικανότητας των νηματωδών να προκαλέσουν ζημιά δια μέσου διαχείρισης του περιβάλλοντος ή από την μαζική εισαγωγή ανταγωνιστών”. Αν και κάτω από εργαστηριακές συνθήκες, αρκετοί μύκητες, βακτήρια και σπορόζωα μειώνουν τους πληθυσμούς των νηματωδών, οι λεπτομερειακές μελέτες για βιολογικό έλεγχο σε δοκιμές στον αγρό είναι λίγες και χωρίς σημαντικά πρακτικά συμπεράσματα. Οι

περισσότερες αναφορές έχουν γίνει για τους κυστογόνους νηματώδεις και κομβονηματώδεις.

Η μεγαλύτερη μέχρι στιγμής επιτυχία για αξιοποίηση ανταγωνιστών των νηματωδών έχει επιτευχθεί με την εστίαση της έρευνας σε περιοχές όπου υπάρχει προϊστορία νηματωδών, αλλά οι ζημιές δεν είναι σημαντικές. Η μεγάλη περίοδος συσχέτισης ανάμεσα στους ανταγωνιστές και στους νηματώδεις που είναι απαραίτητη για την φυσική μείωσή τους δείχνει ότι οι ανταγωνιστές είναι πιθανότερο να βρίσκονται σε μονοκαλλιέργειες και πολυετείς καλλιέργειες. Οι ανταγωνιστές των νηματωδών που απομονώνονται από τις συγκεκριμένες περιοχές πρέπει να παραχθούν σε τεχνητά μέσα χωρίς να χάσουν την παθογένειά τους και η αποτελεσματικότητα του βιολογικού παράγοντα θα πρέπει να είναι εμφανής μετά την εφαρμογή του στον αγρό. Παρ' όλο που υπάρχουν μικροοργανισμοί οι οποίοι πληρούν μερικά από αυτά τα χαρακτηριστικά, οι χρηματοδοτήσεις για έρευνα είναι ελάχιστες και οι νηματωδολόγοι έχουν αναφέρει πολύ λίγα δεδομένα με πρακτικό ενδιαφέρον ώστε να εμπνεύσουν εμπιστοσύνη σε επενδυτές και βιομηχανίες.

Μέχρι τώρα έχουν οριστεί τρεις πρακτικές προσεγγίσεις στον βιολογικό έλεγχο των νηματωδών :

(α) Φυσικός έλεγχος όπου οι ανταγωνιστές υπάρχουν σε υψηλούς πληθυσμούς και η διαχείρισή τους έχει σκοπό να διατηρηθούν ή να βελτιωθούν οι συνθήκες που ευνοούν την δράση τους. Η φυσική μείωση γενικά συμβαίνει όταν ευαίσθητες καλλιέργειες καλλιεργούνται εντατικά σε εδάφη τα οποία έχουν χρόνια προβλήματα από την ύπαρξη νηματωδών και οι φυσικοί ανταγωνιστές έχουν τον χρόνο να αυξηθούν. Λαμβάνοντας υπόψη την παραπάνω προσέγγιση, ο ρόλος της φυσικής ύπαρξης των ανταγωνιστών έχει ερευνηθεί στις παρακάτω περιπτώσεις που αναφέρονται από τον Stirling (1991):

1. Μείωση του νηματώδη *Heterodera avenae* από τους μύκητες *Nematophthora gynophila* και *Pochonia chlamydosporia*.
2. Παρασιτισμός του νηματώδη *Meloidogyne spp.* σε ροδακινιές από τον μύκητα *Dactylella oviparasitica*.
3. Παρασιτισμός του νηματώδη *Criconemella xenoplax* από τον μύκητα *Hirsutella rhossiliensis*.

4. Παρασιτισμός των κομβονηματωδών *Meloidogyne spp.* από το βακτήριο *Pasteuria penetrans*.

(β) Ο ανταγωνιστής έχει εισαχθεί σε μεγάλες ποσότητες για ταχύ έλεγχο των νηματωδών, αλλά αποτυγχάνει να παραμείνει στο έδαφος και είναι απαραίτητη η συχνή εφαρμογή του. Αυτή η τεχνική θα μπορούσε να είναι χρήσιμη σε καλλιέργειες μικρής χρονικής διάρκειας.

(γ) Η εισαγωγή νέων για το έδαφος ανταγωνιστών που μπορούν να εγκατασταθούν και να αυξηθούν μακροχρόνια (Kerry, 1990, Stirling 1991).

#### **4. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *POCHONIA CHLAMYDOSPORIA***

Ο μύκητας *Pochonia chlamydosporia* (Zare et al., 2001) (συν: *Verticillium chlamydosporium*) είναι ένα διαδεδομένο προαιρετικό παράσιτο του εδάφους και έχει βρεθεί σε αυγά σαλιγκαριών, κυστογόνων νηματωδών, κομβονηματωδών, καθώς και στα ωσπόρια μερικών μυκήτων. Η παρουσία του μύκητα έχει συσχετιστεί με εδάφη τα οποία είναι “κατασταλτικά” στην αύξηση των κυστογόνων νηματωδών *Heterodera avenae* και *H. schachtii*.

Τα στάδια του μύκητα υφές, κονίδια και χλαμυδοσπόρια βρίσκονται στην επιφάνεια της ριζόσφαιρας σε σαπροφυτική φάση χωρίς να εισέρχονται στο εσωτερικό της και να δημιουργούν παθολογικά προβλήματα στο φυτό. Η αποίκιση της ριζόσφαιρας είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την αποτελεσματική αντιμετώπιση των νηματωδών. Η ικανότητα ανάπτυξης του μύκητα στη ριζόσφαιρα είναι μεγαλύτερη απ’ ότι στο έδαφος και ο μύκητας βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία σε ρίζες προσβεβλημένες από νηματώδεις απ’ ότι στις υγιείς ρίζες. Ενδεχομένως η παρουσία του νηματώδη οδηγεί σε αυξημένη απελευθέρωση θρεπτικών ουσιών στη ριζόσφαιρα τις οποίες ο μύκητας μπορεί να εκμεταλλευτεί. Η αποίκιση της ριζόσφαιρας είναι απαραίτητη για τον έλεγχο του πληθυσμού των νηματωδών και στελέχη του μύκητα *Pochonia chlamydosporia* τα οποία δεν μπορούν να εγκατασταθούν στην επιφάνεια της ρίζας, δεν έχουν σημαντική επίδραση στους πληθυσμούς των κομβονηματωδών. Ο μύκητας αναπτύσσεται στις μάζες των αυγών καθώς

σχηματίζονται στην επιφάνεια της ρίζας. Σχηματίζεται μια ειδική κατασκευή *appresorium* που έρχεται σε επαφή με το αυγό του νηματώδη και δημιουργεί μόλυνση διατρυπώντας το κέλυφος. Τα μη εμβρυοποιημένα αυγά είναι πιο ευαίσθητα στην προσβολή από τα εμβρυοποιημένα στο εσωτερικό των οποίων έχει σχηματιστεί η προνύμφη (Εικ. 5). Η ανάπτυξη του μύκητα περιορίζεται στη ριζόσφαιρα και όταν σχηματίζονται μεγάλοι όγκοι ως αποτέλεσμα της εισόδου μεγάλου αριθμού προνυμφών, πολλές μάζες αυγών παραμένουν στο εσωτερικό των φυτικών ιστών, διαφεύγοντας τον παρασιτισμό.

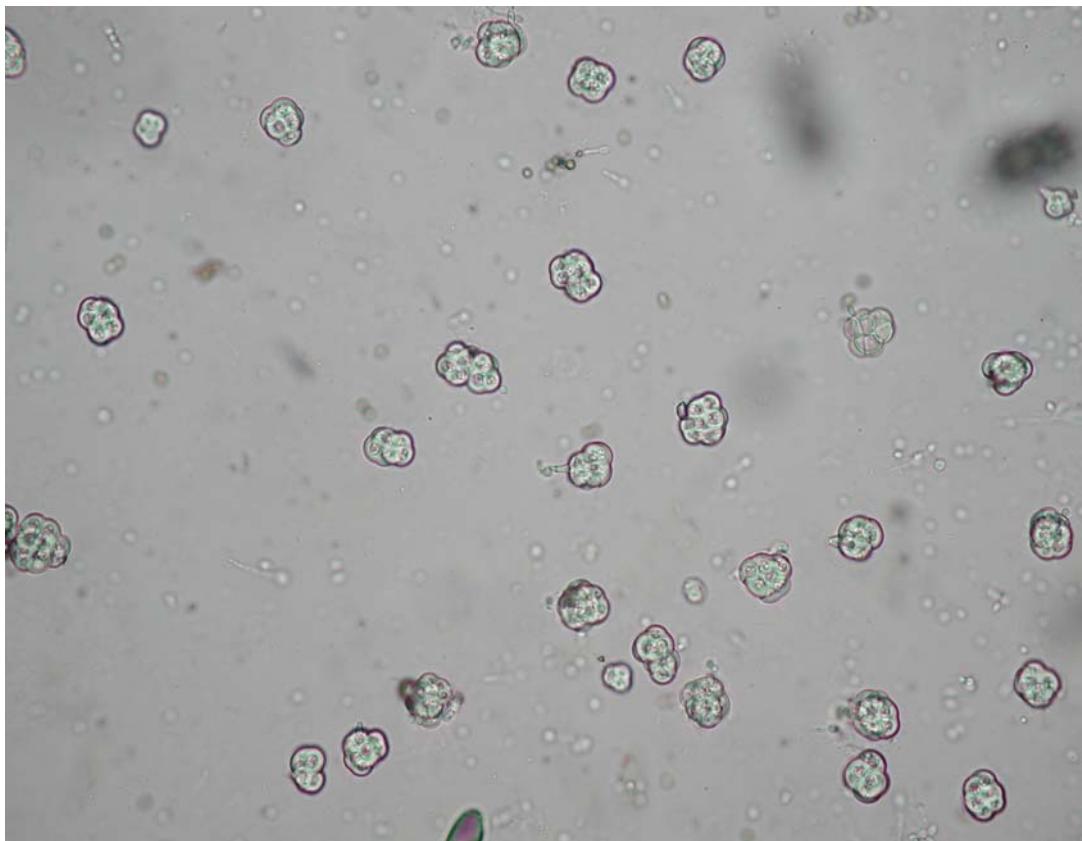
Ο μύκητας μπορεί να αναπτυχθεί στο εργαστήριο αλλά σχετικά αργά, με μέσο ρυθμό ανάπτυξης στο corn meal agar 1,6mm / ημέρα στην θερμοκρασία των 25° C. Στελέχη του μύκητα διαφέρουν όσον αφορά την βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης και την ικανότητά τους να παράγουν χλαμυδοσπόρια και κονίδια. Συνεχής καλλιέργεια του μύκητα σε θρεπτικά υλικά μπορεί να οδηγήσει σε μείωση παραγωγής χλαμυδοσπορίων. Τμήματα υφών και κονίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εγκατάσταση του μύκητα στο έδαφος, αλλά η προσθήκη οργανικού υλικού είναι απαραίτητη ώστε ο μύκητας να μπορέσει να ανταπεξέλθει στον ανταγωνισμό με την υπάρχουσα μικροχλωρίδα του εδάφους και αυτό κάνει το κόστος εφαρμογής μεγάλο. Αποτελεσματικότερος και οικονομικότερος τρόπος είναι η εφαρμογή χλαμυδοσπορίων τα οποία είναι ανθεκτικές μορφές του μύκητα που έχουν την ικανότητα να βλαστάνουν στο έδαφος χωρίς την προσθήκη θρεπτικού υλικού (Εικ. 6).

Η πυκνότητα του μύκητα *Pochonia chlamydosporia* στο έδαφος και στη ριζόσφαιρα υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τεχνικές διαδοχικών αραιώσεων σε ημιεπιλεκτικά για την ανάπτυξη του μύκητα θρεπτικά υλικά. Τέτοιες μέθοδοι παρέχουν την δυνατότητα ποσοτικοποίησης του αριθμού των αποικιών του μύκητα, αλλά χρησιμοποιώντας ημιεπιλεκτικά μέσα δεν είναι δυνατόν να γίνει διαχωρισμός αποικιών οι οποίες αναπτύχθηκαν από χλαμυδοσπόρια, κονίδια ή τμήματα υφών (Davies *et al.*, 1991, Kerry, 1995, Kerry and Bourne, 1996).





**Εικ. 5** Μη εμβρυοποιημένο (αριστερά) και εμβρυοποιημένο (δεξιά) αυγό του νηματώδη *M. incognita*.



**Εικ. 6** Χλαμυδοσπόρια του μύκητα *P. chlamydosporia*.

# ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1. ΣΚΟΠΟΣ

Ένα συγκεκριμένο στέλεχος του μύκητα (No 10) έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση κομβονηματωδών σε πειράματα που έγιναν σε γλάστρες και σε θερμοκήπιο στην Αγγλία (Leij *et al.*, 1993, Kerry, 1995). Πειράματα έγιναν με το ίδιο στέλεχος στην Κρήτη σε συνθήκες θερμοκηπίου για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητάς του στην μείωση πληθυσμών του *M. javanica* σε καλλιέργεια ντομάτας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ενώ ο μύκητας αποίκιζε το έδαφος και τις ρίζες των φυτών δεν είχε καμία επίδραση στους πληθυσμούς των νηματωδών. Σε όλες τις περιπτώσεις στις ρίζες παρατηρήθηκαν μεγάλοι όγκοι λόγω της προσβολής μεγάλου αριθμού προνυμφών και της εξέλιξης περισσότερων από δύο γενεών κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου. Ως αποτέλεσμα του σχηματισμού των μεγάλων και πολλαπλών όγκων, το μεγαλύτερο ποσοστό των ωόσακκων βρισκόνταν στο εσωτερικό των φυτικών ιστών και με τον τρόπο αυτό διέφευγαν τον παρασιτισμό (Tzortzakakis, 2000).

Η καλλιέργεια της πιπεριάς στην Κρήτη προσβάλλεται μόνο από το είδος *M. incognita* ενώ δεν αποτελεί ξενιστή για το *M. javanica* που είναι το κυρίαρχο είδος κομβονηματωδών. Οι όγκοι στις ρίζες της πιπεριάς που έχουν προσβολή νηματωδών είναι συνήθως μικροί και διάσπαρτοι με τους ωόσακκους στην επιφάνεια των φυτικών ιστών (Tzortzakakis *et al.*, 1999). Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν η διερεύνηση της αποτελεσματικότητας του μύκητα στην πυκνότητα των νηματωδών του είδους *M. incognita* σε ντομάτα και πιπεριά. Τα πειράματα έγιναν σε γλάστρες στο Εργαστήριο Νηματωδολογίας του Ινστιτούτου Προστασίας Φυτών Ηρακλείου, Ε.Θ.Ι.Α.Γ.Ε.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Το στέλεχος του μύκητα που χρησιμοποιήθηκε (No 10) προσφέρθηκε από τον Professor B.R. Kerry (IACR, Rothamsted, UK). Οι αποικίες

διατηρήθηκαν σε 1,7% corn meal agar σε τρυβλία Petri τοποθετημένα στο ψυγείο και η μαζική παραγωγή έγινε σε φλάσκες που περιείχαν ένα ελαφρά υγρό μείγμα από χονδρό χαλίκι και αλεσμένο κριθάρι (Εικ. 7). Μετά από 3 εβδομάδες επώασης στους 25°C, το θρεπτικό μέσο απομακρύνθηκε με κόσκινα 250 και 53μm και οι μορφές του μύκητα συλλέχθηκαν με κόσκινο των 10μm. Το υπόλειμμα πλύθηκε επιπλέον για την απομάκρυνση των κονιδίων και των υφών αφήνοντας κυρίως τα χλαμυδοσπόρια. Το μόλυσμα προετοιμάστηκε με την ανάμειξη του πλυμένου υπολείμματος με λεπτόκοκκη αποστειρωμένη άμμο και η συγκέντρωση των χλαμυδοσπορίων εκτιμήθηκε με αραίωση των δειγμάτων χρησιμοποιώντας αιματοκυτόμετρο (Εικ. 8). Ο έλεγχος για την βιωσιμότητα των χλαμυδοσπορίων έγινε σε 1gr μολύσματος που αραιώθηκε σε 0,05% διάλυμα άγαρος και στην συνέχεια 0,2ml αραιώσεων  $10^{-2}$  και  $10^{-3}$  απλώθηκαν σε τρυβλία Petri που περιείχαν sorbose agar και αντιβιοτικά (streptomycin sulphate, chloramphenicol και chlortetracycline). Μετά από 3 ημέρες επώασης στους 26°C εκτιμήθηκε το ποσοστό των χλαμυδοσπορίων που είχε βλαστήσει (Leij and Kerry, 1991).

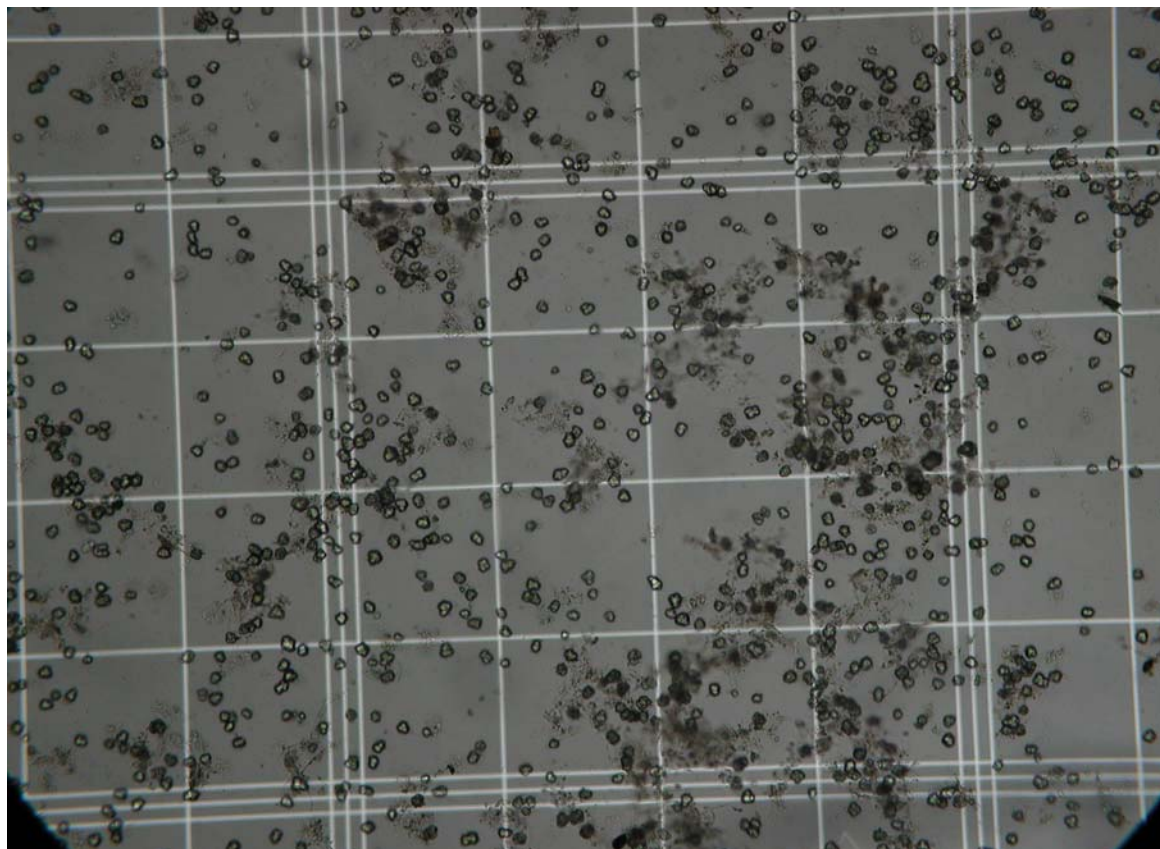
Η άμμος με τα χλαμυδοσπόρια ανακατεύθηκε με φυτόχωμα του εμπορίου απαλλαγμένο από νηματώδεις σε συγκεντρώσεις 5.000 (χαμηλή συγκέντρωση) και 60.000 (υψηλή συγκέντρωση) χλαμυδοσπορίων ανά gr εδάφους. Το χώμα χρησιμοποιήθηκε για να γεμίσουν ποτηράκια 250 ml στα οποία φυτεύτηκαν φυτάρια ντομάτας (cv ACE), και πιπεριάς (cv California Wonder). Μια μέρα μετά το φύτεμα των φυτών κάθε ένα από τα ποτηράκια μολύνθηκε με 180 και 750  $J_2s$  (προνύμφες 2<sup>ου</sup> σταδίου 1-4 ημερών) ενός πληθυσμού *M. incognita*. Τα φυτά μολύνθηκαν πάλι μετά από 2 ημέρες ( με 150 και 250  $J_2s$ ) και μετά από 5 ημέρες (με 120 και 400  $J_2s$ ), έτσι ώστε να δώσουν 450  $J_2s$ /φυτό (χαμηλή συγκέντρωση) και 1400  $J_2s$ /φυτό (υψηλή συγκέντρωση).

Τα φυτά τοποθετήθηκαν σε δωμάτιο με ελεγχόμενη θερμοκρασία αέρα  $25 \pm 2^\circ C$  και 16h φωτοπερίοδο (Εικ. 9). Οι επεμβάσεις που έγιναν ήταν οι εξής:

- α. νηματώδεις μόνο (χαμηλή συγκέντρωση),
- β. νηματώδεις μόνο (υψηλή συγκέντρωση),
- γ. νηματώδεις (χαμηλή συγκέντρωση)+μύκητας (χαμηλή συγκέντρωση),
- δ. νηματώδεις (χαμηλή συγκέντρωση)+μύκητας (υψηλή συγκέντρωση),
- ε. νηματώδεις (υψηλή συγκέντρωση)+μύκητας (χαμηλή συγκέντρωση),



Εικ. 7 Μαζική παραγωγή του μύκητα *P. chlamydosporia* σε φλάσκες.



Εικ. 8 Μέτρηση συγκέντρωσης χλαμυδοσπορίων.



**Εικ. 9** Θάλαμος ανάπτυξης φυτών.

στ. νηματώδεις (υψηλή συγκέντρωση) + μύκητας (υψηλή συγκέντρωση).

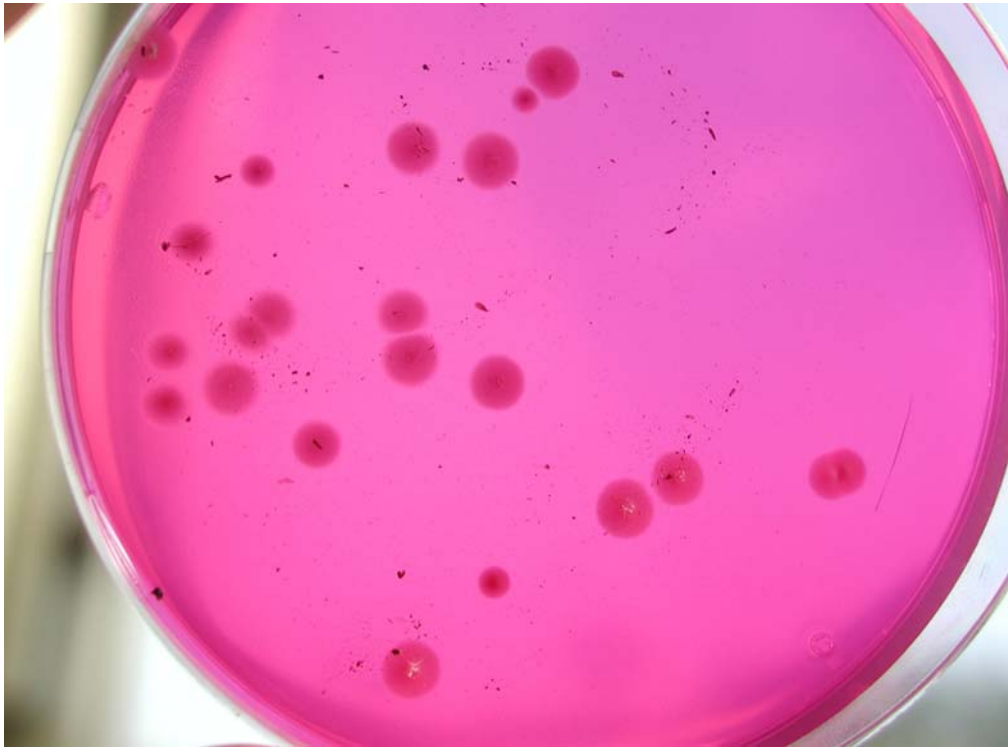
Τρεις εβδομάδες μετά την πρώτη μόλυνση του εδάφους και της ρίζας από νηματώδεις, ο αποικισμός από τον μύκητα προσδιορίστηκε σε ένα φυτό/επέμβαση.

Το ριζικό σύστημα πλύθηκε και 1gr αλέσθηκε σε 9ml 0,05% διαλύματος water agar με την βοήθεια γουδιού κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Το διάλυμα αραιώθηκε επιπλέον ( $10^{-2}$  και  $10^{-3}$ ) σε 0,05% διάλυμα water agar και 0,2ml από κάθε συγκέντρωση απλώθηκε σε τρυβλία τα οποία περιείχαν ημιεπιλεκτικό μέσο για την ανάπτυξη του μύκητα κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Το ημιεπιλεκτικό μέσο περιείχε carbendazim, thiabendazole, rose Bengal, streptomycin sulphate, chlorotetracycline, chloramphenicol, triton $\times$ 100, corn meal agar και NaCl σε απεσταγμένο νερό (Leij and Kerry, 1991).

Δύο εβδομάδες μετά την επώαση στους 25<sup>0</sup>C υπολογίστηκε ο αριθμός των αποικιών του μύκητα *Pochonia chlamydosporia* στα τρυβλία (Εικ. 10). Χώμα από κάθε ποτηράκι αναμείχθηκε και 1gr αντιπροσωπευτικού δείγματος αραιώθηκε σε 0,05% water agar και οι αποικίες του μύκητα εκτιμήθηκαν όπως και για τις ρίζες σε colony forming units (cfu)/gr εδάφους. Στην περίπτωση των ριζών η αποίκιση του μύκητα παρουσιάζεται ως cfu/mm<sup>2</sup> υπολογίζοντας την επιφάνεια 1gr (Leij and Kerry, 1991).

Επτά εβδομάδες μετά την πρώτη μόλυνση με νηματώδεις εκτιμήθηκαν 4 επαναλήψεις / επέμβαση. Γυρίζοντας ανάποδα τα ποτήρια απομακρύνθηκε η ρίζα από το περιβάλλον έδαφος με προσοχή. Το χώμα ανακατεύθηκε και τοποθετήθηκε μέσα σε τροποποιημένους δίσκους Whitehead για την εξαγωγή των προνυμφών που μετρήθηκαν 4 ημέρες μετά την επώαση στους 25<sup>0</sup>C. Επιπλέον προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του μύκητα σε 1gr εδάφους.

Οι ρίζες πλύθηκαν με προσοχή, προσδιορίστηκε ο δείκτης όγκων (RGI) (Bridge and Page, 1980) και έγινε μέτρηση του αριθμού των ωόσακκων στην επιφάνεια της ρίζας με την βοήθεια του στεροσκοπίου. Για να προσδιορίσουμε τον αριθμό των αυγών ανά ωόσακκο τοποθετήθηκαν 5-10 μάζες αυγών / ρίζα σε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου για την ελευθέρωση των αυγών τα οποία μετρήθηκαν στο στεροσκόπιο. Υπολογίστηκε επίσης η αναλογία των



**Εικ. 10** Αποικίες του μύκητα *P. chlamydosporia* σε ημιεπιλεκτικό θρεπτικό υλικό.



**Εικ. 11** Αυγό *M. incognita* παρασιτισμένο από τον μύκητα *P. chlamydosporia*.

εμβρυοποιημένων αυγών. Για την εκτίμηση του ποσοστού των προσβεβλημένων αυγών, τοποθετήθηκαν 5-10 μάζες αυγών σε 1ml νερού, έγινε διασπορά των αυγών με ομογενοποιητή και το διάλυμα απλώθηκε σε τρυβλία που περιείχαν 0,8% water agar και αντιβιοτικά (streptomycin sulphate, chloramphenicol και chlorotetracycline) (Leij and Kerry, 1991). Δύο μέρες μετά την επώαση στους 25<sup>0</sup>C παρατηρήθηκαν τα τρυβλία με την βοήθεια μικροσκοπίου. Μολυσμένα θεωρήθηκαν τα αυγά στο εσωτερικό των οποίων ήταν ορατές υφές του μύκητα (Εικ. 11). Τα ποσοστά μόλυνσης εκτιμήθηκαν σε 50 αυγά / επανάληψη. Επιπλέον υπολογίστηκε η αποίκιση της ρίζας από τον μύκητα.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Είκοσι μία ημέρες μετά την πρώτη εφαρμογή των νηματωδών, ο μύκητας ανιχνεύτηκε στο χώμα σε κάθε επέμβαση με υψηλότερη πυκνότητα στην μεγαλύτερη δόση. Στη χαμηλή πυκνότητα ο μύκητας δεν βρέθηκε στην ρίζα, ενώ όταν εφαρμόστηκε σε υψηλή συγκέντρωση βρέθηκε στις ρίζες ντομάτας και στις δύο πυκνότητες νηματωδών ενώ στην πιπεριά βρέθηκε μόνο στην χαμηλή πυκνότητα νηματωδών (Διάγραμμα 1). Γενικά η εγκατάσταση του μύκητα στην ριζόσφαιρα ήταν σχετικά χαμηλή ώστε να έχει μια σημαντική επίδραση στον παρασιτισμό των αυγών.

Η εκτίμηση του συνολικού πληθυσμού των νηματωδών στο τέλος του πειράματος υπολογίστηκε ως το άθροισμα του αριθμού των προνυμφών στο έδαφος και του συνολικού αριθμού των αυγών (αριθμός ωόσακκων × αριθμός αυγών / ωόσακκο). Η σύγκριση των επεμβάσεων στο τέλος του πειράματος έγινε με ανάλυση διασποράς. Ο μύκητας δεν είχε κανένα αποτέλεσμα στην μείωση των όγκων στις ρίζες (Διάγραμμα 2) και στον συνολικό πληθυσμό των νηματωδών ( Διάγραμμα 3).

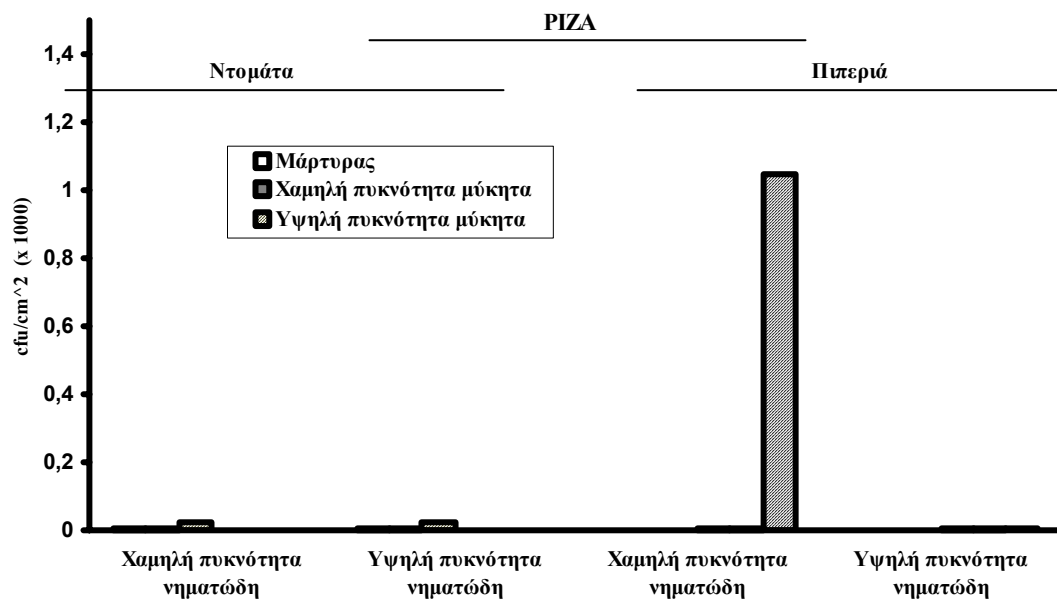
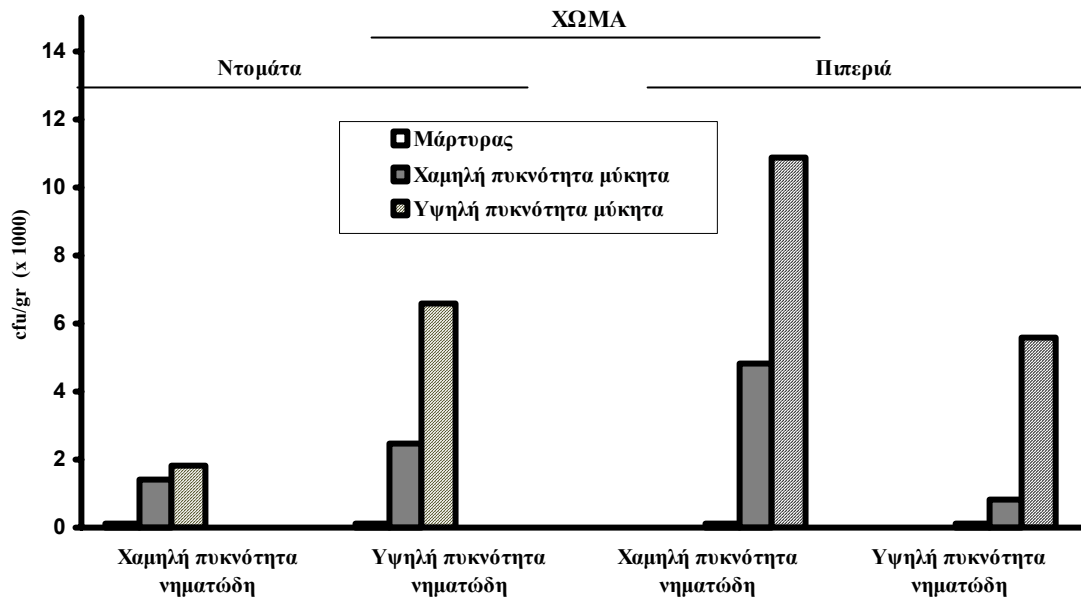
Τα εμβρυοποιημένα αυγά είναι ανθεκτικά στην μόλυνση συγκριτικά με τα μη εμβρυοποιημένα και η αποτελεσματικότητα του μύκητα μπορεί να αξιολογηθεί συγκρίνοντας το ποσοστό των αυγών αυτών στις επεμβάσεις σε σχέση με το μάρτυρα. Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν διαφορές στο ποσοστό των εμβρυοποιημένων αυγών σε κάθε επέμβαση δείχνοντας μια έλλειψη



αποτελεσματικότητας του μύκητα (Διάγραμμα 4). Το ποσοστό των παρασιτισμένων αυγών ήταν 8-30% (Διάγραμμα 5), αλλά ένας σημαντικός αριθμός προνυμφών από την πρώτη γενιά βρέθηκε στο έδαφος. Η πυκνότητα του μύκητα στο έδαφος ήταν για την ντομάτα 1,5-4 φορές υψηλότερη και για την πιπεριά 1-1,5 φορές της αρχικής εφαρμογής των 5.000 χλαμυδοσπορίων / gr εδάφους. Αντίθετα όταν η αρχική εφαρμογή του μύκητα στο έδαφος ήταν 60.000 χλαμυδοσπόρια / gr εδάφους η συγκέντρωση στο έδαφος ήταν σημαντικά χαμηλότερη. Η εγκατάσταση του μύκητα στη ρίζα δεν διέφερε σημαντικά όταν η αρχική δόση των χλαμυδοσπορίων ήταν 5.000 ή 60.000 /gr εδάφους (Διάγραμμα 6).

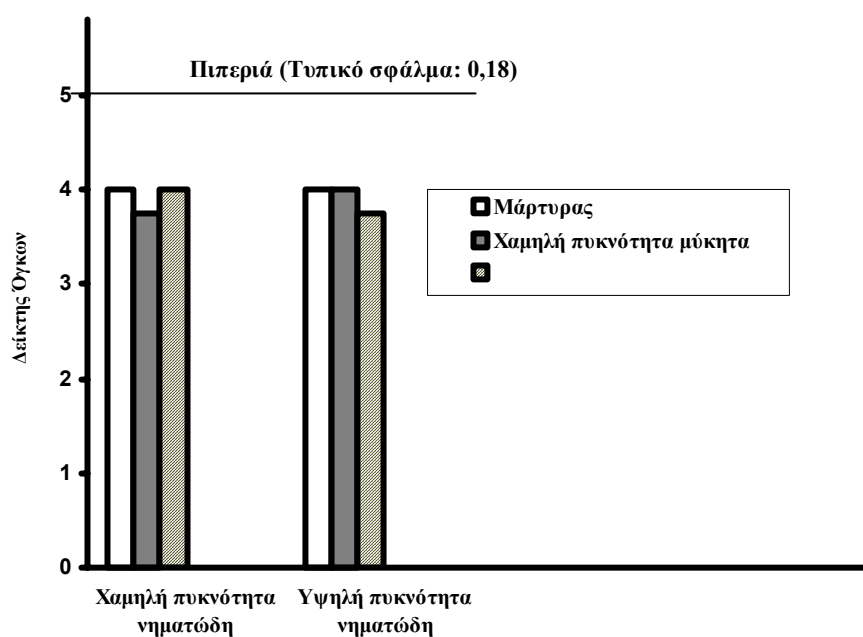
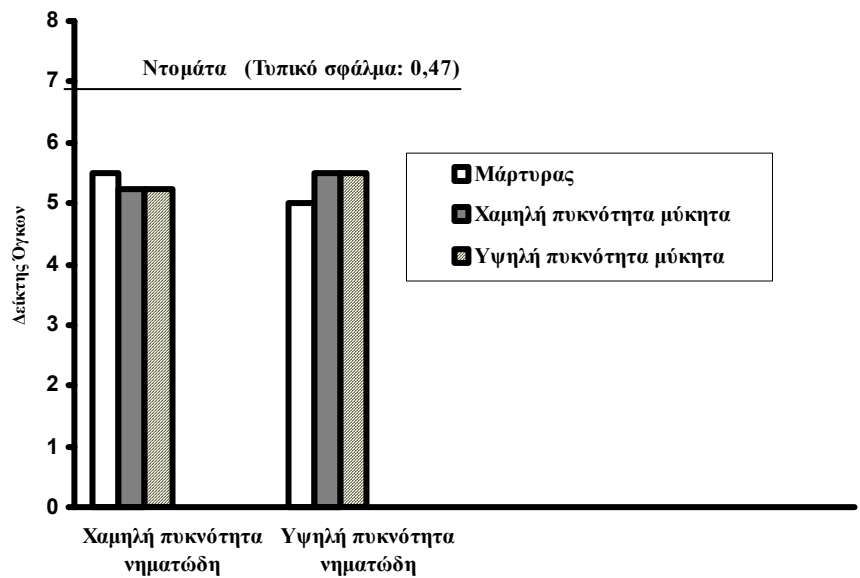
## Διάγραμμα 1

Παρουσία του μύκητα *P. chlamydosporia* στο χώμα και στη ρίζα φυτών ντομάτας και πιπεριάς 3 εβδομάδες μετά την μόλυνση με προνύμφες του *Meloidogyne incognita* (1 επανάληψη ανά επέμβαση).



## Διάγραμμα 2

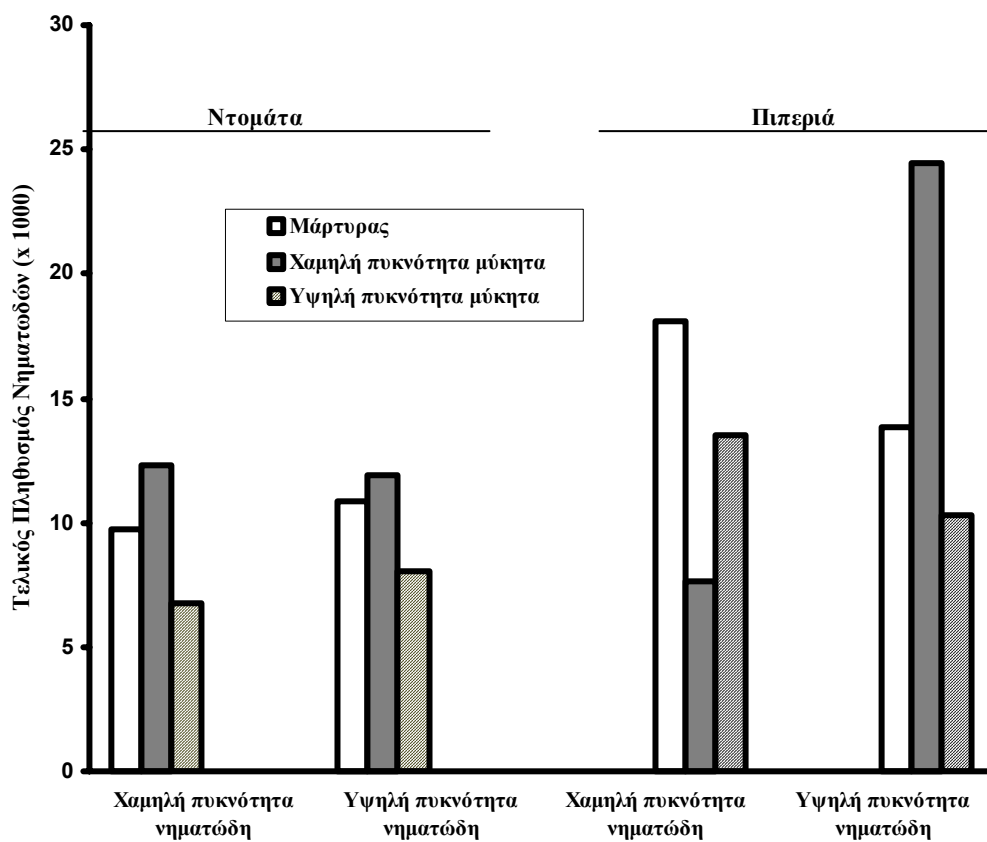
Δείκτης όγκων στις ρίζες ντομάτας και πιπεριάς 7 εβδομάδες μετά την μόλυνση με προνύμφες του *Meloidogyne incognita* (4 επαναλήψεις ανά επέμβαση).



### Διάγραμμα 3

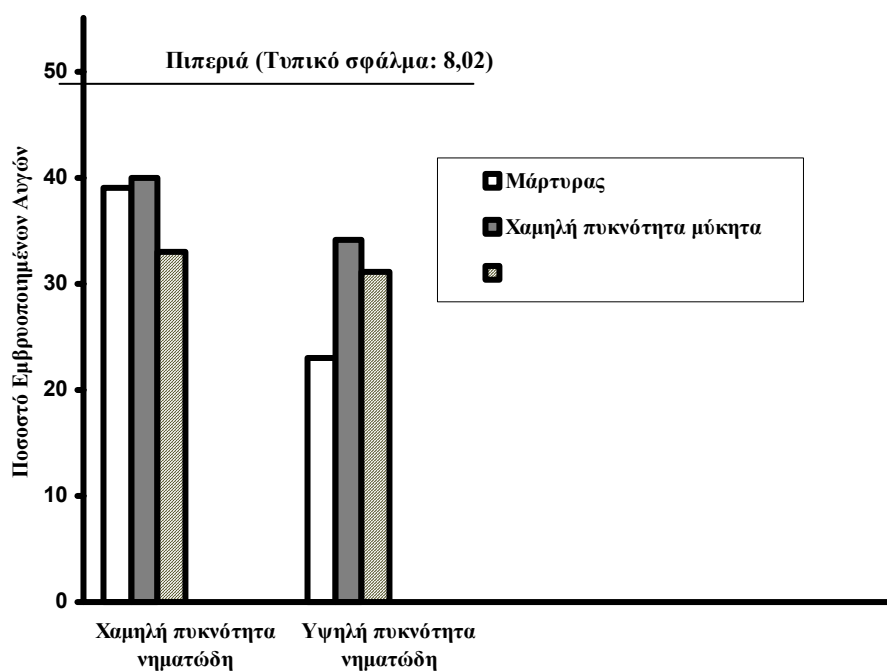
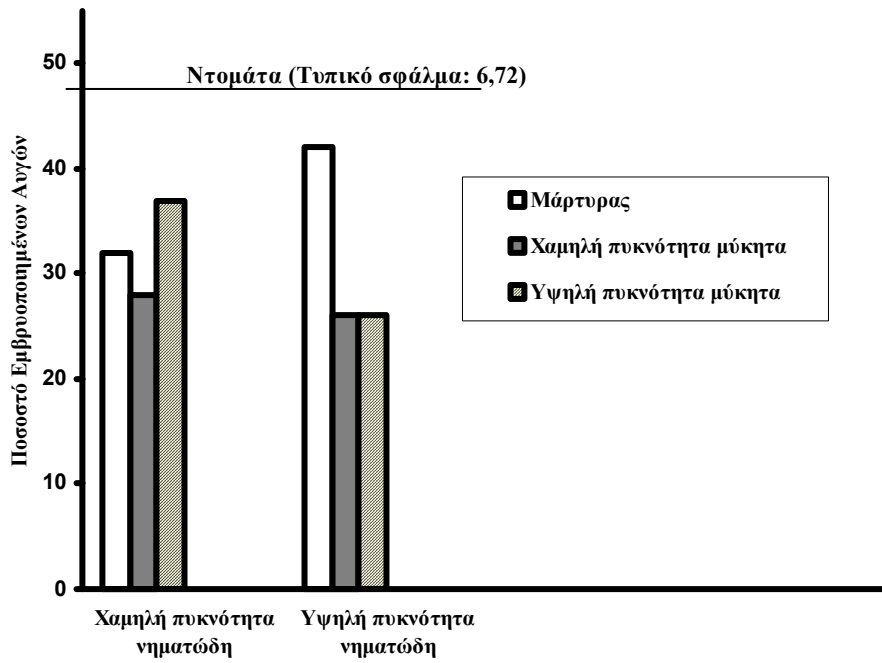
Τελικός πληθυσμός νηματωδών στις ρίζες και στο χώμα 7 εβδομάδες μετά την μόλυνση με προνύμφες του *Meloidogyne incognita* (4 επαναλήψεις ανά επέμβαση).

Τυπικό σφάλμα: 2,67



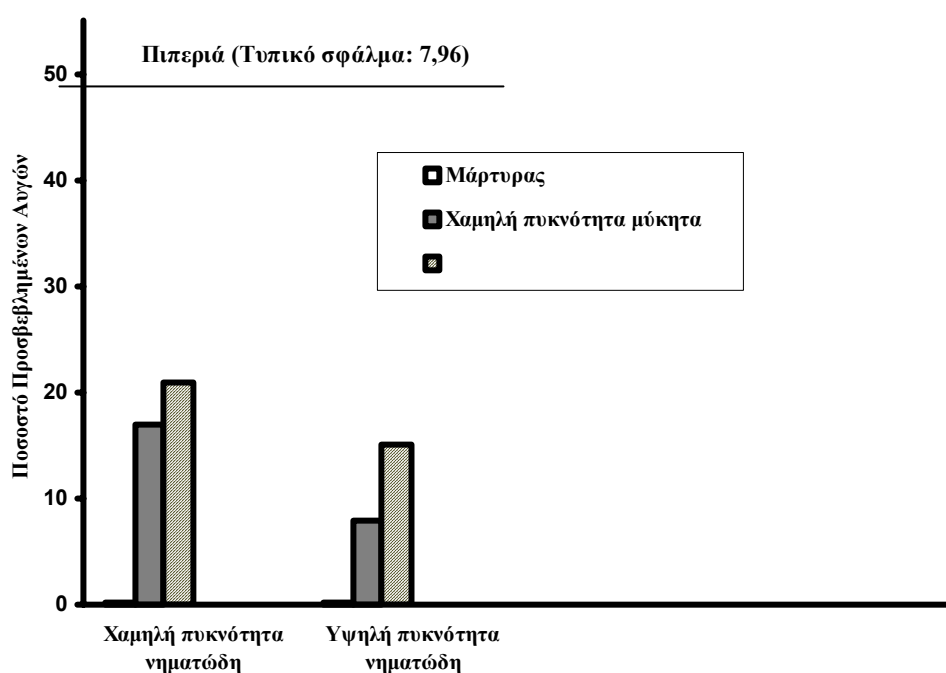
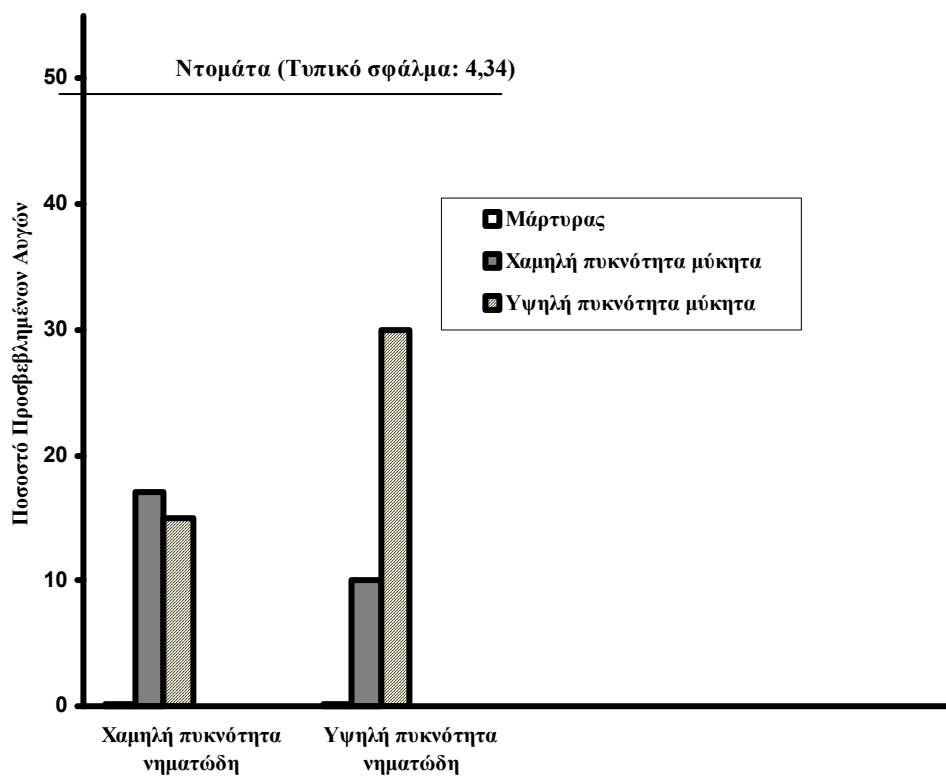
## Διάγραμμα 4

Ποσοστό εμβρυοποιημένων αυγών (%) σε ρίζες ντομάτας και πιπεριάς 7 εβδομάδες μετά την μόλυνση με προνύμφες του *Meloidogyne incognita* (4 επαναλήψεις ανά επέμβαση).



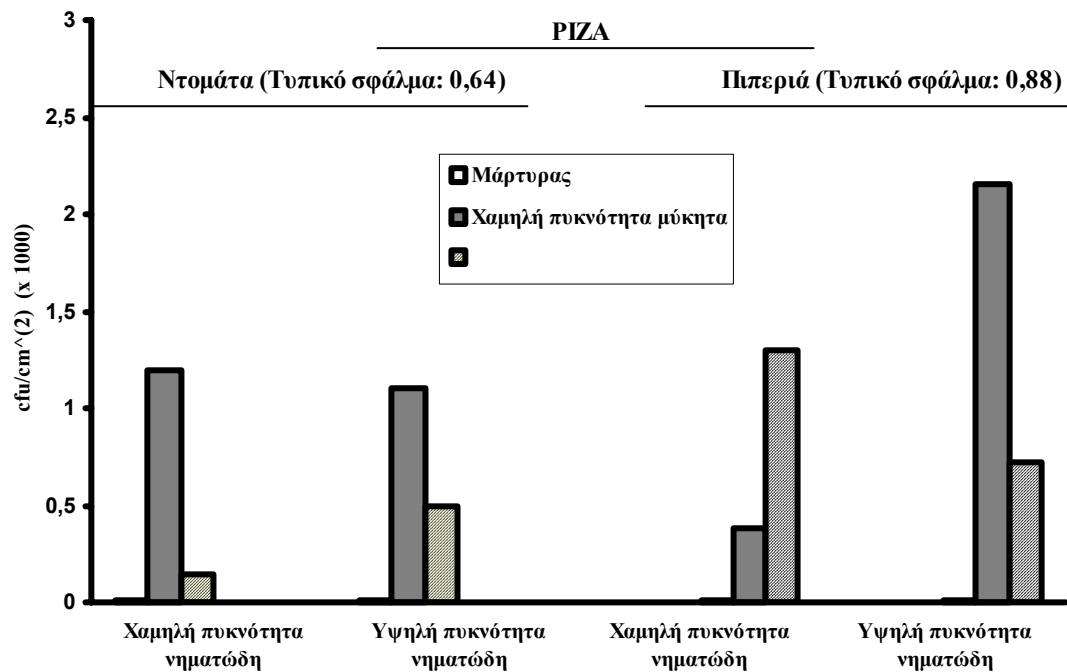
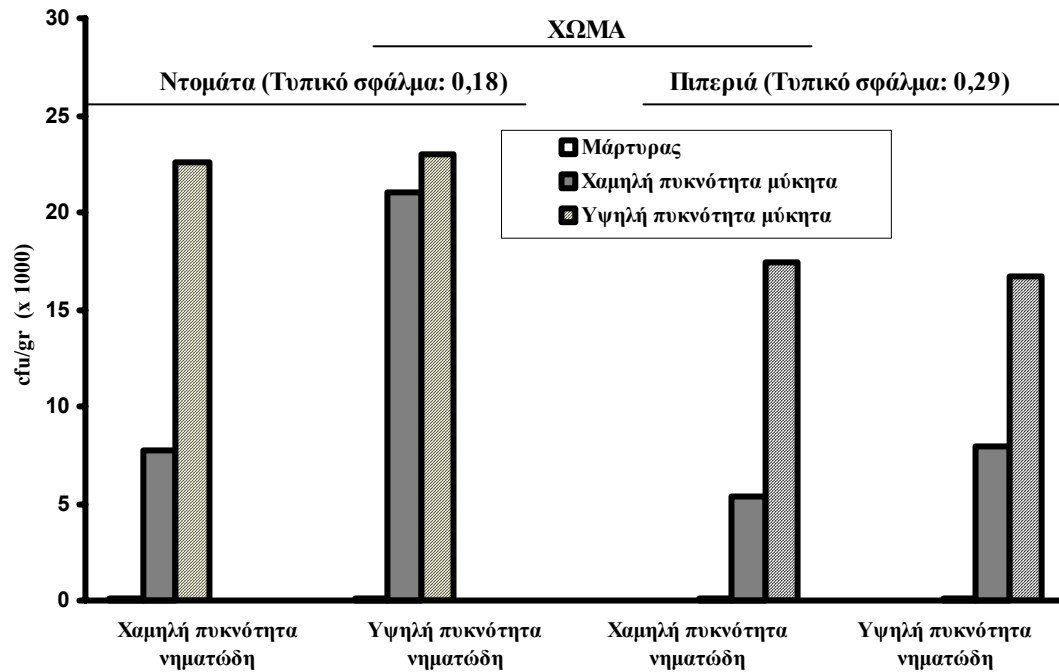
## Διάγραμμα 5

Ποσοστό προσβεβλημένων από τον μύκητα αυγών (%) σε ρίζες ντομάτας και πιπεριάς 7 εβδομάδες μετά την μόλυνση με προνύμφες του *Meloidogyne incognita* (4 επαναλήψεις ανά επέμβαση).



## Διάγραμμα 6

Παρουσία του μύκητα *P. chlamydosporia* στο χώμα και στη ρίζα φυτών ντομάτας και πιπεριάς 7 εβδομάδες μετά την μόλυνση με προύμφες του *Meloidogyne incognita* (4 επαναλήψεις ανά επέμβαση, ανάλυση δεδομένων μετασχηματισμένων σε λογαρίθμους).



#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η δοκιμή βλαστικότητας των χλαμυδοσπορίων πριν την ενσωμάτωση στο έδαφος έδειξε ότι ήταν βιώσιμα σε ποσοστό μεγαλύτερο από 90%. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο μύκητας εγκαταστάθηκε ικανοποιητικά στη ρίζα και στο χώμα μετά από 7 εβδομάδες, αλλά το ποσοστό παρασιτισμού των αυγών ήταν χαμηλό και γενικά δεν παρατηρήθηκε μείωση των όγκων και της πυκνότητας του νηματώδη. Αντίθετα το ίδιο στέλεχος του μύκητα (No 10, IACR Rothamsted UK) βρέθηκε αποτελεσματικό στην μείωση πληθυσμών κομβονηματοδών σε αρκετά πειράματα που έγιναν στην Μ. Βρετανία.

Επομένως η αποτελεσματικότητα του μύκητα δεν είναι σταθερή και τα αποτελέσματα μπορεί να διαφέρουν όταν τα πειράματα διεξάγονται σε διαφορετικά εργαστήρια ή όταν χρησιμοποιούνται πληθυσμοί νηματωδών διαφορετικής προέλευσης. Η εγκατάσταση του μύκητα στη ριζόσφαιρα ήταν ανεξάρτητη της αρχικής δόσης εφαρμογής των χλαμυδοσπορίων στο τέλος του πειράματος και αρκετά χαμηλή 3 εβδομάδες μετά την μόλυνση με νηματώδεις όταν αρχίζει η ωοπαραγωγή, με συνέπεια την “διαφυγή” του παρασιτισμού σε μεγάλο ποσοστό αυγών.

Τα προκαταρκτικά πειράματα δείχνουν ότι το συγκεκριμένο στέλεχος του μύκητα δεν μπορεί να θεωρηθεί ως ένας σημαντικός παράγοντας για την ολοκληρωμένη αντιμετώπιση του κομβονηματοώδη *M. incognita* σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες ντομάτας και πιπεριάς στην Κρήτη.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

BRADY N.C., 1985. Agricultural research and food production. In: An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. Vol 1: Biology and Control J.N. Sasser, C.C. Carted (Eds). North Carolina State University Graphics. pp: 3-9.

BRIDGE J. and PAGE S. L. J., 1980. Estimation of root knot infestation levels on roots using a rating chart. *Tropical Pest Management* 26: 296-298.

DAVIES K. G., LEIJ DE F.A.A.M. and KERRY B. R., 1991. Microbial agents for the biological control of plant parasitic nematodes in tropical agriculture. *Tropical Pest Management* 37:303-320.

HUSSEY, R.S. 1985. Host parasite relationships and associated physiological changes. In: An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. Vol 1: Biology and Control J.N. Sasser, C.C. Carted (Eds). North Carolina State University Graphics. pp:143-153.

KERRY B.R., 1990. An assessment of progress toward microbial control of plant parasitic nematodes. *Journal of Nematology* 22(S): 621-631.

KERRY B. R., 1995. Ecological consideration for the use of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium*, to control plant parasitic nematodes. *Canadian J. Botany (Suppl. 1)* 73: 65-70.

KERRY B. R. and BOURNE J. M., 1996. The importance of rhizosphere interactions in the biological control of plant parasitic nematodes – a case study using *Verticillium chlamydosporium*. *Pesticide Science* 47: 69-75.

LEIJ DE F.A.A.M. and KERRY B. R., 1991. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* as a potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria*. *Revue de Nematologie* 14: 157-164.

LEIJ DE F.A.A.M., KERRY B.R., and DENNEHY J.A., 1993. *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent for *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* in pot and micro-plot tests. *Nematologica* 39: 115-126.

SASSER J.N., 1980. Root-knot nematodes: a global nemace to crop production. *Plant Disease* 64: 36-41.

SASSER J.N., 1989. Plant Parasitic Nematodes. The farmer's Hidden Enemy. North Carolina State University Graphics.

STIRLING G.R., 1991. Biological control of plant parasitic nematodes: progress, problems and prospects. CAB International.

THOMASON I.J. and CASWELL E.P. 1987. Principles of nematode control. In: Principles and Practice of Nematode Control in crops. R.H.Brown and B.R.Kerry (Eds) Academic Press pp: 87-130.

TZORTZAKAKIS E.A., BLOCK VC, PHILLIPS MS and TRUDGILL DL 1999. Variation in root-knot nematode (*Meloidogyne spp.*) in Crete in relation to control with resistant tomato and pepper. *Nematology* 1: 499-506.

TZORTZAKAKIS E.A. 2000. The effect of *Verticillium chlamydosporium* and oxamyl on the control of *Meloidogyne javanica* on tomatoes grown in a plastic house in Crete, Greece. *Nematologia mediterranea* 28: 249-254.

VAN GUNDY S.D., 1985. Ecology of *Meloidogyne spp.*-emphasis on environmental factors affecting survival and pathogenesis. In: An Advanced Treatise on Meloidogyne. Vol 1: Biology and Control J.N. Sasser, C.C. Carted (Eds). North Carolina State University Graphics. pp: 177-182.

WEBSTER J.M., 1980. Nematodes in an overcrowded world. *Revue de Nematologie* 3: 135-143.

ZARE R., GAMS W. and EVANS HC., 2001. A revision of *Verticillium* section Prostrata. V. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthora*. *Nova Hedwigia* 73: 51-86.