

**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΔΥΤΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ
(ΠΡΩΗΝ ΤΜΗΜΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ
ΤΕΙ ΜΕΣΟΛΟΓΓΙΟΥ)**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΑΣΗΣ ΣΕ ΦΥΛΛΑ ΤΟΜΑΤΙΑΣ
ΠΡΟΣΒΕΒΛΗΜΕΝΗΣ ΑΠΟ ΝΗΜΑΤΩΔΕΙΣ**



ΘΕΩΝΗ ΚΩΣΤΑΡΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΓΙΩΡΓΟΣ ΖΕΡΒΟΥΔΑΚΗΣ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Γιώργο Ζερβουδάκη και την Επίκουρη Καθηγήτρια κα Ειρήνη Καραναστάση που με την πολύτιμη βοήθειά τους πραγματοποιήθηκε η ολοκλήρωση της πτυχιακής εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ (ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ).....	4
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ: ΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ STRESS.....	4
1.1. Εισαγωγή.....	4
1.2. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H ₂ O ₂)	5
1.3. Η καταλάση.....	6
1.4. Η δομή των μεμβρανών	7
1.5. Η υπεροξείδωση των λιπιδίων	11
1.6. Η μαλονική διαλδεύδη	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΟΙ ΦΥΤΟΠΑΡΑΣΙΤΙΚΟΙ ΝΗΜΑΤΩΔΕΙΣ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ Meloidogyne	14
2.1. Γενικά για τους νηματώδεις.....	14
2.2. Οι νηματώδεις του γένους <i>Meloidogyne</i>	15
2.3. Συστηματική κατάταξη.....	15
2.4. Βιολογικός Κύκλος	15
2.5. Παθογένεια.....	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ: Η ΤΟΜΑΤΑ <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	17
3.1. Γενικά για την τομάτα.....	17
3.2. Μορφές καλλιέργειας.....	18
3.3. Το γένος <i>Lycopersicon</i>	18
ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ (ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ).....	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	20
5.1. Καλλιέργεια του φυτού και προσβολή από τους νηματώδεις.....	20
5.2. Προσδιορισμός της δραστηρότητας της καταλάσης.....	21
5.3. Προσδιορισμός της υπεροξείδωσης των λιπιδίων (TBARS).....	23
5.4. Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.....	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΤΟ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	27
6.1. Η ανάπτυξη των φυτών.....	27
6.2. Μέτρηση της δραστηρότητας της καταλάσης	29
6.3. Μέτρηση της υπεροξείδωσης λιπιδίων (TBARS).....	30
6.4. Μέτρηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών	31
6.5. Συμπεράσματα-Συζήτηση	32
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	34

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ (ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ: ΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ STRESS

1.1. Εισαγωγή

Το οξυγόνο το οποίο εμφανίστηκε στην ατμόσφαιρα της Γης κυρίως ως προϊόν της φωτοσύνθεσης, έχει διττή σημασία για τους αερόβιους οργανισμούς: επιτρέπει την παραγωγή ενέργειας από την ενζυμική διάσπαση των οργανικών ενώσεων αλλά συγχρόνως προκαλεί βλάβες στα αεροβικά κύτταρα λόγω του σχηματισμού των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), οι οποίες αντιδρούν με όλες τις κατηγορίες βιομορίων. Κατά τη διάρκεια των εκατομμυρίων ετών εξέλιξης, οι αερόβιοι οργανισμοί προσαρμόστηκαν στην απειλή που αποτελεί το οξυγόνο με τη λειτουργία αντιοξειδωτικών συστημάτων που ελαχιστοποιούν τις επιβλαβείς ενέργειες των ROS. Σε κάθε αεροβικό κύτταρο υπάρχει μια ισορροπία μεταξύ της παραγωγής ROS και των αντιοξειδωτών. Μια αλλαγή σε αυτήν την ισορροπία υπέρ των οξειδωτικών αντιδράσεων αναφέρεται ως οξειδωτικό stress (OS). Σήμερα, το οξειδωτικό stress θεωρείται αιτία πολλών ασθενειών των ζωικών οργανισμών και του ανθρώπου ενώ συμβάλλει στη διαδικασία της γήρανσης. Στα φυτά οι μελέτες σε αυτόν τον τομέα είναι λιγότερες αλλά το οξειδωτικό stress δε φαίνεται να είναι λιγότερο σημαντικό απ' ό,τι στον ζωικό κόσμο.

Οι ζωντανοί οργανισμοί εκτίθενται στα διαφορετικά είδη καταπονήσεων, οι οποίες μπορεί να προέλθουν από ανθρώπινες δραστηριότητες ή φυσικές αιτίες όπως η ατμοσφαιρική ρύπανση, η ξηρασία, η θερμοκρασία, οι μεγάλες εντάσεις φωτός και οι τροφοπενίες. Δεδομένου ότι τα φυτά διαθέτουν περιορισμένους μηχανισμούς αποφυγής των καταπονήσεων, απαιτούν ευέλικτους μηχανισμούς προσαρμογής τους στις μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες. Ένα κοινό χαρακτηριστικό γνώρισμα των διαφορετικών παραγόντων καταπόνησης είναι η δυνατότητά τους να αυξάνουν την παραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου στους ιστούς των φυτών. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου παράγονται επίσης στα κύτταρα φυτών κατά τη διάρκεια των φυσιολογικών μεταβολικών διαδικασιών. Το φωτοσυνθετικό σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων είναι η σημαντικότερη πηγή δραστικού οξυγόνου στους ιστούς των φυτών. Η παραγωγή του δραστικού οξυγόνου είναι μια αναπόφευκτη συνέπεια της λειτουργίας της φωτοσυνθετικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων σε μια ατμόσφαιρα οξυγόνου.

Το οξειδωτικό stress είναι ουσιαστικά μια ρυθμιζόμενη διαδικασία, η ισορροπία μεταξύ των οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ικανοτήτων καθορίζουν τη μοίρα των φυτών. Υπό κανονικές συνθήκες, το αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα παρέχει επαρκή προστασία απέναντι στο δραστικό οξυγόνο και τις ελεύθερες ρίζες. Τόσο οι φυσικές όσο και οι προκαλούμενες από τον άνθρωπο καταστάσεις καταπόνησης προκαλούν την αυξανόμενη παραγωγή των τοξικών παραγώγων οξυγόνου. Ως αντίδραση, η ικανότητα του αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος αυξάνεται. Όμως, σε άλλες περιπτώσεις η αντίδραση μπορεί να είναι μέτρια (Τσίτση Θεονίτσα, 2011).

Η πολύ έντονη ακτινοβολία, η έλλειψη νερού, η ατμοσφαιρική και εδαφική ρύπανση, η υπερβολική συγκέντρωση αλάτων και οι επιθέσεις από παθογόνα είναι μερικά παραδείγματα συνθηκών στρες για τα φυτά. Τα φυτά στον αγρό συχνά καλούνται να αντιμετωπίσουν ταυτόχρονα πολλές από αυτές τις καταστάσεις και η ικανότητα προσαρμογής τους εξαρτάται από το είδος και την ποικιλία του κάθε φυτού. Σε αυτές τις διαδικασίες συμπεριλαμβάνεται η ανθεκτικότητα τους στο κρύο, η προσαρμοστικότητα της ανάπτυξης σε διαφορετικές συνθήκες φωτός και η ανθεκτικότητά τους σε παθογόνα. Τα φυτά που εκτίθενται σε κάποιο στρες ορισμένες φορές τα βοηθά να αποκτήσουν αντοχές σε κάποια άλλη μορφή στρες. Άλλες φορές, οι μηχανισμοί καταπολέμησης κάποιας καταπόνησης μπορεί να οδηγήσουν τα φυτά να εκτεθούν σε άλλες καταπονήσεις. Αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν την ύπαρξη κοινών και/ή ανταγωνιστικών παραγόντων οι οποίοι εμπλέκονται στις αποκρίσεις απέναντι σε διαφορετικές συνθήκες καταπόνησης.

Όμως, σε πολλές περιπτώσεις διαφορετικών καταπονήσεων έχουμε συσσώρευση δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) με αποτέλεσμα αλλαγές στην κυτταρική οξειδοαναγωγική κατάσταση.

1.2. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂)

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) είναι ένας όρος που χρησιμοποιείται συχνά από τους επιστήμονες ώστε να συμπεριλάβουν όχι μόνο τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (O₂^{•-}, [•]OH), αλλά και ορισμένες μη ρίζες, παράγωγα του O₂ όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂).

Αν το O₂ προσελκύσει δύο άτομα υδρογόνου τότε σχηματίζεται το H₂O₂ το οποίο αν και τεχνικά δεν θεωρείται ελεύθερη ρίζα, είναι μέλος της οικογένειας των ROS και συμμετέχει στην παραγωγή ελευθέρων ριζών. Το κυτταρικό ένζυμο καταλάση διασπά

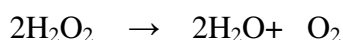
την πλειοψηφία των μορίων H₂O₂ σε οξυγόνο και νερό. Εκτός από την καταλάση, το ένζυμο υπεροξειδάση της γλουταθειόνης είναι υπεύθυνο για τη καταστροφή του H₂O₂ και οποιοδήποτε άλλου υπεροξειδίου σχηματίζεται στα λιπίδια.

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι τοξικό για τα περισσότερα κύτταρα σε επίπεδα της τάξεως των 10-100 mM. Αναμιγνύεται εύκολα με το νερό και διαχέεται εύκολα εντός και μεταξύ των κυττάρων *in vivo*. Μερικές κυτταρικές βλάβες από το H₂O₂ είναι άμεσες. Το H₂O₂ μπορεί να διαπεράσει γρήγορα τις κυτταρικές μεμβράνες και μόλις εισέλθει αντιδρά με ιόντα σιδήρου και χαλκού σχηματίζοντας βλαβερές μορφές όπως [•]OH. Η μετατροπή του H₂O₂ σε [•]OH επίσης μπορεί να επιτευχθεί και μέσω της υπεριώδους ακτινοβολίας.

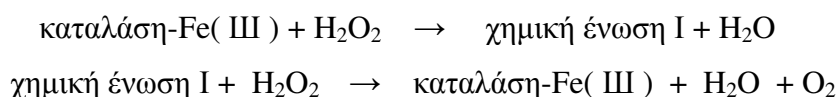
1.3. Η καταλάση

Στους αερόβιους οργανισμούς, το υπεροξείδιο του υδρογόνου μεταβολίζεται συνήθως από δύο τύπους ενζύμων, τις καταλάσες και τις υπεροξειδάσες.

Οι καταλάσες καταλύουν κατευθείαν τη διάσπαση του H₂O₂ προς O₂



Ο μηχανισμός αντίδρασης της καταλάσης είναι ουσιαστικά μια αυτοοξειδοαναγωγή. Ένα H₂O₂ ανάγεται προς H₂O και ένα άλλο οξειδώνεται προς O₂

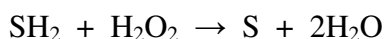


Η καταλάση (catalase) είναι το πρώτο αντιοξειδωτικό ένζυμο που ανακαλύφθηκε και χαρακτηρίστηκε. Το όνομα του ενζύμου το έδωσε ο Loew (1900) σημειώνοντας ότι «φαίνεται ότι δεν υπάρχει φυτό ή ζώο που να μην έχει αυτό το συγκεκριμένο ένζυμο». Επίσης, κάποιοι αναερόβιοι οργανισμοί γνωρίζουμε πως περιέχουν καταλάση.

Αν και μερικές βακτηριακές καταλάσες χρησιμοποιούν το μαγγάνιο ως οξειδοαναγωγικό παράγοντα, όλες οι γνωστές ευκαρυωτικές μορφές περιέχουν αίμη. Ο καλύτερα χαρακτηρισμένος τύπος της αιμη-εξαρτώμενης καταλάσης συναντιέται σε διαφορετικούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων και προκαρυωτών, αλλά και σε μύκητες, ζώα και φυτά και είναι η τυπική μορφή της μονολειτουργικής καταλάσης. Αυτά τα ένζυμα αποτελούνται από πολυπεπίδια των 50-70 kDa, και οργανώνονται σε τετραμερή, που το καθένα μεμονωμένα φέρει προσθετική ομάδα αίμης. Ένας δεύτερος τύπος αίμη-εξαρτώμενης καταλάσης είναι μια διλειτουργική καταλάση-

υπεροξειδάση (catalase-peroxidase) που είναι δομικά διαφορετική πρωτεΐνη και βρίσκεται σε μερικούς μύκητες και προκαρυωτικούς οργανισμούς .

Οι υπεροξειδάσες (peroxidases) είναι ένζυμα που διασπών το H_2O_2 χρησιμοποιώντας το για οξειδώσουν κάποιο άλλο υπόστρωμα (S), σύμφωνα με την αντίδραση



Συχνά, τα φυτά και τα βακτήρια διαθέτουν αιμη-εξαρτώμενες υπεροξειδάσες που μπορούν να οξειδώσουν διάφορα υποστρώματα με τη χρήση H_2O_2 όπως για παράδειγμα η υπεροξειδάση του ασκορβικού (ascorbateperoxidase, APX) που βρίσκεται στους χλωροπλάστες (οι οποίοι δεν περιέχουν καταλάση).

Η διάκριση μεταξύ μονολειτουργικής και διλειτουργικής καταλάσης δεν είναι απόλυτη, επειδή ο πρώτος τύπος μπορεί μερικές φορές να καταλύσει και εξαρτώμενη από το H_2O_2 υπεροξείδωση οργανικών υποστρωμάτων. Από την άλλη πλευρά, οι διλειτουργικέςκαταλάσες-υπεροξειδάσες μοιάζουν περισσότερο με τις αίμη-εξαρτώμενες υπεροξειδάσες όπως για παράδειγμα η APX. Επίσης, έχουν υψηλότερη συγγένεια με το H_2O_2 από τις μονολειτουργικέςκαταλάσες και μπορεί να διακρίνονται από σχετική έλλειψη ευαισθησίας στον αναστολέα 3-αμινο-1,2,4-τριαζόλη (3-AT). Είναι ο πιο κοινός τύπος καταλάσης στα κυανοβακτήρια.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω ακόμα και οι μονολειτουργικέςκαταλάσες μπορούν να καταλύσουν την υπεροξείδωση υποστρωμάτων. Η υπεροξείδωση που οφείλεται σε δράση καταλάσης έχει αναφερθεί και σε φυτά.

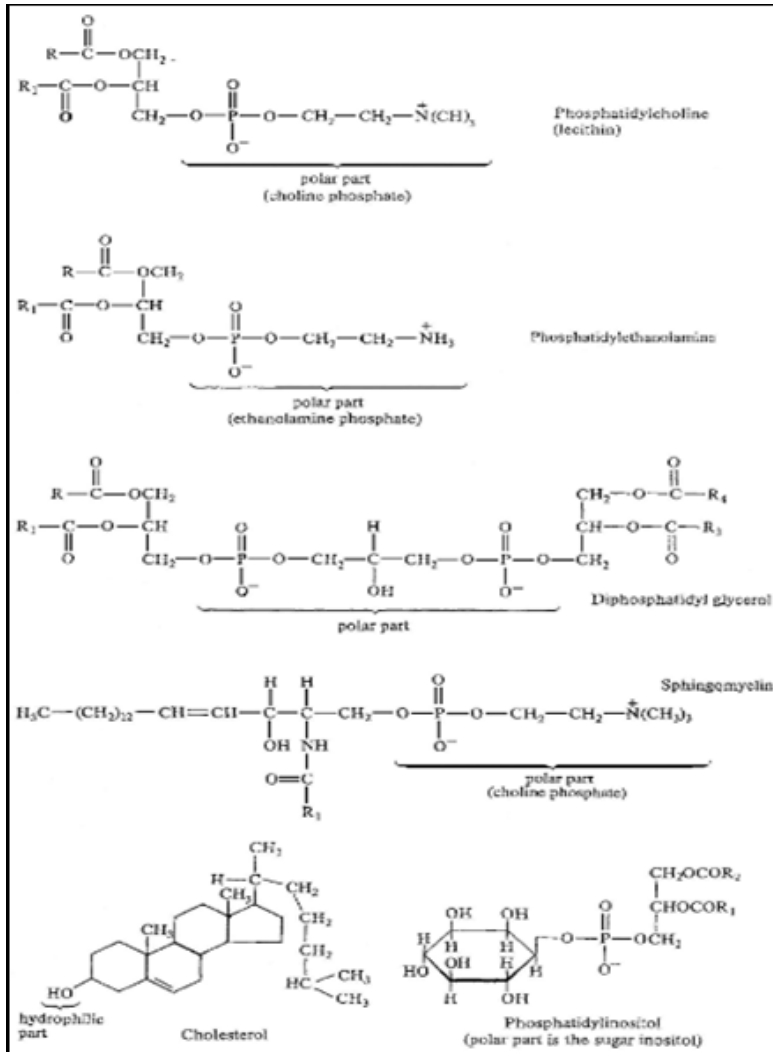
Ένα σημαντικό ερώτημα είναι ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός της καταλάσης στα φυτά. Έτσι, από διάφορες μελέτες φαίνεται ότι τα περοξυσώματα περιέχουν υψηλή δραστικότητα καταλάσης αν και έχουν αναφερθεί και δραστικότητες στο κυτταρόπλασμα και στο μιτοχόνδριο. Υπάρχουν και αναφορές σε πειράματα με απομονωμένους χλωροπλάστες αλλά αμφισβητούνται διότι μπορεί να οφείλεται στην παρουσία περοξυσωμάτων κατά τη διαδικασία απομόνωσης ή στην πρόσδεση του ενζύμου στο εξωτερικό των χλωροπλαστών (Κυρίμη Καλλιόπη, 2013).

1.4. Η δομή των μεμβρανών

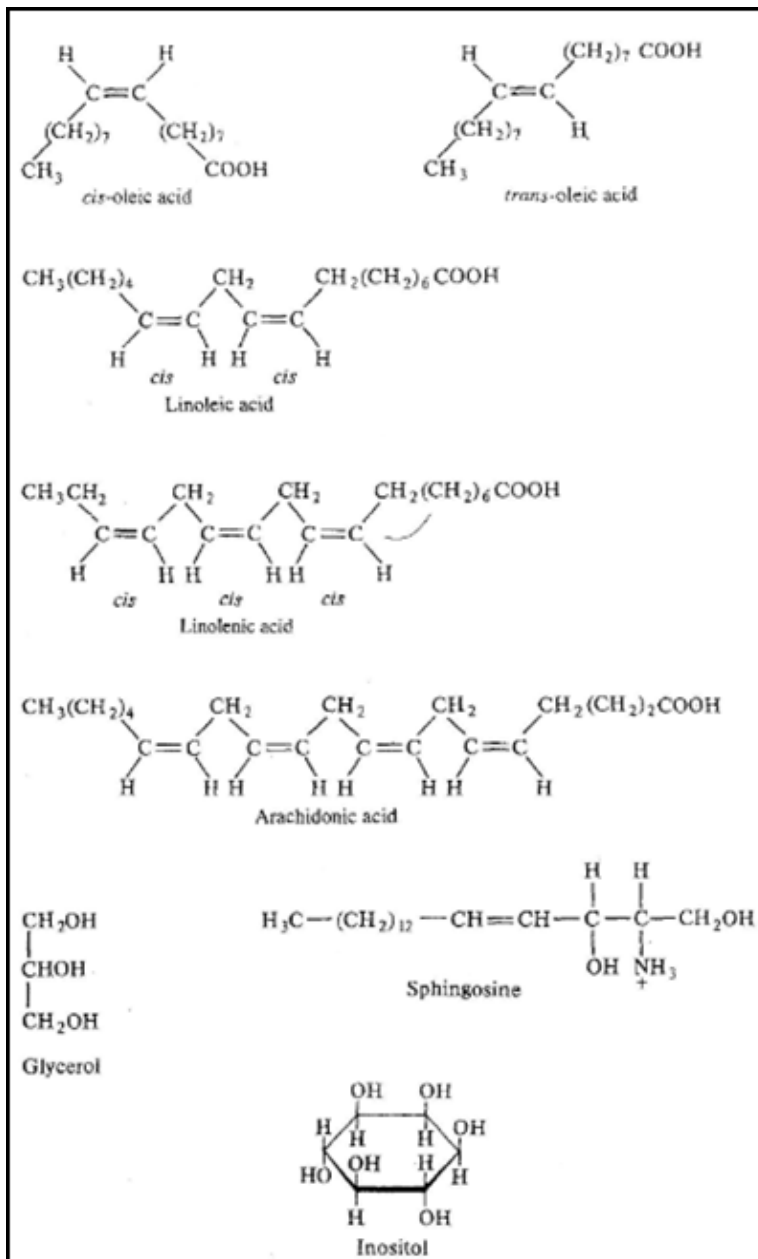
Τα σημαντικότερα συστατικά των βιολογικών μεμβρανών είναι τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες. Οι περισσότερες μεμβράνες έχουν 50% ή και περισσότερη πρωτεΐνες. Μερικές πρωτεΐνες είναι χαλαρά συνδεδεμένες με την ε000πιφάνεια των μεμβρανών (εξωτερικές πρωτεΐνες), αλλά οι περισσότερες είναι στενά συνδεδεμένες (εσωτερικές

πρωτεΐνες), μερικώς ενσωματωμένες στη μεμβράνη, τοποθετημένες στο εσωτερικό των μεμβρανών ή μερικές φορές διαπερνώντας τη μεμβράνη. Η υπεροξειδωση λιπιδίων μπορεί επομένως να προκαλέσει βλάβες στις πρωτεΐνες των μεμβρανών όπως και στα λιπίδια.

Τα λιπίδια μεμβρανών είναι αμφίφιλα μόρια, δηλαδή περιέχουν περιοχές υδρογονανθράκων που τείνουν να συγκεντρώνονται μακριά από το νερό, μαζί με πολικά μέρη τα οποία συνδέονται με το νερό (Εικόνες 1 και 2).



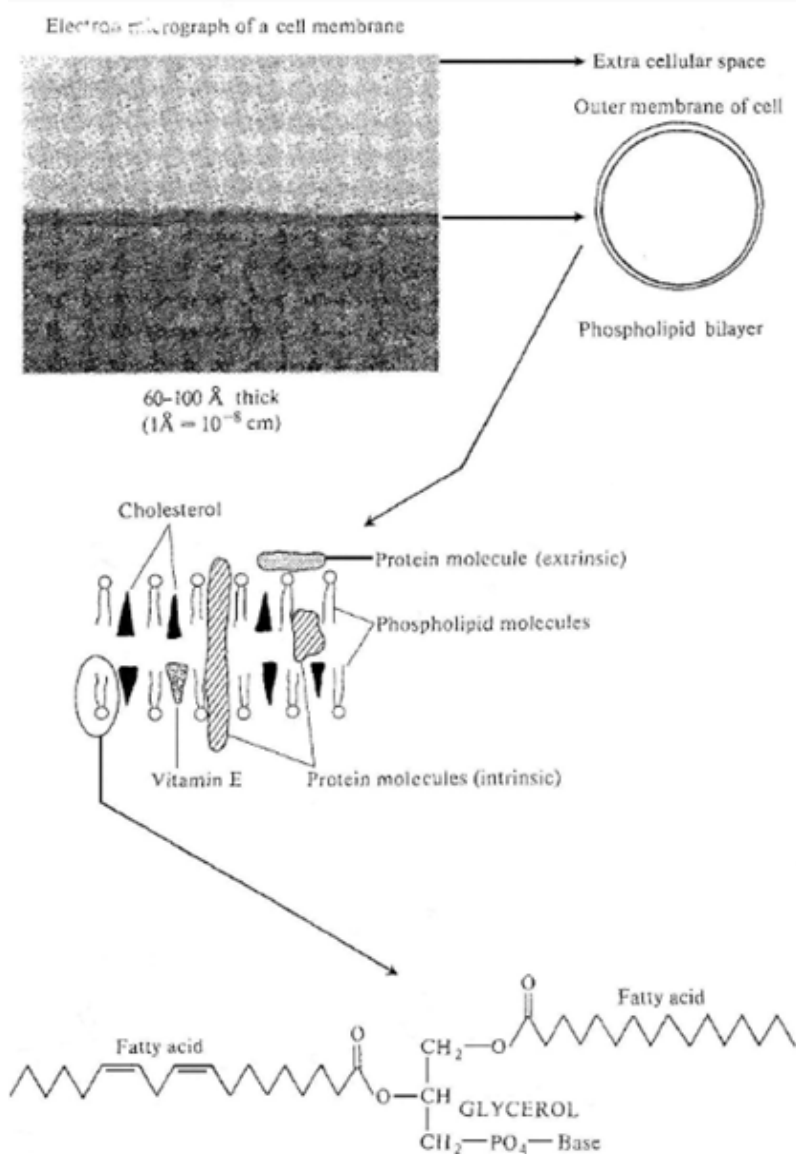
Εικόνα 1. Λιπιδικά μόρια .



Εικόνα 2. Λιπιδικά μόρια .

Δεδομένου ότι, τα μεμβρανικά λιπίδια είναι αμφίφιλα μόρια, όταν εκτίθενται σε νερό τείνουν να συσσωματώνονται με τις υδρόφοβες περιοχές τους ενώ οι υδρόφιλες περιοχές τους έρχονται σε επαφή με το H₂O. Η ακριβής διάταξη εξαρτάται από τα σχετικά ποσά των λιπιδίων και του νερού. Υπάρχουν πολλά στοιχεία που συνηγορούν ότι η λιπιδική διπλοστοιβάδα είναι η βασική δομή όλων των κυτταρικών μεμβρανών, ενώ πρωτεΐνες παρεμβάλλονται σε διάφορες θέσεις της διπλοστοιβάδας (Εικόνα 3). Σε κάθε στοιβάδα της μεμβράνης, τα μόρια της πρωτεΐνης και των λιπιδίων μπορούν να διαχέονται γρήγορα από τη μία άκρη στην άλλη σε μερικά δευτερόλεπτα. Αυτή η

ρευστότητα των μεμβρανών οφείλεται στην παρουσία ακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs), τα οποία χαμηλώνουν το σημείο τήξης στο εσωτερικό των μεμβρανών έτσι ώστε να αποκτήσουν τη χημική φύση και το ιξώδες παρόμοιο ενός λεπτόρευστου ελαίου. Οι βλάβες των PUFAs τείνουν να μειώσουν τη ρευστότητα των μεμβρανών που είναι απαραίτητη για τη σωστή λειτουργία των βιολογικών μεμβρανών. Αντιθέτως, η ανταλλαγή λιπιδικών μορίων μεταξύ των στοιβάδων είναι σπάνια.



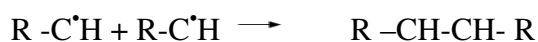
Εικόνα 3. Δομή των μεμβρανών

1.5. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων

Η έναρξη της υπεροξειδωσης λιπιδίων προκαλείται με την αφαίρεση ενός ατόμου υδρογόνου από μια ομάδα μεθυλενίου ($-\text{CH}_2-$). Τα λιπαρά οξέα με έναν ή κανέναν διπλό δεσμό είναι ανθεκτικότερα σε μια τέτοια επίθεση από ό,τι τα PUFAs τα οποία βρίσκονται σε πολλές μεμβράνες και λιποπρωτεΐνες.

Δεδομένου ότι το άτομο υδρογόνου έχει μόνο ένα ηλεκτρόνιο, η αφαίρεση ενός H^\bullet από μια ομάδα $-\text{CH}_2-$ αφήνει πίσω από ένα αζεργάρωτο ηλεκτρόνιο στον άνθρακα ($-\text{C}^\bullet\text{H}-$).

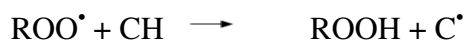
Η ρίζα άνθρακα σταθεροποιείται συνήθως από μια μοριακή αναδιοργάνωση διαμορφώνοντας ένα συζευγμένο διένιο. Οι ρίζες άνθρακα μπορούν να συμμετέχουν σε διάφορες αντιδράσεις όπως π.χ. εάν δύο από αυτές έρθουν σε επαφή μεταξύ τους μέσα σε μία μεμβράνη τότε μπορούν να συνδεθούν μεταξύ τους:



Ωστόσο, υπό αερόβιες συνθήκες οι ρίζες άνθρακα αντιδρούν με το οξυγόνο (O_2), καθώς το O_2 ως υδρόφοβο μόριο συγκεντρώνεται στο εσωτερικό των μεμβρανών. Η αντίδραση με το O_2 δίνει ρίζες περοξυλίου, ROO^\bullet (ή RO_2^\bullet)

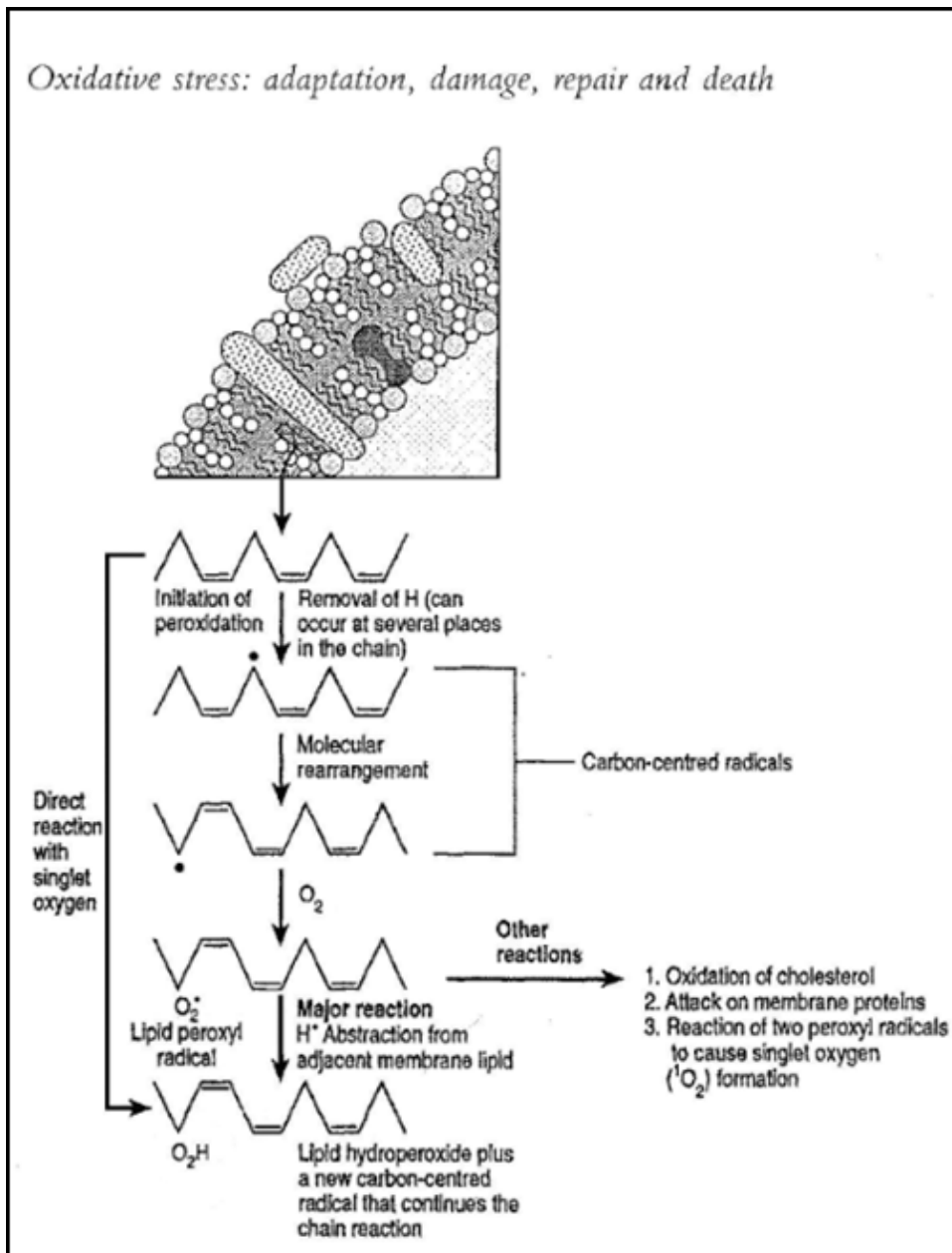


Οι ρίζες περοξυλίου είναι ικανές να αφαιρέσουν ένα H από ένα άλλο γειτονικό λιπιδικό μόριο:



Αυτό είναι το στάδιο διάδοσης της υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Οι ρίζες άνθρακα που σχηματίζονται μπορούν να αντιδράσουν επίσης με O_2 και να δημιουργήσουν νέες ρίζες περοξυλίου και έτσι η αλυσιδωτή αντίδραση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων συνεχίζεται. Η ρίζα περοξυλίου ενώνεται με ένα άτομο υδρογόνου που αποσπά για να δώσει ένα λιπιδικό υδροπεροξείδιο (LOOH). Αυτό μερικές φορές αναφέρεται και ως υπεροξείδιο λιπιδίων, αν και αυτός ο όρος περιλαμβάνει και τα κυκλικά υπεροξείδια.

Έτσι, η έναρξη της υπεροξειδωσης λιπιδίων μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό πολλαπλών μορίων υπεροξειδωσης, ως αποτέλεσμα της αλυσιδωτής αντίδρασης. Επίσης, η αφαίρεση ενός H^\bullet από ένα PUFA μπορεί να συμβεί σε διαφορετικά σημεία της αλυσίδας του άνθρακα (Εικόνα 4).

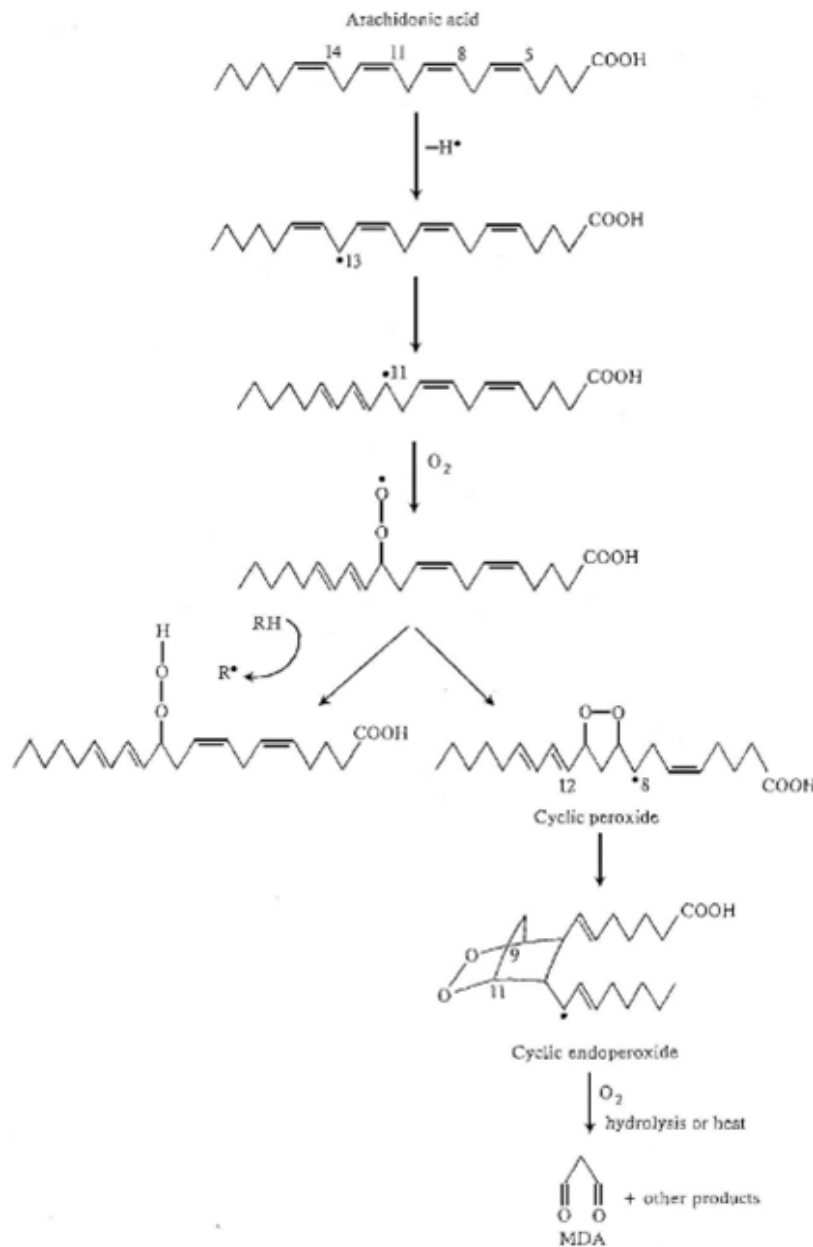


Εικόνα 4. Έναρξη και διάδοση της υπεροξειδωσης λιπιδίων .

1.6. Η μαλονική διαλδεΰδη

Η μαλονική διαλδεΰδη (malondialdehyde, MDA) ήταν για πολλά χρόνια το επίκεντρο της έρευνας στην υπεροξειδωση των λιπιδίων διότι η δοκιμή του θειοβαρβιτουρικού οξέος (thiobarbituric acid test, TBA test), η πιο κοινή ανάλυση (assay) της υπεροξειδωσης λιπιδίων in vitro, θεωρούνταν ότι μετράει την ελεύθερη MDA. Στην πραγματικότητα όμως, η MDA σχηματίζεται μόνο σε μικρές ποσότητες κατά τη διάρκεια της υπεροξειδωσης των περισσότερων λιπιδίων (Εικόνα 5).

Η MDA προκύπτει κατά ένα μεγάλο μέρος από την υπεροξειδωση των PUFAs με περισσότερους από δύο διπλούς δεσμούς. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η MDA προσβάλλει τις πρωτεΐνες ενώ επίσης αντιδρά με βάσεις (γουανίνη και η αδενίνη) του DNA και θεωρείται πιθανό ότι μπορεί να προκαλέσει μεταλλάξεις (Τσίτση Θεονίτσα, 2011).



Εικόνα 5. Σχηματισμός της MDA κατά την υπεροξειδωση των λιπιδίων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΟΙ ΦΥΤΟΠΑΡΑΣΙΤΙΚΟΙ ΝΗΜΑΤΩΔΕΙΣ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *Meloidogyne*

2.1. Γενικά για τους νηματώδεις.

Οι νηματώδεις σκώληκες ανήκουν στο Ζωικό Βασίλειο, Υποβασίλειο: Metazoa, Φύλο: Nemata. Αποτελούν την δεύτερη πολυπληθέστερη ομάδα των Μεταζώων. Είναι πολύ διαδεδομένοι λόγω τις προσαρμοστικότητάς τους που τους επιτρέπει να ζουν σε κάθε περιβάλλον, όπως λίμνες, ποτάμια, στην έρημο και σε καλλιεργούμενα και μη εδάφη. Η λέξη «νηματώδεις» προήλθε από την ελληνική λέξη νήμα, χρησιμοποιήθηκε αρχικά ως επιθετικός προσδιορισμός στο ουσιαστικό σκώληκες, για να προσδιορίσει εκείνα τους σκώληκες που είναι λεπτοί σαν νήματα. Στη συνέχεια το ουσιαστικό «σκώληκες» εγκαταλείφθηκε καθώς βρέθηκε ότι τα ζώα αυτά διαφέρουν από τους πραγματικούς σκώληκες και διατηρήθηκε το επίθετο «νηματώδεις» το οποίο ουσιαστικοποιήθηκε. Η ρίζα της λέξης «νήμα» χρησιμοποιείται για την δημιουργία σύνθετων λέξεων, όπως νηματοκτόνο, νηματολόγος, Νηματολογία κλπ. Σε πολλές περιπτώσεις, ως ρίζα των παραπάνω λέξεων χρησιμοποιείται λανθασμένα ο όρος «νηματώδ-» και παρατηρούμε τη χρήση λέξεων όπως νηματωδοκτόνο, νηματωδολόγος, Νηματωδολογία κλπ, οι οποίες και έχουν παραδόξως επικρατήσει.

Οι νηματώδεις είναι γνωστοί από αρχαιοτάτων χρόνων και έχουν γίνει αναφορές σε αιγυπτιακές επιγραφές για αυτά τα ζωικά παράσιτα που μπορούν να προσβάλλουν και των άνθρωπο. Όμως οι φυτοпараσιτικοί νηματώδεις ήταν άγνωστοι ως τον 18^ο αιώνα λόγω του πολύ μικρού μεγέθους και του τρόπου διαβίωσής τους σε κάθε περιβάλλον. Ο Needham το 1743, παρατήρησε ότι οι νηματώδεις μπορούν να προσβάλλουν και τα φυτά, όπως ο νηματώδεις του σίτου *Anguinatritici* και από τότε ακολούθησαν πολλές έρευνες για αυτά τα παράσιτα και την καταπολέμησή τους.

Οι νηματώδεις μπορούν να προσβάλλουν κάθε ζωντανό οργανισμό, και μπορούν να προκαλούν σοβαρές ασθένειες. Οι δε φυτοпараσιτικοί νηματώδεις μπορούν να προσβάλλουν όλες τις οικογένειες καλλιεργούμενων και άγριων φυτών, προκαλώντας μείωση τις απόδοσης και υποβάθμιση της ποιότητας. Οι φυτοпараσιτικοί νηματώδεις μπορούν να προκαλέσουν σε μια καλλιέργεια ολοκληρωτική καταστροφή, αλλά και απλά να προσβάλλουν ένα τμήμα τις καλλιέργειας. Οι πιο σοβαρές προσβολές δημιουργούνται από τους κομβονηματώδεις του γένους *Meloidogyne* και από τους κυστογόνους νηματώδεις που ανήκουν στα γένη *Heterodera* και *Globodera*.

Οι φυτοпараσιτικοί νηματώδεις περνούν τουλάχιστον ένα στάδιο του βιολογικού κύκλου μέσα στο έδαφος γύρω ή μέσα στο ριζικό σύστημα και ο αριθμός τους

αυξάνεται υπερβολικά. Έχει αναφερθεί ότι μπορούν να μετρηθούν σε ένα κυβικό εκατοστό του εδάφους 5-100 άτομα. Φυσικά δεν είναι όλοι οι νηματώδεις που ζουν στο έδαφος επιβλαβείς, αλλά μόνο ένα μικρό ποσοστό έχει φυτοπαρασιτική δράση. Υπάρχουν αρκετά είδη που είναι ωφέλιμα και τρέφονται με ακάρεα, έντομα, φυτοπαρασιτικούς νηματώδεις, μύκητες και βακτήρια και βοηθούν έτσι στην αύξηση της γονιμότητας του εδάφους και την διατήρηση των φυτών (Needham, T. 1743).

2.2. Οι νηματώδεις του γένους *Meloidogyne*

Οι νηματώδεις του γένους *Meloidogyne* είναι μια μικρή ομάδα φυτοπαρασίτων που προκαλούν μεγάλες καταστροφές. Είναι διασκορπισμένοι σε όλο τον κόσμο και έχουν μεγάλο αριθμό ξενιστών: περίπου 2000 καλλιεργημένα και μη φυτικά είδη. Ο Berkeley (1855) αναφέρει για πρώτη φορά προσβολή σε φυτό από το γένος *Meloidogyne* σε ρίζες φυτού αγγουριάς. Από τότε έχουν γίνει πολλές περιγραφές και για πολλά είδη *Meloidogyne*. Δέκα είδη θεωρούνται επιζήμια για την γεωργία και 4 από αυτά αποτελούν πολύ σοβαρούς ζωικούς εχθρούς (Berkeley M.J. 1855).

2.3. Συστηματική κατάταξη

Σήμερα το γένος *Meloidogyne* κατατάσσεται στην τάξη: Tylenchida. Υπόταξη: Tylenchina. Υπεροικογένεια: Tylenchoidea. Οικογένεια: Heteroderidae.

2.4. Βιολογικός Κύκλος

Οι νηματώδεις *Meloidogyne*, όπως όλοι οι νηματώδεις, έχουν βιολογικό κύκλο που αποτελείται από έξι στάδια (ωά, προνύμφες 1^{ου}, 2^{ου}, 3^{ου} & 4^{ου} σταδίου και ακμαία). Τα αυγά διαχειμάζουν είτε μέσα σε ένα ζελατινώδη ωόσακκο ή ελεύθερα στο έδαφος και μπορεί να επιζήσουν 4 έως 8 χρόνια. Μέσα στα ωά λαμβάνει χώρα μία έκδυση (αποδερμάτωση) και προκύπτει η προνύμφη 1^{ου} σταδίου, οπότε μετά την εκκόλαψη του ωού προκύπτουν οι προνύμφες 2^{ου} σταδίου (J2), οι οποίες είναι η μορφή που προκαλεί τη μόλυνση των ριζών. Για τη μόλυνση, και μετακίνηση των προνυμφών χρειάζεται ροή νερού στο έδαφος. Οι προνύμφες J2 αρχίζουν ένα εκτοπαρασιτικό στάδιο ζωής, και 2-5 ημέρες αργότερα εισέρχονται στις ρίζες, όπου αρχίζουν να τρέφονται. Ακολουθούν δύο ακόμη εκδύσεις. Η τελευταία έκδυση οδηγεί σε ενήλικα αρσενικά (τα οποία αφήνουν τον ριζικό ιστό) ή θηλυκά, των οποίων το ουραίο τμήμα εξέρχεται από τη ρίζα. Μετά από το ζευγάρωμα, τα αρσενικά πεθαίνουν, τα θηλυκά συνεχίζουν τη ζωή τους στα φυμάτια που έχουν δημιουργήσει στις ρίζες. Η σωματική τους μάζα μετασχηματίζεται, καθώς τα ωά για να αναπτυχθούν χρησιμοποιούν τα εσωτερικά όργανα των θηλυκών. Με την

ολοκλήρωση του βιολογικού τους κύκλου τα ωά που εναποτίθενται συγκεντρώνονται μέσα σε ένα ζελατινώδη ωόσακκο, ο οποίος τα προστατεύει από τις αντίξοες συνθήκες (Κύρου, Ν.Χ. 2004).

Τα προνυμφικά στάδια ονομάζονται και ατελή, γιατί έχουν όλα τα όργανά τους ανεπτυγμένα εκτός απ' το αναπαραγωγικό σύστημα, το οποίο υπάρχει υποτυπωδώς και εξελίσσεται κατά τη διάρκεια των τεσσάρων προνυμφικών σταδίων. Το χρονικό διάστημα που χρειάζεται για τη συμπλήρωση του βιολογικού τους κύκλου κυμαίνεται συνήθως από 15 έως 50 ημέρες και εξαρτάται από το είδος του κάθε νηματώδη και από τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Για την επιβίωση και δραστηριοποίησή τους απαιτούνται ορισμένες ευνοϊκές συνθήκες θερμοκρασίας, αερισμού, εδαφικού τύπου, σχετικής εδαφικής υγρασίας καθώς και παρουσία κατάλληλου ξενιστή. Μεγάλη σημασία έχει και η παρουσία επαρκούς νερού και οξυγόνου, με ιδανικότερες συνθήκες: εδαφική υγρασία 50 – 70 %, θερμοκρασία 10 – 30°C, εδαφική οξύτητα pH5 – 8 και έδαφος μέσης σύστασης (Κολιοπάνος, Κ.Ν. 1999).

2.5. Παθογένεια

Οι νηματώδεις του γένους *Meloidogyne* είναι το πιο γνωστό και ευρέως διαδεδομένο γένος νηματωδών. Τα δύο κύρια χαρακτηριστικά της προσβολής τους σε ρίζες φυτών είναι: α) η δημιουργία των κοινοκυττάρων στον αγγειώδη ιστό και β) ο σχηματισμός χαρακτηριστικών εξογκωμάτων στις ρίζες και στα υπόγεια μέρη του φυτού (φυμάτια). Αυτό έχει ως συνέπεια τη μείωση της παραγωγής και υποβάθμιση της ποιότητας του προϊόντος (Κολιοπάνος, Κ.Ν. 1999).

Τα κοινοκύτταρα δημιουργούνται από τις οισοφαγικές εκκρίσεις των νηματωδών και εμφανίζουν έντονες διαφορές από τα γειτονικά τους υγιή κύτταρα. Είναι πολυπύρηνια με διογκωμένα κυτταρικά τοιχώματα και διατηρούνται ζωντανά όσο οι νηματώδεις τρέφονται σε αυτά. Αν θανατωθεί ο νηματώδης ακολουθεί και η νέκρωσή τους. Σχηματίζονται συνήθως μέσα στα φυμάτια και η ύπαρξή τους είναι αναγκαία για την ανάπτυξη και αναπαραγωγή των νηματωδών, σε αντίθεση με τα φυμάτια. Οι σοβαρές ανατομικές μεταβολές, που προκαλούν στους φυτικούς ιστούς, οδηγούν σε δυσλειτουργία του αγγειακού κυλίνδρου (Bird, A.F. 1962).

Τα φυμάτια ποικίλουν ως προς το μέγεθος και το σχήμα τους, γεγονός, που εξαρτάται από την ευαισθησία του ξενιστή αλλά και από το μέγεθος του πληθυσμού, και εκδηλώνονται σε μεγαλύτερο βαθμό, όταν επικρατούν συνθήκες υγρασίας και χαμηλής γονιμότητας εδάφους. Μέσα στα φυμάτια είναι ενσωματωμένα τα θηλυκά

άτομα, ο αριθμός των οποίων εξαρτάται από το είδος του νηματώδους και του ξενιστή. Σε περίπτωση σοβαρής προσβολής, τα φυμάτια μπορεί να καλύψουν ολόκληρο το ριζικό σύστημα, παραμορφώνοντάς το.

Όσες προνύμφες έχουν εισέρθει στους ιστούς, θα παραμείνουν σ' αυτούς, για να αναπτυχθούν, όσο υπάρχει διαθέσιμη τροφή. Όταν η τροφή τελειώσει, οι προνύμφες αποχωρούν προς εύρεση νέου σημείου παρασιτισμού ή άλλον ξενιστή (Κύρου, Ν.Χ. 2004).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ: Η ΤΟΜΑΤΑ *Lycopersicon esculentum* Mill.

3.1. Γενικά για την τομάτα

Επιστημονικό όνομα : *Lycopersicon esculentum* Mill.

Οικογένεια: Solanaceae.

Η καλλιέργεια της τομάτας ξεκίνησε στο Μεξικό και το όνομα τομάτα προήλθε από την ινδιάνικη γλώσσα. Από το Μεξικό εξαπλώθηκε σε όλο τον κόσμο. Περίπου 450 χρόνια μετά, έγινε η εισαγωγή της στην Ευρώπη, αλλά για μεγάλο χρονικό διάστημα υπήρχε η αντίληψη ότι ήταν δηλητηριώδης και ότι δεν τρώγονταν.

Είναι κατά κανόνα ετήσιο φυτό, αρκετά διαδεδομένο και δημοφιλές. Καλλιεργείται για τον καρπό της, ο οποίος καταναλώνεται ώριμος, νωπός, αποξηραμένος, ακέραιος ή σε πολτό. Η καλλιέργειά της εκτείνεται από τις τροπικές περιοχές μέχρι τον αρκτικό κύκλο (όπου η θερμοκρασία το επιτρέπει). Καλλιεργείται στην ύπαιθρο ή σε θερμοκήπια (εκτός εποχής).

Η τομάτα είναι το πλέον διαδεδομένο καλλιεργούμενο λαχανικό στον κόσμο και το δέκατο στο σύνολο όλων των βρώσιμων καλλιεργούμενων φυτών.

Οι χώρες με την μεγαλύτερη παραγωγή τομάτας στον κόσμο είναι η Αμερική, η Ιταλία, η Κίνα, η Τουρκία, η Ισπανία, η Ελλάδα και η Αίγυπτος. Το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής προέρχεται από υπαίθριες καλλιέργειες. Ένα σημαντικό όμως μέρος της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής προέρχεται από θερμοκηπιακές καλλιέργειες.

Στην Ελλάδα η τομάτα καταλαμβάνει την πρώτη θέση ανάμεσα σε όλα τα καλλιεργούμενα λαχανικά, τόσο σε έκταση αλλά και σε παραγωγή. Όπως σε όλες σχεδόν τις μεσογειακές χώρες το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής τομάτας προέρχεται από υπαίθριες καλλιέργειες.

Από το σύνολο της καλλιεργούμενης έκτασης στην Ελλάδα για παραγωγή νωπών καρπών τομάτας, το 8-10% περίπου αφορά θερμοκηπιακές καλλιέργειες.

3.2. Μορφές καλλιέργειας

Εκτατική: Μεγάλες εκτάσεις σε γραμμική καλλιέργεια πλήρως μηχανοποιημένη.

Εντατική: Καλλιέργεια σε θερμοκήπια, συγκομιδή με το χέρι.

Τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει και στη χώρα μας, σε μικρή έκταση, η καλλιέργεια της τομάτας σε αδρανή υποστρώματα ή NFT.

3.3. Το γένος *Lycopersicon*

Το γένος *Lycopersicon* είναι ένα σχετικά μικρό γένος της οικογένειας Solanaceae. Η καλλιεργούμενη τομάτα αναφέρεται ως *Lycopersicon esculentum*.

Οι καρποί από διάφορα συγγενή είδη του γένους *Lycopersicon* (*L. pimpinellifolium*, *L. hirsutum*, *L. chilense*, *L. lycopersicoidew*, *L. peruvianum*, *L. pennellii*etc.) δεν τρώγονται αλλά αυτά τα είδη αποτελούν δεξαμενή γονιδίων για βελτίωση (ειδικά για αντίσταση σε εχθρούς και ασθένειες) των καλλιεργούμενων ποικιλιών. Το *L. esculentum* και οι στενοί συγγενείς, είναι αυτογονιμοποιούμενα είδη.

Σταυρογονιμοποιούνται στις περιοχές που αυτοφύονται και σε μερικές άλλες περιοχές άλλα σε άλλα μέρη αυτογονιμοποιούνται πλήρως.

Αντίθετα τα άλλα είδη του γένους *Lycopersicon* είναι αυτόστειρα και άρα σταυρογονιμοποιούνται πλήρως με διάφορα είδη μελισσών.

Η τομάτα μπορεί να διασταυρωθεί με μικρή ή μεγάλη δυσκολία με τα άλλα είδη του γένους και να δημιουργήσει υβρίδια (ΧΡΙΣΤΟΣ Μ. ΟΛΥΜΠΙΟΥ).

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ (ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εκτιμήσουμε αν η προσβολή της τοματιάς (*Lycopersicon esculentum* Mill var. *Belladonna*) από νηματώδεις (*Meloidogyne*) προκαλεί μεταβολές στο οξειδωτικό στρες στα φύλλα του φυτού. Για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες χρησιμοποιήθηκαν: α) η υπεροξειδωση των λιπιδίων που είναι ένας πολύ καλός δείκτης κυτταρικών βλαβών και β) η δραστικότητα της καταλάσης που είναι ένα από τα βασικά ένζυμα της αντιοξειδωτικής άμυνας του κυττάρου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1. Καλλιέργεια του φυτού και προσβολή από τους νηματώδεις

- Νηματώδεις *Meloidogyne* sp. (προνύμφες 2^{ου} σταδίου, από καλλιέργεια που διατηρείται στο Εργαστήριο Φυτοπροστασίας & Φαρμακολογίας του ΤΕΙ Δυτικής Ελλάδας)
- Σπορόφυτα τομάτας (ΣΠΥΡΟΥ ΑΕΒΕ)
- Διαφανή πλαστικά ποτήρια 300 ml
- Αποστειρωμένο φυτόχωμα εμπορίου

Διαδικασία

Σπορόφυτα τομάτας ηλικίας πέντε εβδομάδων μεταφυτεύτηκαν σε αποστειρωμένο φυτόχωμα, σε πλαστικά ποτήρια, χωρητικότητας 300ml. Πλησίον της ρίζας κάθε σποροφύτου τοποθετήθηκε ο κατάλληλος αριθμός προνύμφων 2^{ου} σταδίου του φυτοпараσιτικού νηματώδη *Meloidogyne* sp., ανάλογα με το επιθυμητό επίπεδο μόλυνσης (0-μάρτυρας, 1000, 3000 και 9000 άτομα).

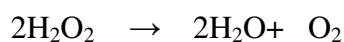
Τα μολυσμένα φυτά τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών στους 25°C, 80% υγρασία για έξι εβδομάδες (μέχρι την εμφάνιση των πρώτων ωόσακων του νηματώδη πάνω στο ριζικό σύστημα των φυτών).

5.2. Προσδιορισμός της δραστηριότητας της καταλάσης

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου **καταλάση (catalase)** γίνεται με τη μέτρηση της κατανάλωσης του H_2O_2 στα 240 nm ή εναλλακτικά όπως κάναμε εμείς στο πείραμά μας στα 253 nm.

Η αρχή της μεθόδου

Η καταλάση καταλύει τη διάσπαση του H_2O_2 προς H_2O και O_2



Η διάσπαση του H_2O_2 συνοδεύεται από τη μείωση της απορρόφησης στο υπεριώδες φάσμα και πιο συγκεκριμένα στα 240 nm. Η διαφορά στην απορρόφηση (ΔA_{240}) ανά μονάδα χρόνου είναι ένα μέτρο της δραστηριότητας της καταλάσης (Aebi, 1984). Όμως, ως μέτρο της συγκέντρωσης του H_2O_2 μπορεί να χρησιμοποιηθεί η οπτική απορρόφηση σε οποιοδήποτε μήκος κύματος σε αυτήν την περιοχή του φάσματος, δεδομένου ότι η απορρόφηση αυξάνεται αναλογικά με τη συγκέντρωση της ουσίας, σύμφωνα με το νόμο Beer-Lambert. Τα προϊόντα της αντίδρασης, οξυγόνο και νερό, δεν απορροφούν σε αυτήν την περιοχή του φάσματος. Αν η ενζυμική δοκιμή περιέχει άλλα συστατικά τα οποία απορροφούν στο υπεριώδες, το σφάλμα στη μέτρηση μπορεί να ελαχιστοποιηθεί με τη χρήση μήκους κύματος στο οποίο η απορρόφηση αυτών των συστατικών θα είναι η μικρότερη δυνατή. Η ύπαρξη ενός συστατικού το οποίο παρεμβαίνει στη μέτρηση μπορεί να αποκαλυφθεί από την αύξηση της αρχικής απορρόφησης κατά την ενζυμική δοκιμή.

Για να αποφευχθεί, κατά την διάρκεια της ενζυμικής δοκιμής, ο σχηματισμός φυσαλίδων στην κυψελίδα λόγω της απελευθέρωσης του O_2 (Beers and Sizer, 1952), είναι απαραίτητο να χρησιμοποιήσουμε μια σχετικά χαμηλή συγκέντρωση H_2O_2 (μέχρι 10 mM). Η συγκέντρωση του H_2O_2 είναι καθοριστική δεδομένου ότι υπάρχει άμεση αναλογία μεταξύ της συγκέντρωσης του υποστρώματος και το ρυθμό διάσπασής του. Η επίδραση της θερμοκρασίας στο ρυθμό της διάσπασης του H_2O_2 είναι μικρή κι έτσι οι μετρήσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν από 0° έως 37°C. Η καμπύλη δραστηριότητας του pH διαθέτει ένα αρκετά ευρύ βέλτιστο (pH 6,8-7,5) γι' αυτό και οι μετρήσεις συνήθως γίνονται σε pH 7,0 (Aebi, 1984).

Υλικά της μεθόδου

- Ρυθμιστικό διάλυμα 100 mM Na_2HPO_4 pH 7,0, 1 mM EDTA, 0,5 mM PMSF διαλυμένο σε αιθανόλη τελικής συγκέντρωσης 0,3% (v/v): Το διάλυμα δεν πρέπει να περιέχει τον συνήθη αντιοξειδωτή BHA, διότι παρεμβάλλεται στη μέθοδο. Το

διάλυμα χρησιμοποιείται για την ομογενοποίηση αλλά και για την αραίωση του ομογενοποιήματος (για τα φύλλα του φυτού, η ομογενοποίηση γίνεται σε χαμηλή ένταση φωτισμού, σε αναλογία 1gr : 5ml, με όλα τα υλικά παγωμένα).

- H_2O_2 4,5 mM (συγκέντρωση στην κυβέτα, διάλυμα φρέσκο): Αναμειγνύονται 92 μl πυκνού H_2O_2 (9,8 M) με 908 μl ρυθμιστικό διάλυμα (δ/μα 1). Το διάλυμα που προκύπτει έχει συγκέντρωση 900 mM. Από αυτό κάνουμε αραίωση 10 φορές δηλαδή 100 μl με 900 μl ρυθμιστικό διάλυμα (δ/μα 1). 100 μl από αυτό το διάλυμα σε 1 ml τελικό όγκο αντίδρασης δίνουν τελική συγκέντρωση H_2O_2 9 mM που αντιστοιχεί σε απορρόφηση A_{240nm} 0,400 ή A_{253nm} 0,200.

Πορεία της μεθόδου

1) Ζυγίζω 0,500 gr φύλλο (χωρίς κεντρικό νεύρο) και ομογενοποιώ με 5 ml buffer στους $0^\circ C$

2) Φυγοκεντρώ το ομογενοποίημα στις 13400 rpm για 15 min στους $4^\circ C$

3) Συλλέγω το υπερκείμενο (σε αυτό κάνουμε και την ποσοτικοποίηση των ολικών πρωτεϊνών) σε καθαρό σωλήνα και ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιώ το πυκνό ή κάνω 10 φορές αραίωση δηλαδή 150 μl ομογενοποίημα και 1350 μl buffer.

Κατασκευάζω σωληνάκια όπως περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα:

Υλικά	Δείγμα (μl)
Δείγμα ολικό σε buffer	900
Ισορροπία στους $30^\circ C$ και μετά προσθέτω H_2O_2	
Διάλυμα H_2O_2	100
Μετρίεται η κλίση στα 253 nm (Μηδενίζω με buffer ενώ οι ρυθμίσεις του οργάνου είναι: Lagtime 10 sec, Ratetime 30 sec, ολοκλήρωση μέτρησης στα 100 sec)	

Προσδιορίζεται η κλίση της αντίδρασης σε χρονικό διάστημα 30 sec (ratetime) ενώ για το ίδιο δείγμα γίνεται τουλάχιστον 3 φορές (μέσα σε 100 sec), ώστε να επιβεβαιωθεί ότι η τιμή της κλίσης σταθεροποιείται στην ίδια τιμή (μετά από τα 100 sec η κλίση θα αρχίσει να μειώνεται λόγω της κατανάλωσης του H_2O_2). Η κλίση εκφράζεται ανά λεπτό και μετατρέπεται σε units ενζύμου με τη χρήση πρότυπης καμπύλης που κατασκευάζεται με καθαρή καταλάση (Sigma). Η τελική έκφραση της

δραστικότητας γίνεται σε **units CAT/ml** ή **units CAT/mg πρωτεΐνης του υπερκειμένου** (που έχει προσδιοριστεί με τη μέθοδο Coomassie Brilliant Blue) (Blum and Fridovich, 1983).

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης της δραστηριότητας καταλάσης

Παρασκευή πρότυπου διαλύματος καταλάσης από ήπαρ βοδιού (SIGMA) 1 unit/ml (σε buffer) και μετά αραιώνω 10 φορές ώστε να έχω 1 unit/10 μl

Ετοιμάζω τα δείγματα σύμφωνα με τον παραπάνω Πίνακα.

Τα δείγματα είναι 20, 40, 60 μl αραιού διαλύματος καταλάσης (2, 4, 6 units, αντιστοίχως) και συμπληρώνονται με buffer μέχρι τα 900 μl.

Οι μετρήσεις που πήραμε φαίνονται στον παρακάτω Πίνακα

	Δείγμα	A _{initial}	ΔA/mi n
1	2 units	0,2227	-0,0359
2	4 units	0,1969	-0,0652
3	6 units	0,2114	-0,1013

5.3. Προσδιορισμός της υπεροξειδωσής των λιπιδίων (TBARS)

Η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση, σε υψηλή θερμοκρασία, του θειοβαρβιτουρικού οξέος (thiobarbituric acid, TBA) με τη μαλονική διαλδεύδη (malondialdehyde, MDA) η οποία είναι παράγωγο της υπεροξειδωσής των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Poly Unsaturated Fatty Acids, PUFAs) που περιέχουν περισσότερους από δύο διπλούς δεσμούς. Επειδή, εκτός από την MDA υπάρχουν και άλλα αλδευδικά παράγωγα υπεροξειδωσής στο κύτταρο που μπορεί να αντιδράσουν με το TBA, η μέθοδος χαρακτηρίζεται ως μη εξειδικευμένη και υπολογίζει το σύνολο των ουσιών αυτών που εν συντομία καλούνται ουσίες αντιδρούσες με θειοβαρβιτουρικό οξύ (ThioBarbituric Acid Reactive Substances, TBARS).

Η μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε είναι παραλλαγή του TBA test που έχει χρησιμοποιηθεί τόσο σε φυτικούς όσο και ζωικούς ιστούς (Buege and Aust, 1978).

Υλικά της μεθόδου:

1. Ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Na₂HPO₄·2H₂O pH 7,2, 1 mM EDTA, 1 mM BHA, 0,15% (v/v) ethanol: Το διάλυμα χρησιμοποιείται για την ομογενοποίηση αλλά και για την αραιώση του ομογενοποιημένου. Ομογενοποιούμε σε αναλογία 1 gr : 5

ml, διατηρώντας όλα τα υλικά παγωμένα, και παίρνουμε το ολικό ομογενοποίηση (χωρίς φυγοκέντρηση).

2. 50% TCA: Διαλύονται 10 g TCA σε τελικό όγκο 20 ml.

3. HCl (37%) 12,07 N

4. Διαλύτης TBA: Για 15 ml διαλύματος σύστασης 20% TCA, 0,33 N HCl, αναμειγνύονται 8,59 ml ddH₂O, 6 ml 50% TCA (εναλλακτικά, το TCA μπορεί να προστεθεί σε στερεή μορφή μέσα στο διάλυμα), 410 μl HCl 12,08 N.

5. Αντιδραστήριο TBA: Για 15 ml διαλύματος σύστασης 20% TCA, 0,33 N HCl, 0,5% TBA αναμειγνύονται 8.59 ml ddH₂O, 6 ml 50% TCA (εναλλακτικά, το TCA μπορεί να προστεθεί σε στερεή μορφή μέσα στο διάλυμα), 410 μl HCl 12,08 N. Στη συνέχεια προστίθενται 0,075 g TBA (MB:144,1) και το διάλυμα αναδεύεται μέχρι πλήρους διάλυσης του στερεού.

6. 2% (w/v) BHA (butyl-hydroxyanisole) σε απόλυτη αιθανόλη: Διαλύονται 0,02 g BHA (MB:180,2) σε 1 ml απόλυτη αιθανόλη.

7. Βουτανόλη-1 (butanol-1) ή εναλλακτικά ισοβουτανόλη (isobutanol)

A. Για τη μέτρηση απορρόφησης:

Διαλύματα (μl)	Τυφλό Αντιδραστηρίων	Δείγμα	Τυφλά Δείγματα
Ομογενοποίηση	–	375	375
Ρυθμιστικό διάλυμα Ομογενοποίησης	375	–	–
Διαλύτης TBA	–	–	375
Αντιδραστήριο TBA	375	375	–
2% BHA	5	5	5
Επώαση για 15 min στους 85°C			
butanol		800	
Έντονο vortex και φυγοκέντρηση για διαχωρισμό των φάσεων			
Μετράται η απορρόφηση της βουτανολικής φάσης στα 535 nm (και στα 600 nm για να αφαιρέσω την απορρόφηση που προκαλεί η θολότητα του δείγματος). Μηδενίζω με βουτανόλη.			

Από την (καθαρή) τιμή του δείγματος αφαιρούνται οι (καθαρές) τιμές του τυφλού των αντιδραστηρίων και του τυφλού δείγματος και η τελική τιμή μετατρέπεται σε ισοδύναμα MDA (με συντελεστή απόσβεσης $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Συνήθως η

αντίδραση πραγματοποιείται για διάφορες αραιώσεις του δείγματος, ώστε να επιβεβαιώνεται η τιμή στις διάφορες αναλογίες. Το τελικό αποτέλεσμα εκφράζεται συνήθως ως ισοδύναμα nmoles MDA/gr ξηρού βάρους ή nmoles MDA/mg ολικής πρωτεΐνης του ιστού (ποσοτικοποιείται με την μέθοδο του Coomassie Brilliant Blue).

5.4. Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Η μέθοδος εφαρμόζεται σε περιπτώσεις που το ομογενοποίημα είναι άφθονο σε πρωτεΐνη και βασίζεται στην ηλεκτροστατικής φύσης αντίδραση των πρωτεϊνών με το αντιδραστήριο Coomassie Brilliant Blue G-250 (Assimakopoulos et al., 2008).

Υλικά της μεθόδου:

1. Το διάλυμα ομογενοποίησης για τα TBARS: χρησιμοποιείται για την αραιώση του ομογενοποιημάτος.

2. Διάλυμα Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB): Φτιάχνεται διάλυμα 0,033% CBB (w/v) σε 0,5 N HCl. Αναμειγνύονται 240 ml απεσταγμένο νερό (ddH₂O) και 10 ml πυκνό HCl (12,07 N) προσθέτοντας αργά και προσεκτικά (σε απαγωγό) το πυκνό HCl στο νερό. Χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή, επειδή η διάλυση είναι ισχυρά εξώθερμη και αν γίνει γρήγορα μπορεί να συμβούν φαινόμενα απότομης εξάτμισης κατά την οποία σταγονίδια HCl μπορεί να εκτιναχθούν. Στη συνέχεια, προστίθενται 0,0825 g Coomassie Brilliant Blue G-250 (MB 854,0) και αφήνεται το διάλυμα να αναδεύεται για περίπου 30 min. Στη συνέχεια, διηθείται το διάλυμα σε χωνί υπό κενό με χαρτί whatman και μεταγγίζεται σε γυάλινο κλειστό δοχείο προφυλαγμένο από το φως. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

3. 0,5% (w/v) triton-X 100: Αραιώνεται 20 φορές (με ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης) το stock διάλυμα 10% (w/v).

4. HCl 6,035N: Αραιώνεται το πυκνό HCl (12,07 N) 1:1 με ddH₂O.

5. HCl 0,5 N: Αραιώνεται το πυκνό HCl με ddH₂O.

6. Πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης (BSA) συγκέντρωσης 1 mg/ml (σε διάλυμα ομογενοποίησης)

Πορεία της μεθόδου:

Τα αντιδραστήρια προστίθενται σύμφωνα με τον πίνακα:

Διαλύματα	Τυφλό Αντιδραστηρίων	Δείγμα	Τυφλό Δείγματος
Ομογενοποίηση	–	63	63
Ρυθμιστικό διάλυμα Ομογενοποίησης	63	–	–
Triton-X-100 0,5% (w/v)	20		
HCL 6,035 N	17		
Ανάδευση και κατόπιν επώαση για 10 λεπτά στους 85°C. Στην συνέχεια, τα αφήνω να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου.			
HCL 0,5 N	–	–	900
Αντιδραστήριο CBB	900	900	–
Σύντομη υπερήχηση (sonication) και μέτρηση απορρόφησης στα 620 nm. Μηδενίζω με απεσταγμένο νερό και ξεπλένω την κυβέτα με απιονισμένο.			

Από την τιμή του δείγματος αφαιρούνται οι τιμές του τυφλού των αντιδραστηρίων και του τυφλού δείγματος και η καθαρή τιμή μετατρέπεται σε ισοδύναμα αλβουμίνης BSA σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη που είναι ευθυγραμμική από 10 έως 60 μg BSA (αναφέρεται σε 1 ml όγκο αντίδρασης). Συνήθως, η αντίδραση πραγματοποιείται για διάφορες αραιώσεις του δείγματος, ώστε να επιβεβαιώνεται η τιμή στις διάφορες αναλογίες. Το τελικό αποτέλεσμα υπολογίζεται με βάση την πρότυπη καμπύλη και εκφράζεται συνήθως ως mg ολικής πρωτεΐνης (ισοδύναμα BSA)/ml ομογενοποιημένου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΤΟ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

6.1. Η ανάπτυξη των φυτών

Μετά την πάροδο των 3 πρώτων εβδομάδων στις ρίζες ορισμένων φυτών παρατηρήθηκαν οι πρώτοι κόμβοι που οφείλονταν στην προσβολή από τους νηματώδεις (Εικ. 1).



Εικόνα 1. Ριζικό σύστημα σποροφύτου τομάτας, όπου φαίνονται οι κόμβοι που έχουν προκληθεί από τον νηματώδη *Meloidogyne* sp.

Μετά την πάροδο έξι εβδομάδων ολοκληρώθηκε ένας βιολογικός κύκλος του νηματώδη, γεγονός το οποίο επιβεβαιώθηκε από την παρουσία ωόσακων πάνω στο ριζικό σύστημα των φυτών στα σημεία όπου υπήρχαν κόμβοι (Εικ. 2).



Εικόνα 2. Ρίζα φυτού τομάτας προσβεβλημένη από νηματώδεις *Meloidogyne* sp. Στην εικόνα διακρίνονται οι κόμβοι και οι καφέ ωόσακοι.

Τα φυτά παρουσίαζαν ορατές διαφορές τόσο στην ανάπτυξή τους όσο και στα επίπεδα προσβολής των ριζών (Εικ. 3, 4).



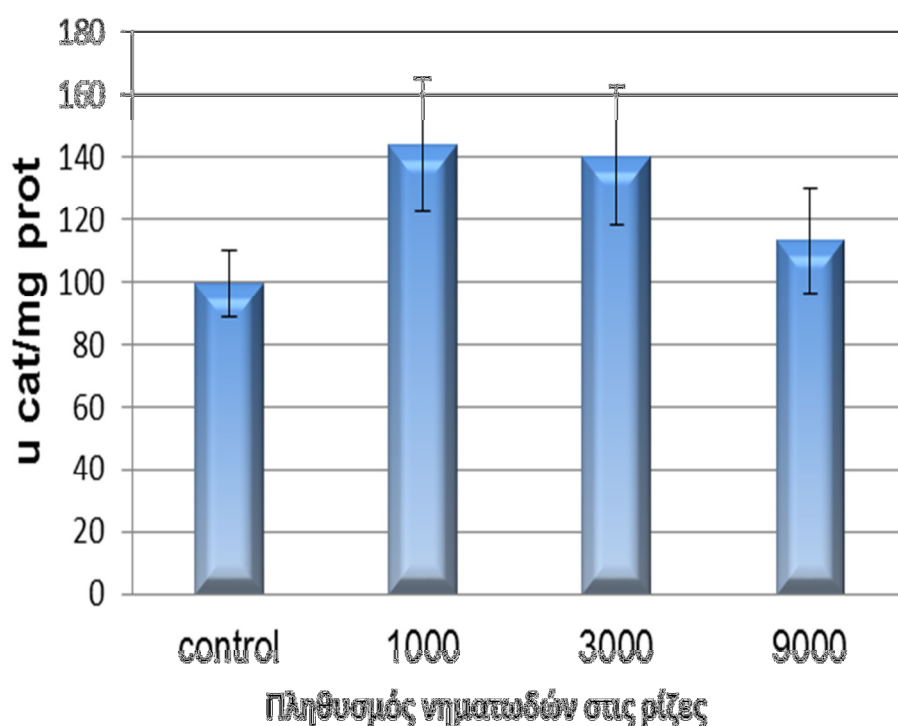
Εικόνα 3. Προσβεβλημένα φυτά τομάτας στα οποία παρατηρείται διαφορά στην ανάπτυξη κατ' ύψος ανάλογα με τον πληθυσμό των νηματωδών στη ρίζα (από αριστερά προς τα δεξιά: 9000, 3000, 1000, 0).



Εικόνα 4. Ρίζες προσβεβλημένων φυτών τομάτας στις οποίες παρατηρείται διαφορά στην ανάπτυξη ανάλογα με τον πληθυσμό των νηματωδών (από αριστερά προς τα δεξιά: 9000, 3000, 1000, 0).

6.2. Μέτρηση της δραστηριότητας της καταλάσης

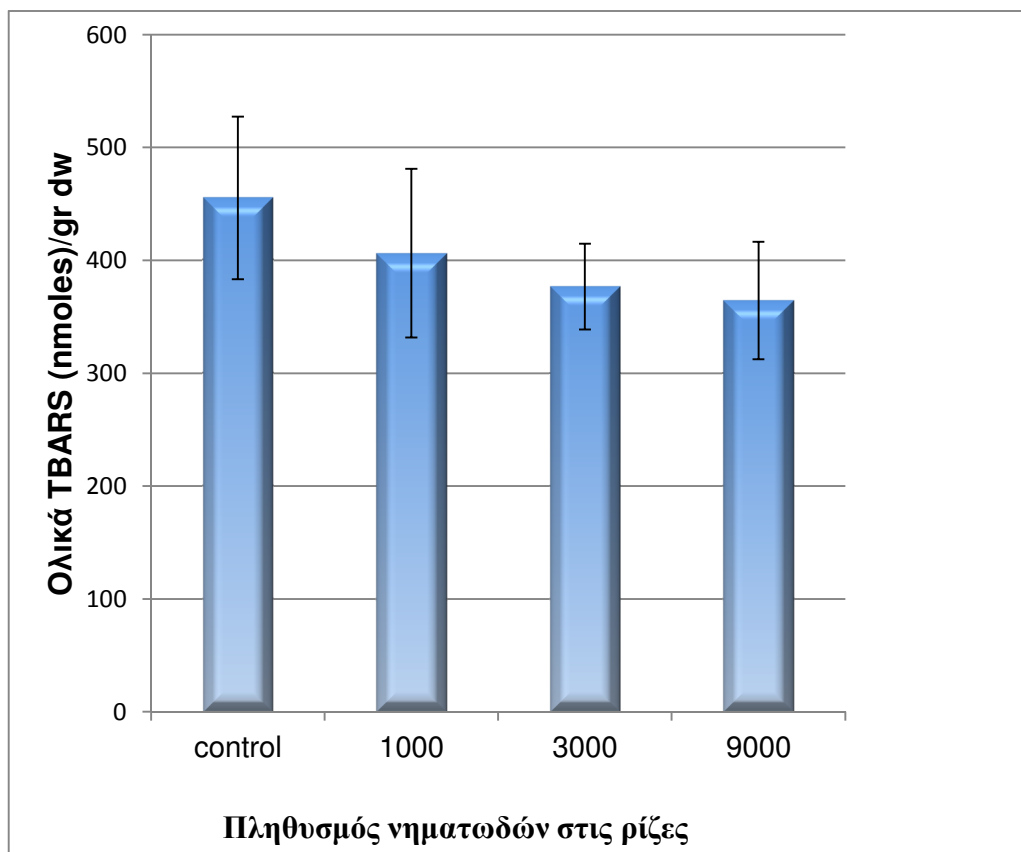
Στο Γράφημα 1 παρατηρούμε ότι η δραστηριότητα της καταλάσης αυξάνεται σε ποσοστό περίπου 40% για τη μικρή (1000) και την ενδιάμεση (3000) μόλυνση σε σχέση με το υγιές φυτό. Αντιθέτως, στη μεγάλη μόλυνση (9000) φαίνεται ότι η δραστηριότητα της καταλάσης αυξάνεται μόνο 14% δηλαδή τείνει να επανέλθει στα επίπεδα του control φυτού.



Γράφημα 1. Η επίδραση της μόλυνσης στη δραστηριότητα της καταλάσης (ο προσδιορισμός του τυπικού σφάλματος είναι αποτέλεσμα 6 πειραμάτων)

6.3. Μέτρηση της υπεροξειδωσης λιπιδίων (TBARS)

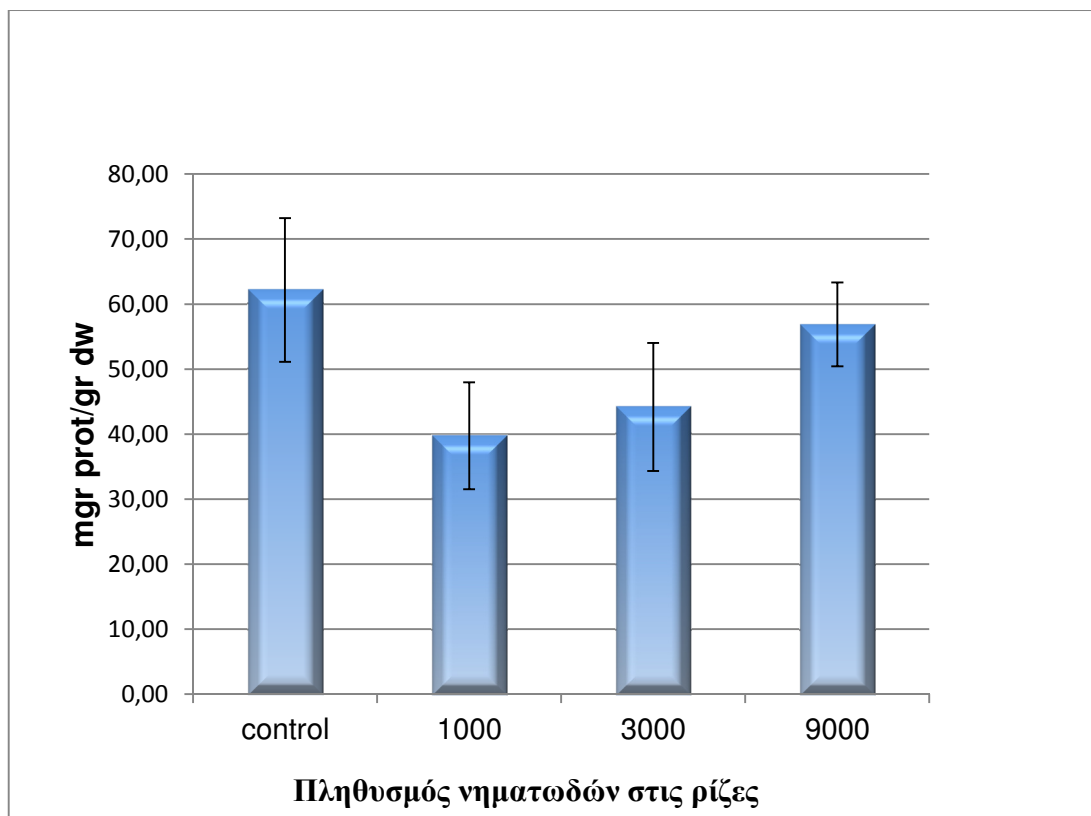
Στο Γράφημα 2 παρατηρούμε μία σταδιακή μείωση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων από το υγιές φυτό προς τα μολυσμένα. Η δε μεγαλύτερη μείωση, της τάξης του 20%, παρατηρήθηκε στα φυτά με τη μεγάλη μόλυνση.



Γράφημα 2. Η επίδραση της μόλυνσης στην υπεροξειδωση των λιπιδίων (ο προσδιορισμός του τυπικού σφάλματος είναι αποτέλεσμα 6 πειραμάτων)

6.4. Μέτρηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών

Στο Γράφημα 3 παρατηρούμε ότι η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης μειώνεται κατά 36% στη μικρή (1000) και 29% στη μεσαία (3000) μόλυνση ενώ στη μεγάλη (9000) μόλυνση η μείωση είναι μόνο 9% δηλαδή η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης τείνει να επανέλθει στα επίπεδα του control φυτού.



Γράφημα 3. Η επίδραση της μόλυνσης στη συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης (ο προσδιορισμός του τυπικού σφάλματος είναι αποτέλεσμα 6 πειραμάτων)

6.5. Συμπεράσματα-Συζήτηση

Για την πιο ουσιαστική και ορθή εκτίμηση τόσο του οξειδωτικού στρες όσο και της αντιοξειδωτικής άμυνας της τομάτας μετά από προσβολή από νηματώδεις θα ήταν χρήσιμο οι όποιες μετρήσεις δεικτών της οξειδωτικής καταπόνησης να γίνουν στις ρίζες των φυτών δεδομένου ότι εκεί γίνεται η προσβολή. Συνεπώς, και στο βαθμό που η προσβολή αποτελεί παράγοντα οξειδωτικής καταπόνησης του φυτού, στις ρίζες αναμένεται να σημειωθεί η αύξηση τόσο των κυτταρικών βλαβών όσο και των πιθανών μηχανισμών άμυνας του φυτού. Όμως, σε μια δειγματοληψία ρίζας προσβεβλημένης από τους νηματώδεις υπάρχει το μεγάλο μειονέκτημα ότι δεν είναι εφικτό να διαχωρίσουμε και να απομονώσουμε τον φυτικό από τον ζωικό ιστό και συνεπώς δεν είναι εφικτό να εκτιμήσουμε με σιγουριά ποιο είναι το μέγεθος της υπεροξείδωσης λιπιδίων και της δραστηριότητας της καταλάσης του φυτού στη ρίζα. Έτσι, γίνεται αναγκαστικά μία έμμεση εκτίμηση της οξειδωτικής καταπόνησης και άμυνας του φυτού μετρώντας τους αντίστοιχους δείκτες στα φύλλα του. Βεβαίως, στη βιβλιογραφία υπάρχουν μελέτες εκτίμησης τόσο της καταλάσης (Abd-Elgawad et al., 2012) όσο και της υπεροξείδωσης λιπιδίων (Vasil'eva et al., 2004) σε δείγματα ρίζας αλλά τα αποτελέσματα αυτών των μελετών μπορούν να αμφισβητηθούν για τους λόγους που περιγράψαμε παραπάνω.

Από το Γράφημα 1 διαπιστώνεται μια σαφής αύξηση της δραστηριότητας της καταλάσης κυρίως στη μικρή και μεσαία μόλυνση ενώ στη μεγάλη μόλυνση το ποσοστό αύξησης είναι μόνο 14% δηλαδή τείνει να επανέλθει στα επίπεδα του control φυτού. Η αύξηση της δραστηριότητας της καταλάσης στα φύλλα των μολυσμένων φυτών έχει παρατηρηθεί και από άλλους ερευνητές (Sun et al., 2010) αλλά υπάρχουν και αποτελέσματα που αντιθέτως αναφέρουν μικρή μείωσή της στους βλαστούς (Kaur et al., 2013). Επιπλέον, έχει αναφερθεί και η αύξηση της δραστηριότητας της καταλάσης στις ρίζες των μολυσμένων φυτών (Abd-Elgawad et al., 2012; Kaur et al., 2013) αλλά ισχύουν οι ίδιες επιφυλάξεις που αναφέρθηκαν παραπάνω για την αξιοπιστία αυτών των μετρήσεων.

Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον το γεγονός ότι η αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου συμβαίνει ταυτόχρονα με τη μείωση της συγκέντρωσης της ολικής πρωτεΐνης στα φύλλα του φυτού (Γράφημα 3) ενώ στη μεγάλη μόλυνση που η δραστηριότητα του ενζύμου τείνει να επανέλθει στα επίπεδα του control φυτού παρατηρούμε ότι συμβαίνει κάτι παρόμοιο και για την ολική πρωτεΐνη. Δεν υπάρχουν

όμως αντίστοιχες βιβλιογραφικές αναφορές για την ολική πρωτεΐνη ώστε να μπορούμε να κάνουμε τη σύγκριση με άλλες μελέτες και να έχουμε μια πιο σαφή εικόνα του φαινομένου.

Από το Γράφημα 2 διαπιστώνουμε μία σταδιακή μείωση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων στα μολυσμένα φυτά. Επιπλέον, η μεγαλύτερη μείωση, της τάξης του 20%, παρατηρήθηκε στα φυτά με τη μεγάλη μόλυνση. Στη βιβλιογραφία για την τομάτα δεν υπάρχουν αντίστοιχα αποτελέσματα ούτε στα φύλλα αλλά ούτε και σε δείγματα από ρίζες ώστε να μπορούμε να τα συγκρίνουμε.

Θεωρητικά, η αύξηση της δραστηριότητας της καταλάσης, ως άμυνα του φυτού στην οξειδωτική καταπόνηση που ενδεχομένως του προκαλεί το παράσιτο, θα μπορούσε σε συνδυασμό και με άλλους μηχανισμούς αντιοξειδωτικής άμυνας να οδηγήσει ακόμα και στη μείωση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων, πολύ περισσότερο σε ένα όργανο όπως το φύλλο το οποίο βρίσκεται μακριά από το σημείο προσβολής του φυτού από το παράσιτο.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abd-Elgawad M.M.M. et al., 2012. Different levels of anti-oxidant enzyme activities in tomato genotypes susceptible and resistant to root-knot nematodes. *Nematropica*, 42, 330-336.
- Aebi H., 1984. Catalase *in Vitro*. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126.
- Assimakopoulos S.F. et al., 2008. Superoxide radical formation in diverse organs of rats with experimentally induced obstructive jaundice. *RedoxRep.*, 13, 179–184.
- Beers Jr. R. F. and Sizer I. W., 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *The Journal of Biological Chemistry*, 195 (1), 133-140.
- Berkeley M.J., 1855. *Vibrio* forming cysts on the roots of cucumbers. *Gardener's Chronicle and Agricultural Gazette* 14, 220.
- Bird A.F., 1962. The influence of giant cells by *Meloidogyne javanica*. *Nematologica* 8, 1-10.
- Blum J. and Fridovich I., 1983. Superoxide, hydrogen peroxide and oxygen toxicity in two free-living nematode species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1, 35-43.
- Buege J.A. and Aust S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, 52, 302–310.
- Kaur R. et al., 2013. Effect of 28-homobrassinolide on susceptible and resistant cultivars of tomato after nematode inoculation. *Plant Growth Regul.*, 71, 199-205.
- Needham T., 1743. A letter concerning certain chalky tubulous concretions called malm; with some microscopical observations on the farina of the red lily, and of worms discovered in smutty corn. *Philos. Trans. Roy. Soc.* 42:173, 174, 634-641.
- Sun Y. et al., 2010. Elevated CO₂ changes the interactions between nematode and tomato genotypes differing in the JA pathway. *Plant, Cell & Environment*, 33, 729-739.
- Vasil'eva I.S. et al., 2004. Effect of furastanol glycosides of *Dioscorea* on lipid peroxidation in tomatoes infected with gall nematode. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 397, 117-119.

- Κολιοπάνος Κ.Ν., 1999. Φυτοπαρασιτικοί νηματώδεις σκόληκες. Βιολογία-Φυσιολογία - Γενετική ταξινόμηση και παθογένεση επί φυτών – Τρόποι αντιμετώπισης. Εκδόσεις Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.
- Κυρίμη Καλλιόπη, 2013. Ανάπτυξη μεθόδων ποσοτικοποίησης της ενεργότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων στα καλλιεργούμενα φυτά. Πτυχιακή εργασία. Τμήμα ΘΕ.Κ.Α., Τ.Ε.Ι. Μεσολογγίου.
- Κύρου Ν.Χ., 2004. Φυτοπαρασιτικοί νηματώδεις. Εκδόσεις Αγροτύπος ΑΕ.
- Ολύμπιου Χ. Μ. Η ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΩΝ ΚΗΠΕΥΤΙΚΩΝ ΣΤΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑ. ΕΚΔΟΣΗΣ ΣΤΑΜΟΥΛΗ
- Τσίτση Θεονίτσα, 2011. Ανάπτυξη μεθόδων μέτρησης της υπεροξειδωσής των λιπιδίων στα καλλιεργούμενα φυτά. Πτυχιακή εργασία. Τμήμα ΘΕ.Κ.Α., Τ.Ε.Ι. Μεσολογγίου.