

Βι βγ, οβγ κ

**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ  
ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

**Μελέτη της παθογένειας σε σπαράγγι και της γενετικής σχέσης  
απομονώσεων του μύκητα *Fusarium proliferatum* από  
διάφορους ξενιστές.**

**Πτυχιακή εργασία  
Του σπουδαστή Χρήστου Βαλαχά**

**Καλαμάτα , Μάρτιος 2005**

**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ  
ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

**Μελέτη της παθογένειας σε σπαράγγι και της γενετικής σχέσης  
απομονώσεων του μύκητα *Fusarium proliferatum* από  
διάφορους ξενιστές.**

**Πτυχιακή εργασία  
Του σπουδαστή Χρήστου Βαλαχά**



**Επιβλέπων καθηγητής: Αναστάσιος Ηλιόπουλος**

**Καλαμάτα , Μάρτιος 2005**

**ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ (ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ)  
Η ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΟΥ ΣΠΑΡΑΓΓΙΟΥ**

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ**

**ΚΥΡΙΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ**

1.1. ΚΑΤΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΕΞΑΠΛΩΣΗ ΤΟΥ ΣΠΑΡΑΓΓΙΟΥ	1
1.2. ΒΟΤΑΝΙΚΑ ΚΑΙ ΑΓΡΟΝΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	1
1.3 ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	3
1.5 ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ – ΥΒΡΙΔΙΑ	4
1.6 ΚΛΙΜΑΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΕΔΑΦΙΚΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ	5

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ**

**ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΦΥΤΕΙΑΣ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΕΣ ΦΡΟΝΤΙΔΕΣ**

2.1. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΔΑΦΟΥΣ	7
2.2. ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ	12

**ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ (ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ)**

**ΔΟΚΙΜΕΣ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ  
*Fusarium proliferatum* ΣΕ ΣΠΟΡΟΦΥΤΑ ΣΠΑΡΑΓΓΙΟΥ**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	18
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	18
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	19
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	20
ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΙΣ	23
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	23
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	28
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	29

**ΟΜΑΔΕΣ ΒΛΑΣΤΙΚΗΣ ΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	33
ΥΛΙΚΑ	33
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	34
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ	35
ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΕΙΣ	36
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	37
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	38

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία αποτελείται από δύο κεφάλαια το θεωρητικό και το πειραματικό. Το θεωρητικό κεφάλαιο της μελέτης αναφέρεται γενικά στη προέλευση και την καλλιέργεια του σπαραγγιού, καθώς και στην εξάπλωσή της στη χώρα μας . Αποτελείται από δύο επιμέρους υποκεφάλαια .

Στο πρώτο υποκεφάλαιο αναλύονται τα βοτανικά χαρακτηριστικά και οι ποικιλίες του σπαραγγιού που καλλιεργούνται. Επίσης αναφέρονται οι εδαφοκλιματικές απαιτήσεις για την καλλιέργειά του , καθώς και το πρόβλημα επαναφύτευσης.

Στο δεύτερο υποκεφάλαιο αναφέρονται οι διαδικασίες εγκατάστασης νέας καλλιέργειας σπαραγγιού καθώς και οι καλλιεργητικές φροντίδες που απαιτούνται.

Το δεύτερο κεφάλαιο αποτελεί το πειραματικό μέρος όπου περιγράφεται η διαδικασία του πειράματος όπου αναφέρονται τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν , η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε και τέλος τα αποτελέσματα και η συζήτησή τους.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς τον κύριο Αναστάσιο Ηλιόπουλο επίκουρο Καθηγητή Φυτοπαθολογίας του Τ.Ε.Ι Καλαμάτας για τη βοήθεια που μου παρείχε δίνοντάς μου πληροφορίες για τη συγγραφή της μελέτης , όπως επίσης και στην Δρα Καλομοίρα Ελένα ερευνήτρια του εργαστηρίου μυκητολογίας του Μπεννακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου για την βοήθεια τόσο στην διεξαγωγή του πειράματος , όσο και στη συγγραφή της μελέτης.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

### ΚΥΡΙΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

#### 1.1 ΚΑΤΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΕΞΑΠΛΩΣΗ ΤΟΥ ΣΠΑΡΑΓΓΙΟΥ

Το σπαράγγι είναι φυτό Ευρωασιατικής καταγωγής. Το αυτοφυές σπαράγγι (*Asparagus acutifolius*), το οποίο συναντάται σήμερα σε όλη την Ελλάδα και καταναλώνεται με μεγάλη ευχαρίστηση, ήταν γνωστό στους αρχαίους Αιγυπτίους και Έλληνες.

Πριν χρησιμοποιηθεί ως λαχανικό ήταν γνωστό σαν φάρμακο για δήγματα εντόμων, για καρδιοπάθειες, για οδοντόπονο και υδρωπεκία.

Η καλλιέργειά του εντοπίζεται 2000 χρόνια πριν, από την εποχή δηλαδή των Ρωμαίων στην Μικρά Ασία. Από την περιοχή της Μεσογείου διαδόθηκε κατόπιν στην Β.Ευρώπη και Β.Αμερική. Στην Ελλάδα για πρώτη φορά καλλιεργήθηκε σε έκταση 20 στρεμμάτων στην περιοχή των Γιαννιτσών το 1961 και σε μικρή έκταση σε Ιδρύματα Γεωργικών Ερευνών.

Πιο γνωστό στους Έλληνες είναι το αυτοφυές, η άγρια δηλαδή μορφή του που συναντάται σε υγρές ημιορεινές περιοχές με το όνομα <<βλαστάρια>>.

#### 1.2 ΒΟΤΑΝΙΚΑ ΚΑΙ ΑΓΡΟΝΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Τα σπαράγγια ανήκουν στην οικογένεια *Liliaceae*. Το αυτοφυές είδος είναι το *Asparagus acutifolius* και το καλλιεργούμενο *Asparagus officinalis* L. Είναι είδος διπλοειδές (2n=20), τετραπλοειδές και εξαπλοειδές. Είναι θαμνώδες πολυετές φυτό (η καλλιέργεια του μπορεί να διαρκέσει περισσότερο από 15 χρόνια), δίοικο, σταυρογονιμοποιούμενο και σπάνια ερμαφρόδιτο. Έχει αρσενικά και θηλυκά φυτά ανάλογα με το άνθος που φέρουν. Η αναλογία αρσενικών προς τα θηλυκά σε μια φυτεία σπαραγγιού είναι περίπου 1:1.

**Ριζικό σύστημα:** Το σπαράγγι αναπτύσσει πλούσιο, σαρκώδες ριζικό σύστημα. Οι κύριες ρίζες αναπτύσσονται στη στάθμη του ριζώματος (εδαφικά στελέχη) που ονομάζεται δίσκος. Αυτές δεν διακλαδίζονται σχεδόν καθόλου, μπορούν να φτάσουν ως 1cm διάμετρο και να προεκταθούν απεριόριστα. Το μεγαλύτερο μέρος τους βρίσκεται σε βάθος από 25 έως 65cm. Οι σαρκώδεις ρίζες ενεργούν σαν αποθήκη αποθησαυρισμού θρεπτικών στοιχείων που χρησιμοποιούνται για την αναβλάστηση την Άνοιξη. Ένα μεγάλο ρίζωμα έχει πιο πολλά αποθησαυριστικά συστατικά και επομένως έχει την δυνατότητα να παράγει περισσότερους βλαστούς. Τα αρσενικά φυτά που είναι πιο αποδοτικά έχουν μεγαλύτερο ρίζωμα και ζούνε περισσότερο.

Από τις σαρκώδεις ρίζες φύονται ριζικά τριχίδια μέσω των οποίων γίνεται η απορρόφηση θρεπτικών στοιχείων και νερού. Κατά τη μεταφύτευση πρέπει να δίνεται προσοχή ώστε να μην καταστρέφεται το ριζικό σύστημα, γιατί οι πληγές διευκολύνουν τη προσβολή από τον εδαφογενή μύκητα *Fusarium* sp.



**Βλαστοί:** Από τους οφθαλμούς του πάνω μέρους του δίσκου, εκφύονται οι βλαστοί. Αναπτύσσονται την άνοιξη, μεγαλώνουν κατακόρυφα μέσα στο έδαφος και αποτελούν το εναέριο τμήμα του φυτού. Επειδή τους λείπει το φως, το χρώμα τους είναι λευκό.

Οι νεαροί βλαστοί που εκπύσσονται από τους οφθαλμούς του ριζώματος αποτελούν το εδώδιμο μέρος των σπαραγγιών. Είναι κυλινδρικοί μεγάλης αρχικά διαμέτρου, χυμώδεις και καταλήγουν στην κορυφή σε μυτερό οφθαλμό που έχει χρώμα ιώδες-πράσινο. Τα αγρονομικά χαρακτηριστικά των βλαστών που ενδιαφέρουν τους καταναλωτές είναι το χρώμα, η διάμετρος και το μήκος. Συλλέγονται όταν φτάσουν τα 20 περίπου εκατοστά. Το χρώμα τους ποικίλει, ανάλογα με την ποικιλία και την καλλιεργητική τεχνική. Συνήθως είναι λευκό, βιολετί ή πράσινο.

Εάν οι βλαστοί δεν συγκομιστούν έγκαιρα, μόλις εμφανιστούν στην επιφάνεια του εδάφους, τότε αρχίζει να ανοίγει ο οφθαλμός και να αναπτύσσεται ο λεπτός διακλαδισμένος βλαστός του σπαραγγιού. Στη φάση αυτή το σπαράγγι παύει να είναι εδώδιμο, διότι ξυλοποιείται γρήγορα.

**Άνθη:** Είναι μικρά, συνήθως μονήρη πρασινοκίτρινου χρώματος και εκφύονται στις μασχάλες των φύλλων. Τα φυτά ανθίζουν μόνο το 14<sup>ο</sup> με 15<sup>ο</sup> μήνα από την σπορά τους.

**Καρπός:** Είναι ράγα, σφαιρικός, στην αρχή πράσινος και όταν ωριμάσει γίνεται κόκκινος. Έχει στο εσωτερικό του 3-4 σπόρους μαύρου χρωματισμού. Σε ένα γραμμάριο αντιστοιχούν 50 περίπου σπόροι, η δε φυτρωτική ικανότητά τους διατηρείται για 4-5 χρόνια.

**Φύλλα:** Το σπαράγγι δεν έχει πραγματικά φύλλα. Οι μικρές βελόνες που φύονται κατά δεσμίδες κυκλικά παίζουν το ρόλο των φύλλων, ενώ στη πραγματικότητα είναι φυλλοκλάδια. Τα φύλλα είναι μικρά βράκτια, που βρίσκονται στην κορυφή των εκπυσσόμενων βλαστών, αλλά δεν λειτουργούν σαν φύλλα.

**Πολλαπλασιασμός:** Το φυτό πολλαπλασιάζεται με ριζώματα τα οποία παράγονται σε ειδικά φυτώρια. Από ένα στρέμμα φυτωρίου παράγονται 20.000 έως 25.000 ριζώματα, για την καλλιέργεια ενός στρέμματος απαιτούνται 1.100-1.200 ριζώματα. Τα χρησιμοποιούμενα ριζώματα για την εγκατάσταση φυτείας πρέπει να πληρούν τις παρακάτω προϋποθέσεις:

- α) Να είναι της ίδιας ποικιλίας
- β) Να είναι ηλικίας ενός έτους
- γ) Να έχουν 7-8 κυλινδρικές ρίζες
- δ) Να έχουν αρκετούς βλαστοφόρους οφθαλμούς
- ε) Να έχουν 3-4 οφθαλμούς
- στ) Να μην έχουν σπασμένες ρίζες
- ζ) Να είναι απαλλαγμένα από μυκητολογικές και εντομολογικές προσβολές
- η) Η προμήθεια να γίνεται από τις ειδικές μονάδες παραγωγής

### 1.3. Η ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΟΥ ΣΠΑΡΑΓΓΙΟΥ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

Για την Ελλάδα η καλλιέργεια του σπαραγγιού είναι σχετικά νέα. Αν και πρωτοδοκιμάστηκε το 1961 στην περιοχή των Γιαννιτσών, η συστηματική καλλιέργειά του επεκτάθηκε τη δεκαετία του 1970 και σε άλλες περιοχές της Κεντρικής και Δυτικής Μακεδονίας και της Θράκης. Οι καλλιεργούμενες εκτάσεις και η παραγωγή κατά το έτος 2002, φαίνονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1: Καλλιεργούμενες εκτάσεις και η παραγωγή σπαραγγιού στην Ελλάδα (έτος 2002)

ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΕΣ/ΝΟΜΟΙ	ΕΚΤΑΣΗ (στρέμματα)	ΠΑΡΑΓΩΓΗ (τόννοι)
<b>Αν.Μακεδονία και Θράκη</b>		
Αλεξανδρούπολης	850	615
Καβάλας	7750	7250
Σερρών	1100	450
Ορεστιάδας	1280	470
Ροδόπης	350	95
<b>Σύνολο</b>	<b>11330</b>	<b>8880</b>
<b>Δυτική και Κεντρική Μακεδονία</b>		
Θεσ/κης	3250	1750
Ημαθίας	6150	4200
Πέλλης	1100	270
Γιαννιτσών	50000	21000
<b>Σύνολο</b>	<b>60500</b>	<b>27220</b>
<b>Θεσσαλία</b>		
Λάρισας	2500	650
Καρδίτσας	81	52
<b>Σύνολο</b>	<b>2581</b>	<b>702</b>
<b>Αχαΐας</b>		
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>75.063</b>	<b>37.260</b>

Πηγή: Υπουργείο Γεωργίας

#### 1.4. ΘΡΕΠΤΙΚΗ ΑΞΙΑ ΤΟΥ ΣΠΑΡΑΓΓΙΟΥ

Το σπαράγγι σαν τρόφιμο, είναι προικισμένο με διατητικές και φαρμακευτικές ιδιότητες. Εκτός από πολύτιμο λαχανικό – σαλατικό, είναι διουρητικό, αλλά δεν πρέπει να χρησιμοποιείται όταν το ουροποιητικό σύστημα έχει φλόγωση, γιατί είναι ερεθιστικό. Δεν συνιστάται, όμως για άτομα που έχουν ρευματισμούς, αρθριτικά, κυστίδες. Χρησιμοποιείται με αφέψημα της ρίζας (60 γραμμάρια σε ένα λίτρο νερού) ή σε μορφή εκχυλίσματος, σε δόση 1-4 γραμμάρια την ημέρα. Για να γίνει πιο εύληπτο παρασκευάζεται σε σιρόπι.

Είναι υδατώδες λαχανικό. Όταν είναι φρεσκοκομμένο περιέχει 90-95% νερό.

Η σύνθεση του, οι οποία ποικίλει, ανάλογα με το στάδιο συγκομιδής του, είναι:

Νερό	93,75-94,5%
Λεύκωμα	1,62-1,79%
Λίπη	0,11-0,25%
Μη αζωτούχες ουσίες	2,26-2,33%
Ίνες	0,81-1,04%
Τέφρα	0,54-0,70%

Η περιεκτικότητά του, σε μεταλλικά στοιχεία και βιταμίνες σε 100 γραμμάρια φρέσκο σπαράγγι είναι:

(CaO) Ασβέστιο	20mg
Φώσφορος	60mg
Σίδηρος	1mg

Βιταμίνη Β1	0,16-1,25mg
Βιταμίνη Β2	0,19-2,17mg
Βιταμίνη Β7	1,40mg
Βιταμίνη C	30-33mg

Η περιεκτικότητα στα παραπάνω συστατικά, στο βλαστό, ελαττώνεται πηγαίνοντας προς τη βάση του. Η κορυφή ( το κεφαλάκι) είναι πάντα πιο πλούσιο σε βιταμίνη C.

Η φλούδα του σπαραγγιού είναι επίσης πλουσιότερη από την καρδιά. Κατά το βράσιμο η απώλεια των βιταμινών, κυμαίνεται από 27-40%. Τα 100 γραμμάρια σπαραγγια έχουν 26 θερμίδες.

## 1.5. ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ-ΥΒΡΙΔΙΑ

Οι καλλιεργούμενες ποικιλίες και τα υβρίδια διακρίνονται σε τέσσερις κατηγορίες:

### α) Απλές ποικιλίες

Οι κλασσικές ή παραδοσιακές ποικιλίες παράγουν σκουροπράσινους ή ανοιχτοπράσινους βλαστούς στον ήλιο. Όλες οι ποικιλίες παράγουν, κάτω από το έδαφος, βλαστούς με λευκό χρώμα. Από τις απλές ποικιλίες οι κυριότερες είναι:

Mary Washington: Ποικιλία πρώιμη με καλή απόδοση και ποιότητα. Οι βλαστοί της είναι λευκού χρώματος.

Alexandre Marionnet: Ποικιλία πρώιμη, με βλαστούς χωρίς ίνες με καλή απόδοση και ποιότητα. Χαρακτηριστικό της ποικιλίας αυτής είναι ότι οι βλαστοί της διατηρούνται λευκοί, ακόμα και όταν παραμένουν έξω από το χώμα, μέχρι 3cm.

Darbonne: Ποικιλία γνωστή στη χώρα μας. Πρώιμη και πολύ παραγωγική. Οι βλαστοί είναι χωρίς ίνες, χοντροί, τρυφεροί, με απόχρωση βιολετί μόλις βγούνε από το χώμα.

Lorela: Ποικιλία πολύ παραγωγική που αντέχει στη σκωρίαση. Το 80-90% της παραγωγής είναι ποιότητας extra

### β) Διπλά υβρίδια

Τα διπλά υβρίδια δημιουργούνται με διασταύρωση μεταξύ δύο απλών υβριδίων. Τα κυριότερα διπλά υβρίδια είναι:

DIANE: Δόθηκε στην καλλιέργεια το 1974 και αντιπροσωπεύει τον πρώτο σταθμό των βελτιωμένων ποικιλιών παραγωγής του ερευνητικού ινστιτούτου INRA στη Γαλλία.

JUNON: Αντιπροσωπεύει παραγωγικότητα μεγαλύτερη από την DIANE. Η διάμετρος των βλαστών είναι μεγαλύτερη.

MINERVE: Είναι υβρίδιο πρώιμο, με κανονική διάμετρο βλαστών και μεγαλύτερη παραγωγικότητα από την DIANE

LARAC: Είναι μεγαλύτερης παραγωγικότητας από τα προηγούμενα διπλά υβρίδια. Έχει βλαστούς με μεγαλύτερη διάμετρο από τα άλλα υβρίδια. (75-80% πάνω από 16cm).

MIRA: Είναι παραγωγικότερο από το JUNON και με βλαστούς καλής εμφάνισης.

### γ) Κλωνικά υβρίδια

Η παραγωγή των κλωνικών υβριδίων στηρίζεται στη τεχνική της *in vitro* μεριστωματικής καλλιέργειας. Απομονώνονται οι πιο ελπιδοφόρες διασταυρώσεις και με ιστοκαλλιέργεια δημιουργείται μεγάλος αριθμός φυτών, που έχουν τον ίδιο γενότυπο και τα οποία χρησιμοποιούνται σαν μητρικά φυτά. Αυτά τα φυτά φυτεύονται σε



απομονωμένους αγρούς, όπου παράγουν σπόρο, που χρησιμοποιείται για παραγωγή μονοετών ριζωμάτων.

Τέτοια υβρίδια είναι:

**DESTO:** Υβρίδιο παραγωγικό. Συγκρίνεται με το MINERVE, αλλά έχει βλαστούς μεγαλύτερης διαμέτρου.

**CITO:** Είναι υβρίδιο με μεγαλύτερη πρωιμότητα από όλα τα άλλα υβρίδια. Οι βλαστοί της έχουν μέση έως κανονική διάμετρο. Ενδείκνυται και για πράσινο σπαράγγι.

**ANETO:** Συγκρίνεται με τη MINERVE, για τη διάμετρο των βλαστών και για την πρωιμότητα της, αλλά είναι μεγαλύτερης παραγωγικότητας. Ενδείκνυται και για πράσινο σπαράγγι.

#### **δ) Αρσενικά υβρίδια**

Η μέθοδος παραγωγής αρσενικών υβριδίων είναι η εξής:

Σε απλοειδή φυτά διπλασιάζεται ο αριθμός των χρωμοσωμάτων και προκύπτουν φυτά θηλυκά (XX). Στη συνέχεια διασταυρώνονται με αρσενικά φυτά τύπου (YY), τα οποία προέρχονται από αυτογονιμοποίηση (XY) αρσενικών, που έχουν τροποποιητικά γονίδια. Όλα τα υβρίδια που θα προκύψουν θα είναι τύπου XY(αρσενικά).

Τα αρσενικά υβρίδια έχουν 30-40% μεγαλύτερη απόδοση. Το μειονέκτημά τους όμως είναι ότι παράγουν πιο λεπτούς βλαστούς. Μερικά αρσενικά υβρίδια είναι:

LUCULLUS, FRANCIM, BOONLIM, VENLIM, ANDREAS

## **1.6. ΚΛΙΜΑΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΕΔΑΦΙΚΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ**

### **1.6.1. Θερμοκρασία**

Για την καλλιέργεια προτιμούνται περιοχές με χαμηλές θερμοκρασίες για 3-4 μήνες στις οποίες το σπαράγγι ευδοκιμεί καλύτερα. Το διάστημα αυτό είναι απαραίτητο για να μπει το φυτό στην περίοδο του λήθαργου. Μπορεί να αντέξει σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες γι' αυτό καλλιεργείται ακόμη και στη Γερμανία, Ολλανδία, Αγγλία, Ουγγαρία κ.α. Ωστόσο, σε περιοχές με πολύ χαμηλές θερμοκρασίες το χειμώνα καλό είναι να "σαμαρώνονται" οι φυτείες πριν από τους παγετούς. Θα πρέπει όμως να σημειωθεί ότι μόνο το υπόγειο μέρος του φυτού είναι ανθεκτικό σε θερμοκρασίες λίγων βαθμών κάτω από το μηδέν.

Η θερμοκρασία του περιβάλλοντος που απαιτείται για το φύτεμα κυμαίνεται γύρω στους 15-30 °C, με ελάχιστη τους 10 και μέγιστη τους 32 °C αντίστοιχα. Η θερμοκρασία του εδάφους που απαιτείται για να ξεκινήσει η βλάστηση είναι 10-12 °C. Η μέση ημερήσια θερμοκρασία εδάφους επηρεάζει την ταχύτητα ανάπτυξης των βλαστών. Παράλληλα όσο υψηλότερη είναι, τόσο γρηγορότερα αναπτύσσονται οι δευτερεύοντες βλαστοί. Τέλος η θερμοκρασία εδάφους έχει σχέση με την ποιότητα των βλαστών.

Η επικράτηση υψηλών θερμοκρασιών το χειμώνα περιορίζει τον αποθησαυρισμό θρεπτικών συστατικών στις σαρκώδεις ρίζες και έτσι μειώνεται η απόδοση και η ζωή της φυτείας. Το σπαράγγι είναι φυτό που αντέχει στην ξηρασία. Οι μεγαλύτερες ανάγκες σε νερό εντοπίζονται από Δεκέμβριο ως Φεβρουάριο και από Ιούνιο ως Σεπτέμβριο.

### **1.6.2. Φωτοπερίοδος**

Το φως επηρεάζει άμεσα την ανάπτυξη του υπέργειου τμήματος των φυτών και στη φάση της φωτοσύνθεσης καθώς και στην ανάπτυξη των ριζών σε σχέση με την φωτοσύνθεση.

Η φωτοσύνθεση, αρχίζει 2 μήνες περίπου από την είσοδο των φυτών στη δραστηριότητα του ριζικού συστήματος, επειδή μεσολαβεί η συγκομιδή. Με τη διαδικασία της συγκομιδής των βλαστών, το φυτό στερείται των οργάνων του φυλλώματος και κατά συνέπεια χάνεται κύκλος φωτοσύνθεσης, ίσος προς το χρόνο συγκομιδής.

### **1.6.3. Εδαφικές συνθήκες**

Τα σπαράγγια ευδοκιμούν σε όλους τους τύπους εδαφών, προκειμένου όμως να δώσουν πλούσια παραγωγή και καλή ποιότητα βλαστών, ιδιαίτερα στην περίπτωση των λευκών σπαραγγιών, θα πρέπει να προτιμούνται τα ελαφρά εδάφη. Το σπαράγγι καλλιεργείται σε αμμώδη έως πηλοαμμώδη εδάφη, ενώ για την παραγωγή πράσινων σπαραγγιών κατάλληλα θεωρούνται τα πηλώδη, ιλυώδη ή ιλυοπηλώδη

Απαραίτητη προϋπόθεση είναι, τα εδάφη να στραγγίζουν καλά, να μην δημιουργούν συνθήκες ασφυξίας για το ριζικό σύστημα.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

# ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΦΥΤΕΙΑΣ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΕΣ ΦΡΟΝΤΙΔΕΣ

## 2.1. ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗ

### 2.1.1.Επιλογή θέσης

Το σπαράγγι είναι ένα φυτό χωρίς ιδιαίτερες απαιτήσεις όσον αφορά την ποιότητα του εδάφους. Φυτρώνει μόνο του σε ελαφρά( αμμώδη) εδάφη που δέχονται πολλές βροχές. Για τη συστηματική καλλιέργεια του σπαραγγιού πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι δεν είναι απαιτητικό στο κλίμα, μπορεί να αναπτυχθεί και να καλλιεργηθεί τόσο σε ζεστές όσο και σε κρύες περιοχές.

Όστούσο προτιμά αμμώδη εδάφη, γόνιμα, βαθιά με νότια έκθεση, ώστε να δέχονται την ηλιακή ακτινοβολία, ενώ θα πρέπει να αποφεύγονται τα βαριά συνεκτικά εδάφη που νεροκρατούν γιατί τότε δημιουργείται πρόβλημα στο ριζικό σύστημα λόγω ασφυξίας ριζών.

### 2.1.2.Προετοιμασία του εδάφους

Η προετοιμασία του εδάφους στοχεύει στο να διαμορφώσει ένα ευνοϊκό και κατάλληλο για την ανάπτυξη του ριζικού συστήματος εδαφικό περιβάλλον.

Επειδή η καλλιέργεια του σπαραγγιού είναι πολυετής, η προετοιμασία του εδάφους πρέπει να είναι προσεκτική και να γίνεται το προηγούμενο από την εγκατάσταση Φθινόπωρο ή Χειμώνα. Η σειρά των εργασιών προετοιμασίας του εδάφους εξαρτάται από την κατάσταση του εδάφους τη στιγμή λήψης της απόφασης για εγκατάσταση της σπαραγγοκαλλιέργειας και είναι συνήθως οι ακόλουθες:

- Αρχικά γίνεται εκχέρσωση και απομάκρυνση των θάμνων και της άγριας βλάστησης γενικότερα, καθώς επίσης και καταστροφή πολυετών ζιζανίων.
- Σε εδάφη με ανώμαλη επιφάνεια γίνεται διευθέτηση του εδάφους έτσι ώστε να προκύψει ισόπεδη ή μικρής κλίσης επιφάνεια.
- Σε περίπτωση υψηλού εδαφικού ορίζοντα ( υψηλή στάθμη υπόγειου ύδατος) είναι απαραίτητη η κατασκευή ανοικτών στραγγιστικών τάφρων ή υπογείου στραγγιστικού δικτύου. Επίσης θα πρέπει να γίνει εγκατάσταση αρδευτικού δικτύου.
- Στη συνέχεια θα πρέπει να γίνει δειγματοληψία εδάφους για να προσδιοριστούν τόσο η μηχανική σύσταση όσο και τα επίπεδα της ηλεκτρικής αγωγιμότητας και των θρεπτικών στοιχείων του εδάφους (επίπεδα K, P, N,) και να γίνουν οι απαραίτητες ενέργειες, εάν είναι εφικτό, για τη βελτίωση της φυσικοχημικής του σύστασης.
- Ακολουθεί μια βαθιά άροση σε βάθος 50-70 cm, γίνεται ενσωμάτωση χημικών λιπασμάτων της βασικής λίπανσης για την κάλυψη των αναγκών σε φώσφορο, ασβέστιο, μαγνήσιο, ρύθμιση pH, κάλυψη των πρώτων αναγκών σε κάλιο και άζωτο.

Επίσης γίνεται ενσωμάτωση χωνεμένης κοπριάς σε ποσότητες 3-5 tn/στρ. για ένα μέσης σύστασης έδαφος.

- Σε περίπτωση όξινων εδαφών γίνεται προσθήκη ασβεστίου ή δολομίτη που έχει ακόμα καλύτερα αποτελέσματα
- Ακολουθεί σβάρνισμα της επιφάνειας του εδάφους με δισκοσβάρνα ή με φρεζάρισμα
- Μετά το σβάρνισμα ακολουθεί η τελική διαμόρφωση του εδάφους. Έτσι ανοίγονται παράλληλα βαθιά χαντάκια βάθους 25-30 cm και πλάτους 50-70 cm τα οποία εναλλάσσονται με φαρδιά αναχώματα, που κυμαίνονται από 2-2.2 m , πάνω στα οποία συσσωρεύεται το έδαφος που έχει βγει από τα αυλάκια.

Οποιοδήποτε είδος κατεργασίας του εδάφους και αν διενεργείται πρέπει να γίνεται όταν το έδαφος βρίσκεται στο «ρόγο» του, δηλαδή σε κατάσταση υγρασίας τέτοια που να μην είναι ούτε πολύ υγρό ούτε πολύ ξηρό. Εμπειρικά αυτό μπορεί να διαπιστωθεί με συμπίεση ενός δείγματος εδάφους μέσα στην παλάμη. Εάν μετά την συμπίεση και το άνοιγμα της παλάμης το έδαφος κονιορτοποιείται, αυτό σημαίνει ότι το έδαφος είναι πολύ ξηρό, ενώ αν παραμένει συγκολλημένο και διατηρεί το σχήμα του, τότε είναι πολύ υγρό. Αντίθετα αν με το άνοιγμα της παλάμης το έδαφος χαλαρώνει, αλλά παραμένει ως σβόλος στη παλάμη τότε βρίσκεται στο «ρόγο».

### 2.1.3. Πολλαπλασιαστικό υλικό

Το πολλαπλασιαστικό υλικό που χρησιμοποιείται για την εγκατάσταση φυτείας σπαραγγιών είναι:

- Ο σπόρος ( απευθείας σπορά), που πλέον δεν συνηθίζεται
- Τα ριζώματα 1-2 ετών που κατά κανόνα χρησιμοποιούνται σήμερα
- Τα φυτάρια σε κύβους ηλικίας 60-70 ημερών.

Στην Ελλάδα δεν γίνεται παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού και η προμήθειά του γίνεται κατά κύριο λόγο από οίκους του εξωτερικού μέσω εμπόρων. Η εισαγωγή των ριζωμάτων το 1999 στοίχιζε 120 δρχ. το ένα, ενώ το 2002 η τιμή του έφτασε στις 160 δρχ το ένα. Τα τελευταία χρόνια έχουν δημιουργηθεί φυτώρια και στην Ελλάδα και πολλές φορές οι ίδιοι οι καλλιεργητές χρησιμοποιούν σπόρο από τις δικές τους καλλιέργειες για παραγωγή ριζωμάτων.

Είναι όμως δύσκολο να βγάλει κανείς συμπεράσματα, τόσο για την ποιότητα όσο και για το χρόνο ζωής αυτών των καλλιεργειών, αφού ούτε έρευνες έχουν γίνει, ούτε εμπειρίες μακρόχρονες υπάρχουν. Για το λόγο αυτό πρέπει να αποφεύγεται η χρήση αυτών των μοσχευμάτων.

Η παραγωγή σπόρων, γίνεται με την ακόλουθη διαδικασία:

Κατά τη διάρκεια της κανονικής παραγωγής επισημαίνονται τα καλύτερα φυτά από τα οποία δεν αφαιρείται κανένα βλαστάρι, ώστε η άνθηση και η ωρίμανση των σπόρων να γίνει πρώιμα. Όταν το φυτό κτιρινίσει, συγκομίζονται οι καρποί και τοποθετούνται σε νερό για να χωριστούν οι σπόροι. Όταν στεγνώσουν οι σπόροι, διατηρούνται ως τη σπορά.

Για την παραγωγή ριζωμάτων γίνεται σπορά του σπόρου σε σπορεία την Άνοιξη ή τον Ιούνιο-Ιούλιο προκειμένου να πετύχουμε ριζώματα 1 έτους, που θα μεταφυτευτούν τον επόμενο χρόνο. Απαιτούνται 35-40 γραμ. σπόρου για 100 τ.μ. σπορείου. Συνήθως η σπορά γίνεται σε σειρές που απέχουν 20-30 cm μεταξύ τους και οι δε σπόροι 6-8 cm.



Εφαρμόζονται οι απαραίτητες καλλιεργητικές φροντίδες και την επόμενη Άνοιξη ξεριζώνονται τα ριζώματα

Από 100 τ.μ. εδάφους συνήθως παίρνονται 1.500 ριζώματα για φύτεμα. Πρέπει όμως να παράγουμε 30% περισσότερα από όσο χρειάζεται, για την περίπτωση που θα χρειαστεί να γίνει αντικατάσταση μερικών και να αφαιρεθούν όσα δεν είναι πολύ καλά. Ένα καλό ριζώμα πρέπει να έχει πολυάριθμες ρίζες, αλλά κυρίως μεγάλες, και οφθαλμούς μεγάλους και στρογγυλούς. Σε κάθε ριζώμα πρέπει να υπάρχουν 7-8 καλά αναπτυγμένες ρίζες, με πολυάριθμα ριζίδια στην κάθε μία, και τουλάχιστον 3-4 οφθαλμούς που να ξεχωρίζουν καλά. Το βάρος των ριζωμάτων κυμαίνεται από 15-55 gr.

Τα ριζώματα καθαρίζονται, στεγνώνουν και απολυμαίνονται και έτσι μπορούν να διατηρηθούν στους 0 °C και σχετική υγρασία 85-95%. Συνιστάται να περιορίζεται η αποθήκευση σε ελάχιστες μέρες.

Σε ορισμένες χώρες το σπαράγγι προέρχεται από φυτώρια σπορείου τα οποία παράγονται σε κύβους ή σε ειδικές κυψελίδες όπου τοποθετείται το κατάλληλο υπόστρωμα. Σε 50-60 ημέρες γίνεται η μεταφύτευση των φυταρίων, ώστε να αποφεύγονται οι πληγές από το σπάσιμο των ριζών, από όπου ο μύκητας *Fusarium* sp. βρίσκει δίοδο και μολύνει το φυτό μετά τη μεταφύτευση

Επειδή η φυτεία του σπαραγγιού είναι πολυετής, πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην υγιεινή κατάσταση των ριζωμάτων. Δεν θα πρέπει να προέρχονται από φυτώρια που ήταν προσβεβλημένα από μύκητες κυρίως του γένους *Fusarium* sp. και δεν πρέπει να περιέχουν αυγά ή προνύμφες εντόμων.

#### 2.1.4. Φύτευση

Με την ολοκλήρωση της προετοιμασίας του εδάφους γίνεται η φύτευση των ριζωμάτων σπαραγγιού. Η φύτευση λαμβάνει χώρα όταν η θερμοκρασία σταθεροποιηθεί πάνω από τους 12 °C, δηλαδή από τέλη Φεβρουαρίου έως τέλη Απριλίου, ανάλογα την περιοχή.

Τα σπαράγγια φυτεύονται σε γραμμές μέσα στα αυλάκια. Οι αποστάσεις φύτευσης μεταξύ των γραμμών είναι από 2.20-2.50 m, ενώ πάνω στη γραμμή είναι από 30-33 cm. Φυτεύονται περίπου 1100-1200 ριζώματα ανά στρέμμα. Μετά τη φύτευση πρέπει να γίνει ένα πότισμά σε περίπτωση που ο καιρός δεν είναι βροχερός.

Πριν από τη φύτευση των ριζωμάτων πρέπει να διασκορπιστεί κοκκώδες εντομοκτόνο για την αντιμετώπιση προσβολών από έντομα εδάφους.

#### 2.1.5. Αμειψισπορά

Αν και το σπαράγγι θεωρείται καλλιέργεια που βελτιώνει την ποιότητα του εδάφους, εντούτοις θα πρέπει να αποφεύγεται η εγκατάσταση νέας καλλιέργειας σπαραγγιού σε εδάφη όπου πριν καλλιεργούνταν σπαράγγι, λόγω εκκρίσεων τοξικών ουσιών από τις ρίζες (πρόβλημα επαναφύτευσης σπαραγγοκαλλιιεργειών). Καλό είναι στο χωράφι που θα καλλιεργηθεί σπαράγγι να έχει προηγηθεί καλλιέργεια κάποιου σιτηρού.



## 2.2. ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΕΣ ΦΡΟΝΤΙΔΕΣ

### 2.2.1. Λίπανση

Ο αριθμός και το βάρος των σπαραγγιών όπως επίσης η πρωιμότητα και η ποιότητα είναι καθοριστικοί παράγοντες, για την απόδοση μιας σπαραγγοκαλλιέργειας. Για το σπαράγγι το ρίζωμα έχει αποταμιευτικό ρόλο για τις αποθησαυριστικές ουσίες.

Κρίσιμο στάδιο στην ανάπτυξη του σπαραγγιού αποτελεί το στάδιο πριν τη συγκομιδή όπου οι βλαστοί χρειάζονται τις μεγαλύτερες ποσότητες από τα θρεπτικά στοιχεία. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να διατεθούν έγκαιρα τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία και στις κατάλληλες ποσότητες.

Το σπαράγγι έχει ανάγκη από άζωτο και κάλιο, ενώ ο φωσφόρος θα πρέπει να διατίθεται σε μικρότερες ποσότητες. Μείωση της ποσότητας του αζώτου και του καλίου έχει ως συνέπεια τη μείωση του αριθμού και του βάρους των βλαστών (πίνακας 2).

Πίνακας 2. Ετήσιες ανάγκες καλλιέργειών σπαραγγιού σε N, P, και K.

Στάδια χρονικά	N (kg/στρ)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (kg/στρ.)	K <sub>2</sub> O (kg/στρ.)	Χρόνος εφαρμογής
1 <sup>ος</sup> χρόνος φυτέματος	-	10	-	Πριν από το βαθύ όργωμα
1 <sup>ος</sup> χρόνος φυτέματος	9	-	9	Στη γραμμή φυτέματος τέλη Απριλίου-τέλη Μαΐου χωρίς πότισμα, Ιούνιο με πότισμα
2 <sup>ος</sup> χρόνος	9	4,5	9	Στη γραμμή φυτέματος, τέλη Απριλίου
2 <sup>ος</sup> χρόνος	9	-	9	Τέλη Μαΐου χωρίς πότισμα, τέλη Ιουνίου με πότισμα
3 <sup>ος</sup> χρόνος	5	4,5	5	Στη γραμμή φυτέματος, τέλη Μαρτίου
3 <sup>ος</sup> χρόνος	9	-	9	Τέλη Μαΐου χωρίς πότισμα
3 <sup>ος</sup> χρόνος	4	-	4	Τέλη Ιουνίου με πότισμα 25-35mm
4 <sup>ος</sup> χρόνος και μετά	5	4,5	5	Δύο μήνες πριν από τα τέλη της συγκομιδής
4 <sup>ος</sup> χρόνος και μετά	9	-	9	Αμέσως μετά τη συγκομιδή ή έπειτα από 15 ημέρες με πότισμα
4 <sup>ος</sup> χρόνος και μετά	4	-	4	Ένα μήνα μετά το τέλος της συγκομιδής με πότισμα

Πηγή: Αγγίδης (1986)

### 2.2.2. Άρδευση

Δεν απαιτείται πότισμα την περίοδο της συγκομιδής (άνοιξη), εκτός αν δεν βρέξει καθόλου. Τις μεγαλύτερες ανάγκες τις παρουσιάζει τον Ιούνιο-Ιούλιο καθώς και Δεκέμβριο με Φεβρουάριο. Ανάλογα δε με τον τύπο του εδάφους καθορίζεται και η δόση άρδευσης. Έτσι σε αμμώδη εδάφη συνιστώνται 15-20 m<sup>3</sup> ανά στρέμμα, κάθε 15 ημέρες, ενώ για ιλυοαμμώδη εδάφη 20-25 m<sup>3</sup> ανά στρέμμα, κάθε 20 ημέρες.



Εικόνα 1. Καλλιέργεια σπαραγγιού (φωτ. Κ. Ελένα)



Εικόνα 2. Συγκομιδή σπαραγγιού (φωτ. Κ. Ελένα)

## 2.2.3. Φυτοπροστασία

Τ Ε Ι Κ Α Λ Α Μ Α Τ Α Σ  
Ι Μ Η Μ Α  
Ε Κ Δ Ο Σ Ε Ω Ν & Β Ι Β Λ Ι Ο Θ Η Κ Η Σ

### 2.2.3.1. Ζιζανιοκτονία

Επειδή η καλλιέργεια του σπαραγγιού είναι πολυετής, τα ζιζάνια θεωρούνται από τους πιο επιζήμιους παράγοντες που μπορούν να μειώσουν την απόδοση μιας καλλιέργειας. Η χρήση ζιζανιοκτόνων είναι απαραίτητη για τον έλεγχο και την καταπολέμησή τους. Τα συνιστώμενα ζιζανιοκτόνα, το στάδιο εφαρμογής καθώς και η συνιστώμενες δόσεις, φαίνονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3: Συνιστώμενα ζιζανιοκτόνα για την καλλιέργεια το σπαραγγιού

Είδος ζιζανιοκτόνου	Δοσολογία (γρ.δρ.ουσίας/στρ)	Στάδιο καλλιέργειας	Συνθήκες για επιτυχία	Διάρκεια δράσης
DIURON	50-80	Πρίν από την εμφάνιση βλαστών τον 1 <sup>ο</sup> χρόνο	Χώμα υγρό αμέσως μετά το φύτεμα	2-3 μήνες
	100-150	Από το 2 <sup>ο</sup> χρόνο και μετά	Αμέσως μετά την επιχωμάτωση	2-3 μήνες
METRIBUZINE	50-88	Από το 1 <sup>ο</sup> και 2 <sup>ο</sup> χρόνο και μετά	Χωράφι φρεσκοοργωμένο	3-4 μήνες
DIQUAT	80	Πρίν από την εμφάνιση των βλαστών	Πρίν βλαστήσουν τα σπαράγγια	Δεν έχουν διάρκεια
MONOLINURON	100	Από το 3 <sup>ο</sup> χρόνος και μετά	Έδαφος υγρό	2-3 μήνες
LINURON	70	Από το 3 <sup>ο</sup> χρόνο και μετά	Πρίν αναπτυχθεί η αγριόβρωμη	3 μήνες
SIMAZINE	250	Από το 3 <sup>ο</sup> χρόνο και μετά	Πρίν βλαστήσουν τα σπαράγγια	6 μήνες και πάνω
2,4- DAMINE	75-100	Από το 3 <sup>ο</sup> χρόνο και μετά	Βαθύρριζα όπως τα γαιδουράγκαθα	Ελικίνδυνο για γειτον. φυτείες
GLYPHOSATE	70-100	Πρίν εγκατασταθεί η καλλιέργεια	Έδαφος υγρό	2 μήνες
OXADIAZONE	200-300	Από το 2 <sup>ο</sup> χρόνο και μετά	Στο σαμάρωμα	6 μήνες

Πηγή: Αγγίδης (1986)

### 2.2.3.2. Αντιμετώπιση ζωϊκών εχθρών

#### *Parahyopta (Hyopta) caestrum* Hbn., Lepidoptera-Cossidae

Ανήκει στην κατηγορία των λεπιδοπτέρων. Η προνύμφη στην πλήρη ανάπτυξη της φτάνει σε μέγεθος 4-5 εκ. νυμφώνεται μέσα σε βομβύκιο. Τα ακμαία εξέρχονται από το βομβύκιο το Μάιο-Ιούνιο, πετούν συνήθως τη νύκτα και έχουν διάρκεια ζωής 5-6 ημέρες. Τα θηλυκά γενούν τα αυγά τους στο λαιμό των βλαστών κάτω από την επιφάνεια του εδάφους. Η εκκόλαψη των αυγών διαρκεί 3-4 εβδομάδες. Οι νεαρές προνύμφες προσβάλλουν τα στελέχη και το ριζικό σύστημα των φυτών και μπορεί να προκαλέσουν την ολοκληρωτική ξήρανσή του. Η αντιμετώπιση του εντόμου γίνεται με καλλιεργητικές όσο και με χημικές μεθόδους. Έτσι συνιστάται η απομάκρυνση ηλικιωμένων προνυμφών και πωπών οι οποίες βρίσκονται μέσα στο "βομβύκιο νύμφωσης", με το χέρι κατά τη διάρκεια της συγκομιδής.

Επίσης μετά το τέλος της συγκομιδής να γίνεται αναμόχλευση του εδάφους, ώστε να καταστραφούν οι ηλικιωμένες προνύμφες. Από χημικής απόψεως συνιστώνται ψεκασμοί κυρίως με εντομοκτόνα όπως carbaryl, parathion methyl. Κατάλληλος χρόνος εφαρμογής



είναι τον Ιούλιο με κατευθυνόμενο ψεκάσμο στο λαιμό των φυτών (ριζοπότισμα) σε ποσότητες 200-250 λίτρα το στρέμμα.

### ***Brachycorynella asparagi*, Hem.-Aphididae (Αφίδα του σπαραγγιού)**

Η ζημιά που προκαλεί η αφίδα είναι σμίκρυνση των μεσογονατίων διαστημάτων και διαταραχή της ανάπτυξης. Τα φύλλα και οι μίσχοι αποκτούν μια φουντωτή, θυσσανώδη ανάπτυξη και τα φυτά μπορούν να ξεραθούν μετά από 2 χρόνια. Συνιστώνται ψεκάσμοι με dimethoate και methamidophos

### ***Phorbia platura*, Diptera – Anthomyiidae (κν. μύγα των σπόρων του φασολιού)**

Δίπτερο με μεγάλο αριθμό ξενιστών, όπως φασόλι, σπαράγγι, κρεμμύδι, πράσο. Οι προνύμφες του εντόμου προσβάλλουν τα τρυφερά στελέχη κοντά στο λαιμό (τέλη Μαΐου-αρχές Ιουνίου) και οι στοές που ορύσσουν προκαλούν ανώμαλη αύξηση του στελέχους και τη συστροφή του. Συνιστώνται ψεκάσμοι με chlopyrifos, το οποίο παρουσιάζει υπολειμματικότητα στο τελικό προϊόν.

### ***Crioceris duodecimpunctata*, Coleoptera-Crysomelidae**

Προσβάλλει κυρίως το φύλλωμα και συνιστάται ψεκάσμος με dimethoate, diazinon ή parathion

### ***Platyparea poeciloptera* Schrahk, Diptera-Tephritidae (Μύγα του σπαραγγιού)**

Πρόκειται για μια μικρή μύγα που το μέγεθός της δεν ξεπερνά το 1 εκ. Έχει μια γενιά το χρόνο και διαχειμάζει στο έδαφος στο στάδιο της πούπας σε υπόγεια τμήματα προσβεβλημένων βλαστών. Μετά το στάδιο της διαχείμασης τα νεαρά άτομα μετακινούνται στην επιφάνεια του εδάφους όπου συζευγνύονται και το θηλυκό γεννά τα αυγά στο έδαφος σε βάθος όχι μεγαλύτερο των 2mm. Οι νεαρές προνύμφες ορύσσουν στοές κάτω από την επιδερμίδα με κατεύθυνση τη ρίζα την οποία δεν προσβάλλουν ποτέ. Τα πρώτα συμπτώματα είναι η εμφάνιση μιας κατά μήκος βύθισης του στελέχους χρώματος καστανού λόγω νέκρωσης των ιστών που οδηγεί στη συστροφή του νεαρού βλαστού. Αντιμετωπίζεται με ψεκάσμούς φυλλώματος με dimethoate.

## **2.2.3.3. Αντιμετώπιση ασθενειών**

### **Σήψη ριζώματος, ριζών και βάσης στελεχών**

Θεωρείται μία από τις πιο σοβαρές και επιζήμιες ασθένειες για την καλλιέργεια του σπαραγγιού. Διεθνώς είναι γνωστή ως root rot ή crown rot ή wilt. Τα προβλήματα στην καλλιέργεια παρουσιάζονται συνήθως από το τρίτο έτος από την εγκατάσταση της καλλιέργειας. Τα συμπτώματα που παρατηρούνται κυρίως το καλοκαίρι στα πράσινα μέρη των φυτών είναι η χλώρωση και ο μαρασμός ενός ή περισσότερων βλαστών και τελικά η κατάρρευση των φυτών. Στη βάση των προσβεβλημένων στελεχών εμφανίζεται καστανός μεταχρωματισμός εσωτερικά, ενώ συχνά παρατηρούνται κηλίδες εξωτερικά. Στο εσωτερικό των ριζωμάτων παρατηρείται καστανός μεταχρωματισμός, ο οποίος αρχίζει

συνήθως από το σημείο έκφυσης των βλαστών και επεκτείνεται εσωτερικά, με αποτέλεσμα τη σήψη όλου του ριζώματος, το οποίο αποκτά τότε ινώδη υφή. Στις ρίζες, εμφανίζονται αρχικά ελλειπτικές καστανόχρωες κηλίδες ακόμη, και κατά την αποθήκευση των ριζωμάτων. Στη συνέχεια η σήψη επεκτείνεται, με αποτέλεσμα την τέλεια καταστροφή του παρεγχύματος, ώστε στο τέλος απομένει ο φλοιός και ο κεντρικός άξονας.

Τα αίτια που προκαλούν αυτή την ασθένεια είναι διάφοροι μύκητες κυρίως του γένους *Fusarium spp* και κατά δεύτερο λόγο *Rhizoctonia sp.*, *Phytophthora sp.* Στη χώρα μας επικρατέστερα παθογόνα είναι οι *Fusarium proliferatum* και *Fusarium oxysporum f.sp. asparagi*. Η ασθένεια μεταδίδεται με το σπόρο, τα ριζώματα, τα φυτικά υπολείμματα και το έδαφος. Ευνοείται από χαμηλό pH, υπερβολικές αζωτούχες λιπάνσεις, θερμοκρασίες από 24-30°C και υψηλή σχετική υγρασία.

Για την αντιμετώπιση συνιστώνται:

- Απολύμανση του εδάφους όταν πρόκειται για την παραγωγή ριζωμάτων
- Απολύμανση σπόρου με thiram
- Χρησιμοποίηση υγιών μοσχευμάτων χωρίς συμπτώματα προσβολών
- Απομάκρυνση από τον αγρό με προσοχή των προσβεβλημένων φυτών με τα ριζώματα και το χώμα γύρω από αυτά, ώστε να μην διασκορπίζεται χώμα και ρίζες στην υπόλοιπη καλλιέργεια
- Η συγκομιδή να αρχίζει μετά το 3ο έτος και να έχει όσο το δυνατόν μικρότερη διάρκεια
- Εγκατάσταση νέων καλλιεργειών σε εδάφη όπου πριν δεν καλλιεργούνταν σπαράγγι, με καλά αποστραγγιζόμενο έδαφος και pH 6.5-7.5
- Αποφυγή εξασθένησης των φυτών από ασθένειες ή λόγω προσβολής από διάφορους εχθρούς, καθώς και λόγω κακών συνθηκών καλλιέργειας όπως κακή θρέψη, όχι κανονική άρδευση.

## Σκωρίαση

Η σκωρίαση, εκτός από το καλλιεργούμενο σπαράγγι, προσβάλλει και το άγριο. Τα συμπτώματα στο σπαράγγι δεν φαίνονται στους λευκούς βλαστούς που προορίζονται για πώληση στο εμπόριο, αλλά στα πράσινα μέρη του φυτού. Τα συμπτώματα εμφανίζονται σε 4 στάδια, δηλαδή ο μύκητας είναι αυτόοικος, μακροκυκλικός. Έτσι την άνοιξη παρατηρούνται πάνω στα στελέχη οβάλ σχηματισμοί στους οποίους σχηματίζονται τα σπερμογόνια και αικίδια. Μετά από 2-3 εβδομάδες προχωρούν στο στάδιο των ουρεδοσπορίων, τα οποία φαίνονται σαν "σκουριά" πάνω στα φύλλα και στους βλαστούς.

Το αποτέλεσμα της προσβολής είναι η μείωση τού ριζικού συστήματος με αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής την επόμενη βλαστική περίοδο.

Το παθογόνο που προκαλεί την ασθένεια αυτή είναι ο μύκητας *Puccinia asparagi* που ανήκει στην οικογένεια *Pucciniaceae* της τάξης *Uredinales* των Βασιδιομυκήτων

Διαχειμάζει με τη μορφή των τελειοσπορίων σε προσβεβλημένα στελέχη. Ο μύκητας ευνοείται από θερμοκρασίες 25-30 °C, ενώ για τις αρχικές μολύνσεις είναι απαραίτητη η υγρασία για 3 ώρες και θερμοκρασία 15 °C.



Για την αντιμετώπιση συνιστώνται τα εξής:

- Απομάκρυνση και καύση των προσβεβλημένων στελεχών
- Απομάκρυνση των φυτών-ξενιστών του μύκητα
- Να γίνονται επεμβάσεις με μυκητοκτόνα όπως maneb, metiram, carbendazim+maneb, mancozeb+χαλκούχο, ziram,, pyracarbolid, cyproconazole κ.ά.

### Κηλίδωση ή καλοκαιρινό κάψιμο

Η ασθένεια εμφανίστηκε για πρώτη φορά στη χώρα μας τον Οκτώβριο το 1991 σε σπαραγγοκαλλιέργειες στην Ορεστιάδα του Έβρου και από τότε προκαλεί σοβαρές ζημιές παντού όπου καλλιεργείται σπαράγγι.

Το παθογόνο αίτιο είναι ο μύκητας *Stemphylium botryosum*. Προσβάλλει το στέλεχος, τις βελόνες και τους κλάδους των φυτών προκαλώντας κιτρίνισμα των βλαστών οι οποίοι στη συνέχεια γίνονται κοκκινοκάστανοι. Το αποτέλεσμα από την προσβολή στις βελόνες είναι η σημαντική μείωση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας του φυτού με άμεση συνέπεια την μείωση της παραγωγής τον επόμενο χρόνο.

Ο μύκητας διαχειμάζει στα υπολείμματα της προηγούμενης καλλιέργειας με την τέλεια μορφή του που είναι ο μύκητας *Pleospora herbarum*. Οι πρώτες μολύνσεις προέρχονται από τα ασκοσπόρια της τέλειας μορφής του.

Ευνοϊκές συνθήκες για την ασθένεια είναι η υψηλή υγρασία και θερμοκρασία από 18-25 °C.

Για την αντιμετώπιση της κηλίδωσης συνιστώνται τα εξής:

- Καταστροφή ή βαθύ παράχωμα των υπολειμμάτων τις προηγούμενης καλλιέργειας
- Καταστροφή των φυτών-ξενιστών
- Επειδή για την ασθένεια δεν υπάρχουν εγκεκριμένα μυκητοκτόνα μπορεί να γίνει επέμβαση με maneb ή mancozeb που χρησιμοποιούνται και για την σκωρίαση. Επίσης πολύ καλά αποτελέσματα έχει και το chlorothalonil, το οποίο όμως δεν έχει έγκριση για το σπαράγγι στην χώρα μας.

## Ιώσεις

Εκτός από μυκητολογικές ασθένειες, το σπαράγγι προσβάλλεται και από ιούς. Στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρονται 7 ιοί που προσβάλλουν το σπαράγγι. Οι ιοί προδιαθέτουν το σπαράγγι στη μόλυνση από μύκητες του γένους *Fusarium sp.* Οι κυριότεροι ιοί, ο τρόπος μετάδοσης τους στη φύση καθώς και οι φυσικοί τους ξενιστές, αναφέρονται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4. Οι κυριότεροι ιοί του σπαραγγιού

Ιός	Μετάδοση στη φύση	Φυσικοί ξενιστές
<i>Asparagus 1 virus</i> (AV-1) Γένος <i>Potyvirus</i>	<i>Myzus persicae</i> <i>Aphis craccivora</i>	<i>Asparagus officinalis</i>
<i>Asparagus 2 virus</i> (AV-2) Γένος <i>Lilarvirus</i>	Σπόρος, γύρη	<i>Asparagus officinalis</i>
<i>Tobacco streak virus</i> (TSV) Γένος <i>Lilarvirus</i>	Θρίπες: <i>Frankliniella occidentalis</i> , <i>Thrips tabaci</i> , Σπόρος, γύρη	10 είδη σε 6 οικογένειες
<i>Asparagus 3 virus</i> (AV-3) Γένος <i>Potexvirus</i>	Φυτικός χυμός, εργαλεία, χέρια	<i>Asparagus officinalis</i>
<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV) Γένος <i>Cucumovirus</i>	Πάνω από 60 είδη αφίδων	Πολύ μεγάλο εύρος ξενιστών
<i>Arabis mosaic virus</i> (AMV) Γένος <i>Nepovirus</i>	Σπόρος, νηματώδεις <i>Xiphinema diversicaudatum</i> , <i>Xiphinema bakeri</i> , <i>Xiphinema coxi</i>	58 είδη που ανήκουν σε περισσότερες από 9 οικογένειες
<i>Strawberry latent ring spot</i> (SLRSV) Γένος <i>Nepovirus</i>	Νηματώδης <i>Xiphinema diversicaudatum</i>	25 είδη που ανήκουν σε περισσότερες από 9 οικογένειες

ΠΗΓΗ: Κ.Ελένα, Φ.Μπέμ, Γ.Τραγιάνος (2001).

**ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ  
(ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ)**

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ  
ΔΟΚΙΜΕΣ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *Fusarium  
proliferatum* ΣΕ ΣΠΟΡΟΦΥΤΑ ΣΠΑΡΑΓΓΙΟΥ**

## 1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί η παθογένεια των διαφόρων απομονώσεων του μύκητα *Fusarium proliferatum* στο σπαράγγι. Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 20 απομονώσεις του μύκητα, οι οποίες προέρχονταν από διάφορους ξενιστές, όπως καλαμπόκι, ορχιδέα, έντομα που προσβάλλουν το σπαράγγι και από δείγματα σπαραγγιού που είχαν προσκομισθεί κατά καιρούς από διάφορους παραγωγούς στο εργαστήριο μυκητολογίας του Μπενακειού Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου ή είχαν μαζευτεί από τον αγρό.

Οι απομονώσεις του *Fusarium proliferatum* που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: F612, F620, F621, F626, F627, F628, F629, F630, F632, F635, F638, F639, F641, F643, F644, F645, F646, F647, F652, F654 σύμφωνα με την αρίθμηση της συλλογής του *Fusarium proliferatum* του εργαστηρίου μυκητολογίας του Μ.Φ.Ι.

Αρχικά έγινε μεταφορά των απομονώσεων σε τρυβλία με υλικό PDA (Potato Dextrose Agar) για την ανάπτυξη του μύκητα, παράλληλα σε δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετήθηκε θρεπτικό υλικό Hoagland που θα χρησίμευε σαν μέσο για την ανάπτυξη των σπαραγγιών τα οποία είχαν τοποθετηθεί σε ειδικό χώρο για την προβλάστησή τους. Έγινε επώαση των καλλιιεργειών για 7 ημέρες και σε θερμοκρασία 27 °C στο θάλαμο ανάπτυξης καλλιιεργειών.

Στη συνέχεια πάρθηκαν μυκηλιακοί δίσκοι διαστάσεων 5 mm και τοποθετήθηκαν στους σωλήνες με το υλικό Hoagland, μετά 3 ημέρες εμφυτεύτηκαν τα προβλαστημένα σπαράγγια. Έγιναν 3 επαναλήψεις χρησιμοποιώντας κάθε φορά μάρτυρα (control).

Ιδιαίτερα μολυσματικές ήταν οι απομονώσεις: **F 612, F 620, F 626, F 627, F 628, F 629, F 630, F 632, F 644, F 645, F 646** στις οποίες παρατηρήθηκε νέκρωση ολόκληρου του φυτού. Ειδικότερα στις **F 612, F 620, F 630, F 645, F 646** παρατηρήθηκαν στη ρίζα καφέ μεταχρωματισμοί σε κηλίδες που οφείλονταν σε σοβαρή προσβολή του ριζικού συστήματος από το μύκητα. Σε όλες τις απομονώσεις, στο υπέργειο τμήμα, παρατηρήθηκε η λευκή εξάνθηση του μύκητα σε όλο το φυτό ή σε τμήματα του βλαστού τα οποία αργότερα νεκρώθηκαν. Στις απομονώσεις **F 621, F 635, F 639, F 643, F 644** από τις τρεις επαναλήψεις σε ισάριθμους σωλήνες σε έναν παρατηρήθηκε νέκρωση του φυτού, ενώ στους άλλους τα φυτά ήταν προσβεβλημένα κατά ένα ποσοστό

## 2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι μύκητες *Fusarium proliferatum* και *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* είναι τα σπουδαιότερα αίτια για την παρακμή (decline), η οποία αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα στην καλλιέργεια του σπαραγγιού τόσο στην Ελλάδα όσο και παγκόσμια. Η παρακμή μπορεί να προκαλέσει προβλήματα σε καλλιέργεια σπαραγγιού που εγκαθίσταται σε νέα εδάφη, αλλά κυρίως σε καλλιέργεια που εγκαθίσταται σε εδάφη που πριν υπήρχε καλλιέργεια σπαραγγιού. Η παρακμή σε επανεγκατεστημένη καλλιέργεια προκαλεί μεγάλα προβλήματα. Σε Γερμανία και Γαλλία, το πρόβλημα της παρακμής σε εδάφη όπου καλλιεργούνταν με σπαράγγι, είναι γνωστό από τις αρχές του 1850.

Σε νεοεγκατεστημένες καλλιέργειες σπαραγγιού το πρόβλημα εμφανίζεται συνήθως μετά από 8-12 χρόνια. Στην Ελλάδα - στις περιοχές που καλλιεργείται το σπαράγγι - το πρόβλημα της παρακμής είναι ήδη έντονο

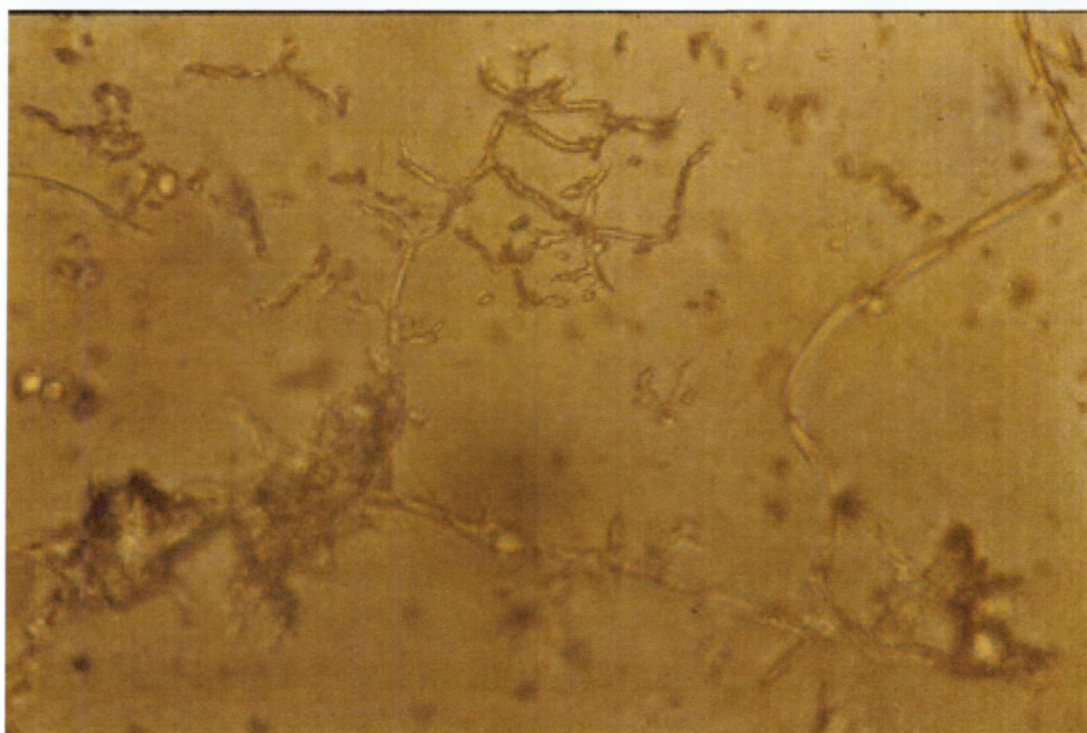


Το 2<sup>ο</sup> παθογόνο προσβάλλει μόνο το σπαράγγι. Η προέλευση του μολύσματος είναι ένας σημαντικός παράγοντας διαχωρισμού του *F. proliferatum* από το συγγενές είδος το *F. oxysporum* f.sp. *asparagi*. Έτσι, η ύπαρξη προηγούμενης ή γειτονικής καλλιέργειας σπαραγγιού δεν είναι απαραίτητος παράγοντας για την εμφάνιση προσβολής από το παθογόνο *F. proliferatum*. Η εμφάνιση της ασθένειας μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη άλλων φυτών-ξενιστών του μύκητα, όπως επίσης και διάφορα έντομα που λειτουργούν ως μεταφορείς του μολύσματος.

Από τα παραπάνω είναι φανερό ότι η επιλογή της σπαραγγοκαλλιέργειας είναι συνάρτηση αφενός μεν του χώρου και της προηγούμενης καλλιέργειας και αφετέρου δε και των γειτονικών καλλιεργειών που τυχόν υπάρχουν.

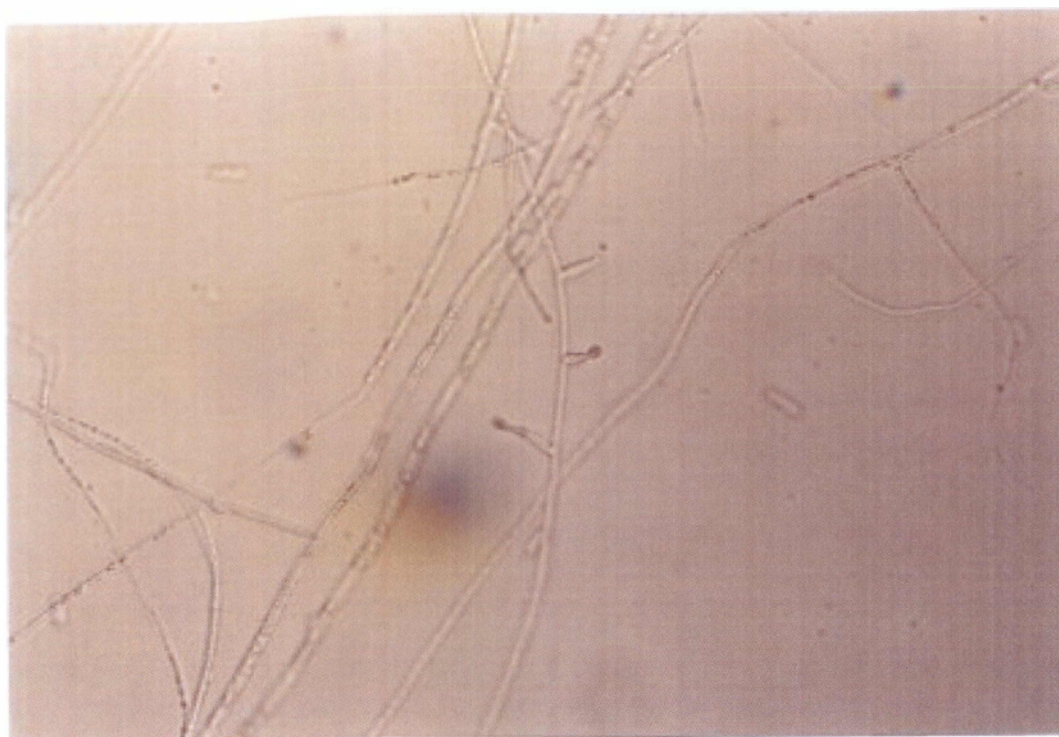
Ο μύκητας *Fusarium proliferatum* σχηματίζει μικροκονίδια σε αλυσίδες, που είναι είναι ελλειψοειδή με διαστάσεις 5-15X2-3,5 μm, ενώ δεν σχηματίζει ποτέ γλαμυδοσπόρια. Μακροκονίδια σχηματίζονται σπάνια σε καλλιέργεια. Έχουν 3-5 σέπτα και διαστάσεις 28-46X2.5-4 μm. Τα κονίδια παράγονται σε μονοφιαλίδια και πολυφιαλίδια (εικ. 3). Ο σχηματισμός των πολυφιαλιδίων είναι και το κύριο γνώρισμα με το οποίο ξεχωρίζει από το συγγενές του είδος *Fusarium moniliforme*. Τα πολυφιαλίδια σχηματίζονται εύκολα σε υλικό με εκχύλισμα φύλλων γαριφαλιάς. Οι διαστάσεις τους είναι 14-28X1.5-4 μm.

Το είδος *Fusarium oxysporum* f.sp. *asparagi* σχηματίζει μικροκονίδια πάνω σε φιαλίδια, τα οποία βγαίνουν από τις υφές ή από κοντούς κονιδιοφόρους (εικ. 4). Το σχήμα των μικροκονιδίων ποικίλλει από ελλειψοειδή κυλινδρικά έως επιμήκη με διαστάσεις από 5-12X2,2-3,5 μm. Τα μακροκονίδια είναι κατά κανόνα λεπτά με 3-5 σέπτα, ενώ στα άκρα τους παρατηρείται μια μικρή κάμψη. Το μέγεθος τους κυμαίνεται από 27-46X3-4,5μm. Ο μύκητας διαχειμάζει στο έδαφος με τη μορφή των γλαμυδοσπορίων, για πολλά χρόνια. Τα γλαμυδοσπόρια σχηματίζονται είτε σε ζεύγη είτε σε αλυσίδες.



Εικόνα 3. Πολυφιαλίδια και μικροκονίδια του μύκητα *Fusarium proliferatum* σε αλυσίδες (φωτ.απο μικροσκόπιο, Κ. Ελένα)





Εικόνα 4. Φιαλίδια και μικροκονίδια του μύκητα *Fusarium oxysporum f.sp. arparagi* (φωτ.απο μικροσκόπιο , Κ. Ελένα)

### **3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά:

#### **Potato Dextrose Agar (PDA)**

Είναι ένα πλούσιο θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη του μύκητα σε τρυβλία και δοκιμαστικούς σωλήνες. Για την παρασκευή του υλικού ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία.

Παρασκευάστηκαν 800 ml από το υλικό PDA. Χρησιμοποιήθηκε έτοιμο της εταιρίας BIOKAR DIAGNOSTICS με σύνθεση:

-Potato Extract	4 g/l
-Glucose	20 g/l
-Bacteriological Agar	15 g/l

Η αναλογία του έτοιμου υλικού PDA είναι 39 g στο λίτρο (1000 ml). Για την παρασκευή 800 ml πρέπει να χρησιμοποιηθούν 31,2 g από το έτοιμο PDA.

Για τη ζύγιση χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονικός ζυγός πάνω στο οποίο τοποθετήθηκε κομμάτι αλουμινόχαρτου, μετρήθηκε το απόβαρο, μηδενίστηκε η ένδειξη και στη συνέχεια με τη βοήθεια μικρού κουταλιού που βρίσκεται μέσα σε βάζο με αιθυλική αλκοόλη, για λόγους απολύμανσης, μεταφέρθηκε η προαναφερόμενη ποσότητα των 31,2 g σκόνης υλικού PDA.

Στη συνέχεια το υλικό τοποθετήθηκε σε κωνική φιάλη των 1000 ml, συμπληρώθηκε με αποσταγμένο νερό έως όγκου 800 ml, μετρούμενο με ογκομετρικό κύλινδρο.

Όταν τελειώσει η συμπλήρωση με το νερό, πωματίστηκε με βαμβάκι, κλείστηκε με αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκε στο αυτόκλειστο για αποστείρωση στους 115°C για 20 min και με πίεση 1,05 bars.

Μετά το πέρας της αποστείρωσης η κωνική φιάλη τοποθετήθηκε σε πάγκο, ώστε το υλικό να αποκτήσει τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος προτού μεταφερθεί στα τρυβλία.

### **Θρεπτικό διάλυμα Hoagland**

Είναι ένα πλούσιο θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη των σπαραγγιών μέσα στους δοκιμαστικούς σωλήνες. Η παρασκευή του υλικού Hoagland έγινε σε 5 στάδια.

Στο πρώτο στάδιο παρασκευάστηκε το διάλυμα **solution A**, με την παρακάτω αναλογία υλικών και διαδικασία.

#### **solution A**

- 280 mg  $H_3BO_3$
- 340 mg  $MnSO_4 \cdot H_2O$
- 10 mg  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
- 22 mg  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$
- 10 mg  $(NH_4)_6 MO_7 \cdot O_{24} \cdot 4H_2O$
- 100 ml αποστειρωμένο νερό

Αποθήκευση στους 4°C

Για τη ζύγιση χρησιμοποιήθηκαν κομμάτια αλουμινόχαρτου, τα οποία αφού ζυγίστηκαν και βρέθηκε το απόβαρο ξαναμηδενίστηκε ο ζυγός και έγινε η ζύγιση των υλικών. Μετά από κάθε μέτρηση οι ποσότητες τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη των 200 ml. Στη συνέχεια προστέθηκαν τα 100 ml αποσταγμένου νερού, πλένοντας κάθε φορά τα κομμάτια του αλουμινόχαρτου. Κατόπιν μεταφέρθηκε για αποθήκευση στο ψυγείο στους 4°C.

Στο δεύτερο στάδιο παρασκευάστηκε το επόμενο διάλυμα το **solution B**, με την παρακάτω αναλογία και διαδικασία:

#### **Solution B**

- 0.5 ml πυκνό  $H_2SO_4$
- 100 ml αποστειρωμένο νερό
- Αποθήκευση στους 4°C

Για το **solution B** χρησιμοποιήθηκε κωνική φιάλη των 200 ml. Στο δεύτερο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε πυκνόθεικό οξύ ( $H_2SO_4$ ) σε ποσότητα ίση με 0,5 ml, η οποία πάρθηκε με τη χρήση μικροπιπέτας από το έτοιμο διάλυμα, το οποίο τοποθετήθηκε στην κωνική φιάλη των 200 ml και συμπληρώθηκε με αποστειρωμένο νερό όγκου 100 ml. Όπως και στο **solution A**, έτσι και το **solution B** μεταφέρθηκε για αποθήκευση στο ψυγείο στους 4°C.

Στο  τρίτο στάδιο παρασκευάστηκε το **solution C**. Στο διάλυμα αυτό ζυγίστηκε, στον ηλεκτρονικό ζυγό, ποσότητα NaFeEDTA ίση με 6,74 g. Για τη ζύγιση χρησιμοποιήθηκε κομμάτι αλουμινόχαρτου, στο οποίο αφού μετρήθηκε το απόβαρο και μηδενίστηκε ο ζυγός, με τη βοήθεια μικρού κουταλιού, που βρίσκεται σε δοχείο με αιθυλική αλκοόλη, πάρθηκε ποσότητα από το δοχείο με το σύμπλοκο NaFeEDTA ίση με την προαναφερθείσα.

Στη συνέχεια η ποσότητα αυτή μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη των 500 ml, όπου συμπληρώνεται με αποστειρωμένο νερό, όγκου 500 ml πλένοντας ταυτόχρονα και το κομμάτι του αλουμινοχαρτου ώστε να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα της σκόνης από αυτό. Η διάλυση της σκόνης του NaFeEDTA γίνεται με λίγη θερμοκρασία σε φλόγα, όπου θερμαίνεται η κωνική φιάλη ελαφρά μέχρις ότου να διαλυθεί η σκόνη. Στη συνέχεια η φιάλη τοποθετήθηκε σε πάγκο ώστε να αποκτήσει τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος, πριν μεταφερθεί στο ψυγείο για να μην σπάσει η φιάλη. Η μεταφορά στο ψυγείο έγινε την επόμενη μέρα όπου και παρέμεινε στους 4 C, μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

Στο τέταρτο στάδιο παρασκευάστηκε το **Hoagland's stock solution(10X)**.

Για το υλικό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά στις αντίστοιχες ποσότητες:

-4,7 g  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

-2,6 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

-3,3 g  $\text{KNO}_3$

-0,6 g  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$

-5 ml solution A

-0,5 ml solution B

- 500 ml αποστειρωμένο νερό

-Αποθήκευση στους 4 °C

Αρχικά κόπηκαν τμήματα από το αλουμινοχαρτο πάνω στα οποία θα τοποθετηθούν οι ποσότητες των υλικών που θα χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή του υλικού.

Αφού μετρήθηκε το απόβαρο του κάθε κομματιού, μηδενίστηκε η ένδειξη του ηλεκτρονικού ζυγού και ξεκίνησε η μέτρηση των απαιτούμενων ποσοτήτων από το κάθε υλικό.

Όλες οι παραπάνω ποσότητες τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη των 500 ml. Στη συνέχεια έγινε συμπλήρωση με απιονισμένο νερό όγκου 500 ml. Κατόπιν με τη χρήση ογκομετρούμενου σιφωνιού των 5 ml και του 1 ml αντίστοιχα, μετρήθηκαν 5 ml από το solution A και 0,5 ml από το solution B.

Μετά την παρασκευή του μεταφέρθηκε για αποθήκευση στους 4° C.

Στο πέμπτο και τελευταίο στάδιο του **Hoagland's nutrient solution** παρασκευάστηκε το **Hoagland's Nutrient Solution (1X)**. Για το υλικό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά:

- 100 ml (10X) stock solution
- 5 ml solution C
- Προσθέτω 1000 ml αποστειρωμένο νερό
- Ρυθμίζω το pH να είναι ίσο με 6 (pH=6)
- Προσθέτω 7,60 g άγαρ.

Αρχικά έγινε μεταφορά 100 ml από το (10X) stock solution με τη χρήση κωνικής φιάλης, κατόπιν με τη βοήθεια του σιφωνιού μεταφέρθηκαν 5 ml από το solution C και τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη των 1000 ml. Κατόπιν έγινε μέτρηση του pH, η τιμή του οποίου θα πρέπει να είναι ίση με 6 (pH=6). Σε περίπτωση που υπάρχει απόκλιση από την απαιτούμενη τιμή γίνεται διόρθωση με την προσθήκη βάσεως, αν το διάλυμα είναι όξινο, ενώ αν είναι βασικό προστίθεται κάποιο οξύ. Στην περίπτωση αυτή το διάλυμα ήταν όξινο και έγινε προσθήκη βάσης (NaOH).

Ολοκληρώνοντας την μέτρηση του pH ζυγίστηκαν στον ηλεκτρονικό ζυγό 7,60 g άγαρ και προστέθηκαν στην προηγούμενη κωνική φιάλη. Στη συνέχεια θερμάνθηκε το διάλυμα μέχρις ότου να διαλυθεί το άγαρ, ανακινώντας κάθε φορά τη φιάλη. Όταν το διάλυμα ομογενοποιήθηκε τότε απομακρύνθηκε από τη φλόγα και αφέθηκε μέχρι να αποκτήσει τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος.



Όταν το διάλυμα κρύωσε λίγο, τότε τοποθετήθηκε στο ντισπένσερ (Dispenser) και παράλληλα ετοιμάστηκαν οι δοκιμαστικοί σωλήνες. Ρυθμίστηκε η ένδειξη του μετρητή στα 13 ml και άρχισε το γέμισμα των σωλήνων. Συνολικά γεμίστηκαν 76 σωλήνες. Μετά από κάθε συμπλήρωση ο σωλήνας σφραγίστηκε με ειδικά πλαστικά πώματα και τοποθετήθηκαν όλοι μέσα σε σιδερένιο κουτί σε όρθια θέση, ούτως ώστε το επίπεδο επιφάνειας του υλικού να είναι σε οριζόντια θέση, και μεταφέρθηκαν στο αυτόκλειστο για αποστείρωση.

Μετά την αποστείρωση τα σιδερένια κουτιά τοποθετήθηκαν σε πάγκο μέχρι να αποκτήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος και να στερεοποιηθεί το διάλυμα των σωλήνων.

#### Απομονώσεις του μύκητα *Fusarium proliferatum*

Για τη δοκιμή παθογένειας στα σπορόφυτα σπαραγγιού χρησιμοποιήθηκαν απομονώσεις του *Fusarium proliferatum* που απομονώθηκαν από διάφορα φυτά που είχαν φέρει παραγωγοί στο εργαστήριο μυκητολογίας του Μ.Φ.Ι ή είχαν συλλεγεί από περιοδείες που έγιναν στους αγρούς. Τα στελέχη αυτά βρίσκονται στην συλλογή του εργαστηρίου μυκητολογίας Ινστιτούτου. Αναλυτικότερα:

Απομόνωση	Φυτό	Περιοχή
F 612	Σπαράγγι (ρίζωμα)	Χρυσούπολη
F 620	Καλαμπόκι (κόμβος)	Καρδίτσα
F 621	Καλαμπόκι (ρίζα)	Καρδίτσα
F 626	Σπαράγγι	Γιαννιτσά
F 627	Σπαράγγι	Νεάπολη Τριχωνίδας
F 628	Καλαμπόκι	Σέρρες
F 629	Καλαμπόκι	Σέρρες
F 630	Καλαμπόκι	Σέρρες
F 632	Ορχιδέα	Ηλεία
F 635	Σπαράγγι	Καβάλα
F 638	Καλαμπόκι (στελέχη)	Αγρίνιο
F 639	Σπαράγγι	Σαραγόσα
F 641	Σπαράγγι (ρίζωμα)	Ορεστιάδα
F 643	Σπαράγγι (ρίζωμα)	Ορεστιάδα
F 644	<i>Ophiomyia simplex</i> σε σπαράγγι	Καβάλα
F 645	Σπαράγγι (ρίζωμα)	Ορεστιάδα
F 646	Σπαράγγι (ρίζα)	Ορεστιάδα
F 647	Σπαράγγι	Καβάλα
F 652	<i>Delia platura</i> σε σπαράγγι	Βύσσα
F 654	<i>Hylemyia sp.</i> σε σπαράγγι	Βύσσα

#### Δημιουργία σποροφύτων σπαραγγιού

Για τη δημιουργία των σποροφύτων σπαραγγιού ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία. Αρχικά αφού έγιναν οι απαραίτητοι υπολογισμοί για τον αριθμό των σπόρων που θα χρησιμοποιηθούν, ετοιμάστηκε και ο αντίστοιχος αριθμός γυάλινων τρυβλίων Petri που χρησιμοποιήθηκαν για την προβλάστηση των σπόρων. Μέσα στα τρυβλία τοποθετήθηκε στρώση βαμβακιού και επάνω από το βαμβάκι διηθητικό χαρτί. Το διηθητικό χαρτί

χρησιμοποιήθηκε ώστε το ριζικό σύστημα του φυτού να μην μπλεχτεί με τις ίνες του βαμβακιού. Έγινε διαβροχή των δύο υλικών με αποσταγμένο νερό και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν τα γυάλινα τρυβλία σε μεταλλικές οβίδες και οδηγήθηκαν στο αυτόκλειστο για αποστείρωση στους 115° C και πίεση 1,05 bars για 20 λεπτά.

Τα τρυβλία μετά το τέλος της αποστείρωσης μεταφέρθηκαν σε χώρο του εργαστηρίου, μέσα στις οβίδες, όπου παρέμειναν ώστε να αποκτήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος και να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την προβλάστηση των σπόρων, χωρίς να υπάρχει πρόβλημα να προκληθούν εγκαύματα σε αυτούς. Τα γυάλινα τρυβλία λειτούργησαν ως μικρά προβλαστήρια για τη βλάστηση των σπόρων του σπαραγγιού υπό ασηπτικές συνθήκες.

Την επόμενη μέρα, και αφού τα τρυβλία απέκτησαν τη θερμοκρασία δωματίου, έγινε η καταμέτρηση των σπόρων. Μετρήθηκαν 130 σπόροι σπαραγγιού υβριδίου STELINE της Γαλλικής εταιρίας VILMORIN. Στη συνέχεια έγινε η απολύμανσή τους ως εξής: Αρχικά οι σπόροι εμβαπτίστηκαν σε αιθυλική αλκοόλη για 30 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια σε διάλυμα χλωρίνης (10%) του εμπορίου για 2 λεπτά. Η διαδικασία αυτή έγινε ούτως ώστε να απομακρυνθούν από τους σπόρους διάφοροι παθογόνοι μικροοργανισμοί όπως μύκητες ή βακτήρια, που θα μπορούσαν, με την ανάπτυξή τους, να προκαλέσουν προβλήματα κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Μετά την απολύμανση, οι σπόροι ξεπλύθηκαν με άφθονο αποστειρωμένο νερό και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί για να στεγνώσουν πριν γίνει η μεταφορά τους στα τρυβλία.

Η μεταφορά των σπόρων στα τρυβλία έγινε σε θάλαμο νηματικής ροής (laminar flow unit), ως εξής: Αρχικά έγινε απολύμανση του πάγκου εργασίας με αιθυλική αλκοόλη. Στη συνέχεια με τη βοήθεια της λαβίδας, εμβαπτίζοντάς την πρώτα σε αιθυλική αλκοόλη και καίγοντάς την στη φλόγα του καμινέτου, άρχισε η μεταφορά των σπόρων στα τρυβλία καίγοντας κάθε φορά τη λαβίδα. Σε κάθε τρυβλίο τοποθετήθηκαν 7 σπόροι. Μετά το τέλος της εργασίας τα τρυβλία με τους σπόρους μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών με κατάλληλες συνθήκες για την προβλάστηση των σπόρων. Συγκεκριμένα η θερμοκρασία ήταν στους 22-26 °C, η δε φωτοπερίοδος ήταν 16 ώρες.

Οι πρώτοι σπόροι βλάστησαν 10 ημέρες μετά την μεταφορά τους, όμως υπήρχε ανομοιομορφία ως προς το χρόνο προβλάστησης και έτσι το πείραμα έγινε σε 4 φάσεις χρησιμοποιώντας κάθε φορά τον αντίστοιχο αριθμό σπόρων τόσο για την μόλυνση όσο και για τους μάρτυρες (control) που χρησιμοποιούνταν σε κάθε φάση. Ο μέσος όρος των προβλαστημένων σπόρων καθημερινά ήταν 5, το δε ποσοστό βλαστικότητας κυμαίνονταν στο 50%.

### **Προετοιμασία μολύσματος**

Η προετοιμασία του μολύσματος έγινε ως εξής:

Αρχικά έγινε μεταφορά της κάθε απομόνωσης από το σωλήνα της συλλογής σε τρυβλίο Petri που είχε σαν θρεπτικό υπόστρωμα PDA (Potato Dextrose Agar), με τη μικροβιολογική βελόνα περνώντας την από οινόπνευμα και τη φλόγα του καμινέτου. Η όλη διαδικασία έγινε κάτω από απόλυτα ασηπτικές συνθήκες στο laminar flow.

Μετά το πέρας της εργασίας τα τρυβλία σφραγίστηκαν με παραφίλμ (parafilm) ώστε να αποτραπεί η είσοδος ακάρων καθώς και η ανάπτυξη δευτερογενών μικροοργανισμών όπως μύκητες και βακτήρια στο εσωτερικό του τρυβλίου και μεταφέρθηκαν στο θάλαμο καλλιέργειών, όπου επικρατούν οι κατάλληλες συνθήκες για την ανάπτυξή τους. Η θερμοκρασία στο θάλαμο ήταν 22 °C. Η επώαση του μύκητα στο θάλαμο καλλιέργειών διήρκεσε 7 ημέρες.



Όταν συμπληρώθηκε το παραπάνω διάστημα και αφού το μυκήλιο του μύκητα ήταν καλά αναπτυγμένο, με τη βοήθεια του φελλοτρυπητή κόπηκαν μυκηλιακοί δίσκοι διαστάσεων 5 mm περιφερειακά του μυκηλίου. Η διαδικασία έλαβε χώρα στο θάλαμο laminar flow περνώντας το φελλοτρυπητή πάνω από τη φλόγα του καμινέτου κάθε φορά.

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω σε κάθε απομόνωση έγιναν τρεις επαναλήψεις. Σε κάθε σωλήνα με υλικό Hoagland τοποθετήθηκαν 3 μυκηλιακοί δίσκοι με τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματίζουν ένα ισόπλευρο τρίγωνο με κορυφές τα μολύσματα της κάθε απομόνωσης. Εκτός από τους σωλήνες για την παθογένεια, χρησιμοποιήθηκαν και σωλήνες για μάρτυρες (control). Οι σωλήνες αντί του μολύσματος περιείχαν δίσκους από υλικό PDA (Potato Dextrose Agar), οι οποίοι τοποθετήθηκαν στους σωλήνες με τον ίδιο τρόπο όπως και τα μολύσματα του μύκητα.

Όταν ολοκληρώθηκε η μεταφορά των μολυσμάτων όλων των απομονώσεων καθώς και των μαρτύρων, οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε στατό και οδηγήθηκαν σε θάλαμο όπου παρέμειναν για 3 ημέρες έως ότου αναπτύχθηκε μυκήλιο στην επιφάνεια του υλικού Hoagland.

### **Μολύνσεις των σποροφύτων παραγγιού**

Τα σπορόφυτα που χρησιμοποιήθηκαν για τις μολύνσεις θα έπρεπε να έχουν ικανοποιητική ανάπτυξη τόσο στο υπόγειο τμήμα (ριζικό σύστημα) όσο και στο υπέργειο τμήμα (βλαστός). Επειδή όμως δεν υπήρχε ομοιόμορφη προβλάστηση των σπάρων έπρεπε να γίνει διαλογή των καταλληλότερων φυτών για τις μολύνσεις. Στα φυτά έγινε κοπή με νυστέρι τμήματος του ριζικού συστήματος ώστε το μήκος του να μην ξεπερνά το 1-1,5 cm, το δε μήκος του βλαστού δεν ξεπερνούσε το 1 cm. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν τα γυάλινα τρυβλία με τα σπορόφυτα στον θάλαμο laminar flow, για να γίνει η μεταφορά τους στους σωλήνες με το υλικό Hoagland για την ανάπτυξή τους.

Η μεταφορά τους έγινε ως εξής: Με τη βοήθεια της λαβίδας, περνώντας την από οινόπνευμα και πάνω από τη φλόγα του καμινέτου για αποστείρωση, λαμβάνοντας το κάθε σπορόφυτο χωριστά και αφού περάστηκε και το στόμιο του δοκιμαστικού σωλήνα από τη φλόγα του καμινέτου, τοποθετήθηκε το σπορόφυτο παραγγιού στο κέντρο του σωλήνα και κατ'επέκταση στο κέντρο του μολύσματος που ήταν ηλικίας 3 ημερών και το μυκήλιο είχε αναπτυχθεί. Κατά την τοποθέτηση έπρεπε να μπαίνει μέσα στο υλικό καλά όλο το ριζικό σύστημα του φυτού. Μετά το πέρας της εργασίας περάστηκε πάλι το στόμιο του δοκιμαστικού σωλήνα πάνω από τη φλόγα του καμινέτου και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε στατό για τη μεταφορά τους. Όλη η παραπάνω διαδικασία έγινε κάτω από απόλυτα ασηπτικές συνθήκες στον θάλαμο laminar flow.

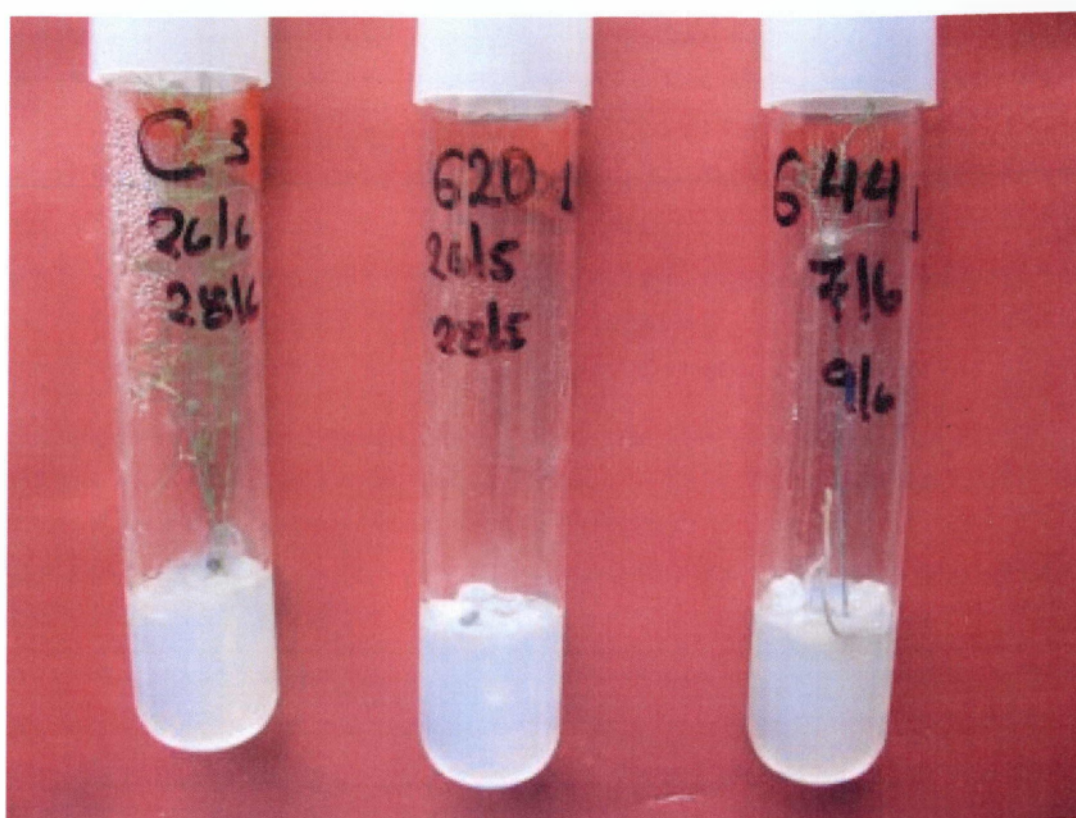
Αφού ολοκληρώθηκε όλη η παραπάνω εργασία για όλες τις απομονώσεις μεταφέρθηκαν, τα στατό που είχαν τους σωλήνες, σε δωμάτιο ανάπτυξης φυτών, όπου η θερμοκρασία κυμαίνονταν μεταξύ 22-26° C και η διάρκεια φωτοπερίοδου κυμαίνονταν στις 16 ώρες (16h), για την ανάπτυξη των σποροφύτων μέσα στο μολυσμένο, με το μύκητα, υλικό Hoagland. Στο δωμάτιο αυτό παρέμειναν για 45 ημέρες, ενώ ανά τακτά χρονικά διαστήματα γινόταν καταγραφή των παρατηρήσεων.

### **Αξιολόγηση παθογένειας**

Για την αξιολόγηση της παθογένειας χρησιμοποιήθηκε κλίμακα από 1-5, ανάλογα με την ένταση και έκταση των συμπτωμάτων

Ειδικότερα:

Συμπτώματα	Ποσοστό προσβολής (%)	*Δείκτης ασθένειας
Κανένα σύμπτωμα	0	1
Μερική μάρανση φυτών	0-25%	2
Μάρανση φυτών κατά το ½	25-50%	3
Μάρανση φυτών κατά τα ¾	50-75%	4
Νέκρωση φυτών	75-100%	5

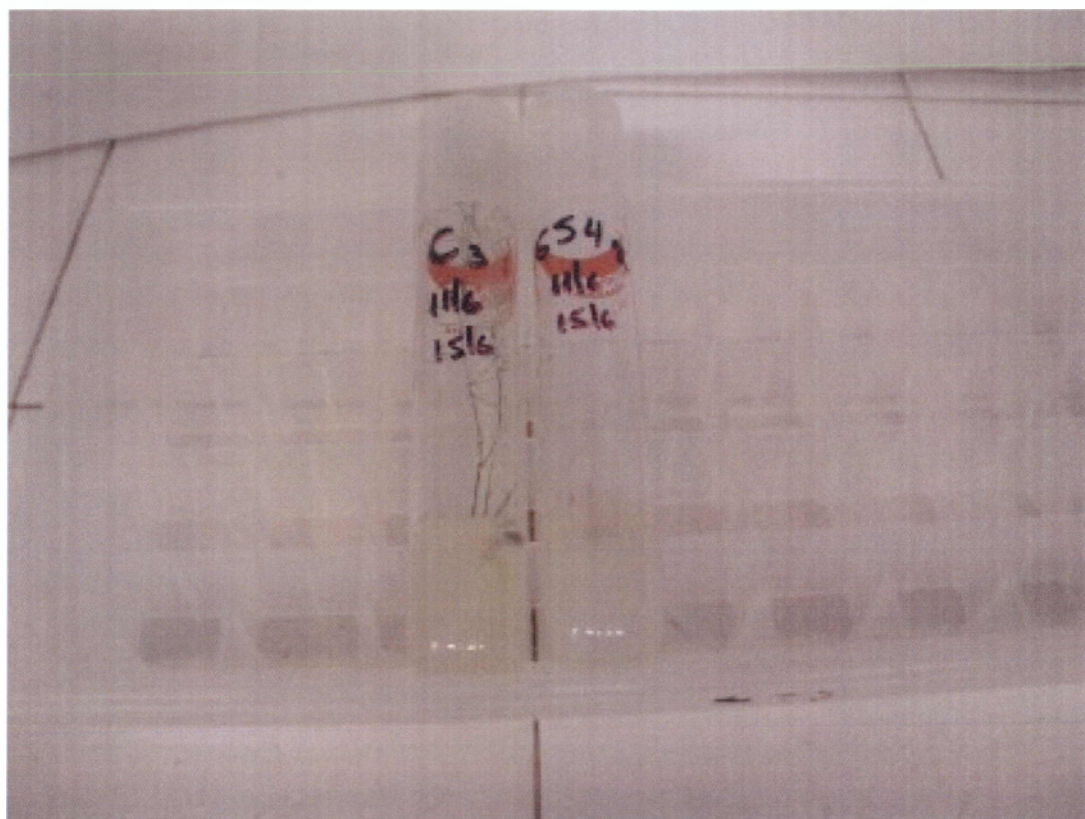


Εικόνα 5. Μολύνσεις με το μύκητα *Fusarium proliferatum*.

Αριστερά: Υγιές φυτό Μάρτυρας (control)

Μέσον: Η απομόνωση F 620 όπου το φυτό έχει νεκρωθεί.

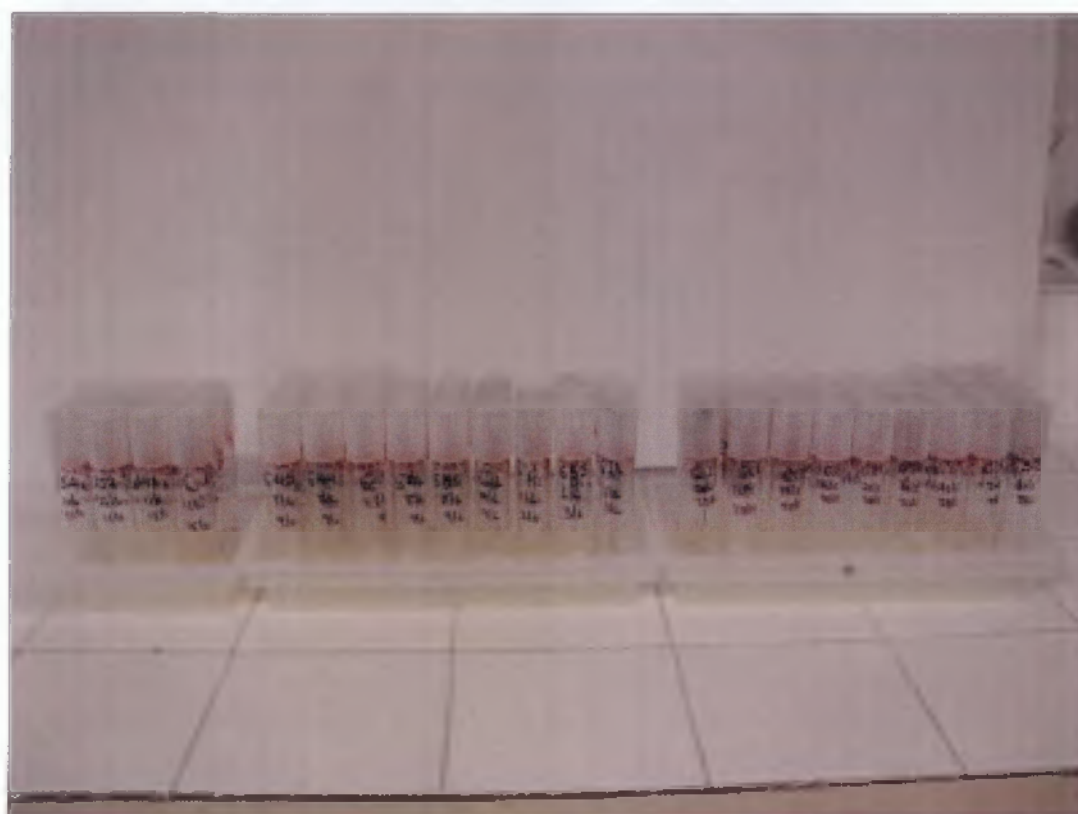
Δεξιά: η απομόνωση F 644 όπου έχει νεκρωθεί μέρος του φυτού.



Εικόνα 6. Μολύνσεις με το μύκητα *Fusarium proliferatum*

Αριστερά: Το υγιές φυτό μάρτυρας(control)

Δεξιά: Η απομόνωση F 654 όπου το φυτό έχει νεκρωθεί.



Εικόνα 7. Μολύνσεις σποροφύτων παραγωγού με το μύκητα *Fusarium proliferatum*.

Συνολική άποψη του πειράματος



#### 4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα του πειράματος φαίνονται συνοπτικά στον πίνακα 5.

Πίνακας 5. Αποτελέσματα μελέτης παθογένειας του μύκητα *Fusarium proliferatum* σε σπορόφοντα παραγγιού.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΙΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΝΕΚΡΩΝ ΦΥΤΩΝ	ΔΕΙΚΤΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ*	ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ (ΗΜΕΡΕΣ ΑΠΟ ΤΗ ΜΟΛΥΝΣΗ)
F 612	3	5	5
F 620	3	5	5
F 621	2	5	33
F 626	3	5	5
F 627	3	5	5
F 628	3	5	5
F 629	3	5	5
F 630	3	5	5
F 632	3	5	5
F 635	2	4	18
F 638	3	5	18
F 639	2	5	12
F 641	3	5	12
F 643	1	4	16
F 644	2	4	2
F 645	2	5	2
F 646	3	5	2
F 647	3	5	10
F 652	3	5	18
F 654	3	5	18



## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η απομόνωση **612** του *Fusarium proliferatum* προκάλεσε τη νέκρωση και των 3 φυτών που είχαν χρησιμοποιηθεί στους δοκιμαστικούς σωλήνες σε σύντομο χρονικό διάστημα. Αρχικά μετά από 3 ημέρες από τη μόλυνση παρατηρήθηκαν πάνω σε τμήματα του βλαστού οι λευκή εξάνθηση του παθογόνου μύκητα, που αργότερα κάλυψε το μεγαλύτερο μέρος του φυτού, ενώ ταυτόχρονα στο ριζικό σύστημα εμφανίστηκαν καστανόμαυρες κηλίδες υποδηλώνοντας την είσοδο του παθογόνου. Μετά το πέρας της 5<sup>ης</sup> ημέρας το φυτό νεκρώθηκε.

Η απομόνωση **620** προκάλεσε τη νέκρωση ολόκληρου του φυτού σε διάστημα 5 ημερών. Τα συμπτώματα ήταν η εμφάνιση σε όλο το φυτό της λευκής εξάνθησης του μύκητα. Από τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση **620** νεκρώθηκαν και τα 3.

Τα συμπτώματα που προκάλεσε η **621** απομόνωση η λευκή εξάνθηση του μύκητα μόνο σε τμήματα του βλαστού και του στελέχους αφενός, και αφετέρου δεν ήταν τόσο έντονα σε σχέση με τις **612**, **620**. Στους βλαστούς που μολύνθηκαν το ποσοστό προσβολής έφτανε το 80%, ενώ σε αντίθεση με τις προηγούμενες απομονώσεις δεν παρατηρήθηκαν καστανόμαυρες κηλίδες στο ριζικό σύστημα του σπαραγγιού. Επίσης από τα 3 φυτά μολύνθηκαν τα 2 με τα προαναφερθέντα συμπτώματα, ενώ στην 3<sup>η</sup> επανάληψη η προσβολή ήταν της τάξεως του 50%. Στη 1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> επανάληψη η νέκρωση έγινε 30 ημέρες μετά τη μόλυνση, ενώ στη 3<sup>η</sup> μετά από 33.

Η απομόνωση **626** παρουσίασε τα ίδια συμπτώματα με τις **612**, **620** στο ίδιο χρονικό διάστημα. Τα δε συμπτώματα ήταν η εμφάνιση της εξάνθησης του μύκητα κατά μήκος του βλαστού και του στελέχους του φυτού, η δε νέκρωση έγινε μέσα σε 5 ημέρες. Η διαφορά με τις **612**, **620** ήταν ότι δεν παρατηρήθηκε μεταχρωματισμός στο ριζικό σύστημα.

Στην **627** απομόνωση παρατηρήθηκε νέκρωση σε όλο το φυτό. Τα συμπτώματα εμφανίστηκαν 3 ημέρες μετά τη μόλυνση των σπορόφυτων. Εμφανίστηκαν οι καρποφορίες του μύκητα σε όλο το μήκος του φυτού και η νέκρωση πραγματοποιήθηκε σε διάστημα 5 ημερών από τη μόλυνση. Η απομόνωση πρόσβαλε και τις 3 επαναλήψεις σε ποσοστό 100%

Στην **628**, όπως και στις **612**, **620**, **626**, **627** η προσβολή των σπορόφυτων σπαραγγιού ήταν ολοκληρωτική σε όλες τις επαναλήψεις. Αρχικά τα πρώτα συμπτώματα εμφανίστηκαν στο λαιμό του φυτού, καθώς και σε τμήματα του βλαστού, μέσα σε διάστημα 3 ημερών από τη μόλυνση. Με την πάροδο του χρόνου το φυτό καταστράφηκε εντελώς, ενώ σε όλο το μήκος εμφανίστηκε η εξάνθηση του παθογόνου. Στο ριζικό σύστημα εμφανίστηκαν καστανό-μαύρες κηλίδες, γεγονός που φανερώνει την προσβολή από το παθογόνο. Η νέκρωση πραγματοποιήθηκε σε 5 ημέρες από τη μόλυνση.

Τα πρώτα συμπτώματα προσβολής από την απομόνωση **629** εμφανίστηκαν στους βλαστούς και αργότερα επεκτάθηκε σχεδόν σε όλο το φυτό. Στους βλαστούς παρατηρήθηκε η εξάνθηση του παθογόνου σε διάστημα 2 ημερών από τη μόλυνση. Αργότερα η προσβολή επεκτάθηκε σε όλο το φυτό σε ποσοστό 85% και η νέκρωση των φυτών έγινε σε διάστημα 5 ημερών.

Στην περίπτωση της **630** απομόνωσης τα συμπτώματα ήταν η εμφάνιση της εξάνθησης του μύκητα στους βλαστούς και των 3 επαναλήψεων. Αρχικά τα πρώτα συμπτώματα ήταν στους βλαστούς, όπου αργότερα ακολούθησε η νέκρωση τους. Με την πάροδο 3 ημερών η μόλυνση επεκτάθηκε σε όλο το μήκος των βλαστών. Όπως και στις **612**, **621**, **626**, **627**, **628** και **629** το αποτέλεσμα ήταν η νέκρωση του φυτού σε διάστημα 5 ημερών από τη μόλυνση.

Στην **632** τα πρώτα συμπτώματα μόλυνσης ήταν στο λαιμό του φυτού καθώς και σε τμήματα του βλαστού. Αργότερα τα συμπτώματα επεκτάθηκαν σε όλο το φυτό . Το αποτέλεσμα ήταν η νέκρωση του φυτού σε διάστημα 5 ημερών από τη μόλυνση.

Στην **635** μολύνθηκαν οι επαναλήψεις 1 και 2 , ενώ η 3<sup>η</sup> παρέμεινε ανέπαφη. Τα πρώτα συμπτώματα εμφανίστηκαν σποραδικά σε τμήματα των βλαστών όπου το ποσοστό δεν ξεπερνούσε το 30% τις πρώτες 5 ημέρες από τη μόλυνση. Στους βλαστούς εμφανίστηκαν οι καρποφορίες του μύκητα , όχι όμως και στο λαιμό του φυτού . Το ποσοστό προσβολής έφτασε το 70% σε διάστημα 12 ημερών , ενώ η νέκρωση έγινε μετά από 18 ημέρες .

Παρόλο που η **638** απομόνωση προκάλεσε την ολοκληρωτική νέκρωση του φυτού , εντούτοις το διάστημα μέχρι την νέκρωση ήταν 18 ημέρες από τη μόλυνση. Τα πρώτα συμπτώματα εμφανίστηκαν στους βλαστούς , ενώ στις επαναλήψεις 1 και 3 παρατηρήθηκε εξάνθηση του μύκητα στο λαιμό των φυτών και αργότερα επεκτάθηκαν προς τα πάνω, ενώ στην 2<sup>η</sup> επανάληψη τα συμπτώματα περιορίστηκαν μόνο στους βλαστούς. Το αποτέλεσμα ήταν η νέκρωση των φυτών στις επαναλήψεις 1 και 3 , ενώ στην 2<sup>η</sup> επανάληψη το ποσοστό προσβολής έφτασε το 85% μέσα σε διάστημα 18 ημερών από τη μόλυνση.

Στην απομόνωση **639** στις επαναλήψεις 1 και 2 τα φυτά νεκρώθηκαν ,ενώ στη 3<sup>η</sup> το ποσοστό προσβολής ήταν 70%. Στις επαναλήψεις 1 και 2 τα συμπτώματα εμφανίστηκαν 6 ημέρες από τη μόλυνση κυρίως στους βλαστούς και αργότερα και στο λαιμό των φυτών με την εμφάνιση της λευκής εξάνθησης του μύκητα . Η νέκρωση πραγματοποιήθηκε 12 ημέρες από τη μόλυνση των φυτών. Στην 3<sup>η</sup> επανάληψη τα πρώτα συμπτώματα εμφανίστηκαν στους βλαστούς σε ποσοστό 30% μέσα σε διάστημα 6 ημερών. Η μόλυνση επεκτάθηκε στα 2/3 των βλαστών του φυτού , οι οποίοι καλύφθηκαν από τη λευκή εξάνθηση του μύκητα . Μέχρι την ολοκλήρωση του πειράματος το ποσοστό προσβολής δεν ξεπερνούσε το 75%.

Στην **641** και οι 3 επαναλήψεις μολύνθηκαν σε ποσοστό πάνω από 50% σε διάστημα 4 ημερών. Τα συμπτώματα ξεκίνησαν από τους βλαστούς και επεκτάθηκαν αργότερα σε όλο το μήκος του φυτού με χαρακτηριστικό την εμφάνιση της εξάνθησης του μύκητα, ενώ μόνο στην 3<sup>η</sup> επανάληψη παρατηρήθηκε προσβολή του λαιμού του φυτού. Παράλληλα στην 3<sup>η</sup> παρατηρήθηκαν καστανόμαυρες κηλίδες στη ρίζα. Η νέκρωση πραγματοποιήθηκε σε διάστημα 12 ημερών από τη μόλυνση των φυτών.

Η απομόνωση **643** σε σύγκριση με τις υπόλοιπες απομονώσεις είναι η μοναδική που προκάλεσε τη νέκρωση σε μια μόνο επανάληψη από τις 3,ενώ στις άλλες δύο το ποσοστό προσβολής που κυμαίνονταν στο 60 και 70% αντίστοιχα για τη 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup>. Στη 1<sup>η</sup> επανάληψη τα συμπτώματα προσβολής εμφανίστηκαν μετά από 4 ημέρες από τη μόλυνση και αφορούσαν αρχικά το λαιμό του φυτού και αργότερα τους βλαστούς. Η νέκρωση πραγματοποιήθηκε σε διάστημα 16 ημερών από τη μόλυνση. Στη 2<sup>η</sup> επανάληψη τα πρώτα συμπτώματα εμφανίστηκαν 7 ημέρες μετά τη μόλυνση και περιορίστηκε κυρίως στους βλαστούς με την εμφάνιση της εξάνθησης του μύκητα .Μέχρι το πέρας του πειράματος το ποσοστό δεν ξεπέρασε το 60%. Παράλληλα παρατηρήθηκε έκπτυξη, νέων βλαστών που δεν παρουσίασαν όμως συμπτώματα προσβολής από το παθογόνο. Στην 3<sup>η</sup> επανάληψη τα συμπτώματα εμφανίστηκαν 10 ημέρες από τη μόλυνση στους βλαστούς , που περιορίστηκαν όμως εκεί . Το υπόλοιπο φυτό δεν παρουσίασε συμπτώματα προσβολής , το δε ποσοστό δεν ξεπερνούσε το 70%.

Η απομόνωση **644** προκάλεσε τη νέκρωση σε δύο από τις τρεις επαναλήψεις σε διάστημα 3 ημερών από τη μόλυνση. Στις επαναλήψεις 1 και 2 τα συμπτώματα εμφανίστηκαν στο λαιμό του φυτού και στους βλαστούς μετά από 2 ημέρες από τη μόλυνση με κύριο χαρακτηριστικό την εξάνθηση του μύκητα . Τα φυτά νεκρώθηκαν μετά από 4 ημέρες από τη



μόλυνση . Στην 3<sup>η</sup> επανάληψη τα συμπτώματα περιορίστηκαν κυρίως στους βλαστούς , ενώ ο λαιμός του φυτού παρέμεινε ανέπαφος. Τα συμπτώματα εμφανίστηκαν 4 ημέρες μετά τη μόλυνση, ενώ το ποσοστό προσβολής ήταν 75%. Σε σύγκριση με τις προηγούμενες απομονώσεις ο χρόνος εκδήλωσης των συμπτωμάτων και νέκρωσης ήταν μικρότερος.

Η απομόνωση **645** προκάλεσε την καταστροφή και των 3 επαναλήψεων σε διάστημα 4 ημερών από τη μόλυνση. Στις επαναλήψεις 1 και 3 τα συμπτώματα ήταν κοινά και ξεκινούσαν από τους βλαστούς και επεκτάθηκαν αργότερα σε ολόκληρο το φυτό με κύριο γνώρισμα την εμφάνιση της λευκής εξάνθησης του μύκητα. Στην 2<sup>η</sup> επανάληψη , εκτός από τους βλαστούς , η αρχική προσβολή εντοπιζόταν στο λαιμό του φυτού σε διάστημα 2 ημερών από τη μόλυνση και αργότερα επεκτάθηκε σε ολόκληρο το φυτό.

Στην **646** παρατηρήθηκε νέκρωση και στις 3 επαναλήψεις σε διάστημα 4 ημερών από τη μόλυνση. Τα συμπτώματα ξεκίνησαν από το λαιμό των φυτών και επεκτάθηκαν κατόπιν σε όλο το φυτό. Τα συμπτώματα εμφανίστηκαν 2 ημέρες από τη μόλυνση, ενώ αργότερα επεκτάθηκαν σε ολόκληρο το φυτό.

Η **647** απομόνωση πρόσβαλε και τις 3 επαναλήψεις σε ποσοστό 85% , 80% , 95% αντίστοιχα. Στην 1<sup>η</sup> επανάληψη το ποσοστό προσβολής ήταν 85% . Τα πρώτα συμπτώματα εμφανίστηκαν 6 ημέρες από τη μόλυνση και αφορούσαν κυρίως την εμφάνιση της εξάνθησης του μύκητα στους βλαστούς. Ο λαιμός και το στέλεχος του φυτού παρέμεινε αρχικά ανέπαφο , αλλά με την πάροδο του χρόνου η προσβολή στο στέλεχος κάλυπτε τα 2/3 αυτού. Το χρονικό διάστημα μέχρι τη νέκρωση ήταν 10 ημέρες από τη μόλυνση. Στη 2<sup>η</sup> επανάληψη το ποσοστό προσβολής ήταν 80% , όπως και στην πρώτη επανάληψη τα συμπτώματα εμφανίστηκαν 6 ημέρες από τη μόλυνση στους βλαστούς και στο στέλεχος κατά το 1/3 αυτού. Αργότερα η προσβολή στο στέλεχος έφτανε τα 2/3 . Χαρακτηριστικό της προσβολής ήταν η εξάνθηση του παθογόνου σε βλαστούς και στέλεχος. Στην 3<sup>η</sup> επανάληψη το ποσοστό προσβολής ήταν μεγαλύτερο σε σύγκριση με τις επαναλήψεις 1 και 2 και έφτανε το 95% . Τα πρώτα συμπτώματα εμφανίστηκαν σε διάστημα 5 ημερών από τη μόλυνση και εντοπιζόταν κυρίως στους βλαστούς και το λαιμό του φυτού , ενώ αργότερα επεκτάθηκε και στο στέλεχος . Το φυτό νεκρώθηκε σε διάστημα 10 ημερών από τη μόλυνση.

Η **652** απομόνωση πρόσβαλε και τις 3 επαναλήψεις . Στη 1<sup>η</sup> επανάληψη τα συμπτώματα εμφανίστηκαν 6 ημέρες από τη μόλυνση και εντοπιζόταν κυρίως στους βλαστούς και αργότερα επεκτάθηκε και στο στέλεχος του φυτού όπου κάλυψε τα 2/3 αυτού. Χαρακτηριστικό της προσβολής ήταν η λευκή εξάνθηση των καρποφοριών του παθογόνου , ενώ το ποσοστό προσβολής ήταν 85%. Στη 2<sup>η</sup> επανάληψη τα συμπτώματα εμφανίστηκαν πιο γρήγορα σε διάστημα 5 ημερών. Η προσβολή ήταν πιο έντονη από τη 1<sup>η</sup> τόσο σε βλαστούς όσο και στο στέλεχος κατά το 1/3 . Μετά από 15 ημέρες το ποσοστό προσβολής έφτανε το 90%. Σε αντίθεση με την 1<sup>η</sup> επανάληψη , η προσβολή στην 3<sup>η</sup> ήταν πιο έντονη. Εκτός από τους βλαστούς συμπτώματα προσβολής παρουσίασε και ο λαιμός του φυτού μέσα σε διάστημα 5 ημερών από τη μόλυνση. Μετά την πάροδο 10 ημερών το φυτό καλύφθηκε από τη λευκή εξάνθηση του παθογόνου , ενώ η νέκρωση πραγματοποιήθηκε σε διάστημα 18 ημερών.

Η **654** απομόνωση πρόσβαλε και τις 3 επαναλήψεις με διαφορετικό ποσοστό προσβολής στην κάθε μία. Έτσι, στην 1<sup>η</sup> επανάληψη τα συμπτώματα εμφανίστηκαν 6 ημέρες μετά τη μόλυνση και εντοπίζονται στους βλαστούς του φυτού και αργότερα στο στέλεχος , το οποίο μετά από 18 ημέρες από τη μόλυνση νεκρώθηκε. Στη 2<sup>η</sup> επανάληψη το ποσοστό προσβολής κυμαίνονταν στο 80% . Τα πρώτα συμπτώματα εμφανίζονται στους βλαστούς σε διάστημα 7 ημερών , ενώ αργότερα επεκτάθηκε στο στέλεχος καλύπτοντας τα 2/3 αυτού. Στην 3<sup>η</sup> επανάληψη το ποσοστό προσβολής , σε διάστημα 6 ημερών ήταν 80%. Η προσβολή

ξεκίνησε από τη μέση του στελέχους και πρόσβαλε όλους τους βλαστούς σε διάστημα 10 ημερών. Κύριο γνώρισμα ήταν η εμφάνιση λευκής εξάνθησης χαρακτηριστικό της προσβολής από το παθογόνο. Μετά από 15 ημέρες η μόλυνση επεκτάθηκε και στο λαιμό του φυτού. Η νέκρωση πραγματοποιήθηκε σε διάστημα 18 ημερών από τη μόλυνση.

Μετά το τέλος του πειράματος όλα τα σπαράγγια παρουσίαζαν συμπτώματα προσβολής από το μύκητα. Αναλυτικότερα και με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνονται τα εξής:

Ιδιαίτερα μολυσματικές ήταν οι απομονώσεις: **F 612, F 620, F 626, F 627, F 628, F 629, F 630, F 632, F 644, F 645, F 646** στις οποίες παρατηρήθηκε νέκρωση ολόκληρου του φυτού. Ειδικότερα στις **F 612, F 620, F 630, F 645, F 646** παρατηρήθηκαν στη ρίζα καφέ μεταχρωματισμοί σε κηλίδες που οφείλονταν σε σοβαρή προσβολή του ριζικού συστήματος από το μύκητα.

Σε όλες τις απομονώσεις, στο υπέργειο τμήμα, παρατηρήθηκε η λευκή εξάνθηση του μύκητα σε όλο το φυτό ή σε τμήματα του βλαστού τα οποία αργότερα νεκρώθηκαν.

Στις απομονώσεις **F 621, F 635, F 639, F 643, F 644**, από τις τρεις επαναλήψεις σε ισάριθμους σωλήνες σε έναν παρατηρήθηκε νέκρωση του φυτού, ενώ στους άλλους τα φυτά ήταν προσβεβλημένα κατά ένα ποσοστό

Με τη μελέτη παθογένειας αποδείχτηκε ότι, παρόλο που οι απομονώσεις προέρχονταν αφενός από διάφορα μέρη φυτών, όπως είναι ο κόμβος και το στέλεχος από το καλαμπόκι, ορχιδέα και από το ρίζωμα του σπαραγγιού, αφετέρου δε και από έντομα που προσβάλλουν το σπαράγγι όπως οι απομονώσεις **F 644** που προέρχονταν από το έντομο *Ophiomyia simplex*, η απομόνωση **F 652** προέρχονταν από το έντομο *Delia platura* καθώς και η **F 654** από το έντομο *Hylemia sp.*, ήταν όλες παθογόνες.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

### ΠΡΟΚΑΤΑΡΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΧΕΣΗΣ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΩΝ

#### 1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Παράλληλα με την μελέτη παθογένειας των απομονώσεων του μύκητα *Fusarium proliferatum*, έγινε προσπάθεια έναρξης της μελέτης της γενετικής σχέσης μεταξύ των απομονώσεων με τη μέθοδο των ομάδων βλαστικής συμβατότητας (Vegetative Compatibility Group's, VCG's).

Με τη μέθοδο των ομάδων βλαστικής συμβατότητας εξετάζεται η γενετική σχέση μεταξύ των διαφόρων απομονώσεων. Για να γίνει αυτό θα πρέπει οι απομονώσεις να υποστούν μετάλλαξη, η οποία θα καθορίσει και τον φαινοτυπικό τους χαρακτηρισμό.

#### 2. ΥΛΙΚΑ

Για την μέθοδο της βλαστικής συμβατότητας χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά:

##### **Fusarium Minimal Medium (FMM) (1)**

- Sucrose 30 g
- NaNO<sub>3</sub> 2 g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g
- MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.5g
- KCl 0.5 g
- Trace element solution 0.2 ml
- Difco agar 20 g

Για την παρασκευή του υλικού ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Αρχικά έγινε η αναγωγή των παραπάνω υλικών στα 800 ml και τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη του 1 l. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στο αυτόκλειστο για αποστείρωση στους 115° C για 20 λεπτά και σε πίεση 1,05 bars. Μετά την αποστείρωση η κωνική φιάλη τοποθετήθηκε σε χώρο του εργαστηρίου και αργότερα μεταφέρθηκε στο θάλαμο νηματικής ροής (laminar flow unit), για τη μεταφορά του υλικού από την κωνική φιάλη σε τρυβλία.

Αφού στερεοποιηθεί το υλικό στα τρυβλία έγινε η μεταφορά των απομονώσεων από τους σωλήνες με υλικό PDA στα τρυβλία με το υλικό FMM, όπου αναπτύχθηκε ο μύκητας. Στη συνέχεια οδηγήθηκαν στο θάλαμο καλλιεργειών για επώαση στους 27° C για 3-4 ημέρες.

Μετά την τέταρτη ημέρα παρατηρήθηκε η ανάπτυξη μυκηλίου πάνω από το υλικό FMM. Παράλληλα έγινε προετοιμασία του υλικού *Fusarium Minimal Chlorite Medium* (FMCM) για την παρασκευή του οποίου χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά:

##### **Fusarium Minimal Chlorite Medium FMCM (1)**

- Sucrose 30 g
- NaNO<sub>3</sub> 2 g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g

- MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.5 g
- KCl 0.5 g
- Trace element solution 0.2 ml
- Difco agar 20 g
- KClO<sub>3</sub> 15 g
- L-asparagine 1.6 g

Αρχικά έγινε αναγωγή των υλικών στα 800 ml ακολούθησε η ζύγισή τους, που έλαβε χώρα στον ηλεκτρονικό ζυγό, και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη των 800 ml και μεταφέρθηκε στο αυτόκλειστο για αποστείρωση στους 115° C για 20 λεπτά και σε πίεση 1,05 bars.

Με την ολοκλήρωση της αποστείρωσης η κωνική φιάλη μεταφέρθηκε σε χώρο του εργαστηρίου, ώστε να αποκτήσει θερμοκρασία τέτοια ώστε να μπορεί να γίνει η μεταφορά του υλικού στα τρυβλία, η οποία έλαβε χώρα στο θάλαμο νηματικής ροής κάτω από ασηπτικές συνθήκες.

### 3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

#### Δημιουργία μεταλλαγμένων στελεχών των απομονώσεων του μύκητα *Fusarium proliferatum*

Για τη δημιουργία των μεταλλαγμένων στελεχών ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία. Αρχικά έγινε μεταφορά από τους σωλήνες, όλων των απομονώσεων, από υλικό PDA (Potato Dextrose Agar), που είχαν διατηρηθεί στη συλλογή σε τρυβλία με υλικό FMM για την ανάπτυξή τους και τοποθετήθηκαν στο θάλαμο καλλιεργειών για επώαση στους 27° C για 3-4 ημέρες (Puhalla 1985)

Με την πάροδο του παραπάνω διαστήματος και αφού παρατηρήθηκε ανάπτυξη του μυκηλίου, έγινε μεταφορά μικρών τμημάτων από το υλικό FMM σε τρυβλίο με υλικό FMCM και τοποθετήθηκαν στο θάλαμο καλλιεργειών για 15 ημέρες στους 27° C.

Κατά τη διάρκεια της επώασης οι τομείς ταχείας ανάπτυξης των απομονώσεων του μύκητα *Fusarium proliferatum* και ανθεκτικοί στο χλώριο μεταφέρθηκαν αρχικά σε ξεχωριστά τρυβλία με υλικό FMM και στη συνέχεια για επώαση στο θάλαμο καλλιεργειών στους 27° C για διάστημα 3-4 ημερών.

Την πέμπτη μέρα από όσες απομονώσεις παρουσίαζαν εκτεταμένη ανάπτυξη, αλλά χωρίς εναέριο μυκήλιο (*nit* ανάπτυξη), λήφθηκαν μικροί μυκηλιακοί δίσκοι από το μυκήλιο και τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με υλικό Hyroxanthine και σε τρυβλία με υλικό Nitrite για το χαρακτηρισμό τους.

Στα περισσότερα τρυβλία παρατηρήθηκε εκτεταμένη ανάπτυξη του μυκηλίου του μύκητα, όχι όμως εναέρια. Η ανάπτυξη αυτή δηλώνει ότι ο μύκητας δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει ως μοναδική πηγή αζώτου το νιτρικό νάτριο (NaNO<sub>3</sub>). Οι περισσότεροι μύκητες χρησιμοποιούν τα νιτρικά ως μοναδική πηγή αζώτου ανάγοντας τα σε αμμωνιακά με τα ένζυμα νιτρική και νιτρώδη ρεδουκτάση.

Τα μεταλλαγμένα αυτά στελέχη καλούνται nitrate non utilizing ή *nit* mutants και είναι αυτά που χρησιμοποιήθηκαν για διασταυρώσεις, σε αντίθεση με τα μεταλλαγμένα στελέχη που ενώ ήταν ανθεκτικά στο χλώριο, σε υλικό FMM παρουσίασαν κανονική ανάπτυξη με το σχηματισμό εναέριου μυκηλίου.

Μετά το χαρακτηρισμό των αποικιών σε τρεις φαινοτυπικές κλάσεις, πέρασε στο στάδιο της διασταύρωσης, από όπου διαπιστώνεται η ύπαρξη ή όχι της γενετικής σχέσης των απομονώσεων με τον αρχικό μύκητα.

### Χαρακτηρισμός μεταλλαγμένων στελεχών

Τα μεταλλαγμένο στέλεχος (mutant) που προκύπτει με την παραπάνω διαδικασία, διαφέρει από το αρχικό σε μια τουλάχιστον γενετική θέση.

Ο φαινότυπος του στελέχους χαρακτηρίζεται από τρία γράμματα που αναφέρονται στο γόνο που επηρεάζει το φαινότυπο ως προς αυτό το χαρακτηριστικό.

Τα στελέχη που δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα νιτρικά ως πηγή αζώτου χαρακτηρίζονται ως nit (nitrate non utilizing mutants).

Υπάρχουν 3 φαινοτυπικές κλάσεις, ανάλογα με την ανάπτυξη του μυκηλίου σε τρυβλία με υλικό Nitrite και Hypoxanthine, όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα:

Χαρακτηρισμός	Νιτρικά (Nitrate)	Νιτρώδη (Nitrite)	Υποξανθίνη (Hypoxanthine)
Nit 1	-	+	+
Nit 3	-	-	+
Nit M	-	+	-

**Όπου:** + ανάπτυξη κανονική  
- ανάπτυξη χωρίς εναέριο μυκήλιο

Οι φαινοτυπικές κλάσεις έχουν μεταλλαγή ως προς τις θέσεις που καθορίζουν τη νιτρική ρεδουκτάση ή την αφομοίωση των νιτρικών.

Έτσι αναλυτικότερα:

- Όταν η μεταλλαγή έχει συμβεί σε θέση που καθορίζει τη δομή της ρεδουκτάσης, τότε δίνεται ο χαρακτηρισμός Nit 1
- Όταν η μεταλλαγή έχει συμβεί σε θέση που ρυθμίζει την αφομοίωση (assimilation) των νιτρικών, τότε χαρακτηρίζεται ως Nit 3
- Όταν η μεταλλαγή έχει συμβεί σε περισσότερες θέσεις (περίπου 5) οπότε επηρεάζεται η σύνθεση ενός παράγοντα (cofactor) που είναι απαραίτητος για τη δράση της ρεδουκτάσης, ο φαινότυπος χαρακτηρίζεται ως Nit M.

### Nitrite-Hypoxanthine

Για την παρασκευή των υλικών Nitrite και Hypoxanthine απαιτήθηκαν τα εξής υλικά και ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

#### Nitrite (1L)

- Sucrose 30 g
- NaNO<sub>2</sub> 0.5 g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g
- MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.5 g
- KCl 0.5 g
- Trace Element Solution 0.2 ml

- Difco Agar 20 g

### **Hypoxanthine (1L)**

- Sucrose 30 g
- Hypoxanthine 0.2 g
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g
- KCl 0.5 g
- Trace Element Solution 0.2 ml
- Difco Agar 20 g

Αρχικά έγινε αναγωγή των υλικών στα 800 ml, αφού ζυγίστηκαν οι ποσότητες στον ηλεκτρονικό ζυγό, μεταφέρθηκαν στη συνέχεια σε κωνικές φιάλες των 1000 ml αντιστοίχως. Για το υλικό Trace Element Solution, το οποίο ήταν έτοιμο και αποθηκευμένο στο ψυγείο, χρησιμοποιήθηκε σιφώνι με το οποίο πάρθηκαν οι απαιτούμενες ποσότητες και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στις κωνικές φιάλες. Στη συνέχεια οι κωνικές φιάλες, αφού πωματίστηκαν, μεταφέρθηκαν στο αυτόκλειστο για αποστείρωση στους  $115^\circ \text{C}$  για 20 λεπτά και σε πίεση 1,05 bars.

Με την ολοκλήρωση της αποστείρωσης οι κωνικές φιάλες μεταφέρθηκαν σε χώρο του εργαστηρίου, όπου αργότερα οδηγήθηκαν για τη μεταφορά τους στα τρυβλία, κάτω από ασηπτικές συνθήκες, στο θάλαμο νηματικής ροής.

Αφού στερεοποιήθηκαν τα υλικά στα τρυβλία, έγινε η μεταφορά των αποικιών των απομονώσεων από τα τρυβλία με υλικό FMM σε αυτά με Nitrite και Hypoxanthine για τη διαδικασία της διασταύρωσης.

### **Διασταυρώσεις**

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω τα μεταλλαγμένα στελέχη παρουσίασαν αδυναμία ως προς τη χρήση των νιτρικών ως μοναδική πηγή αζώτου, η οποία προσδιορίζεται από τρεις διαφορετικές θέσεις στο γενετικό υλικό (τρεις φαινότυποι). Εάν διασταυρωθούν μεταλλαγμένα στελέχη διαφορετικών φαινοτύπων σε υλικό FMM τότε οι ελλείψεις τους ως προς τη θρέψη μπορεί να αλληλοσυμπληρωθούν και στα σημεία επαφής των αποικιών να παρουσιάσουν κανονική ανάπτυξη. Αυτό γίνεται στην περιοχή όπου τα δύο στελέχη συναντώνται και οι υφές αναστομώνονται με το σχηματισμό ετεροκαρού μυκηλίου. Στην περιοχή αυτή παρατηρείται ανάπτυξη άφθονου εναέριου μυκηλίου.

Εάν τα στελέχη δεν αλληλοσυμπληρωθούν, όσον αφορά τη θρέψη, τότε στο σημείο συνάντησης, η ανάπτυξη μυκηλίου χαρακτηρίζεται από απουσία εναέριου μυκηλίου.

Τα στελέχη που σχηματίζουν ετεροκάρυο μυκήλιο έχουν βλαστική συμβατότητα. Οι πλέον επιτυχείς διασταυρώσεις είναι μεταξύ *nit M* στελεχών και των δύο άλλων φαινοτύπων που έχουν βλαστική συμβατότητα.

Ως δοκιμαστές (testers) χρησιμοποιούνται τα *nit M* στελέχη για τον χαρακτηρισμό των άλλων. Τα *nit M* στελέχη είναι τα πλέον κατάλληλα για τις διασταυρώσεις, γιατί δίνουν θετικό αποτέλεσμα ακόμη και στις μεταξύ τους διασταυρώσεις.

Στη διαδικασία της διασταύρωσης έγινε μεταφορά μυκηλιακών δίσκων από το αναπτυγμένο μυκήλιο των αποικιών των απομονώσεων από τα τρυβλία με υλικό FMM σε τρυβλία πάλι με FMM. Για τη μεταφορά των τμημάτων χρησιμοποιήθηκε μικροβιολογικός



κρίκος. Σε κάθε τρυβλίο τοποθετήθηκαν τμήματα από στελέχη που είχαν χαρακτηριστεί ως *nit 1*, *nit 3* και *nit M*. Τα τμήματα τοποθετήθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματίζουν ένα ισόπλευρο τρίγωνο με κορυφές τα μεταλλαγμένα στελέχη.

Στη συνέχεια τα τρυβλία σφραγίστηκαν με παραφίλμ (parafilm) και οδηγήθηκαν στο θάλαμο καλλιέργειών για επώαση στους 27° C.

#### **4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

Τα πρώτα αποτελέσματα που πάρθηκαν δεν έδειξαν βλαστική συμβατότητα

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Αγγίδης Δ.Α (1986) . Σπαράγγι η καλλιέργειά του
2. Αγγίδης Δ.Α (1991). Το σπαράγγι 3<sup>η</sup> έκδοση
3. Αγγίδης Δ.Α (1993). Το σπαράγγι στην Ευρώπη και την Ελλάδα. Γεωργική τεχνολογία 12:34-43
4. Ακομιανάκης Κ (1997) Το ΑΒ των λαχανικών , χειμερινά λαχανικά σελ 185-198
5. Ανώνυμος (1999) Λαχανοκομία κηπευτικών γενική και ειδική 239-244. Εκδόσεις Ψυχάλλου Αθήνα
6. Βούδας Μ (1991) Διατήρηση σπαραγγιού . Γεωργική τεχνολογία 6:32
7. Γεωργιάδης Κ (2000) Κηπευτικά 2000 .Γεωργική τεχνολογία 75-79
8. Δημητράκης Κ.Γ (1998) Λαχανοκομία 1998 . 105-125 .Εκδόσεις Αγρότυπος Αθήνα
9. Ελένα, Κ.. Σύγχρονη αντιμετώπιση των μυκητολογικών ασθενειών του σπαραγγιού. Μπενάκειο φυτοπαθολογικό ινστιτούτο .Στεφάνου Δέλτα 8 Κηφισιά Αθήνα
10. Ελένα, Κ., Μπέμ, Φ. & Γ. Τρωγιάνος (2001). Η φυτοπροστασία στην ολοκληρωμένη διαχείριση της παραγωγής σπαραγγιού. Πρακτικά 3<sup>ης</sup> πανελλήνιας συνάντησης φυτοπροστασίας, Λάρισα, 6-8 Μαρτίου 2001
11. Θεοδοσιάδου Ε. (1994). Ανοιχτοί ορίζοντες για το σπαράγγι Γεωργική τεχνολογία 2:38-45
12. Καστρίτης Γ (1997) Οπωροκηπευτικά 1997. Γεωργία τεχνολογία 117-120
13. Μπρούμας Θ. Εχθροί του σπαραγγιού και αντιμετώπιση τους.3<sup>ο</sup> Πανελλήνιο φυτοπαθολογικό συνέδριο Λάρισας.
14. Παρασκευόπουλος Κ.Π (2000) Σύγχρονη λαχανοκομία ξ119-121. Εκδόσεις Ψυχάλλου Αθήνα
15. Elena K. and Tjamos E.C , (1995). Vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthy* from plants and the rhizosphere of carnation in Greece. Plant Pathology 44: 148-152
16. Elena K. (1999). The vascular wilt fungi of tomato in Greece: vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae* isolates. Phytopathol.Mediterr., 38: 137-143
17. Elena K. and Paplomatas E.J , (1998). Vegetative compatibility groups within *Verticillium dahliae* isolates from different hosts in Greece. Plant Pathology 47: 635-640
18. Elena K. (1999). Genetic relationships among *Verticillium dahliae* isolates from cotton in Greece based on vegetatine compatibility. European Journal of Plant Pathology 105: 609-616.
19. Puhalla J.E.,1985. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Canadian Journal of Botany*, 63,179-183.