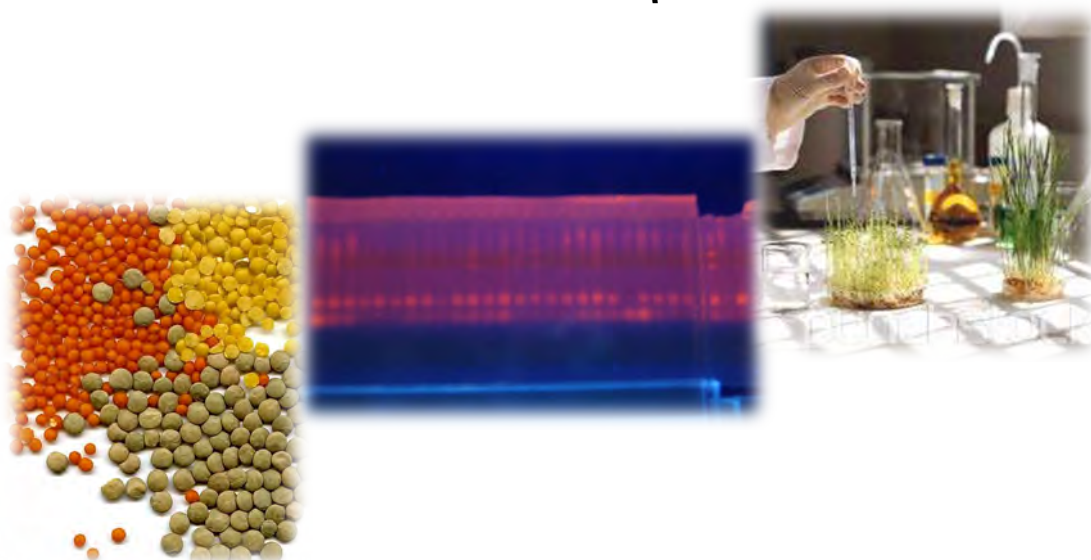


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ, ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΘΕΜΑ: «Ανάπτυξη γενεαλογίας με στόχο τη βελτίωση ποικιλιών φακής για ανθεκτικότητα στο *Fusarium oxysporum f.sp.lentis* και εντοπισμός μοριακών δεικτών στενά συνδεδεμένων με την ανθεκτικότητα»



ΒΑΣΙΛΑΚΟΥ ΜΑΡΙΑ

Γεωπόνος

Επιβλέπων

ΜΑΥΡΟΜΑΤΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ,

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΒΟΛΟΣ 2011

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Ανάπτυξη γενεαλογίας με στόχο τη βελτίωση ποικιλιών φακής για ανθεκτικότητα στο *Fusarium oxysporum* f.sp.lentis και εντοπισμός μοριακών δεικτών στενά συνδεδεμένων με την ανθεκτικότητα

Υποβλήθηκε στη σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Τμήμα Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, στο πλαίσιο του διατμηματικού προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών.

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: *Μαυρομάτης Αθανάσιος*, επίκουρος καθηγητής Τμήματος Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Σχολής Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μέλη: *Χα Ιμπραχίμ-Αβραάμ*, καθηγητής Τμήματος Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Σχολής Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Βλαχοστέργιος Δημήτριος, ερευνητής Ινστιτούτου Κτηνοτροφικών Φυτών και Βοσκών Λάρισας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω , τον επίκουρο καθηγητή του τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Μαυρομάτη Αθανάσιο, επιβλέποντα της μεταπτυχιακής διατριβής μου, για την διδασκαλία της υπέροχης επιστήμης της γενετικής βελτίωσης φυτών, για την υπόδειξη του θέματος, την εμπιστοσύνη που έδειξε προς στο πρόσωπό μου καθώς και την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με τη μοριακή γενετική. Η επιστημονική του κατάρτιση και η αμεσότητά του με βοήθησαν να διαμορφώσω ένα σωστό και επιστημονικό τρόπο σκέψης αλλά και η συνεχής καθοδήγησή του ήταν ιδιαίτερα πολύτιμη για εμένα.

Επίσης, ευχαριστώ πάρα πολύ τον κύριο Βλαχοστέργιο Δημήτριο, ερευνητή του Ινστιτούτου Κτηνοτροφικών Φυτών και Βοσκών Λάρισας, για την παροχή του γενετικού υλικού, την συνεχή προθυμία του καθώς και την απρόσκοπτη καθοδήγηση του σε όλα τα στάδια της εργασίας μου, τις εύστοχες υποδείξεις του και συμβουλές που με βοήθησαν σημαντικά να καταφέρω να ολοκληρώσω τη μεταπτυχιακή μου διατριβή.

Ακόμη, τον καθηγητή του τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Χα Αβραάμ, για την τη συμμετοχή του στην τριμελή εξεταστική επιτροπή και την άψογη συνεργασία.

Ευχαριστώ πολύ τον δρ.Κορκόβελο Αθανάσιο για την βοήθειά του κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων του πειράματος μου.

Θα ήθελα επιπλέον, να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα και μέλος του εργαστηρίου γενετικής βελτίωσης φυτών δ. Σακελλαρίου Μιχαέλα, για την εκμάθηση όλων των μεθόδων που χρειάστηκε να ακολουθήσω ,την προθυμία της, την υπομονή της και την συνολική της συμβολή σε όλα τα στάδια του πειράματος μου όπως και όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία που είχα μαζί τους.

Καθώς και όλους τους αγαπημένους μου φίλους για την συμπαράστασή τους και την φιλία τους όλα τα χρόνια. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την ακλόνητη αγάπη τους, την συνεχή υποστήριξή τους και την υπομονή τους σε όλα τα έτη των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΕΛΙΔΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT.....	7
<u>ΕΝΟΤΗΤΑ Α</u>	9
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	9
1.1 Καταγωγή και διάδοση.....	9
1.2 Ταξινόμηση.....	11
1.3 Συστατικά και θρεπτική αξία.....	12
1.4 Βοτανική περιγραφή.....	12
1.5 Αύξηση και ανάπτυξη	14
1.6 Οικολογικές απαιτήσεις.....	14
1.7 Οικονομική σημασία.....	16
1.8 Προϊόντα και ποιότητα αυτών.....	17
1.9 Γενετική.....	18
1.9.1 Διασταυρώσεις και υβρίδια.....	18
1.9.2 Φυτογενετικοί πόροι.....	19
1.9.3 Φακή.....	22
1.10 Τράπεζες γενετικού υλικού.....	23
2.Η ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΗΣ ΦΑΚΗΣ	26
2.1 Κλασσική βελτίωση.....	27
3.ΜΥΚΗΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΣΒΑΛΛΟΥΝ ΤΗ ΦΑΚΗ	31
4.ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΗΣ ΦΑΚΗΣ ΓΙΑ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥΣ ΜΥΚΗΤΕΣ	34
5.ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΗΣ ΦΑΚΗΣ ΚΑΙ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΓΕΝΕΑΛΟΓΙΚΩΝ ΣΧΕΣΕΩΝ	42
5.1 Χρήση RAPD δεικτών.....	42
5.2 Χρήση ISSR και άλλων δεικτών.....	45
5.3 Χρήση SSR δεικτών.....	46
5.4 Γενετικοί συνδετικοί χάρτες φακής.....	47
6.ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ	50

<u>ΕΝΟΤΗΤΑ Β</u>	51
1.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	51
1.1 Γενετικό υλικό.....	51
1.2 Γενεαλογία μελετώμενων ποικιλιών φακής.....	57
2.ΜΕΘΟΔΟΙ	59
2.1 Σπορά.....	59
2.2 Διασταυρώσεις.....	59
2.3 Συλλογή ιστού-εξαγωγή DNA.....	61
2.4 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν	62
2.5 PCR (Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης).....	64
2.6 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων-υπολογισμός των μεγεθών των ενισχυμένων ζωνών.....	64
2.7 Καταγραφή αποτελεσμάτων.....	65
2.8 Μοριακή στατιστική ανάλυση.....	65
<u>ΕΝΟΤΗΤΑ Γ</u>	66
1.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	66
1.1 Διασταυρώσεις.....	66
1.2 Ενισχυμένες και πολυμορφικές ζώνες.....	67
1.3 Εντοπισμός μοριακών δεικτών στενά συνδεδεμένων με την ανθεκτικότητα στην ασθένεια <i>Fusarium oxysporum f.sp.lentis</i>	69
1.4 Γενετική ταυτοποίηση και μελέτη φυλογενετικών σχέσεων ποικιλιών φακής με SSR δείκτες.....	73
1.5 Ομαδοποίηση των αποτελεσμάτων.....	74
2.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	83
<u>ΕΝΟΤΗΤΑ Δ</u>	84
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	84

ΠΕΡΙΛΗΨΗ:

Η καλλιεργούμενη φακή προέρχεται από την Εγγύς Ανατολή και τη Μικρά Ασία. Αποτελεί μία από τις πιο σημαντικές καλλιέργειες των οσπρίων σε πολλές χώρες του κόσμου. Είναι ετήσιο, αυτογονιμοποιούμενο, διπλοειδές φυτό ($2n=14$), με μεγάλη διαιτητική αξία, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας της σε πρωτεΐνες, μικροστοιχεία και βιταμίνες.

Η φακή προσβάλλεται από αρκετές μυκητολογικές ασθένειες και οι κυριότερες εξ αυτών είναι : η φουζαρίωση , (*Fusarium oxysporum f.sp. lentis*) η ασκοχύτωση, (*Ascochyta fabae f.sp. lentis*) και η σκωρίαση, (*Uromyces viciae fabae*).

Ωστόσο, η βελτίωση της φακής έχει σχετικά μικρή ιστορία. Συγκεκριμένα, η βελτίωση για ασθένειες με δημιουργία ανθεκτικών φυτών προτείνεται ως το πιο αποτελεσματικό μέσο για τον καλύτερο έλεγχο τους. Έχουν βρεθεί πολλοί ανθεκτικοί γενότυποι τόσο στις καλλιεργούμενες όσο και στις άγριες φακές καθώς και γονίδια ανθεκτικότητας.

Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 34 δείγματα ποικιλιών φακής. Το γενετικό υλικό που αξιολογήθηκε προέρχονταν από το υλικό που δημιουργήθηκε στην Ελλάδα τα τελευταία 50 χρόνια (14 ποικιλίες), το ICARDA, καθώς και από τις χώρες Μαρόκο, Ινδία, Τουρκία, Ιορδανία, Χιλή, Καναδά, ΗΠΑ, Αλγερία και Βουλγαρία. Αναλυτικότερα, πέντε σπόροι από κάθε ποικιλία σπάρθηκαν σε Jiffy-pots, όπου προηγουμένως είχε τοποθετηθεί ικανοποιητική ποσότητα τύρφης προκειμένου να αναπτυχθούν και να χρησιμοποιηθούν για την εξαγωγή DNA.

Ομοίως πέντε σπόροι από τις ποικιλίες Αθηνά, ILL 590 και Σάμος σπάρθηκαν ξεχωριστά σε 5 γλάστρες για την καθεμιά προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για τις διασταυρώσεις μεταξύ των συγκεκριμένων ποικιλιών.

Για τη διαδικασία της αποστημόνωσης ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο των **Kumar και Singh, 1998**. Χρησιμοποιήθηκε η ποικιλία Σάμος σαν θηλυκός γονέας και η ποικιλία ILL 590 σαν αρσενικός, οι καιρικές συνθήκες όμως επέδρασαν αρνητικά στην επιτυχία των διασταυρώσεων και το ποσοστό επιτυχίας ήταν μηδενικό.

Η συλλογή του φυτικού ιστού ξεκίνησε όταν τα φυτά απέκτησαν ικανοποιητικό μέγεθος. Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος CTAB με μικρές προσαρμογές. Ακολούθησε ένα συγκεκριμένο πρόγραμμα στη συσκευή PCR

για όλους τους εκκινητές και έπειτα πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων και υπολογισμός των μεγεθών των ενισχυμένων ζωνών.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν έδωσαν συνολικά 12 ενισχυμένες ζώνες. Το μεγαλύτερο ποσοστό πολυμορφισμού έδωσαν ο δείκτης MS 3 και ο MS 6. Τα μεγέθη ζωνών κυμάνθηκαν από 200 bp (MS 3, MS 1) μέχρι 800 bp (MS 3).

Παρατηρήθηκε επίσης, ο δείκτης SSR 59-2A που είναι συγκυρίαρχος ως προς το χαρακτηριστικό της ανθεκτικότητας στην ασθένεια *Fusarium oxysporum f.sp.lentis* και παρουσίασε μία μόνο ζώνη των 200 bp σε όλα τα δείγματα των ποικιλιών φακής που χρησιμοποιήθηκαν.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος NTSYS- pc 2 (Rohlf, 2000), προκειμένου να μελετηθούν τα μοριακά δεδομένα του πειράματος με σκοπό να σχηματισθεί δένδρογραμμα γενετικής ομοιότητας των γενοτύπων.

Παρατηρώντας τις ομαδοποιήσεις που προέκυψαν με βάση το διάγραμμα Jaccard UPGMA, έγινε εκτίμηση της διαφοροποίησης και των σχέσεων μεταξύ των ποικιλιών όπου έδειξε τρεις μεγάλες ομάδες και εντός αυτών άλλες μικρότερες υποομάδες με ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά.

Τέλος, αν και ο αριθμός των SSR δεικτών ήταν μικρός, εμφανίστηκε υψηλό ποσοστό πολυμορφισμού και μεταθετότητας ανάμεσα στις ποικιλίες αλλά και στα είδη της φακής. Οι μοριακοί δείκτες δεν ομαδοποίησαν χωριστά τις πλατύσπερμες και τις λεπτόσπερμες ποικιλίες αποδεικνύοντας ξεκάθαρα πως μεταξύ των δύο τύπων της φακής δεν υπάρχει πάντοτε γενετική απόκλιση.

ABSTRACT:

Lentil (*Lens culinaris* Medik.) comes from Far East and M.Asia and consists one of the most important crops of legumes in many countries all over the world. It is annual, self- pollinating crop and is an important source of dietary protein and it also helps in the management of soil fertility.

The biotic stresses are numerous and mainly include: susceptibility to Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum f.sp. lentis* ;Ascochyta blight caused by *Ascochyta fabae f.sp. lentis*) and rust caused by *Uromyces viciae fabae*.

Plant breeders and geneticists have addressed these stresses by indentifying resistant/ tolerant germplasm, determining the genetics involved and the genetic map positions of the resistant genes.

In this study, were used 34 accessions of lentil. The genetic material studies originated from Greece (14 varieties), ICARDA, Marocco, India, Turkey, Jordan, Chile, Canada, USA, Algeria and Bulgaria. Specifically, five seeds of each variety were sown in Jiffy-pots in order to be used for DNA extraction.

In the same way, five seeds of the varieties named Athena, ILL-590 and Samos were sown individually in order to be used for artificial crossing. The variety named Samos was used as a female partner and the variety named ILL-590 was used as a male partner. The environmental conditions influenced negatively the success of crosses and as a result the rate of success was almost zero.

The DNA extraction was carried out with the CTAB method, and then followed the analysis in the PCR and the estimation of the sizes of the bands.

The 5 SSR primers, which were used, gave totally 12 polymorphic bands. The MS 3 and the MS 6 marker scored the biggest rate. The sizes of the bands were between 200 bp (MS 3,MS 1) and 800 bp (MS 3).

It was also used, the marker SSR 59-2A,which is co-dominant and shows the resistance in the *Fusarium oxysporum f.sp.lentis*. It presented a band in the 200 bp for all varieties.

The Jaccard genetic similarity matrix was used to build an unweighted pair-group method with arithmetic means (UPGMA) tree. NTSYS- pc version 2.0 (Rohlf, 2000) was used for genetic similarity computing and dendrogram construction.

The dendrogram based on Jaccard's coefficient revealed three phylogenetic groups and each one containing more other sub clusters. Although, the number of

SSR's used was small, they presented a high level of polymorphism and transferability across accessions and species of *Lens*. In the present investigation macro-sperma and micro-sperma accessions were arbitrarily distributed showing that there is no always genetic inclination between these two types of lentil.

ΕΝΟΤΗΤΑ Α

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

1.1 Καταγωγή και διάδοση

Το επιστημονικό όνομα της φακής είναι *Lens culinaris*(L.) Medik.subsp.culinaris. Η καλλιεργούμενη φακή προέρχεται από την Εγγύς Ανατολή και τη Μικρά Ασία. Αποτελεί μία από τις πρώτες καλλιέργειες του ανθρώπου και αρχαιολογικά ευρήματα που αφορούν τη φακή αναφέρονται από το 7000 ακόμα και από το 8500 π.Χ στο Mureybit στη Συρία (**Cubero 1981, Toklu κ.α 2009a**). Η καλλιέργεια της διαδόθηκε γρήγορα από την περιοχή της Νότιας Τουρκίας στη περιοχή του Νείλου, στην Ελλάδα και στην Κεντρική Ευρώπη. Επίσης, διαδόθηκε μαζί με το σιτάρι και το κριθάρι νωρίς στην Αίγυπτο. Η καλλιέργεια της ήταν κομμάτι του συνόλου των καλλιεργειών σιτηρών της Εγγύς Ανατολής που εισήχθησαν στην Αιθιοπία από τους εισβολείς (**Erskine,1997**).

Στους αρχαίους χρόνους η καλλιέργεια της φακής ήταν εκτεταμένη στη Μεσοποταμία, την Παλαιστίνη και σε άλλες χώρες γύρω από τη Μεσόγειο. Στην Εγγύς Ανατολή από αρχαιότατους χρόνους διάφορες συνήθειες, ιστορίες και μύθοι αφορούσαν τη φακή. Πολυάριθμες είναι οι αναφορές για τη χρησιμότητα της φακής στη Βίβλο και στην κλασική λογοτεχνία όπου μαρτυρούν τη σημαντικότητα αυτού του φυτού. Στους Ιουδαίους ήταν όσπριο ιδιαίτερα αγαπητό και στη Γένεση αναφέρεται ότι ο Ησαύ παραχώρησε στον Ιακώβ τα πρωτοτόκια δικαιώματα του αντί «πινακίου φακής».

Ακόμη, στην Αρχαία Ελλάδα είχε εξέχουσα θέση και ονομαζόταν «φακός» ή «φακέα». Χαρακτηριστικά αναφέρουμε ότι γίνεται μνεία της σε αποσπάσματα ποιημάτων του Σόλωνος και την αναφέρουν ο Ηρόδοτος, ο Αριστοφάνης και ο Διοσκουρίδης (**Παπακώστα,2006**).Όπως αναφέρεται όμως και σε πολλούς Λατίνους συγγραφείς ήταν ένα βασικό προϊόν διατροφής για τους Ρωμαίους και η σημαντικότητά της ήταν παρόμοια καθ' όλη τη διάρκεια του Μεσαίωνα (**Sonnante και Pignone,2007**).

Η φακή είναι μία από τις πιο σημαντικές καλλιέργειες των οσπρίων σε πολλές χώρες του κόσμου. Η χώρα που παράγει τη μεγαλύτερη ποσότητα φακής είναι η Ινδία, ακολουθούν η Τουρκία και ο Καναδάς και σε μεγάλη απόσταση έπονται η

Αυστραλία, το Νεπάλ, η Κίνα, η Συρία, το Μπαγκλαντές, οι Η.Π.Α, το Ιράν, η Αιθιοπία, η Ισπανία και το Πακιστάν. Σε αυτές τις χώρες ,η παραγωγή κυμαίνεται από 637 έως 1263 kg/ha ενώ η υψηλότερη παραγωγή είναι 5000 kg/ha και καταγράφηκε στη Γερμανία.



Εικόνα 1: Παγκόσμια γεωγραφική κατανομή της καλλιέργειας της φακής

Επίσης στις Η.Π.Α, οι φακές καταλαμβάνουν περίπου 60.000 εκτάρια και από το 1984 έως το 1993, η παραγωγή έφτασε τους 65.000 τόνους. Στην Αυστραλία, η φακή αποτελεί μία αρκετά προσοδοφόρα εξαγωγική καλλιέργεια όπου διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο σε περιοχές με μέσο έως χαμηλό ποσοστό βροχόπτωσης και σε μέσης σύστασης εδάφη.

Όσον αφορά την Ελλάδα, η καλλιέργεια της φακής έχει περιορισθεί αρκετά με αποτέλεσμα οι ανάγκες να καλύπτονται με εισαγωγές από άλλες χώρες όπως την Τουρκία και τον Καναδά. Συγκεκριμένα, η μέση απόδοση της Ελλάδας με βάση νεότερα δεδομένα , αναφέρεται σε 124 kg/στρέμμα. Η χρησιμοποίηση όμως βελτιωμένων ποικιλιών και κατάλληλης καλλιεργητικής τεχνικής είναι σε θέση να αυξήσουν την απόδοση στα 250 kg/στρέμμα.

1. 2 Ταξινόμηση

Η φακή ανήκει στο γένος *Lens* της οικογένειας των ψυχανθών και κατέχει μία ενδιάμεση θέση μεταξύ των γενών *Vicia* και *Lathyrus*. Τα είδη *Lens culinaris* (L.) Medikus έχουν τρία άγρια υποείδη: το *Lens culinaris* spp. *orientalis*, το *Lens culinaris* spp. *odemensis* και το *Lens culinaris* spp. *tomentosus* (Ferguson κ.α, 2000). Ανάμεσα σε αυτά τα είδη το είδος *Lens culinaris* spp. *orientalis*, θεωρείται ο πρόγονος της καλλιεργούμενης φακής. Τα άλλα τρία άγρια είδη είναι το *L. ervoides*, το *L. nigricans* και το *L. lamottei* (van Oss κ.α, 1997). Τα άγρια είδη είναι ευρέως γνωστό πως κατανεμήθηκαν στην δυτική Ασία, τη βόρεια Αφρική και στις μεσογειακές χώρες (Ladizinsky, 1993).

Η ταξινόμηση έχει υποστεί πολυάριθμες αλλαγές. Αρχικές ταξινομήσεις ταξινομούσαν τη φακή στο γένος *Ervum* L., αλλά αργότερα το *Lens* θεωρήθηκε ως ξεχωριστό γένος. Από την πειστική δημοσίευση του Medikus το 1787 του *Lens culinaris*, το όνομα αυτό υπερτερεί του *Lens esculenta*, που χρησιμοποιήθηκε από τον Moench το 1974.

Από μορφολογικής άποψης έχει αποδειχθεί ότι το άγριο είδος *Lens culinaris* spp. *orientalis* είναι πολύ στενά όμοιο με το *Lens culinaris* και πιθανόν να είναι όντως ο πρόγονός του, ενώ το *L. nigricans* παρουσίασε αρκετές διαφορές από το *Lens culinaris* και το *Lens culinaris* spp. *orientalis* (Barulina 1930; Zohary 1972; Williams κ.α 1974).

Με βάση όμως με την ικανότητα της διασταύρωσης και την γονιμότητα των υβριδίων, τα διάφορα μέλη του γένους *Lens* συγκαταλέγονται σε δύο βιολογικά είδη, στο *Lens culinaris* και στο *L. nigricans*.

Σε πρόσφατη ταξινόμηση του van Oss και των συνεργατών του προτάθηκε ότι το γένος *Lens* αποτελείται από 7 taxa: την καλλιεργούμενη φακή *Lens culinaris* Medicus subsp. *culinaris*, τον άγριο πρόγονο του *L. culinaris* subsp. *orientalis* (Boiss) Ponert, *Lens odemensis*, *L. ervoides* και το *Lens nigricans* καθώς και δύο πρόσφατα αναγνωρισμένα είδη τα *L. tomentosus* και *L. lamottei* (Sarker και Erskine, 2006).

1.3 Συστατικά και θρεπτική αξία

Ο ξηρός καρπός χρησιμοποιείται ως όσπριο από τους πληθυσμούς των χωρών που παράγουν τη φακή. Η υψηλή περιεκτικότητα της σε πρωτεΐνη και υδατάνθρακες την καθιστούν απαραίτητη στη διατροφή των ανθρώπων ελάχιστη όμως είναι η ποσότητα της χαμηλής ποιότητας των σπόρων που χρησιμοποιείται στη διατροφή των πουλερικών. Ακόμη, λόγω της μεγάλης περιεκτικότητας σε λυσίνη και τρυπτοφάνη, η κατανάλωση μαζί με σιτάρι και ρύζι παρέχει μία ισορροπημένη διατροφή όσον αφορά τα αμινοξέα (**Sarker και Eskin, 2006**). Σπουδαία είναι και η ανακάλυψη πως οι μακρόσπερμες ποικιλίες έχουν εμφανώς περισσότερο περιεχόμενο σαπωνίνων από αυτό των μικρόσπερων. Οι σαπωνίνες είναι βιοενεργές ενώσεις που έχουν διάφορες καλές ιδιότητες, όπως ο περιορισμός της ανάπτυξης και δημιουργίας σποριδίων σε πολλούς μύκητες, η μείωση της χοληστερόλης του πλάσματος στον άνθρωπο και η αντικαρκινική τους δράση (**Fiocchetti κ.α, 2009**).

1.4 Βοτανική περιγραφή

Η φακή είναι ετήσιο, αυτογονιμοποιούμενο, διπλοειδές φυτό ($2n=14$), με μέγεθος απλοειδούς γενώματος 4063 Mb. Έχει μία λεπτή πασσαλώδη ρίζα από την οποία εκφύονται ινώδεις πλάγιες ρίζες. Η μορφή του ριζικού συστήματος όμως εξαρτάται τόσο από τον γενότυπο όσο και από τις εδαφικές συνθήκες των περιοχών όπου αυτοί οι γενότυποι εξελίχθηκαν. Στην κύρια ρίζα καθώς και στις πλάγιες διακλαδώσεις, κυρίως στα ανώτερα τμήματα του εδάφους, σχηματίζονται φυμάτια συνεχούς ανάπτυξης με σχήμα συνήθως επίμηκες ωοειδές αλλά και στρογγυλό.

Το υπέργειο τμήμα του φυτού αποτελείται από τον κύριο βλαστό και από πρώτης και δεύτερης τάξης διακλαδώσεις. Οι βλαστοί είναι λεπτοί και έχουν γωνιώδη περιφέρεια με ραβδώσεις. Ανάλογα, με τον τρόπο έκπτυξης των βλαστών, οι διάφορες ποικιλίες μπορεί να έχουν όρθια ή έρπουσα ανάπτυξη, με όλες τις ενδιάμεσες μορφές. Τα στελέχη ανάλογα με την ποικιλία φέρουν τρίχες ή είναι σχεδόν λεία. Επίσης σε ορισμένους τύπους λείπει η χρωστική ανθοκυανίνη, ενώ σε άλλους είτε περιορίζεται στη βάση των βλαστών, είτε εκτείνεται σε όλο τους το μήκος.

Τα φύλλα είναι σύνθετα και περιγράφονται ως πτερωτά ή περιπτόληκτα πτερωτά. Ο αριθμός των φυλλαρίων εξαρτάται από τον γενότυπο, ποικίλλει μέσα στον ίδιο τον γενότυπο από τη θέση του φύλλου επάνω στο φυτό που μπορεί να φθάσει τα 7-8 ζεύγη.

Τα άνθη φέρονται μεμονωμένα ή σε ομάδες των 2-3 ανθέων και σπανιότερα των 4, αν και σε ελεγχόμενες συνθήκες αναφέρονται μέχρι και 7 άνθη (Muehlbauer κ.α,1995), στην άκρη ενός ποδίσκου, ο οποίος εκφύεται από τις μασχάλες των ανώτερων φύλλων του φυτού. Τα άνθη είναι μικρά, με μήκος 4-8 mm και χρώμα ελαφρώς ροδόχρουν ή ροδόχρουν-μπλε.

Οι λοβοί είναι λείοι, μικροί, πεπλατυσμένοι, με διαστάσεις 6-20 mm μήκος και 3,5-11 mm πλάτος. Οι σπόροι έχουν σχήμα αμφίκυρτου φακού και είναι λιγότερο ή περισσότερο πεπλατυσμένοι, με βάρος από 20 έως 80 mg και διάμετρο από 2 έως 9 mm, ανάλογα με την ποικιλία το περισπέρμιο έχει ποικίλα χρώματα και η επιφάνεια των σπόρων είναι συνήθως λεία, αλλά σε μερικές μεγαλόκαρπες ποικιλίες μπορεί να είναι ρυτιδωμένη (Παπακώστα,2005).



Εικόνα 2: Βλαστοί φακής όπου διακρίνονται η μορφολογία των φύλλων, των ταξιανθιών, των λοβών καθώς και η συνεχής τους ανάπτυξη

1.5 Αύξηση και ανάπτυξη

Η φακή είναι φυτό συνεχούς ανάπτυξης και η άνθηση προχωρεί σταδιακά από τη βάση προς τη κορυφή του φυτού, ενώ συνεχίζεται η βλαστική ανάπτυξη. Σε πειράματα που έγιναν στη Β.Συρία (**Saxena και Hawtin 1981**) βρέθηκε ότι με φθινοπωρινή σπορά, ο ρυθμός συγκέντρωσης ξηράς ουσίας στα βλαστικά τμήματα των φυτών της φακής ήταν μικρός τις πρώτες 100 ημέρες από τη σπορά και στη συνέχεια αυξήθηκε γραμμικά με το χρόνο. Σε ανοιξιάτικη σπορά, ο ρυθμός συγκέντρωσης της ξηράς ουσίας ήταν ταχύς από τα πρώτα στάδια αύξησης.



Εικόνα 3: Καλλιέργεια φακής στον αγρό στο στάδιο έναρξης της άνθησης

1.6 Οικολογικές απαιτήσεις

Αντέχει στις χαμηλές θερμοκρασίες και στις εύκρατες περιοχές καλλιεργείται ως φθινοπωρινή καλλιέργεια. Η αντοχή όμως μειώνεται με την αύξηση της ηλικίας (**Murray κ.α 1998**) και τα αναπτυγμένα φυτά ζημιώνονται σε θερμοκρασίες

μικρότερες από -12° C. Επιπλέον, πολλές από τις καλλιεργούμενες ποικιλίες υφίστανται ζημιές σε θερμοκρασία -7° C. Για τους λόγους αυτούς, σε πολύ ψυχρές περιοχές η φακή σπέρνεται ως ανοιξιάτικη καλλιέργεια. Στις υψηλές θερμοκρασίες η φακή παρουσιάζει αρκετή ανθεκτικότητα με τις μικρόσπερμες ποικιλίες περισσότερο. Όλες οι ποικιλίες της φακής και ιδιαίτερα οι μικρόκαρπες, αντέχουν αρκετά στην ξηρασία, αποφεύγοντας αυτήν με την πρωιμότητα τους. Η ανάπτυξη γενοτύπων ανθεκτικών στην ξηρασία αποτελεί προτεραιότητα στα βελτιωτικά προγράμματα της φακής. Τέλος, μειωμένη εμφανίζεται και η αντοχή της στην αλατότητα του εδάφους.

Η συμβίωση της φακής με τα υπάρχοντα ριζόβια του εδάφους είναι αποτελεσματική ενώ πάνω από το 85% του ολικού αζώτου που χρειάζεται το φυτό προέρχεται από την αζωτοδέσμευση (**Saxena, 1981**). Οι ανάγκες της σε φώσφορο είναι αυξημένες. Η λίπανση γίνεται είτε πριν τη σπορά σε όλη την επιφάνεια του αγρού με ενσωμάτωση, είτε σε γραμμές συγχρόνως με τη σπορά.

Η άριστη εποχή σποράς εξαρτάται από τις κλιματολογικές συνθήκες της κάθε περιοχής από την καλλιεργούμενη ποικιλία. Γενικότερα, η σπορά της καθυστερεί να επιτρέψει την καλλιέργεια της μετά τις πρώτες βροχές, για την καλύτερη αντιμετώπιση των ζιζανίων όπου φυσικά συντελεί σε μεγαλύτερες παραγωγές. Καταλληλότερος χρόνος σποράς για την χώρα μας όπως έδειξαν σχετικά πειράματα του Ινστιτούτου Κτηνοτροφικών Φυτών και Βοσκών Λάρισας, είναι μετά τις 10 Νοεμβρίου για τη Β. Ελλάδα και μετά τις 21 Νοεμβρίου για την Κεντρική και Νότια Ελλάδα. Οι συνιστώμενες ποσότητες σπόρου είναι 8-9 kg/στρ. για τις μικρόσπερμες ποικιλίες, 9-10 kg/στρ. για τις μεσόσπερμες και 10-11 kg/στρ. για τις μεγαλόσπερμες.

Επιπρόσθετα, στη φακή μπορεί να εφαρμοσθεί μειωμένη κατεργασία του εδάφους ή ακαλλιέργεια. Πειράματα στον Καναδά (**Slinkard 1978**) έδειξαν ότι η απόδοση της φακής, όταν η σπορά έγινε στη καλαμιά των σιτηρών, ήταν ίση με το 83-89% της απόδοσης που επιτεύχθηκε με κατεργασία του εδάφους. Η φακή προσαρμόζεται στο σύστημα αμειψισποράς των χειμερινών σιτηρών. Σε μακροχρόνιο πείραμα αμειψισποράς του Ινστιτούτου Κτηνοτροφικών Φυτών και Βοσκών Λάρισας, με συνεχή εναλλαγή σιταριού με φακή, βρέθηκε ότι η φακή διατήρησε σε υψηλά επίπεδα τις αποδόσεις του σιταριού (**Ηλιάδης 1992**).



Εικόνα 4: Σπόροι φακής

Ως προς τη συγκομιδή της φακής το μεγαλύτερο πρόβλημα είναι το μικρό χρονικό διάστημα που έχει στη διάθεση του ο παραγωγός (μέγιστο 10 ημέρες), από τη στιγμή που τα φυτά αρχίζουν να κιτρινίζουν μέχρις ότου ξηραθούν εντελώς και πάρουν χρώμα κίτρινο –καφέ. Η συγκομιδή γίνεται με τους εξής τρόπους: 1) εκρίζωση των φυτών ή θερισμός στην επιφάνεια του εδάφους, όταν η υγρασία των περισσότερων σπόρων είναι περίπου 30% και τα φυτά αρχίζουν να κιτρινίζουν, 2) θεριζοαλωνισμός όταν η υγρασία του σπόρου είναι 12 έως 14%. Στο στάδιο αυτό οι λοβοί πολλών ποικιλιών ανοίγουν με αποτέλεσμα απώλεια μεγάλης ποσότητας σπόρου στο έδαφος. Για την αποθήκευση της φακής η υγρασία δεν πρέπει να ξεπερνά το 13% και σπόρος πρέπει να είναι καθαρός από ξένες ύλες.

1.7 Οικονομική σημασία

Πρόκειται για μία σημαντική καλλιέργεια με μεγάλη διατητική αξία, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας της σε πρωτεΐνες, μικροστοιχεία και βιταμίνες. Τα ώριμα βλαστικά της μέρη είναι μία έξοχη ξηρά τροφή για τα ζώα.

Αποτελεί μια σχετικά μικρή καλλιέργεια σε σύγκριση με το σιτάρι, το ρύζι, το καλαμπόκι και τη σόγια και καταλαμβάνει τη τρίτη θέση μεταξύ των οσπρίων δροσερής εποχής πίσω από το μπιζέλι και το ρεβίθι.

Καλλιεργείται σε εναλλαγή με τα δημητριακά για να σπάσει τους κύκλους ασθένειας των δημητριακών και για να διορθώσει το ατμοσφαιρικό άζωτο, μειώνοντας με τον τρόπο αυτό τη χρήση αζωτούχων λιπασμάτων (**Rubeena**

κ.α,2003). Λόγω της εξημέρωσης της από την αρχαιότητα έχει παρουσιαστεί μία μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ των ντόπιων ποικιλιών ανά τους αιώνες (**Fiocchetti κ.α, 2009**).

Οι ποικιλίες ανάλογα με το μέγεθος του σπόρου κατατάσσονται σε 2 κατηγορίες : 1) στις μεγαλόσπερμες με σπόρους διαμέτρου 6-9 mm και 2) στις μικρόσπερμες με σπόρους διαμέτρου 2-6 mm. Οι μεγαλόσπερμες ποικιλίες εμφανίζονται κυρίως στην περιοχή της Μεσογείου και στο δυτικό ημισφαίριο, ενώ οι μικρόσπερμες έχουν έντονη παρουσία στην περιοχή της Ινδίας και στις περιοχές της Εγγύς Ανατολής (**Muehlbauer κ.α, 1985**).

Συμπληρωματικά, οι μακρόσπερμες ποικιλίες έχουν κίτρινες ή πορτοκαλί κοτυληδόνες και περισπέρμιο από διάφορα χρώματα, από ωχρό κίτρινο ως μαύρο και οι μεγαλόσπερμες έχουν κίτρινες κοτυληδόνες και ωχρό πράσινο περισπέρμιο, το οποίο μπορεί να έχει στίγματα. Αυτά τα φυτά έχουν μία πιο εύρωστη λαχανοκομική δομή από τις μικρόσπερμες καθώς και μεγαλύτερα φυλλάρια και καρπούς (**Cubero, 1981**).

Μέχρι την αρχή του 20^{ου} αιώνα η καλλιέργεια της φακής ήταν ευρέως διαδεδομένη λόγω της πρωτεϊνικής της αξίας στη διατήρηση της γεωργίας. Από το μέσο του 20^{ου} αιώνα σχεδόν εξαφανίστηκε από τα συστήματα καλλιέργειας, αλλά ντόπιες και καλλιεργούμενες ποικιλίες επέζησαν στις *ex situ* συλλογές. Η κλασσική καλλιέργεια της φακής βασίζεται κυρίως στις τοπικές ποικιλίες του *L. culinaris* ssp. *culinaris*. Αντίθετα, οι νέες ποικιλίες της φακής προέρχονται από ένα μικρό αριθμό βελτιωμένων ποικιλιών που έχουν προσαρμοσθεί για συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες. Η βελτίωση της φακής στην Κεντρική Ευρώπη περιορίστηκε από το 1950, αλλά παραμένει μια ενδιαφέρουσα καλλιέργεια

1.8 Προϊόντα και ποιότητα αυτών

Το κύριο προϊόν για το οποίο καλλιεργείται η φακή είναι ο ξηρός σπόρος για τη διατροφή του ανθρώπου. Στα ζώα διατίθεται κατώτερης ποιότητας σπόρος. Επίσης, τα υπολείμματα της καλλιέργειας μετά τον αλωνισμό μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως χονδροειδής ζωοτροφή. Η χλωρομάζα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακόμα στη διατροφή των ζώων (βόσκηση ή σανός) και ως χλωρά λίπανση. Στην Ελλάδα επειδή η ανάπτυξη της φακής είναι πολύ περιορισμένη λόγω του ξηροθερμικού κλίματος, η

χλωρομάζα δεν βρίσκει τις παραπάνω χρήσεις. Ο σπόρος της φακής είναι υψηλής θρεπτικής ουσίας με περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη από 20-28% και υψηλή περιεκτικότητα σε σίδηρο κατά μέσο όρο 7 mg/100g αποξηραθέντος σπόρου.

Ο πιο συνηθισμένος τρόπος μαγειρέματος της φακής στην Ελλάδα είναι η παρασκευή σούπας με ολόκληρους τους σπόρους. Σε άλλες χώρες προτιμώνται οι αποφλοιωμένοι σπόροι, οι οποίοι έχουν μεγαλύτερη πεπτικότητα των πρωτεϊνών. Σε άλλες περιοχές οι σπόροι αλέθονται σε αλεύρι, το οποίο προστίθεται στο αλεύρι των σιτηρών και παρασκευάζονται διάφορα τρόφιμα.

Η φακή έχει περιορισμένους αντιθρεπτικούς παράγοντες, οι σπουδαιότεροι των οποίων είναι αιμογλουτενίνες και αναστολείς της τρυψίνης. Η αντιθρεπτική τους δράση σχεδόν μηδενίζεται με βρασμό υπό πίεση. Η εμπορική ποιότητα της φακής καθορίζεται κυρίως από τα εξής χαρακτηριστικά : την ομοιομορφία μεγέθους και σχήματος, το χρώμα περισπερμίου και κοτυληδόνων, τη βραστικότητα και την καθαρότητα από ξένες ύλες (Παπακώστα, 2005).

1.9 Γενετική

Η φακή είναι ετήσιο διπλοειδές ($2n=14$ χρωμοσώματα) αυτογονιμοποιούμενο φυτό (Erskine 1997, Sonnante και Pignone 2001, Muehlbauer et al. 2006, Toklu et al. 2009). Όλα τα είδη του γένους έχουν παρόμοιους καρύτυπους. Το μέγεθος του απλοειδούς γονιδιώματος της είναι 4,063 Mbp (Duran κ.α,2004, Hamwieth κ.α,2005).

1.10 Διασταυρώσεις και υβρίδια

Τα είδη *Lens culinaris* και *Lens orientalis* διασταυρώνονται πλήρως μεταξύ τους και παράγουν γόνιμους απογόνους. Διασταυρώσεις μεταξύ των φυτών που ανήκουν στα *L.culinaris-L.odemensis* και φυτών που ανήκουν στα *L.ervoides-L.nigricans* αποτυγχάνουν λόγω αποβολής του εμβρύου του υβριδίου, ωστόσο με την εμβρυογένεση παράγονται βιώσιμα υβρίδια που προκύπτουν από τις παραπάνω διασταυρώσεις.

Μία σχετικά πρόσφατη αναφορά έδειξε ότι τα βιώσιμα υβρίδια μπορούν να συντηρηθούν από τις διασταυρώσεις ανάμεσα σε καλλιεργούμενα και σε 4 άγρια είδη

φακής εφαρμόζοντας γιββερλικό οξύ (GA₃) μετά την γονιμοποίηση (**Ahmad et al. 1995**). Ακόμη, ο **Ladizinsky et al. (1985)** διατήρησε βλαστικώς τα υβρίδια *L. culinaris* × *L. Ervoides* χρησιμοποιώντας τεχνικές της εμβυοκαλλιέργειας. Επίσης, εξήγησε ότι η επιτυχία στις διασταυρώσεις της φακής εξαρτάται από την αλληλεπίδραση μεταξύ των γενωμάτων των γονέων, το υβρίδιο του ζυγώτη, το έμβρυο ή το ενδοσπέρμιο καθώς και στο τμήμα μεταξύ του ιστού του υβριδίου και του περιβλήματος του.

1.11 Φυτογενετικοί πόροι

Σύμφωνα με τον **FAO** (Food & Agriculture Organization), περίπου το 75% του φυτικού γενετικού υλικού και το 90% των ντόπιων ποικιλιών έχουν εκλείψει μέσα στα τελευταία 100 χρόνια, καθώς οι γεωργοί σε όλο τον κόσμο έχουν εγκαταλείψει σταδιακά τις ποικιλίες που καλλιεργούσαν παραδοσιακά, για ομοιόμορφες βελτιωμένες ή “εξωτικές” ποικιλίες, υψηλών αποδόσεων. Αποτέλεσμα αυτής της εγκατάλειψης είναι η παγκόσμια διατροφή να βασίζεται, σήμερα, κατά 75% σε 12 καλλιεργούμενα φυτά, με κύρια το ρύζι, τον αραβόσιτο και το σιτάρι (**FAO, 2004**).

Τα γεγονότα αυτά θέτουν ανησυχίες για το μέλλον, τόσο των ίδιων των φυτογενετικών πόρων και των τοπικών ποικιλιών, όσο και της βιωσιμότητας του γεωργικού τομέα, ιδιαίτερα στις δυτικές, βιομηχανοποιημένες χώρες

Ο όρος φυτογενετικοί πόροι περιλαμβάνει το σύνολο της διαθέσιμης γενετικής παραλλακτικότητας των καλλιεργούμενων ειδών και των άγριων συγγενών ειδών τους, που μπορεί να συμβάλουν στη βελτίωση των καλλιεργειών (**Hawkes, 1983**). Στην περίπτωση της *in situ* διατήρησης, οι πληθυσμοί διατηρούνται στα φυσικά τους περιβάλλοντα, είτε στην άγρια μορφή τους, είτε στον αγρό (on farm), (IPGRI). Η διατήρηση στον αγρό αποτελεί τον καλύτερο τρόπο προστασίας των ποικιλιών, αφού πρόκειται για ένα συνδυασμό ανθρώπινης επέμβασης και φυσικής διαδικασίας. Η ποικιλότητα στον αγρό είναι πολύ σημαντική, για αγρότες που έχουν περιορισμένες δυνατότητες συμμετοχής στην αγορά, λόγω μικρής παραγωγής (**Bellon, 2003**) όπως σχεδόν συμβαίνει και στην ποικιλία την οποία μελετούμε. Με λίγα λόγια, η *in situ* διατήρηση συμβάλει στη διατήρηση της παραδοσιακής γνώσης και πρακτικής των

γεωργών, καθώς και συναφών μεθόδων χρήσης, που αποτελούν σημαντικό κομμάτι της αγροτικής παράδοσης και του πολιτισμού ενός τόπου.

Το πιο σημαντικό, ωστόσο, είναι ότι η έννοια της ποικιλίας, όπως ορίζεται από τους γεωργούς, είναι ένα “ανοιχτό γενετικό σύστημα”, που τροποποιείται δια μέσω του χρόνου. Η ιδέα αυτή, διαφέρει σημαντικά από τη “σταθερή, συγκεκριμένη και ομοιόμορφη” αντίληψη που εφαρμόζεται, τόσο στην αναπαραγωγή φυτών, όσο και στις περισσότερες περιπτώσεις διατήρησης των φυτογενετικών πόρων (**Louette, 1997**).

Με λίγα λόγια, για τη γενετική βελτίωση του γενετικού υλικού, οι φυτογενετικοί πόροι επιλέχθηκαν λόγω των αγρονομικών χαρακτηριστικών τους και της υψηλοαποδοτικότητάς τους. Διασταυρώθηκαν, ανασυνδυάστηκαν και έπειτα επιλέχθηκαν προκειμένου να προσαρμοστούν στο στοχευόμενο περιβάλλον. Ακόμη, οι φυτογενετικοί πόροι μπορούν επίσης να διασταυρωθούν με τα βελτιωτικά υλικά και η επιλογή για το χαρακτηριστικό της απόδοσης να πραγματοποιηθεί στην F_2 και στην BC_1 γενεά. Μία απευθείας χρήση των υψηλώς μη προσαρμόσιμων φυτογενετικών πόρων απαιτεί περισσότερο χρόνο και έξοδα με μοναδικό μειονέκτημα το μεγάλο χρονικό διάστημα που απαιτείται για την πλήρη αξιοποίησή τους. Ο **Goodman(1999)** έδειξε ότι η απευθείας προσαρμογή των άριστων εξωτικών υλικών μπορεί να αποφέρει υλικά ανώτερα από ότι είναι τα πραγματικά αποτελέσματα της βελτίωσης.

Ωστόσο τα εργαλεία της μοριακής γενετικής έρευνας ίσως τελικά βοηθήσουν στην καλύτερη γνώση της γενετικής ικανότητας των άγριων και καλλιεργούμενων πηγών γενετικού υλικού, προς όφελος της κοινωνίας (**Tanksley και McCouch,1997**).

Η χρησιμότητα των μοριακών δεικτών στο τομέα της χρήσης των φυτογενετικών πόρων για τη βελτίωση των φυτών, απαρτίζεται από:

- Τις διαφορετικές μελέτες που σχετίζονται με τη ταυτοποίηση γενετικά όμοιων ή ξεχωριστών ποικιλιών ώστε να καθοριστούν οι μεμονωμένοι βαθμοί ετεροζυγωτίας και ετερογένειας στους πληθυσμούς των φυτογενετικών πόρων.
- Την γενετική χαρτογράφηση ώστε να ταυτοποιηθούν οι κληρονομούμενοι δείκτες που επιδρούν στα ποσοτικά γνωρίσματα.
- Την εκμετάλλευση αξιόλογων ποσοτικών γνωρισμάτων από τους φυτογενετικούς πόρους μέσω της προχωρημένης ανάλυσης μέσω των QTL αναδιασταυρώσεων.

- Τις συνδυαστικές έρευνες που θα οδηγήσουν ακριβώς στη γενετική ποικιλότητα των φυτογενετικών πόρων ώστε να ταυτοποιηθούν τα αλληλόμορφα που είναι ευεργετικά για σημαντικά αγρονομικά χαρακτηριστικά.

Η αυξανόμενη όμως διαθεσιμότητα των μοριακών δεικτών ανακάλυψε νέες πιθανότητες για τη γενετική αποτίμηση των φυτογενετικών πόρων που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στη γενετική βελτίωση.

Ωστόσο η παρακάτω διαδικασία φαίνεται αρκετά κατάλληλη για τη βελτίωση των υβριδίων μέσω της χρήσης των φυτογενετικών πόρων.

Ειδικότερα:

- Η εγκαθίδρυση ετερωτικών ομάδων που βασίζονται σε μοριακούς δείκτες .
- Η δοκιμή της ικανότητας των υβριδίων που παράγονται από διασταυρώσεις σε αντιπροσωπευτικούς γενοτύπους από κάθε ετερωτική ομάδα.

Ακόμη, η βοηθούμενη από μοριακούς δείκτες επιλογή μπορεί να οδηγήσει: α) στην επιλογή των μεμονωμένων ατόμων που μεταφέρουν μοριακούς δείκτες συνδεδεμένους με το ενδιαφέρον χαρακτηριστικό και β) στη μείωση των ανεπιθύμητων τμημάτων του δωρητή-γενώματος συμπεριλαμβανομένου της εμποδιζόμενης σύνδεσης. Χρησιμοποιώντας ένα συνδυασμό αυτών των δύο μεθόδων, η μεταφορά ενός μονογονιδιακού χαρακτηριστικού από ένα φυτογενετικό πόρο σε μία γραμμή βελτίωσης πραγματοποιείται σε τρεις έως τέσσερις γενεές σε αντίθεση με τις συνήθεις έξι της μεθόδου της αναδιασταύρωσης χρησιμοποιώντας πάντα τις ίδιες αναλογίες του γενετικού υλικού του δότη (**Ragot et al.,1995**).

Γενικότερα, η QTL ανάλυση μπορεί να πραγματοποιηθεί σε αναδιασταυρώμενες γενεές που προήλθαν από διασταυρώσεις εξωτικών φυτογενετικών πόρων με πολύ καλά βελτιωτικά υλικά. Η προχωρημένη QTL ανάλυση αναδιασταύρωσης συνδυάζει την QTL ανάλυση με την ανάπτυξη των ανώτερων γενοτύπων και αποδείχθηκε πως είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τη μεταφορά χαρακτηριστικών από χαμηλώς προσαρμόσιμο γενετικό υλικό και για το λόγο αυτό αποτελεί μία από τις σπουδαιότερες τεχνικές για τη χρήση των φυτογενετικών πόρων στη βελτίωση των φυτών.

Η χρήση των φυτογενετικών πόρων είναι πλέον ευρέως διαδεδομένη. Χαρακτηριστικά αναφέρονται τα προγράμματα βελτίωσης ως προς τα ποιοτικά και αγρονομικά χαρακτηριστικά και βελτίωση της αντοχής των φυτών σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. Όλα αυτά όμως είναι σε θέση να επιτευχθούν με τη μέθοδο της αναδιασταύρωσης. Υπάρχουν όμως δυσκολίες στην περίπτωση που τα

προγράμματα βελτίωσης περιλαμβάνουν διασταυρώσεις μεταξύ διαφορετικών ειδών. Δύο νέες τεχνικές, η διάσωση εμβρύου και η σύντηξη πρωτοπλαστών, συμβάλλουν στην επίλυση των προβλημάτων που προκύπτουν από τις διειδικές διασταυρώσεις.

Στη διάσωση του εμβρύου, ένα μη βιώσιμο έμβρυο υβριδίου μεταφέρεται σε ένα καλλιεργητικό μέσο όπου μπορεί να αναπτυχθεί και έπειτα να αναδιασταυρωθεί με ένα καλλιεργούμενο είδος, προκειμένου να μεταφερθεί το επιθυμητό γενετικό χαρακτηριστικό.

Η σύντηξη πρωτοπλαστών παρέχει ένα εναλλακτικό τρόπο για τη μεταφορά των επιθυμητών χαρακτηριστικών ανάμεσα σε διαφορετικά είδη φυτών. Επιτυγχάνεται με τη προσθήκη ιόντων ασβεστίου ή χρησιμοποιώντας ηλεκτρικά πεδία ώστε να έρθουν σε επαφή οι πρωτοπλάστες. Η επιτυχημένη μεταφορά γονιδίων δια μέσου σύντηξης πρωτοπλαστών εξαρτάται από την ικανότητα αναγέννησης φυτού από το προϊόν σύντηξης.

1.12 Φακή

Μία έρευνα των **Solh και Erskine (1979)**, αποδεικνύει πως οι τοπικές ποικιλίες καλύπτουν λίγο παραπάνω από το 80% των περιοχών των πιο παραγωγικών χωρών και δείχνει ότι δεν έχει μελετηθεί πολύ από τους βελτιωτές καθώς η φακή αποτελεί ένα από τα παλαιότερα φυτά που εξημερώθηκαν.

Οι υπάρχουσες τοπικές ποικιλίες αντικατοπτρίζουν τις φυσικές συνέπειες και προτιμήσεις στις χρήσεις της καλλιέργειας. Η ανθρώπινη επιλογή έναντι της φυσικής επιλογής επηρεάζει μόνο λίγους γενετικούς τόπους. Το φαινόμενο αυτό είναι ευρέως γνωστό και ως « σύνδρομο εξημέρωσης» (**Sonnante και Pignone, 2007**).

Στην Ιταλία, οι περισσότερες ποικιλίες επιζούν στον αγρό σε δυσκαλλιεργητες περιοχές και εκτεθειμένες σε μεγάλο κίνδυνο γενετικής διάβρωσης ακόμα και σε αφανισμό. Πολλές όμως είναι και οι ποικιλίες που αναπτύσσονται σε ορισμένες ιταλικές περιοχές λόγω του άριστου συνδυασμού θερμοκρασίας, υγρασίας και εδάφους (**Scirpa κ.α 2008**).

Πρόσφατα αρκετές καλλιεργούμενες ποικιλίες φακής αναπτύχθηκαν μέσω της ξεχωριστής επιλογής φυτών από ορισμένες τοπικές ποικιλίες που συλλέχθηκαν από την νοτιοανατολική Ασία όπως οι 'Kafkas' και 'Ozbek' (**Toklu κ.α,2009b**). Οι τοπικές ποικιλίες από τη Νότια Ασία παρουσιάζουν χαμηλή ποικιλομορφία σε σχέση

με ντόπιες άλλων χωρών, σύμφωνα με το συνδυασμό ποιοτικών και ποσοτικών αγρομορφολογικών χαρακτήρων. Η κατανόηση των γενετικών σχέσεων και της ποικιλότητας των τοπικών ποικιλιών της Νότιας Ασίας σε σχέση με άλλες άλλων χωρών είναι σημαντική για τη διερεύνηση της γενετικής βάσης του γενετικού υλικού στην περιοχή.

1.13 Τράπεζες γενετικού υλικού

Με την τεχνολογική και οικονομική επανάσταση που επικράτησε μετά το δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο δόθηκαν στον άνθρωπο τεράστιες δυνατότητες να επηρεάσει τα φυσικά και αγροτικά οικοσυστήματα και το οικονομικό περιβάλλον. Σταδιακά, οι νέες συνθήκες οδήγησαν στην επικράτηση λίγων εκλεκτών ποικιλιών και υβριδίων με υψηλή ποιότητα και απόδοση. Ως επακόλουθο όλων αυτών των νέων τάσεων ήταν να χαθεί ένα μεγάλο μέρος του παραδοσιακού γενετικού υλικού, μία κατάσταση γνωστή με τον όρο γενετική διάβρωση.

Η έντονη ανησυχία αρκετών συνειδητοποιημένων επιστημόνων και διεθνών οργανισμών για τον ορατό κίνδυνο να χαθεί ο τεράστιος γενετικός πλούτος με το πέρασμα λίγων δεκαετιών οδήγησε στην απόφαση να υποστηριχθεί από τις εθνικές κυβερνήσεις και τους αρμόδιους διεθνείς οργανισμούς (UN, UNDP, CGIAR, FAO κ.λ.π.), η δημιουργία τραπεζών γενετικού υλικού σε στρατηγικά σημεία της υφελίου με υψηλή γενετική ποικιλότητα ειδών.

Οι τράπεζες γενετικού υλικού συμβάλλουν στη συντήρηση και αποθήκευση του γενετικού υλικού τόσο των καλλιεργούμενων ειδών όσο και των άγριων ειδών τους. Το γενετικό υλικό είναι συνήθως σε μορφή σπόρων ή άλλων τμημάτων του φυτικού ιστού. Ορισμένα από τα είδη που διατηρούνται είναι υπό εξαφάνιση και για το λόγο αυτό η αξία αυτών των φυτογενετικών πόρων ενισχύει όχι μόνο τη παρούσα και τη μελλοντική τους χρηστική αξία αλλά και τη προοπτική να χρησιμοποιηθούν στο μέλλον σε κάποιες απρόβλεπτες περιπτώσεις **(Dodds J., A.Krattiger και SP.Kowalski , 2007)**.

Ειδικότερα, οι δράσεις των τραπεζών γενετικού υλικού συνίστανται στη συλλογή, διάσωση και διατήρηση των απειλούμενων εγχώριων παραδοσιακών ποικιλιών και των άγριων και αυτοφυών συγγενών ειδών τους, καθώς και στην εκτίμηση του

βαθμού της γενετικής τους διάβρωσης. Παράλληλα μελετώνται τα κύρια μορφολογικά και αγρονομικά χαρακτηριστικά τους, ώστε να καταστεί δυνατή η αξιοποίηση τους στη γενετική βελτίωση και στη δημιουργία επίλεκτων και ποιοτικά ανώτερων ποικιλιών.

Για παράδειγμα, στην Τράπεζα Γενετικού Υλικού της Ελλάδας που βρίσκεται στη Θέρμη Θεσσαλονίκης, κατά τις τελευταίες δεκαετίες, τα βελτιωτικά προγράμματα βασίζονται σχεδόν αποκλειστικά σε διασταυρώσεις καλών σύγχρονων ποικιλιών με υποσχόμενες εισαγόμενες ποικιλίες, με αποτέλεσμα συνδυασμό των πλεονεκτημάτων τους στις νέες ποικιλίες που προκύπτουν. Στόχος η μεγαλύτερη απόδοση, η προσαρμογή στις τοπικές συνθήκες, η πρωιμότητα, η ανώτερη ποιότητα και η ανθεκτικότητα.

Ακόμη, στο πλαίσιο των δραστηριοτήτων της η Τράπεζα Γενετικού Υλικού έχει καταφέρει να διασώσει και να διαφυλάξει ένα μεγάλο αριθμό εγχώριων παραδοσιακών ποικιλιών, οι οποίες κινδυνεύουν να απολεσθούν οριστικά από την καλλιέργεια.

Γενικότερα, η διατήρηση του φυτογενετικού υλικού περιλαμβάνει: τη συλλογή, τη διατήρηση και διαχείριση, τον προσδιορισμό ενδεχόμενου πολύτιμου γενετικού υλικού, τον χαρακτηρισμό τους και το σκοπό της επακόλουθης χρήσης.

Η συλλογή είναι μία εύκολη διαδικασία στις περιπτώσεις των ειδών που παράγουν πολλούς και μικρούς σπόρους. Το πεδίο των ερευνών έχει διευρυνθεί και έχει καταστεί δυνατό να χρησιμοποιούνται *in vitro* τεχνικές που να επιτρέπουν τη συλλογή των σχετικά μικρών ζυγωτικών εμβρύων στον αγρό και η μεταφορά τους υπό αποστειρωμένες συνθήκες έως το εργαστήριο, όπου τοποθετούνται σε κατάλληλο για βλάστηση καλλιεργητικό μέσο.

Στην προσπάθεια όμως συστηματοποίησης της διαχείρισης των συλλογών γενετικού υλικού δύο είναι οι τύποι αποθήκευσης που επίσημα έχουν κατοχυρωθεί και χρησιμοποιούνται από τις Τράπεζες Γενετικού Υλικού (IBPGR, 1974) και οι οποίοι αναφέρονται με τους όρους : βασική συλλογή (base collection) και ενεργός συλλογή (active collection).

Οι **Engels και Visser (2003)** εισήγαγαν την έννοια του «περισσότερο αρχέτυπου δείγματος» (most-original sample-MOS), προκειμένου να περιγράψουν τα δείγματα που διατηρούνται στις βασικές συλλογές. Ένα δείγμα με την έννοια αυτή αποτελείται από σπόρους, που έχουν υποστεί το μικρότερο αριθμό αναπολλαπλασιασμών από τη στιγμή που το υλικό συλλέχθηκε από την Τράπεζα Γενετικού Υλικού. Ακόμη, θα

μπορούσε να αποτελεί ένα υπό-δείγμα της αρχικής σπορομερίδας αν η αρχική ποσότητα σπόρου απαιτούσε αναπολλαπλασιασμό πριν την ασφαλή αποθήκευση.

Η ενεργός συλλογή συνιστά ένα σύνολο συλλογών γενετικού υλικού, που είναι άμεσα διαθέσιμες για διανομή, καθώς και για σκοπούς αναπολλαπλασιασμού, αξιολόγησης και τεκμηρίωσης του διατηρούμενου φυτικού γενετικού υλικού. Οι συγκεκριμένες συλλογές είναι εύκολα και συχνά προσβάσιμες και διατηρούνται σε συνθήκες που διασφαλίζουν τουλάχιστον 65% βιωσιμότητα του σπόρου για μια περίοδο 10-20 ετών (FAO/IPGRI,1994). Συνδυασμοί θερμοκρασιών και ποσοστών υγρασίας των σπόρων για αποθήκευση των ενεργών συλλογών μπορούν να διασφαλίσουν βιωσιμότητα σπόρου σε ποσοστό 65% για μία περίοδο 10-20 ετών.

Ακόμη, έχουν αναπτυχθεί αρκετές *in vitro* τεχνικές που επιτρέπουν την ασφαλή αποθήκευση ευαίσθητου γενετικού υλικού και οι οποίες μπορούν να καταταχθούν : α) στις διαδικασίες αργής ανάπτυξης και β) στη κρυοδιατήρηση.



Εικόνα 5: *In vitro* τεχνικές που επιτρέπουν την ασφαλή αποθήκευση του γενετικού υλικού

2. Η ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΗΣ ΦΑΚΗΣ

Για αρκετά έτη σχεδόν μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του 1970 πραγματοποιήθηκαν σημαντικά προγράμματα βελτίωσης του είδους Lens με έμφαση στην ανάπτυξη προσαρμοσμένων, ανθεκτικών στις καταπονήσεις, υψηλοαποδοτικών γενοτύπων. Η βελτίωση της φακής έχει σχετικά μικρή ιστορία σε σύγκριση με άλλες μεγαλύτερες καλλιέργειες όπως αυτή των σιτηρών, αν και κατατάσσεται μεταξύ των αρχαιοτέρων φυτών που εξημέρωσε ο άνθρωπος. Στις περισσότερες χώρες όπου καλλιεργείται επί σειρά ετών η φακή, χρησιμοποιούνται ποικιλίες που είναι επιρρεπείς τόσο σε βιοτικούς όσο και σε αβιοτικούς παράγοντες. Οι **Solh** και **Erskine** επεσήμαναν ότι οι τοπικοί αβελτίωτοι πληθυσμοί αποτελούν πάνω από το 80% των ποικιλιών της καλλιεργούμενης φακής στις χώρες με τη μεγαλύτερη παραγωγή φακής. Οι ερευνητές αυτοί χαρακτήρισαν τη φακή αυτή ως «ανέγγιχτο» φυτό από την επιστήμη της βελτίωσης των φυτών.

Ωστόσο, τις τελευταίες 3 δεκαετίες η έρευνα της φακής ξεκίνησε να γίνεται πιο συστηματική σε σύγκριση με τις άλλες πρώιμα εξημερωμένες ποικιλίες και να έχει επιτευχθεί υψηλή πρόοδος σε πολλά επίπεδα έρευνας της καλλιέργειας. Έχουν συλλεχθεί, αποτιμηθεί και συντηρηθεί μεγάλοι αριθμοί γενοτύπων σε εθνικό και διεθνές επίπεδο, όπου το ICARDA διατηρεί τη μεγαλύτερη συλλογή καλλιεργούμενων και άγριων γενοτύπων (περίπου 7407 πληθυσμοί) ενώ σε εθνικά προγράμματα και άλλων χωρών διατηρούνται επίσης σημαντικοί αριθμοί πληθυσμών. Ταυτοποιήθηκαν πολλοί γενότυποι με αντοχή σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις αλλά κυρίως δημιουργήθηκαν πολλοί με ικανότητα αποφυγής του πλαγιάσματος ώστε να είναι κατάλληλοι για μηχανική συγκομιδή κυρίως στις χώρες της Δυτικής Ασίας και της Βόρειας Αφρικής. Δεν είναι τυχαίο εξάλλου πως η υιοθέτηση των βελτιωμένων ποικιλιών σε συνδυασμό με την προοδευτική τεχνολογία συνέβαλαν στην αύξηση της παγκόσμιας παραγωγής της φακής από 1.3 εκατομμύρια τόνους σε 3.8 εκατομμύρια τόνους κατά τις τελευταίες τρεις δεκαετίες.

Η θεωρητική βάση πάνω στην οποία κινήθηκαν τα προγράμματα του ICARDA , ήταν αφενός ότι οι ετερογενείς πληθυσμοί τείνουν να είναι πιο σταθεροί από τους ομογενείς πληθυσμούς και αφετέρου η διατήρηση της παραλλακτικότητας εντός των επιλεγέντων σειρών (**Erskine, 1997**).

Το βελτιωτικό πρόγραμμα του ICARDA είναι, μία τροποποίηση της μαζικής επιλογής. Βασίζεται στην επιλογή ατομικών φυτών και την ανάμιξη των απόρων τους έως την F4 γενεά. Η συνεχιζόμενη διάσπαση στις εναπομένουσες γονιδιακές θέσεις στις γενιές που ακολουθούν οδηγεί σε χαμηλό βαθμό ετεροζυγωτίας εντός των σειρών, αντίστοιχα με ότι ισχύει και στους τοπικούς πληθυσμούς (Erskine 1997). Αυτός ο οικονομικός τρόπος βελτίωσης έδωσε την δυνατότητα για τη δημιουργία βελτιωμένων πληθυσμών με προσαρμοστικότητα σε ένα μεγάλο εύρος περιβαλλόντων και βοήθησε στην αγροτική ανάπτυξη πολλών αναπτυσσόμενων περιοχών.



Εικόνα 6: Αναγέννηση βλαστών στο εργαστήριο

..

2.1 ΚΛΑΣΣΙΚΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ

Η γνώση των δυνάμεων της επιλογής που λειτουργούν κατά τη διάρκεια της διάδοσης της καλλιέργειας της φακής προέρχεται από αξιοποίηση της παραλλακτικότητας που υπάρχει στους σύγχρονους παραδοσιακούς πληθυσμούς από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Ακολουθώντας την εξάπλωση, συλλέγοντας και αξιολογώντας τους παραδοσιακούς πληθυσμούς στη δεκαετία του 1920, ο **Barulina (1930)** ταξινόμησε την παραλλακτικότητα σε έξι ομάδες (**grex varietatum**), κάθε μια από τις οποίες διαφοροποιήθηκε γεωγραφικά και χαρακτηρίστηκε από μία ομάδα μορφολογικών χαρακτήρων, κυρίως ποιοτικών, κοινών μέσα στην ομάδα αλλά διαφορετικών σε άλλες ομάδες. Αυτός ο τύπος γεωγραφικής συσχέτισης αντανάκλαται σε παραλλακτικότητα στα ποσοτικά μορφολογικά γνωρίσματα (**Davies et al.,2007**). Τέτοιοι μορφολογικοί χαρακτήρες παρατηρούνται εύκολα και οδηγούν

σε επιλογή. Η γεωγραφική διαφοροποίηση μεταξύ των παραδοσιακών πληθυσμών έχει βρεθεί και για άλλους άγνωστους οικοφυσιολογικούς παράγοντες που είναι αποτέλεσμα επιλογής για εδαφολογικές και για κλιματολογικές συνθήκες.

Για την εύρεση των σχέσεων, της ποικιλότητας, της διαφοροποίησης της οργάνωσης των γενετικών τόπων και της προσαρμοστικότητας της φακής χρειάζεται μεγαλύτερη ανάλυση (**Erskine και Muehlbauer, 1991**). Οι βελτιωτές και οι γενετιστές έχουν μελετήσει το βιοτικό και αβιοτικό στρες με ταυτοποίηση της αντοχής και της ανθεκτικότητας του γενετικού υλικού, εντοπίζοντας τη γενετική που περιλαμβάνεται και τις θέσεις των γονιδίων αντοχής στο γενετικό χάρτη. Για το λόγο αυτό έχει γίνει μεγάλη πρόοδος στη χαρτογράφηση του γονιδιώματος της φακής και ορισμένοι γενετικοί χάρτες είναι διαθέσιμοι για τη δημιουργία ενός αποδεκτού χάρτη για τη φακή (**Muehlbauer κ.α.,2006**).

Η κατανόηση και η γνώση της γενετικής ποικιλότητας και των γενετικών ομοιοτήτων μεταξύ ατόμων και πληθυσμών είναι χρήσιμη για την καλή χρήση των γενετικών πηγών και την κατάρτιση ενός βελτιωτικού προγράμματος. Ο βελτιωτής μπορεί να χρησιμοποιήσει τις πληροφορίες της γενετικής ομοιότητας ως συμπλήρωμα των φαινοτυπικών στην ανάπτυξη βελτιωμένων πληθυσμών.

Η αξιολόγηση της γενετικής ποικιλότητας δεν είναι χρήσιμη μόνο για πρακτικές εφαρμογές σε ένα βελτιωτικό πρόγραμμα, όπως είναι η συντήρηση των γενετικών πηγών και η εξάπλωση της γενετικής βάσης των καλλιεργούμενων, αλλά και για την προστασία των καλλιεργούμενων ποικιλιών (**Yuzbasioglu κ.α.,2006**).

Προκειμένου να καταστεί περαιτέρω κατανοητή η φαινολογία, μελετήθηκαν οι αντιδράσεις στην άνθηση, στη θερμοκρασία και τη φωτοπερίοδο σε μία παγκόσμια συλλογή 369 πληθυσμών από 13 σημαντικές χώρες παραγωγής (25 τυχαία επιλεγμένοι πληθυσμοί ανά χώρα) μαζί με τις γραμμές από πρόγραμμα βελτίωσης του ICARDA. Η κατανομή των χωρών με ευαισθησία στη θερμοκρασία και τη φωτοπερίοδο εξηγεί την ανταπόκριση στην επιλογή για την προσαρμοστικότητα σε νέα οικολογικά περιβάλλοντα μετά από τη διάδοση της καλλιέργειας από το κέντρο προέλευσης της (**Erskine et al., 1994**).

Η διάδοση σε χαμηλότερα γεωγραφικά πλάτη όπως την Αίγυπτο, την Αιθιοπία και την Ινδία συνοδεύτηκε από μείωση της αντίδρασης στη φωτοπερίοδο. Ο έλεγχος της φωτοπερίόδου στην αρχή της άνθησης, εξασφαλίζει ότι η άνθηση αρχίζει ετησίως την ίδια ημερολογιακή περίοδο, ανεξάρτητα από τις διακυμάνσεις στη θερμοκρασία.

Συνεπώς, η επιλογή για τον έλεγχο της φωτοπερίοδου σε ένα φυτό μεγάλης ημέρας όπως η φακή υπονοεί προσαρμογή σε σχετικά μικρές ημέρες, οι οποίες εμφανίζονται σε χαμηλά γεωγραφικά πλάτη και που ειδάλως θα καθυστερούσαν την άνθηση σε μεγάλη έκταση. Υπό αυτές τις συνθήκες, η καλλιέργεια στηρίζεται περισσότερο στη θερμοκρασία από ότι στην φωτοπερίοδο για να εξασφαλίσει ότι η άνθηση εμφανίζεται σε κατάλληλη οικολογικά και αγρονομικά χρονική στιγμή. Υπήρξαν επίσης στοιχεία, όπου η άνθηση στην υποτροπική ομάδα εμφάνισε ευαισθησία σε σχέση με τη θερμοκρασία από ότι στο δυτικό ασιατικό γένωμα (**Ellis και Hong, 1995**).

Ο **Mikhov (2006)** μελέτησε την αποδοτικότητα των μεθόδων βελτίωσης που χρησιμοποιήθηκαν στη φακή. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση για να μελετηθεί η αποδοτικότητα επιλογής σε παραδοσιακούς και σε βελτιωμένους πληθυσμούς των υβριδίων. Δεκατρείς νέες και παλιές ποικιλίες και πολλές γραμμές με βελτιωμένα χαρακτηριστικά αναπτύχθηκαν χρησιμοποιώντας αυτές τις μεθόδους. Οι παραδοσιακοί πληθυσμοί είχαν τη χαμηλότερη αποδοτικότητα επιλογής. Καταχωρήθηκαν ωστόσο τρεις ποικιλίες υψηλού δυναμικού με πολύτιμες ιδιότητες για την αντικατάσταση των παλαιών που ήδη χρησιμοποιούνται. Από τις ποικιλίες αυτές, οι παραγωγοί έχουν παρουσιάσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη ποικιλία *Bellaandrdquo* λόγω της απουσίας των τανινών και των ελαφριών και μεγάλων σπόρων με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη.

Επιπρόσθετα, για να μελετηθεί η ανθεκτικότητα της φακής στο ψύχος πραγματοποιήθηκε ανάλυση της κληρονομικότητας σε F_2 και F_3 πληθυσμούς σε δύο τοποθεσίες : στο Balochistan του Πακιστάν και σε ένα ελεγχόμενο περιβάλλον στο οχυρό Collins ,στο Κολοράντο των ΗΠΑ. Οι πληθυσμοί των πατρικών και F_2 πληθυσμών καλλιεργήθηκαν για δύο καλλιεργητικές χρονιές (1991-92 και 1992-93). Οι προσπάθειες για να χρησιμοποιηθεί η ανάλυση της παραλλακτικότητας εγκαταλείφθηκαν υπέρ της συσχέτισης γονέα-απογόνου για γνώση της κληρονομικότητας. Οι εκτιμήσεις της κληρονομικότητας κυμάνθηκαν από 0.31-0.06 έως 0,71-0.06 στις συνθήκες αγρού. Υπό ελεγχόμενες συνθήκες, η κατά εκτίμηση κληρονομικότητα μεγιστοποιήθηκε σε 1.00-0.17 χρησιμοποιώντας φακές 6 έως 8 εβδομάδων. Σημαντικές διασπάσεις διαφοροποιημένων φυτών βρέθηκαν σε πέντε από τους έξι πληθυσμούς στην F_3 γενιά. Τα διαφοροποιημένα φυτά εμφανίστηκαν στην ελεγχόμενη F_3 γενιά αλλά δεν παρατηρήθηκαν στον αγρό. Αυτό δείχνει ότι η

ανθεκτικότητα στο κρύο είναι κάτω από τον έλεγχο των γονιδίων και είναι περιβαλλοντικά ευαίσθητη στην έκφραση τους .

Οι **Fernandez et al., (2008)** αξιολόγησαν μια ισπανική συλλογή 234 γενοτύπων φακής για ανθεκτικότητα στο ζιζάνιο *Orobanche crenata* σε συνθήκες αγρού. Ένα ευρύ φάσμα αντιδράσεων παρατηρήθηκε, εντούτοις, πλήρης ανθεκτικότητα δεν ανιχνεύθηκε. Μερικοί γενότυποι φακής εμφάνισαν ουσιαστική μείωση μόλυνσης. Τριάντα πέντε γενότυποι φακής με μειωμένη μόλυνση επιλέχθηκαν για περαιτέρω αξιολόγηση στον αγρό για να καθορίσουν τα συστατικά της ανθεκτικότητας σε εργαστηριακά πειράματα. Η μειωμένη μόλυνση φάνηκε ότι βασίζεται σε ένα συνδυασμό διάφορων μηχανισμών ανθεκτικότητας : α) σε χαμηλότερη πυκνότητα μολυσμάτων στη ρίζα, β) σε χαμηλότερη επαγωγή βλάστησης σπόρου του ζιζανίου, γ) σε μειωμένη παραγωγή ριζών του ζιζανίου και σε δ) περιορισμένη ανάπτυξη φυματίων. Επιπλέον, σε μερικούς γενότυπους παρατηρήθηκε νέκρωση των φυματίων. Αυτή η μελέτη εξηγεί πως οι συμπληρωματικές *in vitro* μέθοδοι αξιολόγησης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ταξινομήσουν και να προσδιορίσουν τους γενότυπους φακής με πιθανή ανθεκτικότητα στο *Orobanche crenata* , βασισμένη σε μηχανισμούς διαφορετικής ανθεκτικότητας, οι οποίοι στο μέλλον μπορεί να μεταφερθούν σε κάποια ποικιλία με βελτίωση.

Οι **Maher et al.(2003)**, αξιολόγησαν 309 γενοτύπους φακής για ανθεκτικότητα σε υψηλά επίπεδα αλατότητας (6dS/m NaCl). Τα χαρακτηριστικά που χρησιμοποιήθηκαν για να καθορίσουν την ανθεκτικότητα ήταν: το ξηρό βάρος των βλαστών, το ύψος των φυτών και τα συμπτώματα τοξικότητας. Το αποτέλεσμα ήταν ότι 237 από τους 309 αξιολογηθέντες γενοτύπους , επηρεάστηκαν σημαντικά από 6 dS/m NaCl. Οι αυστραλιανές ποικιλίες είχαν χαμηλή ανθεκτικότητα σε NaCl , ειδικά η 'Nugget' και για τα τρία χαρακτηριστικά. Ένας γενότυπος που εμφάνισε ανθεκτικότητα και στα τρία χαρακτηριστικά ήταν ο ILL 3534 που κατάγεται από την Ινδία.

3. ΜΥΚΗΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΣΒΑΛΛΟΥΝ ΤΗ ΦΑΚΗ

Οι σπουδαιότερες κατηγορίες μυκητολογικών ασθενειών που προσβάλλουν τη φακή είναι:

- οι τήξεις φυταρίων,
- η φουζαρίωση, (*Fusarium oxysporum f.sp. lentis*)
- η ασκοχύτωση, (*Ascochyta fabae f.sp. lentis*)
- η σκωρίαση, (*Uromyces viciae fabae*)
- η Stemphylium blight και
- η σκληρωτίαση (σήψη), (*Sclerotinia Sclerotiorum*)

Συγκεκριμένα:

1) οι τήξεις φυταρίων: προκαλούνται από τους μύκητες *Rizoctonia solani*, *Pythium spp* και *Fusarium spp* και μόνο η αμειψισπορά είναι σε θέση να μειώσει την παρουσία των παθογόνων στο έδαφος.

2) η φουζαρίωση: Η (*Fusarium oxysporum f.sp. lentis*) αποτελεί μία σοβαρή ασθένεια της φακής σε διάφορα μέρη της γης. Ωστόσο, αποτελεί την πιο σημαντική ασθένεια της φακής στην Αλγερία όπου προκαλεί σπουδαίες οικονομικές απώλειες (**Setti και Bouznad, 1998**). Το παθογόνο παραμένει στο έδαφος για αρκετές καλλιεργητικές περιόδους (**Erskine και Bayaa, 1996**) και είναι σε θέση να αποικεί στα υπολείμματα των καλλιεργειών και κυρίως αυτών που εναλλάσσονται με τη φακή. Εισχωρεί σαν εισβολέας μέσω των τμημάτων της ρίζας στην περιοχή της ανάπτυξης και προσβάλλει το φυτό. Κατά την άνοιξη, τα φύλλα φακής αποκτούν χρώμα ανοικτό πράσινο και κιτρινίζουν στις άκρες. Έπειτα, ολόκληρα τα φυτά κιτρινίζουν και πολύ γρήγορα ξηραίνονται. Η εξάπλωση της ασθένειας ευνοείται με υγρό καιρό.

Η ασθένεια αντιμετωπίζεται με τη χρησιμοποίηση υγιούς και απολυμασμένου σπόρου, αμειψισπορά και φθινοπωρινή σπορά της φακής. Ακόμη, η ανάπτυξη ανθεκτικών ποικιλιών θα μπορούσε να είναι ένας επιπλέον αποτελεσματικός τρόπος αντιμετώπισης. Η βελτίωση της φακής ως προς την ανθεκτικότητα στη συγκεκριμένη ασθένεια είναι βαρύνουσας σημασίας για τους βελτιωτές.

3) η ασκοχύτωση: (*Ascochyta fabae f.sp. lentis*, συν. *Ascochyta lentis*), συγκαταλέγεται στις πιο σημαντικές ασθένειες που επηρεάζουν την παραγωγικότητα των καλλιεργειών. (Singh et al ., 1112 , Slinkard et al ., 1113). Αξίζει να σημειωθεί ότι έχουν παρατηρηθεί απώλειες μεγαλύτερες από 40% (Gossen και Morrall, 1984) σε χώρες όπως η Αργεντινή, ο Καναδάς, η Αιθιοπία, η Ινδία, η Νέα Ζηλανδία, το Πακιστάν και η Ρωσία. Οι μεγαλύτερες όμως οικονομικές απώλειες είναι αρκετά υψηλότερες στον Καναδά όπου μπορεί να φθάσουν μέχρι και το 70% και στην περίπτωση αυτή ο μολυσμένος σπόρος χρησιμοποιείται μόνο για ζωοτροφή.

Σε αρκετές όμως περιπτώσεις η μόλυνση του σπόρου μπορεί να είναι τόσο σημαντική ώστε η παραγωγή να εξανεμίζεται κατά 100%. (Kaiser 1981, Gossen και Morrall, 1983).

Τα συμπτώματα εμφανίζονται από το στάδιο του νεαρού φυταρίου μέχρι την εποχή της ωρίμανσης. Στα φύλλα, τα στελέχη και τους λοβούς αναπτύσσονται κηλίδες , αρχικά ανοιχτόγκριζες οι οποίες αργότερα γίνονται γκριζοκαστανές με σκοτεινο-καστανά περιθώρια. Το κέντρο των κηλίδων είναι ανοιχτόχρωμο και επάνω στους νεκρούς ιστούς αναπτύσσονται μαύρα πυκνίδια. Σε έντονη προσβολή προκαλείται πλήρης αποφύλλωση και ξήρανση των βλαστών στα άκρα τους. Οι σπόροι που προσβάλλονται μέσα στους λοβούς συρρικνώνονται και γίνονται πορφυρο-καστανοί. Ο υγρός καιρός ευνοεί την ανάπτυξη της ασθένειας. Ο μύκητας μεταδίδεται με το σπόρο της φακής και με τα προσβεβλημένα φυτικά τμήματα που πέφτουν στον αγρό.

Τα πυκνιδιοσπόρια στα υπολείμματα είναι τα βασικά μολύσματα των πρωτογενών μολύνσεων και τα μόνα για τις δευτερογενείς μολύνσεις κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των φυτών. Ο υγρός καιρός ευνοεί την ανάπτυξη της επιδημίας, πιθανόν γιατί συμβάλλει στη μετάδοση της ασθένειας.

Αντιμετωπίζεται με την χρησιμοποίηση υγιεινός σπόρου. Πειράματα που έγιναν με χρήση του thiabendazol και του benomyl στο σπόρο, πέτυχαν καλύτερη εμφάνιση του σπόρου και απέφυγαν την αύξηση των μολυσμένων φυτών στον αγρό. (Russell et al ., 1111). Ο χημικός έλεγχος όμως με διαφυλλική εφαρμογή αποτελεί μία αρκετά δαπανηρή επιλογή για εμφανή και άμεσα αποτελέσματα. Επίσης, για την καταπολέμηση της ασθένειας προτείνεται αμειψισπορά και βαθιά ενσωμάτωση των

φυτικών υπολειμμάτων. Υπάρχουν μετρίως ανθεκτικές ποικιλίες, οι οποίες θα πρέπει να προτιμώνται σε περιοχές με έντονο πρόβλημα.

Η βελτίωση για ανθεκτικότητα στην ασκοχύτωση αποτελεί σπουδαίας σημασίας για το ICARDA στο Πακιστάν. Έρευνες που διεξήχθησαν για την κληρονομήση της ανθεκτικότητας έδειξαν ότι τα περισσότερα γονίδια που σχετίζονται, εδράζονται στο γένωμα της φακής και επιτρέπουν την πιθανή χρήση της επιλογής μέσω του βοηθούμενου δείκτη.

4) η σκωρίαση: προκαλείται από τον μύκητα *Uromyces viciae fabae* και είναι η πιο σοβαρή ασθένεια του φυλλώματος της φακής. Η σκωρίαση της φακής εμφανίζεται στη Χιλή, στην Αιθιοπία, στην Ινδία, στο Μαρόκο και στο Πακιστάν. Εξαπλώνεται ωστόσο ταχύτατα και στη λεκάνη της Μεσογείου αλλά είναι οι επιδράσεις της είναι ασήμαντες οικονομικά. Πολλοί είναι οι συγγραφείς που έχουν αναφέρει γενετικές διαφορές στους γενότυπους και διάφορες πηγές ανθεκτικότητας. (Nene et al., 1975, Khare et al., 1979, Gurha, 1983, Reddy, 1984, Amin, 1985, Mishra et al., 1985, ICARDA, 1988, Singh & Sandhu, 1988).

5) η Stemphylium blight: αποτελεί μία μεγάλη απειλή για τη φακή κυρίως στη Νότια Ασία και τη Βόρεια Αμερική (ICARDA, 2004). Το παθογόνο προκαλεί μάρανση των φύλλων, αποφύλλωση των φυτών και θάνατο. Η ασθένεια γίνεται δύσκολα αντιληπτή επειδή υπάρχει διαθέσιμη ανθεκτικότητα στο γενετικό υλικό. Η γενετική της ανθεκτικότητας δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί.

6) η σκληρωτίαση: προκαλείται από τον μύκητα *S. Sclerotiorum* και είναι υπεύθυνη για μία εκτενή καταστροφή στις καλλιέργειες της φακής σε περιοχές που είναι υψηλά τα ποσοστά της υγρασίας. Το παθογόνο προσβάλλει 148 από τα γνωστά φυτικά είδη της φακής και υπάρχει μικρή ανθεκτικότητα στην ασθένεια. Οι βελτιωτικές έρευνες είναι συνεχείς και μία καθοδηγείται από μία QTL ανάλυση, χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένες, βελτιωμένες ποικιλίες από διασταυρώσεις χαμηλώς ανθεκτικών ποικιλιών και υψηλώς επιρρεπών ποικιλιών.

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΗΣ ΦΑΚΗΣ ΓΙΑ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥΣ ΜΥΚΗΤΕΣ

Εκτός από τις εκτενείς μελέτες για αγρονομικό και χημικό έλεγχο, καμία μέθοδος δεν ήταν αρκετή ώστε να αντιμετωπίσει την ασθένεια της ασκοχύτωσης στη φακή.

Η βελτίωση για την ανθεκτικότητα στα παθογόνα αποτελεί τη πιο αποτελεσματική και φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο για τον πλήρη έλεγχο της ασθένειας (**Erskine κ.α, 1994, Ye κ.α 2000**).

Η σύγχρονη λοιπόν βελτίωση της φακής ξεκίνησε εδώ και λίγες δεκαετίες και διεξάγεται σε εθνικά και διεθνή ινστιτούτα. Το μεγαλύτερο μέρος της φακής που καλλιεργείται από αγρότες εκτός του νέου κόσμου, έχει ακόμη τη μορφή των παραδοσιακών ποικιλιών, καθώς οι ποικιλίες αυτές επιλέχθηκαν για προσαρμογή στις συνθήκες κάθε τόπου και αποτελούν πολύτιμη πηγή γενετικής παραλλακτικότητας.

Ακόμη, η βελτίωση για ασθένειες με δημιουργία ανθεκτικών φυτών προτείνεται ως το πιο αποτελεσματικό μέσο για τον καλύτερο έλεγχο τους. Έχουν βρεθεί πολλοί ανθεκτικοί γενότυποι τόσο στις καλλιεργούμενες όσο και στις άγριες φακές καθώς και γονίδια ανθεκτικότητας. Τα προγράμματα βελτίωσης για τον έλεγχο των ασθενειών βασίζεται κυρίως σε επαναδιασταύρωση και τοπικά πειράματα. Η πυραμιδοποίηση των γονιδίων και η εύρεση κάθετης και οριζόντιας ανθεκτικότητας καθώς και η χρησιμοποίηση γονιδίων που είναι παρόντα σε άγρια είδη είναι οι μέθοδοι που θα χρησιμοποιηθούν στο μέλλον. Η αναγνώριση περισσότερων πηγών με γονίδια ανθεκτικότητας, η καλή γνώση του συστήματος παθογόνου-ξενιστή και η αναγνώριση μοριακών δεικτών στενά συνδεδεμένων με γονίδια ανθεκτικότητας προτείνονται ως οι πιο αποτελεσματικές λύσεις για περαιτέρω μελέτη. (**Ye et al., 2002**).

Η αλληλεπίδραση όμως του γενότυπου με το περιβάλλον έχει ιδιαίτερη σημασία όταν η ποικιλία που προκύπτει από την βελτίωση ως προς την ανθεκτικότητα σε κάποιο παθογόνο πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε μεγάλη έκταση. Υπάρχουν για την ακρίβεια δύο λόγοι που την καθιστούν σπουδαία. Πρώτον το γεγονός ότι τα παθογόνα μπορεί να ποικίλλουν στο βαθμό εισβολής κάτω από διαφορετικές περιβαλλοντικές

συνθήκες και δεύτερον ότι η δύναμη, η ανάπτυξη και το προφίλ της φυσιολογίας τους συχνά αλλάζει ανάλογα με το περιβάλλον (Ye, McNeil, Hill, 2002).

Πολλοί είναι οι γενότυποι που αναφέρθηκαν για την ανθεκτικότητα στην ασκοχύτωση. Συγκεκριμένα, γενότυποι όπως ο ILL-5588, ο ILL-7537 και ο Indianhead, χρησιμοποιούνται ευρέως ως πηγές ανθεκτικότητας σε Αυστραλιανά και Καναδέζικα προγράμματα βελτίωσης.

Πρόσφατα, ένα γονίδιο με το όνομα PI320937 ταυτοποιήθηκε ότι έχει ανθεκτικότητα τόσο στην ασκοχύτωση όσο και στην σκωρίαση. Οι στόχοι της έρευνας ήταν να εξιχνιάσουν την γενετική της ανθεκτικότητας στην ασκοχύτωση, χρησιμοποιώντας μία ανασυνδυασμένη, έμφυτη γραμμή πληθυσμού. Αναπτύχθηκε ένας γενετικός χάρτης από 275 AFLP, SSR και RAPD δείκτες. Δύο ποσοτικά γνωρίσματα ίχνους, *QTL1* και *QTL2* αναγνωρίστηκαν σε δύο συνδυαστικές ομάδες τις 6 και 2 όπου εξηγούσαν το 33.3% και το 6,6% αντίστοιχα την αντίδραση της ποικιλίας στην ασκοχύτωση. Το *QTL1* τοποθετήθηκε ανάμεσα σε ένα AFLP δείκτη, το ctagg2 και το *LCt2*, ένα γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την αντοχή στην σκωρίαση (*Colletotrichum truncatum*). Αυτό αποτελεί τη πρώτη ένδειξη για σύνδεση ανάμεσα στα γονίδια που απονέμουν την ανθεκτικότητα στα 2 διαφορετικά παθογόνα. Το αποτέλεσμα αυτό επαληθεύτηκε επιπλέον από τη παρουσία μιας θέσης ενός δείκτη, OP-P4400 στον χαρτογραφημένο πληθυσμό, όπου προηγουμένως είχε ταυτοποιηθεί να είναι συνδεδεμένο με ένα *QTL* για την ανθεκτικότητα στην ασκοχύτωση στην ποικιλία ILL-5588 της φακής.

Το γονίδιο PI320937 αποτελεί λοιπόν, μία άλλη πηγή ανθεκτικότητας έτοιμο σε χρήση για τη βελτίωση της ανθεκτικότητας στην ασκοχύτωση αλλά και στην σκωρίαση. Οι δείκτες AFLP και RAPD που τοποθετήθηκαν γύρω από την περιοχή της ανθεκτικότητας θα αποτελέσουν στο μέλλον χρήσιμα εργαλεία για την βοηθούμενη επιλογή από δείκτη και τη αναπαραγωγή που βασίζεται στον χάρτη. (Tullu, A.D., Taran, B., Breikreutz, C., Buchwaldt, L., Banniza, S., Warkentin, T.D. και Vandenberg, A.)

Σε ένα άλλο πείραμα, βρέθηκαν διαφορές ανάμεσα στις ποικιλίες και στις βελτιωμένες γραμμές ως προς την ανθεκτικότητα στην ασκοχύτωση της φακής (Singh et al., 1982; Morrall & Sheppard, 1981). Όμως κάποιοι άλλοι βρήκαν 24 ανθεκτικές ποικιλίες από τις 86 του *Lens Culinaris* υποείδος *orientalis*, 12 από τις 35 του *L. odemensis*, 3 από τις 35 του *L. nigricans* και 36 από τις 39 ποικιλίες του *L. Ervoides*. (Iqbal et al. 1990).

Αυτές οι 2 έρευνες ώθησαν το ενδιαφέρον για μία άλλη περισσότερο εξειδικευμένη. Δυο άγριες ποικιλίες μία από το κάθε είδος, από το *L. c. ssp. Orientalis* και το *L. ervoides*, τρεις ποικιλίες από το *L. nigricans* και μία ποικιλία από το *L. odemensis* έδειξαν μία υψηλή ανθεκτικότητα όταν δοκιμάστηκαν εναντίον της ασκοχύτωσης, ενώ και οι 3 ποικιλίες από τη Νέα Ζηλανδία ήταν μέτρια έως υψηλά επιρρεπείς στο παθογόνο. Κανένα φυτό δεν κατατάχθηκε σε μία μέση κατάσταση, επιτρέποντας έτσι μία ξεκάθαρη ταξινόμηση των ποικιλιών σε ανθεκτικές και σε επιρρεπείς (**Ahmad κ.α, 1997**).

Τα διειδικά υβρίδια τόσο των ανθεκτικών όσο και των επιρρεπών άγριων ειδών μαζί με τα επιρρεπή *L. c. ssp. Culinaris* ήταν όλα ανθεκτικά και δεν ανέπτυξαν κανένα σύμπτωμα της ασθένειας όταν εμβολιάστηκαν με το παθογόνο. Τα ποσοστά της τάσης για ανθεκτικότητα σε αυτούς τους F2 πληθυσμούς έδειξαν ότι η ανθεκτικότητα στην ασκοχύτωση στα άγρια είδη κυριαρχείται από 2 κυρίαρχα και συμπληρωματικά γονίδια που το καθένα εξακριβώθηκε στους ανθεκτικούς γενοτύπους W6 3192 και W6 3222. Ο γενετικός μηχανισμός άμυνας ξεκαθαρίστηκε από τα επιρρεπή άγρια είδη και από τη καλλιεργούμενη φακή και κρύφτηκε από ένα υποχωρητικό ζεύγος ομοζύγων γονιδίων. Τα κυρίαρχα γονίδια που παρατηρήθηκαν από τον **Tay, Slinkard (1989)** και **Andrahennadi (1994)**, έδωσαν όλα υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας από ότι κάποια ποσοτική ανθεκτικότητα που παρατηρήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα.

Αυτά τα αποτελέσματα είναι παρόμοια με των **Dey και Singh (1993)** όπου βρήκαν μία ποικιλία γενετικών μηχανισμών συμπεριλαμβανομένου την μερική ανθεκτικότητα που είναι υπεύθυνη για την ανθεκτικότητα στην ασκοχύτωση.

Οι **Tay (1989)** και **Andrahennadi (1994)** βρήκαν δύο κυρίαρχα συμπληρωματικά γονίδια που είναι ανθεκτικά στην ασκοχύτωση που προσβάλλει τις καλλιεργούμενες ποικιλίες της φακής (ILL-5588, ILL-5684, PI-339283).

Μια επιπλέον γενετική ανάλυση που χρησιμοποιεί μοριακούς δείκτες της F1 και της F2 γενεάς των επιρρεπών και των ανθεκτικών ποικιλιών θα είναι σε θέση να αποκαλύψει τις αληθινές αλληλεπιδράσεις που αναμιγνύονται με την έκφραση της ανθεκτικότητας στην ασκοχύτωση στη φακή. Γενικότερα, τα αποτελέσματα που εμφανίστηκαν δείχνουν ότι η ανθεκτικότητα στην ασκοχύτωση καθορίζεται από δύο κυρίαρχα γονίδια των *L. Ervoides* και *L. odemensis* που το κάθε ένα συμπληρώνει το άλλο ώστε να παράγουν ένα ανθεκτικό φυτό. (**M. Ahmad, A.C. Russell & D.L. McNeill, 1997**).

Πρέπει να επισημανθεί ότι η βελτίωση για την ανθεκτικότητα της φακής στον μύκητα που προκαλεί την ασκοχύτωση ξεκίνησε σχετικά πρόσφατα και βρίσκεται ακόμη σε πρωταρχικό στάδιο. Το τεστ της πολλαπλής τοποθεσίας υπό τον συντονισμό της ICARDA οδήγησε στην κατοχύρωση αρκετών ανθεκτικών ποικιλιών σε πολλές χώρες (Russell 1994, Singh et al. 1994, Erskine et al. 1996).

Η γνώση της γενετικής ποικιλότητας του παθογόνου και της γενετικής ρύθμισης της ανθεκτικότητας του ξενιστή είναι πολύ περιορισμένη με άμεσο αποτέλεσμα τα καλώς οργανωμένα προγράμματα βελτίωσης να μην είναι ακόμη εφαρμόσιμα. Ωστόσο, η πρόσφατη ταυτοποίηση των γονιδίων της ανθεκτικότητας, οι μεταξύ τους σχέσεις σε αρκετές καλλιεργούμενες ποικιλίες (Ye et al. 2001), καθώς και η επιβεβαίωση της παρουσίας των διάφορων παθότυπων (Nasir και Bretag ,1997) προσέφεραν τη βάση για να σχεδιαστεί ένα βελτιωτικό πρόγραμμα που σαν στόχο θα είχε την μεταφορά και το συνδυασμό αυτών των γονιδίων. Η βελτίωση για την ανθεκτικότητα θα μπορούσε να χρησιμοποιήσει την ίδια μέθοδο με αυτή των άλλων χαρακτηριστικών.

Μία συνδυασμένη μαζική επιλογή και μία γενεαλογική επιλογή χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς στη βελτίωση της φακής αλλά και του ρεβιθιού στο ICARDA (Singh 1993, Muehlbauer et al. 1995). Μία τροποποιημένη μέθοδος αυτής της διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία για την ανθεκτικότητα του ρεβιθιού στην ασκοχύτωση(Singh 1993).

Αναλυτικότερα, όπως έχει αναφερθεί τα γονίδια για την ανθεκτικότητα στην ασκοχύτωση ταυτοποιήθηκαν στα άγρια είδη της φακής. Για το λόγο αυτό, η μεταφορά γονιδίων από τα άγρια είδη στα καλλιεργούμενα θα μπορούσε να είναι μία σπουδαία προσέγγιση για τη βελτίωση του φυτού στην ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο παθογόνο. Το μόνο άγριο είδος που μπορεί να διασταυρωθεί εύκολα με τα καλλιεργούμενα είναι το *L. orientalis* , ο πρόγονος της φακής. (Ladizinsky 1979, 1993).

Με τη χρήση της *in vitro* καλλιέργειας και της μεθόδου των τεχνητών διασταυρώσεων, θα είναι δυνατή η χρήση των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την ανθεκτικότητα από τα άγρια είδη στην επαναλαμβανόμενη διασταύρωση.

Χρησιμοποιώντας την ανάλυση του μαζικού διαχωρισμού ο Ford και άλλοι (1999), αναγνώρισαν 7 RAPD δείκτες συνδεδεμένους με την τοποθεσία της ανθεκτικότητας ως προς την ασκοχύτωση στην ποικιλία 'ILL 5588'. Πέντε από τους εφτά RAPD δείκτες ήταν μέσα στα 30 cM από τη θέση της ανθεκτικότητας και οι πιο

κοντινοί συνορεύοντες δείκτες ήταν σχεδόν 6 cM και 14 cM μακριά από τη θέση της ανθεκτικότητας.

Οι συσχετίσεις όμως μεταξύ της ανθεκτικότητας στην ασκοχύτωση και άλλων αγρονομικών χαρακτηριστικών δεν έχει εξιχνιαστεί ακόμη εξ ολοκλήρου. Μία πρόσφατη έρευνα έδειξε πως το μεγαλύτερο γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την ανθεκτικότητα στις ποικιλίες ILL 5588 και W63241 έχει ενάντιες επιδράσεις στη σποροπαραγωγή. (Ye et al. 2001b).

Ένα άλλο πρόγραμμα βελτίωσης για την ανθεκτικότητα στον μύκητα *Ascochyta fabae f.sp.lentis* πραγματοποιήθηκε με συνεργασία του ICARDA με το Πακιστάν, ένα ευάλωτο μέρος για την συγκεκριμένη ασθένεια. Ειδικότερα, η ποικιλία "Manserha 89" της φακής απελευθερώθηκε στο Πακιστάν με πολλαπλή ανθεκτικότητα στην ασκοχύτωση και στη φουζαρίωση.

Οι έρευνες για την κληρονομηση της ανθεκτικότητας καθοδηγήθηκαν και αξίζει να σημειωθεί πως τα γονίδια που αναμίχθηκαν, τοποθετήθηκαν στο γένωμα της φακής κατά τέτοιο τρόπο ώστε να επιτρέπουν τη πιθανή χρήση της βοηθούμενης επιλογής με δείκτη.

Μία άλλη ανάλυση ποσοτικών ιχνών γνωρισμάτων για την ανθεκτικότητα στην ασκοχύτωση στη φακή πραγματοποιήθηκε από τους **Rubeena, Taylor et al., 2006**, χρησιμοποιώντας χάρτες γενώματος που αναπτύχθηκαν από δύο F₂ πληθυσμούς, το ILL5588/ILL7537 και το ILL7537/ILL6002. Ταυτοποιήθηκαν πέντε QTLs μέσω της σύνθετης ενδιάμεσης χαρτογράφησης που αφορούν την ανθεκτικότητα στην ασκοχύτωση, διαμέσου τεσσάρων συνδετικών ομάδων στο πληθυσμό ILL5588/ILL7537. Με την ίδια μέθοδο ταυτοποιήθηκαν τρία QTLs στον πληθυσμό ILL7537/ILL6002. Η σύγκριση ανάμεσα στους δύο πληθυσμούς απέδειξε ένα πιθανώς όμοιο QTL καθώς και πολλές κοινές περιοχές που περιείχαν δείκτες στενά συνδεδεμένους με την ανθεκτικότητα. Αυτή η έρευνα ήταν καθοριστική αφού απέδειξε την δυνατότητα μεταφοράς των QTLs στους πληθυσμούς και ταυτοποίησε τους δείκτες που ήταν στενά συνδεδεμένο με το μεγαλύτερο QTL που πιθανώς θα είναι χρήσιμο στη μελλοντική βοηθούμενη από δείκτες επιλογή για την ανθεκτικότητα στην ασκοχύτωση.

Επίσης, ένα φυτώριο με ανθεκτικές ποικιλίες στην ασκοχύτωση διαμοιράστηκε στο International Food Legume Testing Program από το 1988 . Οι πληροφορίες από την προσβολή κοινών καλλιεργούμενων φυτών καθώς και εγχώριων πρότειναν την

παρουσία της ποικιλότητας μέσα στο παθογόνο (**W. Erskine, M. Tufail, A. Russell, M. C. Tyagi, M. M. Rahman και M. C. Saxenal, 1994**).

Με λίγα λόγια και έχοντας υπόψιν τις προηγούμενες εμπειρίες από τη βελτίωση της ανθεκτικότητας σε άλλα είδη οσπρίων, η επιλογή για την ανθεκτικότητα απέναντι στον μύκητα που προκαλεί την ασκοχύτωση μπορεί να έχει αντίθετα αποτελέσματα όπως: 1) αύξηση των αντιθρεπτικών παραγόντων, που είναι ανεπιθύμητη τόσο για την ανθρώπινη αλλά και για τη ζωική κατανάλωση (**Helsper 1998**), 2) πιθανή μείωση της ευπεψίας (**Helsper 1998**), 3) καθυστέρηση της ωρίμανσης (**Singh 1993, Porta-Puglia et al.1994**).

Αντίθετα, η ανθεκτικότητα στη σκωρίαση βρέθηκε πρόσφατα ότι κληρονομείται μονογενικώς (**Sinha & Yadav, 1989, Singh & Singh, 1990**). Το ICARDA μαζί με τα εθνικά προγράμματα της Αιθιοπίας, του Μαρόκου και του Πακιστάν βελτιώνει την ανθεκτικότητα στη σκωρίαση και για το λόγο αυτό διοχέτευσε σε αρκετές χώρες τα ανθεκτικά φυτά που δέχθηκαν. Ένα διεθνές φυτώριο ανθεκτικών στη σκωρίαση φυτών διοχετεύτηκε το 1990. Το φυτώριο είχε σκοπό να διαλευκάνει τη σχέση παθογόνου και ξενιστή σε διάφορες τοποθεσίες και να συμβάλλει στην ταυτοποίηση των ποικιλιών του μύκητα (**Muehlbauer et al.,2006**).

Όπως έχει προαναφερθεί όμως, η σοβαρότερη ασθένεια της φακής είναι η φουζαρίωση που προκαλείται από τον μύκητα *Fusarium oxysporum f. sp. Lentis*. Οι οικονομικές απώλειες που προκαλεί είναι πολύ υψηλές και για το λόγο αυτό συνεχώς αναζητούνται τρόποι καταπολέμησης. Πρόσφατα, βρέθηκαν πέντε ανεξαρτήτως χωρισμένα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την ανθεκτικότητα. (**Kamboj et al., 1990**).

Στο ICARDA, έχουν ξεκινήσει αρκετά προγράμματα βελτίωσης της ανθεκτικότητας απέναντι στη φουζαρίωση καθώς και πολλές έρευνες για τη σύνδεση της ανθεκτικότητας στα ισοένζυμα και στους RFLP δείκτες. Η ανθεκτικότητα του μπιζελιού στη φουζαρίωση ελέγχεται από ένα τόπο στενά συνδεδεμένο με το Est-s, που είναι η εστεράση του σπόρου (**Hunt & Barnes, 1982**). Παρατηρώντας λοιπόν το εύρος των συντηρημένων συνδετικών ομάδων ανάμεσα στο μπιζέλι και στη φακή γίνεται εύκολα αντιληπτό πως αυτή η πιθανή σύνδεση στη φακή είναι αναγκαίο να εξιχνιαστεί.

Ένα άλλο πείραμα που έγινε για την αντίδραση στη φουζαρίωση 220 άγριων ειδών φακής φάνηκε ότι υπάρχει ανθεκτικότητα στα υποείδη *orientalis, nigricans και ervoides* (**Bayaa et al., 1991**).

Οι **R.K. Kamboj et al.(1990)** ασχολήθηκαν εκτενέστερα με την ανθεκτικότητα της φακής στη φουζαρίωση. Σύμφωνα με αυτούς, η ανάπτυξη ανθεκτικών ποικιλιών αποτελεί τον πιο αποτελεσματικό τρόπο ελέγχου της ασθένειας. Η βαθύτερη γνώση της γενετικής της ασθένειας χρησιμοποιείται ευρέως στα βελτιωτικά προγράμματα που στοχεύουν στη ανάπτυξη ανθεκτικών ποικιλιών.

Συγκεκριμένα, τρεις γενότυποι της φακής ανθεκτικοί στο *Fusarium oxysporum f.sp. lentis*, οι Pant L 234, JL 446 και LP 286, διασταυρώθηκαν με δύο γενοτύπους επιρρεπείς στην ασθένεια. Στις 8 διασταυρώσεις που πραγματοποιήθηκαν, τα υβρίδια ήταν όλα ανθεκτικά. Ο πατρικός διαχωρισμός για την αντίδραση των F2, BC(P), BC(P2) και F3 γενεών στη φουζαρίωση τόσο στον αγρό όσο και στο θερμοκήπιο έδειξε ότι η ανθεκτικότητα στη φουζαρίωση ελέγχεται από δύο κυρίαρχα γονίδια στη ποικιλία Pant L 234 και δύο ανεξάρτητα κυρίαρχα γονίδια με συμπληρωματικές δράσεις στις ποικιλίες JL 446 and LP 286. Ένα τρίτο κυρίαρχο γονίδιο συμπληρωματικό με τα κυρίαρχα γονίδια των ποικιλιών JL 446 και LP 286 παρουσιάζεται και στις δύο επιρρεπείς γραμμές. Διαδοχικές δοκιμασίες πρότειναν τη παρουσία των 5 ανεξαρτήτως χωρισμένων γονιδίων για την ανθεκτικότητα. Τα κυρίαρχα γονίδια όμως στις ποικιλίες Pant L 234 δεν είναι διαδοχικά με τα δύο κυρίαρχα γονίδια με συμπληρωματικές δράσεις στις ποικιλίες LP 286 και JL 446, ενώ το τρίτο γονίδιο είναι συμπληρωματικό με τα δύο γονίδια στις ποικιλίες JL 446 και LP 286 στις επιρρεπείς γραμμές JL 641 και L9-12. Τέλος, ξεκαθαρίστηκαν τα σύμβολα των γονιδίων ως προς τους γονικούς γενοτύπους τους.

Οι **Eujayl et al.(1998)**, ερεύνησαν τη κληρονομία της ανθεκτικότητας στη φακή που δημιουργείται από τη φουζαρίωση σε μία διασταύρωση ανάμεσα στην ανθεκτική ποικιλία ILL5588 και στην επιρρεπή L692-16-1. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις γενεές προκειμένου να μελετηθεί η κληρονομικότητα και για να ταυτοποιηθεί η τοποθεσία του Fw στο χάρτη αλλά και των DNA δεικτών που ήταν συνδεδεμένοι με τα γονίδια της ανθεκτικότητας. Η ανθεκτικότητα στους πληθυσμούς που μελετήθηκαν καθορίστηκε από ένα μονό και κυρίαρχο γονίδιο. Η θέση του Fw ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά μέσω της σύνδεσης ενός RAPD δείκτη με το όνομα OPK-15₉₀₀ στα 10.8 Cm. Δύο άλλοι RAPD δείκτες ο (OP-B17₈₀₀) και ο (OP-D15₉₀₀) αναγνωρίστηκαν με τη μέθοδο του μαζικού διαχωρισμού όπου ήταν συνδεδεμένοι σε διπλή φάση μαζί με το γνώρισμα της ανθεκτικότητας. Η ίδια ομάδα των ερευνητών αποτελεί τη πρώτη που αναγνώρισαν δείκτες κατάλληλους για

επιλογή γονιδιακών θέσεων ανθεκτικότητας απλά κληρονομούμενων ασθενειών όπως το φουζάριο.

Στην βορειοδυτική Αλγερία οι **Belabid, Eujal et. al., (2004)**, πραγματοποίησαν μία σπουδαία έρευνα. Απομόνωσαν 36 μορφές του *fusarium oxysporum f.sp. lentis*, που είχαν συλλεχθεί από διαφορετικά φυτά φακής σε διάφορες καλλιεργητικές περιοχές της συγκεκριμένης τοποθεσίας. Μετά από μία δοκιμασία παθογένειας, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλες οι μορφές του συγκεκριμένου μύκητα αντιπροσωπεύουν μία μονή φυλή αλλά διαφέρουν στην επιθετικότητα στις επιρρεπείς γραμμές. Το ποσοστό της γενετικής παραλλακτικότητας εξερίχθη από την εφαρμογή της PCR χρησιμοποιώντας 6 RAPD δείκτες και 3 AFLP δείκτες. Γενικότερα , παρουσιάστηκε έντονος πολυμορφισμός αλλά το συνολικό νούμερο ήταν 8 πολυμορφικά τμήματα για τους RAPD δείκτες και 93 για τους AFLP. Τα αποτελέσματα που πάρθηκαν αποδεικνύουν πως το παθογόνο μπορεί να διαιρεθεί σε δύο γενετικούς υποπληθυσμούς και μπορεί να χαρακτηριστεί από ένα χαμηλού πολυμορφισμού δείκτη ως προς όλες τις μορφές του μύκητα και στους δύο υποπληθυσμούς. Τα δεδομένα αυτής της έρευνας απέδειξαν επίσης ότι οι μορφές του μύκητα προέρχονται από δύο γενετικά ξεχωριστούς κλώνους. Παρόμοια αποτελέσματα είχαν προηγηθεί και από τους **Nelson et al.,(1997)**.

Ωστόσο η περιορισμένη γενετική ποικιλότητα που παρατηρήθηκε στις διάφορες μορφές των απομονώσεων όπως φάνηκε από την ανάλυση των RAPD δεικτών ήταν αναμενόμενη για ένα παθογόνο που εξαπλώνεται σχετικά γρήγορα σαν ένα αποτέλεσμα της αύξησης στις αποδόσεις των φυτών- ξενιστών.

Άρα, οι RAPD και οι AFLP δείκτες αποτελούν μία εξαιρετική δυνατότητα για τη διάλυση του πληθυσμού και την εξέλιξη του πληθυσμού του μύκητα που προκαλεί τη φουζαρίωση στη φακή (**Nelson et al.,1997**).

5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΗΣ ΦΑΚΗΣ ΚΑΙ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΓΕΝΕΑΛΟΓΙΚΩΝ ΣΧΕΣΕΩΝ

5.1 Χρήση RAPD δεικτών:

Οι **Abo-elwafa et al., 1994** χρησιμοποίησαν τους RAPD δείκτες για να εκτιμήσουν τις εσωτερικές καθώς και τις εξωτερικές ποικιλοτροπίες του γένους *Lens*. Είκοσι ποικιλίες του *L.culinaris spp.culinaris* , συμπεριλαμβανομένων 11 μικρόσπερων και εννιά μακρόσπερων ποικιλιών αλλά και 16 ποικιλίες άγριων ειδών εκτιμήθηκαν για τη γενετική παραλλακτικότητα τους μέσω της χρήσης των RAPD δεικτών. Παρατηρήθηκαν 50 DNA ζώνες και το 90% αυτών ήταν πολυμορφικές.

Οι **Sharma et.al.,1995** απέδειξαν πως η χρήση των RAPDs αποτελεί μία επιπρόσθετη τεχνική μοριακών δεικτών προκειμένου να εξερευνηθεί η ποικιλότητα και οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ της καλλιεργούμενης και της άγριας φακής. Η ίδια ομάδα όμως ένα χρόνο αργότερα, προσπάθησε να εξερευνήσει τη χρήση των AFLP ώστε να αναλύσει τη γενετική ποικιλότητα στη καλλιεργούμενη φακή και στα άγρια είδη της αλλά και να διακρίνει την φυλογενετική σχέση με σκοπό να καθορίσει εάν ένας επαρκής αριθμός AFLP δεικτών θα μπορούσε εύκολα να αποκαλυφθεί στη καλλιεργούμενη φακή και να εμφανιστεί ένας λεπτομερής γενετικός χάρτης. Τα αποτελέσματα τελικώς έδειξαν ότι η μεγαλύτερη ομοιότητα ήταν ανάμεσα στο *spp.orientalis* και στο *var.microsperma*. Αυτά αποδεικνύουν πως το *spp.orientalis* είναι ο καλύτερος υποψήφιος πρόγονος της φακής. Με λίγα λόγια, η συγκεκριμένη έρευνα, προσέφερε τη καλύτερη λύση στο διαχωρισμό της φυλογενετικότητας της φακής και υποστήριξε προηγούμενες μελέτες που είχαν εμβαθύνει κυρίως στα μορφολογικά χαρακτηριστικά όπως ο **Ladizinsky (1979)** και μελέτες που είχαν βασιστεί στους RFLP δείκτες (**Havey και Muehlbauer 1989**), αποδεικνύοντας πως οι AFLP δείκτες έχουν την δυνατότητα να συνεισφέρουν τόσο στους συμβατικούς όσο και στους μοριακούς δείκτες με σκοπό να κατασκευάσουν την φυλογενετική ιστορία του γένους *Lens*. Ακόμη, φάνηκε πως το *L.ervoides* ήταν το πιο ευδιάκριτο ταχον και ακολούθησε το *L.nigricans*, οι γενετικές αποστάσεις των οποίων ήταν του ίδιου επιπέδου με αυτές των δύο προηγούμενων.

Σε μία άλλη εργασία μελετήθηκε η ποικιλότητα μεταξύ 7 ντόπιων και καλλιεργούμενων ποικιλιών του *Lens culinaris* Medik., λεπτόσπερμου και πλατύσπερμου τύπου με τη χρήση 39 RAPD, το αποτέλεσμα των οποίων ήταν η παραγωγή 168 ζωνών, 40% των οποίων από 16 εκκινητές ήταν πολυμορφικές ανάμεσα στις καταχωρήσεις. Παρατηρήθηκε κάποιος πολυμορφισμός μεταξύ των ντόπιων ποικιλιών αλλά όχι για τις καλλιεργούμενες. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος UPGMA και ο συντελεστής του Jaccard για την ανάλυση των αποτελεσμάτων. Οι πλατύσπερμες καταχωρήσεις δε διέφεραν από τις λεπτόσπερμες περισσότερο από κάποιες λεπτόσπερμες μεταξύ τους. Ωστόσο, 3 διακριτές ζώνες διαχώρισαν τις πλατύσπερμες από τις λεπτόσπερμες (Alvarez κ.α, 1997).

Τρεις ντόπιες ποικιλίες της Νότιας Ασίας (Ινδία, Νεπάλ και Πακιστάν) και 13 άλλων χωρών μελετήθηκαν με RAPD και ισοενζυμική ηλεκτροφόρηση. Παρήχθησαν 22 πολυμορφικές ζώνες από 4 RAPD εκκινητές και εντοπίστηκαν πολυμορφισμοί σε 7 ισοενζυμικούς τόπους (16 αλληλόμορφα). Σύμφωνα με τις γενετικές αποστάσεις του Nei, το γενετικό υλικό από το Αφγανιστάν ομαδοποιήθηκε με αυτό των χωρών της Νότιας Ασίας. Το γενετικό υλικό από αυτές τις χώρες διέφερε σημαντικά από αυτό των άλλων χωρών που εξετάστηκαν. Σύμφωνα με την ανάλυση των RAPD οι χώρες με τη μικρότερη ποικιλότητα ήταν το Πακιστάν, το Αφγανιστάν και το Νεπάλ. Ταξινόμηση σε λεπτόσπερμους και πλατύσπερμους τύπους δεν αντικατροπτίστηκε μεταξύ των χωρών. Δημιουργήθηκαν 4 ομάδες: η αιθιοπική με καταχωρήσεις από την Αιθιοπία και την Υεμένη, η λεβαντινή με καταχωρήσεις από την Συρία, την Ιορδανία και το Λίβανο, η ευρωπαϊκή με καταχωρήσεις από τη Βουλγαρία και την Ισπανία και τέλος μία ομάδα με καταχωρήσεις από το Ιράν και την Αίγυπτο (Ferguson κ.α, 1998).

Οι Sonnante και Pignone, 2001 αξιολόγησαν τη γενετική ποικιλότητα σε μία συλλογή από τοπικές ποικιλίες φακής, προερχόμενες οι περισσότερες από την Ιταλία και από άλλες χώρες της Μεσογείου καθώς και σε ξένο γενετικό υλικό, χρησιμοποιώντας τους μοριακούς δείκτες τύπου RAPD, των μικροδορυφόρων και ISSR. Εντοπίστηκε μικρό επίπεδο πολυμορφισμού με τους δύο πρώτους δείκτες (54% και 55% αντίστοιχα), ενώ οι ISSR έδειξαν ένα υψηλότερο βαθμό ποικιλότητας (65%). Τα δενδρογράμματα που κατασκευάστηκαν έπειτα από τη χρήση RAPD και ISSR δεικτών με τη χρήση του UPGMA και του συντελεστή ομοιότητας Jaccard, δεν έδειξαν ίδιες συστάδες. Ωστόσο και στις δύο περιπτώσεις η καταχώρηση που ξεχώρισε περισσότερο από όλες ήταν αυτή της Αιθιοπίας, μία χώρα στην οποία και

άλλα καλλιεργούμενα είδη έχουν δείξει αξιόλογο βαθμό ποικιλότητας. Από την άλλη πλευρά, οι καταχωρήσεις από την Ιταλία έτειναν να ταξινομούνται μαζί.

Οι **Rubeena et al., 2003** κατασκεύασαν ένα εξειδικευμένο συνδυαστικό χάρτη του γενώματος της φακής που περιείχε 100 RAPDs, 11 ISSRs και 3 RGAs, τα οποία αποτέλεσαν μία συνολική δύναμη της τάξης των 784,1 c M μέσα σε εννιά συνδυαστικές ομάδες.

Πρέπει να επισημανθεί πως η πιο πρόσφατη έρευνα για μοριακούς δείκτες που αναπτύχθηκε για επιλογή κάποιας ασθένειας αναφέρεται από τους **Hamwiah et al.(2005)**, οι οποίοι αναγνώρισαν δείκτες πολύ κοντά στη θέση Fw του πληθυσμού ILL 5588.

Οι **Hamwiah et.al., το 2005**, εμπλούτισαν το γενετικό χάρτη της φακής που είχε προηγουμένως κατασκευαστεί από τους **Eujal et al., 1998** , με 50 AFLPs δείκτες , 21 RAPDs, 39 SSRs και 1 μορφολογικό δείκτη.

Μία ποικιλία μοριακών δεικτών συμπεριλαμβανομένων και των RAPD χρησιμοποιήθηκαν από τους **Yuzbasioglu et al.,2006**, προκειμένου να καθορισθεί η γενετική σχέση των τουρκικών ποικιλιών φακής καθώς και των βελτιωτικών γραμμών. Συγκεκριμένα, δεκατέσσερις ποικιλίες και δεκατρείς βελτιωμένες σειρές εκτιμήθηκαν για να καθορισθεί η γενετική παραλλακτικότητα χρησιμοποιώντας εννιά δείκτες. Ο αριθμός των ζωνών για τον κάθε δείκτη ήταν ανάμεσα από 2 έως 7, με ένα μέσο όρο 4.5 ζωνών για κάθε δείκτη. Το μέγεθος των διευρυμένων προϊόντων ξεκινούσε από 300 bp έως 1400 bp. Από τις 41 ζώνες που παρουσιάστηκαν ,οι 19 ήταν μονομορφικές σε όλες τις υπό δοκιμή ποικιλίες και βελτιωτικές γραμμές, οι υπόλοιπες δύο (54%) ήταν πολυμορφικές με ένα μέσο όρο 2,4 ζώνες για τον κάθε δείκτη. Το δενδρόγραμμα από την ανάλυση με το συντελεστή Simple Matching έδειξε δύο εμφανείς ομάδες. Η πρώτη ομάδα περιείχε δύο βελτιωμένες σειρές και η δεύτερη περιελάμβανε όλα τα καλλιεργούμενα και τις υπόλοιπες 11 βελτιωμένες σειρές. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σύμφωνο με τις προηγούμενες μελέτες με χρήση RAPD δεικτών (**Sharma et al.1995; Ford et al.1997;Sonnante et al.,2001**).

Το επίπεδο των γενετικών διαστάσεων ήταν διαφορετικό στις ποικιλίες αλλά και στις βελτιωτικές γραμμές. Η χαμηλότερη γενετική απόσταση παρατηρήθηκε ανάμεσα στις ποικιλίες 'Ali Dayi' με 5%, ενώ η 'Seyran -96' και η 'Ozbek' είχαν τη μεγαλύτερη γενετική απόσταση ίση με 58%. Οι αποστάσεις στις βελτιωτικές γραμμές ποίκιλλαν από 5.8 έως 55.5. (**Yuzbasioglu et al.,2006**).

Μία άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε, κατάφερε να εξετάσει την γενετική ποικιλότητα σε ex-situ διατηρημένες εγχώριες ποικιλίες φακής του Πακιστάν με τη χρήση βοτανικών περιγραφητών, συνολικής πρωτεΐνης των σπόρων, ισοένζυμα, αλλά και με δείκτες RAPD. Όλες οι τεχνικές ήταν σημαντικές για την εκτίμηση της ποικιλότητας ανεξαρτήτως γεωγραφικής προέλευσης και μεγέθους σπόρου, με τους RAPD όμως να αποτελούν την καλύτερη για την έρευνα της ενδοποικιλότητας και της ποικιλότητας μεταξύ των πληθυσμών (inter and intra accession diversity) όπου χρειάζονται για την επέκταση του γενετικού υλικού και των εκκινήτων για να συνεχιστεί η μελέτη για τους βοτανικούς περιγραφητές. Τα ισοένζυμα και οι πρωτεΐνες του σπόρου έδωσαν χαμηλά ποσοστά ποικιλομορφίας (**Sultana και Ghafoor, 2008**).

5.2 Χρήση ISSR και άλλων δεικτών:

Οι 11 πιο γνωστές τοπικές ποικιλίες της Νότιας και της Κεντρικής Ιταλίας μελετήθηκαν με τη χρήση ISSR δεικτών σε 15 τυχαίως επιλεγμένα φυτά από κάθε τοπική ποικιλία με σκοπό να εκτιμηθεί η γενετική ποικιλότητα εντός και μεταξύ των τοπικών ποικιλιών και πιθανώς η εξακρίβωση της προέλευσης και της γενετικής τους σχέσης. Παρήχθησαν 164 ζώνες, από τις οποίες οι 128 (78,05%) ήταν πολυμορφικές. Η μεγαλύτερη ενδοποικιλότητα στις τοπικές ποικιλίες παρατηρήθηκε στα δείγματα από την κορυφογραμμή των Απέννινων και σε μία σικελική ποικιλία, ενώ δείγματα από μικρά νησιά της Σικελίας παρουσίασαν μικρότερη ποικιλότητα. Οι αναλύσεις έδειξαν ότι οι ποικιλίες από τα μικρά σικελικά νησιά σχετίζονται πολύ στενά μεταξύ τους και φαίνεται να έχουν αποκομιστεί από το υλικό της χερσονήσου. Τελικά φάνηκε πως οι κύριες ιταλικές τοπικές ποικιλίες παρά το γεγονός ότι από την ανάλυση απουσιάζουν κάποιες κύριες τοπικές ποικιλίες, έχουν μεταξύ τους ένα επίπεδο γενετικής ποικιλομορφίας, που ενισχύει κάποιες από τις προσδοκίες εκτίμησης και η συγκεκριμένη έρευνα βοήθησε να αποσαφηνιστεί η προέλευση και η ιστορία διάδοσης ορισμένων τοπικών ποικιλιών (**Sonnante και Pignone, 2007**).

Οι **Toklu κ.α, 2009b** μελέτησαν την γενετική ποικιλότητα 38 τοπικών ποικιλιών φακής χρησιμοποιώντας ISSR και AFLP δείκτες. Η ISSR ανάλυση πραγματοποιήθηκε με 14 εκκινήτες που παρήγαγαν 125 ζώνες εκ των οποίων οι 105 ήταν πολυμορφικές και για τα AFLP οι 6 συνδυασμοί εκκινήτων έδωσαν 212 ζώνες

εκ των οποίων οι 119 ήταν πολυμορφικές. Οι AFLP αν και έδωσαν περισσότερες ζώνες ανά συνδυασμό εκκινητή, οι ISSR εντόπισαν υψηλό ποσοστό πολυμορφισμού. Παρόμοια αποτελέσματα έδωσε επίσης και η ανάλυση των αποτελεσμάτων που έγινε με βάση τη μέθοδο UPGMA και το συντελεστή του Jaccard όπου έγινε ξεχωριστά η ανάλυση των ISSR, ξεχωριστά των AFLP αλλά και ο συνδυασμός αυτών των δύο. Αναλυτικότερα, οι τουρκικές τοπικές ποικιλίες διαχωρίστηκαν σε δύο κύριες ομάδες και έδειξαν αξιόλογη ποικιλομορφία και οι αποστάσεις του Jaccard έδειξαν εμφανείς διαφορές μεταξύ των τοπικών ποικιλιών.

5.3 Χρήση SSR δεικτών:

Οι **Jin et al., 2008** επέλεξαν τυχαία 440 ποικιλίες της φακής από την Εθνική Τράπεζα Γενετικού Υλικού της Κινεζικής Ακαδημίας των Γεωργικών Επιστημών. Χρησιμοποίησαν 14 SSR δείκτες και παρατηρήθηκε έντονη γενετική διαφοροποίηση ανάμεσα σε 16 διαφορετικές γεωγραφικές ομάδες των ποικιλιών της φακής. Η γενετική ποικιλότητα φάνηκε ότι ήταν υψηλότερη στις ξένες ποικιλίες από ό,τι στις εγχώριες- κινεζικές. Χαμηλότερος πολυμορφισμός από τους ξένους πληθυσμούς παρουσιάστηκε για την Ευρώπη, την Νότια Ασία, την Αμερική, την Ιαπωνία και υψηλότερος για τη νότια Ασία και για πληθυσμούς άγνωστης προέλευσης.

Οι **Babayeva κ.α, 2009** ερεύνησαν την ποικιλότητα 39 καλλιεργούμενων τύπων φακής από την Κεντρική Ασία και τον Καύκασο χρησιμοποιώντας μικροδορυφόρους. Εντοπίστηκαν 33 αλληλόμορφα (3-8 ανά τόπο). Με τιμή γενετικής ποικιλότητας 0.66 και γενετικής ομοιότητας 0.24-1.0. έγινε ομαδοποίηση με τη χρήση της μεθόδου UPGMA σε 6 ομάδες. Περισσότερες από τις μισές καταχωρήσεις από το Τατζικιστάν ομαδοποιήθηκαν σε μία μεγάλη συστάδα ενώ υπήρξαν κάποιες από κάθε χώρα όπου έδειξαν μοναδικούς γονότυπους. Οι περισσότερες καταχωρήσεις με στενά σχετιζόμενη προέλευση, διακρίθηκαν με τους SSR, ενώ λίγες μόνο καταχωρήσεις από κάθε χώρα έδειξαν μοναδικούς γονότυπους.

Σε μία άλλη έρευνα χρησιμοποιήθηκαν εικοσιδύο προσφάτως ταυτοποιημένοι SSR δείκτες, και τρεις SSR δείκτες της φακής που είχαν προηγουμένως χαρτογραφηθεί στο γενετικό χάρτη της φακής σύμφωνα με σαράντα ποικιλίες που ανήκαν σε πέντε είδη *Lens*. Το αποτέλεσμα ήταν ένας πολυμορφισμός μεγάλης κλίμακας (**Reddy et al., 2009**) . Χαμηλότερα επίπεδα πολυμορφισμού των EST

βασισμένων στους SSR δείκτες, μπορούν να αποδοθούν στην προέλευση των υψηλών διατηρούμενων ποσοτήτων του γενώματος της φακής. (Varshney et al. 2005). Επειδή όμως η φακή έχει περιορισμένο γενετικό υπόβαθρο και υποφέρει από περιορισμένο γενετικό πολυμορφισμό είναι απαραίτητο να χρησιμοποιείται μεγαλύτερος αριθμός SSR δεικτών που προέρχονται από τη γενετική βιβλιοθήκη παρά από τη Cdna.

5.4 Γενετικοί συνδετικοί χάρτες φακής

Οι γενετικοί χάρτες αποτελούν χρήσιμο εργαλείο για τη βασική γενετική έρευνα και τη βελτίωση των φυτών (Duran κ.α, 2004). Για τη γενετική χαρτογράφηση ποικιλιών φακής είναι απαραίτητη η επιλογή γονέων. Οι γονείς που είναι ομοζύγωτοι, αλλά υψηλής ποικιλότητας ο ένας από τον άλλο για τα χαρακτηριστικά που χαρτογραφούνται είναι και οι προτιμότεροι (Muehlbauer κ.α, 2006).

Γενικότερα, η χρήση των γενετικών δεικτών στην δημιουργία των γενετικών χαρτών έχει αυξηθεί δραματικά τα τελευταία σχεδόν είκοσι χρόνια. Στην καλλιεργούμενη φακή η χρήση των RFLP δεικτών έχει αναδείξει χαμηλά επίπεδα γενετικής ποικιλομορφίας και αποτελούν τους πρώτους μοριακούς δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή ενός γενετικού συνδετικού χάρτη (Havey και Muehlbauer, 1989).

Έχουν δημιουργηθεί αρκετοί χάρτες οι οποίοι περιέχουν γονίδια τα οποία διαχειρίζονται διάφορα ισοένζυμα και ποσοτικά ίχνη γνωρισμάτων, για πολλές καλλιέργειες όπως το σιτάρι (Hart et al.1990), για το καλαμπόκι (Coe et al.1990), για το μπιζέλι (Weeden και Wolko,1990) και για τη φακή (Tahir et.al., 1993).

Μία σπουδαία χρήση αυτών των χαρτών αποτελεί η επιλογή με βάση τους μοριακούς δείκτες στη βελτίωση των φυτών. Παρέχουν επίσης, χρήσιμες πληροφορίες για την συγκριτική απεικόνιση των ειδών γενικότερα. Όπως για παράδειγμα, αρκετές συνδετικές ομάδες που είχαν ταυτοποιηθεί πρωτίστως στο μπιζέλι βρέθηκαν να είναι πανομοιότυπες και στη φακή (Weeden και Marx,1987, Muehlbauer et al. 1989).

Η φακή καθότι μικρότερη σε έκταση καλλιέργεια , η γενετική της έρευνα ήταν περιορισμένη σε παγκόσμιο επίπεδο. Με την ταχεία όμως ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας, η χρήση των μοριακών δεικτών άρχισε να γίνεται μεγαλύτερο ως προς το

γενετικό προφίλ της φακής. Για το λόγο αυτό, άρχισε δειλά δειλά να αναπτύσσεται ο γενετικός της χάρτης. (Frederick et al., 2006).

Η πρώτη αναφορά για ένα συνδεδειγμένο χάρτη στην φακή έγινε στο άρθρο των **Zamir και Ladizinsky (1984)** και το πρώτο άρθρο για την σύνδεση μορφολογικών δεικτών στη φακή έγινε από τον **Emami και Sharma** το **1999**.

Συγκεκριμένα, δεκατρία, μονογενικά και μορφολογικά γνωρίσματα ενός δείκτη της φακής αναλύθηκαν για τη συνδεδειγμένη κληρονομία τους σε εικοσιπέντε διασταυρώσεις. Μόνο τρία ήταν όμως τα γνωρίσματα που φάνηκαν ότι τελικώς συνδέονται, το Ert, το Gs και το Bl. Αυτή η έρευνα αντιτέθηκε με αυτή των **Tahir, 1989** και του **Muehlbauer, 1993** όπου και οι δύο είχαν διατυπώσει πως τα γονίδια Gs και Ert ανήκαν σε διαφορετικές συνδεδειγμένες ομάδες.

Ο πρώτος ενδοειδικός συνδεδειγμένος χάρτης στη φακή έγινε με 114 RAPD, ISSR και RGA (**Rubeena κ.α., 2003**). Πρόσφατα άλλοι δύο συνδεδειγμένοι γενετικοί χάρτες παρουσιάστηκαν, ο ένας με τη χρήση ενδοειδικού πληθυσμού (114 δείκτες και κάλυπτε 784,1 cM) και ο άλλος με από τον **Duran** και των συνεργατών του με τη κατασκευή διυποειδικού (inter-subspecific) χάρτη (200 δείκτες και 5 μορφολογικοί τόποι) που κάλυπτε 2172,4 cM, με μέση απόσταση μεταξύ των δεικτών 15,87 cM. Γενικότερα, το εκτιμώμενο γονιδίωμα κυμαίνεται μεταξύ 751-2172 cM (**Muehlbauer κ.α., 2006**).

Οι χάρτες που προκύπτουν από διασταυρώσεις μεταξύ καλλιεργούμενων ποικιλιών είναι οι πιο χρήσιμοι για τα βελτιωτικά προγράμματα αφού ταυτοποιούν πολυμορφικούς δείκτες μέσα στο καλλιεργούμενο γονιδιακό απόθεμα και για αυτό είναι πιο πιθανό να βρίσκονται σε διασταυρώσεις που περιλαμβάνουν άλλους καλλιεργούμενους γενότυπους. Διασταυρώσεις μέσα στα καλλιεργούμενα είδη μπορεί να σταματήσουν το πρόβλημα της συνδεδειγμένης έλξης που συχνά παρουσιάζεται σε διασταυρώσεις που προέρχονται από άγρια είδη. Οι γενετικοί χάρτες ακόμα που προέρχονται από ενδοειδικές διασταυρώσεις συνιστώνται για χαρτογράφηση ποιοτικών τύπων χαρακτηριστικών λόγω της μικρότερης παραμόρφωσης αναλογίας διαχωρισμού (**Rubeena κ.α., 2003**).

Αξίζει όμως να σημειωθεί πως η ανάπτυξη νέου γενετικού υλικού είναι απαραίτητη προϋπόθεση για το μέλλον των γενωμάτων της φακής. Συγκεκριμένα, προκειμένου να επιτευχθεί μία σωστή χαρτογράφηση της φακής θεωρείται απαραίτητη η χαρτογράφηση πληθυσμών ανασυνδυασμένων καθαρών σειρών. Οι πληθυσμοί αυτοί

θα επιτρέψουν την ταυτοποίηση και την αξιολόγηση για δείκτες σχετικούς με χαρακτηριστικά από διαφορετικά περιβάλλοντα και σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του φυτού. Για τη χρήση αναπτυγμένων γενετικών υλικών , όπως το διακριπωματικό προφίλ και κλωνοποίηση βασισμένη στη χαρτογράφηση, είναι απαραίτητος ο πρόσθετος καθαρισμός του γενετικού υλικού **(Muehlbauer κ.α, 2006).**

6. ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Στόχος του πειράματος ήταν η γενετική ταυτοποίηση, η μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων ποικιλιών φακής με μοριακούς δείκτες καθώς και η ανάπτυξη γενεαλογίας με στόχο τη βελτίωση ποικιλιών φακής για ανθεκτικότητα στο *Fusarium oxysporum f.sp. lentis* καθώς και ο εντοπισμός μοριακών δεικτών στενά συνδεδεμένων με την ανθεκτικότητα.

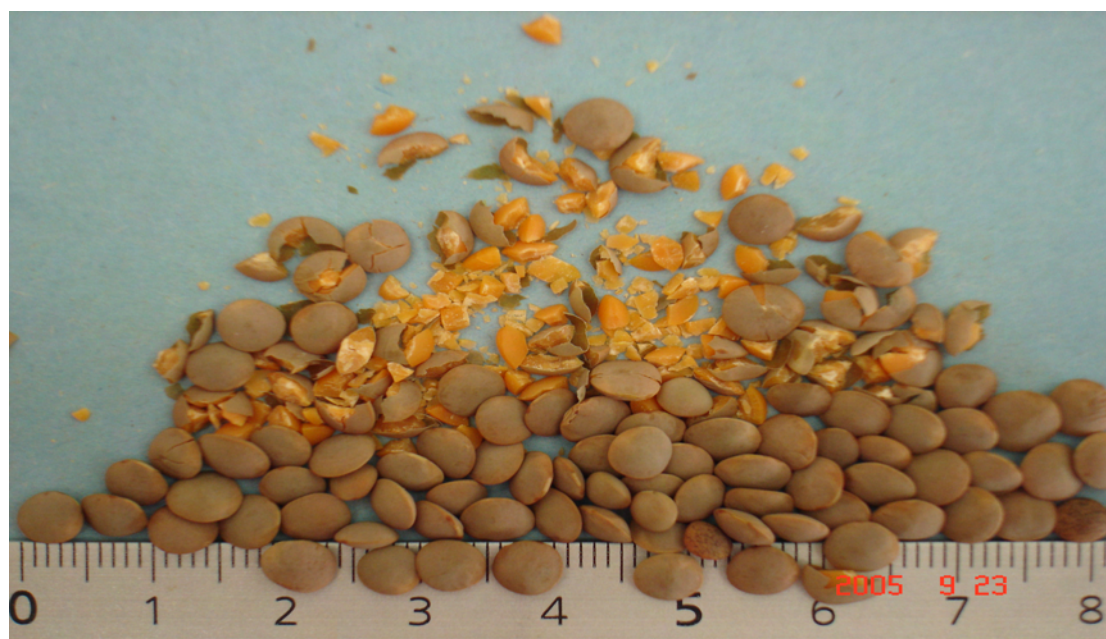
ΕΝΟΤΗΤΑ Β

1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

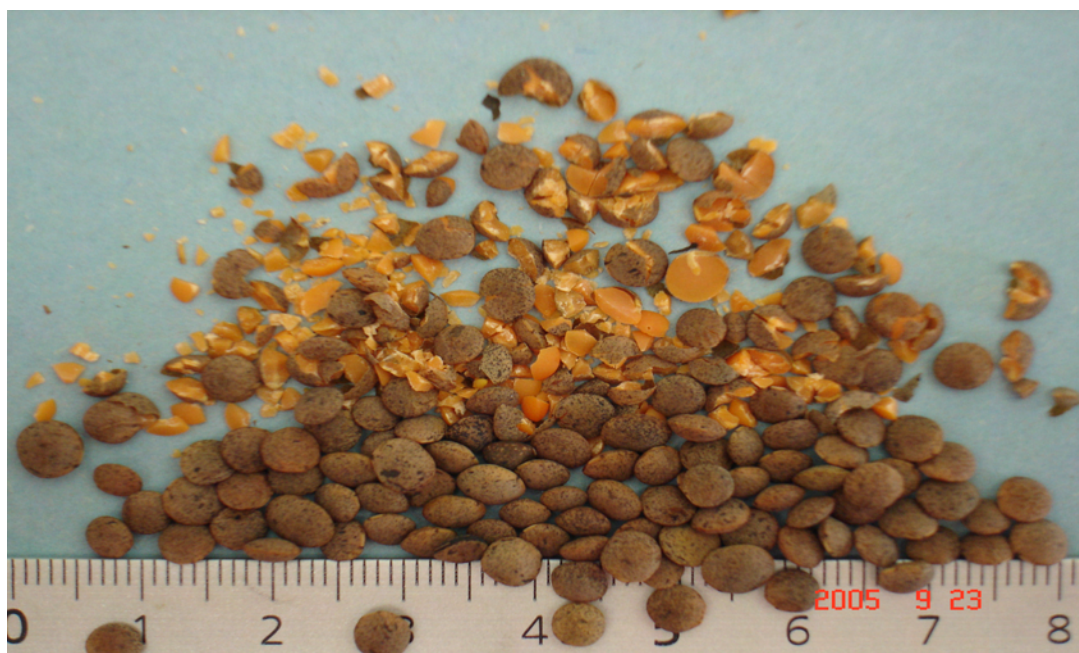
1.1 Γενετικό υλικό

Για την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης μελέτης χρησιμοποιήθηκαν 34 δείγματα ποικιλιών φακής όπου τα περισσότερα συλλέχθηκαν από πειράματα που είχαν εγκατασταθεί στο Κεντρικό Αγρόκτημα του Ινστιτούτου Κτηνοτροφικών Φυτών και Βοσκών στη Λάρισα (γεωγραφικό πλάτος 39⁰ 36' N , γεωγραφικό μήκος 22⁰ 25' E) και στο Αγρόκτημα του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (γεωγραφικό πλάτος 40⁰ 32' N , γεωγραφικό μήκος 22⁰ 59' E).

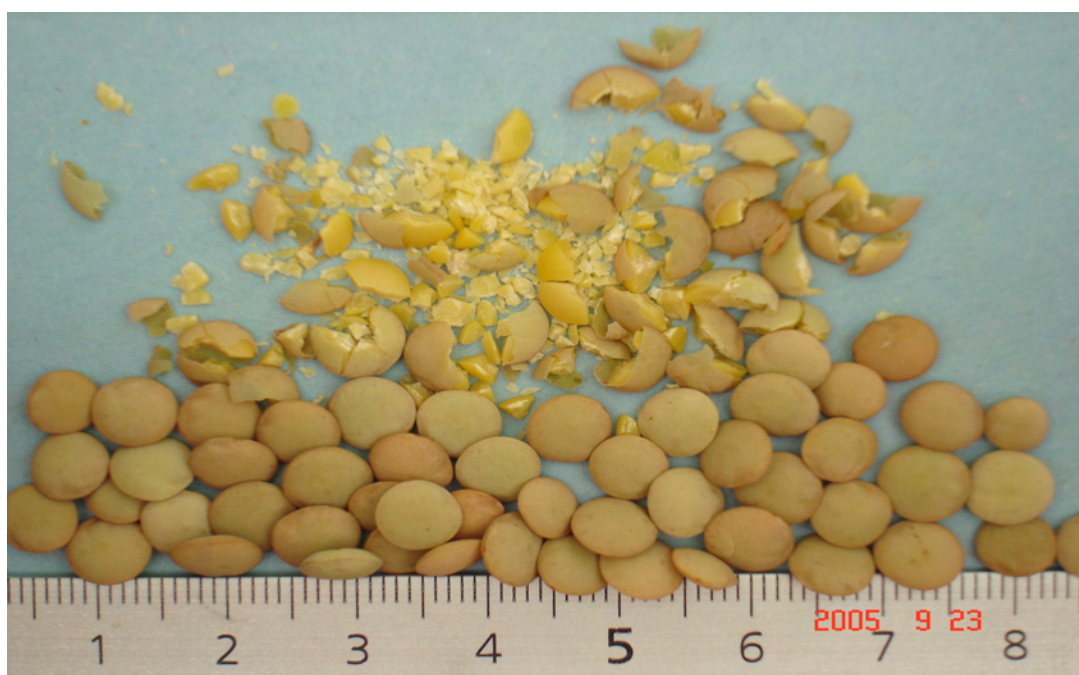
Οι συγκεκριμένοι γενότυποι-ποικιλίες αξιολογήθηκαν για τρία χρόνια στο Κεντρικό Αγρόκτημα του Ινστιτούτου Κτηνοτροφικών Φυτών και Βοσκών στη Λάρισα. Το γενετικό υλικό που αξιολογήθηκε προέρχονταν από το υλικό που δημιουργήθηκε στην Ελλάδα τα τελευταία 50 χρόνια (14 ποικιλίες), το ICARDA, καθώς και από τις χώρες Μαρόκο, Ινδία, Τουρκία, Ιορδανία, Χιλή, Καναδά, ΗΠΑ, Αλγερία και Βουλγαρία (Πίνακας 1). Το γενετικό υλικό που αξιολογήθηκε είχε δημιουργηθεί από προγράμματα κλασσικής βελτίωσης σε συνθήκες αυξημένων εισροών (Βλαχοστέργιος, 2009).



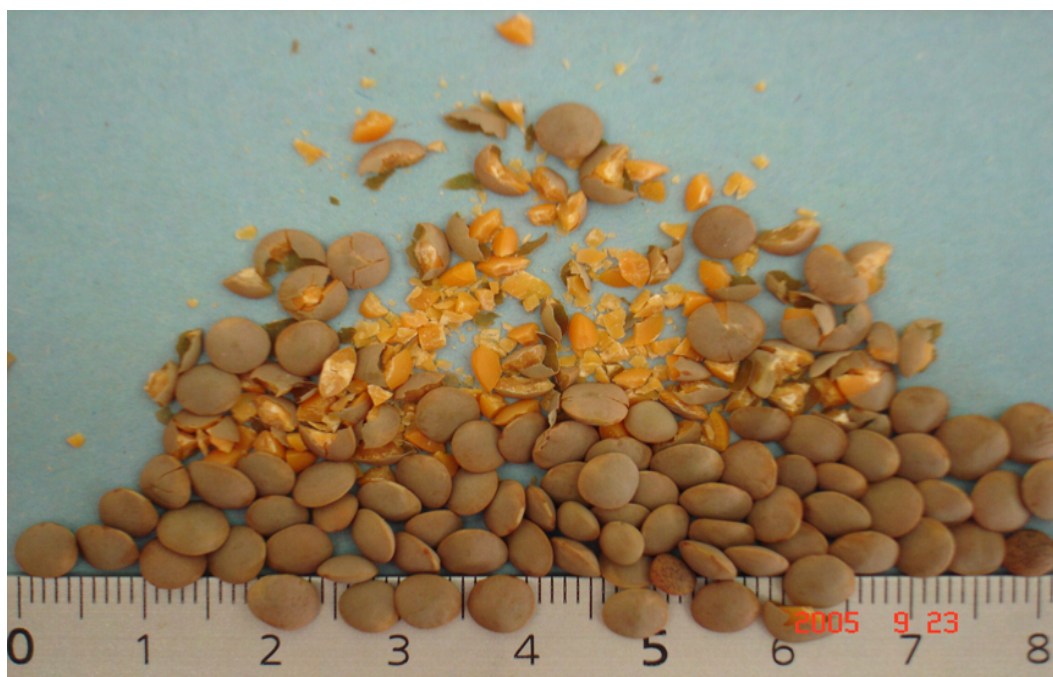
Εικόνα: 7: Σπόροι ποικιλίας ILL 590 (Βλαχοστέργιος, 2005)



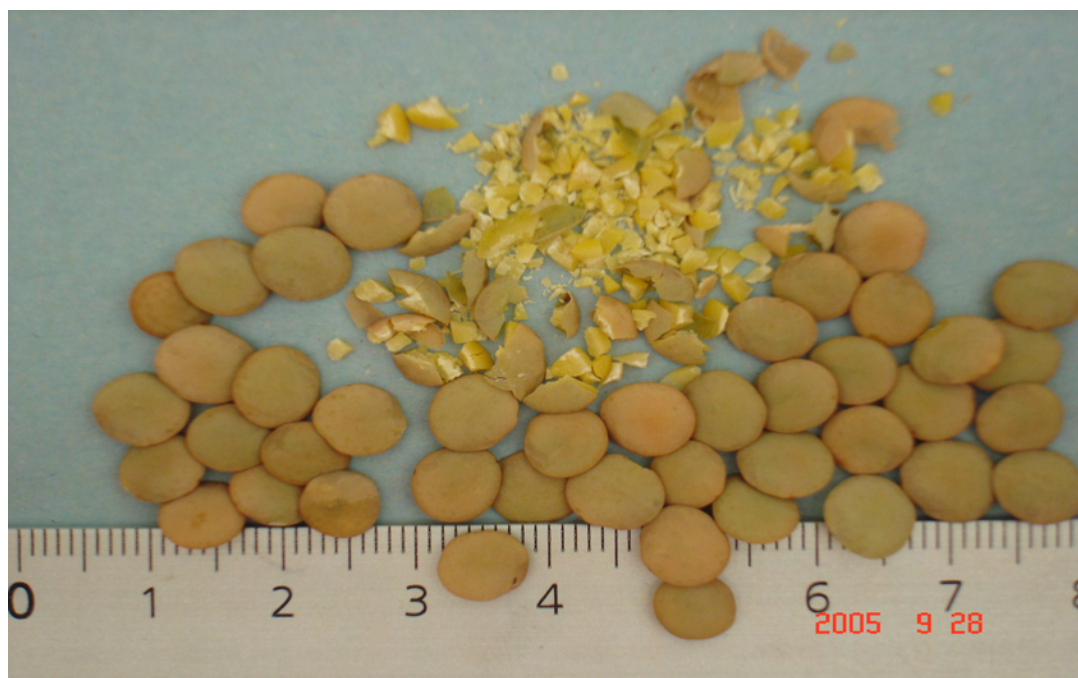
Εικόνα 8: Σπόροι ποικιλίας LL 35-INDIA(Βλαχοστέργιος, 2005)



Εικόνα 9: Σπόροι ποικιλίας ΘΕΣΣΑΛΙΑ (Βλαχοστέργιος, 2005)



Εικόνα 10: Σπόροι ποικιλίας ΙΚΑΡΙΑ (Βλαχοστέργιος, 2005)



Εικόνα 11: Σπόροι ποικιλίας LC 960254 (Βλαχοστέργιος, 2005)

Πίνακας 1: Κωδικός αριθμός, ονομασία και γεωγραφική προέλευση των 36 γενοτύπων- ποικιλιών

Κωδικός	Ονομασία	Προέλευση	Κωδικός	Ονομασία	Προέλευση
1	Morocco	ΜΑΡΟΚΟ	19	ILL 6811	ICARDA
2	USA 1	ΗΠΑ	20	FLIP 94-5L	ICARDA
3	ΘΕΣΣΑΛΙΑ	ΕΛΛΑΔΑ	21	HC-125	ΒΟΥΛΓΑΡΙΑ
4	73	ΑΛΓΕΡΙΑ	22	M-15305	ΕΛΛΑΔΑ
5	ΣΑΜΟΣ	ΕΛΛΑΔΑ	23	ΛΗΜΝΟΣ	ΕΛΛΑΔΑ
6	FLIP 92-36L	ICARDA	24	CANADA 1-Π	ΚΑΝΑΔΑΣ
7	LC-960254	ΗΠΑ	25	FLIP 2002-1L	ICARDA
8	LL35(INDIA)	ΙΝΔΙΑ	26	CANADA 2Λ	ΚΑΝΑΔΑΣ
9	81S15	ΙΟΡΔΑΝΙΑ	27	ΑΡΤΕΜΙΣ	ΕΛΛΑΔΑ
10	FLIP2003-24L	ICARDA	28	FLIP 2003-5L	ICARDA
11	ΑΘΗΝΑ	ΕΛΛΑΔΑ	29	M-17003	ΕΛΛΑΔΑ
12	Φ- 85	ΕΛΛΑΔΑ	30	ΔΗΜΗΤΡΑ	ΕΛΛΑΔΑ
13	Φ -82	ΕΛΛΑΔΑ	31	CANADA 3Λ	ΚΑΝΑΔΑΣ
14	Φ -86	ΕΛΛΑΔΑ	32	USA -2M	ΗΠΑ
15	FLIP2003-12L	ICARDA	33	FLIP 2003-5L	ICARDA
16	ILL-7698	ICARDA	34	ΙΚΑΡΙΑ	ΕΛΛΑΔΑ
17	CHILE	ΧΙΛΗ	35	Φ - 83	ΕΛΛΑΔΑ
18	ILL-590	ΤΟΥΡΚΙΑ	36	Φ - 81	ΕΛΛΑΔΑ

Να σημειωθεί πως οι αριθμοί των ποικιλιών που εμφανίζονται παραπάνω είναι και οι αριθμοί με τους οποίους έτρεξαν στην ηλεκτροφόρηση και καταγράφηκαν.

**Πίνακας 2: Μορφολογικά, Αγρονομικά και Φυσιολογικά
χαρακτηριστικά των ποικιλιών που μελετήθηκαν**

Ποικιλία	Σχήμα σπόρου	Κατηγορία Λ/Π	Πρωιμότητα	Ανθεκτικότητα στο Φουζάριο	
				Απόδοση	
ILL-6811	1	1	3	3	1
ΣΑΜΟΣ	1	1	5	5	5
ΑΘΗΝΑ	1	1	3	7	3
Φ-86	1	1	5	5	3
MOROCCO	1	1	3	7	7
ΑΡΤΕΜΙΣ	1	1	3	7	5
ΔΗΜΗΤΡΑ	1	1	5	5	5
M-15305	2	1	3	5	3
FLIP 92-36L	1	1	3	5	3
FLIP 2003-24L	1	1	3	5	3
ILL-590	1	1	1	1	1
INDIA	1	1	1	3	5
CHILE	2	2	5	5	5
Φ-83	2	2	5	7	7
ΙΚΑΡΙΑ	2	2	5	7	9
ΘΕΣΣΑΛΙΑ	1	2	5	5	7
73	1	1	3	7	5
USA 2-Π	1	2	7	5	9
FLIP 02- 1L	1	1	1	9	5
FLIP 94-5L	1	1	3	7	5
ILL-7698	1	1	5	3	1
Φ-85	1	1	5	3	5
ΛΗΜΝΟΣ	1	2	5	7	7
FLIP 03-12L	1	1	3	5	3
81S15	1	1	3	5	1
Φ-81	1	1	5	5	7
FLIP 2003-57L	1	1	3	3	3
HC-125	1	1	5	5	5

FLIP 20003-50L	1	1	3	5	7
M-17003	1	1	3	7	5
LC-960254	1	2	3	7	5
Φ-82	1	1	5	7	7
CAN 2Α	1	1	7	5	7
CAN 3Α	1	1	7	5	5

(Βλαχαστέργιος, 2010)

Κάποια βασικά μορφολογικά, φυσιολογικά και αγρονομικά χαρακτηριστικά των ποικιλιών που μελετήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 2. Η περιγραφή των μορφολογικών χαρακτηριστικών έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο TG/210/1/UPOV (www.upov.org). Αναλυτικότερα, στη πρώτη στήλη που απεικονίζεται το σχήμα των σπόρων, η ένδειξη 1 υποδεικνύει ότι ο σπόρος είναι φακοειδής ενώ η ένδειξη 2 πως είναι πεπλατυσμένος. Στη δεύτερη στήλη απεικονίζεται για κάθε ποικιλία αν ανήκει στις λεπτόσπερμες ποικιλίες ή στις πλατύσπερμες. Η ένδειξη 1 υποδεικνύει πως πρόκειται για λεπτόσπερμη ποικιλία ενώ η ένδειξη 2 πως πρόκειται για πλατύσπερμη.

Η τρίτη στήλη εμφανίζει για κάθε ποικιλία κατά πόσο πρόιμη είναι συγκεκριμένα, ο δείκτης 1 είναι για τις πολύ πρόιμες ποικιλίες, ο δείκτης 3 για τις πρόιμες ποικιλίες, ο δείκτης 5 για τις μέσης προιμότητας ποικιλίες και ο δείκτης 7 για τις όσιμες.

Η τέταρτη στήλη αναφέρεται την ανθεκτικότητα των 36 μελετώμενων ποικιλιών στην προσβολή από τον μύκητα *Fusarium oxysporum f.sp .lentis*. Ο δείκτης 1 δείχνει πως η ποικιλία είναι πολύ ανθεκτική, ο δείκτης 3 πως είναι ανθεκτική, ο δείκτης 5 πως είναι μέσης ανθεκτικότητας, ο δείκτης 7 πως είναι ευαίσθητη και ο δείκτης 9 πως είναι πολύ ευαίσθητη.

Η πέμπτη στήλη αναφέρεται στην αποδοτικότητα της κάθε μία ποικιλίας. Ο δείκτης 1 υποδεικνύει τις πολύ παραγωγικές ποικιλίες, ο δείκτης 3 τις παραγωγικές, ο δείκτης 5 τις ποικιλίες μέσης παραγωγικότητας, ο δείκτης 7 τις ποικιλίες μικρής παραγωγικότητας και τέλος ο δείκτης 9 απεικονίζει τις ποικιλίες πολύ μικρής παραγωγικότητας. Η αξιολόγηση βασίστηκε σε πειραματικά δεδομένα τριών ετών (Vlachostergios και Roupakias 2008).

1.2 Γενεαλογία μελετώμενων ποικιλιών φακής

Πίνακας 3: Γενεαλογία μελετώμενων ποικιλιών φακής

Ποικιλίες	Γενεαλογία
1. Morocco	-
2. USA 1	-
3. ΘΕΣΣΑΛΙΑ	M-1956 (Berlin)
4. 73	-
5. ΣΑΜΟΣ	M-1956 (Berlin) X M-11071 (Seville Blanche Tardife HUNGARY)
6. FLIP 92-36L	ILL4354 X ILL (1880X813) ή ILL 5879 X ILL 5714
7. LC-960254	-
8. INDIA LL35	-
9. 81S15	UJL 197 X ILL 440 (Syrian local large)
10. FLIP 2003-24L	ILL 7005 X ILL 1939
11. ΑΘΗΝΑ	M-16095 (Ζαχαριανά, Χανιά)
12.Φ- 85	Τοπικός πληθυσμός M-16087 (Λυδία, Καβάλα)
13.Φ -82	Τοπικός πληθυσμός M-16065 (Μεγαρχή, Τρίκαλα)
14.Φ -86	M-12463 (Peloponesse) X M-15324 (Laird Canada)
15. FLIP 2003- 12L	ILL 7115 X AKM 400
16. ILL-7698	-
17. CHILE	-
18. ILL-590	-
19. ILL 6811	ILL 2573 X ILL 5588
20. FLIP 94-5L	-
21. HC-125	-
22. M-15305	FLIP 84-111L
23. ΛΗΜΝΟΣ	M-12490 (Κρήτη)

24. CANADA 1-Π	-
25.FLIP 2002-1L	ILL7005 X ILL 1939
26.CANADA 2Α	-
27.APTEMIS	M-16064 (Βαμβακόφυτο, Σέρρες)
28.FLIP 2003 -50L	ILL 590 X ILL 7723
29. M-17003	-
30.ΔΗΜΗΤΡΑ	M-1956 (Berlin) X M-670 (Ρέθυμνο)
31.USA –2M	-
32. FLIP 2003-57L	ILL 7617 X 91516
33.ΙΚΑΡΙΑ	M-1956 (Berlin) X M-10629 (hybrid INRA)
34.Φ - 83	Τοπικός πληθυσμός M-16083 (Νέο Ικόνιο, Καρδίτσα)
35.Φ – 81	Τοπικός πληθυσμός M-16094 (Νίκαια,Λάρισα)
36.CANADA 3Α	-

(Βλαχοστέργιος, προσωπική επικοινωνία)

Στον συγκεκριμένο πίνακα , εμφανίζεται η γενεαλογία των μελετώμενων ποικιλιών. Οι ποικιλίες που προέρχονται από τις Η.Π.Α και τον Καναδά δεν έχουν γνωστή γενεαλογία και το μοναδικό τους στοιχείο είναι πως αποτελούν καλλιεργούμενες ποικιλίες στις χώρες προέλευσής τους. Το ίδιο ισχύει και για την ποικιλία με το νούμερο 21 που προέρχεται από τη Βουλγαρία καθώς και για τις ποικιλίες 1 από το Μαρόκο, 4 από την Αλγερία, 8 από την Ινδία, 17 από τη Χιλή και 18 από την Τουρκία.

2.ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Σπορά

Πέντε σπόροι από κάθε ποικιλία σπάρθηκαν σε Jiffy-pots, όπου προηγουμένως είχε τοποθετηθεί ικανοποιητική ποσότητα τύρφης προκειμένου να αναπτυχθούν και να χρησιμοποιηθούν για την εξαγωγή DNA.

Ομοίως πέντε σπόροι από τις ποικιλίες Αθηνά, ILL 590 και Σάμος σπάρθηκαν ξεχωριστά σε 5 γλάστρες για την καθεμιά προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για τις διασταυρώσεις μεταξύ των συγκεκριμένων ποικιλιών.

2.2 Διασταυρώσεις

Οι γλάστρες των παραπάνω τριών ποικιλιών που χρησιμοποιήθηκαν για τις διασταυρώσεις τοποθετήθηκαν στον πρότυπο θερμοκηπιακό χώρο του Ινστιτούτου Κτηνοτροφικών Φυτών και Βοσκών Λάρισας. Οι διασταυρώσεις πραγματοποιήθηκαν το δεύτερο δεκαπενθήμερο του Μαΐου του 2010. Προτιμήθηκαν κυρίως οι πρωινές ώρες της ημέρας (08-11).

Για τη διαδικασία της αποστημόνωσης ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο των **Kumar και Singh, 1998**. Χρησιμοποιήθηκε η ποικιλία Σάμος σαν θηλυκός γονέας και η ποικιλία ILL 590 σαν αρσενικός. Συγκεκριμένα, η αποστημόνωση έγινε όταν τα πέταλα είχαν φτάσει στο 50-75% του μήκους των σεπάλων. Η διαδικασία της αποστημόνωσης περιελάμβανε συγκεκριμένα στάδια. Αρχικά, το άνθος παρέμενε ανάμεσα στον δείκτη και τον αντίχειρα και η λαβίδα ήταν στραμμένη προς τον χειριστή. Δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μη λυγίσει ή να συστραφεί ο μίσχος. Χρησιμοποιήθηκαν λαβίδες με κοφτερές μύτες προκειμένου να επιτύχουν μία τομή στη ραχιαία πλευρά του άνθους όπου τελικά και οι δέκα ανθήρες αποτραβήχτηκαν με τις λαβίδες. Επίσης, δόθηκε βαρύνουσα προσοχή ώστε να μη τραυματιστεί το στίγμα. Οι γυρεόκοκκοι συλλέχθηκαν μέσω της εισαγωγής των λαβίδων στο νωτιαίο άκρο και στον ανθήρα του πλήρους ανοιχτού άνθους. Τέλος, οι γυρεόκοκκοι προσκολλήθηκαν στο άκρο των λαβίδων και μεταφέρθηκαν στο στίγμα των αποστημονωμένων μπουμπουκιών.



Εικόνα 12: Διαδικασία αποστημόνωσης



Εικόνα 13: Διαδικασία αποστημόνωσης

2. 3 Συλλογή ιστού-εξαγωγή DNA

Η συλλογή του φυτικού ιστού ξεκίνησε όταν τα φυτά απέκτησαν ικανοποιητικό μέγεθος. Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος CTAB με μικρές προσαρμογές. Μίγμα συνολικού βάρους 0,3 gr από ιστούς υγιών φύλλων και από τα πέντε νεαρά φυτά της κάθε ποικιλίας, αποσπάσθηκε και οι φυτικοί ιστοί τοποθετήθηκαν σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα μαζί με 900 μL ρυθμιστικού διαλύματος CTAB, 10 μL μερκαπτοαιθανόλης (1% v/v) και πολτοποιήθηκαν με τη βοήθεια μικρού πλαστικού αποστειρωμένου γουδιού. Στη συνέχεια, τα διαλύματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 60 ° C για περίπου 15 λεπτά. Μετά την εξαγωγή έγινε απομάκρυνση των πρωτεϊνών με διάλυμα χλωροφθορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1 v/v) και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές για 20 λεπτά. Έπειτα, παρατηρήθηκε διαχωρισμός των φάσεων και μεταφέρθηκε το υπερκείμενο υδατικό διάλυμα που περιείχε το DNA σε νέα φιαλίδια.

Για την καθίζηση του DNA έγινε χρήση 2/3 του όγκου ισοπροπανόλης και 1/10 του όγκου άλατος (NH_4 -acetate, 3M). Στη συνέχεια, τα διαλύματα τοποθετήθηκαν στους -20 ° C για 30 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των διαλυμάτων στις 10.000 στροφές για 15 λεπτά και μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, το DNA παρατηρήθηκε να έχει επικολληθεί στον πυθμένα του tube. Ακολούθησε καθαρισμός του DNA με διάλυμα αιθανόλης 70% και άλατος (K-acetate) 0,1 M για δύο φορές και μία φορά με καθαρή αιθανόλη και φυγοκέντρηση για πέντε λεπτά. Μετά την ξήρανση των δειγμάτων σε κενό αέρος και θερμοκρασία 60 ° C για 20 λεπτά έγινε διάλυση του καθαρού πλέον DNA σε 200 μL διαλύματος TE και τα διαλύματα τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη για περαιτέρω χρήση.

Ο ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός DNA έγινε ως εξής: η συγκέντρωση της ποσότητας του DNA σε ng/ μL προσδιορίστηκε σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους / ορατού με απορρόφηση των δειγμάτων στα 260 nm. Ο μέσος όρος της συγκέντρωσης DNA των δειγμάτων για τους πληθυσμούς, υπολογίστηκε στα 100 ng/ μL .

2.4 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν

Πίνακας 4: Αλληλουχίες νουκλεοτιδίων των SSR εκκινητών (5'-3')

ΟΝΟΜΑ ΕΚΚΙΝΗΤΗ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ
MS 1	TTACGAAAAAGGCAAACATA
MS 3	TTGTTTTTTCTACCCTTCA
MS 6	GAGATTTCCAATACTGAATA
MS 11	ACTCTAGCCTTTTCAACG
MS 5S	TGGTAGCGTAAAAAAGTGTC

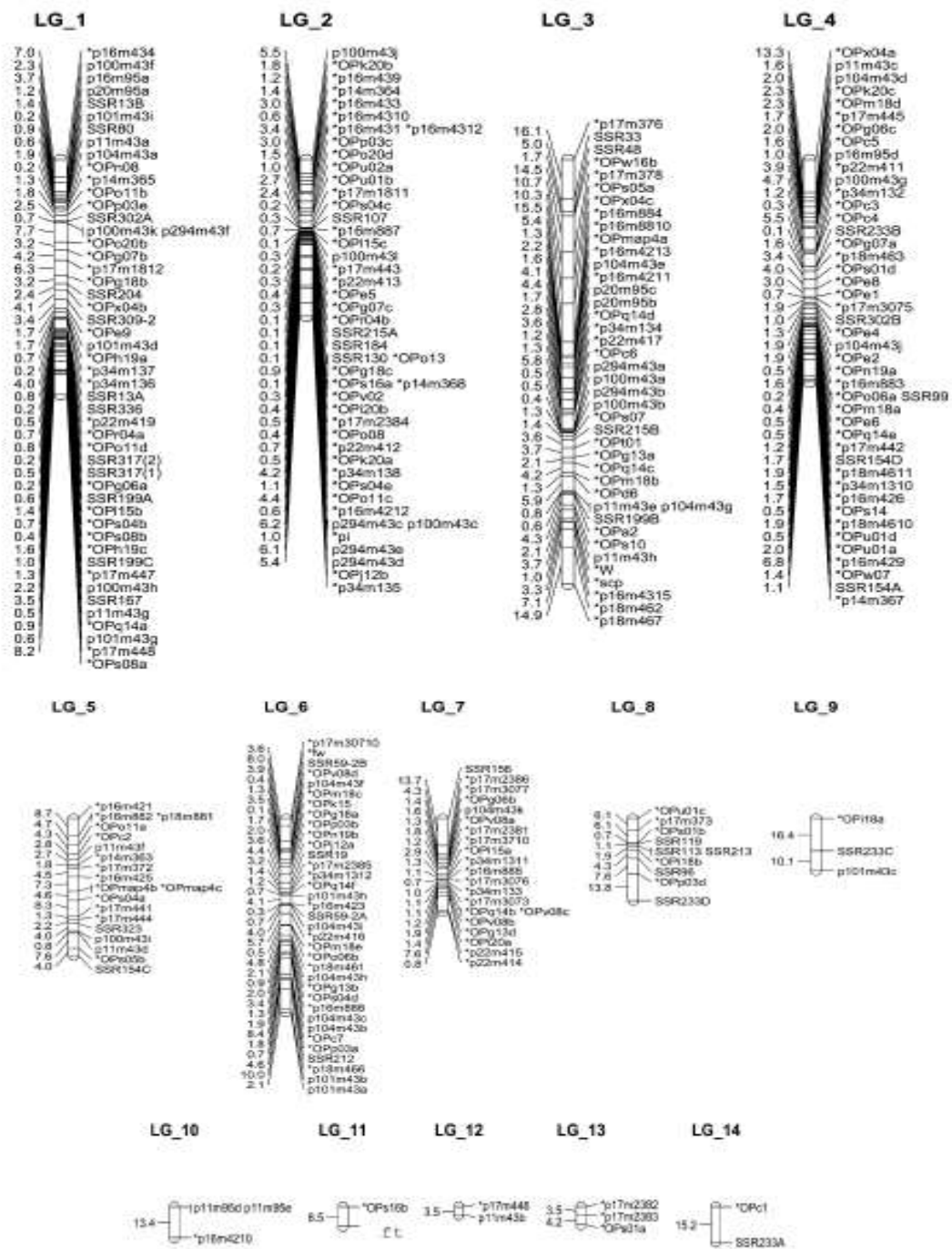
Πίνακας 5: Αλληλουχία νουκλεοτιδίων του SSR- εκκινητή (5'-3') στενά συνδεδεμένου με την ανθεκτικότητα στο *Fusarium oxysporum f.sp.lentis* (A. Hamwiah κ.α,2005)

ΟΝΟΜΑ ΕΚΚΙΝΗΤΗ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ
SSR 59-2	CCAAATACTGCAACACCG

Ο συγκεκριμένος δείκτης επιλέχθηκε με βάση το άρθρο των (A. Hamwiah κ.α, 2005). Ο σκοπός των συγκεκριμένων ερευνητών ήταν να απομονώσουν μικροδορυφόρους από τη φακή και να τους χαρτογραφήσουν χρησιμοποιώντας έναν ήδη υπάρχοντα χαρτογραφημένο πληθυσμό. Συγκεκριμένα, προσπάθησαν να εντοπίσουν τον δείκτη που σχετίζεται με την ανθεκτικότητα της φακής στο *Fusarium oxysporum f.sp. lentis*. Επιδίωξαν κυρίως να καθορίσουν τη γενετική σύνδεση του δείκτη και τη θέση του στο σημείο που αφορά την ανθεκτικότητα. Αυτή η συνδυαστική ανάλυση απέδειξε πως το σημείο που αφορά την ανθεκτικότητα *Fusarium oxysporum f.sp. lentis* τοποθετήθηκε στο LG 6 και πως το σημείο αυτό συνδέθηκε με τον SSR

δείκτη SSR 59-2B και με τον AFLP δείκτη p17m30710 στις αποστάσεις 8.0 cM και 3.5 cM αντίστοιχα.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο δείκτης SSR 59-2A που είναι συγκυρίαρχος και μονομορφικός. Αποτελεί ίσως την αρχή για μια περαιτέρω μελλοντική έρευνα και μελέτη του κυρίαρχου δείκτη SSR 59-2B καθώς και άλλων που συνδέονται με την ανθεκτικότητα στο *Fusarium oxysporum f.sp. lentis*.



Εικόνα 14: Γενετικός συνδετικός χάρτης του *Lens spp.*, όπου δείχνει τη θέση των SSR, AFLP, RAPD δεικτών που μελετήθηκαν από τους A. Hamwieh κ.α, 2005

2.5 PCR (Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης)

Το μίγμα της **PCR** με τελικό όγκο 25 μL περιείχε:

- ✓ 2,5 μL MgCl_2 (50 mM)
- ✓ 2,5 buffer- ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (10x)
- ✓ 2,4 μL από ένα ρυθμιστικό διάλυμα dNTP's
- ✓ 1 μL εκκινητή (primer)
- ✓ 0,25 μL Taq πολυμεράση
- ✓ 5 μL από τα δείγματα του DNA (5 ng/ μl)
- ✓ τέλος, έγινε συμπλήρωση του όγκου με απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό.

Το πρόγραμμα της αντίδρασης PCR για τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- Αρχική αποδιάταξη του DNA σε θερμοκρασία 94⁰ C για 2 min
- Κύκλος που επαναλαμβανόταν 30 φορές και αποτελείται από:
 - θερμική αποδιάταξη στους 94⁰C για 30 sec
 - υβριδισμό του εκκινητή στους 50⁰C για 30 sec
 - επιμήκυνση του εκκινητή για σύνθεση νέου κλώνου στους 72⁰ C για 2 min
- Τελική επιμήκυνση στους 72⁰ C για 10 λεπτά.

2.6 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων- υπολογισμός των μεγεθών των ενισχυμένων ζωνών

Η ανάλυση των προϊόντων της αντίδρασης έγινε σε πηκτή αгарόζης 1% στην οποία είχε προστεθεί 0,004%(w/v) βρωμιούχο αιθίδιο, σε διάλυμα 1x TAE. Το δείγμα που τοποθετείτο σε κάθε κελί περιείχε 10 μL DNA αναμειγμένα με 1 μL διαλύματος κυανού βρωμοφαινόλης. Ο χρόνος που απαιτούνταν για την ηλεκτροφόρηση ήταν περίπου 2-2,5 ώρες για εφαρμοζόμενη τάση 120 Volt. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή εκτίθονταν σε υπεριώδη ακτινοβολία και φωτογραφήθηκε για την καταγραφή των πολυμορφισμών των δειγμάτων.

2.7 Καταγραφή αποτελεσμάτων

Κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων και έπειτα από την εισαγωγή των δεδομένων για κάθε εκκινητή και για όλα τα δείγματα, κατασκευαζόταν πίνακας στον οποίο εμφανιζόταν για κάθε εκκινητή η παρουσία ή απουσία ενισχυμένης ζώνης. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης καταγράφηκαν σε δυαδική μορφή όπου με 1 συμβολιζόταν η παρουσία ενισχυμένης ζώνης και με 0 η απουσία της. Καταγράφηκαν μόνο οι ευδιάκριτες και επαναλήψιμες ζώνες. Ο συγκεκριμένος πίνακας χρησιμοποιήθηκε για την αριθμητική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

2.8 Μοριακή στατιστική ανάλυση

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος NTSYS- pc 2 (Rohlf, 2000), προκειμένου να μελετηθούν τα μοριακά δεδομένα του πειράματος με σκοπό να σχηματισθεί δενδρόγραμμα γενετικής ομοιότητας των γενοτύπων. Η γενετική συγγένεια μεταξύ των εξεταζόμενων γενοτύπων της φακής εκτιμήθηκε με τη βοήθεια του δείκτη Jaccard και ομαδοποίηση κατά UPGMA. Ο υπολογισμός της γενετικής ομοιότητας των δειγμάτων έγινε χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο του Jaccard $S_{ij} = a/(a+b+c)$, (Jaccard,1908) και του Dice $S_{ij} = 2a/(2a+b+c)$, (Dice,1945), όπου:

1. S_{ij} : η γενετική ομοιότητα των δειγμάτων i και j
2. a : το πλήθος των πολυμορφικών τμημάτων DNA που είναι παρόντα στο δείγμα i και στο δείγμα j
3. b : το πλήθος των πολυμορφικών τμημάτων DNA που είναι παρόντα στο δείγμα i και στο δείγμα j
4. c : το πλήθος των πολυμορφικών τμημάτων DNA που είναι παρόντα στο δείγμα j και στο δείγμα i

Με βάση τις μήτρες γενετικής ομοιότητας, κατασκευάστηκαν δενδρογράμματα φυλογενετικών σχέσεων με τους αλγόριθμους Neighbour Joining UPGMA (Unweighted Pair- group Method of arithmetic average). Τελικά, επιλέχθηκε η μέθοδος με τον υψηλότερο συντελεστή συσχέτισης του δενδρογράμματος και του πίνακα δεικτών ομοιότητας των γενοτύπων (cophenetic matrix correlation).

ΕΝΟΤΗΤΑ Γ

1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1.1 Διασταυρώσεις

Οι διασταυρώσεις σε ορισμένα αυτογονιμοποιούμενα φυτά όπως η φακή, παρουσιάζουν μικρό ποσοστό επιτυχίας διότι τα άνθη της είναι μικρά, κλειστόγαμα και εύθραυστα. Ωστόσο, η επιτυχία εξαρτάται κατά ένα μεγάλο ποσοστό και από το περιβάλλον. Έχει αναφερθεί πως εάν η σχετική υγρασία είναι παραπάνω από 50% και πως εάν οι θερμοκρασίες νύχτας/ ημέρας είναι περίπου 15/25 °C αλλά και υπάρχει υψηλή ένταση φωτός τότε τα ποσοστά επιτυχίας είναι πολύ υψηλά στις διασταυρώσεις στο θερμοκήπιο (Wilson, 1972; Muehlbauer et al., 1980).

Στο συγκεκριμένο πείραμα, οι θερμοκρασίες νύχτας /ημέρας ήταν αρκετά χαμηλές και επιπλέον λόγω της υψηλής τιμής της σχετικής υγρασίας, τα φυτά ήταν επιρρεπή στην προσβολή από μυκητολογικές ασθένειες, γεγονός που τελικά φάνηκε περισσότερο τις τελευταίες μέρες των διασταυρώσεων. Τελικά, οι καιρικές συνθήκες επέδρασαν αρνητικά στην επιτυχία των διασταυρώσεων καθώς τα φυτά καταστράφηκαν και το ποσοστό επιτυχίας ήταν μηδενικό.



Εικόνα 15: Πρώτα στάδια ανάπτυξης νεαρών λοβών μετά από διασταύρωση των επιλεγέντων γονέων

ΠΙΝΑΚΑΣ 6 : Διασταυρωθείσες ποικιλίες και ποσοστό επιτυχίας

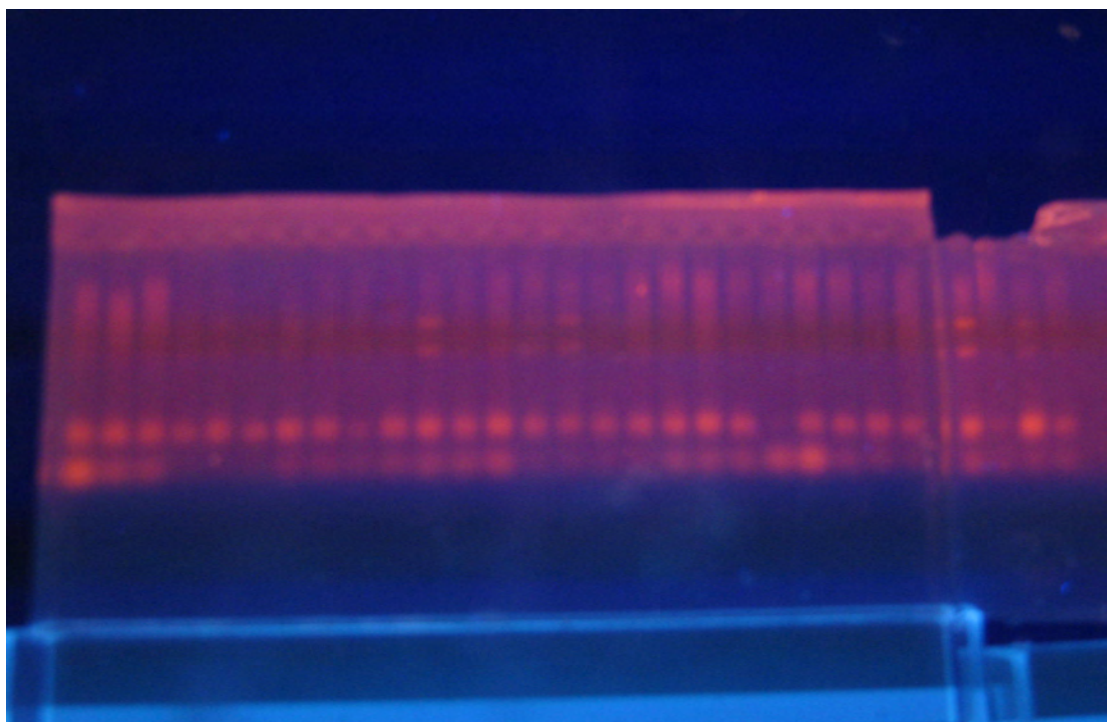
	Αριθμός διασταυρώσεων	Ποσοστό επιτυχίας
ΑΘΗΝΑ x ILL 590	11	0%
ΣΑΜΟΣ x ILL 590	12	1%
ΑΘΗΝΑ x ΣΑΜΟΣ	18	1%

1.2 Ενισχυμένες και πολυμορφικές ζώνες

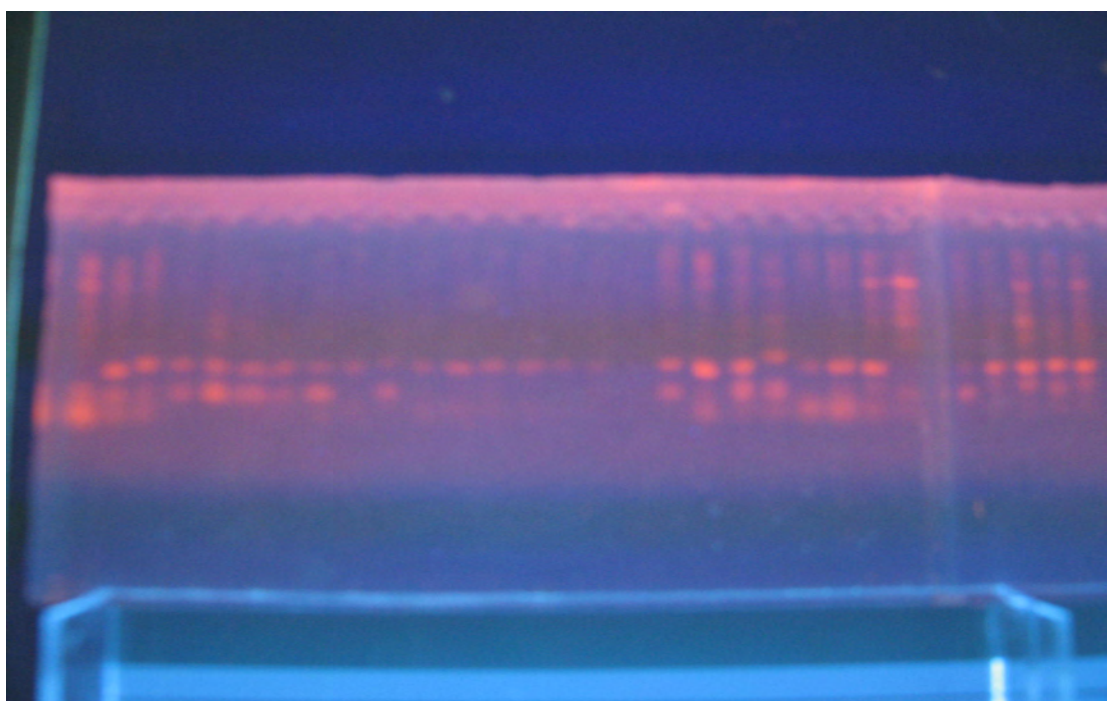
Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν έδωσαν συνολικά 12 ενισχυμένες ζώνες. Το μεγαλύτερο ποσοστό πολυμορφισμού έδωσαν ο δείκτης MS 3 και ο MS 6. Τα μεγέθη ζωνών κυμάνθηκαν από 200 bp (MS 3, MS 1) μέχρι 800 bp (MS 3).

Πίνακας 7: Αποτελέσματα χρησιμοποιηθέντων μοριακών δεικτών

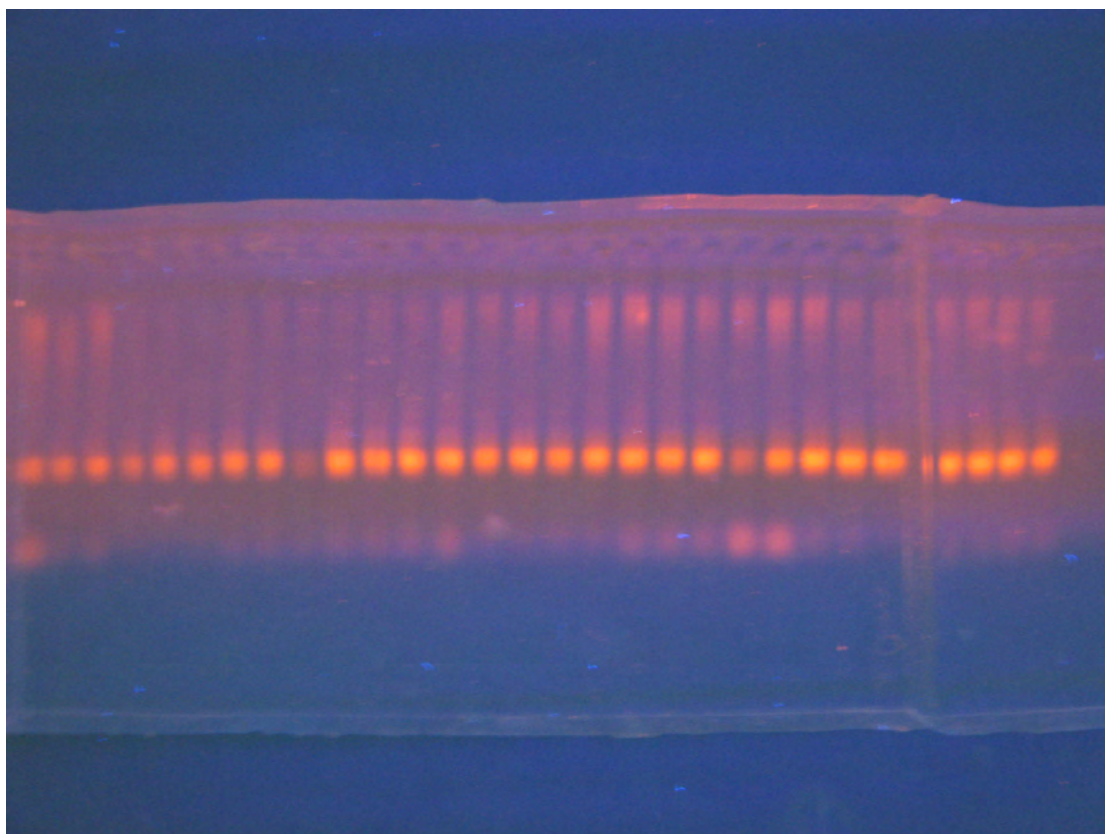
Δείκτες SSR	Πολυμορφικές ζώνες	Μεγέθη ζωνών
MS 1	3	200-700 bp
MS 3	3	200-800 bp
MS 5S	2	200-400 bp
MS 6	2	200-300 bp
MS 11	2	300-600 bp



Εικόνα 16: Πολυμορφικές ζώνες σε πηκτή αγαρόζης για τον εκκινητή MS 1



Εικόνα 17: Πηκτή αγαρόζης για τον εκκινητή MS 3 που παρουσίασε μεγάλο ποσοστό πολυμορφισμού



Εικόνα 18: Πολυμορφικές ζώνες σε πηκτή αγαρόζης για τον εκκινητή MS 6

Σύμφωνα με τους **Duran κ.α, (2004)**, από την έρευνα των οποίων χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι SSR δείκτες, τρεις από τους συγκεκριμένους δείκτες που χαρακτηρίστηκαν από τη γενετική βιβλιοθήκη ήταν πολυμορφικοί. Αν και ο αριθμός των SSR δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μικρός, οι ίδιοι υποστηρίζουν πως το υψηλό επίπεδο του πολυμορφισμού ανάμεσα στις ποικιλίες και στα είδη της φακής επιβεβαίωσε το γεγονός ότι οι δείκτες αυτοί, έχουν ευρύτατες εφαρμογές στη γενετική χαρτογράφηση στο είδος της φακής.

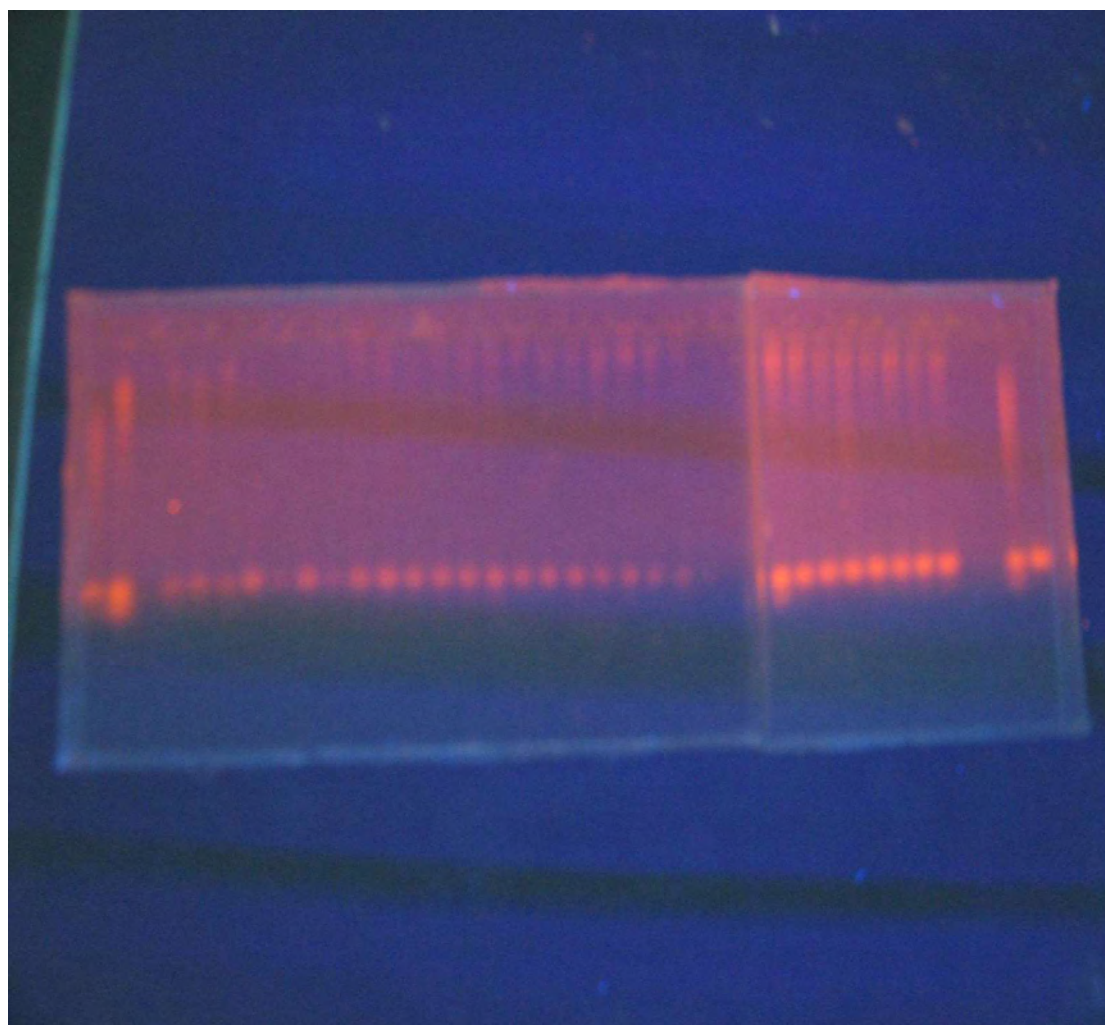
1.3 Εντοπισμός μοριακών δεικτών στενά συνδεδεμένων με την ανθεκτικότητα στην ασθένεια *Fusarium oxysporum f.sp.lentis*

Παρατηρήθηκε επίσης, ο δείκτης SSR 59-2A που είναι συγκυρίαρχος ως προς το χαρακτηριστικό της ανθεκτικότητας στην ασθένεια *Fusarium oxysporum f.sp.lentis* και παρουσίασε μία μόνο ζώνη των 200 bp σε όλα τα δείγματα των ποικιλιών φακής που χρησιμοποιήθηκαν. Σύμφωνα με τους **Eujayl κ.α, 1998** και τους **Hamwiesh κ.α,**

2005 και τη συνδετική τους ανάλυση το γονίδιο που δείχνει την ανθεκτικότητα στη φουζαρίωση εδράζεται στη θέση LG 6 και συνδέεται με τον δείκτη SSR 59-2B.

Πίνακας 8: Αποτελέσματα SSR-59 2A δείκτη

Συγκυρίαρχος δείκτης ως προς την ανθεκτικότητα στο <i>Fusarium oxysporum f.sp.lentis</i>	Πολυμορφικές ζώνες	Μεγέθη ζωνών
SSR-59 2A	1	200 bp

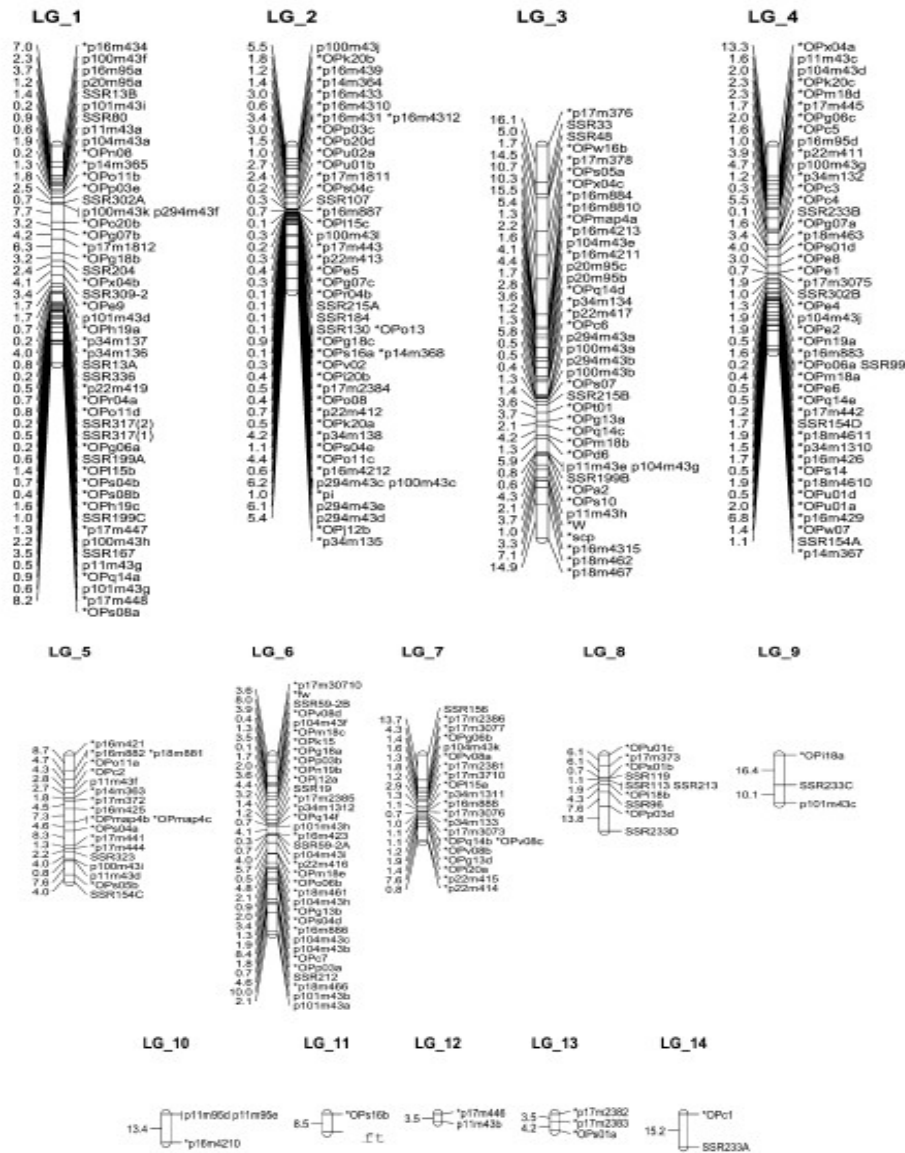


Εικόνα 19: Πηκτή αγαρόζης για τον εκκινητή SSR-59 2A που παρουσίασε μία μόνο ζώνη των 200 bp σε όλα τα δείγματα

Ο εντοπισμός των γονιδίων της ανθεκτικότητας στην φουζαρίωση αποτελεί ένα από τους μεγαλύτερους στόχους της μοριακής βελτίωσης της φακής. Ο **Eujayl et al. (1998b)**, παρατήρησε πως η ασθένεια της φουζαρίωσης της φακής ελέγχεται από ένα κυρίαρχο γονίδιο.

Οι **A. Hamwieh κ.α, (2005)** όμως, τοποθέτησαν επιτυχώς το γονίδιο της ανθεκτικότητας στο LG 6. Το συγκεκριμένο γονίδιο υπερφαλλαγγίζεται από ένα δείκτη SSR με την ονομασία SSR 59-2B και από ένα AFLP δείκτη με την ονομασία p17m30710 σε μία απόσταση 8.0 cM και 3.5 cM αντίστοιχα. Επιπλέον, ο συγκεκριμένος τύπος του δείκτη είναι αρκετά χρήσιμος για την χαρτογράφηση διότι επιτρέπει την διαφοροποίηση των ομοζύγων και ετεροζύγων γενοτύπων.

Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήσαμε τον δείκτη SSR 59-2A που είναι συγκυρίαρχος ως προς το γονίδιο της ανθεκτικότητας στη φουζαρίωση. Το αποτελέσματα που προέκυψαν από τη χρήση του συγκεκριμένου δείκτη ήταν μία ζώνη των 200 bp σε όλες τις ποικιλίες του δείγματος των ποικιλιών που εξετάστηκαν. Παρατηρώντας όμως τον γενετικό χάρτη της φακής και συγκεκριμένα το χρωμόσωμο LG 6 βλέπουμε πως υπάρχει μία γενετική απόσταση ως προς τις θέσεις των δεικτών SSR 59-2A και SSR 59-2B. Ο μεν πρώτος είναι συγκυρίαρχος και ο δεύτερος κυρίαρχος ως προς το χαρακτηριστικό της ανθεκτικότητας στη φουζαρίωση, οπότε ο δείκτης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα έρευνα ίσως δεν ήταν ο σωστός και για το λόγο αυτό παρατηρήθηκαν τα ανωτέρω.



Εικόνα 20: Γενετικός συνδετικός χάρτης της φακής

Ωστόσο, σύμφωνα πάλι με τους **A. Hamwieh κ.α, (2005)**, οι συγκυρίαρχοι δείκτες είναι αρκετά αποτελεσματικοί στην ταυτοποίηση επιθυμητών γενοτύπων στα πρώτα στάδια της επιλογής. Ακόμη αυτού του τύπου οι δείκτες είναι αρκετά χρήσιμοι στην διαφοροποίηση των ομοζύγων και ετεροζύγων γενοτύπων. Στη μοριακή βελτίωση (τόσο στην μέθοδο της επιλογής αλλά και της αναδιασταύρωσης), οι συγκυρίαρχοι δείκτες είναι αποτελεσματικοί στην ταυτοποίηση επιθυμητών ομοζύγων γενοτύπων κυρίως στα πρώτα στάδια της επιλογής.

Για τον λόγο αυτό, οι συγκυρίαρχοι δείκτες που αναπτύχθηκαν στην έρευνα τους , αποτελούν ένα μεγάλο πλεονέκτημα για τη φακή, η οποία μέχρι πρότινος υστερούσε σε συγκυρίαρχους δείκτες. Να σημειωθεί πως γενικότερα, οι SSR δείκτες έχουν μεγάλες δυνατότητες προκειμένου να εμπλουτίσουν τον χάρτη της φακής. Η έρευνα των **A. Hamwieh κ.α, (2005)** είναι σε θέση να παρέχει τη βάση για μία περαιτέρω ανάπτυξη της πυκνότητας του συνδετικού χάρτη της φακής.

1.4 Γενετική ταυτοποίηση και μελέτη φυλογενετικών σχέσεων ποικιλιών φακής με SSR δείκτες

Για τον υπολογισμό της γενετικής ομοιότητας μεταξύ των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκαν όλες οι ζώνες που ενίσχυσαν οι SSR εκκινητές.

Αναλυτικότερα, η μέγιστη τιμή γενετικής ομοιότητας για τον συντελεστή Jaccard ήταν 0.91 (Πίνακας 9) και αφορούσε τις ποικιλίες LL 35 και ILL-590. Οι συγκεκριμένες ποικιλίες έχουν ένα κοινό γνώρισμα που είναι η ανθεκτικότητά τους στη προσβολή από την ασθένεια *Fusarium oxysporum f.sp.lentis*. Η ελάχιστη τιμή γενετικής ομοιότητας παρουσιάστηκε ανάμεσα στις ποικιλίες FLIP 2003-24 L και FLIP 2002-1L και είχε την τιμή 0,80. Οι ποικιλίες αυτές προέρχονται από το ICARDA και αποτελούν επιλογές από την ίδια διασταύρωση.

Όσον αφορά, τη μέγιστη τιμή γενετικής ομοιότητας για τον συντελεστή Dice ήταν 0,95 και ήταν κοινή για δύο ζεύγη ποικιλιών. Το πρώτο ζευγάρι είναι οι ποικιλίες Morocco με καταγωγή από το Μαρόκο και M-15305 με καταγωγή από την Ελλάδα. Το δεύτερο ζευγάρι είναι οι ποικιλίες LL 35 και ILL-590 που όπως προαναφέρθηκε έχουν ένα κοινό γνώρισμα που είναι η ανθεκτικότητά τους στη προσβολή από την ασθένεια *Fusarium oxysporum f.sp.lentis*. Η ελάχιστη τιμή γενετικής ομοιότητας ήταν 0.79 και παρουσιάστηκε στο ζεύγος των ποικιλιών FLIP 2003-24 L και FLIP 2002-1L.

Πίνακας 9: Η ελάχιστη και η μέγιστη τιμή γενετικής ομοιότητας του κάθε συντελεστή.

ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ	ΕΛΑΧΙΣΤΗ ΤΙΜΗ	ΜΕΓΙΣΤΗ ΤΙΜΗ
Jaccard	0,80 (FLIP 2003-24 L και FLIP 2002-1L)	0.91 (LL35-INDIA και ILL-590)
Dice	0.79 (FLIP 2003-24 L και FLIP 2002-1L.)	0,95 (Morocco και M-15305) και (LL 35-INDIA αι ILL-590)

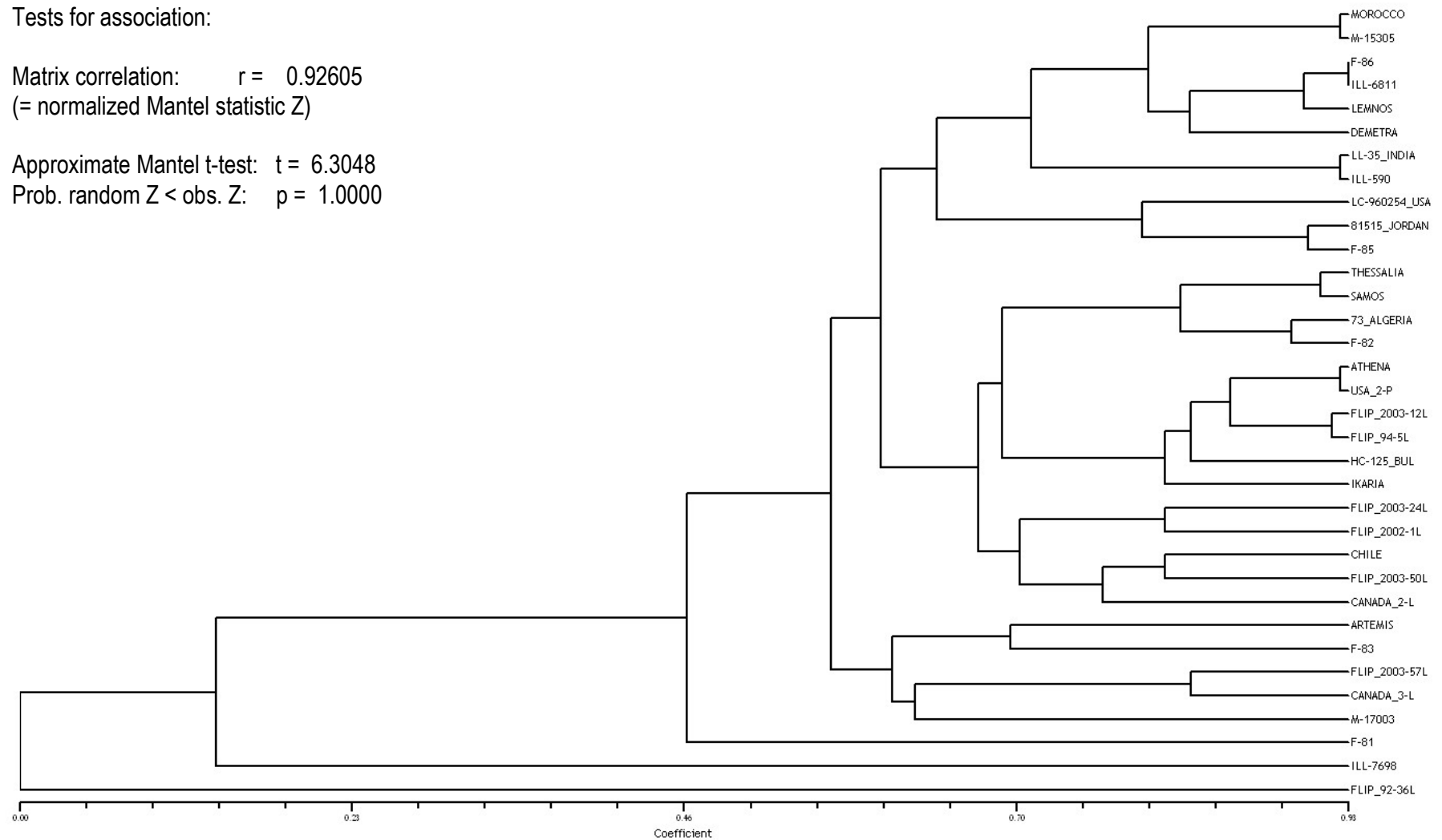
1.5 Ομαδοποίηση των αποτελεσμάτων

Τα δείγματα των 34 ποικιλιών φακής ομαδοποιήθηκαν με τη μέθοδο UPGMA και προέκυψαν δενδρογράμματα. Κατασκευάστηκε ένα δενδρόγραμμα για κάθε συντελεστή ομοιότητας που χρησιμοποιήθηκε (Jaccard, Dice.) Παρακάτω δίδονται τα δενδρογράμματα που κατασκευάστηκαν.

Tests for association:

Matrix correlation: $r = 0.92605$
(= normalized Mantel statistic Z)

Approximate Mantel t-test: $t = 6.3048$
Prob. random Z < obs. Z: $p = 1.0000$

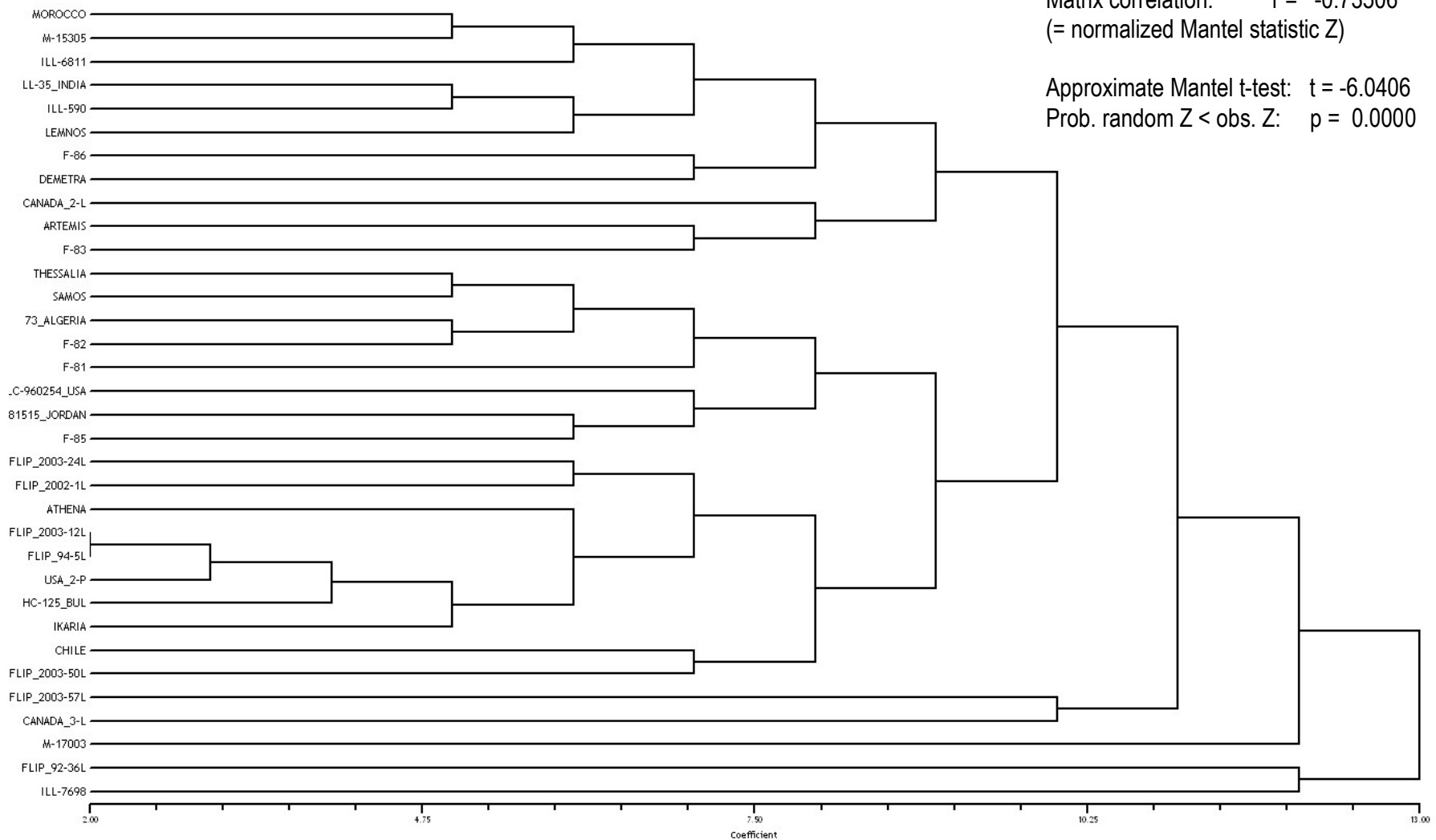


Jaccard UPGMA ΣΧΗΜΑ 1: Δενδρόγραμμα των 34 ποικιλιών φακής με βάση τη διάκριση που προέκυψε από την εφαρμογή SSR δεικτών (δείκτης ομοιομορφίας Jaccard)

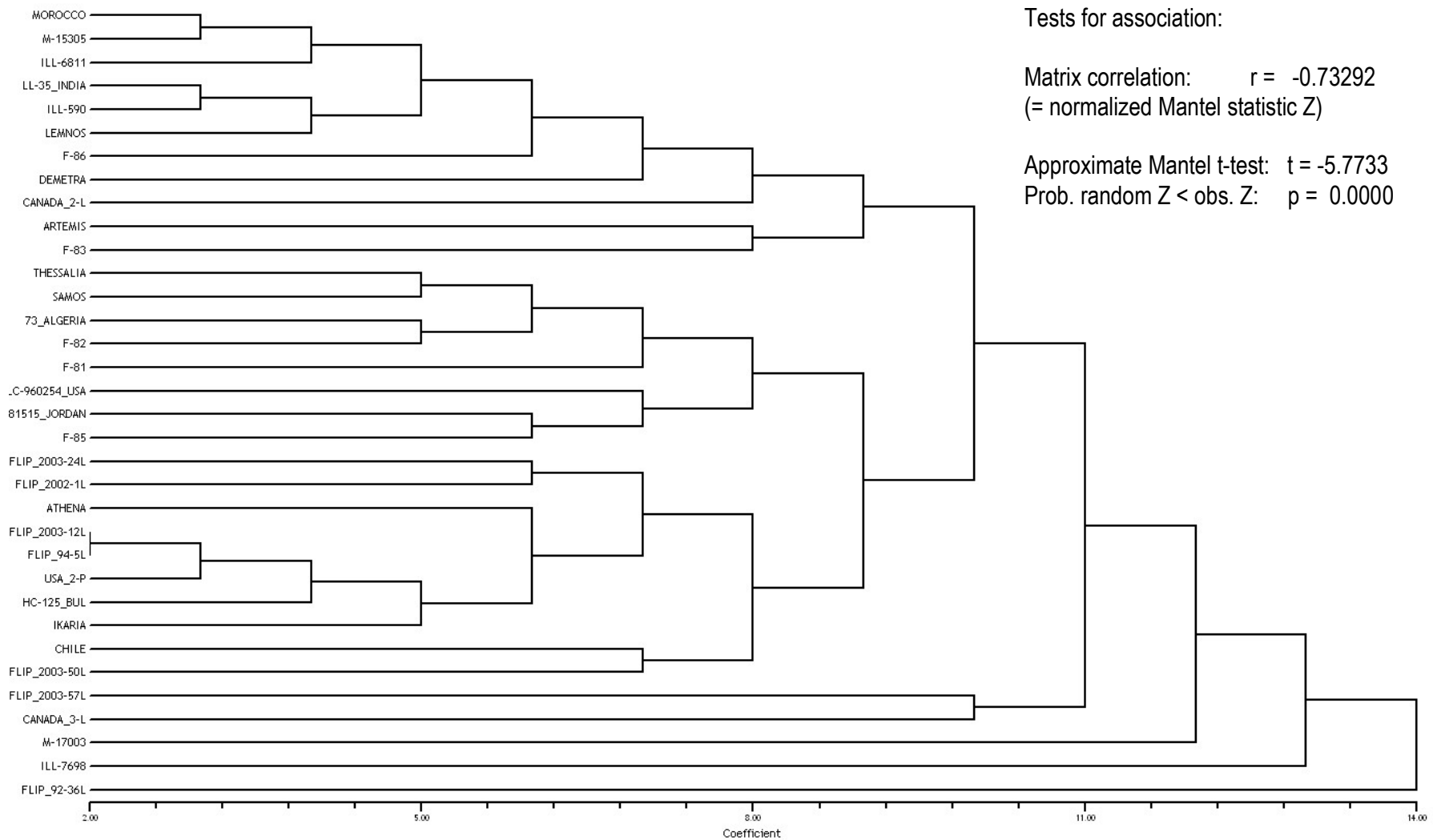
Tests for association:

Matrix correlation: $r = -0.73506$
(= normalized Mantel statistic Z)

Approximate Mantel t-test: $t = -6.0406$
Prob. random Z < obs. Z: $p = 0.0000$



Jaccard Neighbor joining ΣΧΗΜΑ 2: Δενδρόγραμμα των 34 ποικιλιών φακής με βάση τη διάκριση που προέκυψε από την εφαρμογή SSR δεικτών (δείκτης ομοιομορφίας Jaccard)

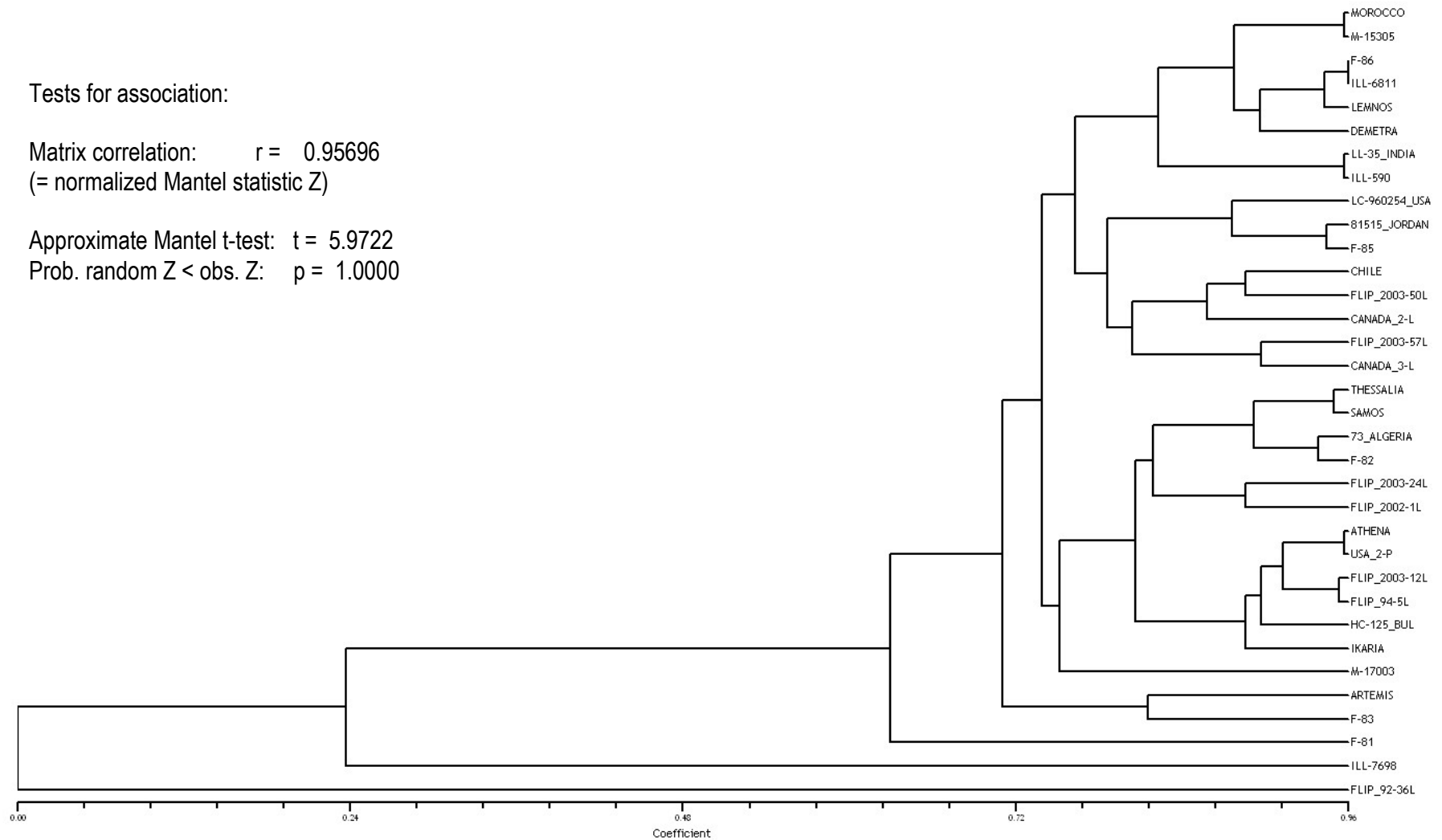


Dice Neighbor joining ΣΧΗΜΑ 3: Δενδρόγραμμα των 34 ποικιλιών φακής με βάση τη διάκριση που προέκυψε από την εφαρμογή SSR δεικτών(δείκτης ομοιομορφίας Dice)

Tests for association:

Matrix correlation: $r = 0.95696$
(= normalized Mantel statistic Z)

Approximate Mantel t-test: $t = 5.9722$
Prob. random Z < obs. Z: $p = 1.0000$



DiceUPGMA ΣΧΗΜΑ 4: Δενδρόγραμμα των 34 ποικιλιών φακίς με βάση τη διάκριση που προέκυψε από την εφαρμογή SSR δεικτών (δείκτης ομοιομορφίας Dice)

Παρατηρώντας τις ομαδοποιήσεις που προέκυψαν με βάση το διάγραμμα Jaccard UPGMA, που επιλέχθηκε να σχολιασθεί διότι παρουσιάζονται πιο ξεκάθαρα οι φυλογενετικές σχέσεις, (ΣΧΗΜΑ 1), έγινε εκτίμηση της διαφοροποίησης και των σχέσεων μεταξύ των ποικιλιών όπου έδειξε τρεις μεγάλες ομάδες και εντός αυτών άλλες μικρότερες υποομάδες με ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά.

Τα αποτελέσματα των μοριακών αναλύσεων με δείκτες, (SSR) έδειξαν ότι δεν υπάρχει γενετική ταύτιση των αξιολογούμενων ποικιλιών. Η διευκρίνιση αυτή ήταν απαραίτητη για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων του πειράματος καθώς έπρεπε να αποκλειστεί η περίπτωση γενετικής ταυτότητας ιδιαίτερα για το ξένο γενετικό υλικό του οποίου η γενεαλογία δεν ήταν εξολοκλήρου γνωστή.

Η πρώτη μεγάλη ομάδα μπορεί να διαιρεθεί σε δύο υποομάδες. Η πρώτη υποομάδα περιλαμβάνει τις ποικιλίες Morocco, M-15305, F-86, ILL-6811, Λήμνος και Δήμητρα καθώς και τις LL-35 και ILL-590. Η δεύτερη υποομάδα περιλαμβάνει τις ποικιλίες LC-960254, 81S15 και την F-85.

Όσον αφορά την πρώτη υποομάδα, η ποικιλία Morocco ομαδοποιείται μαζί με την M-15305. Η πρώτη προέρχεται από την ευρύτερη συλλογή του ICARDA και συγκεκριμένα από το Μαρόκο, ενώ η δεύτερη έχει σαν γονέα την FLIP 84-11L, προέρχεται κι αυτή από το ICARDA και είναι πολύ πιθανόν να υπάρχει κοινό γενετικό υπόβαθρο που ομαδοποιεί τις δυο ποικιλίες κοντά. Μορφολογικά παρουσιάζουν ομοιότητα ως προς το σχήμα του σπόρου καθώς είναι και οι δύο είναι λεπτόσπερμες.

Οι ποικιλίες Δήμητρα και Λήμνος ομαδοποιούνται κοντά με βάση την μοριακή ανάλυση γεγονός που θα μπορούσε να ερμηνευτεί από την κοινή καταγωγή από την Κρήτη (**Πίνακας 3**).

Αξιοσημείωτη παρατήρηση, είναι πως οι ποικιλίες LL-35 και ILL-590 ομαδοποιούνται μαζί. Οι προαναφερόμενες ποικιλίες παρουσιάζουν αρκετά κοινά μορφολογικά χαρακτηριστικά ανήκουν στην ομάδα από το ICARDA αλλά κυρίως είναι οι μόνες από τις μελετώμενες ποικιλίες που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στην ασθένεια *Fusarium oxysporum f.sp.lentis* σύμφωνα με τα πειράματα αξιολόγησης και περιγραφής των ποικιλιών (**Vlachostergios and Roupakias 2008, Βλαχοστέργιος 2009**).

Η δεύτερη υποομάδα περιλαμβάνει τις ποικιλίες LC-960254, 81S15 και την F-85. Συγκεκριμένα, ομαδοποιούνται μαζί οι ποικιλίες 81S15 και η F-85, οι οποίες δεν εμφανίζουν στοιχεία καταγωγής που θα μπορούσαν να εξηγήσουν αυτή την γενετική

συγγένεια καθώς η ποικιλία 81S15 έχει καταγωγή από την Ιορδανία ενώ η F-85 είναι ελληνική. Ωστόσο εμφανίζουν κάποια κοινά μορφολογικά χαρακτηριστικά, όπως ότι είναι και οι δυο λεπτόσπερμες.

Στην δεύτερη ομάδα ανήκουν οι ποικιλίες: Θεσσαλία, Σάμος, 73, F-82, Αθηνά, USA-2P, FLIP 2003-12L, FLIP 94-5L, HC-125, Ικαρία, FLIP 2003-24L, FLIP 2002-1L, CHILE, FLIP 2003-50L και η CANADA 2-L.

Η πρώτη μεγάλη υποομάδα περιέχει τις ποικιλίες Θεσσαλία, Σάμος, 73, F-82, Αθηνά, USA-2P, FLIP 2003-12L, FLIP 94-5L, HC-125 και την Ικαρία.. Στην ίδια υποομάδα παρατηρείται μία ομαδοποίηση μεταξύ των ποικιλιών Θεσσαλία και Σάμος όπου παρατηρώντας την γενεαλογία και τον **(Πίνακα 3)**, φαίνεται πως η Θεσσαλία αποτελεί τον ένα γονέα της διασταύρωσης από την οποία προήλθε η Σάμος. Τέλος, στην υποομάδα αυτή ομαδοποιούνται οι ποικιλίες 73, λεπτόσπερμη με καταγωγή από την Αλγερία και η F-82. Η F-82 είναι ελληνική ποικιλία και αυτή λεπτόσπερμη. Η ποικιλία Αθηνά ομαδοποιείται με την ποικιλία USA-2P. Η Αθηνά είναι ελληνική ποικιλία με καταγωγή από τα Χανιά και είναι λεπτόσπερμη, ενώ η USA-2P είναι πλατύσπερμη, καλλιεργείται εμπορικά στις ΗΠΑ αλλά είναι άγνωστη η γενεαλογία της. Ομοίως, ομαδοποιούνται μαζί οι ποικιλίες FLIP 2003-12L και FLIP 94-5L. Οι δύο αυτές ποικιλίες προέρχονται από το ICARDA, είναι λεπτόσπερμες αλλά μόνο από τη ποικιλία FLIP 2003-12L γνωρίζουμε από ποια διασταύρωση προέκυψε. Ακόμη, στην πρώτη αυτή μεγάλη υποομάδα ανήκουν οι ποικιλίες HC-125, που είναι λεπτόσπερμη και προέρχεται από τη Βουλγαρία και η Ικαρία που είναι πλατύσπερμη και ελληνική. Φαίνεται να υπάρχει πιθανή γεωγραφική γειτνίαση που θα μπορούσε να συνεπάγεται και γενετική συγγένεια.

Η δεύτερη μεγάλη υποομάδα περιλαμβάνει τις ποικιλίες, FLIP 2003-24L, FLIP 2002-1L, CHILE (33-032-10403), FLIP 2003-50L και την CANADA 2-L. Αναλυτικότερα, ομαδοποιούνται μαζί οι ποικιλίες FLIP 2003-24L και FLIP 2002-1L που εξηγείται άμεσα καθώς είναι επιλογές από την ίδια διασταύρωση και προέρχονται από το ICARDA. Η ποικιλία FLIP 2003-50L προέρχεται από το ICARDA και είναι λεπτόσπερμη και ομαδοποιείται μαζί με την CHILE (33-032-10403), η οποία προέρχεται από την Χιλή και είναι πλατύσπερμη. Ακόμη, η CANADA 2-L προέρχεται από τον Καναδά είναι λεπτόσπερμη και ανήκει στην ευρύτερη ομαδοποίηση των δύο προαναφερθέντων.

Η τρίτη και τελευταία μεγάλη ομάδα περιλαμβάνει τις ποικιλίες Άρτεμις, F-83, FLIP 2003-57L, CANADA 3-L, M-17003, F-81, ILL-7698 και FLIP 92-36 L. Στην

ομάδα αυτή υπάρχουν δύο υποομάδες ενώ οι υπόλοιπες ποικιλίες δεν ομαδοποιούνται μεταξύ τους.

Η ποικιλία F-83 είναι πλατύσπερμη και ελληνική και η ποικιλία Άρτεμις είναι λεπτόσπερμη και ελληνική και ομαδοποιούνται μαζί.

Οι ποικιλίες FLIP 2003-57L και CANADA 3- L ομαδοποιούνται. Η FLIP 2003-57L είναι λεπτόσπερμη και προέρχεται από το ICARDA και η CANADA 3- L είναι και αυτή λεπτόσπερμη αλλά προέρχεται από τον Καναδά όπου δεν γνωρίζουμε την γενεαλογία της.

Τέλος , όλες οι υπόλοιπες ποικιλίες δηλαδή οι M-17003, F-81, ILL-7698 και FLIP 92-36 L δεν ομαδοποιούνται.

Να σημειωθεί πως η M-17003 έχει καταγωγή από το ICARDA όπως και οι ποικιλίες ILL-7698 ,FLIP 92-36 L, όπου και οι τρεις τους είναι λεπτόσπερμες. Η ποικιλία F-81, είναι λεπτόσπερμη και κατάγεται από τη Νίκαια της Λάρισας.

Γενικότερα, από το δενδρόγραμμα του Σχήματος 1, φαίνεται ότι δύσκολα ομαδοποιούνται οι ποικιλίες με βάση τη γεωγραφική τους προέλευση, παρατήρηση που πιθανόν να υποδηλώνει την ύπαρξη κοινών γονιδίων μεταξύ των ποικιλιών που δημιουργήθηκαν ή καλλιεργούνται σε διαφορετικές περιοχές.

Σε παρόμοια συμπεράσματα κατέληξαν και οι **Abo-elwafa κ.α, (1995)**, οι οποίοι μάλιστα υποστηρίζουν την άποψη ότι οι καλλιεργούμενες ποικιλίες φακής εμφανίζουν στενή γενετική βάση και δύσκολα μπορούν να διαχωριστούν ακόμα και με τη χρήση μοριακών δεικτών.

Οι **Duran κ.α,(2004)**, που χρησιμοποίησαν 5 από τους δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν στην εν λόγω εργασία, πρότειναν πως η χρήση των SSR δεικτών έχει πολλές εφαρμογές στη γενετική χαρτογράφηση της φακής καθώς αν και ο αριθμός των δεικτών ήταν μικρός, εμφανίστηκε υψηλό ποσοστό πολυμορφισμού και μεταθετότητας ανάμεσα στις ποικιλίες αλλά και στα είδη της φακής.

Οι **Parson κ.α,(1997)** όμως διαπίστωσαν πως οι διαφορές στους γενετικούς τόπους όπως εντοπίστηκαν με RAPD και ISSR δείκτες μπορούν να εκτιμήσουν τη γενετική ποικιλότητα. Ομοίως, οι **Kojima κ.α (1998)**, απέδειξαν πως οι RAPD δείκτες στο σιτάρι εμφανίστηκαν πιο αντιπροσωπευτικοί ως προς τις χρωμοσωμικές περιοχές που ήταν εμπλουτισμένες από τις επαναλαμβανόμενες ακολουθίες, ενώ οι ISSR σχετίστηκαν όπως οι RFLPs, στην κωδικοποίηση των ακολουθιών. Οπότε είναι πολύ πιθανό να υποτεθεί πως σε κάποια είδη οι διαφορές θα μπορούσαν να είναι υψηλότερες από ότι σε άλλα είδη , γεγονός που ισχύει και στην περίπτωση της φακής.

Τέλος, οι μοριακοί δείκτες δεν ομαδοποίησαν ξεχωριστά τις πλατύσπερμες και τις λεπτόσπερμες ποικιλίες αποδεικνύοντας ξεκάθαρα πως μεταξύ των δύο τύπων φακής δεν υπάρχει πάντοτε γενετική απόκλιση. Ωστόσο πρέπει να επισημανθεί πως δεν έχει σημασία που διαφέρουν μορφολογικώς διότι στην F2 γενεά παρουσιάζεται μεγάλη παραλλακτικότητα όταν διασταυρώνονται γονείς που ο ένας είναι πλατύσπερμος και ο άλλος λεπτόσπερμος με αποτέλεσμα να γίνεται επιλογή τόσο για λεπτόσπερμες όσο και για πλατύσπερμες ποικιλίες.

Αξίζει να ειπωθεί πως το γεγονός ότι αυτοί οι δείκτες αντέδρασαν ανεξάρτητα μεταξύ τους, αποτελεί ένα επιπλέον κίνητρο ώστε να διαπλατυνθούν οι συνδυαστικές ομάδες των δεικτών, να αυξηθεί ο αριθμός των δεικτών και να διαλευκανθεί περισσότερο η κατασκευή του γενετικού χάρτη της φακής καλύπτοντας όσο το δυνατόν καλύτερα το γένωμά της .

Με λίγα λόγια, η συγκεκριμένη έρευνα χρησιμοποιώντας ένα περιορισμένο αριθμό εκκινητών εμφάνισε διακριτές ομαδοποιήσεις μεταξύ των ποικιλιών. Ίσως αποτελεί το κίνητρο για μία πιο εκτενή μελέτη και ανάλυση με τη χρήση μεγαλύτερου αριθμού εκκινητών τύπου SSRs και αυξημένου αριθμού δειγμάτων των ίδιων ποικιλιών της φακής. Ακόμη, η μελέτη του συγκυρίαρχου δείκτη SSR 59-2A έδωσε το έναυσμα για μία περαιτέρω έρευνα του κυρίαρχου δείκτη που συνδέεται με την ανθεκτικότητα στη φουζαρίωση καθώς και για τον εντοπισμό περισσότερων μοριακών δεικτών που συνδέονται στενά με την ανθεκτικότητα. Επιπλέον, στην παρούσα έρευνα η αξιοπιστία της μεθόδου κρίνεται επαρκής καθόσον όλες οι ομαδοποιήσεις των ποικιλιών που παρουσιάστηκαν σχολιάστηκαν με βάση καθαρά τη γενεαλογία τους και πιθανόν οι επιπλέον γνώσεις μας σχετικά με τα θέματα της γενεαλογίας θα ήταν σε θέση να εξάγουν περισσότερα ασφαλή συμπεράσματα.

2. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Η χρήση μικρού αριθμού μοριακών δεικτών τύπου SSR είναι ικανή για τον εντοπισμό της γενετικής ποικιλότητας των εξεταζόμενων ποικιλιών φακής, εξαιτίας του υψηλού πολυμορφισμού που εμφάνισαν τα εξεταζόμενα δείγματα.
- Στη παρούσα εργασία παρατηρήθηκε αξιόλογος πολυμορφισμός μεταξύ των ποικιλιών
- Οι δείκτες SSR με τον μεγαλύτερο πολυμορφισμό ήταν οι MS 1 και MS 3
- Ο εξεταζόμενος συγκυρίαρχος δείκτης SSR 59-2A παρουσίασε μία μοναδική ζώνη σε όλες τις εξεταζόμενες ποικιλίες
- Οι ποικιλίες LL-35 και ILL-590 ομαδοποιήθηκαν μαζί επαληθεύοντας προηγούμενες έρευνες καθώς εμφανίζουν ανθεκτικότητα στην ασθένεια *Fusarium oxysporum f.sp.lentis* σύμφωνα με τα πειράματα αξιολόγησης και περιγραφής των ποικιλιών. Ωστόσο, η ανθεκτικότητα στη συγκεκριμένη ασθένεια αποτελεί ένα μόνο χαρακτηριστικό άρα συμπεραίνεται πως η κοινή ομαδοποίηση τους σημαίνει ύπαρξη πολλών κοινών χαρακτηριστικών
- Η ομαδοποίηση των ποικιλιών φακής έγινε ανεξάρτητα από την κατηγοροποίηση τους βάση του μεγέθους των απόρων τους. Για παράδειγμα αν και η ποικιλία F-83 είναι πλατύσπερμη ενώ η ποικιλία Άρτεμις είναι λεπτόσπερμη, ομαδοποιήθηκαν μαζί.
- Οι ελληνικές ποικιλίες με κοινή γενεαλογία ομαδοποιήθηκαν (με κάποιες εξαιρέσεις) σε ομάδες κοινής προέλευσης και γενετικής συγγένειας
- Οι ποικιλίες δεν ομαδοποιήθηκαν με βάση τη γεωγραφική τους προέλευση, παρατήρηση που πιθανόν να υποδηλώνει την ύπαρξη κοινών γονιδίων μεταξύ των ποικιλιών που δημιουργήθηκαν ή καλλιεργούνται σε διαφορετικές περιοχές της Μεσογείου.

ΕΝΟΤΗΤΑ Δ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ:

Ηλιάδης, Κ.(1992β).Φακή. Υπουργείο Γεωργίας, Έκδοση Διεύθυνσης Γεωργικών Εφαρμογών, Αθήνα. Έντυπο,σελ.61

Θανασουλόπουλος Κ.,(1995).Μυκητολογικές ασθένειες φυτών μεγάλης καλλιέργειας,σελ.220

Παπακώστα-Τασοπούλου Δ., (2005).Ειδική γεωργία 1, τεύχος Β",σελ:161-178

ΔΙΕΘΝΗΣ:

Abo-elwafa A, Murai K, Shimada T (1995) Intra- and interspecific variations in *Lens* revealed by RAPD markers. TAG 90:335–340

Ahmad, M., A. G. Fautrier, and D. L. McNeil, (1996) Identification and genetic characterization of different resistance sources to *Ascochyta* blight within the genus *Lens*. Euphytica 97, 311—315.

Ahmed, S., and R. A. A. Morrall, (1996) Field reactions of lentil lines and cultivars to isolates of *Ascochyta fabae* f. sp. *lentis*. Can. J. Plant Pathol. 18, 362-369.

Ahmed, S., R. A. A. Morrall, and J. W. Sheard, (1996) Distribution of mating types of *Ascochyta fabae* f. sp. *lentis*. Can. J. Plant Pathol. 18, 347-353.

Ahmed, S., R. A. A. Morrall, and J. W. Sheard, (1996) Virulence of *Ascochyta fabae* f. sp. *lentis* on lentils. Can. J. Plant Pathol. 18, 354-361.

Barulina HI (1930) Lentils of the U.S.S.R. and other countries. Bull Appl Bot Plant Breed (Leningrad) 40(Suppl):1–319

Bayaa, B., and W. Erskine,(1994)Response of wild lentil to *Ascochyta fabae* f. sp. *lentis* from Syria. Genet. Crop Evol. 41, 61-65.

Bayaa B, Erskine W, Abbas A (1994). Evaluating different methods for screening lentil germplasm for resistance to lentil wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*. Arab. J. Plant Protection 12: 83-91.

Bayaa B, Erskine W, Hamdi A (1995). Evaluation of a wild lentil collection for resistance to vascular wilt. Genet. Resour. Crop Evol. 42: 231-235.

Bayaa B, Erskine W, Singh M (1997). Screening lentil for resistance to *Fusarium* wilt: Methodology and source of resistance. Euphytica 98:69-74.

Cohen, D., G. Ladizinsky, M. Ziv, and F. J. Muehlbauer,(1984)Rescue of interspecific *Lenshybrids* by means of embryo culture. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 3, 343-347.

Duran, Y., R. Fratini, P. Garcia & M. Perez de la Vega, (2004). An intersubspecific genetic map of *Lens*. Theor Appl Genet 108: 1265–1273.

Duran, Y., R. Fratini, S. Morales, M. Fernandez, P. Garcia & M. Perez de laVega, (2002).A genetic map of lentil. First International Conference on Legume Genomics and Genetics: Translation to Crop Improvement, June 2–6, 2002, Minneapolis-St. Paul,MN.

Erskine, W., B. Bayaa, and M. C. Saxena, (1996) Registration of ILL 5588 lentil germplasm resistant to vascular wilt and ascochyta blight. Crop Sci. 36, 1080.

Erskine, W., F.J. Muehlbauer & R.S. Short, (1990) Stages of development in lentil. Expl Agric 26 (3): 297–302.

Erskine, W., R.H. Ellis, R.J. Summerfield, E.H. Roberts & A. Hussain, (1990). Characterisation of responses to temperature and photoperiod for time to flowering in a world lentil collection. Theor Appl Genet 80: 193–199.

Erskine, W., N.P. Saxena & M.C. Saxena, (1993). Iron Deficiency in lentil: Yield loss and geographic distribution in a germplasm collection. *Plant Soil* 15: 249–254.

Erskine, W., M. Tufail, A. Russell, M. C. Tyagi, M. M. Rahman and M. C. Saxena, (1994). Current and future strategies in breeding lentil for resistance to biotic and abiotic stresses, *Euphytica* 73 : 127-135, 1994 .

Erskine, W., (1997). Lessons for breeders from land races of lentil. *Euphytica* 93: 107-112

Eujayl, I., M. Baum, W. Erskine, E. Pehu & F.J. Muehlbauer, (1997). The use of RAPD markers for lentil genetic mapping and the evaluation of distorted F₂ segregation. *Euphytica* 96: 405–412.

Eujayl, I., M. Baum, W. Powell, W. Erskine & E. Pehu, (1998a). A genetic linkage map of lentil (*Lens* sp.) based on RAPD and AFLP markers using recombinant inbred lines. *Theor Appl Genet* 97:83–89.

Eujayl, I., W. Erskine, B. Bayaa, M. Baum, E. Pehu, (1998b). Fusarium vascular wilt in lentil: Inheritance and identification of DNA markers for resistance. *Plant Breed* 117: 497–499.

Eujayl, I., W. Erskine, B. Bayaa & M. Baum, (1998). The inheritance and DNA-marker linkage analysis of fusarium vascular wilt and frost injury in lentil. Third European Conference on Grain Legume, Valladolid, Spain.

Ferguson M., L.D. Robertson, B. Ford-Liodyd and H.J. Newsbury (1998). Contrasting genetic variation amongst lentil landraces from different geographical origins. *Euphytica*. Volume 102, Number 2, 1998, pp. 265-273(9).

Fernandez M., JC Sillero, A. Perez & D Rubiales (2008). Identification of sources of resistance to crenate broomrape (*Orobanche crenata*) in Spanish lentil (*Lens culinaris*) germplasm. *New Phytologist*, Volume 160 Issue 3, Pages 459-461.

Fikiru E., Tesfaye K., Bekele E. (2007). Genetic diversity and population structure of Ethiopian lentil (*Lens culinaris* Medicus) landraces as revealed by ISSR marker. *African Journal of Biotechnology* 6:1460-1468

Fiocchetti F., Laddomada B., Roseli M., Crino P., Lucretti S. (2009). Fingerprinting of three typical macrosperma Italian lentil (*Lens culinaris* Medik.) landraces using fluorescence – based AFLP markers. *Scientia Horticulturae* 121: 383-387

Frattini R., Ruiz Ma. L., Perez De La Vega M. (2004). Intra-specific and inter-sub-specific crossing in lentil (*Lens culinaris* Medik.) *Canadian Journal of Plant Science* 84 : 981-986

Furman B.J. 2006. Methodology to establish a composite collection: case study in lentil. *Plant Genetic Resources* 4 : 2-12

Ford, R., E. C. K. Pang, and P. Taylor, (1999) Genetics of resistance to *Ascochyta* blight of lentil and the identification of closely linked RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 98, 93-98.

Gossen, B.D. & R.A.A. Morrall, (1983) Effects of *Ascochyta* blight on seed yield and quality of lentils. *Can J Plant Pathol* 5: 168–173.

Gossen, B.D. & R.A.A. Morrall, (1984) Seed quality loss at harvest due to *Ascochyta* blight of lentil. *Can J Plant Pathol* 6: 233–237.

Gossen, B. D., J. W. Sheppard, C. J. Beauchamp, and R. A. A. Morrall, (1986) *Ascochyta lentis* renamed *Ascochyta fabae* f. sp. *lentis*. *Can. J. Plant Pathol.* 8, 154-160.

Hamwieh, A., W. Choumane, S.M. Udapa, F. Dreyer, C. Jung & M. Baum, (2004). Development of microsatellite markers for the genus *Lens*. *Final Abstracts Guide, Plant and Animal Genome XII Conference*, p. 135.

Hamwieh, A., S.M. Udapa, W. Choumane, A. Sarker, F. Dreyer, C.Jung & M. Baum, (2005). A genetic linkage map of lentil based on microsatellite and AFLP markers and localization of *Fusarium* vascular wilt resistance. *Theor Appl Genet* 110: 669–677.

Havey, M.J. & F.J. Muehlbauer, (1989). Linkages between restriction fragment length, isozyme, and morphological markers in lentil. *Theor Appl Genet* 77: 395–401.

Iqbal, S.M., A. Bakhsh & R.A. Malik, (1990) Identification of resistant sources to ascochyta blight in lentil. *LENS Newsl* 17: 26–27.

Kaiser, W. J., and R. M. Hannan, (1986). Incidence of seed-borne *Ascochyta lentis* in lentil germplasm. *Phytopathology* 76, 605-610.

R.K. Kamboj, M.P. Pandey & H.S. Chaubel, Inheritance of resistance to *Fusarium* wilt in Indian lentil germplasm (*Lens culinaris* Medik.) *Euphytica* 50: 113-117, (1990) .

Kumar Ajay and D.P. Singh, Hybridization Technique in Lentil under Field Conditions, *LENS Newsletter* 25 (1& 2) (1998).

Ladizinsky, G., (1979) The origin of lentil and its wild genepool. *Euphytica* 28, 179-187.

Ladizinsky G, Braun D, Goshen D, Muehlbauer FJ (1984) The biological species of the genus *Lens* L. *BotGaz* 145:253–261

Ladizinsky, G., (1993) Wild lentils. *Crit. Rev. Plant Sci.* 12, 169-184.

Lakhdar Belabid, Michael Baum, Zohra Fortas, Zouaoui Bouznad, and Imad Eujayl (2004) Pathogenic and genetic characterization of Algerian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* by RAPD and AFLP analysis, *African Journal of Biotechnology* Vol. 3 (1), pp. 25-31

Maher Laura, Roger Armsrong, David Connor (2003). Salt tolerant lentils-a possibility for the future, regional.org.au

Mikhov, M(2006). Efficiency of lentil (*Lens culinaris* Medik.) breeding methods. Plant genetics and breeding. P.237-243

Muehlbauer FJ, ChenW (2007) Resistance to ascochyta blights of cool season food legumes. Eur J Plant Pathol 119:135–141

Muehlbauer FJ, McPhee KE (2005). Lentil (*Lens culinaris* Medik.). In: Singh RJ, Jauhar PP (eds) Genetic resources and chromosome engineering and crop improvement. Grain legumes, vol I. CRC Press, Taylor and Francis, Boca Raton, pp 219–230

Muehlbauer FJ, Cho S, Sarker A, Ford R (2006) Application of modern technologies in lentil breeding for biotic and abiotic stress resistance. Euphytica 147:149–165

Nasir, M., and T. W. Bretag, (1997) Prevalence of *Ascochyta fabae* f. sp. *lentis* on lentil seed from Victoria, Australia. Aust. J. Plant Pathol. 26, 117-120.

Nelson AJ, Elias KS, Arévalo GE, Darlington LC, Bailey BA (1997). Genetic characterization by RAPD analysis of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *erythroxyli* associated with an emerging epidemic in Peru. Phytopathology 87: 1220-1225.

Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO (1983). *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park. 193 pp.

Nene, Y. L., S. B. Hanounik, S. H. Qureshi, and B. Sen, (1988) Fungal and bacterial foliar disease of peas, lentils, faba bean and chickpea. In: R. J. Summerfield (ed.), World Crops: Cool Season Food Legumes, 577-589. Kluwer Academic Publ., Dordrecht.

Pomazi A, Wittner A, Pesti M, Hornok L (1994). A PCR-generated simple RFLP-probe differentiates three distinct groups within *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*. Acta Phytopathol. Entomol. Hung. 29: 203-213.

Rai, R., S.K.T. Nasar, S.J. Singh & V. Prasad, (1985). Interactions between *Rhizobium* strains and lentil (*Lens culinaris* Linn.) genotypes under salt stress. J Agric Sci 104: 199–205.

Rai, R. & R.P. Singh, (1999). Effect of salt stress on interaction between lentil (*Lens culinaris*) genotypes and *Rhizobium* spp. Strains: Symbiotic N₂ fixation in normal and sodic soils. Biol Fert Soils 29: 187–195.

Rubeena, R. Ford & P.W.J. Taylor, (2003). Construction of an intraspecific linkage map of lentil (*Lens culinaris* ssp. *culinaris*). Theor Appl Genet 107: 910–916.

Saxena, M.C., (1981). Agronomy of lentils. In Webb C. and Hawtin G. (eds.) Lentils, CAB International, U.K., pp. 111-129.

Saxena, M.C., Hawtin G.C. (1981). Morphology and growth pattern. In Webb C. and Hawtin G. (eds.) Lentils, CAB International, U.K., pp. 39-52.

Saxena, M.C., (1993). The challenge of developing biotic and abiotic stress resistance in cool-season food legumes. In: K.B. Singh & M.C. Saxena (Eds.), Breeding for Stress Tolerance in Cool-Season Food Legumes, pp. 3–14. Wiley, Chichester, United Kingdom.

Sharma, R.N., (1981). Inheritance of resistance to wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*) in chickpea (*Cicer arietinum* L.) Ph.D. Thesis, G.B.P.U.A. and T., Pantnagar, India.

Sharma K., Dawson I.K. and Waugh R. (1995). Relationships among cultivated and wild lentils revealed by RAPD analysis. Theor. Appl. Genet. 91: 647-654.

Singh, Y and J.E.Winch.(1974).Morphological development of two alfalfa cultivars under various harvesting schedules. Canadian Journal of Planrt Science 54:79-87.

Sharma S.K., Knox M.R. and Ellis T.H.N. (1996). AFLP analysis of the diversity and phylogeny of Lens and its comparison with RAPD analysis. Theor. Appl. Genet. 93: 751-758.

Slinkard, A.E.(1978).Fallow vs. stubble culture of lentils. Lens 5:27

Sonnante G. and Pignone D. (2001). Assessment of genetic variation in a collection of lentil using molecular tools. Euphytica 120: 301-307.

Sonnante G., Galasso I. and Pignone D. (2003). ITS sequence analysis and phylogenetic inference in the genus Lens Mill. Ann. Bot. 91: 49-54.

Sultana T.,Ghafoor A.,Ashraf M.(2005). Genetic divergence in lentil germplasm for botanical descrotirs in relation with geograohic origin. Pak.J.Bot. 37: 61-69

Sultana T., Ghafoor A.,(2008).Genetic Diversity in ex-situ Conserved Lens culinaris for Botanical Descriptors, Biochemical and Molecular Markers and Identification of Landraces from Indigenous Genetic Resources of Pakistan. Journal of Integrative Plant Biology 50: 484-490

Tahir, M. & F.J. Muehlbauer, (1994). Gene mapping in lentil with recombinant inbred lines. J Hered 85: 306–310.

Tahir, M, C.J. Simon & F.J. Muehlbauer, (1993). Gene map of lentil: A review. LENS Newslett 20: 3–10.

Tay, J., (1989) Inheritance of resistance to ascochyta blight of lentil. MSc Thesis, Department of Crop Science and Plant Ecology, University of Saskatchewan, Canada.

Tay, J. & E.A. Slinkard, (1989) Transgressive segregation of ascochyta resistance in lentil. *Can J Plant Sci* 69 (2): 547

Tullu, A., L. Buchwaldt, T. Warkentin, B. Taran & A. Vandenberg, (2003). Genetics of resistance to anthracnose and identification of AFLP and RAPD markers linked to the resistance gene in PI 320937 germplasm of lentil (*Lens culinaris* Medikus). *Theor Appl Genet* 106: 428–434.

Vandenberg, A., F.A. Kiehn, C. Vera, R. Gaudiel, L. Buchwaldt, K.J. Kirkland, R.A.A. Morrall, J. Wahab & A.E. Slinkard, (2001). CDC Milestone lentil. *Can J Plant Sci* 81: 113–114.

Vandenberg, A., F.A. Kiehn, C. Vera, R. Gaudiel, L. Buchwaldt, S. Dueck, J. Wahab & A. E Slinkard, (2002). CDC Robin lentil. *Can J Plant Sci* 82: 111–112.

Vlachostergios, D. N., Mavromatis, A. G., Korkovelos, A. & Roupakias, D.G. (2006). Phylogenetic relationships of lentil (*Lens culinaris* Medik.) varieties. In *Book of Abstracts of the 10th Panhellenic Congress: Plant Breeding and Rural Development* (Eds Hellenic Scientific Society of Genetics and Plant Breeding), p. 129. Orestiada, Greece (in Greek): Hellenic Scientific Society of Genetics and Plant Breeding.

Vlachostergios, D.N. & Roupakias, D.G. (2008). Response to conventional and organic environment of thirty-six lentil (*Lens culinaris* Medik.) varieties. *Euphytica* 163, 449–457

Ye, G., D. L. McNeil and G. D. Hill (2002). Breeding for resistance to lentil *Ascochyta* blight. *Plant Breeding* Volume 121 Issue 3 Page 185-191.

Ye, G., D. L. McNeil, and G. D. Hill, (2000) Two major genes conferred *Ascochyta* blight resistance coming from *Lens orientalis*. *N. Z. Plant Prot.* 53, 109-132.

Ye G, McNeil DL, Hill GD (2001) Inheritance of resistance to *ascochyta* blight in lentil. *N Z Plant Prot* 54:198–201

Yu Z., Li-Qiong L., Huan L., Jie B., Man-Ye Y., Chen M., Ying-Fan C., Xiao-Lin Q. and Fang C. (2002). RAPD markers in diversity detection and variety identification of Tibetan Hulless barley. *Plant Mol. Biol. Rep.* 20: 369-377.

Yusbasioglou E., Ozcan S., L. Acik, (2006). Analysis of genetic relationships among Turkish cultivars and breeding lines of *Lens culinaris* Mestili using RAPD markers. *Gen. Res. Cr. Evol.* 53: 507-514.