

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**Σχολή Γεωπονικών Επιστημών**

**Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος**

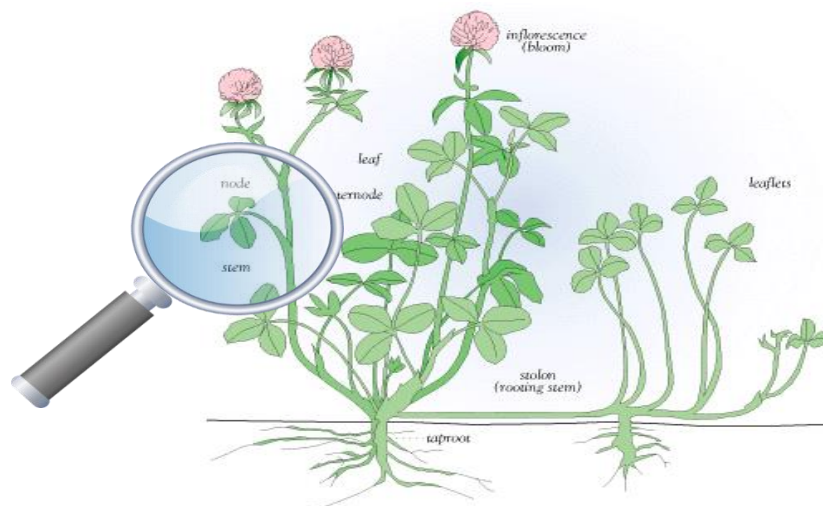
**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**«Αειφόρος Αγροτική Παραγωγή και Διαχείριση Περιβάλλοντος»**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**«Διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών ανθεκτικότητας της φακής στη  
φουζαρίωση»**



**ΙΩΑΝΝΑ ΤΖΑΝΑΚΟΥΛΗ**

**ΒΟΛΟΣ, 2020**

Διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών ανθεκτικότητας της φακής στη φουζαρίωση

Ιωάννα Τζανακούλη

#### **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

- Ουρανία Παυλή, Επικ. Καθηγήτρια, Γενετική Βελτίωση Φυτών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Ιμπραχίμ- Αβραάμ Χα, Καθηγητής, Γενετική Βελτίωση Φυτών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Εμμανουήλ Φλεμετάκης, Αναπλ. Καθηγητής, Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Copyright © *ΙΩΑΝΝΑ ΤΖΑΝΑΚΟΥΛΗ*, 2020.

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας διατριβής, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης.

Η έγκριση της Μεταπτυχιακής Διατριβής Ειδίκευσης από το Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δε δηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου μελέτης αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα. Ουρανία Παυλή, Επικ. Καθηγήτρια του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του ΠΘ, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα, τις ουσιαστικές υποδείξεις, τη συμπαράσταση και την υποστήριξη καθ' όλη την διάρκεια της ερευνητικής διαδικασίας, καθώς και για την προτροπή και τις συμβουλές της για την συνέχιση των σπουδών μου.

Τον κ. Ιμπραχίμ Αβράαμ Χα, Καθηγητή του τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του ΠΘ, για τις εύστοχες υποδείξεις του και τις χρήσιμες συμβουλές για την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Τον κ. Εμμανουήλ Φλεμετάκη, Αναπλ. Καθηγητή του τμήματος Βιοτεχνολογίας του ΓΠΑ, για την άψογη συνεργασία και την συνεισφορά του στη διεξαγωγή του πειράματος.

Την υποψήφια διδάκτορα Χρυσάνθη Φώτη για την απρόσκοπτη καθοδήγηση, τις συμβουλές, τη συμπαράσταση και τη συνολική συμβολή της σε όλα τα στάδια της ερευνητικής μου μελέτης.

Τέλος, οι ιδιαίτερες ευχαριστίες ανήκουν στους γονείς μου και την αδερφή μου Κάτια, για την απεριόριστη στήριξη και εμπιστοσύνη τους προς το πρόσωπό μου, την ηθική συμπαράσταση και την αγάπη καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ασθένεια της φουζαρίωσης, η οποία προκαλείται από τον παθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*, αποτελεί μία από τις πλέον επιζήμιες ασθένειες της φακής (*Lens culinaris*) παγκοσμίως. Με δεδομένη την έλλειψη ερευνητικών δεδομένων σχετικά με τα είδη του γένους *Fusarium* που προσβάλλουν την καλλιέργεια της φακής στον ελλαδικό χώρο, αντικείμενο της μεταπτυχιακής διατριβής αποτέλεσε η ταυτοποίηση του παθογόνου στις κύριες ζώνες καλλιέργειας και η μελέτη των μοριακών μηχανισμών που διέπουν την ανθεκτικότητα στην ασθένεια σε μεταβολικό επίπεδο. Αρχικά πραγματοποιήθηκε συλλογή εδαφικών δειγμάτων από 6 περιοχές, οι οποίες αντιπροσωπεύουν τις κύριες περιοχές καλλιέργειας φακής στην Ελλάδα και τα φυτά παρουσίαζαν τα χαρακτηριστικά για την ασθένεια της φουζαρίωσης συμπτώματα. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την ύπαρξη του παθογόνου και ταυτοποιήθηκαν 21 απομονώσεις μέσω μακροσκοπικής και μικροσκοπικής παρατήρησης. Ακολούθησε μοριακή ανάλυση για την ταυτοποίηση των απομονώσεων βάσει της αλληλουχίας που αντιστοιχεί στο γονίδιο *TEF*. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν υψηλό ποσοστό ομοιότητας (99 %) με ομόλογα γονίδια απομονώσεων του γένους *Fusarium* spp., ενώ 5 απομονώσεις εμφάνισαν υψηλή ομολογία (97-99 %) με αλληλουχίες που αντιστοιχούν στο *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis*. Στο πλαίσιο περαιτέρω μελέτης των εν λόγω απομονώσεων, ακολούθησε η ανάλυση των αλληλουχιών που αντιστοιχούν στα γονίδια *b-tubulin* και *calmodulin*. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν υψηλή νουκλεοτιδική ομοιότητα, της τάξης του 98 %, με ομόλογα γονίδια του *F. oxysporum*. Στο πλαίσιο μελέτης της απόκρισης της φακής στο παθογόνο *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* σε μεταβολικό επίπεδο, επιλέχθηκαν 2 ποικιλίες φακής, με διαφορετική απόκριση στην ασθένεια - ανθεκτική και ευαίσθητη ποικιλία -, οι οποίες μολύνθηκαν τεχνητά με το *Fol* και ακολούθησε ο προσδιορισμός του μεταβολικού προφίλ ρίζας και βλαστού, με χρήση αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας (GC-MS). Η ανάλυση επέτρεψε την ανίχνευση και ταυτοποίηση συνολικά 178 μεταβολιτών, εκ των οποίων οι 84 επιλέχθηκαν, έπειτα από κατάλληλο φιλτράρισμα, και ταξινομήθηκαν στις χημικές ομάδες των υδατανθράκων, αμινοξέων, οργανικών οξέων, πολυολών, αζωτούχων ενώσεων και φωσφορικών ενώσεων. Από το σύνολο των μεταβολιτών, 17 συστατικά παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μεταβολή της συσσώρευσής τους, μεταβολή η οποία αφορούσε στη σύγκριση μεταξύ της ανθεκτικής και ευαίσθητης ποικιλίας ή μεταξύ των *Fol*-φυτών και των μαρτύρων ή στην αλληλεπίδραση ποικιλίας x μεταχείρισης. Ακολούθησε επεξεργασία των μεταβολικών προφίλ των 2 επιλεγμένων ποικιλιών μέσω πολυπαραγοντικών αναλύσεων (OPLS-DA, Correlation circle plot) προκειμένου να ελεγχθούν οι τάσεις στα δεδομένα και να προσδιοριστούν τα μεταβολικά συστατικά που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα έναντι της

φουζαρίωσης. Τα αποτελέσματα της μελέτης αποτελούν την πρώτη προσπάθεια ταυτοποίησης απομονώσεων του *Fusarium* spp. σε ζώνες καλλιέργειας της φακής στην Ελλάδα καθώς και εμπλουτισμού της βιβλιογραφίας με μεταβολίτες που σχετίζονται με το γνώρισμα της ανθεκτικότητας και μπορούν να αξιοποιηθούν ως δείκτες για την έμμεση επιλογή των ανθεκτικών γονοτύπων σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια.

**Λέξεις κλειδιά:** φακή, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*, ανθεκτικότητα, αλληλεπίδραση φυτού-παθογόνου, GC-MS, μεταβολομική ανάλυση

## SUMMARY

Fusarium wilt, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*, is one of the most destructive diseases of lentil (*Lens culinaris*) worldwide. Given the lack of research data related to the *Fusarium* species infecting lentil crop in Greece, this MSc thesis aimed at identifying and characterizing isolates of *Fusarium* sp. from fields that represent the main lentil cultivation zones as well as studying the molecular mechanisms underlying resistance to Fusarium wilt at metabolic level. To this purpose, soil samples were collected from 6 cultivation areas, that are representative of the main cultivation zones in Greece and plants exhibit symptoms characteristic of the disease. Based on macroscopic and microscopic observations, 21 isolates were identified and further analyzed on the basis of nucleotide identity for the sequences corresponding to the *TEF* gene. The findings indicated high nucleotide sequence identity (99 %) with homologues from isolates belonging to *Fusarium* spp., while 5 isolates showed high nucleotide sequence identity (97-99 %) to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*. In order to further characterize the above mentioned isolates, the sequences corresponding to the *b-tubulin* and *calmodulin* genes were also determined. The analysis showed high nucleotide sequence identity (98 %) to *F. oxysporum*. In order to study the metabolic response of lentil plants to infection with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*, 2 lentil varieties, differing in their disease response – resistant and susceptible – were mechanically infected and their root and leaf metabolic profiles were determined by means of Gas-Chromatography combined with Mass-Spectrometry (GC-MS). The analysis yielded 178 quantifiable compounds, of which 84 were selected, following data filtering, for further analysis. Such compounds belong to the groups of carbohydrates, amino acids, organic acids, polyols, nitrogenous and phosphate compounds. In total, 17 metabolites showed statistically significant difference at the variety level (G), the treatment level (T) or their interaction (G x T). Data matrices were subjected to multivariate analyses (Correlation circle plot, OPLS-DA) for the detection of trends and the determination of metabolic compounds which are related to disease resistance. To the best of our knowledge, this study is a first attempt to identify isolates of *Fusarium* spp. in Greek lentil cultivation zones and to provide research data regarding the metabolic compounds which are related to the trait of Fusarium wilt resistance. The data obtained may form the basis to build on the possible exploitation of specific metabolites as markers for an indirect selection of disease resistant genotypes at early growth stages.

**Key words:** lentil, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*, resistance, plant-pathogen interaction, GC-MS, metabolomics

Εγώ, η Ιωάννα Τζανακούλη, είμαι ο συγγραφέας αυτής της Μ.Δ.Ε. Αυτή η Μ.Δ.Ε. αντικατοπτρίζει την έρευνα που έγινε από εμένα και δεν έχει υποβληθεί (εξ ολοκλήρου ή μέρος της) σαν προπτυχιακή διατριβή ή Μ.Δ.Ε. ή ως μέρος Διδακτορικής Διατριβής σε αυτό ή άλλο Προπτυχιακό ή Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών Ιδρυμάτων Τριτοβάθμιας Εκπαίδευσης του εσωτερικού ή εξωτερικού. Όποια συνεργασία καθώς και το μέγεθος αυτής δηλώνονται επακριβώς στο αντίστοιχο πεδίο αυτής της διατριβής. Επίσης έχω διαβάσει όλες τις βιβλιογραφικές αναφορές που παρατίθενται στο τέλος.





Ως επιβλέπων της έρευνας που περιγράφεται σε αυτή τη διατριβή, δηλώνω ότι όλοι οι όροι του Εσωτερικού Κανονισμού του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος έχουν τηρηθεί από την κα Ιωάννα Τζανακούλη.



# Πίνακας περιεχομένων

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	1
<b>1.1 Ιστορική αναδρομή</b> .....	1
<b>1.2 Διατροφική αξία – Χρήσεις</b> .....	3
<b>1.3 Ταξινόμηση</b> .....	5
<b>1.4 Βοτανική περιγραφή</b> .....	6
<b>1.5 Γενετικό υλικό φακής</b> .....	9
<b>1.6 Οικολογικές απαιτήσεις</b> .....	11
<b>1.7 Μυκητολογικές ασθένειες φακής</b> .....	13
<b>1.8 Φουζαρίωση φακής</b> .....	15
1.8.1. Γενικά .....	15
1.8.2. Συμπτωματολογία.....	15
1.8.3. Καταπολέμηση της ασθένειας.....	17
1.8.4. Γενετική παραλλακτικότητα του παθογόνου .....	18
1.8.5. Βελτίωση για ανθεκτικότητα έναντι της φουζαρίωσης .....	19
<b>1.9 Μεταβολομική ανάλυση</b> .....	21
<b>Σκοπός της εργασίας</b> .....	24
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	25
<b>2.1. Συλλογή εδαφικών δειγμάτων</b> .....	25
<b>2.2. Απομόνωση του μύκητα <i>Fusarium spp.</i></b> .....	25
<b>2.3. Μοριακή ταυτοποίηση του μύκητα <i>Fusarium spp.</i></b> .....	27
2.3.1. Εξαγωγή DNA από καλλιέργειες του μύκητα του γένους <i>Fusarium spp.</i> .....	27
2.3.2. Ενίσχυση γονιδιωματικού DNA μέσω PCR .....	28
2.3.3. Ανάκτηση DNA από πηκτή αγαρόζης.....	29
<b>2.4 Τεχνητές μολύνσεις</b> .....	30
2.4.1 Γενετικό υλικό.....	30
2.4.2 Ανάπτυξη φυτών .....	30
2.4.3 Προετοιμασία μολύσματος .....	30
2.4.4 Διαδικασία μόλυνσης.....	31
2.4.5 Συλλογή φυτικού ιστού.....	31
<b>2.5 Απομόνωση μεταβολιτών</b> .....	32
<b>2.6 Στατιστική ανάλυση</b> .....	32
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	34
<b>3.1. Απομόνωση του μύκητα <i>Fusarium spp.</i></b> .....	34
<b>3.2. Μοριακή ταυτοποίηση του μύκητα <i>Fusarium spp.</i></b> .....	35

<b>3.3. Μεταβολομική ανάλυση</b> .....	40
3.3.1 Επίδραση της μόλυνσης ( <i>Fol</i> ) στο μεταβολικό προφίλ των γονοτύπων φακής .....	41
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	51
<b>5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	59

## Κατάλογος Πινάκων

<b>Πίνακας 2.1:</b> Περιοχές συλλογής εδαφικών δειγμάτων με σκοπό την ταυτοποίηση των απομονώσεων του μύκητα του γένους <i>Fusarium</i> .	25
<b>Πίνακας 2.2:</b> Η σύσταση του εκλεκτικού θρεπτικού υποστρώματος.	26
<b>Πίνακας 2.3:</b> Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των επιλεγμένων DNA αλληλουχιών του μύκητα <i>Fusarium</i> spp.	28
<b>Πίνακας 2.4:</b> Το πρόγραμμα της PCR που ακολουθήθηκε για την ενίσχυση των επιλεγμένων DNA αλληλουχιών.	29
<b>Πίνακας 3.1:</b> Οι 21 απομονώσεις του μύκητα <i>Fusarium</i> spp.	35
<b>Πίνακας 3.2:</b> Ποσοστό ομολογίας των αλληλουχιών, οι οποίες αντιστοιχούν στο γονίδιο <i>TEF</i> , με ομόλογες κατατεθειμένες αλληλουχίες που βρίσκονται σε διεθνείς βάσεις δεδομένων.	36
<b>Πίνακας 3.3:</b> Το ποσοστό ομολογίας των αλληλουχιών, οι οποίες αντιστοιχούν στο γονίδιο <i>b-tubulin</i> , με ομόλογες κατατεθειμένες αλληλουχίες οι οποίες υπάρχουν σε διεθνείς βάσεις δεδομένων.	40
<b>Πίνακας 3.4:</b> Το ποσοστό ομολογίας των αλληλουχιών, οι οποίες αντιστοιχούν στο γονίδιο <i>calmodulin</i> , με ομόλογες κατατεθειμένες αλληλουχίες οι οποίες υπάρχουν σε διεθνείς βάσεις δεδομένων.	40
<b>Πίνακας 3.5:</b> Μεταβολίτες που παρουσίασαν σημαντική μεταβολή σε επίπεδο γονοτύπου, μεταχείρισης ή αλληλεπίδρασής τους. Για κάθε μεταβολικό συστατικό, παρουσιάζεται ο χρόνος έκλυσης (RT), η αναλογία μάζας προς φορτίο (m/z) καθώς και η αναλογία (ratio) των Fol- και των φυτών-μαρτύρων για την ανθεκτική και ευαίσθητη ποικιλία, η οποία υπολογίστηκε με βάση τη διάμεσο των 4 επαναλήψεων των Fol-φυτών προς τη διάμεσο των 4 επαναλήψεων των φυτών-μαρτύρων. Με έντονη γραφή επισημαίνονται οι μεταβολίτες που σημείωσαν στατιστικά σημαντικές διαφορές (p-value<0,05) σε επίπεδο γονοτύπου (G), μεταχείρισης (T) και αλληλεπίδρασής τους (GxT).	42

## Κατάλογος Εικόνων – Σχημάτων

- Εικόνα 1.1:** Παγκόσμια καλλιεργούμενη έκταση και παραγωγή φακής για τα έτη 1994-2017 (Πηγή Fao, 2019). 2
- Εικόνα 1.2:** Καλλιεργούμενη έκταση και παραγωγή φακής στην Ελλάδα για τα έτη 1994-2017 (Πηγή Fao, 2019). 2
- Εικόνα 1.3:** Βλαστοί φακής όπου διακρίνονται η μορφολογία των φύλλων, των ταξιανθιών, των λοβών καθώς και η συνεχής τους ανάπτυξη (Πηγή: [www.biolib.de](http://www.biolib.de)). 8
- Εικόνα 1.4:** α) Προσβεβλημένος αγρός φυτών φακής από το παθογόνο *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* (Πηγή: <https://www.legumematrix.com/>). β) Φυτό ελέγχου (δεξιά) και προσβεβλημένο φυτό από *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* (αριστερά) (Πηγή: Soomro et al., 2008) γ) Χαρακτηριστικός μεταχρωματισμός του αγγειακού συστήματος της φακής μετά από προσβολή από *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* (Πηγή: <https://www.legumematrix.com/>). 16
- Εικόνα 2.1:** Απομόνωση και μικροσκοπική ταυτοποίηση του μύκητα *Fusarium* spp. 26  
α. Μεταφορά δείγματος χόματος σε εκλεκτικό θρεπτικό μέσο. β. Μεταφορά των υφών του μύκητα σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν PDA. γ. Επίστρωση των υφών του μύκητα σε τριβλία Petri που περιέχουν PDA. δ. Μονόσπορη καλλιέργεια του μύκητα *Fusarium* spp. και ε. Μικροσκοπική παρατήρηση και ταυτοποίηση του μύκητα μέσω των χαρακτηριστικών μονοκύτταρων και πολυκύτταρων κυρτού σχήματος κονιδίων που σχηματίζει.
- Εικόνα 2.2:** Μυκήλια τοποθετημένα σε αποστειρωμένο χαρτί με σκοπό την απομάκρυνση της υγρασίας. 27
- Εικόνα 2.3:** Προετοιμασία μολύσματος. α. Ανάπτυξη υφών του μύκητα και προσθήκη 55mL dH<sub>2</sub>O. β. Διήθηση/ φίλτράρισμα του εναιωρήματος σπορίων. 31
- Εικόνα 3.1:** Μακροσκοπική παρατήρηση των χαρακτηριστικών λευκών – ροζ υφών που σχηματίζει ο μύκητας *Fusarium* spp. 34
- Εικόνα 3.2:** Μικροσκοπική παρατήρηση των χαρακτηριστικών μονοκύτταρων και πολυκύτταρων κυρτού σχήματος κονιδίων του μύκητα. 34
- Εικόνα 3.3:** Προϊόντα ενίσχυσης PCR για το γονίδιο *TEF* σε γονιδιωματικό DNA, το οποίο απομονώθηκε από μονόσπορες καλλιέργειες του μύκητα *Fusarium* spp. 36  
M: 100 bp DNA Ladder, NEB.

- Δενδρόγραμμα 3.1:** Ομαδοποίηση των απομονώσεων του γένους *Fusarium* spp., σύμφωνα με την αλληλουχία που αντιστοιχεί στο γονίδιο *TEF*, με τη βοήθεια του λογισμικού MultiAlin. Το δενδρόγραμμα περιλαμβάνει αλληλουχίες αναφοράς των *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* και *Fusarium* spp. B=1000 ο αριθμός επαναλήψεων bootstrap. 38
- Δενδρόγραμμα 3.2:** Ομαδοποίηση των απομονώσεων του *Fusarium* spp. σύμφωνα με την αλληλουχία η οποία αντιστοιχεί στο γονίδιο *TEF*, με τη βοήθεια του λογισμικού MultiAlin. Το δενδρόγραμμα περιλαμβάνει αλληλουχίες αναφοράς του *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis*. B=1000 ο αριθμός επαναλήψεων bootstrap. 39
- Εικόνα 3.4:** Τα προϊόντα ενίσχυσης για το γονίδιο *b-tubulin* (350 bp) σε γονιδιωματικό DNA, το οποίο απομονώθηκε από μονόσπορες καλλιέργειες του γένους *Fusarium* spp. M: 100 bp DNA Ladder, NEB. 39
- Εικόνα 3.5:** Τα προϊόντα ενίσχυσης για το γονίδιο *calmodulin* (700 bp) σε γονιδιωματικό DNA, το οποίο απομονώθηκε από μονόσπορες καλλιέργειες του *Fusarium* spp. M: 100 bp DNA Ladder, NEB. 39
- Εικόνα 3.6:** Το ποσοστό των ταυτοποιημένων μεταβολιτών ανά χημική ομάδα. 41
- Εικόνα 3.7:** PLS-DA scores plot για το διαχωρισμό των GC/MS μεταβολικών προφίλ ριζών που προέρχονται από Fol-μολυσμένα και φυτά-μάρτυρες της ανθεκτικής και της ευαίσθητης ποικιλίας. ILL-590: Ανθεκτική ποικιλία, ILL-6031: Ευαίσθητη ποικιλία, C: Φυτά μάρτυρες, F: Μολυσμένα φυτά. 46
- Εικόνα 3.8:** PLS-DA scores plot για το διαχωρισμό των GC/MS μεταβολικών προφίλ βλαστών που προέρχονται από Fol-μολυσμένα και φυτά-μάρτυρες της ανθεκτικής και της ευαίσθητης ποικιλίας. ILL-590: Ανθεκτική ποικιλία, ILL-6031: Ευαίσθητη ποικιλία, C: Φυτά μάρτυρες, F: Μολυσμένα φυτά. 47
- Εικόνα 3.9:** Κυκλικό διάγραμμα συσχέτισης (Correlation Circle Plot) για τον εντοπισμό των μεταβολιτών με την πλέον σημαντική συνεισφορά στο GC/MS μεταβολικό προφίλ ριζών που προέρχονται από Fol-μολυσμένα και φυτά-μάρτυρες της ανθεκτικής και της ευαίσθητης ποικιλίας. 48
- Εικόνα 3.10:** Κυκλικό διάγραμμα συσχέτισης (Correlation Circle Plot) για τον εντοπισμό των μεταβολιτών με την πλέον σημαντική συνεισφορά στο GC/MS μεταβολικό προφίλ βλαστών που προέρχονται από Fol-μολυσμένα και φυτά-μάρτυρες της ανθεκτικής και της ευαίσθητης ποικιλίας. 49

## 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

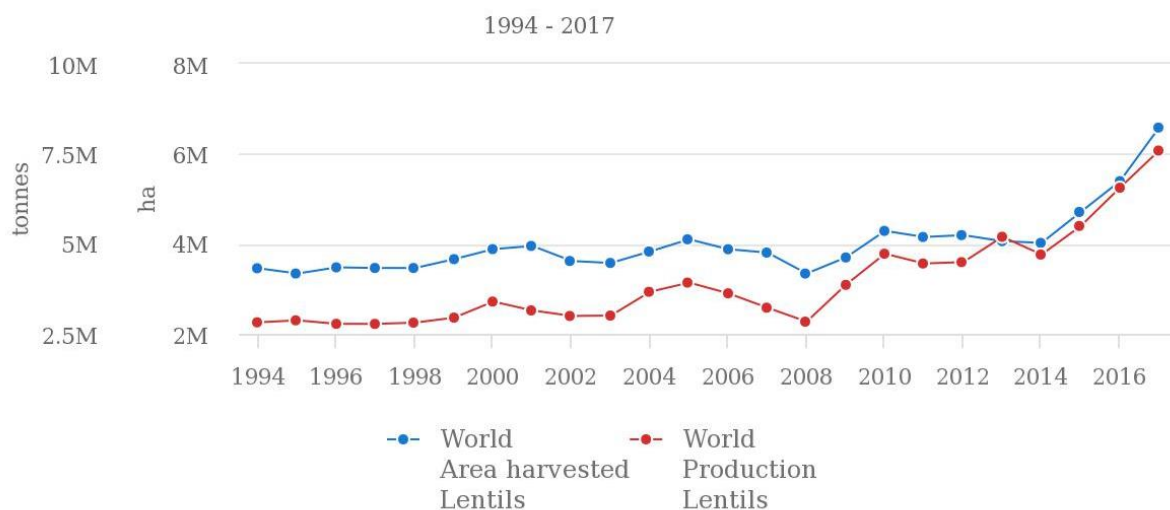
### 1.1 Ιστορική αναδρομή

Η φακή (*Lens culinaris* L. Medik. subsp. *culinaris*) αποτελεί ένα από τα κυριότερα ψυχανθή παγκοσμίως, ενώ η καλλιέργειά της αναφέρεται ως η αρχαιότερη μεταξύ των υπόλοιπων οσπρίων (Cokkizgin and Shtaya, 2013). Το αρχαιότερο εύρημα απολιθωμένης φακής στη χώρα μας χρονολογείται κατά το 11.000 π.Χ. και εντοπίστηκε στο σπήλαιο Φράγχι στην περιοχή της Αργολίδας (Sandhu and Singh, 2007), ενώ η σπουδαιότητα της φακής αναδεικνύεται ήδη από την αρχαιότητα από αναφορές σε έργα του Ηρόδοτου, του Αριστοφάνη και του Διοσκουρίδη (Παπακώστα - Τασοπούλου, 2012). Επιπροσθέτως, αξιοσημείωτη είναι και η αναφορά της φακής στη Βίβλο, όπου ο Ησαΰ έναντι πινακίου φακής παραχώρησε τα πρωτότοκα δικαιώματα στον αδερφό του Ιακώβ (Yadav et al., 2007).

Αναφορικά με τη προέλευσή της, παρόλο που η καλλιεργούμενη φακή κατάγεται από την Εγγύς ανατολή και τη Δυτική Ασία, η καλλιέργειάς της εξαπλώθηκε γρήγορα στην Αίγυπτο, την Κεντρική και Νότια Ευρώπη, τη λεκάνη της Μεσόγειου, την Αιθιοπία, το Αφγανιστάν, την Ινδία, το Πακιστάν, την Κίνα και αργότερα έφτασε ως το Νέο Κόσμο συμπεριλαμβανομένης της Λατινική Αμερικής, το Μεξικό, τη Χιλή και την Αργεντινή (Cokkizgin and Shtaya, 2013). Σήμερα, καλλιεργείται στις περισσότερες υποτροπικές, σε περιοχές του βορειοδυτικού Ειρηνικού αλλά και σε περιοχές του βόρειου ημισφαιρίου (Abraham, 2015).

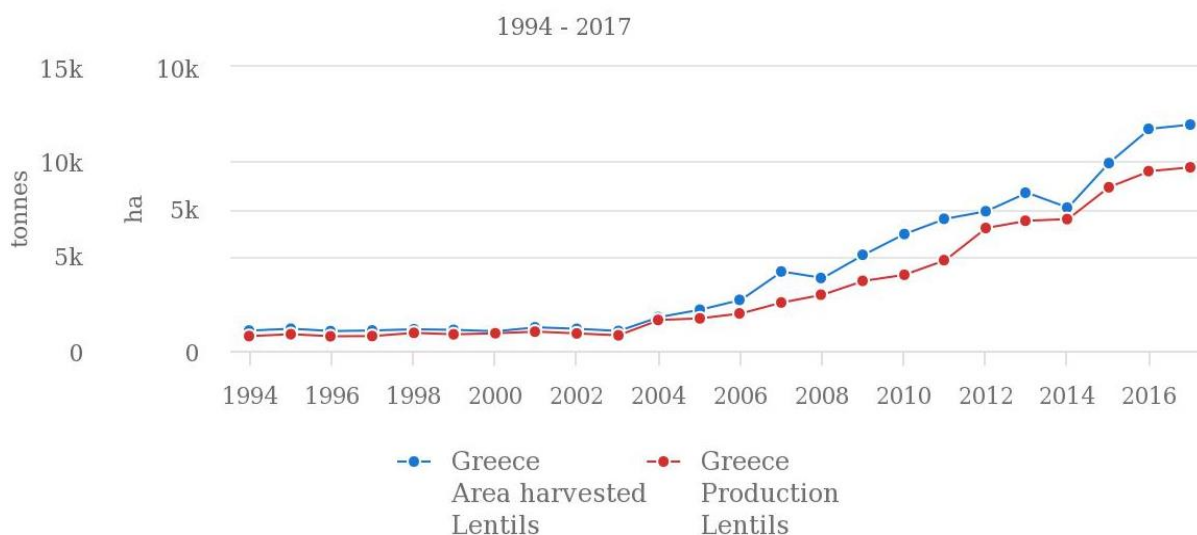
Αναλυτικότερα, η φακή καλλιεργείται σε πάνω από 35 χώρες και 5 διαφορετικές ηπείρους, με κυριότερη χώρα παραγωγής τον Καναδά. Πιο συγκεκριμένα, η παραγωγή της φακής στον Καναδά ανέρχεται τους 1.253.025 τόνους και ακολουθείται από την παραγωγή της Ινδίας (952.437.5 τόνους) και της Τουρκίας (468.438.58 τόνους). Ακολουθούν στην κατάταξη οι Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, το Νεπάλ, η Αυστραλία και η Κίνα (Fao, 2019). Παρόλο που οι χώρες της μέσης ανατολής και της Βόρειας Αφρικής κατέχουν την υψηλότερη καταναλωτική μερίδα (Muehlbauer et al., 2006), ο Καναδάς αποτελεί τον κύριο εξαγωγέα φακής παγκοσμίως (Longobardi et al., 2017).

Σύμφωνα με τα τελευταία στοιχεία του FAO (2019), η παγκόσμια παραγωγή φακής κατέδειξε αυξητική πορεία τα τελευταία χρόνια. Η συνολική καλλιεργούμενη έκταση σε παγκόσμιο επίπεδο ανέρχεται στα 6.582.779 εκτάρια, ενώ η συνολική παραγωγή υπολογίζεται στους 7.590.761 τόνους για το έτος 2017 (Εικόνα 1.1). Παρόμοια εξέλιξη καταγράφηκε και στις χώρες της Ευρώπης, όπου από το 1994 έως το 2017 η παραγωγή της φακής σχεδόν εννεαπλασιάστηκε, καθώς από τους 30.842 τόνους το 1994, έφτασε τους 275.565 τόνους το 2017 (Fao, 2019).



**Εικόνα 1.1:** Παγκόσμια καλλιεργούμενη έκταση και παραγωγή φακής για τα έτη 1994-2017 (Πηγή Fao, 2019).

Αναφορικά με την Ελλάδα, η καλλιεργούμενη έκταση υπολογίζεται στα 7.967 εκτάρια, ενώ η ετήσια παραγωγή αγγίζει μόλις τους 9.693 τόνους, με μέση απόδοση τα 1216 kg/ha (Εικόνα 1.2). Παρόλο που η παραγωγή της φακής στον ελλαδικό χώρο έχει σημειώσει σημαντική αύξηση, παραμένει ανεπαρκής για την κάλυψη των εγχώριων αναγκών (Fao, 2019) με αποτέλεσμα σημαντικές ποσότητες φακής να εισάγονται από Καναδά, Τουρκία και ΗΠΑ ([www.minagric.gr](http://www.minagric.gr)).



**Εικόνα 1.2:** Καλλιεργούμενη έκταση και παραγωγή φακής στην Ελλάδα για τα έτη 1994-2017 (Πηγή Fao, 2019).



## 1.2 Διατροφική αξία – Χρήσεις

Παγκοσμίως, παρατηρείται σημαντική στροφή του καταναλωτικού κοινού στην επιλογή υγιεινών και λειτουργικών τροφίμων. Με δεδομένο ότι η φακή αποτελεί ένα όσπριο με υψηλή διατροφική αξία, επάξια έχει διατηρήσει μια σταθερή θέση στο τραπέζι των καταναλωτών. Πιο συγκεκριμένα, από την αρχαιότητα, η φακή συχνά αποκαλείται “κρέας των φτωχών”, και όχι άδικα, αφού η περιεκτικότητά της σε πρωτεΐνη μπορεί να ανταγωνιστεί αυτή του κρέατος. Παρόλου που σήμερα καταναλώνεται από όλες τις κοινωνικές τάξεις, υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ φακής και φτώχειας και για αυτό το λόγο οι αρχαίοι Έλληνες οδηγήθηκαν σε αυτή την περιγραφή, η οποία ισχύει μέχρι και σήμερα (Bhatty, 1988).

Αναφορικά με τη θρεπτική αξία της φακής, αξίζει να σημειωθεί η υψηλή περιεκτικότητα των σπόρων της φακής σε πρωτεΐνη που κυμαίνεται από 25.8 g έως 28.4 g ανά 100g ξηρής ουσίας προϊόντος. Επιπροσθέτως, οι υδατάνθρακες αποτελούν το κύριο συστατικό των σπόρων της φακής και υπολογίζονται στα 59.1g έως 60.1g ανάλογα με την ποικιλία, ανά 100g προϊόντος. Επί των συνολικών υδατανθράκων, το άμυλο αποτελεί το 34.7-65.0 % αυτών, ενώ η συνολική περιεκτικότητα σε φυτικές ίνες ανέρχεται στα 14 g (Nongmaithem and Meda, 2018). Τέλος, η περιεκτικότητα σε λιπαρά ανέρχεται μόλις στα 1.4 g ανά 100 g προϊόντος (Faris et al., 2013).

Σημαντικά αμινοξέα όπως η κυστεΐνη, η μεθειονίνη και η τρυπτοφάνη βρίσκονται σε μικρές ποσότητες στη φακή. Ωστόσο, περιέχει σημαντικές ποσότητες λυσίνης, η οποία είναι ανεπαρκής στα δημητριακά που αποτελούν την κύρια τροφή στις αναπτυσσόμενες χώρες. Για το λόγο αυτό στις παραπάνω χώρες, η φακή αποτελεί τη σημαντικότερη πηγή πρωτεΐνης φυτικής προέλευσης, λόγω του χαμηλού της κόστους καθώς και του περιορισμένου αριθμού πρωτεϊνών ζωικής προέλευσης (Nongmaithem and Meda, 2018).

Τα ανόργανα στοιχεία, όπως το μαγνήσιο, ο φωσφόρος, το ασβέστιο και το θείο, επίσης αποτελούν σημαντικά συστατικά της φακής, ενώ η χαμηλή περιεκτικότητά της σε νάτριο και η υψηλή σε κάλιο διαμορφώνει την αναλογία από 30:1 έως 90:1, υπέρ του καλίου. Αδιαμφισβήτητα, ο σίδηρος (Faris et al., 2013) καθώς και το φολικό οξύ (Nongmaithem and Meda, 2018) απαντώνται σε σημαντικές ποσότητες στη φακή. Πιο συγκεκριμένα, η περιεκτικότητα του σιδήρου ανέρχεται στα 7,6 mg (Faris et al., 2013), ενώ του φολικού οξέος στα 18,6 mg ανά 100 g προϊόντος (Nongmaithem and Meda, 2018). Τέλος, η περιεκτικότητα της φακής σε ψευδάργυρο κυμαίνεται μεταξύ 3,2 mg και 6,3 mg ανά 100 g, ενώ σε σελήνιο ποικίλει και εξαρτάται από τις καλλιεργητικές πρακτικές και τον τύπο του εδάφους. Άλλα ιχνοστοιχεία όπως ο χαλκός, το μαγγάνιο, το μολυβδαίνιο και το βόριο, αλλά και βιταμίνες (B1, B2, K, E) εμπεριέχονται επίσης σε σημαντικές ποσότητες στη φακή (Faris et al., 2013).

Πέραν της πληθώρας θρεπτικών συστατικών, στη φακή απαντώνται και ορισμένες αντιθρεπτικές ουσίες. Σε αυτές συγκαταλέγονται οι τανίνες, οι αναστολείς τρυψίνης και οι ολιγοσακχαρίτες. Ειδικότερα, η περιεκτικότητα της φακής επί ξηρού σε τανίνες κυμαίνεται από 0,4 % έως 1,0 %, σε ολιγοσακχαρίτες από 2,5 % έως 3,3 % και σε αναστολείς τρυψίνης από 1,9 mg έως 3,1 mg ανά γραμμάριο προϊόντος. Οι ουσίες αυτές είναι ικανές να προκαλέσουν ανεπιθύμητες ενέργειες όπως μείωση βιοδιαθεσιμότητας πρωτεϊνών και ανόργανων στοιχείων, περιορισμό ή απενεργοποίηση ενζύμων, δημιουργία πρηξίματος και αίσθηση φουσκώματος. Εντούτοις, η περιεκτικότητα των σπόρων στα εν λόγω συστατικά μπορεί να μειωθεί σημαντικά με την εμβάπτιση των σπόρων σε νερό ή/και θερμική επεξεργασία (Nongmaithem and Meda, 2018).

Αναφορικά με την κατανάλωση, το μεγαλύτερο μέρος της παραγόμενης φακής καταναλώνεται είτε ως αναποφλοιώτος ξηρός σπόρος είτε ως αποφλοιωμένος. Ωστόσο, η πρόοδος και τα επιτεύγματα στις τεχνολογίες επεξεργασίας τροφίμων έχουν αναδείξει νέες οδούς στην αξιοποίηση της πρωτεΐνης και του αμύλου της φακής σε διάφορα διατροφικά σκευάσματα, όπως παιδικές τροφές, σνακ και αρτοσκευάσματα. Εξαιτίας του χαμηλού γλυκαιμικού δείκτη και των άριστων λειτουργικών του ιδιοτήτων, το άμυλο της φακής μπορεί να αποτελέσει ένα πολλά υποσχόμενο υποκατάστατο άλλων αμύλων δημητριακών και οσπρίων που χρησιμοποιούνται σήμερα στην παραγωγική διαδικασία τροφίμων. Επιπλέον, η πρωτεΐνη της φακής έχει βρεθεί ότι έχει εξαιρετικές ιδιότητες ως παράγοντας σχηματισμού πηκτής, ως γαλακτωματοποιητής και ως σταθεροποιητής τροφίμων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα πιο υγιεινό υποκατάστατο διαφόρων πρωτεϊνών ζωικής προέλευσης. Στη βιβλιογραφία ωστόσο αναφέρεται η αναγκαιότητα διεξαγωγής περαιτέρω μελέτης σχετικά με τις λειτουργικές ιδιότητες των συστατικών της φακής (Joshi et al., 2017).

Εξαιτίας της τιμής της, η φακή δεν χρησιμοποιείται συνήθως στο σιτηρέσιο των κτηνοτροφικών ζώων και των πουλερικών. Οι χαμηλής ποιότητας σπόροι ωστόσο, όπως αυτοί που έχουν υποστεί βλάβη από παγετό ή έχουν προσβληθεί από κάποια ασθένεια, συχνά αξιοποιούνται στη διατροφή των ζώων (Bhatty, 1988). Επιπλέον, τα υπολείμματα μετά τη συγκομιδή της φακής (σανός) αποτελούν μια εξίσου σημαντική ζωοτροφή, εξαιτίας της χαμηλής περιεκτικότητάς τους σε κυτταρίνη, ενώ τα φυτικά τμήματα της μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως χλωρά λίπανση (Cokkizgin and Shtaya, 2013).

Τέλος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν οι αναφορές στις θεραπευτικές ιδιότητες της φακής. Σύμφωνα με το Διοσκουρίδη, η φακή συγκαταλέγεται στα θεραπευτικά φυτά. Οι σπόροι του φυτού χρησιμοποιούνται ακόμη και σήμερα στην παραδοσιακή ιατρική πολλών εθνικοτήτων

για την θεραπεία διάφορων ασθενειών. Πιο συγκεκριμένα, αφού ψηθούν και αλεσθούν, επαλείφονται πάνω στην πληγείσα περιοχή ως πάστα για τη θεραπεία δερματικών λοιμώξεων και εγκαυμάτων. Τέλος, η κατανάλωση φακής θεωρείται ότι βοηθά στην πρόληψη διαφόρων ασθενειών όπως ο διαβήτης, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ο καρκίνος και οι ρετροϊκές λοιμώξεις (Faris et al., 2013).

### 1.3 Ταξινόμηση

Η λέξη “lens” σημαίνει “φακός”, είναι λατινικής προέλευσης και αναφέρεται σε ένα αντικείμενο με δισκοειδή μορφή, ενώ ο Tournefort ήταν ο πρώτος που χρησιμοποίησε τη λέξη “culinaris” για να αποδώσει τη χρήση της φακής στη διατροφή και τη μαγειρική. Σύμφωνα με τους Sarker και Erskine (2006), στη φακή έχουν αποδοθεί διάφορες ονομασίες ανά τον κόσμο, συμπεριλαμβανομένου των "lentil" (αγγλικά), "adas" (αραβικά), "mercimek" (Τουρκία), "messer" (Αιθιοπία), "masser" ή "massur" (Ινδία), "heramame" (Ιαπωνία), ενώ λιγότερο συχνά χρησιμοποιούνται και άλλες ονομασίες, όπως "mangu" or "margu" (Περσία), "masura", "renuka", "mangalaya" (σανσκριτική) (Sandhu and Singh, 2007). Το επιστημονικό όνομα της φακής δόθηκε από τον Medikus, Γερμανό βοτανολόγο και ιατρό, το 1787.

Η φακή είναι ετήσιο αυτογονιμοποιούμενο διπλοειδές φυτό ( $2n = 2x = 14$ ), το οποίο ανήκει βοτανικά στην οικογένεια Leguminosae (Ψυχανθή) (Sarker and Erskine, 2006). Το γένος *Lens* Miller περιλαμβάνει 5 ετήσια είδη, εκ των οποίων μόνο το *Lens culinaris* L. Medik. subsp. *culinaris* καλλιεργείται (Ladizinsky, 1979). Μεταξύ των άγριων ειδών φακής, το *Lens culinaris* subsp. *orientalis* θεωρείται ο επικρατέστερος πρόγονος της καλλιεργούμενης φακής, καθώς τα δύο είδη εάν διασταυρωθούν μπορούν να παράγουν πλήρως γόνιμους απογόνους (Muehlbauer et al., 2006). Επιπλέον, τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των παραπάνω ειδών παρουσιάζουν μικρές και δυσδιάκριτες διαφορές (Sandhu and Singh, 2007).

Η ταξινόμηση του γένους *Lens* έχει υποστεί αρκετές τροποποιήσεις μέχρι τη σημερινή, κοινά αποδεκτή μορφή της. Βασιζόμενοι στη χρήση μοριακών και βιοχημικών δεικτών οι Ferguson et al. (2000) πρότειναν την ταξινόμηση του γένους *Lens* σε 4 είδη και 7 υποείδη:

1. *Lens culinaris* Medikus
  - a) subsp. *culinaris*
  - b) subsp. *orientalis* (Boiss.) Ponert
  - c) subsp. *Tomentosus* (Ladiz.)
  - d) subsp. *Odemensis* (Ladiz.)
2. *Lens ervoides* (Brign.) Grande
3. *Lens nigricans* (M. Bieb.) Godr.

#### 4. *Lens lamottei* Czefr. (Sarker and Erskine, 2006).

Σύμφωνα με τον Barulina (1930), το καλλιεργούμενο είδος *Lens culinaris* L. Medik. subsp. *culinaris* ανάλογα με το μέγεθος των σπόρων περιλαμβάνει δύο τύπους ποικιλιών:

- i. τις λεπτόσπερμες με διάμετρο σπόρου 2-6 mm, μικρούς κυρτούς λοβούς (6-15 mm μήκος και 3,5-7 mm πλάτος) (Sharma et al., 1995), κόκκινες, πορτοκαλί ή κίτρινες κοτυληδόνες και παρουσία στιγμάτων σε άνθη και άλλα φυτικά μέρη (Sandhu and Singh, 2007) και
- ii. τις πλατύσπερμες με διάμετρο σπόρου 6-9 mm, μεγάλους πεπλατυσμένους λοβούς (15-20 mm μήκος και 7,7-10,5 mm πλάτος) (Sharma et al., 1995), κίτρινες κοτυληδόνες και ανοιχτού χρώματος ή χωρίς στίγματα άνθη και φυτικά μέρη (Sandhu and Singh, 2007).

Στην Ελλάδα, καλλιεργούνται τόσο οι λεπτόσπερμες όσο και οι πλατύσπερμες ποικιλίες φακής με αντιπροσωπευτικότερες την Αθηνά, τη Σάμο και τη Δήμητρα για τις λεπτόσπερμες και τη Θεσσαλία, την Ικαρία και την Ελπίδα για τις πλατύσπερμες (ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ, 2016).

### 1.4 Βοτανική περιγραφή

Η φακή είναι ένα ετήσιο ποώδες φυτό, ελαφρώς χνουδωτό, ανοιχτού πράσινου χρώματος, με ύψος που κυμαίνεται συνήθως από 20 cm έως 30 cm (Εικόνα 1.3). Παρόλ' αυτά, υπάρχουν ποικιλίες που δεν ξεπερνούν τα 15 cm και άλλες που αγγίζουν τα 75 cm. Πρόκειται για ένα φυτό ακαθόριστης ανάπτυξης, καθώς παρουσιάζει υψηλή παραλλακτικότητα για το παραπάνω γνώρισμα. Αναλυτικότερα, η ανάπτυξη μπορεί να κυμαίνεται από ορθόκλαδη με ένα μονό στέλεχος έως ήμι-ορθόκλαδη και συμπαγής με διακλαδισμένες, χαμηλές θαμνώδεις μορφές. Η παραλλακτικότητα αυτή αποδίδεται κυρίως σε γενετικά αίτια, ωστόσο και οι περιβαλλοντικές συνθήκες επηρεάζουν σημαντικά την έκφραση των παραπάνω γνωρισμάτων (Saxena, 2009).

Ο βλαστός της φακής είναι λεπτός, τετράγωνος και φέρει ραβδώσεις στις γωνίες, ενώ ο κύριος βλαστός αποτελείται από πρώτης και δεύτερης τάξεως διακλαδώσεις. Τα στελέχη είναι επίσης λεπτά, γωνιώδη, ανοιχτού πράσινου χρώματος και συνήθως φέρουν τρίχες (Sandhu and Singh, 2007).

Τα φύλλα της φακής είναι σύνθετα, εναλλασσόμενα, πτεροειδή με 1 έως 8 ζεύγη έμμισχων ή άμισχων, ωοειδών, ελλειπτικών ή λογχοειδών φυλλαρίων, μήκους 4-5cm. Ο αριθμός των φυλλαρίων εξαρτάται από το γονότυπο, ενώ διαφορές σημειώνονται ακόμη και στον ίδιο γονότυπο, γεγονός που επηρεάζεται από τη θέση του φύλλου επάνω στο φυτό. Το χρώμα των

φύλλων ποικίλλει και μπορεί να είναι από κιτρινο-πράσινο έως σκούρο πρασινο-μπλέ, συμπεριλαμβανομένων όλων των ενδιάμεσων χρωματισμών (Saxena, 2009).

Τα άνθη φέρονται μεμονωμένα ή σε ομάδες αποτελούμενες από 2 έως 4 άνθη (έχουν αναφερθεί έως και 7 άνθη) στην άκρη του ποδίσκου, ο οποίος εκφύεται από τις μασχάλες των ανώτερων φύλλων του φυτού. Τα άνθη είναι μικρά (4-9 mm), τυπικά της οικογένειας των ψυχανθών και το χρώμα τους μπορεί να είναι λευκό, ροζ, μωβ ή απαλό μπλε (Saxena, 2009).

Οι λοβοί είναι λείοι, επιμήκεις και πλευρικά συμπιεσμένοι, με μήκος 6 mm έως 20 mm και πλάτος που κυμαίνεται από 3,5 mm έως 11 mm. Συνήθως, περιέχουν 1 έως 3 σπόρους. Οι λοβοί αρχικά είναι επίπεδοι και κατά το στάδιο του γεμίσματος του σπόρου διογκώνονται. Η αλλαγή αυτή παρατηρείται στις λεπτόσπερμες ποικιλίες, ενώ οι λοβοί των πλατύσπερμων ποικιλιών παραμένουν επίπεδοι. Ο αριθμός των λοβών ανά ποδίσκο κυμαίνεται συνήθως από 1 έως 4, ωστόσο έχουν παρατηρηθεί έως και 6 λοβοί ανά ποδίσκο. Ο αριθμός των λοβών ανά φυτό αποτελεί ένα σημαντικό δείκτη απόδοσης της παραγωγής και εξαρτάται τόσο από το γονότυπο όσο και τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες (Saxena, 2009).

Οι σπόροι έχουν τυπικά το σχήμα φακού και είναι λιγότερο ή περισσότερο πεπλατυσμένοι ανάλογα με το γονότυπο, ενώ η διάμετρός τους ποικίλει από 2 mm έως 9 mm. Η επιφάνειά τους είναι συνήθως λεία, αλλά σε ορισμένες πλατύσπερμες ποικιλίες εμφανίζεται και ως ρυτιδωμένη. Το χρώμα του περισπερμίου ποικίλει και εξαρτάται επίσης από το γονότυπο. Ο αριθμός των σπόρων ανά φυτό είναι στενά συνδεδεμένος με τον αριθμό των λοβών ανά φυτό, γνώρισμα που επίσης αποτελεί σημαντικό συστατικό της απόδοσης. Το βάρος χιλίων σπόρων (ΒΧΣ) μπορεί να κυμαίνεται από 10,7 g έως 85,5 g και εξαρτάται κυρίως από το γονότυπο, ενώ το περιβάλλον δε φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά το παραπάνω γνώρισμα (Saxena, 2009).

Αναφορικά με το υπόγειο μέρος του φυτού, η φακή διαθέτει μια λεπτή πασσαλώδη ρίζα, από την οποία εκφύονται πολυάριθμες πλάγιες διακλαδώσεις. Ανάλογα με το βάθος της ρίζας και τον προσανατολισμό των πλάγιων διακλαδώσεων, διακρίνονται οι εξής τύποι ριζών: i) πολύ διακλαδιζόμενο, επιφανειακό ριζικό σύστημα, το οποίο φτάνει σε βάθος περίπου 15 cm, ii) λεπτή, βαθιά πασσαλώδη ρίζα, η οποία φτάνει έως 36 cm βάθος και iii) ενδιάμεσος τύπος. Ο τύπος της ρίζας έχει άμεση σχέση με τον τύπο του εδάφους και τα χαρακτηριστικά αυτού. Ο πρώτος τύπος συναντάται σε αλλουβιακές αποθέσεις, ενώ ο δεύτερος σε βαριά μαύρα εδάφη που σχηματίζουν επιφανειακή κρούστα (Saxena, 2009).



**Εικόνα 1.3:** Βλαστοί φακής όπου διακρίνονται η μορφολογία των φύλλων, των ταξιανθιών, των λοβών καθώς και η συνεχής τους ανάπτυξη (Πηγή: [www.biolib.de](http://www.biolib.de)).

Σημαντική παραλλακτικότητα έχει παρατηρηθεί στην ανάπτυξη των ριζών, για επιμέρους γνωρίσματά της, όπως το μήκος της κύριας ρίζας, ο αριθμός των πλάγιων διακλαδώσεων, το συνολικό μήκος της ρίζας, το βάρος της, ο αριθμός των τριχιδίων που φέρει ανά μονάδα επιφάνειας, αλλά και στο ρυθμό αύξησής της. Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι ιδιαίτερα σημαντικά, κυρίως σε φτωχά, χαμηλής γονιμότητας εδάφη ή σε εδάφη που νεροκρατούν, καθώς σχετίζονται με την πρόσληψη του νερού και των ανόργανων θρεπτικών στοιχείων από το έδαφος. Τέλος, θετική συσχέτιση έχει παρατηρηθεί μεταξύ του ρυθμού ανάπτυξης και του όγκου του ριζικού συστήματος με την απόδοση της καλλιέργειας της φακής (Saxena, 2009).

Η κύρια ρίζα καθώς και οι πλάγιες διακλαδώσεις του ανώτερου στρώματος του εδάφους αποτελούν τα σημεία πάνω στα οποία δημιουργούνται τα πολυάριθμα μικρά στρόγγυλα, επιμήκη ή ωοειδή φυμάτια, του γένους *Rhizobium*. Τα φυμάτια αρχίζουν να εμφανίζονται συνήθως 15 ημέρες μετά το φύτεμα, με το μέγιστο της ανάπτυξής τους, σε αριθμό αλλά και σε μέγεθος, να παρατηρείται όταν το φυτό φτάσει στο μέγιστο της βλαστικής του ανάπτυξης, ενώ μειωτική τάση παρατηρείται περίπου κατά το στάδιο της έναρξης της ανθοφορίας.

Ωστόσο, η μείωση αυτή μπορεί να καθυστερήσει σε κάποιο βαθμό με την αύξηση της υγρασίας του εδάφους, είτε μέσω άρδευσης είτε μέσω βροχόπτωσης. Τα υγιή ενεργά φυμάτια έχουν λευκό έως ελαφρώς ροζ χρωματισμό, γεγονός που οφείλεται στην leg-αιμογλοβίνη (Saxena, 2009).

Πιο αναλυτικά, η φακή δημιουργεί μια συμβιωτική σχέση με το *Rhizobium leguminosarum*, κατά την οποία τα βακτήρια εσωκλείονται εντός των φυματίων τα οποία υπάρχουν στις ρίζες. Η εξειδικευμένη αυτή μορφή είναι γνωστή ως βακτηριοειδές. Ο σχηματισμός αυτής της συμβίωσης είναι συγκεκριμένος για κάθε ξενιστή και εξαρτάται από την αλληλεπίδραση των φυτικών και των βακτηριακών γονιδίων (McNeil and Materne, 2007).

Η σύνθετη αυτή δομή των φυματίων υφίσταται ώστε να καταστεί δυνατή η λειτουργία των ενζύμων της νιτρογενάσης, τα οποία παρουσιάζουν ιδιαίτερη ευαισθησία στο οξυγόνο, καθώς και των ριζόβιων βακτηρίων τα οποία είναι υποχρεωτικά αερόβια. Στα φυμάτια, το εσωτερικό οξυγόνο ρυθμίζεται στα 3 nM έως 30 nM και η διάχυση του οξυγόνου διευκολύνεται μέσω των διακυτταρικών αέριων χώρων και της αιμοπρωτεΐνης (leg-αιμογλοβίνης) που δεσμεύεται από το οξυγόνο (McNeil and Materne, 2007).

Τα βακτηριοειδή περικλείονται εντός μιας μεμβράνης, η οποία προέρχεται από τον ξενιστή και είναι υπεύθυνη για την ρύθμιση των ροών μεταξύ των βακτηριδίων και του περιβάλλοντος. Το φυτό παρέχει οργανικά οξέα ως πηγή άνθρακα για τα βακτήρια, ενώ τα βακτηριοειδή με τη σειρά τους εξάγουν σταθεροποιημένο N με τη μορφή αμμωνίας. Στη συνέχεια, τα φυμάτια τροποποιούν την αμμωνία, ώστε να εξάγουν αμίδια στα επίγεια τμήματα του φυτού μέσα στο ξύλωμα, καθιστώντας έτσι τη σχέση επωφελή και για τους δύο οργανισμούς (McNeil and Materne, 2007).

### 1.5 Γενετικό υλικό φακής

Σε παγκόσμιο επίπεδο, η μεγαλύτερη τράπεζα γενετικού υλικού φακής διατηρείται στο ICARDA (International Center for Agricultural Research in Dry Areas). Το ICARDA διατηρεί 10587 καταχωρήσεις, εκ των οποίων οι 8858 αποτελούν τοπικές και καλλιεργούμενες ποικιλίες, οι οποίες συλλέχθηκαν από 69 διαφορετικές χώρες 4 διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών. Επίσης, περιλαμβάνει 1137 βελτιωμένες σειρές και 583 καταχωρήσεις 6 άγριων υποειδών, τα οποία προέρχονται από 24 χώρες. Αναλυτικότερα, από τις 583 καταχωρήσεις οι 65 ανήκουν στο *Lens culinaris* subsp. *odemensis*, οι 268 στο subsp. *orientalis*, οι 11 στο subsp. *tomentosus*, οι 166 στο *Lens ervoides*, οι 10 στο *Lens lamottei* και οι 63 στο *Lens nigricans* (Redden et al., 2007).

Η πλειοψηφία των δειγμάτων της συλλογής (48 %) προέρχεται από την Κεντρική και Δυτική Ασία και τη Βόρεια Αφρική, περιοχές οι οποίες αποτελούν το κέντρο προέλευσης και αρχικής ποικιλομορφίας της φακής, ενώ από τη Νότια Ασία προέρχεται ένα επιπλέον 25 % των καταχωρήσεων. Οι καταχωρήσεις προέρχονται από 113 συλλογές του ICARDA (46 %), 56 από άλλα Ιδρύματα/Τράπεζες Γενετικού Υλικού (44 %) και βελτιωτικά προγράμματα (11 %) (Redden et al., 2007).

Ταυτόχρονα, σημαντικές συλλογές φακής απαντώνται στο ATFCC (Australian Temperate Field Crops Collection) της Αυστραλίας με 5250 καταχωρήσεις, στην Τράπεζα Γενετικού Υλικού του Vavilov (N.I. Vavilov All-Russian Scientific Research Institute of Plant Industry) στη Ρωσία με 2396 καταχωρήσεις (<http://vir.nw.ru/>), στην Τράπεζα Γενετικού Υλικού Pullman των ΗΠΑ (USDA Agricultural Research Service - ARS) με 2797 καταχωρήσεις (<https://www.ars-grin.gov/>) και τέλος, στην Ινδία στο National Board of Plant Genetic Resource με 2212 καταχωρήσεις (<http://www.nbpg.ernet.in/>) (Redden et al., 2007).

Η διατήρηση γενετικού υλικού τοπικών ποικιλιών φακής και άγριων συγγενικών ειδών του γένους *Lens* γίνεται κατά κύριο λόγο *ex-situ*, ενώ αρκετές προσπάθειες πραγματοποιούνται για την *in-situ* διατήρηση αυτών. Αν και σε περιοχές με υψηλή παραλλακτικότητα του γένους *Lens* έχει επιτευχθεί μια σχετική πρόοδος στην *in-situ* διατήρηση, εξακολουθεί να υπάρχει επιτακτική ανάγκη για περαιτέρω προσπάθειες καθιέρωσής της, καθώς μέσω αυτής καθίσταται εφικτή η προσαρμογή και εξέλιξη των τοπικών ποικιλιών στο φυσικό τους περιβάλλον (Piergiorganni, 1999).

Στην Ελλάδα, πέραν των υπολοίπων εμπορικών ποικιλιών, διατηρείται η παραδοσιακή καλλιέργεια της τοπικής ποικιλίας "Εγκλουβή Λευκάδας". Πρόκειται για μια λεπτόσπερμη ποικιλία με μοναδικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, όπως πλούσια γεύση και μεγάλη βραστική ικανότητα («κάλοψη»), τα οποία αποδίδονται κατά κύριο λόγο στο έδαφος της περιοχής. Η πρώτη επίσημη καταγραφή της έγινε το 1717, αλλά η παρουσία της στην περιοχή είναι πολύ παλαιότερη. Η φακή Εγκλουβής αποτελεί σπάνιο γενετικό υλικό που διατηρείται *ex-situ* στο ΙΚΦ&Β (Ινστιτούτο Βιομηχανικών και Κτηνοτροφικών Φυτών) Λάρισας και στο ICARDA (International Center for Agricultural Research in Dry Areas), με κωδικό ILL 293, από το 1992. Η συλλογή φακής Εγκλουβής αξιοποιείται σε βελτιωτικά προγράμματα, ενώ περιλαμβάνεται στη λίστα με τις τοπικές ποικιλίες οι οποίες εμφανίζουν γενετική διάβρωση (Nikolaou and Maxted, 2009).



## 1.6 Οικολογικές απαιτήσεις

Η φακή είναι ένα ετήσιο ψυχανθές, μακράς ή ουδέτερης φωτοπεριόδου, κατάλληλο για καλλιέργεια σε ένα ευρύ φάσμα αγρο-κλιματικών συνθηκών (Sarker and Erskine, 2006). Η φακή συνήθως καλλιεργείται ως μονοκαλλιέργεια, αλλά μπορεί να συγκαλλιεργηθεί με διάφορα άλλα φυτικά είδη όπως το σιτάρι, το κριθάρι, το ρύζι κ.α. (Andrews and McKenzie, 2007). Πιο συγκεκριμένα, η φακή συχνά χρησιμοποιείται σε συστήματα αμειψισποράς κυρίως με σιτηρά. Έχει αποδειχθεί ότι οι αποδόσεις των σιτηρών είναι υψηλότερες μετά από καλλιέργεια φακής, γεγονός που αποδίδεται στην βελτίωση των φυσικών ιδιοτήτων του εδάφους και στον εμπλουτισμό του με διαθέσιμο άζωτο. Σε συστήματα αμειψισποράς ρυζιού-φακής, η αύξηση της παραγωγής του ρυζιού μπορεί να αγγίξει το 23,4 % όταν προηγείται καλλιέργεια φακής (Sekhon et al., 2007).

Η φακή είναι φυτό ψυχρής περιόδου. Κατά κανόνα, σπέρνεται στην αρχή της χειμερινής περιόδου, αλλά στις περιοχές οι οποίες είναι επιρρεπείς σε παγετούς σπέρνεται την άνοιξη (Sarker and Erskine, 2006). Στη χώρα μας, σύμφωνα με πειράματα του Ινστιτούτου Βιομηχανικών και Κτηνοτροφικών Φυτών Λάρισας, η καταλληλότερη ημερομηνία σποράς για τη Βόρεια Ελλάδα είναι μετά τις 10 Νοεμβρίου, ενώ για την Κεντρική και Νότια Ελλάδα ο καταλληλότερος χρόνος σποράς είναι μετά τις 21 Νοέμβρη. Τέλος, σε ψυχρότερες περιοχές όπως αυτές της Δυτικής Μακεδονίας συνίσταται σπορά στις αρχές Νοέμβρη (Παπακώστα – Τασοπούλου, 2012).

Αναφορικά με τον τρόπο σποράς, αυτός μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε πεταχτά με το χέρι είτε με τη χρήση σπαρτικής μηχανή σιτηρών. Ως άριστη πυκνότητα φυτών για την επίτευξη ικανοποιητικών αποδόσεων θεωρούνται τα 100 φυτά ανά  $m^2$  (Andrews and McKenzie, 2007). Στη χώρα μας, οι συνιστώμενες ποσότητες σπόρου είναι 8-9 kg/στρ. για τις λεπτόσπερμες ποικιλίες και 10-11 kg/στρ. για τις πλατύσπερμες (Παπακώστα – Τασοπούλου, 2012).

Η φακή μπορεί να αναπτυχθεί σε ένα ευρύ φάσμα εδαφικών τύπων και pH, αν και σε σχέση με άλλα όσπρια, όπως το λούπινο και το ρεβίθι, φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητη σε  $pH < 6,5$  και σε εδάφη που νεροκρατούν. Ωστόσο, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα όσπρια θεωρείται πιο ανθεκτική στην ξηρασία και στις χαμηλές θερμοκρασίες (Andrews and McKenzie, 2007). Η ανεκτικότητα στην ξηρασία, συγκριτικά με άλλα όσπρια, αποδίδεται εν μέρει στο γεγονός ότι οι ρίζες των φυτών φακής είναι ικανές να αντλούν νερό από βάθος τουλάχιστον 90 cm, με τις λεπτόσπερμες ωστόσο ποικιλίες να προσαρμόζονται καλύτερα από τις πλατύσπερμες σε ξηρικά περιβάλλοντα. Επιπρόσθετα, η επιλογή πρώιμων ποικιλιών και η σπορά τους νωρίς την άνοιξη ή το φθινόπωρο μπορεί να συνεισφέρει σημαντικά στην αποφυγή των αρνητικών επιπτώσεων

της υδατικής καταπόνησης. Η πρωιμότητα αποτελεί σημαντικό γνώρισμα των ποικιλιών, λαμβάνοντας υπόψη ότι σε πολλές περιοχές καλλιέργειας της φακής η βροχόπτωση αποτελεί τον μοναδικό τρόπο άρδευσής της (Andrews and McKenzie, 2007).

Επιπλέον, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα όσπρια η φακή θεωρείται ανεκτική στις χαμηλές θερμοκρασίες (Andrews and McKenzie, 2007). Η καταλληλότερη θερμοκρασία φυτρώματος είναι οι 15-25 °C, αν και η έναρξη του φυτρώματος μπορεί να παρατηρηθεί ακόμη και στους 4-6 °C (Παπακώστα – Τασοπούλου, 2012). Θερμοκρασίες μικρότερες των -9 °C αποδεικνύονται συνήθως καταστρεπτικές για τα φυτά της φακής. Ωστόσο, η ανοχή των φυτών μειώνεται καθώς αυξάνεται η ηλικία τους (Murray et al., 1988). Αγρονομικές πρακτικές, όπως η πυκνότερη φύτευση των φυτών (περίπου 400 φυτά/ m<sup>2</sup>), μπορεί να αυξήσει επιπλέον την ανοχή στις χαμηλές θερμοκρασίες (Andrews and McKenzie, 2007). Στην ανοχή αυτή μπορεί να συμβάλλει και η βαθύτερη φύτευση του σπόρου της φακής (Murray et al., 1988), ενώ οι πλατύσπερμες ποικιλίες δείχνουν να έχουν μεγαλύτερη ανοχή στις χαμηλές θερμοκρασίες, σε σχέση με τις λεπτόσπερμες (Andrews and McKenzie, 2007).

Εκτός από την ξηρασία και τις χαμηλές θερμοκρασίες, η μείωση της παραγωγής μπορεί να προκληθεί και από τη μη αποτελεσματική αντιμετώπιση των ζιζανίων. Δεδομένου του χαμηλού ρυθμού ανάπτυξης της φακής, τα ζιζάνια ανταγωνίζονται την καλλιέργεια, επιφέροντας σημαντικές αρνητικές επιπτώσεις στην αύξηση και ανάπτυξη. Με βάση τα παραπάνω, η έγκαιρη σπορά και η επαρκής πρόβλεψη για την αντιμετώπιση των ζιζανίων συνεισφέρει σημαντικά στην αύξηση της απόδοσης της καλλιέργειας (Andrews and McKenzie, 2007).

Τέλος, αναφορικά με τις ανάγκες της καλλιέργειας σε λίπανση, η φακή είναι ικανή να καλύψει επαρκώς τις ανάγκες της σε άζωτο, λόγω της συμβιωτικής σχέσης με τα αζωτοδεσμευτικά ριζόβια του εδάφους. Παρόλο αυτά, σε περιπτώσεις όπου η σπορά πραγματοποιείται σε άγονο έδαφος με εξαιρετικά χαμηλό διαθέσιμο άζωτο ή σε περιπτώσεις που κατά τη σπορά της επικρατούν χαμηλές θερμοκρασίες και υψηλή υγρασία εδάφους, κρίνεται απαραίτητη η προσθήκη μικρής ποσότητας αζώτου, ώστε να καλυφθούν οι ανάγκες του φυτού πριν ξεκινήσει η αζωτοδέσμευση. Οι ανάγκες της φακής σε φώσφορο ποικίλουν, ωστόσο υποστηρίζεται πως 4-6 kg/στρ συνδράμουν καθοριστικά στην αύξηση της απόδοσης, ενώ η ανεπάρκειά του περιορίζει σημαντικά την αύξηση, ανάπτυξη και αποδοτικότητα της καλλιέργειας. Επιπλέον, η εφαρμογή περίπου 2 kg/στρ καλίου λειτουργεί ευεργετικά σε αμμώδη ή διαβρωμένα εδάφη. Το θείο τέλος, είναι ιδιαίτερα σημαντικό στην καλλιέργεια της φακής καθώς είναι απαραίτητο για τον σχηματισμό των φυματίων και τη σταθεροποίηση του αζώτου (McKenzie et al., 2007).

## 1.7 Μυκητολογικές ασθένειες φακής

Η φακή προσβάλλεται από ένα ευρύ φάσμα παθογόνων μικροοργανισμών με τις μυκητολογικές ασθένειες να αποτελούν τις σημαντικότερες και ταυτόχρονα τις καταστρεπτικότερες εξ αυτών. Οι μυκητολογικές ασθένειες προκαλούν σημαντικές βλάβες στο μεγαλύτερο μέρος των φυτικών ιστών μειώνοντας με αυτό τον τρόπο την παραγωγικότητα της καλλιέργειας αλλά και την εμπορευσιμότητα του παραγόμενου προϊόντος. Οι κυριότερες μυκητολογικές ασθένειες που προσβάλλουν την φακή είναι:

- i. η ασκοχύτωση (*Ascochyta fabae* f.sp. *lentis*)
- ii. ο βοτρύτης (*Botrytis fabae* και *Botrytis cinerea*)
- iii. η σκωρίαση (*Uromyces viciae fabae*) (Taylor et al., 2007)
- iv. η σκληρωτινίαση (*Sclerotinia sclerotiorum*) (Vagelas, 2014) και
- v. η φουζαρίωση (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*) (Taylor et al., 2007)

Αναλυτικότερα, η **ασκοχύτωση** (*Ascochyta blight*) προκαλείται από τον μύκητα *Ascochyta fabae* f. sp. *lentis* συν. *Ascochyta lentis*. Η μόλυνση, η ανάπτυξη και η εξάπλωση του παθογόνου ευνοούνται από δροσερό και υγρό καιρό, με υψηλότερη συχνότητα μόλυνσης να παρατηρείται σε παρατεταμένη περίοδο υγρού καιρού 24 έως 48 ωρών και θερμοκρασία μεταξύ 10 °C και 15 °C (Ye et al., 2002). Αναφορικά με τη συμπτωματολογία, περιλαμβάνει κηλίδες σε φύλλα, στελέχη και λοβούς. Οι κηλίδες είναι ακανόνιστου σχήματος αρχικά ανοιχτού γκρι χρώματος, ενώ στη συνέχεια γίνονται γκρι-καστανές με σκούρα καστανά περιθώρια και στο κέντρο των νεκρών ιστών εμφανίζονται μαύρα πικνίδια. Οι έντονα προσβεβλημένοι σπόροι συρρικνώνονται και αποχρωματίζονται, ενώ έντονες προσβολές μπορούν να οδηγήσουν στην ολοκληρωτική καταστροφή της καλλιέργειας. Σημαντικά μέτρα για τη μείωση των σοβαρών απωλειών αποτελούν η χρήση υγιούς σπόρου, η πρώιμη σπορά, η αποφυγή υγρού καιρού κατά το στάδιο της συγκομιδής, η τριετής αμειψισπορά και η καύση των ασθενών φυτικών υπολειμμάτων (Taylor et al., 2007). Παρόλο αυτά, η χρήση ανθεκτικών στην ασκοχύτωση ποικιλιών φακής αποτελεί την αποτελεσματικότερη, αποδοτικότερη και πλέον αειφόρο μέθοδο για την αντιμετώπιση της ασθένειας (Ye et al., 2002; Taylor et al., 2007).

Η **τεφρά σήψη** της φακής προκαλείται από τους μύκητες *Botrytis fabae* και *Botrytis cinerea*. Πιο αναλυτικά, όλα τα υπέργεια μέρη της φακής μπορούν να προσβληθούν από την ασθένεια, εκδηλώνοντας χαρακτηριστικά συμπτώματα. Η συμπτωματολογία εμφανίζεται αρχικά στα κατώτερα φύλλα του φυτού ως διακριτές κηλίδες σκούρου πράσινου χρώματος, που στη συνέχεια γίνονται γκριζο-καστανές και με το πέρασμα του χρόνου καταλήγουν ως λευκές, οι οποίες μεγεθύνονται συνενώνονται και τελικά καλύπτουν ολόκληρο το έλασμα των φύλλων.

Αποτέλεσμα αυτού είναι τα έντονα προσβεβλημένα φύλλα να καταλήγουν στο έδαφος, τα οποία στη συνέχεια μπορούν να λειτουργήσουν ως δευτερεύουσα πηγή μόλυσματος. Εάν οι συνθήκες του περιβάλλοντος παραμείνουν ευνοϊκές για μεγάλο χρονικό διάστημα, η προσβολή μπορεί να εξαπλωθεί στα κατώτερα στελέχη στα οποία εμφανίζονται γκρι καρποφορίες του μύκητα (γκρι χνούδι), προκαλώντας τελικά την καταστροφή του στελέχους και τη μόλυνση ολόκληρου του φυτού (Taylor et al., 2007). Οι προσβεβλημένοι σπόροι αποχρωματίζονται και συρρικνώνονται. Θερμοκρασίες μεταξύ 15 °C - 25 °C και σχετική υγρασία RH > 95% κατά την ανθοφορία ή στη φάση γεμίσματος του λοβού ευνοούν την ανάπτυξη της ασθένειας (Davidson et al., 2007). Για την αντιμετώπιση της ασθένειας, συστήνεται η χρήση υγιούς και απολυμασμένου σπόρου, η καταστροφή των προσβεβλημένων τμημάτων του φυτού, η αμειψισπορά και η εφαρμογή διαφόρων καλλιεργητικών τεχνικών, όπως η κατάλληλη εποχή σποράς, η αποφυγή της πυκνής φύτευσης -η οποία εντείνει το πρόβλημα της υγρασίας-, ο έλεγχος των ζιζανίων και η κατάλληλη εφαρμογή των λιπασμάτων, ώστε να αποφεύγονται τα υψηλά επίπεδα αζώτου. Τέλος, αναγκαία κρίνεται η ανάπτυξη ανθεκτικών στο βοτρυτή ποικιλιών φακής (Davidson et al., 2007; Taylor et al., 2007).

Η **σκωρίαση**, η οποία προκαλείται από τον μύκητα *Uromyces viciae fabae*, θεωρείται ως η σημαντικότερη ασθένεια φυλλώματος της φακής και είναι δυνατό να προκαλέσει ολοκληρωτική καταστροφή της καλλιέργειας (Taylor et al., 2007). Η υψηλή υγρασία, ο νεφελώδης ή ομιγλώδης καιρός και η θερμοκρασία μεταξύ 20 °C και 22 °C ευνοούν την ανάπτυξη της ασθένειας. Το παθογόνο εμφανίζεται στο στάδιο της ανθοφορίας και του πρώιμου σταδίου γεμίσματος του λοβού με τα φύλλα, τα στελέχη και τους λοβούς να παρουσιάζουν κιτρινωπές-λευκές κηλίδες, όπου δημιουργούνται αρχικά κιτρινοπορτοκαλί φλύκταινες και έπειτα καστανόμαυροι σωροί. Για την αντιμετώπιση της ασθένειας, συνίσταται η απομάκρυνση των μολυσμένων φυτικών τμημάτων της καλλιέργειας, η χρήση μυκητοκτόνων αμέσως μετά την εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων, ενώ την πλέον ασφαλή και αποτελεσματική προσέγγιση αποτελεί η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών (Taylor et al., 2007).

Η **σκληρωτινίαση** προκαλείται από τον μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum*, ο οποίος αποτελεί παθογόνο εδάφους, ικανό να επιβιώνει με τη μορφή μυκηλίων στους σπόρους της φακής. Αναφορικά με τα συμπτώματα, προκαλεί σήψεις στις ρίζες, στο λαιμό και στους βλαστούς των φυτών της φακής και ευνοείται σε συνθήκες υψηλής υγρασίας. Πριν το στάδιο της ανθοφορίας, παρατηρείται η ανάπτυξη μυκηλιακών υφών με τη μορφή βαμβακιού, ενώ σε διάστημα 2-4 ημερών παρατηρείται ο σχηματισμός μαύρων σκληρωτίων. Τα σκληρώτια διατηρούνται στο έδαφος για αρκετά χρόνια και μπορούν να αποτελέσουν εστία μόλυνσης. Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην περιοχή της Θεσσαλίας τα έτη 2012 και 2013 κατέδειξαν μείωση

παραγωγής μεγαλύτερης του 70 % εξαιτίας του παθογόνου. Η χρήση μυκητοκτόνων φαίνεται να επιδρά θετικά στον περιορισμό της ασθένειας καθώς επίσης και η χρήση υγιούς απαλλαγμένου από την ασθένεια σπόρου (Vagelas, 2014).

Η **φουζαρίωση** προκαλείται από τον μύκητα *Fusarium oxysporum* Schlecht. Emend Snyder and Hansen f. sp. *lentis* Vasudeva and Srinivasan (Fol) και αποτελεί την πλέον επιζήμια ασθένεια της φακής (Eujayl et al., 1988; Erskine and Bayaa, 1996; Bayaa et al., 1997; Al-Husien et al., 2007; Parihar et al., 2017; Hiremani and Dubey, 2018; Koleva et al., 2018; Soomro et al., 2018; Desai et al., 2019). Η ασθένεια ευδοκμεί σε θερμοκρασία 22-25 °C και μπορεί να προσβάλλει τη φακή σε όλα τα στάδια ανάπτυξης (Taylor et al., 2007; Tiwari et al., 2018). Είναι διαδεδομένη σχεδόν σε όλες τις χώρες καλλιέργειας της φακής και δύναται να προκαλέσει ολοκληρωτική καταστροφή της καλλιέργειας υπό ευνοϊκές για την ανάπτυξη της ασθένειας συνθήκες (Erskine and Bayaa, 1996; Eujayl et al., 1998; Al-Husien et al., 2017; Koleva et al., 2018).

## 1.8 Φουζαρίωση φακής

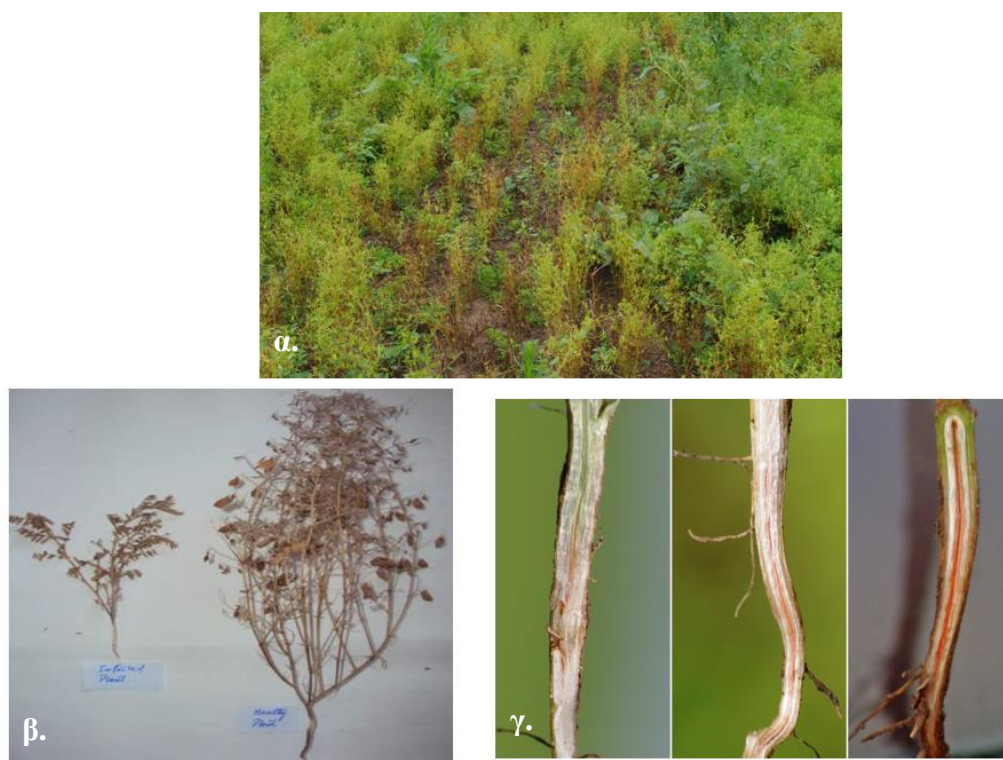
### 1.8.1. Γενικά

Το παθογόνο, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*, αναφέρθηκε για πρώτη φορά στην Ουγγαρία και έκτοτε εμφανίστηκε σε πολλές χώρες, συμπεριλαμβανομένου της Ινδίας, των ΗΠΑ, της Τσεχοσλοβακίας, της πρώην Σοβιετικής ένωσης, της Βραζιλίας, της Γαλλίας, της Αργεντινής, του Μπαγκλαντές, της Τουρκίας, της Συρίας, της Μιανμάρ (Βιρμανία), του Πακιστάν, του Νεπάλ, της Αιθιοπίας, της Αιγύπτου και της Ιταλίας (Tiwari et al., 2018). Παρόλο που οι μολύνσεις από σπόρο είναι αρκετά διαδεδομένες (Taylor et al., 2007), πρόκειται για παθογόνο εδάφους, με διάφορους τρόπους αναπαραγωγής όπως τα μικροκονίδια, τα μακροκονίδια και τα γλαμυδοσπόρια (Arya and Kushwaha, 2018). Τα γλαμυδοσπόρια μπορούν να επιβιώνουν στο έδαφος είτε σε αδρανή μορφή, είτε σαπροφυτικά για αρκετά χρόνια, χωρίς την παρουσία ξενιστή. Αναφορικά με την επιδημιολογία της, η ασθένεια ευνοείται από συνθήκες θερμού και ξηρού καιρού, με βέλτιστη θερμοκρασία τους 22 °C-25 °C (Taylor et al., 2007).

### 1.8.2. Συμπτωματολογία

Το παθογόνο έχει την ικανότητα να προσβάλλει τα φυτά της φακής σε όλα τα στάδια ανάπτυξής τους, από το φύτευμα μέχρι την καρποφορία (Εικόνα 1.4). Συνήθως εμφανίζεται είτε στο στάδιο της ανθοφορίας είτε στο στάδιο γεμίσματος του λοβού. Τα συμπτώματα του υπέργειου τμήματος περιλαμβάνουν μαρασμό των κορυφαίων φύλλων, το οποίο συγχέεται συνήθως με το σύμπτωμα της έλλειψης νερού, καθώς και συρρίκνωση και συστροφή των φύλλων, οι οποίες

ξεκινούν από τα κατώτερα φύλλα και προοδευτικά επεκτείνονται προς τα ανώτερα, επηρεάζοντας τελικά όλα τα φυτικά μέρη του προσβεβλημένου φυτού. Ολόκληρο το φύλλωμα του φυτού ή μεμονωμένα κλαδιά αποκτούν από θαμπό πράσινο έως κίτρινο χρωματισμό, με αποτέλεσμα το μεγαλύτερο μέρος του φυτού να ξεραίνεται (Taylor et al., 2007). Αναφορικά με το υπόγειο μέρος του φυτού, στο ριζικό σύστημα παρατηρείται μειωμένη ανάπτυξη τόσο των πλευρικών ριζών όσο και της δημιουργίας φυματίων. Η προσβολή των πλευρικών ριζών έχει ως αποτέλεσμα τη μερική μάρανση του φυτού, ενώ η προσβολή της πασσαλώδους ρίζας μπορεί να προκαλέσει τη μάρανση ολόκληρου του φυτού. Ως αποτέλεσμα, τα φυτά χαρακτηρίζονται από μειωμένη αύξηση και ανάπτυξη που συχνά οδηγεί σε υποβάθμιση του παραγόμενου προϊόντος ή ακόμη και ολοκληρωτική καταστροφή της παραγωγής. Όταν η προσβολή πραγματοποιείται κατά το στάδιο πλήρωσης του λοβού, οι σπόροι συχνά συρρικνώνονται (Desai et al., 2019), ενώ όταν λαμβάνει χώρα στο στάδιο του φυτρώματος παρατηρείται σάπισμα του σπόρου, απότομη μάρανση και τελικά νέκρωση του φυτού (Taylor et al., 2007). Σε πολύ ευαίσθητους γονοτύπους, τα φυτά μπορούν να εμφανίσουν συμπτώματα σε διάστημα 2-3 ημερών. Τέλος, μπορεί να παρατηρηθεί μερική μάρανση, η οποία επηρεάζει μόνο τη μία πλευρά του φυτού (ημιπληγία) (Desai et al., 2019).



**Εικόνα 1.4:** α) Προσβεβλημένος αγρός φυτών φακής από το παθογόνο *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lentis* (Πηγή: <https://www.legumematrix.com/>). β) Φυτό ελέγχου (δεξιά) και προσβεβλημένο φυτό από *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* (αριστερά) (Πηγή: Soomro et al., 2008) γ) Χαρακτηριστικός μεταχρωματισμός του αγγειακού συστήματος της φακής μετά από προσβολή από *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* (Πηγή: <https://www.legumematrix.com/>).

### 1.8.3. Καταπολέμηση της ασθένειας

Στο πλαίσιο αντιμετώπισης της ασθένειας έχουν προταθεί διαφορετικές ή/και συμπληρωματικές προσεγγίσεις. Αρχικά, συνίσταται η χρήση υγιούς και απαλλαγμένου από το παθογόνο σπόρου (Taylor et al., 2007). Επιπλέον, εφαρμόζονται διάφορες καλλιεργητικές πρακτικές, όπως η αμειψισπορά και η επιλογή πρώιμων ποικιλιών. Η αμειψισπορά εφαρμόζεται συχνά χωρίς ωστόσο να κρίνεται ιδιαίτερα αποτελεσματική λόγω της φύσης του παθογόνου μύκητα, ο οποίος μπορεί και επιβιώνει στο έδαφος για αρκετά χρόνια μέσω των χλαμυδοσπορίων (Rafique et al., 2016). Από την άλλη πλευρά, η επιλογή πρώιμων ποικιλιών που ωριμάζουν πριν την επικράτηση ευνοϊκών για την ασθένεια καιρικών συνθηκών, είναι δυνατόν να συμβάλει ουσιαστικά στην αντιμετώπιση της ασθένειας. Ωστόσο, οι ευνοϊκές ημερομηνίες για την ανάπτυξη του μύκητα ποικίλλουν ανάλογα με την περιοχή καλλιέργειας. Η χρήση χημικής καταπολέμησης, τόσο σε *in vitro* δοκιμές όσο και θερμοκηπιακές καλλιέργειες, αποδείχθηκε αποτελεσματική έναντι του παθογόνου, ωστόσο οι εφαρμογές στο χωράφι δεν είναι πάντοτε το ίδιο αποτελεσματικές εξαιτίας τόσο του υψηλού κόστους όσο και της τεχνικής δυσκολίας της ενσωμάτωσης των χημικών ουσιών κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου (Taylor et al., 2007). Τέλος, ο βιολογικός έλεγχος του παθογόνου με τη δράση άλλων ανταγωνιστικών οργανισμών, όπως τα είδη του γένους *Trichoderma*, θεωρείται ιδιαίτερα αποτελεσματικός (Rafique et al., 2016). Επίσης, σημαντική μείωση των δυσμενών επιπτώσεων της ασθένειας, και ταυτόχρονη αύξηση του μήκους της ρίζας και της ανάπτυξης του φυτού, επιτυγχάνεται με τη χρήση του ανταγωνιστικού βακτηρίου *Bacillus subtilis*. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα και η πρακτική εφαρμογή του βιολογικού ελέγχου στο χωράφι βρίσκεται υπό μελέτη (Taylor et al., 2007).

Αν και τα παραπάνω έχουν συνδράμει μερικώς στην αντιμετώπιση της ασθένειας, η πλέον αποτελεσματική, οικονομική και συγχρόνως αειφορική στρατηγική για την διαχείριση της φουζαρίωσης είναι η δημιουργία ανθεκτικών ποικιλιών. Παρότι έχουν δημιουργηθεί ποικιλίες με ανθεκτικότητα ή μερική ανθεκτικότητα στη φουζαρίωση οι αποκρίσεις αυτών δεν είναι σταθερές στις διάφορες αγρο-κλιματικές συνθήκες, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη γενετικής παραλλακτικότητας στον παθογόνο παράγοντα (Hiremani and Dubey, 2018). Ως εκ τούτου, η εκτίμηση της υπάρχουσας παραλλακτικότητας αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση ώστε να καταστεί εφικτή η δημιουργία νέων ανθεκτικών ποικιλιών προς αντικατάσταση των υπάρχουσών ευαίσθητων ποικιλιών φακής. Η αναβάθμιση της ανθεκτικότητας στην ασθένεια της φουζαρίωσης αποτελεί σημαντικό στόχο των βελτιωτικών προγραμμάτων της φακής.

#### 1.8.4. Γενετική παραλλακτικότητα του παθογόνου

Το *Fusarium oxysporum* sp. περιλαμβάνει ποικίλες φυλές, οι οποίες διαφέρουν γενετικά ή φαινοτυπικά ως προς την παθογένειά τους, και απαντώνται σε ένα ευρύ φάσμα οικοσυστημάτων. Οι περισσότερες μελέτες έχουν επικεντρωθεί σε παθογόνες φυλές που προσβάλλουν φυτά, οι οποίες ξεπερνούν τις 120. Εξαιτίας του μεγάλου αριθμού ξενιστών, το παθογόνο διαθέτει ένα πλήθος ειδικών φυλών - *formae speciales* (ff. spp). Αξιοσημείωτο είναι ότι μεταξύ ξενιστή και παθογόνου υπάρχει υψηλός βαθμός εξειδίκευσης (Kang et al., 2014), με το *Fusarium oxysporum* sp. *lentis* (*Fol*) να εμφανίζει ιδιαίτερα περιορισμένο εύρος ξενιστών καθώς μολύνει μόνο τη φακή. Σε μελέτες τεχνητής μόλυνσης με *Fol*, δεν κατέστη δυνατή η μόλυνση πλήθους ξενιστών, συμπεριλαμβανομένου του αμπελοφάσουλου, του πράσινου φασολιού, του ρεβιθιού, του μπιζελιού και της σόγιας (Taylor et al., 2007).

Πρόσφατες μελέτες έχουν αποκαλύψει υψηλή γενετική ποικιλομορφία μεταξύ των απομονώσεων του *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* (Mohammadi et al. 2011; Al-Husien et al. 2017; Hiremani and Dubey, 2019). Στο επίπεδο αυτό, έχουν ταυτοποιηθεί 7 παθότυποι, οι οποίοι προέρχονται από το Ιράν, τη Συρία και την Αλγερία (Hiremani and Dubey, 2019) και 8 φυλές/παθότυποι από την Ινδία (Hiremani and Dubey, 2018). Η ανάλυση της γενετικής δομής και παραλλακτικότητας των πληθυσμών του *Fol* έχει προσεγγιστεί με πληθώρα μεθόδων, συμπεριλαμβανομένου των ομάδων βλαστικής συμβατότητας και ποικίλων γονιδιωματικών αναλύσεων, όπως του διαγονιδιακού διαστήματος IGS (intergenic spacer) και μοριακών δεικτών τύπου ISSRs (inter- simple sequence repeat), SSRs (simple sequence repeat), RAPDs (random amplified polymorphic DNA) και AFLPs (amplified fragment length polymorphism) καθώς και με τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του rDNA (ριβοσωμικού DNA) (Pouralibaba et al., 2019).

Πέραν των κλασικών μελετών ταξινόμησης και γενετικής δομής πληθυσμών, τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί διάφορες μοριακές τεχνικές, συμπεριλαμβανομένων αυτών που βασίζονται στην PCR, για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των μυκήτων. Αρκετές από αυτές αξιοποιούν τη νουκλεοτιδική παραλλακτικότητα εντός της rDNA περιοχής. Στο πλαίσιο αυτό, προηγούμενες μελέτες έχουν αναδείξει τη συσχέτιση DNA και RFLPs πολυμορφισμών εντός της ITS περιοχής με συγκεκριμένα γένη ή είδη μυκήτων. Παράλληλα, έχουν σχεδιαστεί DNA ανιχνευτές, βάσει της rDNA αλληλουχίας, οι οποίοι επιτρέπουν την ανίχνευση συγκεκριμένων μυκήτων, μέσω υβριδισμού στο ITS PCR προϊόν (Glass and Donaldson, 1995). Η ανάλυση ομαδοποίησης αποτελεί ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο για την εκτίμηση της παραλλακτικότητας των πληθυσμών του *Fusarium* spp. και επιτυγχάνεται μέσω αλληλούχισης



συντηρημένων γονιδίων. Σχετικά με το *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*, μέχρι σήμερα δεν έχει προσδιοριστεί ειδικός διαγνωστικός δείκτης. Ωστόσο, οι πλέον χρησιμοποιούμενες αλληλουχίες που αξιοποιούνται για την ταυτοποίηση ειδών του γένους *Fusarium* είναι αυτές που αντιστοιχούν στα γονίδια που κωδικοποιούν τους μεταγραφικούς παράγοντες επιμήκυνσης *TEF* (Bogale et al., 2007; Dubey et al., 2014; O'Donnell et al., 2015; Rafique et al. 2015; Hiremani and Dubey, 2019). Ειδικότερα, η αλληλουχία που αντιστοιχεί στο γονίδιο *TEF-1a* παρουσιάζει υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού και έχει αξιοποιηθεί για τον σχεδιασμό δεικτών ειδών, καθώς και για την ανίχνευση, ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση παθογόνων πληθυσμών του γένους *Fusarium* (Bogale et al., 2007; Dubey et al., 2014; Rafique et al. 2015). Τα γονίδια *b-tubulin* (Glass and Donaldson, 1995; Chandra et al., 20011; Dubey et al., 2014; Nosratabadi et al., 2018) και *calmodulin* (O'Donnell et al., 2000; Mulè et al., 2004; Chandra et al., 2011) θεωρούνται επίσης κατάλληλα για την ανίχνευση και τη διάκριση των ειδών του γένους *Fusarium* (Glass and Donaldson, 1995; O'Donnell et al., 2000; Mulè et al., 2004; Chandra et al., 20011; Dubey et al., 2014; Nosratabadi et al., 2018).

#### 1.8.5. Βελτίωση για ανθεκτικότητα έναντι της φουζαρίωσης

Στο πλαίσιο διαχείρισης της φουζαρίωσης, πρώτο μέλημα αποτελεί η ανάπτυξη αξιόπιστων και εύκολα αναπαραγόμενων μεθόδων ανίχνευσης του παθογόνου, ώστε να καταστεί εφικτή η αξιολόγηση ενός μεγάλου αριθμού γονοτύπων (άγριων και καλλιεργήσιμων) τόσο σε συνθήκες αγρού όσο και σε συνθήκες θερμοκηπίου. Παραδοσιακά, η δημιουργία ανθεκτικών ποικιλιών αποτελεί βασικό στόχο του προγράμματος βελτίωσης της φακής στο ICARDA, που θεωρείται ως το πλέον δραστήριο Ινστιτούτο στη διεξαγωγή σχετικών βελτιωτικών προγραμμάτων. Η συστηματική χρήση πηγών ανθεκτικότητας, προερχόμενων από καλλιεργούμενες καταχωρήσεις όπως “ILL 5883”, “ILL 5588”, “ILL 4400” και “ILL 590”, έχει οδηγήσει στη δημιουργία ανθεκτικών στη φουζαρίωση ποικιλιών που καλλιεργούνται σε χώρες όπως Συρία (“Idleb 2”, “Idleb 3”, “Idleb 4” και “Ebla 1”), Λίβανος (“Talya 2”, “Rachayya” και “Hala”), Τουρκία (“Firat 87” και “Syran 96”), Αιθιοπία (“Aada”, “Alemaya”, “Assano”, “Alemtena” και “Teshale”), Ιράν (“Kimiya”) και Ιράκ (“IPA 98”). Στην Ινδία, έχουν δημιουργηθεί, υπό την αιγίδα εθνικού προγράμματος, και διατίθεται εμπορικά πληθώρα ανθεκτικών ποικιλιών, όπως “L 4147”, “Pant L 406”, “Pant L 4”, “Pant L 639”, “Priya”, “Seri”, “JL3”, “Noori” και “VL 507” (Tiwari et al., 2018).

Για τον προσδιορισμό ανθεκτικών ποικιλιών στο *Fusarium oxysporum* f.sp.*lentis* έχει προταθεί η αξιολόγηση των ποικιλιών τόσο σε συνθήκες αγρού όσο και σε ελεγχόμενες συνθήκες (συνθήκες θερμοκηπίου και εργαστηρίου). Υπό συνθήκες αγρού, η γονοτυπική αξιολόγηση

πραγματοποιείται υπό συνθήκες υψηλής έντασης του φυσικού μολύσματος (*Fol*). Η πλέον συνήθης μέθοδος αξιολόγησης και επιλογής ανθεκτικών στη φουζαρίωση ποικιλιών είναι η Wilt Sick Plot (WSP), η οποία αξιοποιείται τόσο από το ICARDA όσο και τη NARS. Σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η δυνατότητα ευχερούς αξιολόγησης μεγάλου αριθμού γονοτύπων. Στο πλαίσιο αυτό, προηγούμενες έρευνες έχουν επιτρέψει την αξιολόγηση συλλογής, αποτελούμενης από 577 σειρές από 33 χώρες (Bayaa et al., 1997), και ανέδειξαν την υπεροχή αυτών που προέρχονταν από τη Χιλή, την Αίγυπτο, την Ινδία, το Ιράν και τη Ρουμανία (Tiwari et al., 2018). Στην Ελλάδα, η μέθοδος WSP αξιοποιήθηκε για την αξιολόγηση 20 ποικιλιών ως προς την ανθεκτικότητα στο *Fol*, χρησιμοποιώντας 3 πυκνότητες σποράς. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η ανθεκτική ποικιλία ILL 590. Τα αποτελέσματα της μελέτης κατέδειξαν ότι η αξιολόγηση υπό συνθήκες χαμηλής πυκνότητας σποράς παρέχει τη δυνατότητα αξιόπιστης επιλογής των *Fol*-ανθεκτικών γονοτύπων. Επιπλέον, εξήχθησε το συμπέρασμα πως το ποσοστό των *Fol*-προσβεβλημένων φυτών (dwr %) αποτελεί έναν κατάλληλο δείκτη εκτίμησης της ανθεκτικότητας των elite ποικιλιών, ενώ το δυναμικό παραγωγής (PYP) αποτελεί το πλέον αποτελεσματικό κριτήριο αξιολόγησης ετερογενούς γενετικού υλικού (Vlachostergios and Roupakias, 2017).

Παράλληλα, στο πλαίσιο αξιολόγησης και προσδιορισμού των *Fol*-ανθεκτικών γονοτύπων, έχουν αναπτυχθεί ποικίλες μέθοδοι τεχνητών μολύνσεων. Σύμφωνα με τους Konacikona και Suchanek (1993), τεχνητή μόλυνση μπορεί να επιτευχθεί με διάτρηση του μίσχου, αμέσως μετά το σχηματισμό των πρώτων φύλλων (συνήθως 10 ημέρες μετά τη φύτευση), και στη συνέχεια έγχυση του μολύσματος σε ενέσιμη μορφή στην περιοχή αυτή. Σύμφωνα με άλλες μελέτες, αποτελεσματική μόλυνση επιτυγχάνεται με τομή των φυτών, που βρίσκονται στο στάδιο των 2-4 φύλλων (περίπου 10 έως 12 ημέρες μετά τη φύτευση), αφαίρεση περίπου 5 εκατ. από το υπάρχον ριζικό σύστημα και εμφύτευσή τους σε εναιώρημα σπορίων (Omar et al., 1988), ενώ οι Erskine και Bayaa (1990) εφάρμοσαν απλή εμφύτευση των ριζών νεαρών φυτών φακής (7 ημέρες μετά την φύτευση) σε εναιώρημα σπορίων, χωρίς να προηγηθεί τομή. Τέλος, έχει προταθεί η σπορά υγιών και απολυμασμένων σπόρων σε *Fol*-προσβεβλημένο έδαφος (Infantino et al., 2006).

Με στόχο την αξιολόγηση 196 γονοτύπων φακής ως προς την ανθεκτικότητα έναντι του παθογόνου *Fol*, οι ερευνητές Pouralibaba et al. (2015) εφάρμοσαν την μέθοδο τεχνητής μόλυνσης που αναπτύχθηκε από τους Omar et al. (1988) και, έπειτα από μεταφύτευση σε δοχεία με αποστειρωμένο περλίτη, τα φυτά αναπτύχθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών και αξιολογήθηκαν με χρήση βαθμονομικής κλίμακας. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν φυτά τα οποία εμφυτεύτηκαν, σύμφωνα με την ίδια διαδικασία, σε αποστειρωμένο νερό.

Ειδικότερα, η αξιολόγηση της συμπτωματολογίας έγινε με τη χρήση τετραψήφιας κλίμακας ως ακολούθως: 0 = απουσία συμπτωμάτων, 1 = ελαφρύ κιτρίνισμα στην επιφάνεια του ελάσματος, 2 = κίτρινη επιφάνεια ελάσματος, 3= φύλλο με συμπτώματα μαρασμού/καρουλιάσματος/ξήρανση/αποφύλλωση. Προκειμένου να χαρακτηριστούν όλα τα πιθανά πρότυπα της ασθένειας, η αξιολόγηση των συμπτωμάτων πραγματοποιήθηκε σε μεμονωμένα φύλλα και αφορούσε σε αυτά του κεντρικού στελέχους, αφού είχε προηγηθεί αφαίρεση των υπολοίπων. Η αξιολόγηση της συμπτωματολογίας ξεκίνησε με την εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων (περίπου 10 ημέρες μετά τη μόλυνση) και στη συνέχεια εκτελούνταν σε εβδομαδιαία βάση για διάστημα 45 ημερών. Έπειτα, ακολούθησε γονοτυπική αξιολόγηση σε συνθήκες αγρού, η οποία βασίστηκε στην εκτίμηση του ποσοστού νεκρών φυτών ανά γραμμή σποράς, κατά το αναπαραγωγικό στάδιο, ενώ η ευαίσθητη ποικιλία είχε φτάσει ποσοστό θνησιμότητας 50 %. Προκειμένου να εξομαλυνθούν τυχόν διαφορές που σχετίζονταν με το μολυσματικό φορτίο του εδάφους, έγινε διόρθωση με τη μέση τιμή που προέκυψε από τις δύο γραμμές της ευαίσθητης ποικιλίας. Τα ευρήματα κατέδειξαν την ύπαρξη υψηλής συσχέτισης μεταξύ των αξιολογήσεων εργαστηρίου και αγρού, παρέχοντας σημαντικές ενδείξεις σχετικά με την αξιοπιστία των αξιολογήσεων της ανθεκτικότητας έναντι της φουζαρίωσης υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Επιπλέον, η μέθοδος παρείχε τη δυνατότητα εκτίμησης της εξέλιξης της συμπτωματολογίας στο χρόνο. Βάσει των δεικτών AUDPC (εμβαδόν κάτω από την καμπύλη προόδου της ασθένειας) και RAUDPC (σχετική τιμή του εμβαδού κάτω από την καμπύλη προόδου της ασθένειας), προέκυψε το συμπέρασμα ότι τα φυτά που χαρακτηρίζονταν από καθυστερημένη εκδήλωση συμπτωμάτων επηρεάζονται σε μικρότερο βαθμό από την ασθένεια. Αξιοσημείωτο είναι ότι τα συνολικά αποτελέσματα της μελέτης υπογραμμίζουν τη δυνατότητα διεξαγωγής πρόωμης επιλογής *Fol*-ανθεκτικών γονοτύπων, συμβάλλοντας ουσιαστικά στην αναβάθμιση και επιτάχυνση των σχετικών βελτιωτικών προγραμμάτων (Pouralibaba et al., 2015).

## 1.9 Μεταβολομική ανάλυση

Τα φυτά διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα αμυντικών μηχανισμών προκειμένου να αποτρέψουν την είσοδο και αναπαραγωγή των παθογόνων εντός του φυτικού τους ιστού, αποτρέποντας την εκδήλωση ασθένειας. Το πρώτο επίπεδο άμυνας των φυτών αφορά στη θεμελιώδη - προϋπάρχουσα άμυνα (παθητικό αμυντικό σύστημα), ενώ σε δεύτερο επίπεδο τα φυτά αναπτύσσουν την επαγόμενη άμυνα. Η επαγόμενη άμυνα ενεργοποιείται είτε έπειτα από την αναγνώριση του παθογόνου (επαγόμενη επίκτητη αντοχή) είτε από τα βακτήρια της ριζόσφαιρας (επαγόμενη διασυστηματική αντοχή) και έχει ως αποτέλεσμα τη ρύθμιση αμυντικών αντιδράσεων. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η επαγόμενη άμυνα μπορεί να

προκληθεί από φυσικές ή συνθετικές ενώσεις, έπειτα από επίθεση από παθογόνο μικροοργανισμό. Οι αντιδράσεις αυτές περιλαμβάνουν επαγωγή ουσιών όπως οι ολιγοσακχαρίτες, οι γλυκοζίτες, τα αμίδια, οι βιταμίνες, τα καρβοξυλικά οξέα και οι αρωματικές ενώσεις (Camañes et al., 2015).

Το συνολικό μεταβόλωμα των ανώτερων φυτών εκτιμάται ότι συνίσταται από περισσότερους από 100.000 πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες με μόλις το 10 % αυτών περίπου να έχει ανιχνευθεί. Πολλοί εξ αυτών αποτελούν βασικά συστατικά της άμυνας του φυτού και ταυτόχρονα αποτελούν πλούσια πηγή βιονεργών συστατικών που μπορεί να αξιοποιηθούν ως λειτουργικοί δείκτες για ταυτοποίηση και επιλογή ανθεκτικού γενετικού υλικού (Aliferis and Jabaji, 2012). Τα τελευταία χρόνια, ολοένα και περισσότερα ερευνητικά δεδομένα υπογραμμίζουν ότι τα επίπεδα των μεταβολιτών μπορούν να θεωρηθούν ως η απόλυτη αντίδραση των βιολογικών συστημάτων στις γενετικές και περιβαλλοντικές αλλαγές (Fiehn, 2002; Rubiales et al., 2014). Στο πλαίσιο αυτό, η ανάλυση των μεταβολιτών που συμμετέχουν στις κυτταρικές διαδικασίες μπορεί να συνεισφέρει στην αποσαφήνιση των κυτταρικών μεταβολικών διεργασιών (Kumar et al., 2017), καθώς και στην κατανόηση των βιοχημικών μονοπατιών που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα έναντι καταπονήσεων (Rubiales et al., 2014).

Η ποιοτική και ποσοτική σύσταση του φυτικού μεταβολώματος αντανακλά το γονιδίωμα των φυτικών οργανισμών, τη φυσιολογική κατάσταση και τις αποκρίσεις τους σε βιοτικά και αβιοτικά ερεθίσματα, εκφράζοντας τη σχέση μεταξύ γονότυπου και φαινότυπου (Fiehn, 2002). Ωστόσο, η πολυπλοκότητα και ποικιλότητα του φυτικού μεταβολώματος συχνά καθιστά δυσχερή την ανίχνευση και ποσοτικοποίησή τους, οι οποίες απαιτούν την ανάπτυξη και εφαρμογή εξειδικευμένων πρωτοκόλλων. Μέχρι σήμερα, δεν έχει αναπτυχθεί εξειδικευμένο πρωτόκολλο ή/και ειδικός αναλυτής για την ανίχνευση του πλήρους φάσματος των μεταβολιτών που απαντώνται στους φυτικούς ιστούς.

Η μεταβολομική (metabolomics) αποτελεί αδιαμφισβήτητα ένα ισχυρό βιοαναλυτικό εργαλείο για την ολοκληρωμένη ανάλυση και παρακολούθηση του μεταβολισμού του φυτού, ενώ ταυτόχρονα αποτελεί μια ενδιαφέρουσα μέθοδο για την μελέτη της αντοχής των φυτών σε ασθένειες, παράσιτα αλλά και αβιοτικές καταπονήσεις. Στα ψυχανθή, η μεταβολομική έχει αξιοποιηθεί για τη μελέτη των συμβιωτικών αλληλεπιδράσεων με ριζόβια βακτήρια (Rubiales et al., 2014), την προσαρμογή / ανοχή τους σε αβιοτικές καταπονήσεις, όπως αλατότητα (Skliros et al., 2018), ξηρασία και έλλειψη ή περίσσεια θρεπτικών συστατικών (Rubiales et al., 2014) καθώς και τη μελέτη της άμυνας έναντι παθογόνων μικροοργανισμών. Αναφορικά με

συστήματα ξενιστών-παθογόνων μυκήτων έχει διεξαχθεί πληθώρα ερευνών, συμπεριλαμβανομένου των αλληλεπιδράσεων *Colletotrichum*-λούπινο (Muth et al., 2009; Wojakowska et al., 2013), *Rhizoctonia*-σόγια (Aliferis et al., 2014), *Sclerotinia*-φασόλι (Robinson et al., 2018), *Phytophthora*-σόγια (Zhu et al., 2018) και *Sclerotinia*-σόγια (Ranjan et al., 2019). Αντίστοιχες έρευνες για το γένος *Fusarium* αφορούν στην αλληλεπίδραση φυτών με το είδος *graminearum* (Hamzehzarghani et al., 2005; Bollina et al., 2010; Kumaraswamy et al., 2011; Gunnaiah et al., 2012; Cajka et al., 2014), ενώ για τη φακή λείπουν ερευνητικά δεδομένα σχετικά με την αλληλεπίδρασή της με το είδος *F. oxysporum*. Ωστόσο, στη βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές σχετικά με την αξιοποίηση της μεταβολομικής για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης *F. oxysporum* -ρεβίθι (Kumar et al., 2015; Kumar et al., 2016).

Είναι αξιοσημείωτο ωστόσο, ότι η επιτυχής αξιοποίηση της μεταβολομικής προϋποθέτει την κατά περίπτωση εφαρμογή των κατάλληλων αναλυτικών τεχνικών. Η καταλληλότητα της μεθόδου εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως οι φυσικοχημικές ιδιότητες και η χημική σύνθεση των δειγμάτων, ο σκοπός της μελέτης και ο διαθέσιμος εξοπλισμός. Σήμερα διατίθεται πληθώρα αναλυτικών οργάνων που εξυπηρετούν διαφορετικούς ερευνητικούς σκοπούς, ωστόσο η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (nuclear magnetic resonance spectroscopy -NMR) και η φασματομετρία μάζας (mass spectrometry -MS) αποτελούν τον πλέον αξιοποιήσιμο εξοπλισμό σε μελέτες της μεταβολομικής (Lindon and Nicholson, 2008). Οι ανιχνευτές της τεχνολογίας MS παρέχουν υψηλότερα όρια ανίχνευσης σε σχέση με τους αντίστοιχους της τεχνολογίας NMR, ωστόσο στερούνται επαναληψιμότητας. Επιπρόσθετα, το κόστος αγοράς ενός απλού συστήματος MS, όπως ένας αναλυτής τετραπόλου (GC - MS), είναι αρκετά προσιτό σε σχέση με το υψηλό κόστος αγοράς της NMR. Οι τεχνολογίες αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας (GC-MS) συνιστούν τις πλέον διαδεδομένες πλατφόρμες μεταβολομικής ανάλυσης, παρέχοντας αξιόπιστες πληροφορίες για ένα μεγάλο εύρος μεταβολιτών που απαντώνται σε φυτικούς ιστούς σε σύντομο χρόνο (Fiehn, 2002).

## Σκοπός της εργασίας

Με δεδομένο ότι η ασθένεια της φουζαρίωσης, που προκαλείται από το παθογόνο *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis*, αποτελεί την πλέον καταστρεπτική ασθένεια για την καλλιέργεια της φακής παγκοσμίως, αντικείμενο της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής αποτέλεσε αρχικά η ταυτοποίηση του παθογόνου στις κύριες ζώνες καλλιέργειας στον ελλαδικό χώρο και η μελέτη των μηχανισμών που διέπουν την ανθεκτικότητα στην ασθένεια σε μεταβολικό επίπεδο. Για το σκοπό αυτό, επιμέρους στόχοι της διατριβής ήταν: i) η απομόνωση και ταυτοποίηση των απομονώσεων του *Fusarium* sp. σε ζώνες καλλιέργειας της φακής, ii) η επιλογή κατάλληλης απομόνωσης για την τεχνητή μόλυνση επιλεγμένων ποικιλιών φακής, που παρουσιάζουν διαφορετική απόκριση στην ασθένεια της φουζαρίωσης (ανθεκτική και ευαίσθητη), iii) η συγκριτική αξιολόγηση του μεταβολικού προφίλ των *Fol*-καταπονημένων και των φυτών μαρτύρων της ανθεκτικής και ευαίσθητης ποικιλίας φακής, τόσο σε επίπεδο ρίζας όσο και βλαστού και iv) η κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν το γνώρισμα της ανθεκτικότητας της φακής στη φουζαρίωση καθώς και ο προσδιορισμός πιθανών βιοδεικτών που σχετίζονται με το γνώρισμα για πιθανή αξιοποίησή τους ως διαγνωστικά εργαλεία για την έμμεση επιλογή ανθεκτικών γονοτύπων.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. Συλλογή εδαφικών δειγμάτων

Για την απομόνωση και ταυτοποίηση του παθογόνου μύκητα *Fusarium* spp. πραγματοποιήθηκε συλλογή 24 δειγμάτων εδάφους. Η δειγματοληψία έγινε από αγρούς οι οποίοι αντιπροσωπεύουν τις κύριες ζώνες καλλιέργειας της φακής στην Ελλάδα και τα φυτά παρουσίαζαν τα χαρακτηριστικά συμπτώματα της ασθένειας της φουζαρίωσης (Πίνακας 2.1). Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο της διδακτορικής διατριβής της υποψήφιας διδάκτορος Χρυσάνθης Φώτη κατά την καλλιεργητική περίοδο 2017- 2018. Για την αντιπροσωπευτικότερη συλλογή των δειγμάτων, αρχικά συλλέχθηκαν 8-10 υποδείγματα βάθους 5-6 cm, τα οποία κάλυπταν επαρκώς την έκταση των υπό δειγματοληψία αγρών και ακολούθησε μηχανική ανάμιξη, ώστε να προκύψει ένα ενιαίο δείγμα (bulk) ανά περιοχή συλλογής.

**Πίνακας 2.1:** Περιοχές συλλογής εδαφικών δειγμάτων με σκοπό την ταυτοποίηση των απομονώσεων του μύκητα του γένους *Fusarium*.

1	Ορεστιάδα (Αγρόκτημα ΔΠΘ)
2	Φλώρινα (Αγρόκτημα ΤΕΙ)
3	Θεσσαλονίκη (Αγρόκτημα ΑΠΘ)
4	Γρεβενά (Περιοχή Μαυρονέρι)
5	Εγκλουβή Λευκάδας (Περιοχή Κάμπος)
6	Εγκλουβή Λευκάδας (Περιοχή Πρίμος)
7	Λάρισα (Περιοχή Δίλοφος)
8	Λάρισα (ΕΘΙΑΓΕ- ΙΚΦ)

### 2.2. Απομόνωση του μύκητα *Fusarium* spp.

Για την απομόνωση του μύκητα από τα εδαφικά δείγματα, παρασκευάστηκε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Park (1963). Η σύσταση του εκλεκτικού υποστρώματος περιγράφεται στον Πίνακα 2.2. Μετά από αποστείρωση, το εκλεκτικό υπόστρωμα τοποθετήθηκε σε τριβλία, όπου προστέθηκαν 0,2 g χώματος ανά εδαφικό δείγμα (Εικόνα 2.1α).

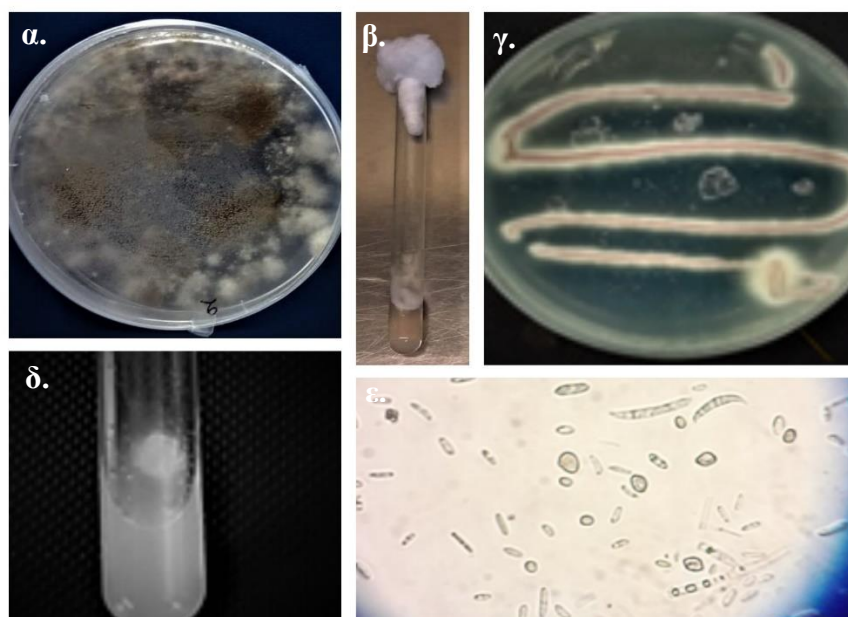
Έπειτα από επώαση 5 ημερών, σε θερμοκρασία 25 °C με 12h φως / 12h σκοτάδι, παρατηρήθηκε η ανάπτυξη των χαρακτηριστικών λευκών – ροζ υφών του μύκητα. Οι υφές του παθογόνου μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες, οι οποίοι περιείχαν PDA (15g σουκρόζη, 200g πατάτα και 15g άγαρ) (Εικόνα 2.1β). Προκειμένου να επιτευχθεί η ανάπτυξη μονόσπορης αποικίας, πραγματοποιήθηκε εκ νέου μεταφορά των ανεπτυγμένων υφών με επίστρωση

(streaking) σε τριβλία Petri (Εικόνα 2.1γ) που περιείχαν PDA. Έπειτα από επώαση 3 ημερών, έγινε μεταφορά των μονόσπορων αποικιών σε νέους δοκιμαστικούς σωλήνες με PDA, με στόχο τη δημιουργία μονόσπορων καλλιέργειών του μύκητα *Fusarium* spp. (Εικόνα 2.1δ). Οι παραπάνω διαδικασίες έγιναν υπό ασηπτικές συνθήκες εντός του θαλάμου νηματικής ροής.

**Πίνακας 2.2:** Η σύσταση του εκλεκτικού θρεπτικού υποστρώματος.

Θρεπτικό υλικό	Ποσότητα (g/L)
NaNO <sub>3</sub>	2
K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ,	0.3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.5
Galactose	10
Άγαρ	15

Ακολούθησε η δημιουργία παρασκευάσματος προκειμένου να ταυτοποιηθεί μικροσκοπικά ο μύκητας *Fusarium* spp. Μέσω μικροσκοπικής παρατήρησης, επιβεβαιώθηκε η παρουσία των χαρακτηριστικών μονοκύτταρων και πολυκύτταρων κυρτού σχήματος κονιδίων του μύκητα (Εικόνα 2.1ε).



**Εικόνα 2.1:** Απομόνωση και μικροσκοπική ταυτοποίηση του μύκητα *Fusarium* spp. α. Μεταφορά δείγματος χώματος σε εκλεκτικό θρεπτικό μέσο. β. Μεταφορά των υφών του μύκητα σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν PDA. γ. Επίστρωση των υφών του μύκητα σε τριβλία Petri που περιέχουν PDA. δ. Μονόσπορη καλλιέργεια του μύκητα *Fusarium* spp. και ε. Μικροσκοπική παρατήρηση και ταυτοποίηση του μύκητα μέσω των χαρακτηριστικών μονοκύτταρων και πολυκύτταρων κυρτού σχήματος κονιδίων.



## 2.3. Μοριακή ταυτοποίηση του μύκητα *Fusarium* spp.

### 2.3.1. Εξαγωγή DNA από καλλιέργειες του μύκητα του γένους *Fusarium* spp.

Η εξαγωγή του DNA του μύκητα πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Lodhi et al. (1994), με μικρές τροποποιήσεις όπως η απουσία χρήσης υγρού αζώτου. Για την ανάπτυξη των καλλιεργειών του μύκητα, λήφθηκε εμβόλιο από τις μονόσπορες καλλιέργειες, το οποίο τοποθετήθηκε σε κωνικές φιάλες των 100 ml που περιείχαν 50 ml θρεπτικού μέσου PDA. Ο εμβολιασμός των κωνικών φιαλών έγινε υπό ασηπτικές συνθήκες στην τράπεζα νηματικής ροής. Έπειτα από επώαση για διάστημα 8-10 ημερών, με συνεχή ανάδευση (150 στροφές) στους 24°C, ακολούθησε μεταφορά των καλλιεργειών του μύκητα σε σωλήνες φυγοκέντρησης των 50 ml και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 4500 στροφές για 10 λεπτά. Μετά την απόρριψη του υπερκείμενου, το μυκήλιο τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο χαρτί με σκοπό την απομάκρυνση της υγρασίας (Εικόνα 2.2).



**Εικόνα 2.2:** Μυκήλια τοποθετημένα σε αποστειρωμένο χαρτί με σκοπό την απομάκρυνση της υγρασίας.

Για την απομόνωση του DNA, 225 mg μυκηλίου ανά δείγμα τοποθετήθηκαν σε σωλήνες Eppendorf με χρήση αποστειρωμένης λαβίδας. Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος CTAB, το οποίο είχε προθερμαθεί στους 60 °C και ακολούθησε η ομογενοποίηση του δείγματος. Μετά την προσθήκη 25 mg PVPP25, πραγματοποιήθηκε εκ νέου ομογενοποίηση των δειγμάτων με σταδιακή προσθήκη 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος CTAB και τα ομογενοποιημένα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο για 25 λεπτά. Ακολούθησε ανάδευση μέσω vortex και τοποθέτηση των δειγμάτων σε πάγο. Ακολούθησε καθαρισμός των δειγμάτων με προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης: χλωροφορμίου (200: 200 μl), ελαφριά ανάδευση (δημιουργία γαλακτώματος) και φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, έγινε μεταφορά του υπερκείμενου, όγκου περίπου 400 μl, σε νέο eppendorf και εκ νέου τοποθέτηση σε πάγο. Ακολούθησε η προσθήκη 200 μl NaCl 5M και ελαφριά ανάδευση. Με σκοπό την κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων, έγινε προσθήκη 800 μl παγωμένης (-20 °C) αιθυλικής αλκοόλης 95 % και επώαση των δειγμάτων στους -20°C για 24 ώρες. Έπειτα από φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές για 10 λεπτά, έγινε απομάκρυνση της

αιθυλικής αλκοόλης και καθαρισμός του ιζήματος με προσθήκη 1 ml παγωμένης (- 20 °C) αιθυλικής αλκοόλης 70 %. Ακολούθησε εκ νέου φυγοκέντρηση, στις 13.000 στροφές για 5 λεπτά, και απομάκρυνση της αλκοόλης. Τέλος, έγινε επώαση του ιζήματος σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να επιτευχθεί εξάτμιση ενδεχόμενων υπολειμμάτων νερού και αιθυλικής αλκοόλης, και επαναδιάλυση με προσθήκη 30 μl mQ H<sub>2</sub>O. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και καθαρότητας του DNA πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια σπεκτροφωτόμετρου NanoDrop (Thermo Scientific).

### 2.3.2. Ενίσχυση γονιδιωματικού DNA μέσω PCR

Για την ταυτοποίηση των απομονώσεων του μύκητα *Fusarium* spp. πραγματοποιήθηκε ενίσχυση επιλεγμένων DNA αλληλουχιών μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction -PCR), χρησιμοποιώντας εξειδικευμένα για τα γονίδια ζεύγη εκκινητών (Πίνακας 2.3).

**Πίνακας 2.3:** Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των επιλεγμένων DNA αλληλουχιών του μύκητα *Fusarium* spp.

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία (5' → 3')	Tm (°C)	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Πηγή
<i>TEF</i>	EF1-For	ATGGGTAAGGARGACAAGAC	54	700	O'Donnell <i>et al.</i> , 1998b
<i>TEF</i>	EF2-Rev	GGARGTACCAGTSATCATGTT	54	700	O'Donnell <i>et al.</i> , 1998b
<i>calmodulin</i>	CL1-For	GARTWCAAGGAGGCCTTCTC	52	700	O'Donnell <i>et al.</i> , 2000
<i>calmodulin</i>	CL2A-Rev	TTTTTGCATCATGAGTTGGAC	52	700	O'Donnell <i>et al.</i> , 2000
<i>b-tubulin</i>	Bt2a-For	GGTAACCAAATCGGTGCT	50	350	Glass and Donaldson, 1995
<i>b-tubulin</i>	Bta2b-Rev	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	50	350	Glass and Donaldson, 1995

Η σύσταση του μίγματος της PCR ήταν η ακόλουθη: 1 μl DNA, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα, 0.25 μM από κάθε εκκινητή, 200 μM dNTPs, 1.25mM MgCl<sub>2</sub>, 1x Taq buffer, 1.25u Taq polymerase (GoTaq Flexi DNA polymerase, Promega) σε τελικό όγκο 30 μl. Το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή για την ενίσχυση των επιλεγμένων αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκε περιγράφεται στον Πίνακα 2.4.

Τέλος, τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 3% με ρυθμιστικό διάλυμα TAE (1X) για 2.5 ώρες στα 60V, ενώ για την χρώση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε

βρωμιούχο αιθίδιο. Τέλος, για τον έμμεσο προσδιορισμό του μεγέθους των προϊόντων ενίσχυσης χρησιμοποιήθηκε ο 100 bp DNA Ladder (NEB).

**Πίνακας 2.4:** Το πρόγραμμα της PCR που ακολουθήθηκε για την ενίσχυση των επιλεγμένων DNA αλληλουχιών.

Στάδια PCR	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	94°C	3 min	1
Αποδιάταξη	94°C	30 sec	30
Υβριδισμός	50-54°C	1 min	30
Σύνθεση	72°C	1 min	30
Τελική σύνθεση	72°C	5 min	1

### 2.3.3. Ανάκτηση DNA από πηκτή αγαρόζης

Για την ανάκτηση του DNA από πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε το QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αρχικά έγινε ζύγιση της ζώνης που περιείχε το προϊόν αναμενόμενου μεγέθους και ακολούθησε προσθήκη τριπλάσιου όγκου ρυθμιστικού διαλύματος QG. Ακολούθησε επώαση στους 50 °C για 5-10 λεπτά και κατόπιν προσθήκη 1x όγκου ισοπροπανόλης. Μετά από ήπια ανάδευση, έγινε τοποθέτηση του διαλύματος σε στήλη QIAquick Spin και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 λεπτό. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση του υποκείμενου διαλύματος, πλύση της στήλης με 750 µl διαλύματος QG και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 λεπτό. Μετά την απομάκρυνση του υποκείμενου διαλύματος, έγινε εκ νέου φυγοκέντρηση για 1 λεπτό. Κατόπιν, η στήλη τοποθετήθηκε σε νέο σωλήνα erpendorf και στη συνέχεια έγινε έκλουση του DNA με προσθήκη 30 µl ddH<sub>2</sub>O. Τέλος, πραγματοποιήθηκε επώαση για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 λεπτό.

### 2.3.4. Αλληλούχιση των προϊόντων ενίσχυσης και ταυτοποίηση του μύκητα *Fusarium* spp.

Αφού πραγματοποιήθηκε έμμεσος προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA σε πηκτή αγαρόζης, ακολούθησε αλληλούχιση των προϊόντων ενίσχυσης στη CEMIA DNA sequencing. Στη συνέχεια, έγινε σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που προέκυψαν με ήδη κατατεθειμένες αλληλουχίες σε διεθνείς βάσεις δεδομένων, χρησιμοποιώντας το εργαλείο ευθυγράμμισης BLAST (Basic Local Alignment Tool) του NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Τέλος, έγινε συγκριτική ευθυγράμμιση των γονιδίων (*TEF*, *calmodulin*, *b-tubulin*) με ομόλογες κατατεθειμένες δημοσιευμένες αλληλουχίες, με τη βοήθεια του λογισμικού MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>), και κατασκευή δένδρογραμμάτων με σκοπό την εκτίμηση της γενετικής συγγένειας.

## 2.4 Τεχνητές μολύνσεις

### 2.4.1 Γενετικό υλικό

Το γενετικό υλικό της φακής που χρησιμοποιήθηκε στις τεχνητές μολύνσεις αποτελούνταν από έναν ευαίσθητο και έναν ανθεκτικό στη φουζαρίωση γονότυπο φακής. Ως ανθεκτικός γονότυπος χρησιμοποιήθηκε η ποικιλία ILL-590 (Choudhary and Kumar, 2016; Vlachostergios and Roupakias, 2017; Tiwari et al., 2018) και ως ευαίσθητος η ποικιλία ILL-6031 (Chaudhry et al., 2008).

### 2.4.2 Ανάπτυξη φυτών

Σπόροι των επιλεγμένων γονοτύπων φακής απολυμάνθηκαν, μέσω εμβάπτισης σε διάλυμα χλωρίνης 10 % που περιείχε Tween-20 για 5 λεπτά υπό ήπια ανακίνηση, και ακολούθησαν 4x πλύσεις με αποστειρωμένο dH<sub>2</sub>O. Οι απολυμασμένοι σπόροι τοποθετήθηκαν σε τριβλία Petri όπου είχε προηγηθεί τοποθέτηση εμποτισμένου με αποστειρωμένο dH<sub>2</sub>O διηθητικού χαρτιού, προκειμένου να επιτευχθεί η προβλάστησή τους. Οι βλαστήσαντες σπόροι τοποθετήθηκαν σε φυτοδοχεία (6 x 6 x 8 cm) που περιείχαν αποστειρωμένο περλίτη (10 φυτοδοχεία/γονότυπο). Τα φυτά τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης (Θερμοκρασία: 26 ± 2°C, Φωτοπερίοδος: 12h φως / 12h σκοτάδι) έως ότου φτάσουν στο στάδιο των 4 φύλλων.

### 2.4.3 Προετοιμασία μολύσματος

Για την τεχνητή μόλυνση των νεαρών φυτών φακής χρησιμοποιήθηκε η απομόνωση 2.1, που προέρχεται από ζώνη καλλιέργειας της φακής στη Φλώρινα (Πίνακας 2.1). Η επιλογή της απομόνωσης έγινε βάσει της ομολογίας που παρουσίασε με ομόλογες κατατεθειμένες αλληλουχίες του παθογόνου *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis* σε διεθνείς βάσεις δεδομένων. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί ανάπτυξη της επιλεγμένης απομόνωσης, έγινε μεταφορά της (από δοκιμαστικό σωλήνα/παραφινέλαιο) σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν PDA. Ακολούθησε επώαση, έως ότου γίνει ορατή η ανάπτυξη των χαρακτηριστικών λευκών-ροζ υφών του μύκητα και επίστρωση (streaking) σε τριβλία Petri που περιείχαν PDA, τα οποία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης (Θερμοκρασία: 26± 2°C, Φωτοπερίοδος: 12h φως/ 12h σκοτάδι) για διάστημα 5 ημερών. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε προσθήκη 5mL dH<sub>2</sub>O ανά τριβλίο και ελαφριά απόξεση (Εικόνα 2.3α). Το εναιώρημα σπορίων διηθήθηκε μέσω 4

στρωμάτων αποστειρωμένου τουλπανιού (Εικόνα 2.3β). Η επιθυμητή συγκέντρωση ήταν  $10^5$  κόνidia/ml και η ρύθμισή του πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αιματοκυτταρόμετρου.



**Εικόνα 2.3:** Προετοιμασία μολύσματος. α. Ανάπτυξη υφών του μύκητα και προσθήκη 5 mL dH<sub>2</sub>O. β. Διήθηση/ φιλτράρισμα του εναιωρήματος σπορίων.

#### 2.4.4 Διαδικασία μόλυνσης

Η τεχνητή μόλυνση των φυτών πραγματοποιήθηκε στο στάδιο των 4 φύλλων, περίπου 12-14 μέρες μετά το φύτευμα, σύμφωνα με την μέθοδο που περιγράφηκε από τους Rouralibaba et al. (2015) με μικρές τροποποιήσεις. Αρχικά, οι ρίζες των νεαρών φυτών βυθίστηκαν σε αιώρημα σπορίων για 10 λεπτά και ακολούθησε φύτευση σε φυτοδοχεία (6 x 6 x 8 cm) που περιείχαν αποστειρωμένο περλίτη. Ως μάρτυρες, αξιοποιήθηκαν φυτά που εμβαπτίστηκαν σε αποστειρωμένο dH<sub>2</sub>O, σύμφωνα με την ίδια διαδικασία. Ακολούθησε άρδευση των φυτών με 15 mL διαλύματος Hoagland ((Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O:KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:KNO<sub>3</sub>:MgSO<sub>4</sub>·(5:1:5:2 mM):7H<sub>2</sub>O:FeEDTA (5 μM)) (Hoagland and Arnon, 1950). Τέλος, τα φυτά τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης (Θερμοκρασία: 26± 2°C , Φωτοπερίοδος: 12h φως/ 12h σκοτάδι) για διάστημα 15 ημερών.

#### 2.4.5 Συλλογή φυτικού ιστού

Δεκαπέντε ημέρες μετά την τεχνητή μόλυνση, πραγματοποιήθηκε συλλογή του φυτικού ιστού. Η συλλογή αφορούσε σε δείγματα φύλλων και ριζών, καταπονημένων και μη φυτών, για κάθε γονότυπο ξεχωριστά. Κάθε δείγμα είχε δημιουργηθεί από την μηχανική ανάμιξη 4 φυτών (bulk). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν άμεσα σε θάλαμο βαθιάς κατάψυξης έως ότου χρησιμοποιηθούν στις αναλύσεις της μεταβολομικής.

## 2.5 Απομόνωση μεταβολιτών

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε λειοτρίβηση των δειγμάτων με τη χρήση υγρού αζώτου. Στη συνέχεια, 50 mg κορνιοποιημένου ιστού μεταφέρθηκαν σε erpendorf, το οποίο περιείχε 400 μl mastermix (395 μl μεθανόλης, 5 μl ριβιτόλης). Έπειτα, πραγματοποιήθηκε ανάμιξη του δείγματος με τη χρήση vortex και ακολούθησε τοποθέτησή του σε μηχανικό αναδευτήρα στους 70 °C για 15 λεπτά. Αφού έγινε προσθήκη 200 μl χλωροφορμίου, το δείγμα ανακινήθηκε και τοποθετήθηκε σε μηχανικό αναδευτήρα για 5 λεπτά στους 37 °C. Ακολούθησε προσθήκη 400 μl ddH<sub>2</sub>O και ανάμιξη του δείγματος. Τέλος, για την απομάκρυνση των φυτικών θραυσμάτων πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 5 λεπτά. Ακολούθησε μεταφορά 100 μl του υπερκείμενου σε νέο erpendorf και εξάτμιση των δειγμάτων με χρήση αερίου αζώτου.

Προκειμένου να αυξηθεί η πτητικότητα των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε η παραγωγοποίηση τους. Αρχικά, έγινε επαναδιάλυση των δειγμάτων σε 25 μl διαλύματος μεθοξυαμίνης (MOX) και ακολούθησε επώαση σε υδατόλουτρο στους 30 °C για 90 λεπτά. Κατόπιν, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 13000 rpm για 30 δευτερόλεπτα και ακολούθησε προσθήκη 75 μl N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA) και ήπια ανάδευση. Ακολούθησε εκ νέου επώαση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο στους 37 °C για 30 λεπτά και φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 2 λεπτά. Στη συνέχεια, έγινε μεταφορά του υπερκείμενου σε γυάλινα φιαλίδια και ακολούθησε επώαση για 2 ώρες.

Ακολούθησε ανάλυση των δειγμάτων σε αέριο χρωματογράφο συζευγμένο με φασματογράφο μάζας (Agilent 7890A/5975C GC-MS system) στο Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής του ΓΠΑ. Η ταυτοποίηση των δειγμάτων έγινε μέσω της χρήσης του λογισμικού προγράμματος AMDIS (Stein, 1999), το οποίο διαθέτει βιβλιοθήκες που περιλαμβάνουν φάσματα και δείκτες δέσμευσης για ένα μεγάλο εύρος μεταβολιτών που απαντώνται σε φυτικούς οργανισμούς (Feihl metabolome database). Για την έκφραση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ο λόγος της περιοχής του μεταβολίτη στόχου προς την περιοχή του μεταβολίτη αναφοράς (ribitol, m/z 217). Η παρουσίασή τους πραγματοποιήθηκε σε σχέση με το νωπό βάρος των δειγμάτων.

## 2.6 Στατιστική ανάλυση

Για την επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό R version 4.0.0 (R Core Team (2014) (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Αρχικά, πραγματοποιήθηκε φιλτράρισμα των δεδομένων κατά το οποίο αφαιρέθηκαν 40 μεταβολίτες οι οποίοι δεν πληρούσαν το κριτήριο των μη-μηδενικών τιμών (τα μηδενικά αποτελέσματα για κάθε παρατήρηση ξεπερνούσαν το 80% των παρατηρήσεων ανά μεταβολίτη).

Στο επόμενο βήμα, υλοποιήθηκε μονομεταβλητή ανάλυση με τη χρήση μεθοδολογίας ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) στο μοντέλο που περιέχει κύριους παράγοντες την ποικιλία και τη μεταχείριση και την αλληλεπίδραση των κυρίων παραγόντων ξεχωριστά για τα δείγματα του βλαστού και της ρίζας.

Επιπλέον, εφαρμόστηκε p-value adjustment με τη μέθοδο Benjamini & Hochberg (1995) για την ορθή ρύθμιση του σφάλματος τύπου I λόγω επαναλαμβανόμενων ελέγχων υποθέσεων. Επιλέχθηκαν οι μεταβολίτες με FDR adjusted p-value < 0.05.

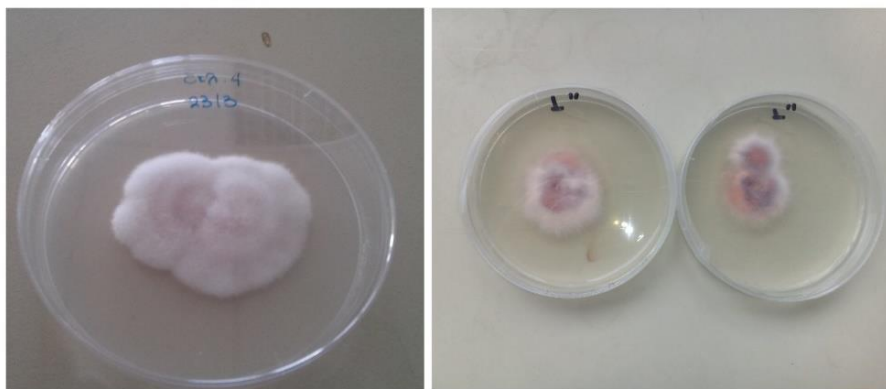
Για την πολυμεταβλητή ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το πακέτο “mixOmics” (Le chao et al., 2016) για την εφαρμογή μεθοδολογίας Partial Least Squares – Discriminant Analysis (διαχωριστική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων), cluster analysis (ανάλυση συστάδων) και την παραγωγή των κατάλληλων, αντίστοιχων γραφημάτων.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

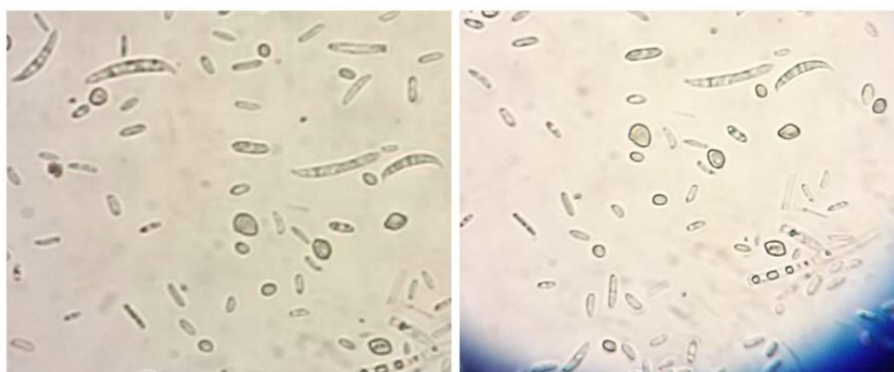
#### 3.1. Απομόνωση του μύκητα *Fusarium* spp.

Για την απομόνωση του μύκητα *Fusarium* spp. πραγματοποιήθηκε λήψη εδαφικών δειγμάτων από τις κύριες ζώνες καλλιέργειας της φακής στον ελλαδικό χώρο. Η λήψη των δειγμάτων έγινε από αγρούς των οποίων τα φυτά παρουσίαζαν τα χαρακτηριστικά για την ασθένεια συμπτώματα, ενώ ταυτόχρονα λήφθηκε υπόψη και το ιστορικό καλλιέργειας κάθε αγρού. Αξίζει να σημειωθεί ότι στις περιοχές της Λευκάδας και της Φλώρινας η καλλιέργεια της φακής αποτελεί μονοκαλλιέργεια, ενώ στις υπόλοιπες περιοχές εντάσσεται σε συστήματα αμειψισποράς με σιτηρά.

Έπειτα από μακροσκοπική (Εικόνα 3.1) και μικροσκοπική παρατήρηση (Εικόνα 3.2) των δειγμάτων απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 21 μονόσπορες απομονώσεις του μύκητα του γένους *Fusarium* spp. (Πίνακας 3.1).



**Εικόνα 3.1:** Μακροσκοπική παρατήρηση των χαρακτηριστικών λευκών – ροζ υφών που σχηματίζει ο μύκητας *Fusarium* spp.



**Εικόνα 3.2:** Μικροσκοπική παρατήρηση των χαρακτηριστικών μονοκύτταρων και πολυκύτταρων κυρτού σχήματος κονιδίων του μύκητα.



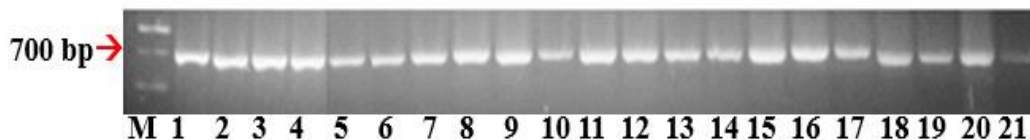
**Πίνακας 3.1:** Οι 21 απομονώσεις του μύκητα *Fusarium* spp.

α/α	Απομονώσεις	Περιοχή συλλογής
1	1.1	Ορεστιάδα
2	1.2	Ορεστιάδα
3	2.1	Φλώρινα
4	2.2	Φλώρινα
5	2.5	Φλώρινα
6	3.1	Θεσσαλονίκη
7	4.1	Γρεβενά
8	4.2	Γρεβενά
9	4.3	Γρεβενά
10	5.2	Κάμπος Λευκάδας
11	5.3	Κάμπος Λευκάδας
12	5.4	Κάμπος Λευκάδας
13	5.5	Κάμπος Λευκάδας
14	6.1	Πρίμος Λευκάδας
15	6.2	Πρίμος Λευκάδας
16	6.3	Πρίμος Λευκάδας
17	6.4	Πρίμος Λευκάδας
18	7.1	Δίλοφος Λάρισας
19	7.2	Δίλοφος Λάρισας
20	7.6	Δίλοφος Λάρισας
21	8.1	ΕΛΓΟ Λάρισα

### 3.2. Μοριακή ταυτοποίηση του μύκητα *Fusarium* spp.

Για την ταυτοποίηση των απομονώσεων του μύκητα *Fusarium* spp, πραγματοποιήθηκε αρχικά εξαγωγή DNA από μονόσπορες καλλιέργειες του μύκητα και ακολούθησε ενίσχυση επιλεγμένων αλληλουχιών DNA, μέσω PCR με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών.

Η ύπαρξη του γονιδίου που κωδικοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα επιμήκυνσης 1 alpha (elongation factor 1 alpha - *TEF1a*) επικυρώθηκε με την ενίσχυση προϊόντων αναμενόμενου μεγέθους 700 bp, σε όλες τις απομονώσεις που μελετήθηκαν (Εικόνα 3.3). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση των προϊόντων ενίσχυσης, με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών, ώστε να προσδιοριστεί η νουκλεοτιδική αλληλουχία του *TEF* στις υπό μελέτη απομονώσεις.



**Εικόνα 3.3.:** Προϊόντα ενίσχυσης PCR για το γονίδιο *TEF* σε γονιδιωματικό DNA, το οποίο απομονώθηκε από μονόσπορες καλλιέργειες του μύκητα *Fusarium* spp. M: 100 bp DNA Ladder, NEB.

Ακολούθησε σύγκριση των προϊόντων ενίσχυσης που αντιστοιχούν στο γονίδιο *TEF* με ομόλογες αλληλουχίες που είναι κατατεθειμένες σε διεθνείς βάσεις δεδομένων. Το ποσοστό κάλυψης της αλληλουχίας, το ποσοστό της νουκλεοτιδικής ομολογίας και η τιμή του E- value, η οποία αποτελεί παράμετρο εκτίμησης της αξιοπιστίας των τιμών ομοιότητας (S score), αποτέλεσαν τη βάση πάνω στην οποία στηρίχτηκαν τα αποτελέσματα ομοιότητας.

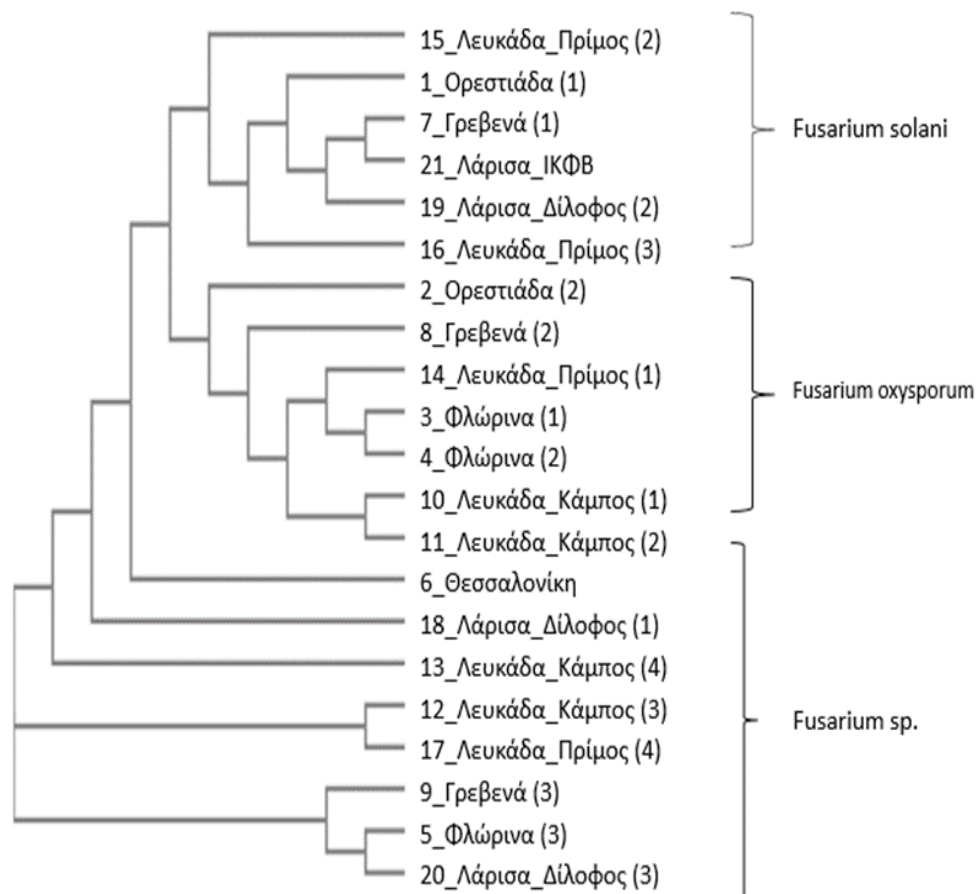
Το ποσοστό νουκλεοτιδικής ομοιότητας της αλληλουχίας που αντιστοιχεί στο γονίδιο *TEF* με ομόλογα γονίδια απομονώσεων του γένους *Fusarium* spp. άγγιξε το 99 %. Από τις 21 απομονώσεις του μύκητα, οι 7 εξ αυτών (33,3 %) εμφάνισαν υψηλή ομολογία με το *Fusarium oxysporum* (Accession N. KF574862.1), ενώ 5 απομονώσεις (23,8 %) είχαν υψηλή ομολογία με κατατεθειμένες αλληλουχίες οι οποίες αντιστοιχούν στη φυλή από την οποία προσβάλλεται η φακή *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis* (Accession N. KR139797.1 - KR139826.1) (Πίνακας 3.2). Οι απομονώσεις που εμφάνισαν υψηλή ομολογία με το *Fol* παρατίθενται στον Πίνακα 3.2 και αντιστοιχούν στους κωδικούς 3, 4, 10, 11 και 14. Από τις υπόλοιπες απομονώσεις, 8 εμφάνισαν υψηλή ομολογία με το *Fusarium* sp. (Accession N. GU250577.1) και 6 με το *Fusarium solani* (Accession N. HQ731056.1).

**Πίνακας 3.2:** Ποσοστό ομολογίας των αλληλουχιών, οι οποίες αντιστοιχούν στο γονίδιο *TEF*, με ομόλογες κατατεθειμένες αλληλουχίες σε διεθνείς βάσεις δεδομένων.

Αριθμός δείγματος	GeneBank	Source	Query Cover (%)	Isolate/strain
1	HQ731056.1	<i>Fusarium solani</i>	97	cc61C
2	KT239473.1	<i>Fusarium oxysporum</i>	97	Fox125a
3	KF574862.1	<i>Fusarium oxysporum</i>	98	F28-P1GR3
	KR139823.1	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lentis</i>	98	FWL9
	KR139826.1	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lentis</i>	97	FWK2
	KR139811.1	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lentis</i>	97	FWJ16
4	KF574862.1	<i>Fusarium oxysporum</i>	98	F28-P1GR3
	KR139823.1	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lentis</i>	98	FWL9
	KR139826.1	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lentis</i>	97	FWK2

	KR139811.1	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lentis</i>	97	FWJ16
5	GU250577.1	<i>Fusarium</i> sp.	95	NRRL 46662
6	GU250576.1	<i>Fusarium</i> sp.	95	NRRL 46648
7	MG973093.1	<i>Fusarium solani</i>	97	F65
8	KX822794.1	<i>Fusarium oxysporum</i>	98	STAT9
9	GU250577.1	<i>Fusarium</i> sp.	96	NRRL 46662
10	MG557839.1	<i>Fusarium oxysporum</i>	97	FOBS1
	KR139802.1	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lentis</i>	96	FWC15
11	MG557839.1	<i>Fusarium oxysporum</i>	97	FOBS1
	KR139823.1	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lentis</i>	97	FWL9
	KR139802.1	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lentis</i>	96	FWC15
12	GU250577.1	<i>Fusarium</i> sp.	95	NRRL 46662
13	GU250577.1	<i>Fusarium</i> sp.	95	NRRL 46662
14	KF574862.1	<i>Fusarium oxysporum</i>	98	F28-P1GR3
	KR139823.1	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lentis</i>	98	FWL9
	KR139810.1	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lentis</i>	97	FWJ15
	KR139826.1	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lentis</i>	97	FWK2
	KR139811.1	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lentis</i>	97	FWJ16
15	HQ731056.1	<i>Fusarium solani</i>	95	cc61C
16	KY486684.1	<i>Fusarium solani</i>	96	Fs-147P
17	GU250577.1	<i>Fusarium</i> sp.	95	NRRL 46662
18	GU250577.1	<i>Fusarium</i> sp.	95	NRRL 46662
19	HQ731056.1	<i>Fusarium solani</i>	97	cc61C
20	GU250577.1	<i>Fusarium</i> sp.	95	NRRL 46662
21	HQ731056.1	<i>Fusarium solani</i>	97	cc61C

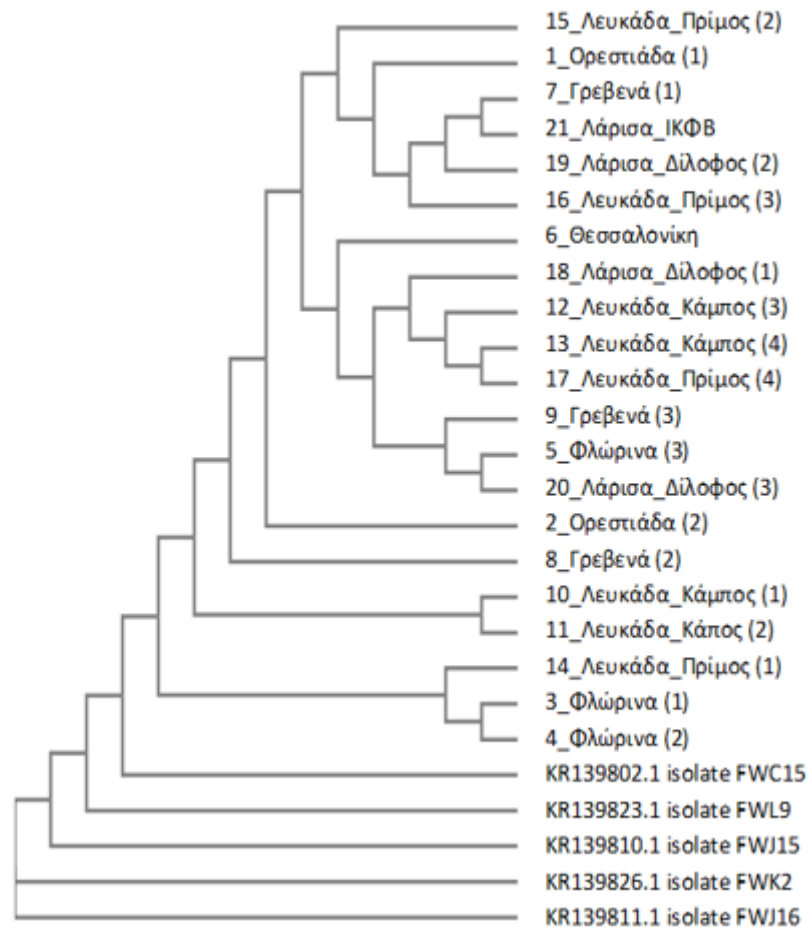
Η κατασκευή των δενδρογραμμάτων πραγματοποιήθηκε με χρήση του λογισμικού MultAlin. Στο Δενδρόγραμμα 3.1 είναι εμφανής η υψηλή ομοιότητα των ελληνικών απομονώσεων με ομόλογες αλληλουχίες των *Fusarium* spp., *Fusarium oxysporum* και *Fusarium solani*. Επιπλέον, στο Δενδρόγραμμα 3.2 είναι διακριτή η ομαδοποίηση των απομονώσεων 3, 4, 10, 11 και 14 με αλληλουχίες που αντιστοιχούν στο *F. oxysporum* f.sp. *lentis* (Accession N. KR139802.1, KR139823.1, KR139810.1, KR139826.1, KR139811.1). Ωστόσο, δεν κατέστη δυνατή η ομαδοποίηση των απομονώσεων βάσει της γεωγραφικής τους προέλευσης.



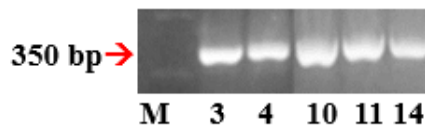
**Δενδρόγραμμα 3.1:** Ομαδοποίηση των απομονώσεων του γένους *Fusarium* spp., σύμφωνα με την αλληλουχία που αντιστοιχεί στο γονίδιο *TEF*, με τη βοήθεια του λογισμικού MultiAlin. Το δενδρόγραμμα περιλαμβάνει αλληλουχίες αναφοράς των *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* και *Fusarium* spp. B=1000 ο αριθμός επαναλήψεων bootstrap.

Δεδομένης της υψηλής ομολογίας των απομονώσεων με κωδικούς 3, 4, 10, 11 και 14 με τις κατατεθειμένες αλληλουχίες που αντιστοιχούν στο *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis*, κρίθηκε αναγκαία η περαιτέρω διερεύνησή τους. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε PCR για την ενίσχυση των αλληλουχιών οι οποίες αντιστοιχούν στα γονίδια *b-tubulin* και *calmodulin*.

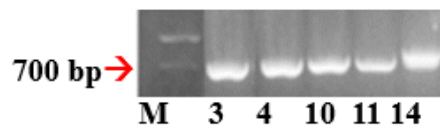
Η ύπαρξη των γονιδίων *b-tubulin* και *calmodulin* επιβεβαιώθηκε με την ενίσχυση προϊόντων αναμενόμενου μεγέθους, 350 bp (Εικόνα 3.4) και 700 bp (Εικόνα 3.5) αντίστοιχα, σε όλες τις απομονώσεις που εξετάστηκαν. Ακολούθησε σύγκριση των προϊόντων ενίσχυσης με ομόλογες κατατεθειμένες αλληλουχίες, η οποία ανέδειξε την υψηλή νουκλεοτιδική ομοιότητα (98 %) με αντίστοιχα γονίδια του γένους *Fusarium* spp..



**Δενδρόγραμμα 3.2:** Ομαδοποίηση των απομονώσεων του *Fusarium* spp. σύμφωνα με την αλληλουχία η οποία αντιστοιχεί στο γονίδιο *TEF*, με χρήση του λογισμικού MultiAlin. Το δενδρόγραμμα περιλαμβάνει αλληλουχίες αναφοράς του *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis*. B=1000 ο αριθμός επαναλήψεων bootstrap.



**Εικόνα 3.4:** Τα προϊόντα ενίσχυσης για το γονίδιο *b-tubulin* (350 bp) σε γονιδιωματικό DNA, το οποίο απομονώθηκε από μονόσπορες καλλιέργειες του γένους *Fusarium* spp. M: 100 bp DNA Ladder, NEB.



**Εικόνα 3.5:** Τα προϊόντα ενίσχυσης για το γονίδιο *calmodulin* (700 bp) σε γονιδιωματικό DNA, το οποίο απομονώθηκε από μονόσπορες καλλιέργειες του *Fusarium* spp. M: 100 bp DNA Ladder, NEB.

Αναφορικά με το γονίδιο *b-tubulin*, οι υπό μελέτη ελληνικές απομονώσεις εμφάνισαν ποσοστό ομολογίας της τάξης του 94-96 % με το στέλεχος CO4 του *Fusarium oxysporum* (Accession N. MF806523.1) (Πίνακας 3.3). Το αντίστοιχο ποσοστό νουκλεοτιδικής ομοιότητας για το γονίδιο *calmodulin* κυμάνθηκε μεταξύ 88 και 98 %. Οι απομονώσεις 4, 10, 11 και 14 παρουσίασαν τα υψηλότερα ποσοστά ομολογίας με το *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* (Accession N. LT841230.1) (Πίνακας 3.4).

**Πίνακας 3.3:** Το ποσοστό ομολογίας των αλληλουχιών, οι οποίες αντιστοιχούν στο γονίδιο *b-tubulin*, με ομόλογες κατατεθειμένες αλληλουχίες σε διεθνείς βάσεις δεδομένων.

Αριθμός Δείγματος	GeneBank	Source	Query Cover (%)	Strain
3	<a href="#">MF806523.1</a>	<i>Fusarium oxysporum</i>	95	C04
4	<a href="#">MF806523.1</a>	<i>Fusarium oxysporum</i>	96	C04
10	<a href="#">MF806523.1</a>	<i>Fusarium oxysporum</i>	94	C04
11	<a href="#">MF806523.1</a>	<i>Fusarium oxysporum</i>	94	C04
14	<a href="#">MF806523.1</a>	<i>Fusarium oxysporum</i>	95	C04

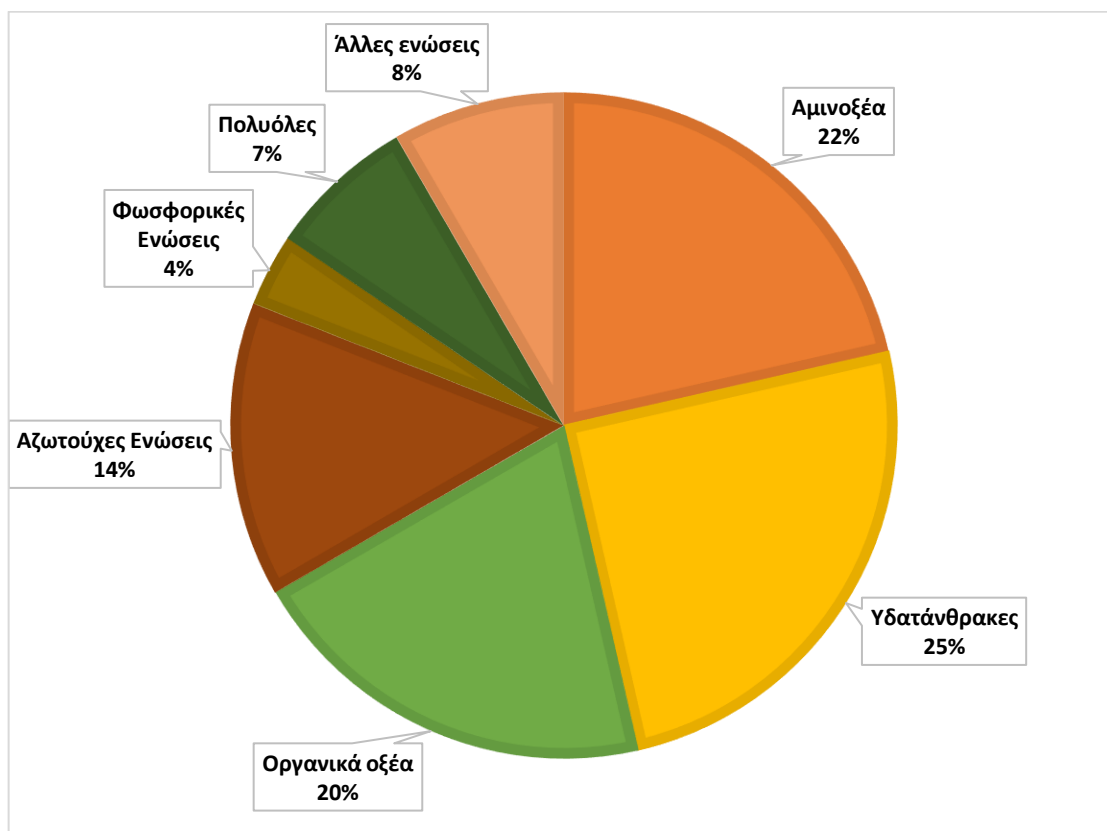
**Πίνακας 3.4:** Το ποσοστό ομολογίας των αλληλουχιών, οι οποίες αντιστοιχούν στο γονίδιο *calmodulin*, με ομόλογες κατατεθειμένες αλληλουχίες σε διεθνείς βάσεις δεδομένων.

Αριθμός Δείγματος	GeneBank	Source	Query Cover (%)	Strain
3	MH484772.1	<i>Fusarium oxysporum</i>	94	CBS 144135
4	LT841230.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	98	Fod008
10	LT841230.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	98	Fod008
11	LT841230.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	98	Fod008
14	LT841230.1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	88	Fod008

### 3.3. Μεταβολομική ανάλυση

Για τη μεταβολομική ανάλυση, αρχικά επιλέχθηκαν 2 γονότυποι φακής, οι οποίοι διαφέρουν ως προς τη φαινοτυπική τους απόκριση στο παθογόνο *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis* - ανθεκτικός και ευαίσθητος-, και ακολούθησε τεχνητή μόλυνση με το παθογόνο *Fol*. Ακολούθησε ο προσδιορισμός του μεταβολομικού προφίλ των *Fol*-μολυσμένων και φυτών μαρτύρων, με χρήση αέριας χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (GC-MS). Συνολικά, ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 178 μεταβολίτες, οι οποίοι ανήκουν στις χημικές ομάδες των υδατανθράκων, οργανικών οξέων, αμινοξέων, αζωτούχων ενώσεων, πολυολών, φωσφορικών και άλλων ενώσεων. Έπειτα από φιλτράρισμα των ανιχνευθέντων μεταβολιτών, επιλέχθηκαν 84 μεταβολικά συστατικά για περαιτέρω ανάλυση και στατιστική επεξεργασία.

Από τους 84 αναλυθέντες μεταβολίτες, το 25 % ανήκει στη χημική ομάδα των υδατανθράκων, το 22 % στην ομάδα των αμινοξέων, το 20 % στα οργανικά οξέα, το 14 % στις αζωτούχες ενώσεις, το 7 % στις πολυόλες, το 4 % στις φωσφορικές ενώσεις, ενώ το 8 % ανήκε σε άλλες χημικές ομάδες (Εικόνα 3.6).



**Εικόνα: 3.6:** Κατηγοριοποίηση των επιλεγμένων 84 μεταβολιτών βάσει της χημικής τους ομάδας.

### 3.3.1 Επίδραση της μόλυνσης (*Fol*) στο μεταβολικό προφίλ των γονοτύπων φακής

Από τους 84 μεταβολίτες που συνολικά αναλύθηκαν, οι 17 παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μεταβολή ( $P < 0,05$ ) είτε σε επίπεδο ποικιλίας είτε σε επίπεδο μεταχείρισης είτε στην αλληλεπίδρασή τους. Η σημαντικότητα των μεταβολών προσδιορίστηκε με βάση το κριτήριο του  $p$ -value  $< 0.05$  (Πίνακας 3.5).

Στον Πίνακα 3.5 παρουσιάζεται για τους σημαντικούς μεταβολίτες ο χρόνος έκλουσης RT, η αναλογία μάζας προς φορτίο  $m/z$ , η αναλογία (ratios) των *Fol*-φυτών προς τα φυτά-μάρτυρες στην ανθεκτική και ευαίσθητη ποικιλία και ο συντελεστής σημαντικότητας  $p$ -value. Οι αναλογίες υπολογίστηκαν με βάση τη διάμεσο των 4 επαναλήψεων των *Fol*-φυτών προς τη διάμεσο των 4 επαναλήψεων των φυτών- μαρτύρων.

**Πίνακας 3.5:** Μεταβολίτες που παρουσίασαν σημαντική μεταβολή σε επίπεδο γονοτύπου, μεταχείρισης ή αλληλεπίδρασής τους. Για κάθε μεταβολικό συστατικό, παρουσιάζεται ο χρόνος έκλυσης (RT), η αναλογία μάζας προς φορτίο (m/z) καθώς και η αναλογία (ratio) των *Fol*- και των φυτών-μαρτύρων για την ανθεκτική και ευαίσθητη ποικιλία, η οποία υπολογίστηκε με βάση τη διάμεσο των 4 επαναλήψεων των *Fol*-φυτών προς τη διάμεσο των 4 επαναλήψεων των φυτών-μαρτύρων. Με έντονη γραφή επισημαίνονται οι μεταβολίτες που σημείωσαν στατιστικά σημαντικές διαφορές (p-value<0,05) σε επίπεδο γονοτύπου (G), μεταχείρισης (T) και αλληλεπίδρασής τους (GxT).

Μεταβολίτης	RT	m/z	ratio				p- value					
			Ρίζα		Βλαστός		Ρίζα			Βλαστός		
			Ανθεκτική	Ευαίσθητη	Ανθεκτική	Ευαίσθητη	G	T	G x T	G	T	G x T
<b>Υδατάνθρακες</b>												
Κελλοβιόζη	41,706	204	2,6498	0,6561	0,5564	3,6029	<b>0,0358</b>	0,9439	0,4190	0,6771	0,5675	0,6009
Λευκρόζη	41,059	361	#Δ/Υ <sup>1</sup>	0,0000	0,0000	0,0000	<b>0,0309</b>	0,1241	0,1250	0,7132	0,4589	0,8690
D-τρεχαλόζη	41,046	361	2,9993	1,0632	0,8144	0,6916	<b>0,0234</b>	0,3380	0,4190	0,4663	0,8581	0,8690
Ταλόζη	27,131	319	#Δ/Υ	0,0000	0,0000	0,0000	<b>0,0058</b>	<b>0,0058</b>	<b>0,0116</b>	0,7132	0,4689	0,8690
<b>Αμινοξέα</b>												
L-προλίνη	12,437	142	3,9458	0,2844	2,2659	0,4684	0,1908	0,3282	0,4190	<b>0,0431</b>	0,5475	0,6009
L-ασπαραγίνη	20,858	188	11,2495	33,6464	23,1092	5,4158	0,5366	0,1241	0,4190	0,0861	<b>0,0100</b>	0,2154
L-ορνιθίνη	20,371	142	#ΔΙΑΙΡ./0! <sup>2</sup>	#ΔΙΑΙΡ./0!	#ΔΙΑΙΡ./0!	0,6418	0,4742	<b>0,0326</b>	0,4190	0,7132	0,8383	0,6009
<b>Πολυόλες</b>												
Παλατινιτόλη	43,154	361	2,4775	2,0362	0,7734	1,3449	<b>0,0005</b>	<b>0,0193</b>	0,0720	0,7799	0,8603	0,8690
Ακετόλη*	23,957/43,792	217	0,0000 <sup>3</sup>	0,0000	#Δ/Υ	0,3545	0,5591	0,3039	0,5499	<b>0,0193</b>	0,5475	0,6009
2-βουτυνο-1,4-διόλη	27,746	147	0,0000	0,0000	#Δ/Υ	0,3439	0,6620	0,3039	0,6792	<b>0,0108</b>	0,3545	0,6009
<b>Οργανικά οξέα</b>												
Μελεϊναμικό οξύ	11,939	244	0,7154	0,3276	0,4991	0,8397	<b>0,0358</b>	<b>0,0209</b>	0,0890	0,1950	0,4345	0,6009
Φουμαρικό οξύ	13,710	245	#Δ/Υ	0,0000	#Δ/Υ	0,0020	0,4757	0,3039	0,4438	<b>0,0016</b>	<b>0,0014</b>	<b>0,0017</b>
Ιμινοδιασετικό οξύ	18,077	232	0,0492	0,0071	0,8166	0,5237	0,5591	0,3039	0,5306	<b>0,0353</b>	0,6172	0,7385
<b>Αζωτούχες ενώσεις</b>												
2-αμινο-1-φαινυλαιθανόλη	11,671	174	12,3455	7,2492	19,6887	2,4997	0,4742	<b>0,0209</b>	0,4190	0,1716	0,3354	0,4839
Πουτρεσκίνη	22,948	174	0,3919	0,0000	0,5003	0,5169	<b>0,0358</b>	<b>0,0012</b>	<b>0,0184</b>	0,9132	0,5475	0,8690
<b>Φωσφορικές ενώσεις</b>												
1-φωσφορική γλυκερόλη	23,874	357	1,9829	0,3596	#ΔΙΑΙΡ./0!	1,3322	0,6451	0,7517	0,1124	0,1851	<b>0,0014</b>	0,0698
<b>Καρβοξυλικά οξέα</b>												
3-υδροξυπροπανοϊκό οξύ	15,584	219	0,0000	0,0000	#Δ/Υ	0,0000	0,5366	0,3039	0,5148	<b>0,0038</b>	<b>0,0026</b>	<b>0,0038</b>

\* Προκύπτει από το άθροισμα των ακετόλη 3 και 4. <sup>1</sup> Δεν ανιχνεύθηκε ο μεταβολίτης ούτε στα φυτά μάρτυρες, ούτε στα μολυσμένα φυτά. <sup>2</sup> Ο μεταβολίτης δεν ανιχνεύθηκε στα φυτά μάρτυρες.

<sup>3</sup> Ο μεταβολίτης δεν ανιχνεύθηκε στα μολυσμένα φυτά



Στη συνέχεια, παρουσιάζονται οι μεταβολίτες οι οποίοι παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μεταβολή στους ιστούς ρίζας και βλαστού των φυτών φακής, ανά χημική ομάδα.

### 3.3.1.1. Ρίζα

#### Υδατάνθρακες

Από τους 21 μεταβολίτες που ανήκουν στη χημική ομάδα των υδατανθράκων, στατιστικά σημαντική διαφορά σημειώθηκε στους μεταβολίτες κελλοβιόζη, λευκρόζη, D-τρεχαλόζη και ταλόζη. Σε επίπεδο γονοτύπου, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές για το σύνολο των ανωτέρω συστατικών, ενώ σε επίπεδο μεταχείρισης και αλληλεπίδρασης γονοτύπου x μεταχείρισης, μόνο η ταλόζη διέφερε σημαντικά. Αναφορικά με τις ποσοτικές μεταβολές στο επίπεδο συσσώρευσης των μεταβολιτών, η κελλοβιόζη παρουσίασε αύξηση στα *Fol*-φυτά της ανθεκτική ποικιλίας, συγκριτικά με τους μάρτυρες, ενώ αντίθετα σημείωσε μικρή μείωση στα *Fol*-φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας. Σχετικά με τους μεταβολίτες λευκρόζη και ταλόζη, στην ανθεκτική ποικιλία δεν κατέστη εφικτή η ανίχνευσή τους, ενώ στην ευαίσθητη ποικιλία ανιχνεύθηκαν μόνο στα *Fol*-μολυσμένα φυτά. Τέλος, η συσσώρευση της D-τρεχαλόζης εμφάνισε σημαντική αύξηση (3x) στα *Fol*-φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας και δε μεταβλήθηκε στην ευαίσθητη ποικιλία.

#### Αμινοξέα

Στη χημική ομάδα των αμινοξέων αναλύθηκαν 18 μεταβολίτες, εκ των οποίων η L-ορνιθίνη εμφάνισε σημαντική μεταβολή σε επίπεδο μεταχείρισης. Ειδικότερα, η L-ορνιθίνη ανιχνεύθηκε στα *Fol*-φυτά τόσο της ανθεκτικής όσο και της ευαίσθητης ποικιλίας, ενώ στα φυτά-μάρτυρες εμφάνισε μηδενική συσσώρευση.

#### Πολυόλες

Στη χημική ομάδα των πολυολών αναλύθηκαν 6 μεταβολίτες, εκ των οποίων η παλατινιτόλη παρουσίασε στατιστικά σημαντική μεταβολή σε επίπεδο γονοτύπου και μεταχείρισης. Πιο συγκεκριμένα, σημειώθηκε αύξηση της συσσώρευσης της παλατινιτόλης στα *Fol*-φυτά, συγκριτικά με τους μάρτυρες, τόσο στην ανθεκτική όσο και στην ευαίσθητη ποικιλία.

#### Οργανικά οξέα

Η ανάλυση των οργανικών οξέων, όπου συνολικά αναλύθηκαν 17 μεταβολίτες, κατέδειξε σημαντική διαφορά στη συσσώρευση του μελεϊναμικού οξέος σε επίπεδο γονοτύπου καθώς

και μεταχείρισης. Υπό συνθήκες *Fol*-καταπόνησης, σημειώθηκε μείωση στη συσσώρευση του μελεϊναμικού οξέος τόσο στην ανθεκτική ποικιλία όσο και στην ευαίσθητη ποικιλία, με την πρώτη ωστόσο να εμφανίζει μεγαλύτερη μείωση.

#### Αζωτούχες ενώσεις

Από τις 12 αζωτούχες ενώσεις που αναλύθηκαν, σημαντική διαφορά μεταξύ των *Fol*- και των φυτών-μαρτύρων σημειώθηκε στη συσσώρευση των αμινών 2-αμινο-1-φαινυλαιθανόλη και πουτρεσκίνη, με την τελευταία να διαφέρει επίσης σε επίπεδο γονοτύπου αλλά και αλληλεπίδρασης γονοτύπου x μεταχείρισης. Η 2-αμινο-1-φαινυλαιθανόλη παρουσίασε αυξημένη συσσώρευση στα *Fol*-φυτά και των δύο ποικιλιών, συγκριτικά με τους μάρτυρες, με μεγαλύτερη ωστόσο αύξηση να καταγράφεται στην ανθεκτική ποικιλία (12x). Σχετικά με την πουτρεσκίνη, τα *Fol*-φυτά εμφάνισαν μηδενική και μειωμένη συσσώρευση, συγκριτικά με τους μάρτυρες, στις ρίζες της ευαίσθητης και της ανθεκτικής ποικιλίας, αντίστοιχα.

#### 3.3.1.2. Βλαστός

##### Αμινοξέα

Στη χημική ομάδα των αμινοξέων, σημαντική διαφορά εμφάνισαν η L-προλίνη και η L-ασπαραγίνη, με την πρώτη να διαφέρει σε επίπεδο γονοτύπου και την τελευταία σε επίπεδο μεταχείρισης. Ειδικότερα, η L-προλίνη εμφάνισε αυξημένη συσσώρευση στα *Fol*-φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας και την αντίθετη τάση στην ευαίσθητη ποικιλία. Από την άλλη πλευρά, η L-ασπαραγίνη παρουσίασε αυξημένη συσσώρευση στα *Fol*-φυτά και των δύο ποικιλιών, συγκριτικά με τους μάρτυρες, με μεγαλύτερη ωστόσο αύξηση να καταγράφεται στην ανθεκτική ποικιλία (23x).

##### Οργανικά οξέα

Στην ομάδα των οργανικών οξέων, σημαντική διαφορά παρουσιάστηκε στα συστατικά φουμαρικό οξύ, ιμινοδιασετικό οξύ και 3-υδροξυπροπανοϊκό οξύ. Μεταξύ των ποικιλιών, σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές για το σύνολο των παραπάνω μεταβολιτών, ενώ σε επίπεδο μεταχείρισης και στην αλληλεπίδραση γονοτύπου x μεταχείρισης οι διαφορές αφορούσαν το φουμαρικό οξύ και το ιμινοδιασετικό οξύ. Το φουμαρικό οξύ δεν ανιχνεύθηκε στα φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας, ενώ στην ευαίσθητη ποικιλία τα *Fol*-φυτά και οι μάρτυρες εμφάνισαν παρόμοια επίπεδα συσσώρευσης. Το ιμινοδιασετικό οξύ εμφάνισε μειωμένη συσσώρευση στα *Fol*-φυτά, συγκριτικά με τους μάρτυρες, τόσο στην ανθεκτική όσο και στην ευαίσθητη ποικιλία. Τέλος, το 3-υδροξυπροπανοϊκό οξύ εμφάνισε διαφορετικό προφίλ συσσώρευσης

στην ανθεκτική και ευαίσθητη ποικιλία, με την πρώτη να εμφανίζει μηδενική συσσώρευση και στα φυτά και των δύο επεμβάσεων και την τελευταία στα *Fol*-φυτά.

### Πολυόλες

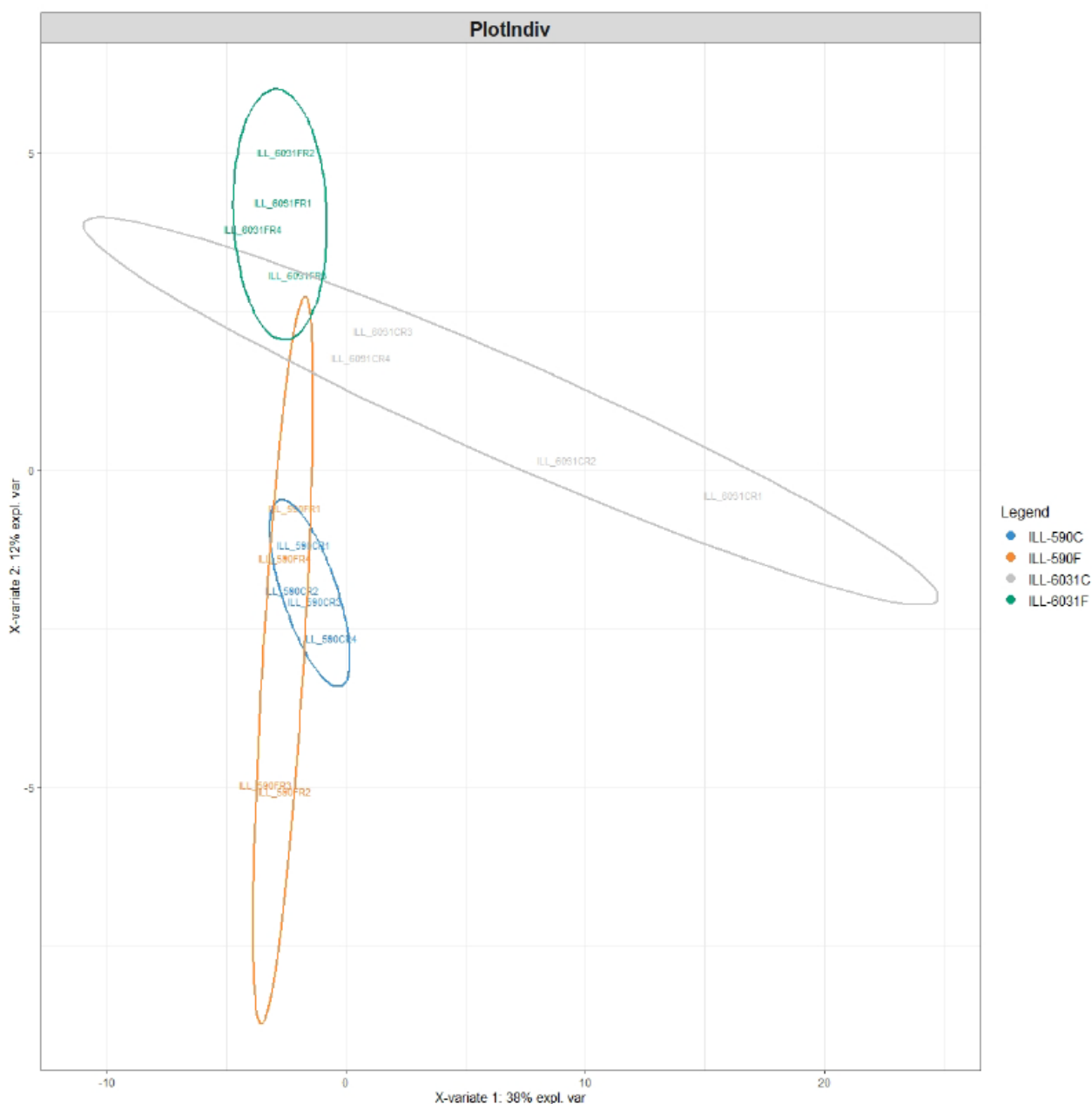
Στην ομάδα των πολυολών, σημαντική διαφορά σε επίπεδο γονοτύπου παρουσίασαν τα συστατικά ακετόλη και 2-βούτυνο-1,4-διόλη. Ειδικότερα, η ανθεκτική ποικιλία εμφάνισε μηδενική συσσώρευση τόσο στα *Fol*-φυτά όσο και στους μάρτυρες, ενώ η ευαίσθητη ποικιλία παρουσίασε σημαντικά μειωμένη συσσώρευση στα *Fol*-φυτά.

### Φωσφορικές ενώσεις

Στις φωσφορικές ενώσεις, σημαντική διαφορά μεταξύ των *Fol*- και των φυτών-μαρτύρων σημειώθηκε στη συσσώρευση της 1-φωσφορικής γλυκερόλης, η οποία ανιχνεύθηκε αποκλειστικά στα *Fol*-φυτά της ανθεκτικής ποικιλίας και παρουσίασε αύξηση, συγκριτικά με τους μάρτυρες, στα *Fol*-φυτά της ευαίσθητης ποικιλίας.

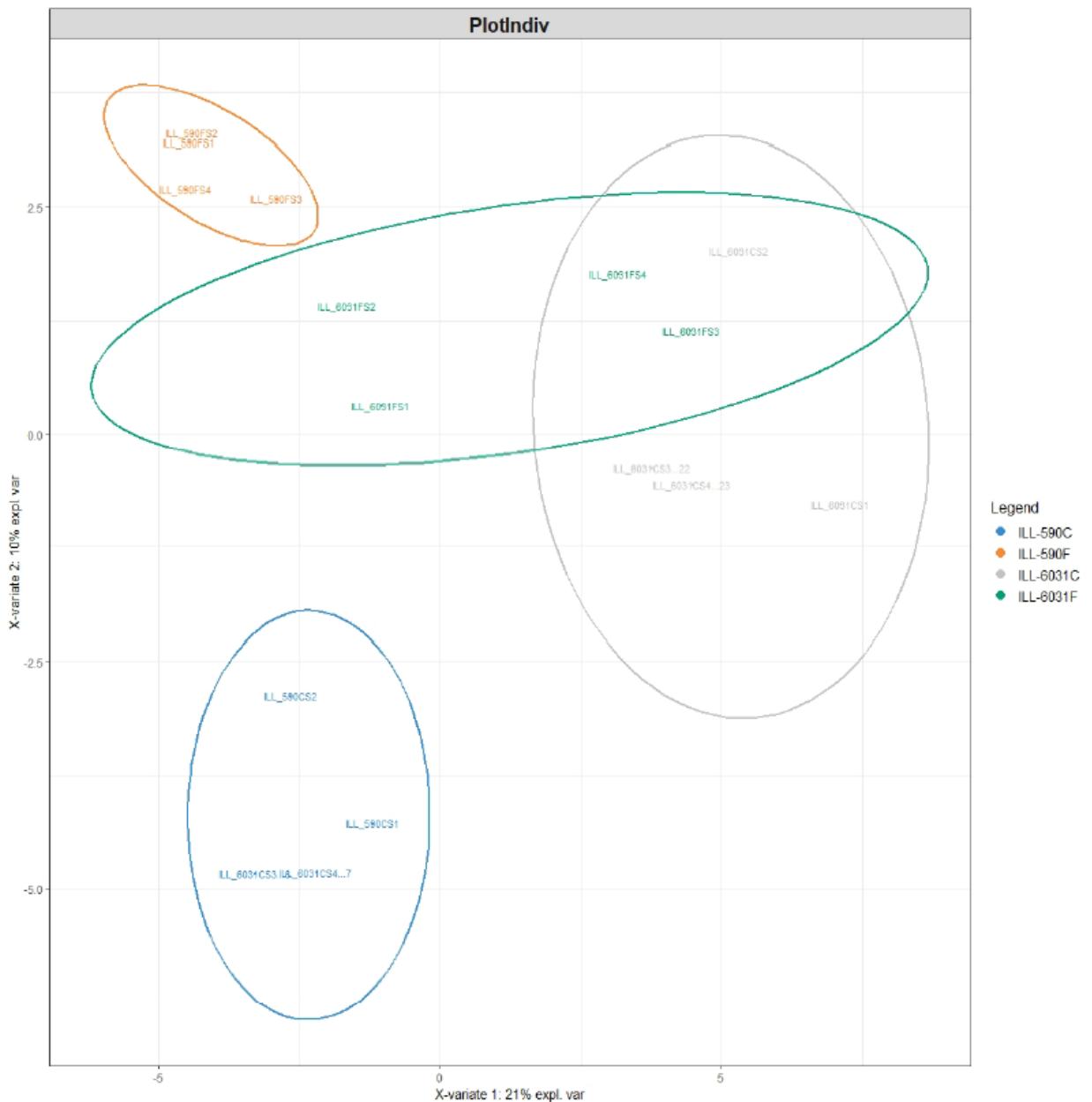
Με σκοπό την ανακάλυψη των τάσεων μεταξύ των δύο διαφορετικών ποικιλιών και των δύο διαφορετικών επεμβάσεων πραγματοποιήθηκε Διαχωριστική Ανάλυση με τη μέθοδο των Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων PLS-DA (Εικόνα 3.7 και Εικόνα 3.8). Η PLS-DA αφορούσε σε ανάλυση των φυτικών δειγμάτων που προέρχονται από τον ανθεκτικό (ILL-590) και ευαίσθητο (ILL-6031) στη φουζαρίωση γονότυπο, υπό συνθήκες μόλυνσης (*Fol*) και συνθήκες ελέγχου (Control), τόσο για τη ρίζα (Εικόνα 3.7) όσο και για τον βλαστό (Εικόνα 3.8) φυτών φακής.

Όσον αφορά τα δείγματα ρίζας, το συστατικό 1 (άξονας x) εξηγεί το 38 % της παραλλακτικότητας, ενώ το συστατικό 2 (άξονας y) εξηγεί το 12 % της παραλλακτικότητας. Σύμφωνα με την ανάλυση, μεταξύ των ποικιλιών ILL-590 και ILL-6031 επετεύχθη ικανοποιητικός διαχωρισμός, ενώ μεταξύ των *Fol*- και των φυτών-μαρτύρων δεν πραγματοποιήθηκε καλός διαχωρισμός (Εικόνα 3.7).



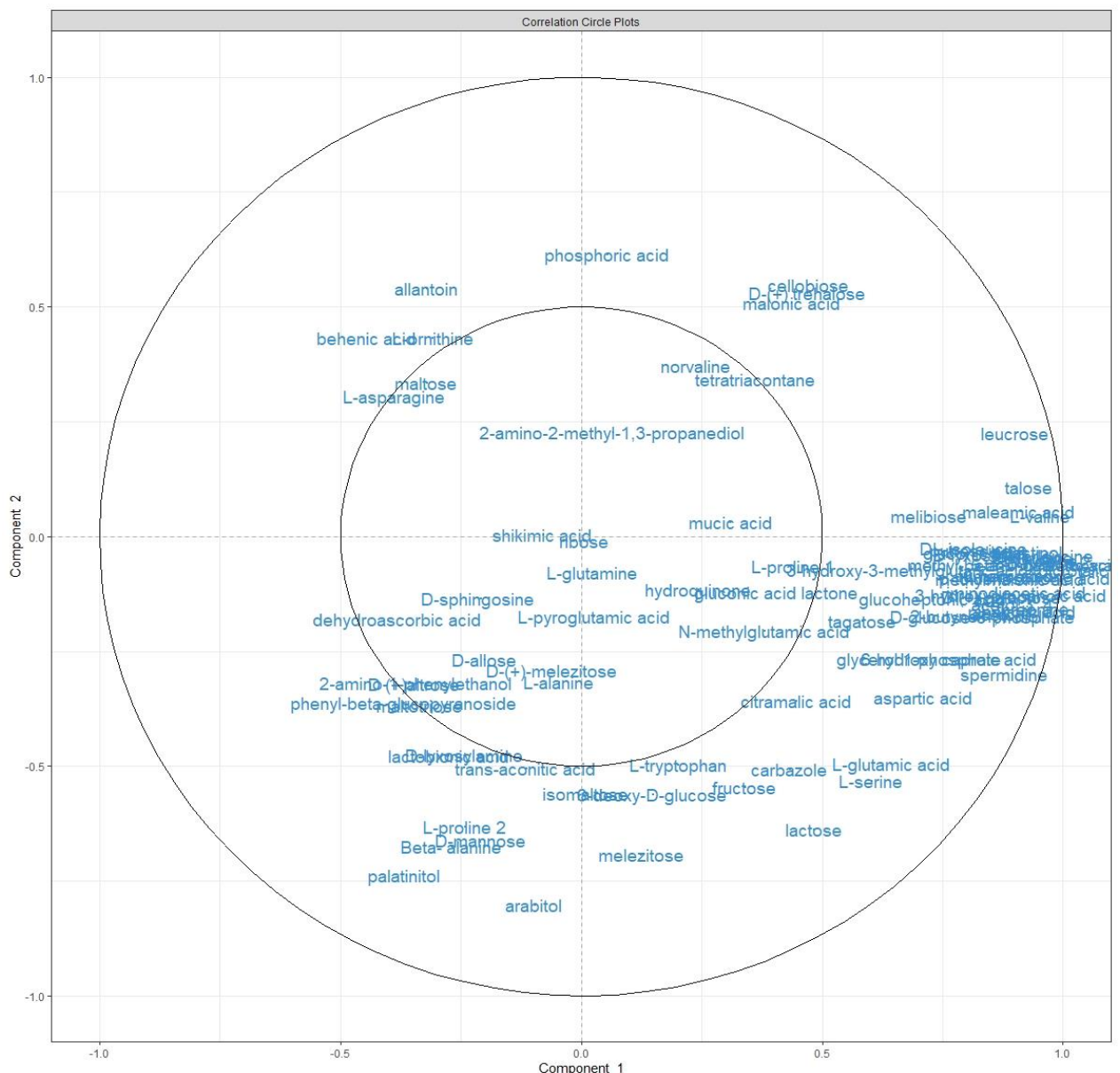
**Εικόνα 3.7:** PLS-DA scores plot για το διαχωρισμό των GC/MS μεταβολικών προφίλ ριζών που προέρχονται από *Fol*-μολυσμένα και φυτά-μάρτυρες της ανθεκτικής και της ευαίσθητης ποικιλίας. ILL-590: Ανθεκτική ποικιλία, ILL-6031: Ευαίσθητη ποικιλία, C: Φυτά μάρτυρες, F: Μολυσμένα φυτά.

Αναφορικά με τα δείγματα βλαστού, το συστατικό 1 εξηγεί το 21 % της παραλλακτικότητας, ενώ το συστατικό 2 εξηγεί το 10 % της παραλλακτικότητας. Βάσει της ανάλυσης, ικανοποιητικός ήταν ο διαχωρισμός μεταξύ των ποικιλιών. Ωστόσο, μεταξύ των *Fol*- και των φυτών-μαρτύρων, η PLS-DA επέτρεψε μόνο το διαχωρισμό των δειγμάτων της ποικιλίας ILL-590. Αντίθετα, δεν κατέστη δυνατός ο διαχωρισμός των μολυσμένων και μη φυτών της ποικιλίας ILL-6031 (Εικόνα 3.8).



**Εικόνα 3.8:** PLS-DA scores plot για το διαχωρισμό των GC/MS μεταβολικών προφίλ βλαστών που προέρχονται από *Fol*-μολυσμένα και φυτά-μάρτυρες της ανθεκτικής και της ευαίσθητης ποικιλίας. ILL-590: Ανθεκτική ποικιλία, ILL-6031: Ευαίσθητη ποικιλία, C: Φυτά μάρτυρες, F: Μολυσμένα φυτά.

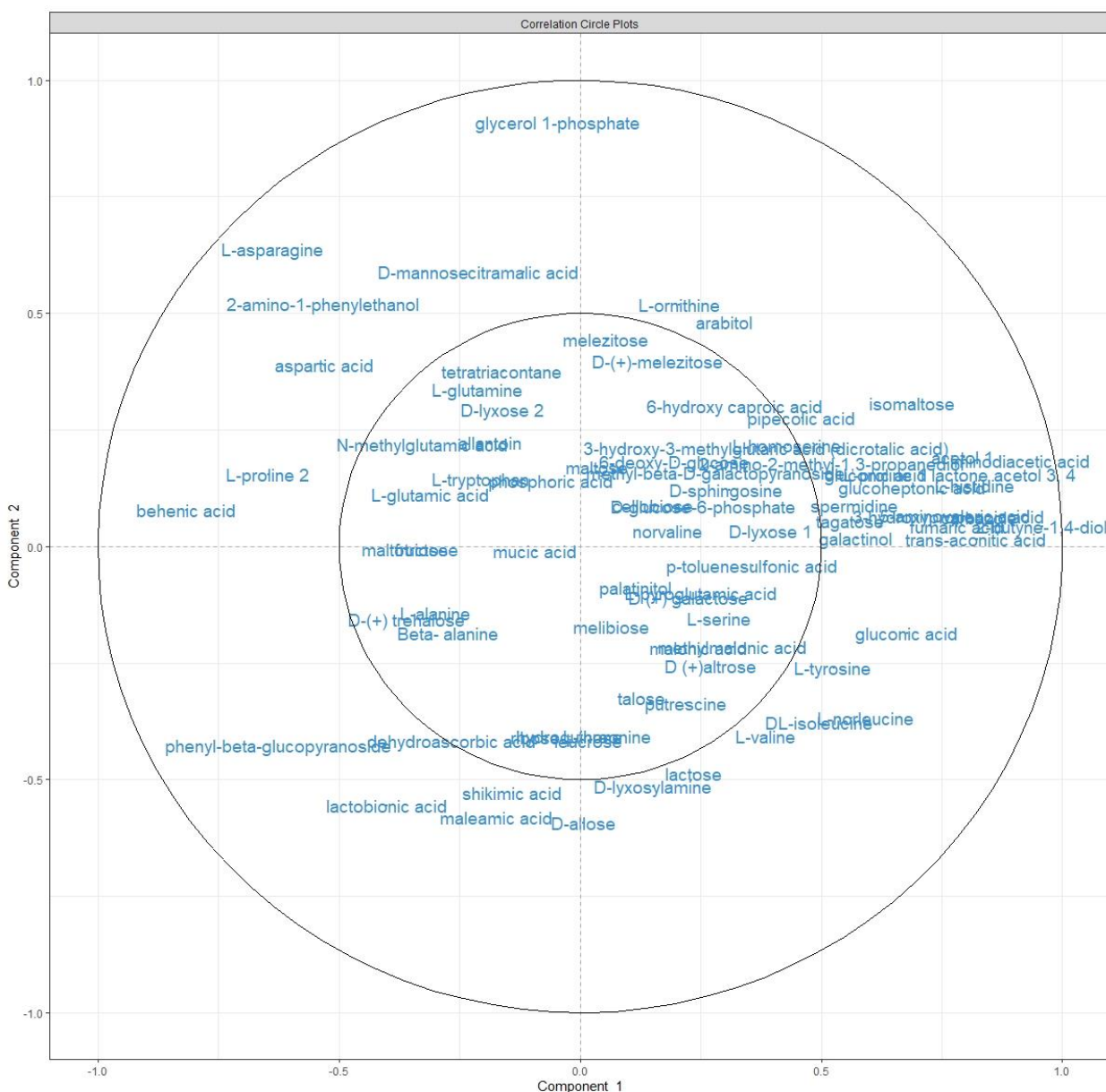
Συμπληρωματικά της PLS-DA, κατασκευάστηκε Κυκλικό Διάγραμμα Συσχέτισης (Correlation Circle Plot) προκειμένου να εντοπιστούν τα μεταβολικά συστατικά με την πλέον σημαντική συνεισφορά στο GC/MS μεταβολικό προφίλ των *Fol*- και των φυτών-μαρτύρων στους ιστούς ρίζας και βλαστού της ανθεκτικής και της ευαίσθητης ποικιλίας (Εικόνα 3.9 και Εικόνα 3.10).



**Εικόνα 3.9:** Κυκλικό διάγραμμα συσχέτισης (Correlation Circle Plot) για τον εντοπισμό των μεταβολιτών με την πλέον σημαντική συνεισφορά στο GC/MS μεταβολικό προφίλ ριζών που προέρχονται από *Fol*-μολυσμένα και φυτά-μάρτυρες της ανθεκτικής και της ευαίσθητης ποικιλίας.

Στις ρίζες, ως προς το συστατικό 1, τη μεγαλύτερη συνεισφορά παρουσίασαν μεταβολίτες που ανήκουν στις χημικές ομάδες των σακχάρων και των αμινοξέων. Ειδικότερα, ως πλέον σημαντικά αναδείχθηκαν τα σάκχαρα κελλοβιόζη, D-τρεχαλόζη, λευκρόζη, λακτόζη, μελιβιόζη και ταλόζη καθώς και τα αμινοξέα L-ορνιθίνη, L-σερίνη, ασπαρτικό οξύ, L-βαλίνη και L-γλουταμικό οξύ. Σημαντική συνεισφορά επίσης παρουσίασαν τα οργανικά οξέα βεγενικό οξύ και μελεϊναμικό οξύ καθώς και οι αζωτούχες ενώσεις σπερμιδίνη και αλλαντοΐνη. Τέλος, σημαντική ήταν και η συνεισφορά των πολυολών παλατινιτόλη και καρβαζόλη. Αντίθετα, ως προς το συστατικό 2, τη μεγαλύτερη συνεισφορά παρουσίασαν οι μεταβολίτες που ανήκουν στην ομάδα των αμινοξέων, με κυριότερα τα συστατικά L-ορνιθίνη, L-προλίνη,

L-γλουταμικό οξύ, ασπαρτικό οξύ, b-αλανίνη και L-σερίνη. Ακολούθως, σημαντική ήταν η συνεισφορά των σακχάρων μελιβιόζη, D-μανόζη και λακτόζη και των οργανικών οξέων κιτραμηλικό οξύ και βεχενικό οξύ. Τέλος, σημαντική ήταν η συνεισφορά των αζωτούχων ενώσεων αλλαντοΐνη και 2 αμινο-1-φαινυλαιθανόλη καθώς και των πολυολών αραβιτόλη και παλατινιτόλη. Αναφορικά με τις παρατηρηθέντες συσχετίσεις, οι μεταβολίτες L-προλίνη, Β-αλανίνη και D-μανόζη παρουσίασαν θετική μεταξύ τους συσχέτιση, ενώ παρόμοια συσχέτιση καταγράφηκε και μεταξύ των συστατικών κελλοβιόζη, D- τρεχαλόζη και μαλονικό οξύ. Είναι αξιοσημείωτο ότι μεταξύ των ανωτέρω δύο συστάδων (clusters) σημειώθηκε αρνητική συσχέτιση.



**Εικόνα 3.10:** Κυκλικό διάγραμμα συσχέτισης (Correlation Circle Plot) για τον εντοπισμό των μεταβολιτών με την πλέον σημαντική συνεισφορά στο GC/MS μεταβολικό προφίλ βλαστών που προέρχονται από *Fol*-μολυσμένα και φυτά-μάρτυρες της ανθεκτικής και της ευαίσθητης ποικιλίας.

Στο βλαστό, ως προς το συστατικό 1, τη μεγαλύτερη συνεισφορά παρουσίασαν οι μεταβολίτες που ανήκουν στην ομάδα των οργανικών οξέων, και ειδικότερα τα συστατικά λακτοβιονικό οξύ, βεχενικό οξύ, φουμαρικό οξύ, trans-ακονιτικό οξύ, γλυκονικό οξύ και ιμινοδιασετικό οξύ. Σημαντική ήταν επίσης η συνεισφορά των αμινοξέων L- ασπαραγίνη, ασπαρτικό οξύ, L- προλίνη και DL- ισολευκίνη, των αζωτούχων ενώσεων 2-αμινο-1-φαινυλαιθανόλη και νορλευκίνη καθώς και των πολυολών 2-βουτυνο-1,4-διόλη και ακετόλη. Τέλος, αξιοσημείωτη συνεισφορά καταγράφηκε για τα συστατικά φαινυλ-beta-γλυκοκυρανοσίδιο και γλυκονο-δ-λακτόνη. Ως προς το συστατικό 2, τη μεγαλύτερη συνεισφορά παρουσίασαν τα οργανικά οξέα σκιμικό οξύ, κιτραμηλικό οξύ, λακτοβιονικό οξύ και μελεϊναμικό οξύ. Ακολούθως, σημαντική ήταν η συνεισφορά των αμινοξέων ασπαρτικό οξύ, L- ορνιθίνη, L- ασπαραγίνη και των σακχάρων D- μανόζη, λακτόζη και ισομαλτόζη. Τέλος, η ανάλυση κατέδειξε ως σημαντική την επίδραση των αζωτούχων ενώσεων 2-αμινο-1-φαινυλαιθανόλη και D- λυξοζιλαμίνη και του γλυκοσίδιου φαινυλ-beta-γλυκοκυρανοσίδιο. Σε αντίθεση με τις ρίζες, στους βλαστούς σημειώθηκαν μόνο θετικές συσχετίσεις, οι οποίες αφορούν στις ακόλουθες συστάδες i) σκιμικό οξύ/λακτοβιονικό οξύ/μελεϊναμικό οξύ, ii) DL-ισολευκίνη/L-βαλίνη/L-νορλευκίνη, iii) φουμαρικό οξύ/2-βουτυνο-1,4-διόλη/trans-ακονιτικό οξύ και iv) ακετόλη/ιμινοδιασετικό οξύ/γλυκονο-δ- λακτόνη/L-ιστιδίνη/γλυκοεπτονικό οξύ.



#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Παγκοσμίως, η φακή καλλιεργείται σε πάνω από 35 χώρες και 5 διαφορετικές ηπείρους, καλύπτοντας συνολική έκταση 6.582.779 εκταρίων (FAO, 2019). Η ευρεία καλλιέργειά της οφείλεται τόσο στην υψηλή διατροφική της αξία, καθώς είναι πλούσια πηγή πρωτεϊνών (Nongmaithem and Meda, 2018) και απαραίτητων ιχνοστοιχείων όπως ο σίδηρος, ο ψευδάργυρος (Faris et al., 2013) και το φολικό οξύ (Nongmaithem and Meda, 2018), όσο και στις χαμηλές απαιτήσεις σε εισροές, δεδομένου ότι συγκαταλέγεται στην οικογένεια των ψυχανθών και μπορεί να καλύψει επαρκώς τις ανάγκες της σε άζωτο (McKenzie et al., 2007). Επιπλέον, η φακή διαθέτει την ικανότητα προσαρμογής σε ένα ευρύ φάσμα αγρο-κλιματικών συνθηκών (Sarker and Erskine, 2006), με αξιοσημείωτη ανεκτικότητα στην ξηρασία και στις χαμηλές θερμοκρασίες (Andrews and McKenzie, 2007), γεγονός που καθιστά την καλλιέργειά της εφικτή ακόμη και σε εκτάσεις που θεωρούνται ακατάλληλες για καλλιέργεια άλλων ειδών.

Ωστόσο, η καλλιέργεια της φακής πλήττεται από ένα ευρύ φάσμα βιοτικών παραγόντων καταπόνησης, οι οποίοι δύναται να προκαλέσουν σημαντικές απώλειες στην παραγωγικότητά της. Οι κυριότεροι βιοτικοί παράγοντες που προσβάλλουν τη φακή είναι οι παθογόνοι μύκητες, οι οποίοι είναι ικανοί να προκαλέσουν έως και την ολοκληρωτική καταστροφή της καλλιέργειας. Την κυριότερη εξ' αυτών αποτελεί η ασθένεια της φουζαρίωσης (Eujayl et al., 1988; Erskine and Bayaa, 1996; Bayaa et al., 1997; Al-Husien et al., 2007; Parihar et al., 2017; Hiremani and Dubey, 2018; Koleva et al., 2018; Soomro et al., 2018; Desai et al., 2019), η οποία προκαλείται από τον παθογόνο μύκητα *Fusarium oxysporum* Schlecht. Emend Snyder and Hansen f. sp. *lentis* Vasudeva and Srinivasan (*Fol*). Το παθογόνο μπορεί να επιβιώσει στο έδαφος μέσω των χλαμυδοσπορίων που παράγει για αρκετές καλλιεργητικές περιόδους, ακόμη και χωρίς την παρουσία ξενιστή (Taylor et al., 2007). Αν και έχουν προταθεί διάφορες στρατηγικές για την αντιμετώπιση της ασθένειας, η πλέον αποτελεσματική, οικονομική και αειφόρος προσέγγιση είναι η χρήση ποικιλιών με γενετική ανθεκτικότητα στην ασθένεια (Bayaa et al., 1995; Pournalibaba et al., 2015; Hiremani and Dubey, 2018), ιδιαίτερα λαμβάνοντας υπόψη την υψηλή γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των απομονώσεων του *Fol* (Mohammadi et al. 2011; Al-Husien et al. 2017; Hiremani and Dubey, 2019).

Στην Ελλάδα, έχει αναφερθεί η παρουσία του *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis*, κυρίως βάσει φαινοτυπικών παρατηρήσεων, που αφορούν σε εκδήλωση συμπτωμάτων χαρακτηριστικών της φουζαρίωσης όπως χλωρώσεις, μεταχρωματισμούς και συστροφή φύλλων (Βλαχοστεργίος, 2009; Καργιωτίδου, 2012), χωρίς ωστόσο αυτές να συνοδεύονται από εργαστηριακά δεδομένα ανίχνευσης και ταυτοποίησης του παθογόνου. Με δεδομένη την έλλειψη ερευνητικών

δεδομένων αναφορικά με τα είδη του γένους *Fusarium* που προσβάλλουν την καλλιέργεια φακής στον ελλαδικό χώρο, σκοπό της παρούσας μελέτης αποτέλεσε i) η απομόνωση και ταυτοποίηση του παθογόνου που προκαλεί συμπτώματα φουζαρίωσης σε φυτά που προέρχονται από τις κύριες ζώνες καλλιέργειας της φακής στην Ελλάδα και ii) η μελέτη των μοριακών μηχανισμών που διέπουν την ανθεκτικότητα της φακής έναντι της φουζαρίωσης σε μεταβολικό επίπεδο. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αποτελούν την πρώτη προσπάθεια ταυτοποίησης απομονώσεων του *Fusarium* spp. σε ζώνες καλλιέργειας της φακής στον ελλαδικό χώρο καθώς και εμπλουτισμού της διεθνούς βιβλιογραφίας με μεταβολικά συστατικά που σχετίζονται με το γνώρισμα της ανθεκτικότητας και μπορούν να αξιοποιηθούν ως δείκτες για την έμμεση επιλογή των ανθεκτικών γονοτύπων σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε συλλογή 24 εδαφικών δειγμάτων από 6 περιοχές, οι οποίες αντιπροσωπεύουν τις κύριες περιοχές καλλιέργειας φακής στον ελλαδικό χώρο, και τα φυτά παρουσίαζαν τα χαρακτηριστικά για την ασθένεια της φουζαρίωσης συμπτώματα. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την ύπαρξη του παθογόνου και κατέστη δυνατή η ταυτοποίηση 21 απομονώσεων μέσω μακροσκοπικής και μικροσκοπικής παρατήρησης. Με δεδομένο ότι η χρήση μορφολογικών δεικτών για την ταυτοποίηση ειδών του γένους *Fusarium* θεωρείται λιγότερο αξιόπιστη, συγκριτικά με τις μοριακές τεχνικές που βασίζονται στη χρήση της PCR, κρίθηκε αναγκαία η μοριακή ανάλυση των υπό μελέτη απομονώσεων ως μία γρήγορη και αξιόπιστη προσέγγιση για την ανίχνευση και ταυτοποίησή τους (Dubey et al., 2014; Rafique et al., 2015).

Προς την κατεύθυνση αυτή, και με δεδομένη την έλλειψη ειδικών διαγνωστικών δεικτών για τον μύκητα *Fusarium oxysporum* sp. *lentis*, η μοριακή ανάλυση των απομονώσεων αρχικά έγινε βάσει της αλληλουχίας που αντιστοιχεί στο γονίδιο *TEF*, το οποίο αποτελεί την ευρύτερα χρησιμοποιούμενη αλληλουχία για την ανίχνευση και διάκριση των ειδών του *Fusarium* spp. (Bogale et al., 2007; Dubey et al., 2014; O'Donnell et al., 2015; Rafique et al. 2015; Hiremani and Dubey, 2019). Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε ενίσχυση των επιλεγμένων αλληλουχιών DNA, αλληλούχιση των προϊόντων ενίσχυσης και σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών με κατατεθειμένες αλληλουχίες για το γονίδιο *TEF* σε διεθνείς βάσεις δεδομένων.

Τα αποτελέσματα της ευθυγράμμισης κατέδειξαν ποσοστό νουκλεοτιδικής ομολογίας 99 % των ελληνικών απομονώσεων με αντίστοιχα γονίδια απομονώσεων του γένους *Fusarium* spp. Ειδικότερα, το 33,3 % των απομονώσεων εμφάνισε υψηλή ομολογία (97 έως 99 %) με το *Fusarium oxysporum*, ενώ 5 εξ αυτών παρουσίασαν υψηλή ομολογία (97-99 %) με αλληλουχίες οι οποίες αντιστοιχούν στο *Fusarium oxysporum* f.sp.*lentis*. Αξίζει να σημειωθεί

ότι οι απομονώσεις αυτές προέρχονται από αγρούς της Λευκάδας και της Φλώρινας, στις οποίες η φακή καλλιεργείται ως μονοκαλλιέργεια. Ακολούθως, το 38,1 % των απομονώσεων εμφάνισε υψηλή ομολογία (93-99 %) με το γένος *Fusarium* spp. χωρίς όμως να καταστεί δυνατός ο προσδιορισμός του είδους, ενώ το υπόλοιπο 28,57 % των απομονώσεων παρουσίασε υψηλή ομολογία (86-99 %) με το παθογόνο *Fusarium solani*. Το παραπάνω εύρημα έρχεται σε συμφωνία με άλλες έρευνες όπου αναφέρεται η δυνατότητα του *F. solani* να προσβάλλει τους σπόρους φακής, προκαλώντας μεταβολές που είναι έκδηλες τόσο σε μορφολογικό όσο και σε φυσιολογικό επίπεδο (Kamel et al., 1973; Ahmed et al., 2017).

Στο πλαίσιο περαιτέρω ανάλυσης των απομονώσεων (5) που εμφάνισαν υψηλή ομολογία με το *F. oxysporum* f. sp. *lentis*, ακολούθησε η μελέτη των αλληλουχιών που αντιστοιχούν στα γονίδια *b-tubulin* και *calmodulin*. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν υψηλή νουκλεοτιδική ομοιότητα, της τάξης του 98 %, με ομόλογα γονίδια του *F. oxysporum*. Η ευθυγράμμιση των αλληλουχιών με το *formae specialis* (*f.sp. lentis*) δεν επετεύχθη, γεγονός που ωστόσο αποδίδεται στον ιδιαίτερα περιορισμένο αριθμό κατατεθειμένων αλληλουχιών για τα γονίδια *b-tubulin* και *calmodulin*. Περαιτέρω, η ανάλυση κατέδειξε την αδυναμία ομαδοποίησης των απομονώσεων βάσει της γεωγραφικής τους προέλευσης. Τα συνολικά αποτελέσματα της μελέτης παρέχουν ενδείξεις για την ομαδοποίηση των απομονώσεων, που προέρχονται από ζώνες καλλιέργειας της Λευκάδας και της Φλώρινας (3, 4, 10, 11 και 14), με απομονώσεις που ανήκουν στο *F. oxysporum* f.sp. *lentis*. Επιπλέον, τα αποτελέσματα παρέχουν πρόσθετες ενδείξεις σχετικά με την καταλληλότητα των αλληλουχιών που αντιστοιχούν στα γονίδια *TEF*, *b-tubulin* και *calmodulin* για την ταυτοποίηση ειδών που ανήκουν στο γένος *Fusarium*. Η παρούσα μελέτη μπορεί να αποτελέσει το έναυσμα για την περαιτέρω διερεύνηση της γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ των απομονώσεων του *Fol*, η οποία θα επιτρέψει τον αποτελεσματικότερο σχεδιασμό βελτιωτικών προγραμμάτων με στόχο την ανάπτυξη ποικιλιών με γενετική ανθεκτικότητα στην ασθένεια της φουζαρίωσης.

Στοχεύοντας στην αναβάθμιση των βελτιωτικών διαδικασιών που οδηγούν στη δημιουργία σύγχρονων ποικιλιών, τα τελευταία χρόνια οι "ομικές" προσεγγίσεις - γονιδωματική, πρωτεομική, μεταγραφομική και μεταβολομική - αποκτούν ολοένα και περισσότερο ενεργό ρόλο και πρακτικές εφαρμογές στη βελτίωση φυτών. Η μεταβολομική ανάλυση αδιαμφισβήτητα αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο της βιολογίας των συστημάτων, το οποίο συμβάλει στο συνεχή εμπλουτισμό της βασικής γνώσης σχετικά με τη ρύθμιση των μεταβολικών οδών (Fiehn, 2002). Τα τελευταία χρόνια, η μεταβολομική τυγχάνει ευρείας εφαρμογής σε μελέτες βιολογικών συστημάτων που στοχεύουν στην αποσαφήνιση των αλληλεπιδράσεων φυτού-παθογόνου σε φυτά μοντέλα (Kumar et al., 2015). Ωστόσο, οι μελέτες

που αφορούν σε καλλιεργούμενα είδη είναι σαφώς περισσότερο περιορισμένες (Kumar et al., 2015), ενώ αντίστοιχα ερευνητικά δεδομένα για την αλληλεπίδραση *F. oxysporum*-φακής λείπουν από τη διεθνή βιβλιογραφία.

Αντικείμενο της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η μελέτη της απόκρισης γενετικού υλικού φακής στο παθογόνο *Fusarium oxysporum* f. sp *lentis* σε μεταβολικό επίπεδο και η κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν το γνώρισμα της ανθεκτικότητας στην ασθένεια. Για το σκοπό αυτό, επιλέχθηκαν 2 ποικιλίες φακής, με διαφορετική απόκριση στην ασθένεια - ανθεκτική και ευαίσθητη ποικιλία -, οι οποίες μολύνθηκαν τεχνητά με το *Fol* και ακολούθησε ο προσδιορισμός του μεταβολικού προφίλ ρίζας και βλαστού, με χρήση αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας (GC-MS). Έπειτα από ταυτοποίηση των μεταβολιτών μέσω κατάλληλου λογισμικού, προσδιορίστηκαν οι μεταβολίτες οι οποίοι διέφεραν σημαντικά σε επίπεδο ποικιλίας, μεταχείρισης και αλληλεπίδρασής τους.

Η ανάλυση επέτρεψε την ανίχνευση και ταυτοποίηση συνολικά 178 μεταβολιτών, εκ των οποίων οι 84 επιλέχθηκαν, έπειτα από κατάλληλο φιλτράρισμα, και ταξινομήθηκαν στις χημικές ομάδες των υδατανθράκων, αμινοξέων, οργανικών οξέων, πολυολών, αζωτούχων ενώσεων και φωσφορικών ενώσεων. Από το σύνολο των μεταβολιτών, 17 συστατικά παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μεταβολή της συσσώρευσής τους, μεταβολή η οποία αφορούσε στη σύγκριση μεταξύ της ανθεκτικής και ευαίσθητης ποικιλίας ή μεταξύ των *Fol*-φυτών και των μαρτύρων ή στην αλληλεπίδραση ποικιλίας x μεταχείρισης.

Η παραγωγή συγκεκριμένων μεταβολιτών ως απόκριση των φυτών στην προσβολή από παθογόνα μπορεί να ενισχύσει την ικανότητα υπερκέρρασης του παράγοντα καταπόνησης. Η μεταβολή στη συσσώρευση πρωτογενών μεταβολιτών, όπως τα αμινοξέα και τα σάκχαρα, επιτελείται στο πλαίσιο ρύθμισης του μεταβολισμού της ενέργειας προκειμένου να καταστεί εφικτή η καταπολέμηση της παθογόνου επίθεσης (Scheideler et al., 2002; Heuberger et al., 2014; Chen et al., 2020). Ειδικότερα, τα σάκχαρα συμβάλλουν στην άμυνα έναντι παθογόνων, μέσω της δράσης τους ως μόρια εκκίνησης σε βιοχημικά μονοπάτια άμυνας των φυτών (Bolouri Moghaddam and Van den Ende, 2012).

Η τρεχαλόζη είναι ένα μη αναγωγικό σάκχαρο με σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φυτών, καθώς εμπλέκεται σε διεργασίες όπως η μεταγωγή σήματος σε αλληλεπιδράσεις με φυτοπαθογόνους ή συμβιώτες οργανισμούς και έντομα (Bolouri Moghaddam and Van den Ende, 2012). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι συμβάλλει στην επαγωγή των μηχανισμών άμυνας έπειτα από προσβολή από το παθογόνο *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* στο σιτάρι καθώς και

μετά από προσβολή από αφίδες (Reignault et al., 2001; Singh et al., 2011). Παράλληλα, η φωσφορυλιωμένη μορφή της (trehalose 6-phosphate) δρα ως ρυθμιστικό μόριο στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, συμμετέχοντας σε λειτουργίες ανάπτυξης, αύξησης και γήρανσης των φυτών (Bolouri Moghaddam and Van den Ende, 2012). Σε συμφωνία με προηγούμενες αναφορές σχετικά με τη θετική συσχέτιση της συσσώρευσης τρεχαλόζης με την ανθεκτικότητα έναντι καταπονήσεων (Foster et al., 2003; Botanga et al., 2012; Bönnighausen et al., 2019), τα αποτελέσματα κατέδειξαν σημαντική αύξηση της συσσώρευσής της στις ρίζες των *Fol*-φυτών της ανθεκτικής ποικιλίας. Αντίθετα, η μόλυνση δεν επέφερε μεταβολή των επιπέδων τρεχαλόζης στις ρίζες των *Fol*-φυτών της ευαίσθητης ποικιλίας, ενώ στους βλαστούς και των δύο ποικιλιών παρατηρήθηκε μικρή μείωση συγκριτικά με τους μάρτυρες. Τα ευρήματα αυτά παρέχουν πρόσθετες ενδείξεις για τη σημαντική συνεισφορά της τρεχαλόζης στην απόκριση έναντι βιοτικών καταπονήσεων.

Σημαντική επίσης ήταν η αύξηση στη συσσώρευση της κελλοβιόζης στη ρίζα των *Fol*-φυτών της ανθεκτικής ποικιλίας. Η κελλοβιόζη είναι ένα ολιγομερές της κελλόζης, η οποία αποτελεί το κύριο συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων και η σύνθεσή της έχει συσχετιστεί με την απόκριση έναντι καταπονήσεων καθώς μπορεί να λειτουργεί ως DAMP (damage-associated molecular pattern) (de Azevedo Souza et al., 2017; Khizar et al., 2020). Ειδικότερα, μπορεί να συμμετέχει στην διατήρηση της ακεραιότητας του κυτταρικού τοιχώματος και αντιπροσωπεύει ένα επιπλέον μόριο σηματοδότησης, έπειτα από διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος λόγω παθογόνου επίθεσης (de Azevedo Souza et al., 2017). Χρήζει ωστόσο περαιτέρω διερεύνησης το γεγονός ότι η κελλοβιόζη εμφάνισε σημαντική αύξηση στο βλαστό της ευαίσθητης ποικιλίας.

Στη χημική ομάδα των πολυολών, σημαντική ήταν η αύξηση της συσσώρευσης της παλατινιτόλης στις ρίζες των *Fol*-φυτών τόσο της ανθεκτικής όσο και της ευαίσθητης ποικιλίας, ενώ μικρότερη αύξηση σημειώθηκε στο βλαστό της ευαίσθητης ποικιλίας. Επίσης, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρόμοια απόκριση των πολυολών ακετόλη και 2-βουτυνο-1,4-διόλη, οι οποίες εμφάνισαν μηδενική συσσώρευση στις ρίζες των *Fol*-φυτών, ενώ στους βλαστούς των αντίστοιχων φυτών σημείωσαν μηδενική και ελαφρώς μειωμένη συσσώρευση στην ανθεκτική και ευαίσθητη ποικιλία αντίστοιχα. Οι πολυόλες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των ανώτερων φυτών, ενώ η αυξημένη συσσώρευσή τους έχει συσχετιστεί με την άμυνα έναντι καταπονήσεων και την προστασία έναντι οξειδωτικού στρες (ROS) υπό συνθήκες καταπόνησης (Williamson et al., 2002; Bönnighausen et al., 2019). Επιπλέον, υπό συνθήκες μυκητολογικών ασθενειών, σημαντική αύξηση των επιπέδων των πολυολών έχει συσχετιστεί με την παραγωγή οσμολυτών κατά την ταχεία αύξηση της

μυκητιακής βιομάζας, καθώς το παθογόνο εξέρχεται από τα πρωτογενώς μολυσμένα επιδερμικά κύτταρα (Draper et al., 2018).

Το άζωτο διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο κατά την αλληλεπίδραση παθογόνων-φυτών και μάλιστα αναφέρεται ότι η είσοδος ενός παθογόνου στο φυτό επιφέρει κινητοποίηση του αζώτου και μεταβολή της συσσώρευσης αμινοξέων (Tavernier et al., 2007; Chen et al., 2020). Στο πλαίσιο αυτό, ολοένα και περισσότερες μελέτες παρέχουν ενδείξεις σχετικά με το ρόλο των αμινοξέων και των παραγώγων τους στην άμυνα των φυτών (Chen et al., 2020). Στην ομάδα των αμινοξέων, σημειώθηκε σημαντική αύξηση της συσσώρευσης της ασπαραγίνης τόσο στη ρίζα και όσο και στο βλαστό των μολυσμένων φυτών και των δύο ποικιλιών. Η ασπαραγίνη είναι ένα ελεύθερο αμινοξύ το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μεταφορά του αζώτου στα ψυχανθή (Yang et al., 2005), καθώς και στη μεταγωγή σημάτων στρες (Heuberger et al., 2014). Προηγούμενες μελέτες έχουν αναδείξει την αύξηση των επιπέδων ασπαραγίνης σε φυτά ευαίσθητων ποικιλιών ρεβιθιού και ηλιάνθου, έπειτα από προσβολή από τα παθογόνα *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* (Kumar et al. 2016) και *Sclerotinia sclerotiorum*, αντίστοιχα (Peluffo et al., 2010). Επίσης, τα αποτελέσματα της μελέτης κατέδειξαν μεταβολή στη συσσώρευση προλίνης, έπειτα από μόλυνση με το *Fol*, με τις ποικιλίες να διαφέρουν σημαντικά ως προς το προφίλ συσσώρευσης του συγκεκριμένου μεταβολίτη. Πιο συγκεκριμένα, τόσο στις ρίζες όσο και στα φύλλα της ανθεκτικής ποικιλίας παρατηρήθηκε αύξηση της προλίνης στα *Fol*-φυτά, ενώ τα αντίστοιχα φυτά της ευαίσθητης εμφάνισαν μειωμένα επίπεδα προλίνης συγκριτικά με τους μάρτυρες. Σχετικά με την προλίνη, συνεχώς αυξανόμενα ερευνητικά δεδομένα επιβεβαιώνουν τη θετική συσχέτιση της συσσώρευσής της με την προηγμένη άμυνα, υπογραμμίζοντας παράλληλα το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει στην απόκριση των φυτών σε καταπονήσεις που οφείλονται σε πληθώρα βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων. Ειδικότερα, στην προλίνη αποδίδεται πολυδιάστατος ρόλος στο μεταβολισμό των φυτών καθώς εμπλέκεται σε διεργασίες που σχετίζονται με την προστασία από το οξειδωτικό στρες, τη μεταφορά ενέργειας, τη μεταγωγή σημάτων στρες υπό συνθήκες προσβολής από φυτοπαθογόνους οργανισμούς και τον κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) (Fabro et al., 2004; Verslues and Sharma, 2010; Chen et al., 2020). Στα ανώτερα φυτά, η προλίνη συντίθεται είτε από γλουταμικό οξύ είτε από ορνιθίνη. Το μη πρωτεϊνικό αμινοξύ ορνιθίνη, εκτός του ρόλου του ως πρόδρομης ένωσης της προλίνης, αποτελεί έναν ενδιαφέρον μεταβολίτη καθώς αποτελεί ενδιάμεσο προϊόν σε βασικές μεταβολικές οδούς. Η πλέον γνωστή λειτουργία της είναι αυτή στον κύκλο της ουρίας, ενώ λιγότερο μελετημένη είναι η λειτουργία της στο μονοπάτι σύνθεσης του ακετυλο-γλουταμικού (acetyl-glutamate), το οποίο λαμβάνει χώρα στους χλωροπλάστες (Fabro et al., 2004; Verslues and Sharma, 2010). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε η μεταβολή της

συσσώρευσης της ορνιθίνης, η οποία ανιχνεύθηκε αποκλειστικά στις ρίζες των *Fol*-φυτών της ανθεκτικής και ευαίσθητης ποικιλίας, ενώ στα φυτά-μάρτυρες εμφάνισε μηδενική συσσώρευση. Επίσης, στους βλαστούς της ανθεκτικής ποικιλίας παρουσιάστηκε το ίδιο προφίλ συσσώρευσης, ενώ μικρή μείωση σημειώθηκε στους βλαστούς των *Fol*-φυτών της ευαίσθητης ποικιλίας.

Επιπλέον, προηγούμενες έρευνες αναφέρουν το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν οι πολυαμίνες στην άμυνα των φυτών, μέσω της εμπλοκής τους σε σηματοδοτικά μονοπάτια άμυνας έναντι βιοτικών καταπονήσεων. Στην ομάδα των πολυαμινών, η ανάλυση κατέδειξε τη μειωμένη συσσώρευση της πουτρεσκίνης στα *Fol*-φυτά και των δύο ποικιλιών, με τις μολυσμένες ρίζες της ευαίσθητης ποικιλίας να εμφανίζουν μηδενική συσσώρευση. Παρά το γεγονός ότι τα ευρήματα αυτά αντιτίθενται σε προηγούμενες αναφορές που υπογραμμίζουν την αυξημένη συσσώρευση πουτρεσκίνης υπό συνθήκες καταπόνησης (Hamzehzarghani et al., 2008; Paranidharan et al., 2008; Bönnighausenet al., 2019), βρίσκονται σε πλήρη αναλογία με τα παρατηρηθέντα προφίλ συσσώρευσης της ορνιθίνης, η οποία αποτελεί πρόδρομη ουσία της πουτρεσκίνης.

Τα οργανικά οξέα, εκτός του ρόλου τους ως φυτοορμόνες που επάγουν την ανάπτυξη των φυτών, τους έχει αποδοθεί επιπλέον ο ρόλος ως αντιμικροβιακές ουσίες καθώς μπορούν να λειτουργήσουν ως επαγωγείς (διεγέρτες) αμυντικών αποκρίσεων (Morgunov et al., 2017). Επιπλέον, μπορούν να λειτουργήσουν ως ταχεία πηγή ενέργειας και άνθρακα για τη σύνθεση άλλων ενώσεων που προάγουν την άμυνα υπό συνθήκες καταπόνησης (Velásquez-Valle et al., 2020).

Η φωσφορική γλυκερόλη αποτελεί ένα σημαντικό συστατικό το οποίο συμμετέχει στις μεταβολικές διεργασίες των υδατανθράκων και των λιπιδίων, ενώ παράλληλα η αυξημένη συσσώρευσή της έχει αποδειχθεί ότι συνεισφέρει στην άμυνα των φυτών έναντι καταπονήσεων (Chanda et al., 2008; Chanda et al., 2011; Tenenboim, and Brotman., 2016). Ειδικότερα, οι Chanda et al. (2018) απέδειξαν τη θετική συσχέτιση μεταξύ υψηλών επιπέδων φωσφορικής γλυκερόλης και άμυνας έναντι του παθογόνου μύκητα *Colletotrichum higginsianum* σε φυτά αραβίδοψης (*Arabidopsis thaliana*). Επίσης, έχει προταθεί ότι η φωσφορική γλυκερόλη επάγει μία μορφή ευρέος φάσματος ανοσία στα φυτά, τη διασυστηματική επαγόμενη ανθεκτικότητα (SAR), η οποία ενεργοποιείται στην πρωτογενή μόλυνση και παρέχει διασυστηματική προστασία από δευτερογενείς μολύνσεις (Chanda et al., 2011). Στην παρούσα μελέτη, σημαντική ήταν η μεταβολή στη συσσώρευση της φωσφορικής γλυκερόλης, μεταξύ των *Fol*-και των φυτών-μαρτύρων. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της συσσώρευσής

της στις ρίζες των *Fol*-φυτών της ανθεκτικής ποικιλίας, ενώ η ευαίσθητη ποικιλία εμφάνισε αντίθετη τάση. Τέλος, στο βλαστό, καταγράφηκε αύξηση των επιπέδων φωσφορικής γλυκερόλης και στις δύο ποικιλίες, με την ανθεκτική ωστόσο να εμφανίζει μηδενική συσσώρευση στα φυτά-μάρτυρες.

Εν κατακλείδι, στην παρούσα διατριβή η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν την ανθεκτικότητα της φακής στην ασθένεια της φουζαρίωσης προσεγγίστηκε με μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση, η οποία αποτελεί την πλέον κατάλληλη τεχνολογία, ιδιαίτερα για την ανάλυση βιολογικών συστημάτων που χαρακτηρίζονται από έλλειψη σχετικών ερευνητικών δεδομένων. Τα αποτελέσματα της μεταβολομικής ανέδειξαν σημαντική μεταβολή στη συσσώρευση μεταβολικών συστατικών ως απόκριση στη μόλυνση από το *F. oxysporum* f. sp *lentis*, ενώ παράλληλα η πολυπαραγοντική ανάλυση επέτρεψε σε ορισμένες περιπτώσεις το διαχωρισμό μεταξύ ανθεκτικών και ευαίσθητων γονοτύπων. Τα συνολικά ευρήματα της μελέτης θέτουν μία βάση για την περαιτέρω μελέτη των σχετικών μηχανισμών που δύναται να συμβάλουν ουσιαστικά στην αποσαφήνιση των μεταβολικών οδών στις οποίες βασίζεται η ανθεκτικότητα της φακής στη φουζαρίωση. Η εξέλιξη αυτή αναμένεται να επιτρέψει την πρακτική αξιοποίηση των μεταβολικών δεδομένων για τον προσδιορισμό των μεταβολιτών που μπορεί να αξιοποιηθούν ως βιοδείκτες για την αξιόπιστη έμμεση επιλογή ανθεκτικού γενετικού υλικού σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια.



## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abraham, R. (2015). Lentil (*Lens culinaris* Medikus) Current status and future prospect of production in Ethiopia. *Advances in Plants & Agricultural Research*, 2(2), 40.
- Ahmed, D., & Shahab, S. (2017). Effect of different inoculum levels of *Fusarium solani* (Mart.) Sacc on plant growth, biochemical and nutrient parameters of lentil (*Lens culinaris* Medik.). *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 10(2), 239-243.
- Akbar, A., Hussain, S., Ullah, K., Fahim, M., & Ali, G. S. (2018). Detection, virulence and genetic diversity of *Fusarium* species infecting tomato in Northern Pakistan. *PloS one*, 13(9).
- Al-Husien, N. H., Hamwiah, A., Ahmed, S., & Bayaa, B. (2017). Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* population affecting lentil in Syria. *Journal of Phytopathology*, 165(5), 306-312.
- Aliferis, K. A., & Jabaji, S. (2012). FT-ICR/MS and GC-EI/MS metabolomics networking unravels global potato sprout's responses to *Rhizoctonia solani* infection. *PLoS One*, 7(8).
- Aliferis, K. A., Faubert, D., & Jabaji, S. (2014). A metabolic profiling strategy for the dissection of plant defense against fungal pathogens. *PLoS One*, 9(11).
- Andrews, M., & McKenzie, B. A. (2007). Adaptation and ecology. In *Lentil: An ancient crop for modern times*. S. S. Yadav, D. McNeil, P. C. Stevenson Eds. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 23-32.
- Arya, A., Kushwaha, K. (2018). Evaluation of chemicals for the management of lentil wilt, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(5), 2320-2323.
- Barulina, O. H. (1930). Lentil of USSR and of other countries. *Bull. Appl. Bot. Genet. Pl. Breed.*, 40, 1-319.
- Bayaa, B., Erskine, W., & Hamdi, A. (1995). Evaluation of a wild lentil collection for resistance to vascular wilt. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 42(3), 231-235.
- Bayaa, B., Erskine, W., & Singh, M. (1997). Screening lentil for resistance to *Fusarium* wilt: methodology and sources of resistance. *Euphytica*, 98(1-2), 69-74.
- Bhatty, R. S. (1988). Composition and Quality of Lentil (*Lens culinaris* Medik): A Review. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 21(2), 144-160.

- Bogale, M., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J., & Steenkamp, E. T. (2006). Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates from Ethiopia using AFLP, SSR and DNA sequence analyses. *Fungal Diversity*, 23(6), 51.
- Bogale, M., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J., & Steenkamp, E. T. (2007). Species-specific primers for *Fusarium redolens* and a PCR-RFLP technique to distinguish among three clades of *Fusarium oxysporum*. *FEMS microbiology letters*, 271(1), 27-32.
- Bollina, V., Kumaraswamy, G. K., Kushalappa, A. C., Choo, T. M., Dion, Y., Rioux, S., Faubert, D., & Hamzehzarghani, H. (2010). Mass spectrometry-based metabolomics application to identify quantitative resistance-related metabolites in barley against *Fusarium* head blight. *Molecular plant pathology*, 11(6), 769-782.
- Bolouri Moghaddam, M. R., & Van den Ende, W. (2012). Sugars and plant innate immunity. *Journal of experimental botany*, 63(11), 3989-3998.
- Bönnighausen, J., Schauer, N., Schäfer, W., & Bormann, J. (2019). Metabolic profiling of wheat rachis node infection by *Fusarium graminearum*—decoding deoxynivalenol-dependent susceptibility. *New Phytologist*, 221(1), 459-469.
- Botanga, C. J., Bethke, G., Chen, Z., Gallie, D. R., Fiehn, O., & Glazebrook, J. (2012). Metabolite profiling of *Arabidopsis* inoculated with *Alternaria brassicicola* reveals that ascorbate reduces disease severity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(12), 1628-1638.
- Cajka, T., Vaclavikova, M., Dzuman, Z., Vaclavik, L., Ovesna, J., & Hajslova, J. (2014). Rapid LC-MS-based metabolomics method to study the *Fusarium* infection of barley. *Journal of separation science*, 37(8), 912-919.
- Camañes, G., Scalschi, L., Vicedo, B., González-Bosch, C., & García-Agustín, P. (2015). An untargeted global metabolomic analysis reveals the biochemical changes underlying basal resistance and priming in *Solanum lycopersicum* and identifies 1-methyltryptophan as a metabolite involved in plant responses to *Botrytis cinerea* and *Pseudomonas syringae*. *The Plant Journal*, 84(1), 125-139.
- Chanda, B., Venugopal, S. C., Kulshrestha, S., Navarre, D. A., Downie, B., Vaillancourt, L., Kachroo A., & Kachroo, P. (2008). Glycerol-3-phosphate levels are associated with basal resistance to the hemibiotrophic fungus *Colletotrichum higginsianum* in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 147(4), 2017-2029.

- Chanda, B., Xia, Y., Mandal, M. K., Yu, K., Sekine, K. T., Gao, Q. M., Selote, D., Hu, Y., Stromberg, A., Navaree, D., Kachroo, A., & Kachroo, P. (2011). Glycerol-3-phosphate is a critical mobile inducer of systemic immunity in plants. *Nature genetics*, *43*(5), 421.
- Chandra, N. S., Wulff, E. G., Udayashankar, A. C., Nandini, B. P., Niranjana, S. R., Mortensen, C. N., & Prakash, H. S. (2011). Prospects of molecular markers in *Fusarium* species diversity. *Applied microbiology and biotechnology*, *90*(5), 1625-1639.
- Chaudhry, M. A., Ilyas, M. B., & Ghazanfar, M. U. (2008). Sources of resistance from lentil international *Fusarium* wilt nursery 2006-7. *Pakistan Journal of Phytopathology, Pakistan*.
- Chen, L., Wu, Q., He, T., Lan, J., Ding, L., Liu, T., Wu, K., Pan, Y., & Chen, T. (2020). Transcriptomic and Metabolomic Changes Triggered by *Fusarium solani* in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Genes*, *11*(2), 177.
- Choudhary, A. K., & Kumar, S. (2016). Genetic Improvement of Lentil for *Fusarium* wilt Resistance. Society for Upliftment of Rural Economy Varanasi.
- Cokkizgin, A., & Shtaya, M. J. (2013). Lentil: Origin, cultivation techniques, utilization and advances in transformation. *Agricultural Science*, *1*(1), 55-62.
- Davidson, J. A., Pande, S., Bretag, T. W., Lindbeck, K. D., & Krishna-Kishore, G. (2007). Biology and management of *Botrytis* spp. in legume crops. In *Botrytis: biology, pathology and control* (pp. 295-318). Springer, Dordrecht.
- de Azevedo Souza, C., Li, S., Lin, A. Z., Boutrot, F., Grossmann, G., Zipfel, C., & Somerville, S. C. (2017). Cellulose-derived oligomers act as damage-associated molecular patterns and trigger defense-like responses. *Plant physiology*, *173*(4), 2383-2398.
- Desai, S., Prasad, R. D., & Kumar, G. P. (2019). *Fusarium* Wilts of Chickpea, Pigeon Pea and Lentil and Their Management. In *Microbial Interventions in Agriculture and Environment* (pp. 49-68). Springer, Singapore.
- Draper, J., Rasmussen, S., & Zubair, H. (2018). Metabolite analysis and metabolomics in the study of biotrophic interactions between plants and microbes. *Annual Plant Reviews online*, 25-59.
- Dubey, S. C., Priyanka, K., & Upadhyay, B. K. (2014). Development of molecular markers and probes based on TEF-1 $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin and ITS gene sequences for quantitative detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* by using real-time PCR. *Phytoparasitica*, *42*(3), 355-366.
- Erskine, W., & Bayaa, B. (1996). Yield loss, incidence and inoculum density associated with vascular wilt of lentil. *Phytopathologia Mediterranea*, *35*(1), 24-32.

- Eujayl, I., Erskine, W., Bayaa, B., Baum, M., & Pehu, E. (1998). Fusarium vascular wilt in lentil: inheritance and identification of DNA markers for resistance. *Plant breeding*, *117*(5), 497-499.
- Fabro, G., Kovács, I., Pavet, V., Szabados, L., & Alvarez, M. E. (2004). Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in Arabidopsis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *17*(4), 343-350.
- FAO (2019), Food and Agriculture Organization, [www.fao.org](http://www.fao.org).
- Faris, M. E. A. I. E., Takruri, H. R., & Issa, A. Y. (2013). Role of lentils (*Lens culinaris* L.) in human health and nutrition: a review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, *6*(1), 3-16.
- Ferguson, M. E., Maxted, N., Van Slageren, M. I. C. H. A. E. L., & Robertson, L. D. (2000). A re-assessment of the taxonomy of Lens Mill. (Leguminosae, Papilionoideae, Viciae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, *133*(1), 41-59.
- Fiehn, O. (2002). Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. In *Functional genomics* (pp. 155-171). Springer, Dordrecht.
- Glass, N. L., & Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.*, *61*(4), 1323-1330.
- Gunnaiah, R., Kushalappa, A. C., Duggavathi, R., Fox, S., & Somers, D. J. (2012). Integrated metabolo-proteomic approach to decipher the mechanisms by which wheat QTL (Fhb1) contributes to resistance against Fusarium graminearum. *PloS one*, *7*(7).
- Hamzehzarghani, H., Kushalappa, A. C., Dion, Y., Rioux, S., Comeau, A., Yaylayan, V., Marshall, W.D., & Mather, D. E. (2005). Metabolic profiling and factor analysis to discriminate quantitative resistance in wheat cultivars against fusarium head blight. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *66*(4), 119-133.
- Hamzehzarghani, H., Paranidharan, V., Abu-Nada, Y., Kushalappa, A. C., Dion, Y., Rioux, S., Comeau, A., Yaylayan, V., & Marshall, W. D. (2008). Metabolite profiling coupled with statistical analyses for potential high-throughput screening of quantitative resistance to Fusarium head blight in wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*, *30*(1), 24-36.

- Heuberger, A. L., Robison, F. M., Lyons, S. M. A., Broeckling, C. D., & Prenni, J. E. (2014). Evaluating plant immunity using mass spectrometry-based metabolomics workflows. *Frontiers in Plant Science*, 5, 291.
- Hiremani, N. S., & Dubey, S. C. (2018). Race profiling of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* causing wilt in lentil. *Crop Protection*, 108, 23-30.
- Hiremani, N. S., & Dubey, S. C. (2019). Phylogenetic relationship among Indian population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* infecting lentil and development of specific SCAR markers for detection. *3 Biotech*, 9(5), 196.
- Hoagland, D. R., & Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *Circular. California agricultural experiment station*, 347(2nd edit).
- Infantino, A., Kharrat, M., Riccioni, L., Coyne, C. J., McPhee, K. E., & Grünwald, N. J. (2006). Screening techniques and sources of resistance to root diseases in cool season food legumes. *Euphytica*, 147(1-2), 201-221.
- Joshi, M., Timilsena, Y., & Adhikari, B. (2017). Global production, processing and utilization of lentil: A review. *Journal of integrative agriculture*, 16(12), 2898-2913.
- Kamel, M., Shatla, M. N., & El Shanawani, M. Z. (1973). Histopathological studies on hypocotyl of lentils infected by *Fusarium solani*/Histopathologische Untersuchungen an Hypokotylen von Linsen infiziert mit *Fusarium solani*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection*, 547-550.
- Kang, S., Demers, J., del Mar Jimenez-Gasco, M., & Rep, M. (2014). *Fusarium oxysporum*. In *Genomics of Plant-Associated Fungi and Oomycetes: Dicot Pathogens* (pp. 99-119). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Khizar, M., Shi, J., Saleem, S., Liaquat, F., Ashraf, M., Latif, S., Haroon, U., Hasan S. W., ur Rehman, S., Chaudhary, H. J., & Quraishi, U. M. (2020). Resistance associated metabolite profiling of *Aspergillus* leaf spot in cotton through non-targeted metabolomics. *PloS one*, 15(2), e0228675.
- Foster, A. J., Jenkinson, J. M., & Talbot, N. J. (2003). Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plant infection by *Magnaporthe grisea*. *The EMBO journal*, 22(2), 225-235.
- Kim-Anh Le Cao, Florian Rohart, Ignacio Gonzalez, Sebastien Dejean with key contributors Benoit Gautier, Francois Bartolo, contributions from Pierre Monget, Jeff Coquery, FangZou

- Yao and Benoit Liqueur. (2016). mixOmics: Omics Data Integration Project. R package version 6.1.1. <https://CRAN.R-project.org/package=mixOmics>
- Koleva, M., Stanoeva, Y., Kiryakov, I., Ivanova, A., & Chamurlyiski, P. (2018). Evaluation of lentil cultivars and lines for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. lentis. *Agricultural Science and Technology*, 10(1), 25-28.
- Kováčiková, E., & Suchánek, A. (1973). A Method of Lentil Inoculation with *Fusarium oxysporum* Schlecht. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite Naturwissenschaftliche Abteilung: Allgemeine, Landwirtschaftliche und Technische Mikrobiologie*, 128(1-2), 12-22.
- Kumar, R., Bohra, A., Pandey, A. K., Pandey, M. K., & Kumar, A. (2017). Metabolomics for plant improvement: status and prospects. *Frontiers in plant science*, 8, 1302.
- Kumar, Y., Dholakia, B. B., Panigrahi, P., Kadoo, N. Y., Giri, A. P., and Gupta, V. S. (2015). Metabolic profiling of chickpea-*Fusarium* interaction identifies differential modulation of disease resistance pathways. *Phytochemistry* 116, 120–129.
- Kumar, Y., Zhang, L., Panigrahi, P., Dholakia, B. B., Dewangan, V., Chavan, S. G., Kunjir, S.M., Wu, X., Li, N., Rajmohanan, P.R., Kadoo, N. Y., Giri, A.P., Tang, H., & Gupta, V. S. (2016). *Fusarium oxysporum* mediates systems metabolic reprogramming of chickpea roots as revealed by a combination of proteomics and metabolomics. *Plant biotechnology journal*, 14(7), 1589-1603.
- Kumaraswamy, K. G., Kushalappa, A. C., Choo, T. M., Dion, Y., & Rioux, S. (2011). Mass spectrometry based metabolomics to identify potential biomarkers for resistance in barley against fusarium head blight (*Fusarium graminearum*). *Journal of chemical ecology*, 37(8), 846-856.
- Ladizinsky, G. (1979). The origin of lentil and its wild genepool. *Euphytica*, 28(1), 179-187.
- Lindon, J. C., & Nicholson, J. K. (2008). Spectroscopic and statistical techniques for information recovery in metabonomics and metabolomics. *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 1, 45-69.
- Lodhi, M. A., Ye, G. N., Weeden, N. F., & Reisch, B. I. (1994). A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 12(1), 6-13.
- Longobardi, F., Innamorato, V., Di Gioia, A., Ventrella, A., Lippolis, V., Logrieco, A. F., & Agostiano, A. (2017). Geographical origin discrimination of lentils (*Lens culinaris* Medik.)

using <sup>1</sup>H NMR fingerprinting and multivariate statistical analyses. *Food chemistry*, 237, 743-748.

McKenzie, B. A., Andrews, M., & Hill, G. D. (2007). Nutrient and irrigation management. In *Lentil: An ancient crop for modern times*. S. S. Yadav, D. McNeil, P. C. Stevenson Eds. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 145-158.

McNeil, D. L., & Materne, M. (2007). Rhizobium management and nitrogen fixation. In *Lentil: An ancient crop for modern times*. S. S. Yadav, D. McNeil, P. C. Stevenson Eds. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 127-143.

Mohammadi, N., Goltapeh, E. M., Kari, D. H., Babaie, A. A., & HR, P. (2011). The genetic diversity of Iranian isolates causing Fusarium wilt of lentil. *Journal of Agricultural Technology*, 7(6), 1809-1822.

Morgunov, I. G., Kamzolova, S. V., Dedyukhina, E. G., Chistyakova, T. I., Lunina, J. N., Mironov, A. A., Stepanova, N. N., Shemshura, O. N., & Vainshtein, M. B. (2017). Application of organic acids for plant protection against phytopathogens. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(3), 921-932.

Muehlbauer, F. J., Cho, S., Sarker, A., McPhee, K. E., Coyne, C. J., Rajesh, P. N., & Ford, R. (2006). Application of biotechnology in breeding lentil for resistance to biotic and abiotic stress. *Euphytica*, 147(1-2), 149-165.

Mulè, G., Susca, A., Stea, G., & Moretti, A. (2004). Specific detection of the toxigenic species *Fusarium proliferatum* and *F. oxysporum* from asparagus plants using primers based on calmodulin gene sequences. *FEMS Microbiology Letters*, 230(2), 235-240.

Murray, G. A., Eser, D., Gusta, L. V., & Eteve, G. (1988). Winter hardiness in pea, lentil, faba bean and chickpea. In *World crops: Cool season food legumes*. Summerfield R.J. Eds. Springer, Dordrecht, pp. 831-843.

Muth, D., Kachlicki, P., Krajewski, P., Przystalski, M., & Stobiecki, M. (2009). Differential metabolic response of narrow leafed lupine (*Lupinus angustifolius*) leaves to infection with *Colletotrichum lupini*. *Metabolomics*, 5(3), 354-362.

Nikolaou, L., Maxted, N. (2009). Community-based Landrace Conservation: Lentils of Eglouvi, Lefkada. In *European landraces: on-farm conservation, management and use* (No.

15). M. Vetelainen, V. Negri, N. Maxted Eds. *Biodiversity International, Rome, Italy*, pp. 223-232.

Nongmaithem, R., & Meda, V. (2018). Lentils and its Utilization: A Review. *Research & Reviews: Journal of Food Science and Technology*, 5(1), 34-44.

Nosratabadi, M., Kachuei, R., Rezaie, S., & Harchegani, A. B. (2018). Beta-tubulin gene in the differentiation of *Fusarium* species by PCR-RFLP analysis. *system*, 3, 8.

O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E., & Ploetz, R. C. (1998b). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(5), 2044-2049.

O'Donnell, K., Nirenberg, H. I., Aoki, T., & Cigelnik, E. (2000). A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience*, 41(1), 61-78.

O'Donnell, K., Ward, T. J., Robert, V. A., Crous, P. W., Geiser, D. M., & Kang, S. (2015). DNA sequence-based identification of *Fusarium*: current status and future directions. *Phytoparasitica*, 43(5), 583-595.

Omar, S. A. M., Salem, D. E., & Rizk, M. A. (1988). Sources of resistance to root-rot/wilt disease complex of lentil [*Lens culinaris*]. *Lentil Experimental News Service*.

Paranidharan, V., Abu-Nada, Y., Hamzehzarghani, H., Kushalappa, A. C., Mamer, O., Dion, Y., Rioux, S., Comeau, A., & Choiniere, L. (2008). Resistance-related metabolites in wheat against *Fusarium graminearum* and the virulence factor deoxynivalenol (DON). *Botany*, 86(10), 1168-1179.

Parihar, A. K., Basandrai, A. K., Saxena, D. R., Kushwaha, K. P. S., Chandra, S., Sharma, K., Singha, K. D., Singh, D., Lal, H. C., & Gupta, S. (2017). Biplot evaluation of test environments and identification of lentil genotypes with durable resistance to fusarium wilt in India. *Crop and Pasture Science*, 68(11), 1024-1030.

Park, D. (1963). The presence of *Fusarium oxysporum* in soils. *Transactions of the British Mycological Society*, 46(3), 444-448.

Peluffo, L., Lia, V., Troglia, C., Maringolo, C., Norma, P., Escande, A., Hopp, E. H., Lytovchenko, A., Fernie, A. R., Heinz, R., & Carrari, F. (2010). Metabolic profiles of sunflower



genotypes with contrasting response to *Sclerotinia sclerotiorum* infection. *Phytochemistry*, 71(1), 70-80. Pierviovanni, A. R. (2000). The evolution of lentil (*Lens culinaris* Medik.) cultivation in Italy and its effects on the survival of autochthonous populations. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 47(3), 305-314.

Pouralibaba, H. R., Rubiales, D., & Fondevilla, S. (2015). Identification of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* in Spanish lentil germplasm. *European journal of plant pathology*, 143(2), 399-405.

Pouralibaba, H. R., Šatović, Z., Cobos, M. J., Rubiales, D., & Fondevilla, S. (2019). Genetic diversity and structure of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* isolates from Iran, Syria and Algeria. *European Journal of Plant Pathology*, 153(4), 1019-1029.

R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>

Rafique, K., Rauf, C. A., Naz, F., & Shabbir, G. (2015). DNA sequence analysis, morphology and pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* isolates inciting lentil wilt in Pakistan. *International Journal of Biosciences*, 7, 74-91.

Rafique, K., Rauf, C. A., Naz, F., & Shabbir, G. (2016). Management of vascular wilt of lentil through host plant resistance, biological control agents and chemicals. *Pak. J. Bot*, 48(5), 2085-2092.

Ranjan, A., Westrick, N. M., Jain, S., Piotrowski, J. S., Ranjan, M., Kessens, R., & Kabbage, M. (2019). Resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean involves a reprogramming of the phenylpropanoid pathway and up-regulation of antifungal activity targeting ergosterol biosynthesis. *Plant biotechnology journal*, 17(8), 1567-1581.

Redden, B., Maxted, N., Furman, B., & Coyne, C. (2007). History and origin. In *Lentil: An ancient crop for modern times*. S. S. Yadav, D. McNeil, P. C. Stevenson Eds. *Springer, Dordrecht, The Netherlands*, pp. 11-22.

Reignault, P. H., Cogan, A., Muchembled, J., Lounes-Hadj Sahraoui, A., Durand, R., & Sancholle, M. (2001). Trehalose induces resistance to powdery mildew in wheat. *New Phytologist*, 149(3), 519-529.

Robison, F. M., Turner, M. F., Jahn, C. E., Schwartz, H. F., Prenni, J. E., Brick, M. A., & Heuberger, A. L. (2018). Common bean varieties demonstrate differential physiological and metabolic responses to the pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant, cell & environment*, 41(9), 2141-2154.

- Rubiales, D., Fondevilla, S., Chen, W., Gentzbittel, L., Higgins, T. J., Castillejo, M. A., Singh, K. B., & Rispaill, N. (2015). Achievements and challenges in legume breeding for pest and disease resistance. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1-3), 195-236.
- Sandhu, J. S., & Singh, S. (2007). History and origin. In *Lentil: An ancient crop for modern times*. S. S. Yadav, D. McNeil, P. C. Stevenson Eds. *Springer, Dordrecht, The Netherlands*, pp. 1-9.
- Sarker, A., & Erskine, W. (2006). Recent progress in the ancient lentil. *The Journal of Agricultural Science*, 144(1), 19-29.
- Saxena, M. C. (2009). Plant morphology, anatomy and growth habit. In *The lentil: Botany, production and uses*. W. Erskine, F.J. Muehlbauer, A. Sarker, B. Sharma Eds. *CABI Press, Wallingford, UK*, pp. 34-46.
- Scheideler, M., Schlaich, N. L., Fellenberg, K., Beissbarth, T., Hauser, N. C., Vingron, M., Slusarenko, A. J., & Hoheisel, J. D. (2002). Monitoring the switch from housekeeping to pathogen defense metabolism in *Arabidopsis thaliana* using cDNA arrays. *Journal of Biological Chemistry*, 277(12), 10555-10561.
- Sekhon, H. S., Singh, G., & Ram, H. (2007). Lentil-based cropping systems. In *Lentil: An ancient crop for modern times*. S. S. Yadav, D. McNeil, P. C. Stevenson Eds. *Springer, Dordrecht, The Netherlands*, pp. 107-126.
- Sharma, S. K., Dawson, I. K., & Waugh, R. (1995). Relationships among cultivated and wild lentils revealed by RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 91(4), 647-654.
- Singh, V., Louis, J., Ayre, B. G., Reese, J. C., & Shah, J. (2011). TREHALOSE PHOSPHATE SYNTHASE11-dependent trehalose metabolism promotes *Arabidopsis thaliana* defense against the phloem-feeding insect *Myzus persicae*. *The Plant Journal*, 67(1), 94-104.
- Skliros, D., Kalloniati, C., Karalias, G., Skaracis, G. N., Rennenberg, H., & Flegmetakis, E. (2018). Global metabolomics analysis reveals distinctive tolerance mechanisms in different plant organs of lentil (*Lens culinaris*) upon salinity stress. *Plant and soil*, 429(1-2), 451-468.
- Soomro, M. P., Wagan, K. H., Hussain, K., Dhiloo, S. P. S., Soomro, M. H., Hassan, S., & Mastoi, P. M. (2018). Response of lentil varieties against *Fusarium* wilt. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(1), 858-862.

- Stein, S. E. (1999). An integrated method for spectrum extraction and compound identification from gas chromatography/mass spectrometry data. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 10(8), 770-781.
- Tavernier, V., Cadiou, S., Pageau, K., Laugé, R., Reisdorf-Cren, M., Langin, T., & Masclaux-Daubresse, C. (2007). The plant nitrogen mobilization promoted by *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus* leaves depends on fungus pathogenicity. *Journal of experimental botany*, 58(12), 3351–3360.
- Taylor, P., Lindbeck, K., Chen, W., & Ford, R. (2007). Lentil diseases. In *Lentil: An ancient crop for modern times*. S. S. Yadav, D. McNeil, P. C. Stevenson Eds. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 291-313.
- Tenenboim, H., & Brotman, Y. (2016). Omic relief for the biotically stressed: metabolomics of plant biotic interactions. *Trends in plant science*, 21(9), 781-791.
- Tiwari, N., Ahmed, S., & Sarker, A. (2018). Fusarium wilt: a killer disease of lentil. In *Fusarium—plant diseases, pathogen diversity, genetic diversity, resistance and molecular markers*. T. Askun Ed. IntechOpen, Rijeka, 119-138.
- Vagelas, I. (2014). Diagnosis and management of *Sclerotinia* stem rot (white mould) of lentils in Greece. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47(10), 1209-1217.
- Velásquez-Valle, R., Villa-Ruano, N., Hidalgo-Martínez, D., Zepeda-Vallejo, L. G., Pérez-Hernández, N., Reyes-López, C. A., Reyes-Cervantes, E., Medina-Melchor, D. L., & Becerra-Martínez, E. (2020). Revealing the <sup>1</sup>H NMR metabolome of mirasol chili peppers (*Capsicum annuum*) infected by *Candidatus Phytoplasma trifolii*. *Food Research International*, 131, 108863.
- Verslues, P. E., & Sharma, S. (2010). Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 8.
- Vlachostergios, D. N., & Roupakias, D. G. (2017). Screening under Low Plant Density Reinforces the Identification of Lentil Plants with Resistance to Fusarium Wilt. *Crop Science*, 57(3), 1285-1294.
- Williamson, J. D., Jennings, D. B., Guo, W. W., Pharr, D. M., & Ehrenshaft, M. (2002). Sugar alcohols, salt stress, and fungal resistance: polyols—multifunctional plant protection. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127(4), 467-473.

Wojakowska, A., Muth, D., Narożna, D., Mądrzak, C., Stobiecki, M., & Kachlicki, P. (2013). Changes of phenolic secondary metabolite profiles in the reaction of narrow leaf lupin (*Lupinus angustifolius*) plants to infections with *Colletotrichum lupini* fungus or treatment with its toxin. *Metabolomics*, 9(3), 575-589.

Yadav, S. S., McNeil, D., & Stevenson, P. C. (Eds.). (2007). *Lentil: An ancient crop for modern times*. Springer Science & Business Media.

Yang, Z., Rogers, L. M., Song, Y., Guo, W., & Kolattukudy, P. E. (2005). Homoserine and asparagine are host signals that trigger in planta expression of a pathogenesis gene in *Nectria haematococca*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(11), 4197-4202.

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

Zhu, L., Zhou, Y., Li, X., Zhao, J., Guo, N., & Xing, H. (2018). Metabolomics analysis of soybean hypocotyls in response to *Phytophthora sojae* infection. *Frontiers in plant science*, 9, 1530.

Βλαχοστέργιος, Δ. Ν. (2009). *Μελέτη συστημάτων επιλογής ποικιλιών φακής (*Lens culinaris* Medik.) κατάλληλων στην οργανική γεωργία* (No. GRI-2009-2461). Aristotle University of Thessaloniki, Θεσσαλονίκη.

ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ (2016), *Ελληνικές ποικιλίες οσπρίων*, Γενική Διεύθυνση Αγροτικής Έρευνας, Ινστιτούτο Βιομηχανικών & Κτηνοτροφικών Φυτών, Λάρισα [https://www.elgo.gr/images/pdf/publications/other\\_publications/Poikilies-Ospriwn.pdf](https://www.elgo.gr/images/pdf/publications/other_publications/Poikilies-Ospriwn.pdf)

Καργιωτίδου, Α. (2012). *Γενεαλογική και μαζική επιλογή για απόδοση σε πληθυσμό φακής υπό συνθήκες χαμηλής πυκνότητας και χαμηλών εισροών και η σχέση της έντασης επιλογής με την παραγωγικότητα σε σπόρο και το επίπεδο ανοχής των φυτών σε ιούς* Doctoral dissertation, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης (ΔΠΘ). Τμήμα Αγροτικής Ανάπτυξης. Τομέας Διαχείρισης Φυτικής Παραγωγής. Εργαστήριο Γενετικής Βελτίωσης Φυτών και Φυσιολογίας, Ορεστιάδα.

Παπακόστα-Τασοπούλου, Δ. (2012). *Ειδική γεωργία Σιτηρά & Ψυχανθή*, τεύχος Β, Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη, σελ. 161-178.

ΥΠΑΑΤ, Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και τροφίμων, [www.minagric.gr/](http://www.minagric.gr/)

Ηλεκτρονικές πηγές

<https://www.vir.nw.ru/>

<https://www.ars-grin.gov/>

<http://www.nbpgr.ernet.in/>