

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ, ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΘΕΜΑ: «ΣΥΚΡΙΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΣΤΗ ΦΑΚΗ
(*Lens culinaris* L.) ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΕΣ ΣΠΟΡΑΣ ΚΑΙ
ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΙΑ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΟ
Fusarium oxysporum sp.»



ΦΩΤΗ ΧΡΥΣΑΝΘΗ-ΛΑΜΠΡΙΝΗ

*Γεωπόνος
Υπότροφος ΙΚΥ*

**Επιβλέπων
ΧΑ ΙΜΠΡΑΧΙΜ-ΑΒΡΑΑΜ,
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

ΒΟΛΟΣ 2014

Μεταπτυχιακή Διατριβή

ΣΥΚΡΙΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΣΤΗ ΦΑΚΗ (*Lens culinaris* L.) ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΕΣ ΣΠΟΡΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΙΑ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΟ *Fusarium oxysporum* sp.

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

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

Μέλη:

Μαυρομάτης Αθανάσιος, επίκουρος καθηγητής Τμήματος Γεωπονίας, Α.Π.Θ.

Βλαχοστέργιος Δημήτριος, ερευνητής Ινστιτούτου Κτηνοτροφικών Φυτών και Βοσκών Λάρισας

Η ολοκλήρωση της εργασίας αυτής έγινε στο πλαίσιο της υλοποίησης του μεταπτυχιακού προγράμματος το οποίο συγχρηματοδοτήθηκε μέσω της Πράξης «Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών ΙΚΥ με διαδικασία εξατομικευμένης αξιολόγησης ακαδ. έτους 2012-2013» από πόρους του Ε.Π. «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου (ΕΚΤ) και του ΕΣΠΑ (2012-2013).

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Μετά το τέλος της συγκεκριμένης δουλειάς θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στους παρακάτω:

Τον επίκουρο καθηγητή του Α.Π.Θ κ. Μαυρομάτη Α., επιβλέποντα της μεταπτυχιακής διατριβής μου, για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, για την καθοδήγηση στη διενέργεια του πειραματισμού, την ανάλυση και συζήτηση των δεδομένων καθώς και για την ηθική στήριξη του όλο αυτό το διάστημα.

Τον καθηγητή του τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Χα Α., για την άψογη συνεργασία και επίβλεψη του στο τελευταίο στάδιο της διατριβής μου.

Τον κ. Βλαχοστέργιο Δ., ερευνητή του Ινστιτούτου Κτηνοτροφικών Φυτών και Βοσκών Λάρισας, μέλος της τριμελούς επιτροπής μου, για την συνεχή προθυμία του καθώς και την απρόσκοπτη καθοδήγηση του σε όλα τα στάδια της εργασίας μου.

Τον κ. Τοκατλίδη Ι., για την εμπιστοσύνη και τη ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετάσχω σε ένα τόσο αξιόλογο ερευνητικό πρόγραμμα «ΘΑΛΗΣ» καθώς και την υποστήριξή του όλο το διάστημα μέχρι την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Ακόμη όλο το τμήμα Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Π.Θ και πιο συγκεκριμένα το εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και τον καθηγητή κ. Γούναρη Ι., το εργαστήριο Φυτοπαθολογίας και τον καθηγητή κ. Βέλλιο Ε., και τέλος το εργαστήριο Εντομολογίας .

Το εργαστήριο της Γενετικής Βελτίωσης Φυτών με καθηγητή τον κ. Χα Α., και τα μέλη αυτού κ. Πανάγου Μ. και την διδάκτορα Σακελλαρίου Μ., για την προθυμία, την άψογη συνεργασία και τη συνολική συμβολή τους σε όλα τα στάδια των πειραμάτων μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες στο εργαστήριο Βελτίωσης Φυτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου της Αθήνας και τον καθηγητή κ. Σκαράκη Γ., για την φιλοξενία και τη διεξαγωγή ενός μέρους των μοριακών πειραμάτων μου.

Την εκλεγμένη λέκτορα του εργαστηρίου της Γενετικής Βελτίωσης των φυτών του Π.Θ. κ. Παυλή Ουρανία για τις ουσιαστικές υποδείξεις, την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, την κριτική ανάγνωση του κειμένου, τις εύστοχες υποδείξεις, τις

ποικίλες διευκολύνσεις, ιδιαίτερα στα κρίσιμα τελευταία στάδια της διατριβής, και τέλος την τόσο σημαντική για μένα ηθική στήριξή της.

Τους αγαπημένους συναδέλφους: Μυλωνά Ι., Τζανταρμά Κ., Καριωτίδου Α. για την άρτια συνεργασία και βοήθεια, καθώς και τους αγαπημένους μου φίλους για την ακλόνητη αγάπη, τη συνεχή συμπαράσταση και υπομονή τους σε όλα τα στάδια της μέχρι τώρα πορείας μου: Εύα, Πόπη, Ελένη, Φώτη, Κατερίνα, Έλενα, Χάρη, Αλεξάνδρα, Κέλλυ, Αγγελο, Ραφία και Σάββα.

Επίσης το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών για την οικονομική στήριξή του στο τελευταίο εξάμηνο των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Τέλος, οι θερμότερες ευχαριστίες ανήκουν στην οικογένεια, και ιδιαίτερα στην αδερφή μου Αθηνά που μέσα από τις αντιθέσεις και διαφωνίες μας μπόρεσα να καταλάβω τον ιδιαίτερο και ξεχωριστό τρόπο αγάπης της.

Ο κόσμος
προχωράει επειδή κάποιος
επιμένει να κάνει την ίδια ερώτηση ξανά και ξανά...

Πίνακας Περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	8
ABSTRACT.....	10
ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ.....	11
1.1 ΓΕΝΙΚΑ.....	11
1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ.....	12
1.3 ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ.....	13
1.4 ΑΥΞΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ.....	16
1.5 ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ.....	19
1.6 ΜΥΚΗΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΣΒΑΛΛΟΥΝ ΤΗ ΦΑΚΗ	20
1.7 ΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΤΗΣ ΦΑΚΗΣ.....	23
1.8 ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΗΣ ΦΑΚΗΣ.....	24
1.8.1 Στόχοι.....	24
1.8.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ.....	28
1.8.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΠΙΛΟΓΗ.....	38
1.9 ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΗΣ ΦΑΚΗΣ.....	45
1.9.1 Συμβολή των μοριακών δεικτών στη Βελτίωση της φακής.....	45
1.9.2 Αξιοποίηση μοριακών δεικτών στην εκτίμηση της γενετικής παραλλακτικότητας.....	46
1.9.3 Βελτίωση φακής για ανθεκτικότητα σε ασθένειες - Παθοβελτίωση ...	52
1.9.4 Γενετικοί χάρτες σύνδεσης στη φακή.....	59
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	64
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	65
2.1 ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.....	65
2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΓΡΟΥ.....	66
2.1.1. Πειράματα αξιολόγησης του παραγωγικού δυναμικού.....	66
2.2.2 Στατιστική ανάλυση.....	71
2.2 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ.....	72
2.2.1 Συλλογή ιστού - Εξαγωγή DNA.....	72
2.2.2 Επιλογή SSR εκκινητών.....	74
2.2.3 Αναλύσεις SSR-PCR.....	75
2.2.4 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων των προϊόντων ενίσχυσης σε πηκτή αγαροζης.....	76
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	78
3.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΓΡΟΥ.....	78

3.1.1 Αξιολόγηση του παραγωγικού δυναμικού στην πυκνότητα σποράς 1,8 φυτών / m ²	78
3.1.2 Αξιολόγηση του παραγωγικού δυναμικού στην πυκνότητα σποράς 4,6 φυτών/m ²	81
3.1.3 Απογονικός έλεγχος και ανάλυση του παραγωγικού δυναμικού των επιλογών 1 ^{ης} γενεάς σε συνθήκες αραιής σποράς.....	84
3.2 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ.....	90
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	96
4.1 Πειράματα 1 ^{ης} καλλιεργητικής περιόδου.....	97
4.2 Πείραμα 2 ^{ης} καλλιεργητικής περιόδου.....	99
4.3 Μοριακές αναλύσεις δεικτών τύπου SSR.....	101
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	103
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	105

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπό της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η αξιολόγηση και επιλογή εντός του τοπικού πληθυσμού φακής "Εγκλουβή" για ανθεκτικότητα στο μύκητα εδάφους *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis*, μετά από συγκριτική εφαρμογή της κυψελωτής μεθοδολογίας σε δύο διαφορετικές πυκνότητες σποράς καθώς και ο απογονικός έλεγχος των επιλογών. Απώτεροι στόχοι των πειραμάτων ήταν: ο εντοπισμός της καταλληλότερης απόστασης μεταξύ των αξιολογούμενων φυτών που επιτρέπει την πρόωμη έκφραση της προσβολής καθώς και ο γενετικός έλεγχος των αξιολογούμενων φυτών φακής μέσω μοριακών δεικτών τύπου SSR στενά συνδεδεμένων με την ανθεκτικότητα στο *Fusarium oxysporum* ώστε η χρήση τους να αποτελέσει βοηθητικό εργαλείο στην τελική διαδικασία επιλογής.

Ο πειραματισμός διεξήχθη στο αγρόκτημα του ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε της Λάρισας. Κατά την πρώτη καλλιεργητική περίοδο (2011-2012), εγκαταστάθηκαν 2 σχέδια κυψελωτής διάταξης (NR-0) σε διαφορετικές αποστάσεις φύτευσης (1,8 φυτά/m² και 4,6 φυτά/m²) και αφού επιλέχθηκαν τα 15 υψηλοαποδοτικότερα φυτά από κάθε πυκνότητα, τη δεύτερη καλλιεργητική περίοδο πραγματοποιήθηκε η απογονική αξιολόγηση των 30 οικογενειών 1^{ης} γενεάς σε κυψελωτή διάταξη R-31. Με βάση το παραγωγικό δυναμικό, που προσδιορίστηκε από το δυναμικό απόδοσης ανά φυτό και το συντελεστή ομοιότητας, ξεχώρισαν 4 οικογένειες. Η μικρή πυκνότητα σποράς φαίνεται να μεγιστοποιεί τη φαινοτυπική διαφοροποίηση και συνεπώς, λειτουργεί ως αποτελεσματικότερο εργαλείο ανίχνευσης ανθεκτικών-ανεκτικών γονοτύπων. Οι μεγάλες τιμές της τυπικής απόκλισης και το μεγάλο CV υποδηλώνουν τη μεγάλη φαινοτυπική διαφοροποίηση μεταξύ των γονοτύπων που επιτυγχάνεται μέσω της κυψελωτής μεθοδολογίας, ειδικότερα κατά τις πρώτες γενεές επιλογής.

Με στόχο την εύρεση πολυμορφισμών που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα της φακής Εγκλουβής στην ασθένεια της φουζαρίωσης, εφαρμόστηκε ανάλυση DNA τύπου SSR σε δείγματα ατομικών φυτών. Οι SSR αναλύσεις περιελάμβαναν τη μελέτη 26 δειγμάτων, τα οποία με βάση τη συμπτωματολογία τους κατηγοριοποιήθηκαν σε ευαίσθητα, ανθεκτικά και φυτά με μέτρια ανάπτυξη συμπτωμάτων. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA από νεαρά φύλλα ατομικών φυτών και ακολούθησε PCR χρησιμοποιώντας 10 επιλεγμένα ζεύγη SSR εκκινητών. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων και

υπολογισμός των μεγεθών των ενισχυμένων ζωνών. Η έλλειψη υψηλών επιπέδων πολυμορφισμού, όπως αυτή αποκαλύφθηκε από τις SSR αναλύσεις, αποτελεί ένδειξη για χαμηλή ενδοπληθυσμιακή παραλλακτικότητα. Το γεγονός αυτό ενισχύει την υπόθεση ότι το υψηλό CV πιθανότατα οφείλεται σε εξειδικευμένη ως προς τη φουζαρίωση διαφορική απόκριση των φυτών, καθιστώντας έτσι πιο αποτελεσματική την κατευθυνόμενη προς ανθεκτικότητα επιλογή. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης παρέχουν ενδείξεις για την εύρεση μίας νέας πολυμορφικής ζώνης που προκύπτει από την εφαρμογή του δείκτη SSR 59-2 και πιθανότατα σχετίζεται με την γενετική ανθεκτικότητα στη φουζαρίωση.

ABSTRACT

The objectives of the present study was the evaluation of the local landrace cv. Eglouvi (*Lens culinaris* spp) and the selection of plants with respect to resistance against Fusarium wilt, a disease caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. lentis, using two non-replicated honeycomb designs, as well as the evaluation of progeny deriving from selections. In particular, the study aimed at determining the most suitable plant density so as to allow for an early expression of disease symptoms and the screening on a single plants basis using SSR molecular markers linked to trait of disease resistance, aiming at exploiting such loci for marker-assisted selections.

Two non-replicated (NR-0) honeycomb experiments were established in the region of Larisa, Greece, during the 2011-212 season, at density of 1,8 plants/m² and 4,6 plants/m², respectively. Following selection of fifteen high yielding plants from each density, during the second growing season, progeny evaluation was conducted in an R-31 experiment. Based on the genotype crop yield potential, which is defined by the progeny yield potential index and coefficient of homeostasis, four lines were selected. Our findings demonstrate that the low density planting allows for a maximization of phenotypic differentiation and thus, may prove more efficient in screening resistant and/or tolerant genotypes. Furthermore, the high values of standard deviation and CV highlight the efficiency of this methodology in revealing genetic differences among genotypes, specifically during the early generations of selection.

Aiming at revealing polymorphisms related to genetic resistance of the landrace cv. Eglouvi against fusarium, SSR analysis was conducted on 26 individual plants, which on the basis of phenotypic evaluation were classified as susceptible, resistant and plants with moderate symptom development. Following DNA isolation from young lentil leaves, PCR analysis was performed using 10 selected SSR primer pairs and finally the amplification products were visualized on agarose gels. The selected SSR primers employed revealed a relatively low intrapopulation diversity. This finding strengthens the hypothesis that the high CV probably reflects a differential plant response to fusarium and therefore, may be exploited for maximizing the efficiency of targeted selections. Overall findings provide evidence that the marker SSR 59-2 results in the amplification of a novel polymorphic band which is probably related to the genetic resistance against fusarium.

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

1.1 ΓΕΝΙΚΑ

Η φακή είναι ετήσιο διπλοειδές φυτό ($2x = 2n = 14$) με επιστημονικό όνομα *Lens culinaris* L. Medik. subsp. *culinaris* και ανήκει βοτανικά στην οικογένεια των ψυχανθών (Leguminosae).

Η καλλιεργούμενη φακή προέρχεται από την Εγγύς Ανατολή και τη Μικρά Ασία ενώ η καλλιέργεια της χρονολογείται από την αρχαιότητα. Στο χάρτη αρχαιολογικών ανασκαφών νεολιθικής εποχής, υπάρχουν πέντε σημεία στον ελλαδικό χώρο όπου αναφέρονται ευρήματα απολιθωμένων σπόρων φακής, με το πιο διαδεδομένο είναι αυτό στο Τολό Αργολίδας που χρονολογείται σε μια εποχή 12000-20000 π.Χ. (Sandhu and Singh, 2007). Η καλλιέργεια της διαδόθηκε γρήγορα από την περιοχή της Νότιας Τουρκίας στη περιοχή του Νείλου, στην Ελλάδα και στην Κεντρική Ευρώπη.

Στην αρχαιότητα, η καλλιέργεια της φακής ήταν εκτεταμένη στη Μεσοποταμία, την Παλαιστίνη και σε άλλες χώρες γύρω από τη Μεσόγειο. Στην αρχαία Ελλάδα είχε εξέχουσα σημασία και ονομαζόταν «φακός» ή «φακέα». Μνεία της γίνεται από τον Ηρόδοτο, τον Αριστοφάνη και τον Διοσκουρίδη (Παπακώστα, 2005). Τέλος, πολυάριθμες και αξιοσημείωτες είναι και οι αναφορές της στη Βίβλο και στην κλασική λογοτεχνία, οι οποίες και μαρτυρούν την σημαντικότητα και την ιδιαιτερότητα του συγκεκριμένου φυτού.

Η φακή είναι μία από τις σημαντικότερες καλλιέργειες οσπρίων σε πολλές χώρες του κόσμου. Η καλλιέργειά της εκτείνεται από την Άπω Ανατολή μέχρι την Μεσόγειο, την Ασία, την Ευρώπη και τον Δυτικό Κόσμο. Ο Καναδάς κατατάσσεται πρώτη παραγωγική χώρα και ακολουθούν η Ινδία, η Τουρκία και η Αυστραλία. Επίσης στις ΗΠΑ, οι φακές καταλαμβάνουν περίπου 60.000 εκτάρια και από το 1984 έως το 1993, η παραγωγή έφτασε τους 65.000 τόνους. Στην Αυστραλία, η φακή αποτελεί μία αρκετά προσοδοφόρα εξαγωγική καλλιέργεια όπου διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο σε περιοχές με μέσο έως χαμηλό ποσοστό βροχόπτωσης και σε μέσης σύστασης εδάφη.

Όσον αφορά την κατανάλωση της, οι σημαντικότερες καταναλώτριες χώρες είναι η Ινδία, η Τουρκία, η Ιαπωνία και η Συρία (www.cpnindia.com). Στην Ελλάδα, η καλλιέργεια της φακής έχει περιοριστεί σημαντικά (μέση ετήσια παραγωγή 971

τόνοι), με αποτέλεσμα το 95% των εγχώριων αναγκών να καλύπτονται με εισαγωγές από άλλες χώρες όπως η Τουρκία και ο Καναδάς. (Τζουραμάνη κ.α., 2008). Πιο συγκεκριμένα, η μέση απόδοση για την Ελλάδα ανέρχεται σε 124 kg/στρέμμα, ενώ η αξιοποίηση βελτιωμένων ποικιλιών αναμένεται να αυξήσει την παραγωγή στα 250 kg/στρέμμα. Για το έτος 2011, η παραγωγή των οσπρίων στην Ευρώπη έφτασε τους 103089 τόνους, ενώ ο αντίστοιχος αριθμός για την Ελλάδα ανέρχεται στους 2858 τόνους. Όσον αφορά την παραγωγή για το ίδιο έτος, αυτή ανέρχεται στους 1,17 τόνους/εκτάριο για την Ευρώπη ενώ στην Ελλάδα αγγίζει τους 1,28 τόνους/εκτάριο (FAO, 2011).

1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Το είδος *L. culinaris* subsp. *orientalis* θεωρείται ο πρόγονος του καλλιεργούμενου είδους *L. culinaris* subsp. *culinaris* (Ladizinsky, 1979). Από μορφολογικής άποψης έχει αποδειχθεί ότι το άγριο είδος *Lens culinaris* spp. *orientalis* είναι πολύ στενά συγγενικό με το *Lens culinaris* και πιθανόν να είναι όντως ο πρόγονός του, ενώ το *L. nigricans* παρουσιάζει αρκετές διαφορές από το *Lens culinaris* και το *Lens culinaris* spp. *orientalis* (Barulina, 1930; Williams et al., 1974; Zohary et al., 2000). Με βάση όμως την ικανότητα διασταύρωσης και την γονιμότητα των παραγόμενων υβριδίων, τα διάφορα είδη του γένους *Lens* συγκαταλέγονται σε δύο βιολογικά είδη, στο *Lens culinaris* και στο *L.nigricans* (Ladizinsky et al., 1984). Σε μια πιο πρόσφατη ταξινόμηση που βασίστηκε στη χρήση μορφολογικών και μοριακών δεικτών, οι van Oss et al.(1997), οι Ferguson et al. (2000) και οι Sarker and Erskine (2006) πρότειναν την ταξινόμηση του γένους *Lens* σε 7 είδη/υποείδη:

1. <i>Lens culinaris</i> Medikus (a) subsp. <i>culinaris</i> (b) subsp. <i>orientalis</i> (Boiss.) Ponert (c) subsp. <i>tomentosus</i> (Ladiz.) (d) subsp. <i>odemensis</i> (Ladz.)

2. <i>Lens ervoides</i> (Brign.) Grande 3. <i>Lens nigricans</i> (M. Bieb) Godr. 4. <i>Lens lamottei</i> Czefr.

Η συλλογή καλλιεργούμενης φακής του ICARDA, που διατηρείται στο National Bureau of Plant Genetic Resources (NBPGR) στο Νέο Δελχί, στην Ινδία, περιλαμβάνει 475 καταχωρήσεις. Συγκεκριμένα, 222 καταχωρήσεις ανήκουν στο *L.*

culinaris subsp. *orientalis*, 57 στο subsp. *odemensis*, 134 στο *L. ervoides*, 55 στο *L. nigricans* και 7 στο *L. lamottei* (Ferguson and Erskine, 2000).

Επίσης, μεγάλη συλλογή φακής υπάρχει στην Αυστραλία στο ATFCC (Australian Temperate Field Crops Collection), όπου φυλάσσονται 5.250 καταχωρήσεις (<http://149.144.200.50:8080/QMWebRoot/SiteMain.jsp>). Η Τράπεζα του Vavilon στη Ρωσία (N.I. Vavilof Research Institute of Plant Industry) έχει 320.000 καταχωρήσεις από 15 βοτανικές οικογένειες, 2.352 είδη από 425 γένη. Περιλαμβάνει 2.396 καταχωρήσεις φακής (<http://vir.nw.ru>).

Μέχρι πρόσφατα, η διατήρηση γενετικού υλικού τοπικών ποικιλιών φακής και άγριων συγγενικών ειδών γινόταν κυρίως *ex-situ*, ενώ πρόσφατα ξεκίνησε και η *in-situ* διατήρηση, μέσα στα πλαίσια ολοκληρωμένων στρατηγικών διατήρησης. Σε αντίθεση με την *ex-situ* διατήρηση, η *in-situ* διατήρηση επιτρέπει την εξελικτική δράση της φυσικής επιλογής, επιδρώντας έτσι θετικά στην προσαρμοστικότητα του γενετικού υλικού (Ferguson et al., 1998).

1.3 ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Η φακή είναι ετήσιο, αυτογονιμοποιούμενο, διπλοειδές φυτό ($2n=14$), με μέγεθος απλοειδούς γονιδιώματος 4.063 Mb (Duran et al., 2004; Hamwieh et al., 2005). Έχει μία λεπτή πασσαλώδη ρίζα από την οποία εκφύονται ινώδεις πλάγιες ρίζες. Η μορφή του ριζικού συστήματος όμως εξαρτάται τόσο από τον γονότυπο όσο και από τις εδαφικές συνθήκες των περιοχών, όπου οι γονότυποι αυτοί εξελίχθηκαν. Στην κύρια ρίζα καθώς και στις πλάγιες διακλαδώσεις, κυρίως στα ανώτερα τμήματα του εδάφους, σχηματίζονται φυμάτια συνεχούς ανάπτυξης με σχήμα συνήθως επίμηκες ωοειδές αλλά και στρογγυλό.

Το υπέργειο τμήμα του φυτού αποτελείται από τον κύριο βλαστό και από πρώτης και δεύτερης τάξης διακλαδώσεις. Οι βλαστοί είναι λεπτοί και έχουν γωνιώδη περιφέρεια με ραβδώσεις. Ανάλογα, με τον τρόπο έκπτυξης των βλαστών, οι διάφορες ποικιλίες μπορεί να έχουν όρθια ή έρπουσα ανάπτυξη, με όλες τις ενδιάμεσες μορφές. Τα στελέχη, ανάλογα με την ποικιλία, φέρουν τρίχες ή είναι σχεδόν λεία. Επίσης, σε ορισμένους τύπους λείπει η χρωστική ανθοκυανίνη, ενώ σε άλλους είτε περιορίζεται στη βάση των βλαστών, είτε εκτείνεται σε όλο τους το μήκος (Εικ. 1).

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

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

Οι λοβοί είναι λείοι, μικροί, πεπλατυσμένοι, με διαστάσεις 6-20 mm μήκος και 3,5-11 mm πλάτος. Οι σπόροι έχουν σχήμα αμφίκυρτου φακού και είναι λιγότερο ή περισσότερο πεπλατυσμένοι, με βάρος από 20 έως 80 mg και διάμετρο από 2 έως 9 mm. Ανάλογα με την ποικιλία, το περισπέρμιο έχει ποικίλα χρώματα και η επιφάνεια των σπόρων είναι συνήθως λεία, αλλά σε μερικές μεγαλόκαρπες ποικιλίες μπορεί να είναι ρυτιδωμένη (Παπακώστα, 2005). Πιο συγκεκριμένα, με βάση το μέγεθος του σπόρου, το καλλιεργούμενο είδος διαιρείται σε δύο υποείδη, τις μικρόσπερμες (διάμετρος σπόρου 2-6 mm) και τις μεγαλόσπερμες φακές (διάμετρος σπόρου 6-9 mm). Στη χώρα μας, αναφέρεται και μία ενδιάμεση κατηγορία (μεσόσπερμες) (Ηλιάδης, 1992β).

Οι μεγαλόσπερμες ποικιλίες εμφανίζονται κυρίως στην περιοχή της Μεσογείου και στο δυτικό ημισφαίριο, ενώ οι μικρόσπερμες έχουν έντονη παρουσία στην περιοχή της Ινδίας και στις περιοχές της Εγγύς Ανατολής (Muehlbauer et al., 1995). Συμπληρωματικά, οι μακρόσπερμες ποικιλίες έχουν κίτρινες ή πορτοκαλί κοτυληδόνες και περισπέρμιο ποικίλου χρωματισμού, από ωχρό κίτρινο έως μαύρο, ενώ οι μεγαλόσπερμες έχουν κίτρινες κοτυληδόνες και ωχρό πράσινο περισπέρμιο, το οποίο μπορεί να έχει στίγματα. Οι μεγαλόσπερμες ποικιλίες παρουσιάζουν πιο εύρωστη δομή από τις μικρόσπερμες καθώς και μεγαλύτερα φυλλάρια και καρπούς (Cubero, 1981). Οι σπόροι αποτελούν πλούσια πηγή μεταλλικών στοιχείων (K, P, Fe, Zn) και βιταμινών, απαραίτητων για την ανθρώπινη διατροφή (Iqbal et al., 2006), ενώ τα υπολείμματα του φυτού χρησιμοποιούνται ως ζωοτροφή (Erskine, 1990a). Εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητας σε λυσίνη και τρυπτοφάνη, η κατανάλωση των σπόρων φακής μαζί με το σιτάρι και το ρύζι προσφέρει μια ισορροπημένη διατροφή σε θρεπτικά αμινοξέα (Iqbal et al., 2006; Sarker and Erskine, 2006).



Εικόνα 1. Βλαστοί φακής όπου διακρίνονται η μορφολογία των φύλλων, των ταξιανθιών, των λοβών καθώς και η συνεχής τους ανάπτυξη (<http://www.enotes.com/topic/Lentil>).

Στη χώρα μας, καλλιεργούνται ποικιλίες και τοπικοί πληθυσμοί που ανήκουν και στα δύο υποείδη. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η φακή Εγκλουβής Λευκάδος, η οποία διακρίνεται αναφορικά τόσο για τον παραδοσιακό τρόπο καλλιέργειάς της όσο και την αποδεδειγμένη μεγάλη θρεπτική αξία της. Οι κάτοικοι της περιοχής ονόμαζαν τα χωράφια στα οποία καλλιεργούσαν φακή «Φακοχώραφα» και υποστήριζαν πως το έδαφος τους περιείχε σίδηρο (Fe), πράγμα που κάνει τη φακή *κάλοψη*, δηλαδή όταν βράζει γίνεται γουλιάστρα (το γάλα της πρώτης μέρας). Η φακή Εγκλουβής καλλιεργείται σε μικρές εκτάσεις στο οροπέδιο του νησιού και παράγεται σε πολύ μικρές ποσότητες. Αποτελεί σπάνιο γενετικό υλικό και δείγμα της φυλάσσεται στον ΟΗΕ και στη Συρία (ICARDA), στο διεθνές κέντρο έρευνας για ξηρές περιοχές με κωδικό ILL 293 (Vetelainen M., et al. 2009)

Είναι αξιοσημείωτο, ότι τόσο η εγχώρια παραγωγή οσπρίων γενικά όσο και φακής ειδικότερα αδυνατεί να καλύψει τις ανάγκες της κατανάλωσης. Το γεγονός αυτό οφείλεται στις ασταθείς από χρονιά σε χρονιά αποδόσεις, συγκριτικά με άλλες ανταγωνιστικές καλλιέργειες, λόγω έλλειψης ποικιλιών κατάλληλα προσαρμοσμένων στα ιδιαίτερα περιβάλλοντα και τις κλιματικές συνθήκες των εκάστοτε περιοχών καλλιέργειας, σε μυκητολογικές και ιολογικές ασθένειες που δύσκολα καταπολεμούνται καθώς και στην αδυναμία μηχανοποίησης της παραγωγής (Ηλιάδης, 2002).

1.4 ΑΥΞΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

Η φακή είναι φυτό συνεχούς ανάπτυξης και η άνθηση προχωρεί σταδιακά από τη βάση προς τη κορυφή του φυτού, ενώ συνεχίζεται η βλαστική ανάπτυξη (Saxena and Hawtin, 1981) (Εικ.2). Σε πειράματα που έγιναν στη Β. Συρία (Saxena and Hawtin 1981) βρέθηκε ότι με φθινοπωρινή σπορά ο ρυθμός συγκέντρωσης ξηράς ουσίας στα βλαστικά τμήματα των φυτών της φακής ήταν μικρός τις πρώτες 100 ημέρες από τη σπορά και στη συνέχεια, αυξήθηκε γραμμικά με το χρόνο. Σε ανοιξιάτικη σπορά, ο ρυθμός συγκέντρωσης της ξηράς ουσίας ήταν ταχύτερος από τα πρώτα στάδια αύξησης. Αντέχει στις χαμηλές θερμοκρασίες και στις εύκρατες περιοχές καλλιεργείται ως φθινοπωρινή καλλιέργεια.



Εικόνα 2. (Α) Φυτό φακής λίγες μέρες μετά το φύτεμα. (Β) Φυτό φακής στο στάδιο έναρξης της άνθησης. (Γ) Φυτό φακής στο στάδιο σχηματισμού των λοβών.

Η αντοχή της φακής μειώνεται με την αύξηση της ηλικίας (Murray et al., 1988) και τα αναπτυγμένα φυτά ζημιώνονται σε θερμοκρασίες μικρότερες από -12° C. Επιπλέον, πολλές από τις καλλιεργούμενες ποικιλίες υφίστανται ζημιές σε θερμοκρασία -7° C. Για τους λόγους αυτούς, σε πολύ ψυχρές περιοχές η φακή σπέρνεται ως ανοιξιάτικη καλλιέργεια (Εικ.3). Σε υψηλές θερμοκρασίες, η φακή, και ειδικότερα οι μικρόσπερμες ποικιλίες, παρουσιάζει σχετικά υψηλή ανθεκτικότητα σε αβιοτικές καταπονήσεις. Όλες οι ποικιλίες της φακής και ιδιαίτερα οι μικρόκαρπες,

παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στην ξηρασία, μέσω αποφυγής, λόγω της πρωιμότητας τους. Η ανάπτυξη γονοτύπων ανθεκτικών στην ξηρασία αποτελεί προτεραιότητα στα βελτιωτικά προγράμματα της φακής. Τέλος, μειωμένη εμφανίζεται και η αντοχή της φακής στην αλατότητα του εδάφους. Τα βελτιωτικά προγράμματα έχουν ως στόχο να αυξήσουν την απόδοση της καλλιέργειας αυξάνοντας την προσαρμοστικότητα του φυτού σε περιβάλλοντα καταπόνησης. Βασικό στοιχείο της προσαρμοστικότητας σε ξηρικά περιβάλλοντα, είναι η προσαρμογή της ανάπτυξης της καλλιέργειας την περίοδο που υπάρχει διαθέσιμη υγρασία. Αυτό επιτυγχάνεται με την επιλογή γονοτύπων που αναπτύσσονται γρήγορα, ανθίζουν πρώιμα και ολοκληρώνουν την καρπόδεση νωρίς, με επιλογή μικρόσπερων ποικιλιών που προσαρμόζονται καλύτερα σε ξηρικά περιβάλλοντα καθώς και με σπορά γονοτύπων ανθεκτικών στις χαμηλές θερμοκρασίες για σπορά το φθινόπωρο (Erskine, 1996; Kusmenoglou and Muehlbauer, 1998; Muehlbauer et al., 2006). Με τη φθινοπωρινή σπορά, το φυτό επιτυγχάνει μεγαλύτερη βλαστική ανάπτυξη, και συνεπώς υψηλότερες αποδόσεις σε σχέση με την ανοιξιάτικη σπορά, εξαιτίας της αποτελεσματικότερης αξιοποίησης του νερού (Sarker et al., 2004; Chen., 2006). Οι μεγαλόσπερες ποικιλίες αποδίδουν περισσότερο σε σπόρο σε περιοχές με χαμηλές θερμοκρασίες, καθώς παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανοχή σε αυτές σε σύγκριση με τις μικρόσπερες (Erskine, 1996).



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

Η συμβίωση της φακής με τα υπάρχοντα ριζόβια του εδάφους είναι αποτελεσματική, ενώ πάνω από το 85% των συνολικών αναγκών σε άζωτο προέρχεται από την αζωτοδέσμευση (Saxena and Hawtin, 1981). Οι ανάγκες της σε φώσφορο είναι επίσης αυξημένες. Η λίπανση γίνεται είτε πριν τη σπορά σε όλη την επιφάνεια του αγρού με ενσωμάτωση, είτε σε γραμμές συγχρόνως με τη σπορά.

Η άριστη εποχή σποράς εξαρτάται από την καλλιεργούμενη ποικιλία και τις κλιματολογικές συνθήκες της εκάστοτε περιοχής. Σύμφωνα με πειραματικά αποτελέσματα του Ινστιτούτου Κτηνοτροφικών Φυτών και Βοσκών Λάρισας, καταλληλότερος χρόνος σποράς για την χώρα μας θεωρείται η περίοδος μετά τις 10 Νοεμβρίου για τη Β. Ελλάδα και μετά τις 21 Νοεμβρίου για την Κεντρική και Νότια Ελλάδα. Οι συνιστώμενες ποσότητες σπόρου είναι 8-9 kg/στρ. για τις μικρόσπερμες, 9-10 kg/στρ. για τις μεσόσπερμες και 10-11 kg/στρ. για τις μεγαλόσπερμες ποικιλίες. Επιπρόσθετα, στη φακή μπορεί να εφαρμοσθεί μειωμένη κατεργασία του εδάφους ή ακαλλιέργεια. Πειράματα στον Καναδά (Slinkard, 1978) έδειξαν ότι η απόδοση της φακής, όταν αυτή εντάχθηκε σε αμειψισπορά με σιτάρι, ήταν ίση με το 83-89% της απόδοσης που επιτεύχθηκε κατόπιν κατεργασίας του εδάφους. Η φακή προσαρμόζεται στο σύστημα αμειψισποράς των χειμερινών σιτηρών. Σε μακροχρόνιο πείραμα αμειψισποράς του Ινστιτούτου Κτηνοτροφικών Φυτών και Βοσκών Λάρισας, με συνεχή εναλλαγή σιταριού με φακή, βρέθηκε ότι η φακή διατήρησε σε υψηλά επίπεδα τις αποδόσεις του σιταριού (Ηλιάδης, 1992).

Ως προς τη συγκομιδή της φακής, το μεγαλύτερο πρόβλημα είναι το μικρό χρονικό διάστημα που έχει στη διάθεση του ο παραγωγός (μέγιστο 10 ημέρες), από τη στιγμή που τα φυτά αρχίζουν να κιτρινίζουν μέχρις ότου ξηραθούν εντελώς και αποκτήσουν χρώμα κίτρινο – καφέ. Η συγκομιδή γίνεται με τους εξής τρόπους: α) εκρίζωση των φυτών ή θερισμός στην επιφάνεια του εδάφους, όταν η υγρασία των περισσότερων σπόρων είναι περίπου 30% και τα φυτά αρχίζουν να κιτρινίζουν, β) θεριζοαλωνισμός όταν η υγρασία του σπόρου είναι 12 έως 14%. Στο στάδιο αυτό, οι λοβοί πολλών ποικιλιών ανοίγουν με αποτέλεσμα την απώλεια μεγάλης ποσότητας σπόρου στο έδαφος. Επιπλέον, οι ποδίσκοι των λοβών είναι πολύ εύθραυστοι, οπότε προκαλείται πτώση λοβών από τον αέρα καθώς και την ανατάραξη των φυτών κατά τη μηχανική συγκομιδή. Ακόμη, η μηχανική συγκομιδή προκαλεί το πλάγιασμα των φυτών, που οφείλεται στους λεπτούς λοβούς κοντά στην επιφάνεια του εδάφους. Κατά τη συγκομιδή σε δύο φάσεις, οι απώλειες κυμαίνονται από 4 έως 10 %, ενώ με θεριζοαλωνισμό από 5 έως 15% (Khayrallah, 1981). Οι απώλειες μειώνονται όταν η συγκομιδή γίνει τις πρωινές ώρες, κατά τις οποίες η υγρασία των φυτών είναι αυξημένη. Για την αποθήκευση της φακής, η υγρασία δεν πρέπει να ξεπερνά το 13% και ο σπόρος πρέπει να είναι απαλλαγμένος από ξένες ύλες.

1.5 ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ

Πρόκειται για μία σημαντική καλλιέργεια με μεγάλη διατροφική αξία, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας της σε πρωτεΐνες, μικροστοιχεία και βιταμίνες. Τα ώριμα βλαστικά της μέρη είναι μία έξοχη ξηρά τροφή για τα ζώα (Toklu et al., 2009a). Αποτελεί μια σχετικά μικρή καλλιέργεια σε σύγκριση με το σιτάρι, το ρύζι, το καλαμπόκι και τη σόγια και καταλαμβάνει την τρίτη θέση μεταξύ των οσπρίων μετά το μπιζέλι και το ρεβίθι.

Καλλιεργείται σε εναλλαγή με τα δημητριακά, για να "σπάσει" τον κύκλο ασθένειας των δημητριακών και για να εμπλουτίσει το έδαφος με άζωτο, μειώνοντας με τον τρόπο αυτό τη χρήση αζωτούχων λιπασμάτων (Rubeena et al., 2003).

Μέχρι τις αρχές του 20^{ου} αιώνα, η καλλιέργεια της φακής ήταν ευρέως διαδεδομένη λόγω της υψηλής της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη. Από τα μέσα του 20^{ου} αιώνα, σχεδόν εξαφανίστηκε από τα συστήματα καλλιέργειας, αλλά τοπικές και καλλιεργούμενες ποικιλίες διατηρήθηκαν σε *ex situ* συλλογές. Η κλασσική καλλιέργεια της φακής βασίζεται κυρίως στις τοπικές ποικιλίες του *L. culinaris* ssp. *culinaris*. Αντίθετα, οι σύγχρονες ποικιλίες της φακής προέρχονται από ένα μικρό αριθμό βελτιωμένων ποικιλιών που έχουν προσαρμοσθεί για συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες. Η βελτίωση της φακής στην Κεντρική Ευρώπη περιορίστηκε από το 1950, αλλά παραμένει μια ενδιαφέρουσα καλλιέργεια εξαιτίας του ότι ο σπόρος της φακής είναι υψηλής θρεπτικής ουσίας με περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη από 20-28% και υψηλή περιεκτικότητα σε σίδηρο που φθάνει κατά μέσο όρο τα 7 mg/100g αποξηρανθέντος σπόρου.

Τα τελευταία χρόνια, παρατηρείται αύξηση των καλλιεργήσιμων με φακή εκτάσεων μέσω της αγροτικής πολιτικής που ασκείται μέσω του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων.

Η συνέχιση των μονοκαλλιεργειών των αροτριαίων ξηρικών αγρών κυρίως με σιτάρι και βαμβάκι, δημιουργεί σοβαρά προβλήματα υποβάθμισης της γονιμότητας των εδαφών, με αποτέλεσμα η εφαρμογή συστημάτων αμειψισποράς με ψυχανθή να κρίνεται πλέον αναγκαία. Η αλλαγή των διατροφικών συνηθειών του πληθυσμού έχει αυξήσει την κατανάλωση των οσπρίων και κατ' επέκταση της φακής. Λόγω των εδαφοκλιματικών απαιτήσεων της, η φακή αποτελεί μια καλλιέργεια με μικρές απαιτήσεις σε λίπανση, ιδανική για ορεινές και ημιορεινές περιοχές. Επίσης, αν και χαρακτηρίζεται από χαμηλές αποδόσεις, αποτελεί ποιοτικό προϊόν που

προσφέρεται για βιολογική γεωργία. Λόγω της ικανότητας της να ρυθμίζει το άζωτο, καθίσταται μια καλλιέργεια φιλική προς το περιβάλλον (Howieson et al., 2000). Κρίνεται αναγκαία επομένως η δημιουργία νέων ελληνικών ποικιλιών που να χαρακτηρίζονται από σταθερές αποδόσεις, ανθεκτικότητα στις βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις και ευρεία προσαρμοστικότητα, ιδιαίτερα όταν πρόκειται να καλλιεργηθεί σε περιβάλλοντα μειωμένων εισροών.

1.6 ΜΥΚΗΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΣΒΑΛΛΟΥΝ ΤΗ ΦΑΚΗ

Οι σπουδαιότερες κατηγορίες μυκητολογικών ασθενειών που προσβάλλουν τη φακή είναι:

- Τήξεις φυταρίων,
- Φουζαρίωση, (*Fusarium oxysporum f.sp. lentis*)
- Ασκοχύτωση, (*Ascochyta fabae f.sp. lentis*)
- Σκωρίαση, (*Uromyces viciae fabae*)
- *Stemphyllium* blight και
- Σκληρωτίαση (σήψη), (*S. sclerotiorum*)

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

2) Η φουζαρίωση: Η φουζαρίωση (*Fusarium oxysporum f.sp. lentis*) αποτελεί μία σοβαρή ασθένεια της φακής σε παγκόσμιο επίπεδο. Συγκεκριμένα, αποτελεί την πιο επιζήμια ασθένεια της φακής στην Αλγερία, Ινδία, Καναδά, Τουρκία όπου και προκαλεί σπουδαίες οικονομικές απώλειες (Setti and Bouznad, 1998). Το παθογόνο παραμένει στο έδαφος για αρκετές καλλιεργητικές περιόδους και είναι σε θέση να αποικεί στα υπολείμματα των καλλιεργειών και κυρίως αυτών που εναλλάσσονται με τη φακή (Erskine and Bayaa, 1996). Το παθογόνο εισχωρεί μέσω των τμημάτων της ρίζας και προσβάλλει το φυτό (Εικ.4). Η θερμοκρασία του εδάφους και του αέρα αποτελούν περιβαλλοντικούς παράγοντες που ασκούν μεγάλη επίδραση στην ανάπτυξη και τη σοβαρότητα της ασθένειας. Η άριστη εδαφική θερμοκρασία για την ανάπτυξη της φουζαρίωσης είναι περίπου 28⁰C, και η ταχεία εκδήλωση των συμπτωμάτων στα υπέργεια μέρη των φυτών ευνοείται όταν η θερμοκρασία αέρα κυμαίνεται σε παρόμοια επίπεδα. Κατά την άνοιξη, τα φύλλα φακής αποκτούν χρώμα

ανοικτό πράσινο και κιτρινίζουν στις άκρες. Έπειτα, ολόκληρα τα φυτά κιτρινίζουν και πολύ γρήγορα ξηραίνονται. Η εξάπλωση της ασθένειας ευνοείται σε υγρό καιρό.



Εικόνα 4. Προσβολή φυτών φακής από το μύκητα *Fusarium oxysporum f.sp. lentis* (Compendium: *Diseases of field in Canada*).

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

3) Η ασκοχύτωση: (*Ascochyta fabae f.sp. lentis*, συν. *Ascochyta lentis*). Η ασκοχύτωση συγκαταλέγεται στις πιο επιβλαβείς ασθένειες για την παραγωγικότητα διαφόρων καλλιεργειών. Αξίζει να σημειωθεί, ότι έχουν παρατηρηθεί απώλειες μεγαλύτερες από 40% (Gossen and Morrall, 1983) σε χώρες όπως η Αργεντινή, ο Καναδάς, η Αιθιοπία, η Ινδία, η Νέα Ζηλανδία, το Πακιστάν και η Ρωσία. Οι μεγαλύτερες όμως οικονομικές απώλειες είναι αρκετά υψηλότερες στον Καναδά, όπου μπορεί να φθάσουν μέχρι και το 70% και στην περίπτωση αυτή ο μολυσμένος σπόρος χρησιμοποιείται μόνο για ζωοτροφή.

Σε αρκετές όμως περιπτώσεις, η μόλυνση του σπόρου μπορεί να είναι τόσο σημαντική ώστε η παραγωγή να καταστρέφεται ολοσχερώς (Gossen and Morrall, 1983).

Τα συμπτώματα εμφανίζονται από το στάδιο του νεαρού φυταρίου μέχρι την εποχή της ωρίμανσης. Στα φύλλα, τα στελέχη και τους λοβούς αναπτύσσονται κηλίδες, αρχικά ανοικτόγκριζες οι οποίες αργότερα γίνονται γκριζοκαστανές με

σκοτεινο-καστανά περιθώρια (Εικ.5). Το κέντρο των κηλίδων είναι ανοικτόχρωμο και επάνω στους νεκρούς ιστούς αναπτύσσονται μαύρα πυκνίδια. Σε έντονη προσβολή προκαλείται πλήρης αποφύλλωση και ξήρανση των βλαστών στα άκρα τους. Οι σπόροι που προσβάλλονται μέσα στους λοβούς συρρικνώνονται και γίνονται πορφυρο-καστανοί. Ο υγρός καιρός ευνοεί την ανάπτυξη της ασθένειας. Ο μύκητας μεταδίδεται με το σπόρο της φακής και με τα προσβεβλημένα φυτικά τμήματα που πέφτουν στον αγρό.

Αντιμετωπίζεται με τη χρήση υγειούς σπόρου. Πειράματα που έγιναν με χρήση του thiabendazol και του benomyl στο σπόρο, απέδωσαν καλύτερη εμφάνιση του σπόρου και αποφυγή της αύξησης του αριθμού μολυσμένων φυτών στον αγρό. Ο χημικός έλεγχος όμως με διαφυλλική εφαρμογή αποτελεί μία αρκετά δαπανηρή επιλογή για εμφανή και άμεσα αποτελέσματα. Επίσης, για την καταπολέμηση της ασθένειας προτείνεται αμειψισπορά και βαθιά ενσωμάτωση των φυτικών υπολειμμάτων. Υπάρχουν μετρίως ανθεκτικές ποικιλίες, οι οποίες θα πρέπει να προτιμώνται σε περιοχές με έντονη προσβολή.

Η βελτίωση για ανθεκτικότητα στην ασκοχύτωση αποτελεί στόχο σπουδαίας σημασίας για το ICARDA. Έρευνες που διεξήχθησαν για την κληρονόμηση της ανθεκτικότητας έδειξαν ότι τα περισσότερα γονίδια που ελέγχουν το γνώρισμα, εδράζονται στο γονιδίωμα της καλλιεργούμενης φακής και επιτρέπουν την πιθανή χρήση της έμμεσης επιλογής μέσω δεικτών.



Εικόνα 5. Προσβολή φυτών φακής από το μύκητα *Ascochyta fabae* f. sp. *lentil*, συν. *Ascochyta lentis* (*Compendium: Diseases of field in Canada*).

4) Η σκωρίαση: Η σκωρίαση προκαλείται από τον μύκητα *Uromyces viciae fabae* και είναι η πιο σοβαρή ασθένεια του φυλλώματος της φακής. Η σκωρίαση της φακής εμφανίζεται στη Χιλή, στην Αιθιοπία, στην Ινδία, στο Μαρόκο και στο Πακιστάν.

Εξαπλώνεται ωστόσο ταχύτατα και στη λεκάνη της Μεσογείου αλλά είναι οι επιδράσεις της είναι ασήμαντες οικονομικά. Έρευνες αναφέρουν γενετικές διαφορές στους γονότυπους και διάφορες πηγές ανθεκτικότητας (Nene et al., 1988).

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

6) Η σκληρωτίαση: Η σκληρωτίαση προκαλείται από τον μύκητα *S. sclerotioru* και είναι υπεύθυνη για μία εκτενή καταστροφή στις καλλιέργειες της φακής σε περιοχές που έχουν υψηλά ποσοστά υγρασίας. Το παθογόνο προσβάλλει 148 από τα γνωστά είδη της φακής και υπάρχει μικρή ανθεκτικότητα στην ασθένεια.

1.7 ΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΤΗΣ ΦΑΚΗΣ

Η φακή προσβάλλεται από τουλάχιστον 30 διαφορετικούς ιούς που ανήκουν σε 16 γένη εννέα οικογενειών, με γονιδίωμα μονόκλωνο RNA ή DNA (Bos et al., 1988; Makkouk et al., 2003; Abraham et al., 2006; Taylor et al., 2007; Kumari et al., 2009). Από αυτούς, οι παρακάτω πέντε ιοί αναφέρονται ότι μεταδίδονται με το σπόρο της φακής:

- Ιός της βαφής των κουκιών, *Broad bean stain virus* (BBSV, γένος *Comovirus*, οικογένεια *Comoviridae*) (Makkouk and Azzam, 1986),
- Ιός του σπορομεταδιδόμενου μωσαϊκού του αρακά, *Pea seed-borne mosaic virus* (PSbMV, γένος *Potyvirus*, οικογένεια *Potyviridae*) (Hampton and Muehlbauer, 1977),
- Ιός του κίτρινου μωσαϊκού της φασολιάς, *Bean yellow mosaic virus* (BYMV, γένος *Potyvirus*, οικογένεια *Potyviridae*) (Kumari et al., 1994),
- Μωσαϊκό της μηδικής, *Alfalfa mosaic virus* (AMV, γένος *Alfamovirus*, οικογένεια *Bromoviridae*)
- Ιός του Μωσαϊκού της Αγγουριάς, *Cucumber mosaic virus* (CMV, γένος *Cucumovirus*, οικογένεια *Bromoviridae*) (Jones and Coutts, 1996).
- Οι ιοί AMV, CMV, BYMV και PSbMV μεταδίδονται με διάφορα είδη αφίδων με μη-έμμονο τρόπο (Bos et al., 1988) και ο ιός BBSV μεταδίδεται με

διάφορα είδη κολεοπτέρων όπως τα *Arion* sp. και *Sitona* sp. με έμμοιο τρόπο (Makkouk and Kumari, 1995).

Οι μη σπορομεταδιδόμενοι ιοί που προσβάλλουν την καλλιέργεια της φακής έχουν αναφερθεί οι:

- Ιός του νεκρωτικού ικτέρου των κουκιών, *Faba bean necrotic yellows virus* (FBNYV, γένος *Nanovirus*, οικογένεια *Nanoviridae*),
- Ιός του χλωρωτικού νανισμού του ρεβυθιού, *Chickpea chlorotic dwarf virus* (CpCDV, γένος *Mastrevirus*, οικογένεια *Geminiviridae*),
- και τρεις ιοί της οικογένειας *Luteoviridae*:
- Ιός του καρουλιάσματος των φύλλων της φασολιάς, *Bean leafroll virus* (BLRV, γένος *Luteovirus*),
- Ιός του δυτικού ίκτερου των τεύτλων, *Beet western yellows virus* (BWYV γένος *Polerovirus*) και
- Ιός του νανισμού της σόγιας, *Soybean dwarf virus* (SbDV, γένος *Luteovirus*) (Horn et al., 1993; 1996; Katul et al., 1993; Makkouk et al., 1997; Najjar et al., 2000).
- Οι ιοί της οικογένειας *Luteoviridae* και ο FBNYV μεταδίδονται με αφίδες με έμμοιο τρόπο (Bos et al, 1988) και ο ιός CpCDV μεταδίδεται με τζίτζικια.

1.8 ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΗΣ ΦΑΚΗΣ

1.8.1 Στόχοι

Προτεραιότητες των ερευνών που σχετίζονται με τη βελτίωση της φακής είναι η ταυτοποίηση του τόπου προέλευσης των τοπικών ποικιλιών, η εκτίμηση της γενετικής τους ποικιλότητας και πιθανώς η ταυτοποίηση συγκεκριμένων δεικτών για την πιστοποίηση και προστασία των υπέρτερων τοπικών ποικιλιών (Sonnante and Pignone, 2007).

Τα τελευταία χρόνια, η γενετική βάση της φακής έχει αναπτυχθεί και διευρυνθεί, κυρίως στη νότια Ασία, μέσω της εισαγωγής νέων ειδών, του υβριδισμού και της μεταλλαξιγένεσης, αμβλύνοντας έτσι τις συνέπειες της γενετικής διάβρωσης στη συγκεκριμένη περιοχή (Erskine et al., 1998; Sarker and Erskine, 2006).

Έρευνες που επικεντρώθηκαν στην εκτίμηση της υπάρχουσας γενετικής παραλλακτικότητας, έχουν αποκαλύψει την ύπαρξη χρήσιμης ποικιλότητας για

γνωρίσματα ενδιαφέροντος προς χρήση σε βελτιωτικά προγράμματα και προγράμματα επιλογής για μορφολογικά χαρακτηριστικά (Sarker and Erskine, 2006).

Είναι βέβαια σημαντικό να τονιστεί, ότι ο προσδιορισμός των γενετικών σχέσεων, η εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας καθώς και ο εντοπισμός γενετικών τόπων ενδιαφέροντος απαιτεί τη διεξαγωγή περισσότερων και λεπτομερέστερων ερευνών (Erskine and Muehlbauer, 1991). Στο πλαίσιο αυτό, σημαντικό στόχο στη βελτίωση της φακής αποτελεί η χαρτογράφηση του γονιδιώματος της φακής και η κατασκευή ενός περιεκτικού γενετικού χάρτη σύνδεσης (Sharma et al., 1995; Muehlbauer et al., 2006). Σε πρόσφατες έρευνες έχει μελετηθεί η απόκριση γενετικού υλικού φακής σε ποικίλες βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις ενώ παράλληλα, έχουν χαρτογραφηθεί σχετικοί γενετικοί τόποι και ταυτοποιηθεί γονίδια ανθεκτικότητας.

Επιπλέον, τα προγράμματα βελτίωσης της φακής σε όλο τον κόσμο στοχεύουν στη μεγαλύτερη προσαρμοστικότητα και σταθερότητα συμπεριφοράς καθώς και στην αύξηση της παραγωγικότητας των ποικιλιών. Βέβαια, οι επιμέρους προτεραιότητες και οι στόχοι της βελτίωσης διαφέρουν μεταξύ των περιοχών, λόγω των διαφορετικών αγροκλιματικών συνθηκών, συστημάτων καλλιέργειας και καταναλωτικών αναγκών. Σήμερα, οι σπουδαιότεροι στόχοι πέρα από την αύξηση της απόδοσης συνοψίζονται στους παρακάτω:

Προσαρμοστικότητα σε ξηροθερμικά περιβάλλοντα

Τα σπουδαιότερα χαρακτηριστικά για την επίτευξη της προσαρμοστικότητας σε ξηροθερμικές περιοχές είναι η πρωιμότητα στην άνθιση, και η ολοκλήρωση της καρπόδεσης πριν την έναρξη της ξηροθερμικής περιόδου. Οι Solanki et al. (2007) αναφέρουν ότι τα παραπάνω χαρακτηριστικά συσχετίζονται θετικά με την αύξηση της απόδοσης στα ξηροθερμικά κλίματα. Η φακή καλλιεργείται κυρίως ως ξηρική καλλιέργεια και ένας από τους κύριους λόγους της χαμηλής της απόδοσης είναι η ανεπάρκεια εδαφικής υγρασίας (McKenzie et al., 2007). Η σειρά ILL 6002 θεωρείται χρήσιμο γενετικό υλικό για τη δημιουργία ανθεκτικών στη ξηρασία ποικιλιών, κυρίως λόγω της ανάπτυξης πλούσιου ριζικού συστήματος (Sarker et al., 2004).

Ανθεκτικότητα στις ασθένειες

Οι ασθένειες που είναι ιδιαίτερα επιζήμιες για την καλλιέργεια της φακής προκαλούνται από παθογόνα εδάφους. Σημαντικότερη ασθένεια θεωρείται η φουζαρίωση που οφείλεται στο μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis*. Λόγω της έλλειψης κατάλληλων μέτρων για την καταπολέμηση του μύκητα, η αποτελεσματικότερη προσέγγιση για την αντιμετώπιση της ασθένειας είναι η δημιουργία και αξιοποίηση γενετικά ανθεκτικών ποικιλιών. Έχει βρεθεί ανθεκτικότητα στη σειρά ILL5588 που αποτελεί γενετικό υλικό του ICARDA. Επίσης, η σκωρίαση που οφείλεται στο μύκητα φυλλώματος *Uromyces vicia-fabae* και η ασκοχύτωση που οφείλεται στο μύκητα *Ascochyta fabae* Speg. F. sp. *lentis* κάτω από ευνοϊκές συνθήκες μπορούν να προκαλέσουν μείωση της απόδοσης έως και 70% (Chen et al., 2009).

Ανταγωνιστικότητα έναντι των ζιζανίων

Είναι ένα χαρακτηριστικό που ενδιαφέρει ιδιαίτερα τα συστήματα καλλιέργειας μειωμένων εισροών. Η φακή εξαιτίας της σχετικά αργής ανάπτυξης και του χαμηλού ύψους χαρακτηρίζεται από χαμηλή ανταγωνιστικότητα έναντι των ζιζανίων. Η δημιουργία ποικιλιών με πρόωμη και πλαγιόκλαδη ανάπτυξη μπορεί να αποτελέσει λύση για την έλλειψη ανταγωνιστικότητας έναντι των ζιζανίων (Yenish et al., 2009).

Ποιότητα

Ένας από τους βασικούς στόχους, ιδιαίτερα στις χώρες του αναπτυγμένου κόσμου, αποτελεί η βελτίωση της ποιότητας της φακής. Η ποιότητα της φακής αναφέρεται στα χαρακτηριστικά του σπόρου όπως το μέγεθος σπόρου, το χρώμα των κοτυληδόνων, τη θρεπτική αξία των σπόρων και τη βραστικότητα (Muehlbauer et al., 1995).

Εξέλιξη των προγραμμάτων βελτίωσης στη φακή

Περίπου μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του 1970, πραγματοποιήθηκαν σημαντικά προγράμματα βελτίωσης του γένους *Lens* με έμφαση στην ανάπτυξη καλά προσαρμοσμένων, ανθεκτικών στις καταπονήσεις και υψηλοαποδοτικών γονοτύπων.

Η βελτίωση της φακής έχει σχετικά μικρή ιστορία σε σύγκριση με άλλες καλλιέργειες όπως αυτή των σιτηρών, αν και κατατάσσεται μεταξύ των πρώτων φυτών που εξημέρωσε ο άνθρωπος. Στις περισσότερες χώρες όπου καλλιεργείται επί σειρά ετών η φακή, χρησιμοποιούνται ποικιλίες που είναι ευάλωτες τόσο σε βιοτικούς όσο και σε αβιοτικούς παράγοντες. Οι Solh και Erskine (1981) επεσήμαναν ότι οι τοπικοί αβελτίωτοι πληθυσμοί συνιστούν πάνω από το 80% των καλλιεργούμενων ποικιλιών φακής στις χώρες με τη μεγαλύτερη παραγωγή φακής. Οι ερευνητές αυτοί χαρακτήρισαν τη φακή αυτή ως "ανέγγιχτο" φυτό από την επιστήμη της βελτίωσης των φυτών.

Ωστόσο, τις τελευταίες 3 δεκαετίες η έρευνα της φακής ξεκίνησε να γίνεται πιο συστηματική σε σύγκριση με τις άλλες πρώιμα εξημερωμένες σειρές ενώ έχει επιτευχθεί σημαντική πρόοδος σε πολλά επίπεδα έρευνας της καλλιέργειας. Έχουν συλλεχθεί, αποτιμηθεί και συντηρηθεί μεγάλοι αριθμοί γονοτύπων σε εθνικό και διεθνές επίπεδο, με το ICARDA (International Centre for Arid Research in the Dry Areas) στη Συρία να διατηρεί τη μεγαλύτερη συλλογή καλλιεργούμενων και άγριων γονοτύπων 9.646 και 479 αντίστοιχα (ενώ σε εθνικά προγράμματα και άλλων χωρών διατηρούνται επίσης σημαντικοί αριθμοί πληθυσμών. Κάθε χρόνο στο ICARDA πραγματοποιούνται πάνω από 200 διασταυρώσεις στη φακή με σκοπό την ενσωμάτωση επιθυμητών χαρακτηριστικών σε νέες ποικιλίες (Erskine and Sarker, 2004). Το υλικό αυτό αποτελεί πολύτιμη πηγή παραλλακτικότητας για πολλά και σημαντικά αγρονομικά χαρακτηριστικά (Muehlbauer et al., 1995). Ταυτοποιήθηκαν πολλοί γονότυποι με αντοχή σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις αλλά κυρίως δημιουργήθηκαν πολλοί με ικανότητα αποφυγής του πλαγιάσματος ώστε να είναι κατάλληλοι για μηχανική συγκομιδή κυρίως στις χώρες της Δυτικής Ασίας και της Βόρειας Αφρικής. Είναι αξιοσημείωτο ότι την τελευταία 30ετία, η δημιουργία και χρήση νέων, βελτιωμένων ποικιλιών σε συνδυασμό με την προοδευτική τεχνολογία συνέβαλαν στην αύξηση της παγκόσμιας παραγωγής της φακής από 1.3 εκατομμύρια τόνους σε 3.8 εκατομμύρια τόνους κατά τις τελευταίες τρεις δεκαετίες.

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

Το κύριο βελτιωτικό πρόγραμμα του ICARDA βασίζεται σε μία τροποποιημένη μέθοδο μαζικής επιλογής. Βασίζεται στην επιλογή ατομικών φυτών

και την ανάμιξη των σπόρων τους έως την F₄ γενεά. Η συνεχιζόμενη διάσπαση στις εναπομένουσες γονιδιακές θέσεις στις γενιές που ακολουθούν, οδηγεί σε χαμηλό βαθμό ετεροζυγωτίας εντός των σειρών, αντίστοιχα με ότι ισχύει και στους τοπικούς πληθυσμούς (Erskine, 1997). Λόγω της οικονομικότητάς της, η συγκεκριμένη μέθοδος βελτίωσης έδωσε την δυνατότητα για τη δημιουργία βελτιωμένων πληθυσμών με προσαρμοστικότητα σε ένα μεγάλο εύρος περιβαλλόντων και βοήθησε στην αγροτική ανάπτυξη πολλών αναπτυσσόμενων περιοχών.

Ειδικότερα, η Ελλάδα ήταν μια από τις πρώτες χώρες που ασχολήθηκαν συστηματικά με τη βελτίωση της φακής. Το Ινστιτούτο Κτηνοτροφικών Φυτών και Βοσκών στη Λάρισα, συνετέλεσε στην αντικατάσταση των τοπικών αβελτίωτων πληθυσμών με βελτιωμένες ποικιλίες. Ήδη, από το 1939 διοχετεύθηκε και καλλιεργήθηκε στη χώρα η πρώτη ελληνική ποικιλία, που αποτελούσε προϊόν βελτιωτικού προγράμματος του ΣΕΚΦΟ με το όνομα ΠΕΛΑΣΓΙΑ. Το φυτικό υλικό οσπρίων που διαθέτει το ΙΚΦΒ αποτελεί πολύτιμο εθνικό γενετικό υλικό, το οποίο δημιουργήθηκε στη διάρκεια πολλών δεκαετιών με τα συνεχιζόμενα προγράμματα βελτίωσης. Ο ρόλος και η συμβολή των βελτιωμένων ποικιλιών στην άνοδο της ανταγωνιστικότητας της ελληνικής γεωργίας αλλά και στη διατήρηση της υψηλής διατροφικής ποιότητας ήταν και συνεχίζει και σήμερα να είναι καθοριστικός. Μερικές από τις ποικιλίες φακής που διατίθενται άμεσα στην ελληνική αγορά, είναι εγγεγραμμένες στον "Ελληνικό Εθνικό Κατάλογο Ποικιλιών". Μεταξύ αυτών, οι καλύτερα προσαρμοζόμενες στις ελληνικές συνθήκες ποικιλίες είναι οι: ΔΗΜΗΤΡΑ, ΣΑΜΟΣ, ΑΘΗΝΑ, ΘΕΣΣΑΛΙΑ, ΙΚΑΡΙΑ (http://www.ismc.gr/pdf/2_Blaxostergios.pdf).

1.8.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ

Τη γενετική βελτίωση της φακής αφορά ένα ευρύ φάσμα αγρονομικών χαρακτηριστικών όπως η παραγωγικότητα, η αντοχή σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις, ο τύπος ανάπτυξης για μηχανοποίηση της καλλιέργειας και η χημική σύνθεση του σπόρου. Οι μέθοδοι βελτίωσης που χρησιμοποιούνται στα βελτιωτικά προγράμματα είναι παρόμοιες με αυτές που χρησιμοποιούνται και στα άλλα αυτογονιμοποιούμενα φυτά και περιλαμβάνουν την μαζική επιλογή, τη γενεαλογική επιλογή, τη μέθοδο καταγωγής από μεμονωμένο σπόρο καθώς και τροποποιήσεις των παραπάνω μεθόδων (Toker et al., 2007).

Ένα βελτιωτικό πρόγραμμα φακής, όπως και άλλων ψυχανθών, περιλαμβάνει τα παρακάτω τέσσερα στάδια (Ranalli and Cubero, 1997):

1. Δημιουργία γενετικής παραλλακτικότητας
2. Επιλογή στις διασπώμενες γενεές
3. Αξιολόγηση των επιλεγμένων σειρών
4. Σταθεροποίηση και απελευθέρωση της/των ποικιλιών

Η επίτευξη του πρώτου σταδίου, που αφορά τη δημιουργία γενετικής παραλλακτικότητας, γίνεται με τον υβριδισμό και πιο συγκεκριμένα, τη διασταύρωση καθαρών σειρών που αποτελεί τον πιο συνηθισμένο τρόπο δημιουργίας γενετικής παραλλακτικότητας για τα αυτογονιμοποιούμενα είδη (Singh, 1987; Saker et al., 2009). Η φακή παρουσιάζει μεγάλη γενετική ποικιλομορφία μεταξύ των τοπικών ποικιλιών λόγω της εξημέρωσής της από την αρχαιότητα. (Fiocchetti et al., 2009). Η δημιουργία ωφέλιμης γενετικής παραλλακτικότητας πραγματοποιείται με την σωστή επιλογή των γονέων. Ο Fasoulas (1978) διατύπωσε την άποψη ότι καλύτεροι γονείς είναι εκείνοι που οδηγούν σε ετερωτική ευρωστία στην F_1 γενεά και μικρότερο εκφυλισμό στην F_2 . Σε κάθε περίπτωση, η επιτυχημένη επιλογή των γονέων είναι το πρώτο βήμα που οδηγεί στην επίτευξη υψηλοαποδοτικών ποικιλιών (Nass, 1979). Την επιλογή των γονέων ακολουθεί μεγάλος αριθμός διασταυρώσεων και η απογονική αξιολόγηση και επιλογή. Δυστυχώς, μέχρι σήμερα δεν υπάρχει αποτελεσματική μέθοδος επιλογής των υπέρτερων διασταυρώσεων στην F_1 γενεά. Οι Kotzamanidis and Rourakias (2004) επιβεβαίωσαν τη θέση αυτή με την κυψελωτή μεθοδολογία σε χαμηλή πυκνότητα σποράς, και βρήκαν ότι η συνδυασμένη απόδοση των γενεών $F_1 + F_2$ ήταν αποτελεσματική για την πρόβλεψη της απόδοσης στην F_3 γενεά. Στο πλαίσιο μεγιστοποίησης της αναμενόμενης ετέρωσης, η ανάπτυξη της τεχνολογίας των μοριακών δεικτών αποδείχθηκε πολύτιμο εργαλείο για την πρόβλεψη των γενετικών αποστάσεων μεταξύ καθαρών σειρών (Manjarrez-Sandoval et al., 1997).

Μετά τη δημιουργία γενετικής παραλλακτικότητας, απαιτείται κατάλληλη μέθοδος επιλογής για την αποτελεσματικότερη αξιοποίηση των υπέρτερων γονοτύπων. Η εξέλιξη της βελτίωσης τα τελευταία 100 χρόνια, είχε ως αποτέλεσμα να προταθούν διάφορες μέθοδοι βελτίωσης, ανάλογα με τον επιδιωκόμενο στόχο (πχ. δημιουργία ή βελτίωση πληθυσμών, παραγωγή καθαρών σειρών, βελτίωση επιμέρους χαρακτηριστικών σε ποικιλίες) και του τρόπου αναπαραγωγής των φυτών

(αυτογονιμοποίηση και σταυρογονιμοποίηση). Το γεγονός ότι η κλασσική βελτίωση δεν παρεμβαίνει άμεσα αλλά έμμεσα στο γενετικό υλικό μέσω του φαινοτύπου, σε συνδυασμό με τις μεγάλες επιδράσεις του περιβάλλοντος στη φαινοτυπική έκφραση των ποσοτικών γνωρισμάτων, καθιστούν δύσκολη την βελτιστοποίηση συγκεκριμένης μεθόδου με γενική εφαρμογή. Μια υποθετικά ολοκληρωμένη μέθοδος εξαλείφει πλήρως τις αρνητικές επιδράσεις στην αποτελεσματικότητα της επιλογής που ασκούν η ετερογένεια του εδάφους, ο ανταγωνισμός μεταξύ των φυτών, οι εδαφοκλιματικές συνθήκες και η αλληλεπίδραση γονοτύπου - περιβάλλοντος.

Πιο συγκεκριμένα, για τη βελτίωση της φακής οι μέθοδοι που ακολουθούνται είναι: η μαζική επιλογή, η γενεαλογική επιλογή, η κυψελωτή μέθοδος επιλογής, η μέθοδος καταγωγής από μεμονωμένο σπόρο και οι τροποποιήσεις αυτών. Εδώ θα πρέπει να τονιστεί ότι η επιλογή του εκάστοτε βελτιωτικού προγράμματος εξαρτάται από τον επιδιωκόμενο στόχο, το διαθέσιμο χρόνο, το αρχικό γενετικό υλικό καθώς και άλλους οικονομικούς και πρακτικούς παράγοντες.

Μαζική Επιλογή (Bulk selection)

Η μαζική επιλογή (bulk population) περιλαμβάνει επιλογή μεγάλου αριθμού φαινοτυπικά υπέρτερων ατομικών φυτών και ανάμειξη των σπόρων τους για να αποτελέσουν το σπόρο της επόμενης γενεάς. Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από απλότητα και ευκολία στην εφαρμογή, καθώς δεν απαιτεί διατήρηση στοιχείων και το χαμηλό σχετικά κόστος την καθιστά ελκυστική για τα περισσότερα προγράμματα βελτίωσης με περιορισμένους πόρους. Επίσης, παρέχει ικανοποιητική ποσότητα σπόρου από τις διασπώμενες γενεές για αξιολόγηση και επιλογή σε διαφορετικά περιβάλλοντα. Σύμφωνα με τους Muehlbauer et al. (2009), η μέθοδος αυτή ενδείκνυται για ποιοτικά γνωρίσματα, γνωρίσματα δηλαδή που ελέγχονται από ένα ή λίγα γονίδια, όπως η αντοχή σε χαμηλές θερμοκρασίες. Στόχος της παραπάνω μεθόδου είναι η βελτίωση ή η δημιουργία πληθυσμών.

Βασικό μειονέκτημα της μαζικής επιλογής είναι ότι η επιλογή στις πρώτες γενεές διασπώμενου υλικού (πχ F_2) δεν είναι αποτελεσματική λόγω της μικρής φαινοτυπικής διαφοροποίησης. Η αδυναμία ακριβούς φαινοτύπισης δυσχεραίνει την αναγνώριση των υπέρτερων γονοτύπων, με αποτέλεσμα να μειώνεται η κληρονομικότητα. Για την αντιμετώπιση τέτοιων αδυναμιών έχουν προταθεί τροποποιήσεις της μαζικής επιλογής.

Χονδροειδής Μαζική Επιλογή

Προτάθηκε για την άρση της αδυναμίας επιλογής στις πρώτες γενεές διασπώμενου υλικού. Έτσι προτάθηκε να μην εφαρμόζεται επιλογή μέχρι την F₄ ή F₅ γενεά, οπότε η επερχόμενη ομοζυγωτία επιτρέπει φαινοτυπική διαφοροποίηση και αυξάνει την αποτελεσματικότητα επιλογής. Όταν όμως οι διαδοχικές γενεές μέχρι την F₅ σπέρνονται πυκνά, λόγω ανταγωνισμού ευνοούνται οι ανταγωνιστικοί γονότυποι με συνέπεια να χάνεται ευνοϊκή γενετική παραλλακτικότητα. Η αδυναμία αυτή οδήγησε στη δεύτερη τροποποιημένη μαζική επιλογή που είναι η μέθοδος καταγωγής από μεμονωμένους σπόρους.

Μέθοδος Καταγωγής από Μεμονωμένους Σπόρους

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, στις πρώτες γενεές που δεν είναι εφικτή η επιλογή, για να μη χαθεί ευνοϊκή γενετική παραλλακτικότητα, από κάθε φυτό συλλέγεται ένας σπόρος έτσι ώστε όλα τα φυτά να αντιπροσωπεύονται στην επόμενη γενεά. Βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι η διατήρηση της μεγάλης γενετικής παραλλακτικότητας και ο ελάχιστος χρόνος που απαιτείται (Muehlbauer et al., 2009). Αδυναμία της μεθόδου αποτελεί η διαχείριση των πρώτων γενεών διασπώμενου γενετικού υλικού καθώς οι σπόροι που παράγονται από ένα μόνο φυτό αντιπροσωπεύουν διαφορετικούς γονοτύπους, με αποτέλεσμα ο σπόρος που τυχαία θα επιλεγεί από το φυτό να μην αντιπροσωπεύει ουσιαστικά το σύνολο της γενετικής παραλλακτικότητας και πιθανότατα τον καλύτερο δυνατό γονότυπο (Fasoulas, 1981). Τα βελτιωτικά προγράμματα που διεξάγονται στο ICARDA για τη βελτίωση της φακής είναι η χονδροειδής μαζική αναπαραγωγή στις πρώτες γενεές (F₂-F₃) και η επιλογή μεμονωμένων φυτών ως προς τα επιθυμητά αγρονομικά χαρακτηριστικά (Erskine and Saker, 2004).

Οι Haddad and Muehlbauer (1981) συγκρίνοντας την αποτελεσματικότητα της μαζικής και της μεθόδου επιλογής από μεμονωμένο σπόρο, διαπίστωσαν ότι η τελευταία αποτελεί μια αποτελεσματική και ταυτόχρονα οικονομικότερη μέθοδο και συστήνεται για βελτιωτικά προγράμματα καθώς επιτυγχάνει μεγιστοποίηση της διατηρούμενης γενετικής παραλλακτικότητας.

Τέλος, οι Fahim et al.(1998) και Singh et al.(1998) μελετώντας το ρύζι και το σιτάρι αντίστοιχα, συνέκριναν διαφορετικές βελτιωτικές μεθόδους επιλογής

(γενεαλογική, μαζική, μέθοδο καταγωγής από μεμονωμένο σπόρο) και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η μαζική επιλογή παρουσίασε το μεγαλύτερο οικονομικό και γενετικό όφελος όταν σκοπός είναι η βελτίωση πληθυσμών.

Γενεαλογική Μέθοδος Επιλογής (Pedigree Selection)

Η γενεαλογική επιλογή είναι μέθοδος που βρίσκει εφαρμογή σε όλα τα καλλιεργούμενα είδη. Τα χαρακτηριστικά της είναι τα ακόλουθα:

- Επιλογή ατομικών φυτών και αξιολόγηση τους με βάση τη συμπεριφορά των απογόνων τους
- Κάθε επιλεγόμενο φυτό συνιστά μια διαφορετική οικογένεια που σπέρνεται σε χωριστή γραμμή
- Τηρούνται γενεαλογικά στοιχεία για κάθε επιλεγόμενο φυτό σε όλες τις γενεές έτσι ώστε να είναι γνωστοί οι πρόγονοί του.

Στη γενεαλογική επιλογή επομένως, η αξία του κάθε γονοτύπου που αρχικά επιλέγεται με βάση το φαινότυπο, εκτιμάται στη συνέχεια με το αν έχει την ικανότητα ή όχι να μεταβιβάζει τα επιθυμητά χαρακτηριστικά γνωρίσματα στους απογόνους. Με τον τρόπο αυτό αξιολογείται αν η υπεροχή του επιλεγόμενου φυτού είναι κληρονομήσιμη. Ο κύριος στόχος της γενεαλογικής επιλογής είναι η δημιουργία καθαρών σειρών. Σύμφωνα με τους Muehlbauer et al. (2009) η γενεαλογική μέθοδος επιλογής δεν ενδείκνυται για τη βελτίωση της φακής διότι η φακή λόγω των αγρονομικών της χαρακτηριστικών καταλαμβάνει μεγάλο χώρο με αποτέλεσμα να μην είναι διακριτή η μακροσκοπική φαινοτυπική διάκριση. Βέβαια, τονίζουν ότι θα μπορούσε να φανεί χρήσιμη μόνο για γνωρίσματα με υψηλή κληρονομικότητα, όπως το μέγεθος του σπόρου.

Πίνακας 1. Οι βασικές μέθοδοι βελτίωσης, το κριτήριο επιλογής, η κατηγορία φυτών στα οποία εφαρμόζονται και ο κύριος στόχος.

ΜΕΘΟΔΟΣ	ΚΡΙΤΗΡΙΟ ΕΠΙΛΟΓΗΣ	ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΕ	ΣΤΟΧΟΣ
ΜΑΖΙΚΗ	ατομικό φυτό	Αυτογονιμοποιούμενα	Βελτίωση και δημιουργία πληθυσμών
ΓΕΝΕΑΛΟΓΙΚΗ	ατομικό φυτό + απόγονοι	+ σταυρογονιμοποιούμενα	Δημιουργία καθαρών σειρών

Κυψελωτή Μέθοδος Επιλογής

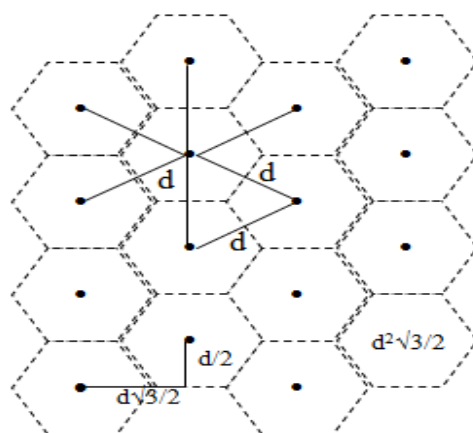
Η αξιολόγηση και επιλογή ατομικών φυτών θεωρείται επιτυχημένη όταν εκτιμά αξιόπιστα το γονότυπο μέσα από το φαινότυπο. Σύμφωνα με τον Fasoulas (1981; 1988; 1993), η κυψελωτή μέθοδος βελτίωσης των φυτών αυξάνει την αντικειμενικότητα αξιολόγησης και επιλογής με βάση το φαινότυπο και έχει σαν αποτέλεσμα τη μεγιστοποίηση της γενετικής προόδου. Αυτό επιτυγχάνεται, όταν τα φυτά αναπτύσσονται σε μεγάλες αποστάσεις, ώστε να ελαχιστοποιείται ο συντελεστής παραλλακτικότητας (CV) της απόδοσης των ατομικών φυτών, και η συνθήκη ονομάζεται "απουσία ανταγωνισμού". Στις αποστάσεις αυτές δεν υπάρχει ανταγωνισμός που να οφείλεται σε γενετικές ή επίκτητες διαφορές μεταξύ των φυτών, ενώ επιτυγχάνεται και μέγιστη φαινοτυπική διαφοροποίηση που διευκολύνει την αναγνώριση των υπέρτερων γονοτύπων και αυξάνει την αποτελεσματικότητα της φαινοτυπικής επιλογής. Η επιλογή τόσο των καλύτερων απογονικών σειρών όσο και των καλύτερων ατομικών φυτών εντός της επιλεγμένης σειράς πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας ως μονάδα αξιολόγησης και επιλογής το ατομικό φυτό, αναπτυσσόμενο απουσίας ανταγωνισμού. Επειδή ο ανταγωνισμός είναι επιζήμιος όχι μόνο κατά την επιλογή σε ένα βελτιωτικό πρόγραμμα, αλλά και στη γεωργική πράξη, η κυψελωτή μεθοδολογία συνιστά την δημιουργία και καλλιέργεια μονογενοτυπικών και όχι πολυγενοτυπικών ποικιλιών (Fasoulas, 1981; 1988; 1993; Fasoula and Tokatlidis, 2012).

Συχνά, οι μεγάλες αποστάσεις των φυτών εξαλείφουν τον ανταγωνισμό, αυξάνουν όμως τον συντελεστή παραλλακτικότητας εξαιτίας της ετερογένειας του εδάφους, καθώς για τον ίδιο αριθμό φυτών απαιτείται μεγαλύτερη επιφάνεια. Η αρνητική αυτή συσχέτιση εξαλείφεται με τη χρήση των κυψελωτών σχεδίων επιλογής, που αντιμετωπίζουν την επίδραση της εδαφικής ετερογένειας, εξασφαλίζοντας ισόποσο καταμερισμό πόρων μεταξύ των φυτών και επιτυγχάνουν μέγιστη φαινοτυπική έκφραση και μέγιστη φαινοτυπική διαφοροποίηση (Fasoulas and Fasoula, 1995).

Η διάταξη των φυτών σε ένα τέτοιο σχέδιο επιλογής είναι συστηματική και όχι τυχαία. Το βασικό χαρακτηριστικό ενός κυψελωτού σχήματος είναι οι ίσες αποστάσεις μεταξύ των φυτών, οι οποίες είναι τέτοιες ώστε να αποκλείουν το μεταξύ των φυτών ανταγωνισμό. Με αποστάσεις μεταξύ των φυτών (**d**), κάθε φυτό απέχει **d** από όλα τα γειτονικά του, σχηματίζοντας ισόπλευρα τρίγωνα. Για να επιτευχθεί αυτό,

τα φυτά πάνω σε κάθε γραμμή απέχουν d , οι γραμμές όμως μεταξύ τους απέχουν $(d\sqrt{3}/2)$ και οι άρτιες γραμμές ξεκινούν κατά $(d/2)$ εσωτερικά των περιττών γραμμών. Τελικά, σε κάθε φυτό αντιστοιχεί μια επιφάνεια εδάφους ίση με $(d^2\sqrt{3}/2)$ (Εικ. 6).

Με τον τρόπο αυτό, η ετερογένεια του εδάφους δειγματίζεται καλύτερα σε σχέση με την τυχαία τοποθέτηση, επιτρέποντας την αντικειμενικότερη σύγκριση μεταξύ μεγάλου αριθμού απογονικών σειρών (οικογενειών) και την αξιόπιστη επιλογή ατομικών φυτών από τις καλύτερες οικογένειες (Εικ.7). Κάθε φυτό οποιασδήποτε απογονικής σειράς περιβάλλεται από συγκεκριμένους δακτυλίους που περικλείουν πάντα τα φυτά που προέρχονται από τις ίδιες οικογένειες, συνιστώντας έτσι κάθε δακτύλιος μια σταθερή επανάληψη. Η διάταξη αυτή δίνει τη δυνατότητα η απόδοση κάθε φυτού να εκφραστεί ως ποσοστό της μέσης απόδοσης της επανάληψης, εξαλείφοντας τελικά τις εσφαλμένες εκτιμήσεις που προκαλεί η ετερογένεια του εδάφους. Τα πειράματα αξιολόγησης πραγματοποιούνται διατοπικά και διαχρονικά έτσι ώστε αφενός μεν να ελαχιστοποιούνται οι περιβαλλοντικές επιδράσεις και αφετέρου να επιτυγχάνεται η μέγιστη αξιοποίηση των αλληλεπιδράσεων γονοτύπου-περιβάλλοντος για τη δημιουργία νέων ποικιλιών.



Αποστάσεις μεταξύ των φυτών: d

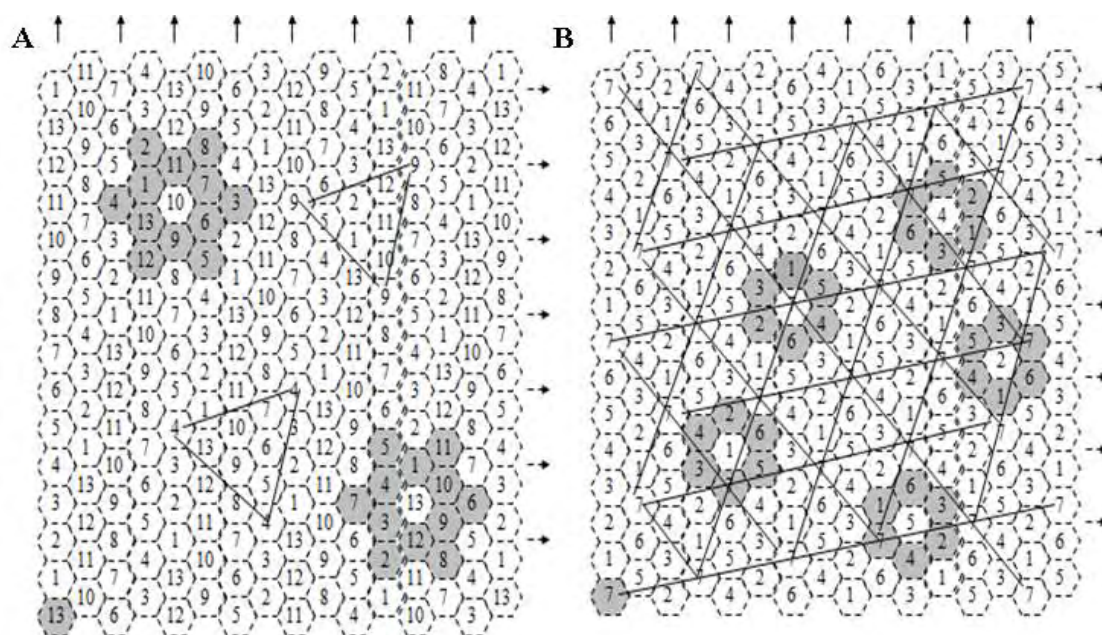
Αποστάσεις μεταξύ γραμμών σποράς: $d\sqrt{3}/2$

Επιφάνεια που αντιστοιχεί σε κάθε φυτό: $d^2\sqrt{3}/2$

Εικόνα 6. Συστηματική διάταξη των μεταχειρίσεων βάση της κυψελωτής μεθοδολογίας.

Η αποτελεσματικότητα της κυψελωτής μεθοδολογίας παρουσιάζεται σε μια σειρά ερευνών εδώ και 40 περίπου χρόνια. Κατόπιν πολυετούς έρευνας, ο Tokatlidis et al. (2010b) ακολουθώντας το κυψελωτό σχέδιο επιλογής σε εγχώριους πληθυσμούς

ξηρού φασολιού, απομονώσαν 8 απογονικές σειρές με έως και 38% υψηλότερη απόδοση και ανεκτικότητα σε υψηλές θερμοκρασίες.



Εικόνα 7. Διάταξη κυψελωτού σχεδίου επιλογής (A) R-13 και (B) R-7.

Οι Ntanos and Rourakias (2001) αξιολόγησαν την αποτελεσματικότητα δυο μεθόδων επιλογής σε δύο πληθυσμούς από τις πρώτες γενεές ρυζιού με επιλογή από τις πρώτες γενεές και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η κυψελωτή μεθοδολογία είναι περισσότερο αποτελεσματική ως προς την απόδοση και ποιότητα σπόρου σε σχέση με την μέθοδο "σπάδικας και γραμμή" (panicle-to-row).

Επίσης, η κυψελωτή μεθοδολογία αποδείχθηκε ικανή να εντοπίσει αλλά και να αναδείξει την υπάρχουσα γενετική παραλλακτικότητα ακόμη και εντός καθαρών σειρών που θεωρούνται γενετικά ομοιογενείς. Την εφαρμογή της συγκεκριμένης προσέγγισης αναφέρουν σε έρευνά τους οι Tokatlidis et al. (2000, 2008) ως προς την απόδοση σε σπόρο και άλλα αγρονομικά χαρακτηριστικά σε καθαρές σειρές καλαμποκιού και αντίστοιχα σε ποικιλίες βαμβακιού ως προς την απόδοση σε σπόρο, την ποιότητα της ίνας και άλλα αγρονομικά γνωρίσματα.

Τέλος, η κυψελωτή μεθοδολογία επιτρέπει την αναγνώριση της γενετικής αλλά και επίκτητης παραλλακτικότητας εντός των ποικιλιών, που προκύπτει από τις μεταβολές του περιβάλλοντος. Μέσω διατοπικών πειραμάτων, οι εκάστοτε ποικιλίες επαναξιολογούνται και βελτιώνονται (Fasoula and Fasoula, 2000).

Για τη βελτιστοποίηση της κυβελωτής μεθόδου, πρόσφατα προτάθηκαν δύο εξισώσεις: η εξίσωση A που αξιολογεί τα ατομικά φυτά συγκριτικά μεταξύ τους και η εξίσωση B που αξιολογεί τις οικογένειες συγκριτικά μεταξύ τους (Fasoula, 2006; 2008; Fasoula and Tokatlidis, 2012):

$$A = (x/\bar{x}_r)^2 \cdot (\bar{x}/s)^2 \qquad B = (\bar{x}/\bar{x}_t)^2 \cdot (\bar{x}/s)^2$$

όπου \mathcal{X} είναι η απόδοση του αξιολογούμενου ατομικού φυτού,

\bar{x}_r είναι η μέση απόδοση των φυτών που το περιβάλλουν ευρισκόμενα σε κύκλο, το μέγεθος του οποίου ποικίλει σύμφωνα με την κρίση του βελτιωτή,

\bar{x}_t είναι η μέση απόδοση του συνόλου του πειράματος, ενώ

\bar{x} και s είναι η μέση απόδοση και η αντίστοιχη τυπική απόκλιση της αξιολογούμενης διαλογής.

Οι εξισώσεις αυτές εκτιμούν με ακρίβεια το γενετικό παραγωγικό δυναμικό των ατομικών φυτών και των διαλογών σε συνθήκες έλλειψης ανταγωνισμού, και βελτιστοποιούν την αποτελεσματικότητα επιλογής, επιτρέποντας την εφαρμογή πολύ μεγάλων εντάσεων επιλογής. Οι δύο εξισώσεις συνίστανται σε δύο παραμέτρους, που αφορούν:

(1) πρώτη παράμετρος: $(\mathcal{X}/\bar{x}_r)^2$ (εξίσωση A) και $(\bar{x}/\bar{x}_t)^2$ (εξίσωση B)

Αφορά στην εκτίμηση του δυναμικού απόδοσης σε επίπεδο ατομικού φυτού και διαλογής αντίστοιχα, και

(2) δεύτερη παράμετρος: $(\bar{x}/s)^2$

Αφορά την εκτίμηση του συντελεστή ομοιότητας και κατ' επέκταση τη σταθερότητα συμπεριφοράς της διαλογής από την οποία προέρχεται το αξιολογούμενο φυτό (εξίσωση A) ή η αξιολογούμενη διαλογή (εξίσωση B).

Η συνδυασμένη εκτίμηση του δυναμικού απόδοσης και του συντελεστή ομοιόστασης σε συνθήκες έλλειψης ανταγωνισμού αποτελεί κριτήριο πρόβλεψης του παραγωγικού δυναμικού σε συνθήκες καλλιέργειας. Οι εξισώσεις αυτές προέκυψαν από ενσωμάτωση των τριών γενετικών συστατικών του παραγωγικού δυναμικού (Fasoula and Fasoula, 2002), δηλαδή της μέσης απόδοσης \bar{x} , της σταθερότητας συμπεριφοράς \bar{x}/S , και της ανταπόκρισης στις $(\bar{x}_{sel}-\bar{x})/s$ εισροές.

Πειραματικά δεδομένα εκτίμησης του παραγωγικού δυναμικού έδειξαν ότι:

(1) Υβρίδια καλαμποκιού της δεκαετίας του '90, το Costantza (PIONEER HI-BREED HELLAS) και το Nubia (PIONEER HI-BREED HELLAS) βελτιώθηκαν ως προς τον μέσο όρο της απόδοσης ανά φυτό απουσία ανταγωνισμού, σε σχέση με το υβρίδιο B73 xMo17 (Koutsika and Karagounis, 2005).

(2) Οι νέες ποικιλίες κριθής (*H. vulgare* L.) υπερέχουν κατά 40% ως προς την ανταπόκριση στις εισροές, έναντι των παλαιών ελληνικών ποικιλιών (Κοπαράνης κ.α. 2006).

(3) Σε διασπώμενες γενεές που προέκυψαν μετά από διασταυρώσεις στο σιτάρι (*Triticum turgidum* L. var *durum*), δε βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ των συστατικών στις δύο διαδοχικές γενεές, ωστόσο βρέθηκε θετική συσχέτιση όσον αφορά το τρίτο συστατικό δηλ. την ανταπόκριση στις εισροές, σε αντίθεση με τα άλλα δύο συστατικά που οι συντελεστές συσχέτισης ήταν αρνητικοί (Βελλής, 2006). Η εφαρμογή της εξίσωσης σε πειράματα σόγιας επέλεξε με ακρίβεια τις καλύτερες απογονικές σειρές και τα καλύτερα φυτά για απόδοση και σταθερότητα (Fasoula and Boerma, 2005).

Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν και έρευνες που υποστηρίζουν ότι μέσω της κυψελωτής μεθοδολογίας τα αποτελέσματα δεν ήταν ενθαρρυντικά. Οι Lulsdorf and McVetty (1986) εφαρμόζοντας την κυψελωτή μεθοδολογία στα κουκιά κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι δεν ήταν αποτελεσματική. Ακολούθως οι Pasini and Bos (1990a, 1990b) εφάρμοσαν την παραπάνω μεθοδολογία σε δύο πυκνότητες σποράς και δεν παρατήρησαν σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιλεγμένων ατομικών φυτών και των απογονικών σειρών. Τέλος, οι Bussemakers and Bos (1999) αξιολόγησαν τα αποτελέσματα πενταετούς κυψελωτής επιλογής σε δύο πυκνότητες σποράς και διαπίστωσαν ότι οι γονότυποι που επιλέχθηκαν σε συνθήκες απουσίας ανταγωνισμού δεν διατηρούν την υπεροχή τους σε πυκνή σπορά. Οι Fasoula and Fasoula (2000) τα ευρήματα των παραπάνω ερευνών, τα απέδωσαν στη χρήση ακατάλληλων και αναποτελεσματικών κριτηρίων αξιολόγησης και επιλογής.

1.8.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΠΙΛΟΓΗ

Για τα αγρονομικά γνωρίσματα των ποικιλιών που ενδιαφέρουν το γεωργό και επομένως το βελτιωτή, είναι δύσκολο να προσδιοριστούν τα γονίδια που τα ελέγχουν, όπως και ο ακριβής προσδιορισμός του αριθμού αλληλόμορφων. Ταυτόχρονα, συχνά είναι δύσκολος ο προσδιορισμός τόσο των γονιδίων που παρουσιάζουν ευνοϊκή επίδραση στο γνώρισμα ή έχουν αρνητική συμβολή όσο και του καλύτερου γονιδιακού συνδυασμού στο γονότυπο. Ιδιαίτερα, στα ποσοτικά γνωρίσματα μάλιστα στα οποία ανήκει η πλειονότητα των αγρονομικών γνωρισμάτων η δυσκολία αυτή είναι πολύ μεγαλύτερη για δύο βασικούς λόγους:

- α. Ελέγχονται από μεγάλο αριθμό γονιδιακών θέσεων
- β. Επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από το περιβάλλον και συνεπώς, χαρακτηρίζονται από μεγάλη γενετική παραλλακτικότητα

Εξαιτίας των παραπάνω λόγων, η έμμεση αξιολόγηση και επιλογή των γονοτύπων με βάση το φαινότυπο, αποτελεί τη βασική μεθοδολογία στην κλασική βελτίωση των φυτών. Κατά την αξιολόγηση των φυτών, επιλέγονται αυτά που έχουν τα επιθυμητά γνωρίσματα, ευελπιστώντας ότι αφ' ενός έχουν υπέρτερο γονότυπο, αφετέρου ότι η υπεροχή είναι κληρονομήσιμη στις επόμενες γενεές. Βέβαια, η έμμεση αξιολόγηση και επιλογή εμπεριέχει κινδύνους, καθώς η φαινοτυπική υπεροχή του φυτού ενδέχεται να μην έχει γενετική βάση αλλά να οφείλεται σε τυχαία γεγονότα. Ακόμη και αν η υπεροχή είναι γενετική ενδέχεται να μην είναι κληρονομήσιμη (αθροιστική), άρα άνευ ουσιαστικής σημασίας. Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν την αντικειμενική αξιολόγηση των γονοτύπων με βάση το φαινότυπο, η γνώση των οποίων είναι απαραίτητη για να περιοριστούν στο ελάχιστο οι λανθασμένες επιλογές, και να μη διαφύγουν οι πραγματικά υπέρτεροι γονότυποι. Οι παράγοντες αυτοί είναι: (Allard, 1960).

I. Το περιβάλλον

- α. Η γονιμότητα του εδάφους
- β. Η ετερογένεια του εδάφους
- γ. Οι αποστάσεις μεταξύ των φυτών

II. Ο γονότυπος

III. Η αλληλεπίδραση γονοτύπου-περιβάλλοντος.

I. Περιβάλλον

Γονιμότητα του εδάφους

Τα εδάφη διαφέρουν ως προς το επίπεδο γονιμότητας. Η επίδραση που ασκεί η κακή γονιμότητα στην αποτελεσματικότητα επιλογής είναι παρόμοια με αυτή της ετερογένειας. Όσο λιγότερο γόνιμο είναι το έδαφος τόσο αυξάνει η περιβαλλοντική παραλλακτικότητα, μειώνοντας την πιθανότητα αναγνώρισης υπέρτερων γονοτύπων.

Ετερογένεια του εδάφους

Το έδαφος είναι πηγή παραλλακτικότητας, καθώς οι φυσικοχημικές του ιδιότητες (μηχανική σύσταση, γονιμότητα, υδατοϊκανότητα, οργανική ουσία, ειδική ηλεκτρική αγωγιμότητα, pH) διαφοροποιούνται στα διαφορετικά επιμέρους τμήματά του. Οι συνθήκες επομένως κάτω από τις οποίες συγκρίνονται τα φυτά δεν είναι απόλυτα ομοιογενείς, με αποτέλεσμα κάποια από αυτά να αναπτύσσονται σε ευνοϊκότερες συνθήκες, συγκριτικά με τα υπόλοιπα. Συνεπώς, η ετερογένεια του εδάφους είναι ένας παράγοντας που επιδρά σημαντικά στην αντικειμενική αξιολόγηση και επιλογή. Η ανάπτυξη μεθόδων για την αντιμετώπιση της αρνητικής επίδρασης που ασκεί η εδαφική ετερογένεια, βασίζεται στην παραδοχή ότι όσο πιο κοντά βρίσκονται δύο σημεία της επιφάνειας του εδάφους, τόσο λιγότερο διαφέρουν.

Μέθοδοι εκτίμησης της ετερογένειας του εδάφους

1. Μέθοδος μικροτεμαχίων ή μέθοδος του Gardner

Η μέθοδος των τεμαχίων προτάθηκε από τον Gardner (1961) με σκοπό τον έλεγχο της ετερογένειας του εδάφους, ο οποίος πρότεινε τη διαίρεση του πειραματικού αγρού σε μικρότερα τεμάχια των 40 φυτών. Στη συνέχεια, από κάθε τεμάχιο επιλέγονταν τα τέσσερα υψηλοαποδοτικότερα φυτά, ανεξάρτητα από τις αποδόσεις των φυτών των γειτονικών τεμαχίων. Μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι δεν συγκρίνονται γειτονικά φυτά μεταξύ τους όταν ανήκουν σε διαφορετικά τεμάχια, ενώ συγκρίνονται φυτά που μπορεί να είναι περισσότερο απομακρυσμένα.

2. Μέθοδος των γειτονικών μαρτύρων

Η μέθοδος των γειτονικών μαρτύρων εφαρμόζεται στην αξιολόγηση οικογενειών. Η μέθοδος προτάθηκε από τους Briggs and Shebeski (1968) και η εφαρμογή της έχει ως εξής: μια γραμμή μάρτυρα επαναλαμβάνεται μετά από κάθε γραμμή του υπό αξιολόγηση υλικού και η απόδοση κάθε πειραματικού τεμαχίου εκφράζεται επί τοις εκατό (%) της απόδοσης του γειτονικού μάρτυρα. Η επιλογή γίνεται με βάση το ποσοστό υπεροχής κάθε τεμαχίου από το γειτονικό μάρτυρα. Μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι μεγάλο μέρος της πειραματικής έκτασης καταλαμβάνεται από το μάρτυρα με αποτέλεσμα την αύξηση της ετερογένειας εξαιτίας της αύξησης της συνολικής πειραματικής επιφάνειας.

3. Μέθοδος του κινητού μέσου όρου

Η μέθοδος προτάθηκε από τον Knott (1972). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, η απόδοση κάθε γραμμής εκφράζεται επί τοις εκατό (%) του μέσου όρου της απόδοσης των γειτονικών έξι γραμμών (τρεις δεξιά και τρεις αριστερά). Η επιλογή των φυτών γίνεται με βάση το ποσοστό υπεροχής κάθε γραμμής από τον κινητό μέσο όρο των γειτονικών έξι γραμμών. Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι η συγκριτική αξιολόγηση των γονοτύπων έχει σε μεγάλο βαθμό το στοιχείο του τυχαίου, λόγω της έλλειψης σταθερού μάρτυρα. Μια μεγαλύτερη απόδοση μπορεί να μην οφείλεται σε υπέρτερο γονότυπο, αλλά στο γεγονός ότι οι γειτονικές της γραμμές συνιστούν υποδεέστερους γονοτύπους.

4. Κυψελωτή μέθοδος επιλογής

Η μέθοδος προτάθηκε από τον Fasoulas (1973) και βασίζεται στην αξιολόγηση και επιλογή των ατομικών φυτών σε συνθήκες απουσίας ανταγωνισμού, εφαρμόζοντας πολύ χαμηλές πυκνότητες σποράς. Τα φυτά σπέρνονται σε εξαγωνική διάταξη και κάθε φυτό τοποθετείται στο κέντρο ενός εξαγώνου. Η απόδοση του κεντρικού φυτού συγκρίνεται με τις αποδόσεις των γειτονικών φυτών σε διάφορες εντάσεις επιλογής. Το φυτό επιλέγεται όταν έχει μεγαλύτερη απόδοση από τα φυτά του ομόκεντρου κύκλου με τα οποία συγκρίνεται. Η μέθοδος έχει εφαρμογή στην αξιολόγηση και επιλογή ατομικών φυτών από την F_1 γενεά. Η κυψελωτή μέθοδος

επιλογής έχει αποδειχθεί αποτελεσματική στην επιλογή στις πρώτες γενεές (Roupakias et al., 1997; Ntanos and Roupakias, 2001; Kotzamanidis and Roupakias, 2004).

Αποστάσεις μεταξύ των φυτών

Όταν τα φυτά βρίσκονται σε πολύ μικρές αποστάσεις μεταξύ τους, με αποτέλεσμα οι διαθέσιμοι πόροι (θρεπτικά στοιχεία, νερό, φως, κτλ) να μη επαρκούν, αναπτύσσεται μεταξύ τους ανταγωνισμός. Ο ανταγωνισμός μεταξύ φυτών που έχουν διαφορετικούς γονοτύπους ασκεί αρνητική επίδραση στην αποτελεσματικότητα επιλογής των υπέρτερων γονοτύπων για τους παρακάτω λόγους:

- α. Μειώνεται η φαινοτυπική έκφραση των γονοτύπων
- β. Μειώνεται η φαινοτυπική διαφοροποίηση
- γ. Υπάρχει αρνητική συσχέτιση μεταξύ αποδοτικής και ανταγωνιστικής ικανότητας (Fasoula and Fasoula, 1997a).

Οι μικρές αποστάσεις μεταξύ των φυτών σε συνδυασμό με τη γενετική ανομοιομορφία μεταξύ τους επιφέρουν τον ανταγωνισμό, δηλαδή την αρνητική παρέμβαση στον ισόποσο καταμερισμό πόρων ανάπτυξης εξαιτίας γενετικών και επίκτητων διαφορών. Για να γίνει αποτελεσματική η επιλογή για υψηλή και σταθερή απόδοση, ο ανταγωνισμός μεταξύ των φυτών θα πρέπει να ελαχιστοποιηθεί. Αυτό επιτυγχάνεται στην απόσταση μεταξύ των φυτών που ελαχιστοποιεί το συντελεστή παραλλακτικότητας (CV) και μεγιστοποιεί την φαινοτυπική διαφοροποίηση (Fasoulas and Fasoula, 1995). Σε συνθήκες πυκνής σποράς αυξάνει ο ανταγωνισμός και ταυτόχρονα εξαλείφεται κάθε δυνατότητα προόδου με την επιλογή, επειδή δεν επιλέγονται πλέον οι παραγωγικοί γονότυποι, αλλά οι ανταγωνιστικότεροι (Kyriakou and Fasoulas, 1985; Fasoulas, 1988; 1993; Fasoula and Fasoula, 1997a; Chatzoglou and Tokatlidis, 2012; Fasoula and Tokatlidis, 2012).

II. Γονότυπος

Όπως προαναφέρθηκε, η αξιοποίηση της γενετικής παραλλακτικότητας με φαινοτυπική επιλογή των υπέρτερων γονοτύπων ακολουθείται από την απογονική αξιολόγησή τους, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι η υπεροχή είναι κληρονομήσιμη. Ο γονότυπος μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την επιλογή. Δύο τέτοιες περιπτώσεις αποτελούν η ετεροζυγωτία και η ετερόπλευρη σύνδεση γονιδιακών θέσεων. Ακόμη

και σε περιπτώσεις ύπαρξης γενετικής υπεροχής, όταν αυτή οφείλεται σε ετεροζύγωτη κατάσταση γονιδίων που παρουσιάζουν κυριαρχικές ή/και επιστατικές δράσεις η υπεροχή δεν είναι απόλυτα κληρονομήσιμη. Από την άλλη πλευρά, η ετερόπλευρη σύνδεση γονιδίων δεν επιτρέπει πάντοτε τον ιδανικότερο ανασυνδυασμό των γονιδίων, καθώς καθιστά δύσκολη την επιθυμητή συσσώρευση κυρίαρχων αλληλομόρφων σε έναν υπέρτερο γονότυπο.

III. Αλληλεπίδραση Γονοτύπου - Περιβάλλοντος

Οι ποικιλίες ενός καλλιεργούμενου είδους προορίζονται για ένα ευρύ φάσμα καλλιεργητικών συνθηκών, όπως είναι οι διαφορετικοί τύποι εδαφών, η διαφορετική γονιμότητα του εδάφους, τα διαφορετικά επίπεδα υγρασίας και θερμοκρασίας, καθώς και οι διαφορετικές τεχνικές καλλιέργειας. Οι παράμετροι που διαμορφώνουν το φαινότυπο εξαιρουμένου του γονοτύπου, μπορούν να χαρακτηριστούν όλες μαζί ως περιβάλλον.

Όταν οι ποικιλίες συγκρίνονται σε διαφορετικά περιβάλλοντα, η συμπεριφορά της μιας σε σχέση με τις υπόλοιπες μπορεί να μην είναι η ίδια. Οι αλλαγές της σχετικής συμπεριφοράς των διαφόρων γονοτύπων που παρατηρούνται στα διάφορα περιβάλλοντα είναι γνωστές ως αλληλεπίδραση γονοτύπου x περιβάλλοντος (Romagosa and Fox, 1993).

Η αλληλεπίδραση γονοτύπου x περιβάλλοντος διακρίνεται σε "ποσοτική" και "ποιοτική". Όταν οι αλλαγές του περιβάλλοντος επιφέρουν στον ίδιο βαθμό διαφοροποίηση της συμπεριφοράς των γονοτύπων (το ευνοϊκό περιβάλλον ευνοεί στον ίδιο βαθμό τους γονοτύπους), τότε θεωρείται ότι δεν υφίσταται αλληλεπίδραση γονοτύπου x περιβάλλοντος. Όταν η αλλαγή περιβάλλοντος επηρεάζει σε διαφορετικό βαθμό τη συμπεριφορά των γονοτύπων, χωρίς όμως να αλλάξει την κατάταξή τους, υφίσταται αλληλεπίδραση γονοτύπου x περιβάλλοντος, η οποία χαρακτηρίζεται ως «ποσοτική». Τέλος όταν η αλλαγή περιβάλλοντος επηρεάζει σε τέτοιο βαθμό τη συμπεριφορά των γονοτύπων, ώστε να αλλάξει τη κατάταξη υφίσταται αλληλεπίδραση γονοτύπου x περιβάλλοντος η οποία χαρακτηρίζεται ως "ποιοτική".

Οι αλληλεπιδράσεις γονοτύπου x περιβάλλοντος ενδιαφέρουν τον βελτιωτή για τους παρακάτω λόγους:

1. Η ανάγκη δημιουργίας ποικιλιών για ειδικές περιπτώσεις, προσδιορίζονται από την κατανόηση της αλληλεπίδρασης των γονοτύπων με προβλέψιμους παράγοντες του περιβάλλοντος. Για παράδειγμα, ειδικές ποικιλίες μπορεί να απαιτούνται για καλλιέργεια σε διαφορετικές πυκνότητες σποράς, διαφορετικούς τύπους εδαφών ή και για διαφορετικές ημερομηνίες σποράς.
2. Η πιθανή ανάγκη δημιουργίας ειδικών ποικιλιών για διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές καθορίζεται από την ύπαρξη ή μη αλληλεπίδρασης του γονοτύπου με τις τοποθεσίες. Η σημασία αυτής της αλληλεπίδρασης μπορεί να προσδιορίσει εάν υπάρχει ανάγκη υποδιαίρεσης μιας μεγάλης γεωγραφικής περιοχής σε υποπεριοχές, όπου η αξιολόγηση των νέων γονοτύπων θα έδινε πιο αξιόπιστες πληροφορίες για την επιλογή των καλύτερων γονοτύπων.
3. Η σχετική σημασία των αλληλεπιδράσεων γονοτύπου x τοποθεσίας, γονοτύπου x έτος και γονοτύπου x τοποθεσία x έτος συμβάλει στην αποτελεσματικότερη κατανομή των διαθέσιμων μέσων για την αξιολόγηση των γονοτύπων.
4. Η αντίδραση των γονοτύπων, για παράδειγμα, σε διαφορετικά επίπεδα γονιμότητας που παρατηρούνται στα διάφορα περιβάλλοντα παρέχει ενδείξεις για τη σταθερότητα συμπεριφοράς των γονοτύπων στα περιβάλλοντα αυτά, καθώς βοηθά στην εκτίμηση εάν και κατά πόσο ένας γονότυπος παρουσιάζει ικανοποιητική προσαρμοστικότητα.

Ο προσδιορισμός της σημασίας των αλληλεπιδράσεων γονοτύπου x περιβάλλοντος απαιτεί τη διεξαγωγή των κατάλληλων πειραμάτων. Επομένως, η καλή γνώση των σταδίων που εμπλέκονται στον σχεδιασμό, εκτέλεση, ανάλυση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων ενός τέτοιου πειράματος είναι πολύ χρήσιμη για τη βελτιωτική διαδικασία. Η εκτίμηση της αλληλεπίδρασης αυτής είναι σημαντική για τον προσδιορισμό της βελτιωτικής στρατηγικής ώστε να δημιουργηθούν ποικιλίες με επαρκή προσαρμοστικότητα και σταθερότητα στις περιοχές όπου θα καλλιεργηθούν. Ο όρος προσαρμοστικότητα συνήθως αναφέρεται ως η διατοπικά σταθερή συμπεριφορά. Γενικά όμως μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο όρος ομοιόσταση για σταθερότητα συμπεριφοράς τόσο διατοπικά όσο και διαχρονικά. Το πρόβλημα αντιμετωπίζεται με την εφαρμογή διατοπικής αξιολόγησης σε περιβάλλοντα που κατά το δυνατό προσομοιάζουν με αυτά για τα οποία προορίζονται οι ποικιλίες. Στις περιπτώσεις αυτές, σε κάθε στάδιο του βελτιωτικού προγράμματος επιλέγονται γονότυποι οι οποίοι στη συνέχεια αξιολογούνται σε διαφορετικά περιβάλλοντα. Γονότυποι οι οποίοι συμπεριφέρονται ικανοποιητικά σε όλα τα περιβάλλοντα δείχνουν να έχουν γενική προσαρμοστικότητα και σ' αυτούς γίνονται νέες επιλογές.

Η διατοπική αξιολόγηση και επιλογή των σταθερών γονοτύπων συνεχίζεται μέχρι το τελευταίο στάδιο του προγράμματος όπου και σταθεροποιούνται γενετικά. Συχνά επιλέγονται γονότυποι που παρουσιάζουν ειδική προσαρμοστικότητα ενώ, οι ποικιλίες που προκύπτουν από αυτούς προορίζονται αποκλειστικά για καλλιέργεια στις περιοχές προσαρμογής τους. Με το πέρας του βελτιωτικού προγράμματος οι υποψήφιες ποικιλίες αξιολογούνται και πάλι στις περιοχές "στόχους" για να επιβεβαιωθεί η γενική ή ειδική προσαρμοστικότητα τους.

Μερικοί ερευνητές ισχυρίζονται ότι το κατάλληλο περιβάλλον επιλογής θα πρέπει να προσομοιάζει κατά το δυνατό περισσότερο με το περιβάλλον-στόχο (Atlin and Frey, 1989; Ceccarelli, 1989; Oosterom et al., 1993; Phillips and Wolfe, 2005). Έτσι, ποικιλίες που προορίζονται για οργανική καλλιέργεια θα πρέπει να επιλέγονται υπό τις αντίστοιχες συνθήκες (Vlachostergios and Roupakias, 2008; Vlachostergios et al., 2011). Όταν η αλληλεπίδραση γονοτύπου-περιβάλλοντος είναι μεγάλη, η επιλογή πρέπει να στοχεύει σε ποικιλίες με ειδική προσαρμοστικότητα και να πραγματοποιείται στα ακραία αυτά περιβάλλοντα. Πιο συγκεκριμένα, οι Vlachostergios and Roupakias (2008) μελετώντας 36 ποικιλίες φακής σε οργανικό και συμβατικό περιβάλλον έδειξαν ότι υπάρχουν ποικιλίες με γενική και ειδική προσαρμοστικότητα. Αντίθετα, οι Karimizadeh and Mohammadi (2010) αξιολογώντας 11 γονοτύπους φακής σε πέντε διαφορετικά περιβάλλοντα κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι δεν υπήρξε γονότυπος με γενική προσαρμοστικότητα. Βρέθηκαν όμως γονότυποι με υψηλή απόδοση, σταθερότητα και προσαρμοστικότητα συμπεριφοράς, επιθυμητά αγρονομικά χαρακτηριστικά και τέλος αντοχή στο μύκητα *Fusarium*.

Από την άλλη πλευρά, κάποιοι ερευνητές προτείνουν τη διαδοχική εναλλαγή μεταξύ ευνοϊκού και δυσμενούς περιβάλλοντος για την επιλογή γονοτύπων που αποδίδουν καλά και στα δυο περιβάλλοντα (Ceccarelli, 1996). Ο Singh (1995) επιλέγοντας για ξηρασία στο φασόλι μεταξύ δύο πληθυσμών παρατήρησε ότι στο περιβάλλον της ενδιάμεσης καταπόνησης μεγιστοποιούνται οι διαφορές μεταξύ των γονοτύπων και διευκολύνεται η επιλογή.

1.9 ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΗΣ ΦΑΚΗΣ

1.9.1 Συμβολή των μοριακών δεικτών στη Βελτίωση της φακής

Οι μοριακοί δείκτες αποτελούν πολύτιμα εργαλεία για την τεκμηρίωση της γενετικής ιδιομορφίας των οικοτύπων και συγκεκριμένα την κατοχύρωση προϊόντων προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης (Π.Ο.Π.) και προϊόντων προστατευόμενης γεωγραφικής ένδειξης (Π.Γ.Ε.), που μπορούν να δοθούν σε τοπικά προϊόντα, όπως λαχανικά, φρούτα, τυριά, κρέας, λάδι, κ.ά. Η αναβάθμιση αυτή της αξίας των εκλεκτών τοπικών ποικιλιών δύναται να συντελέσει σημαντικά στην αύξηση του εισοδήματος των αγροτών (Sonnante and Pignone, 2001).

Δεδομένης της απώλειας της γενετικής ποικιλότητας λόγω της δραματικής μείωσης της καλλιέργειας τοπικών ποικιλιών, ως αποτέλεσμα της αντικατάστασής τους από σύγχρονες ποικιλίες που καλλιεργούνται ως μονοκαλλιέργειες, η συντήρηση και η αναγνώριση της υπάρχουσας βιοποικιλότητας αποτελεί στόχο θεμελιώδους σημασίας. Στο πλαίσιο συντήρησης του γενετικού υλικού, κρίνεται απαραίτητη η αξιολόγηση, διατήρηση και αύξηση της διαθέσιμης γενετικής ποικιλότητας στις τοπικές ποικιλίες, με τη χρήση των μοριακών δεικτών.

Οι μοριακοί δείκτες, και ο μέσω αυτών εντοπισμός γενετικών τόπων ενδιαφέροντος (gene tagging), παρέχουν τη δυνατότητα επιτάχυνσης της βελτιωτικής διαδικασίας και αποτελούν ένα αξιοποιήσιμο εργαλείο για την έμμεση επιλογή γνωρισμάτων, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις όπου αυτή είναι πρακτικά δυσχερής. Στα πλαίσια βελτίωσης της φακής, οι μοριακοί δείκτες:

1. Στοχεύουν στη βελτίωση των στρατηγικών βελτίωσης (Muehlbauer et al., 2006).
2. Είναι χρήσιμοι για τη διάκριση μεταξύ στενά σχετιζόμενων γονοτύπων και την εύρεση πιθανής γενετικής ποικιλομορφίας (Laghetto et al., 2008).
3. Χρησιμοποιούνται ακόμα για τη βελτίωση φυτών ως προς την αντίσταση στις ασθένειες και για τη δημιουργία γενετικών συνδετικών χαρτών (Sharma et al., 1996).

Η ύπαρξη σημαντικής γενετικής παραλλακτικότητας για διάφορα γνωρίσματα στη γονιδιακή δεξαμενή της φακής, καθιστά δυνατή την επιτέλεση κατάλληλων χειρισμών που στοχεύουν στη βελτίωση του είδους. Παρόλα αυτά, η απουσία ή παρουσία μειωμένης παραλλακτικότητας για σημαντικά αγρονομικά χαρακτηριστικά

της φακής όπως η παραγωγή βιομάζας, η καρπόπτωση, η δέσμευση του αζώτου (nitrogen fixation), η αντοχή στη σιτόνα, στις αφίδες και το παρασιτικό ζιζάνιο της οροβάγχης καθιστά πρακτικά αδύνατη τη δυνατότητα αναβάθμιση της φακής ως προς τα γνωρίσματα αυτά (Sarker and Erskine 2006).

1.9.2 Αξιοποίηση μοριακών δεικτών στην εκτίμηση της γενετικής παραλλακτικότητας

I. Μοριακοί δείκτες τύπου RAPD

Πρόκειται για θραύσματα DNA που ενισχύονται μέσω της PCR χρησιμοποιώντας μικρού μεγέθους (συνήθως 10 βάσεων) εκκινητές, τα λεγόμενα δεκαμερή, τυχαίας αλληλουχίας νουκλεοτιδίων. Τα ενισχυμένα κομμάτια διαχωρίζονται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης. Οι τυχόν πολυμορφισμοί του υλικού διακρίνονται με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου σε δυαδικό σύστημα ως παρουσία ή απουσία ζωνών. Η ευκολία στην χρήση, τους έχει καταστήσει από τους πιο δημοφιλείς μοριακούς δείκτες. Το κύριο πλεονέκτημα των RAPD είναι η γρήγορη και εύκολη χρήση τους. Επίσης, δεν απαιτείται μεγάλη ποσότητα πρότυπου DNA (συνήθως 5-50 ng ανά αντίδραση), ούτε γνώση της αλληλουχίας τους εφόσον οι εκκινητές είναι τυχαίοι. Επιπροσθέτως, βρίσκονται σε αφθονία και τυχαίως κατανεμημένα στο γονιδίωμα. Μειονέκτημα αποτελεί η χαμηλή επαναληψιμότητα της μεθόδου καθώς και η αναγκαιότητα χρήσης καθαρού DNA υψηλού μοριακού βάρους. Επιπλέον πρέπει να λαμβάνονται μέτρα προστασίας για αποφυγή επιμόλυνσης του DNA διότι οι μικροί αυτοί τυχαίοι εκκινητές μπορούν να δώσουν ενίσχυση σε DNA πολλών οργανισμών. (Spooner et al., 2005). Τέλος τα RAPD είναι κυρίαρχοι δείκτες, και συνεπώς δεν είναι δυνατή η διάκριση της ομοζυγωτίας και ετεροζυγωτίας (Ferguson et al., 1998; Spooner et al., 2005).

Οι Abo-elwafa et al. (1994). χρησιμοποίησαν τους RAPD δείκτες για να εκτιμήσουν τη γενετική παραλλακτικότητα στο γένος *Lens*. Η μελέτη περιελάμβανε την ανάλυση είκοσι ποικιλιών του *L. culinaris spp.culinaris*, συμπεριλαμβανομένων 11 μικρόσπερων και εννιά μακρόσπερων ποικιλιών, και 16 ποικιλιών άγριων ειδών μέσω της χρήσης των RAPD δεικτών. Παρατηρήθηκαν 50 DNA ζώνες εκ των οποίων το 90% ήταν πολυμορφικές. Ακολούθως, ο Sharma et al. (1995) απέδειξαν πως η χρήση των RAPDs αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για την εκτίμηση της γενετικής

ποικιλότητας και των προσδιορισμό των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των καλλιεργούμενων και των άγριων ειδών φακής. Η ίδια ομάδα ένα χρόνο αργότερα, αξιοποίησε την εφαρμογή των δεικτών τύπου AFLP για την εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας τόσο στη καλλιεργούμενη όσο και στα άγρια είδη φακής με σκοπό την εύρεση των φυλογενετικών σχέσεων. Απώτερος στόχος ήταν ο καθορισμός ενός επαρκή αριθμού AFLP δεικτών για τη δημιουργία ενός λεπτομερή γενετικού χάρτη της φακής. Τα ευρήματα υπέδειξαν μεγαλύτερη γενετική ομοιότητα ανάμεσα στο *spp. orientalis* και στο *var. Microsperma*, αποδεικνύοντας ότι το *spp. orientalis* αποτελεί τον πιθανότερο πρόγονο της φακής. Η συγκεκριμένη έρευνα συνέβαλε καθοριστικά στον προσδιορισμό των φυλογενετικών σχέσεων στη φακή. Ταυτόχρονα τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που βασίστηκαν σε μορφολογικά χαρακτηριστικά (Ladizinsky, 1979) καθώς και στην εφαρμογή δεικτών τύπου RFLP (Havey and Muehlbauer, 1989), αποδεικνύοντας ότι οι AFLP δείκτες μόνοι τους ή σε συνδυασμό με μορφολογικούς δύνανται να συμβάλουν στη χαρτογράφηση και τη κατανόηση της φυλογένειας στο γένος *Lens*. Ακόμη, φάνηκε ότι το είδος *L. ervoides* ήταν το πιο διακριτό taxon και ακολούθησε το *L. nigricans*, οι γενετικές αποστάσεις των οποίων ήταν του ίδιου επιπέδου με αυτές των δύο προηγούμενων.

Επίσης, η μελέτη της γενετικής ποικιλότητας μεταξύ 7 τοπικών και καλλιεργούμενων ποικιλιών του είδους *Lens culinaris* Medik., λεπτόσπερμου και πλατύσπερμου τύπου, με τη χρήση 39 RAPD, οδήγησε στην ενίσχυση 168 ζωνών, 40% των οποίων ήταν πολυμορφικές (Alvarez et al., 1997). Παρατηρήθηκε πολυμορφισμός μεταξύ των τοπικών ποικιλιών αλλά όχι και μεταξύ των καλλιεργούμενων. Για την ομαδοποίηση του γενετικού υλικού, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος UPGMA και ο συντελεστής του Jaccard. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν μεγαλύτερη γενετική ποικιλότητα μεταξύ των πλατύσπερμων και λεπτόσπερμων καταχωρήσεων συγκριτικά με τις καταχωρήσεις εντός των λεπτόσπερμων καταχωρήσεων. Ωστόσο, 3 διακριτές ζώνες διαχώρισαν τις πλατύσπερμες από τις λεπτόσπερμες (Alvarez et al., 1997).

Ακόμη, τρεις τοπικές ποικιλίες της Νότιας Ασίας (Ινδία, Νεπάλ και Πακιστάν) και 13 άλλων χωρών μελετήθηκαν με τη χρήση ισοενζύμων και μοριακών δεικτών τύπου RAPD. Συνολικά, παρήχθησαν 22 πολυμορφικές ζώνες από 4 RAPD εκκινήτες και εντοπίστηκαν πολυμορφισμοί σε 7 ισοενζυμικούς τύπους (16 αλληλόμορφα). Σύμφωνα με τις γενετικές αποστάσεις του Nei, το γενετικό υλικό από το Αφγανιστάν

ομαδοποιήθηκε με αυτό των χωρών της Νότιας Ασίας. Το γενετικό υλικό από αυτές τις χώρες διέφερε σημαντικά από αυτό των άλλων χωρών που εξετάστηκαν. Σύμφωνα με την ανάλυση των RAPD οι χώρες με τη μικρότερη ποικιλότητα ήταν το Πακιστάν, το Αφγανιστάν και το Νεπάλ. Η ταξινόμηση σε λεπτόσπερμους και πλατύσπερμους τύπους δεν αντικατροπτίστηκε μεταξύ των χωρών αλλά δημιουργήθηκαν 4 ομάδες με γεωγραφική συγγένεια: (Ferguson et al., 1998).

- η Αιθιοπική με καταχωρήσεις από την Αιθιοπία και την Υεμένη,
- η Λεβαντινή με καταχωρήσεις από την Συρία, την Ιορδανία και το Λίβανο,
- η Ευρωπαϊκή με καταχωρήσεις από τη Βουλγαρία και την Ισπανία και τέλος,
- μία ομάδα με καταχωρήσεις από το Ιράν και την Αίγυπτο.

Οι Sonnante and Pignone, 2001 αξιολόγησαν τη γενετική ποικιλότητα σε μία συλλογή από τοπικές ποικιλίες φακής, προερχόμενες κυρίως από την Ιταλία και από άλλες χώρες της Μεσογείου, καθώς και σε ξένο γενετικό υλικό, χρησιμοποιώντας τους μοριακούς δείκτες τύπου RAPD, SSR και ISSR. Εντοπίστηκε μικρό επίπεδο πολυμορφισμού για τους δύο πρώτους δείκτες (54% και 55% αντίστοιχα), ενώ οι ISSR ανέδειξαν υψηλότερο βαθμό ποικιλότητας (65%). Τα δένδρογράμματα που κατασκευάστηκαν από τη χρήση RAPD και ISSR δεικτών με τον αλγόριθμο κατά UPGMA και του συντελεστή ομοιότητας Jaccard, δεν έδειξαν ίδιες συστάδες. Ωστόσο και στις δύο περιπτώσεις, η καταχώρηση που ξεχώρισε περισσότερο από όλες ήταν αυτή της Αιθιοπίας, μία χώρα στην οποία και άλλα καλλιεργούμενα είδη έχουν δείξει αξιόλογο βαθμό ποικιλότητας. Από την άλλη πλευρά, οι καταχωρήσεις από την Ιταλία έτειναν να ταξινομούνται μαζί.

Οι Rubeena et al. (2003), κατασκεύασαν ένα χάρτη σύνδεσης του γονιδιώματος της φακής που περιείχε 100 RAPDs, 11 ISSRs και 3 RGAs, τα οποία αποτέλεσαν μία συνολική δύναμη της τάξης των 784,1 cM μέσα σε εννιά συνδετικές ομάδες. Πρέπει να επισημανθεί, πως η πιο πρόσφατη έρευνα για μοριακούς δείκτες που αναπτύχθηκε για επιλογή κάποιας ασθένειας αναφέρεται από τους Hamwieh et al. (2005), οι οποίοι αναγνώρισαν δείκτες πολύ κοντά στη θέση *Fw* του πληθυσμού ILL 5588. Οι Hamwieh et al., (2005), εμπλούτισαν το γενετικό χάρτη της φακής που είχε προηγουμένως κατασκευαστεί από τους Eujal et al. (1998), με 50 AFLPs, 21 RAPDs, 39 SSRs και 1 μορφολογικό δείκτη.

Πληθώρα μοριακών δεικτών, συμπεριλαμβανομένων και των RAPD, έχουν αξιολογηθεί από τους Yüzbasioğlu et al.(2006), προκειμένου να καθορισθεί η γενετική σχέση τουρκικών ποικιλιών και βελτιωτικών σειρών φακής. Συγκεκριμένα, δεκατέσσερις ποικιλίες και δεκατρείς βελτιωμένες σειρές εκτιμήθηκαν για να καθορισθεί η γενετική παραλλακτικότητα χρησιμοποιώντας εννέα δείκτες. Ο αριθμός των ζωνών για τον κάθε δείκτη κυμάνθηκε μεταξύ 2 και 7, με μέσο όρο 4.5 ζώνες ανά δείκτη. Το μέγεθος των προϊόντων ενίσχυσης κυμάνθηκε μεταξύ 300 - 1400 bp. Από τις 41 ζώνες, οι 19 ήταν μονομορφικές σε όλες τις υπό δοκιμή ποικιλίες και βελτιωτικές σειρές, ενώ οι υπόλοιπες (54%) ήταν πολυμορφικές με μέσο όρο 2,4 ζώνες ανά δείκτη. Το δενδρόγραμμα από την ανάλυση με το συντελεστή Simple Matching έδειξε δύο εμφανείς ομάδες. Η πρώτη ομάδα περιείχε 2 βελτιωμένες σειρές και η δεύτερη περιελάμβανε όλες τις καλλιεργούμενες ποικιλίες και τις υπόλοιπες 11 σειρές. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκαν δείκτες RAPD (Sharma et al., 1995; Ford et al., 1997; Sonnante et al., 2001). Μία άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε, με στόχο την εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας σε *ex-situ* διατηρημένες εγχώριες ποικιλίες φακής του Πακιστάν πραγματοποιήθηκε με τη χρήση βοτανικών περιγραφητών, τη μέτρηση της συνολικής πρωτεΐνης των σπόρων καθώς και τη χρήση ισοενζύμων και δεικτών RAPD. Όλοι δείκτες αποδείχθηκαν κατάλληλοι για την εκτίμηση της ποικιλότητας ανεξαρτήτως γεωγραφικής προέλευσης και μεγέθους σπόρου, με τους RAPD όμως να αποτελούν την αποτελεσματικότερη μέθοδο για την εκτίμηση της ενδοποικιλιακής και διαπληθυσμιακής παραλλακτικότητας (inter and intra accession diversity). Τα ισoenζυμα και οι πρωτεΐνες του σπόρου έδωσαν χαμηλά ποσοστά ποικιλομορφίας (Sultana and Ghafoor, 2008).

II. Μοριακοί δείκτες τύπου ISSR

Τα ISSR είναι θραύσματα DNA μεγέθους 100-3000 bp που βρίσκονται μεταξύ παρακείμενων αντίθετα προσανατολισμένων μικροδορυφόρων. Η μεθοδολογία βασίζεται στην ενίσχυση ενός μοναδικού εκκινητή που περιλαμβάνει μικροδορυφορική 'πυρηνική' αλληλουχία που βρίσκεται στο 3' ή 5' και τελειώνει με 2-4 επιλεγμένα νουκλεοτίδια. Η διαδικασία περιλαμβάνει τη δημιουργία θραυσμάτων από διάφορους γενετικούς τόπους, τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό τους σε πηκτή αгарόζης ή πολυακρυλαμίδης και την καταγραφή τους ως παρουσία ή απουσία

ζωνών. Τα ISSR βρίσκονται σε αφθονία διάσπαρτα μέσα στο γονιδίωμα, απαιτείται μικρή ποσότητα πρότυπου DNA για την διεξαγωγή της PCR (5-50 ng ανά αντίδραση) και τέλος, δεν απαιτείται γνώση της αλληλουχίας για την κατασκευή εκκινητών. Επειδή αναφέρονται σε πολλαπλούς γενετικούς τόπους, υπάρχει περίπτωση μη ομολογίας ζωνών παραπλήσιου μεγέθους. Επίσης, συχνά παρουσιάζονται προβλήματα επαναληψιμότητας (Spooner et al., 2005). Πρόκειται για μία τεχνική που παρέχει τη δυνατότητα διαφοροποίησης στενά συγγενικών γονοτύπων (Sonnante and Pignone, 2001). Χρησιμοποιούνται για τη διερεύνηση της γενωμικής καταγωγής, της γενετικής ποικιλότητας σε συλλογές γενετικού υλικού και στην ταυτοποίηση των καλλιεργούμενων ποικιλιών (Prevost and Wilkinson, 1999). Η ανάλυση δεικτών ISSR έχει αξιοποιηθεί σε μεγάλο αριθμό καλλιεργούμενων ειδών, όπως το φασόλι, η φακή, το καλαμπόκι και το σιτάρι (Toklu et al., 2009b).

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

Οι Toklu et al. (2009b) μελέτησαν την γενετική ποικιλότητα 38 τοπικών ποικιλιών φακής χρησιμοποιώντας ISSR και AFLP δείκτες. Η ISSR ανάλυση πραγματοποιήθηκε με 14 εκκινητές που παρήγαγαν 125 ζώνες, εκ των οποίων οι 105 ήταν πολυμορφικές ενώ για τα AFLP οι 6 συνδυασμοί εκκινητών έδωσαν 212 ζώνες, εκ των οποίων οι 119 ήταν πολυμορφικές. Παρά το γεγονός ότι οι δείκτες AFLP έδωσαν περισσότερες ζώνες ανά συνδυασμό εκκινητή, οι ISSR εντόπισαν υψηλότερο ποσοστό πολυμορφισμού. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων με βάση τη μέθοδο UPGMA και το συντελεστή του Jaccard, οδήγησε σε παρόμοια αποτελέσματα τόσο

για τις ξεχωριστές αναλύσεις δεικτών τύπου ISSR και AFLP όσο και για το συνδυασμό των δύο αναλύσεων. Αναλυτικότερα, οι τουρκικές τοπικές ποικιλίες διαχωρίστηκαν σε δύο κύριες ομάδες και έδειξαν αξιόλογη ποικιλομορφία, ενώ οι αποστάσεις κατά Jaccard έδειξαν εμφανείς διαφορές μεταξύ των τοπικών ποικιλιών.

III. Μοριακοί δείκτες τύπου SSR

Οι δείκτες SSR είναι γνωστοί ως μικροδορυφόροι και αντιπροσωπεύουν διαδοχικές επαναλήψεις απλών νουκλεοτιδίων της μορφής (GT)_n, (GATA)_n, (GA)_n, όπου το n κυμαίνεται συνήθως από 5 έως 50 (Spooner et al., 2005). Είναι συνήθως 2-5 bp σε μήκος και απαντώνται στα περισσότερα ευκαρυωτικά γονιδιώματα (Hamwieth et al., 2005). Όταν υπάρχει γνώση της αλληλουχίας των ακραίων περιοχών των μικροδορυφόρων είναι δυνατός ο σχεδιασμός εξειδικευμένων εκκινητών (μήκους συνήθως 20-25 bp) για την μέσω της PCR ενίσχυση των μικροδορυφόρων (Spooner et al., 2005). Οι δείκτες SSR είναι εξαιρετικά πολυμορφικοί, εύκολα άφθονοι και διανεμημένοι σε όλο το γονιδίωμα (Durán et al., 2004). Παρουσιάζουν υψηλή ποικιλότητα αναφορικά με τον αριθμό των επαναλήψεων και ταυτόχρονα χαρακτηρίζονται από συγκυρίαρχη κληρονομικότητα. Οι δείκτες SSR έχουν ευρέως εφαρμοσθεί για την ανίχνευση πολυμορφισμών, τη χαρτογράφηση του φυτικών γενομάτων και τη φυλογενετική ανάλυση λόγω της συγκυρίαρχης κληρονόμησής τους και του υψηλού βαθμού πολυμορφισμού που εμφανίζουν (Sonnante and Pignone, 2001). Οι SSRs έχουν χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση γονοτύπων στη σόγια (Rongwen et al., 1995), στο μπιζέλι (Ford et al., 2002) και στο ρεβίθι (Winter et al., 1999) και γενικότερα, αποτελούν χρήσιμο εργαλείο για την αποτελεσματικότερη διαχείριση του γενετικού υλικού (Babayeva et al., 2009).

Στη φακή, οι Jin et al., (2008) αξιοποίησαν δείκτες SSR για την εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας μεταξύ 440 τυχαία επιλεγμένων ποικιλιών που προέρχονταν από την Εθνική Τράπεζα Γενετικού Υλικού της Κινεζικής Ακαδημίας των Γεωργικών Επιστημών. Συγκεκριμένα, η χρήση 14 SSR δεικτών ανέδειξε έντονη γενετική διαφοροποίηση ανάμεσα τις 16 διαφορετικές γεωγραφικές ομάδες των υπό μελέτη ποικιλιών φακής. Οι ξένες ποικιλίες εμφάνισαν μεγαλύτερη γενετική ποικιλότητα φάνηκε από τις εγχώριες-κινεζικές. Αναφορικά με τους ξένους πληθυσμούς, χαμηλότερα επίπεδα πολυμορφισμού εμφάνισαν οι πληθυσμοί από την Ευρώπη, τη Νότια Ασία, την Αμερική και την Ιαπωνία ενώ αντίθετα υψηλότερος ήταν ο

πολυμορφισμός για τη νότια Ασία καθώς και για τους πληθυσμούς άγνωστης προέλευσης.

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

Σε μία άλλη έρευνα χρησιμοποιήθηκαν 22 προσφάτως ταυτοποιημένοι SSR δείκτες, και 3 SSR δείκτες που είχαν προηγουμένως χαρτογραφηθεί στο γενετικό χάρτη της φακής, σύμφωνα με την ανάλυση 40 ποικιλιών προερχόμενων από 5 είδη του γένους *Lens*. Τα ευρήματα ανέδειξαν υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού (Reddy et al., 2009). Αντίθετα, τα χαμηλότερα επίπεδα πολυμορφισμού που ανιχνεύτηκαν μέσω SSR δεικτών σε EST αλληλουχίες, μπορεί να αποδοθούν στο γεγονός ότι η φαή, ως αυτογονιμοποιούμενο είδος, εμφανίζει γενικά περιορισμένο γενετικό υπόβαθρο και συνεπώς, περιορισμένο γενετικό πολυμορφισμό (Varshney et al. 2005). Για το λόγο αυτό, η κατά το δυνατό μέγιστη αποκάλυψη πολυμορφισμών στη φακή απαιτεί τη χρησιμοποίηση μεγάλου αριθμού SSR δεικτών προερχόμενων από γενωμικές παρά cDNA βιβλιοθήκες.

1.9.3 Βελτίωση φακής για ανθεκτικότητα σε ασθένειες - Παθοβελτίωση

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

Είναι πλέον αποδεκτό, ότι η δημιουργία γενετικά ανθεκτικών ποικιλιών αποτελεί το αποτελεσματικότερο μέσο για την αιφόρο αντιμετώπιση επίσημων ασθενειών. Στα πλαίσια αυτά, έχουν βρεθεί πολλοί ανθεκτικοί γονότυποι τόσο στα καλλιεργούμενα όσο και στα άγρια είδη φακής ενώ παράλληλα, αυξάνεται συνεχώς ο

αριθμός των χαρακτηρισμένων γονιδίων ανθεκτικότητας. Μέχρι σήμερα, τα βελτιωτικά προγράμματα που στοχεύουν στη βελτίωση της ανθεκτικότητας έναντι φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών αξιοποίησαν τη μέθοδο της αναδιασταύρωσης. Η περαιτέρω αύξηση των διαθέσιμων πηγών ανθεκτικότητας θα επιτρέψει τη συσσώρευση ποικίλων γονιδίων ανθεκτικότητας, μέσω της πυραμίδωσης, ενώ παράλληλα η εύρεση κάθετης και οριζόντιας ανθεκτικότητας καθώς και η αξιοποίηση γονιδίων που είναι παρόντα σε άγριο γενετικό υλικό αναμένεται να αποτελέσουν κύριους στόχους των σχετικών βελτιωτικών προγραμμάτων.

Η αναγνώριση και ταυτοποίηση νέων πηγών ανθεκτικότητας, η καλύτερη κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ παθογόνου και ξενιστή καθώς και ο εντοπισμός μοριακών δεικτών που παρουσιάζουν στενή σύνδεση με γονίδια ανθεκτικότητας προτείνονται ως πολύτιμα εργαλεία για την περαιτέρω βελτίωση της γενετικής ανθεκτικότητας. Η αλληλεπίδραση όμως του γονότυπου με το περιβάλλον έχει ιδιαίτερη σημασία όταν η ποικιλία που προκύπτει από την βελτίωση ως προς την ανθεκτικότητα σε κάποιο παθογόνο πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε μεγάλη έκταση. Υπάρχουν για την ακρίβεια δύο λόγοι που την καθιστούν σπουδαία. Πρώτον, το γεγονός ότι τα παθογόνα μπορεί να ποικίλλουν στο βαθμό εισβολής κάτω από διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες και δεύτερον, ότι η δύναμη, η ανάπτυξη και το προφίλ της φυσιολογίας τους συχνά αλλάζει ανάλογα με το περιβάλλον (Ye et al., 2000). Συνεπώς, η βελτίωση για ανθεκτικότητα στα παθογόνα αποτελεί την πιο αποτελεσματική και φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο για τον αποτελεσματικό και πληρέστερο έλεγχο των ασθενειών (Erskine et al., 1994; Ye et al., 2000).

Ασκοχύτωση

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στην ασθένεια της ασκοχύτωσης αποτελεί ένα χαρακτηριστικό επιτυχημένο παράδειγμα της εφαρμογής της υποβοηθούμενης από μοριακούς δείκτες βελτίωσης της φακής. Πολλοί είναι οι γονότυποι που αναφέρθηκαν για την ανθεκτικότητα στην ασκοχύτωση. Συγκεκριμένα, γονότυποι όπως ο ILL-5588 και ο ILL-7537, χρησιμοποιούνται ευρέως ως πηγές ανθεκτικότητας σε Αυστραλιανά και Καναδέζικα προγράμματα βελτίωσης.

Το γονίδιο *PI 320937* συνδέθηκε με την ανθεκτικότητα στην ασκοχύτωση. Στο πλαίσιο εύρεσης ανθεκτικότητας στην ασκοχύτωση, οι Tullu et al. (2003) κατασκεύασαν ένα γενετικό χάρτη αποτελούμενο από 275 AFLP, SSR και RAPD

δείκτες, χρησιμοποιώντας έναν ανασυνδυασμένο πληθυσμό φακής. Η έρευνα αυτή οδήγησε στον εντοπισμό δύο ποσοτικών γνωρισμάτων, τα *QTL1* και *QTL2* στα χρωμοσώματα 6 και 2, που εξηγούν το 33.3% και το 6,6% της γενετικής παραλλακτικότητας αντίστοιχα. Το *QTL1* εκτιμήθηκε ανάμεσα σε ένα AFLP δείκτη (*cttagg2*) και το γονίδιο *LCt2*, που ελέγχει την ανθεκτικότητα της φακής στη σκωρίαση (*Uromyces viciae fabae*). Τα ευρήματα αυτά αποτελούν την πρώτη ένδειξη για τη γενετική σύνδεση των γονιδίων που συνδέονται με την ανθεκτικότητα στα παθογόνα που προκαλούν την ασκοχύτωση και τη σκωρίαση. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν από την ταυτόχρονη παρουσία του δείκτη OP-P4400 στο χαρτογραφημένο πληθυσμό της ποικιλίας, που προηγουμένως είχε ταυτοποιηθεί ως συνδεδεμένο με ένα *QTL* για την ανθεκτικότητα στην ασκοχύτωση.

Το γονίδιο *PI 320937* αποτελεί λοιπόν, μία νέα πηγή ανθεκτικότητας που δύναται να ενσωματωθεί σε γενετικό υλικό φακής για την ταυτόχρονη βελτίωση της ανθεκτικότητας στην ασκοχύτωση και στη σκωρίαση. Οι δείκτες AFLP και RAPD που χαρτογραφήθηκαν στους αντίστοιχους γενετικούς τόπους θα αποτελέσουν στο μέλλον χρήσιμα εργαλεία για την υποβοηθούμενη από δείκτες επιλογή (Tullu et al., 2003). Προηγούμενες μελέτες επίσης, έχουν καταδείξει την ύπαρξη διαφορών μεταξύ ποικιλιών και βελτιωμένων σειρών ως προς την ανθεκτικότητα στην ασκοχύτωση της φακής (Morrall and Sheppard, 1981; Ahmad et al., 1996). Προς την κατεύθυνση αυτή, οι Ahmad et al. (1996) μελέτησαν την ανθεκτικότητα στην ασκοχύτωση σε ποικίλο γενετικό υλικό φακής. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν δύο ποικιλίες που ανήκουν στα άγρια είδη *L. c. ssp. orientalis* και *L. ervoides*, τρεις ποικιλίες του είδους *L. nigricans*, μία ποικιλία του είδους *L. odemensis* καθώς και τρεις ποικιλίες που προέρχονταν από τη Ν. Ζηλανδία. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι με εξαίρεση τις ποικιλίες από τη Νέα Ζηλανδία που υπήρξαν μέτρια έως υψηλά ευπαθείς στο παθογόνο, όλες οι άλλες ποικιλίες χαρακτηρίζονταν από υψηλή ανθεκτικότητα στην ασθένεια. Κανένα φυτό δεν κατατάχθηκε σε μία μέση κατάσταση, επιτρέποντας έτσι την ευχερή ταξινόμηση των ποικιλιών σε ανθεκτικές και ευαίσθητες (Ahmad et al., 1996).

Τα διειδικά υβρίδια τόσο των ανθεκτικών όσο και των άγριων ειδών μαζί με τα *L. c. ssp. culinaris* ήταν όλα ανθεκτικά και δεν ανέπτυξαν κανένα σύμπτωμα της ασθένειας όταν εμβολιάστηκαν με το παθογόνο. Τα ποσοστά για ανθεκτικότητα στους F_2 πληθυσμούς υποδεικνύουν ότι η ανθεκτικότητα στα άγρια είδη ελέγχεται από 2 κυρίαρχα γονίδια, που το καθένα εντοπίστηκε στους ανθεκτικούς γονοτύπους

W6 3192 και W6 3222. Επίσης, τα κυρίαρχα γονίδια που ταυτοποιήθηκαν από τους Tay and Slinkard (1989) και Andrahennadi (1994), φάνηκε να προσδίδουν υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας. Στο σύνολό τους, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η ανθεκτικότητα στην ασκοχύτωση καθορίζεται από δύο κυρίαρχα γονίδια, προερχόμενα από τα είδη *L. ervoides* και *L. odemensis*, που παρουσιάζουν συμπληρωματική δράση (Ahmad et al., 1996).

Πρέπει να επισημανθεί ότι η βελτίωση για την ανθεκτικότητα της φακής στον μύκητα που προκαλεί την ασκοχύτωση ξεκίνησε σχετικά πρόσφατα και βρίσκεται ακόμη σε πρωταρχικό στάδιο. Βέβαια τα διατοπικά πειράματα υπό τον συντονισμό του ICARDA έχουν ήδη οδηγήσει στην κατοχύρωση αρκετών ανθεκτικών ποικιλιών σε πολλές χώρες του κόσμου (Russell, 1994; Singh et al., 1994; Erskine et al., 1996).

Η γνώση της γενετικής ποικιλότητας του παθογόνου και του ελέγχου της γενετικής ανθεκτικότητας του ξενιστή είναι πολύ περιορισμένη με άμεσο αποτέλεσμα τα καλώς οργανωμένα προγράμματα βελτίωσης να μην είναι ακόμη εφαρμόσιμα. Ωστόσο, η πρόσφατη ταυτοποίηση των γονιδίων ανθεκτικότητας, η κατανόηση του τρόπου δράσης τους σε αρκετές καλλιεργούμενες ποικιλίες (Ye et al., 2000), καθώς και η επιβεβαίωση της ύπαρξης των διαφορετικών παθότυπων (Nasir and Bretag, 1997) προσέφεραν τη βάση για να σχεδιαστεί ένα βελτιωτικό πρόγραμμα που στοχεύει στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας στην ασθένεια.

Στο πλαίσιο δημιουργίας βελτιωμένων ποικιλιών ως προς την ανθεκτικότητα στην ασκοχύτωση αλλά και ως προς άλλα επιθυμητά γνωρίσματα, το ICARDA έχει αξιοποιήσει μία συνδυασμένη μαζική επιλογή και μία γενεαλογική επιλογή τόσο στη φακή όσο και στο ρεβίθι (Singh, 1993; Muehlbauer et al., 1995). Η συγκεκριμένη μεθοδολογία έχει εφαρμοστεί επιτυχώς για τη δημιουργία ανθεκτικότητας του ρεβιθίου στην ασκοχύτωση (Singh, 1993). Κατά ανάλογο τρόπο, η σχετικά πρόσφατη ταυτοποίηση ομόλογων γονιδίων σε άγρια είδη φακής καθιστά δυνατή την ενσωμάτωση των γονιδίων αυτών ανθεκτικότητας σε καλλιεργούμενες ποικιλίες φακής. Παρά το γεγονός ότι η μεταφορά γονιδίων από άγριο σε βελτιωμένο γενετικό υλικό αποτελεί ελκυστική προσέγγιση για τη βελτίωση συγκεκριμένων γνωρισμάτων, αυτή δυσχεραίνεται λόγω ταξινομικών εμποδίων. Στη φακή, το μοναδικό άγριο είδος που μπορεί να διασταυρωθεί με τα καλλιεργούμενα είναι το *L. orientalis*, που αποτελεί πρόγονο της φακής (Ladizinsky, 1979; 1984). Με τη χρήση της *in vitro* καλλιέργειας και της μεθόδου των τεχνητών διασταυρώσεων, καθίσταται δυνατή η ενσωμάτωση γονιδίων ανθεκτικότητας μέσω της αναδιασταύρωσης. Είναι βέβαια

γνωστό ότι η αξιοποίηση γονιδίων από άγριο γενετικό υλικό συχνά ενέχει τον κίνδυνο ταυτόχρονης μεταφοράς ανεπιθύμητων γνωρισμάτων λόγω γενετικής σύνδεσης με το υπό ενσωμάτωση γονίδιο. Για ο λόγο αυτό, στόχο αποτελεί η εξάλειψη των ανεπιθύμητων γονιδίων που όμως είναι πρακτικά αδύνατη σε περιπτώσεις πολύ στενής γενετικής σύνδεσης. Εναλλακτικά, όταν εξαντλούνται οι υπάρχουσες πηγές ανθεκτικότητας ή δεν μπορούν να αξιοποιηθούν άλλες λόγω στενής σύνδεσης, πρωτεύον ρόλο αποκτούν οι βιοτεχνολογικές προσεγγίσεις όπου δεν υπάρχουν ταξινομικά εμπόδια και θεωρητικά τουλάχιστον αποτελούν ανεξάντλητη πηγή νέων γονιδίων. Επίσης, σε ορισμένα είδη αξιοποιείται επιτυχώς η σωματοκλωνική παραλλακτικότητα που όμως προϋποθέτει την ανάλυση μεγάλου αριθμού φυτών και φυσικά τη δυνατότητα πολύ ακριβούς φαινοτύπισης.

Χρησιμοποιώντας την ανάλυση του μαζικού διαχωρισμού οι Ford et al. (1997), αναγνώρισαν 7 RAPD δείκτες συνδεδεμένους με το γενετικό τόπο ανθεκτικότητας στην ασκοχύτωση, στην ποικιλία 'ILL 5588'. Πέντε από τους 7 RAPD δείκτες χαρτογραφήθηκαν σε απόσταση 30 cM από τη θέση της ανθεκτικότητας, ενώ οι πιο στενά συνορεύοντες δείκτες απείχαν 6 cM και 14 cM από τη θέση αυτή. Οι συσχετίσεις όμως μεταξύ της ανθεκτικότητας στην ασκοχύτωση και άλλων αγρονομικών χαρακτηριστικών δεν έχει ακόμη επακριβώς προσδιοριστεί. Πρόσθετες έρευνες παρέχουν ενδείξεις ότι το γονίδιο που ελέγχει την ανθεκτικότητα στην ασκοχύτωση στις ποικιλίες ILL 5588 και W63241 επιδρά αρνητικά σε άλλα αγρονομικά γνωρίσματα όπως πχ η απόδοση (Ye et al., 2000).

Ένα άλλο πρόγραμμα βελτίωσης για την ανθεκτικότητα στον μύκητα *Ascochyta fabae f.sp.lentis* πραγματοποιήθηκε με συνεργασία του ICARDA με το Πακιστάν, που πλήττεται από τη συγκεκριμένη ασθένεια. Συγκεκριμένα, η ποικιλία φακής "Manserha 89" απελευθερώθηκε στο Πακιστάν και χαρακτηρίζεται από ταυτόχρονη ανθεκτικότητα σε ασκοχύτωση και φουζαρίωση.

Μία άλλη ανάλυση ποσοτικών γνωρισμάτων για την ανθεκτικότητα στην ασκοχύτωση της φακής οδήγησε στην κατασκευή γενετικών χαρτών μέσω της χρήσης από δύο F₂ πληθυσμών, τους ILL5588/ILL7537 και ILL7537/ILL6002 (Taylor et al., 2007). Η μελέτη οδήγησε στην ταυτοποίηση πέντε QTL μέσω της σύνθετης ενδιάμεσης χαρτογράφησης που αφορούν την ανθεκτικότητα στην ασκοχύτωση, διαμέσου τεσσάρων ομάδων σύνδεσης στον πληθυσμό ILL5588/ILL7537, ενώ με την ίδια μέθοδο ταυτοποιήθηκαν τρία QTL στον πληθυσμό ILL7537/ILL6002. Η σύγκριση των δύο πληθυσμών έδειξε ένα πιθανώς

όμοιο QTL καθώς και πολλές κοινές περιοχές που περιείχαν δείκτες στενά συνδεδεμένους με την ανθεκτικότητα. Τα ευρήματα αυτά συνέβαλαν στην ταυτοποίηση των δεικτών που παρουσιάζουν στενή σύνδεση με το κύριο QTL και συνεπώς καταδεικνύουν τη δυνατότητα μεταφοράς των QTLs στους πληθυσμούς αυτούς μέσω της υποβοηθούμενης από δείκτες επιλογής για την ανθεκτικότητα στην ασκοχύτωση.

Λαμβάνοντας υπόψη δεδομένα που αφορούν τη βελτίωση της ανθεκτικότητας σε άλλα είδη οσπρίων, η επιλογή για την ανθεκτικότητα απέναντι στο μύκητα που προκαλεί την ασκοχύτωση μπορεί να έχει αντίθετα αποτελέσματα όπως:

- 1) αύξηση των αντιθρεπτικών παραγόντων, που είναι ανεπιθύμητη τόσο για την ανθρώπινη αλλά όσο και για τη ζωική κατανάλωση (Helsper, 1998),
- 2) πιθανή μείωση της ευπεψίας (Helsper, 1998),
- 3) καθυστέρηση της ωρίμανσης (Singh et al., 1993; Porta-Puglia et al., 1994).

Αντίθετα, η ανθεκτικότητα στη σκωρίαση βρέθηκε ότι αποτελεί μονογονιδιακό γνώρισμα (Sinha and Yadav, 1989; Singh and Singh, 1990) και συνεπώς καθίσταται δυνατή η ενσωμάτωσή του σε ευαίσθητες στην ασθένεια ποικιλίες φακής. Το ICARDA σε συνεργασία με τα εθνικά προγράμματα της Αιθιοπίας, του Μαρόκου και του Πακιστάν βελτιώνει την ανθεκτικότητα στη σκωρίαση με σκοπό την διοχέτευση ανθεκτικών ποικιλιών σε καλλιεργούμενες περιοχές που πλήττονται από την ασθένεια.

Φουζαρίωση

Όπως έχει προαναφερθεί, η περισσότερο επιζήμια ασθένεια της φακής είναι η φουζαρίωση που προκαλείται από τον μύκητα *Fusarium oxysporum f. sp. lentis*. Δεδομένου ότι η ασθένεια επιφέρει σημαντικότερες οικονομικές απώλειες που θέτουν σε κίνδυνο τη βιωσιμότητα της καλλιέργειας, οι βελτιωτές αναζητούν συνεχώς αποτελεσματικούς τρόπους καταπολέμησης. Μέχρι σήμερα, έχουν βρεθεί πέντε γονίδια τα οποία φαίνεται ότι ελέγχουν το γνώρισμα της ανθεκτικότητας στη φουζαρίωση (Kamboj et al., 1990).

Στο ICARDA, έχουν ξεκινήσει αρκετά προγράμματα βελτίωσης της ανθεκτικότητας έναντι της φουζαρίωσης ενώ παράλληλα, γίνονται προσπάθειες για τη σύνδεση της ανθεκτικότητας με ισοένζυμα και μοριακούς δείκτες τύπου RFLP. Η

ανθεκτικότητα του μπιζελιού στη φουζαρίωση ελέγχεται από ένα γενετικό τόπο στενά συνδεδεμένο με το *Est-js* (Hunt and Barnes, 1982). Παρατηρώντας λοιπόν το εύρος των συντηρημένων συνδετικών ομάδων ανάμεσα στο μπιζέλι και στη φακή γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι αυτή η πιθανή σύνδεση στη φακή είναι αναγκαίο να εξιχνιαστεί. Επίσης, ανθεκτικότητα στη φουζαρίωση έχει ανιχνευθεί στα υποείδη *orientalis*, *nigricans* και *ervoides* (Bayaa et al., 1997).

Στοχεύοντας στην ανάπτυξη ανθεκτικών στο *Fusarium oxysporum f.sp. lentis* ποικιλιών φακής, οι Kamboj et al. (1990) διασταύρωσαν τρεις ανθεκτικούς γονότυπους (Pant L 234, JL 446 και LP 286) με δύο ευαίσθητους γονότυπους. Τα υβρίδια των 8 διασταυρώσεων που αξιολογήθηκαν ήταν όλα ανθεκτικά στην ασθένεια. Η μελέτη των διασπώμενων πληθυσμών F_2 , BC(P), BC(P_2) και F_3 για την ανθεκτικότητα στη φουζαρίωση, τόσο στον αγρό όσο και στο θερμοκήπιο, έδειξε ότι η ανθεκτικότητα στη φουζαρίωση ελέγχεται από δύο κυρίαρχα γονίδια, που έχουν προκύψει από διπλοποίηση, στην ποικιλία Pant L 234 και δύο ανεξάρτητα κυρίαρχα γονίδια, που παρουσιάζουν συμπληρωματική δράση, JL 446 and LP 286. Ένα τρίτο κυρίαρχο γονίδιο συμπληρωματικό με τα κυρίαρχα γονίδια των ποικιλιών JL 446 και LP 286 παρουσιάζεται και στις δύο ευαίσθητες σειρές. Παράλληλα, οι διαλληλικές δοκιμές υποδεικνύουν την παρουσία πέντε ανεξάρτητων γονιδίων ανθεκτικότητας.

Οι Eujayl et al. (1998a), ερεύνησαν την κληρονόμηση της ανθεκτικότητας στη φουζαρίωση αξιοποιώντας μία διασταύρωση ανάμεσα στην ανθεκτική ποικιλία φακής ILL5588 και στην ευαίσθητη L692-16-1. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις γενεές προκειμένου να μελετηθεί η κληρονομικότητα και να ταυτοποιηθεί η τοποθεσία τόσο του γονιδίου *Fw* όσο και των DNA δεικτών που είναι συνδεδεμένοι με αυτό. Η ανθεκτικότητα στους πληθυσμούς που μελετήθηκαν, καθορίστηκε από ένα μοναδικό κυρίαρχο γονίδιο. Η θέση του *Fw* ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά μέσω της σύνδεσης του δείκτη RAPD-OPK-15₉₀₀ στα 10.8 cM. Δύο άλλοι RAPD δείκτες, ο OP-B17₈₀₀ και ο OP-D15₉₀₀, αναγνωρίστηκαν με τη μέθοδο του μαζικού διαχωρισμού ως συνδεδεμένοι με το γνώρισμα της ανθεκτικότητας.

Οι Eujal et. al., (1998), απομόνωσαν 36 μορφές του *Fusarium oxysporum f.sp. lentis*, που είχαν συλλεχθεί από διαφορετικά φυτά φακής σε διάφορες περιοχές της Αλγερίας. Τα ευρήματα έδειξαν ότι όλες οι απομονώσεις του συγκεκριμένου μύκητα αντιπροσωπεύουν μία μονή φυλή αλλά διαφέρουν ως προς την επιθετικότητα στις ευαίσθητες σειρές. Τα δείγματα που αναλύθηκαν παρουσίασαν έντονο πολυμορφισμό, ενώ ο συνολικός αριθμός πολυμορφικών ζωνών ήταν 8 για τους

RAPD δείκτες και 93 για τους AFLP. Τα αποτελέσματα της μελέτης υποδεικνύουν ότι οι απομονώσεις του παθογόνου ταξινομούνται σε δύο γενετικούς υποπληθυσμούς. Παράλληλα, τα δεδομένα παρέχουν ενδείξεις ότι οι μορφές του μύκητα προέρχονται από δύο γενετικά ξεχωριστούς κλώνους. Παρόμοια ευρήματα είχαν προηγηθεί και από τους Nelson et al. (1997). Το γεγονός ότι οι διάφορες απομονώσεις του παθογόνου εμφανίζουν περιορισμένη γενετική ποικιλότητα, όπως διαπιστώθηκε αναλύσεις δεικτών τύπου RAPD, αποδόθηκε στη σχετικά γρήγορη εξάπλωση του παθογόνου που συνεπάγεται χαμηλή πίεση επιλογής και συνεπώς, χαμηλό ρυθμό μεταλλαγών.

1.9.4 Γενετικοί χάρτες σύνδεσης στη φακή

Οι γενετικοί χάρτες αποτελούν χρήσιμο εργαλείο για τη βασική γενετική έρευνα και τη βελτίωση των φυτών (Duran et al., 2004). Γενικά, η κατασκευή γενετικών χαρτών προϋποθέτει την επιλογή κατάλληλων γονέων για τη δημιουργία διασπώμενων ως προς συγκεκριμένο(α) γνώρισμα(τα) πληθυσμών. Συγκεκριμένα, καταλληλότεροι είναι οι ομοζύγωτοι για τα γονίδια ενδιαφέροντος γονείς που όμως διαφέρουν γενετικά μεταξύ τους (Muehlbauer et al., 2006). Επίσης, η αξιοποίηση καλλιεργούμενου φυτικού υλικού για διασταυρώσεις γενικά θεωρείται προτιμότερη καθώς επιτρέπουν την ταυτοποίηση πολυμορφισμών εντός του καλλιεργούμενου γονιδιακού αποθέματος. Με τον τρόπο αυτό ελαχιστοποιούνται οι πιθανότητες συνδιαχωρισμού με ανεπιθύμητα γνωρίσματα, ως αποτέλεσμα συνδετικής έλξης που συχνά παρουσιάζεται σε διασταυρώσεις με άγρια είδη. Οι γενετικοί χάρτες ακόμα που προέρχονται από ενδοειδικές διασταυρώσεις συνιστώνται για χαρτογράφηση ποιοτικών χαρακτηριστικών λόγω της μικρότερης αλλοίωσης των αναλογιών διαχωρισμού (Rubeena et al., 2003). Η χαρτογράφηση απαιτεί τη μελέτη μεγάλων πληθυσμών ανασυνδυασμένων καθαρών σειρών. Τέτοιοι πληθυσμοί επιτρέπουν την ταυτοποίηση δεικτών που συνδέονται με χαρακτηριστικά που πιθανώς ποικίλουν μεταξύ των διαφόρων περιβαλλόντων και σταδίων ανάπτυξης του φυτού. (Muehlbauer et al., 2006).

Γενικότερα, η χρήση των γενετικών δεικτών στη δημιουργία των γενετικών χαρτών έχει αυξηθεί δραματικά τα τελευταία είκοσι χρόνια. Η γενετική έρευνα της φακής ήταν περιορισμένη σε παγκόσμιο επίπεδο λόγω του ότι η φακή καλλιεργείται σε μικρή έκταση. Με την έλευση των δεικτών που βασίζονται σε PCR, ο αριθμός των

χαρτογραφηθέντων δεικτών σε ολόκληρο το γονιδίωμα *Lens* έχει αυξηθεί. Ο πρώτος εκτενής χάρτης περιελάμβανε 177 τυχαία ενισχυμένου πολυμορφικού DNA (RAPD), (AFLP), (RFLP) και μορφολογικούς δείκτες και βασίστηκε στην αξιοποίηση RILs πληθυσμών από διασταύρωση μεταξύ καλλιεργούμενων ποικιλιών *L. ssp. culinaris culinaris* και *L. culinaris ssp. orientalis* (Eujayl et al., 1998a). Ο κύριος λόγος χρησιμοποίησης γονέων με μακρινή συγγενική σχέση αποτελεί ο περιορισμένος πολυμορφισμός λόγω της μειωμένης δεξαμενής γονιδίων στη φακή (Ford et al. 1997).

Προκειμένου να προσδιοριστούν περιοχές του γονιδιώματος που συνδέονται με γνωρίσματα ενδιαφέροντος κατασκευάστηκαν οι αρχικοί γενετικοί χάρτες του γένους *Lens* στηριζόμενοι σε μορφολογικούς και ισοενζυμικούς δείκτες (Zamir and Ladizinsky, 1984; Tadmor et al., 1987). Στην καλλιεργούμενη φακή, οι RFLP δείκτες, αν και ήταν οι πρώτοι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή γενετικού χάρτη σύνδεσης, έχουν αναδείξει χαμηλά επίπεδα γενετικής ποικιλομορφίας (Havey and Muehlbauer, 1989). Μεταγενέστεροι χάρτες βασίστηκαν σε γενετικό υλικό που προέκυψε από διειδικές και ενδοειδικές διασταυρώσεις (Weeden et al., 1992; Tahir et al., 1993; Tahir and Muehlbauer, 1994; Vaillancourt and Slinkard, 1993).

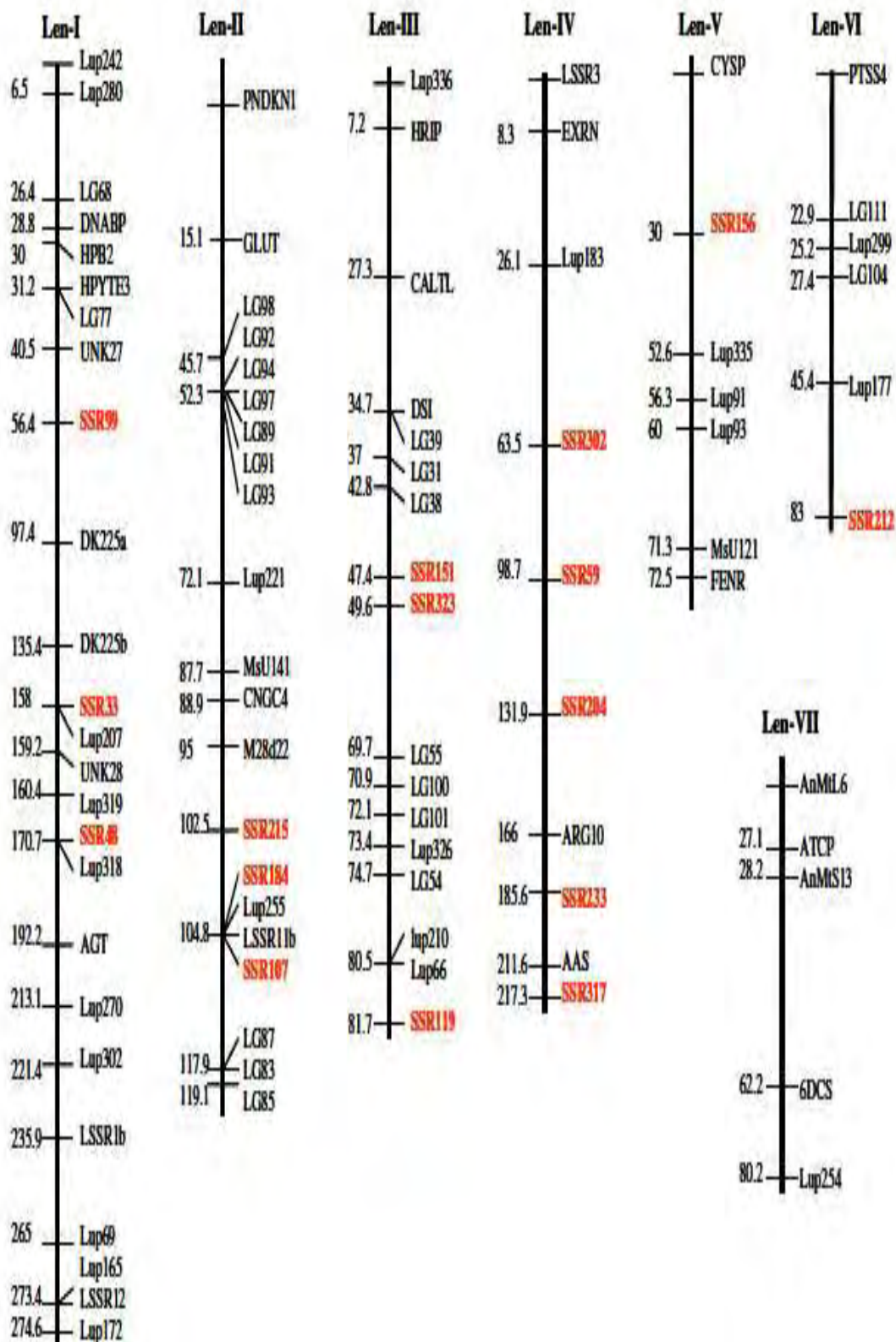
Ο πρώτος χάρτης σύνδεσης της φακής που βασίστηκαν σε προερχόμενο από ενδοειδικές διασταυρώσεις γενετικό υλικό δημιουργήθηκε από τους Rubeena et al. (2003) και περιελάμβανε 114 RAPD, ISSR και RGA δείκτες. Έρευνες που ακολούθησαν οδήγησαν στην κατασκευή τριών γενετικών χαρτών. Συγκεκριμένα, ο πρώτος εξ αυτών κατασκευάστηκε με τη χρήση ενός F₂ πληθυσμού που προέκυψε από διασταύρωση μεταξύ μιας ανθεκτικής (ILL7537) και μιας ευαίσθητης (ILL6002) στην ασκοχύτωση ποικιλίας. Ο χάρτης περιελάμβανε 72 δείκτες (38 RAPD, 30 AFLP, 3 ISSR και έναν μορφολογικό) (Rubeena et al. 2006). Οι υπόλοιποι δύο χάρτες αφορούσαν σε γενετικό υλικό που προέκυψε από ενδοειδική διασταύρωση με τη χρήση 114 δεικτών που κάλυπταν 784,1 cM και σε διειδικό πληθυσμό με τη χρήση 200 μοριακών και ενός μορφολογικού δείκτη που κάλυπταν 2172,4 cM και μέση απόσταση μεταξύ των δεικτών 15,87 cM (Duran et al, 2004). Γενικότερα, το εκτιμώμενο γονιδίωμα της φακής κυμαίνεται μεταξύ 751-2172 cM (Muehlbauer et al., 2006). Επίσης, αναφορικά με την ασθένεια που προκαλείται από το *Fusarium oxysporum*, κατασκευάστηκε γενετικός χάρτης με τη χρήση SSR και AFLP δεικτών που περιελάμβανε 283 δείκτες και κάλυπτε 751 cM με μέση απόσταση δείκτη 2,6 cM (Hamwieth κ.ά. 2005). Ενδοειδικός χάρτης ακόμα έγινε από τον Tullu και τους

συνεργάτες του (2008) με τη χρήση 207 δεικτών (AFLP, RAPD και SSR) και κάλυπτε 1868 cM, με μέση πυκνότητα δείκτη 8,9 cM.

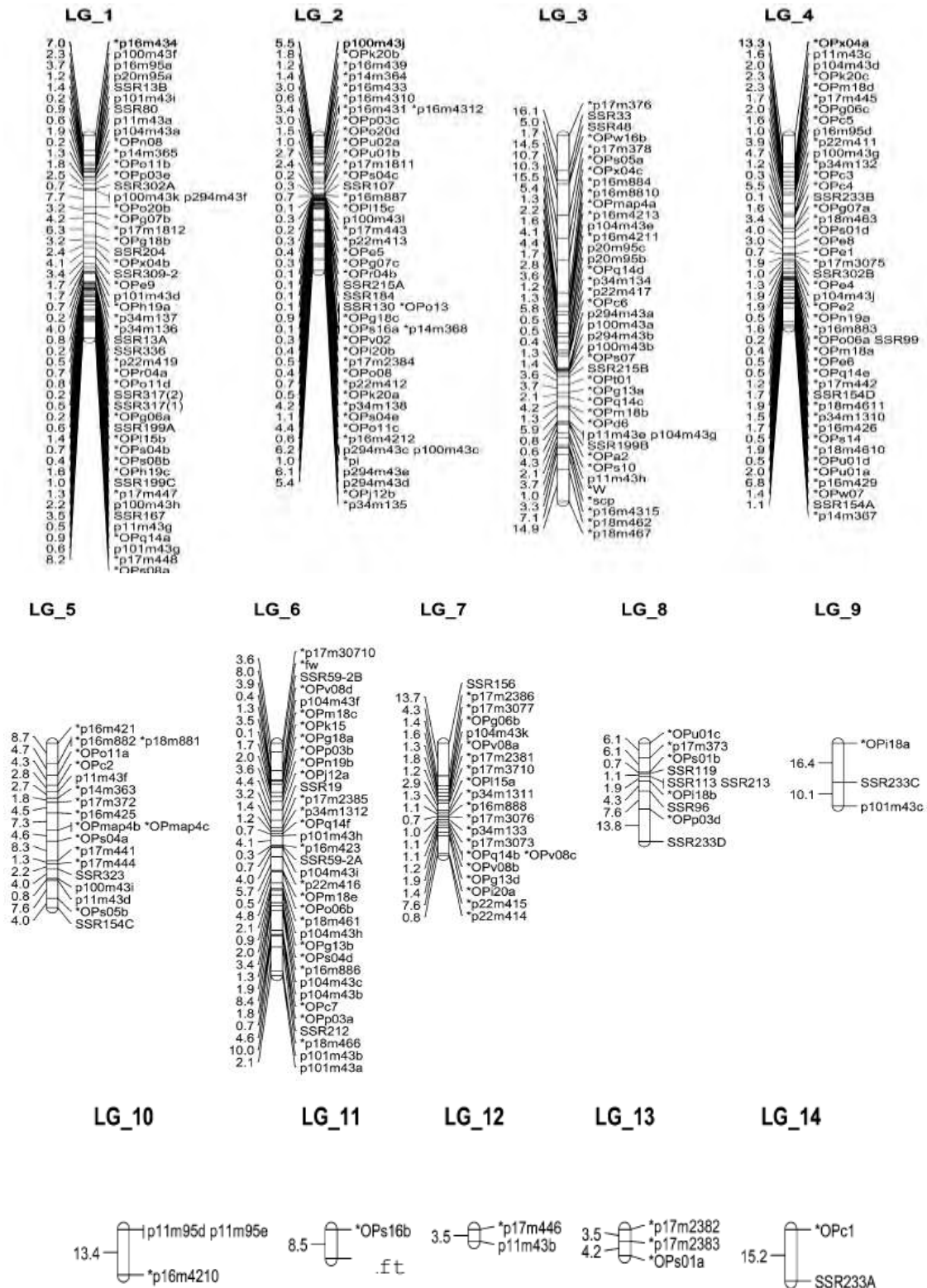
Μία σπουδαία χρήση των παραπάνω χαρτών αποτελεί η επιλογή με βάση τους μοριακούς δείκτες στη βελτίωση των φυτών. Επίσης, μέσω των γενετικών χαρτών είναι δυνατή η άντληση πληροφοριών για τη συγκριτική απεικόνιση των ειδών, μέσω της οποίας είναι εφικτή η ταυτοποίηση ομόλογων συνδετικών ομάδων σε διαφορετικά είδη. Κατ' αυτόν τον τρόπο ομάδες σύνδεσης που είχαν ταυτοποιηθεί πρωτίστως στο μπιζέλι βρέθηκαν να είναι πανομοιότυπες στη φακή (Weeden και Marx, 1987; Muehlbauer et al., 1989). Αντίστοιχη ομολογία έχει επίσης αναφερθεί για άλλα είδη, όπως η μηδική και η φακή χρησιμοποιώντας 18 SSR και 79 ITAP δείκτες όπως (Huyen et al., 2007) (Εικ. 8).

Η πιο πρόσφατη έρευνα που αφορούσε στη χαρτογράφηση της φακής πραγματοποιήθηκε από τους Gupta et al., (2012). Σε αυτή τη μελέτη βρέθηκε ότι, οι RAPD, ISSR και SSR δείκτες είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την κατασκευή γενετικού χάρτη σύνδεσης της φακής. Η έρευνα αυτή προσθέτει στον ήδη προϋπάρχοντα χάρτη (Hamwich et.al., 2005) 11 νέους SSRs στο χάρτη σύνδεσης (Εικ. 9). Ο F₂ πληθυσμός που δημιουργήθηκε για την κατασκευή του χάρτη σύνδεσης παρουσίασε επαρκή πολυμορφισμό για τους υπό μελέτη DNA δείκτες.

Η ύπαρξη πληθώρας γενετικών χαρτών στη φακή, παρέχει τη δυνατότητα αξιοποίησης των σχετικών F₂ και RIL χαρτών για την κατασκευή ενός κορεσμένου χάρτη σύνδεσης που θα αποτελέσει τη βάση για τον εντοπισμό και χαρτογράφηση QTL γενετικών τόπων για σημαντικά αγρονομικά γνωρίσματα. Ωστόσο, υπάρχει απόλυτη ανάγκη να αναπτυχθούν και να χαρτογραφηθούν πιο λειτουργικοί δείκτες όπως οι EST-SSRs και SNPs, με σκοπό την ενίσχυση του ολοκληρωτικού γενετικού χάρτη της φακής.



Εικόνα 8. Γενετική απεικόνιση των 7 πρώτων χρωμοσωμάτων της φακής σύμφωνα με τους Huyen et al. (2007)



Εικόνα 9. Γενετικός χάρτης σύνδεσης στο γένος *Lens spp.*, όπου δείχνει τη θέση των δεικτών SSR, AFLP, RAPD (Hamwieh et al., 2005)

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπό της εργασίας αποτέλεσε η αξιολόγηση και επιλογή εντός του τοπικού πληθυσμού φακής "Εγκλουβή" για ανθεκτικότητα στο μύκητα εδάφους *Fusarium oxysporum f.sp. lentis*, μετά από συγκριτική εφαρμογή της κυψελωτής μεθοδολογίας σε δύο διαφορετικές πυκνότητες σποράς καθώς και ο απογονικός έλεγχος των επιλογών. Απώτεροι στόχοι των πειραμάτων ήταν :

(I) ο εντοπισμός της καταλληλότερης απόστασης μεταξύ των αξιολογούμενων φυτών που επιτρέπει την πρόιμη έκφραση της προσβολής καθώς και

(II) ο γενετικός έλεγχος των αξιολογούμενων φυτών φακής μέσω μοριακών δεικτών τύπου SSR στενά συνδεδεμένων με την ανθεκτικότητα στο *Fusarium oxysporum* ώστε η χρήση τους να αποτελέσει βοηθητικό εργαλείο στην τελική διαδικασία επιλογής.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Γενετικό υλικό αποτέλεσε ο παραδοσιακός πληθυσμός Εγκλουβής Λευκάδας (Εικ. 10). Πρόκειται για ένα παραδοσιακό πληθυσμό που καλλιεργείται εδώ και 800 χρόνια στο χωριό Εγκλουβή καθώς και στην ευρύτερη περιοχή της Λευκάδας. Η φακή Εγκλουβής έχει αποδεδειγμένα μεγάλη θρεπτική αξία καθώς αποτελεί πλούσια πηγή υδατανθράκων, φυτικών πρωτεϊνών, φυτικών ινών, βιταμινών, μετάλλων, ιχνοστοιχείων, ασβεστίου και σιδήρου. (Urbano et al., 2007)

Η φακή Εγκλουβής πλεονεκτεί σε σχέση με άλλα όσπρια λόγω της υπέρτερης γεύσης της καθώς και του ελάχιστου χρόνου μαγειρέματος. Για τη μοναδικότητα της η φακή Εγκλουβής έχει διακριθεί παγκοσμίως. Ο σπόρος της Φακής Εγκλουβής είναι χαρακτηριστικά μικρός, ανομοιόμορφος και έχει διάφορα χρώματα από σκούρο καφέ έως ανοιχτό κίτρινο και από μαύρο έως ανοιχτόχρωμο με σκούρες κηλίδες. Τα χαρακτηριστικά αυτά την ξεχωρίζουν από τις υπόλοιπες ποικιλίες φακής.



Εικόνα 10. Α. Λοφίσκος φακής. Β. και Γ. Σωρός φακής. Διακρίνεται το κίτρινοπράσινο έως ελαφρώς καφέ χρώμα του καρπού.

Αποτελεί σπάνιο γενετικό υλικό και δείγμα της φυλάσσεται στον ΟΗΕ και στη Συρία στο διεθνές κέντρο έρευνας για ξηρές περιοχές με κωδικό ILL 293. Το οροπέδιο της Εγκλουβής περιλαμβάνεται στον κατάλογο του FAO (Οργανισμός τροφίμων και Γεωργίας του ΟΗΕ). Σήμερα, το ενδιαφέρον έχει στραφεί στην

κατοχύρωση της φακής Εγκλουβής ως προϊόν προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης (Π.Ο.Π.). Η ζήτηση του συγκεκριμένου προϊόντος είναι ιδιαίτερα αυξημένη, με αποτέλεσμα παραγωγή να προπωλείται πριν ακόμα γίνει η συγκομιδή.

2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΓΡΟΥ

2.1.1. Πειράματα αξιολόγησης του παραγωγικού δυναμικού

Ο πειραματισμός διεξήχθη στο αγρόκτημα του Ινστιτούτου Κτηνοτροφικών Φυτών και Βοσκών στην περιοχή της Λάρισας (Γεωγραφικό Πλάτος: 39°36', Γεωγραφικό Μήκος: 22°25') κατά την διάρκεια των καλλιεργητικών περιόδων 2011-2012 και 2012-2013, σύμφωνα με την κυψελωτή διάταξη NR-0 (για το πρώτο έτος πειραματισμού) και NR-31 (για το δεύτερο έτος πειραματισμού) (Fasoulas, 1977; Fasoulas και Fasoula, 1995). Τα δεδομένα των εδαφολογικών αναλύσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Η κατεργασία του εδάφους περιελάμβανε όργωμα και εφαρμογή δισκοσβάρνας και για τις δύο καλλιεργητικές περιόδους.

Πίνακας 2. Ανάλυση Εδάφους του Ινστιτούτου Κτηνοτροφικών Φυτών και Βοσκών στην περιοχή της Λάρισας.

Άμμος (%)	Ιλύς (%)	Άργιλος (%)	ΟΜ (mg/kg)	NO ₃ ⁻ (mg/kg)	P* (mg/kg)	K (mg/kg)
36	22	42	15	31	10	1,1

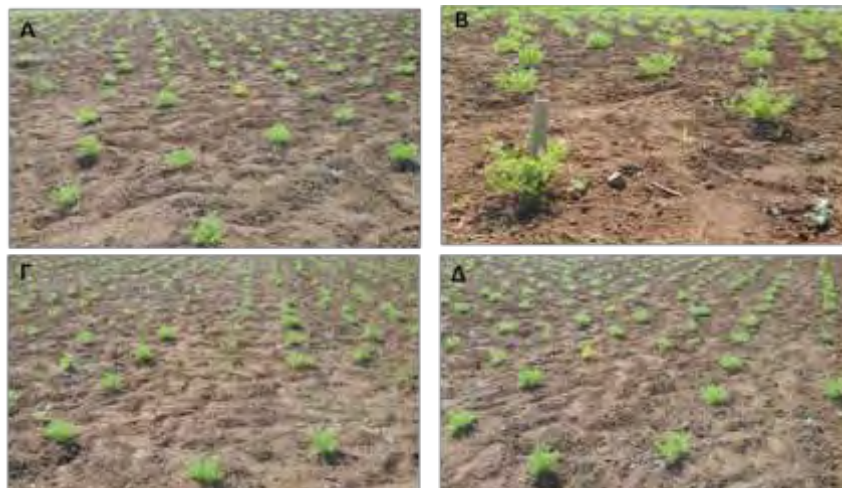
*Κατά Olsen

Πιο αναλυτικά, κατά την πρώτη καλλιεργητική περίοδο εγκαταστάθηκαν 2 πειραματικά τεμάχια σύμφωνα με το σχέδιο της κυψελωτής μεθοδολογίας NR-0 με 25 σειρές των 40 φυτών ανά πειραματικό σχέδιο. Στο πρώτο πειραματικό τεμάχιο, οι αποστάσεις μεταξύ των φυτών ήταν 80 cm, ενώ στο δεύτερο 50 cm. Στο πειραματικό σχέδιο των 80 cm (Εικ. 11), ο αριθμός των φυτών ήταν 1000 φυτά και η έκταση η οποία καταλάμβαναν ήταν περίπου 554 m², που αντιστοιχεί σε πυκνότητα σποράς 1,8 φυτά ανά τμ, ενώ στο σχέδιο των 50 cm (Εικ. 12) ο αριθμός των φυτών παρέμεινε ο ίδιος αλλά η έκταση περιορίστηκε στα 217 m², που αντιστοιχεί σε πυκνότητα σποράς 4,6 φυτά / m².



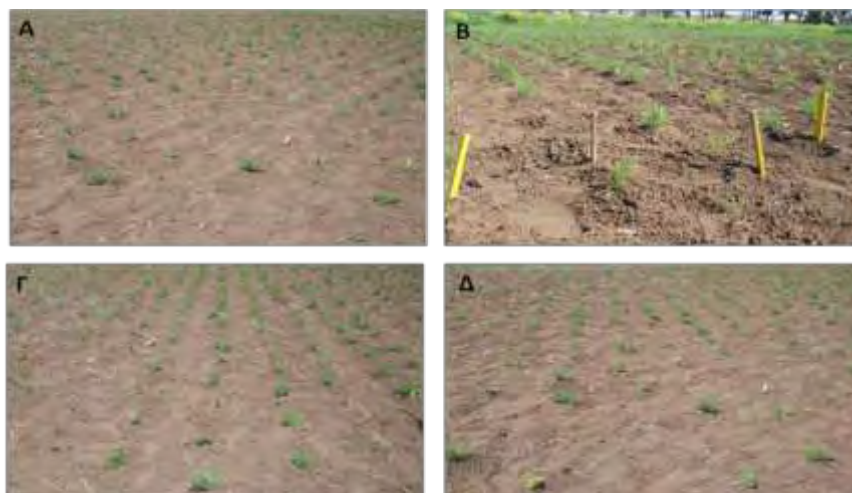
Διάγραμμα 1. Δεδομένα βροχόπτωσης και θερμοκρασίας για το πρώτο έτος πειραματισμού.

Κατά τη διάρκεια της σποράς, η οποία πραγματοποιήθηκε στις 15 Νοεμβρίου του 2011, έγινε τοποθέτηση 2-3 σπόρων κατά θέση και, 15 ημέρες μετά το φύτευμα των σπόρων, ακολούθησε αραίωμα ώστε να διασφαλιστεί η παρουσία ενός φυτού ανά θέση. Η καλλιεργητική περίοδος χαρακτηρίστηκε από φυσιολογικές για την περίοδο θερμοκρασίες. Η βροχόπτωση ήταν ικανοποιητική στο στάδιο της βλαστικής περιόδου, ενώ ήταν υπερβολική κατά το στάδιο γεμίσματος του λοβού που λαμβάνει χώρα κατά το μήνα Μάιο (Διάγραμμα 1). Σε όλη τη διάρκεια ανάπτυξης των φυτών, έγιναν καλλιεργητικές φροντίδες που απαιτούνται για την απρόσκοπτη ανάπτυξη των φυτών και τη μεγιστοποίηση της απόδοσης. Για την καταπολέμηση των ζιζανίων, πραγματοποιήθηκαν συνολικά 7 σκαλίσματα ενώ δεν υπήρξε καμία εφαρμογή ζιζανιοκτόνων ή άλλων χημικών ουσιών. Επίσης, δεν πραγματοποιήθηκαν ποτίσματα.



Εικόνα 11. Πειραματικό σχέδιο κυψελωτής διάταξης για το πείραμα των 80 cm

Με το τρόπο αυτό, διασφαλίσθηκε ένα σύστημα μειωμένων εισροών καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου.



Εικόνα 12 . Πειραματικό σχέδιο κυψελωτής διάταξης για το πείραμα των 50 cm

Αμέσως μετά το αραίωμα και ανά 2 περίπου εβδομάδες, λαμβάνονταν παρατηρήσεις που αφορούσαν στη φαινοτυπική κατάσταση των φυτών. Συγκεκριμένα, καταγραφόταν η ημερομηνία εμφάνισης συμπτωμάτων καχεξίας, μεταχρωματισμού, ημιπληγίας, όπου αυτά εμφανιζόταν, καθώς και παρατηρήσεις που σχετιζόνταν με τη μη φυσιολογική φαινοτυπική εμφάνιση, ως αποτέλεσμα παρεμπόδισης της φυσιολογικής ανάπτυξης των φυτών (Εικ. 13). Επίσης, σημειωνόταν η ημερομηνία ξήρανσης του κάθε ατομικού φυτού ξεχωριστά καθώς και ο αντίστοιχος αριθμός των κενών θέσεων, λόγω αδυναμίας φυτρώματος υπό συνθήκες ασθένειας. Οι ημερομηνίες που λήφθηκαν παρατηρήσεις είναι οι ακόλουθες:

1^η παρατήρηση: 24/03/2012

2^η παρατήρηση: 11/04/2012

3^η: παρατήρηση: 04/05/2012

4^η :παρατήρηση: 11/05/2012

5^η :παρατήρηση: 22/05/2012.



Εικόνα 13. Φυτά με πιθανά συμπτώματα φουζαρίωσης που καταγράφηκαν στον αγρό.

Λόγω της ανομοιόμορφης ωρίμανσης των φυτών, η συγκομιδή πραγματοποιήθηκε σε 4 χέρια κατά τις ακόλουθες ημερομηνίες:

1^η συγκομιδή: 12/06/2012

2^η συγκομιδή: 20/06/2012

3^η συγκομιδή: 27/06/2012

4^η συγκομιδή: 04/07/2012.

Κάθε φυτό συγκομίστηκε χωριστά και τοποθετήθηκε μέσα σε χάρτινες σακούλες στις οποίες αναγραφόταν ο κωδικός του φυτού για κάθε πειραματικό σχέδιο (π.χ κωδικός 25-30 A: 25^ο φυτό της 30^{ης} σειράς του πειραματικού τεμαχίου των 80 cm) / κωδικός 3-19 B: 3^ο φυτό της 19^{ης} σειράς του πειραματικού τεμαχίου των 50 cm).

Ακολούθησε αλώνισμα κάθε φυτού χωριστά μέσω αλωνιστικής μηχανής και τοποθέτηση των σπόρων σε κλίβανο με σκοπό την καταπολέμηση του βρούχου (*Bruchus lentis*). Τέλος, πραγματοποιήθηκε ζύγισμα κάθε φυτού χωριστά και καταγραφή του βάρους των σπόρων σε γραμμάρια.

Υπολογίστηκε ο αριθμός των φυτών που συγκομίστηκαν (n), η μέση απόδοση σε σπόρο ανά φυτό, η τιμή της τυπικής απόκλισης (s) και ο συντελεστής παραλλακτικότητας (CV). Με κριτήριο αποκλειστικά την απόδοση σε σπόρο, επιλέχθηκαν τα 15 υψηλοαποδοτικότερα φυτά από κάθε πυκνότητα σποράς για τη δημιουργία 30 οικογενειών (κάθε φυτό συνιστά μία οικογένεια), οι οποίες και

τοποθετήθηκαν μαζί με το μάρτυρα (αρχικός πληθυσμός) σε κυβελωτή διάταξη NR-31 την επόμενη καλλιεργητική περίοδο.

Κατά το δεύτερο χρόνο πειραματισμού, η σπορά πραγματοποιήθηκε στις 22-11-2012 με τον ίδιο ακριβώς τρόπο όπως και στην προηγούμενη καλλιεργητική περίοδο. Η χρονιά χαρακτηρίστηκε από φυσιολογικές θερμοκρασίες και αυξημένη βροχόπτωση κατά τους μήνες Μάιο και Ιούνιο και μόνο την περίοδο της ανθοφορίας, περίπου στο δεύτερο δεκαήμερο του Απριλίου, επικράτησαν ξηρικές συνθήκες (Διάγραμμα 2). Με βάση τα αποτελέσματα της πρώτης χρονιάς, διαπιστώθηκε πως η καταλληλότερη πυκνότητα φύτευσης με σκοπό την επιλογή ανθεκτικών φυτών είναι αυτή των 80 cm. Κατ' αυτόν τον τρόπο, δημιουργήθηκαν 40 γραμμές των 70 φυτών. Ακολούθησε σύστημα μειωμένων εισροών σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Κατά αντιστοιχία με τα πειράματα της προηγούμενης χρονιάς, καταγραφόταν παρατηρήσεις που αφορούσαν τη φυσιολογική κατάσταση των φυτών κατά τις ακόλουθες ημερομηνίες:

1^η παρατήρηση: 04-04-2013

2^η παρατήρηση: 19-04-2013

3^η παρατήρηση: 02-05-2013

4^η παρατήρηση: 17-05-2013



Διάγραμμα 2. Δεδομένα βροχόπτωσης και θερμοκρασίας για το δεύτερο έτος πειραματισμού.

Αντιστοίχως, λόγω της ανομοιόμορφης ωρίμανσης των φυτών η συγκομιδή πραγματοποιήθηκε σε 6 χέρια κατά τις ακόλουθες ημερομηνίες:

1^η συγκομιδή: 28-5-2013

2^η συγκομιδή: 31-5-2013

3^η συγκομιδή: 05-6-2013

4^η συγκομιδή: 10-6-2013

5^η συγκομιδή: 13-6-2013

6^η συγκομιδή: 17-6-2013



Εικόνα 14 . Πειραματικό σχέδιο κυψελωτής διάταξης R-31

Κάθε φυτό συγκομίστηκε χωριστά και τοποθετήθηκε μέσα σε χάρτινες σακούλες στις οποίες αναγραφόταν ο κωδικός του φυτού. Ακολούθησε αλώνισμα κάθε φυτού χωριστά, με τη χρήση ειδικής αλωνιστικής μηχανής, στις 12 και 13 Ιουνίου του 2013 και τοποθέτηση των σπόρων σε κλίβανο με σκοπό την καταπολέμηση του βρούχου (*Bruchus lentis*). Τέλος, πραγματοποιήθηκε ζύγισμα κάθε φυτού χωριστά και καταγραφή του βάρους των σπόρων σε γραμμάρια.

2.2.2 Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των κυψελωτών πειραμάτων έγιναν αναλύσεις μέσω του στατιστικού λογισμικού JMPv.7. Η σύγκριση των μέσων όρων των οικογενειών έγινε με το t-κριτήριο ($\alpha=0,05$) για δείγματα ανεξάρτητα μετά από

ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA). Για το δεύτερο έτος πειραματισμού, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση του παραγωγικού δυναμικού στα τρία συστατικά με βάση την κυβελωτή μεθοδολογία (Fasoula and Fasoula, 2000; 2002; Fasoula, 2008; 2009). Τέλος έγινε ανάλυση της συνολικής παραλλακτικότητας σ_p^2 στις συνιστώσες σ_g^2 (γενετική παραλλακτικότητα) και σ_e^2 (περιβαλλοντική παραλλακτικότητα με τη χρήση των εξισώσεων (Steel and Torrie, 1980):

- $\sigma_p^2 = \sigma_g^2 + \sigma_e^2$
- $\sigma_g^2 = \frac{[(\sigma_p^2 + r\sigma_e^2) - (\sigma_e^2)]}{r}$
- σ_e^2 = προσδιορίζεται από το μέσο τετράγωνο σφάλματος

και στη συνέχεια υπολογίστηκε ο συντελεστής κληρονομικότητας υπό την ευρεία έννοια (H^2) (Moreno-Gonzalez and Cubero 1993; Acquaah, 2007).

2.2 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

2.2.1 Συλλογή ιστού - Εξαγωγή DNA

Η συλλογή του φυτικού υλικού έλαβε χώρα όταν τα φυτά απέκτησαν ικανοποιητικό μέγεθος. Κατά τη διάρκεια της πρώτης καλλιεργητικής περιόδου, δείγματα φυτών λήφθηκαν από το χωράφι στις 24-05-2012 και στις 07-06-2012. Με βάση το φαινότυπό τους, τα φυτά χωρίστηκαν σε 3 κατηγορίες: (Πίνακας 3)

- α. πράσινα φυτά (ασυμπτωματικά/ανθεκτικά),
- β. υποκίτρινα φυτά (μέτρια εμφάνιση συμπτωμάτων) και
- γ. κίτρινα φυτά (συμπτωματικά/ευαίσθητα).

Συνολικά, λήφθηκαν δείγματα από 28 φυτά. Επίσης, ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν οι ποικιλίες ILL-590 και ILL-6031 που συνιστούν ανθεκτικό και ευαίσθητο στο φουζάριο εισαγόμενο γενετικό υλικό (ICARDA).

Πίνακας 3. Αριθμός, κωδικός και φαινοτυπική κατάσταση φυτών από τα οποία έγινε η απομόνωση DNA.

Αριθμός φυτού	Κωδικός φυτού	Ύψος φυτού	Φαινοτυπική Κατάσταση φυτού
Δείγμα 1	13-12	50 cm	ΥΠΟΚΙΤΡΙΝΟ
Δείγμα 2	25-19	80 cm	ΚΙΤΡΙΝΟ
Δείγμα 3	15-7	80 cm	ΥΠΟΚΙΤΡΙΝΟ
Δείγμα 4	9-5	80 cm	ΚΙΤΡΙΝΟ
Δείγμα 5	11-20	80 cm	ΚΙΤΡΙΝΟ
Δείγμα 6	6-26	50 cm	ΚΙΤΡΙΝΟ
Δείγμα 7	3-14	80 cm	ΚΙΤΡΙΝΟ
Δείγμα 8	8-4	80 cm	ΚΙΤΡΙΝΟ
Δείγμα 9	8-13	80 cm	ΚΙΤΡΙΝΟ
Δείγμα 10	4-32	50 cm	ΥΠΟΚΙΤΡΙΝΟ
Δείγμα 11	5-35	80 cm	ΥΠΟΚΙΤΡΙΝΟ
Δείγμα 12	21-8	80 cm	ΥΠΟΚΙΤΡΙΝΟ
Δείγμα 13	16-2	50 cm	ΥΠΟΚΙΤΡΙΝΟ
Δείγμα 14	19-5	50 cm	ΥΠΟΚΙΤΡΙΝΟ
Δείγμα 15	5-1	50 cm	ΥΠΟΚΙΤΡΙΝΟ
Δείγμα 16	14-10	50 cm	ΠΡΑΣΙΝΟ
Δείγμα 17	17-8	80 cm	ΠΡΑΣΙΝΟ
Δείγμα 18	7-19	50 cm	ΠΡΑΣΙΝΟ
Δείγμα 19	4-14	50 cm	ΠΡΑΣΙΝΟ
Δείγμα 20	23-4	80 cm	ΠΡΑΣΙΝΟ
Δείγμα 21	17-24	50 cm	ΠΡΑΣΙΝΟ
Δείγμα 22	7-19	80 cm	ΠΡΑΣΙΝΟ
Δείγμα 23	11-12	50 cm	ΠΡΑΣΙΝΟ
Δείγμα 24	6-10	80 cm	ΠΡΑΣΙΝΟ
Δείγμα 25	18-15	80 cm	ΠΡΑΣΙΝΟ
Δείγμα 26	18-7	80 cm	ΠΡΑΣΙΝΟ
Δείγμα 27	ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ		ILL-590
Δείγμα 28	ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ		ILL-6031

Για την εξαγωγή του γενετικού υλικού έγινε χρήση του Invisorb Spin Plant Mini Kit της Invitrogen και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες των κατασκευαστών.

Ειδικότερα, συλλέχθηκε συγκεκριμένη ποσότητα νεαρών φυλλαρίων από κάθε φυτό και τοποθετούνταν σε αλουμινόχαρτο πάνω στο οποίο σημειωνόταν ο κωδικός του αριθμός και κατόπιν σε πάγο ή σε θερμό με υγρό άζωτο για να διατηρηθεί μέχρι τη μεταφορά του στο εργαστήριο. Ακολούθησε λιοτρίβηση αρχικά σε κατάλληλο γουδί (κάψα πορσελάνης) με τη βοήθεια του υγρού αζώτου και στη συνέχεια ακολουθήθηκαν τα υπόλοιπα στάδια του πακέτου εξαγωγής. Οι DNA απομονώσεις τοποθετήθηκαν -20°C για περαιτέρω χρήση.

Ο ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του DNA έγινε με τη χρήση φασματοφωτόμετρου υπεριώδους /ορατού με απορρόφηση στα 260 nm, όπου η συγκέντρωση DNA υπολογίστηκε σε ng/μ L. Ο μέσος όρος της συγκέντρωσης DNA των δειγμάτων για τα δείγματα, υπολογίστηκε στα 100 ng/ μL.

2.2.2 Επιλογή SSR εκκινητών

Συνολικά, επιλέχθηκαν 10 εκκινητές τύπου SSR (Πίν. 4). Η επιλογή των μοριακών δεικτών βασίστηκε σε στην έρευνα των Hamwieh et al. (2005). Η συγκεκριμένη μελέτη αναφέρει το δείκτη SSR 59-2 ως στενά συνδεδεμένο με την ανθεκτικότητα της φακής στο *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis*. Στόχο της μελέτης αποτέλεσε η χαρτογράφηση μικροδορυφόρων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα της φακής στο *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis*, αξιοποιώντας έναν ήδη υπάρχοντα χαρτογραφημένο πληθυσμό. Τα ευρήματα της συνδετικής ανάλυσης κατέδειξαν την παρουσία του γονιδίου ανθεκτικότητας στο LG 6 καθώς και τη σύνδεσή του με το δείκτη SSR 59-2 και τον δείκτη AFLP-p17m30710 στις αποστάσεις 8.0 cM και 3.5 cM, αντίστοιχα. Αντίθετα, αντίστοιχες μελέτες άλλων ερευνητών οδήγησαν στην τοποθέτηση του δείκτη SSR 59 στο LG 4, χωρίς όμως αυτή να αναφέρεται η πιθανή σύνδεση του συγκεκριμένου δείκτη με την ανθεκτικότητα στο φουζάριο (Huyen et al., 2007). Πιο πρόσφατα, οι Mamta et al. (2012), αποσκοπώντας στην κατασκευή γενετικού χάρτη χρησιμοποίησαν 199 μοριακούς δείκτες, εκ των οποίων οι ήταν 28 SSRS χωρίς όμως να συμπεριλάβουν το δείκτη 59-2.

Πίνακας 4. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις PCR-SSR αναλύσεις.

ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ	Forward	Reverse
SSR 19	GACTCATACTTTGTTCTTAGCAG	GAACGGAGCGGTCACATTAG
SSR 59-2	CCAAATACTGCAACACACCG	GTTCCCATCAGGCAGAAGG
SSR 96	GTTATCTTCCAGCGTC	GATATACAATCAGAGATG
SSR 107	GCGGCGAGCAAATAAAT	GGAGAATAA AGTGAAATG
SSR 156	GTACATTGAACAGCATCATC	CAAATGGGCATGAAAGGAG
SSR 184	GTGTGTACCTAAAGCCTTG	GTAAGTTGATCAAACGCC
SSR 199	GTGTGCATGGTGTGTG	CCATCCCCCTCTATC
SSR 215	CATTAATATTTCTTTGGTGC	CTTTTCTTCTTTCCCC
SSR 233	CTTGGAGCTGTTGGTC	GCCGCCTACATTATGG
SSR 302	CAAGCCACCCATACACC	GGGCATTAAGTGTGCTGG
SSR 323	AGTGACAACAAAATGTGAGT	GTACCTAGTTTCATCATTG

2.2.3 Αναλύσεις SSR-PCR

Το μίγμα της **PCR** με τελικό όγκο 15 μ L περιείχε: (για όλους τους δείκτες εκτός από τον 59-2)

- ✓ 0,6-0,8 μ L $MgCl_2$ (25 mM)
- ✓ 1 μ L buffer- ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (10x)
- ✓ 0.25 μ L από ένα ρυθμιστικό διάλυμα dNTPs (2,5 mM)
- ✓ 0,5 μ L εκκινητή (10mM)
- ✓ 0,25 μ L Taq πολυμεράση
- ✓ 2 μ L από τα δείγματα του DNA (5 ng/ μ l)
- ✓ mQH20 σε τελικό όγκο 15 μ L

Το μίγμα της **PCR** με τελικό όγκο 25 μ L για τον δείκτη 59-2 περιείχε:

- ✓ 1 μ L $MgCl_2$ (25 mM)
- ✓ 5 μ L buffer- ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (5x)
- ✓ 0.5 μ L από ένα ρυθμιστικό διάλυμα dNTP's (10 mM)
- ✓ 1 μ L εκκινητή (10mM)
- ✓ 0,25 μ L Taq πολυμεράση
- ✓ 1 μ L από τα δείγματα του DNA (5 ng/ μ l)
- ✓ H2O σε τελικό όγκο 25 μ L

Πρόγραμμα της PCR

Το πρόγραμμα της αντίδρασης **PCR** για τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν περιελάμβανε τους ακόλουθους κύκλους:

- Αρχική αποδιάταξη του DNA σε θερμοκρασία 94 °C για 2 min
- 30 κύκλους αποτελούμενους από:
 - θερμική αποδιάταξη στους 94°C για 30 sec
 - υβριδισμό του εκκινητή από 48-60 °C για 30 sec (πιν. 5)
 - ενίσχυση στους 72 °C για 2 min
- Τελική ενίσχυση στους 72° C για 10 λεπτά.

Πίνακας 5. Θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις SSR αναλύσεις

EKKINHΤΗΣ	Annealing temperature for PCR (°C)
SSR 19	50
SSR 59-2	60
SSR 96	49
SSR 107	48
SSR 156	50
SSR 184	50
SSR 199	50
SSR 215	50
SSR 233	52
SSR 302	50
SSR 323	50

2.2.4 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων των προϊόντων ενίσχυσης σε πηκτή αγαρόζης

Η ανάλυση των προϊόντων ενίσχυσης έγινε σε πηκτή αγαρόζης 3% στην οποία είχε προστεθεί 0,004% (w/v) βρωμιούχο αιθίδιο, σε διάλυμα 1x TAE. Για τη "φόρτωση" των δειγμάτων στην πηκτή, 12 μL δείγματος DNA αναμίχθηκε με 3 μL διαλύματος κυανού βρωμοφαινόλης. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε τάση

60 Volt και διήρκησε 2,5-3 ώρες. Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με έκθεση της πηκτής σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΓΡΟΥ

Κατά την πρώτη καλλιεργητική περίοδο, ο πειραματισμός αγρού αποσκοπούσε αφενός μεν στην αξιολόγηση της συμπεριφοράς του πληθυσμού Εγκλουβής και αφετέρου στη συγκριτική αξιολόγηση των αποδόσεων υπό διαφορετικές πυκνότητες σποράς. Εφαρμόστηκε η κυψελωτή μεθοδολογία, και εγκαταστάθηκαν συνολικά 1000 φυτά για κάθε πυκνότητα.

3.1.1 Αξιολόγηση του παραγωγικού δυναμικού στην πυκνότητα σποράς 1,8 φυτών / m²

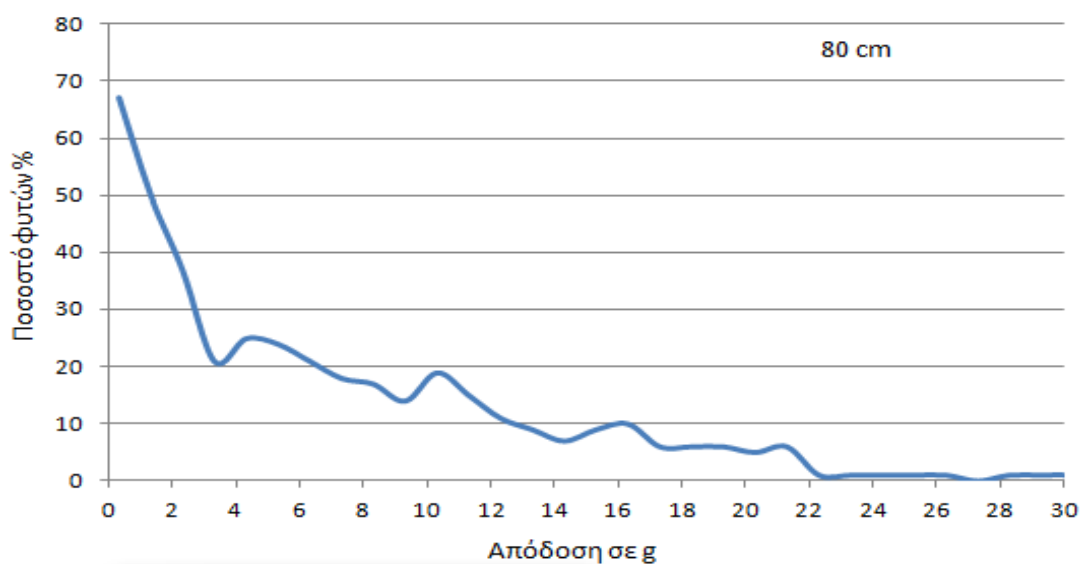
Κατά τη πρώτη καλλιεργητική περίοδο, Στο πείραμα των 80 cm συγκομίστηκαν τα 848 φυτά, δηλαδή υπήρξαν απώλειες περίπου 15 %, ενώ από αυτά μόλις τα 440 ήταν παραγωγικά. Η μέση απόδοση ανά φυτό (\bar{x}) ήταν 6,96 g για τα παραγωγικά φυτά και 3,61 για τα συγκομισθέντα φυτά, με μέγιστο απόδοσης τα 35 g και ελάχιστο τα 0,1 g. Η τυπική απόκλιση (s) του πληθυσμού ήταν 6,52 για τα παραγωγικά φυτά και 5,84 για το σύνολο των φυτών που συγκομίστηκαν. Αντίστοιχα, ο συντελεστής παραλλακτικότητας (CV) κυμάνθηκε στο 93,6 % και 161,71 % για τα παραγωγικά και τα συγκομισθέντα φυτά (Πιν.6)

Η κατανομή συχνότητας (σχήμα 1 και σχήμα 2) της απόδοσης του πληθυσμού παρουσίασε έντονη εκτροπή από την κανονικότητα και για τα δύο πειράματα. Η πλειοψηφία των φυτών κατατάχθηκε στις χαμηλοαποδοτικές κλάσεις, με αποτέλεσμα η μέση απόδοση ανά φυτό να εμφανίζει μεγάλη απόκλιση από την ενδιάμεση τιμή.

Με κριτήριο αποκλειστικά την απόδοση σε σπόρο ανά φυτό και ανεξάρτητα της θέσης τους, επιλέχθηκαν τα 15 υψηλοαποδοτικότερα φυτά, τα οποία και αποτέλεσαν 15 οικογένειες 1ης γενεάς (κάθε φυτό και οικογένεια) (Πίν. 7, Διάγραμμα 2). Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι κανένα από τα επιλεγμένα φυτά δεν παρουσίασε συμπτώματα ιολογικής ασθένειας ή φουζαρίωσης (ασυμπτωματικά).

Πίνακας 6 : Στατιστικές παράμετροι για απόδοση σε σπόρο ανά φυτό (g) για το πείραμα των 80 cm: Αριθμός συγκομιζόμενων και επιλεγέντων φυτών (n), μέση απόδοση \bar{x} , τυπική απόκλιση (s) και συντελεστής παραλλακτικότητας (CV).

	ΣΥΓΚΟΜΙΣΘΕΝΤΑ ΦΥΤΑ	ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΑ ΦΥΤΑ
n	816	440
\bar{x}	3,61	6,96
s	5,84	6,52
CV%	161,71	93,6

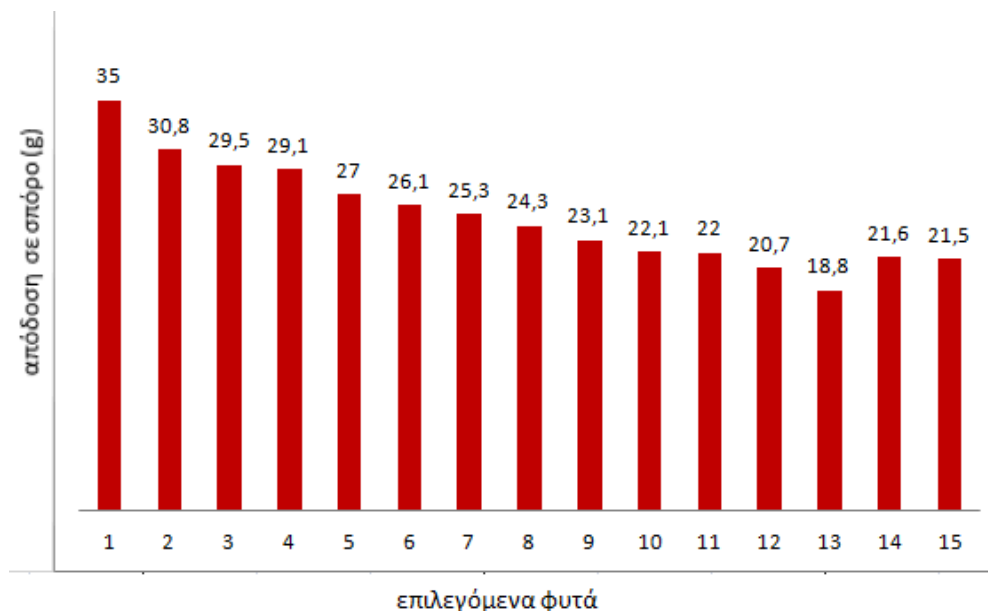


Σχήμα 1. Κατανομή συχνότητας της απόδοσης των ατομικών φυτών στο πείραμα των 80 cm.

Πίνακας 7. Τα 15 υψηλοποδοτικότερα φυτά του πειράματος των 80 cm που επιλέχθηκαν με βάση την απόδοση, ο αριθμός συγκομιδής τους καθώς και η φαινοτυπική τους κατάσταση.

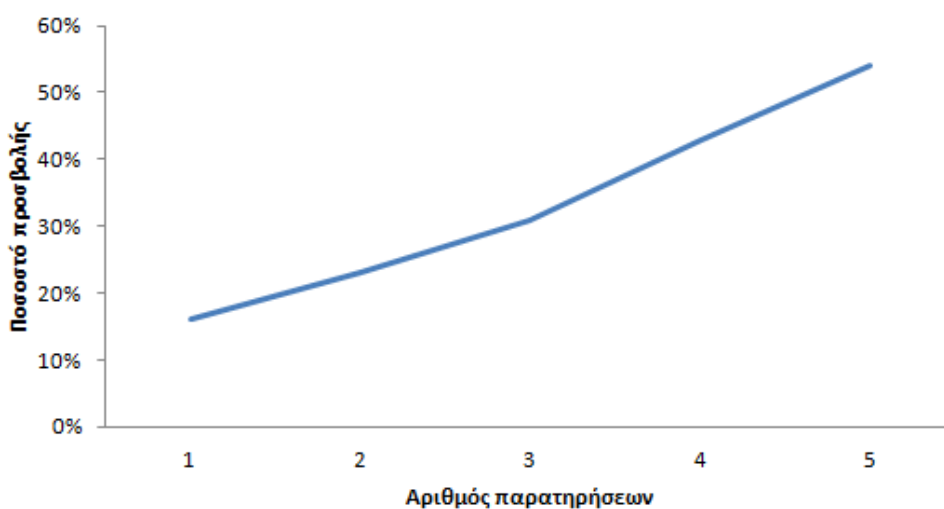
Ν. Επιλογής	Απόδοση	Σειρά	Φυτό	Συγκομιδή	CR- MR=120	Ασθένειες
1	35	17	9	4	28,04	1 *
2	30,8	18	7	2	20,95	1
3	29,5	18	15	2	23,20	1
4	29,1	20	6	3	18,11	1
5	27	23	4	3	17,28	1
6	26,1	6	10	2	31,89	1
7	25,3	17	8	3	14,80	1
8	24,3	11	23	2	64,81	1
9	23,1	5	10	2	24,93	1
10	22,1	15	17	2	19,33	1
11	22	22	6	3	9,53	1
12	20,7	10	24	2	48,45	1
13	18,8	17	30	2	1222,11	1
14	21,6	7	19	2	25,48	1
15	21,5	17	20	2	32,03	1

* όπου I=φαινοτυπικά υγιές φυτό και CR-MR:ποσοστό υπερχήσης ατομικού φυτού έναντι του δακτυλίου



Διάγραμμα 2. Απόδοση σε σπόρο ανά φυτό των 15 επιλεγέντων φυτών του πειράματος των 80 cm, καθένα από το οποία αποτέλεσε μια οικογένεια 1^{ης} γενεάς.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα των παρατηρήσεων για το πείραμα των 80 cm, καταγράφηκαν 184 κενές θέσεις (συνολικός αριθμός φυτών=1000). Κατά την πρώτη παρατήρηση, ο αριθμός των ασθενικών φυτών ανερχόταν στα 148 (18%), κατά τη δεύτερη στα 206 (25%), κατά την τρίτη στα 268 (33%) ενώ κατά την τέταρτη και πέμπτη παρατήρηση ανήλθε στα 372 (45,5%) και 459 ασθενικά φυτά αντίστοιχα. Το ποσοστό προσβολής που καταγράφηκε κατά την τελευταία παρατήρηση ήταν 56% (Σχήμα 2) ενώ σημειώθηκαν 357 υγιή φυτά, που αντιστοιχούν σε ποσοστό 44% .



Σχήμα 2. Ποσοστό προσβολής ανά παρατήρηση για το πείραμα των 80 cm.

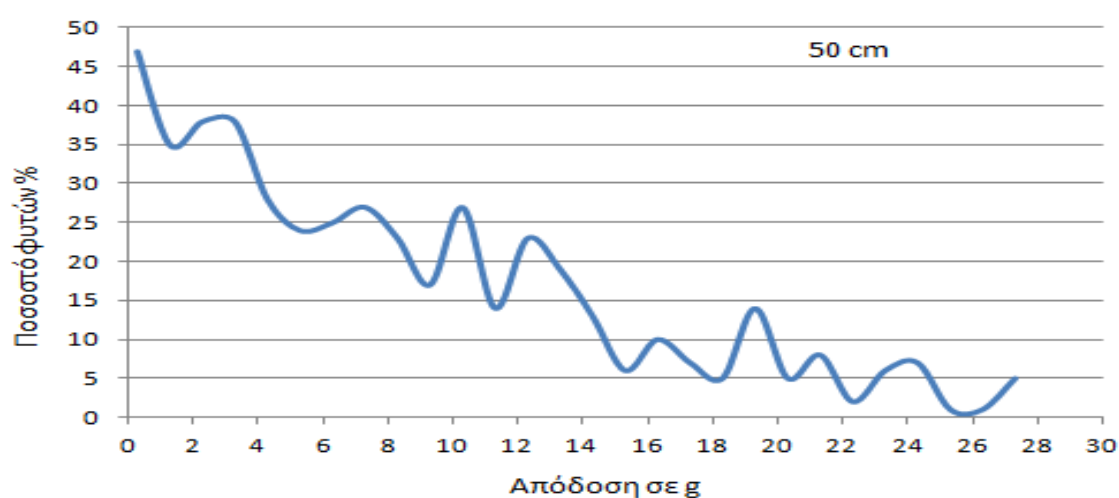
3.1.2 Αξιολόγηση του παραγωγικού δυναμικού στην πυκνότητα σποράς 4,6 φυτών/m²

Για το πείραμα των 50 cm, ο αριθμός των συγκομισμένων φυτών κυμάνθηκε στα 894, με απώλειες κοντά στο 10,5%. Αντίστοιχα, ο αριθμός των παραγωγικών φυτών ήταν 501. Η μέση απόδοση ανά φυτό \bar{x} ήταν 8,41 για τα παραγωγικά φυτά και 4,71 για το σύνολο των συγκομισθέντων. Το μέγιστο της απόδοσης κυμάνθηκε στα 34 g. Η τυπική απόκλιση (s) του πληθυσμού διακυμάνθηκε από 6,86 έως 6,61 για τα παραγωγικά και συγκομισθέντα φυτά, αντίστοιχα. Τέλος, ο συντελεστής παραλλακτικότητας κυμάνθηκε στο 81,58 και 140,42 για τα παραγωγικά και τα συγκομισθέντα φυτά, αντίστοιχα. Η απόδοση σε σπόρο ανά φυτό και οι σχετικές στατιστικές παράμετροι παρουσιάζονται στον Πίνακα 8. Κατά αναλογία με το πείραμα των 80 cm, επιλέχθηκαν τα 15 καλύτερα φυτά, τα οποία αποτέλεσαν τις 15

οικογένειες 1ης γενεάς (Πίνακας 9). Τα 15 επιλεγθέντα φυτά χαρακτηρίζονταν από απουσία συμπτωμάτων ιολογικών ασθενειών και φουζαρίωσης (ασυμπτωματικά).

Πίνακας 8 : Στατιστικές παράμετροι για απόδοση ανά φυτό σε σπόρο ανά φυτό (g) για το πείραμα των 50 cm. Αριθμός συγκομιζόμενων και επιλεγέντων φυτών (n), μέση απόδοση \bar{x} , τυπική απόκλιση (s) και συντελεστής παραλλακτικότητας (CV).

	ΣΥΓΚΟΜΙΣΘΕΝΤΑ ΦΥΤΑ	ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΑ ΦΥΤΑ
n	894	501
\bar{x}	4,71	8,41
s	6,61	6,86
CV%	140,42	81,58

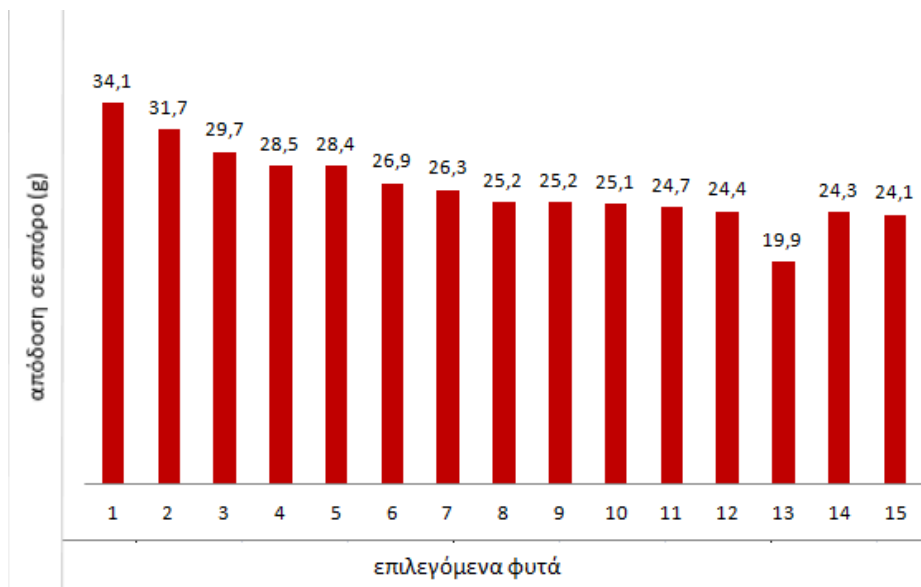


Σχήμα 2. Κατανομή συχνότητας της απόδοσης των ατομικών φυτών στο πείραμα των 50 cm.

Πίνακας 9 . Τα 15 υψηλοαποδοτικότερα φυτά του πειράματος των 50 cm που επιλέχθηκαν με βάση την απόδοση, ο αριθμός συγκομιδής τους καθώς και η φαινοτυπική τους κατάσταση.

Ν. Επιλογής	Απόδοση	Σειρά	Φυτό	Συγκομιδή	CR - MR=120	Ασθένειες
1	34,1	12	21	2	33,46	1*
2	31,7	6	5	2	22,15	1
3	29,7	11	12	2	15,52	1
4	28,5	12	10	3	13,12	1
5	28,4	7	12	3	13,85	1
6	26,9	15	7	4	13,94	1
7	26,3	14	28	2	28,88	1
8	25,2	7	19	3	16,25	1
9	25,2	4	14	2	15,33	1
10	25,1	21	4	2	26,46	1
11	24,7	17	26	2	29,18	1
12	24,4	16	5	2	13,16	1
13	19,9	21	28	2	54,44	1
14	24,3	17	24	4	22,92	1
15	24,1	12	11	3	8,33	1

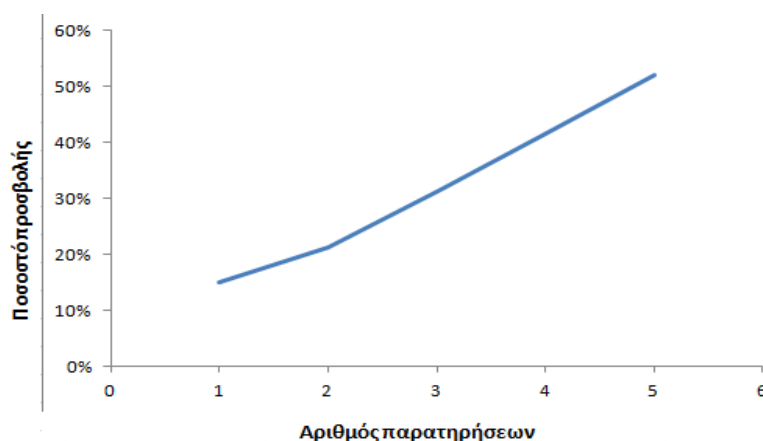
* όπου I = φαινοτυπικά υγιές φυτό και CR-MR: ποσοστό υπεροχής ατομικού φυτού έναντι του δακτυλίου



Διάγραμμα 3. Απόδοση σε σπόρο ανά φυτό των 15 επιλεγέντων φυτών του πειράματος των 50 cm, καθένα από το οποία αποτέλεσε μια οικογένεια 1^{ης} γενιάς.

Όσον αναφορά τα αποτελέσματα των παρατηρήσεων για το πείραμα των 50 cm, καταγράφηκαν 106 κενές θέσεις (συνολικός αριθμός φυτών =1000). Κατά την πρώτη παρατήρηση, ο αριθμός των ασθενικών φυτών ανερχόταν στα 135 (15,1%),

κατά τη δεύτερη στα 191 (21,4%), κατά την τρίτη στα 280 (31,3%) ενώ κατά την τέταρτη και πέμπτη παρατήρηση ανήλθε στα 372 (41,6%) και 462 ασθενικά φυτά αντίστοιχα. Κατά την τελευταία παρατήρηση, το ποσοστό προσβολής έφτασε στο 52% (Σχήμα 3) ενώ καταγράφηκαν 432 υγιή φυτά, το ποσοστό των οποίων έφτασε το 48% .



Σχήμα 3: Ποσοστό προσβολής ανά παρατήρηση για το πείραμα των 80 cm.

3.1.3 Απογονικός έλεγχος και ανάλυση του παραγωγικού δυναμικού των επιλογών 1^{ης} γενεάς σε συνθήκες αραιής σποράς

Το δεύτερο έτος πειραματισμού (2012-2013) αξιολογήθηκαν οι επιλογές 1^{ης} γενεάς, δηλαδή οι 30 οικογένειες με μάρτυρα τον αρχικό πληθυσμό, σύμφωνα με το κυψελωτό σχέδιο επιλογής R-31. Οι μέσες αποδόσεις ανά φυτό κυμάνθηκαν από 1,11g στην οικογένεια 10 έως 3,97 g στην οικογένεια 24, ενώ η μέση απόδοση του αρχικού πληθυσμού ήταν 2,75 (πίνακας 9). Εξαιτίας υψηλών τιμών της τυπικής απόκλισης, δεν βρέθηκε οικογένεια να διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τον μάρτυρα (πίνακας 10). Οι τιμές του CV της απόδοσης των οικογενειών κυμάνθηκαν σε πολύ υψηλά επίπεδα, από 135% στην οικογένεια 27 έως 256% στην οικογένεια 3, ενώ του αρχικού πληθυσμού ήταν 167%.

Η μέση απόδοση ανά φυτό κυμάνθηκε από 40,75% του αρχικού πληθυσμού στην οικογένεια 10 έως 144,85% στην οικογένεια 24. Τέσσερις οικογένειες ξεπερνούσαν τον αρχικό πληθυσμό, η οικογένεια 24 κατά 44,85%, η οικογένεια 27 κατά 28,65%, η οικογένεια 20 κατά 19,9% και η οικογένεια 7 κατά 10,8%, χωρίς όμως οι διαφορές αυτές να είναι στατιστικά σημαντικές. Οι υπόλοιπες οικογένειες υπολείπονταν του μάρτυρα (σχήμα 4).

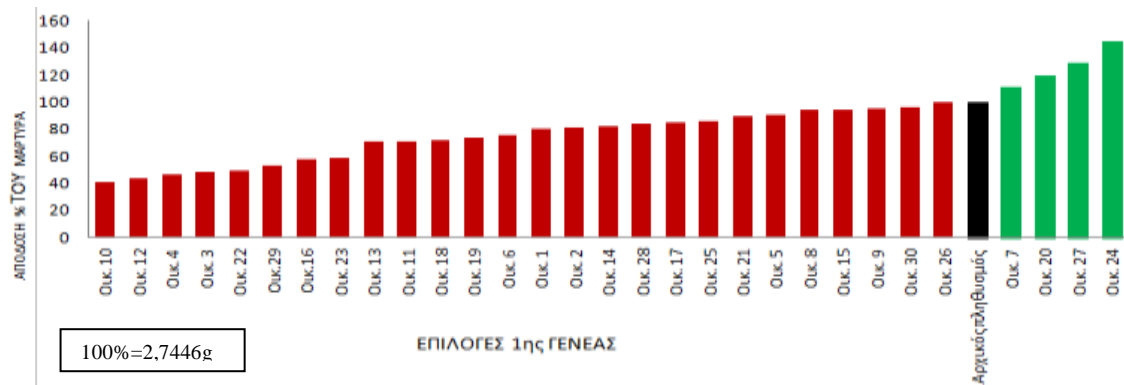
Πίνακας 9: Απογονικός έλεγχος για τις 30 οικογένειες σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό. Απόδοση ανά οικογένεια σε σπόρο (g), αριθμός φυτών που συγκομίστηκαν και μέση απόδοση.

Οικογένεια	n	Μ.Ο.		Μέση Απόδοση (%)
1	77	2,1931	bcde	55,2
2	72	2,2183	bcde	55,8
3	70	1,3293	de	33,4
4	72	1,2671	e	31,9
5	70	2,4954	abcde	62,8
6	55	2,0755	bcde	52,2
7	62	3,0413	abcde	76,5
8	77	2,5943	abcde	65,3
9	66	2,6056	abcde	65,5
10	59	1,1186	e	28,1
11	69	1,9362	bcde	48,7
12	65	1,2040	e	30,3
13	61	1,9349	bcde	48,7
14	68	2,2416	bcde	56,4
15	61	2,5980	abcde	65,3
16	74	1,5938	cde	40,1
17	69	2,3162	abcde	58,3
18	70	1,9766	bcde	49,7
19	73	2,0138	bcde	50,7
20	67	3,2915	abcde	82,8
21	76	2,4475	abcde	61,6
22	73	1,3444	de	33,8
23	77	1,6045	cde	40,4
24	74	3,9758	abcde	100
25	74	2,3582	abcde	59,3
26	71	2,7382	abcde	68,9
27	70	3,5310	abcde	88,8
28	69	2,2938	abcde	57,7
29	73	1,4484	de	36,4
30	71	2,6346	abcde	66,3
Αρχικός Πληθυσμός	71	2,7446	abcde	69

*τιμές διαλογών που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$)

Πίνακας 10: Απογονικός έλεγχος των 30 οικογενειών σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό. Τυπική απόκλιση και συντελεστής παραλλακτικότητας (CV%).

Οικογένεια	s	CV(%)
1	4,1	188,0
2	4,3	192,3
3	3,4	256,4
4	2,8	224,2
5	4,4	177,6
6	4,1	196,9
7	4,6	149,7
8	4,5	174,2
9	4,6	176,1
10	2,2	199,6
11	3,8	198,4
12	3,0	252,5
13	4,6	237,5
14	4,6	203,3
15	4,4	167,5
16	3,1	196,1
17	4,3	184,2
18	3,7	185,9
19	3,0	150,2
20	5,3	160,3
21	4,0	161,3
22	2,3	173,0
23	3,2	199,2
24	7,3	183,8
25	3,8	161,3
26	4,2	152,4
27	4,8	134,6
28	3,7	161,3
29	3,0	208,8
30	4,4	168,1
Αρχικός Πληθυσμός	4,6	166,9

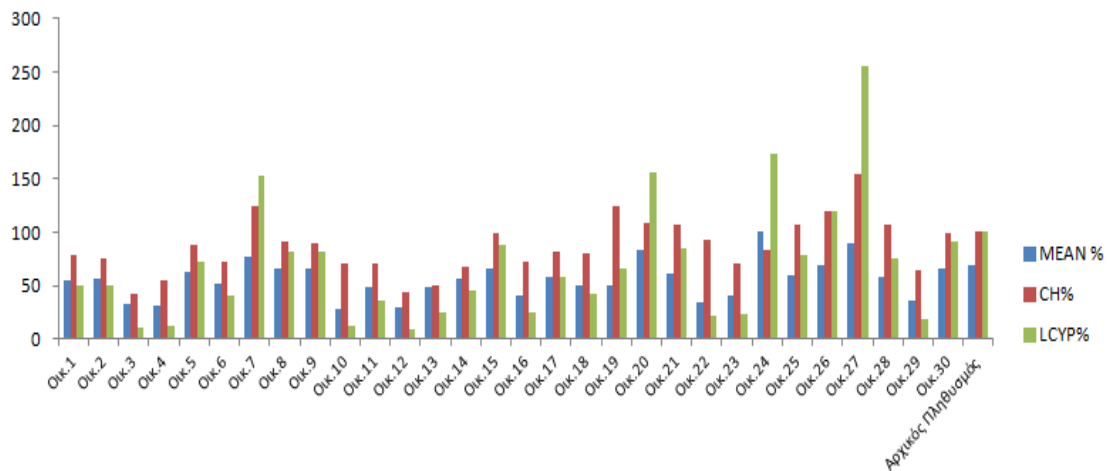


Σχήμα 4: Κατάταξη των 30 οικογενειών με βάση τη συγκριτική αξιολόγηση της απόδοσής σε σχέση με αυτή του αρχικού πληθυσμού (%) (μαύρη στήλη).

Το παραγωγικό δυναμικό (LCYP) κάθε οικογένειας υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση $B = (\bar{x} / \bar{x}_i)^2 \cdot (\bar{x} / s)^2$. Στον πίνακα 11 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης. Οι τιμές του πρώτου συστατικού της εξίσωσης, δηλαδή ο συντελεστής απόδοσης των οικογενειών (CLR) ή αλλιώς $(\bar{x} / \bar{x}_i)^2$ κυμάνθηκε από 16,6% έως 209,9% του αρχικού πληθυσμού. Η χαμηλότερη τιμή παρατηρήθηκε στην οικογένεια 10 ενώ στην οικογένεια 24 σημειώθηκε η μεγαλύτερη τιμή του συντελεστή. Οι τιμές του συντελεστή ομοιότητας (CH) ή αλλιώς $(\bar{x} / s)^2$ κυμάνθηκαν από 42% του αρχικού πληθυσμού στην οικογένεια 3 έως 154% στην οικογένεια 27. Το γινόμενο των δύο συντελεστών, δηλαδή το παραγωγικό δυναμικό κάθε οικογένειας κυμάνθηκε από 8,5% για την οικογένεια 12 έως 254,8% του αρχικού πληθυσμού για την οικογένεια 27. Συνολικά 5 οικογένειες ξεπέρασαν τον αρχικό πληθυσμό αναφορικά με την τιμή της εξίσωσης B. Κατά αύξουσα σειρά οι οικογένειες που ξεπέρασαν τον αρχικό πληθυσμό είναι: η οικογένεια 27 (LCYP=254,8%), η οικογένεια 24 (LCYP=173,1%), η οικογένεια 20 (LCYP=156,3%), η οικογένεια 7 (LCYP=152,4%) και η οικογένεια 26 (LCYP=119,2%) (Διάγραμμα 4).

Πίνακας 11: Ανάλυση του παραγωγικού δυναμικού (LCYP) των οικογενειών με την εξίσωση Β στους επιμέρους συντελεστές, το συντελεστή απόδοσης (CLR) και το συντελεστή ομοιότητας (CH).

Οικογένεια	CLR	CLR%	CH	CH%	LCYP	LCYP%
1	0,964	63,9	0,283	78,8	0,272	50,2
2	0,986	65,3	0,271	75,5	0,267	49,3
3	0,354	23,5	0,152	42,3	0,054	10,0
4	0,322	21,3	0,199	55,4	0,064	11,8
5	1,248	82,7	0,317	88,3	0,395	72,9
6	0,863	57,2	0,258	71,9	0,223	41,1
7	1,853	122,8	0,446	124,2	0,826	152,4
8	1,349	89,4	0,330	91,9	0,444	81,9
9	1,360	90,1	0,323	90,0	0,439	81,0
10	0,251	16,6	0,251	69,9	0,063	11,6
11	0,751	49,8	0,254	70,8	0,191	35,2
12	0,290	19,2	0,157	43,7	0,046	8,5
13	0,750	49,7	0,177	49,3	0,133	24,5
14	1,007	66,7	0,242	67,4	0,243	44,8
15	1,353	89,7	0,356	99,2	0,481	88,7
16	0,509	33,7	0,260	72,4	0,132	24,4
17	1,075	71,2	0,294	81,9	0,317	58,5
18	0,783	51,9	0,290	80,8	0,227	41,9
19	0,813	53,9	0,444	123,7	0,360	66,4
20	2,171	143,9	0,390	108,6	0,847	156,3
21	1,200	79,5	0,384	107,0	0,461	85,1
22	0,362	24,0	0,334	93,0	0,121	22,3
23	0,516	34,2	0,252	70,2	0,130	24,0
24	3,167	209,9	0,296	82,5	0,938	173,1
25	1,114	73,8	0,385	107,2	0,429	79,2
26	1,502	99,5	0,430	119,8	0,646	119,2
27	2,498	165,5	0,553	154,0	1,381	254,8
28	1,054	69,8	0,384	107,0	0,405	74,7
29	0,420	27,8	0,229	63,8	0,096	17,7
30	1,391	92,2	0,353	98,3	0,492	90,8
Αρχικός Πληθυσμός	1,509	100,0	0,359	100,0	0,542	100,0



Διάγραμμα 4: Διαγραμματική απεικόνιση της μέσης απόδοσης (\bar{X}), του παραγωγικού δυναμικού (LCYP) και του δείκτη ομοιόστασης (CH), των 30 οικογενειών εκφρασμένοι επί τοις εκατό του αρχικού πληθυσμού.

Ο αριθμός των συγκομισθέντων φυτών έφτασε το 77%, όμως μόλις το 31,3% (875 φυτά) ήταν παραγωγικά. Ο επιμερισμός της φαινοτυπικής παραλλακτικότητας, ο οποίος διαχωρίζει την γενοτυπική από την περιβαλλοντική επίδραση δηλαδή τις γενετικές (σ^2_g) από τις περιβαλλοντικές (σ^2_ϵ) διαφορές έδειξε ότι η επίδραση του περιβάλλοντος ήταν 48,97%, ενώ το 51,03% οφειλόταν σε διαφορές μεταξύ των οικογενειών (Πίν. 12). Η μεταξύ των γονοτύπων παραλλακτικότητα αποτελεί τον συντελεστή κληρονομικότητας υπό την ευρεία έννοια (h^2). Έτσι, ο συντελεστής κληρονομικότητας του πειράματος για την απόδοση ήταν 51,03%, ενώ ο συντελεστής παραλλακτικότητας έφτασε το 185,37% (συμπεριλαμβάνοντας τα φυτά με μηδενική απόδοση). Η τιμή του συντελεστή παραλλακτικότητας θα μειωνόταν φτάνοντας στο 89,48% αν η ανάλυση περιελάμβανε μόνο τα παραγωγικά φυτά.

Πίνακας 12: Συνολικός αριθμός φυτών (συμπεριλαμβανομένων των φυτών με μηδενική απόδοση), μέσος όρος απόδοσης, τυπική απόκλιση, συντελεστής παραλλακτικότητας και επιμερισμός της φαινοτυπικής παραλλακτικότητας.

n	x	s	CV%	σ^2_g	σ^2_ϵ
2156	2,23	4,14	185,37	51,03	48,97

3.2 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

Με στόχο την εύρεση πολυμορφισμών που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα της φακής Εγκλουβής στην ασθένεια της φουζαρίωσης, εφαρμόστηκε ανάλυση DNA τύπου SSR σε δείγματα ατομικών φυτών. Οι SSR αναλύσεις περιελάμβαναν τη μελέτη 26 δειγμάτων, τα οποία με βάση τη συμπτωματολογία τους κατηγοριοποιήθηκαν σε ευαίσθητα, ανθεκτικά και φυτά με μέτρια ανάπτυξη συμπτωμάτων. Στον Πίνακα 13 αναφέρεται η ημερομηνία εκδήλωσης συμπτωμάτων, ο χρόνος συγκομιδής καθώς και η απόδοση των υπό μελέτη δειγμάτων, ως παράμετρος έμμεσης ποσοτικοποίησης της ανθεκτικότητας των γονοτύπων.

Πιο συγκεκριμένα, η κατηγοριοποίηση των δειγμάτων με βάση τη συμπτωματολογία τους οδήγησε στο σχηματισμό 3 διακριτών ομάδων: α) φυτά που χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικά (16-26), β) φυτά που παρουσίασαν μέτρια ανάπτυξη συμπτωμάτων (3, 9-15) και γ) φυτά που χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητα (2, 4-8). Παράλληλα, στις SSR αναλύσεις συμπεριλήφθηκαν ως μάρτυρες οι ποικιλίες LC-590 και LC-6031 που συνιστούν ανθεκτικό και ευαίσθητο στη φουζαρίωση γενετικό υλικό, εισαγόμενο από ICARDA. Προκειμένου να εξαλειφθούν προβλήματα επαναληψιμότητας, όλες οι SSR αναλύσεις επαναλήφθηκαν 3 φορές.

Συνολικά, χρησιμοποιήθηκαν 10 εκκινητές τύπου SSR. Όπως φαίνεται και στις Εικόνες 14-19, οι 6 από τους 10 επιλεγθέντες εκκινητές δεν παρουσίασαν πολυμορφισμό για τα υπό μελέτη δείγματα φακής. Συγκεκριμένα, οι SSR εκκινητές 96, 107, 156, 184, 199 και 302 υπήρξαν μονομορφικοί δείκτες και συνεπώς ακατάλληλοι για τη διάκριση γονοτυπικών διαφορών που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα των φυτών στην ασθένεια της φουζαρίωσης.

Πίνακας 13: Φαινοτυπική κατάσταση των 26 υπό εξέταση μοριακών δειγμάτων καθώς και η απόδοσή τους σε g.

ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ	ΑΠΟΔΟΣΗ	ΧΡΟΝΟΣ ΣΥΓΚΟΜΙΔΗΣ
Δείγμα 1	v *	6,3	1 ^η **
Δείγμα 2	4 ^η	2,8	3 ^η
Δείγμα 3	5 ^η	1	1 ^η
Δείγμα 4	5 ^η	0,2	1 ^η
Δείγμα 5	v	4,7	1 ^η
Δείγμα 6	v	8,2	2 ^η
Δείγμα 7	5 ^η	3,4	3 ^η
Δείγμα 8	v	1,6	2 ^η
Δείγμα 9	v	2,7	2 ^η
Δείγμα 10	5 ^η	1,6	5 ^η
Δείγμα 11	1 ^η	1,6	1 ^η
Δείγμα 12	v	7,2	1 ^η
Δείγμα 13	v	5,7	1 ^η
Δείγμα 14	3 ^η	3,7	3 ^η
Δείγμα 15	v	1	2 ^η
Δείγμα 16	v	13	4 ^η
Δείγμα 17	v	25,3	3 ^η
Δείγμα 18	v	25,2	3 ^η
Δείγμα 19	v	25,2	3 ^η
Δείγμα 20	v	27	3 ^η
Δείγμα 21	v	24,3	4 ^η
Δείγμα 22	v	21,6	2 ^η
Δείγμα 23	v	29,7	2 ^η
Δείγμα 24	v	26,1	2 ^η
Δείγμα 25	v	29,5	2 ^η
Δείγμα 26	v	30,8	2 ^η

*Όπου: v =υγιές φυτό, 1^η =το φυτό παρουσίασε συμπτώματα κατά την πρώτη παρατήρηση, 3^η = το φυτό παρουσίασε συμπτώματα κατά την τρίτη παρατήρηση κλπ. **Όπου: 1^η =το φυτό συγκομίστηκε κατά τη πρώτη συγκομιδή, 2^η =το φυτό συγκομίστηκε κατά τη δεύτερη συγκομιδή κτλ.



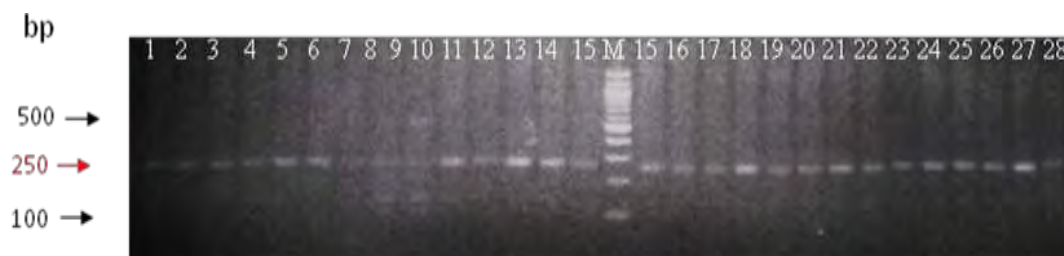
Εικόνα 14 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων ενίσχυσης χρησιμοποιώντας το δείκτη SSR 96. 1-26: Υπό μελέτη δείγματα φακής. 27: Ευαίσθητος μάρτυρας (ICARDA, LC-6031). 28: Ανθεκτικός μάρτυρας (ICARDA, LC-590). M: Marker (bp) (100 bp, NEB).



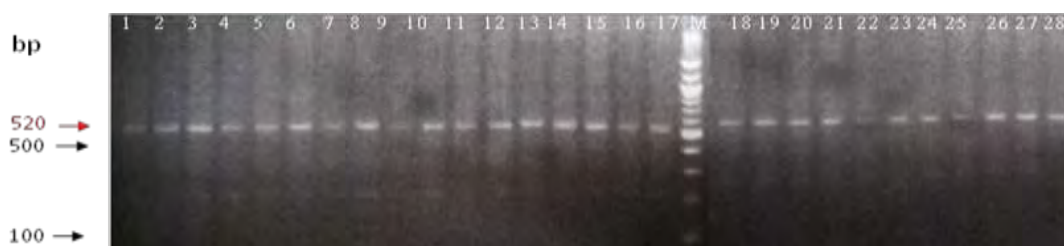
Εικόνα 15 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζη των προϊόντων ενίσχυσης χρησιμοποιώντας το δείκτη SSR 107. 1-26: Υπό μελέτη δείγματα φακής. 27: Ευαίσθητος μάρτυρας (ICARDA, LC-6031). 28: Ανθεκτικός μάρτυρας (ICARDA, LC-590). M: Marker (bp) (100 bp, NEB).



Εικόνα 16 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζη των προϊόντων ενίσχυσης χρησιμοποιώντας το δείκτη SSR 156. 1-26: Υπό μελέτη δείγματα φακής. 27: Ευαίσθητος μάρτυρας (ICARDA, LC-6031). 28: Ανθεκτικός μάρτυρας (ICARDA, LC-590). M: Marker (bp) (100 bp, NEB).



Εικόνα 17 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζη των προϊόντων ενίσχυσης χρησιμοποιώντας το δείκτη SSR 184. 1-26: Υπό μελέτη δείγματα φακής. 27: Ευαίσθητος μάρτυρας (ICARDA, LC-6031). 28: Ανθεκτικός μάρτυρας (ICARDA, LC-590). M: Marker (bp) (100 bp, NEB).



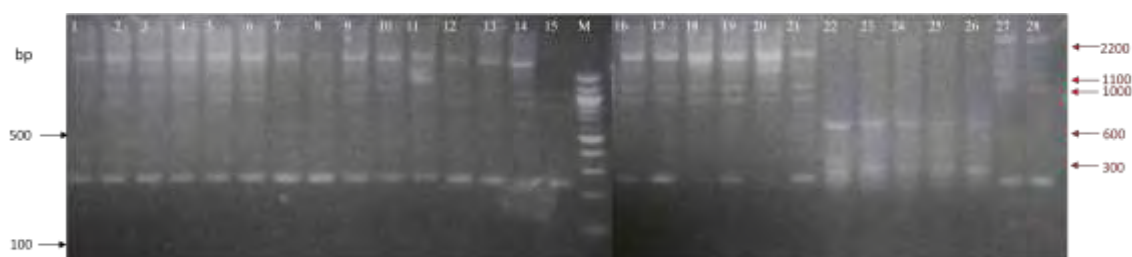
Εικόνα 18 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζη των προϊόντων ενίσχυσης χρησιμοποιώντας το δείκτη SSR 199. 1-26: Υπό μελέτη δείγματα φακής. 27: Ευαίσθητος μάρτυρας (ICARDA, LC-6031). 28: Ανθεκτικός μάρτυρας (ICARDA, LC-590). M: Marker (bp) (100 bp, NEB).



Εικόνα 19. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων ενίσχυσης χρησιμοποιώντας το δείκτη SSR 302. . 27: Ευαίσθητος μάρτυρας (ICARDA, LC-6031). 28: Ανθεκτικός μάρτυρας (ICARDA, LC-590). M: Marker (bp) (100 bp, NEB).

Αντίθετα, τα αποτελέσματα των αναλύσεων ανέδειξαν τους δείκτες SSR 19, 215, 323 και 59-2 ως πολυμορφικούς. Για τον εκκινητή SSR 19, η ανάλυση αποκάλυψε την ύπαρξη 5 πολυμορφικών ζωνών, μεγέθους περίπου 300, 600, 1000, 1100 και 2200 bp, που όμως δε σχετίζονται με τη φαινοτυπική κατάταξη των φυτών σε ευαίσθητα, ανθεκτικά ή φυτά με μέτρια ανάπτυξη συμπτωμάτων. Ομοίως, το προφίλ που προέκυψε από την ανάλυση με τους εκκινητές SSR 215 και SSR 323, ανέδειξε την ύπαρξη 4 (μεγέθους περίπου 250, 400, 900 και 1100 bp) και 3 (μεγέθους περίπου 130, 210, 310 bp) πολυμορφικών ζωνών αντίστοιχα, που επίσης δε φαίνεται να σχετίζονται με τη γενετική ανθεκτικότητα των φυτών.

Η μη συσχέτιση των δεικτών αυτών με την ανθεκτικότητα στη φουζαρίωση ενισχύεται από το γεγονός ότι η χρήση τους δεν καθιστά ικανή τη διάκριση των ταυτοποιημένων μαρτύρων (LC-590 και LC-6031).



Εικόνα 20. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων ενίσχυσης χρησιμοποιώντας το δείκτη SSR 19. 1-26: Υπό μελέτη δείγματα φακής. 27: Ευαίσθητος μάρτυρας (ICARDA, LC-6031). 28: Ανθεκτικός μάρτυρας (ICARDA, LC-590). M: Marker (bp) (100 bp, NEB).



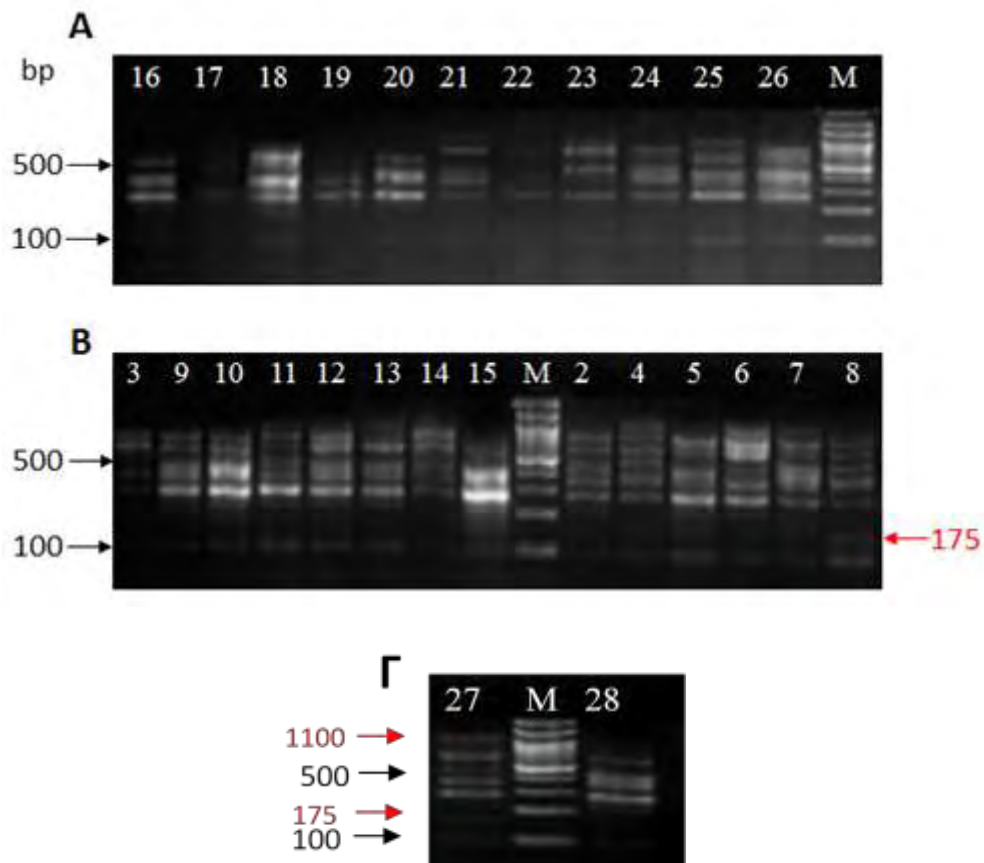
Εικόνα 20. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων ενίσχυσης χρησιμοποιώντας το δείκτη SSR 215. 1-26: Υπό μελέτη δείγματα φακής. 27: Ευαίσθητος μάρτυρας (ICARDA, LC-6031). 28: Ανθεκτικός μάρτυρας (ICARDA, LC-590). M: Marker (bp) (100 bp, NEB).



Εικόνα 21. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων ενίσχυσης χρησιμοποιώντας το δείκτη SSR 323. 1-26: Υπό μελέτη δείγματα φακής. 27: Ευαίσθητος μάρτυρας (ICARDA, LC-6031). 28: Ανθεκτικός μάρτυρας (ICARDA, LC-590). M: Marker (bp) (100 bp, NEB).

Αναφορικά με το δείκτη SSR 59-2, η ανάλυση αποκάλυψε την ύπαρξη 2 τουλάχιστον πολυμορφικών ζωνών, μεγέθους περίπου 175 και 1100 bp, και επιπρόσθετα, υποδεικνύει συσχέτιση των ανιχνευμένων πολυμορφισμών με τη φαινοτυπική κατάταξη των φυτών σε ευαίσθητα, ανθεκτικά ή φυτά με μέτρια ανάπτυξη συμπτωμάτων τόσο για τους ταυτοποιημένους μάρτυρες (ποικιλίες LC-590 και LC-6031) όσο και για τα υπό μελέτη δείγματα φακής. Συγκεκριμένα, το πρότυπο ζωνών που προέκυψε από τη χρήση του δείκτη SSR 59-2 ανέδειξε παρουσία πολυμορφικής ζώνης μεγέθους 175 bp στον ευαίσθητο μάρτυρα (LC-6031) καθώς και σε ορισμένα δείγματα φυτών που ήταν ευαίσθητα (2, 4-8) ή παρουσίασαν μέτρια ανάπτυξη συμπτωμάτων (3, 9-15) και αντίστοιχα, απουσία της σε όλα τα δείγματα που κατηγοριοποιήθηκαν ως ανθεκτικά (16-26).

Όσον αφορά την πολυμορφική ζώνη 1100 bp, αυτή ήταν παρούσα στον ευαίσθητο μάρτυρα (ποικιλία LC-6031) και αντιστοίχως στα δείγματα 4 (ευαίσθητο), 11 και 13 (μέτρια ανάπτυξη συμπτωμάτων), 21, 23 και 25 (ανθεκτικά).



Εικόνα 22. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων ενίσχυσης χρησιμοποιώντας το δείκτη SSR 59-2. **A** 16-26: Φυτά φακής που χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικά (ασυμπτωματικά). **B** 3, 9-15: Φυτά φακής που παρουσίασαν μέτρια ανάπτυξη συμπτωμάτων. 2, 4-8: Φυτά φακής που χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητα. **Γ** 27: Ευαίσθητος μάρτυρας (ICARDA, LC-6031). 28: Ανθεκτικός μάρτυρας (ICARDA, LC-590). M: Marker (bp) (100 bp, NEB).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο πειραματισμός διεξήχθη σε συνθήκες μειωμένων εισροών, απουσίας λίπανσης και άρδευσης, καθώς άμεση προϋπόθεση για την τήρηση των κριτηρίων αιφορικής παραγωγής αποτελεί η δημιουργία ποικιλιών που θα χαρακτηρίζονται από προσαρμοστικότητα σε ακραία περιβάλλοντα. Σύμφωνα με τον Ceccarelli (1994), το περιβάλλον επιλογής θα πρέπει να είναι όμοιο με το μελλοντικό περιβάλλον καλλιέργειας των υπό αξιολόγηση ποικιλιών. Αντίθετα, άλλες έρευνες καταδεικνύουν ότι μέσω της άμεσης επιλογής το γενετικό κέρδος είναι μεγαλύτερο (Sinebo et al., 2002; Brancourt-Hulmel et al., 2005).

Η πυκνότητα που προσεγγίζει την έλλειψη ανταγωνισμού είναι ωφέλιμη για δύο λόγους. Πρώτον, υπό την παρουσία βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων, οι μεγάλες πυκνότητες μειώνουν την αναλογία των προσβεβλημένων φυτών και ευνοούν την ανάπτυξη υγιών φυτών, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις ιολογικών προσβολών (Jones, 2004; Kotzamanidis et al., 2009; Makkouk and Kumari, 2009). Σύμφωνα με τις έρευνες αυτές, οι μικρές πυκνότητες καθιστούν ευχερή την αναγνώριση των ευαίσθητων γονοτύπων ενώ αντίθετα, σε μεγάλες πυκνότητες η φαινοτυπική αναγνώριση των ασθενικών φυτών δυσχερénεται. Άμεση απόρροια των παραπάνω είναι η αποτελεσματικότερη αναγνώριση και επιλογή ατομικών φυτών που αντιπροσωπεύουν ανεκτικούς ή ανθεκτικούς γονοτύπους.

Ο δεύτερος λόγος είναι ότι η απουσία ανταγωνισμού βελτιώνει την αποτελεσματικότητα επιλογής (Fasoula and Fasoula, 1997a; Tokatlidis et al., 2010a; Fasoula and Tokatlidis, 2012). Σε συνθήκες έλλειψης ανταγωνισμού, εξαλείφεται η αρνητική συσχέτιση ανταγωνιστικής και αποδοτικής ικανότητας (Kyriakou and Fasoulas, 1985; Janick, 1999; Pan et al., 2003) και είναι εφικτή η εφαρμογή μεγάλων εντάσεων επιλογής. Επίσης, βελτιώνεται ο συντελεστής κληρονομικότητας και μεγιστοποιείται η φαινοτυπική διαφοροποίηση μεταξύ των γονοτύπων. Σύμφωνα με τα παραπάνω, αυτές είναι και οι τρεις αναγκαίες συνθήκες για αποτελεσματική αναγνώριση των υπέρτερων γονοτύπων με βάση την εξίσωση του Falconer (1989).

Ο ανταγωνισμός μηδενίζεται στην πυκνότητα όπου επιτυγχάνεται η μέγιστη απόδοση ανά φυτό και ελαχιστοποιείται η τιμή του CV της απόδοσης (Fasoula and Fasoula, 1997a; Tokatlidis et al., 2010a). Οι Tokatlidis et al. (2010a) αξιολογώντας υβρίδια καλαμποκιού σε διαφορετικές πυκνότητες, διαπίστωσαν ότι οι μεγάλες πυκνότητες συνεπάγονται υψηλές τιμές CV, και επομένως υψηλή περιβαλλοντική

επίδραση. Από την άλλη πλευρά, με την έλλειψη ανταγωνισμού επιτυγχάνεται μεγιστοποίηση της κληρονομήσιμης φαινοτυπικής παραλλακτικότητας. Δεδομένου ότι στόχος οποιασδήποτε βελτιωτικής διαδικασίας είναι η δημιουργία υπέρτερων γονοτύπων, η πυκνότητα φύτευσης θα πρέπει να αναδεικνύει τους γονοτύπους αυτούς. Βέβαια, είναι προφανές ότι η ιδανική πυκνότητα εξαρτάται από το είδος, το περιβάλλον και τους γονοτύπους. Για τη φακή, προηγούμενες μελέτες έχουν αναδείξει την πυκνότητα 3,2 φυτά /m² ως την καταλληλότερη, εφόσον αυτή εξασφαλίζει συνθήκες έλλειψης ανταγωνισμού (Βλαχοστέργιος, 2009). Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε η πυκνότητα των 1,8 φυτών / m² και 4,6 φυτών / m² για το πείραμα των 80 και 50 cm, αντίστοιχα. Για το πείραμα της δεύτερης χρονιάς πειραματισμού η πυκνότητα ήταν 1,8 φυτά / m² και η απόσταση στα 80 cm.

4.1 Πειράματα 1^{ης} καλλιεργητικής περιόδου

Κατά την πρώτη καλλιεργητική περίοδο, οι αποδόσεις των ατομικών φυτών σε σπόρο κυμάνθηκαν σε παρόμοια, χαμηλά επίπεδα και για τις δύο πυκνότητες που εφαρμόστηκαν. Για το πείραμα των 80 cm, ο μέσος όρος της απόδοσης διαμορφώθηκε στα 3,61g ανά φυτό, ενώ για το πείραμα των 50 cm ανήλθε στα 4,71g ανά φυτό. Οι απώλειες για το πείραμα των 80cm ήταν κατά 4,6% μεγαλύτερες σε σχέση με το πείραμα των 50 cm. Οι μεγάλες τιμές της τυπικής απόκλισης και του συντελεστή παραλλακτικότητας (CV) αποτέλεσαν κοινά χαρακτηριστικά και για τα 2 πειράματα, αν και ο CV ήταν περίπου κατά 21% χαμηλότερος στο πείραμα των 50 cm (CV=140,42%) σε σχέση με αυτό των 80 cm (CV=161,71%). Οι τιμές CV αντανakλούν το επίπεδο επίδρασης του περιβάλλοντος στο γονότυπο (Taylor et al., 1999; Pan et al., 2003; Martin et al., 2005; Fasoula and Tokatlidis, 2012). Οι πολύ μεγάλες διακυμάνσεις ως προς την απόδοση των ατομικών φυτών -που κυμάνθηκαν από 0,1g έως 35g για το πείραμα των 80 cm και από 0,1g έως 34,1g για το πείραμα των 50 cm-, σε συνδυασμό με την μικρή απόδοση, οδήγησαν σε πολύ μεγάλες τιμές του CV. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στο πείραμα της επόμενης γενεάς. Τα υψηλά επίπεδα του CV δεν δικαιολογούνται από την ενδοπληθυσμιακή γενετική παραλλακτικότητα και συνεπώς, πιθανότατα οφείλονται στην πίεση από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η παρουσία φουζαρίου ή/και ιών που προσβάλλουν τη φακή.

Όπως προαναφέρθηκε για τις βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις, οι μεγάλες πυκνότητες μειώνουν την αναλογία των προσβεβλημένων φυτών και ευνοούν την ανάπτυξη υγιών κυρίως για τις προσβολές από ιούς (Jones, 2004· Kotzamanidis et al., 2009· Makkouk and Kumari, 2009). Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας ενισχύουν την παραπάνω διαπίστωση, αφού το ποσοστό των προσβεβλημένων (από φουζάριο ή/και ιούς) φυτών στο πείραμα των 80 cm ήταν κατά 4% μεγαλύτερο σε σχέση με το πείραμα των 50 cm.

Με βάση το παραπάνω κριτήριο, αν και το πείραμα των 50cm είχε μικρότερο CV (μικρότερη περιβαλλοντική επίδραση) αλλά και μεγαλύτερη μέση απόδοση, στο πείραμα των 80cm μεγιστοποιείται η φαινοτυπική διαφοροποίηση και γίνεται ευκολότερη η ανίχνευση ανεκτικών ή ανθεκτικών γονοτύπων, που αποτελεί προϋπόθεση για τη δημιουργία ανεκτικών ή ανθεκτικών ποικιλιών.

Η κατανομή συχνότητας της απόδοσης και για τα 2 πειράματα εμφάνισε αρνητική εκτροπή με το μεγαλύτερο μέρος των φυτών να κατατάσσεται στις χαμηλοαποδοτικές κλάσεις (σχήμα 1 και 2). Θεωρητικά, η κατανομή συχνότητας των αποδόσεων αναμένεται να είναι κανονική, συχνά όμως αποκλίνει από την κανονικότητα λόγω της έντονης επίδρασης περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως είναι οι βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις (Fasoula and Fasoula, 1997a). Όσο μεγαλύτερες είναι οι τιμές του CV τόσο μεγαλύτερες είναι οι χαμηλοαποδοτικές κλάσεις (Fasoula and Fasoula, 1997a). Προς την κατεύθυνση αυτή, τα αποτελέσματα από την αξιολόγηση 2 πληθυσμών φασολιού σε περιβάλλον θερμοκηπίου και χωραφιού κατέδειξαν ότι η κατανομή συχνότητας, τόσο της απόδοσης των ατομικών φυτών όσο και του αριθμού λοβών ανά φυτό, αποκλίνει από την κανονική κατανομή (Παπαδόπουλος, 2007). Στο θερμοκήπιο, λόγω περισσότερο ελεγχόμενων συνθηκών, οι τιμές του CV ήταν μικρότερες σε σχέση με το χωράφι.

Η επιλογή έγινε με βάση την απόδοση του ατομικού φυτού. Οι αποδόσεις των φυτών που επιλέχθηκαν κυμάνθηκαν για το πείραμα των 80 cm από 35g, για το φυτό που αποτέλεσε την οικογένεια 1^{ης} γενεάς με κωδικό 1, έως 21,5g για το φυτό που έδωσε την οικογένεια 15. Οι αποδόσεις αυτές ήταν πολύ υψηλότερες από τη μέση απόδοση του πληθυσμού (3,61g) (Πιν. 6). Για το πείραμα των 50 cm, οι αποδόσεις κυμάνθηκαν από 34,1g (1^η οικογένεια) έως 24,1g (15^η οικογένεια) ενώ ο μέσος όρος ήταν μόλις 4,71g (Πιν. 8). Παράλληλα, η επιλογή υψηλοαποδοτικών γονοτύπων αντιπροσωπεύει γονοτύπους που πιθανά διέφυγαν από ιολογικές και μυκητολογικές προσβολές.

4.2 Πείραμα 2^{ης} καλλιεργητικής περιόδου

Δεδομένου ότι τα αποτελέσματα της πρώτης χρονιάς πειραματισμού, έδειξαν ότι η μικρή πυκνότητα σποράς μεγιστοποιεί τη φαινοτυπική διαφοροποίηση και διευκολύνει τον εντοπισμό γονοτύπων με επιθυμητά γνωρίσματα όπως είναι η ανεκτικότητα-ανθεκτικότητα σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις, ο απογονικός έλεγχος των 30 οικογενειών πραγματοποιήθηκε κάτω από τη πυκνότητα των 80 cm. Κατά το δεύτερο έτος αξιολόγησης, όπως και το πρώτο, η απόδοση σε σπόρο κυμάνθηκε σε χαμηλά επίπεδα ενώ παράλληλα, ο συντελεστής παραλλακτικότητας παρουσίασε υψηλές τιμές.

Η χαμηλή μέση απόδοση (2,23g) μπορεί να αποδοθεί στην καταπόνηση από ανεπάρκεια εδαφικής υγρασίας κατά το μήνα Απρίλιο, όπου λαμβάνει χώρα η άνθιση και ο σχηματισμός των λοβών, καθώς το ύψος βροχόπτωσης ήταν ελάχιστο (Διάγραμμα 2). Σύμφωνα με τους Erskine and El Ashkar (1993), το κύριο χαρακτηριστικό που επηρεάζει σημαντικά την απόδοση των γονοτύπων και διαφέρει μεταξύ των ετών είναι το ύψος της βροχόπτωσης. Στις περιοχές γύρω από τη λεκάνη της Μεσογείου, όπου καλλιεργείται η φακή, το 80% της παραλλακτικότητας της απόδοσης σε σπόρο οφείλεται στο ετήσιο ύψος βροχόπτωσης.

Η ανάλυση του παραγωγικού δυναμικού της απόδοσης σε σπόρο έδειξε ότι από τις 30 οικογένειες οι 4 σημείωσαν αρκετά υψηλό δυναμικό απόδοσης ανά φυτό και ξεπέρασαν έως 44% (οικ. 24) τον αρχικό πληθυσμό, χωρίς οι διαφορές αυτές να διαφέρουν στατιστικά, ενώ οι υπόλοιπες υπολειπόταν έως και 59% (οικ.10) (Πιν. 11). Οι τιμές του συντελεστή ομοιόστασης των οικογενειών ξεπέρασαν έως και 54% (οικ.27) τον αρχικό πληθυσμό. Οι τιμές του CV ήταν πολύ υψηλές για την πλειοψηφία των οικογενειών και μόνο 8 υπολειπόταν του αρχικού πληθυσμού, γεγονός που σηματοδοτεί την υψηλή επίδραση του περιβάλλοντος (Πιν.12). Οι τιμές CV αντικατοπτρίζουν την επίδραση του περιβάλλοντος στην φαινοτυπική έκφραση μονογονοτυπικών ποικιλιών, όταν αυτές αξιολογούνται σε συγκρίσιμες συνθήκες (Fasoula and Fasoula, 1997a; Tokatlidis et al., 2010b).

Είκοσι δύο συνολικά οικογένειες σημείωσαν τιμές CV μεγαλύτερες του αρχικού πληθυσμού, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί είτε σε χαμηλά επίπεδα ομοιόστασης των οικογενειών αυτών (Fasoula and Tokatlidis, 2012) είτε σε ευαισθησία σε βιοτικές καταπονήσεις. Η οικογένεια 27 σημείωσε την υψηλότερη τιμή του συντελεστή ομοιόστασης καθιστώντας την περισσότερο σταθερή με

καλύτερη ομοιόσταση καθώς σε αυτή περιορίζεται η γενετική παραλλακτικότητα και πιθανά η ανεκτικότητα σε προσβολές.

Η οικογένεια 27 ξεχώρισε σημειώνοντας το υψηλότερο παραγωγικό δυναμικό, (έχοντας ταυτόχρονα και την υψηλότερη τιμή του συντελεστή ομοιόστασης), ξεπερνώντας κατά 154,8% τον αρχικό πληθυσμό. Ακολούθησε η οικογένεια 24 με 73,1%, η οικογένεια 20 με 56,3%, η οικογένεια 7 με 52,4% και τέλος η οικογένεια 26 με παραγωγικό δυναμικό που ξεπέρασε κατά 19,2% τον αρχικό πληθυσμό (Σχήμα 4).

Η οικογένεια 26 παρόλο που απέδωσε χαμηλότερα από τον αρχικό πληθυσμό, επιλέχθηκε για το παραγωγικό της δυναμικό με την εξίσωση Β. Πρόσφατη μελέτη σχετική με τη δημιουργία ανθεκτικών σε ιολογικές ασθένειες ποικιλιών φακής, απέδειξε ότι η επιλογή για ανθεκτικότητα σε ιολογικές ασθένειες μπορεί να γίνει έμμεσα, μέσω της επιλογής για αυξημένο παραγωγικό δυναμικό. Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα της μελέτης αποδεικνύουν ότι επιλεγθέντα φυτά με βάση την υψηλή απόδοση, ακόμη και όταν αυτά προέρχονται από οικογένειες με χαμηλή τιμή παραγωγικού δυναμικού, είναι απαλλαγμένα από ιολογικές προσβολές (Καργιωτίδου, 2012; Kargiotidou et al., 2013). Ο συντελεστής ομοιόστασης που αποτελεί συστατικό της εξίσωσης και είναι το αντίστροφο της τιμής CV, συντελεί καθοριστικά στην επιλογή. Με αυτό τον τρόπο, η εξίσωση λαμβάνει υπόψη όλους τους περιβαλλοντικούς παράγοντες που επιδρούν στο γονότυπο. Η εφαρμογή της εξίσωσης συνέβαλε στην επιτυχή απομόνωση υψηλοαποδοτικών γονοτύπων φακής σε περιβάλλον οργανικής γεωργίας (Βλαχοστεργίος, 2009; Vlachostergios et al., 2011b) και στη διάκριση και απομόνωση υβριδίων καλαμποκιού που συμπεριφέρονται ανεξάρτητα της πυκνότητας σποράς και αξιοποιούν αποτελεσματικότερα διαθέσιμους πόρους τόσο σε ευνοϊκά όσο και σε δυσμενή (χωρίς άρδευση) περιβάλλοντα (Tokatlidis et al., 2011a).

Στα πλαίσια επιλογής ανεκτικών σειρών βαμβακιού στο *Verticillium wilt*, ο Fasoulas (1998) ανέφερε την αξιοποίηση της κυψελωτής μεθοδολογία σε χαμηλή πυκνότητα σποράς. Η επιλογή σε μικρή πυκνότητα σποράς με κριτήριο την εξίσωση Β συμβάλλει σε υψηλή παραγωγικότητα και σταθερότητα συμπεριφοράς. Βελτιώνοντας το παραγωγικό δυναμικό σε επίπεδο ατομικού φυτού επιτυγχάνεται εξάλειψη της επίδρασης της πυκνότητας σποράς, αντοχή σε καταπονήσεις και αποτελεσματικότερη ανταπόκριση στις εισροές (Fasoula and Tokatlidis, 2012).

4.3 Μοριακές αναλύσεις δεικτών τύπου SSR

Στα πλαίσια ανίχνευσης πολυμορφισμών που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα της φακής στην ασθένεια της φουζαρίωσης και την πιθανή αξιοποίηση αυτών για την υποβοηθούμενη από μοριακούς δείκτες επιλογή, πραγματοποιήθηκαν SSR αναλύσεις με τη χρήση 10 δεικτών που έχουν στο παρελθόν αξιοποιηθεί σε μελέτες που αφορούν τη φακή. Συνολικά, αξιοποιήθηκαν 10 SSR δείκτες, εκ των οποίων οι 6 αποδείχθηκαν μονομορφικοί και συνεπώς, ακατάλληλοι για τη διάκριση γονοτυπικών διαφορών που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα των φυτών στην ασθένεια της φουζαρίωσης. Ταυτόχρονα, η έλλειψη υψηλών επιπέδων πολυμορφισμού, όπως αυτή αποκαλύφθηκε από τις αναλύσεις δεικτών τύπου SSR, αποτελεί ένδειξη για χαμηλή ενδοπληθυσμιακή παραλλακτικότητα. Το γεγονός αυτό ενισχύει την υπόθεση ότι το υψηλό CV πιθανότατα οφείλεται σε εξειδικευμένη ως προς τη φουζαρίωση διαφορική απόκριση των φυτών, καθιστώντας έτσι πιο αποτελεσματική την κατευθυνόμενη προς ανθεκτικότητα επιλογή.

Αναφορικά με τους δείκτες που βρέθηκαν πολυμορφικοί, και με εξαίρεση το δείκτη SSR 59-2, οι ανιχνευθέντες πολυμορφισμοί δε φαίνεται να σχετίζονται με τη γενετική ανθεκτικότητα των φυτών, αφού δεν κατέστη δυνατή η διάκριση των ταυτοποιημένων μαρτύρων που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα και ευαισθησία στη φουζαρίωση. Είναι αξιοσημείωτο βέβαια, το γεγονός ότι, με βάση τα πρότυπα ζωνών που πρόεκυψαν από τη χρήση των δεικτών SSR 19 και SSR 215, τα δείγματα 22-26 φαίνεται να ομαδοποιούνται και ταυτόχρονα, να διαχωρίζονται από τα υπόλοιπα δείγματα φυτών που μελετήθηκαν. Δεδομένου ότι στόχο της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η ανίχνευση πολυμορφισμών που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα της φακής στην ασθένεια της φουζαρίωσης, τα ευρήματα αυτά δε μπορούν να ερμηνευτούν επαρκώς. Αν και η ομαδοποίηση των φυτών 22-26 και η διάκριση τους από τα υπόλοιπα δείγματα, απαιτεί επιπρόσθετες αναλύσεις ώστε να προσδιοριστεί τυχόν συσχέτιση των παρατηρηθέντων πολυμορφισμών με αγρονομικά γνωρίσματα ενδιαφέροντος, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι τα δείγματα αυτά παρουσιάζουν ομοιότητα ως προς το χρόνο συγκομιδής και την υψηλή απόδοσή τους. Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα αυτά συγκομίσθηκαν ταυτόχρονα, κατά τη 2η συγκομιδή, υποδεικνύοντας πιθανή συσχέτιση των δεικτών αυτών με το χρόνο ωρίμανσης και με την υψηλή παραγωγικότητα. Παρά το γεγονός, ότι τα ευρήματα της παρούσας μελέτης δεν μπορούν να υποστηρίξουν επαρκώς την υπόθεση αυτή, η πιθανή

σύνδεση των συγκεκριμένων δεικτών με το γνώρισμα αυτό είναι ουσιώδους σημασίας και προφανώς χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα της SSR ανάλυσης χρησιμοποιώντας το δείκτη 59-2, συνάδουν με προηγούμενες έρευνες που αναφέρουν το δείκτη SSR 59-2 ως στενά συνδεδεμένο με την ανθεκτικότητα της φακής στο *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis* (Hamwieh et al., 2005). Στο πλαίσιο χαρτογράφησης μικροδορυφόρων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα της φακής στη φουζαρίωση, αξιοποιώντας έναν ήδη υπάρχοντα χαρτογραφημένο πληθυσμό, αναδείχθηκε η παρουσία του γονιδίου ανθεκτικότητας στο LG 6 καθώς και η σύνδεσή του με το δείκτη SSR 59-2 και τον δείκτη AFLP-p17m30710 στις αποστάσεις 8.0 cM και 3.5 cM, αντίστοιχα (Hamwieh et al., 2005). Αντίθετα, αντίστοιχες μελέτες άλλων ερευνητών οδήγησαν στην τοποθέτηση του δείκτη SSR 59 στο LG 4, χωρίς όμως να αναφέρεται η πιθανή σύνδεσή του με τη ανθεκτικότητα στο φουζάριο (Huyen et al., 2007). Προς την κατεύθυνση αυτή, η SSR ανάλυση χρησιμοποιώντας το συγκεκριμένο δείκτη διέκρινε επαρκώς τους ταυτοποιημένους μάρτυρες. Επίσης, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης παρέχουν ενδείξεις για την εύρεση μίας νέας πολυμορφικής ζώνης που προκύπτει από την εφαρμογή του δείκτη SSR 59-2 και πιθανότατα σχετίζεται με την γενετική ανθεκτικότητα στη φουζαρίωση.

Το γεγονός ότι το προφίλ των ζωνών για τα υπό μελέτη δείγματα δε συνάδει απόλυτα με τη βασιζόμενη στο φαινότυπο κατάταξη των φυτών, πιθανώς οφείλεται στη μη ακριβή φαινοτυπική αξιολόγηση και κατάταξη των φυτών, η οποία βασίστηκε σε μακροσκοπική παρατήρηση των συμπτωμάτων. Η έλλειψη δεδομένων που αφορούν στην ποσοτικοποίηση του παθογόνου, τόσο στα ασυμπτωματικά όσο και στα φαινοτυπικά υγιή φυτά, δύναται να οδηγήσει σε μεροληπτική εκτίμηση που πιθανώς επισκιάζει την ευαισθησία των γονοτύπων στην υπό μελέτη ασθένεια.

Στο σύνολό τους, τα ευρήματα των μοριακών αναλύσεων παρέχουν ενδείξεις για τη σύνδεση του δείκτη SSR 59-2 με την ανθεκτικότητα της φακής στη φουζαρίωση. Παρά το γεγονός ότι η εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση, αλλά και ακριβέστερη φαινοτύπιση, τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης αλλά και οι υπάρχουσες βιβλιογραφικές αναφορές συνηγορούν στη δυνατότητα αξιοποίησης του δείκτη αυτού για την υποβοηθούμενη από μοριακούς δείκτες έμμεση επιλογή (marker-assisted selection, MAS).

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Η μικρή πυκνότητα σποράς φαίνεται να μεγιστοποιεί τη φαινοτυπική διαφοροποίηση και συνεπώς, λειτουργεί ως αποτελεσματικότερο εργαλείο ανίχνευσης ανθεκτικών-ανεκτικών γονοτύπων.
2. Οι μεγάλες τιμές της τυπικής απόκλισης και το μεγάλο CV υποδηλώνουν τη μεγάλη φαινοτυπική διαφοροποίηση μεταξύ των γονοτύπων που επιτυγχάνεται μέσω της κυψελωτής μεθοδολογίας, ειδικότερα κατά τις πρώτες γενεές επιλογής.
3. Παρά το γεγονός ότι στον πειραματισμό επιδιώκεται η ελαχιστοποίηση των περιβαλλοντικών επιδράσεων, που συνεπάγεται μικρό CV, τα ευρήματα της παρούσας εργασίας υποδεικνύουν ότι το μεγάλο CV δύναται να αποκαλύψει τις ανεκτικές και ανθεκτικές οικογένειες.
4. Η εξίσωση B παρέχει τη δυνατότητα διάκρισης των οικογενειών με υψηλή παραγωγικότητα και ταυτόχρονη σταθερότητα συμπεριφοράς. Η μεγάλη τιμή της εξίσωσης B (LCYP) για την οικογένεια 27 οφείλεται κυρίως στον υψηλό δείκτη ομοιότητας, που έμμεσα αποτελεί δείκτη ανοχής-αντοχής στις βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις.
5. Μια μόνο γενεά επιλογής αρκεί για τη δημιουργία οικογενειών με μεγάλη υπεροχή συγκριτικά με το μάρτυρα, υποδεικνύοντας την αποτελεσματικότητα της επιλογής σε συνθήκες έλλειψης ανταγωνισμού καθώς και τη δυνατότητα ευχερούς διάκρισης των υποσχόμενων προς επιλογή γονοτύπων.
6. Η έλλειψη υψηλών επιπέδων πολυμορφισμού, όπως αυτή αποκαλύφθηκε από την ανάλυση δεικτών τύπου SSR, αποτελεί ένδειξη για χαμηλή ενδοπληθυσμιακή παραλλακτικότητα. Το γεγονός αυτό ενισχύει την υπόθεση ότι το υψηλό CV πιθανότατα οφείλεται σε εξειδικευμένη ως προς τη φουζαρίωση διαφορική απόκριση των φυτών, καθιστώντας έτσι πιο αποτελεσματική την κατευθυνόμενη προς ανθεκτικότητα επιλογή.
7. Παρά το γεγονός ότι ο δείκτης SSR 59-2, που έχει συνδεθεί με το γνώρισμα της ανθεκτικότητας στη φουζαρίωση, παρουσίασε πολυμορφισμό, το προφίλ των ζωνών δεν συνάδει απόλυτα με τη βασιζόμενη στο φαινότυπο κατάταξη των δειγμάτων.
8. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης παρέχουν ενδείξεις για την εύρεση μίας νέας πολυμορφικής ζώνης που προκύπτει από την εφαρμογή του δείκτη SSR

59-2 και πιθανότατα σχετίζεται με την γενετική ανθεκτικότητα στη φουζαρίωση.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abo-elwafa A, Murai K, Shimada T (1995) Intra- and interspecific variations in *Lens* revealed by RAPD markers. *TAG* 90:335–340
- Abraham A.D., W. Menzel, D.E. Lesemann, M. Varrelmann, H.J. Vetter (2006) Chickpea chlorotic stunt virus: a new polerovirus infecting cool-season food legumes in Ethiopia. *Phytopathology* 96(5); 437-446
- Acquaah G. (2007) *Principles of Plant Genetics and Breeding*. Blackwell Publishing, Malden, USA.
- Ahmad, M., A. G. Fautrier, and D. L. McNeil, (1996) Identification and genetic characterization of different resistance sources to *Ascochyta* blight within the genus *Lens*. *Euphytica* 97, 311-315.
- Allard R.W. (1960) *Principles of plant breeding*. John Wiley and Sons, New York
- Alvarez M.T., García P., Pérez De La Vega M. 1997. RAPD polymorphism in Spanish lentil landraces and cultivars. *Journal of Genetics and Breeding* 51: 91-96
- Andrahennadi, C.P.1994. Genetics and linkage of isozyme markers and resistance to seedborne *ascochyta* infection in lentil. M. Sc. Thesis, Department of Crop Science and Plant Ecology of Saskatchewan, Saskatchewan, SK.
- Atlin G.N., K. Frey (1989) Breeding crop varieties for low input agriculture. *American Journal of Alternative Agriculture* 4;53-58
- Babayeva S., Akparov Z., Abbasov M., Mammadov A., Zaifzadeh M., Street K. 2009. Diversity analysis of Central Asia and Caucasian lentil (*Lens culinaris* Medik.) germplasm using SSR fingerprinting. *Genetic Resources and Crop Evolution* 56: 293-298
- Barulina HI (1930) Lentils of the U.S.S.R. and other countries. *Bull Appl Bot Plant Breed (Leningrad)* 40(Suppl):1-319
- Bayaa B., W. Erskine & M. Singh, 1997. Screening lentil for resistance to fusarium wilt: methodology and sources of resistance. *Euphytica* 98: 69–74, 1997
- Bos L., R.O. Hampton, K.M. Makkouk (1988) Virus and virus diseases of pea, lentil, faba bean and chickpea. *World crop: cool season food legumes*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands pp: 591-615

- Brancourt-Hulmel M., E. Heumez, P. Pluchard, D. Beghin, C. Depatureaux, A. Giraud, and J. Le Gouis (2005) Indirect versus direct selection of winter wheat for low-input or high-input levels. *Crop Science* 45; 1427–1431
- Briggs, K.G. and L.H. Shebeski, 1968. Implications concerning the frequency of control plots in wheat breeding nurseries. *Can. J. Plant Sci.* 48: 149-153.
- Bussemakers A., I. Bos (1999) The effect of interplant distance on the effectiveness of honeycomb selection in spring rye. III. Accumulated results of five selection cycles. *Euphytica* 105; 229-237
- Ceccarelli S. (1989) Wide adaptation: How wide? *Euphytica* 40; 197-205
- Ceccarelli S. (1994) Specific adaptation and breeding for marginal conditions. *Euphytica* 77; 205-219
- Ceccarelli S. (1996) Adaptation to low/high input cultivation. *Euphytica* 92; 203-214
- Chatzoglou Th., I.S. Tokatlidis (2012) Short Communication. Decision on germplasm choice to apply breeding within a local population of common vetch is affected by crowding. *Spanish Journal of Agricultural Research* 10(3); 752-755
- Chen C., P. Miller, F. Muehlbauer, K. Neill, D. Wichman, K. McPhee (2006) Winter pea and lentil response to seeding date and micro- and macro-environments. *Agronomy Journal* 98; 1655-1663
- Chen W., A.K. Basandrai, D. Basandrai, S. Banniza, B. Bayaa, L. Buchwaldt, J. Davidson, R. Larsen, D. Rubiales, P.W.J. Taylor (2009) Diseases and their management. In “The lentil: Botany, production and uses” (Erskine W., Muehlbauer F.J., Sarker A., Sharma B.). CAB International pp.262-281
- Cubero, J.I. 1981. Origin, taxonomy and domestication. In Webb, C. and G. Hawtin (eds.) *Lentils* pp. 15-38. CAB International, U.K.
- Duran Y., Fratini R., Garcia P., Perez de la Vega M. 2004. An intersubspecific genetic map of *Lens*. *Theoretical and Applied Genetics* 108:1265-1273
- Erskine W., J. Isawi, K. Masoud (1990) Single plant selection for yield in lentil. *Euphytica* 48; 113-116
- Erskine W., Muehlbauer F.J. 1991. Allozyme and morphological variability, outcrossing rate and core collection formation in lentil germplasm. *Theoretical and Applied Genetics* 83: 119-125
- Erskine W., El Ashkar F. (1993) Rainfall and temperature effects on lentil (*Lens culinaris*) seed yield in Mediterranean environments. *Journal of Agricultural Science* 121; 347-354

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

Erskine W. (1996) Seed-size effects on lentil (*Lens culinaris*) yield potential and adaptation to temperature and rainfall in West Asia. *Journal of Agricultural Science* 126(3); 335-341

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

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

Erskine W., Chandra S., Chaudhry M., Malik I.A., Sarker A., Sharma B., Tufail M., Tyagi M.C. 1998. A bottleneck in lentil: widening its genetic base in South Asia. *Euphytica* 101: 207-211

Erskine W., A. Sharker (2004) Breeding. In "Lentil" pp.142-149 Elsevier

Eujal 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: 497-499

Eujal I., Baum M, Powell W, Erskine W, Pehu E (1998a) A genetic linkage map of lentil (*Lens sp.*) based on RAPD and AFLP markers using recombinant inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics* 97,83-89.

Fahim M., Dhanapala M.P., Senadhira D., Lawrence M.J. (1998) Quantitative genetics of rice II. A comparison of the efficiency of four breeding methods. *Field Crops Research* 55; 257-266

Falconer, D.S., 1989. Introduction to quantitative genetics. 3rd Edition Longman Group, London.

Fasoulas A., 1973. A new approach to breeding superior yielding varieties. Dept. Genet. Plant Breed. Aristotelian Univ., Thessaloniki, Greece. Publ. 3.42 pp.

Fasoulas A., 1978. Selection for yield in the absence of the masking effects of competition and soil heterogeneity. XIV Intern. Congr. Of Gen. Sections 21-32 p.75 Moscow.

Fasoulas A.C. (1981) Principles and methods of plant breeding. Dept. Gen. Plant Breeding Arist. Univ. Of Thessaloniki Greece Pub. No. 11

Fasoulas A.C. (1988) The honeycomb methodology of plant breeding. Dept. Gen. Plant Breeding Arist. Univ. Of Thessaloniki Greece

Fasoulas A.C. (1993) Principles of crop breeding. Dept. Gen. Plant Breeding Arist. Univ. Of Thessaloniki Greece

Fasoulas A.C., V.A. Fasoula (1995) Honeycomb selection designs. Plant Breeding Reviews 13; 87-139

Fasoula D.A., V.A. Fasoula (1997a) Competitive ability and Plant breeding. In J. Janick. Plant Breeding Reviews 14; 89-138

Fasoulas A.C. (1998) Building up resistance to Verticillium wilt in cotton through honeycomb breeding. Proceedings of the 2nd World Cotton Research Conference. 6-12 September 1998, Athens, Greece, pp 120-124

Fasoula V., D. Fasoula (2000) Honeycomb breeding: principles and applications. Plant Breeding Review 18; 177-250

Fasoula V.A., D.A. Fasoula (2002) Principles underlying genetic improvement for high and stable crop yield potential. Field Crops Research 75:191-209

Fasoula, V.A., and H.R.Boerma, 2005. Divergent selection at ultra-low plant density for seed protein and oil content within soybean cultivars. Field Crops Research 91: 217-229.

Fasoula V.A. (2006) Component analysis of the crop yield potential optimizes selection efficiency and unravels the evolution of the maize ideotype. Increasing efficiency of 146

Fasoula V.A. (2008) Two novel whole-plant field phenotyping equations maximize selection efficiency. Modern Variety Breeding for Present and Future Needs. Editorial Universidad Politecnica de Valencia, Spain p.361-365

Fasoula V.A., I.S. Tokatlidis (2012) Development of crop cultivars by honeycomb breeding. Agronomy for Sustainable Development 32 (1); 161-180

Ferguson M.E., Robertson L.D., Ford-Lloyd B.V., Newbury H.J., Maxted N. 1998. Contrasting genetic variation amongst lentil landraces from different geographical origins. Euphytica 102: 265-273

Ferguson M.E., Erskine W. 2000. Lentils (Lens L.). In Maxted N., Bennet S.J. (eds.) Plant Genetic Resources of Legumes in the Mediterranean. pp.125-131

Ferguson M.E., N. Maxted, M. van Slageren, L.D. Robertson (2000) A reassessment of the taxonomy of Lens Mill (Leguminosae, Papilionoideae, Vicieae). Botanical Journal Linnean Society 133; 41-59

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

Food & Agriculture Organization, FAO 2011

Ford R, Pang ECK, Taylor PWJ (1997) Diversity analysis and species identification in *Lens* using PCR generated markers. *Euphytica* 96:247–255

Ford R, Le Roux K, Itman C, Brouwer JB, Taylor PWJ (2002) Genome-specific sequence tagged microsatellite site (STMS) markers for diversity analysis and genotyping in *Pisum* species. *Euphytica* 124:397–405

Gardner, C.O. 1961. An evaluation of effects of mass selection and seed irradiation with thermal neutrons on yield of corn. *Cr. Sci.* 1: 241-245.

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

Gupta M., Verma B., Kumar N., Chahota R. K., Rathour R., Sharma S, K., Bhatia S, and Sharma T.R, 2012 Construction of intersubspecific molecular genetic map of lentil based on ISSR, RAPD and SSR markers. *J. Genet.* 91:279-287.

Haddad N.I. and F. J. Muehlbauer, 1981. Comparison of random bulk population and single seed descent methods for Lentil breeding *Euphytica* 30: 643-651

Hampton R.O., F.J. Muehlbauer (1977) Seed transmission of pea seed borne mosaic virus in lentils. *Plant Disease Reporter* 61; 235-238

Hamwiah A., Udupa S.M., Choumane W., Sarker A., Dreyer F., Baum M. 2005. A genetic linkage map of *Lens* sp. Based on microsatellite and AFLP markers and the localization of fusarium vascular wilt resistance. *Theoretical and Applied Genetics* 110:669-667

Havey M H, Muehlbauer F J (1989) Linkages between restriction fragment length, isozyme and morphological markers in lentil. *Theoretical and Applied Genetics* 77: 839–843

Helsper, J. D. F. G, 1998: Recent developments on the improvement of ANF levels in legume seeds by breeding. In: A. J. M. Jansman, G. D. Hill, J. Huisman, and A. F. B. Poel (eds), *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds and Rapeseed*, 351-365. CAB Int., Wallingford.

Horn N.M., Reddy S.V., Roberts I.M., Reddy D.V.R. (1993) Chickpea chlorotic dwarf virus, a new leafhopper transmitted geminivirus of chickpea in India. *Annals of Applied Biology* 122; 467-479

Horn N.M., Reddy S.V., van den Heuvel J.F.J.M., Reddy D.V.R. (1996) Survey of chickpea (*Cicer arietinum* L.) for chickpea stunt disease and associated viruses in India and Pakistan. *Plant Disease* 80; 286-290

- Howieson J.G., O'Hara G.W., S.J. Carr (2000) Changing roles for legumes in Mediterranean agriculture: developments from an Australian perspective. *Field Crops Research* 65; 107-122
- Hunt, J.S. & M.F. Barnes, 1982. *Euphytica* 31:341-348
- Huyen T. T. Phan, Simon R. Ellwood, James K. Hane, Rebecca Ford, Michael Materne, Richard P. Oliver (2007) Extensive macrosyteny between *Medicago truncatula* and *Lens culinaris* spp. *culinaris*. *Theor Appl Genet* 114:549-558
- Iqbal A., I.A. Khalil, N. Ateeq, M.S. Khan (2006) Nutritional quality of important food legumes. *Food Chemistry* 97; 331-335
- Janick J. (1999) Exploitation of heterosis: Uniformity and stability. In: *The Genetics and Exploitation of Heterosis in Crops*. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI. USA. pp. 319–333.
- Jin L, Jian-Ping G, Dong-Xu X, Xiao-Yan Z, Jing G, Xu-Xiao Z (2008) Analysis of genetic diversity and population structure in lentil (*Lens culinaris* Medik.) germplasm by SSR markers. *Acta Agron Sin* 34(11):1901-1909
- Jones R.A., Coutts B.A. (1996) Alfalfa mosaic and cucumber mosaic virus infection in chickpea and lentil: incidence and seed transmission. *Annals of Applied Biology* 129; 491-506
- Jones R.A. (2004) Using epidemiological information to develop effective integrated virus disease management strategies. *Virus Research* 100; 5-30
- Kamboj, R. K., M. P. Pandey, and H. S. Chaube, 1990: Inheritance of *Fusarium* vascular wilt in lentil resistance to *Fusarium* wilt in Indian lentil germplasm (*Lens culinaris* Medik.). *Euphytica* 50, 113-117
- Kargiotidou A., Chatzivassiliou E., Tzantarmas C., Sinapidou E., Papageorgiou A., Skaracis G.N., Tokatlidis I.S. (2013) Selection at ultra-low density identifies plants escaping virus infection and leads towards high-performing lentil (*Lens culinaris* L.) varieties. *Journal of Agricultural Science* pp. 1-10
- Karimizadeh R., M. Mohammadi (2010) AMMI adjustment for rainfed lentil yield trials in Iran. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 116(1); 66-73
- Katul L., H.J. Vetten, E Maiss, K.M. Makkouk, D.E. Lesemann, R. Casper (1993) Characterisation and serology of virus –like particles associated with faba bean necrotic yellows. *Annals of Applied Biology* 123; 629-647
- Khayrallah, W.A. 1981. The mechanization of lentil harvesting. In Webb, C. and G. Hawtin (eds.) *Lentils* pp.131-141. CAB International, UK
- Knott, D.R., 1972. Effects of selection for F2 plant yield on subsequent generation of wheat. *Can. J. Plant Sci.* 52, 721–726.

- Kotzamanidis S.T. and D.G. Roupakias, 2004. Plant density affects the reliability of using F1 and F2 yield to predict F3 yield in barley. *Austr. J. of Agric. Res.* 55(9): 961–965.
- Kotzamanidis S.T., A.S. Lithourgidis, D.G. Roupakias (2009) Plant density effect on individual plant to plant yield variability expressed as coefficient of variation in barley. *Spanish Journal of Agricultural Research* 7(3); 607-610
- Koutsika-Sotiriou, M.S., and Ch. A. Karagounis, 2005. Assessment of maize hybrids. *Maydica* 50:63-70.
- Kumari S.G., K.M. Makkouk, I.D. Ismail (1994) Seed transmission and yield loss induced in lentil (*Lens culinaris* Med.) by bean yellow mosaic potyvirus. *Lens Newsletter* 21; 42-44
- Kusmenoglou I., F.J. Muehlbauer (1998) Genetic variation for biomass and residue production in lentil (*Lens culinaris* Medik.). II Factor determining seed and straw yield. *Crop Science* 38; 911-915
- Kumari S.G., R. Larsen, K.M. Makkouk, M. Bashir (2009) Virus diseases and their control. In “The lentil: Botany, production and uses” (Erskine W., Muehlbauer F.J., Sarker A., Sharma B.). CAB International pp. 306-325
- Kyriakou D.T., A.C. Fasoulas (1985) Effects of competition and selection pressure on yield response in winter rye (*Secale cereale* L.). *Euphytica* 34; 883-895
- Ladizinsky G. (1979) The origin of lentil and its wild genepool. *Euphytica* 28; 179-187
- Ladizinsky G., Braun D., Goshen D., Muehlbauer FJ (1984). The biological species of the genus *Lens* L. *BotGaz* 145:253-261
- Laghetti G., Pignone D., Sonnante G. 2008. Statistical Approaches to analyse gene bank data using a lentil germplasm collection as a case study. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 73: 175-181
- Lulsdorf M.M., P.B.E. McVetty (1986) Comparison of honeycomb and independent culling of spaced plants for yield potential in faba bean. *Canadian Journal of Plant Science* 66; 483-489
- Makkouk K.M., O.I. Azzam (1986) Detection of broad bean stain virus in lentil seed groups. *Lens Newsletter* 13; 37-38
- Makkouk K.M., S.G. Kumari (1995) Transmission of broad bean stain comovirus and broad bean mottle bromovirus by weevils in Syria. *Journal of Plant Disease and Protection* 102; 136-139

Makkouk K.M., V. Damsteegt, L. Johnstone, L. Katul, D.E. Lesemann, S.G. Kumari (1997) Identification and some properties of soybean dwarf luteovirus affecting lentil in Syria. *Phytopathologia Mediterranea* 36; 135-144

Makkouk K.M., S.G. Kumari, J.dA. Hughes, V. Muniyappa, N.K. Kulkarni (2003) Other legumes: Faba bean, chickpea, lentil, pigeonpea, mungbean, blackgram, lima bean, horsegram, bambard ground nut and winged bean. In "Virus and virus-like diseases of major crops in developing countries" (Loebenstein G., Thottappilly G.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands pp 447-476

Manjarrez-Sandoval, P., Carter, T.E.Jr., Webb, D.M., J.W. Burton, 1997. RFLP genetic similarity estimates and coefficient of parentage as genetic variance predictors for soybean yield. *Crop Sci.* 37, 698-703.

Martin K.L., P.J. Hodgen, K.W. Freeman, R. Melchiori, D.B. Arnall, R.K. Teal, R.W. Mullen, K. Desta, S.B. Phillips, J.B. Solie, M.L. Stone, O. Caviglia, F. Solani, D.D. Francis, J.S. Schepers, J.L. Hatfield, W.R. Raun (2005) Plant to plant variability in corn production. *Agronomy Journal* 97; 1603-1611

McKenzie B.A., M. Andrews, G.D. Hill (2007) Nutrient and irrigation management. In "Lentil. An ancient crop for modern times" (S.S. Yadav, D. McNeil, P.C. Stevenson) Springer, Dordrecht, The Netherlands pp: 146

Moreno-Gonzalez J., Cubero J.I. (1993) Selection Methods. In: Haywar M.D., Romagosa I., Bosemark N.O. (Eds.). *Plant Breeding: Principles and Prospects* Chapman and Hall, London, UK., pp. 281-313.

Morrall, R.A.A.; Sheppard, J.W. 1981: Ascochyta blight of lentils in western Canada:1978-1980. *Can. Plant Disease Survey* 61: 7-13.

Muehlbauer FJ, Weeden NF, Hoffman DL (1989) Inheritance nad linkage relationships of morphological and isozyme loci in lentil (*Lens Miller.*) *J Hered* 80:298-303

Muehlbauer, F.J., W.J. Kaiser, S.L. Clement and R.J. Sumerfield. 1995. Production and breeding of lentil. *Adnances in Agronomy* 54:283-332

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

Muehlbauer F.J., M. Mihov, A. Vandenberg, A. Tullu, M. Materne (2009) In "The lentil: Botany, production and uses." (W. Erskine, F.J. Muehlbauer, A. Sarker, B. Sharma). CAB International pp.137-154

Murray, G.A., D. Eser, L.V. Gusta and G. Eteve. 1988. Winter- hardiness in pea, lentil, faba bean and chickpea. In Summerfield R.J. (ed.) *World crops: cool season food legumes* pp.831-843. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

Najar A., F.B. Othman, H. Boudhir, K.M. Makkouk, R. Zarouk, R. Bessai, S.G. Kumari (2000) *Viral diseases of cultivated legume and cereal crops in Tunisia*. *Phytopathologia Mediterranea* 39(3)

Nasir, M., and T. W. Bretag, 1997a: Pathogenic variability in Australian isolates of *Ascochyta faba* f. sp. *lentis*. *Aust. J. Plant Pathol.* 26, 217-220.

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

Nass H.G., 1979. Selecting superior spring wheat crosses in early generations. *Euphytica* 28:161-167.

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

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

Ntanos D.A., D. Roupakias (2001) Comparative efficiency of two breeding methods for yield and quality in rice. *Crop Science* 41; 345-350

Oosterom, E.J., Ceccarelli, S. 1993 Indirect selection for grain yield of barley in harsh Mediterranean environments *Crop Science* 33 (6) , pp. 1127-113

Pan X.Y., G.X. Wang, H.M. Yang, X.P. Wei (2003) Effect of water deficits on within plot variability in growth and grain yield of spring wheat in northwest China. *Field Crops Research* 80; 195-205

Pasini R.J., I. Bos (1990a) The effect of interplant distance on the effectiveness of honeycomb selection. I. Results of the first selection cycle. *Euphytica* 49; 121-130

Pasini R.J., I. Bos (1990b) The effect of interplant distance on the effectiveness of honeycomb selection. II. Results of the second selection cycle. *Euphytica* 50; 147-153

Phillips S.L., M.S. Wolfe (2005) Evolutionary plant breeding for low input systems. *Journal of Agricultural Science* 143; 245-254

Porta-Puglia, A., C. C. Bernier, G. J. Jellis, and W. J. Kaiser, 1994: Screening techniques and sources to foliar diseases caused by fungi and bacteria in cool season food legumes. In: F. J. Muehlbauer, and W. J. Kaiser (eds), *Expanding the Production and Use of Cool Season Food Legumes*. Kluwer Academic Publ., Dordrecht, .

Prevost A., Wilkinson M.J. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 107-112

Ranalli P., J.I. Cubero (1997) Bases for genetic improvement of grain legumes. *Field Crops Research* 53; 69-82

Reddy, R. Rathour, N. Kumar, P. Katoch and T. R. Sharma (2009) Cross-genera legume SSR markers for analysis of genetic diversity in *Lens* species. *Plant Breeding* 129, 514-518

Romagosa I. and P.N. Fox. 1993. Genotype x environment interaction and adaptation. Pp. 373-390. In M.D. Hayward, N.O. Bosemark & I. Romagosa (eds.) *Plant Breeding: Principles and prospects*. Chapman & Hall, London.

Rongwen J, Akkaya MS, Bhagwat AA, Lavi U, Cregan PB (1995) The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theoretical and Applied Genetics* 90:43–48

Roupakias D., A. Zesopoulou, S. Kazolea, G. Dalkalitses, A. Mavromatis, T. Lazaridou (1997) Effectiveness of early generation selection under two plant densities in faba bean (*Vicia faba* L.). *Euphytica* 93; 63-70

Rubeena P. W. J. Taylor, P. K. Ades and R. Ford (2006) QTL mapping of resistance in lentil (*Lens culinaris* ssp. *culinaris*) to ascochyta blight (*Ascochyta lentis*) *Plant Breeding* 125, 506-512

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

Russell, A. C., 1994: Three new pulse cultivars for New Zealand's arable industry. *Proc. Annu. Conf. Agron. Soc. N. Z.* 24, 125-128.

Sandhu J.S., S. Singh (2007) History and origin. In "Lentil. An ancient crop for modern times" (S.S. Yadav, D. McNeil, P.C. Stevenson) Springer, Dordrecht, The Netherlands pp: 4-6

Sarker A., A. Aydogan, S.H. Sabaghpour, I. Kusmenoglu, B. Sakr, W. Erskine, F.J. Muehlbauer (2004) Lentil Improvement for the benefit of highland farmers.

Sarker A., W. Erskine (2006) Recent progress in the ancient lentil. *Journal of Agricultural Science* 144; 1-11

- Sarker A., A. Aydogan, S. Chandra, M. Kharrat, S. Sabaghpour (2009) Genetic enhancement for yield and yield stability. In "The lentil: Botany, production and uses" (Erskine W., Muehlbauer F.J., Sarker A., Sharma B.). CAB International pp. 102-120
- Saxena , M.C., Hawtin G.C. (1981). Morphology and growth pattern. In Webb C. and Hawtin G. (eds.) Lentils, CAB International, U.K, pp. 39-52
- Saxena, M.C., (1981). Agronomy of lentils. In Webb C. and Hawtin G. (eds.) Lentils, CAB International, U.K.,pp. 111-129
- Setti B, Bouznad Z (1998), Fusarium root rot and wilt of lentil in Western Algeria. In Proceeding of the 3rd European Conference on Grain and Legumes, 14-19 November, Valladolid, Spain, AEP (Eds), 254 p.
- Sharma S.K., Dawson I.K., Waugh R. 1995. Relationships among cultivated and wild lentils revealed by RAPD analysis . Theoretical and Applied Genetics 91: 647-654
- Sharma S.K., Knox M.R., Ellis T.H.N. 1996. AFLP analysis of the diversity and phylogeny of Lens and its comparison with RAPD analysis. Theoretical and Applied Genetics 93: 751-758
- Sinebo W., Gretzmacher R., Edelbauer A. (2002) Environment of selection for grain yield in low fertilizer input barley. Field Crops Research 74; 151-162
- Singh, K.B., 1987. Chickpea breeding. pp. 127. In: The chickpea. M.C. Saxena and K.B.
- Singh, J.P. & Singh, 1990. Indian Journal of Pulses Research 3:132-135
- Singh, M., S. Ceccarelli and J. Hamblin, 1993. Estimation of heritability from varietal trials data. Theor Appl Genet 86:437-441
- Singh, I. S., J. P. Singh, A. K. Singh, and M. P. Chauhan, 1994: Pant Lentil 4: a high yielding, rust-, wilt- and blight-resistant variety for the North-Western Plains of India. Lens Newsl. 21, 8-9.
- Singh, S.P. 1995 Selection for water-stress tolerance in interracial populations of common bean Crop Science 35 (1) , pp. 118-124
- Singh R.P., S. Rajaram, A. Miranda, J. Huerta-Espino, E. Autrique (1998) Comparison of two crossing and four selection schemes for yield, yield traits, and slow rusting resistance to leaf rust in wheat. Euphytica 100; 35-43
- Sinha, R.P.& B.P. Yadav, 1989. LENS 16:41
- Slinkard, A.E. (1978). Fallow vs. stubble culture of lentils. Lens 5:27

- Solanki I.S., Shyam S. Yadav, P.N. Bahl, 2007. In: S.S. Yadav et al. (eds.), *Lentil: Ancient Crop for Modern Times*, 255–274.
- Solh, M. and W. Erskine, 1981. Genetic Resources. In: C. Webb & G.C. Hawtin (Eds). pp. 54–67. Common Wealth Agricultural Bureaux, Slough, U.K
- Sonante G., Pignone D. 2001. Assessment of genetic variation in a collection of lentil using molecular tools. *Euphytica* 120: 301-307
- Sonnante G., Pignone D. 2007. The major Italian landraces of lentil (*Lens culinaris* Medik.): Their molecular diversity and possible origin. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54: 1023-1031
- Spooner D., van Treuen R., de Vicente M. C. 2005. *Molecular Markers for Genebank Management*, IPGRI
- Steel R.G.D., Torrie J.H. (1980) *Principles and procedures of statistics: a biometrical approach*. New York: McGROW-HILL, 1980
- Sultana T., Ghafoor A. 2008. Genetic Diversity in ex-situ Conserved *Lens culinaris* for Botanical Descriptors, Biochemical and Molecular Markers and Identification of Landraces from Indigenous Genetic Resources of Pakistan. *Journal of Integrative Plant Biology* 50: 484-490
- Tadmor Y, Zamir D, Ladizinsky G (1987) Genetic mapping of an ancient translocation in the genus *Lens*. *Theoretical and Applied Genetics* 73:883–892
- Tahir M, Muehlbauer FJ (1994) Gene mapping in lentil with recombinant inbred lines. *Journal of Heredity* 85:306–310
- Tahir M, Simon CJ, Muehlbauer FJ (1993) Gene map of lentil: A review. *Lens Newsletter* 20:3–10
- Tay,J, and Slinkard, A. E. (1989). Transgressive segregation for *Ascochyta* resistance in lentil. *Canadian Journal of Plant Sciences*, 69:547.
- Taylor P., K. Lindbeck, W. Chen, R. Ford (2007) Lentil diseases. In “*Lentil. An ancient crop for modern times*” (S.S. Yadav, D. McNeil, P.C. Stevenson) Springer, Dordrecht, The Netherlands pp: 307-308
- Taylor S.L., M.E. Payton, W.R. Raun (1999) Relationship between mean yield, coefficient of variation, mean square error and plot size in wheat field experiments. *Communication in Soil Science and Plant Analysis* 30(9-10); 1439-1447
- Tokatlidis I.S., Tsialtas I.T. (2008) Comparative analysis of two crop yield potential models based on yield potential per plant of maize and bread wheat genotypes. *Asian Journal of Plant Sciences* 7(3); 241-250

- Tokatlidis I.S. (2000) Variation within maize lines and hybrids in the absence of competition and relation between hybrid potential yield per plant with line traits. *Journal of Agricultural Science* 134; 391-398
- Tokatlidis I.S., I.I. Papadopoulos, D. Baxevanos, O. Koutita (2010b) Genotype x Environment effects on single plant selection at low density for yield and stability dry bean population. *Crop Science* 50; 775-783
- Toker C., Yadav S.S., Solanki I.S. (2007) Mutation Breeding. In “Lentil. An ancient crop for modern times” (S.S. Yadav, D. McNeil, P.C. Stevenson) Springer, Dordrecht, The Netherlands pp: 210
- Toklu F., T. Karakoy, E. Hakli, T. Bicer, A. Brandolini, B. Kilian, H. Ozkan (2009a) Genetic variation among lentil (*Lens culinaris* Medik) landraces from Southeast Turkey. *Plant Breeding* 128; 178-186
- Toklu F., Karaköy T., Hakli E., Bicer T., Brandolini A., Kilian B., Özkan H. 2009b. Genetic variation among lentil (*Lens culinaris* Medik.) landraces from Southeast Turkey. *Plant Breeding* 128: 178-186
- Tullu, A., L. Buchwaldt, T. Warkentin, B. Taran & A. Vandenberg, (2003). Genetics of resistance to anthracnose and identification of AFLP and RAPD markers linked to the resistance gene in PI 320937 germplasm of lentil (*Lens culinaris* Medikus). *Theor Appl Genet* 106: 428-434
- Tullu A., Taran B., Breikreutz C., Buchwaldt L., Banniza S., Warkentin T.D., Vandenberg A. 2006. A quantitative-trait locus for resistance to ascochyta blight (*Ascochyta lentis*) maps close to a gene for resistance to anthracnose (*Colletotrichum truncatum*) in lentil *Canadian Journal of Plant Pathology* 28 : 588-595
- Tullu A., Taran B., Warkentin T., Vandenberg A. 2008. Construction of an Intraspecific Linkage Map and QTL Analysis for earliness and Plant Height in Lentil. *Crop Science* 48: 2254-2264
- Urbano G., J.M. Porres, J. Frias, C.N. Vidal-Valverde, S.S. Yadav, D.L. McNeil *et al.* Nutritional value lentil, Springer, Netherlands (2007), pp. 47–93)
- Vaillancourt RE, Slinkard AE (1993) Linkage of morphological and isozyme loci in lentil, *Lens culinaris* L. *Canadian Journal of Plant Science* 73:917–926
- Van Oss H., Y. Aron, G. Ladizinsky (1997) Chloroplast DNA variation and evolution in the genus *Lens* Mill. *Theoretical and Applied Genetics* 94; 452-457
- Varshney RK, Graner A, Sorrells ME. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnol.* 2005;23(1):48–55
- Veteläinen M., Negri V., Maxted N., 2009 Bioversity Technical Bulletin No. 15. European Landraces: On-farm conservation, management and use

Vlachostergios, D.N., Roupakias, D.G. 2008 Response to conventional and organic environment of thirty-six lentil (*Lens culinaris* Medik.) varieties *Euphytica* 163 (3) , pp. 449-45

Vlachostergios, D.N., Lithourgidis, A.S., Dordas, C.A., Baxevanos, D. 2011 Advantages of mixing common vetch cultivars developed from conventional breeding programs when grown under low-input farming system *Crop Science* 51 (3) , pp. 1274-1281

Weeden, N. F., and G. A. MARX, 1987 Further genetic analysis and linkage relationships of isozyme loci in the pea. Confirmation of the diploid nature of the genome. *J. Hered.* 78:153-159

Weeden NF, Muehlbauer FJ, Ladizinsky G (1992) Extensive conservation of linkage relationship between pea and lentil genetic maps. *Journal of Heredity* 83:123–129

Williams J.T., Sanchez A.M.C., M.T. Jackson, 1974. Studies on lentils and their variation. The taxonomy of the species. *Sabrao J.* 6:133-145

Winter P, Pfaff T, Udupa SM, Huettel B, Sharma PC, Sahi S, Arreguin-Espinoza R, Weigand F, Muehlbauer FJ, Kahl G (1999) Characterization and mapping of sequence-tagged microsatellite sites in the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome. *Molecular and General Genetics* 262:90–101

Ye, G., D. L. McNeil and G. D. Hill (2000). Breeding for resistance to lentil *Ascochyta* blight. *Plant Breeding* Volume 121 Issue 3 Page 185-191

Yenish J.P., J. Brand, M. Pala, A. Haddad (2009) Weed management. In “The lentil: Botany, production and uses” (Erskine W., Muehlbauer F.J., Sarker A., Sharma B.). CAB International pp. 326-342

Yüzbasioğlu E., Özcan S., Acik L. 2006. Analysis of genetic relationships among Turkish and breeding lines of *Lens culinaris* Mestile using RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 507-514

Zamir D, Ladizinsky G (1984) Genetics of allozyme variants and linkage groups in lentil. *Euphytica* 33:329–336

Zohary D., Hopf M. 2000. Domestication of Plants in the Old World, third edition, Oxford: University Press, New York, pp.116

Βελλής, E., 2006. Σύγκριση των πρώτων γενεών επιλογής στο παραγωγικό δυναμικό, στην ετέρωση και στην ανταπόκριση στις εισροές στο σκληρό σιτάρι (*Triticum turgidum* L. var *durum*). Μεταπτυχιακή διατριβή. Εργαστήριο Γενετικής και Βελτίωσης Φυτών Α.Π.Θ.

Βλαχοστέργιος Δ. (2009) Μελέτη συστημάτων επιλογής ποικιλιών φακής (*Lens culinaris* Medik.) κατάλληλων για οργανική γεωργία. Διδακτορική Διατριβή, Α.Π.Θ. Θεσ/νίκη.

Ηλιάδης, Κ. (1992β). Φακή. Υπουργείο Γεωργίας, Έκδοση Διεύθυνσης Γεωργικών Εφαρμογών, Αθήνα. Έντυπο, σελ.51

Ηλιάδης Κ. (2002) Η καλλιέργεια των «ξηρικών οσπρίων» στην Ελλάδα. Παραδοσιακά προϊόντα που έγιναν εισαγόμενα. Ινστιτούτο Κτηνοτροφικών Φυτών και Βοσκών, ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε. Μάιος 2002

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. Διδακτορική Διατριβή, Δ.Π.Θ. Ορεστιάδα.

Κοπαράνης, Θ., Κ. Μπλαδενόπουλος, και Μ.Σ. Κούτσικα-Σωτηρίου, 2006. Επίδραση του συμβατικού και βιολογικού τρόπου καλλιέργειας στα χαρακτηριστικά παλαιών και νέων ποικιλιών κριθής (*H. vulgare* H.) και εκτίμηση του παραγωγικού δυναμικού αυτών. Γεωργική Έρευνα.

Παπαδόπουλος Ι. (2007) Μελέτη της αλληλεπίδρασης γενοτύπου-περιβάλλοντος στο κοινό φασόλι (*Phaseolus vulgaris* L.) με επιλογή και απογονικό έλεγχο σε συνθήκες θερμοκηπίου και υπαίθρου. Διδακτορική Διατριβή, Δ.Π.Θ. Ορεστιάδα.

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

Τζουραμάνη Ε., Ναβρούζογλου Π., Σιντόρη Αλ., Λιοντάκης Αγ., Παπαευθυμίου Μ., Καρανικόλας Π., Αλεξόπουλος Γ., Φακή. Ινστιτούτο Γεωοικονομικών και Κοινωνιολογικών Ερευνών, ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε., Οκτώβριος 2008

<http://vir.nw.ru>

http://www.ismc.gr/pdf/2_Blaxostergios.pdf