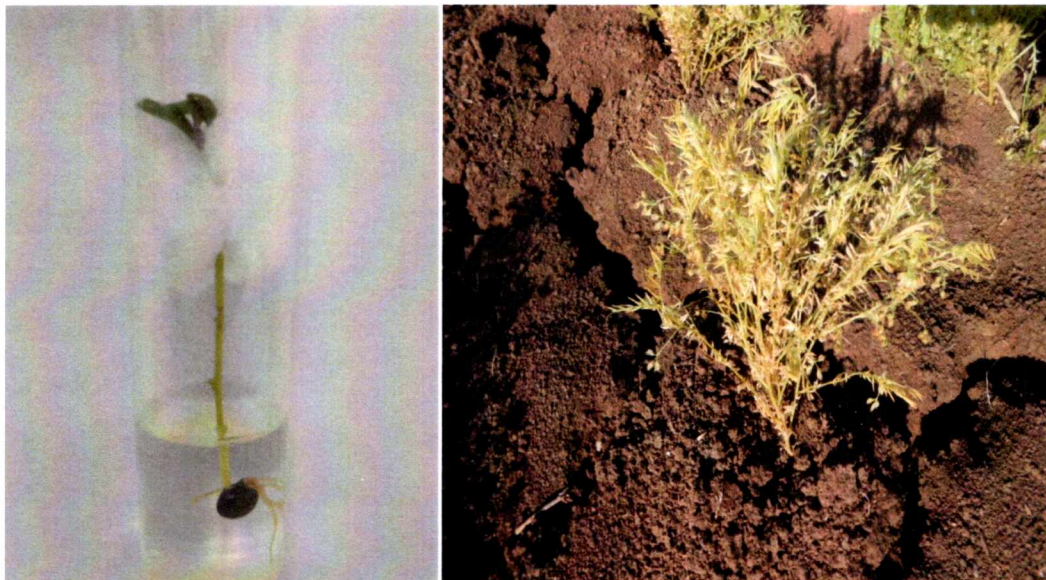


ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΘΕΜΑ: «In vitro αξιολόγηση γενοτύπων φακής και εφαρμογή τεχνικών
μοριακής βελτίωσης για ανθεκτικότητα στο *Fusarium oxysporum* f. sp.
lentis»**



ΑΓΓΕΛΟΠΟΥΛΟΣ ΒΑΣΙΛΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΒΕΛΛΙΟΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ

ΒΟΛΟΣ 2014



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ & ΚΕΝΤΡΟ ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 13513/1
Ημερ. Εισ.: 22/01/2015
Δωρεά: Συγγραφέα
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ-ΦΠΑΠ
2014
ΑΓΓ

Πτυχιακή Διατριβή

In vitro αξιολόγηση γενοτύπων φακής και εφαρμογή τεχνικών μοριακής βελτίωσης για ανθεκτικότητα στο *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*

Αγγελόπουλος Βασίλης

Τριμελής Επιτροπή

Επιβλέπων

Βέλλιος Ευάγγελος, Επίκουρος καθηγητής Φυτοπαθολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μέλη

Μαυρομάτης Αθανάσιος, Επίκουρος Καθηγητής Γενετικής Βελτίωσης Φυτών και Βιοτεχνολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Χα Αβραάμ Ιμπραήμ, Καθηγητής Σποροπαραγωγής και Τεχνολογίας Σπόρου, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Φτάνοντας στο τέλος της παρούσας πτυχιακής διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω τους εξής ανθρώπους:

Τον κ. Μαυρομάτη Α., επίκουρο καθηγητή του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, την καθοδήγηση και υποστήριξη του καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές του.

Τον κ. Βέλλιο Ε., επίκουρο καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την επίβλεψη της διατριβής στο υπόλοιπο διάστημα, την άψογη συνεργασία και για τις γνώσεις που μου παρείχε.

Τον κ. Χα Α., καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τη συμμετοχή του στην επιτροπή καθώς και για τη διόρθωση της εργασίας.

Τον κ. Βλαχοστρέγιο Δ., ερευνητή του Ινστιτούτου Κτηνοτροφικών Φυτών και Βοσκών Λάρισας, για τη συμβολή του στην πτυχιακή διατριβή και την άριστη συνεργασία που είχαμε όλο αυτό το διάστημα.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω από το εργαστήριο Γενετικής και Βελτίωσης Φυτών, την κ. Πανάγου Μίνα για τη συνεχή βοήθειά της και την αμέριστη υποστήριξη της. Επίσης, τις ευχαριστίες μου στην κ. Παυλή Ουρανία, λέκτορα Γενετικής και Βελτίωσης Φυτών και τη Φώτη Χρύσα, υποψήφια διδάκτορα του εργαστηρίου για τις συμβουλές και την εκμάθηση των μοριακών τεχνικών. Από το εργαστήριο Φυτοπαθολογίας θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Παναγιωτάκη Λιάνα για τη βοήθεια και τις συμβουλές της καθώς και τη Λίνα Κασσαβέτη, μεταπτυχιακή φοιτήτρια του εργαστηρίου.

Τέλος οι θερμές ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου για την υποστήριξη τους και τη βοήθεια τους να ολοκληρώσω τις σπουδές μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	6
Abstract.....	7
1. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ.....	8
1.1 Το είδος <i>Lens culinaris</i>	8-9
1.2 Σπουδαιότερες μυκητολογικές ασθένειες φακής.....	10-11
1.3 Φουζαρίωση Φακής.....	11
1.3.1 Συμπτώματα.....	11-13
1.3.2 Παθογόνο αίτιο.....	13-16
1.3.3 Καταπολέμηση της ασθένειας.....	16-17
1.4 Βελτίωση για ανθεκτικότητα σε ασθένειες.....	17
1.4.1 Γενετική ανθεκτικότητα των φυτών σε ασθένειες.....	17
1.4.1.1 Τύποι γενετικής ανθεκτικότητας και εύρεση γονιδίων ανθεκτικότητας.....	17-20
1.4.1.2 <i>In vitro</i> επιλογή σωματοκλωνικών προϊόντων για ανθεκτικότητα σε ασθένειες.....	20-21
1.4.2 Βελτίωση φακής για ανεκτικότητα-ανθεκτικότητα στην προσβολή από φυτοπαθογόνους μύκητες.....	21-25
1.4.3 Βελτίωση φακής για ανθεκτικότητα στο φουζάριο.....	26-29
1.4.4 Μοριακή Βελτίωση της φακής και εύρεση μοριακών δεικτών για ανθεκτικότητα στο φουζάριο.....	30-33
1.5 Σκοπός πτυχιακής διατριβής.....	34
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	35
2.1 Φυτικό υλικό.....	35
2.2 Απομόνωση παθογόνου και συνθήκες καλλιέργειας του μύκητα.....	35-40

2.3 In vitro αξιολόγηση της αντίδρασης των γενοτύπων φακής στο φουζάριο	41-43
2.4 Εφαρμογή του μοριακού δείκτη SSR 59-2 για εύρεση ανθεκτικών φυτών στο <i>Fusarium oxysporum f.sp. lentis</i>	44
2.4.1 Συλλογή δειγμάτων	44-45
2.4.2 Εξαγωγή DNA	45
2.4.3 Αντίδραση PCR	46-47
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	48
3.1 Απομόνωση και ταυτοποίηση του <i>Fusarium oxysporum f. sp. lentis</i>	48
3.2 Αποτελέσματα της in vitro αξιολόγησης των γενοτύπων φακή	49-56
3.3 Μοριακός δείκτης SSR 59-2	57
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	58
4.1 <i>Fusarium oxysporum f. sp. lentis</i>	58
4.2 In vitro αξιολόγηση γενοτύπων φακής	59
4.3 Μοριακή ανάλυση δείκτη SSR 59-2	61
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	62
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	63-67

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ένας από τους κυριότερους παράγοντες οικονομικών απωλειών στην καλλιέργεια της φακής είναι ο μύκητας *Fusarium oxysporum f. sp. lentis* που προκαλεί την ασθένεια της φουζαρίωσης. Τα τυπικά συμπτώματα της ασθένειας είναι ο καφέ αποχρωματισμός του αγγειακού συστήματος, η χλώρωση και η ξήρανση των φυτών. Προσπάθειες γίνονται τόσο μέσω της κλασικής βελτίωσης όσο και με τη χρήση μοριακών και βιοτεχνολογικών μεθόδων για την ανάπτυξη ανθεκτικών φυτών απέναντι στο μύκητα. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να εκτιμηθεί η ανθεκτικότητα τεσσάρων γενοτύπων φακής και συγκεκριμένα των ποικιλιών ILL 590 και ILL 6031 και των δύο F₃ γενεών Αθηνά x 590 και Σάμος x 590 των οποίων η ανθεκτικότητα στο μύκητα ήταν άγνωστη αλλά και η αξιοποίηση του μοριακού δείκτη SSR 59-2 για την ανάλυση του μοριακού προφίλ ανθεκτικών και ευαίσθητων φυτών. Για την διερεύνηση των παραπάνω πραγματοποιήθηκε *in vitro* αξιολόγηση των τεσσάρων γενοτύπων φακής υπο ελεγχόμενες συνθήκες στο εργαστήριο. Από κάθε γενότυπο αξιολογήθηκαν 10 φυτά σε δοκιμαστικούς σωλήνες, των οποίων οι ρίζες εμβαπτίστηκαν σε εναιώρημα σπορίων του *Fusarium oxysporum f. sp. lentis* και καταγράφονταν ανά συγκεκριμένο χρονικό διάστημα η εκδήλωση των συμπτωμάτων τους. Επιπλέον, συλλέχθηκαν δείγματα από την ποικιλία ILL 590, την ILL 6031, ένα φαινοτυπικά ευαίσθητο φυτό και ένα φαινοτυπικά ανθεκτικό φυτό από πειραματικό τεμάχιο με κυψελωτή διάταξη του I.K.Φ&B.Λ. και στα οποία εφαρμόστηκε ο μοριακός δείκτης SSR 59-2. Τα αποτελέσματα της *in vitro* αξιολόγησης έδειξαν ότι η ILL 590 είναι μετρίως ευαίσθητη, η ILL 6031 είναι ευαίσθητη ενώ η Αθηνά x 590 και Σάμος x 590 χαρακτηρίζονται ως μετρίως ανθεκτικές. Η ανάλυση με το μοριακό δείκτη αποκάλυψε μια ζώνη μεγέθους 175 bp η οποία παρατηρήθηκε στο φαινοτυπικά ευαίσθητο φυτό και να ενδεχομένως σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στη φουζαρίωση.

ABSTRACT

One of the most important factors of economic losses in lentil is the fungus *Fusarium oxysporum f. sp. lentis* that causes the disease lentil wilt. The typical symptoms of the disease are vascular discoloration and unilateral or total wilting. Efforts are being made in order to develop resistance in the fungus through classical breeding and through the use of molecular and biotechnological tools. The objectives of the present study was to examine the resistance of four lentil genotypes and specifically the cultivars ILL 590, ILL 6031 and the two F₃ generations Αθηνά x 590 and Σάμος x 590 as well as the molecular marker SSR 59-2 was used so as to analyze the molecular profile of resistant and susceptible plants. Therefore, an *in vitro* assessment was conducted under controlled conditions in the laboratory. 10 plants were assessed from every genotype in test tubes whose roots were dipped in a spore suspension of *Fusarium oxysporum f. sp. lentis* and the symptoms were recorded. Moreover, samples from ILL 590, ILL 6031, one resistant and one susceptible plant based on phenotype, were collected from N.AG.RE.F in Larisa and the molecular marker SSR 59-2 was applied on them. The results of the *in vitro* assessment showed that the cultivar ILL 590 is medium susceptible, ILL 6031 is susceptible and Αθηνά x 590 and Σάμος x 590 are medium resistant. The analysis with the molecular marker revealed a band of 175 bp size and it was observed in the susceptible plant based on the phenotype and might be connected with the resistance to lentil wilting.

1. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

1.1 Το είδος *Lens culinaris*

Το επιστημονικό όνομα της φακής είναι *Lens culinaris(L.) Medik.subsp.culinaris*. Η καλλιεργούμενη φακή προέρχεται από την Εγγύς Ανατολή και τη Μικρά Ασία ωστόσο η καλλιέργεια της διαδόθηκε γρήγορα από την περιοχή της Νότιας Τουρκίας στη περιοχή του Νείλου, στην Ελλάδα και στην Κεντρική Ευρώπη.

Η φακή είναι μία από τις πιο σημαντικές καλλιέργειες των οσπρίων σε πολλές χώρες του κόσμου. Η χώρα που παράγει τη μεγαλύτερη ποσότητα φακής είναι η Ινδία, έπειτα ακολουθεί η Τουρκία και ο Καναδάς και σε μεγάλη απόσταση έπονται η Αυστραλία, το Νεπάλ, η Κίνα, η Συρία, το Μπαγκλαντές, οι Η.Π.Α, το Ιράν, η Αιθιοπία, η Ισπανία και το Πακιστάν. Σε αυτές τις χώρες ,η παραγωγή κυμαίνεται από 637 έως 1263 kg/ha ενώ η υψηλότερη παραγωγή είναι 5000 kg/ha και καταγράφηκε στη Γερμανία.

Όσον αφορά την Ελλάδα, η καλλιέργεια της φακής έχει περιορισθεί αρκετά με αποτέλεσμα οι ανάγκες να καλύπτονται με εισαγωγές από άλλες χώρες όπως η Τουρκία και ο Καναδάς. Συγκεκριμένα, η μέση απόδοση της Ελλάδας για το 1998 ανέρχεται σε 124 kg/στρέμμα. Η χρησιμοποίηση όμως βελτιωμένων ποικιλιών και κατάλληλης καλλιεργητικής τεχνικής είναι σε θέση να αυξήσουν την απόδοση στα 250 kg/στρέμμα. (Βασιλάκου, Διατριβή)

Τα είδη *Lens culinaris(L.) Medikus* έχουν τρία άγρια υποείδη: το *Lens culinaris spp.orientalis*, το *Lens culinaris spp odemensis* και το *Lens culinaris spp tomantosus* (Ferguson et al., 2000). Ανάμεσα σε αυτά τα είδη το είδος *Lens culinaris spp.orientalis* , θεωρείται ο πρόγονος της καλλιεργούμενης φακής. Τα άλλα τρία άγρια είδη είναι το

L. ervoides, το *L. nigricans* και το *L. lamottei* τα οποία κατανεμήθηκαν στην δυτική Ασία, τη βόρεια Αφρική και στις μεσογειακές χώρες (Ladizinsky, 1993).

Από μορφολογικής άποψης έχει αποδειχθεί ότι το άγριο είδος *Lens culinaris* ssp.*orientalis* είναι πολύ στενά όμοιο με το *Lens culinaris* και πιθανόν να είναι όντως ο πρόγονός του, ενώ το *L.nigricans* παρουσίασε αρκετές διαφορές από το *Lens culinaris* και το *Lens culinaris* ssp.*orientalis*. Με βάση όμως με την ικανότητα της διασταύρωσης και την γονιμότητα των υβριδίων, τα διάφορα μέλη του γένους *Lens* συγκαταλέγονται σε δύο βιολογικά είδη, στο *Lens culinaris* και στο *Lens nigricans* (Ladizinsky et al., 1984).

Η φακή είναι ετήσιο, αυτογονιμοποιούμενο, διπλοειδές φυτό ($2n=14$), με μέγεθος απλοειδούς γενώματος 4063 Mb. Έχει μία λεπτή πασσαλώδη ρίζα από την οποία εκφύονται ινώδεις πλάγιες ρίζες. Είναι όμως σημαντικό πως η μορφή του γενοτύπου εξαρτάται τόσο από τον γενότυπο όσο και από τις εδαφικές συνθήκες των περιοχών όπου αυτοί οι γενότυποι εξελίχθηκαν. (Κατσαβού, Διατριβή)

Οι ποικιλίες ανάλογα με το μέγεθος του σπόρου κατατάσσονται σε 2 κατηγορίες: 1) στις μεγαλόσπερμες με σπόρους διαμέτρου 6-9 mm και 2) στις μικρόσπερμες με σπόρους διαμέτρου 2-6 mm. Οι μεγαλόσπερμες ποικιλίες εμφανίζονται κυρίως στην περιοχή της Μεσογείου και στο δυτικό ημισφαίριο, ενώ οι μικρόσπερμες έχουν έντονη παρουσία στην περιοχή της Ινδίας και στις περιοχές της Εγγύς Ανατολής. (Mishra et al., 2007)

Η κλασική καλλιέργεια της φακής βασίζεται κυρίως στις τοπικές ποικιλίες του *L. Culinaris* ssp.*culinaris*. Αντίθετα, οι νέες ποικιλίες της φακής προέρχονται από ένα μικρό αριθμό βελτιωμένων ποικιλιών που έχουν προσαρμοσθεί για συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες.

1.2 Σπουδαιότερες μυκητολογικές ασθένειες φακής

Οι πιο σημαντικοί βιοτικοί παράγοντες καταπονήσεως της φακής είναι οι μυκητολογικές ασθένειες. Οι σπουδαιότερες μυκητολογικές ασθένειες που προσβάλλουν τη φακή στη χώρα μας είναι: η φουζαρίωση, η ασκοχύτωση, η σκωρίαση, η σκληρωτινίαση και οι τήξεις φυταρίων (Παπακώστα, 2012).

1) **Φουζαρίωση:** Η φουζαρίωση είναι από τις πιο σημαντικές ασθένειες της φακής και αναπτύσσεται λεπτομερώς σε επόμενη παράγραφο.

2) **Ασκοχύτωση:** Η ασκοχύτωση που προκαλείται από το παθογόνο *Ascochyta lentis* Bond. & Vassil, είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες καταπονήσεως στην παραγωγή της φακής. Προσβάλλει όλα τα υπέργεια φυτικά τμήματα σε οποιοδήποτε στάδιο ανάπτυξης υπο ευνοϊκές συνθήκες και προκαλεί μείωση της παραγωγής και υποβάθμιση της ποιότητας του σπόρου. Η ασθένεια συναντάται σε διάφορα μέρη του κόσμου και προκαλεί απώλειες στη σοδειά 30%, 50% ακόμα και 70% στο Καναδά, τις Η.Π.Α. και την Αυστραλία. Σε αρκετές όμως περιπτώσεις η μόλυνση του σπόρου μπορεί να είναι τόσο σημαντική ώστε η παραγωγή να μειώνεται κατά 100%. Ο πιο οικονομικό τρόπος για τον έλεγχο της ασθένειας είναι μέσω της ανάπτυξης ανθεκτικών γενοτύπων και καλλιεργητικών πρακτικών. Οι απώλειες από την ασθένεια μπορούν να ελαχιστοποιηθούν με αμειψισπορά, πρόωμη σπορά ώστε να αποφευχθούν υγρές συνθήκες κατά τη συγκομιδή, η χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού και η καταστροφή των φυτικών υπολειμμάτων (Taylor *et al.*, 2007).

3) **Σκωρίαση:** Η σκωρίαση προκαλείται από το μύκητα *Uromyces viciae-fabae* (Pers.) Schroet, (Uredinales, Pucciniaceae) και θεωρείται η πιο σημαντική ασθένεια φυλλώματος στη φακή. Η σκωρίαση της φακής έχει εξαπλωθεί παγκοσμίως αλλά αποτελεί σοβαρό πρόβλημα στην παραγωγή σε χώρες όπως η Αλγερία, Μπαγκλαντές, Καναδάς, Αιθιοπία, Ινδία, Ιταλία, Μαρόκο, Πακιστάν, Νεπάλ, Συρία και Τουρκία.

Εξαπλώνεται ωστόσο ταχύτατα και στη λεκάνη της Μεσογείου αλλά οι επιδράσεις της είναι ασήμαντες οικονομικά. Για την αντιμετώπιση της ασθένειας εφαρμόζονται καλλιεργητικά μέτρα τα οποία περιλαμβάνουν καταστροφή φυτών εθελοντών, αποφυγή καλλιέργειας κοντά σε μολυσμένες καλλιέργειες, χρήση μυκητοκτόνων για εφαρμογή στο σπόρο και μυκητοκτόνα φυλλώματος. Ωστόσο η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών είναι ο καλύτερος τρόπος καταπολέμησης της σκωρίασης σύμφωνα με τους Bayaa and Erskine 1998. (Taylor *et al.*, 2007)

4) Σκληρωτινίαση: Προκαλείται από τον μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum* και είναι υπεύθυνη για την εκτενή καταστροφή των καλλιεργειών φακής σε περιοχές που είναι υψηλό το ποσοστό της υγρασίας. Το παθογόνο προσβάλλει 148 από τα γνωστά φυτικά είδη της φακής και υπάρχει μικρή ανθεκτικότητα στην ασθένεια. Οι έρευνες που στοχεύουν στη βελτίωση ως προς το μύκητα συμπεριλαμβάνουν QTL αναλύσεις, χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένες, βελτιωμένες ποικιλίες από διασταυρώσεις χαμηλώς ανθεκτικών ποικιλιών και υψηλώς επιρρεπών ποικιλιών.

5) Τήξεις φυταρίων: προκαλούνται από τους μύκητες *Rizoctonia solani*, *Pythium spp* και *Fusarium spp* και η αμειψισπορά αποτελεί από τα μοναδικά μέτρα που είναι σε θέση να μειώσει την παρουσία των παθογόνων στο έδαφος.

1.3 Φουζαρίωση Φακής

1.3.1 Συμπτώματα

Η φουζαρίωση μπορεί να προκαλέσει ολοκληρωτική καταστροφή της καλλιέργειας υπο ευνοϊκές συνθήκες και αποτελεί τον κύριο περιοριστικό παράγοντα για την καλλιέργεια της φακής. Η ονομασία της ασθένειας αναφέρεται σε μια σειρά γενικών συμπτωμάτων μαρασμού και νέκρωσης τα οποία ωστόσο είναι δυνατόν να

παραπέμπουν σε ασθένειες που προκαλούνται από άλλα είδη του γένους *Fusarium*. (Taylor *et al.*, 2007).

Η φουζαρίωση εκδηλώνεται είτε στα πρώτα στάδια ανάπτυξης της καλλιέργειας είτε κατά τη διάρκεια του αναπαραγωγικού σταδίου (άνθιση μέχρι το γέμισμα των λοβών) της καλλιέργειας. Όταν η μάρανση εμφανίζεται στην ανθοφορία δεν παράγονται σπόροι όμως όταν εμφανίζεται στα μέσα μετέωλου του γεμίσματος των λοβών τότε η απόδοση μειώνεται δραστικά και οι σπόροι είναι συρρικνωμένοι (Kraft *et al.*, 1994). Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν μαρασμό των ανώτερων φύλλων που μοιάζει με έλλειψη νερού, νανισμό των φυτών και συστροφή των φύλλων που πρώτα παρατηρείται στα κατώτερα φύλλα και έπειτα επεκτείνεται προς τα πάνω. Τελικά τα φυτά γίνονται χλωρωμένα και πεθαίνουν. Ο μαρασμός μπορεί να είναι μονομερής και να περιορίζεται σε μεμονωμένα τμήματα.

Τα συμπτώματα στις ρίζες περιλαμβάνουν μειωμένη ανάπτυξη του ριζικού συστήματος με καφέ αποχρωματισμό και κατεστραμμένα τα ακραία τμήματα. Ο μεταχρωματισμός των αγγείων στο λαιμό δεν είναι πάντα ορατός. Επίσης, στην Ινδία έχει αναφερθεί ότι η ασθένεια συμβαίνει και στο στάδιο του σποροφύτου. Τα πιο συχνά συμπτώματα σε αυτό το στάδιο είναι η σήψη των σπόρων και ο ξαφνικός μαρασμός (Taylor *et al.*, 2007).

Η διάγνωση της ασθένειας στο χωράφι θα πρέπει να γίνεται σε συνδυασμό με τη γνώση της καλλιεργητικής του ιστορίας. Η πρόσφατη καλλιέργεια φακής ιδίως αν υπάρχει κάποιο ιστορικό φουζαρίωσης θα παρουσιάσει προβλήματα μαρασμού. Φυτά τα οποία φαίνονται υπανάπτυκτα και μαραμμένα θα πρέπει να αφαιρούνται προσεκτικά από το έδαφος έτσι ώστε οι ρίζες να μπορούν να ελεγχθούν για μειωμένη ανάπτυξη χωρίς να υπάρχει εξωτερική ανάπτυξη μυκήτων. Η εξωτερική ανάπτυξη μυκήτων

υποδεικνύει την παρουσία άλλων ασθενειών. Το κάτω τμήμα του στελέχους θα πρέπει να κόβεται για να ελέγχεται για αγγειακό μεταχρωματισμό. Παρόλο που ο αγγειακός μεταχρωματισμός δεν αποτελεί πάντοτε ένδειξη της προσβολής από φουζάριο, η παρουσία του θα επιβεβαιώσει την ύπαρξη της ασθένειας. Καλλιέργεια ιστών από μολυσμένα φυτά στο εργαστήριο θα πρέπει να γίνεται με προσοχή λόγω της πιθανής παρουσίας άλλων σαπροφυτικών μικροοργανισμών *Fusarium spp.* που εμφανίζουν ομοιότητες με το *F. oxysporum f. sp. lentis* (Kraft *et al.*, 1994).

1.3.2 Παθογόνο αίτιο

Το παθογόνο που προκαλεί αδρομυκώσεις στη φακή είναι το *Fusarium oxysporum Schlecht. Emend. Snyder & Hansen f. sp. lentis Vasudeva and Srinivasan*. Αν και η τέλεια μορφή του δεν έχει βρεθεί ακόμη πιστεύεται ότι ανήκει στους ασκομύκητες (Taylor *et al.*, 2007).

Η καλλιέργεια του παθογόνου σε θρεπτικό μέσο δίνει υάλινο μυκήλιο, διαχωρισμένο το οποίο διακλαδίζεται έντονα. Το μυκήλιο μπορεί να είναι χνουδωτό έως πιο συμπιεσμένο ενώ το χρώμα μπορεί να είναι από άσπρο έως ροζ. Το *F. oxysporum f. sp. lentis* παράγει τριών ειδών σπόρια όπως φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1. Καρποφορίες του *F. oxysporum f. sp. lentis*

Είδος σπορίου	Χαρακτηριστικά
Μικροκονίδια	ωοειδή ή σφαιρικά, υαλώδη, μονοκύτταρα
Μακροκονίδια	επιμήκη με μυτερό το κορυφαίο κύτταρο και οδοντωτό το κύτταρο της βάσης, δύο-επτά κύτταρα
Χλαμυδοσπόρια	οβάλ ή σφαιρικά, μονοκύτταρα με παχιά τοιχώματα

Όπως πολλοί άλλοι παθότυποι του *F. oxysporum*, το συγκεκριμένο παθογόνο έχει ένα περιορισμένο εύρος ξενιστών, καθώς προσβάλλει μόνο τη φακή στη φύση. Σε μελέτες ανοσοποίησης, το *F. oxysporum f. sp. lentis* δεν ήταν σε θέση να μολύνει διάφορα είδη ψυχανθών. Η ασθένεια ευνοείται από ζεστές και ξηρές συνθήκες με τη βέλτιστη θερμοκρασία να κυμαίνεται από 22-25 °C. Επίσης, μετρίως υψηλές θερμοκρασίες του εδάφους (20-25 °C) οι οποίες ευνοούν την ανάπτυξη του μύκητα και το φως που αυξάνει τη διαπνοή συμβάλλουν στην εκδήλωση των συμπτωμάτων (Kraft *et al.*, 1994). Το *F. oxysporum f. sp. lentis* είναι ένα εδαφογενές παθογόνο, αν και η μόλυνση των σπόρων είναι κοινή. Τα χλαμυδοσπόρια μπορούν να επιβιώσουν στο έδαφος είτε σε λανθάνουσα μορφή ή σαπροφυτικά για πολλά χρόνια. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί συνεργιστική αλληλεπίδραση μεταξύ του *F. oxysporum f. sp. lentis* και του νηματώδη *Meloidogyne javanica*, η οποία φέρεται να αυξάνει την ένταση της προσβολής (Taylor *et al.*, 2007). Ακόμη θα πρέπει να αναφερθεί ότι ορισμένοι ερευνητές πιστεύουν ισχυρά στην ποικιλομορφία της παθογένειας (μολυσματικότητας) των απομονώσεων και ως εκ τούτου σε αναγνωρισμένες φυλές. Ωστόσο άλλοι επιστήμονες έχουν δείξει ότι η πολυμορφία στην παθογένεια υπο την έννοια της φυλής δεν υφίσταται αλλά οφείλεται σε διαφορές στην επιθετικότητα των μολυσμάτων. (Mohammadi *et al.*, 2012)

Μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί το τελομορφικό στάδιο του μύκητα (Belabid *et al.*, 2004), συνεπώς οι όποιες γενετικές αλλαγές προκύπτουν από φαινόμενα που δεν σχετίζονται με την εγγενή αναπαραγωγή. Αυτό συμβαίνει επειδή το πρώτο στάδιο του σεξουαλικού κύκλου είναι ο σχηματισμός του ετεροκάρου το οποίο είναι ιδιαίτερα σημαντικό. Σε αυτό το στάδιο λόγω της ανταλλαγής γενετικού υλικού μεταξύ διάφορων απομονώσεων του μύκητα, η παθογένεια αλλάζει. Για παράδειγμα, λόγω του

σχηματισμού ετεροκάρυου μεταξύ δύο φυλών του *F. oxysporum f. sp. lycopersici*, μία νέα φυλή αναπτύχθηκε με υψηλή παθογένεια (Mohammadi *et al.*, 2012).

Τριάντα τρεις απομονώσεις του *F. oxysporum f.sp. lentis (Fol)* από διαφορετικές περιοχές της βορειοδυτικής Αλγερίας όπου καλλιεργείται φακή, διέφεραν ως προς την επιθετικότητα τους σε ευαίσθητες σειρές αλλά ανήκαν στην ίδια ομάδα βλαστικής συμβατότητας VCG 0471. Με βάση τα αποτελέσματα κατέληξαν στο ότι δεν υπήρχαν διαφορετικές φυλές εντός του πληθυσμού απομονώσεων. Οι ίδιοι αναφέρουν ότι το μόλυσμα του *Fol* διαδίδεται από μια περιοχή σε μια άλλη μέσω της εξωτερικής μόλυνσης του σπόρου. Η ανταλλαγή μολυσμένων σπόρων μεταξύ των παραγωγών πιθανώς εξηγεί γιατί οι πληθυσμοί του *Fol* είναι ομοιογενείς (Belabid and Fortas *et al.*, 2002).

Σε μία άλλη έρευνα οι ίδιοι επιστήμονες εξέτασαν τον ίδιο πληθυσμό μολυσμάτων πραγματοποιώντας RAPD και AFLP ανάλυση όπου ομαδοποίησαν τις απομονώσεις σε δύο υποπληθυσμούς που ωστόσο παρουσίαζαν μικρή γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ τους και δεν υπήρξε κάποια συσχέτιση με τη γεωγραφική προέλευση ή την επιθετικότητα των μολυσμάτων. Τέλος συμπέραναν ότι δεν υπήρχαν διαφορετικές φυλές μεταξύ των απομονώσεων από την Αλγερία (Belabid *et al.*, 2004).

Οι Datta S. *et al.* (2011) χρησιμοποίησαν RAPD δείκτες, SSR και ενίσχυση της περιοχής του ριβοσωμικού DNA και στη συνέχεια PCR-RFLP ανάλυση για να εξετάσουν 100 απομονώσεις του *Fol* από διαφορετικές αγρο-κλιματικές περιοχές της Ινδίας. Και οι τρεις μοριακές τεχνικές κατέταξαν τις απομονώσεις σε δύο υπο-ομάδες. Συνεπώς, προτείνουν ότι η γενετική παραλλακτικότητα που ανιχνεύθηκε στο *Fol* μέσω αυτών των μεθόδων δείχνει την ικανότητα ενός παθογόνου να προσαρμόζεται σε διαφορετικό βιολογικό κύκλο σύμφωνα με τις διαφορετικές κλιματικές περιοχές, τις καλλιεργητικές πρακτικές και την εφαρμογή της αμειψισποράς. Αυτό έχει

μακροπρόθεσμες συνέπειες στα βελτιωτικά προγράμματα. Τα γονίδια ανθεκτικότητας ενάντια στις κυριότερες φυλές παθογένειας θα πρέπει να πυραμιδοποιούνται με βάση τις αγροκλιματικές περιοχές για αποτελεσματική αντιμετώπιση της ασθένειας.

1.3.3 Αντιμετώπιση της ασθένειας

Ο πιο οικονομικός τρόπος για τον έλεγχο της ασθένειας είναι μέσω της χρήσης ανθεκτικών ποικιλιών. Επίσης, η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών αναγνωρίζεται ευρέως ότι είναι η πιο ασφαλής, οικονομική και αποτελεσματική μέθοδος για τον έλεγχο των ασθενειών (Infantino *et al.*, 2006). Η μελέτη της γενετικής της ανθεκτικότητας στη φουζαρίωση θα συμβάλει ώστε να δημιουργηθούν περισσότερες ανθεκτικές ποικιλίες φακής ενώ η επιλογή ποικιλιών που ωριμάζουν νωρίς και η ρύθμιση της ημερομηνίας φύτευσης μπορούν να μειώσουν την συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας. Η χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού και η χρήση μυκητοκτόνων επεξεργασίας σπόρων μπορεί να εξαλείψει ή να μειώσει τις πηγές μόλυνσης. Δεδομένου ότι το παθογόνο έχει ένα πολύ περιορισμένο εύρος ξενιστών, αμειψισπορά τριών έως πέντε ετών θα βοηθούσε να μειωθεί το επίπεδο του μολυσματικού φορτίου στο έδαφος.

Αν και οι δοκιμές *in vitro* και στο θερμοκηπίου έδειξαν ότι τα μυκητοκτόνα ήταν αποτελεσματικά έναντι της φουζαρίωσης, εφαρμογές στον αγρό έδειξαν ότι δεν ήταν πρακτικό λόγω του κόστους και των τεχνικών δυσκολιών ενσωμάτωσης των χημικών ουσιών στο έδαφος κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου. Όσον αφορά την επεξεργασία σπόρων με μυκητοκτόνο benomyl, αυτή μείωσε τη συχνότητα εμφάνισης της φουζαρίωσης. Επιπροσθέτως, έχει εξετασθεί σε πειραματικό στάδιο η βιολογική καταπολέμηση του παθογόνου μέσω της χρήσης σκευασμάτων του *Bacillus subtilis*, τα

οποία φαίνεται ότι δίνουν κάποιο αποτέλεσμα. Παρ' όλα αυτά, η συγκεκριμένη μέθοδος καταπολέμησης θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω (Taylor *et al.*, 2007).

1.4 Βελτίωση για ανθεκτικότητα σε ασθένειες

1.4.1 Γενετική ανθεκτικότητα των φυτών σε ασθένειες

1.4.1.1 Τύποι γενετικής ανθεκτικότητας και εύρεση γονιδίων ανθεκτικότητας

Η γενετική ανθεκτικότητα διακρίνονται σε δύο τύπους: 1) στη μονογονιδιακή ή κατακόρυφη η οποία ελέγχεται από ένα ζευγάρι αλληλομόρφων και είναι σχετικά εύκολο να προσδιοριστεί ο γενετικός τόπος που βρίσκεται το συγκεκριμένο γονίδιο. Ωστόσο έχει το μειονέκτημα ότι μπορεί να ξεπεραστεί με μεγαλύτερο βαθμό ευκολίας από τους παθογόνους μύκητες με την εμφάνιση νέων φυλών 2) στην πολυγονιδιακή ή οριζόντια ανθεκτικότητα που ελέγχεται από πολλά γονίδια και διαρκεί για μεγαλύτερο διάστημα. Παρ' όλα αυτά δεν μπορεί να μεταφερθεί εύκολα σε μια άλλη ποικιλία και να αξιοποιηθεί σε σύντομο χρονικό διάστημα σε ένα βελτιωτικό πρόγραμμα. (Ρουπακιάς, 2010)

Μελέτες της κλασσικής γενετικής έχουν δείξει ότι τα γονίδια ανθεκτικότητας ομαδοποιούνται στο γένωμα ορισμένων ειδών παρουσιάζοντας ανθεκτικότητα στα παθογόνα. Διαφορετικά γονίδια εντός της ίδιας ομάδας μπορεί να ελέγχουν την ανθεκτικότητα σε ταξινομικά διαφορετικά παθογόνα. Με τη μοριακή γενετική όμως, έχει διευκολυνθεί η αναγνώριση και χαρτογράφηση των γονιδίων ανθεκτικότητας στα φυτικά χρωμοσώματα.

Πολλά γονίδια ανθεκτικότητας περιέχουν παρόμοια μοτίβα αλληλουχιών, αν και ελέγχουν την ανθεκτικότητα σε διαφορετικούς παθογόνους μικροοργανισμούς. Λόγω της παρουσίας συντηρημένων περιοχών στα γονίδια ανθεκτικότητας, έχει γίνει εφικτή η

κλωνοποίηση γονιδίων ανθεκτικότητας από διαφορετικά είδη μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Οι απόγονοι των διασταυρώσεων μπορούν να ελεγχθούν προκαταρκτικά μέσω τεστ DNA για να αναγνωρισθούν εκείνα τα άτομα που φέρουν γνωστά γονίδια ανθεκτικότητας ή αλληλουχίες στα χρωμοσώματα που είναι στενά συνδεδεμένες με τέτοια γονίδια. Αυτή η διαδικασία είναι γνωστή ως επιλογή υποβοηθούμενη από μοριακούς δείκτες (Marker Assisted Selection-MAS).

Υιοθετώντας τη μέθοδο MAS θα είναι δυνατή η αποτελεσματική μεταχείριση των γονιδίων ώστε να παρέχουν σταθερή ανθεκτικότητα σε διαφορετικές οικονομικά σημαντικές ασθένειες. Όλες οι περιοχές στο φυτικό γένωμα μπορούν να αξιολογηθούν για σύνδεση με την ανθεκτικότητα χρησιμοποιώντας τους μοριακούς δείκτες. Όμως η ανθεκτικότητα μπορεί να συνδέεται και με ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά. Η χαρτογράφηση του γενώματος μέσω των μοριακών δεικτών συμβάλλει στην εύρεση γενετικών τόπων που ελέγχουν ποσοτικά γνωρίσματα (QTL) για ορισμένα χαρακτηριστικά συμπεριλαμβανομένων και των γονιδίων ανθεκτικότητας.

Τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών καθώς και η διαθεσιμότητα δεδομένων που αφορούν τις γενωμικές και εκφρασμένες αλληλουχίες σήμανσης για ορισμένα φυτικά είδη έχει ανοίξει το δρόμο για σημαντική πρόοδο στο χαρακτηρισμό των αποκρίσεων των φυτών που σχετίζονται με την παθογένεση. Είναι δυνατός ο έλεγχος της έκφρασης εκατοντάδων ή και χιλιάδων γονιδίων ταυτόχρονα μέσω της εφαρμογής της μεθόδου των μικροσυστοιχιών DNA. Νέα γονίδια τα οποία σχετίζονται με την παθογένεση καθώς και τα σχετιζόμενα ρυθμιστικά συστήματα μπορούν να ανιχνευθούν.

Η βασική προϋπόθεση για τη δημιουργία ανθεκτικών ποικιλιών σε ασθένειες είναι η ύπαρξη αξιόπιστων πηγών ανθεκτικότητας. Η αναγνώριση γενοτύπων που διαθέτουν γονίδια ανθεκτικότητας μπορεί να επιτευχθεί μέσω τεστ οπτικής αξιολόγησης και

κατηγοριοποίησης των διαφόρων φυτών σε ομάδες με βάση το βαθμό αντοχής τους. Αν και η οπτική αξιολόγηση είναι απλή και εύκολη στην εφαρμογή, ωστόσο στερείται ακρίβειας και εξειδίκευσης ενώ μπορούν να συγχυθούν με συμπτώματα που αναπτύσσει το φυτό λόγω στρεσαρίσματος από άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Επιπλέον, δεν είναι κατάλληλη σε περιπτώσεις που έχουμε ένα σύμπλοκο ασθενειών.

Η βιομάζα του παθογόνου που υπάρχει στο φυτό-ξενιστή μπορεί να ποσοτικοποιηθεί και σχετίζεται με το επίπεδο ανθεκτικότητας του φυτού. Υπάρχει μια αρνητική σχέση μεταξύ της βιομάζας του παθογόνου και την ανθεκτικότητα του φυτού στο παθογόνο. Η ανοσοενζυμική δοκιμή (ELISA) έχει εφαρμοσθεί ώστε να ποσοτικοποιηθούν τα αντιγόνα των μυκήτων σε ευαίσθητες και ανθεκτικές ποικιλίες μετά από μόλυνση με το παθογόνο. Εφαρμόζοντας ένα τεστ ELISA σε βελτιωτικό πρόγραμμα για το φουντούκι, προέκυψε ένας απόγονος με υψηλό επίπεδο ανθεκτικότητας από την ποικιλία Gasaway. Επίσης, έχει αναπτυχθεί και η τεχνική BA ELISA (biotin/avidin enzyme-linked immunosorbent assay) η οποία δείχνει τις ποσοτικές διαφορές μεταξύ των ποικιλιών όσον αφορά την ανθεκτικότητά τους και μπορεί να διαβαθμίσει το επίπεδο ανθεκτικότητας των διάφορων γενοτύπων και ως εκ τούτου θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και αυτή σε ένα βελτιωτικό πρόγραμμα.

Οι τεχνικές που βασίζονται στα νουκλεϊκά οξέα έχουν αποδειχθεί περισσότερο ευαίσθητες, εξειδικευμένες, γρήγορες και αξιόπιστες τεχνικές σε σχέση με την ELISA. Για παράδειγμα η Real-time PCR, εκτιμά απευθείας το DNA του μύκητα από το ολικό DNA που εξάγεται από τους φυτικούς ιστούς οπότε θα μπορούσε να εφαρμοσθεί για τη μέτρηση του μολυσματικού φορτίου του μύκητα πριν ακόμα εμφανισθούν ορατά συμπτώματα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η εφαρμογή της στην περίπτωση της πιπεριάς με το μύκητα *Phytophthora capsici* ο οποίος μπορούσε να ανιχνευθεί

ακόμα και οκτώ ώρες μετά τη μόλυνση με αποτέλεσμα να έχουμε κατηγοριοποίηση ανθεκτικών και ευαίσθητων ποικιλιών σε σύντομο χρονικό διάστημα.

Οι εδαφογενείς ασθένειες που προκαλούνται από τους μύκητες *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* και *Aphanomyces euteichus* προσβάλουν το φασόλι, το ρεβύθι, τη φακή και το λούπινο περιορίζοντας την απόδοσης τους σε διάφορες χώρες ανά τον κόσμο. Η συμβατική μέθοδος ανάπτυξης των φυτών σε προσβεβλημένα πειραματικά τεμάχια (Sick Plots) και η οπτική αξιολόγησή τους χρησιμοποιώντας το ποσοστό των φυτών που προσβλήθηκαν θεωρείται η πιο πρακτική διαδικασία για τη εύρεση φυτών που μπορούν να μην αναπτύξουν τα συμπτώματα της ασθένειας (Narayanasamy, 2008).

1.4.1.2 *In vitro* επιλογή σωματοκλωνικών προϊόντων για ανθεκτικότητα σε ασθένειες

Τα σωματοκλωνικά προϊόντα που προέρχονται από ατομικά κύτταρα ή από ιστούς οργάνων μπορούν να εμφανίσουν παραλλακτικότητα σε ορισμένα χαρακτηριστικά συμπεριλαμβανομένης και της ανθεκτικότητας στους παθογόνους μικροοργανισμούς ή τους μεταβολίτες τους που έχει ως συνέπεια να διαφέρουν από τους γονείς.

Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί παράγουν τοξίνες οι οποίες είναι υπεύθυνες για την εκδήλωση των συμπτωμάτων. Οπότε κάνοντας το ξενιστή ανθεκτικό στις συγκεκριμένες τοξίνες μπορεί ο υπό εξέταση οργανισμός να γίνει ανθεκτικός στην ασθένεια. Η χρήση τοξινών για την επιλογή *in vitro* ανθεκτικών γενοτύπων εξαρτάται από την παραγωγή της τοξίνης από όλες τις απομονώσεις του μύκητα και την πρόκληση αρχικών συμπτωμάτων όμοια με αυτά που προκαλούνται από το μύκητα. Τα κύρια πλεονεκτήματα της *in vitro* επιλογής ανθεκτικών γενοτύπων είναι ότι αποφεύγονται μη ευνοϊκές συνθήκες, η συγκέντρωση των τοξινών για το τεστ μπορεί να βελτιστοποιηθεί, ένας μεγάλος αριθμός φυτών μπορεί να εξετασθεί σε μικρό χώρο και η μεταχείριση μεταλλαγμένων, απλοειδών ή σωματοκλωνικών προϊόντων με υψηλότερη

παραλλακτικότητα στο γένωμα είναι εφικτή. Ορισμένα παραδείγματα δημιουργίας τέτοιων προϊόντων με τη χρήση της συγκεκριμένης μεθόδου αποτελούν η μηδική, το κριθάρι, το ρεβύθι, το γαρύφαλλο. (Narayanasamy, 2008)

1.4.2 Βελτίωση φακής για ανεκτικότητα-ανθεκτικότητα στην προσβολή από φυτοπαθογόνους μύκητες

Όσον αφορά την εύρεση ανθεκτικότητας στο μύκητα *Ascochyta fabae f. sp. Lentis* χρησιμοποιούνται μέθοδοι τεχνητής επιμόλυνσης ώστε να εντοπιστούν οι ανθεκτικοί γενότυποι με βάση την αντίδραση που παρουσιάζουν στα φύλλα αλλά και στη ζημιά που προκαλείται στους σπόρους. Συγκεκριμένα η τεχνητή επιμόλυνση πραγματοποιείται βελτίωση για ανθεκτικότητα στην ασκοχύτωση πραγματοποιείται από το ICARDA και στην περιοχή Islamabad όπου είχε αναπτυχθεί και δοθεί στο εμπόριο η ποικιλία Manserha 89 με πολλαπλή ανθεκτικότητα στην ασθένεια. Επίσης, είναι σημαντική η εύρεση των γονιδίων που εμπλέκονται στη γενετική της ασθένειας ώστε να γίνει δυνατή η χρήση των μοριακών δεικτών για τη βελτίωση της φακής. (Erskine *et al.*, 1994)

Η βελτίωση για ανθεκτικότητα στην ασκοχύτωση αποτελεί μία σημαντική επιτυχία των βελτιωτών παγκοσμίως. Η ILL5588 (PI592998, Talia 2) έχει καταγραφεί ως γενετικό υλικό φακής ανθεκτικό στη φουζαρίωση και την ασκοχύτωση ενώ η Northfield αποτελεί ανθεκτική ποικιλία στην ασκοχύτωση στην Αυστραλία. (Materne and McNeil, 2007)

Αναφέρεται ότι ένα εύρος ανθεκτικών σειρών στην ασκοχύτωση είχαν διαφορετική αντίδραση σε απομονώσεις του μύκητα σε διάφορες χώρες το οποίο σημαίνει ότι παρουσιάζεται μία παραλλακτικότητα στην παθογένεια εντός του μύκητα και το οποίο θα πρέπει να ληφθεί υπόψη. (Erskine *et al.*, 1994)

Επιπλέον, διεξάγονται πειράματα προκαταρκτικής αξιολόγησης για εύρεση ανθεκτικών γενοτύπων σε διάφορες τοποθεσίες από το ICARDA και το οποίο έχει οδηγήσει στην καταγραφή ορισμένων ανθεκτικών ποικιλιών. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι οι ίδιες με αυτές για άλλα χαρακτηριστικά προς επιλογή ενώ έχει χρησιμοποιηθεί και μια συνδυασμένη μέθοδος μαζικής και γενεαλογικής επιλογής από το συγκεκριμένο ινστιτούτο (Ye *et al.*, 2002)

Άλλες προσεγγίσεις που μπορούν να εφαρμοσθούν στη βελτίωση για ανθεκτικότητα στην ασκοχύτωση είναι οι εξής: α) η πυραμιδοποίηση γονιδίων η οποία μπορεί να δώσει ποικιλίες με πολλαπλά γονίδια ανθεκτικότητας τα οποία μπορούν να έχουν αθροιστική δράση και θα μπορούν να εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε διάφορα περιβάλλοντα β) το γεγονός ότι έχουν ανιχνευθεί γονίδια ανθεκτικότητας στο άγριο είδος *Lens orientalis*, αυτό το καθιστά πολύτιμο υλικό σε ένα βελτιωτικό πρόγραμμα καθώς θα μπορούσε να διασταυρωθεί με το ήμερο είδος *Lens culinaris*. Βιώσιμα υβρίδια μπορούν να αποκτηθούν μέσω δύο τεχνικών με βάση τη βιβλιογραφία και συγκεκριμένα μέσω εφαρμογής γιββεριλλικού οξέος μετά την επικονίαση και με ιστοκαλλιέργεια διειδικών εμβρύων γ) η χρήση μοριακών δεικτών καθώς έχουν ανιχνευθεί δύο RAPD δείκτες οι οποίοι είναι 6 cM και 14 cM αντίστοιχα μακριά από το γενετικό τόπο ανθεκτικότητας δ) τα διαγονιδιακά φυτά αποτελούν ένα νέο εργαλείο για τους βελτιωτές αν και η αναγέννηση γενετικά τροποποιημένων φυτών φακής είναι μια δύσκολη διαδικασία. (Ye *et al.*, 2002)

Έχοντας υπόψη τις προηγούμενες εμπειρίες από τη βελτίωση της ανθεκτικότητας σε άλλα είδη οσπρίων, η επιλογή για την ανθεκτικότητα απέναντι στον μύκητα που προκαλεί την ασκοχύτωση μπορεί να έχει δυσμενείς επιπτώσεις όπως: 1) αύξηση των αντιθρεπτικών παραγόντων, που είναι ανεπιθύμητη τόσο για την ανθρώπινη αλλά και

για τη ζωική κατανάλωση 2) πιθανή μείωση της ευπεψίας 3) καθυστέρηση της ωρίμανσης. (Βασιλάκου, Διατριβή)

Στην περίπτωση της σκωρίασης η ανθεκτικότητα των φυτών βρέθηκε ότι κληρονομείται μονογενικώς με αποτέλεσμα να μπορεί να υπερπηδηθεί εύκολα από τον παθογόνο μύκητα ενώ όμως μία πρόσφατη έρευνα έδειξε πως το σημαντικότερο γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την ανθεκτικότητα στις ποικιλίες ILL 5588 και W63241 έχει αρνητικές επιδράσεις στη σποροπαραγωγή. Παράλληλα έχουν αναφερθεί από τους ερευνητές αρκετές πηγές ανθεκτικότητας. Έχουν διενεργηθεί αξιολογήσεις στο χωράφι σε διάφορες περιοχές όπως η Αιθιοπία, το Μπαγκλαντές και η Ινδία ενώ έχει αναπτυχθεί μία τεχνητή μέθοδος επιμόλυνσης.

Η βελτίωση στη σκωρίαση διεξάγεται στο ICARDA που σε συνδυασμό με εθνικά προγράμματα της Αιθιοπίας, του Μαρόκο και του Πακιστάν έχουν δημιουργηθεί ανθεκτικές ποικιλίες.

Οι T. Negussie *et al.* (2005) αξιολόγησαν τέσσερις ποικιλίες φακής (Gudo, R-186, FLIP-87-66L και FLIP-89-60L) στο θερμοκήπιο, εκτιμώντας τέσσερα στοιχεία που σχετίζονταν με την ανθεκτικότητα και συγκεκριμένα τη λανθάνουσα περίοδο, την αποτελεσματικότητα της μόλυνσης, το μέγεθος των φλύκταινων και την παραγωγή σπορίων. Βρέθηκε ότι η Gudo και η R-186 ανέπτυξαν μικρότερες και λιγότερες ενώ η λανθάνουσα περίοδος ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με τις άλλες δύο ποικιλίες. Επίσης, τα αποτελέσματα έδειξαν την ύπαρξη μερικής ανθεκτικότητας στις υπο εξέταση ποικιλίες ενώ τα τέσσερα στοιχεία που εκτιμήθηκαν μπορούν να συμπεριληφθούν στην αξιολόγηση για ύπαρξη μερικής ανθεκτικότητας.

Άλλες ποικιλίες που έχουν προκύψει από βελτιωτικά προγράμματα είναι οι 'Barimasur-4', η 'Pant Lentil 4' η οποία είναι υψηλοαποδοτική και εμφανίζει ανθεκτικότητα στη σκωρίαση, τη φουζαρίωση και την ασκοχύτωση, η ILL 6001-81,

ILL 4536 , FLIP 96-46L, ILL 2580, ILL 358, ILL 2704. ILL 4605, ILL 5540, ILL 5680, ILL 5748, ILL 5764, ILL 6027, η Bombay 18, Pant L 236 και η Pusa 10. Επίσης, υπάρχει πρόοδος και στον τομέα της μοριακής βελτίωσης όπου έχει αναφερθεί η εύρεση ενός ενισχυμένου πολυμορφικού δείκτη, του F7XEM4a ο οποίος σχετίζεται με ένα γονίδιο ανθεκτικότητας που έχει βρεθεί στην ποικιλία ILL4605. Ωστόσο θα πρέπει να βρεθούν περισσότεροι δείκτες που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στη σκωρίαση ώστε να γίνει μια πιο συστηματική προσπάθεια στην βελτίωση της. (Negussie and Pretorius, 2012)

Για την εύρεση ανθεκτικότητας στη σκωρίαση όπως και σε κάθε άλλη ασθένεια είναι σημαντικό η μέθοδοι και τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση των γενοτύπων να χαρακτηρίζονται από ομοιόμορφη κατανομή της πίεσης του μολύσματος, να είναι αποτελεσματικές και πρακτικές. Επίσης, οι αξιολογήσεις στο χωράφι θα πρέπει να γίνεται σε περιβάλλοντα που ευνοούν την ανάπτυξη και εκδήλωση της ασθένειας. Η αξιολόγηση στο θερμοκήπιο και στο εργαστήριο μπορεί να συμβάλλει επικουρικά στην αξιολόγηση των φυτών. Έχει βρεθεί ότι η βέλτιστη συγκέντρωση για μόλυνση είναι $3 \cdot 10^4$ ουρεδοσπόρια/ml.

Στον Καναδά η ποικιλία Robin έχει μεσαία ανθεκτικότητα στην ανθράκωση όμως ο συνδυασμός ανθεκτικότητας στην ανθράκωση και ασκοχύτωση της δίνει ένα σημαντικό πλεονέκτημα στη βελτίωση της φακής. (Materne and McNeil, 2007)

Όπως αναφέρουν οι Tullu *et al.* (2004) 16 σειρές έχει βρεθεί ότι έχουν ανθεκτικότητα στη φυλή Ct1 του μύκητα *Colletotrichum truncatum* που προκαλεί την ανθράκωση, ενώ αντίστοιχα είναι ευαίσθητες στη φυλή Ct0. Σε πείραμά χρησιμοποιήσαν 574 καταχωρήσεις από έξι άγρια είδη καθώς και φυτά μάρτυρες τα οποία αξιολογήθηκαν σε συνθήκες αγρού και θερμοκηπίου με βάση μία κλίμακα από το 1-9. Η Indianhead και PI 320937 ήταν ανθεκτικές ενώ η Eston και Pardina ήταν

ευαίσθητες στη φυλή Ct1, όμως καμία τους δεν ήταν ανθεκτική στη φυλή Ct0. Τον υψηλότερο βαθμό ανθεκτικότητας στη φυλή Ct1 και Ct0 τον εμφάνισαν τα φυτά που ανήκαν στο είδος *Lens ervoides* (Brign.) Grande και κυρίως αυτά που προέρχονταν από τη Συρία και την Τουρκία, τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε βελτιωτικά προγράμματα.

Όσον αφορά τη βελτίωση για ανθεκτικότητα στη σήψη από το μύκητα *Stemphylium botrysum* Wallr., αυτή έχει επιτευχθεί από το ICARDA και κυβερνητικούς φορείς του Μπαγκλαντές, δημιουργώντας της ποικιλίες Bari-Masur και οι οποίες έχουν σημαντική διάδοση σε αυτή την χώρα. (Materne and McNeil, 2007)

Η πρώτη ποικιλία με ανθεκτικότητα στο μύκητα *Botrytis cinerea* χρησιμοποιήθηκε στο Πακιστάν το 1981. Επίσης ανθεκτικοί γενότυποι ανιχνεύθηκαν στην Αυστραλία το 2002 και 2006 αλλά και στον Καναδά, το Νεπάλ και το Πακιστάν. Το 2004 στην Αυστραλία κυκλοφόρησε στο εμπόριο η ποικιλία Nirper ώστε να παρέχει στους αγρότες τη δυνατότητα χρήση μιας ποικιλίας με μειωμένο κίνδυνο προσβολής από το βοτρυτή ο οποίος προκαλεί σημαντικές απώλειες στην παραγωγή των ευαίσθητων ποικιλιών. Επιπλέον, τα δεδομένα των ερευνών έχουν δείξει ότι υπάρχει μικρή παραλλακτικότητα στην ανθεκτικότητα εντός του αυστραλιανού γενετικού υλικού (Materne and McNeil, 2007). Διασταυρώσεις που έχουν γίνει χρησιμοποιώντας ως γονέα την ποικιλία Indianhead έχουν δώσει καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τις πρόσφατες ποικιλίες που κυκλοφορούν στο εμπόριο. (Davidson *et al.*, 2007)

1.4.3 Βελτίωση φακής για ανθεκτικότητα στο φουζάριο

Η φουζαρίωση μπορεί να επιφέρει σοβαρές οικονομικές απώλειες στην παραγωγή της φακής σε περιοχές την Νότιας Αμερικής, της περιοχής της Μεσογείου και της

Νότιας Ασίας για αυτό και κύριος στόχος των βελτιωτικών προγραμμάτων είναι η εύρεση ανθεκτικότητας και η ανάπτυξη ανθεκτικών ποικιλιών. Η ανθεκτικότητα στη φουζαρίωση (φυλή 1) στο μπιζέλι έχει βρεθεί ότι ελέγχεται από ένα γενετικό τόπο στενά συνδεδεμένο με ένα γονίδιο της εστεράσης του σπόρου. Συνεπώς, λόγω των διατηρημένων συνδεδεμένων ομάδων μεταξύ της φακής και του μπιζελιού μπορεί να διερευνηθεί αυτή η συσχέτιση. (Erskine *et al.*, 1994)

Οι Kamboj *et al.* (1990) αξιολόγησαν τρεις ανθεκτικούς γενοτύπους στο φουζάριο οι οποίοι διασταυρώθηκαν με δύο ευαίσθητους γονείς. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα υβρίδια που αποκτήθηκαν ήταν όλα ανθεκτικά στην ασθένεια και ακόμη τεστ σε αλληλόμορφα γονίδια έδειξαν την παρουσία πέντε ανεξάρτητων διασπόμενων γονιδίων για την ανθεκτικότητα.

Οι παραγωγοί στη Συρία, το Ιράκ και τον Λίβανο έχουν στηριχθεί στο παρελθόν σε λίγες ανθεκτικές ποικιλίες για την τον έλεγχο της ασθένειας. Πρόσφατα οι ερευνητές στο ICARDA αξιολόγησαν 3033 εγχώριες ποικιλίες προερχόμενες από 62 χώρες και 247 άγρια συγγενικά είδη από 14 χώρες (2000–2007), τα οποία αναπτύχθηκαν σε μολυσμένο έδαφος με φουζάριο βρίσκοντας ότι το 28% των εγχώριων ποικιλιών ήταν ανθεκτικές. Ανάμεσα στα άγρια είδη, τα *L. culinaris ssp.*, *L. orientalis* και *L. ervoides* παρουσίασαν καλά επίπεδα ανθεκτικότητας στην ασθένεια. Αυτές οι ανθεκτικές σειρές αξιολογήθηκαν για τα αγρονομικά χαρακτηριστικά τους και τα επιθυμητά άτομα στάλθηκαν για περαιτέρω έλεγχο στο NARS (Department of Land and Natural Resources). Τα επιπλέον αποτελέσματα που προκύπτουν από αυτές τις περιοχές χρησιμοποιούνται ως ανατροφοδότηση για την ανάπτυξη κατάλληλων στρατηγικών βελτίωσης ώστε να δημιουργηθούν βελτιωτικές σειρές με καλή προσαρμογή. (Gurta *et al.*, 2011)

Οι Mohammadi *et al.* (2012) πραγματοποίησαν ένα τεστ παθογένειας με 45 απομονώσεις του *Fusarium oxysporum f.sp. lentis* πάνω στην ευαίσθητη ποικιλία ILL 4605 κάτω από συνθήκες θερμοκηπίου. Τρεις από αυτές επιλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στην αξιολόγηση 55 ανεπτυγμένων σειρών σε συνθήκες αγρού και θερμοκηπίου. Στο θερμοκήπιο τα φυτά εμβολιάστηκαν εμβαπτίζοντας τα κορυφαία τμήματα των ριζών σε εναιώρημα σπορίων του μύκητα και σπέρνοντας σπόρους σε γλάστρες με μολυσμένο χώμα. Ο έλεγχος στο χωράφι πραγματοποιήθηκε σε αγρό ο οποίος ήταν φυσικά προσβεβλημένος από το φουζάριο. Σε όλα τα στάδια η αντίδραση των φυτών στην ασθένεια βασίστηκε στο ποσοστό των νεκρών φυτών. Τελικώς επιλέχθηκαν από το θερμοκήπιο και το χωράφι τρεις σειρές (81S15, FLIP2007-42 L and FLIP2009-18 L) οι οποίες ήταν ανθεκτικές. Επιπλέον, σε αυτή τη μελέτη βρέθηκε ότι οι απομονώσεις στα φυτά είχαν διαφορετικές επιδράσεις καθώς υπήρχαν ανθεκτικά, ευαίσθητα και φυτά με δύο ενδιάμεσες καταστάσεις. Ωστόσο ορισμένες σειρές όπως οι FLIP2006-52 L, FLIP2007-41 L και FLIP2009-4 L ήταν ανθεκτικές υπο συνθήκες αγρού αλλά ευαίσθητες ή μετρίως ευαίσθητες υπο συνθήκες θερμοκηπίου.

Σχετικά με την προκαταρκτική αξιολόγηση υλικού βελτίωσης στο χωράφι, αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί εύκολα και γρήγορα με μικρό κόστος με τη χρήση φυσικώς ή τεχνητώς μολυσμένων τεμαχίων ('sick plots', SP). Το κύριο πλεονέκτημα των SP είναι ότι επιτρέπουν τον ταυτόχρονο έλεγχο ενός μεγάλου αριθμού γενετικού υλικού σε συνθήκες περιβάλλοντος παρόμοιες με αυτές των καλλιεργούμενων φυτών. Ορισμένες μέθοδοι έχουν περιγραφεί για την ανάπτυξη ασθενών πειραματικών τεμαχίων μαρασμού (Wilt Sick Plots-WSP) για τα όσπρια. Τα συγκεκριμένα τεμάχια θα πρέπει να εγκαθίστανται με βάση την παρουσία της ασθένειας όπως ενδείκνυται από τα ορατά συμπτώματα και την απομόνωση του μύκητα. Η προκαταρκτική αξιολόγηση αρχίζει όταν παρατηρείται σε μεγάλο βαθμό μαρασμός των φυτών. Οι εξεταζόμενες

σειρές θα πρέπει να φυτεύονται μαζί με ευαίσθητους μάρτυρες οι οποίοι θα πρέπει να επαναλαμβάνονται κάθε δύο με τέσσερις γραμμές. Η προσβολή από την ασθένεια θα πρέπει να καταγράφεται σε τακτά χρονικά διαστήματα ενώ το έδαφος του χωραφιού θα πρέπει να ελέγχεται και για την ύπαρξη και άλλων μικροοργανισμών.

Στην περίπτωση αξιολόγησης γενετικού υλικού σε ελεγχόμενο περιβάλλον όπως το θερμοκήπιο ή το εργαστήριο, αυτό αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο σε πολλά βελτιωτικά προγράμματα που εστιάζουν στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η υγρασία, το φώς και η θερμοκρασία μπορούν εύκολα να ελεγχθούν ώστε να δημιουργηθούν οι κατάλληλες συνθήκες για την ανάπτυξη της ασθένειας. Η εκτίμηση της ασθένειας υπο ελεγχόμενες συνθήκες μπορεί να εφαρμοστεί για την αναγνώριση ανθεκτικού βελτιωτικού υλικού κατά τη διάρκεια μη καλλιεργήσιμων περιόδων αλλά μπορεί και να χρησιμοποιηθεί για την επιβεβαίωση της αντίδρασης ανθεκτικών γενοτύπων. Παρ'όλα αυτά ο περιορισμένος χώρος είναι συνήθως ο κύριος περιοριστικός παράγοντας για την αξιολόγηση των φυτών σε ελεγχόμενο περιβάλλον.

Επιπλέον, στην αξιολόγηση σε συνθήκες θερμοκηπίου και εργαστηρίου, το αρχικό μόλυσμα του μύκητα *Fusarium oxysporum f. sp. lentis* μπορεί να αυξηθεί σε οποιοδήποτε κατάλληλο μέσο όπως το PDA (Potato Dextrose Agar). Όπως αναφέρουν οι Kraft *et al.* (1994), η τεχνική της υγρής καλλιέργειας περιγράφηκε αρχικά από τους Wensley & McKeen (1962) και Roberts & Kraft (1971) και τροποποιήθηκε από τους Omar *et al.* (1988). Οι προηγούμενοι ερευνητές χρησιμοποίησαν αυτή τη μέθοδο για τον έλεγχο 10 ημερών φυταρίων τα οποία αναπτύχθηκαν προηγουμένως σε αποστειρωμένη άμμο και εμβαπτίστηκαν σε εναιώρημα σπορίων με συγκέντρωση 10^5 σπόρια/ml. Η αντίδραση των φυτών αξιολογήθηκε σε μια κλίμακα 0-7 που περιγράφηκε από τους Dixon & Doodson (1971), 7- 10 ημέρες αργότερα. Χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο οι Roberts & Kraft (1971) βρήκαν ότι η βέλτιστη

συγκέντρωση σπορίων για να γίνει η διαφοροποίηση των ευαίσθητων από τις ανθεκτικές γραμμές σε 7 ημέρες ήταν $1.5 \cdot 10^5$ με $2 \cdot 10^5$ σπόρια/ml ή $6.5 \cdot 10^5$ σπόρια/ml.

Επιπλέον, οι σπόροι μπορούν να σπαρθούν σε αποστειρωμένο έδαφος και μετά από 14 ημέρες ανάπτυξης σε υγρό υπόστρωμα να γίνει η μόλυνσή τους. Στο ICARDA έχει χρησιμοποιηθεί μια συγκέντρωση σπορίων της τάξης $2.5 \cdot 10^6$ μικροκονίδια/ml για τον εμβολιασμό αποστειρωμένου εδάφους στο θερμοκήπιο. Η σταθεροποίηση της ποσότητας του μολύσματος αποτελεί έναν καθοριστικό παράγοντα για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων από ένα τεστ αξιολόγησης και την χρησιμοποίησή τους από επόμενα τεστ. Η ένταση της προσβολής καταγράφεται είτε 56 ημέρες μετά τη σπορά για τα φυτάρια ή κατά την ανάπτυξη των λοβών για τα ενήλικα φυτά. Οι παρατηρήσεις για τη θνησιμότητα των φυτών μετατρέπονται σε ποσοστό μαραμένων φυτών σε μια κλίμακα 1-9 όπου: 1= 1% ή λιγότερα φυτά έχουν μαραθεί; 3=1-10% των φυτών μαραμένα; 9=51% ή περισσότερα φυτά έχουν μαραθεί. Παρατηρήσεις πάνω στην ένταση του μαρασμού καταγράφονται ώστε να εκτιμηθεί η ανάπτυξη των συμπτωμάτων σε εξεταζόμενες γραμμές. (Kraft *et al.*, 1994) Όταν γίνεται αναφορά για εύρεση ανθεκτικότητας, είναι σημαντικό να αναφερθεί το στάδιο ανάπτυξης της καλλιέργειας κατά την αξιολόγηση. Οι περισσότερες σειρές φακής που παρουσιάζουν αντοχή στο στάδιο του σποροφύτου, χάνουν αυτή την ανθεκτικότητα στο στάδιο του ενήλικου φυτού.

1.4.4 Μοριακή Βελτίωση της φακής και εύρεση μοριακών δεικτών για ανθεκτικότητα στο φουζάριο

Οι περισσότερες καλλιεργήσιμες εκτάσεις φακής, βρίσκονται σε αναπτυσσόμενες χώρες όπου η χρηματοδότηση της έρευνας και η εξειδίκευση σε νέες μοριακές τεχνικές

για τη βελτίωση, είναι περιορισμένη και συνεπώς η χρήση της μοριακής βελτίωσης για την αντιμετώπιση περιοριστικών παραγόντων στην παραγωγή γίνεται στις ανεπτυγμένες χώρες. Επιπλέον, η εφαρμογή των δεικτών για καθημερινή χρήση στα βελτιωτικά προγράμματα φακής είναι προς το παρόν περιορισμένη επειδή ορισμένες φορές τα χαρακτηριστικά υπο επιλογή μπορούν να διακριθούν μέσω φαινοτυπικής αξιολόγησης χωρίς ιδιαίτερο κόστος. Η επιλογή χαρακτηριστικών τα οποία θα επωφελούνταν από τη διαθεσιμότητα ισχυρών και με ακρίβεια δεικτών, αφορά τη ξηρασία, το ψύχος και το βόριο την αλατότητα και την ανθεκτικότητα στη φουζαρίωση, την ασκοχύτωση, το Βοτρύτη και τη στεμφυλίωση. (Muehlbauer *et al.*, 2006)

Στην χαρτογράφηση του γενόματος της φακής έχουν χρησιμοποιηθεί και δείκτες οι οποίοι σχετίζονται με γονίδια ανθεκτικότητας σε ασθένειες, ονόματι RGA (Resistance Gene Analogue). Η σημειακή κλωνοποίηση αυτών των δεικτών θα μπορούσε να οδηγήσει στον εντοπισμό τέτοιων γονιδίων ανθεκτικότητας.

Οι Eujayl *et al.*, 1998 χρησιμοποίησαν 86 αναδιασταυρωμένες καθαρές σειρές (F6:8) που αποκτήθηκαν από μια μερικώς διειδική διασταύρωση με αποτέλεσμα να κατασκευάσουν ένα γενετικό χάρτη με 89 RAPD, 79 AFLP, 6 RFLP και τρεις μορφολογικούς δείκτες. Ο χάρτης κάλυπτε μια περιοχή 1073 cM του γενόματος της φακής και με μια μέση απόσταση μεταξύ των κοντινών δεικτών 6.0 cM. Όπως αναφέρουν, ο πληθυσμός των αναδιασταυρωμένων καθαρών σειρών που χρησιμοποιήθηκε παρουσίασε ένα υψηλό βαθμό πολυμορφισμού για του δείκτες DNA, μεγάλη παραλλακτικότητα σε βιοτικούς παράγοντες όπως η αδρομύκωση από φουζάριο αλλά και αβιοτικούς παράγοντες. Συνεπώς, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε περαιτέρω μελέτες για την κατασκευή ενός νέου γενετικού χάρτη.

Οι Tanyolac *et al.* (2009) κατασκεύασαν ένα μοριακό συνδετικό χάρτη της φακής με τη χρήση αναδιασταυρωμένων καθαρών σειρών από 94 φυτά με 166 δείκτες. Ο

συγκεκριμένος χάρτης αποτελείται από 11 συνδετικές ομάδες και καλύπτει 1396.3 cM του γενώματος της φακής όπου η μέση απόσταση μεταξύ των δεικτών είναι 8.4 cM. Οι περισσότεροι από τους RAPD και ISSR δείκτες ήταν ομοιόμορφα κατανομημένοι στο γένωμα της φακής. Ο συγκεκριμένος χάρτης θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην χαρτογράφηση σημαντικών γονιδίων αγρονομικού ενδιαφέροντος, στην κλωνοποίηση των γονιδίων, στην επιλογή υποβοηθούμενη από μοριακούς δείκτες για γονίδια ανθεκτικότητας σε βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες.

Η πρώτη μελέτη εύρεσης του γονιδίου ανθεκτικότητας στο μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis* έγινε από τους Eujayl *et al.* (1998). Η κληρονομηση της ανθεκτικότητας της φακής εξετάστηκε σε αναδιασταυρωμένες καθαρές σειρές που προέκυψαν από διασταυρώσεις μεταξύ ανθεκτικών και καθαρών σειρών οι οποίες αξιολογήθηκαν σε ένα μολυσμένο πειραματικό τεμάχιο. Η ανθεκτικότητα στην αδρομύκωση από το φουζάριο βρέθηκε ότι ελέγχεται από ένα κυρίαρχο γονίδιο στους υπο μελέτη πληθυσμούς φακής. Η εύρεση του έγινε μέσω ενός RAPD δείκτη (OPK-15,00)

Οι Hamwieh *et al.* (2005) χαρτογράφησαν ένα σύνολο 41 μικροδορυφορικών και AFLP δεικτών σε 86 αναδιασταυρωμένες σειρές που προέκυψαν από τη διασταύρωση των ποικιλιών ILL 5588 και L 692-16-1(s). Η ILL 5588 ήταν ανθεκτική στην ασθένεια της φουζαρίωσης οπότε οι αναδιασταυρωμένες καθαρές σειρές διασπώνταν ως προς το γονίδιο ανθεκτικότητας. Ο γενωμικός χάρτης που προέκυψε περιείχε 283 δείκτες που κάλυπταν μία περιοχή μήκους 751 cM. Το γονίδιο ανθεκτικότητας στη φουζαρίωση εντοπίστηκε στη συνδετική ομάδα 6 και πλαισιώνονταν από το δείκτη SSR 59 και τον AFLP p17m30710 σε αποστάσεις 8.0 cM και 3.5 cM αντίστοιχα. Αυτοί οι δείκτες αποτελούν τους πιο κοντινούς στο συγκεκριμένο αγρονομικό χαρακτηριστικό.

Επίσης, οι Gupta *et al.* (2012) κατασκεύασαν ένα γενετικό χάρτη της φακίης χρησιμοποιώντας 114 F2 φυτά που προήλθαν από τη διασταύρωση της ποικιλίας L 830 με την ILWL 77. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι δείκτες RAPD παρουσίαζαν μεγαλύτερο πολυμορφισμό σε σχέση με τους ISSR και τους SSR δείκτες. 199 δείκτες εκ των οποίων 28 SSRs, 9 ISSRs και 162 RAPDs χαρτογραφήθηκαν σε 11 συνδετικές ομάδες. Η ανάλυση σύνδεσης έδειξε 9 κύριες ομάδες σύνδεσης και δύο μικρότερες ομάδες σύνδεσης ενώ βρέθηκαν 11 νέοι SSRs. Επιπλέον, οι ISSR και RAPD δείκτες αποδείχθηκε ότι ήταν χρήσιμοι στη κατασκευή του γενετικού χάρτη και στον κορεσμό. Ο συγκεκριμένος χάρτης καλύπτει σε ένα μεγάλο βαθμό το γένωμα της φακίης και θα μπορούσε να συμβάλλει στον εντοπισμό QTL περιοχών οι οποίες συνδέονται με σημαντικά αγρονομικά χαρακτηριστικά αλλά και στη μοριακή βελτίωση της φακίης.

Οι Sharpe *et al.* (2013) χρησιμοποίησαν ως υλικό εννέα γενοτύπους της καλλιεργούμενης φακίης *L. culinaris* και δύο καταχωρήσεις γενετικού υλικού από το άγριο είδος *L. ervoides* στα οποία εφάρμοσαν αλληλούχηση με σύγχρονες μεθόδους ενώ και με τη βοήθεια της βιοπληροφορικής μπόρεσαν να εντοπίσουν έναν μεγάλο αριθμό σημειακών νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) και να κατασκευάσουν έναν πολύπλοκο γενετικό χάρτη της φακίης. Αυτοί οι πολυμορφισμοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τους ερευνητές και τους βελτιωτές για γενετικές αναλύσεις και την αξιοποίησή τους σε βελτιωτικά προγράμματα.

Επίσης, εντοπίστηκαν δύο RAPD δείκτες, ο RV01 και RB18, οι οποίοι βρίσκονταν στα 6 και 14 cM αντίστοιχα και οι οποίοι πλαισίωσαν το γονίδιο ανθεκτικότητας στην ασκοχύτωση, στην ποικιλία ILL5588. Στη συνέχεια μετατράπηκαν σε δείκτες SCAR ώστε να εφαρμοσθούν και σε άλλες γονικές σειρές. Έπειτα προέκυψαν άλλοι δύο δείκτες RAPD (UBC2271290 και OPD-10870) στην ποικιλία Indianhead και περιστοίχιζαν το γονίδιο *ral2*. Πιο πρόσφατα έχουν αναπτυχθεί δείκτες οι οποίοι είναι

συνδεδεμένοι με τα κυρίαρχα γονίδια ανθεκτικότητας στην ποικιλία ILL7537 και θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην πυραμιδοποίηση των γονιδίων ανθεκτικότητα για τη δημιουργία μιας ανθεκτικής ποικιλίας στην ασκοχύτωση.

Όσον αφορά την ανθεκτικότητα στην ανθράκωση χρησιμοποιήθηκαν 147 αναδιασταυρωμένες καθαρές σειρές που προήλθαν από τη διασταύρωση της ανθεκτικής (PI320937) και της ευαίσθητης (Eston) ποικιλίας. Αναγνωρίστηκαν δύο RAPD δείκτες, οι OPE061250 και UBC704700 στα 6.4 cM και 10.5 cM αντίστοιχα, οι οποίοι ήταν συνδεδεμένοι στο γενετικό τόπο *LCt-2*, υπεύθυνος για την ανθεκτικότητα στη συγκεκριμένη ασθένεια. (Muehlbauer *et al.*, 2006)

1.5 Σκοπός πτυχιακής διατριβής

Η παρούσα ερευνητική εργασία είχε ως σκοπό τη διερεύνηση της ανθεκτικότητας ποικιλιών φακής στο μύκητα *Fusarium oxysporum f. sp. lentis*, μετά από εφαρμογή πειραμάτων αγρού και *in vitro* αξιολόγηση στο εργαστήριο, με παράλληλη εξέταση της δυνατότητας για αξιοποίηση μοριακών δεικτών (SSR) ως εργαλείο για τον εντοπισμό και επιλογή ανθεκτικών φυτών στην ασθένεια της φουζαρίωσης.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Φυτικό υλικό

Το φυτικό υλικό του πειράματος αποτέλεσε ευγενική χορηγία του Ινστιτούτου Κτηνοτροφικών Φυτών & Βοσκών στη Λάρισα και αποτελούνταν από δύο ποικιλίες (ILL 590, ILL 6031) και από δύο F₃ σειρές (Αθηνά x ILL 590, Σάμος x ILL 6031).

Η ποικιλία ILL 590 με καταγωγή από την Τουρκία, στάλθηκε στην Ελλάδα μέσω ICARDA ως ανθεκτική στο φουζάριο.

Η ποικιλία ILL 6031 στάλθηκε στην Ελλάδα μέσω ICARDA ως ευαίσθητος μάρτυρας στο φουζάριο.

Η σειρά (Αθηνά x 590) δημιουργήθηκε μετά από διασταύρωση στα πλαίσια βελτιωτικού προγράμματος του ΙΚΦ&Β με στόχο τη δημιουργία ποικιλιών με ανθεκτικότητα στο φουζάριο, πρωιμότητα και άριστα οργανοληπτικά και αγρονομικά χαρακτηριστικά.

Η σειρά (Σάμος x 590) δημιουργήθηκε μετά από διασταύρωση στα πλαίσια βελτιωτικού προγράμματος του ΙΚΦ&Β με στόχο τη δημιουργία ποικιλιών με ανθεκτικότητα στο φουζάριο και άριστα οργανοληπτικά και αγρονομικά χαρακτηριστικά.

2.2 Απομόνωση παθογόνου και συνθήκες καλλιέργειας του μύκητα

Για την απομόνωση του φουζαρίου συλλέχθηκε χώμα κάτω από τα 10 cm του εδάφους από το Ινστιτούτο Κτηνοτροφικών Φυτών & Βοσκών στη Λάρισα , το οποίο είναι επιμολυσμένο και χρησιμοποιείται για τις ανάγκες αξιολόγησης και επιλογής στο μύκητα *Fusarium spp.* που εφαρμόζει το Ι.Κ.Φ.&Β.Λ.

Πενήντα σπόροι από την ευαίσθητη ποικιλία ILL 6031 τοποθετήθηκαν για προβλάστηση και στη συνέχεια τα φυτάρια μεταφυτεύθηκαν σε γλάστρες με διαστάσεις 6.5 x 6.5 cm (1 σπόρος / γλάστρα) με μολυσμένο χώμα. Τα φυτά ποτίζονταν τακτικά και αναπτύσσονταν σε θερμοκήπιο με θερμοκρασία 27°C. Έπειτα από δύο εβδομάδες παρατηρήθηκαν τα πρώτα συμπτώματα σε 12 φυτά (Εικ. 1) που ήταν συστροφή των φύλλων και η χλώρωσή τους από κάτω προς τα πάνω όπως και στο σημείο του λαιμού.

Επίσης ο βλαστός παρουσίαζε χλώρωση και είχε μικρότερο πάχος ενώ το ριζικό σύστημα των φυτών είχε μειωμένη ανάπτυξη και εμφάνιζε κατά σημεία καφέ αποχρωματισμό.

Από τα παραπάνω προσβεβλημένα φυτά, επιλέχθηκαν αυτά που εμφάνιζαν σε μεγαλύτερο βαθμό τα συμπτώματα της ασθένειας και τοποθετήθηκαν για 12 ώρες σε τρεχούμενο νερό βρύσης για απομάκρυνση άλλων μικροοργανισμών. Στη συνέχεια έγινε κοπή τμημάτων της ρίζας και του βλαστού στο σημείο του λαιμού και στα σημεία που παρουσίαζαν χλώρωση και μεταφέρθηκαν υπο ασηπτικές συνθήκες σε τριβλία με εκλεκτικό υλικό για απομόνωση του μύκητα.

Η συγκεκριμένη μέθοδος αποτέλεσε μια τροποποίηση αυτής του Park (1963) όπου το εκλεκτικό υλικό χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του *Fusarium oxysporum* από το έδαφος και όχι από ιστούς φυτού. Το υλικό αποτελούνταν από: NaNO₃, 2 g; KH₂PO₄, 1 g; MgSO₄*7H₂O, 0.5 g; K₂S₂O₅, 0.3 g; galactose, 10 g; agar, 15 g; απεσταγμένο νερό μέχρι το 1 L. Στη συνέχεια έγινε αποστείρωσή του στις 151b./sq.in. για 20 min.

Τα τριβλία αφέθηκαν για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου με 12h φως/ 12h σκοτάδι. Έπειτα από δύο ημέρες είχαμε την ανάπτυξη άσπρων υφών στα διάφορα φυτικά τμήματα. (Εικ. 2)

Ακολούθως, μεταφέρθηκαν οι υφές με τη μέθοδο streaking σε καινούρια τριβλία με PDA (Potato Dextrose Agar) και επωάστηκαν σε συνθήκες δωματίου. Μετά από πέντε ημέρες τα τριβλία παρουσίαζαν άσπρο έως ροζ αποχρωματισμό. (Εικ. 3)

Στη συνέχεια, υφές μεταφέρθηκαν εκ νέου σε δοκιμαστικούς σωλήνες με PDA και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο στους 20 °C και στο σκοτάδι. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες παρουσίασαν κόκκινο αποχρωματισμό ενώ έγινε δείγμα για παρατήρηση στο μικροσκόπιο.



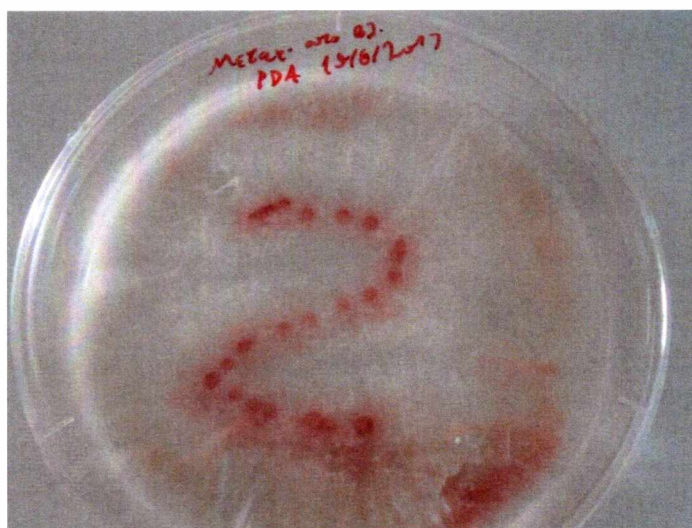
Εικόνα 1. Προσβεβλημένο φυτό σε επιμολυσμένο χόμα



Εικόνα 2. Ανάπτυξη υφών σε τμήματα φυτού φακής σε εκλεκτικό υλικό

Κατά την 3η ημέρα από τον εμβολιασμό, παρατηρήθηκαν τα κονίδια του μύκητα τα οποία ήταν μονοκύτταρα ή πολυκύτταρα κυρτού σχήματος. (Εικ. 4)

Για την επανα-απομόνωση του φουζάριου από προσβεβλημένα φυτά, 5 σπόροι από την ευαίσθητη ποικιλία ILL 6031 απολυμάνθηκαν σε 2% διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου και τοποθετήθηκαν για προβλάστηση σε γλάστρες με περλίτη σε θάλαμο επώασης στους 20 °C με 12h η φως/12h σκοτάδι και 90% σχετική υγρασία, για 3 εβδομάδες. Έπειτα έγινε ξέπλυμα των ριζών κάτω από ασηπτικές συνθήκες στην τράπεζα νηματικής ροής (Laminar flow) και ακολούθησε η κοπή των κορυφαίων τμημάτων τους γύρω στα 0.5 cm. Οι ρίζες εμβαπτίστηκαν σε εναιώρημα σπορίων του μύκητα το οποίο παρασκευάστηκε την ίδια ημέρα από έναν από τους παραπάνω δοκιμαστικούς σωλήνες με αποστειρωμένα υλικά. Η εμβάπτιση έγινε σε 10 ml εναιωρήματος και διάρκησε 10 min. Τα φυτά στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες με υγρό διάλυμα MS και επώαστηκαν σε θάλαμο στους 20 °C με 12h η φως/12h σκοτάδι και 90% σχετική υγρασία ώστε να εκδηλωθούν τα συμπτώματα. Η λήψη παρατηρήσεων άρχισε την 5η ημέρα οπότε και καταγράφονταν τα συμπτώματα των φυτών κάθε 3 ημέρες και για διάστημα τεσσάρων εβδομάδων.



Εικόνα 3. Ανάπτυξη ροζ αποχρωματισμού σε υπόστρωμα PDA

Έπειτα από τέσσερις εβδομάδες, τα φυτά που παρουσίασαν τα πιο έντονα συμπτώματα τοποθετήθηκαν σε τρεχούμενο νερό για 12 ώρες. Στη συνέχεια τμήματα των φυτών από τις ρίζες και τους χλωρωμένους βλαστούς τοποθετήθηκαν σε εκλεκτικό υλικό για το φουζάριο και επώαστηκαν σε συνθήκες δωματίου. Μετά από πέντε ημέρες έγινε μεταφορά των υφών σε τριβλία με PDA, τα οποία μας έδωσαν αρχικά άσπρο και στη συνέχεια ροζ αποχρωματισμό ενώ τη 10η ημέρα από τον εμβολιασμό των τριβλίων παρατηρήθηκαν μονοκύτταρα και πολυκύτταρα κονίδια.

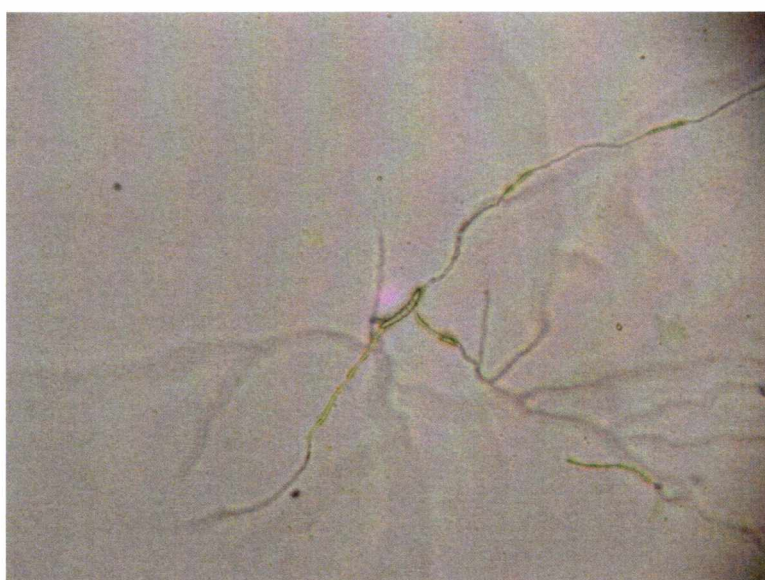
Για να εξασφαλισθεί η καθαρότητα της απομόνωσης, έγινε μονόσπορη καλλιέργεια. Αρχικά από ένα τριβλίο με PDA έγινε εναιώρημα σπορίων 10 ml με αποστειρωμένα υλικά. Με μικροπιπέτα έγινε η έγχυση μιας σταγόνας σε τριβλίο με water agar και αφέθηκε να κυλήσει στην άλλη άκρη του τριβλίου. Κατά μήκος της γραμμής παρατηρήθηκαν μακροκονίδια οξυκατάληκτα κυρτού σχήματος. Η βλάστηση των κονιδίων έγινε ορατή μετά από δύο ημέρες.



Εικόνα 4. Μονοκύτταρα και πολυκύτταρα κονίδια του μύκητα

Ένα από τα κονίδια που βλάστησαν (Εικ. 5) μεταφέρθηκε ξεχωριστά σε τριβλίο με PDA ώστε να συνεχιστεί η ανάπτυξη των υφών και το οποίο με τη σειρά του έδωσε ροζ αποχρωματισμό.

Το παραπάνω τριβλίο αποτέλεσε την απομόνωση με ονομασία EFS/6M (Εικ. 6) η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον περαιτέρω εμβολιασμό τριβλίων και την τελική παρασκευή μολύσματος, για τη μόλυνση όλων των γενοτύπων φακής που χρησιμοποιήθηκαν ILL 590, ILL 6031, Αθηνα x 590 και Σάμος x 590.



Εικόνα 5. Κονίδιο που έχει βλαστήσει σε water agar



Εικόνα 6. Η απομόνωση του μύκητα EFS/6M σε υπόστρωμα PDA

2.3 In vitro αξιολόγηση της αντίδρασης των γενοτύπων φακής στο φουζάριο

Δεδομένου ότι η ποικιλία ILL 590 έχει αποδειχθεί ανθεκτική στο *Fusarium oxysporum f. sp. lentis* ενώ η ποικιλία ILL 6031 έχει αποδειχθεί ότι είναι ευαίσθητη στο μύκητα χρησιμοποιήθηκαν ως θετικός και ως αρνητικός μάρτυρας αντίστοιχα για το φουζάριο. (Φώτη, Διατριβή) Η αντίδραση των δύο F₃ γενεών στο φουζάριο αξιολογήθηκε σε συνθήκες *in vitro* υπό την επίδραση του μύκητα για να διαπιστωθεί το επίπεδο ανθεκτικότητά τους.

Αρχικά έγινε ο εμβολιασμός τριβλίων με την απομόνωση EFS/6M και επώαστηκαν σε συνθήκες δωματίου. Την ένατη ημέρα τοποθετήθηκαν κάτω από λάμπα UV για 24h ώστε να επάγουμε την σποριοποίηση του μύκητα και να παραχθούν περισσότερα κονίδια. Τη δέκατη ημέρα από τον εμβολιασμό των τριβλίων προστέθηκαν 10 ml σε κάθε τριβλίο και το διάλυμα περάστηκε από τουλουπάνι ώστε να συγκρατηθεί το μυκήλιο. Οι εργασίες πραγματοποιήθηκαν με αποστειρωμένα υλικά κάτω από συνθήκες του θαλάμου νηματικής ροής (Laminar flow). Στη συνέχεια έγινε η ρύθμιση της συγκέντρωσης του εναιωρήματος σπορίων με το αιματοκυτταρόμετρο και προσαρμόστηκε στα 10⁵ σπόρια/ml.

Η μόλυνση των φυτών πραγματοποιήθηκε την ίδια μέρα που έγινε παρασκευή του εναιωρήματος σπορίων. Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 10 σπόροι ανά κατηγορία, οι οποίοι απολυμάνθηκαν στο Laminar flow σε 2% υποχλωριώδες νάτριο για 3 min. και στη συνέχεια ξεπλύθηκαν μία φορά με αποστειρωμένο νερό και τοποθετήθηκαν για 14 ημέρες σε κλειστά δοχεία με αποστειρωμένη άμμο ώστε να βλαστήσουν. Οι σπόροι τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 25°C με 12h φώς/12h σκοτάδι. Έπειτα από 14 ημέρες τα φυτά αφαιρέθηκαν από τα δοχεία και ξεπλύθηκαν οι ρίζες τους με αποσταγμένο νερό. Έπειτα στο Laminar flow κόπηκαν τα κορυφαία τμήματα των ριζών περίπου στα 0.5 cm ώστε να διευκολυνθεί η είσοδος του παθογόνου και έγινε η

εμβάπτιση τους σε 10 ml εναιώρημα σπορίων για 10 min. Ακολούθησε η τοποθέτηση των φυτών σε δοκιμαστικούς σωλήνες όπου οι βλαστοί είχαν περιτυλιχθεί με αποστειρωμένο βαμβάκι για καλύτερη σταθεροποίηση τους. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες αποτελούνταν από 20 ml υγρό θρεπτικό διάλυμα MS μέσα στο οποίο είχαν εμβαπτιστεί οι ρίζες των φυτών. Τα συστατικά των αποθεματικών διαλυμάτων (stocks) για την παρασκευή του θρεπτικού διαλύματος παρουσιάζονται στον πίνακα 1. Επιπλέον, οι βλαστοί των φυτών περιτυλίχθηκαν με και ώστε μόνο οι ρίζες να έρχονται σε επαφή με το διάλυμα. Ως μάρτυρας (control) χρησιμοποιήθηκαν φυτά τα οποία αναπτύχθηκαν και προετοιμάστηκαν με τον ίδιο τρόπο, των οποίων όμως οι ρίζες εμβαπτίστηκαν σε 10 ml αποστειρωμένο νερό για 10 min. Τα φυτά επώαστηκαν σε θάλαμο στους 25°C με 12h φώς/12h σκοτάδι.

Η καταγραφή της αντίδρασης των φυτών στο μύκητα ξεκίνησε την πέμπτη ημέρα από τη μόλυνση και πραγματοποιούνταν κάθε τρίτη ημέρα για σύνολο τριών εβδομάδων χρησιμοποιώντας την κλίμακα 1-9 των Bayaa *et al.* (1995), η οποία περιγράφεται παρακάτω.

1=κανένα σύμπτωμα-υψηλή ανθεκτικότητα,

3=κιτρίνισμα μόνο των φύλλων της βάσης-ανθεκτικό,

5=κιτρίνισμα του 50% του φυλλώματος-μετρίως ανθεκτικό,

7=κιτρίνισμα ολόκληρου του φυλλώματος και μερικός μαρασμός-ευαίσθητο,

9=ολοκληρωτική μάρανση του φυτού και/ή ξήρανση-πολύ ευαίσθητο.

Αφού ολοκληρώθηκε η λήψη των παρατηρήσεων, κόπηκαν τμήματα από το βλαστό και τη ρίζα και από τις τέσσερις κατηγορίες γενοτύπων και εμβαπτίστηκαν σε 2% υποχλωριώδες νάτριο για 3 min. για απολύμανση. Ακολούθησε το ξέπλυμά τους

και αφού στέγνωσαν τοποθετήθηκαν σε τριβλία με θρεπτικό υπόστρωμα PDA και επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Εφόσον είχε αναπτυχθεί μυκήλιο έγινε δείγμα για το μικροσκόπιο για να παρατηρηθούν οι καρποφορίες του μύκητα ώστε να εξακριβωθεί η ύπαρξη του στο αγγειακό σύστημα του φυτού.

Πίνακας 2. Συστατικά υγρού θρεπτικού διαλύματος MS (Murashige & Skoog)

Stock	mg/l
Stock 1	(x10)
CaCl ₂ 2H ₂ O	440
Stock 2	(x10)
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
MgSO ₄ 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Stock 3	(x100)
FeSO ₄ 7H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA	37,23
Stock 4	(x100)
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄	22,3
ZnSO ₄	8,6
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,25
Stock 5	(x1000)
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,025
Stock βιταμινών	(x10)
Myo-Inositol	100
Thiamine HCl	2
Νικοτινικό οξύ	0,5
Πυριδοξίνη	1

2.4 Εφαρμογή του μοριακού δείκτη SSR 59-2 για εύρεση ανθεκτικών φυτών στο *Fusarium oxysporum f. sp. lentis*

2.4.1 Συλλογή δειγμάτων

Η συλλογή φυτών έγινε απο πειραματικό τεμάχιο (Εικ. 7) στο αγρόκτημα του Ινστιτούτο Κτηνοτροφικών Φυτών και Βοσκών στη Λάρισα (γεωγραφικό πλάτος 39⁰ 36'N , γεωγραφικό μήκος 22⁰ 25' E). Συγκεκριμένα στο πειραματικό τεμάχιο είχαν σπαρθεί 21 γενότυποι οι οποίοι αποτελούνταν από φυτά της ποικιλίας ILL 590 και της ILL 6031 αλλά και από ατομικά φυτά των F3 σειρών Αθηνά x ILL 590 και Σάμος x ILL 590. Τα φυτά αξιολογήθηκαν σε κυψελωτή διάταξη σε ενδιάμεση πυκνότητα σποράς σε οργανικό περιβάλλον και χρησιμοποιήθηκε το επαναλαμβανόμενο κυψελωτό σχέδιο R-21 (Fasoulas και Fasoula 1995). Η απόσταση μεταξύ των φυτών ήταν 30 εκ. που αντιστοιχεί σε πυκνότητα σποράς 12,8 φυτά/m² και θεωρήθηκε ότι αντιπροσωπεύει την ύπαρξη ανταγωνισμού από κάποιο σημείο της ανάπτυξης τους και μετά. Σπάρθηκαν 25 γραμμές με 23 φυτά σε κάθε γραμμή που αντιστοιχεί σε 575 θέσεις σποράς συνολικά. Το έδαφος στο οποίο αναπτύχθηκαν τα φυτά ήταν μολυσμένο με το μύκητα *Fusarium oxysporum*, με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν ορισμένα συμπτώματα όπως χλώρωση των φύλλων ή τμημάτων των φυτών, μειωμένη ανάπτυξη, αδρομηκώσεις και μαρασμό ολόκληρων των φυτών. Συνεπώς, επιλέχθηκαν ορισμένα δείγματα από τους 21 γενότυπους στα οποία θα εφαρμόζονταν ο μοριακός δείκτης SSR 59-2 με σκοπό να διαπιστωθεί η ύπαρξη ή όχι του γονιδίου ανθεκτικότητας και κατά πόσο το μοριακό προφίλ των φυτών συνάδει με την επιλογή με βάση το φαινότυπό τους. Πιο αναλυτικά επιλέχθηκε ένα φυτό από την ποικιλία ILL 6031 (Εικ. 8) και ένα φυτό από την ILL 590 (Εικ. 9) τα οποία αποτέλεσαν τον ανθεκτικό και ευαίσθητο μάρτυρα αντίστοιχα στο μύκητα. Στη συνέχεια επιλέχθηκαν ένα φυτό φαινοτυπικά ευαίσθητο (Εικ. 10) και ένα φυτό φαινοτυπικά ανθεκτικό (Εικ. 11) όπου και στις δύο

περιπτώσεις επιλογής με βάση το φαινότυπο τα δείγματα αποτελούνταν από άτομα των F3 σειρών (Αθηνά x ILL 590) και (Σάμος x ILL 6031).



Εικόνα 7. Πειραματικό τεμάχιο

2.4.2 Εξαγωγή DNA

Για την εξαγωγή του DNA από τους ιστούς των παραπάνω φυτών, ζυγίστηκαν 0.3 g από τα φύλλα και έγινε η λιοτρίβησή τους σε γουδί με τη βοήθεια του υγρού αζώτου ενώ διαδικασία που ακολουθήθηκε βασίστηκε στο πρωτόκολλο DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Έπειτα έγινε ο ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του DNA του κάθε δείγματος με τη χρήση φασματοφωτόμετρου υπεριώδους/ορατού, με απορρόφηση στα A_{260} nm ώστε να εκτιμηθεί η συγκέντρωση του DNA και με απορρόφηση στα A_{280} nm με σκοπό να εκτιμηθεί η παρουσία πρωτεϊνών από το λόγο A_{260}/A_{280} . Η συγκέντρωση DNA υπολογίστηκε σε ng/ μ L. Τέλος πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις ώστε κάθε δείγμα να περιέχει ίση ποσότητα DNA.



Εικόνα 8. Δείγμα 1-ILL 6031



Εικόνα 9. Δείγμα 2-ILL 590



Εικόνα 10. Δείγμα 3-Αθηνά x ILL 590



Εικόνα 11. Δείγμα 4-Αθηνά x ILL 590

2.4.3 Αντίδραση PCR

Για την εύρεση ανθεκτικών και ευαίσθητων γενοτύπων φακής στο φουζάριο χρησιμοποιήθηκε ο μοριακός δείκτης SSR 59-2 ο οποίος αναπτύχθηκε από τους Hamwieh *et al.* (2005). Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε βασίστηκε σε αυτό της Φώτη Χρύσας (Φώτη, Διατριβή) με ορισμένες τροποποιήσεις στην ποσότητα του DNA και των dNTPs. Ο όγκος της αντίδρασης για το κάθε δείγμα ήταν 25 μ l.

Πίνακας 3

Αντιδραστήρια	Ποσότητα (μl)
Taq	0.25
10x PCR Buffer	5
25 Mm MgCl ₂	1
2.5 mM dNTPs	0.25
Primer forward 10 mM	1
Primer reverse 10 mM	1
H ₂ O	13.5
DNA	3

Το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή για την πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 4.

Στάδια PCR		Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη		94 ⁰ C	2 min
Αποδιάταξη	35 κύκλοι	94 ⁰ C	30 sec
Υβριδισμός		60 ⁰ C	30 sec
Επιμήκυνση		72 ⁰ C	2 min
Τελική επιμήκυνση		72 ⁰ C	10 min

Τέλος τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 3% για 2.5 ώρες στα 60 V και έγινε η οπτικοποίηση των ζωνών με έκθεση της πηκτής σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Απομόνωση και ταυτοποίηση του *Fusarium oxysporum f. sp. lentis*

Ο μύκητας ο οποίος απομονώθηκε από τους ιστούς των φυτών φακής τα οποία αξιολογήθηκαν *in vitro*, κατά την ανάπτυξη του σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA έδωσε ροζ αποχρωματισμό (Εικ. 12) και κονίδια κυρτού σχήματος (Εικ. 13). Ο ροζ αποχρωματισμός σε PDA υποδηλώνει ότι πρόκειται για το *Fusarium oxysporum* και όχι για κάποιο άλλο σαπροφυτικό είδος όπως το *Fusarium solani* το οποίο δίνει λευκό με κρεμ αποχρωματισμό στο ίδιο υπόστρωμα. Επίσης, λόγω των διαδοχικών απομονώσεων του μύκητα από μολυσμένους ιστούς φυτών φακής όπως έχει περιγραφεί στα υλικά και μέθοδοι, συμπεραίνουμε ότι πρόκειται για το *Fusarium oxysporum f. sp. lentis*.



Εικόνα 12. *Fusarium oxysporum* σε PDA

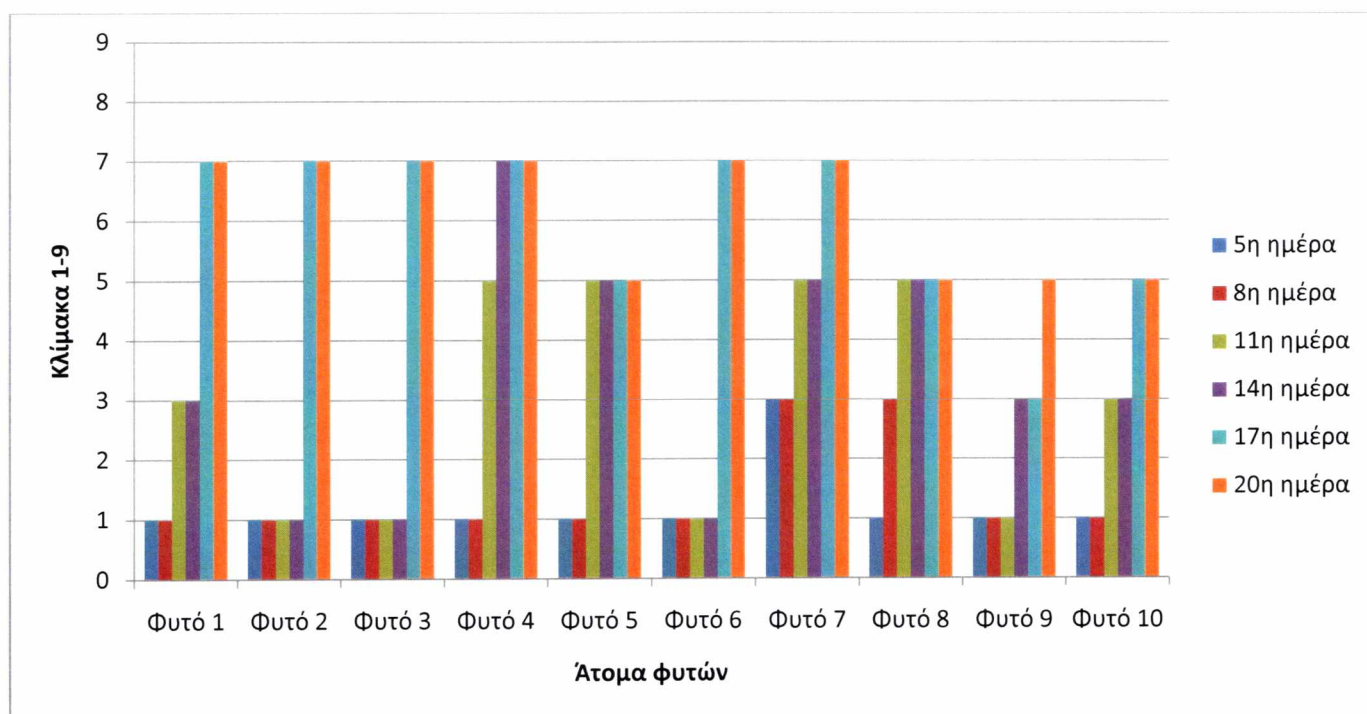


Εικόνα 13. Μακροκόνιδιο του *Fusarium oxysporum f. sp. lentis*

3. 2 Αποτελέσματα της *in vitro* αξιολόγησης των γενοτύπων φακής

Παρακάτω παρουσιάζονται τα διάγραμμα από την *in vitro* αξιολόγηση των γενοτύπων φακής. Στο κάθετο άξονα είναι η κλίμακα 1-9 των Bayaa *et al.* (1995) με την οποία αξιολογήθηκαν τα φυτά ενώ στον οριζόντιο άξονα παρουσιάζονται τα ατομικά φυτά στα οποία έγινε η λήψη παρατηρήσεων στα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα. Παράλληλα εκτίθενται και φωτογραφίες από τα πιο ανθεκτικά και πιο ευαίσθητα φυτά ανά γενότυπο.

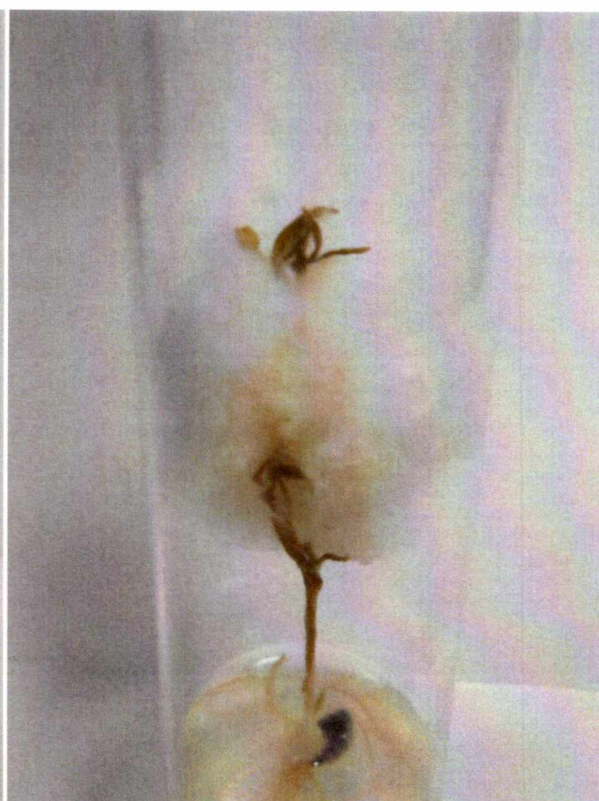
Διάγραμμα 1. ILL590



Από τα 10 φυτά τα 9 σκόραραν 1 (υψηλή ανθεκτικότητα) κατά την πρώτη λήψη παρατηρήσεων. Κατά την τελευταία λήψη παρατηρήσεων το 60% φυτών χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητα ενώ τα 40% ως μετρίως ανθεκτικά. Επίσης, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα σε ορισμένα φυτά υπάρχει μια μη ομαλή μετάβαση από το αρχικό στάδιο της κλίμακας στο τελευταίο στάδιο λήψης παρατηρήσεων.



Εικόνα 14. ILL 590 / φυτό 9/ 5^η ημέρα



Εικόνα 15. ILL 590 / φυτό 9/ 20^η ημέρα

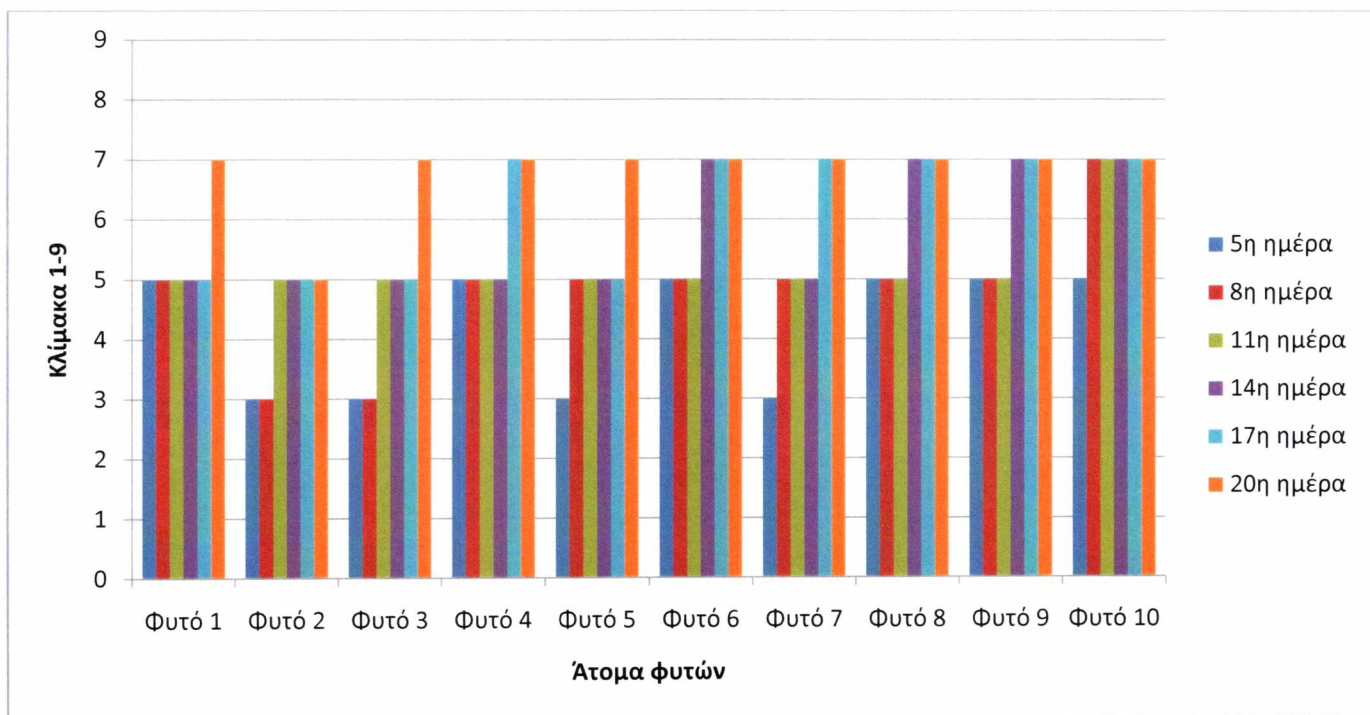


Εικόνα 16. ILL 590 / φυτό 7 / 5^η ημέρα



Εικόνα 17. ILL 590 / φυτό 7 / 20^η ημέρα

Διάγραμμα 2. ILL 6031



Κατά την πρώτη λήψη παρατηρήσεων το 40% των φυτών χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικά ενώ το 60% ως μετρίως ανθεκτικά. Αντίθετα κατά την τελευταία λήψη παρατηρήσεων το 90% των φυτών χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητα.



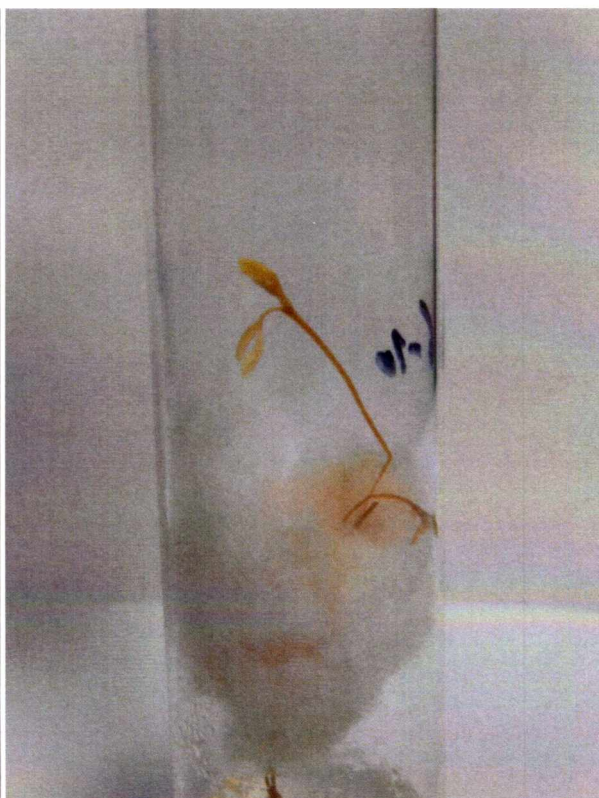
Εικόνα 18. ILL 6031 / φυτό 2 / 5^η ημέρα



Εικόνα 19. ILL 6031 / φυτό 2 / 20^η ημέρα

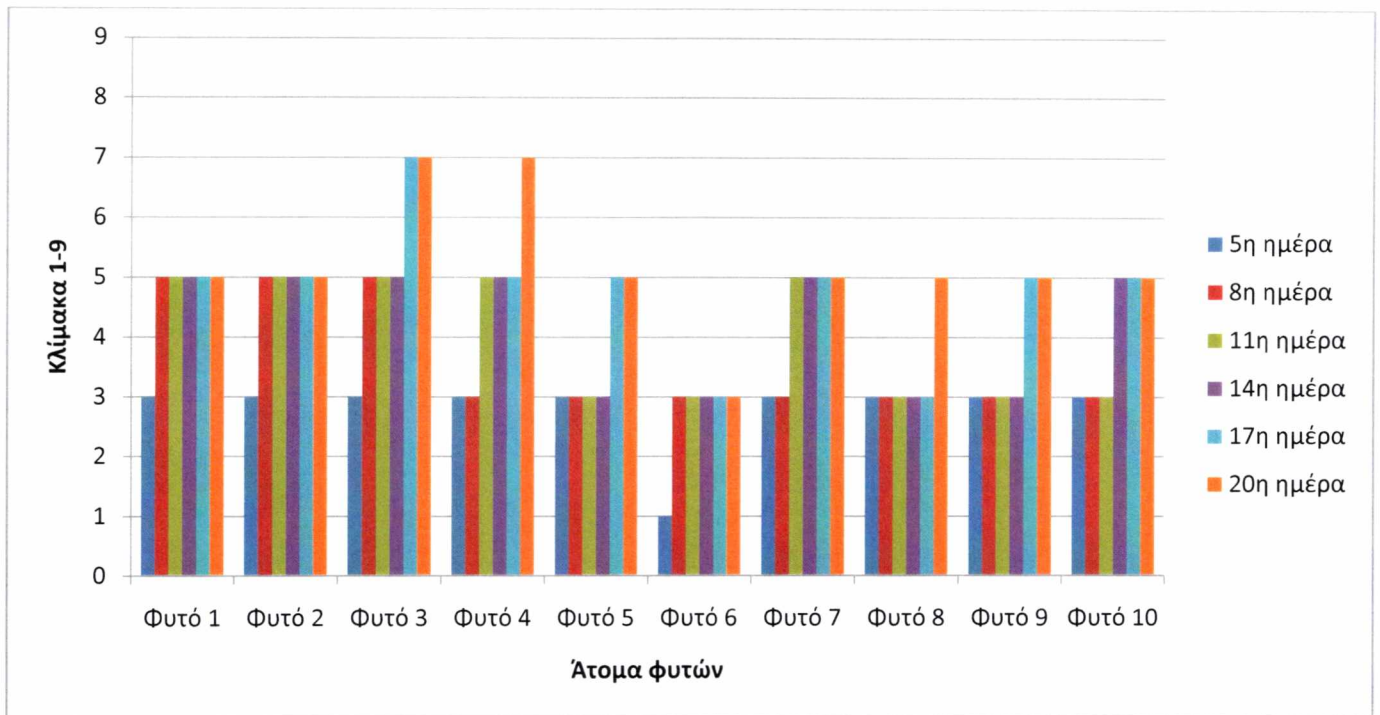


Εικόνα 20. ILL 6031 / φυτό 10 / 5^η ημέρα

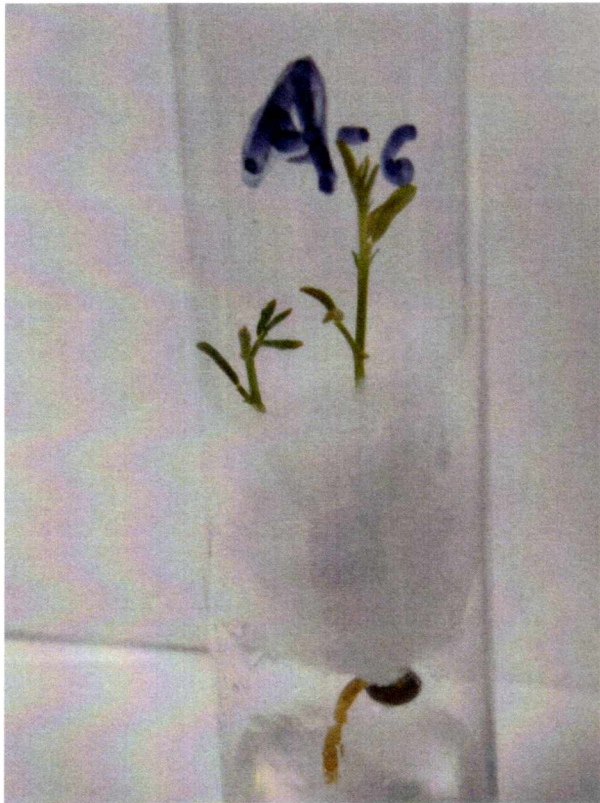


Εικόνα 21. ILL 6031 / φυτό 10 / 20^η ημέρα

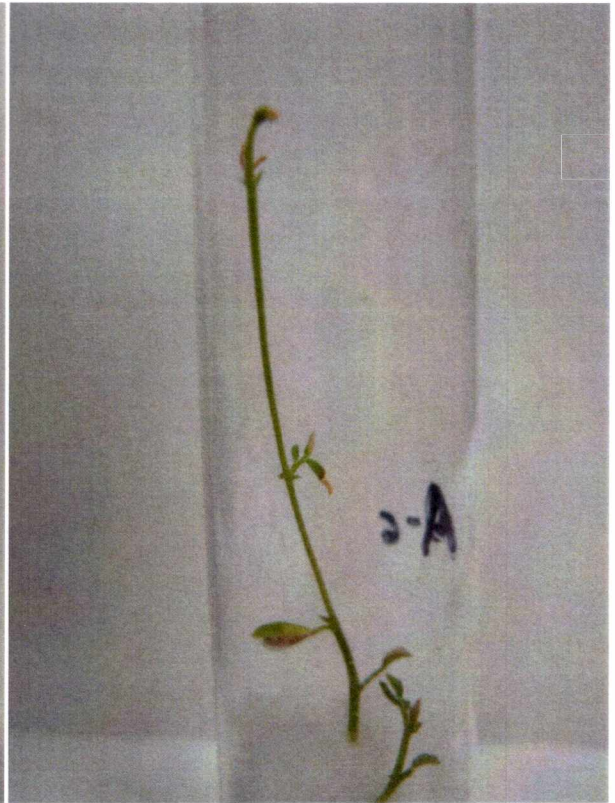
Διάγραμμα 3. Αθηνά x 590



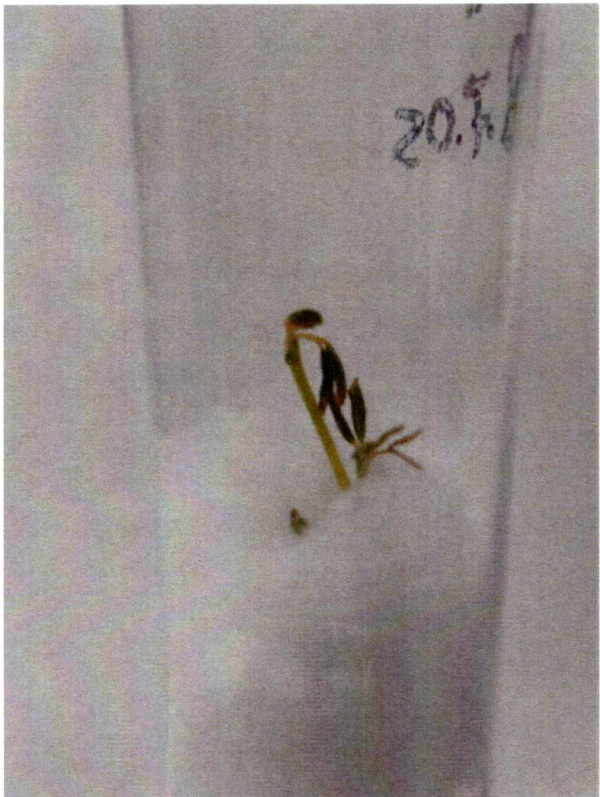
Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα κατά την πρώτη λήψη παρατηρήσεων το 90% των φυτών χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικά ενώ μόνο ένα φυτό εμφάνισε υψηλή ανθεκτικότητα. Κατά την τελευταία λήψη παρατηρήσεων το 80% των φυτών εμφάνισε μέτρια ανθεκτικότητα στο μύκητα ενώ το 20% ήταν ευαίσθητα.



Εικόνα 22. Αθηνά x 590 / φυτό 6 / 5^η ημέρα



Εικόνα 23. Αθηνά x 590 / φυτό 6 / 20^η ημέρα

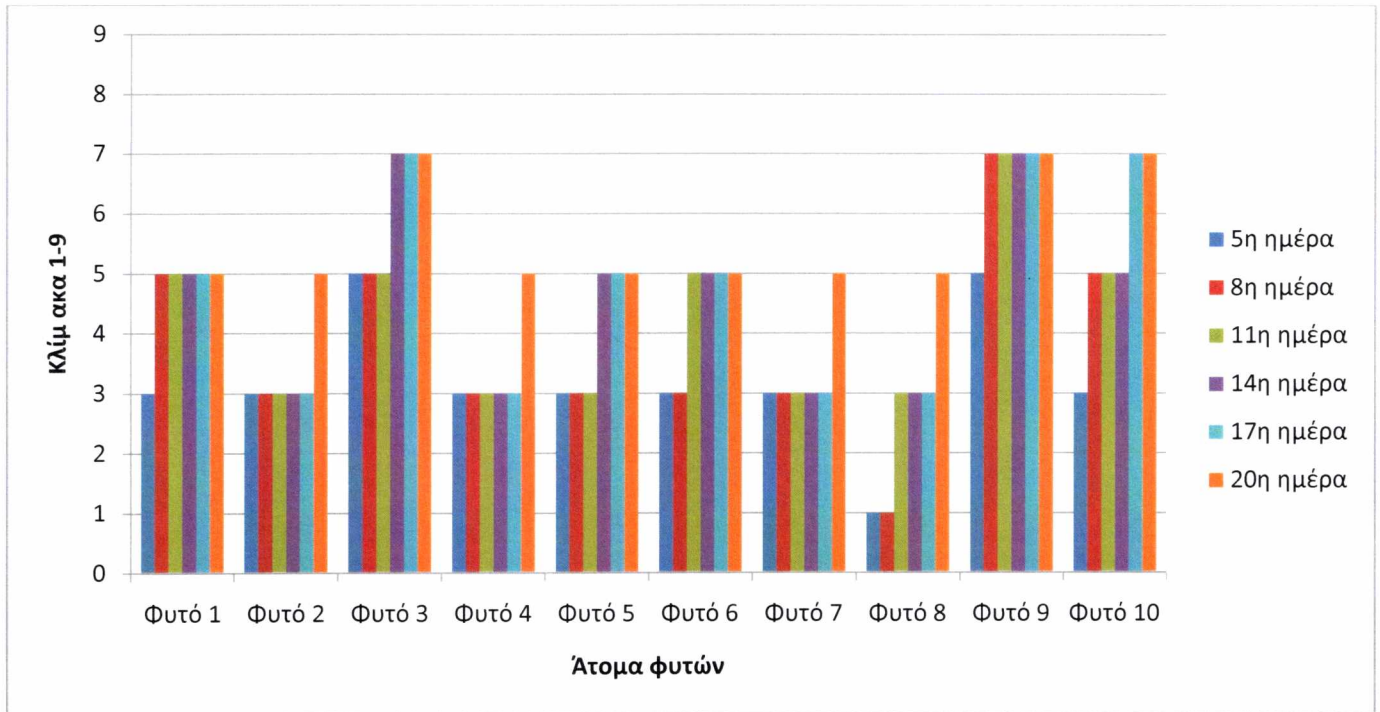


Εικόνα 24. Αθηνά x 590 / φυτό 3 / 5^η ημέρα

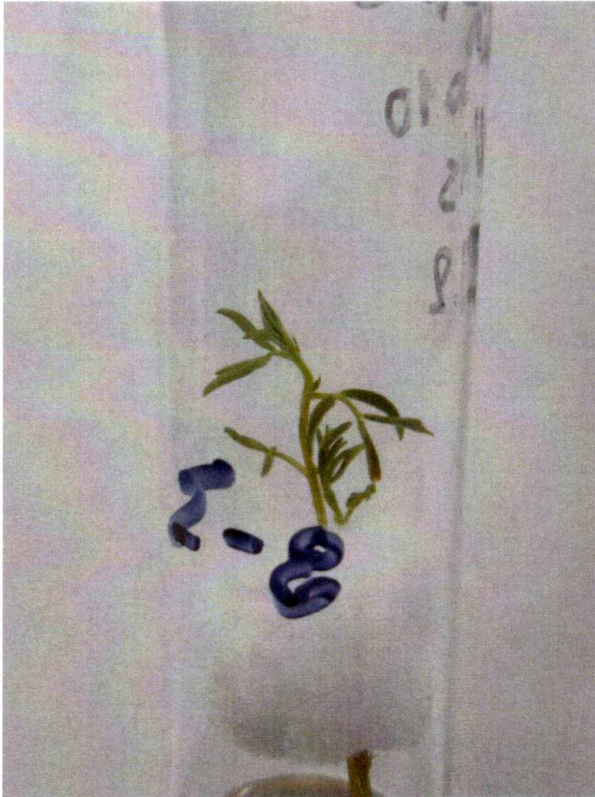


Εικόνα 25. Αθηνά x 590 / φυτό 3 / 20^η ημέρα

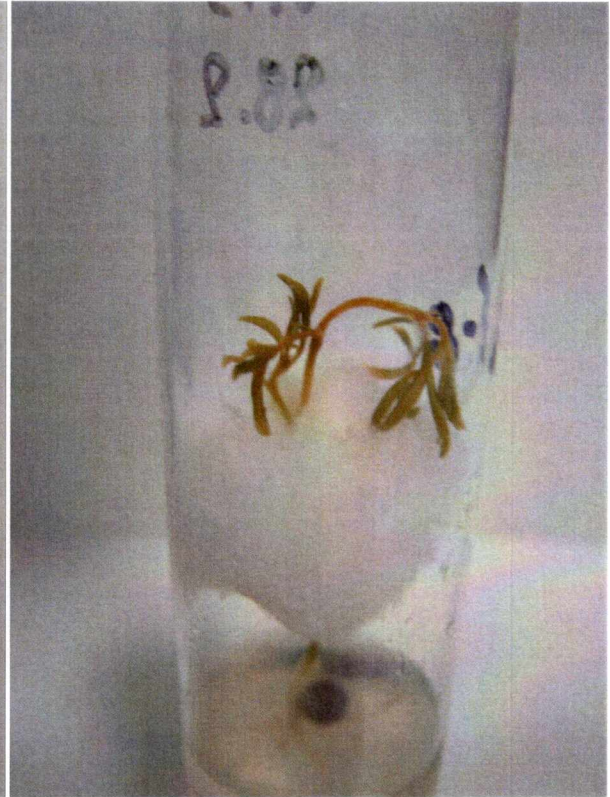
Διάγραμμα 4. Σάμος x 590



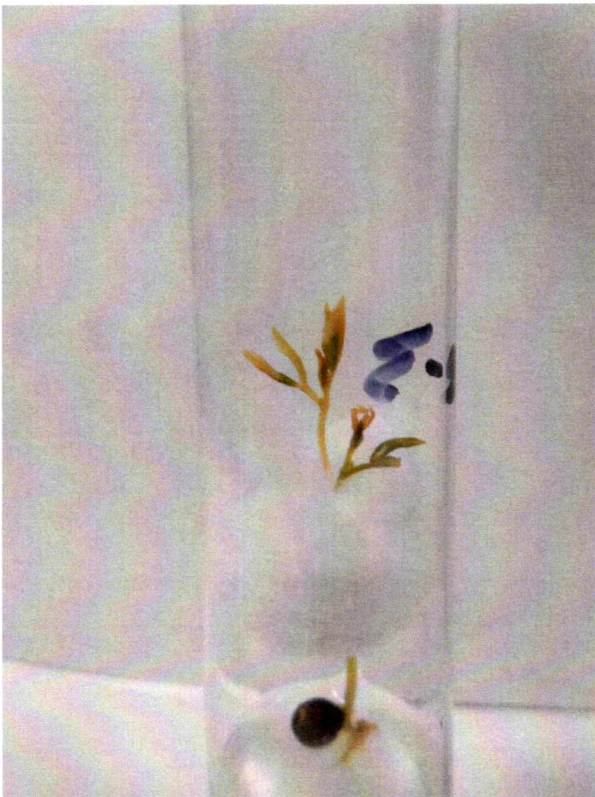
Με βάση το διάγραμμα παρατηρούμε ότι κατά την πρώτη λήψη παρατηρήσεων το 80% των φυτών χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικά ενώ 1 φυτό εμφάνισε υψηλή ανθεκτικότητα. Κατά την τελευταία λήψη παρατηρήσεων το 70% των φυτών χαρακτηρίστηκαν ως μετρίως ανθεκτικά ενώ το 30% ως ευαίσθητα.



Εικόνα 26. Σάμος x 590 / φυτό 8 / 5^η ημέρα



Εικόνα 27. Σάμος x 590 / φυτό 8 / 20^η ημέρα



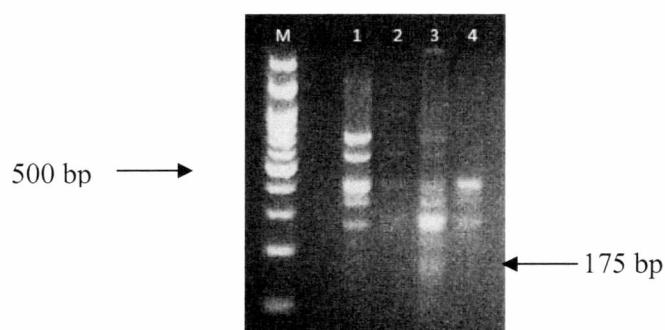
Εικόνα 28. Σάμος x 590 / φυτό 9 / 5^η ημέρα



Εικόνα 29. Σάμος x 590 / φυτό 9 / 20^η ημέρα

3.3 Μοριακός δείκτης SSR 59-2

Η ανάλυση έδειξε ότι το μοριακό προφίλ των δειγμάτων 1 (ευαίσθητος μάρτυρας) και 3 (ευαίσθητο φυτό με βάση το φαινότυπο) ταυτίζεται. Επιπλέον, στο δείγμα 3 παρατηρήθηκε μία ζώνη γύρω στα 175 bp η οποία ωστόσο δεν φαίνεται ευκρινώς στο δείγμα 1. Όσον αφορά τα δείγματα 2 (ανθεκτικός μάρτυρας) και 4 (ανθεκτικό φυτό με βάση το φαινότυπο), το μοριακό προφίλ τους ταυτίζεται στις ζώνες 280 bp και 400 bp ενώ έχουμε απουσία της ζώνης 600 bp στο δείγμα 4. Παρ' όλα αυτά έχουμε απουσία της ζώνης 175 bp και στα δύο δείγματα. Η συγκεκριμένη ζώνη πιθανώς να σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στη φουζαρίωση.



Εικόνα 30. Οπτικοποίηση σε λάμπα UV των ζωνών σε πηκτή αγαρόζης. **M:** δείκτης μοριακού βάρους 500 bp. **1:** ILL 590. **2:** ILL 6031. **3:** Φυτό φαινοτυπικά ευαίσθητο. **4:** Φυτό φαινοτυπικά ανθεκτικό

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 *Fusarium oxysporum f. sp. lentis*

Με βάση τη βιβλιογραφία για λόγους ταυτοποίησης και σποριοποίησης των μυκήτων επιλέγονται στερεά υποστρώματα και σπάνια χρησιμοποιούνται υγρά υποστρώματα. Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε στερεό υπόστρωμα και συγκεκριμένα το Potato Dextrose Agar (PDA) το οποίο είναι το πιο συνηθισμένο μέσο που αξιολογείται για τέτοιους σκοπούς (Kraft *et al.*, 1994). Αυτό έδωσε τη δυνατότητα να αναγνωρισθεί ο μύκητας και να γίνει ο διαχωρισμός από άλλα παθογόνα του εδάφους μέσω της ανάπτυξης χαρακτηριστικού χρωματισμού στο υπόστρωμα που αποτελεί κριτήριο ταυτοποίησης. Ωστόσο όσον αφορά τη σποριοποίηση δεν υπήρξαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα καθώς είχαμε την παραγωγή μικρού αριθμού σπορίων. Συνεπώς, τα τριβλία με τον παθογόνο μικροοργανισμό εκτέθηκαν σε φως κοντά στην περιοχή της υπεριώδους ακτινοβολίας. Όπως αναφέρουν οι Su *et al.* (2012), η έκθεση του μυκηλίου σε αυτό το μήκος κύματος φωτός αποτελεί ένα σημαντικό διεγερτικό παράγοντα για το σχηματισμό σπορίων. Η σποριοποίηση με αυτό τον τρόπο φάνηκε να δίνει αποτελέσματα αν και θα πρέπει να ληφθεί υπόψη και το χρονικό διάστημα της έκθεσης του μυκηλίου κοντά στην περιοχή της υπεριώδους ακτινοβολίας. Επιπλέον, οι ίδιοι ερευνητές αναφέρουν ότι η σποριοποίηση εξαρτάται και από άλλους παράγοντες όπως οι συχνές μεταφορές σε νέο υπόστρωμα, η σύνθεση του υποστρώματος όπως για παράδειγμα αν θα χρησιμοποιηθεί ιστός από το φυτό ξενιστή κατά την παρασκευή του μέσου, η θερμοκρασία, η υγρασία.

4.2 *In vitro* αξιολόγηση γενοτύπων φακής

Για την πραγματοποίηση της μόλυνσης των φυτών φακής, η ποσότητα του μολύσματος που χρησιμοποιήθηκε ήταν 10^5 σπόρια/ml. Η ποσότητα του μολύσματος που χρησιμοποιείται σε προκαταρκτικές αξιολογήσεις φυτών φακής κυμαίνεται σε διάφορα επίπεδα όπως $1 \cdot 10^5$, $1.5 \cdot 10^5$, $2 \cdot 10^5$, $6.5 \cdot 10^5$, $2.5 \cdot 10^6$, $5 \cdot 10^6$ (Kraft *et al.*, 1994 ; Mohammadi *et al.*, 2012) όπου η κάθε ποσότητα μπορεί να εφαρμοσθεί σε διαφορετική ηλικία του φυτού. Σε αντίθεση με τους Belabid & Fortas (2002) οι οποίοι χρησιμοποίησαν συγκέντρωση μολύσματος $2.5 \cdot 10^6$ για να εκτιμήσουν την επιθετικότητα απομονώσεων του *Fusarium oxysporum f. sp. lentis* απέναντι σε 15 ημερών φυτά, στην παρούσα διατριβή επιλέχθηκε η συγκέντρωση $1 \cdot 10^5$ ώστε να εκτιμηθεί η ανθεκτικότητα φυταρίων ηλικίας 15 ημερών. Ο λόγος που επιλέχθηκε η συγκεκριμένη συγκέντρωση ήταν αφενός επειδή τα φυτά αναπτύχθηκαν σε ελεγχόμενο περιβάλλον και όχι στο χωράφι ώστε να μην είναι τόσο εύρωστα και αφετέρου σκοπός ήταν να γίνει εκτίμηση των διαφόρων επιπέδων ανθεκτικότητας των φυτών και όχι της μολυσματικότητας απομονώσεων του παθογόνου μύκητα. Επιπλέον, θα πρέπει να αναφερθεί ότι υψηλές συγκεντρώσεις μολύσματος μπορεί να οδηγήσουν στην ταχεία ανάπτυξη συμπτωμάτων από τα φυτά με αποτέλεσμα να μη υπάρχει μια ξεκάθαρη εικόνα ως προς την ανθεκτικότητας και παράλληλα να αξιολογηθούν λανθασμένα ανθεκτικοί γενότυποι ως ευαίσθητοι.

Σχετικά με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την αξιολόγηση των τεσσάρων γενοτύπων φακής, η ποικιλία ILL 590 η οποία έχει ταυτοποιηθεί ως ανθεκτικός μάρτυρας στο *Fusarium oxysporum f. sp. lentis* δεν εμφάνισε το αναμενόμενο επίπεδο ανθεκτικότητας καθώς χαρακτηρίστηκε ως μετρίως ευαίσθητη. Επίσης, και οι Mohammadi *et al.* (2012) στην αξιολόγηση σειρών φακής που πραγματοποίησαν, αναφέρουν ότι τρεις σειρές οι οποίες ήταν ανθεκτικές σε συνθήκες αγρού

εμφανίστηκαν ευαίσθητες έως μετρίως ευαίσθητες σε συνθήκες θερμοκηπίου. Αυτό συνηγορεί στο ότι εκτός από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και την ποσότητα του μολύσματος, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη και η γενετική δομή του φυτού η οποία μπορεί να επηρεάσει την αντίστασή του σε μια ασθένεια. Έτσι και σε αυτήν την περίπτωση αν και το πείραμα της διατριβής πραγματοποιήθηκε σε ελεγχόμενες συνθήκες στο εργαστήριο, αυτές δεν είναι ικανές από μόνες τους να μας βοηθήσουν στην εκτίμηση της ανθεκτικότητας αν δεν συνυπολογιστεί και ο γενότυπος του κάθε φυτού που αξιολογείται. Παρ' όλα αυτά η αξιολόγηση φυτών υπο ελεγχόμενες συνθήκες μπορεί να μας δώσει μια ακριβέστερη εικόνα για το επίπεδο ανθεκτικότητας των διάφορων γενοτύπων καθώς αποκλείονται παράγοντες που μπορούν να υπάρξουν στο χωράφι όπως διάφορα είδη μολυσμάτων, συνεργιστική δράση των παθογόνων με νηματώδεις, η χημική σύσταση του εδάφους. (Mohammadi *et al.*, 2012). Επιπλέον, ένας ακόμα παράγοντας που θα πρέπει να ληφθεί υπόψη είναι και η απομόνωση του μύκητα που χρησιμοποιείται καθώς μολύσματα με διαφορετικό βαθμό μολυσματικότητας μπορούν να δώσουν διαφορετικά αποτελέσματα όταν χρησιμοποιούνται για την μόλυνση ενός δεδομένου γενοτύπου καάθε φορά. Ως εκ τούτου η αλληλεπίδραση γενοτύπου-απομόνωσης παθογόνου μπορεί να διαφέρει από πείραμα σε πείραμα και να δίνει διαφορετικά αποτελέσματα.

4.3 Μοριακή ανάλυση δείκτη SSR 59-2

Με βάση τους Hamwiah *et al.* (2005) το γονίδιο ανθεκτικότητας στη φουζαρίωση (F_w) εντοπίστηκε στο χρωμόσωμα LG 6 και υπερφαλαγγίζεται από το μοριακό δείκτη SSR 59-2 ο οποίος έδωσε μια ζώνη στα 175 bp. Επίσης, και η Φώτη (2013) εντόπισε με τον SSR 59-2 μια ζώνη στα 175 bp που ήταν παρών στα ευαίσθητα και μετρίως ευαίσθητα φυτά ενώ παρατηρήθηκε και μια νέα πολυμορφική ζώνη στα 1100 bp η

οποία ενδεχομένως να σχετίζεται με το γονίδιο ανθεκτικότητας και εμφανίστηκε τόσο σε ευαίσθητα όσο και σε ανθεκτικά δείγματα φυτών. Ωστόσο η συγκεκριμένη ζώνη δεν παρατηρήθηκε σε κάποιο από τα δείγματα της παρούσας διατριβής. Επίσης, είχαμε μια ζώνη μεγέθους 175 bp στο φαινοτυπικά ευαίσθητο φυτό η οποία όμως ήταν απών στο φαινοτυπικά ανθεκτικό φυτό και ίσως σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στο μύκητα *Fusarium oxysporum f. sp. lentis*.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Ο προσδιορισμός αλλά και η επιλογή της συγκέντρωσης του μολύσματος που θα χρησιμοποιηθεί σε πειράματα μόλυνσης φυτών αποτελεί έναν κρίσιμο παράγοντα για την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας των γενοτύπων.
- Η αξιολόγηση φυτών στο εργαστήριο κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες μπορεί να μας δώσει μια πιο ακριβή εικόνα της αντίδρασης των γενοτύπων απέναντι σε έναν παθογόνο μικροοργανισμό ωστόσο και συμπληρωματικές αξιολογήσεις στο χωράφι ή στο θερμοκήπιο μπορούν να δώσουν μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για την συμπεριφορά των φυτών υπό συνθήκες πίεσης του μολύσματος.
- Με βάση τα αποτελέσματα η ποικιλία ILL 590 θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως μετρίως ευαίσθητη αν και είναι ανθεκτικός μάρτυρας στο *Fusarium oxysporum f. sp. lentis*.
- Η ποικιλία ILL 6031 η οποία είναι ευαίσθητος μάρτυρας στο *Fusarium oxysporum f. sp. lentis* παρουσίασε την αναμενόμενη αντίδραση και χαρακτηρίστηκε ως ευαίσθητη.
- Οι δύο F₃ γενεές Αθηνά x 590 και Σάμος x 590, των οποίων η ανθεκτικότητα στο μύκητα δεν ήταν γνωστή βρέθηκε ότι είναι μετρίως ανθεκτικές.
- Αναφορικά με το μοριακό δείκτη SSR 59-2, εντοπίστηκε μία ζώνη μεγέθους 175 bp σε φαινοτυπικά ευαίσθητο φυτό η οποία όπως υποστηρίζεται και από άλλους συνδέεται με την ανθεκτικότητα στη φουζαρίωση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Bayaa B., Erskine W. and Hamdi A. (1995). Evaluation of a wild lentil collection for resistance to vascular wilt. *Genetic Resources and Crop Evolution* 42:231-235

Belabid Lakhdar and Fortas Zohra. (2002). Virulence and vegetative compatibility of Algerian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lentis*. *Phytopathol. Mediterr.* 41, 179–187

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

Datta S., Choudhary R. G., Shamim Md, Singh R. K. and Dhar Vishwa. (2011). Molecular diversity in Indian isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis* inciting wilt disease in lentil (*Lens culinaris* Medik). *African Journal of Biotechnology* 10, 7314-7323

Davidson Jenny A., Pande Suresh, Bretag Trevor W., Lindbeck Kurt D. and Krishna-Kishore Gali. (2007). Biology and Management of *Botrytis spp.* in Legume Crops. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, 295-318

Erskine W., Tufail M., Russell A., Tyagi M.C., Rahman M.M. and Saxena M.C. (1994). Current and future strategies in breeding lentil for resistance to biotic and abiotic stresses. *Euphytica* 73:27-135

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

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

Gupta Dorin, Ford Rebecca, and Taylor Paul W. J. (2011). *Lens*. *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Legume Crops and Forages*, 127-139

Gupta Mamta, Verma Bhawna, Kumar Naresh, Chahota Rakesh K., Rathour Rajeev, Sharma Shyam K., Bhatia Sabyhata, Sharma Tilak R. (2012). Construction of intersubspecific molecular genetic map of lentil based on ISSR, RAPD and SSR markers. *Journal of Genetics* 91, 279-287

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

Infantino Alessandro, Kharrat Mohamed, Riccioni Luca, Coyne Clarice J., McPhee Kevin E. and Grünwald Niklaus J. (2006). Screening techniques and sources of resistance to root diseases in cool season food legumes. *Euphytica* 147: 201–221

Kamboj R.K., Pandey M.P. and Chaube H.S. (1990). Inheritance of resistance to Fusarium wilt in Indian lentil germplasm (*Lens culinaris Medik.*). *Euphytica* 50:13-117

Kraft J. M., Haware M. P., Jimenez-Diaz R. M., Bayaa B. and Harrabi M. Screening techniques and sources of resistance to root rots and wilts in cool season food legumes. (1994). *Euphytica* 73:27-39.

Materne Michael and McNeil David L. (2007). *Breeding Methods and Achievements. Lentil*, 241-253

Mishra S. K. , Sharma B. and Sharma S. K. (2007). *Genetics and Cytogenetics of Lentil. Lentil*, 187-208

Mohammadi N., Puralibaba H., Mohammadi Goltapeh E., Babaie Ahari A., Pakdaman Sardrood B. (2012). Advanced lentil lines screened for resistance to *Fusarium oxysporum f. sp. lentis* under greenhouse and field conditions. *Phytoparasitica* 40:69–76

Muehlbauer Frederick J., Cho Seungho, Sarker Ashutosh, McPhee Kevin E., Coyne Clarice J., Rajesh P.N. and Ford Rebecca. (2006). Application of biotechnology in breeding lentil for resistance to biotic and biotic stress. *Euphytica* 147:149–165

Narayanasamy P. (2008). Genetic Resistance of Crops to Diseases. *Molecular Biology in Plant Pathogenesis and Disease Management: Disease Management* 3, 23-170

Negussie T. and Pretorius Z.A. (2012). Lentil rust: Present status and future prospects. *Crop Protection* 32, 119-128

Negussie T., Pretorius Z.A. and Bender C.M. (2005). Components of rust resistance in lentil. *Euphytica* 142: 55–64

Park David. (1963). The presence of *Fusarium oxysporum* in soils. *Transactions of the British Mycological Society* 46:444–448

Sharpe Andrew G, Ramsay Larissa, Sanderson Lacey-Anne, Fedoruk Michael J, Clarke Wayne E, Li Rong, Kagale Sateesh, Vijayan Perumal, Vandenberg Albert and Bett Kirstin E. (2013). Ancient orphan crop joins modern era: gene-based SNP discovery and mapping in lentil. *BMC Genomics*, 14:192

Su Yuan-Ying, Qi Ya-Lin and Cai Lei. (2012). Induction of sporulation in plant pathogenic fungi. *Mycology* 3: 195–200

Tanyolac Bahattin, Ozatay Sehnaz, Kahraman Abdullah and Muehlbauer Fred. (2009). Linkage mapping of Lentil (*Lens culinaris* L.) genome using recombinant inbred lines revealed by AFLP, ISSR, RAPD and some morphologic markers. *Journal of Applied Biological Sciences* 3:179-185

Taylor Paul , Lindbeck Kurt , Chen Weidong, Ford Rebecca . (2007). Lentil diseases. *Lentil*, 291-313

Tullu A., Buchwaldt L., Lulsdorf M., Banniza S., Barlow B., Slinkard A.E., Sarker A., Tar'an B., Warkentin T. Warkentin and Vandenberg A. (2006). Sources of resistance to anthracnose (*Colletotrichum truncatum*) in wild *Lens* species. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53:111–119

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

Βασιλίου Μαρία (2011). *Ανίπτιξη γενεαλογίας με στόχο τη βελτίωση ποικιλιών φακίς για ανθεκτικότητα στο *Fusarium oxysporum* fsp. *lentis* και εντοπισμός μοριακών δεικτών στενών συνδεδεμένων με την ανθεκτικότητα.* Μεταπτυχιακή Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος

Κατσαβού Αικατερίνη. (2008). *In vitro* ανταπόκριση ποικιλιών φακίς (*Lens culinaris* L.) και μέλη των φυσικοχημικών και οργανοληπτικών ιδιοτήτων τους σε περιβάλλοντα συμβατικών και βιολογικών καλλιέργειας. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος

Παπακώστα-Τασοπούλου Δέσποινα. (2012). *Σιτηρά και Ψυχανθή.* Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη, σελ. 583

Ρουπακιάς. (2010). *Βελτίωση Φυτών.* University Studio Press, Θεσσαλονίκη, σελ. 408

Φώτη Χρυσάνθη (2013). Συγκριτική αξιολόγηση μεθόδων επιλογής στη φακή (*Lens culinaris*) σε διαφορετικές πυκνότητες σποίρας και μοριακές γενετικές πλεγχοί για ανθεκτικότητα στο *Fusarium oxysporum spp lentis*. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος

Fusarium species. (2008). Διαθέσιμο στο <http://www.google.gr/url?sa=t&ret=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCoQFjAA&url=http%3A%2F%2Ffaciar.gov.au%2Ffiles%2Fnode%2F8613%2FMN129%2520part6.pdf&ei=34LzU9GPFITaPKvGgfAC&usg=AFQjCNHkTnSwmpR3BUIAshx6PqoCX8no0g&bvm=bv.73231344,d.ZWU>. Ημερομηνία πρόσβασης: 8/3/2014



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



004000123112