



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

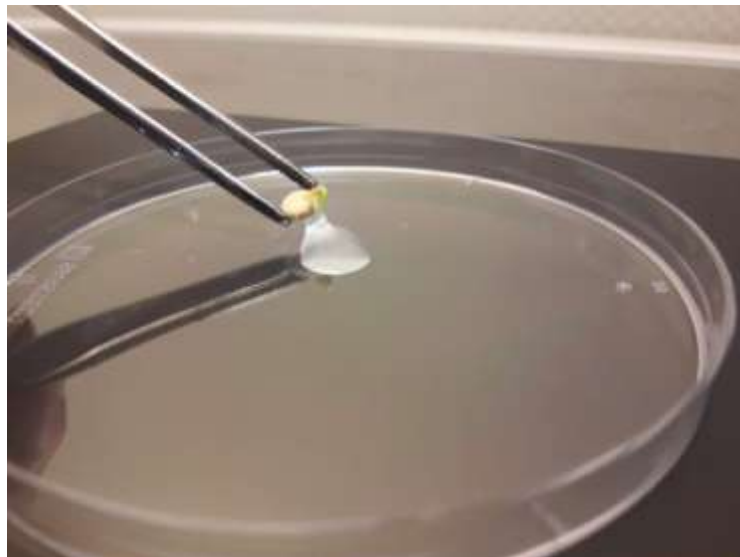
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΦΥΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Ανάπτυξη πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού της φακής
μέσω του βακτηρίου *Agrobacterium rhizogenes*»

ΤΟΥΜΠΟΥ ΧΡΙΣΤΙΝΑ



Επιβλέπουσα: Ουρανία Παυλή, Επικ. Καθηγήτρια, Π.Θ.

ΒΟΛΟΣ 2020

**«Ανάπτυξη πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού της φακής
μέσω του βακτηρίου *Agrobacterium rhizogenes*»**

**«Protocol development for *Agrobacterium rhizogenes*-mediated
genetic transformation of lentil»**

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΤΟΥΜΠΙΟΥ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπουσα: Παυλή Ουρανία, Επίκ. Καθηγήτρια, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής και
Αγροτικού Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

Χα Ιμπραχίμ-Αβραάμ, Καθηγητής, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού
Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δαναλάτος Νικόλαος, Καθηγητής, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού
Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

*Στην υπέροχη γιαγιά μου,
Αικατερίνη*

Βεβαιώνω ότι είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας, η οποία εκπονήθηκε σύμφωνα με τον Κανονισμό Εκπόνησης Πτυχιακή Εργασίας του ΤΓΦΠΑΠ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην Επικ. Καθηγήτρια του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του ΠΘ κα. Ουρανία Παυλή, επιβλέπουσα της πτυχιακής μου εργασίας για την κριτική ανάγνωση του κειμένου, τις εύστοχες υποδείξεις, τις ποικίλες διευκολύνσεις και την στήριξη της. Πραγματικά, δε μετανιώνω στιγμή την επιλογή μου να εκπονήσω την εργασία μου στο εργαστήριο Γενετικής Βελτίωσης Φυτών.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την διδάκτορα και μέλος του εργαστηρίου γενετικής βελτίωσης φυτών Φώτη Χρυσάνθη-Λαμπρινή για την πολύτιμη βοήθεια της, την εκμάθηση όλων των μεθόδων που χρειάστηκε να ακολουθήσω, την προθυμία της, την υπομονή της και την συνολική της συμβολή σε όλα τα στάδια του πειράματος μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κολλητή μου Κέλλυ και στον φίλο μου Βασίλη για την στήριξη τους και την πίστη τους σε μένα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και ιδιαίτερα τη μητέρα μου και τις θείες μου Βάσω και Δήμητρα για την αγάπη τους, την τεράστια βοήθεια τους και τη συμπαράταση τους όλο αυτό το διάστημα.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	vii
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Η καλλιέργεια και η σημασία της Φακής	1
1.2 Ταξινόμηση της φακής.....	3
1.3 Βοτανική περιγραφή.....	4
1.4 Αύξηση και Ανάπτυξη	6
1.5 Διατροφική αξία.....	7
1.6 Χρήσεις.....	9
1.7 Η καλλιέργεια φακής στην Ελλάδα	10
1.8 Βελτίωση της Φακής.....	12
1.8.1 Βελτιωτικοί στόχοι.....	14
1.8.2 Μέθοδοι Βελτίωσης της Φακής.....	16
1.8.2.1 Κλασικές μέθοδοι βελτίωσης	18
→ Γενεαλογική Μέθοδος Επιλογής.....	19
→ Μαζική Επιλογή (Bulk Selection).....	20
→ Μέθοδος Καταγωγής από Μεμονωμένους Σπόρους (SSD)	21
→ Κυβελωτή Μέθοδος Επιλογής.....	22
1.8.2.2 Μοριακές μέθοδοι βελτίωσης.....	23
→ Μοριακοί δείκτες	23
→ Ανάπτυξη γενετικών χαρτών σύνδεσης.....	24
→ Γενετική Μηχανική.....	26
1.9 Η αξιοποίηση της Γενετικής Μηχανικής στη φακή	27
1.9.1 Διαδικασίες αναγέννησης ολόκληρων φυτών στη φακή.....	28
1.9.2 Μέθοδοι γενετικού μετασχηματισμού της φακής.....	30
1.9.3 Πρακτικές εφαρμογές της γενετικής μηχανικής στη φακή	31
1.10 Το <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	33
1.10.1 Το Πλασμίδιο <i>Ri</i>	34
1.10.2 Ο φαινότυπος <i>Ri</i>	36
1.10.3 Εφαρμογές του μετασχηματισμού μέσω του <i>A. rhizogenes</i>	36

1.11 Σκοπός της Μελέτης	39
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	40
2.1 Φυτικό υλικό	40
2.2 Στελέχη του <i>Agrobacterium rhizogenes</i> και συνθήκες ανάπτυξης	40
2.3 Μετασχηματισμός σποροφύτων φακής μέσω του <i>A. rhizogenes</i>	41
2.4 Συλλογή ιστού και Εξαγωγή DNA	44
2.5 Έλεγχος του μετασχηματισμού μέσω PCR	45
2.6 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων των προϊόντων ενίσχυσης σε πηκτή αгарόζης ...	46
2.7 Στατιστική ανάλυση	47
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	48
3.1 Χρόνος εμφάνισης διαγονιδιακών ριζών μετά των εμβολιασμό.....	48
3.2 Διαφορές στο φαινότυπο των ριζικών τριχιδίων	49
3.3 Συχνότητα μετασχηματισμού	52
3.4 Επαλήθευση της διαγονιδιακής φύσης των ριζικών τριχιδίων.....	54
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	56
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	61
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	62

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στο παρελθόν, η δυστροπία που παρουσιάζει η φακή αποτέλεσε σημαντικό εμπόδιο στις προσπάθειες μετασχηματισμού και αναγέννησης ολόκληρων φυτών, ενώ τα ποσοστά επιτυχίας στις ανωτέρω διαδικασίες κυμαίνονταν σε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα. Αντικείμενο της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου μετασχηματισμού, διαμέσου του *Agrobacterium rhizogenes*, με σκοπό τη δημιουργία σύνθετων φυτών φακής, αποτελούμενων από διαγονιδιακό ριζικό σύστημα και αγρίου τύπου υπέργειο μέρος. Με στόχο τη βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου, ο μετασχηματισμός πραγματοποιήθηκε με τη χρήση τριών διαφορετικών βακτηριακών στελεχών, των *R1000*, *K599* και *Arqua*, και δύο πρωτοκόλλων που διέφεραν ως προς τη σύνθεση των υποστρωμάτων, και ειδικότερα την παρουσία ακετοσιρινόνης και MES. Τα μετασχηματισμένα σπορόφυτα εμφάνισαν θυσανώδες ριζικό σύστημα, που χαρακτηρίστηκε από αυξημένο αριθμό διακλαδώσεων στην εγγύτατη περιοχή υποκοτυλίου, παρουσιάζοντας περιστασιακά μια πλαγιοτροπική ανάπτυξη. Τα συνολικά αποτελέσματα υπογραμμίζουν τη σημαντική επίδραση του βακτηριακού στελέχους, της σύνθεσης των υποστρωμάτων καθώς και του συνδυασμού τους στη συχνότητα του μετασχηματισμού. Μεταξύ των βακτηριακών στελεχών, το *R1000* αποδείχθηκε ως το πιο ικανό για επαγωγή ριζικών τριχιδίων, ενώ η παρουσία τόσο της ακετοσυριγγόνης όσο και του MES στα θρεπτικά μέσα εμβολιασμού και καλλιέργειας οδήγησε σε σημαντική ενίσχυση της συχνότητας μετασχηματισμού. Η διαγονιδιακή φύση των ριζικών τριχιδίων επιβεβαιώθηκε μέσω της επιτυχούς ένθεσης του γονιδίου *rolB2*, με τη μεσολάβηση του RiT-DNA, και την ταυτόχρονη απουσία της αλληλουχίας *virCD* του *A. rhizogenes*. Συμπερασματικά, τα ευρήματα παρέχουν ισχυρές ενδείξεις ότι ο μετασχηματισμός με τη μεσολάβηση του *A. rhizogenes* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως κατάλληλη προσέγγιση για τη δημιουργία διαγονιδιακών ιστών φακής, ένα είδος του οποίου η δυστροπία παρεμποδίζει τις προσπάθειες που στοχεύουν στο μετασχηματισμό και αναγέννηση ολόκληρων φυτών. Επιπλέον, η προτεινόμενη μεθοδολογία θέτει τα θεμέλια για την ευχερή υλοποίηση ερευνών που πραγματεύονται τη μελέτη της βιολογίας της ρίζας στη φακή

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η καλλιέργεια και η σημασία της Φακής

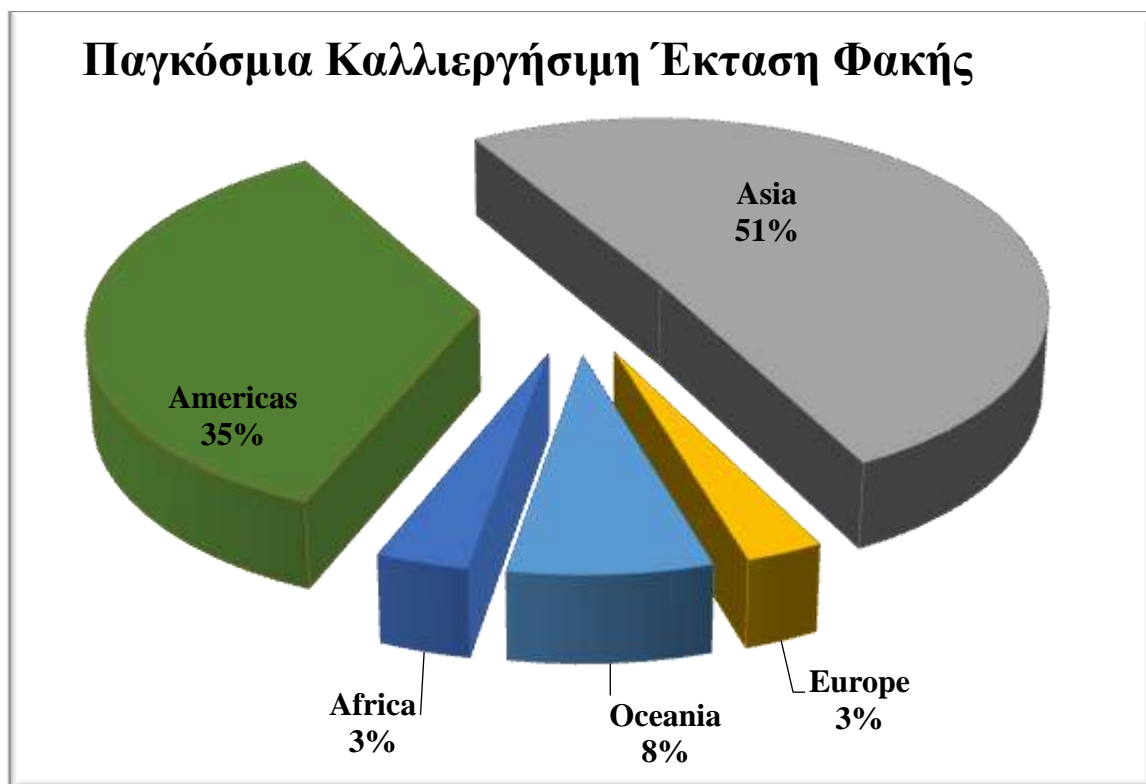
Η φακή (*Lens culinaris Medik*) ανήκει βοτανικά στην οικογένεια των ψυχανθών (*Leguminosae*) και αποτελεί ιδιαίτερα σημαντική καλλιέργεια, προοριζόμενη για ανθρώπινη κυρίως κατανάλωση σε παγκόσμιο επίπεδο. Οι σπόροι της φακής συνιστούν πλούσια πηγή πρωτεϊνών, μετάλλων και βιταμινών τόσο για τον άνθρωπο όσο και για τα ζώα. Ταυτόχρονα, η καλλιέργεια της φακής βελτιώνει τη συγκέντρωση του αζώτου, του άνθρακα και της οργανικής ύλης στο έδαφος, παρέχοντας δυνατότητες ένταξης της σε βιώσιμα συστήματα φυτικής παραγωγής (Sarker and Erskine, 2006).

Η καλλιεργούμενη φακή κατάγεται από την Εγγύς Ανατολή και τη Μικρά Ασία, αλλά εντοπίστηκε για πρώτη φορά, πριν από 7.000-10.000 χρόνια κατά την Νεολιθική εποχή, στην Ανατολική Μεσόγειο. Στη συνέχεια, διαδόθηκε στις Νοτιοδυτικές περιοχές της Ασίας και της Μεσογείου και πιο συγκεκριμένα από την Νότια Τουρκία διαδόθηκε στην περιοχή του Νείλου, στην Ελλάδα και στην Κεντρική Ευρώπη, ενώ αργότερα εισήχθηκε στη Βόρεια και Νότια Αμερική και στην Αυστραλία (Dissanayake *et al.*, 2020).

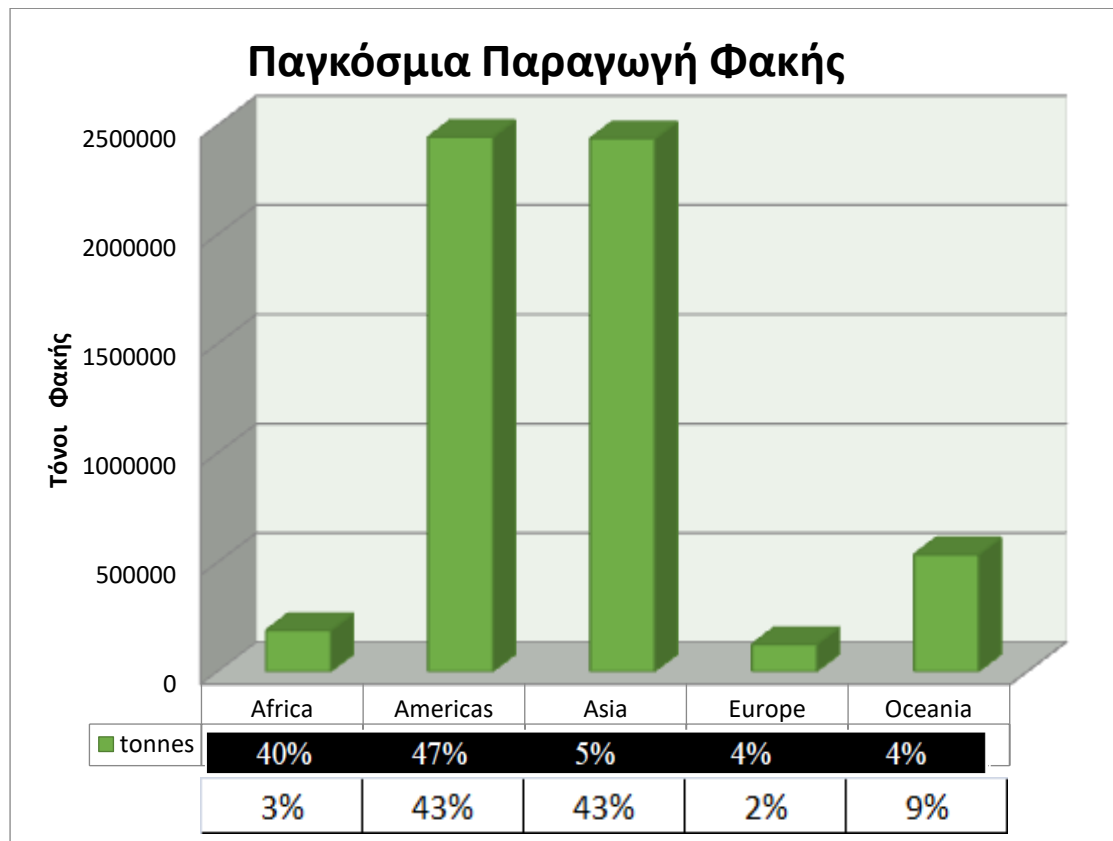
Στην Ελλάδα η καλλιέργεια της φακής είναι γνωστή ήδη από την αρχαιότητα, ενώ τα αρχαιότερα απομεινάρια φακής χρονολογούνται το 11.000 π.Χ. και βρέθηκαν στο σπήλαιο Φράγχθι. Σύμφωνα με πηγές, στην αρχαία Ελλάδα η φακή, αναφερόμενη ως «φακός», «φακή» και «φακέα», αποτελούσε σημαντικό μέρος της διατροφής των φτωχών τάξεων και συγκεκριμένα χρησιμοποιούνταν στην παρασκευή ψωμιού σε ανάμειξη με κριθάρι (Γλερίδου, 2014). Γίνεται μνεία της σε αποσπάσματα ποιημάτων του Σόλωνος, ενώ παράλληλα αναφέρεται σε κείμενα των Ηρόδοτου, Αριστοφάνη, Διοσκουρίδη (Παπακόστα-Τασοπούλου, 2012), και Θεόφραστου, ο οποίος στα έργα του αναφέρεται στις μεθόδους καλλιέργειάς της (Γλερίδου, 2014). Επιπλέον, αρκετές αναφορές στη φακή έχουν εντοπιστεί στην Παλαιά Διαθήκη και στην κλασική λογοτεχνία. Συγκεκριμένα, στους Ιουδαίους ήταν όσπριο ιδιαίτερα αγαπητό και αναφέρεται στη Γένεση, ότι ο Ησαύ παραχώρησε στον Ιακώβ τα

πρωτοτόκια δικαιώματά του αντί «πινακίου φακής» (Παπακώστα-Τασοπούλου, 2012).

Σήμερα, η φακή καλλιεργείται σε περισσότερες από 58 χώρες, καλύπτοντας συνολική έκταση 48.000.170 στρεμμάτων και αποδίδοντας παγκόσμια παραγωγή της τάξης των 5.734.201 τόνων (FAO, 2019) (Διάγραμμα 1.1, 1.2). Η φακή θεωρείται η τέταρτη πιο σημαντική καλλιέργεια οσπρίου στον κόσμο (Shaheen *et al.*, 2019). Ο Καναδάς βρίσκεται στη πρώτη θέση της παγκόσμιας κατάταξης τόσο για την παραγωγή (48,1 % της παγκόσμιας παραγωγής) όσο και για τις εξαγωγές (64,0 % των παγκόσμιων εξαγωγών), ενώ δεύτερη έρχεται η Ινδία που, παρά το υψηλό ποσοστό παραγωγής (15,7 % της παγκόσμια παραγωγής), αδυνατεί να καλύψει τις εγχώριες ανάγκες, γεγονός που την καθιστά το μεγαλύτερο εισαγωγέα φακής στον κόσμο (Dissanayake *et al.*, 2020). Στην Ελλάδα, η καλλιέργεια της φακής συγκεντρώνεται σε συνολικά 96.640 στρέμματα με ετήσια παραγωγή 11.556 τόνων. Η παραγωγή αυτή ωστόσο δε δύναται να εξασφαλίσει την εγχώρια ζήτηση, με αποτέλεσμα να γίνεται εισαγωγή συνολικά 14.652 τόνων φακής κυρίως από τον Καναδά και τις Η.Π.Α (FAO, 2019).



Διάγραμμα 1.1 Παγκόσμια καλλιεργήσιμη έκταση φακής σε στρέμματα. (Πηγή: FAO 2019)



Διάγραμμα 1.2 Παγκόσμια παραγωγή φακής σε τόνους. (Πηγή: FAO 2019)

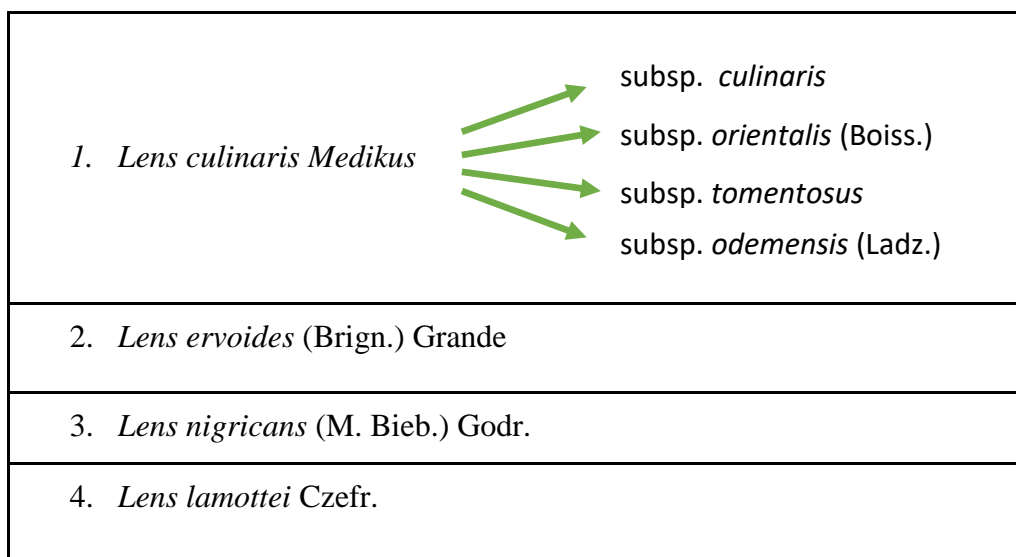
1.2 Ταξινόμηση της φακής

Η φακή ανήκει στο γένος *Lens* της οικογένειας *Leguminosae*, υποοικογένεια *Papilionaceae* και ανήκει στη φυλή *Vicieae*. Όλα τα είδη του γένους είναι διπλοειδή με $2n = 14$ χρωμοσώματα και έχουν παρόμοιους καρυότυπους.

Η ταξινόμηση της φακής έχει υποστεί πολλές αλλαγές. Οι πρώτοι ταξινομικοί, ταξινόμησαν τη φακή στο γένος *Ervum* L., αλλά αργότερα έγινε δεκτή ως ξεχωριστό γένος. Δεδομένου ότι το *Lens culinaris* δημοσιεύθηκε έγκυρα από τον Medikus το 1787, η εν λόγω ονομασία έχει προτεραιότητα έναντι του *Lens esculenta*, που χρησιμοποιήθηκε από τον Moench το 1794. Αρχικά αναγνωρίστηκαν πέντε είδη στο γένος και ειδικότερα, τα *L. culinaris*, *L. ervoides*, *L. montbretii*, *L. nigricans* και *L. orientalis*. Ο Alefeld (1866) αναγνώρισε οκτώ υποείδη (ποικιλίες) φακής, ταξινόμηση η οποία ωστόσο δεν έγινε αποδεκτή από τον Barulina (1930). Αργότερα, οι Williams et al. (1974) πρότειναν τα *L. culinaris* και *L. orientalis* ως υποείδη του *L. culinaris*, ενώ με την υποστήριξη του έργου του Ladizinsky (1979) συνήχθη το συμπέρασμα ότι το *L. culinaris* subsp. *orientalis* είναι ο πρόγονος της καλλιεργούμενης φακής, *L.*

culinaris subsp. *culinaris*. Σε μια πρόσφατη επανακατάταξη, οι Van Oss et al. (1997) πρότειναν ότι το γένος *Lens* αποτελείται από επτά τάξα: τον καλλιεργημένο φακό *L. culinaris* Medikus subsp. *culinaris*, τον άγριο πρόγονο του *L. culinaris* subsp. *orientalis* (Boiss.) Ponert, το *L. odemensis* (Ladiz.), *L. ervoides* (Brign.) Grande, το *L. nigricans* (M. Bieb.) Gordon και δύο πρόσφατα αναγνωρισμένα είδη, τα *L. tomentosus* (Ladiz.) και *L. lamottei* Czefr.

Αρκετοί συγγραφείς έχουν χρησιμοποιήσει βιοχημικές και μοριακές μεθόδους για να συμπληρώσουν τις παραδοσιακές ταξινομικές μεθόδους ταυτοποίησης καθώς επίσης και να μελετήσουν τις ταξινομικές σχέσεις στο γένος *Lens*. Αναλύοντας προηγούμενα ευρήματα, βάσει της προέλευσης και εξάπλωσης καθώς και μορφολογικών, κυτταρολογικών, κυτταρογενετικών παρατηρήσεων και πιο πρόσφατα της χρήσης ισοενζύμων και μοριακών δεικτών, το γένος *Lens* ταξινομήθηκε εκ νέου από τους Ferguson et al. (2000) σε επτά taxa χωρισμένα σε τέσσερα είδη:



1.3 Βοτανική περιγραφή

Η φακή είναι ένα αυτογονιμοποιούμενο, διπλοειδές ($2n = 2x = 14$), ψυχρής εποχής όσπριο με μεγάλο μέγεθος γονιδιώματος c. 4 Gbp. Το ριζικό της σύστημα αποτελείται από μια λεπτή πασσαλώδη ρίζα, από την οποία εκφύονται ινώδεις πλάγιες ρίζες. Υπάρχουν τρεις τύποι ριζικού συστήματος, οι οποίοι καθορίζονται από

το γονότυπο και τις εδαφικές συνθήκες ανάπτυξης ως ακολούθως: i) πλούσια διακλαδιζόμενο, επιφανειακό, ii) περιορισμένα διακλαδιζόμενη κύρια πασσαλώδη ρίζα που εισχωρεί σε βάθος και iii) ενδιάμεσος τύπος. Στην κύρια ρίζα αλλά και στις πλάγιες διακλαδώσεις, σχηματίζονται φυμάτια συνεχούς ανάπτυξης με σχήμα ωοειδές ή στρογγυλό στα ανώτερα τμήματα του εδάφους.

Το υπέργειο τμήμα του φυτού απαρτίζεται από τον κύριο βλαστό και τις διακλαδώσεις πρώτης και δεύτερης τάξης. Οι βλαστοί είναι λεπτοί, με γωνιώδη περιφέρεια και ραβδώσεις και, ανάλογα με την ποικιλία, φέρουν τρίχες ή είναι σχεδόν λείοι. Ανάλογα με τον τρόπο έκπτυξης των βλαστών, οι ποικιλίες διακρίνονται σε έρπουσας και όρθιας ανάπτυξης, ενώ υπάρχουν και ενδιάμεσες μορφές. Το ύψος του φυτού μπορεί να φτάσει τα 75 cm και παρουσιάζει σημαντική εξάρτηση από το γονότυπο, την πυκνότητα φύτευσης στον αγρό και τις εδαφοκλιματικές συνθήκες.

Τα φύλλα είναι σύνθετα και περιγράφονται ως πτερωτά ή περιττόληκτα πτερωτά. Ο αριθμός των φυλλαρίων κάθε φύλλου καθορίζεται από το γονότυπο, ωστόσο μπορεί να ποικίλει και εντός του ίδιου γονοτύπου, ανάλογα με τη θέση του φύλλου πάνω στο φυτό, και μπορεί να φτάσει τα 7-8 ζεύγη. Τα φύλλα στους περισσότερους γονοτύπους καταλήγουν σε έλικα, η οποία συνήθως είναι απλή (Εικόνα 1.1).

Τα άνθη είναι μικρά, μήκους 4-8 mm και χρώματος λευκού, ελαφρώς ροδόχρουν ή ροδόχρουν-μπλε. Φέρονται μεμονωμένα ή σε ομάδες των 2-3 ανθέων και σπανιότερα των 4. Ωστόσο, σε ελεγχόμενες συνθήκες αναφέρονται μέχρι και 7 άνθη στην άκρη του ποδίσκου, ο οποίος εκφύεται από τις μασχάλες των ανώτερων φύλλων.

Οι λοβοί είναι λείοι, μικρού μεγέθους, πεπλατυσμένοι, μήκους 6-20 mm και πλάτους 3,5-11 mm. Συνήθως περιέχουν έναν ή δύο σπόρους και σπάνια τρεις. Σε κάθε ποδίσκο, σχηματίζονται 1-2 λοβοί και πολύ σπάνια 3-4.

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. Με βάση τη διάμετρο του σπόρου, οι ποικιλίες κατηγοριοποιούνται σε μεγαλόσπερμες (διάμετρος σπόρου 6-9 mm) και μικρόσπερμες (διάμετρος σπόρου 2-6 mm). Επιπλέον, οι διαφορετικές ποικιλίες χαρακτηρίζονται από διαφορετικά χρώματα περισπερμίου, όπως ανοιχτό κόκκινο, πράσινο, καφέ, μαύρο κ.α. Η

επιφάνεια των σπόρων είναι συνήθως λεία, ενώ σε ορισμένες μεγαλόκαρπες ποικιλίες μπορεί να είναι ρυτιδωμένη (Παπακώστα-Τασοπούλου, 2012) (Εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1. Φυτό φακής με εμφανή τη μορφολογία των φύλλων, των ανθέων και των λοβών. (Πηγή: <https://www.prota4u.org/database/>)

1.4 Αύξηση και Ανάπτυξη

Η φακή χαρακτηρίζεται ως φυτό συνεχούς ανάπτυξης. Η άνθιση ξεκινά από τη βάση του φυτού και σταδιακά προχωρεί προς την κορυφή, ενώ η βλαστική ανάπτυξη συνεχίζεται. Η διάρκεια του βιολογικού κύκλου εξαρτάται από το γονότυπο, την εποχή σποράς και τις κλιματολογικές συνθήκες, με σημαντικότερες τη θερμοκρασία και τη βροχόπτωση κατά την άνθηση και την καρποφορία. Επιπρόσθετα, οι μικρόσπερμες ποικιλίες ωριμάζουν νωρίτερα από τις μεγαλόσπερμες (Muehlbauer *et al.*, 1995).

Η φακή χαρακτηρίζεται ως ιδιαίτερα ανθεκτική στις χαμηλές θερμοκρασίες και υπό συνθήκες εύκρατου κλίματος καλλιεργείται ως φθινοπωρινή καλλιέργεια. Η

φθινοπωρινή καλλιέργεια επιτρέπει τη βέλτιστη βλαστική ανάπτυξη και την επίτευξη υψηλότερων αποδόσεων, που συχνά υπερβαίνουν κατά > 50% τις αντίστοιχες αποδόσεις της εαρινής σποράς. Επίσης, η φθινοπωρινή καλλιέργεια παρέχει υψηλότερη αποδοτικότητα χρήσης νερού από τη χειμερινή βροχόπτωση, υπό την προϋπόθεση ότι η ποικιλία είναι ανθεκτική στον παγετό (Sarker and Erskine, 2006). Τα νεαρά φυτά εμφανίζουν μεγάλη ανθεκτικότητα ακόμα και σε ισχυρούς παγετούς, ωστόσο η αντοχή τους μειώνεται με την αύξηση της ηλικίας και τα ανεπτυγμένα φυτά πλήττονται από θερμοκρασίες μικρότερες από -12 °C. Έτσι, σε περιοχές όπου επικρατούν χαμηλές θερμοκρασίες και παρατεταμένοι παγετοί η φακή σπέρνεται ως εαρινή καλλιέργεια. Επίσης, η φακή εμφανίζει μεγάλη αντοχή και στις υψηλές θερμοκρασίες, με πλέον ανθεκτικές να θεωρούνται οι μικρόσπερμες ποικιλίες που καλλιεργούνται κυρίως στη Νοτιοδυτική Ασία.

Όλες οι ποικιλίες φακής, αλλά κυρίως οι μικρόσπερμες, εμφανίζουν αντοχή στην ξηρασία, η οποία θεωρείται ως η πλέον δυσμενής αβιοτική καταπόνηση σε παγκόσμιο επίπεδο, με αποτέλεσμα η αντοχή στην υδατική καταπόνηση να αποτελεί βασικό βελτιωτικό στόχο.

Η καλλιέργεια της φακής μπορεί να γίνει σε διάφορους εδαφικούς τύπους, καταλληλότερα όμως θεωρούνται τα καλά αποστραγγιζόμενα ελαφρά έως μέσης μηχανικής σύστασης. Αναγκαία θεωρείται και η επάρκεια του εδάφους σε ασβέστιο (Ca^{+2}) καθώς η φακή είναι ευαίσθητη στην οξύτητα. Μεταξύ των αβιοτικών καταπονήσεων, η αλατότητα αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες περιορισμού της απόδοσης στις χώρες της Μεσογείου και της Ανατολικής Ασίας (Muscolo *et al.*, 2020).

1.5 Διατροφική αξία

Εξαιτίας της υψηλής διατροφικής της αξίας, η φακή κατατάσσεται μεταξύ των πλέον θρεπτικών τροφίμων. Οι σπόροι της φακής, ανάλογα με την ποικιλία και την περιοχή καλλιέργειας, περιέχει από 22 – 33 % πρωτεΐνη και κυρίως σφαιρίνες (~ 50 g/100 g) (Πίνακας 1.1). Επίσης, οι σπόροι της φακής είναι πλούσιοι σε απαραίτητα αμινοξέα, όπως η λυσίνη και η λευκίνη, γεγονός που τους προσδίδει υψηλή πεπτικότητα καθώς και λειτουργικές ιδιότητες, όπως ο αφρισμός, η

γαλακτωματοποίηση και η πήξη, που καθιστούν ευχερή την αξιοποίησή της σε προϊόντα διατροφής (Saricaoglu, 2020).

Πέραν της υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη, η φακή περιέχει ένα μεγάλο εύρος θρεπτικών συστατικών, όπως φυλλικό οξύ, βιταμίνες Α, Β και C και ίνες. Επιπλέον, αποτελεί πηγή ανόργανων συστατικών, όπως ο φωσφόρος (P), το κάλιο (K), το ασβέστιο (Ca), το μαγνήσιο (Mg), ο σίδηρος (Fe), ο ψευδάργυρος (Zn), το σελήνιο (Se), ο χαλκός (Cu) και το μαγγάνιο (Mn), τα οποία είναι απαραίτητα για την ανθρώπινη υγεία και διατροφή (Türk, 2020) (Πίνακας 1.2).

Παρά την υψηλή θρεπτική της αξία, η φακή περιέχει και ορισμένους αντιθρεπτικούς παράγοντες, εκ των οποίων οι σημαντικότεροι είναι οι αιμογλουτενίνες και οι αναστολείς της τρυψίνης. Οι αντιθρεπτικοί αυτοί παράγοντες προκαλούν συμπτώματα δυσπεψίας και περιορίζουν την αξιοποίηση των θρεπτικών στοιχείων (Salunkhe and Kadam, 1989). Η δράση των αντιθρεπτικών παραγόντων, όπως οι αναστολείς της τρυψίνης, ωστόσο σχεδόν μηδενίζεται έπειτα από βρασμό υπό πίεση λόγω της θερμοευαισθησίας τους (Παπακώστα-Τασοπούλου, 2012).

Πίνακας 1.1. Σύσταση σπόρων φακής σε μικροστοιχεία.

Θρεπτικό στοιχείο	Αξία ανά 100 g εδώδιμου τμήματος	Μονάδα μέτρησης
Νερό	8.26	g
Θερμίδες	352	kcal
Ενέργεια	1473	kJ
Πρωτεΐνες	24.63	g
Λιπαρά	1.06	g
Υδατάνθρακες	63.35	g
Ίνες	10.7	g
Σάκχαρα	2.03	g

* (Πηγή: USDA, National Nutrient Database for Standard Reference, 2019)

Πίνακας 1.2 Σύσταση σπόρων φακής σε βιταμίνες.

Θρεπτικό συστατικό	Αξία ανά 100 g εδώδιμου τμήματος	Μονάδα μέτρησης
Βιταμίνες		
Θειαμίνη (B1)	0.873	mg
Ριβοφλαβίνη (B2)	0.211	mg
Νιασίνη (B3)	2.605	mg
Παντοθενικό οξύ (B5)	2.14	mg
Βιταμίνη B6	0.54	mg
Φυλλικό οξύ (B9)	479	μg
Βιταμίνη C	4.5	mg
Έχνη μετάλλων		
Ασβέστιο (Ca)	35	mg
Σίδηρος (Fe)	6.51	mg
Μαγνήσιο (Mg)	47	mg
Φωσφόρος (P)	281	mg
Κάλιο (K)	677	mg
Νάτριο (Na)	6	mg
Ψευδάργυρος (Zn)	3.27	mg
Χαλκός (Cu)	0.754	mg
Μαγγάνιο (Mn)	1.393	mg

(Πηγή: USDA, National Nutrient Database for Standard Reference, 2019)

1.6 Χρήσεις

Το κύριο προϊόν που συγκομίζεται από την καλλιέργεια της φακής είναι ο ξηρός σπόρος που προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση (Παπακώστα-Τασοπούλου, 2012). Η φακή θεωρείται αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφικής κουλτούρας σε πολλές χώρες του κόσμου, λόγω της υψηλής διατροφικής της αξίας, της ποιότητας και του χαμηλού κόστους της (Muscolo *et al.*, 2020) και ιδίως στην Ινδία, τη Μεσόγειο και τη Νοτιοανατολική Ασία όπου αποτελεί βασική τροφή (Portman *et al.*, 2020).

Η κατανάλωση των σπόρων φακής γίνεται σε σούπες ή ολόκληρες μετά από μούλιασμα και βράσιμο, ενώ η κατανάλωση της ως βλαστάρι επιφέρει μια σειρά ωφελειών για την ανθρώπινη υγεία, λόγω επαγωγής προηγμένων χημικών τροποποιήσεων (Santos *et al.*, 2020). Επιπρόσθετα στις δυτικές χώρες, έχει

παρατηρηθεί μία αυξανόμενη τάση για παρασκευή αλεύρων από το σπόρο της φακής και η μετέπειτα επεξεργασία τους σε νέα διατροφικά προϊόντα. Τόσο οι σπόροι της φακής όσο και τα παράγωγά τους είναι κατάλληλα για χορτοφαγικές και αυστηρώς χορτοφαγικές (vegan) δίαιτες (Portman *et al.*, 2020), καθώς η πρωτεΐνη που περιέχουν αποτελεί άριστο υποκατάστατο των ζωικών πρωτεϊνών (Shaheen *et al.*, 2019). Επιπλέον, η κατανάλωση της φακής συνδέεται με μειωμένο σωματικό βάρος και σωματικό λίπος αλλά και αντιυπερτασική λειτουργία (Santos *et al.*, 2020).

Πέραν της διατροφικής χρήσης, οι κατώτερης ποιότητας σπόροι καθώς και τα υπολείμματα της καλλιέργειας, μετά από αλωνισμό, διατίθενται ως ζωοτροφή. Τέλος, η χλωρομάζα μπορεί να διατεθεί για θρέψη των ζώων ή ως χλωρή λίπανση (Παπακώστα-Τασοπούλου, 2012).

1.7 Η καλλιέργεια φακής στην Ελλάδα

Στην Ελλάδα η καλλιέργεια της φακής ακολούθησε πτωτική τάση, η οποία άρχισε να αναστρέφεται τη τελευταία δεκαετία, ενώ παράλληλα απαντάται σε ξηρικούς αγρούς και συστήματα χαμηλών εισροών (Παπακώστα-Τασοπούλου, 2012). Απόρροια των ανωτέρω είναι η εγχώρια ζήτηση να είναι κάτω από τα όρια της αυτάρκειας και να καλύπτεται με εισαγωγές από άλλες χώρες, όπως η Τουρκία και ο Καναδάς. Σύμφωνα με τα στοιχεία της ΕΛΣΤΑΤ, η καλλιεργήσιμη έκταση φακής αυξήθηκε από τα 46.469 στρέμματα το 2011 σε 126.271 στρέμματα το 2018 με αντίστοιχη αύξηση της παραγωγής από 4.785 τόνους σε 14.946 τόνους φακής. Τα περισσότερα καλλιεργήσιμα στρέμματα φακής εντοπίζονται στη Θεσσαλία και τη Δυτική Μακεδονία και ακολουθεί η Στερεά Ελλάδα (Διάγραμμα 1.3). Προκειμένου να καλυφθούν οι καταναλωτικές ανάγκες εξ ολοκλήρου από την εγχώρια παραγωγή βασική προϋπόθεση αποτελεί η δημιουργία σύγχρονων υψηλοαποδοτικών ποικιλιών φακής, οι οποίες θα χαρακτηρίζονται από ικανοποιητική ποιότητα, ευρεία προσαρμοστικότητα και αναβαθμισμένη ανθεκτικότητα έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων.



Διάγραμμα 1.3 Εκτάσεις και παραγωγή φακής στην Ελλάδα. (Πηγή ΕΛΣΤΑΤ 2018)

Στην Ελλάδα η φακή απαντάται ως φθινοπωρινή καλλιέργεια, ενώ σύμφωνα με το Ινστιτούτο Βιομηχανικών & Κτηνοτροφικών Φυτών η καταλληλότερη εποχή σποράς είναι περί τα μέσα Νοεμβρίου για τη Β. Ελλάδα και την Κ. και Ν. Ελλάδα. Γενικά, προτιμάται η καλλιέργεια κυρίως μεγαλόσπερμων (βάρος 1000 σπόρων > 60 gr) και μικρόσπερμων (βάρος 1000 σπόρων > 50 gr) ποικιλιών φακής. Στις πιο παραγωγικές και ευρέως καλλιεργούμενες ποικιλίες συγκαταλέγονται οι ποικιλίες Πελασγία και Αράχωβα, ενώ διατίθενται και εγχώριες ποικιλίες με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά όπως η φακή Εγκλουβής (Λευκάδα), η φακή Βούζιου και η φακή Βοΐου Κοζάνης. Οι εν λόγω τοπικές ποικιλίες διακρίνονται για την προσαρμοστικότητά τους στις τοπικές εδαφοκλιματικές συνθήκες και τα ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους, ενώ παράλληλα ενδείκνυνται για βιολογική καλλιέργεια (Θανόπουλος κ.α., 2008).

Ένα από τα πλέον ενεργά στην έρευνα της φακής ινστιτούτα είναι το Ινστιτούτο Βιομηχανικών & Κτηνοτροφικών Φυτών, το οποίο δραστηριοποιείται στη βελτίωση της φακής και έχει συμβάλλει στη δημιουργία σύγχρονων ποικιλιών, όπως οι

Δήμητρα, Σάμος, Αθηνά, Θεσσαλία και Ικαρία, που χαρακτηρίζονται από υψηλή απόδοση και υψηλή διατροφική αξία. Παράλληλα, οι εν λόγω ποικιλίες εμφανίζουν σταθερότητα της απόδοσης καθώς και ικανοποιητική αντοχή έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων (Γλερίδου, 2014).

1.8 Βελτίωση της Φακής

Η εκθετική αύξηση του ανθρώπινου πληθυσμού, που ευθύνεται για τη μείωση της κατά κεφαλήν διαθεσιμότητας τροφίμων, καθιστά επιτακτική πλέον την ανάγκη αύξησης της παραγωγικότητας των καλλιεργειών, ιδιαίτερα στις αναπτυσσόμενες χώρες. Σύμφωνα με εκτιμήσεις του Παγκόσμιου Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας (FAO), η δυνατότητα τροφοδότησης του συνεχώς αυξανόμενου παγκόσμιου πληθυσμού επιτάσσει την αύξηση της παγκόσμιας γεωργικής παραγωγής κατά 70 % έως το 2050. Η επίτευξη ωστόσο του ανωτέρω στόχου περιορίζεται σημαντικά από τη μείωση της καλλιεργήσιμης έκτασης αλλά και τη δραστική μείωση των διαθέσιμων υδάτινων πόρων (FAO, 2009). Συνεπώς, η αύξηση της παγκόσμιας παραγωγής τροφίμων με τη χρήση μειωμένων γεωργικών εισροών αποτελεί τη μόνη πρακτική επιλογή (Mba, 2013). Σύμφωνα με τη σύσταση του FAO (2011) για υιοθέτηση συστημάτων χαμηλών εισροών τον 21^ο αιώνα, και ενόψει της κλιματικής αλλαγής, είναι αναγκαία η δημιουργία βελτιωμένων ποικιλιών με καλή προσαρμοστικότητα σε ένα εύρος αγρο-οικοσυστημάτων και γεωργικών πρακτικών, δυνατότητα επίτευξης υψηλών αποδόσεων σε συστήματα χαμηλών εισροών και βελτιωμένες διατροφικές ιδιότητες. Ωστόσο, σημαντικό εμπόδιο στα ανωτέρω δημιουργεί η εξαιρετικά στενή γενετική βάση των διαθέσιμων πληθυσμών φακής, που περιορίζει τις δυνατότητες παραγωγής σύγχρονων και υψηλοαποδοτικών ποικιλιών (Laskar *et al.*, 2019).

Η φακή, όντας πολύ θρεπτική και προσαρμοσμένη σε ένα εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών, ταιριάζει εξαιρετικά στο προφίλ των καλλιεργειών με δυνατότητες και προοπτικές βελτίωσης, καθιστώντας ιδιαίτερα επιτακτική την ανάγκη διεξαγωγής ερευνών στο πλαίσιο βελτίωσής της. Σύμφωνα με πρόσφατες αναφορές, το γενετικό υλικό φακής του Καναδά και της Νότιας Ασίας έχει ως επί το πλείστον μια στενή γενετική βάση, καθώς σε αυτές τις περιοχές η καλλιέργεια απειλείται διαρκώς από πληθώρα βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων, στο πλαίσιο της ήδη κρίσιμης επισιτιστικής κρίσης (Khazaei *et al.*, 2016). Σύμφωνα με τους ερευνητές, το γεγονός αυτό επιτάσσει την επαγωγή μεταλλάξεων σε γονίδια που

ελέγχουν την απόδοση προκειμένου να καταστεί εφικτή η δημιουργία ποικιλιών με υψηλή απόδοση και ευρεία προσαρμοστικότητα. Προς την ίδια κατεύθυνση, οι Erskine *et al.* (1998) και Toker *et al.* (2007) προβάλλουν την πρόκληση μεταλλάξεων ως εξαιρετικά σημαντική τεχνική για τη διεύρυνση της γενετικής βάσης της φακής, ενός είδους που οι πληθυσμοί του εισέρχονται από γενετική στενωπό. Στο πλαίσιο αυτό, οι πρόσφατες εξελίξεις στη γονιδιωματική προσφέρουν σημαντικές δυνατότητες πρόκλησης στοχευμένων μεταλλάξεων προς αξιοποίηση στη γενετική βελτίωση φακών.

Παρά την καλή προσαρμοστικότητα της φακής, συγκριτικά με άλλα καλλιεργούμενα είδη, το δυναμικό απόδοσης των ποικιλιών φακής μειώνεται σημαντικά λόγω της ευαισθησίας σε πλήθος καταπονήσεων, με αρνητικό αντίκτυπο στη μέση απόδοση. Είναι αδιαμφισβήτητο γεγονός ότι η καλλιέργεια σε συστήματα χαμηλών εισροών, σε συνδυασμό με την επικράτηση δυσμενών κλιματικών συνθηκών στις πλέον συνήθεις περιοχές καλλιέργειας, παρεμποδίζουν την απόδοση σε παγκόσμιο επίπεδο (Muehlbauer *et al.*, 2006; Sinclair and Vadez, 2012; Tivoli *et al.*, 2006). Πέραν των βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων, με πλέον κύριες τις αφίδες, τους σκώληκες, το ωίδιο, την ξηρασία και τις ακραίες θερμοκρασίες (Silim *et al.*, 1993), πρόσθετους περιορισμούς συνιστούν οι μη βέλτιστες αγρονομικές πρακτικές της συγκομιδής, το πλάγιασμα και η ακατάλληλη διαχείριση των καλλιεργειών από τους καλλιεργητές (Sarker and Erskine, 2006).

Η Ινδία είναι ο μεγαλύτερος παραγωγός οσπρίων, αν και η καλλιέργειά τους έρχεται δεύτερη σε προτεραιότητα, έπειτα από τα δημητριακά και τις ανταγωνιστικές καλλιέργειες (cash crops), λόγω της χαμηλής εμπορικής τους αξίας και της προσβασιμότητας σε αγορές για τη διάθεση του πλεονάζοντος προϊόν. Πρόσθετο περιορισμό στην αύξηση της παραγωγής οσπρίων θέτει η ποιότητα των σπόρων καθώς και οι απαιτήσεις σε πρόσθετες εισροές (David *et al.*, 2002). Στην Ινδία, αναφέρεται ένα χάσμα απόδοσης 30–105 %, με μέσο όρο 42 %, στις διαφορετικές περιοχές καλλιέργειας (Reddy and Reddy, 2010), λόγω των χαμηλών θερμοκρασιών στα στάδια του σποροφύτου και της ανθοφορίας, της διαλείπουσας ή καθολικής ξηρασίας και της θερμικής καταπόνησης κατά τη διάρκεια της συγκομιδής (Farooq *et al.*, 2009; Silim *et al.*, 1993; Wery *et al.*, 1994). Σημαντική αναμένεται να είναι η μείωση του εν λόγω χάσματος στην απόδοση μέσω της ανάπτυξης βελτιωμένων ποικιλιών με αυξημένη απόδοση έως και κατά 20-25 % (Ali and Gupta, 2012). Σύμφωνα με αναφορές, οι ποικιλίες με χαμηλό δυναμικό απόδοσης και η στενή

γενετική βάση συνιστούν τους κύριους περιορισμούς στην απόδοση (Asnake και Bejiga, 2003; Amin *et al.*, 2015).

1.8.1 Βελτιωτικοί στόχοι

Οι στόχοι βελτίωσης της φακής συνήθως διαμορφώνονται σύμφωνα με τα προβλήματα της καλλιέργειας, τις προτεραιότητες των αγροτών αλλά και τις προτιμήσεις των καταναλωτών στις εκάστοτε περιοχές καλλιέργειας. Σύμφωνα με τους Muehlbauer *et al.*, (1995), ως κύριοι στόχοι παραγωγής στις βασικές χώρες-εξαγωγείς φακής τίθενται η υψηλή και σταθερή απόδοση, η ανθεκτικότητα έναντι ασθενειών και η βελτιωμένη ποιότητα σπόρων, με την αύξηση της απόδοσης ανά εκτάριο να αποτελεί τον πρωταρχικό στόχο στις χώρες που εξαρτώνται από τις εισαγωγές, όπως η Ινδία. Σήμερα, οι σπουδαιότεροι στόχοι βελτίωσης της φακής, πέραν της αύξησης της απόδοσης, συνοψίζονται στους παρακάτω:

1. Προσαρμοστικότητα σε ξηροθερμικά περιβάλλοντα

Η ανεπάρκεια εδαφικής υγρασίας συνιστά την πλέον σημαντική αβιοτική καταπόνηση σε παγκόσμιο επίπεδο. Στο μεσογειακό περιβάλλον της Δυτικής Ασίας και της Βόρειας Αφρικής, η καλλιέργεια της φακής πλήττεται από ξηρασία, ενώ αντίθετα στη Νότια Ασία περιστασιακά αντιμετωπίζει διαλείπουσα ξηρασία (Sarker and Erskine, 2006). Ως εκ τούτου, η έρευνα για τη βελτίωση της αντοχής έναντι της ξηρασίας και ο προσδιορισμός ανθεκτικών γονότυπων αποτελεί βασική επιδίωξη στη στρατηγική βελτίωσης του ICARDA (Malhotra *et al.*, 2004). Για το σκοπό αυτό, επιδιώκεται η επιλογή ανθεκτικών γονοτύπων, των οποίων η ανθεκτικότητα έγκειται σε ποικίλους μηχανισμούς αντοχής, όπως διαφυγή, αποφυγή αφυδάτωσης και αντοχή αφυδάτωσης, ενώ οι επιλεγμένοι γονότυποι αξιολογούνται εν συνεχεία από το NARS (Malhotra *et al.*, 2004).

2. Ανθεκτικότητα σε ασθένειες

Μεταξύ των βιοτικών καταπονήσεων, οι ασθένειες που προκαλούνται από παθογόνους μύκητες συνιστούν τους σημαντικότερους παράγοντες μείωσης της απόδοσης της φακής. Μεταξύ αυτών, η φουζαρίωση, η σκουριά και η ασκοχύτωση είναι οι πιο σημαντικές ασθένειες (Bayaa *et al.*, 1994). Παράλληλα, λόγω της έλλειψης κατάλληλων μέτρων καταπολέμησής τους, η αντιμετώπιση έγκειται στη

δημιουργία και αξιοποίηση γενετικά ανθεκτικών ποικιλιών. Για το σκοπό αυτό, έχουν αναπτυχθεί τεχνικές επιλογής, οι οποίες επέτρεψαν τον εντοπισμό γενετικών πηγών αντοχής (Sarker and Erskine, 2006).

3. Ανταγωνιστικότητα έναντι των ζιζανίων

Η φακή είναι ευαίσθητη στον ανταγωνισμό των ζιζανίων (Sarker and Erskine, 2006), εξαιτίας του μικρού ρυθμού ανάπτυξης κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξής της, καθιστώντας έτσι τα ζιζάνια σοβαρή αιτία μείωσης της απόδοσης (Παπακώστα-Τασοπούλου, 2012). Η δημιουργία ποικιλιών με πρόωμη και πλαγιόκλαδη ανάπτυξη μπορεί να αποτελέσει λύση για τη μειωμένη ανταγωνιστικότητα έναντι των ζιζανίων (Yenish *et al.*, 2009), ιδιαίτερα σε συστήματα καλλιέργειας μειωμένων εισροών.

4. Δημιουργία φυτών κατάλληλων για μηχανική συγκομιδή

Η εκμηχάνιση της συγκομιδής της φακής θεωρείται απαραίτητη για τη μείωση του κόστους παραγωγής της καλλιέργειας (Sarker and Erskine, 2006). Σημαντικά χαρακτηριστικά για την επιτυχία της μηχανικής συγκομιδής είναι το μεγάλο ύψος φυτών, ο σχηματισμός των λοβών σε ύψος 15 cm από την εδαφική επιφάνεια, η όρθια ανάπτυξη των φυτών, η αντοχή στην ωρίμανση, το περιορισμένο άνοιγμα και ο περιορισμός της πτώσης των λοβών. Σημειώνεται ότι για τα εν λόγω γνωρίσματα υπάρχει γενετική παραλλακτικότητα, η οποία αποτελεί αντικείμενο μελέτης των σχετικών βελτιωτικών προγραμμάτων (Παπακώστα-Τασοπούλου, 2012).

5. Αύξηση ποιότητας

Ένας από τους βασικούς στόχους, ιδιαίτερα στις χώρες του αναπτυσσόμενου κόσμου, αποτελεί η βελτίωση της ποιότητας της φακής. Η βελτιωμένη ποιότητα αφορά στα χαρακτηριστικά του σπόρου, όπως το μέγεθος, το χρώμα των κοτυληδόνων, η θρεπτική αξία των σπόρων και η βραστικότητα (Βλαχοστεργίος, 2009).

Κοινό στόχο των προγραμμάτων βελτίωσης σε παγκόσμιο επίπεδο αποτελεί η ενίσχυση του ύψους και σταθερότητας απόδοσης σε σπόρο, η οποία συχνά επιτυγχάνεται έμμεσα μέσω βελτίωσης της ανθεκτικότητας έναντι αβιοτικών και βιοτικών καταπονήσεων, οι οποίες υπό συνθήκες προκαλούν σημαντική μείωση της απόδοσης. Η εξημέρωση της φακής και η επιλογή για χιλιάδες χρόνια οδήγησαν σε σημαντική μείωση της γενετικής παραλλακτικότητας (γενετική στενωπό), οδηγώντας

σε αντίστοιχο περιορισμό των προοπτικών βελτίωσης της φακής. Έως σήμερα, κατέστη εφικτή η βελτίωση μονογονιδιακών γνωρισμάτων, μέσω συμαβτικών συστημάτων επιλογής και υβριδισμού, ωστόσο οι εν λόγω προσεγγίσεις συχνά δεν προσφέρουν έδαφος για την αντιμετώπιση περισσότερο σύνθετων γνωρισμάτων, λόγω της πολυγονιδιακής τους φύσης και της σημαντικής αλληλεπίδρασης γονότυπου-περιβάλλοντος, όπως η απόδοση σε σπόρο. Είναι επομένως επιτακτική η αναζήτηση πρόσθετων μεθόδων για την εισαγωγή γενετικής παραλλακτικότητας στη φακή, με κύριο στόχο τη βελτίωση της αντοχής σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις που, έμμεσα, θα οδηγήσουν σε αύξηση της απόδοσης.

1.8.2 Μέθοδοι Βελτίωσης της Φακής

Η γενετική παραλλακτικότητα αποτελεί τη θεμέλια βάση για τη βελτίωση των φυτικών ειδών και ενίσχυση της αποδοτικότητας των καλλιεργειών, ενώ ο συνεχής χαρακτηρισμός σημαντικών γονιδίων και αλληλόμορφων προς ενσωμάτωση σε elite γενετικό υλικό προσφέρει ολοένα και περισσότερες προοπτικές βελτίωσής τους. Οι διασταυρώσεις μεταξύ ανόμοιων γονέων αποτελούν την πλέον συνήθη και αποτελεσματική οδό βελτίωσης των αγρονομικών γνωρισμάτων και επίτευξης υψηλών αποδόσεων. Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητη η διεξοδική μελέτη της γονιδιακής δεξαμενής της φακής προκειμένου να καταστεί εφικτή η ενίσχυση της παραγωγικότητάς της (Dissanayake *et al.*, 2020).

Παρόλο που η φακή αποτελεί ένα από τα αρχαιότερα φυτά που εξημέρωσε ο άνθρωπος, συγκριτικά με άλλα φυτικά είδη όπως τα σιτηρά, δεν εμφανίζει μεγάλο ιστορικό βελτίωσης. Στις περισσότερες χώρες όπου καλλιεργείται επί σειρά ετών η φακή, χρησιμοποιούνται ποικιλίες που είναι επιρρεπείς τόσο σε βιοτικούς όσο και σε αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης. Οι Solh και Erskine (1984) επεσήμαναν ότι οι τοπικοί αβελτίωτοι πληθυσμοί συνιστούν > 80 % των ποικιλιών καλλιεργούμενης φακής στις κύριες χώρες παραγωγής της, χαρακτηρίζοντας τη φακή ως «ανέγγιχτο» είδος από πλευράς βελτίωσης.

Η φακή παρέμεινε μια ανεκμετάλλευτη καλλιέργεια μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του 1970, ενώ σύμφωνα με τη Συμβουλευτική Ομάδα Διεθνούς Γεωργικής Έρευνας (CGIAR), η συστηματική έρευνα φακής ξεκίνησε από το ICARDA το 1977, το οποίο συνεργάστηκε στενά με τα εθνικά συστήματα γεωργικής έρευνας του

αναπτυσσόμενου και ανεπτυγμένου κόσμου. Μερικά εθνικά προγράμματα, όπως και αυτά της Ινδίας, ξεκίνησαν νωρίτερα τις δραστηριότητες βελτίωσης, εστιάζοντας κυρίως στη συλλογή τοπικών πληθυσμών και στην επιλογή καθαρών σειρών (Tyagi and Sharma, 1981). Παρόλο που διεξάγεται έρευνα σε περίπου 40 χώρες παγκοσμίως, εντατικά εν εξελίξει προγράμματα απαντώνται στις κύριες παραγωγικές χώρες, όπως Ινδία, Καναδάς, Τουρκία, Ιράν, Αυστραλία, Νεπάλ, Μπαγκλαντές, Συρία, Αιθιοπία, Μαρόκο, Πακιστάν και ΗΠΑ (Sarker and Erskine, 2006).

Σημαντικά επίπεδα γενετικής παραλλακτικότητας έχουν αναφερθεί στο γένος *Lens* για μια σειρά αγρονομικών και φαινολογικών γνωρισμάτων. Συνολικά, 58.405 καταχωρήσεις φακής απαντώνται σε τράπεζες γενετικού υλικού παγκοσμίως (FAO, 2010), με το 18,6% να βρίσκεται στο ICARDA, στο Λίβανο, ενώ οι υπόλοιπες διατηρούνται σε 103 χώρες (FAO, 2010). Στην Αυστραλία, πολυάριθμες καταχωρήσεις φακής (5251, δηλαδή το 9% της παγκόσμιας συλλογής), που προέρχονται από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές διατηρούνται στην τράπεζα AGG (Horsham, VIC, Αυστραλία). Η συλλογή φακής στην AGG περιλαμβάνει άγρια είδη (4%), τοπικές ποικιλίες (54%), ερευνητικό υλικό / βελτιωτικές σειρές (10%), elite ποικιλίες (5%) και άλλους τύπους (26%), οι οποίοι είτε δεν έχουν χαρακτηριστεί είτε συνιστούν μείγμα δύο ή περισσότερων τύπων (Dissanayake et al., 2020).

Το πρόγραμμα βελτίωσης του ICARDA βασίζεται στη συλλογή και αξιοποίηση του διαθέσιμου γενετικού υλικού. Μελέτες σχετικά με τη γενετική παραλλακτικότητα σε διάφορα ιδρύματα, αναφέρουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των γνωρισμάτων προς αξιοποίηση σε προγράμματα βελτίωσης και επιλογής για μορφολογικά χαρακτηριστικά (Sarker et al., 2005), αποκρίσεις της άνθησης στη θερμοκρασία και τη φωτοπερίοδο (Erskine et al., 1994), ανθεκτικότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες (Sarker et al., 2004), την ανάπτυξη χλώρωσης λόγω ανεπάρκειας σιδήρου (Erskine et al., 1993) και ανισοροπίας βορίου (Yau & Erskine, 2000; Srivastava et al., 2000), και την αντοχή στη ξηρασία (Sarker and Erskine, 2002; Malhotra et al., 2004). Ακόμα, έχει αναφερθεί σημαντική παραλλακτικότητα για αντοχή σε μυκητιακές ασθένειες (Nasir and Bretag, 1998; Bayaa and Erskine, 1998) και ιώσεις (Makkouk et al., 2001).

Η Ελλάδα ήταν μια από τις πρώτες χώρες που ασχολήθηκαν συστηματικά με τη βελτίωση της φακής. Το Ινστιτούτο Βιομηχανικών & Κτηνοτροφικών Φυτών

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 (Βλαχοστέργιος, 2009). Στο πλαίσιο βελτίωσης, τα προγράμματα βασίζονται σε διασταυρώσεις καλών σύγχρονων ποικιλιών με υποσχόμενες εισαγόμενες ποικιλίες, οδηγώντας σε συνδυασμό των επιθυμητών γνωρισμάτων στις νέες ποικιλίες. Σημαντικούς στόχους συνιστούν η αύξηση της απόδοσης, η προσαρμογή στις εγχώριες συνθήκες, η πρωιμότητα, η ανώτερη ποιότητα και η ανθεκτικότητα. Στο πλαίσιο των δραστηριοτήτων της, η Τράπεζα Γενετικού Υλικού (Θέρμη Θεσσαλονίκης) έχει διασώσει και διαφυλάσσει ένα μεγάλο αριθμό εγχώριων παραδοσιακών ποικιλιών, οι οποίες κινδυνεύουν να απολεσθούν οριστικά.

Οι Solanki (2001) και Kumar *et al.* (2005) κάνοντας μια αποτίμηση της βελτίωσης στη φακή συμπεράναν ότι η πλειοψηφία των ποικιλιών που δημιουργήθηκαν, είναι επιλογές ανάμεσα σε υπάρχοντες πληθυσμούς και όχι τόσο προϊόντα υβριδισμού. Οι περισσότερες από αυτές τις ποικιλίες είναι άριστα προσαρμοσμένες σε περιορισμένες περιοχές, λίγες έχουν ευρεία προσαρμοστικότητα και ορισμένες εξ αυτών δύνανται να καλλιεργηθούν ακόμη και σε ακραία περιβάλλοντα (Βλαχοστέργιος, 2009).

1.8.2.1 Κλασικές μέθοδοι βελτίωσης

Η φακή αποτελεί ένα από τα αρχαιότερα φυτά που εξημερώθηκαν από τον άνθρωπο και, ήδη από το 700 π.Χ., οι πρώτοι καλλιεργητές ξεκίνησαν την επιλογή φυτών με επιθυμητά χαρακτηριστικά, όπως φυτά με πιο άθικτους ώριμους λοβούς. Κατά τα πρώιμα στάδια βελτίωσης της φακής, ο Muehlbauer (1992) ανέφερε την επιλογή καθαρών σειρών σε ετερογενή εδάφη ως την πιο κοινή βελτιωτική μέθοδο. Οι εν λόγω πρώιμες προσπάθειες ήταν επιτυχείς ως προς τη μείωση πτώσης των λοβών και μη ζωτικών σπόρων, τη μείωση του πλαγιάσματος, την αύξηση του μεγέθους των σπόρων, οι οποίοι εμφάνιζαν ποικιλία χρωμάτων (Zohary, 1996). Η επιλογή καθαρών σειρών οδήγησε σε ανάπτυξη γενετικά ομοιόμορφων και τοπικά προσαρμοσμένων ποικιλιών φακής. Ωστόσο, κατά τις τελευταίες τρεις έως τέσσερις δεκαετίες, ο υβριδισμός και η μετέπειτα επιλογή υπέρτερων γονοτύπων συνιστούν το

κύριο μέσο βελτίωσης της φακής, ειδικά στις ανεπτυγμένες χώρες (Laskar *et al.*, 2019).

Η μέθοδος βελτίωσης που επιλέγεται σε κάθε βελτιωτικό πρόγραμμα καθορίζεται από μια σειρά παραγόντων, όπως ο στόχος του προγράμματος και η διάρκειά του, ο χώρος που απαιτείται για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, το κόστος των εργατικών και άλλοι πρακτικοί και οικονομικοί παράγοντες. Επιπλέον, εξαρτάται από τον αριθμό των γονοτύπων με επιθυμητά χαρακτηριστικά οι οποίοι προκύπτουν από την μεθοδολογία που έχει επιλεγεί. Για τη βελτίωση της φακής, οι επικρατούσες μέθοδοι περιλαμβάνουν τη γενεαλογική επιλογή, τη μαζική επιλογή, τη μέθοδο καταγωγής από μεμονωμένο σπόρο, καθώς και διάφορους συνδυασμούς και τροποποιήσεις αυτών (Βλαχοστέργιος, 2009).

→ **Γενεαλογική Μέθοδος Επιλογής**

Η γενεαλογική μέθοδος χρησιμοποιείται κατά τη συγγενική αναπαραγωγή πληθυσμών αυτογονιμοποιούμενων και σταυρογονιμοποιούμενων ειδών με στόχο την επιλογή των υπέρτερων φυτών για τη δημιουργία των επιθυμητών ομογενών σειρών (Ρουπακιάς, 2016). Η μέθοδος συνίσταται στη φαινοτυπική επιλογή ατομικών φυτών από την F_2 γενεά και σπορά των απογόνων τους σε γραμμές. Η επιλογή συνεχίζεται στις επόμενες γενεές μεταξύ και εντός των γραμμών έως ότου σταθεροποιηθούν οι γονότυποι (Βλαχοστέργιος, 2009). Η επιλογή γίνεται σε διαφορετικά περιβάλλοντα, παρέχοντας τη δυνατότητα ανάδειξης της γενετικής παραλλακτικότητας ως προς τα προς επιλογή χαρακτηριστικά, δίνοντας έμφαση στη χρήση περιβαλλόντων που επιτρέπουν της έκφραση της παραλλακτικότητας των προς βελτίωση χαρακτηριστικών (Ρουπακιάς, 2016). Ως μειονεκτήματα της μεθόδου αναφέρονται η επιλογή βάσει του φαινοτύπου και η εξαντλητική καταγραφή των γενεαλογικών δεδομένων (Βλαχοστέργιος, 2009).

Παρά το γεγονός ότι η γενεαλογική μέθοδος επιλογής δεν ενδείκνυται για τη βελτίωση της φακής, καθώς λόγω των αγρονομικών της χαρακτηριστικών δεν είναι ευχερής η μακροσκοπική φαινοτυπική διάκριση, είναι χρήσιμη για γνωρίσματα με υψηλή κληρονομικότητα, όπως το μέγεθος του σπόρου (Muehlbauer *et al.*, 2009). Επιπλέον, σύμφωνα με τους Erskine *et al.*, (1990), η γενεαλογική επιλογή ως προς την απόδοση ατομικών φυτών αποδείχθηκε αναποτελεσματική στη φακή καθώς δε διαφέρει από την τυχαία επιλογή.

→ **Μαζική Επιλογή (Bulk Selection)**

Η μαζική επιλογή χρησιμοποιείται τόσο για τη δημιουργία νέων ποικιλιών όσο και για τη διατήρηση της καθαρότητας των ποικιλιών σε αυτογονιμοποιούμενα είδη (Ρουπακιάς, 2016). Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει μαζική συγκομιδή των υπέρτερων γονοτύπων μιας γενεάς, ανάμειξη των σπόρων τους και σπορά της επόμενης γενεάς με τυχαίο δείγμα από το μείγμα των σπόρων που δημιουργήθηκε. Εν αντιθέσει με την επίπονη γενεαλογική επιλογή (Βλαχοστέργιος, 2009), συνιστά μια διαδικασία που χαρακτηρίζεται από απλότητα και ευκολία στη διεξαγωγή της και αποτελεσματικότητα από άποψη χρόνου και κόστους. Ωστόσο, δεν ενδείκνυται για τη βελτίωση γνωρισμάτων με μικρή κληρονομικότητα καθώς η αποτελεσματικότητά της εξαρτάται από την κληρονομικότητα των προς βελτίωση χαρακτηριστικών (Ρουπακιάς, 2016).

Η μαζική επιλογή και οι τροποποιήσεις αυτής συνιστούν τις πλέον προτιμώμενες μεθόδους βελτίωσης της φακής λόγω της ευκολίας εφαρμογής και των εγγενών δυσκολιών κατά την εφαρμογή άλλων μεθόδων, δίνοντας έμφαση ωστόσο στην λεπτομερή παρακολούθηση των μαζικών πληθυσμών και της σύνθεσής τους. Η μαζική επιλογή ενδείκνυται για εφαρμογή σε μεγάλους πληθυσμούς για τη βελτίωση γνωρισμάτων, όπως το μέγεθος, το σχήμα και το χρώμα των σπόρων.

Το βελτιωτικό πρόγραμμα των ΗΠΑ χρησιμοποιεί μια τροποποιημένη μέθοδο, όπου οι πληθυσμοί προωθούνται μαζικά στην F_4 γενεά και εν συνεχεία γίνεται φαινοτυπική επιλογή των υπέρτερων φυτών. Οι επιλεγμένες σειρές έπειτα αξιολογούνται ως προς τα αγρονομικά χαρακτηριστικά, την ανθεκτικότητα σε ασθένειες, τα χαρακτηριστικά ποιότητας των σπόρων και την απόδοση. Οι υποσχόμενες επιλογές δοκιμάζονται διατοπικά και διαχρονικά και, ανάλογα με την απόδοση, διατίθενται ως βελτιωμένες ποικιλίες (Muehlbauer *et al.*, 2009).

Το αντίστοιχο πρόγραμμα της Αυστραλίας βασίζεται επίσης σε μια τροποποίηση της μαζικής επιλογής, όπου γίνεται επιλογή απλού λοβού στην F_2 και F_3 γενεά και μεμονωμένη επιλογή φυτών στην F_4 . Οι πληθυσμοί F_2 , F_3 και F_4 αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου σε μολυσμένους αγρούς με ασκοχύτωση για τον έλεγχο της ανθεκτικότητας στην ασθένεια. Η απογονική αξιολόγηση και επιλογή βασίζεται στην ανθεκτικότητα στην ασκοχύτωση, στο ύψος των φυτών, στην αντίσταση στο πλάγιασμα, στην πτώση και θραύση των λοβών, στη βιομάζα και στο

χρόνο ανθοφορίας και ωρίμανσης. Οι επιλεγμένες σειρές αξιολογούνται μακροσκοπικά ως προς το χρώμα του σπόρου, το μέγεθος, το σχήμα και την απουσία κηλίδων ασκοχύτωσης. Τέλος, οι επιλεγμένες σειρές αξιολογούνται ως προς την ανταπόκριση στις κοινώς χρησιμοποιούμενες αγρονομικές πρακτικές.

Οι Slinkard *et al.*, (2000) περιέγραψαν τη μέθοδο παραγωγής ανασυνδυασμένης οικογένειας (RDF) για τη βελτίωση της φακής, σύμφωνα με την οποία η επιλογή πρώτης γενιάς για απόδοση εφαρμόζεται στις οικογένειες F_{2: 4}, F_{2: 5} και F_{2: 6} για την απόρριψη των ανεπιθύμητων γονοτύπων και οικογενειών που προέρχονται από την F₂. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου RDF αφορούν στη δυνατότητα αξιολόγησης της απόδοσης κατά τις πρώτες γενιές, που οδηγεί σε ταχεία απόρριψη των γονοτύπων και οικογενειών με χαμηλή απόδοση, και στο σύντομο χρόνο μεταξύ της αρχικής διασταύρωσης και τελικής απελευθέρωσης της ποικιλίας.

→ **Μέθοδος Καταγωγής από Μεμονωμένους Σπόρους (SSD)**

Η μέθοδος καταγωγής από μεμονωμένους σπόρους αποτελεί τροποποίηση της γενεαλογικής επιλογής (Βλαχοστέργιος, 2009) και αφορά σε επιλογή, έπειτα από αυτογονιμοποίηση, ενός διασπώμενου πληθυσμού. Η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί και σε περιβάλλοντα μη αντιπροσωπευτικά των προς καλλιέργεια περιβαλλόντων (Ρουπακιάς, 2016). Κατά την εφαρμογή της, γίνεται συγκομιδή ενός σπόρου από κάθε φυτό του πληθυσμού, ανάμειξη όλων των σπόρων και σπορά του δείγματος για δημιουργία της επόμενης γενεάς. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται έως ότου επιτευχθεί το επιθυμητό επίπεδο ομοζυγωτίας, οπότε συγκομίζονται ατομικά φυτά και οι σειρές που προκύπτουν αξιολογούνται ως προς τα χαρακτηριστικά ενδιαφέροντος (Ρουπακιάς, 2016). Το κύριο πλεονέκτημα είναι η διατήρηση της γενετικής παραλλακτικότητας κατά το πέρασμα των γενεών και ο ελάχιστος χρόνος που απαιτείται για τη διεξαγωγή της (Muehlbauer *et al.*, 2009). Αντίθετα, ως μειονέκτημα ορίζεται 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).

Η μέθοδος καταγωγής από μεμονωμένους σπόρους είναι ιδανική για τη βελτίωση της φακής καθώς ταιριάζει με την ταχεία ανάπτυξη των γενεών υπό την

προϋπόθεση ότι υπάρχουν υποδομές (θερμοκήπια ή φυτώρια εκτός εποχής) για την εναλλαγή γενεών εντός του έτους (Muehlbauer *et al.*, 2009). Σύμφωνα με τους Haddad and Muehlbauer (1981), η SSD διατηρεί μεγαλύτερη γενετική παραλλακτικότητα συγκριτικά με τους πληθυσμούς που προκύπτουν από μαζική επιλογή. Η μέθοδος έχει εφαρμοστεί επιτυχώς για τη βελτίωση της αντοχής στο πλάγιασμα καθώς και για την ανάπτυξη ανασυνδυασμένων καθαρών σειρών (RILs) προς αξιοποίηση σε αναλύσεις γενετικής σύνδεσης και ανάπτυξη γενετικών χαρτών του γονιδιώματος της φακής (Eujayl *et al.*, 1998; Kahraman *et al.*, 2004; Hamwieh *et al.*, 2005).

→ **Κυψελωτή Μέθοδος Επιλογής**

Η κυψελωτή μέθοδος επιλογής, στο Fasoulas (1973) όπως αναφέρεται στο (Fasoulas, (1981), βασίζεται στην αξιολόγηση και επιλογή φυτών από την F₁ γενεά σε συνθήκες χαμηλής πυκνότητας σποράς, εξασφαλίζοντας την απουσία ανταγωνισμού. Κύριο στόχο αποτελεί η παράκαμψη της επισκιαστικής δράσης της ετερογένειας του εδάφους και των αρνητικών επιπτώσεων του άλλο-ανταγωνισμού στην αποτελεσματικότητα επιλογής, ενώ τα οφέλη από την εφαρμογή της μεθόδου σχετίζονται με τη μεγιστοποίηση της φαινοτυπικής παραλλακτικότητας (Fasoulas, 1973). Η μέθοδος περιλαμβάνει σπορά των φυτών σε εξαγωνική διάταξη ώστε κάθε φυτό να βρίσκεται στο κέντρο ενός εξαγώνου. Η απόδοση του εκάστοτε κεντρικού φυτού αξιολογείται συγκριτικά με τις αποδόσεις των γειτονικών φυτών, χρησιμοποιώντας διάφορες εντάσεις επιλογής, και γίνεται επιλογή του υπέρτερου ως προς την απόδοση φυτού εν συγκρίσει με τα φυτά που απαντώνται στον ομόκεντρο κύκλο με τα οποία συγκρίνεται. Η κυψελωτή μέθοδος θεωρείται ιδιαίτερα αποτελεσματική συγκριτικά με άλλες μεθόδους (Vlachostergios *et al.*, 2011) και, σύμφωνα με τους Fasoula and Fasoula, (2002), αποτελεί ιδανική επιλογή για την επίτευξη βασικών βελτιωτικών στόχων, όπως η σταθερότητα της απόδοσης, η αντοχή σε βιοτικές και το αβιοτικές καταπονήσεις και η προσαρμοστικότητα σε περιβάλλοντα χαμηλών εισροών.

Σχετικά με την εφαρμογή της στη βελτίωση της φακής, ένα σύνολο αναφορών υποδεικνύει την αποτελεσματικότητά της για δημιουργία υψηλοαποδοτικών ποικιλιών, χωρίς υποβάθμιση των ποιοτικών χαρακτηριστικών, με ανθεκτικότητα έναντι καταπονήσεων και κατάλληλων για ένταξη σε συστήματα χαμηλών εισροών

(Vlachostergios *et al.*, 2011a; Kargiotidou *et al.*, 2014; Vlachostergios and Roupakias, 2017; Vlachostergios *et al.*, 2018a; Ninou *et al.*, 2019).

1.8.2.2 Μοριακές μέθοδοι βελτίωσης

Ο όρος «Μοριακή Βελτίωση» χρησιμοποιείται για να περιγράψει ένα διεπιστημονικό πεδίο της σύγχρονης βελτίωσης φυτών που συνδυάζει τεχνικές και μεθόδους της μοριακής βιολογίας με συμβατικές βελτιωτικές προσεγγίσεις για την παραγωγή σύγχρονων ποικιλιών. Η Μοριακή Βελτίωση, στη σύγχρονη μορφή της, περιλαμβάνει δύο κύριες εφαρμογές: την αξιοποίηση μοριακών δεικτών προς ενσωμάτωση σε διαδικασίες υποβοηθούμενης από δείκτες επιλογή (MAS) και τη Γενετική Μηχανική για τη γενετική τροποποίηση των φυτών (Τσαυτάρης κ.α., 2012)

Είναι γεγονός ότι οι κλασικές μέθοδοι βελτίωσης, συμπεριλαμβανομένου του υβριδισμού και διαφόρων συστημάτων επιλογής, επέτρεψαν τη βελτίωση πληθώρας μονογονιδιακών γνωρισμάτων, ωστόσο χαρακτηρίζονται ως πολύπλοκες, χρονοβόρες και συχνά αναποτελεσματικές κατά τη βελτίωση των ποσοτικών γνωρισμάτων, όπως η απόδοση σε σπόρο, λόγω της πολυπλοκότητας του γενετικού υποβάθρου τους καθώς και της ύπαρξης σημαντικής αλληλεπίδρασης γονοτύπου-περιβάλλοντος. υπό το πρίσμα αυτό, η βελτίωση γενετικά σύνθετων χαρακτηριστικών μπορεί να επωφεληθεί σημαντικά από την αξιοποίηση των σύγχρονων βιοτεχνολογικών εργαλείων, συμπεριλαμβανομένων των μοριακών δεικτών και συστημάτων βιοπληροφορικής καθώς και των τεχνολογιών ανασυνδυασμένου DNA. Μέσω των ανωτέρω τεχνολογιών είναι πλέον εφικτή η δημιουργία και αξιοποίηση νέας γενετικής παραλλακτικότητας, ο εντοπισμός των μοριακών δικτύων και συστατικών που εμπλέκονται σε σημαντικά γνωρίσματα καθώς και η στοχευμένη ενσωμάτωση επιθυμητών γνωρισμάτων σε elite γενετικό υλικό (Laskar *et al.*, 2019).

→ Μοριακοί δείκτες

Οι μοριακοί δείκτες είναι μια συγκεκριμένη αλληλουχία DNA η οποία είναι συνδεδεμένη με χρωμοσωμικές περιοχές, που περιλαμβάνουν ένα ή περισσότερα γονίδια, ένα μικρό αριθμό επαναλαμβανόμενων νουκλεοτιδίων ή ακόμη και ένα νουκλεοτίδιο που διαφέρει σε δύο αλληλόμορφα. Οι μοριακοί δείκτες εμφανίζουν πλήθος εφαρμογών στη βελτίωση των φυτών, με κυριότερες τη μελέτη της γενετικής

παραλλακτικότητας σε πληθυσμιακό επίπεδο, τον εντοπισμό γονιδίων που ελέγχουν σημαντικά γνωρίσματα, τη δημιουργία γενετικών χαρτών σύνδεσης και τη φυλογενετική ανάλυση. Επιπλέον, οι πρακτικές εφαρμογές στη βελτίωση των φυτών αφορούν στην αξιοποίηση της γενετικής παραλλακτικότητας, στην ευχερή επιλογή κατάλληλων γονέων προς αξιοποίηση σε διασταυρώσεις και στην επιλογή των υπέρτερων γονοτύπων (Γλερίδου, 2014).

Στην έρευνα για τη βελτίωση της φακής, η χρήση των μοριακών δεικτών αφορά σε αναβάθμιση της βελτιωτικής διαδικασίας (Muehlbauer *et al.*, 2006), μέσω εφαρμογών όπως η διάκριση συγγενικών γονοτύπων και η ανάδειξη της υπάρχουσας γενετικής παραλλακτικότητας (Laghetti *et al.*, 2008). Η γενετική παραλλακτικότητα σε άγριους και καλλιεργούμενους πληθυσμούς φακής έχει μελετηθεί χρησιμοποιώντας διάφορα συστήματα δεικτών, εκ των οποίων οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNP) συνιστούν τον πιο άφθονο τύπο (Dissanayake *et al.*, 2020). Επίσης, στη φακή οι μοριακοί δείκτες έχουν αξιοποιηθεί στο πλαίσιο ανάπτυξης ανθεκτικότητας έναντι ασθενειών αλλά και δημιουργίας γενετικών χαρτών σύνδεσης. Οι Eujayl *et al.*, (1998) εντόπισαν έναν δείκτη RAPD συνδεδεμένο με το κυρίαρχο γονίδιο *Fw* που ρυθμίζει την αντίσταση στον αγγειακό μαρασμό που προκαλείται από τη φουζαρίωση, ενώ, αργότερα, οι Hamwieh *et al.*, (2005) ταυτοποίησαν δύο δείκτες (SSR και AFLP) που πλαισιώνουν το γονίδιο ανθεκτικότητας στο μαρασμό που προκαλείται από την ίδια ασθένεια. Επίσης, οι Ford *et al.*, (1999) ταυτοποίησαν τους δείκτες RAPD που συνδέονται με το γονίδιο ανθεκτικότητας στην ασκοχύτωση στη σειρά ILL5588. Ακολούθως, οι Chowdhury *et al.*, (2001) εντόπισαν δύο δείκτες RAPD που πλαισιώνουν το γονίδιο ανθεκτικότητας στην ασκοχύτωση στην ποικιλία Indian head, ενώ πιο πρόσφατα αναπτύχθηκαν μοριακοί δείκτες που συνδέονται με τα συμπληρωματικά κυρίαρχα γονίδια ανθεκτικότητας στη σειρά ILL7537 (Rubeena, μη δημοσιευμένο). Σύμφωνα με τους Sarker and Erskine (2006), υπάρχουν σημαντικές προοπτικές αξιοποίησης δεικτών για την πυραμίδωση γονιδίων ανθεκτικότητας έναντι της ασκοχύτωσης σε elite γενετικό υλικό φακής.

→ **Ανάπτυξη γενετικών χαρτών σύνδεσης**

Οι γενετικοί χάρτες αποτελούν χρήσιμο εργαλείο για τη βασική έρευνα στη γενετική και βελτίωση των φυτών (Duran *et al.*, 2004). Η δημιουργία χαρτών σύνδεσης σε καλλιεργούμενα φυτικά είδη επιτρέπει τον εντοπισμό ενός ή

περισσότερων γονιδίων που ελέγχουν σημαντικά αγρονομικά χαρακτηριστικά και την ανάπτυξη στενά συνδεδεμένων μορφολογικών και μοριακών δεικτών ώστε να καταστεί δυνατή η έμμεση επιλογή επιθυμητών γονοτύπων (Sarker and Erskine, 2006). Με δεδομένο ότι η γενετική χαρτογράφηση προϋποθέτει τη σωστή επιλογή γονέων, ως πλέον κατάλληλοι θεωρούνται οι ομοζύγωτοι γονότυποι, οι οποίοι ωστόσο είναι γενετικά ανόμοιοι ως προς τα υπό χαρτογράφηση χαρακτηριστικά (Muehlbauer *et al.*, 2006). Οι χάρτες σύνδεσης αξιοποιούνται σε εφαρμογές της υποβοηθούμενης από δείκτες επιλογής, ενώ επιπλέον παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για τη συγκριτική μελέτη των ειδών. Στο πλαίσιο αυτό, έχει αποδειχθεί ότι αρκετές ομάδες σύνδεσης που είχαν ταυτοποιηθεί στο μπιζέλι είναι πανομοιότυπες με της φακής (Weeden and Marx, 1987).

Στη φακή, οι πρώτοι γενετικοί χάρτες βασίστηκαν στη χρήση μορφολογικών δεικτών, ισοενζύμων και δεικτών DNA, καλύπτοντας περιορισμένο μέρος του γονιδιώματος (Tahir *et al.*, 1993). Αργότερα, αναπτύχθηκε ένας πιο πυκνός χάρτης σύνδεσης, με χρήση περισσότερων PCR-δεικτών που καλύπτουν περιοχή μεγαλύτερη από 1073 cM (Eujayl *et al.*, 1998).

Οι Ford *et al.*, (2003) ανέφεραν τον πρώτο ενδοειδικό χάρτη σύνδεσης στη φακή, με χρήση 114 μοριακών δεικτών, ενώ κατασκευάστηκαν δύο πιο πυκνοί χάρτες σύνδεσης, με χρήση ενός ενδοειδικού (Kahraman *et al.*, 2004) και ενός διειδικού πληθυσμού (Duran *et al.*, 2004). Ο τελευταίος, κατασκευάστηκε με τη χρήση 62 δεικτών RAPD, 29 ISSR, 65 AFLP, 4 μορφολογικών και 1 SSR, οι οποίοι συνολικά καλύπτουν περιοχή 2172 cM εντός 10 ομάδων σύνδεσης. Αντιστοίχως, ο χάρτης των Kahraman *et al.*, (2004) κάλυπτε 1192 cM σε 9 ομάδες σύνδεσης και περιελάμβανε συνολικά 130 RAPDs, ISSRs και AFLPs. Πιο πρόσφατα, αναπτύχθηκε ένας ολοκληρωμένος χάρτης, εμπλουτίζοντας το χάρτη των Eujayl *et al.*, (1998) με 39 νέα SSR ειδικά για φακές και 50 νέους δείκτες AFLP που εκτείνονται σε περιοχή 751 cM (Hamwiah *et al.*, 2005).

Μέχρι σήμερα, όλοι οι γενετικοί χάρτες φακής περιελάμβαναν περισσότερες ομάδες σύνδεσης σε σχέση με τον αριθμό του απλοειδούς χρωμοσώματος ($n = 7$). Σήμερα, η εκτιμώμενη ποσότητα του χαρτογραφημένου γονιδιώματος κυμαίνεται μεταξύ 751 cM και 2172 cM με μέση πυκνότητα δείκτη 2,7 cM έως 15,9 cM (Sarker and Erskine, 2006).

→ Γενετική Μηχανική

Η Γενετική Μηχανική περιλαμβάνει ένα σύνολο τεχνολογιών που επιτρέπουν την απομόνωση επιλεγμένων γονιδίων ανεξαρτήτως προέλευσης και την ενσωμάτωσή τους στον ίδιο ή διαφορετικό οργανισμό με στόχο τη δημιουργία ειδών με νέες ιδιότητες (Τσαυτάρης, 1995). Σε αντίθεση με την κλασσική βελτιωτική μεθοδολογία, που συμβάλει στη δημιουργία ποικιλιών αξιοποιώντας την έκφραση της υπάρχουσας γενετικής παραλλακτικότητας, η γενετική μηχανική αφορά σε τροποποίηση του γενετικού υλικού διασπώντας τους φραγμούς της φύσης. Συνεπώς, η κλασσική βελτίωση αφορά σε μίμηση των διαδικασιών που υφίστανται στη φύση, όπως διασταυρώσεις, φυλετική και αφυλετική αναπαραγωγή, για μεταφορά γονιδίων εντός του είδους ή μεταξύ συγγενικών ειδών, ενώ η γενετική μηχανική αφορά σε άμεση εισαγωγή επιθυμητών γνωρισμάτων σε ένα οργανισμό, χωρίς μεσολάβηση εγγενούς αναπαραγωγής, παρακάμπτοντας τους ταξινομικούς περιορισμούς.

Η γενετική μηχανική, η οποία συνιστά την πλέον αμφισβητούμενη μοριακή τεχνολογία, προσφέρει τη δυνατότητα ακριβέστερου χειρισμού των γονιδίων και ταχύτερης ενσωμάτωσης γνωρισμάτων στον οργανισμό-στόχο. Βάσει των ανωτέρω, η γενετική μηχανική συμβάλει στην επιτάχυνση της βελτιωτικής διαδικασίας και ενίσχυση του εύρους βελτίωσης των φυτών, μέσω μεταφοράς γονιδίων ανθεκτικότητας σε παράσιτα, ασθένειες, ζιζανιοκτόνα και περιβαλλοντικές καταπονήσεις καθώς και γονιδίων που συμβάλλουν στη βελτίωση ποιοτικών ή και μετασυλλεκτικών χαρακτηριστικών των φυτών όπως η διατηρησιμότητα, το άρωμα, η γεύση, η διατροφική αξία και το χρώμα.

Η γενετική τροποποίηση λαμβάνει χώρα σε δύο βασικά στάδια: i) απομόνωση του γονιδίου ενδιαφέροντος και ii) ένθεση του γονιδίου σε καλλιέργειες φυτικών κυττάρων. Πέραν της ένθεσης γονιδίων από άλλο οργανισμό, η γενετική μηχανική επιτρέπει τη μεταβολή της γονιδιακής έκφρασης. Η ενσωμάτωση των γονιδίων στο φυτικό γονιδίωμα μπορεί να γίνει άμεσα ή με τη χρήση φορέων. Η άμεση μεταφορά γονιδίων επιτυγχάνεται μέσω διαφορετικών μεθόδων που ειδικότερα περιλαμβάνουν τη χρήση της πολυαιθυλενικής γλυκόλης, τη βιολιστική μέθοδο, την ηλεκτροδιήθηση και τη μικροέγχυση. Η χρήση της πολυαιθυλενικής γλυκόλης (PEG) έγκειται στην υψηλή ωσμωτική πίεση που δημιουργείται στα κύτταρα, η οποία προκαλεί την ένθεση του προς μεταφορά γονιδίου. Η βιολιστική μέθοδος περιλαμβάνει επικάλυψη σφαιριδίων χρυσού ή βολφραμίου με το προς μεταφορά DNA και εκτόξευσή του,

υπό κενό αέρος, οπότε το DNA ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του φυτικού κυττάρου ενώ τα σφαιρίδια αποβάλλονται ως αδρανή υλικά. Αντιστοίχως, η ηλεκτροδιήθηση, η οποία συνιστά την πρώτη μέθοδο άμεσης ενωμάτωσης, βασίζεται σε προσωρινή δημιουργία πόρων στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, λόγω υψηλής τάσης σύντομης διάρκειας, οι οποίοι επιτρέπουν τη διέλευση γονιδίων στο φυτικό γονιδίωμα (Foerster and Neuman, 1989). Τέλος, η μικροέγχυση πραγματοποιείται με την έγχυση του γενετικού υλικού σε κοιλότητες που περιέχουν μεριστωματικά κύτταρα ή αναπαραγωγικά όργανα των φυτών που βρίσκονται σε κατάλληλο αναπτυξιακό στάδιο.

Η γενετική τροποποίηση με χρήση φορέων αφορά κυρίως στην αξιοποίηση του αγροβακτηρίου, με συνηθέστερη τη χρήση του *Agrobacterium tumefaciens*, κατά την οποία το γονίδιο ενσωματώνεται στο πλασμίδιο του αγροβακτηρίου και ακολούθως εισάγεται στο φυτικό γονιδίωμα. Η μέθοδος έγκειται στο γεγονός ότι το *A. tumefaciens* διαθέτει την εγγενή ικανότητα μόλυνσης των φυτικών κυττάρων, μεταφέροντας το *Ti* πλασμίδιο, το οποίο κατά την ενσωμάτωσή του προκαλεί τη δημιουργία όγκων στα φυτά. Ωστόσο, η αξιοποίησή του σε σχετικές διαδικασίες έγκειται στην απόπλισή του, μέσω αφαίρεσης των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό όγκων. Έπειτα από την ενσωμάτωση γονιδίων ενδιαφέροντος, το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εισάγεται σε φυτικά κύτταρα, τα οποία υπό συνθήκες ιστοκαλλιέργειας, μέσω κατάλληλων ρυθμιστών αύξησης, προσφέρουν δυνατότητες αναγέννησης ολόκληρων φυτών και μεταβίβασης των επιθυμητών γνωρισμάτων σε επόμενες γενεές.

1.9 Η αξιοποίηση της Γενετικής Μηχανικής στη φακή

Στις κλασικές βελτιωτικές διαδικασίες, τα τελευταία χρόνια προστίθενται οι σύγχρονες βιοτεχνολογικές προσεγγίσεις, οι οποίες προσφέρουν δυνατότητες ενίσχυσης του διαθέσιμου γονιδιακού αποθέματος και επιτάχυνσης της βελτίωσης των οσπρίων, συμπεριλαμβανομένης και της φακής (Das *et al.*, 2017).

Οι μεθοδολογικές εξελίξεις στην καλλιέργεια ιστών φακής συνέβαλλαν στη δημιουργία ενός βασικού πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού της φακής. Η αύξηση των διαθέσιμων πρωτοκόλλων μετασχηματισμού της φακής και η ενίσχυση της αποτελεσματικότητάς τους πρόκειται να επιτρέψει την εισαγωγή γονιδίων

ενδιαφέροντος στη φακή, τα οποία εκλείπουν από το γονιδιακό απόθεμα του είδους ή δεν είναι μεταβιβάσιμα μέσω της συμβατικής αναπαραγωγής (Gupta *et al.*, 2020). Η εξέλιξη αυτή πρόκειται να συμβάλλει στη βελτίωση σημαντικών αγρονομικών γνωρισμάτων που περιορίζουν την παραγωγικότητα του είδους, όπως η ευπάθεια σε εχθρούς και ασθένειες, η ευαισθησία σε αβιοτικές καταπονήσεις, η πτώση ανθέων και οι μετασυλλεκτικές απώλειες (Das *et al.*, 2019).

1.9.1 Διαδικασίες αναγέννησης ολόκληρων φυτών στη φακή

Σημαντική προϋπόθεση για την επιτυχή μεταφορά γονιδίων αποτελεί η δυνατότητα αναγέννησης ολόκληρων φυτών από φυτικά κύτταρα ή κάλους (*in vitro* αναγέννηση). Η ευχερής αναγέννηση φυτών επίσης καθιστά εφικτή την αξιοποίηση της σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας, που δημιουργείται κατά τις φάσεις της ιστοκαλλιέργειας (Das *et al.*, 2017), καθώς του μικροπολλαπλασιασμού, ο οποίος αφορά σε σωματική εμβρυογένεση και οργανογένεση (Cruz-Cruz *et al.*, 2013) μέσω του *in vitro* πολλαπλασιασμού για παραγωγή φυτικού υλικού υπό ασηπτικές συνθήκες. Οι εν λόγω τεχνικές, που προσφέρουν δυνατότητες αξιοποίησης και διεύρυνσης των διαθέσιμων γενετικών πόρων, έχουν εφαρμοσθεί στη φακή χρησιμοποιώντας διαφορετικά έκφυτα (Laskar *et al.*, 2019), όπως επικοτύλια (Williams and McHughen, 1986), βλαστικούς κόμβους (Ahmad *et al.*, 1997), καρατομημένο (decapitated) έμβρυο, άξονας εμβρύου, ανώριμους σπόρους (Polanco and Ruiz, 2001) και κοτυληδονικούς κόμβους (Gulati *et al.*, 2001; Sarker *et al.*, 2003; Omran *et al.*, 2008).

Αντίθετα, οι διαθέσιμες αναφορές αναγέννησης μέσω καλλιέργειας κάλων στη φακή είναι σαφώς περιορισμένες. Έως σήμερα, υπάρχουν αναφορές για αναγέννηση της φακής από κάλους μέσω οργανογένεσης (Williams and McHughen, 1986; Bayraz, 2004; Bagheri *et al.*, 2012), εμβρυογένεσης (Saxena and King, 1987), καλλιέργειας πρωτοπλαστών (Warkentin and McHughen, 1992; Sarker *et al.*, 2003) και άμεσης αναγέννησης (Sarker *et al.*, 2012). Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα των τεχνικών αυτών περιορίζεται σημαντικά από την εξάρτηση από το γονότυπο και το χρησιμοποιούμενο τύπο εκφύτου (Sultana *et al.*, 2016).

Στη φακή, η πρώτη αναφορά για *in vitro* αναγέννηση ολόκληρων φυτών έγινε με τη χρήση κορυφών μερισμάτων ως έκφυτα (Bajaj and Dhanju, 1979), ενώ

αργότερα αναφέρθηκε ο σχηματισμός πολλαπλών βλαστών από κορυφές βλαστών (Polanco *et al.*, 1988). Επίσης, προτάθηκε πρωτόκολλο αναγέννησης από τα υποκύτταρα και τα κύτταρα του επικοτυλίου (Williams and McHughen, 1986), ενώ πρόσφατη μελέτη ανέδειξε την αποτελεσματικότητα *in vitro* αναγέννησης βλαστών με χρήση διαφόρων εκφύτων και διαφορετικών συγκεντρώσεων 6-βενζυλαμινοπουρίνης (BAP) (Omran *et al.*, 2008). Σύμφωνα με τα ευρήματα, τα υψηλότερα επίπεδα BAP επιδρούν θετικά στην αναγέννηση των βλαστών, με τα καρατομημένα έμβρυα να συνιστούν τον πλέον επιδεκτικό τύπο εκφύτων. Παράλληλα, σημαντική ήταν η επίδραση της σύνθεσης του υποστρώματος ως προς τα άλατα και τις βιταμίνες, με το συνδυασμό των βιταμινών B5 και της υψηλής συγκέντρωσης Ca να συμβάλλουν σε αποφυγή της νέκρωσης των βλαστών. Τέλος, πρόσφατες μελέτες αναφέρουν την επιτυχή αναγέννηση βλαστών από εμφυτεύματα κοτυληδονικού κόμβου και τη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών με συχνότητα μετασχηματισμού 7 % (Bermejo *et al.*, 2012, 2016).

Η διαδικασία αναγέννησης φυτών φακής δυσχεραίνεται σημαντικά από την επαγωγή λειτουργικών ριζών σε βλαστούς, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται αδύναμες ρίζες (Laskar *et al.*, 2019). Στο πλαίσιο ενίσχυσης της ριζοβολίας, πρόσφατες μελέτες ανέδειξαν ότι ο εμπλουτισμός του θρεπτικού μέσου τόσο με ινδολοβουτυρικό οξύ (25 mg/ l IBA) (Sarker *et al.*, 2003) όσο και με ενεργό άνθρακα (Sultana *et al.*, 2016) οδηγούν σε αύξηση της ριζοβολίας κατά 30% και κατά 47%, αντίστοιχα. Οι Sarker *et al.*, (2012) και Das *et al.*, (2012) προχώρησαν στην επιτυχή *in vitro* επαγωγή της ανθοφορίας φυτών φακής ακολουθούμενη από σχηματισμό λοβών και σπόρων απευθείας από *in vitro* αναγεννημένους βλαστούς.

Στη φακή, επιπλέον, έχει εφαρμοστεί η τεχνική της εμβρυοδιάσωσης για ενσωμάτωση γονιδίων ανθεκτικότητας σε ασθένειες, προερχόμενων από μακρινά συγγενικά είδη, όπως τα *L. ervoides* (Fiala *et al.*, 2009; Tullu *et al.*, 2013) και *L. Lamottei* (Saha *et al.*, 2015) για την ανθρακινόζη, το *L. odemensis* για την ασκοχύτωση και το *L. tomentosus* για το *stemphylium blight* (Saha *et al.*, 2015), καθώς και γονιδίων που ελέγχουν το μέγεθος των σπόρων (Tullu *et al.*, 2013). Τέλος, η μέθοδος έχει εφαρμοσθεί για την επιτάχυνση της βελτιωτικής διαδικασίας προς παραγωγή elite ποικιλιών σε σύντομο χρόνο (Gupta *et al.*, 2020).

1.9.2 Μέθοδοι γενετικού μετασχηματισμού της φακής

Η γενετική τροποποίηση της φακής έχει προσεγγιστεί τόσο με τη χρήση του φορέα *Agrobacterium tumefaciens* (Lurquin *et al.*, 1998), όσο και με μεθόδους άμεσης μεταφοράς γονιδίων, όπως η βιολιστική, η ηλεκτροδιήθηση (Chowrira *et al.*, 1996) και ο βομβαρδισμός σωματιδίων (Gulati *et al.*, 2002; Mahmoudian *et al.*, 2002). Σε δικοτυλήδωνα είδη, ωστόσο, όπως η φακή, η πιο αποτελεσματική μέθοδος είναι μέσω του *A. tumefaciens* (Grant *et al.*, 1998).

Στο πλαίσιο μετασχηματισμού της φακής με άμεσες μεθόδους μεταφοράς, η πρώτη αναφορά περιλαμβάνει την παροδική έκφραση γονιδίων, μέσω ηλεκτροπόρωσης και εφαρμογής PEG, σε πρωτοπλάστες ριζών φακής (Maccarrone *et al.*, 1995), ενώ η τεχνική της ηλεκτροπόρωσης επιχειρήθηκε επίσης χρησιμοποιώντας ως έκφυτα μεριστωματικό ιστό (Chowrira *et al.*, 1995, 1996). Βάσει της έκφρασης της β-γλυκουρονιδάσης (*GUS*), ως γονίδιο αναφοράς, απεδείχθη η ανάπτυξη χμιαϊκού βλαστού, ο οποίος επέτρεψε τη δημιουργία διαγονιδιακών σπόρων. Ομοίως, επιτυχής έκφραση του *GUS* ανεδείχθη έπειτα από εμβολιασμό του εμβρυακού άξονα με διαφορετικά στελέχη *Agrobacterium* (Lurquin *et al.*, 1998). Αργότερα, οι Oktem *et al.*, (1999) ανέφεραν την πρώτη παροδική και σταθερή χμιαϊκή διαγονιδιακή έκφραση σε κοτυληδονικούς κόμβους φακής χρησιμοποιώντας βομβαρδισμό σωματιδίων. Έπειτα από τη διαπίστωση ότι η διήθηση υπό κενό αυξάνει τη συχνότητα μετασχηματισμού μέσω του *Agrobacterium* σε είδη οσπρίων (Trieu *et al.*, 2000), η ίδια τεχνική αναδείχθηκε ως αποτελεσματική στη φακή, με τη χρήση του στελέχους *GV2260 (pGUSINT)* σε κοτυληδονικούς κόμβους, χωρίς ωστόσο να καταστεί εφικτή η δημιουργία διαγονιδιακών φυτών (Mahmoudian *et al.*, 2002). Η πρώτη αναφορά ωστόσο αναγέννησης γόνιμων διαγονιδιακών φυτών αφορούσε σε μετασχηματισμό κοτυληδονικών κόμβων, μέσω βομβαρδισμού του *pBUC19* πλασμιδίου με χμιαϊκό *SuRA / SuRB* γονίδιο (*ALS*) προερχόμενο από καπνό, παρέχοντας αντοχή σε ζιζανιοκτόνα σουλφονουλουρίας (Gulati *et al.*, 2002).

Η πρώτη αναφορά γενετικού μετασχηματισμού της φακής, μέσω του *A. tumefaciens*, αφορούσε σε χρήση διαφόρων εκφύτων, όπως κορυφές βλαστών, επικοτύλιο, ρίζα, κοτυληδόνες και κοτυληδονικούς κόμβους (Warkentin and McHughen, 1992). Τα αποτελέσματά ανέδειξαν την επιδεκτικότητα όλων των τύπων εκφύτων, όπως προέκυψε από την παροδική έκφραση του *GUS*, με εξαίρεση τους

κοτυληδονικούς κόμβους, οι οποίοι μετασχηματίστηκαν αργότερα από τους Sarker *et al.*, (2003). Η μελέτη της επίδρασης διαφόρων ρυθμιστών αύξησης στις διαδικασίες αναγέννησης και μετασχηματισμού, ανέδειξε τη θετική επίδραση των NAA / IAA στο μετασχηματισμό, μέσω του *Agrobacterium*, χρησιμοποιώντας ως έκφυτα αποφλοιωμένους κοτυληδονικούς κόμβους, κοτυληδονικές πετιόλες, άκρες και ρίζες βλαστών (Bayrac, 2004). Η συγκριτική μελέτη διαφόρων εκφύτων και γονοτύπων φακής, σχετικά με την ικανότητα σχηματισμού όγκων και ριζών έπειτα από εμβολιασμό με στελέχη *A. tumefaciens* και *A. rhizogens*, ανέδειξε επίσης την υπεροχή των εκφύτων κοτυληδονικού κόμβου καθώς και την επιδεκτικότητα ως προς τη ριζοβολία της ποικιλίας Erzurum 89 (Dogan *et al.*, 2005).

Επίσης το *A. tumefaciens* χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς για το μετασχηματισμό δύο μικρόσπερων ποικιλιών φακής (Das *et al.*, 2012), ενώ παράλληλα πρόσφατη μελέτη ανέδειξε τη δυνατότητα δημιουργίας διαγονιδιακών φυτών, χρησιμοποιώντας ως έκφυτο το σπόρο και το στέλεχος EHA105 ως φορέα μεταφοράς των γονιδίων *nptII* και *uidA*, επιτυγχάνοντας ωστόσο χαμηλή συχνότητα μετασχηματισμού (0,66 %) (Chopra and Saini, 2012). Τέλος, οι Zaker *et al.*, (2017) πραγματοποίησαν επιτυχώς την έκφραση του γονιδίου *codA*, με τη χρήση του *A. tumefaciens* και την υγρομυκίνη ως παράγοντας επιλογής.

1.9.3 Πρακτικές εφαρμογές της γενετικής μηχανικής στη φακή

Στο πλαίσιο δημιουργίας φυτών φακής με ανθεκτικότητα σε εχθρούς και ζιζάνια, έχει αναφερθεί η ανάπτυξη διαγονιδιακών φυτών φακής που φέρουν το γονίδιο ενδοτοξίνης *Bt*, για τον έλεγχο του *Sitona weevil*, καθώς και γονίδια ανθεκτικότητας σε ζιζανιοκτόνα για τον έλεγχο του *Orobanche* sp (ICARDA). Για το σκοπό αυτό, έχουν δημιουργηθεί ανασυνδυασμένα πλασμίδια που ενσωματώθηκαν σε τρεις γονότυπους φακής, pCGP1258 (ILL 5582), pCGP1258, pROK2 / GST9 (ILL 5588), pCGP1258, pROK2 / GST (ILL 5883) (Sarker and Erskine, 2006). Επίσης, η ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι ζιζανιοκτόνων, και ειδικότερα του γλουφωζινικού αμμωνίου, επιχειρήθηκε μέσω μετασχηματισμού των γονοτύπων ILL5582, ILL5883 και ILL5588 με το στέλεχος AgL0 του *A. tumefaciens* που φέρει το πλασμίδιο pCGP1258 (Khatib *et al.*, 2007). Η γονιδιακή λειτουργία επιβεβαιώθηκε μέσω εφαρμογής ζιζανιοκτόνου. Προς την ίδια κατεύθυνση, κατέστη εφικτή η ανάπτυξη

ανθεκτικότητας έναντι μυκήτων, μέσω της έκφρασης του γονιδίου *Ri-pgip* που κωδικοποιεί ανασταλτική πρωτεΐνη πολυγαλακτουρονάσης, (Hashem, 2007). Ως έκφυτα χρησιμοποιήθηκαν έμβρυα, ενώ η χρήση ενός βελτιστοποιημένου συστήματος αναγέννησης οδήγησε σε ιδιαίτερα υψηλή συχνότητα μετασχηματισμού (περίπου 35%). Η πρώτη ωστόσο αναφορά σε γόνιμα διαγονιδιακά φυτά φακής περιλαμβάνει το μετασχηματισμό κοτυληδονικών κόμβων μέσω διαφορετικών στελεχών του *A. tumefaciens* (EHA 105, C58C1 και KYRT1), για έκφραση των γονιδίων *nptII* και *gusA* (Akcaay *et al.*, 2009).

Με στόχο την ενίσχυση της ανθεκτικότητας της φακής στις καταπονήσεις ξηρασίας και υψηλής αλατότητας πραγματοποιήθηκε ένθεση του γονιδίου *DREB1A*, η έκφραση του οποίου ρυθμίζεται από τον προαγωγέα *rd29A*, σε φυτά φακής. Η ανάλυση κατέδειξε την επιτυχή ένθεση του διαγονιδίου σε ένα αντίγραφο καθώς και τη σταθερή κληρονομία του (Khatib *et al.*, 2011). Πιο πρόσφατα, οι Das *et al.* (2019) διερεύνησαν την ενσωμάτωση του γονιδίου χιτινάσης στη φακή, μέσω του στελέχους του EHA 105 του *A. tumefaciens*. Η πλειοψηφία των μετασχηματισμένων βλαστών ανέπτυξαν *in vitro* άνθη και λοβούς, έπειτα από καλλιέργεια σε MS εμπλουτισμένο με IBA, NAA και τικαρκιλλίνη, ενώ επίσης επιβεβαιώθηκε η σταθερή ενσωμάτωση του διαγονιδίου στους απογόνους αυτογονιμοποίησης.

Η βασική προϋπόθεση για την επιτυχία της βελτίωσης των καλλιεργειών είναι η δημιουργία ενός κατάλληλου και αξιόπιστου συστήματος αναγέννησης και μετασχηματισμού (Das *et al.*, 2017). Λόγω της στενής γενετικής της βάσης αλλά και της έλλειψης φυσικών πηγών ανθεκτικότητας, η απόδοση της φακής επηρεάζεται από πληθώρα καταπονήσεων σε όλα τα στάδια της ανάπτυξής της (Taylor *et al.*, 2007), καθιστώντας επιτακτική την ανάγκη δημιουργίας πρωτοκόλλων μετασχηματισμού για τη δημιουργία φυτών με γενετική ανθεκτικότητα έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων (Naz *et al.*, 2015). Παρά τις αναφορές επιτυχούς αναγέννησης και μετασχηματισμού φυτών φακής, η ευρεία εφαρμογή των ανωτέρω μεθόδων είναι σαφώς περιορισμένη, συγκριτικά με άλλα φυτικά είδη, γεγονός που αποδίδεται στην έλλειψη αποτελεσματικών πρωτοκόλλων έμμεσης αναγέννησης (Gupta *et al.*, 2020). Είναι συνεπώς προφανής η αναγκαιότητα ανάπτυξης αποτελεσματικών πρωτοκόλλων αναγέννησης και μετασχηματισμού για την ευχερή γενετική τροποποίηση της φακής.

1.10 Το *Agrobacterium rhizogenes*

Το γένος *Agrobacterium* ανήκει στην οικογένεια *Rhizobiaceae* και περιλαμβάνει Gram-αρνητικά βακτήρια που αναπτύσσονται στο έδαφος, τόσο σαπρόφυτα όσο και παράσιτα, (Nilsson and Olsson, 1997) με κυριότερα εξ αυτών τα φυτοπαθογόνα είδη *A. tumefaciens* και *A. rhizogenes*, πλέον γνωστά με την ονομασία *Rhizobium radiobacter* και *Rhizobium rhizogenes* αντίστοιχα (Bahramnejad *et al.*, 2019). Και τα δύο έχουν τη δυνατότητα να μολύνουν, μέσω τραυμάτων, ένα εύρος δικοτυλήδων και ορισμένα μονοκοτυλήδων είδη, μεταφέροντας μέρος του γενετικού τους υλικού και ενσωματώνοντάς το στο γονιδίωμα του φυτού-ξενιστή. Το *Agrobacterium rhizogenes* (ή *Rhizobium rhizogenes*) είναι ένα παθογόνο βακτήριο εδάφους που ευθύνεται για την ανάπτυξη της ασθένειας των «τριχωτών ριζών» (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2 Μορφολογία του *A. Rhizogenes* (Πηγή: <https://www.sandi.org/animal-of-the-week/rhizobium-rhizogenes/>)

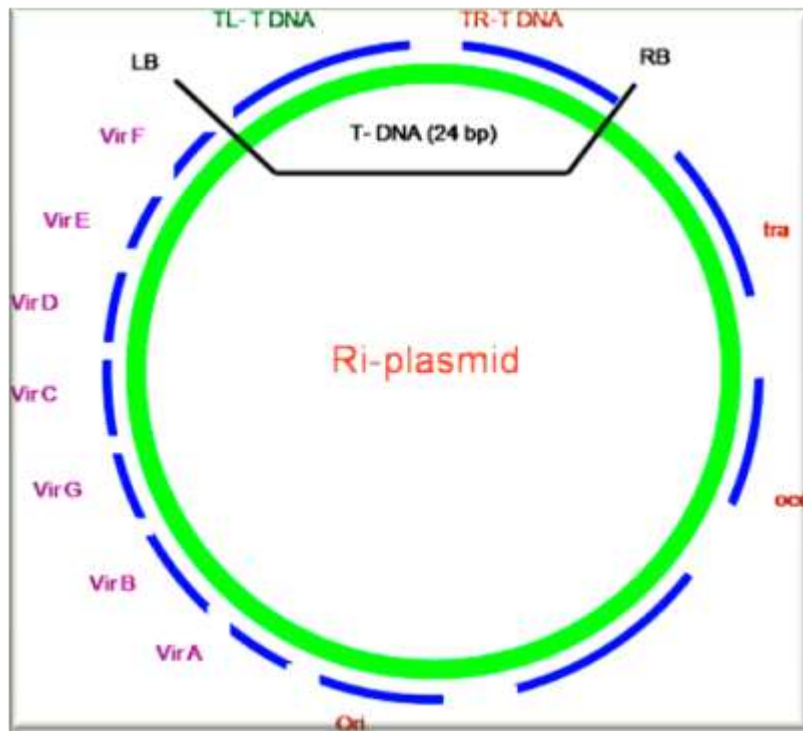
Το χαρακτηριστικό σύμπτωμα της ασθένειας των «τριχωτών ριζών» είναι ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός τυχαίων ριζών στη θέση της βακτηριακής προσβολής (Cardarelli *et al.*, 1987). Η μόλυνση ξεκινά στα τραύματα του ξενιστή με τη μεταφορά και έκφραση του T-DNA του *A. rhizogenes*, μέσω του *Ri* πλασμιδίου, στα φυτικά κύτταρα του ξενιστή (Estrada-Navarrete *et al.*, 2006). Μετά την επιτυχή ενσωμάτωση των γονιδίων T-DNA στο πυρηνικό DNA, ο ξενιστής υπόκειται σε αλλαγές που υποκινούνται από το ξένο DNA, με κύριο σύμπτωμα τον πολλαπλασιασμό των ριζών από το σημείο της μόλυνσης. Το φαινόμενο αυτό

περιγράφηκε αρχικά από τους Riker *et al.*, (1930) ως μολυσματικές ή τριχωτές ρίζες. Αργότερα, έγινε γνωστό ότι οι τριχωτές ρίζες συνθέτουν και εκκρίνουν συγκεκριμένες ενώσεις άνθρακα χαμηλού μοριακού βάρους, που ονομάζονται οπίνες, και χρησιμεύουν στην παραγωγή θρεπτικών συστατικών για το αγροβακτήριο (Desmet *et al.*, 2020).

1.10.1 Το Πλασμίδιο *Ri*

Το πλασμίδιο *Ri* είναι μια εξωχρωμοσωμική κυκλική δομή DNA, μεγάλου μεγέθους (180 έως 250 kbp) (Bahramnejad *et al.*, 2019), που φέρουν τα στελέχη του *A. rhizogenes* και είναι απαραίτητο για την παθογένεια τους. Τα πλασμίδια αυτά ταξινομούνται με βάση τον τύπο της οπίνης που παράγεται από μετασχηματισμένους ιστούς και μέχρι σήμερα, έχουν περιγραφεί τέσσερις διαφορετικοί τύποι οπινών και *Ri* πλασμιδίου (*pRi*): (1) το agropine (*pRiA4* του στελέχους A4), (2) το cucumopine (*pRi2659* του στελέχους NCPPB2659), (3) το mannopine (*pRi8196* του στελέχους NCIB8196) και (4) το mikimopine (*pRi1724* του στελέχους MAFF301724) (Estrada-Navarrete *et al.*, 2006).

Τα πλασμιδιακά μέρη που δεν μεταφέρονται στο φυτό-ξενιστή περιλαμβάνουν την περιοχή μολυσματικότητας, την έναρξη της αντιγραφής και την περιοχή καταβολισμού των οπινών. Το μεταφερθέν μέρος του *Ri* πλασμιδίου, το T-DNA, φέρει γονίδια για τη βιοσύνθεση οπινών, την επαγωγή τριχωτών ριζών, όπως τα ογκογόνο γονίδια (γονίδια *rol*), συμπεριλαμβανομένων των *rolA*, *rolB*, *rolC* και *rolD* και άλλα γονίδια άγνωστης λειτουργίας (ORFs). Το T-DNA των στελεχών τύπου agropine διακρίνεται στο TL-DNA και στο TR-DNA. Το TL-DNA των στελεχών της agropine μοιράζεται ομολογία με το αντίστοιχο των στελεχών cucumopine, mannopine και mikimopine, το οποίο αποτελείται από ένα απλό T-DNA. Συγκριτικά, το TR-DNA μοιράζεται ομολογία με το *pTi* T-DNA σε περιοχές που είναι υπεύθυνες για τη σύνθεση της agropine και τα γονίδια βιοσύνθεσης αυξίνης (τα γονίδια *aux1* και *aux2* του *pRi* είναι ομόλογα με τα *tms1* και *tms2* του *pTi*) (Desmet *et al.*, 2020) (Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3 Μορφολογία πλασμιδίου *Ri* του *A.rhizogenes*. (Πηγή: Rawat *et al*, 2019)

Με τις διαδικασίες μεταφοράς και έκφρασης του pRi T-DNA στο φυτικό κύτταρο παρατηρούνται φαινοτυπικές αλλαγές στις σειρές Ri. Συγκεκριμένα, πολλά από τα γονίδια T-DNA και ORFs προκαλούν έντονες μορφογενετικές αλλαγές που οφείλονται σε υποκείμενες μεταβολές στον μεταβολισμό των ορμονών του φυτού. Κατά τα τελευταία 40 χρόνια, πλήθος μελετών έχει εστιάσει στα μεταφερόμενα γονίδια *rol* και ORF αναφορικά με τις μορφολογικές αλλαγές που προκαλούν σε μετασχηματισμένα φυτά (Moriuchi *et al.*, 2004; Kodahl *et al.*, 2016), ωστόσο τόσο ο μηχανισμός λειτουργίας τους όσο και οι λειτουργίες των πρωτεϊνικών προϊόντων τους παραμένουν ως επί το πλείστον άοριστα. Εξάιρεση αποτελεί το γονίδιο *rolD*, το οποίο κωδικοποιεί μια λειτουργική κυκλοδεαμινάση που μετατρέπει την ορνιθίνη σε προλίνη, και έχει περιγραφεί ως οσμοπροστατευτικό που σχετίζεται με το στρες (Tronato *et al.*, 2001). Γενικά, πολλά από τα γονίδια *rol* και τα ORF οδηγούν σε ορμονικές αλλαγές και αλλοιωμένη κυτταρική διαίρεση στα φυτά και δρουν συνεργιστικά μεταβάλλοντας τα μορφολογικά τους γνωρίσματα (White *et al.*, 1985; Sprena *et al.*, 1987).

1.10.2 Ο φαινότυπος *Ri*

Τα φυτά που μολύνονται από το *A. rhizogenes* και αναπτύσσουν τριχωτές ρίζες έχουν αλλοιωμένο φαινότυπο, ο οποίος αναφέρεται ως «φαινότυπος *Ri*» ή «φαινότυπος τριχωτών ριζών» (Christey, 2001). Ο Terfer (1984) ήταν ο πρώτος που ανέφερε τα χαρακτηριστικά του φαινοτύπου *Ri*, τα οποία περιελάμβαναν συστροφή των φύλλων, αυξημένη ικανότητα ριζοβολίας, μειωμένη κυριαρχία κορυφής και αλλαγές στη μορφολογία των ανθέων. Έκτοτε, έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες σχετικά με τα φυσικά μετασχηματισμένα φυτά, όπου περιγράφονται παρόμοια χαρακτηριστικά. Με βάση την αρχική περιγραφή του Terfer (1984), ορίστηκαν τέσσερα βασικά χαρακτηριστικά που επηρεάζουν διαφορετικά μέρη του φυτού: (1) συμπαγής ανάπτυξη, (2) αλλοιωμένη μορφολογία φύλλων, (3) αλλοιωμένη μορφολογία ρίζας και (4) τροποποιημένη ανθοφορία και γονιμότητα. Κάθε γνώρισμα ορίζεται ευρέως, έτσι ώστε να περιλαμβάνεται ένα εύρος διακύμανσης.

1.10.3 Εφαρμογές του μετασχηματισμού μέσω του *A. rhizogenes*

Τα τελευταία χρόνια, η παραγωγή διαγονιδιακών φυτών μέσω της χρήσης του *A. rhizogenes* επιδιώκεται ολοένα και περισσότερο λόγω του σύντομου χρόνου και της ευκολίας εφαρμογής των σχετικών πρωτοκόλλων μετασχηματισμού. Το *A. rhizogenes* χρησιμοποιήθηκε για την απόκτηση φαινοτυπικά διακριτών φυτών με γνωρίσματα ενδιαφέροντος.

Η δημιουργία «σύνθετων» φυτών, αποτελούμενων από μετασχηματισμένο ριζικό σύστημα και εναέρια μέρη άγριου τύπου (Lambert and Terfer, 1992), αποτελεί μια γρήγορη και αποτελεσματική οδό για τη μελέτη της βιολογίας των ριζών καθώς και της αλληλεπίδρασής της με βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης. Η αναγέννηση από μετασχηματισμένους ιστούς οδήγησε στην ανάπτυξη πλήρως διαγονιδιακών φυτών, που επέτρεπαν τη μεταβίβαση των γνωρισμάτων στις απογονικές γενεές (Costantino *et al.*, 1984; Terfer, 1984; Ooms *et al.*, 1985). Αν και οι διαγονιδιακές ρίζες, που έχουν προκύψει μέσω μετασχηματισμού με το *A. rhizogenes*, έχουν περιγραφεί ως μορφολογικά παρόμοιες με τις ρίζες άγριου τύπου, δεν μπορεί να αποκλειστεί ότι μια διαταραχή της ισορροπίας ορμονών στις διαγονιδιακές ρίζες δύναται να επηρεάσει τις βιοτικές αλληλεπιδράσεις και τη

γονιδιακή έκφραση, ειδικά όταν τα ρυθμιζόμενα από φυτοορμόνη διαγονίδια αναλυθούν σε τέτοιες ρίζες (Mrosk *et. al.*, 2009).

Σε σύγκριση με άλλες μεθόδους μετασχηματισμού, η συγκεκριμένη θεωρείται πιο πρακτική, λόγω της υψηλής αποτελεσματικότητας και του χαμηλού κόστους. Επίσης, σημαντικό πλεονέκτημα συνιστά ο σύντομος χρόνος που απαιτεί η λήψη διαγονιδιακών ριζών (περίπου 3-4 εβδομάδες), οι οποίες διατίθενται άμεσα για έρευνα καθώς το διαγονιδιακό ριζικό σύστημα μπορεί να αποτελέσει αντικείμενο μελετών γονιδιακής έκφρασης, παρακάμπτοντας τις δυσκολίες που συνοδεύουν το σταθερό μετασχηματισμό. Στο πλαίσιο αυτό, οι διαγονιδιακές ρίζες μπορούν να αξιοποιηθούν ως πλατφόρμα για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών και δευτερογενών μεταβολιτών, τη μεταβολική μηχανική και τη λειτουργική ανάλυση γονιδίων καθώς και τη φυσιολογική και βιοχημική ανάλυση της ριζόσφαιρας. Η παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στο διαγονιδιακό ριζικό σύστημα έχει αναδειχθεί ως μια γρήγορη, χαμηλού κόστους και αξιόπιστη μέθοδος. Η μεταβολική μηχανική συμβάλλει στη μελέτη της βιοσυνθετικής οδού φυτοχημικών σε καλλιέργειες ριζών, ενώ η μελέτη των ριζών μπορεί να έχει πλήθος εφαρμογών που εκτείνονται από την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης και λειτουργίας έως και την ανάλυση της φυσιολογίας ρίζας αναφορικά με τη σταθεροποίηση αζώτου, την επάρκεια θρεπτικών ή τοξικότητα ξενοβιοτικών ουσιών και την αλληλεπίδραση φυτών-παθογόνων (Chen *et. al.*, 2018). Ο μετασχηματισμός με τη μεσολάβηση του *A. rhizogenes* έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε πληθώρα φυτικών ειδών, συμπεριλαμβανομένων των *Glycine max* (Cao *et al.*, 2011), *Capsicum annuum* (Aarrouf *et al.*, 2012), *Lotus corniculatus* (Jian *et al.*, 2009), *Prunus* sp. (Bosselut *et al.*, 2011), *Pisum sativum* (Clemow *et al.*, 2011) και *Catharanthus roseus* (Tang *et al.*, 2011).

Στα ψυχανθή, η γονιδιωματική μελέτη επικεντρώθηκε κυρίως στα είδη *Lotus japonicus* και *Medicago truncatula*, τα οποία αξιοποιούνται ως φυτά-μοντέλα, μεταξύ άλλων, λόγω του μικρού γονιδιώματος και μεγέθους των φυτών, της διπλοειδίας, και ικανοποιητικής ποσότητας παραγόμενων σπόρων (Udvardi *et al.*, 2005). Το *M. truncatula* προτάθηκε ως πρότυπο σύστημα για μοριακές και γενετικές μελέτες (Barker *et al.*, 1990), καθώς παρουσιάζει μια σειρά ευνοϊκών χαρακτηριστικών, όπως αυτογαμία, μικρό διπλοειδές γονιδίωμα και καλά αναπτυγμένα γενετικά και γονιδιωματικά εργαλεία για προσεγγίσεις λειτουργικής γονιδιωματικής. Αντίστοιχα, το αυτόγαμο *L. japonicus* ενδείκνυται ως πρότυπο για μελέτες σχετικά με το

σχηματισμό φυματίων (Handberg and Stougaard, 1992; Jiang and Gresshoff, 1993, 1997; Handberg *et al.*, 1994), καθώς φέρει τα απαιτούμενα χαρακτηριστικά για γενετικές αναλύσεις, όπως ύπαρξη πρωτοκόλλων μετασχηματισμού και αναγέννησης, μικρό μέγεθος γονιδιώματος (0,5 pg), μικρός βιολογικός κύκλος, ικανοποιητική ποσότητα σπόρου και ευχέρεια διασταύρωσης (Stiller *et al.*, 1997). Τα ανωτέρω είδη με το *G. max* βρίσκονται στο επίκεντρο της συστηματικής γονιδιωματικής μελέτης (Udvardi *et al.*, 2005).

Ο μετασχηματισμός με τη μεσολάβηση του *Agrobacterium rhizogenes* στα όσπρια περιγράφηκε για πρώτη φορά για το *Lotus corniculatus* (Petit *et al.*, 1987). Στη συνέχεια, αποδείχθηκε ότι τέτοιες διαγονιδιακές ρίζες μπορούν να σχηματίσουν φυμάτια άμεσα (Hansen *et al.*, 1989) και προς το παρόν η χρησιμότητα της τριχωτής ρίζας ή της σύνθετης προσέγγισης του φυτού (όρος που προέρχεται από το γεγονός ότι οι μετασχηματισμένες ρίζες προκαλούνται σε ένα μη μετασχηματισμένο φυτό) ως συντόμευση για τη δημιουργία φυματίων έχει επεκταθεί και σε άλλα όσπρια όπως *Trifolium repens*, *Vigna aconitifolia*, *Glycine max*, *Vicia hirsuta*, *Lotus japonicus*, *Medicago truncatula*, *Trifolium pratense*, *Sesbania rostrata* και *Cicer arietinum* (Boisson-Dernier *et al.*, 2001).

Στη φακή, μεταξύ των διαφορετικών προσεγγίσεων γενετικού μετασχηματισμού, η χρήση του φορέα *Agrobacterium* έχει θεωρηθεί ως η πλέον κοινή και αποτελεσματική μέθοδος για παραγωγή διαγονιδιακών φυτών (Warkentin and McHughen, 1992; Barton *et al.*, 1997; Halbach *et al.*, 1998; Sarker *et al.*, 2003, Akcay *et al.*, 2009, Das *et al.*, 2012). Η πλειονότητα των μελετών που διεξήχθησαν έως σήμερα ωστόσο, αφορούν στην ανάπτυξη πρωτοκόλλων γενετικού μετασχηματισμού, μέσω του *Agrobacterium*, (Das *et al.*, 2019), ενώ είναι περιορισμένες οι αναφορές σχετικά με την πρακτική αξιοποίησή τους για δημιουργία φυτών με επιθυμητά γνωρίσματα. Σχετικά με τη δυνατότητα μετασχηματισμού μέσω του *A. rhizogenes*, έχει διεξαχθεί μελέτη που αφορά σε μετασχηματισμό τεσσάρων ποικιλιών φακής, υπό συνθήκες φωτός και σκότους, με τα βακτήρια *A. tumefaciens* και *A. rhizogenes* και μελέτη των μετασχηματισμένων φυτών ως προς τον σχηματισμό όγκων και τριχωτών ριζών αντίστοιχα (Dogan *et al.*, 2005). Τα ευρήματα της μελέτης ανέδειξαν την επιδεκτικότητα της μίας μόνο ποικιλίας (Erzurum 89), η οποία ανέπτυξε ριζικά τριχίδια υπό συνθήκες σκότους, υποδεικνύοντας ότι η δράση του *A. rhizogenes* και η επιτυχία του μετασχηματισμού παρουσιάζει εξάρτηση από το γονότυπο, τις περιβαλλοντικές συνθήκες αλλά και το μέσο καλλιέργειας.

1.11 Σκοπός της Μελέτης

Έως σήμερα, ο γενετικός μετασχηματισμός, διαμέσου του *A. rhizogenes* έχει αξιοποιηθεί σε πληθώρα φυτικών ειδών, καλλιεργούμενων και μοντέλων, συμπεριλαμβανομένων αυτών που ανήκουν στα ψυχανθή. Οι σχετικές ερευνητικές προσπάθειες στη φακή ωστόσο περιορίζονται σε μία μόνο μελέτη, η οποία χαρακτηρίστηκε ως ανεπιτυχής ως προς τη δυνατότητα μετασχηματισμού των φυτών φακής μέσω του *A. rhizogenes*. Με δεδομένη τη δυστροπία που χαρακτηρίζει τη φακή ως προς το γενετικό μετασχηματισμό και αναγέννηση ολόκληρων φυτών, αντικείμενο της παρούσας διατριβής αποτέλεσε η βελτιστοποίηση ενός πρωτοκόλλου μετασχηματισμού, μέσω του *A. rhizogenes* για τη γρήγορη και ευχερή δημιουργία διαγονιδιακών ριζών προς αξιοποίηση σε μελέτες γονιδιακής έκφρασης και βιολογία των ριζών. Στο πλαίσιο βελτιστοποίησης του πρωτοκόλλου, αξιοποιήθηκαν και μελετήθηκαν συγκριτικά διαφορετικά βακτηριακά στελέχη και πρωτόκολλα μετασχηματισμού, που διέφεραν κυρίως ως προς τη σύνθεση των θρεπτικών υποστρωμάτων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Φυτικό υλικό

Με σκοπό τη διεξαγωγή των πειραμάτων γενετικού μετασχηματισμού χρησιμοποιήθηκε η παραδοσιακή ποικιλία “Σάμος”, η οποία συνιστά εγχώριο γενετικό υλικό που δημιουργήθηκε από Ινστιτούτο Βιομηχανικών και Κτηνοτροφικών φυτών, του ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ. Η εν λόγω ποικιλία προήλθε από διασταύρωση της πλατύσπερμης ελληνικής ποικιλίας “Θεσσαλία” με τη λεπτόσπερμη M-11071. Πρόκειται για μια λεπτόσπερμη ποικιλία με βάρος 1000 σπόρων 40-45 γραμμάρια ενώ ο σπόρος έχει το σχήμα φακού με χρώμα ανοιχτό πράσινο ή υπόξανθο χωρίς στίγματα ή κηλίδες (Εικόνα 2.1) (Γλερίδου, 2014).



Εικόνα 2.1 Σπόροι φακής ποικιλίας "Σάμος". (Πηγή: Βλαχοστέριος, 2015)

2.2 Στελέχη του *Agrobacterium rhizogenes* και συνθήκες ανάπτυξης

Για το μετασχηματισμό των φυτών φακής, χρησιμοποιήθηκαν τα βακτηριακά στελέχη του *Agrobacterium rhizogenes*: R1000, K599 και Arqua. Αρχικά, τα βακτήρια αναπτύχθηκαν σε 5 ml υγρού θρεπτικού μέσου (LB) που περιείχε τα

κατάλληλα αντιβιοτικά, για διάστημα 2 ημερών, στους 28 °C ή έως ότου αποκτήσουν $OD_{600} = 0,6-1,0$ (Εικόνα 2.2). Πιο συγκεκριμένα, τα αντιβιοτικά ήταν το ναλιδιξικό οξύ ($25 \mu\text{g ml}^{-1}$), η ριφαμπικίνη ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) και η σπεκτινομυκίνη ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) για τα βακτηριακά στελέχη *R1000*, *K599* και *Arqua*, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, με σκοπό τη συλλογή των βακτηριακών κυττάρων, 10 ml από κάθε βακτηριακή καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 rpm για 5 λεπτά. Έπειτα από προσθήκη 1 ml MS, ακολούθησε εκ νέου φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 5 λεπτά, απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος (pellet) σε υγρό MS, το οποίο και χρησιμοποιήθηκε ως εμβόλιο για το μετασχηματισμό των εκφύτων φακής.



Εικόνα 2.2 Ανάπτυξη βακτηριακών καλλιεργειών σε μηχανικό αναδευτήρα, σε 160 rpm.

2.3 Μετασχηματισμός σποροφύτων φακής μέσω του *A. rhizogenes*

Για τη διαδικασία του γενετικού μετασχηματισμού χρησιμοποιήθηκαν υγιή σπορόφυτα φακής, ηλικίας τριών ημερών, με φυσιολογικό φαινότυπο, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους Pavlí και Skaracis (2010), με μικρές τροποποιήσεις. Οι τροποποιήσεις αφορούσαν στην ηλικία των σποροφύτων, στη μέθοδο εμβολιασμού καθώς και στη σύσταση των θρεπτικών υποστρωμάτων εμβολιασμού και συγκαλλιέργειας. Με στόχο τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας μετασχηματισμού εφαρμόστηκαν δύο πρωτόκολλα, που διέφεραν ως προς την παρουσία ακετοσιριγκόνης και MES (Πίνακας 2.1).

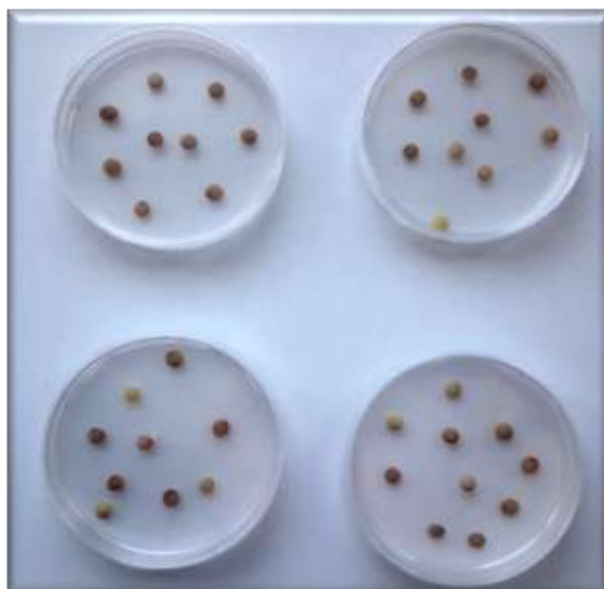
Αρχικά, πραγματοποιήθηκε απολύμανση των σπόρων φακής με διάλυμα χλωρίνης 20 % που περιείχε Tween-20 για 5 λεπτά. Ακολούθησαν 4 πλύσεις με αποστειρωμένο dH_2O και στη συνέχεια, οι απολυμασμένοι σπόροι τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα βλάστησης που περιείχε 0.5 % άγαρ (Εικόνα 2.3). Τα τριβλία

σφραγίστηκαν με parafilm και τοποθετήθηκαν υπό ελεγχόμενες συνθήκες στους 25 °C, 16 ώρες φωτός / 8 ώρες σκοτάδι, για διάστημα 3 ημερών.

Πίνακας 2.1 Σύνθεση υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την μέσσω του *A. rhizogenes* επαγωγή διαγονιδιακών ριζών.

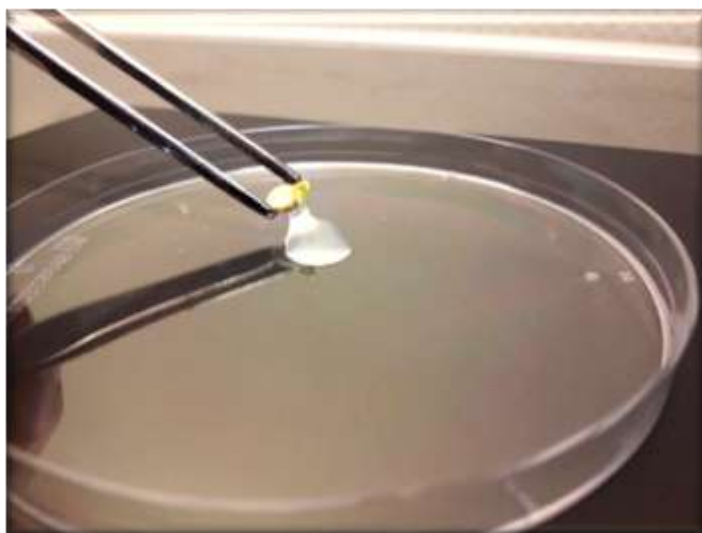
ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ	ΠΡΩΤΟΚΟΛΟ 1	ΠΡΩΤΟΚΟΛΟ 2
Υπόστρωμα βλάστησης	Agar: 5 g/L	Agar: 5 g/L
Υπόστρωμα συν-καλλιέργειας	MS: 2,2 g/L Sucrose: 20 g/L Agar: 9 g/L -	MS/MES/vitamins: 2,2 g/L Sucrose: 20 g/L Agar: 9 g/L Ακετοσυριγκόνη: 100 μM
Υπόστρωμα επαγωγής ριζών	MS: 2,2 g/L Sucrose: 30 g/L Agar: 9 g/L	MS/MES/vitamins: 2,46 g/L Sucrose: 30 g/L Agar: 9 g/L
MS	MS: 4,4 g/L Sucrose: 30 g/L -	MS/MES/vitamins: 4,9 g/L Sucrose: 30 g/L Ακετοσυριγκόνη: 150 μM

*Σε όλα τα υποστρώματα το pH ρυθμίστηκε στο $5,7 \pm 0,1$



Εικόνα 2.3 Αποστειρωμένοι σπόροι φακίς προς βλάστηση σε τριβλία που περιέχουν υπόστρωμα βλάστησης.

Μετά το πέρας 3 ημερών, υγιή σπορόφυτα φακής χρησιμοποιήθηκαν ως εκφύτα για την επαγωγή διαγονιδιακών ριζών. Για το σκοπό αυτό, με τη βοήθεια αποστειρωμένου νυστεριού, οι υπάρχουσες ρίζες αποκόπηκαν στην περιοχή του υποκοτυλίου και ακολούθησε η εμφύτευση του τραυματισμένου άκρου εντός των βακτηριακών κυττάρων (Εικόνα 2.4). Στη συνέχεια, τα εμβολιασμένα φυτά φακής μεταφέρθηκαν σε τετράγωνα τριβλία Petri που περιείχαν υπόστρωμα συνκαλλιέργειας. Τα τριβλία σφραγίστηκαν με parafilm κατά τα $\frac{3}{4}$ και αφήθηκαν να αναπτυχθούν για 3 ημέρες σε ελεγχόμενες συνθήκες (23 °C με 16 ώρες φωτός / 8 ώρες σκοτάδι). Ακολούθως, με σκοπό την αναχαίτιση της ανάπτυξης των βακτηρίων, τα σπορόφυτα μεταφέρθηκαν σε τετράγωνα τριβλία Petri με υπόστρωμα επαγωγής ριζών που περιείχε σεφοταξίμη (250 mg L^{-1}). Μετά από 15 ημέρες, τα σπορόφυτα μεταφέρθηκαν εκ νέου σε υπόστρωμα επαγωγής ριζών με σεφοταξίμη. Τα τριβλία Petri σφραγίστηκαν μερικώς, ώστε να επιτρέπεται ο αερισμός, και τοποθετήθηκαν κατακόρυφα σε θάλαμο ανάπτυξης για περίπου 15 ημέρες. Ο συνολικός αριθμός των τριβλίων ανερχόταν σε 16 (4 τριβλία ανά βακτηριακό στέλεχος) συμπεριλαμβανομένου των φυτών μαρτύρων (wild type), τα οποία υπέστησαν τις ίδιες μεταχειρίσεις απουσία εμβολιασμού με βακτηριακά κύτταρα. Η εμφάνιση των χαρακτηριστικών ριζικών τριχιδίων αποτέλεσε το κριτήριο αποτελεσματικότητας του μετασχηματισμού.



Εικόνα 2.4 Εμβάπτιση εκφύτων φακής στα βακτηριακά κύτταρα.

2.4 Συλλογή ιστού και Εξαγωγή DNA

Για τη συλλογή των δειγμάτων, αποκόπηκαν με αποστειρωμένο νυστέρι ρίζες από τα μετασχηματισμένα και τα αγρίου τύπου φυτά φακής. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε αλουμινόχαρτο, πάνω στο οποίο σημειωνόταν ο κωδικός αριθμός και το στέλεχος του βακτηρίου, και τοποθετήθηκαν απευθείας σε θάλαμο βαθιάς κατάψυξης (-80 °C), προς αποφυγή μετασυλλεκτικών αλλοιώσεων, έως ότου γίνει η απομόνωση DNA.

Η απομόνωση DNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Kit NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel GmbH & Co), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αναλυτικότερα, τα δείγματα λειοτριβήθηκαν σε κατάλληλα γουδιά (κάψα πορσελάνης), με χρήση υγρού αζώτου, έως ότου κονιορτοποιηθούν και ακολούθως 100 mg ιστού ανά δείγμα τοποθετήθηκε σε eppendorf. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 400 µl διαλύματος PL1, με σκοπό τη λύση των κυττάρων, και έπειτα από ανακίνηση, έγινε προσθήκη 10 µl RNase A. Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο στους 65 °C για 10 λεπτά. Έπειτα από μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο eppendorf με στήλη NucleoSpin® Plant II, ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 2 λεπτά. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 450 µl buffer PC και τα δείγματα μεταφέρθηκαν στη στήλη NucleoSpin® Plant II, η οποία έχει την ιδιότητα συγκράτησης του DNA.

Αμέσως μετά, έγινε φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 1 λεπτό, προσθήκη 400 µl διαλύματος έκπλυσης (PW1) και εκ νέου φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 1 λεπτό. Μετά την απομάκρυνση του υποκειμένου, προστέθηκαν 700 µl διαλύματος έκπλυσης (PW2), ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 1 λεπτό και εκ νέου απομάκρυνση του υποκειμένου. Η διαδικασία έκπλυσης επαναλήφθηκε ακόμη μία φορά με 200 µl διαλύματος PW2, φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του υποκειμένου. Ακολούθως, η στήλη τοποθετήθηκε σε νέο eppendorf, προστέθηκαν 50 µl διαλύματος έκπλυσης (PE), και έπειτα από 5 λεπτά επώασης των δειγμάτων στο υδατόλουτρο στους 65 °C, έγινε φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 1 λεπτό. Στη συνέχεια, η στήλη τοποθετήθηκε σε νέο σωλήνα eppendorf και έγινε έκλυση του DNA με την προσθήκη 30 µl ddH₂O. Ακολούθησε επώαση του δείγματος για 1 λεπτό και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 λεπτό. Τέλος, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους -20 °C.

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 υπολογίστηκε στα 100 ng/ μL.

2.5 Έλεγχος του μετασχηματισμού μέσω PCR

Με σκοπό την επιβεβαίωση της ένθεσης του διαγονιδίου, πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR. Η επαλήθευση της ενσωμάτωσης της T-DNA περιοχής στο φυτικό γονιδίωμα και της απουσίας των βακτηριακών κυττάρων πραγματοποιήθηκε μέσω ενίσχυσης εξειδικευμένων ζευγών εκκινητών, που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στο μείγμα της PCR περιγράφονται στον Πίνακα 2.3, ενώ στην Εικόνα 2.5 παρουσιάζεται το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή για την πραγματοποίηση της PCR.

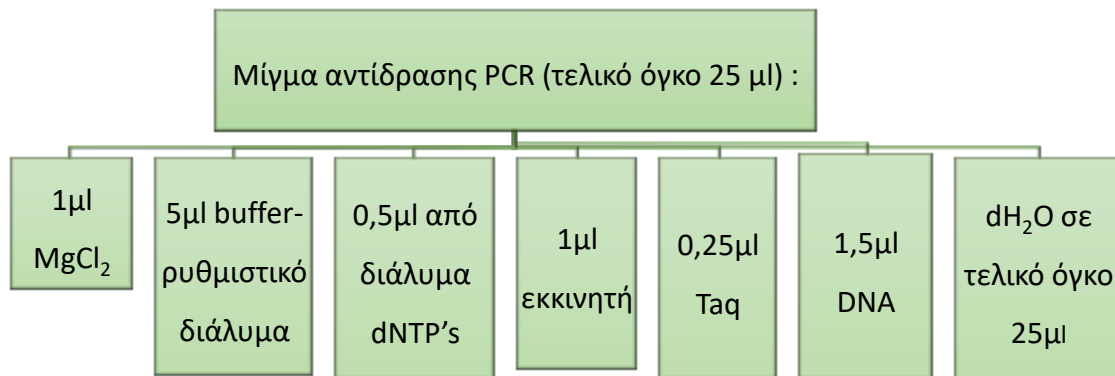
Πίνακας 2.2 Τα εξειδικευμένα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των επιλεγμένων αλληλουχιών.

Εκκινητής	Αλληλουχία (5' → 3')	T _m (°C)	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Πηγή
<i>rolB2-F</i>	GCTCTTGCAGTGCTAGATTT	52	423	Thilip <i>et al.</i> , 2015
<i>rolB2-R</i>	GAAGGTGCAAGCTACCTCTC	52		
<i>virCD-F</i>	CTCATCAGGCACGCTTG	52	1074	Pavli and Scarakis 2010
<i>virCD-R</i>	GCGGATGCTTCAAATGG	52		

Πίνακας 2.3 Το μίγμα που χρησιμοποιήθηκε στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).

Αντιδραστήρια	Ποσότητα (μl)
Ρυθμιστικό διάλυμα (5x)	5
MgCl ₂ (25 mM)	1
dNTPs (10 mM)	0.5
Εκκινητές (10 mM)	1

Taq polymerase (5u/μl)	0.25
DNA (20ng/μl)	1.5
H₂O	14.75
Τελικός όγκος	25



Εικόνα 2.5 Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.

2.6 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων των προϊόντων ενίσχυσης σε πηκτή αγαρόζης

Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1,5 % με ρυθμιστικό διάλυμα TAE (1X) για 2.5 ώρες στα 60 V. Η οπτικοποίηση των PCR προϊόντων έγινε με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο έχει την ιδιότητα να

παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και να φθορίζει παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας (UV).

2.7 Στατιστική ανάλυση

Το πειραματικό σχέδιο ήταν των πλήρων τυχαιοποιημένων ομάδων, με 3 επαναλήψεις για κάθε μία από τις 6 επεμβάσεις. Πιο συγκεκριμένα, το πειραματικό σχέδιο περιλάμβανε 20 σπορόφυτα, ενώ παράγοντες αποτελούσαν τα 3 διαφορετικά στελέχη και τα 2 διαφορετικά εφαρμοζόμενα πρωτόκολλα (2 x 3 παραγοντικό πείραμα). Η συχνότητα μετασχηματισμού εκφράστηκε ως ποσοστό των εκφύτων που εμφάνισαν ριζικά τριχίδια, ενώ δεδομένης της κανονικότητας των δεδομένων (W-test, $Prob < 0.115$), εφαρμόστηκε ANOVA (ΕΣΔ σε επίπεδο σημαντικότητας 5 %). Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου JMP (version 13.0).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Με στόχο τη βελτιστοποίηση πρωτοκόλλου γενετικού μετασχηματισμού της φακής, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός με τη μεσολάβηση του *Agrobacterium rhizogenes*, χρησιμοποιώντας διαφορετικά βακτηριακά στελέχη και πρωτόκολλα που διέφεραν ως προς τη σύσταση των θρεπτικών υποστρωμάτων. Πιο συγκεκριμένα, ως φορείς μετασχηματισμού χρησιμοποιήθηκαν τα βακτηριακά στελέχη *R1000*, *Arqua* και *K599* ενώ αναφορικά με τα πρωτόκολλα, αξιοποιήθηκαν δύο διαφορετικά πρωτόκολλα που διαφέρουν ως προς την παρουσία ακετοσυρινγκόνης και MES.

Ο μετασχηματισμός πραγματοποιήθηκε μέσω εμβολιασμού του υποκοτυλίου ασηπτικά ανεπτυγμένων εκφύτων φακής, χρησιμοποιώντας το κατάλληλο βακτηριακό στέλεχος. Σε σύντομο χρονικό διάστημα, ένας περιορισμένος αριθμός πλευρικών ριζών εμφανίστηκε στην τομή του ριζώματος, ως απόκριση στην αφαίρεση του υπάρχοντος ριζικού συστήματος. Η αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού βασίστηκε στη συγκριτική αξιολόγηση των εμβολιασμένων σποροφύτων με τα αγρίου τύπου φυτά φακής (μάρτυρες).

3.1 Χρόνος εμφάνισης διαγονιδιακών ριζών μετά των εμβολιασμό

Μετά τον εμβολιασμό των ασηπτικά ανεπτυγμένων εκφύτων φακής με το αντίστοιχο εμβόλιο, που προερχόταν από τα τρία διαφορετικά βακτηριακά στελέχη, ακολούθησε καθημερινή καταγραφή του αριθμού των ημερών που μεσολάβησαν για την εμφάνιση διαγονιδιακών ριζών. Η καταγραφή αφορούσε στο χρόνο εμφάνισης ριζικών τριχιδίων κατά το μετασχηματισμό με τα διαφορετικά βακτηριακά στελέχη και τα διαφορετικά πρωτόκολλα μετασχηματισμού.

Σύμφωνα με το *Πρωτόκολλο 1*, η εμφάνιση των πρώτων διαγονιδιακών ριζών στα φυτά που εμβολιάστηκαν με το βακτηριακό στέλεχος *R1000* σημειώθηκε σε διάστημα 12 ± 1 ημερών, έπειτα από τον εμβολιασμό. Ακολούθησαν τα σπορόφυτα που μετασχηματίστηκαν με το βακτηριακό στέλεχος *K599*, στα οποία τα ριζικά τριχίδια εμφανίστηκαν 16 ± 1 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, ενώ τα φυτά που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *Arqua* δεν εμφάνισαν διαγονιδιακές ρίζες σε όλη τη

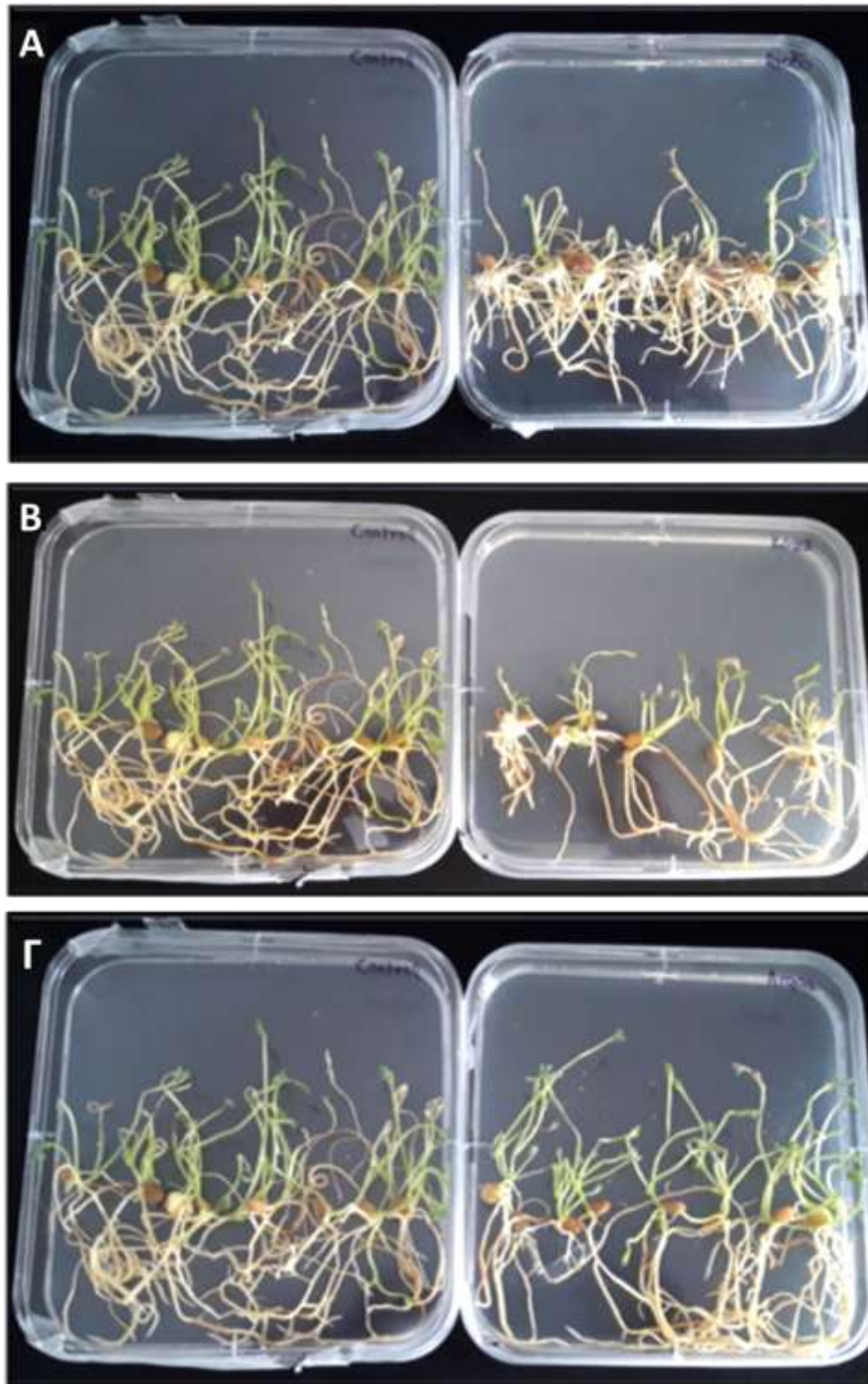
διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Στο παραπάνω χρονικό διάστημα, τα μη μετασχηματισμένα φυτά (wild type) ανέπτυξαν ρίζες άγριου τύπου.

Η εφαρμογή του *Πρωτοκόλλου 2* οδήγησε σε επαγωγή ριζικών τριχιδίων στο σύνολο των φυτών που εμβολιάστηκαν με όλα τα βακτηριακά στελέχη (*R1000*, *Arqua* και *K599*). Ειδικότερα, η εμφάνιση των πρώτων διαγονιδιακών ριζών καταγράφηκε στα φυτά φακής που μετασχηματίστηκαν με το βακτηριακό στέλεχος *R1000*, περίπου 10 ± 1 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Αντίθετα, στα φυτά που μετασχηματίστηκαν με τα στελέχη *Arqua* και *K599* η εμφάνιση των διαγονιδιακών ριζών σημειώθηκε 5-6 ημέρες αργότερα, συγκριτικά με το *R1000*. Ομοίως με το *Πρωτόκολλο 1*, τα μη μετασχηματισμένα φυτά (wild type) ανέπτυξαν ριζικό σύστημα αγρίου τύπου.

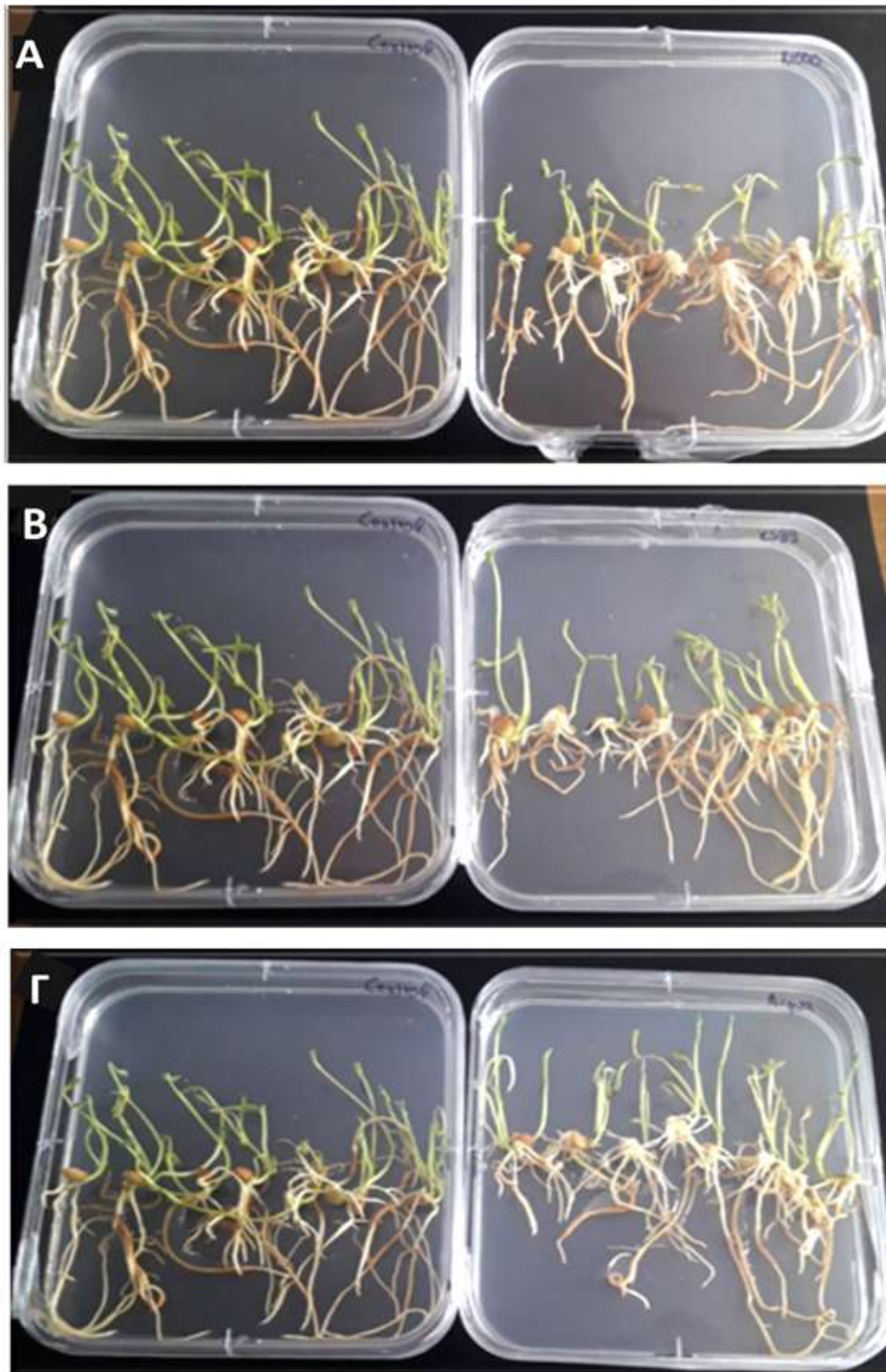
3.2 Διαφορές στο φαινότυπο των ριζικών τριχιδίων

Μετά το πέρας τριών εβδομάδων από τον εμβολιασμό, ο φαινότυπος των διαγονιδιακών ριζών διέφερε εμφανώς από τον αντίστοιχο των φυτών αγρίου τύπου τόσο ως προς τον ρυθμό ανάπτυξης όσο και ως προς τη δομή και βιομάζα του ριζικού συστήματος. Οι μετασχηματισμένες ρίζες εμφάνισαν αυξημένο αριθμό διακλαδώσεων και περιστασιακά πλαγιοτροπική ανάπτυξη.

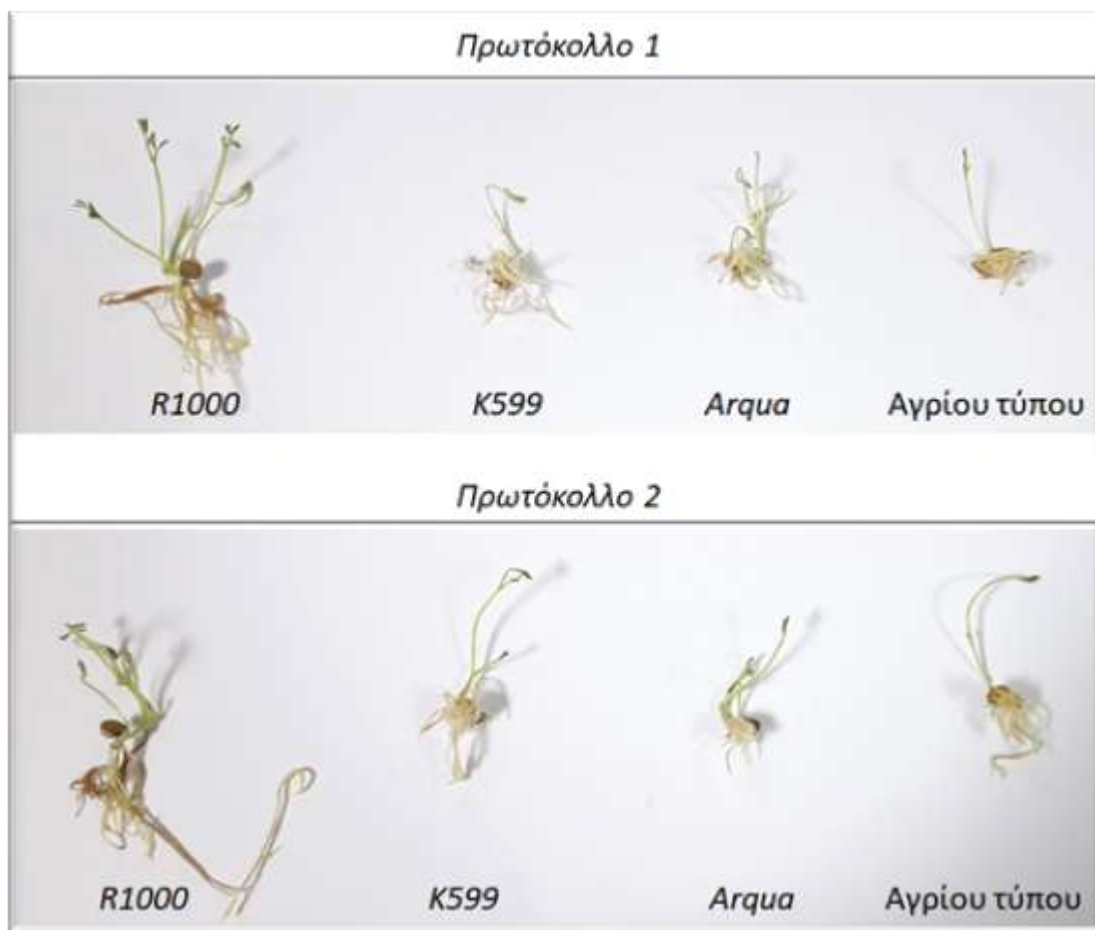
Στις Εικόνες 3.1 (*Πρωτόκολλο 1*) και 3.2 (*Πρωτόκολλο 2*) απεικονίζεται το μοτίβο ανάπτυξης των μετασχηματισμένων ριζών φακής συγκριτικά με το ριζικό σύστημα των φυτών αγρίου τύπου για κάθε βακτηριακό στέλεχος.



Εικόνα 3.1 Έκφυτα φακής μετασχηματισμένα, με τη χρήση του Πρωτοκόλλου 1, τρεις εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό. (Α) Μη-μετασχηματισμένα έκφυτα (αριστερά) και έκφυτα μετασχηματισμένα με το στέλεχος *R1000* (δεξιά), (Β) Μη-μετασχηματισμένα έκφυτα (αριστερά) και έκφυτα μετασχηματισμένα με το στέλεχος *K599* (δεξιά), (Γ) Μη-μετασχηματισμένα έκφυτα (αριστερά) και έκφυτα μετασχηματισμένα με το στέλεχος *Arqua* (δεξιά).



Εικόνα 3.2 Έκφυτα φακής μετασχηματισμένα, με τη χρήση του Πρωτοκόλλου 2, τρεις εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό. (A) Μη-μετασχηματισμένα έκφυτα (αριστερά) και έκφυτα μετασχηματισμένα με το στέλεχος *R1000* (δεξιά), (B) Μη-μετασχηματισμένα έκφυτα (αριστερά) και έκφυτα μετασχηματισμένα με το στέλεχος *K599* (δεξιά), (Γ) Μη-μετασχηματισμένα έκφυτα (αριστερά) και έκφυτα μετασχηματισμένα με το στέλεχος *Arqua* (δεξιά).



Εικόνα 3.3 Συγκριτική απεικόνιση των φυτών φακής, τρεις εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό. Παρουσιάζονται τα φυτά που εμβολιάστηκαν με τα στελέχη *R1000*, *K599* και *Arqua* καθώς και τα μη-μετασχηματισμένα φυτά (αγρίου τύπου).

3.3 Συχνότητα μετασχηματισμού

Παρά την ικανότητα όλων των βακτηριακών στελεχών να προκαλούν την επαγωγή διαγονιδιακών ριζών, σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές, τόσο μεταξύ των πρωτοκόλλων όσο και μεταξύ των βακτηριακών στελεχών, ως προς τη συχνότητα μετασχηματισμού. Συνεπώς, η συχνότητα του μετασχηματισμού επηρεάστηκε σημαντικά από τη σύσταση των θρεπτικών μέσων εμβολιασμού και συγκαλλιέργειας, όπως διαπιστώνεται από τη διαφορετική αποτελεσματικότητα των πρωτοκόλλων που εφαρμόστηκαν, καθώς και από τα διαφορετικά βακτηριακά στελέχη (Πίνακας 3.1).

Σύμφωνα με το *Πρωτόκολλο 1*, το οποίο συνεπάγεται απουσία ακετοσιριγκόνης και MES, ως καταλληλότερο βακτηριακό στέλεχος για την επαγωγή ριζικών τριχιδίων στη φακή αναδείχθηκε το *R1000*, το οποίο οδήγησε σε συχνότητα μετασχηματισμού 76,60 %. Ακολούθησε το βακτηριακό στέλεχος *K599*, με αρκετά

χαμηλότερο ποσοστό (10 %), ενώ το βακτηριακό στέλεχος *Arqua* δεν οδήγησε σε σχηματισμό διαγονιδιακών ριζών.

Πίνακας 3.1 Η επίδραση των στελεχών του *Agrobacterium rhizogenes* και των υποστρωμάτων στο χρόνο εμφάνισης διαγονιδιακών ριζών και στην αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού.

Στελέχη <i>A. rhizogenes</i>	Αριθμός εμβολιασμένων έκφυτων		Χρόνος εμφάνισης διαγονιδιακών ριζών (dpt)		Συχνότητα Μετασχηματισμού (%)*		M.O. (S)
	1**	2	1	2	1	2	
R1000	60	60	12 ± 1	10 ± 1	76.7a	95.0a	85.8a
K599	60	60	16 ± 1	15 ± 1	10.0b	38.3c	24,15b
Arqua	60	60		15 ± 1	0.0b	56.7b	28.3b
M.O. (P)					28,9a	63,3b	

*Ποσοστό μετασχηματισμού (%) = αριθμός έκφυτων φακής που εμφάνισαν τριχωτές ρίζες / συνολικός αριθμός έκφυτων φακής × 100.

**Πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε.

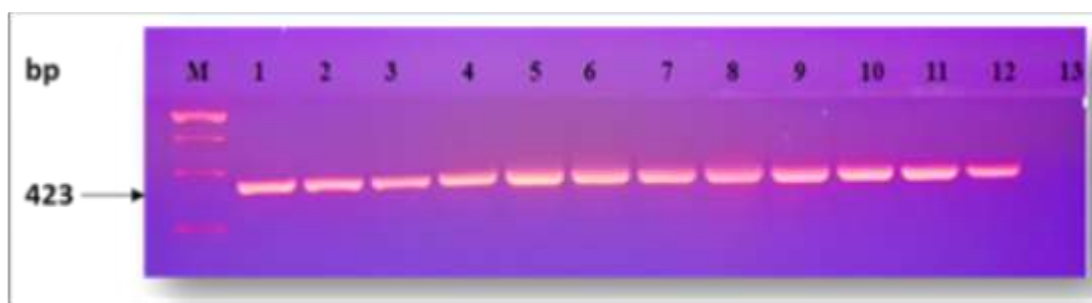
Ωστόσο, το Πρωτόκολλο 2, που αφορά σε εμπλουτισμό των θρεπτικών μέσων με ακετοσιριγκόνη και MES, οδήγησε σε σημαντική αύξηση της συχνότητας μετασχηματισμού με τη χρήση και των τριών βακτηριακών στελεχών. Ειδικότερα, το ποσοστό μετασχηματισμού ανήλθε στο 95 %, 56,60 % και 38,3 % για τα βακτηριακά στελέχη *R1000*, *Arqua* και *K599*, αντίστοιχα. Βάσει των ανωτέρω, είναι προφανής η υπεροχή του στελέχους *R1000* ως προς την ικανότητα σχηματισμού διαγονιδιακών ριζών στη φακή, ανεξάρτητα από την παρουσία ακετοσιριγκόνης και MES.

Συνολικά, τα ευρήματα αναδεικνύουν τον καθοριστικό ρόλο του βακτηριακού στελέχους, της σύνθεσης των υποστρωμάτων, αλλά και της συνδυασμένης επίδρασής τους στην αποτελεσματικότητα επαγωγής διαγονιδιακών ριζών στη φακή. Περαιτέρω τα ευρήματα, συνδυαστικά, καταδεικνύουν τόσο την υπεροχή του βακτηριακού στελέχους *R1000* όσο και του Πρωτοκόλου 2 αναφορικά με την ικανότητα επαγωγής διαγονιδιακών ριζών στη φακή.

3.4 Επαλήθευση της διαγονιδιακής φύσης των ριζικών τριχιδίων

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η διαγονιδιακή φύση των ριζών φακής, πραγματοποιήθηκε PCR για την ενίσχυση του γονιδίου *rolB2* καθώς και της αλληλουχίας *virCD*, με σκοπό τον έλεγχο της ενσωμάτωσης του T-DNA του *A. rhizogenes* στα φυτά φακής.

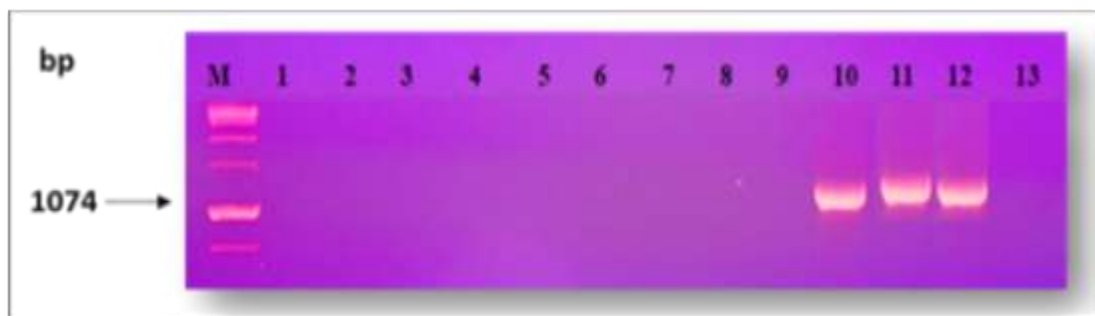
Η παρουσία του γονιδίου *rolB2* (423 bp) επιβεβαιώθηκε σε όλα τα δείγματα ριζών που εμβολιάστηκαν με τα βακτηριακά στελέχη *R1000*, *Arqua* και *K599*, επιβεβαιώνοντας τη διαγονιδιακή φύση των ριζικών τριχιδίων. Επιπλέον, όπως αναμενόταν, η παρουσία του γονιδίου *rolB2* επιβεβαιώθηκε στα βακτηριακά κύτταρα των 3 στελεχών του *A. rhizogenes*, ενώ αντίθετα δεν κατέστη εφικτή η ενίσχυση του γονιδίου *rolB2* στις ρίζες των φυτών αγρίου τύπου, τα οποία συμπεριλήφθηκαν ως μάρτυρες (Εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.4 Προϊόντα της PCR για τον έλεγχο της ένθεσης του γονιδίου *rolB2* και την επιβεβαίωση της επιτυχίας του μετασχηματισμού φυτών φακής. 1, 2, 3: μετασχηματισμένες ρίζες με το βακτηριακό στέλεχος *R1000*, που φέρουν το γονίδιο *rolB2*. 4, 5, 6: μετασχηματισμένες ρίζες με το βακτηριακό στέλεχος *K599*, που φέρουν το γονίδιο *rolB2*. 7, 8, 9: μετασχηματισμένες ρίζες με το βακτηριακό στέλεχος *Arqua*, που φέρουν το γονίδιο *rolB2*. 10, 11, 12: βακτηριακά κύτταρα από τα στελέχη *R1000*, *K599* και *Arqua* που φέρουν το γονίδιο *rolB2*. 13: δείγμα ριζών αγρίου τύπου, όπου διαπιστώνεται η απουσία του γονιδίου. DNA Ladder (FastGene 100bp DNA Ladder RTU, NIPPON Genetics Europe GmbH).

Αναφορικά με την περιοχή *virCD* του *A. rhizogenes*, δεν κατέστη εφικτή η ενίσχυσή του τόσο στα μετασχηματισμένα όσο και στα αγρίου τύπου φυτά. Αντίθετα, σημειώθηκε ενίσχυση της περιοχής *virCD*, όπως αναμενόταν, στα βακτηριακά κύτταρα του *A. rhizogenes*. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει την απουσία βακτηριακών

υπολειμμάτων στις ρίζες που αναπτύχθηκαν παρουσία σεφοταξίμης, επιβεβαιώνοντας ταυτόχρονα τη διαγονιδιακή φύση των ριζικών τριχιδίων που σχηματίστηκαν ως αποτέλεσμα του εμβολιασμού με τα βακτηριακά στελέχη του *A. rhizogenes* (Εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.5 Προϊόντα της PCR για τον έλεγχο της παρουσίας της περιοχής *virCD* του *A. rhizogenes* και την επιβεβαίωση της επιτυχίας του μετασχηματισμού φυτών φακής. 1, 2, 3: μετασχηματισμένες ρίζες με το βακτηριακό στέλεχος *R1000*, όπου αποδεικνύεται η απουσία της περιοχής *virCD*. 4, 5, 6: μετασχηματισμένων ρίζες με το βακτηριακό στέλεχος *K599*, όπου αποδεικνύεται η απουσία της περιοχής *virCD*. 7, 8, 9: μετασχηματισμένες ρίζες με το βακτηριακό στέλεχος *Arqua*, όπου αποδεικνύεται η απουσία της περιοχής *virCD*. 10, 11, 12: βακτηριακά κύτταρα των στελεχών *R1000*, *K599* και *Arqua* που φέρουν την περιοχή *virCD*. 13: δείγμα ριζών αγρίου τύπου, όπου διαπιστώνεται η απουσία της περιοχής *virCD*. DNA Ladder (FastGene 100bp DNA Ladder RTU, NIPPON Genetics Europe GmbH).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η βελτίωση φυτών είναι μια συνεχής διαδικασία, η οποία στοχεύει στη δημιουργία νέων χαρακτηριστικών (Louwaars *et al.*, 2012; Morgan and Funnell, 2018). Η κλασική βελτίωση, μέσω ενδο- και διειδικών διασταυρώσεων και διαφόρων σχημάτων επιλογής, αποτελεί την πλέον συνήθη και ευρέως χρησιμοποιούμενη προσέγγιση για την ανάπτυξη ποικιλιών με νέα χαρακτηριστικά (Kuligowska *et al.*, 2016). Παρά τα αναρίθμητα παραδείγματα επιτυχών βελτιωτικών διαδικασιών, η κλασική προσέγγιση παρουσιάζει αρκετούς περιορισμούς που σχετίζονται με τη χρονική επένδυση, τη διαθέσιμη γενετική παραλλακτικότητα αναφορικά με τα γνωρίσματα ενδιαφέροντος και τα ταξινομικά εμπόδια που περιορίζουν τις δυνατότες διεύρυνσης της γονιδιακής δεξαμενής (Horn, 2002; Long *et al.*, 2018). Εναλλακτικά, ο μετασχηματισμός διαμέσου του *Agrobacterium* μπορεί να συμβάλλει δραματικά στη διεύρυνση του γονιδιακού αποθέματος (Casanova *et al.*, 2005), επισύροντας ωστόσο προβλήματα που συνδέονται με την πρακτική αξιοποίηση των γενετικά τροποποιημένων φυτών ενόψει του νομοθετικού πλαισίου που ισχύει ιδιαιτέρως στην Ευρώπη (Gelvin, 2003).

Η φακή, όπως και άλλα είδη που ανήκουν στα ψυχανθή, αποτελεί προϊόν ιδιαίτερα υψηλής διατροφικής αξίας, του οποίου η ζήτηση αναμένεται να αυξηθεί μέσα στα επόμενα έτη (De Souza *et al.*, 2020). Παρά το γεγονός ότι ένας συνεχώς αυξανόμενος αριθμός μελετών καταδεικνύει τα πολυάριθμα οφέλη της κατανάλωσής της στην ανθρώπινη υγεία, η καλλιέργειά της, ειδικά στις αναπτυσσόμενες χώρες, δε συγκαταλέγεται στις πλέον ανταγωνιστικές και πραγματοποιείται ως επί το πλείστον σε υποβαθμισμένα εδάφη και συστήματα χαμηλών εισροών. Απόρροια των ανωτέρω είναι η μειωμένη απόδοση της καλλιέργειας φακής, η οποία εν μέρει αποδίδεται και στη δυσμενή επίδραση διαφόρων βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης (Portman *et al.*, 2020). Ταυτόχρονα, η στενή γενετική βάση της φακής, σε συνδυασμό με τους περιορισμούς που συνοδεύουν τις συμβατικές βελτιωτικές τεχνικές, θέτουν περαιτέρω φραγμούς στις δυνατότητες και προοπτικές βελτίωσής της για απόκτηση ανθεκτικότητας έναντι των κύριων βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων (Laskar *et al.*, 2019). Βάσει των ανωτέρω, είναι προφανής η δυνατότητα αναβάθμισης των βελτιωτικών διαδικασιών μέσω της ενσωμάτωσης των σύγχρονων βιοτεχνολογικών προσεγγίσεων, με έμφαση αυτών της γενετικής μηχανικής (Das, 2017).

Η γενετική τροποποίηση της φακής αντιμετωπίζει αρκετούς φραγμούς, οι όποιοι συνοψίζονται στην αδυναμία δημιουργίας ενός αξιόπιστου και άμεσα εφαρμόσιμου πρωτοκόλλου μετασχηματισμού που θα μπορούσε να αξιοποιηθεί για μελέτες σχετικά με την έκφραση και λειτουργία γονιδίων ενδιαφέροντος. Μέχρι στιγμής, ο μετασχηματισμός της φακής έχει επιτευχθεί μέσω της μεταφοράς γονιδίων με τη μεσολάβηση του *A. tumefaciens* (Barton *et al.*, 1997; Lurquin *et al.*, 1998; Khatib *et al.*, 2007; Akcay *et al.*, 2009; Khatib *et al.*, 2011; Das *et al.*, 2012; Chopra and Saini 2012; Zaker *et al.*, 2017; Das *et al.*, 2019) αλλά και με μεθόδους άμεσης μεταφοράς (Chowrira *et al.*, 1996; Oktem *et al.*, 1999; Gulati *et al.*, 2002; Mahmoudian *et al.*, 2002). Ωστόσο, τα μέχρι σήμερα ερευνητικά δεδομένα συνηγορούν στο συμπέρασμα ότι οι εν λόγω προσεγγίσεις παρεμποδίζονται από πρακτικά κωλύματα, συμπεριλαμβανομένου της επίπονης και χρονοβόρας φύσης τους και των δυσκολιών που ενέχουν οι διαδικασίες γενετικού μετασχηματισμού και αναγέννησης ολόκληρων φυτών, λόγω της δυστροπίας της φακής, με αποτέλεσμα η συχνότητα μετασχηματισμού να κυμαίνεται σε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα.

Προς παράκαμψη των ανωτέρω δυσχερειών, ελκυστική εναλλακτική αποτελεί ο γενετικός μετασχηματισμός με τη μεσολάβηση του *A. rhizogenes* για δημιουργία σύνθετων φυτών, αποτελούμενων από διαγονιδιακές ρίζες και υπέργειο μέρος άγριου τύπου. Η αποτελεσματικότητα της ταχείας επαγωγής διαγονιδιακών ριζών, που εκφράζουν διαγονίδια ενδιαφέροντος, έχει αποδειχθεί σε ένα ευρύ φάσμα ειδών που περιλαμβάνουν καλλιεργούμενα όσο και φυτά-μοντέλα. Στα ψυχανθή, η πρώτη μελέτη μετασχηματισμού με *A. rhizogenes* πραγματοποιήθηκε στο *Lotus corniculatus*, αποσκοπώντας στη δημιουργία ενός συστήματος για μελέτες σχηματισμού φυματίων (Petit *et al.*, 1987; Hansen *et al.*, 1989). Ακολούθως, η έρευνα επικεντρώθηκε στην ανάπτυξη πρωτοκόλλων μετασχηματισμού σε φυτά-μοντέλα, όπως το *Lotus japonicus* (Stiller *et al.*, 1997) και το *Medicago truncatula* (Boisson-Dernier *et al.*, 2001), περιλαμβάνοντας ωστόσο και είδη καλλιεργούμενων οσπρίων (Estrada-Navarrete *et al.*, 2006; Aggarwal *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2018; Leppyanen *et al.*, 2019).

Δεδομένης της έλλειψης πρωτοκόλλων γενετικού μετασχηματισμού της φακής γενικότερα, και ειδικότερα με τη χρήση του *A. rhizogenes*, στόχο της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου επαγωγής διαγονιδιακών ριζών, οι οποίες δύνανται να προσφέρουν τη βάση για διεξαγωγή μελετών σχετικών με τη βιολογία της ρίζας. Στο πλαίσιο βελτιστοποίησης της μεθόδου γενετικού

μετασχηματισμό της φακής, αξιολογήθηκαν τρία διαφορετικά βακτηριακά στελέχη του *A. rhizogenes*, τα *R1000*, *K599* και *Arqua*, και δύο πρωτόκολλα που διέφεραν ως προς τη σύσταση των θρεπτικών μέσων εμβολιασμού, συγκαλλιέργειας και επαγωγής ριζών.

Στο σύνολό τους, τα αποτελέσματα της μελέτης κατέδειξαν τη σημαντική επίδραση τόσο του βακτηριακού στελέχους όσο και της σύστασης των θρεπτικών υποστρωμάτων, καθώς και της συνδυασμένης δράσης τους, στην αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού στη φακή. Ειδικότερα, σημαντική ήταν η θετική επίδραση της ακετοσυρινγκόνης και του MES (*Πρωτόκολλο 2*) στη συχνότητα μετασχηματισμού, όπως προέκυψε από τον αυξημένο αριθμό φυτών που σχημάτισαν διαγονιδιακές ρίζες στην περιοχή του υποκοτύλου. Είναι επίσης αξιοσημείωτο ότι η αυξημένη συχνότητα μετασχηματισμού, λόγω της παρουσίας ακετοσυρινγκόνης / MES, ήταν καθολική και συνεπώς ανεξάρτητη από το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε. Η παρατηρηθείσα επαγωγή του μετασχηματισμού συνάδει με προηγούμενες αναφορές σχετικά με τη δράση της ακετοσυρινγκόνης ως μέσου ενίσχυσης της συχνότητας μετασχηματισμού και μείωσης του απαιτούμενου χρόνου για την εμφάνιση ριζικών τριχιδίων σε διάφορα φυτικά είδη (Kumar *et al.*, 2006; Ishida *et al.*, 2007; Beigmohammadi *et al.*, 2019). Η δράση της εν λόγω φαινόλης έχει αποδοθεί στην επαγωγή των γονιδίων *vir* και και την προαγωγή της μεταφοράς του Ri T-DNA στα φυτικά κύτταρα (Zhou *et al.*, 2011). Παρά τις πρόσφατες αναφορές σχετικά με αμελητέα συμβολή της ακετοσυρινγκόνης στη συχνότητα μετασχηματισμού της φακής με το βακτηριακό στέλεχος *KYRT1* του *A. tumefaciens* (Akcaay *et al.*, 2009), τα ευρήματα της παρούσας μελέτης καταδεικνύουν την αποτελεσματικότητά της στην αύξηση του ποσοστού μετασχηματισμού των εμβολιασμένων έκφυτων. Επιπλέον, η αυξημένη συχνότητα μετασχηματισμού μπορεί να αποδοθεί στη θετική επίδραση του MES, το οποίο λειτουργεί ως ρυθμιστικός παράγοντας που εξισορροπεί το pH των θρεπτικών υποστρωμάτων, ενισχύοντας έμμεσα την αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού που προκαλείται από *Agrobacterium* (Mano *et al.*, 2014).

Περαιτέρω, καθοριστική ως προς την επιτυχία του μετασχηματισμού ήταν και η επίδραση του βακτηριακού στελέχους που χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό των νεαρών φυτών φακής, όπως προέκυψε από τις διαφορές που σημειώθηκαν τόσο σε επίπεδο συχνότητας όσο και χρόνου έπτυξης των διαγονιδιακών ριζών. Ειδικότερα, το στέλεχος *R1000* αναδείχθηκε ως το πλέον αποτελεσματικό στην επαγωγή ριζικών

τριχιδίων, οδηγώντας σε ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά μετασχηματισμού (76,60 % και 95 % για τα Πρωτόκολλα 1 και 2, αντίστοιχα), συγκριτικά με τα αντίστοιχα για τα στελέχη *K599* και *Arqua* (10 % και 38,30 % / 0 % έως 56,70 % για τα Πρωτόκολλα 1 και 2, αντίστοιχα). Παρά τις διαφορές μεταξύ των διαφορετικών βακτηριακών στελεχών, αξίζει να σημειωθεί ότι το Πρωτόκολλο 2, που περιλάμβανε τον εμπλουτισμό των μέσων με ακετοσιρινόνη/MES, οδήγησε σε υψηλότερα ποσοστά μετασχηματισμού. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες αναφορές σχετικά με την ικανότητα των βακτηριακών στελεχών του *A. rhizogenes* για επαγωγή ριζικών τριχιδίων σε ψυχανθή. Συγκεκριμένα, το στέλεχος *K599* έχει αναδειχθεί ως ικανό να μετασχηματίσει τα είδη *Phaseolus vulgaris* (Estrada-Navarrete *et al.*, 2006), *Glycine max* (Mankin *et al.*, 2007) και *Cicer arietinum* (Aggarwal *et al.*, 2018), ενώ το στέλεχος *Arqua* έχει μετασχηματίσει επιτυχώς το *Medicago truncatula* (Mrosk *et al.*, 2009) και *Pisium sativum* (Leppyanen *et al.*, 2019). Τέλος, η υψηλή αποτελεσματικότητα του στελέχους *R1000* έχει αποδειχθεί σε ένα εύρος φυτικών ειδών (Stiller *et al.*, 1997; Tiwari *et al.*, 2007; Pavli and Skaracis 2010), η οποία μάλιστα αποδίδεται στην υψηλή εγγενή ικανότητα του πλασμιδίου Ri του *R1000* (Tao and Li, 2006; Thwe *et al.*, 2016) για μεταφορά του T-DNA στα κύτταρα ξενιστές κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μόλυνσης (Mariashibu *et al.*, 2013).

Παράλληλα, είναι αξιοσημείωτη η ύπαρξη σημαντικών διαφορών, σε φαινοτυπικό επίπεδο, μεταξύ των διαγονιδιακών και των ριζών αγρίου τύπου. Ειδικότερα, οι διαφορές αφορούσαν τόσο στη δομή όσο και στο ρυθμό ανάπτυξης των ριζών. Έτσι, τα μη-μετασχηματισμένα φυτά εμφάνισαν ριζικό σύστημα αγρίου τύπου, απαλλαγμένου από σχηματισμό ριζικών τριχιδίων, ενώ αντίθετα τα εμβολιασμένα εμφάνισαν μακριές προεκτάσεις ριζικών τριχιδίων στην εγγύτατη περιοχή του υποκοτύλου. Η διαγονιδιακή φύση των ριζικών τριχιδίων επιβεβαιώθηκε μέσω της επιτυχούς ένθεσης -διαμέσου μέσω του RiT-DNA- του γονιδίου *rol2B*, το οποίο διαδραματίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην επαγωγή ριζικών τριχιδίων (Desmet *et al.*, 2020). Το *A. rhizogenes* έχει την ικανότητα να μεταφέρει δύο ανεξάρτητα T-DNA, τα TL-DNA και TR-DNA, στο γονιδίωμα μολυσμένων φυτικών ιστών (Nilsson and Olsson 1997), με το πρώτο - που φέρει τα ORF 10 (*rolA*), ORF 11 (*rolB*), ORF 12 (*rolC*) και ORF (*rolD*) -να αποτελεί προϋπόθεση για τον σχηματισμό ριζικών τριχιδίων (Georgiev *et al.*, 2012). Τα ευρήματα αυτά, σε συνδυασμό με την ταυτόχρονη απουσία της περιοχής *virCD* του *A. rhizogenes* στα ριζικά τριχίδια των εμβολιασμένων φυτών, αποδεικνύουν τον επιτυχή

μετασχηματισμό και την αποτελεσματικότητα του εφαρμοζόμενου πρωτοκόλλου. Παρά το γεγονός ότι τα ριζικά τριχίδια δεν επιλέχθηκαν βάσει της πλέον χρησιμοποιούμενης επιλογής σε αντιβιοτικά, τα συνολικά ευρήματα της μελέτης προσφέρουν τη βάση για την περαιτέρω βελτίωση του πρωτοκόλλου με στόχο την ενίσχυση της αποτελεσματικότητάς του στην επαγωγή διαγονιδιακών ριζών στη φακή.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης υπογραμμίζουν την καταλληλότητα της χρήσης του *A. rhizogenes* για το γενετικό μετασχηματισμό και τη δημιουργία διαγονιδιακών ιστών φακής, παρά τη δυστροπία που παρουσιάζει το είδος ως προς τις διαδικασίες μετασχηματισμού και αναγέννησης ολόκληρων φυτών. Βάσει των συνολικών ευρημάτων της μελέτης, ως πλέον κατάλληλο για το μετασχηματισμό της φακής αναδείχθηκε το βακτηριακό στέλεχος *R1000* του *A. rhizogenes*, ενώ παράλληλα ιδιαίτερα θετική ήταν η επίδραση του εμπλουτισμού των θρεπτικών μέσων με ακετοσιρινόνη και MES.

Η ανάπτυξη διαγονιδιακών ριζών στη φακή θέτει τα θεμέλια για τη διεξαγωγή μελετών σχετικών με τη βιολογία της ρίζας, συμπεριλαμβανομένων αυτών που άπτονται του σχηματισμού φυματίων, καθώς και με τις αλληλεπιδράσεις ριζών με παθογόνα και αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης. Επιπλέον, η παρούσα προσέγγιση δημιουργίας διαγονιδιακών ιστών μπορεί να αξιοποιηθεί και σε πιο πρακτικές εφαρμογές, όπως η παραγωγή πολύτιμων δευτερογενών μεταβολιτών ή/και άλλων βιοδραστικών ουσιών. Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη εισάγει μία ελκυστική διαδικασία για τη δημιουργία διαγονιδιακών ριζών στη φακή παρακάμπτοντας τις μέχρι τώρα επίπονες και χαμηλής απόδοσης διαδικασίες σταθερού μετασχηματισμού.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη Βιβλιογραφία:

- Aarrouf, J., Castro-Quezada, P., Mallard, S., Caromel, B., Lizzi, Y., & Lefebvre, V. (2012). *Agrobacterium rhizogenes*-dependent production of transformed roots from foliar explants of pepper (*Capsicum annuum*): a new and efficient tool for functional analysis of genes. *Plant cell reports*, 31(2), 391-401.
- Aggarwal, P. R., Nag, P., Choudhary, P., Chakraborty, N., & Chakraborty, S. (2018). Genotype-independent *Agrobacterium rhizogenes*-mediated root transformation of chickpea: a rapid and efficient method for reverse genetics studies. *Plant methods*, 14(1), 1-13.
- Ahmad, M., Fautrier, A. G., McNeill, D. L., Hill, G. D., & Burritt, D. J. (1997). In vitro propagation of *Lens* species and their F1 interspecific hybrids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 47(2), 169-176.
- Akcay, U. C., Mahmoudian, M., Kamci, H., Yucel, M., & Oktem, H. A. (2009). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of a recalcitrant grain legume, lentil (*Lens culinaris* Medik). *Plant cell reports*, 28(3), 407-417.
- Ali, M., & Gupta, S. (2012). Carrying capacity of Indian agriculture: pulse crops. *Current Science*, 874-881.
- Amin, R., Laskar, R. A., & Khan, S. (2015). Assessment of genetic response and character association for yield and yield components in Lentil (*Lens culinaris* L.) population developed through chemical mutagenesis. *Cogent Food & Agriculture*, 1(1), 1000715.
- Asnake, F., & Bejiga, G. (2003, September). Breeding lentil for wider adaptation. In *Proceedings of the Workshop on food and forage legumes* (pp. 80-86)
- Bagheri, A., Ghasemi Omraan, V. O., & Hatefi, S. (2012). Indirect in vitro regeneration of lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Journal of Plant Molecular Breeding*, 1(1), 43-50.
- Bahramnejad, B., Najji, M., Bose, R., & Jha, S. (2019). A critical review on use of *Agrobacterium rhizogenes* and their associated binary vectors for plant transformation. *Biotechnology advances*, 37(7), 107405.
- Barker, D. G., Bianchi, S., Blondon, F., Dattée, Y., Duc, G., Essad, S., ... & Huguet, T. (1990). *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 8(1), 40-49.
- Barton, J., Klyne, A., Tennakon, D., Francis, C., & Hamblin, J. (1997). Development of a system for gene transfer to lentils. In *Proceedings of International Food Legume Research Conference III*.
- Barulina, H. (1930). Lentils of the USSR and other countries. Supplement 40 to the Bulletin of Applied Botany, Genetics and Plant Breeding, Leningrad, 265-304.
- English summary. Bayaa B, Erskine W (1998) Diseases of lentil. In 'The pathology of

food and pasture legumes'. (Eds DJ Allen, LM Lenné) pp. 423–472. (CAB International: Wallingford, UK)

Bayraç, A. T. (2004). *Optimization of a regeneration and transformation system for lentil (Lens culinaris M., cv. Sultan-I) cotyledonary petioles and epicotyls* (Doctoral dissertation, MSc Thesis Middle East Technical University).

Beigmohammadi, M., Sharafi, A., & Jafari, S. (2019). An optimized protocol for *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation of *Citrullus colocynthis*. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 6(3), 113-117.

Bermejo, C., Espósito, M. A., Cravero, V., Anido, F. L., & Cointry, E. (2012). In vitro plant regeneration from cotyledonary nodes of recombinant inbred lines of lentil. *Scientia horticultrae*, 134, 13-19.

Bermejo, C., Gatti, I., & Cointry, E. (2016). In vitro embryo culture to shorten the breeding cycle in lentil (*Lens culinaris* Medik). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 127(3), 585-590.

Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Bécard, G., Rosenberg, C., & Barker, D. G. (2001). *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(6), 695-700.

Bosselut, N., Van Ghelder, C., Claverie, M., Voisin, R., Onesto, J. P., Rosso, M. N., & Esmenjaud, D. (2011). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Prunus* as an alternative for gene functional analysis in hairy-roots and composite plants. *Plant cell reports*, 30(7), 1313.

Cao, D., Hou, W., Liu, W., Yao, W., Wu, C., Liu, X., & Han, T. (2011). Overexpression of TaNHX2 enhances salt tolerance of 'composite' and whole transgenic soybean plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 107(3), 541-552.

Cardarelli, M., Mariotti, D., Pomponi, M., Spano, L., Capone, I., & Costantino, P. (1987). *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype. *Molecular and General Genetics MGG*, 209(3), 475-480.

Casanova, E., Trillas, M. I., Moysset, L., & Vainstein, A. (2005). Influence of rol genes in floriculture. *Biotechnology Advances*, 23(1), 3-39.

Chen, L., Cai, Y., Liu, X., Guo, C., Sun, S., Wu, C., ... & Hou, W. (2018). Soybean hairy roots produced in vitro by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. *The Crop Journal*, 6(2), 162-171.

Chopra, R., & Saini, R. (2012). Use of sonication and vacuum infiltration for *Agrobacterium*-mediated transformation of an Indian lentil (*Lens culinaris* Medik.) cultivar. *Scientia horticultrae*, 143, 127-134.

Chowdhury, M. A., Andrahennadi, C. P., Slinkard, A. E., & Vandenberg, A. (2001). RAPD and SCAR markers for resistance to acochyta blight in lentil. *Euphytica*, 118(3), 331-337.

Chowrira, G. M., Akella, V., & Lurquin, P. F. (1995). Electroporation-mediated gene transfer into intact nodal meristems in planta. *Molecular biotechnology*, 3(1), 17-23.

- Chowrira, G. M., Akella, V., Fuerst, P. E., & Lurquin, P. F. (1996). Transgenic grain legumes obtained by in planta electroporation-mediated gene transfer. *Molecular Biotechnology*, 5(2), 85-96.
- Christey, M. C. (2001). Use of Ri-mediated transformation for production of transgenic plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37(6), 687-700.
- Christou, P. (1994). Application to plants. *Particle Bombardment Technology for Gene Transfer*, 71-99.
- Clemow, S. R., Clairmont, L., Madsen, L. H., & Guinel, F. C. (2011). Reproducible hairy root transformation and spot-inoculation methods to study root symbioses of pea. *Plant Methods*, 7(1), 46.
- Costantino, P., Spano, L., Pomponi, M., Benvenuto, E., & Ancora, G. (1984). The T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* is transmitted through meiosis to the progeny of hairy root plants. *Journal of molecular and applied genetics*, 2(5), 465-470.
- Cruz-Cruz, C. A., González-Arno, M. T., & Engelmann, F. (2013). Biotechnology and conservation of plant biodiversity. *Resources*, 2(2), 73-95.
- Das, S. K., Hoque, M. I., & Sarker, R. H. (2017). R. H. IN VITRO REGENERATION OF LENTIL (*LENS CULINARIS* MEDIK.) THROUGH CALLUS CULTURE.
- Das, S. K., Shethi, K. J., Hoque, M. I., & Sarker, R. H. (2012). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in lentil (*Lens culinaris* Medik.) followed by in vitro flowering and seed formation. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 22(1), 13-26.
- Das, S. K., Shethi, K. J., Hoque, M. I., & Sarker, R. H. (2019). *Agrobacterium*-mediated Genetic Transformation of Lentil (*Lens culinaris* Medik.) with Chitinase Gene followed by In vitro Flower and Pod Formation. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 29(1), 99-109.
- David, S., Mukandala, L., & Mafuru, J. (2002). Seed availability, an ignored factor in crop varietal adoption studies: a case study of beans in Tanzania. *Journal of Sustainable Agriculture*, 21(2), 5-20.
- De Souza, P. R. F., Souza, G. C. C., Pinto, J. V. F. A., Doria, A. C. O. C., Nascimento, L. M., Gomes, M. C., ... & Pessoa, R. S. (2020). Effect of Ozone Exposure on Water Uptake and Germination of Lentil (*Lens culinaris*) Seeds. *Ozone: Science & Engineering*, 1-12.
- Desmet, S., Dhooghe, E., De Keyser, E., Van Huylenbroeck, J., Müller, R., Geelen, D., & Lütken, H. (2020). Rhizogenic *agrobacteria* as an innovative tool for plant breeding: current achievements and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(6), 2435-2451.
- Dissanayake, R., Braich, S., Cogan, N. O., Smith, K., & Kaur, S. (2020). Characterization of Genetic and Allelic Diversity Amongst Cultivated and Wild Lentil Accessions for Germplasm Enhancement. *Frontiers in Genetics*, 11.
- Dogan, D. İ. L. E. K., Khawar, K. M., & Özcan, S. E. B. A. H. A. T. T. İ. N. (2005). *Agrobacterium* mediated tumor and hairy root formation from different explants of lentils derived from young seedlings. *International Journal of Agriculture and Biology*, 7, 1019-1025.

- Duran, Y., Fratini, R., Garcia, P., & De la Vega, M. P. (2004). An intersubspecific genetic map of Lens. *Theoretical and Applied Genetics*, 108(7), 1265-1273.
- Erskine, W., Ellis, R. H., Summerfield, R. J., Roberts, E. H., & Hussain, A. (1990). Characterization of responses to temperature and photoperiod for time to flowering in a world lentil collection. *Theoretical and Applied Genetics*, 80(2), 193-199.
- Erskine, W., Muehlbauer, F. J., & Short, R. W. (1990). Stages of development in lentil. *Experimental Agriculture*, 26(3), 297-302.
- Erskine, W., Saxena, N. P., & Saxena, M. C. (1993). Iron deficiency in lentil: yield loss and geographic distribution in a germplasm collection. *Plant and Soil*, 151(2), 249-254.
- Erskine, W., Hussain, A., Tahir, M., Bahksh, A., Ellis, R. H., Summerfield, R. J., & Roberts, E. H. (1994). Field evaluation of a model of photothermal flowering responses in a world lentil collection. *Theoretical and Applied Genetics*, 88(3-4), 423-428
- Erskine W, Chandra S, Chaudhury M et al (1998) A bottleneck in lentil: widening the genetic base in South Asia. *Euphytica* 101:207–211
- Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J. E., Díaz-Camino, C., Santana, O., Murillo, E., ... & Li, D. (2006). *Agrobacterium rhizogenes* transformation of the Phaseolus spp.: a tool for functional genomics. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(12), 1385-1393.
- Eujayl, I., Baum, M., Powell, W., Erskine, W., & Pehu, E. (1998). A genetic linkage map of lentil (*Lens sp.*) based on RAPD and AFLP markers using recombinant inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics*, 97(1-2), 83-89.
- Eujayl, I., Erskine, W., Bayaa, B., Baum, M., & Pehu, E. (1998). Fusarium vascular wilt in lentil: inheritance and identification of DNA markers for resistance. *Plant breeding*, 117(5), 497-499.
- FAO (2019) “FAOSTAT database” Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO (2009) “FAOSTAT database” Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO (2010) “FAOSTAT database” Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO (2011) “FAOSTAT database” Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D. B. S. M. A., & Basra, S. M. A. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. In *Sustainable agriculture* (pp. 153-188). Springer, Dordrecht.
- Fasoulas, A. C. (1981). Principles and methods of plant breeding. Publ. 11. *Arist. Univ., Thessaloniki*, 147.
- Fasoula, V. A., & Fasoula, D. A. (2002). Principles underlying genetic improvement for high and stable crop yield potential. *Field Crops Research*, 75(2-3), 191-209.

- FERGUSON, M. E., MAXTED, N., Van Slageren, M. I. C. H. A. E. L., & ROBERTSON, L. D. (2000). A re-assessment of the taxonomy of *Lens* Mill. (Leguminosae, Papilionoideae, Viciae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 133(1), 41-59.
- Fiala, J. V., Tullu, A., Banniza, S., Séguin-Swartz, G., & Vandenberg, A. (2009). Interspecies transfer of resistance to anthracnose in lentil (*Lens culinaris* Medic.). *Crop Science*, 49(3), 825-830.
- Ford, R., Pang, E. C. K., & Taylor, P. W. J. (1999). Genetics of resistance to ascochyta blight (*Ascochyta lentis*) of lentil and the identification of closely linked RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 98(1), 93-98.
- Ford, R., & Taylor, P. W. J. (2003). Construction of an intraspecific linkage map of lentil (*Lens culinaris* ssp. *culinaris*). *Theoretical and Applied Genetics*, 107(5), 910-916.
- Förster, W., & Neumann, E. (1989). Gene transfer by electroporation. In *Electroporation and electrofusion in cell biology* (pp. 299-318). Springer, Boston, MA.
- Gelvin, S. B. (2003). Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(1), 16-37.
- Georgiev, M. I., Agostini, E., Ludwig-Müller, J., & Xu, J. (2012). Genetically transformed roots: from plant disease to biotechnological resource. *Trends in biotechnology*, 30(10), 528-537.
- Grant, J. E., Cooper, P. A., Gilpin, B. J., Hoglund, S. J., Reader, J. K., Pither-Joyce, M. D., & Timmerman-Vaughan, G. M. (1998). Kanamycin is effective for selecting transformed peas. *Plant Science*, 139(2), 159-164.
- Gulati, A., Schryer, P., & McHughen, A. (2001). Regeneration and micrografting of lentil shoots. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37(6), 798.
- Gulati, A., Schryer, P., & McHughen, A. (2002). Production of fertile transgenic lentil (*Lens culinaris* Medik) plants using particle bombardment. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 38(4), 316.
- Gupta, D., Dadu, R. H., Sambasivam, P., Bar, I., Azad, M., Beera, N., ... & Biju, S. (2020). Conventional and Biotechnological Approaches for Targeted Trait Improvement in Lentil. In *Accelerated Plant Breeding, Volume 3* (pp. 67-107). Springer, Cham.
- Haddad, N. I., & Muehlbauer, F. J. (1981). Comparison of random bulk population and single-seed-descent methods for lentil breeding. *Euphytica*, 30(3), 643-651.
- Halbach, T., Kiesecker, H., Jacobsen, H. J., & DeKathen, A. (1998). Tissue culture and genetic engineering of lentil (*Lens culinaris* Medik.). In *3rd European Conference on Grain Legumes, Valladolid, Spain*.
- Hamwieh, A., Udupa, S. M., Choumane, W., Sarker, A., Dreyer, F., Jung, C., & 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(4), 669-677.
- Handberg, K., & Stougaard, J. (1992). Lotus japonicus, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *The Plant Journal*, 2(4), 487-496.
- Handberg, K., Stiller, J., Thykjær, T., & Stougaard, J. (1994). Transgenic plants: Agrobacterium-mediated transformation of the diploid legume Lotus japonicus. In *Cell Biology* (pp. 119-127). Academic Press.
- Hansen, J., Jørgensen, J. E., Stougaard, J., & Marcker, K. A. (1989). Hairy roots—a short cut to transgenic root nodules. *Plant Cell Reports*, 8(1), 12-15.
- Hashem, R. (2007). *Improvement of lentil (Lens culinaris Medik.) through genetic transformation* (Doctoral dissertation, Verlag nicht ermittelbar).
- Horn, W. (2002). Breeding methods and breeding research. In *Breeding for ornamentals: classical and molecular approaches* (pp. 47-83). Springer, Dordrecht.
- Jian, B., Hou, W., Wu, C., Liu, B., Liu, W., Song, S., ... & Han, T. (2009). Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of Superroot-derived Lotus corniculatus plants: a valuable tool for functional genomics. *BMC Plant Biology*, 9(1), 1-14.
- Jiang, Q., & Gresshoff, P. M. (1993). Lotus japonicus: A model plant for structure-function analysis in nodulation and nitrogen fixation. *Current Topics of Plant Molecular Biology*, 2, 97-110.
- Jiang, Q., & Gresshoff, P. M. (1997). Classical and molecular genetics of the model legume Lotus japonicus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10(1), 59-68.
- Ishida, Y., Hiei, Y. and Komari, T. (2007). Agrobacterium-mediated transformation of maize. *Nature Protocols*, 2, 1614-1621.
- Kahraman, A., Kusmenoglu, I., Aydin, N., Aydogan, A., Erskine, W., & Muehlbauer, F. J. (2004). QTL mapping of winter hardiness genes in lentil. *Crop Science*, 44(1), 13-22.
- Kargiotidou, A., Chatzivassiliou, E., Tzantarmas, C., Sinapidou, E., Papageorgiou, A., Skaracis, G. N., & Tokatlidis, I. S. (2014). Selection at ultra-low density identifies plants escaping virus infection and leads towards high-performing lentil. *Journal of Agricultural Science*, 152, 749-758.
- Khatib, F., Koudsieh, S., Ghazal, B., Barton, J. E., Tsujimoto, H., & Baum, M. (2007). Developing herbicide resistant lentil (*Lens culinaris* Medikus subsp. culinaris) through Agrobacterium-mediated transformation. *Arab Journal of Plant Protection*, 25(2), 185-192.
- Khatib, F., Makris, A., Yamaguchi-Shinozaki, K., Kumar, S., Sarker, A., Erskine, W., & Baum, M. (2011). Expression of the DREB1A gene in lentil (*Lens culinaris* Medik. subsp. culinaris) transformed with the Agrobacterium system. *Crop and Pasture Science*, 62(6), 488-495.

- Khazaei H, Caron CT, Fedoruk M, Diapari M, Vandenberg A, Coyne CJ, McGee R, Bett KE (2016) Genetic diversity of cultivated lentil (*Lens culinaris* Medik.) and its relation to the World's agro-ecological zones. *Front Plant Sci* 7:1093.
- Kodahl, N., Müller, R., & Lütken, H. (2016). The *Agrobacterium rhizogenes* oncogenes *rolB* and *ORF13* increase formation of generative shoots and induce dwarfism in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Science*, 252, 22-29.
- Kuligowska, K., Lütken, H., & Müller, R. (2016). Towards development of new ornamental plants: status and progress in wide hybridization. *Planta*, 244(1), 1-17.
- Kumar, R., Sharma, S. K., Luthra, O. P., & Sharma, S. (2005). Phenotypic stability of lentil genotypes under different environments. *Annals of Biology*, 21(2), 155.
- Kumar, V., Sharma, A., Narasimha Prasad, B. C., Bhaskar Gururaj, H., & Aswathanarayana Ravishankar, G. (2006). *Agrobacterium rhizogenes* mediated genetic transformation resulting in hairy root formation is enhanced by ultrasonication and acetosyringone treatment. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(4), 0-0.
- Ladizinsky, G. (1979). The genetics of several morphological traits in the lentil. *Journal of Heredity*, 70(2), 135-137.
- Laghetti, G., Piergiovanni, A. R., Sonnante, G., Lioi, L., & Pignone, D. (2008). The Italian lentil genetic resources: a worthy basic tool for breeders. *Eur J Plant Sci Biotechnol*, 2, 48-59.
- Lambert, C., & Tepfer, D. (1992). Use of *Agrobacterium rhizogenes* to create transgenic apple trees having an altered organogenic response to hormones. *Theoretical and Applied Genetics*, 85(1), 105-109.
- Laskar, R. A., Khan, S., Deb, C. R., Tomlekova, N., Wani, M. R., Raina, A., & Amin, R. (2019). Lentil (*Lens culinaris* Medik.) Diversity, Cytogenetics and Breeding. In *Advances in Plant Breeding Strategies: Legumes* (pp. 319-369). Springer, Cham.
- Leppyanen, I. V., Kirienko, A. N., & Dolgikh, E. A. (2019). *Agrobacterium rhizogenes*—mediated transformation of *Pisum sativum* L. roots as a tool for studying the mycorrhizal and root nodule symbioses. *PeerJ*, 7, e6552.
- Long, C., Chen, Z., Zhou, Y., & Long, B. (2018). The role of biodiversity and plant conservation for ornamental breeding. In *Ornamental Crops* (pp. 1-12). Springer, Cham.
- Louwaars N, Dons H, Van Overwalle G, Raven H, Arundel A, Eaton D, Nelis A (2012) Breeding business: plant breeder's rights and patent rights in the plant breeding business. In: *Improving Agricultural Knowledge and Innovation Systems: OECD Conference Proceedings*, OECD Publishing, Paris, pp 263–277.
- Lurquin, P. F., Cai, Z., Stiff, C. M., & Fuerst, E. P. (1998). Half-embryo cocultivation technique for estimating the susceptibility of pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* Medik.) cultivars to *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular biotechnology*, 9(2), 175-179.
- Maccarrone, M., Veldink, G. A., Agrò, A. F., & Vliegthart, J. F. (1995). Lentil root protoplasts: a transient expression system suitable for coelectroporation of

- monoclonal antibodies and plasmid molecules. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1243(1), 136-142.
- Mahmoudian, M., Yücel, M., & Öktem, H. A. (2002). Transformation of lentil (*Lens culinaris* M.) cotyledonary nodes by vacuum infiltration of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20(3), 251-257.
- Makkouk, K., Kumari, S., Sarker, A., & Erskine, W. (2001). Registration of six lentil germplasm lines with combined resistance to viruses. *Crop Science*, 41(3), 931-a.
- Malhotra, R. S., Sarker, A., & Saxena, M. C. (2004). Drought tolerance in chickpea and lentil—present status and future strategies. *Challenges and Strategies of Dryland Agriculture*, 32, 257-273.
- Mano, H., Fujii, T., Sumikawa, N., Hiwatashi, Y., & Hasebe, M. (2014). Development of an *Agrobacterium*-mediated stable transformation method for the sensitive plant *Mimosa pudica*. *Plos one*, 9(2), e88611.
- Mankin, S.L., Hill, D.S., Olhoft, P.M., Toren, E., Wenck, A.R., Nea, L., Xing, L., Brown, J.A., Fu, H., Ireland, L., Jia, H., Hillebrand, H., Jones, T. and Song, H.S. (2007). Disarming and sequencing of *Agrobacterium rhizogenes* strain K599 (NCPFB2659) plasmid pRi2659. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 6, 521-535.
- Mariashibu, T. S., Subramanyam, K., Arun, M., Mayavan, S., Rajesh, M., Theboral, J., ... & Ganapathi, A. (2013). Vacuum infiltration enhances the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in Indian soybean cultivars. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(1), 41-54.
- Mba, C. (2013). Induced mutations unleash the potentials of plant genetic resources for food and agriculture. *Agronomy*, 3(1), 200-231.
- Morgan E, Funnell K (2018) *Limonium*. In: Van Huylbroeck J (ed) *Ornamental Crops. Handbook of Plant Breeding*. Springer Cham, Switzerland, pp 513–52.
- Moriuchi, H., Okamoto, C., Nishihama, R., Yamashita, I., Machida, Y., & Tanaka, N. (2004). Nuclear localization and interaction of RolB with plant 14-3-3 proteins correlates with induction of adventitious roots by the oncogene rolB. *The Plant Journal*, 38(2), 260-275.
- Mrosk, C., Forner, S., Hause, G., Küster, H., Kopka, J., & Hause, B. (2009). Composite *Medicago truncatula* plants harbouring *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots reveal normal mycorrhization by *Glomus intraradices*. *Journal of experimental botany*, 60(13), 3797-3807.
- Muehlbauer, F. J. (1992). Use of Introduced Germplasm in Cool-Season Food Legume Cultivar Development. *Use of Plant Introductions in Cultivar Development Part 2*, 20, 49-73.
- Muehlbauer, F. J., Kaiser, W. J., Clement, S. L., & Summerfield, R. J. (1995). Production and breeding of lentil. *Advances in Agronomy* 54:283-332.
- Muehlbauer, F. J., Cho, S., Sarker, A., McPhee, K. E., Coyne, C. J., Rajesh, P. N., & Ford, R. (2006). Application of biotechnology in breeding lentil for resistance to biotic and abiotic stress. *Euphytica*, 147(1-2), 149-165.

- Muehlbauer, F. J., Mihov, M., Vandenberg, A., Tullu, A., & Materne, M. (2009). 10 Improvement in Developed Countries. *The Lentil*, 137.
- Musco, A., Calderaro, A., Papalia, T., Settineri, G., Mallamaci, C., & Panuccio, M. R. (2020). Soil salinity improves nutritional and health promoting compounds in three varieties of lentil (*Lens culinaris* Med.). *Food Bioscience*, 100571.
- Nasir, M. & Bretag, T. (1998). Screening lentil for Ascochyta blight resistance. *Annual Report, Centre for Legumes in Mediterranean Agriculture*, 14, 2-6.
- Naz, S., Kausar, H., Saleem, F., & Zafarullah, A. (2015). Characterization of abiotic stress genes from different species of eucalyptus. *Pakistan Journal of Botany*, 47(4), 1217-1223.
- Nilsson, O., & Olsson, O. (1997). Getting to the root: the role of the *Agrobacterium rhizogenes* rol genes in the formation of hairy roots. *Physiologia Plantarum*, 100(3), 463-473.
- Ninou, E., Papathanasiou, F., Vlachostergios, D. N., Mylonas, I., Kargiotidou, A., Pankou, C., ... & Tokatlidis, I. (2019). Intense breeding within lentil landraces for high-yielding pure lines sustained the seed quality characteristics. *Agriculture*, 9(8), 175.
- Oktem, H. A., Mahmoudian, M., & Yucel, M. (1999). GUS gene delivery and expression in lentil cotyledonary nodes using particle bombardment. *Lentil Experimental News Service*.
- Omran, V. G., Bagheri, A., & Moshtaghi, N. (2008). Direct in vitro regeneration of Lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Pak. J. Biol. Sci*, 11(18), 2237-2242.
- Ooms, G., Karp, A., Burrell, M. M., Twell, D., & Roberts, J. (1985). Genetic modification of potato development using Ri T-DNA. *Theoretical and applied genetics*, 70(4), 440-446.
- Pavli, O. I., & Skaracis, G. N. (2010). Fast and efficient genetic transformation of sugar beet by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nature Protocol Exchange Year published*. doi, 10.
- Petit, A., Stougaard, J., Kühle, A., Marcker, K. A., & Tempé, J. (1987). Transformation and regeneration of the legume *Lotus corniculatus*: a system for molecular studies of symbiotic nitrogen fixation. *Molecular and General Genetics MGG*, 207(2-3), 245-250.
- Polanco, M. C., Peláez, M. I., & Ruiz, M. L. (1988). Factors affecting callus and shoot formation from in vitro cultures of *Lens culinaris* Medik. *Plant cell, tissue and organ culture*, 15(2), 175-182.
- Polanco, M. C., & Ruiz, M. L. (2001). Factors that affect plant regeneration from in vitro culture of immature seeds in four lentil cultivars. *Plant cell, tissue and organ culture*, 66(2), 133.
- Portman, D., Dolgow, C., Maharjan, P., Cork, S., Blanchard, C., Naiker, M., & Panozzo, J. F. (2020). Frost-affected lentil (*Lens culinaris* M.) compositional changes through extrusion: Potential application for the food industry. *Cereal Chemistry*.

- Reddy, A., & Reddy, G. P. (2010). Supply side constrains in production of pulses in India: Case study of lentils. *Agricultural Economics Research Review*, 23, 129-136.
- Riker, A. J., Banfield, W. M., Wright, W. H., Keitt, G. W., & Sagen, H. E. (1930). Studies on infectious hairy root of nursery apple trees. *Journal of Agricultural Research*, 41(7).
- S Santos, C., Silva, B., MP Valente, L., Gruber, S., & W Vasconcelos, M. (2020). The Effect of Sprouting in Lentil (*Lens culinaris*) Nutritional and Microbiological Profile. *Foods*, 9(4), 400.
- Saha, S., Tullu, A., Yuan, H. Y., Lulsdorf, M. M., & Vandenberg, A. (2015). Improvement of embryo rescue technique using 4-chloroindole-3 acetic acid in combination with in vivo grafting to overcome barriers in lentil interspecific crosses. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 120(1), 109-116.
- Salunkhe, D. K., & Kadam, S. S. (1989). Handbook of world food legumes, nutritional chemistry, processing technology and utilization. Boca Raton, FL: CRC Press (pp. 23–144).
- Saricaoglu, F. T. (2020). Application of high-pressure homogenization (HPH) to modify functional, structural and rheological properties of lentil (*Lens culinaris*) proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 144, 760-769.
- Sarker, A., & Erskine, W. (2002). Lentil production in the traditional lentil world. In *Proceedings of Lentil Focus* (pp. 35-40).
- Sarker, R. H., Mustafa, B. M., Biswas, A., Nahar, M., Hashem, R., & Hoque, M. I. (2003). In vitro regeneration in lentil (*Lens culinaris* Medik.).
- Sarker, A., Erskine, W., & Saxena, M. C. (2004). Global perspective on lentil improvement. *Pulses in new perspective*. (Eds A Masood, B Singh, S Kumar, V Dhar) pp, 543-550.
- Sarker, A., Erskine, W., & Singh, M. (2005). Variation in shoot and root characteristics and their association with drought tolerance in lentil landraces. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52(1), 89-97.
- Sarker A., W. Erskine (2006) Recent progress in the ancient lentil. *Journal of Agricultural Science* 144; 1-11.
- Sarker, R. H., Das, S. K., & Hoque, M. I. (2012). In vitro flowering and seed formation in lentil (*Lens culinaris* Medik.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 48(5), 446-452.
- Saxena, P. K., & King, J. (1987). Morphogenesis in lentil: plant regeneration from callus cultures of *Lens culinaris* Medik. via somatic embryogenesis. *Plant Science*, 52(3), 223-227.
- Shaheen, N., Halima, O., Akhter, K. T., Nuzhat, N., Rao, R. S. P., Wilson, R. S., & Ahsan, N. (2019). Proteomic characterization of low molecular weight allergens and putative allergen proteins in lentil (*Lens culinaris*) cultivars of Bangladesh. *Food chemistry*, 297, 124936.

- Silim, S. N., Saxena, M. C., & Erskine, W. (1993). Adaptation of lentil to the Mediterranean environment. II. Response to moisture supply. *Experimental Agriculture*, 29(1), 21-28.
- Sinclair, T. R., & Vadez, V. (2012). The future of grain legumes in cropping systems. *Crop and Pasture Science*, 63(6), 501-512.
- Slinkard, A. E., Solh, M. B., & Vandenberg, A. (2000). Breeding for yield: the direct approach. In *Linking Research and Marketing Opportunities for Pulses in the 21st Century* (pp. 183-190). Springer, Dordrecht.
- Solanki, I. S., & Sharma, B. (2001). Early generation selection of polygenic mutations in lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Journal of Genetics and Plant Breeding (India)*.
- Solh, M., & Erskine, W. (1984). Genetic resources of lentils. In *Genetic Resources and Their Exploitation—Chickpeas, Faba beans and Lentils* (pp. 205-224). Springer, Dordrecht.
- Spena, A., Schmülling, T., Koncz, C., & Schell, J. S. (1987). Independent and synergistic activity of *rol A*, *B* and *C* loci in stimulating abnormal growth in plants. *The EMBO journal*, 6(13), 3891-3899.
- Srivastava, S. P., Bhandari, T. M. S., Yadav, C. R., Joshi, M., & Erskine, W. (2000). Boron deficiency in lentil: yield loss and geographic distribution in a germplasm collection. *Plant and Soil*, 219(1-2), 147-151.
- Stiller, J., Martirani, L., Tuppale, S., Chian, R. J., Chiurazzi, M., & Gresshoff, P. M. (1997). High frequency transformation and regeneration of transgenic plants in the model legume *Lotus japonicus*. *Journal of Experimental Botany*, 48(7), 1357-1365.
- Sultana, T., Majeed, N., Khan, F., REHMAN, A., & Naqvi, S. S. (2016). Direct regeneration and efficient in vitro root development studies in lentil (*Lens culinaris* Medik). *Pak. J. Bot*, 48(5), 1999-2004.
- Tahir, M., Simon, C. J., & Muehlbauer, F. J. (1993). Gene map of lentil: a review [*Lens culinaris*]. *Lentil Experimental News Service*.
- Tang, K. X., Liu, D. H., Wang, Y. L., Cui, L. J., Ren, W. W., & Sun, X. F. (2011). Overexpression of transcriptional factor ORCA3 increases the accumulation of catharanthine and vindoline in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58(3), 415-422.
- Tao J, Li L (2006) Genetic transformation of *Torenia fournieri* L. mediated by *Agrobacterium rhizogenes*. *South Afr J Bot* 72:211-216.
- Taylor, P. W. J., Lindbeck, K., Chen, W., & Ford, R. (2007). Lentil diseases. In 'Lentil: an ancient crop for the modern times'.(Eds SS Yadav, D Mcneil, PC Stevenson) pp. 291–313.
- Tepfer, D. (1984). Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell*, 37(3), 959-967.
- Thwe A, Valan Arasu M, Li X, Park CH, Kim SJ, Al-Dhabi NA, Park SU (2016) Effect of Different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and

phenylpropanoid biosynthesis in Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn). *Front Microbiol.* 7 :318.

Tivoli, B., Baranger, A., Avila, C. M., Banniza, S., Barbetti, M., Chen, W., ... & Sadiki, M. (2006). Screening techniques and sources of resistance to foliar diseases caused by major necrotrophic fungi in grain legumes. *Euphytica*, 147(1-2), 223-253.

Tiwari, R.K., Trivedi, M., Guang, Z.C., Guo, G.Q. and Zheng, G.C. (2007). Genetic transformation of *Gentiana macrophylla* with *Agrobacterium rhizogenes*: growth and production of secoiridoid glucoside gentiopicroside in transformed hairy root cultures. *Plant Cell Reports*, 26, 199-210.

Toker, C., Yadav, S. S., & Solanki, I. S. (2007). Mutation breeding. In *Lentil* (pp. 209-224). Springer, Dordrecht.

Trieu, A. T., Burleigh, S. H., Kardailsky, I. V., Maldonado-Mendoza, I. E., Versaw, W. K., Blaylock, L. A., ... & Harrison, M. J. (2000). Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium*. *The plant journal*, 22(6), 531-541.

Trovato, M., Maras, B., Linhares, F., & Costantino, P. (2001). The plant oncogene roID encodes a functional ornithine cyclodeaminase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(23), 13449-13453.

Tullu, A., Bett, K., Banniza, S., Vail, S., & Vandenberg, A. (2013). Widening the genetic base of cultivated lentil through hybridization of *Lens culinaris* 'Eston' and *L. ervoides* accession IG 72815. *Canadian Journal of Plant Science*, 93(6), 1037-1047.

Türk, Z. (2020). Effects of different harvesting times on protein content and mineral nutrient values of some lentil (*Lens culinaris*) cultivars seeds. *Journal of Plant Nutrition*, 43(4), 563-577.

Tyagi, M. C., & Sharma, B. (1981). Effect of photoperiod and vernalization on flowering and maturity in macrosperma lentils. *Pulse Crops Newsletter*, 1(2), 40-41.

Udvardi, M. K., Tabata, S., Parniske, M., & Stougaard, J. (2005). *Lotus japonicus*: legume research in the fast lane. *Trends in plant science*, 10(5), 222-228.

Van Oss, H., Aron, Y., & Ladizinsky, G. (1997). Chloroplast DNA variation and evolution in the genus *Lens* Mill. *Theoretical and Applied Genetics*, 94(3), 452-457.

Vlachostergios, D. N., Lithourgidis, A. S., & Roupakias, D. G. (2011). Effectiveness of single-plant selection at low density under organic environment: A field study with lentil. *Crop Science*, 51(1), 41-51.

Vlachostergios, D. N., & Roupakias, D. G. (2017). Screening under Low Plant Density Reinforces the Identification of Lentil Plants with Resistance to Fusarium Wilt. *Crop Science*, 57(3), 1285-1294.

Vlachostergios, D. N., Lithourgidis, A. S., Baxevanos, D. V., Mavromatis, A. G., Noulas, C. S., & Roupakias, D. G. (2018). Evaluation of lentil varieties and farming system effect on seed damage and yield loss due to bruchid (*Bruchus* spp.) infestation. *Crop and Pasture Science*, 69(4), 387-394.

- Warkentin, T. D., & McHughen, A. (1992). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated beta-glucuronidase (GUS) gene expression in lentil (*Lens culinaris* Medik.) tissues. *Plant Cell Reports*, 11(5-6), 274-278.
- Weeden, N. F., & Marx, G. A. (1987). Further genetic analysis and linkage relationships of isozyme loci in the pea: Confirmation of the diploid nature of the genome. *Journal of Heredity*, 78(3), 153-159.
- Wery, J., Silim, S. N., Knights, E. J., Malhotra, R. S., & Cousin, R. (1994). Screening techniques and sources of tolerance to extremes of moisture and air temperature in cool season food legumes. In *Expanding the Production and Use of Cool Season Food Legumes* (pp. 439-456). Springer, Dordrecht.
- White, F. F., Taylor, B. H., Huffman, G. A., Gordon, M. P., & Nester, E. W. (1985). Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of bacteriology*, 164(1), 33-44.
- Williams, J. T. (1974). Studies on lentils and their variation. I. The Taxonomy of the species. *Sabrao Journal*, 6, 133-145.
- Williams, D. J., & McHughen, A. (1986). Plant regeneration of the legume *Lens culinaris* Medik. (lentil) *in vitro*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 7(2), 149-153.
- Yau, S. K., & Erskine, W. (2000). Diversity of boron-toxicity tolerance in lentil growth and yield. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 47(1), 55-62.
- Yenish, J. P., Brand, J., Pala, M., & Haddad, A. (2009). Weed management. *The lentil: botany, production and uses*, 326-342.
- Zaker Tavallaie, F., Ghareyazie, B., Bagheri, A., & Sharma, K. K. (2017). Genetic transformation of Lentil (*Lens culinaris* M.) and production of transgenic fertile plants. *Iranian Journal Pulses Research*, 7(2), 215-229.
- Zhou ML, Zhu XM, Shao JR, Tang YX, Wu YM (2011) Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 90(4):1229-1239.
- Zohary, D. (1996). The mode of domestication of the founder crops of Southwest Asian agriculture. *The origins and spread of agriculture and pastoralism in Eurasia*, 142, 158.

Ελληνική Βιβλιογραφία:

- Βλαχοστέργιος, Δ. Ν. (2009). Μελέτη συστημάτων επιλογής ποικιλιών φακής (*Lens culinaris* Medik.) κατάλληλων στην οργανική γεωργία (No. GRI-2009-2461). Aristotle University of Thessaloniki.
- Γλερίδου, Α. Μ. (2014). *Ανάλυση της γενετικής παραλλακτικότητας σε εγχώριες ποικιλίες φακής (*Lens culinaris*) με μοριακούς και μορφολογικούς δείκτες* (No. GRI-2014-13086). Aristotle University of Thessaloniki.
- Θανόπουλος, Ρ., Σαμαράς, Σ., Γανίτης, Κ., Γκατζελάκη, Χ., Κόταλη, Ε., Ψαρρά, Ε., ... & Κοινοτικών, Δ. Τ. (2008). Τοπικές ποικιλίες καλλιεργούμενων ειδών στην

Κρήτη με έμφαση στα κηπευτικά: Ένα δυναμικό για πολλαπλή αξιοποίηση. Ένα δυναμικό για πολλαπλή αξιοποίηση.

Παπακόστα-Τασοπούλου, Δ. (2012). Ειδική Γεωργία Ι: Σιτηρά και ψυχανθή Εαρινά. *Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη, 760.*

Ρουπακιάς, Δ. (2016). Βελτίωση Φυτών. UNOVERSITY STUDIO PRESS, Θεσσαλονίκη.

Τσαυτάρης Α. Νιάνιου-Ομπεϊντάτ Ε. Πολύδωρος Α. (2012), Βελτίωση Φυτών, Σύγχρονη Παιδεία.

Τσαυτάρης Α. 1995. Βελτίωση Φυτών Αρχές και Μέθοδοι. Υπηρεσία Δημοσιευμάτων Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη.

Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία:

<http://faostat.fao.org/>

<https://www.prota4u.org/>

<https://www.sanbi.org/animal-of-the-week/rhizobium-rhizogenes/>

Συμβουλευτική Ομάδα Διεθνούς Γεωργικής Έρευνας (CGIAR):

<https://www.cgiar.org/>

<https://www.cgiar.org/research/center/icarda/>

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΚΤΗΝΟΤΡΟΦΙΚΩΝ ΦΥΤΩΝ:

<http://www.ipsw.gr/>

<https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US2019X00198>

USDA, National Nutrient Database for Standard Reference:

<https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/?query=lentil>