



Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος

Παραδοτέο Π.1.2.1: Μοριακά διαγνωστικά LAMP για την ανίχνευση φυτοπαθολογικών εχθρών – φυτοπαθογόνων

Πληροφορίες για το έγγραφο

Αριθμός παραδοτέου: **Π.1.2.1**

Ενότητα εργασίας: **ΕΕ1**

Επικεφαλής δικαιούχος: **ΙΤΕ**

Συγγραφείς: Ηλέκτρα Γκιζελή, Εμμανουήλ Μαρκάκης, Αλίκη Τζίμα, Γλυκερία Μέρμηγκα, Δημήτριος Γκούμας

Έκδοση: **1.2**

Είδος Παραδοτέου: **Έκθεση**

Ημερομηνία παράδοσης: **19/12/2025**

Στοιχεία Πράξης

Τίτλος: Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος

Τίτλος (EN): InnoPP-Innovations in Plant Protection for sustainable and environmentally friendly pest control

Κωδικός πράξης: TAEDR-0535675

Ακρωνύμιο έργου: InnoPP

Ημερομηνία έναρξης: 15 Μαΐου 2023

Διάρκεια: 31 Μήνες

Συντονιστής Φορέας: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Συντονιστής/ Επιστημονικός Υπεύθυνος: Ιωάννης Βόντας

Πίνακας Περιεχομένων

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ	4
2	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ	5
	A. ΒΑΚΤΗΡΙΑ <i>Clavibacter michiganensis</i> , <i>Acidovorax citrulli</i> ΣΦΑΛΜΑ! ΔΕΝ ΕΧΕΙ ΟΡΙΣΤΕΙ ΣΕΛΙΔΟΔΕΙΚΤΗΣ.	
	B. ΜΥΚΗΤΕΣ <i>B.CINEREA</i> , <i>V. DAHLIAE</i> , <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> F.SP. <i>RADICIS-CUCUMERINUM</i> , <i>P. INFESTANS</i>	15
	Γ. Μύκητας <i>Colletotrichum</i> spp.....	43
3	ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	50
4	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	51

Περίληψη του Έργου

Το έργο «Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος» στοχεύει στην ανάπτυξη σύγχρονων και καινοτόμων μεθόδων για την προστασία των καλλιεργειών όπως τα κηπευτικά, τα εσπεριδοειδή και το επιτραπέζιο σταφύλι. Περιλαμβάνει τη δημιουργία προηγμένων διαγνωστικών εργαλείων για την ανίχνευση εχθρών και παθογόνων με τεχνολογίες αιχμής, όπως ηλεκτρονικές παγίδες και βιοαισθητήρες, καθώς και πλατφόρμες αλληλούχισης για τον πλήρη προσδιορισμό των ιωμάτων. Επιπλέον, θα αναπτυχθούν μοντέλα πρόβλεψης επιδημιών και καινοτόμα βιοφυτοπροστατευτικά προϊόντα, τα οποία θα αξιολογηθούν για την ασφάλεια τους σε μη στόχους οργανισμούς. Τέλος, οι νέες τεχνολογίες θα ενσωματωθούν σε συστήματα ολοκληρωμένης διαχείρισης φυτοπροστασίας και θα δοκιμαστούν σε πραγματικές συνθήκες, ενώ θα αξιολογηθούν οι κοινωνικοοικονομικές και περιβαλλοντικές επιπτώσεις τους.

Σύνοψη της ΕΕ1

Στην ΕΕ1 θα αναπτυχθούν διαγνωστικά εργαλεία και μέθοδοι για την ανίχνευση, ταυτοποίηση και παρακολούθηση εχθρών και παθογόνων, περιλαμβάνοντας καινοτόμες προσεγγίσεις όπως βελτιωμένα συστήματα παρακολούθησης εντομολογικών εχθρών με σύγχρονες παγίδες και νέα ελκυστικά. Θα αναπτυχθούν σύγχρονα μοριακά διαγνωστικά εργαλεία, όπως η τεχνολογία LAMP και kit «Ready to Go Lyophilised pellets» για ποιοτική και ποσοτική ταυτοποίηση, καθώς και υπερευαίσθητες πλατφόρμες ακριβείας. Επιπλέον, θα χρησιμοποιηθούν τεχνολογίες τεχνητής νοημοσύνης και φασματικές τεχνικές για την αναγνώριση ζιζανίων και ασθενειών, ενώ βιοαισθητήρες θα χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων και ωχρατοξινών. Τέλος, θα αναπτυχθούν νέοι μοριακοί δείκτες ανθεκτικότητας και διαγνωστικά συστήματα για την αξιολόγηση της άμυνας των φυτών και της βιοδραστικότητάς τους.

Συνοπτική παρουσίαση του παραδοτέου 1.2.1

Αξιολογημένα με γνωστά δείγματα πρωτόκολλα εξαγωγής DNA/RNA και ανάπτυξη διαγνωστικών (πρωτόκολλα και "prototypes" μοριακής δοκιμής), σε μικροσυσκευή ενίσχυση του γενετικού υλικού LAMP και χρωμομετρικής ποιοτικής – ημιποσοτικής ανίχνευσης. Στο πλαίσιο του συγκεκριμένου παραδοτέου αυτής της δουλειάς χρησιμοποιούμε πρωτόκολλα εξαγωγής DNA/RNA και μέθοδο ενίσχυσης γενετικού υλικού σε συνδυασμό με φορητή συσκευή για την ανίχνευση φυτοπαθογόνων μυκήτων και βακτηρίων. Η αξιολόγηση της μεθόδου θα γίνει σε δείγματα τεχνητά μολυσμένων φυτών. Τα πρωτόκολλα εξαγωγής γενετικού υλικού, καθώς και η μέθοδος ενίσχυσης γενετικού υλικού LAMP (Loop mediated isothermal amplification) βασίζονται σε μεθόδους που έχουν ήδη αναπτυχθεί και αξιολογηθεί στο εργαστήριο του IMBB. Η μεθοδολογία θα εφαρμοστεί για την ανίχνευση των μυκήτων *Verticillium dahliae*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum f.sp. radicum-cucumerinum*, *Phytophthora infestans*, *Colletotrichum sp.* και όχι του μύκητα *Phoma tracheiphila* όπως είχε αρχικά προταθεί. Όσον αφορά τα βακτήρια, θα αναπτύξουμε μεθοδολογία για τα *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* και *Acidovorax citrulli*. Τα βακτήρια *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* και *Xanthomonas vesicatoria*, όπως και ο μύκητας *Phoma tracheiphila* δεν θα συμπεριληφθούν τελικά στην παρούσα εργασία, λόγω του ότι η ανίχνευση των παθογόνων αποδείχτηκε πιο χρονοβόρα απ' ότι αρχικά είχε υπολογιστεί και θεωρούμε ότι θα ήταν προτιμότερο να μειώσουμε τον αριθμό των στόχων, αλλά να παραδοθούν ολοκληρωμένα και αποτελεσματικά πρωτόκολλα για τους υπόλοιπους.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

Οι τρέχουσες μέθοδοι ανίχνευσης παθογόνων βασίζονται στον εντοπισμό συγκεκριμένων τμημάτων του DNA μέσω εργαστηριακών τεχνικών, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Ενώ η PCR είναι ευαίσθητη και αξιόπιστη μέθοδος, απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό και κατάλληλες εργαστηριακές συνθήκες. Η ισοθερμική ενίσχυση μέσω βρόχου (LAMP) είναι μια απλούστερη εναλλακτική που όμως έχει σημαντικούς περιορισμούς, όπως η ανάγκη για ακριβή οπτικά συστήματα ανίχνευσης φθορισμού για την ποσοτικοποίηση του παθογόνου. Στο πλαίσιο του έργου χρησιμοποιήθηκε μια καινοτόμος μέθοδος, η ποσοτική χρωματομετρική ισοθερμική ενίσχυση μέσω βρόχου (qcLAMP), που δεν υπόκειται σε αυτούς τους περιορισμούς. Προσφέρει δυνατότητα παράλληλης ανίχνευσης μέχρι και 6 δειγμάτων σε πραγματικό χρόνο, έχει μεγάλη ευελιξία ως προς τα είδη των υπό ανάλυση δειγμάτων και είναι πολύ οικονομική. Η μέθοδος είναι εύχρηστη και διαρκεί περίπου 30 λεπτά, θέτοντας νέα πρότυπα για τις μοριακές διαγνώσεις. Η χρήση σταθερής θερμοκρασίας για την αντίδραση LAMP, αντί για τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες που απαιτεί η PCR, απλοποιεί την κατασκευή της συσκευής. Συνολικά, η συσκευή αποτελείται από μια θήκη για 6 αντιδράσεις LAMP και από ηλεκτρονικά εξαρτήματα: την κύρια ηλεκτρονική πλακέτα, ένα Raspberry Pi Zero, μια μικρή κάμερα και έναν αισθητήρα θερμοκρασίας συνδεδεμένο σε θερμαντικό στοιχείο αντίστασης PCB. Για την παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο των αντιδράσεων LAMP συλλέγονται μη βαθμονομημένα στιγμιότυπα των 6 αντιδράσεων που περιέχουν το μείγμα LAMP μαζί με τη χρωστική κάθε 6 δευτερόλεπτα από μια κάμερα τοποθετημένη απέναντι από τις αντιδράσεις και κατά την εξαγωγή των κόκκινων, πράσινων και μπλε (RGB) pixel εμφανίζεται μια καμπύλη πραγματικού χρόνου στο tablet. Στον άξονα x εμφανίζεται η χρονική πορεία της αντίδρασης και στον άξονα y η αλλαγή χρώματος σε pixels. Μια αρνητική αντίδραση παράγει μια επίπεδη γραμμή παράλληλη στον άξονα x ενώ μια θετική αντίδραση παρουσιάζει μια αλλαγή στην κλίση της γραμμής, η οποία εμφανίζεται σε μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή που αναφέρεται ως ο χρόνος-προς-θετικό αποτέλεσμα. Ο χρόνος θετικού αποτελέσματος αντικατοπτρίζει το ποσό του αρχικού γενετικού υλικού αφού η αλλαγή της κλίσης σε πρώιμο χρονικό σημείο σχετίζεται με υψηλή συγκέντρωση του παθογόνου-στόχου ενώ η αλλαγή σε μεταγενέστερο σημείο υποδεικνύει μικρή ποσότητα παθογόνου στο αρχικό δείγμα. Η ικανότητα παρακολούθησης της αντίδρασης LAMP σε πραγματικό χρόνο που επιτρέπει την εφαρμογή ποσοτικής χρωματομετρικής LAMP (qcLAMP) με απλό και γρήγορο τρόπο καθιστά τη συσκευή κατάλληλη να λειτουργεί εκτός εργαστηριακού περιβάλλοντος.

2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

Α. Βακτήρια *Clavibacter michiganensis*, *Acidovorax citrulli*

2.1.1 Ανίχνευση του φυτοπαθογόνου *Clavibacter michiganensis* (Cm) με τη μεθοδολογία της LAMP χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω μεθοδολογία:

Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν: τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα στελέχη αναφοράς *C. michiganensis* CFBP4999^T, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (DC3000) και τα *C. michiganensis* (HMU 4521 και HMU4783), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (HMU8020) και *Bacillus* sp. (GL2) τα οποία προέρχονται από απομονώσεις του εργαστηρίου μας (ΕΒΕΦ, ΕΛΜΕΠΑ). Τα βακτήρια καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα NAG (Nutrient Agar Glucose) στους 26°C για διάστημα δύο ημερών.

Προετοιμασία αιωρημάτων με *C. michiganensis*: Για την προετοιμασία αιωρημάτων με το φυτοπαθογόνο αρχικά πραγματοποιήθηκε γραμμική ράβδωση των δύο στελεχών (HMU 4521 και HMU4783) από τα αντίστοιχα στοκ γλυκερόλης (15% β/ο) σε θρεπτικό υπόστρωμα NAG. Στη συνέχεια και αφού διαπιστώθηκε η ομοιομορφία των αποικιών, παρασκευάστηκε αιώρημα από το κάθε στέλεχος και μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα στα 600 nm (OD₆₀₀). Από κάθε αιώρημα παρασκευάστηκαν 2 ml βακτηριακού αιωρήματος με 0.2 OD. Τα αιωρήματα χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του μολύσματος σε περίπου 3*10⁶ CFU/ml.

Δημιουργία φυτικού υλικού σπορόφυτων τομάτας: Για τη δημιουργία φυτικού υλικού, σπορόφυτα τομάτας της ποικιλίας «Ελπίδα» που χορηγήθηκαν από την εταιρία Agris, μεταφυτεύτηκαν σε γλάστρες με φυτόχωμα και αναπτύχθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης στους 25°C με φωτοπερίοδο 16 ωρών. Τα φυτά ποτίζονταν σε τακτά χρονικά διαστήματα. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν και οι παρακάτω ποικιλίες τομάτας Lobello, Kalloni, Ekstasi, Lesvos, Christina, Nissos και Aethra.

Μόλυνση φυτών τομάτας με το Cm. Τα φυτά τομάτας μολύνθηκαν με το φυτοπαθογόνο βακτήριο Cm με τη δημιουργία μιας μικρής οπής στον βλαστό των φυτών ακριβώς κάτω από τις κοτυληδόνες. Στη συνέχεια, στην οπή τοποθετήθηκαν 10 μl από το αιώρημα του φυτοπαθογόνου.

Προετοιμασία δειγμάτων για LAMP από φυτικούς ιστούς: Για την πραγματοποίηση της δειγματοληψίας, έγινε μία εγκάρσια τομή στα φυτά τομάτας περίπου 2-3 cm πάνω από το σημείο μόλυνσης και αφαιρέθηκε από τον βλαστό ένας λεπτός δακτύλιος μήκους περίπου 3 mm. Το φυτικό δείγμα τοποθετήθηκε σε διάλυμα ομογενοποίησης (TPS buffer: 100 mM Tris-HCl, 1 M KCl, 10mM, EDTA, pH 8) και έγινε εκχύμωση του περιεχομένου με μια πλαστική ράβδο (pestle). Ακολούθησε μια 1:5 αραιώση σε 80 μl απιονισμένου νερού (dH₂O). Από την αραιώση αυτή λήφθηκαν 2 μl που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση της LAMP. Επιπλέον των παραπάνω, το αρχικό εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε για επίστρωση σε ημι-εκελεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα μετά την πραγματοποίηση κατάλληλων αραιώσεων.

Συνθήκες αντίδρασης LAMP: Για την ανάπτυξη της διαγνωστικής αντίδρασης LAMP χρησιμοποιήθηκε ως αλληλουχία-στόχος η περιοχή *micA* (*michiganin A*) του παθογόνου, καθώς σύμφωνα με τους Yasuhara-Bell et al (Yasuhara-Bell et al. 2013) η περιοχή αυτή είναι εξαιρετικά ειδική για το *C. michiganensis*. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με τη χρήση του προγράμματος σχεδιασμού εκκινητών LAMP (PrimerExplorer) που βρίσκεται στο Eiken Chemical Co., Ltd. (Τόκιο) (<http://primerexplorer.jp/e/>) και παρατίθενται στον Πίνακα 1.2.1-1. Η αντίδραση LAMP διεξήχθη με τη χρήση της φορητής πλατφόρμας PEBBLE-R qLAMP και μίγματος με το ένζυμο από τον ίδιο πάροχο (BioRx-T, Ηράκλειο Κρήτης, Ελλάδα). Η αντίδραση LAMP είχε τελικό όγκο 25 μl και περιείχε 1x από το 10x συμπυκνωμένο μίγμα εκκινητών (CmF3 2 μM, CmB3 2 μM, CmFIP 18 μM, CmBIP 18 μM, CmLF 5 μM, CmLB 5 μM), 1x από το Universal Master mix (BioRx-T, cat.no: 000054) και 2 μl υποστρώματος. Για να αποφευχθεί η εξάτμιση στη συσκευή Pebble, προστέθηκαν 15 μl ορυκτέλαιο (περιλαμβάνεται στο kit BioRx-T) σε κάθε αντίδραση. Οι αντιδράσεις επώαστηκαν στους 65°C για 30 λεπτά. Όλες οι αντιδράσεις LAMP εκτελέστηκαν στην πλατφόρμα PEBBLE-R qLAMP. Για την ενίσχυση και την παρακολούθησή της σε πραγματικό

χρόνο, η συσκευή θερμαίνει τα δείγματα στην κατάλληλη θερμοκρασία, ενώ απεικονίζει την αλλαγή του χρώματος μέσω φωτισμού LED και μιας κάμερας.

Πίνακας 1.2.1-1. Εκκινήτες της αντίδρασης LAMP για την ανίχνευση του *C. michiganensis*

Όνομα εκκινήτη	Αλληλουχία (5'-3')
CmF3	CCATGCGCGACAACAGG
CmB3	ACATGTACGGGCTCACGA
CmFIP	GGCTGACCATGACGGGGGTCAACACAGGTGGAACAC GATG
CmBIP	CGGTGGGACATGCTGCTCGACTCCGCGTCGATCTGG
CmLF	TCCGTCTCGAGGATGTCGTT
CmLB	GGGCGAGGACACCAGCCCGT

2.1.2 Ανίχνευση του φυτοπαθογόνου *Acidovorax citrulli* (Ac) με τη μεθοδολογία της LAMP χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω μεθοδολογία:

Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν: Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν είναι το *A. citrulli* (HMU50810), *A. citrulli* (Group I, M6), το *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (HMU31000), *P. syringae* pv. *lachrymas* (HMU7035) και το *Bacillus* sp. (GL5) τα οποία προέρχονται από απομονώσεις του εργαστηρίου μας (ΕΒΕΦ, ΕΛΜΕΠΑ), καθώς και το *Pectobacterium brasiliense* (HMU3758). Τα βακτήρια καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα NAG (Nutrient Agar Glucose) στους 26°C για διάστημα δύο ημερών.

Προετοιμασία αιωρημάτων με *A. citrulli*. Για την προετοιμασία αιωρημάτων με το φυτοπαθογόνο αρχικά πραγματοποιήθηκε γραμμική ράβδωση του στελέχους HMU50810 από το αντίστοιχο στοκ γλυκερόλης (15% β/ο) σε θρεπτικό υπόστρωμα NAG (Nutrient Agar Glucose) (23 g L-1, NaCl 8 g L-1, glucose g L-1). Στη συνέχεια και αφού διαπιστώθηκε η ομοιομορφία των αποικιών το βακτήριο επιστρώθηκε σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα NAG και αναπτύχθηκε στους 26 °C για 4 ημέρες. Παρασκευάστηκε αιώρημα από το βακτήριο και μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα στα 600 nm (OD₆₀₀). Από κάθε αιώρημα παρασκευάστηκαν 100 ml βακτηριακού αιωρήματος σε 10 mM MgCl₂ με συγκέντρωση 10⁸ CFU/ml. Τα αιωρήματα χρησιμοποιήθηκαν για την μόλυνση των σπόρων καρπουζιάς (βλ. παρακάτω). Επιπλέον, και προκειμένου να υπολογιστεί επακριβώς η συγκέντρωση του βακτηριακού αιωρήματος, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις οι οποίες απλώθηκαν σε θρεπτικό NAG και επώαστηκαν σε θάλαμο στους 26°C για διάστημα τριών ημερών. Στη συνέχεια έγινε καταμέτρηση των αποικιών σε κάθε μία από τις επαναλήψεις και υπολογίστηκε η συγκέντρωση του αρχικού αιωρήματος.

Δημιουργία αιωρημάτων με Ac σε ρυθμιστικό διάλυμα ή σε διάλυμα από έκπλυση σπόρων. Δημιουργήθηκαν αιωρήματα του Ac σε ρυθμιστικό διάλυμα TPS διαφορετικής συγκέντρωσης με το φυτοπαθογόνο (10⁴-10⁶ CFU/ml). Επιπλέον, υγιείς σπόροι καρπουζιάς αφέθηκαν με ανακίνηση για 40 λεπτά σε διάλυμα TPS (10 ml TPS/ 5 gr σπόρων). Λήφθηκε ποσότητα του εκπλύματος το οποίο επιμολύνθηκε με διαφορετικές συγκεντρώσεις του βακτηρίου (10⁴-10⁶ CFU/ml). Τέλος, πραγματοποιήθηκε αραιώση 1:5 σε dH₂O το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα στις αντιδράσεις LAMP. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε και έκπλυμα σπόρων χωρίς την επιμόλυνση με το βακτήριο.

Επιμόλυνση σπόρων καρπουζιάς. Για τη δημιουργία φυτικού υλικού χρησιμοποιήθηκαν σπόροι καρπουζιού (*Citrullus lanatus*) της ποικιλίας «CELINE F1» (Hm.CLAUSE, Lot # I36328), οι οποίοι χορηγήθηκαν από την εταιρία Agris. Οι σπόροι αρχικά εμβαπίστηκαν σε 40 ml βακτηριακού αιωρήματος σε σωλήνες τύπου φάλκον 50 ml και επώαστηκαν στους 4 °C για 24. Μετά την επώαση των σπόρων στο αιώρημα, ο σωλήνας με τους βυθισμένους σπόρους στο αιώρημα τοποθετήθηκε σε ειδική συσκευή αντλίας κενού (Millipore) όπου εφαρμόστηκε υποπίεση -80 kPa για 5 λεπτά. Ο σωλήνας ανακινήθηκε και η διαδικασία επαναλήφθηκε για άλλα 5 min. Στη συνέχεια το βακτηριακό αιώρημα απομακρύνθηκε και οι σπόροι τοποθετήθηκαν σε

αποστειρωμένο χαρτί Whatman για 15 min ώστε να απορροφηθεί η περίσσεια του αιωρήματος. Πενήντα από τους μολυσμένους σπόρους χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση του μολύσματος εσωτερικά και εξωτερικά των σπόρων.

Δημιουργία μολυσμένων δειγμάτων σπόρων. Για την ανίχνευση του φυτοπαθογόνου σε σπόρους δημιουργήθηκαν τα παρακάτω δείγματα: 0% μολυσμένοι σπόροι, 1%, 5%, 10%, 25%, 50% και 100%. Συγκεκριμένα, υπήρχαν συνολικά 100 σπόροι/ φαλκον με την αναλογία μολυσμένων – υγιών να διαφέρει ανάλογα με την μεταχείριση. Στη συνέχεια, τα φάλκον ζυγίστηκαν ώστε να τοποθετείται η ίδια αναλογία TPS/ gr σπόρων (10 ml TPS/ 5 gr σπόρων) και ανακινούνταν για 40 λεπτά. Στη συνέχεια από κάθε δείγμα λήφθηκαν 200 μλ.. Ακολούθησε αραιώση 1: 5 που χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για την αντίδραση LAMP.

Δημιουργία φυτικού υλικού. Οι μολυσμένοι με Ac σπόροι τοποθετήθηκαν σε τρυβλία (15 σπόροι / τρυβλίο) στα οποία υπήρχε χαρτί εμποτισμένο με νερό και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης στους 25°C με φωτοπερίοδο 16 ωρών. Μόλις εκπύχθηκε το βλαστίδιο ξεκίνησαν οι δειγματοληπτικοί έλεγχοι. Σε όλη την διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν και αρνητικοί μάρτυρες ελέγχου. Αυτοί αποτελούνταν από σπόρους που μεταχειρίστηκαν με διάλυμα 1xPBS απουσία μολύσματος.

Συνθήκες αντίδρασης LAMP: Για την ανάπτυξη της διαγνωστικής αντίδρασης LAMP χρησιμοποιήθηκε ως αλληλουχία-στόχος μέρος του γονιδίου NON-RIBOSOMAL PEPTIDE SYNTHETASE (NRPS) (locus tag: Aave_4658) του παθογόνου. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με τη χρήση του προγράμματος σχεδιασμού εκκινητών LAMP (PrimerExplorer) που βρίσκεται στο Eiken Chemical Co., Ltd. (Τόκιο) (<http://primerexplorer.jp/e/>) και παρατίθενται στον **Πίνακα 1.2.1-2**. Η αντίδραση LAMP διεξήχθη με τη χρήση της φορητής πλατφόρμας PEBBLE-R qCLAMP και μίγματος με το ένζυμο από τον ίδιο πάροχο (BIOPIX-T, Ηράκλειο Κρήτης, Ελλάδα). Η αντίδραση LAMP είχε τελικό όγκο 25 μl και περιείχε 1x από το 10x συμπυκνωμένο μίγμα εκκινητών (AcF3 2 μM, AcB3 2 μM, AcFIP 18 μM, AcBIP 18 μM, AcLF 5 μM), 1x από το Universal Master mix (Biorix-T, cat.no: 000054) και 2 μl υποστρώματος. Για να αποφευχθεί η εξάτμιση στη συσκευή Pebble, προστέθηκαν 15 μl ορυκτέλαιο (περιλαμβάνεται στο kit Biorix-T) σε κάθε αντίδραση. Οι αντιδράσεις επώαστηκαν στους 65°C για 30 λεπτά. Όλες οι αντιδράσεις LAMP εκτελέστηκαν στην πλατφόρμα PEBBLE-R qCLAMP. Για την ενίσχυση και την παρακολούθησή της σε πραγματικό χρόνο, η συσκευή θερμαίνει τα δείγματα στην κατάλληλη θερμοκρασία, ενώ απεικονίζει την αλλαγή του χρώματος μέσω φωτισμού LED και μιας κάμερας.

Πίνακας 1.2.1-2. Εκκινητές της αντίδρασης LAMP για την ανίχνευση του *A. citrulli*

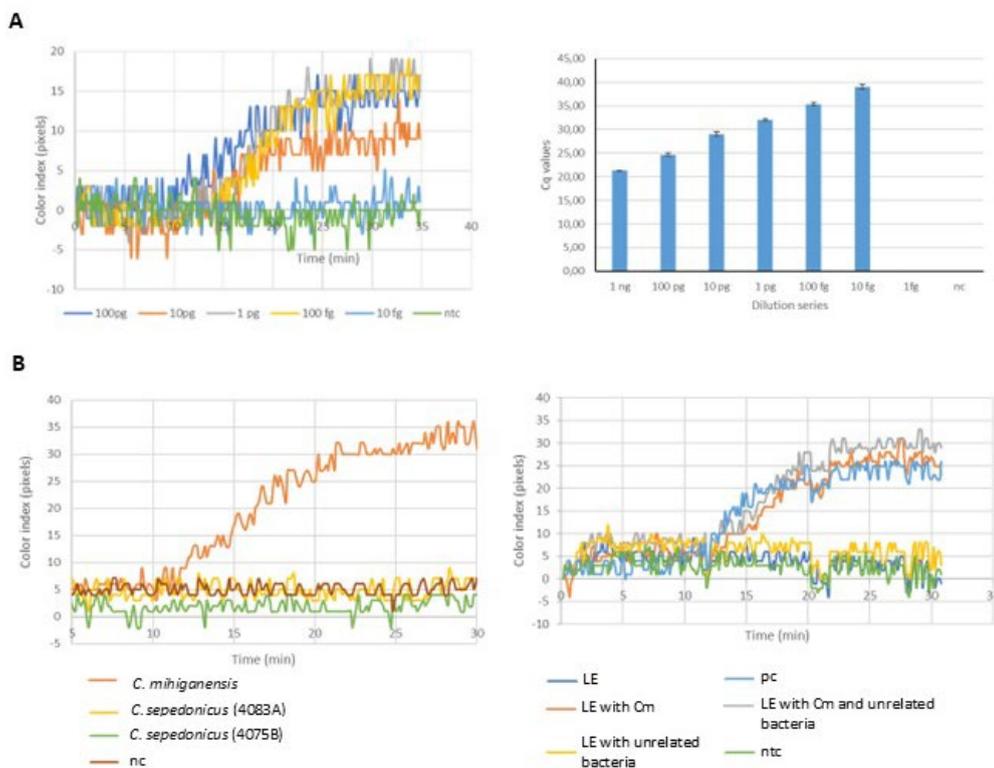
Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία (5'–3')
AcF3	GGTACGGGCTGGAATCCA
AcB3	CGAGGGCACGAGTGGGA
AcFIP	AGCAGCGGCCAGAAGAACTCCCGCGTGCTGCAGAAG AC
AcBIP	GCGCAACGCTCGTGATCGCTGAGGTCCGCCAGGTAC
AcLF	CGAGACTCGAAGCTCGAAGGT

2.1 Αποτελέσματα Συζήτηση

2.2.1 Αποτελέσματα πειραμάτων που αφορούν την ανίχνευση του φυτοπαθογόνου *C. michiganensis* (Cm) με τη μεθοδολογία της LAMP

Ευαισθησία και εξειδίκευση μεθόδου: Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση του Cm με αντίδραση LAMP σχεδιάστηκαν έναντι του γονιδίου *micA* με βάση προηγούμενη μελέτη των Yasuhara-Bell et al (Yasuhara-Bell et al. 2013). Αρχικά, το όριο ανίχνευσης της αναπτυχθείσας δοκιμασίας LAMP με τη φορητή συσκευή BIOPIX-T/ μείγμα

ενζύμων (από εδώ και πέρα θα αναφέρεται ως CmLAMP) προσδιορίστηκε με τη δοκιμή σειριακών αραιώσεων από εξαγόμενο βακτηριακό DNA. Οι ίδιες σειρές αραιώσεων χρησιμοποιήθηκαν επίσης για την εκτέλεση της qPCR. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1.2.1-1A** (αριστερός πίνακας), η χαμηλότερη ποσότητα DNA που βρέθηκε σταθερά θετική με τη χρήση της LAMP ήταν 100 fg ανά αντίδραση, ενώ το όριο ανίχνευσης αυξήθηκε κατά μία τάξη μεγέθους όταν αξιολογήθηκε με qPCR (10 fg/αντίδραση) (**Εικόνα 1.2.1-1A**, δεξιός πίνακας). Η εξειδίκευση της LAMP δοκιμάστηκε με τη χρήση DNA από Cm και δύο απομονώσεις του *C. sepedonicus* (**Εικόνα 1.2.1-1B**, αριστερό πλαίσιο) ή βακτηριακών αιωρημάτων από Cm και διαφορετικά είδη βακτηρίων που απαντώνται συνήθως σε φυτά τομάτας (*X. campestris* pv. *vesicatoria*, *Xcv*, *P. syringae* pv. *tomato*, *Pst* και ένα βακτήριο που ανήκει στο είδος *Bacillus*, GL2, της συλλογής μας που απομονώθηκε από φυτά τομάτας) (**Εικόνα 1.2.1-1B**, δεξιός πίνακας). Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 1.2.1-1B**, σε όλες τις περιπτώσεις θετικά αποτελέσματα προέκυψαν μόνο σε δείγματα που περιείχαν Cm, ενώ η παρουσία μη συγγενών βακτηρίων δεν είχε καμία επίδραση στην ανίχνευση του Cm στο δείγμα (Εικόνα 1.2.1-1Γ).



Εικόνα 1.2.1-1. Μελέτη της ευαισθησίας της LAMP σε σχέση με την qPCR (**A**) και της εξειδίκευσής της (**B**). **A.** Η ευαισθησία της μεθόδου προσδιορίστηκε με σειριακές αραιώσεις (100 pg – 10 fg) του DNA που εξήχθη από Cm (αριστερό τμήμα) και συγκρίθηκε με την qPCR (δεξί τμήμα). Όπως φαίνεται στην Εικόνα A, το LoD όταν το DNA χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα αντιστοιχεί σε 100 fg/αντίδραση για τη LAMP και 10 fg/αντίδραση για την qPCR. **B.** Η εξειδίκευση της CmLAMP μελετήθηκε με DNA προερχόμενο από το *C. sepedonicus* (αριστερά) και βακτηριακού αιωρήματος τριών βακτηρίων από άλλα γένη. (*X. campestris* pv. *vesicatoria*, *Xcv*, *P. syringae* pv. *tomato*, *Pst* και ενός βακίλου, GL2) (δεξί τμήμα). Και στις δύο περιπτώσεις καταγράφηκαν θετικά αποτελέσματα μόνο όταν χρησιμοποιήθηκαν υποστρώματα που περιείχαν Cm.

Αξιολόγηση του ορίου ανίχνευσης της CmLAMP

Δεδομένου ότι η ανάπτυξη αυτής της φορητής δοκιμασίας CmLAMP αποσκοπεί στον εντοπισμό Cm σε φυτικούς ιστούς, αλλά με ελάχιστη επεξεργασία του δείγματος, επιδιώξαμε να

συγκρίνουμε το όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LoD) μεταξύ φυτικών εκχυλισμάτων από σπορόφυτα τομάτας και απλού ρυθμιστικού διαλύματος ομογενοποίησης, επιμολυσμένα με διαφορετικές συγκεντρώσεις Cm (10^6 - 10^4 CFU/ml). Σε όλες τις περιπτώσεις τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν χωρίς εκχύλιση DNA αλλά απευθείας με αραιώση 1:5 σε νερό. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παρουσία φυτικών εκχυλισμάτων επηρέασε αρνητικά το LoD κατά μια τάξη μεγέθους (**Πίνακας 1.2.1-3**). Αναλυτικότερα, το ελάχιστο βακτηριακό φορτίο που μπορούσε να ανιχνευθεί σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε Cm ήταν 10^4 CFU/ml, ενώ στα δείγματα που περιείχαν φυτικά εκχυλίσματα το LoD αντιστοιχούσε σε 10^5 CFU/ml. Επιπλέον, διαπιστώσαμε ότι η αύξηση της ποσότητας του φυτικού ιστού στο εκχύλισμα είχε αρνητική επίδραση στην ανίχνευση του παθογόνου (**Πίνακας 1.2.1-4**). Τα δείγματα που ήταν πυκνότερα σε φυτικά εκχυλίσματα εμφανίστηκαν ως αρνητικά στην ανάλυση CmLAMP, κάτι που μπορούσε να ξεπεραστεί με την αύξηση του συντελεστή αραιώσης του δείγματος σε νερό στο 1/25. Μετά από αυτή την αύξηση της αραιώσης του δείγματος, η δοκιμασία CmLAMP μπορούσε και πάλι να ανιχνεύσει το παθογόνο σε συγκέντρωση 10^5 CFU/ml (**Πίνακας 5**). Έτσι, η αύξηση της ποσότητας φυτικού ιστού στο διάλυμα ομογενοποίησης δεν βελτιώνει το LoD, επειδή η περίσσεια των φυτικών μεταβολιτών παρεμποδίζει την ενζυμική διαδικασία, με αποτέλεσμα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα στη δοκιμασία LAMP.

Πίνακας 1.2.1-3. Σύγκριση του LoD της CmLAMP μεταξύ ρυθμιστικού διαλύματος αιωρήματος Cm και φυτικών εκχυλισμάτων που έχουν επιμολυνθεί με Cm. Παρατηρήθηκε καλύτερη LoD όταν χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα αιωρήματα του βακτηρίου σε ρυθμιστικό διάλυμα.

Μεταχείριση	Αριθμός επαναλήψεων	Μέσος όρος χρόνου εμφάνισης σήματος	SD
Φυτικά εκχυλίσματα με 10^6 CFU/ML	4	15,5	0,5
Φυτικά εκχυλίσματα με 10^5 CFU/ML	4	20,5	0,5
Φυτικά εκχυλίσματα με 10^4 CFU/ML	4	nd*	
Βακτηριακά αιωρήματα με 10^6 CFU/ml	4	15,4	0,1
Βακτηριακά αιωρήματα με 10^5 CFU/ml	4	18,15	1,15
Βακτηριακά αιωρήματα με 10^4 CFU/ml	4	23,95	0,45
Αρνητικός μάρτυρας (dH ₂ O)	6	nd	
Θετικός μάρτυρας (gDNA του Cm)	6	12,5	0,38

*nd= not detected

Πίνακας 1.2.1-4. Δυσμενείς επιπτώσεις στην ανίχνευση Cm με LAMP όταν χρησιμοποιείται αυξημένη ποσότητα φυτικού ιστού (5x) για την προετοιμασία των δειγμάτων. Χρησιμοποιήθηκε 5x περισσότερος φυτικός ιστός (0,5 gr/ml ρυθμιστικού διαλύματος εναιωρήματος) για την προετοιμασία των δειγμάτων με αποτέλεσμα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Όταν τα δείγματα αραιώθηκαν πέντε φορές επιπλέον (1/25 συνολικά), η ανίχνευση του Cm επιβεβαιώθηκε.

Μεταχείριση	Αριθμός επαναλήψεων	Μέσος όρος χρόνου εμφάνισης σήματος	sd
Φυτικά εκχυλίσματα με 10^6 CFU/ml	4	16,5	1,5
Φυτικά εκχυλίσματα με 10^5 CFU/ml	4	nd**	

Φυτικά εκχυλίσματα με 10^4 CFU/ml	4	nd	
Επιπλέον αραιώση φυτικών εκχυλισμάτων με 10^6 CFU/ml	4	14,7	0,5
Επιπλέον αραιώση φυτικών εκχυλισμάτων με 10^5 CFU/ml	4	19,3	0,8
Επιπλέον αραιώση φυτικών εκχυλισμάτων με 10^4 CFU/ml	4	nd	
Αρνητικός μάρτυρας (??)	4	nd	
Αρνητικός μάρτυρας (dH ₂ O)	4	12,7	0,28
Θετικός μάρτυρας (gDNA του Cm)			

*nd= not detected,

Αξιολόγηση της επίδρασης φυτικών εκχυλισμάτων από διαφορετικές ποικιλίες τομάτας. Στη γεωργία, καλλιεργούνται διάφορες ποικιλίες τομάτας με βάση τις προτιμήσεις των αγροτών/καταναλωτών. Ωστόσο, κάθε μία από αυτές μπορεί να έχει ένα μοναδικό μεταβολικό προφίλ, το οποίο ενδεχομένως να εμποδίζει ενζυμικές αντιδράσεις που ακολουθούν, όπως η δοκιμή LAMP. Για να επικυρώσουμε την αποτελεσματικότητα της CmLAMP στην ανίχνευση του Cm ανεξάρτητα από τη χρησιμοποιούμενη ποικιλία τομάτας, εξετάσαμε οκτώ εμπορικές ποικιλίες τομάτας που χρησιμοποιούνται τοπικά: Lobello, Kalloni, Ekstasi, Lesvos, Elpida, Christina, Nissos, Aethra. Οι βλαστοί των σποροφύτων τομάτας χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των φυτικών εκχυλισμάτων και επιμολύνθηκαν με την ίδια συγκέντρωση βακτηρίων Cm (10^5 CFU/ml). Μετά από την κατάλληλη αραιώση 1/5 του ενισχυμένου εκχυλίσματος σε νερό, τα δείγματα χρησίμευσαν ως πρότυπα στη δοκιμασία CmLAMP. Το Cm ταυτοποιήθηκε αποτελεσματικά ανεξάρτητα από την ποικιλία τομάτας που αναλύθηκε (**Πίνακας 1.2.1-5**), γεγονός που υποδηλώνει ότι ανεξάρτητα από την υπό εξέταση ποικιλία τομάτας, η μέθοδος CmLAMP θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση του Cm.

Πίνακας 1.2.1-5. Η ανίχνευση του Cm με τη CmLAMP ήταν αποτελεσματική ανεξάρτητα από τις ποικιλίες τομάτας που χρησιμοποιήθηκαν για τη δοκιμασία. Οκτώ διαφορετικές εμπορικές ποικιλίες χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της Cm-LAMP. Όλα τα δείγματα φυτών επιμολύνθηκαν με την ίδια συγκέντρωση Cm (10^5 CFU/ml).

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΣΕ	Ποικιλίες τομάτας	Μέσος όρος χρόνου εμφάνισης σήματος
ΜΟΛΥΣΜΕΝΑ ΦΥΤΑ	Lobello	17,5
	Kalloni	15,7
	Ekstasis	16,5
	Lesvos	17,3
	Elpida	18,7
	Christina	16
	Nissos	14,7
	Aethra	14,5
ΥΓΙΑ ΦΥΤΑ	Lobello	nd*
	Kalloni	nd
	Ekstasis Control	nd
	Lesvos	nd
	Elpida	nd
	Christina	nd
	Nissos	nd

	Aethra	nd
Θετικός μάρτυρας (gDNA του Cm)		12,7

*nd= not detected

Αξιολόγηση της ανίχνευσης Cm σε τεχνητώς μολυσμένα φυτά τομάτας με Cm. Η CmLAMP αξιολογήθηκε σε φυτά τομάτας που μολύνθηκαν τεχνητά με Cm, με τα δείγματα να λαμβάνονται σε διαφορετικές χρονικές στιγμές από την ημέρα μόλυνσης (4, 7 και 12 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, dpi). Σε κάθε περίπτωση, τα φυτικά εκχυλίσματα παρασκευάστηκαν από τον ιστό του στελέχους 3 cm πάνω από το σημείο του εμβολιασμού και μετά την κατάλληλη αραιώση 1/5. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκαν τα φυτικά εκχυλίσματα για την αξιολόγηση του βακτηριακού πληθυσμού. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 1.2.1-6, όταν ο βακτηριακός πληθυσμός στα φυτικά εκχυλίσματα ήταν χαμηλότερος από το LoD, το παθογόνο δεν μπορούσε να ανιχνευθεί. Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις, ακόμη και 4 dpi, η δοκιμασία CmLAMP μπορούσε εύκολα να ανιχνεύσει το παθογόνο, παρόλο που τα φυτά ήταν ακόμη ασυμπτωματικά.

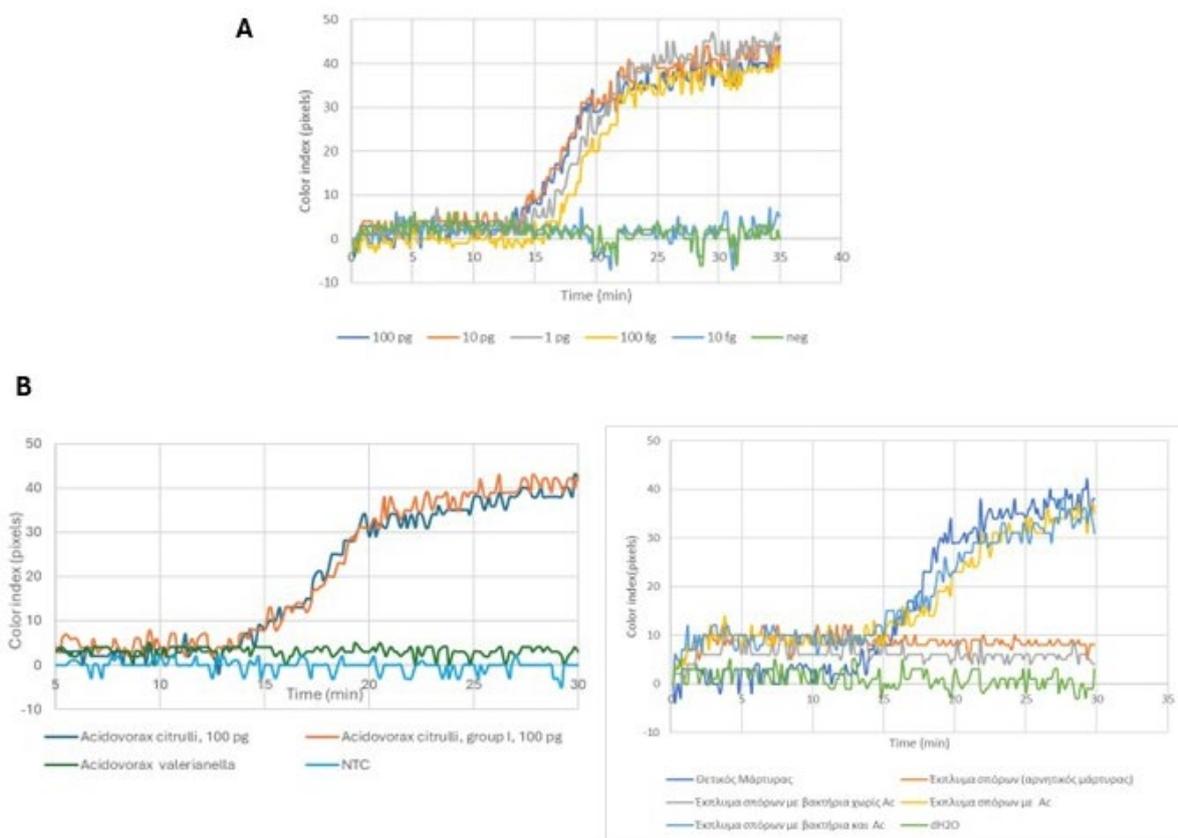
Πίνακας 1.2.1-6. Ανίχνευση Cm σε τεχνητώς μολυσμένα φυτά τομάτας. Τα στελέχη φυταρίων τομάτας που μολύνθηκαν τεχνητά με Cm χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση του παθογόνου με τη CmLAMP. Ο πίνακας παρουσιάζει το αποτέλεσμα της μεθοδολογίας σε κάθε περίπτωση και τον αντίστοιχο αριθμό κυττάρων στο δείγμα και στην αντίδραση.

dpi	Ονομασία δείγματος	Αριθμός Φυτών	Χρόνος Ανίχνευσης	CFU/ml δείγματος	Αριθμός κυττάρων στην αντίδραση
4	Φυτικά εκχυλίσματα από υγιή φυτά	1	nd*	0	0
		2	nd	0	0
		3	nd	0	0
		4	nd	0	0
	Φυτικά εκχυλίσματα από μολυσμένα φυτά	1	nd	133	0
		2	14,2	7,3E+07	2,93E+04
		3	14,8	4,47E+06	1,79E+03
		4	nd	1,73E+04	6,93E+00
7	Φυτικά εκχυλίσματα από υγιή φυτά	1	nd	0	0
		2	nd	0	0
		3	nd	0	0
		4	nd	0	0
	Φυτικά εκχυλίσματα από μολυσμένα φυτά	1	n/d	0	0
		2	nd	0	0
		3	12,8	6E+07	2,40E+04
		4	12,5	3,1+07	1,25E+04
12	Φυτικά εκχυλίσματα από υγιή φυτά	1	nd	0	0
		2	nd	0	0
		3	nd	0	0
		4	nd	0	0
	Φυτικά εκχυλίσματα από μολυσμένα φυτά	1	15,3	5,1E+06	2,15E+03
		2	13,7	5,1+07	2,05E+04
		3	13,3	5,5+07	2,21E+04
	Θετικός μάρτυρας (gDNA του Cm)		12.5		

*nd= not detected

2.2.2 Αποτελέσματα πειραμάτων που αφορούν την ανίχνευση του φυτοπαθογόνου *A. citrulli* (Ac) με τη μεθοδολογία της LAMP

Ευαισθησία και εξειδίκευση μεθόδου: Οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση του Ac με αντίδραση LAMP σχεδιάστηκαν έναντι του NRPS. Αρχικά, το όριο ανίχνευσης της αναπτυχθείσας δοκιμασίας LAMP με τη φορητή συσκευή BIOPIX-T/ μείγμα ενζύμων (από εδώ και πέρα θα αναφέρεται ως AcLAMP) προσδιορίστηκε με τη δοκιμή σειριακών αραιώσεων από εξαγόμενο βακτηριακό DNA. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1.2.1-2A**, η χαμηλότερη ποσότητα DNA που βρέθηκε θετική με τη χρήση της LAMP ήταν 100 fg ανά αντίδραση. Η εξειδίκευση της LAMP δοκιμάστηκε με τη χρήση DNA από το Ac, του *A. valerianella* και του *A. citrulli* που ανήκει στην ομάδα I (Group I) (**Εικόνα 1.2.1-2B**, αριστερό πλαίσιο). Επιπλέον, η εξειδίκευση μελετήθηκε με τη χρήση εκπλυμάτων από σπόρους καρπουζιού τα οποία επιμολύνθηκαν με Ac ή με διαφορετικά είδη βακτηρίων που απαντώνται συνήθως σε σπόρους καρπουζιού (*P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *lachrymans*, *Pectobacterium brasiliense* και ένας βάκιλος GL5) (**Εικόνα 1.2.1-2B**, δεξιός πίνακας). Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 1.2.1-2**, σε όλες τις περιπτώσεις θετικά αποτελέσματα προέκυψαν μόνο σε δείγματα που περιείχαν Ac, ενώ η παρουσία μη συγγενών βακτηρίων δεν είχε καμία επίδραση στην ανίχνευση του Ac στο δείγμα.



Εικόνα 1.2.1-2. Μελέτη της ευαισθησίας της LAMP (A) και της εξειδίκευσής της (B). Η ευαισθησία της μεθόδου προσδιορίστηκε με σειριακές αραιώσεις (100 pg – 10 fg) του DNA που εξήχθη από Ac (αριστερό τμήμα). Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1.2.1-2A**, το LoD όταν το DNA χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα αντιστοιχεί σε 100 fg/αντίδραση για τη LAMP. **B**, η εξειδίκευση της AcLAMP μελετήθηκε με DNA προερχόμενο από το *A. valerianella* και το *A. citrulli* που ανήκει στην ομάδα I (Group I) (αριστερά) και τριών βακτηρίων από άλλα γένη. (*P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *lachrymans*, *Pectobacterium brasiliense* και ένας βάκιλος GL5) τα οποία επιμόλυναν εκπλύματα από σπόρους καρπουζιού (δεξιό τμήμα). Και στις δύο περιπτώσεις καταγράφηκαν θετικά αποτελέσματα μόνο όταν χρησιμοποιήθηκαν υποστρώματα που περιείχαν

Ac.

Αξιολόγηση του ορίου ανίχνευσης της AcLAMP

Δεδομένου ότι η ανάπτυξη αυτής της φορητής δοκιμασίας AcLAMP αποσκοπεί στον εντοπισμό Ac σε φυτικούς ιστούς, αλλά με ελάχιστη επεξεργασία του δείγματος, επιδιώξαμε να συγκρίνουμε το όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LoD) μεταξύ εκπλυμάτων από σπόρους καρπουζιού και απλού ρυθμιστικού διαλύματος ομογενοποίησης, εμπλουτισμένα με διαφορετικές συγκεντρώσεις Ac (10^6 - 10^4 CFU/ml). Σε όλες τις περιπτώσεις τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν χωρίς εκχύλιση DNA αλλά απευθείας με αρραίωση 1:5 σε νερό. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παρουσία εκπλυμάτων σπόρων επηρέασε αρνητικά το LoD κατά μια τάξη μεγέθους (**Πίνακας 1.2.1-7**). Αναλυτικότερα, το ελάχιστο βακτηριακό φορτίο που μπορούσε να ανιχνευθεί σε όλες τις περιπτώσεις ήταν 10^5 CFU/ml.

Πίνακας 1.2.1-7. Σύγκριση του LoD της AcLAMP σε διάφορες συγκεντρώσεις του βακτηρίου μέσα σε εκχύλισμα από σπόρους καρπουζιού ή σε ρυθμιστικού διάλυμα ομογενοποίησης.

Όνομασία δείγματος	Αριθμός δειγμάτων v	Μέσος όρος εμφάνισης σήματος σε λεπτά (TA)	CFU/ml εκχυλίσματος	Αριθμός κυττάρων v στην αντίδραση
Έκπλυμα από σπόρους καρπουζιού 10^7	4	17,75 ($\pm 1,7$)	1,5E+07	6,1E+03
Έκπλυμα από σπόρους καρπουζιού 10^6	4	19,65 (± 1)	1,8E+06	7,0E+02
Έκπλυμα από σπόρους καρπουζιού 10^5	4	21,875 ($\pm 2,6$)	1,2E+06	6,3E+01
Έκπλυμα από σπόρους καρπουζιού 10^4	4	nd*	2,3E+04	9,2E+00
Έκπλυμα από σπόρους καρπουζιού (αρνητικός μάρτυρας)	4	nd		
Αιώρημα σε ΡΔμ με 10^6 Ac	2	16,1 ($\pm 0,4$)	2,7E+06	1,1E+03
Αιώρημα σε ΡΔμ με 10^4 Ac	2	21,75 ($\pm 0,05$)	2,9E+05	1,2E+02
Αιώρημα σε ΡΔμ με 10^4 Ac	2		3,0E+04	1,2E+01
Θετικός μάρτυρας (gDNA)	10	13,82 ($\pm 0,4$)		
Αρνητικός μάρτυρας (dH ₂ O)	10	nd		

*nd= not detected

Εύρεση του ποσοστού μολυσμένων σπόρων που μπορούν να ανιχνευτούν

Προκειμένου να μελετηθεί το ποσοστό του ορίου ανίχνευσης σε εκπλύματα από σπόρους καρπουζιού, αρχικά σπόροι καρπουζιάς μολύνθηκαν με Ac και στη συνέχεια δημιουργήθηκαν διαφορετικά ποσοστά μολυσμένων σπόρων (0, 1, 5, 10, 25, 50 και 100 %). Από τα πειράματα αυτά που συνοψίζονται στον **Πίνακα 1.2.1-8**, βρέθηκε ότι το ελάχιστο ποσοστό ανίχνευσης του φυτοπαθογόνου Ac με την AcLAMP σε μολυσμένους σπόρους ήταν 1%.

Πίνακας 1.2.1-8. Σύγκριση του LoD της AcLAMP σε διάφορες συγκεντρώσεις του βακτηρίου μέσα σε εκχύλισμα από σπόρους καρπουζιού ή σε ρυθμιστικού διάλυμα ομογενοποίησης (ΡΔμ).

Ποσοστό % μολυσμένων σπόρων	Αριθμός δειγμάτων	Μέσος όρος εμφάνισης σήματος σε λεπτά (TA)	CFU/ml εκχυλίσματος	Αριθμός κυττάρων στην αντίδραση
0	4	nd*		

1	4	20,6 (±0,6)	0,6	6,0E+03
5	4	19,5 (±1,9)	1,9	2,2E+05
10	4	17 (±0,7)	0,7	2,7E+06
25	4	15,7 (±0,3)	0,3	5,3E+06
50	4	15,7 (±0,9)	0,9	2,7E+06
100	4	14,2 (±0,6)	0,6	3,5E+07
Θετικός μάρτυρας (gDNA)	8	12,1 (±0,1)	0,1	
Αρνητικός μάρτυρας (dH2O)	8	nd		

*nd= not detected

B. Μύκητες *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*, *Verticillium dahliae*, *Phytophthora infestans*

1. Προσδιορισμός ευαισθησίας μεθόδων PCR, qPCR και qCLAMP

Για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας των μεθόδων PCR, qPCR και qCLAMP και προκειμένου να καταστεί δυνατή η σύγκριση της ευαισθησίας ως προς το όριο ανίχνευσής τους, προετοιμάστηκαν 10 δείγματα διαδοχικά αραιωμένων συγκεντρώσεων καθαρού γενωμικού DNA (100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg και 0 fg) για καθέναν από τους μύκητες *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* και *Verticillium dahliae* καθώς και για τον ωμοκύκητα *Phytophthora infestans*. Για την διενέργεια των αντιδράσεων της συμβατικής PCR χρησιμοποιήθηκαν δημοσιευμένοι εκκινητές (**Πίνακας 1.2.1-1**) καθώς και τα προγράμματα που αναγράφονται στον Πίνακα **1.2.1-2**. Οι αντιδράσεις συμβατικής PCR επαναλήφθηκαν τρεις φορές για κάθε δείγμα.

Βάσει των αποτελεσμάτων των αντιδράσεων της συμβατικής PCR, το όριο ανίχνευσης του DNA του ***B. cinerea*** προσδιορίστηκε στα **100 pg - 1 ng** (σε 1/3 αντιδράσεις ανιχνεύθηκε στο 100 pg), του ***F.o.r.c.*** στο **1 ng** ενώ του ***P. infestans*** και του ***V. dahliae*** στα **100 pg** (**Πίνακας 1.2.1-3, Εικόνα 1.2.1-1**).

Τα ίδια δείγματα DNA από τους μύκητες *F. o. f.sp. radicis-cucumerinum*, και *V. dahliae* χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας της qPCR. Για την διενέργεια των αντιδράσεων qPCR χρησιμοποιήθηκαν δημοσιευμένοι εκκινητές των παθογόνων (**Πίνακας 1.2.1-1**) και εφαρμόστηκαν τα ακόλουθα προγράμματα: 1) ***F.o.r.c.***: αρχικό στάδιο μετουσίωσης στους 95°C για 3 λεπτά, ακολουθούμενο από 40 κύκλους με τα στάδια μετουσίωσης, υβριδισμού και ενίσχυσης στους 95°C, 65°C και 72 °C, για 30, 30 και 30 δευτερόλεπτα αντίστοιχα, και 2) ***V. dahliae***: αρχικό στάδιο μετουσίωσης στους 95°C για 3 λεπτά, ακολουθούμενο από 40 κύκλους με τα στάδια μετουσίωσης, υβριδισμού και ενίσχυσης στους 95°C, 60°C και 72 °C, για 30, 30 και 30 δευτερόλεπτα αντίστοιχα. Οι αντιδράσεις qPCR επαναλήφθηκαν **τρεις φορές** για κάθε δείγμα.

Βάσει των αποτελεσμάτων των αντιδράσεων της qPCR, το όριο ανίχνευσης του DNA του ***F.o.r.c.*** προσδιορίστηκε στο **1 pg** ενώ του DNA του ***V. dahliae*** στα **100 fg**.

Επιπλέον, το εργαστήριο μυκητολογίας του ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ παρείχε καθαρά δείγματα DNA διάφορων φυτοπαθογόνων που προσβάλλουν την τομάτα και την αγγουριά προκειμένου να προσδιοριστεί και η εξειδίκευση της μεθόδου qCLAMP ως προς τον εκάστοτε στόχο. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε εξαγωγή DNA από τα παθογόνα *Alternaria* sp., *Botrytis cinerea*, *Fulvia fulva*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*, *Leveillula taurica*, *Phytophthora infestans*, *Phytophthora nicotianae*, *Pseudoperonospora cubensis*, *Stemphyllium* sp. και *Verticillium dahliae*.

Πίνακας 1.2.1-1. Δημοσιευμένοι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των παθογόνων με συμβατική PCR και qPCR

Εκκινητές παθογόνων	Αλληλουχία 5'→3'	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Βιβλιογραφία
VD1_ITS1-F	CCGCCGGTCCATCAGTCTCTCTGTTTATAC	347	Nazar et al. 1991
VD2_ITS2-R	CGCCTGCGGGACTCCGATGCGAGCTGTAAC		
Bc-f	CAGGAAACACTTTTGGGGATA	327	Fan et al., 2015
Bc-r	GAGGGACAAGAAAATCGACTAA		
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	456	Paul Tooley et al., 1997
PINF2	CGATTCAAATGCCAAGCTAAAG		
ForcF1	GGTGACGCAGCAGTCTAGA	277	Lievens et al, 2007
ForcR2	GTGACGCAGGGTAGGCAT		

Εκκινητές γονιδίων αναφοράς	Αλληλουχία 5'→3'	Ξενιστής	Βιβλιογραφία
CyOXID_F	TGGTAATTGGTCTGTTCCGATT`	Αγγουριά	Papayiannis et al., 2011
CyOXID_R	TGGAGGCAACAACCAGAATG		
SoIACT-F	TTCCGTTGCCAGAGGTCCT	Τομάτα	Chen et al. 2007
SoIACT-R	TCGCCCTTTGAAATCCACATC		

Πίνακας 1.2.1-2. Προγράμματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) που εφαρμόστηκαν για τον προσδιορισμό των ορίων ανίχνευσης των παθογόνων

Παθογόνο			
<i>B. cinerea</i>	<i>F.o.f.sp. radicis-cucumerinum</i>	<i>P. infestans</i>	<i>V. dahliae</i>
Hold 94°C (3min)			
Cycling 27 Repeats	Cycling 40 Repeats	Cycling 30 Repeats	Cycling 40 Repeats
Step 1 94°C (30sec)	Step 1 94°C (45sec)	Step 1 94°C (15sec)	Step 1 94°C (1 min)
Step 2 51°C (30 sec)	Step 2 65°C (45sec)	Step 2 50°C (1min)	Step 2 50°C (1min)
Step 3 72°C (1min)	Step 3 72°C (45sec)	Step 3 72°C (45sec)	Step 3 72°C (2min)

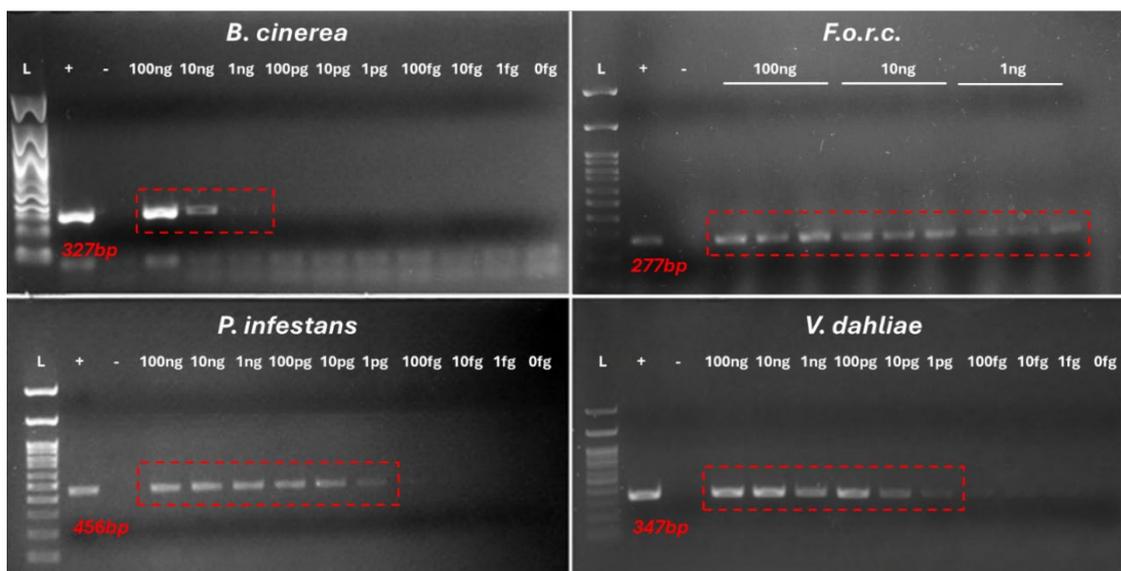
Hold 72°C (10min) Hold 72°C (8min) Hold 72°C (3min) Hold 72°C (8min)

Hold 8°C Infinite

Πίνακας 1.2.1-3. Αποτελέσματα ανίχνευσης των παθογόνων σε 10 δείγματα διαδοχικά αραιωμένων συγκεντρώσεων καθαρού DNA με αντιδράσεις συμβατικής PCR

Ποσότητα καθαρού DNA ανά αντίδραση	Αποτελέσματα συμβατικής PCR*											
	<i>B. cinerea</i>			<i>F.o.r.c.</i>			<i>P. infestans</i>			<i>V. dahliae</i>		
	1 ^η	2 ^η	3 ^η	1 ^η	2 ^η	3 ^η	1 ^η	2 ^η	3 ^η	1 ^η	2 ^η	3 ^η
100 ng	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ng	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 ng	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
100 pg	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
10 pg	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
1 pg	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
100 fg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 fg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 fg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0 fg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Για κάθε βιολογικό δείγμα πραγματοποιήθηκαν τρεις αντιδράσεις συμβατικής PCR (επαναλήψεις)
Με «+» συμβολίζεται η επιτυχής ανίχνευση του στόχου ενώ με «-» η μη-ανίχνευσή του.



Εικόνα 1.2.1-1. Προσδιορισμός ορίων ανίχνευσης σε δείγματα διαδοχικά αραιωμένων συγκεντρώσεων καθαρού γενωμικού DNA των παθογόνων, που υποβλήθηκαν σε 3 επαναλαμβανόμενες αντιδράσεις συμβατικής PCR. L: Ladder, +: θετικός μάρτυρα και -: αρνητικός μάρτυρα (νερό).

Πίνακας 1.2.1-4. Αποτελέσματα (τιμές Ct) ανίχνευσης των παθογόνων *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-cucumerinum* και *Verticillium dahliae* σε 10 δείγματα διαδοχικά αραιωμένων συγκεντρώσεων καθαρού DNA με αντιδράσεις qPCR

Αποτελέσματα qPCR*						
Ποσότητα καθαρού DNA ανά αντίδραση	<i>F.o.r.c.</i>			<i>V. dahliae</i>		
	1 ^η	2 ^η	3 ^η	1 ^η	2 ^η	3 ^η
H ₂ O	37,234	34,432	34,120	37,960	40,000	35,183
100 ng	17,715	17,436	17,411	12,775	11,946	11,885
10 ng	19,516	20,383	19,521	14,055	13,597	13,897
1 ng	23,190	23,583	23,219	17,099	17,521	17,460
100 pg	27,172	26,926	26,777	20,497	20,797	20,589
10 pg	30,948	29,502	30,627	24,226	24,306	24,408
1 pg	33,383	31,931	32,445	27,682	27,504	27,751
100 fg	33,395	34,535	33,983	30,019	31,667	30,715
10 fg	34,430	34,210	33,524	33,628	31,841	35,539
1 fg	34,458	35,641	35,417	34,692	33,859	34,472

*Για κάθε βιολογικό δείγμα πραγματοποιήθηκαν τρεις αντιδράσεις qPCR (επαναλήψεις)

Οι αντιδράσεις qPCR πραγματοποιήθηκαν στη φορητή συσκευή ποσοτικής χρωματομετρικής ανίχνευσης Pebble (BIOPIX) με χρήση του Universal Mastermix (BIOPIX) στους 65°C για 35 λεπτά. Στην περίπτωση των *V. dahliae*, *P. infestans* σχεδιάστηκαν νέοι εκκινητές με το πρόγραμμα Primer Explorer στην περιοχή ITS (Internal Transcribed Spacer) του rRNA, ενώ για το *F.o.r.c.* σχεδιάστηκαν νέοι εκκινητές βασισμένοι σε RAPD ανάλυση. Το *Botrytis cinerea* ανιχνεύτηκε με δημοσιευμένους εκκινητές (J.A. Tomlinson et al 2010). Κάθε αντίδραση LAMP περιείχε 0.2 μM F3, 0.2 μM B3, 1.8 μM FIP, 1.8 μM BIP, 0.6 μM LF, 0.6 μM LB. Οι αλληλουχίες των εκκινητών φαίνονται παρακάτω (Πίνακας 1.2.1-5).

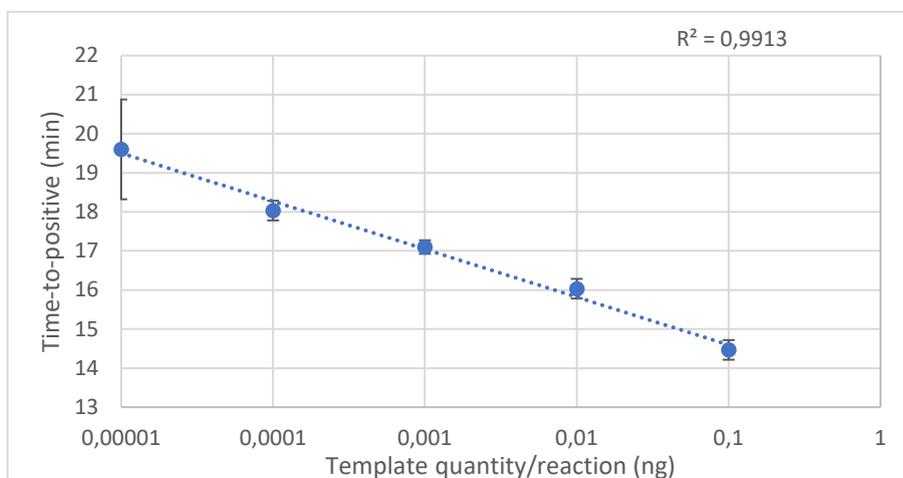
Πίνακας 1.2.1-5. Αλληλουχίες των LAMP εκκινητών

Μύκητας	LAMP εκκινητές
<i>V. dahliae</i>	F3: CCGAGTATCTACTCATAAACCCTTTG
	B3: TGTGCGTTCAAAGATTCGATGAT
	FIP: CAGAGAGACTGATGGACCGCGTGAACCATATTGTTGCTTCGGC
	BIP: ACGGATCTCTTGGCTCTAGCATCGCACTGAATTCTGCAATTCACACTAC
	LF: GCTCGCAGAACGAGCC
	LB: TGAAGAACGCAGCGAAACG
<i>F.o.r.c.</i>	F3: CCAGAGTCTGCCTGTGATTG
	B3: TGACGCAGGGTAGGCATTA
	FIP: CTCAGCGCGACACATGGTGTATCTGCTTTGCCTCGTCACAATG
	BIP: TGAGCAGCAGCAAAAATGTGTTGA-AAGTAACTCTGCGGGATGGA
	LF: CGTGCCACCCATGCTGAAAT
	LB: TCTTAAGTTATCTCTTGTGCGGGGT
<i>B. cinerea</i>	F3: TCGGAGTGTCTTAGGAATGC
	B3: TGAGATGGCCAACTCTCAGA
	FIP: GCCTGCTCACCGGTAGTAGTGTGTGAGCCCTTGGTCTAAAGC
	BIP: GCAGAATCTGTCCCCGGTGAGCGGGAGCAACAATTAATCGC

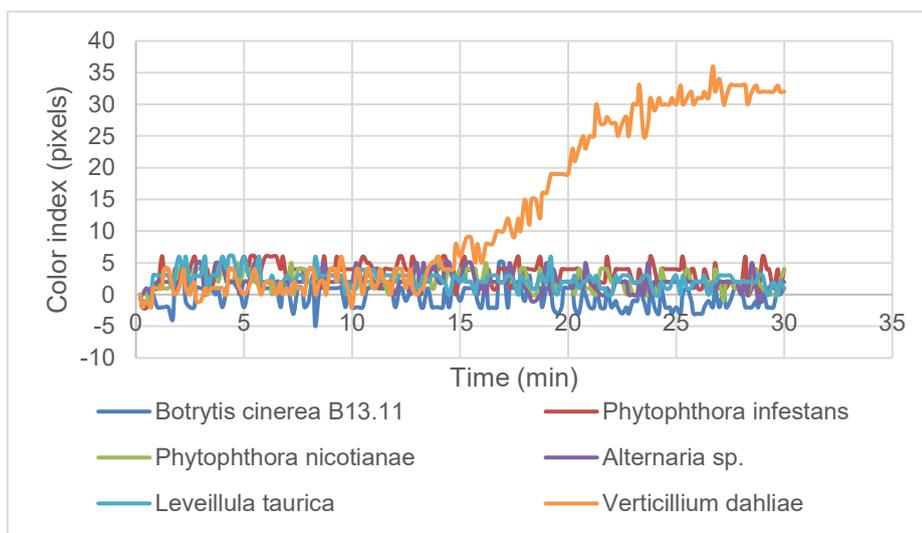
	LF: TGGGGTAACTAGTCACCTATACG
	LB: AGGTCACCTTGCAATGAGTGGA
<i>P. infestans</i>	F3: GCCTGTATCAGTGTCCGTAC
	B3: CATTAACGCCGCAGCAGA
	FIP: ACCAACC GCAAGACACTTCACATTGGCTTTCTTCCTTCCGTG
	BIP: GCTCCAAAAGTGGTGGCATTGCCAAACCGGTCGCCAACTC
	LF: GGCATCTCCTCCACCGACTA

Με απομονωμένο DNA από το εργαστήριο μυκητολογίας, προσδιορίστηκε το όριο ανίχνευσης και η ειδικότητα των LAMP εκκινήτων. Τα αποτελέσματα για κάθε παθογόνο φαίνονται στα παρακάτω γραφήματα.

- ***V. dahliae***

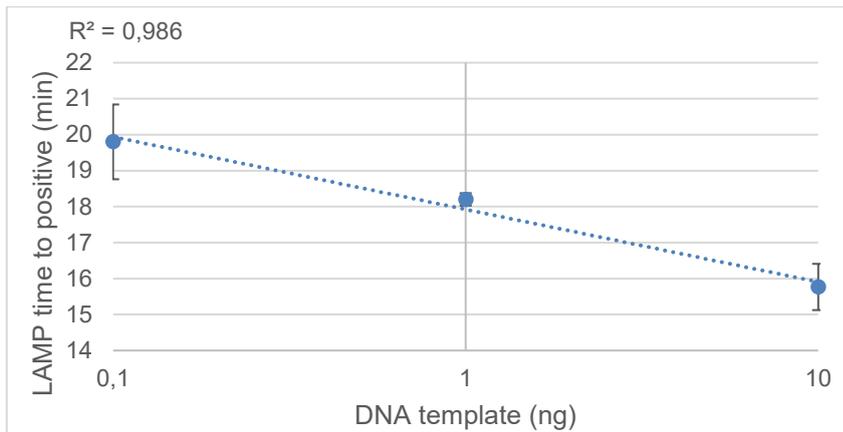


Γράφημα 1.2.1-1: Συσχέτιση του χρόνου θετικού σήματος των αντιδράσεων LAMP με διαδοχικές αραιώσεις απομονωμένου DNA του μύκητα. Ως όριο ανίχνευσης προσδιορίζονται τα 10 fg που δίνουν σήμα στα 20 λεπτά.

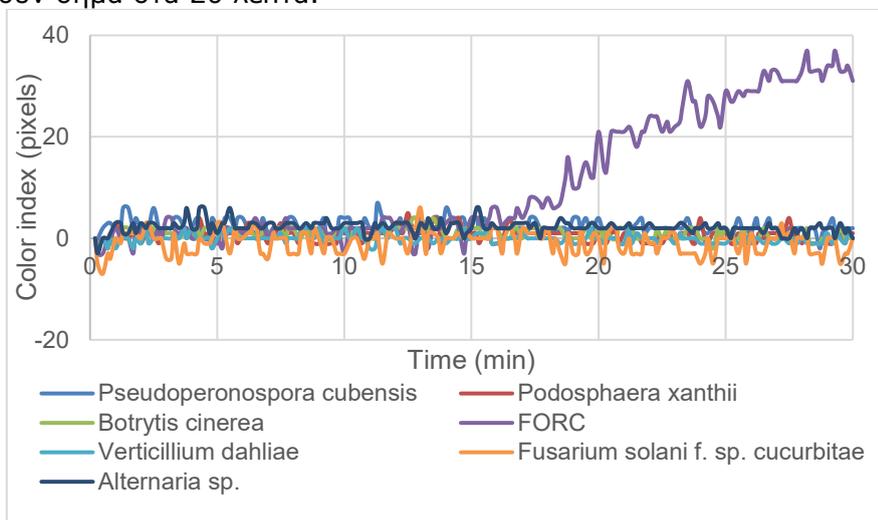


Γράφημα 1.2.1-2: Γράφημα αλλαγής χρώματος πραγματικού χρόνου όπου φαίνεται η ειδικότητα των εκκινήτων. Μόνο 1 ng *V.d* δίνει θετικό σήμα σε αντίθεση με τα υπόλοιπα παθογόνα που δεν ανιχνεύονται.

- **F.o.r.c.**

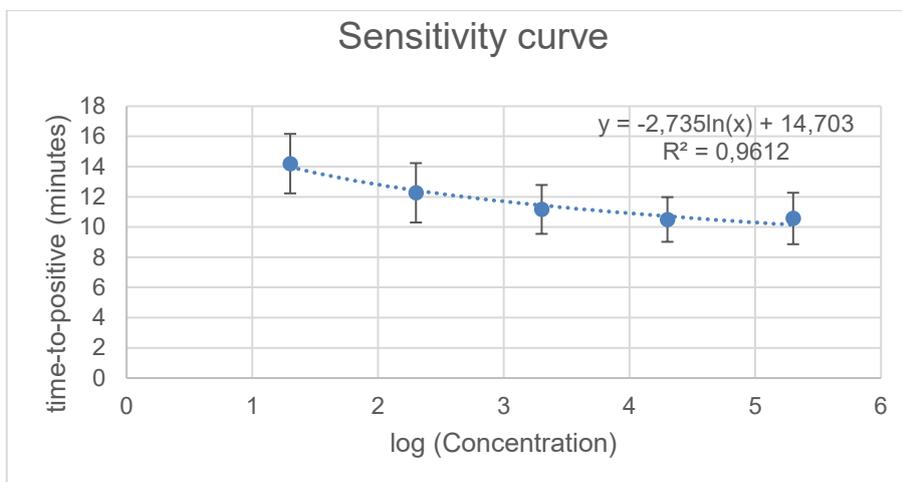


Γράφημα 1.2.1-3: Συσχέτιση του χρόνου θετικού σήματος των αντιδράσεων LAMP με διαδοχικές αραιώσεις απομονωμένου DNA του μύκητα. Ως όριο ανίχνευσης προσδιορίζονται τα 100 pg που δίνουν σήμα στα 20 λεπτά.

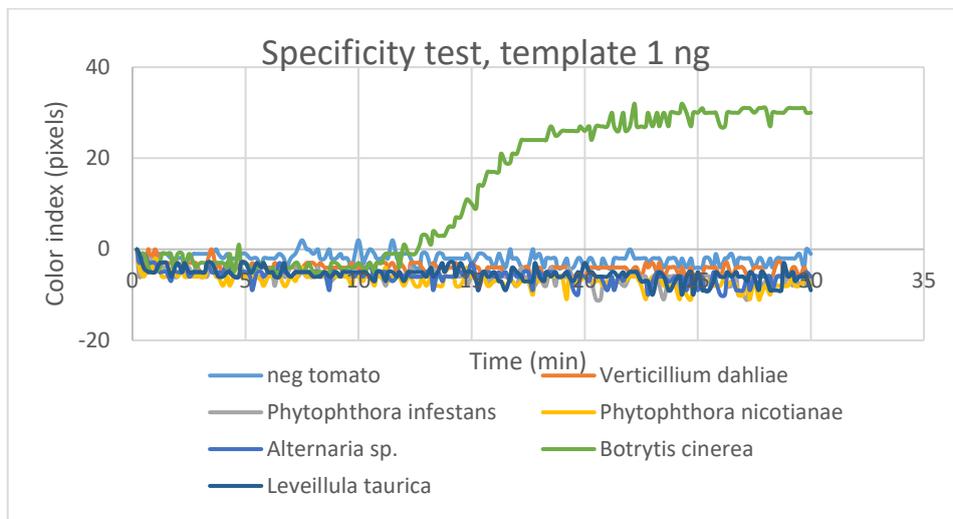


Γράφημα 1.2.1-4: Γράφημα αλλαγής χρώματος πραγματικού χρόνου όπου φαίνεται η ειδικότητα των εκκινήτων. Μόνο 1 ng F.o.r.c. δίνει θετικό σήμα σε αντίθεση με τα υπόλοιπα παθογόνα που δεν ανιχνεύονται.

- ***B. cinerea***

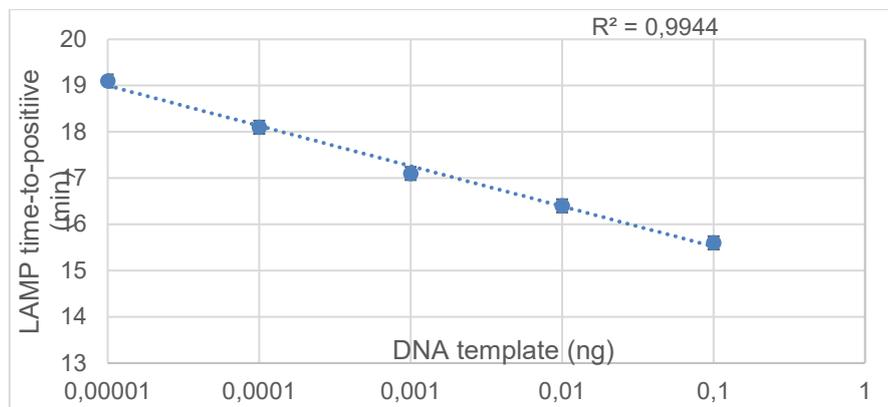


Γράφημα 1.2.1-5: Συσχέτιση του χρόνου θετικού σήματος των αντιδράσεων LAMP με διαδοχικές αραιώσεις απομονωμένου DNA του μύκητα. Ως όριο ανίχνευσης προσδιορίζονται τα 2 pg που δίνουν σήμα στα 14 λεπτά.

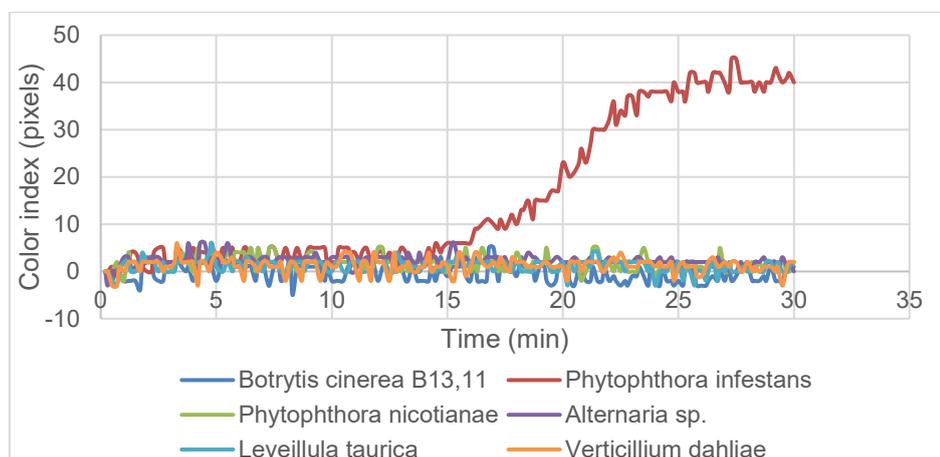


Γράφημα 1.2.1-6: Γράφημα αλλαγής χρώματος πραγματικού χρόνου όπου φαίνεται η ειδικότητα των εκκινήτων. Μόνο 1 ng *B. cinerea* δίνει θετικό σήμα σε αντίθεση με τα υπόλοιπα παθογόνα που δεν ανιχνεύονται.

- ***P. infestans***



Γράφημα 1.2.1-7: Συσχέτιση του χρόνου θετικού σήματος των αντιδράσεων LAMP με διαδοχικές αραιώσεις απομονωμένου DNA του μύκητα. Ως όριο ανίχνευσης προσδιορίζονται τα 10 fg που δίνουν σήμα στα 19 λεπτά.



Γράφημα 1.2.1-8: Γράφημα αλλαγής χρώματος πραγματικού χρόνου όπου φαίνεται η ειδικότητα των εκκινήτων. Μόνο 1 ng *P. infestans* δίνει θετικό σήμα σε αντίθεση με τα υπόλοιπα παθογόνα

που δεν ανιχνεύονται.

2. 2. Ανίχνευση πολλαπλασιαστικών μονάδων του μύκητα *Botrytis cinerea* σε ακατέργαστα φυτικά δείγματα

Για την ανίχνευση του παθογόνου *B. cinerea* σε **ακατέργαστα φυτικά δείγματα**, πραγματοποιήθηκε τεχνητή μόλυνση δισκίων φύλλου τομάτας (διαμέτρου 10 mm) με εναπόθεση **10 μl** κονιδιακού αιωρήματος επτά διαβαθμιζόμενων συγκεντρώσεων του παθογόνου (**10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 , 1 και 0** κονίδια ανά δισκίο φύλλου). Κάθε συγκέντρωση εφαρμόστηκε σε 6 δισκία (6 επαναλήψεις/συγκέντρωση μολύσματος). Η δειγματοληψία των δισκίων φύλλου τομάτας πραγματοποιήθηκε **30 λεπτά** μετά την τεχνητή μόλυνση και τα δείγματα διατηρήθηκαν σε υπερκαταψύκτη στους -80°C . Ακολούθησε **εξαγωγή ολικού DNA με τη μέθοδο CTAB** (Murray and Thompson 1980) από τρία δισκία φύλλου της εκάστοτε συγκέντρωσης τα οποία υποβλήθηκαν σε αντιδράσεις συμβατικής PCR όπως αυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο 1. Επιπλέον, ποσότητα ολικού DNA χρησιμοποιήθηκε για να προσδιοριστεί το όριο ανίχνευσης της μεθόδου qCLAMP και να συγκριθούν τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων. Βάσει των αποτελεσμάτων των αντιδράσεων της συμβατικής PCR, το παθογόνο ανιχνεύθηκε σταθερά στα δισκία φύλλου τομάτας που μολύνθηκαν τεχνητά με τις συγκεντρώσεις **10^4 και 10^5 κονίδια/δισκίο φύλλου και στις τρεις επαναλήψεις-αντιδράσεις** (Εικόνα 1.2.1-2, Πίνακας 1.2.1-6).

Επιπρόσθετα, το εργαστήριο μυκητολογίας παρείχε δισκία φύλλου της εκάστοτε συγκέντρωσης (τα εναπομείναντα 3 δισκία/συγκέντρωση) από τα οποία παρασκευάστηκαν ακατέργαστα εκχυλίσματα DNA τα οποία μετέπειτα υποβλήθηκαν τόσο σε αντιδράσεις qCLAMP όσο και σε αντιδράσεις συμβατικής PCR. Τα φυτικά εκχυλίσματα παρασκευάστηκαν ως εξής: α) Λειοτρίβηση δισκίου φύλλου (διαμέτρου 10 mm) με πλαστικό pestle σε σωληνάριο erpendorf (1,5 ml) στο οποίο έχουν προστεθεί 0,5 ml TPS (100 mM Tris-HCl, 1 M KCl, 10mM, EDTA, pH 8), β) Μεταφορά 20 μl του παραπάνω εκχυλίσματος σε νέο σωληνάριο με 80 μl H₂O. γ) Προσθήκη 2 μl αραιωμένου εκχυλίσματος στη LAMP (Universal mastermix και εκκινητές παθογόνου).

Βάσει των αποτελεσμάτων των αντιδράσεων της συμβατικής PCR, το παθογόνο **δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα δείγμα ακατέργαστου εκχυλίσματος** (Εικόνα 1.2.1-3, Πίνακας 1.2.1-6). Με τη μέθοδο της qCLAMP, το παθογόνο ανιχνεύτηκε σε όλες τις επαναλήψεις σε ακατέργαστα δείγματα συγκεντρώσεων **10^5 - 10^3** και στις 2 από τις 3 επαναλήψεις συγκέντρωσης **10^2** . Οπότε το όριο ανίχνευσης προσδιορίστηκε στα **10^3 - 10^2 κονίδια** σε ακατέργαστο δείγμα.

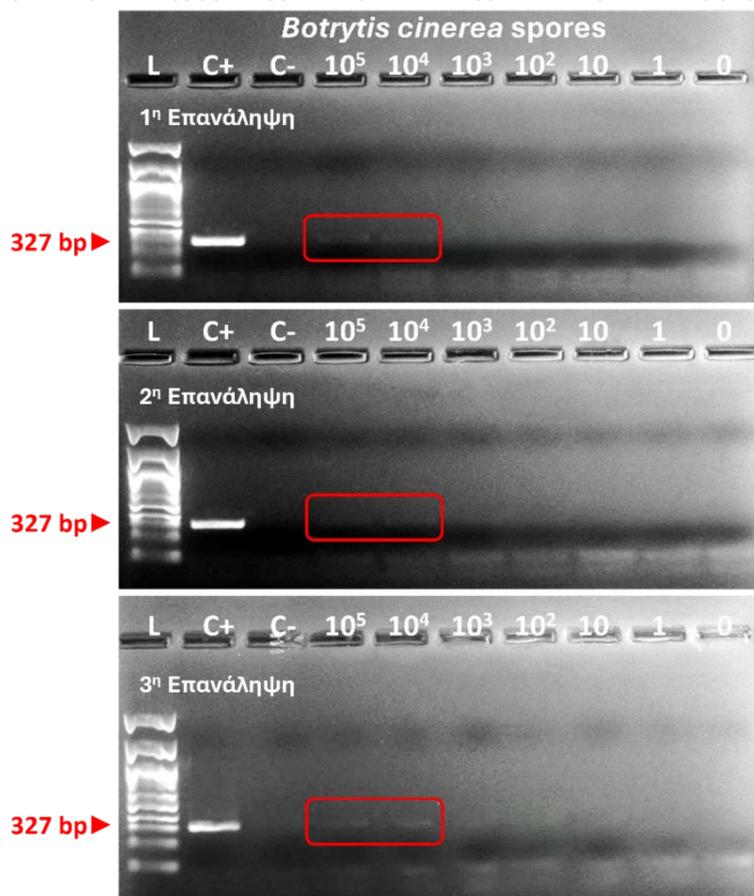
Πίνακας 1.2.1-6. Αποτελέσματα ανίχνευσης του *Botrytis cinerea* με συμβατική PCR και με qCLAMP σε δείγματα ολικού DNA καθώς και σε δείγματα ακατέργαστων εκχυλισμάτων δισκίων φύλλου τομάτας που μολύνθηκαν τεχνητά με κονιδιακό αιώρημα επτά διαβαθμιζόμενων συγκεντρώσεων του παθογόνου (10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 , 1 και 0 κονίδια ανά δισκίο φύλλου)

Συγκέντρω	Συμβατική PCR*	qCLAMP
-----------	----------------	--------

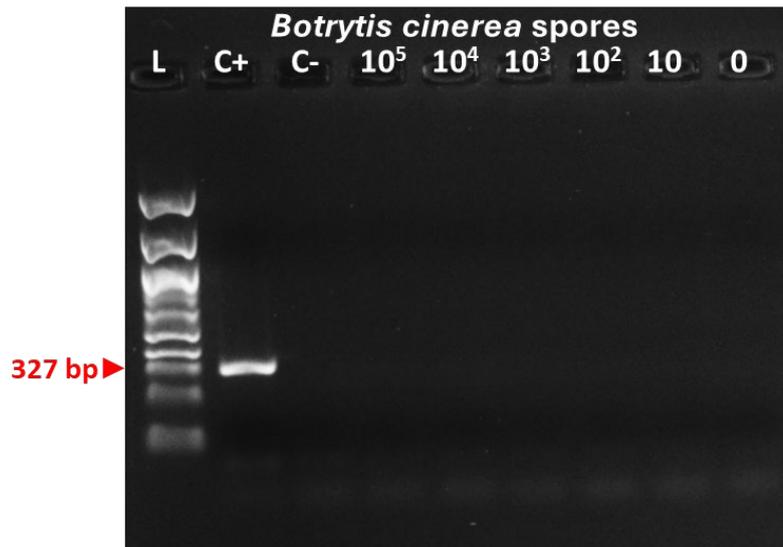
ση κονιδιακού αιωρήματος	Δείγματα ολικού DNA			Ακατέργαστα εκχυλίσματα			Ακατέργαστα εκχυλίσματα		
	1 ^η	2 ^η	3 ^η	1 ^η	2 ^η	3 ^η	1 ^η	2 ^η	3 ^η
10 ⁵ κονίδια	+	+	+	-	-	-	+20.8 min	+15.3 min	+22. 3min
10 ⁴ κονίδια	+	+	+	-	-	-	+22.2 min	+19.2 min	+23. 3min
10 ³ κονίδια	-	-	-	-	-	-	+22.5 min	+20.5 min	+24. 2min
10 ² κονίδια	-	-	-	-	-	-	+34.2 min	+30.3 min	-
10 κονίδια	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 κονίδια	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0 κονίδια	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Για κάθε βιολογικό δείγμα πραγματοποιήθηκαν τρεις αντιδράσεις συμβατικής PCR (επανάληψεις)

** Με «+» συμβολίζεται η επιτυχής ανίχνευση του στόχου ενώ με «-» η μη-ανίχνευσή του.



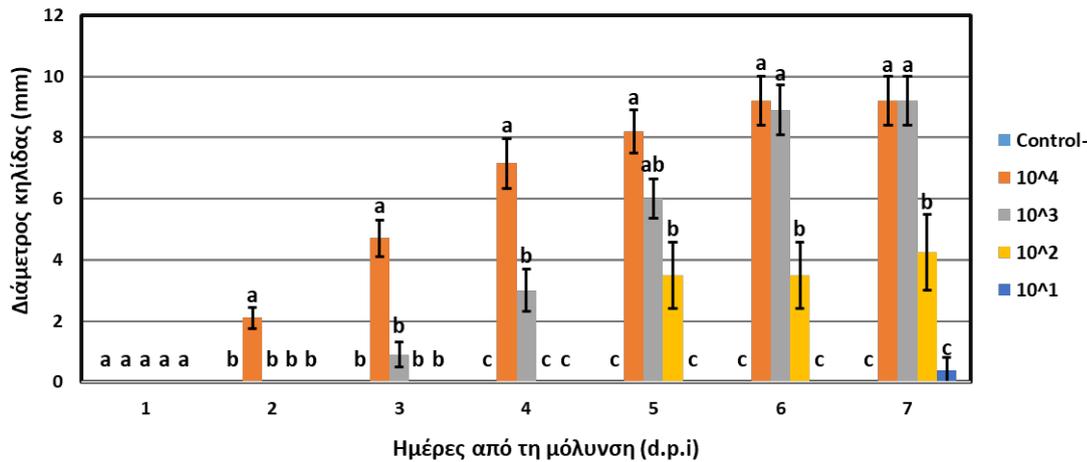
Εικόνα 1.2.1-1. Ανίχνευση του *Botrytis cinerea* με συμβατική PCR σε δείγματα ολικού DNA δισκίων φύλλου τομάτας που μολύνθηκαν τεχνητά με κονιδιακό αιώρημα επτά διαβαθμιζόμενων συγκεντρώσεων του παθογόνου (10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10, 1 και 0 κονίδια ανά δισκίο φύλλου).



Εικόνα 1.2.1-2. Ανίχνευση του *Botrytis cinerea* με συμβατική PCR σε δείγματα ακατέργαστων εκχυλισμάτων δισκίων φύλλου τομάτας που μολύνθηκαν τεχνητά με κονιδιακό αιώρημα επτά διαβαθμιζόμενων συγκεντρώσεων του παθογόνου (10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 και 0 κονίδια ανά δισκίο φύλλου).

3. Αξιολόγηση της ικανότητας έγκαιρης ανίχνευσης των παθογόνων με τη χρήση qCLAMP **3.1 Παθοσύστημα *Botrytis cinerea*-Τομάτα**

Για την υλοποίηση των πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν **προκαταρκτικές δοκιμές παθογένειας** προκειμένου να επιλεγθεί η καταλληλότερη συγκέντρωση μολύσματος του παθογόνου που εξυπηρετεί καλύτερα τις ανάγκες του έργου. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε τεχνητή μόλυνση δισκίων φύλλου τομάτας με εναπόθεση 10 μl κονιδιακού αιωρήματος του *B. cinerea* με τελικό αριθμό κονιδίων ανά δισκίο 10^4 , 10^3 , 10^2 και 10 κονίδια ανά δισκίο. Από τα αποτελέσματα του προκαταρκτικού πειράματος προέκυψε ότι η πιο κατάλληλη ποσότητα μολύσματος είναι τα **10^3 κονίδια ανά δισκίο φύλλου τομάτας**, καθώς η συγκεκριμένη συγκέντρωση προκαλεί καθυστερημένη έναρξη των συμπτωμάτων αλλά προσεγγίζει εξίσου υψηλή τελική ένταση ασθένειας με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση μολύσματος που εφαρμόστηκε (Γράφημα 1.2.1-9).



Γράφημα 1.2.1-9. Αποτελέσματα εξέλιξης της ασθένειας (διάμετρος της αναπτυσσόμενης κηλίδας) σε δισκία φύλλων επί των οποίων εναποτέθηκαν κονιδιακά αιωρημάτων διαβαθμιζόμενης συγκέντρωσης του παθογόνου *Botrytis cinerea* (10⁴, 10³, 10² και 10¹ κονίδια/δισκίο) στις 1, 2, 3, 4, 5, 6 και 7 ημέρες από τη μόλυνση.

Ακολουθώντας, για την αξιολόγηση της ικανότητας της **έγκαιρης ανίχνευσης** του παθογόνου *B. cinerea*, πραγματοποιήθηκε τεχνητή μόλυνση δισκίων φύλλου τομάτας (διαμέτρου 10 mm) με εναπόθεση **10 μl** κονιδιακού αιωρήματος συγκέντρωσης **10³ κονίδια ανά δισκίο φύλλου τομάτας** η οποία επιλέχθηκε έπειτα από προπαρασκευαστικές δοκιμές παθογένειας. Ειδικότερα, για τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν πέντε κουτιά που περιείχαν δικτυωτό πλέγμα πάνω στο οποίο τοποθετήθηκαν τα δισκία φύλλων τομάτας. Δύο κουτιά περιείχαν δισκία φύλλων τομάτας στα οποία εναποτέθηκαν 10 μl αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού, τα οποία αποτέλεσαν τους αρνητικούς μάρτυρες. Επιπλέον, δύο κουτιά περιείχαν δισκία φύλλων τομάτας στα οποία εναποτέθηκαν 10 μl κονιδιακού αιωρήματος με τελική ποσότητα μολύσματος **10³ κονίδια ανά δισκίο φύλλου τομάτας**. Τέλος, σε ένα κουτί τοποθετήθηκαν δισκία φύλλου τομάτας προκειμένου να καταγράφεται η εξέλιξη της ασθένειας στον χρόνο. Η δειγματοληψία των δισκίων φύλλου τομάτας πραγματοποιήθηκε σε οκτώ χρονικές στιγμές από τη μόλυνση (**0 ώρες, 6 ώρες, 12 ώρες, 1 ημέρα, 2 ημέρες, 3 ημέρες, 4 ημέρες και 5 ημέρες**). Σε κάθε δειγματοληψία (χρονική στιγμή) λήφθηκαν τρία δείγματα δισκίων της επέμβασης του αρνητικού μάρτυρα καθώς και τρία δείγματα τεχνητά μολυσμένων δισκίων φύλλων. Επιπροσθέτως, για κάθε χρονική στιγμή πραγματοποιήθηκαν καταγραφές συμπτωμάτων μετρώντας τη διάμετρο της αναπτυσσόμενης κηλίδας (mm) περιμετρικά του σημείου μόλυνσης. Ακολούθησε **εξαγωγή ολικού DNA με τη μέθοδο CTAB** και τα δείγματα υποβλήθηκαν σε αντιδράσεις συμβατικής PCR. Επιπρόσθετα, όλα τα δείγματα των μη μολυσμένων αλλά και των μολυσμένων δισκίων φύλλου για κάθε χρονική στιγμή χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της έγκαιρης ανίχνευσης του παθογόνου με τη μέθοδο qcLAMP.

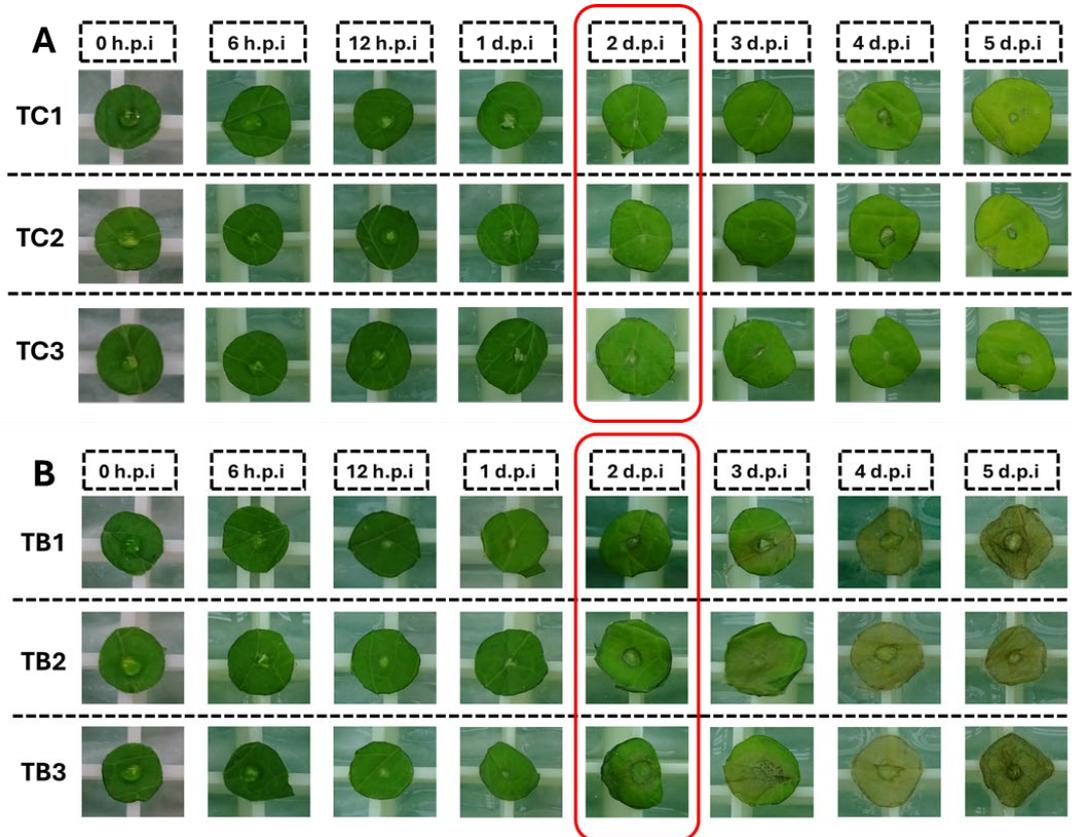
Βάσει των αποτελεσμάτων των αντιδράσεων της συμβατικής PCR, το παθογόνο ανιχνεύθηκε επιτυχώς έπειτα **από 2 ημέρες επώασης**, σε στάδιο όπου τα συμπτώματα της ασθένειας ήταν ορατά μακροσκοπικά (Εικόνα 1.2.1-4). Πιο συγκεκριμένα, το παθογόνο

ανιχνεύθηκε επιτυχώς με τη συμβατική PCR στις 2, 3, 4 και 5 ημέρες από τη μόλυνση (Εικόνα 1.2.1-5, Πίνακας 1.2.1-7). Επιπλέον, μολυσμένα δισκία φύλλων και οι αντίστοιχοι μάρτυρες (τρία δισκία/επέμβαση) συλλέχθηκαν σε κάθε χρονική στιγμή από τη μόλυνση (0 ώρες, 6 ώρες, 12 ώρες, 1 ημέρα, 2 ημέρες, 3 ημέρες, 4 ημέρες και 5 ημέρες). και προετοιμάστηκαν ακατέργαστα εκχυλίσματα τα οποία υποβλήθηκαν τόσο σε αντιδράσεις qCLAMP όσο και σε αντιδράσεις συμβατικής PCR. Βάσει των αποτελεσμάτων των αντιδράσεων της συμβατικής PCR, το παθογόνο ανιχνεύθηκε επιτυχώς μόνο στις **3 ημέρες από τη μόλυνση** (Εικόνα 1.2.1-6), ενώ με τη χρήση της qCLAMP στα ακατέργαστα εκχυλίσματα, ο βοτρώτης **ανιχνεύτηκε σε όλες τις χρονικές στιγμές** μετά την τεχνητή μόλυνση. Γρηγορότερη ανίχνευση παρατηρήθηκε στις 3 μέρες, ενώ το παθογόνο δεν ανιχνεύτηκε σε κανέναν από τους αντίστοιχους αρνητικούς μάρτυρες (Γράφημα 1.2.1-10).

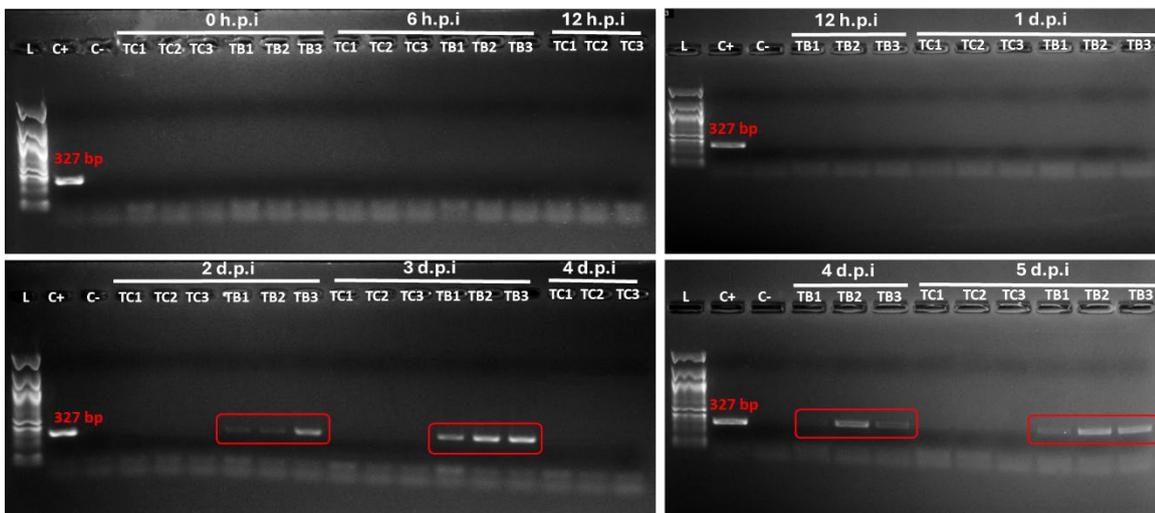
Πίνακας 1.2.1-7. Αποτελέσματα ανίχνευσης του παθογόνου *Botrytis cinerea* με συμβατική PCR σε δείγματα ολικού DNA και σε δείγματα ακατέργαστων εκχυλισμάτων δισκίων φύλλων τομάτας που δέχθηκαν επέμβαση με νερό (αρνητικοί μάρτυρες), καθώς και δισκίων φύλλων που μολύνθηκαν τεχνητά με το παθογόνο (τεχνητά μολυσμένα), σε οκτώ διαφορετικές χρονικές στιγμές από την μόλυνση (0 ώρες, 6 ώρες, 12 ώρες, 1 ημέρα, 2 ημέρες, 3 ημέρες, 4 ημέρες και 5 ημέρες)

Επέμβαση	Χρονικές στιγμές από τη μόλυνση	Συμβατική PCR*					
		Δείγματα ολικού DNA			Ακατέργαστα εκχυλίσματα		
		1 ^η επανάληψη (Διάμετρος κηλίδας)	2 ^η επανάληψη (Διάμετρος κηλίδας)	3 ^η επανάληψη (Διάμετρος κηλίδας)	1 ^η επανάληψη (Διάμετρος κηλίδας)	2 ^η επανάληψη (Διάμετρος κηλίδας)	3 ^η επανάληψη (Διάμετρος κηλίδας)
ΑΡΝΗΤΙΚΟΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ	0 ώρες	- (0 mm**)	- (0 mm)				
	6 ώρες	- (0 mm)					
	12 ώρες	- (0 mm)					
	1 ημέρα	- (0 mm)					
	2 ημέρες	- (0 mm)					
	3 ημέρες	- (0 mm)					
	4 ημέρες	- (0 mm)					
	5 ημέρες	- (0 mm)					
Επέμβαση	Χρονικές στιγμές από τη μόλυνση	Συμβατική PCR*					
		Δείγματα ολικού DNA			Ακατέργαστα εκχυλίσματα		
		1 ^η επανάληψη (Διάμετρος κηλίδας)	2 ^η επανάληψη (Διάμετρος κηλίδας)	3 ^η επανάληψη (Διάμετρος κηλίδας)	1 ^η επανάληψη (Διάμετρος κηλίδας)	2 ^η επανάληψη (Διάμετρος κηλίδας)	3 ^η επανάληψη (Διάμετρος κηλίδας)
ΤΕΧΝΗΤΑ ΜΟΛΥΣΜΕΝΑ	0 ώρες	- (0 mm)					
	6 ώρες	- (0 mm)					
	12 ώρες	- (0 mm)					
	1 ημέρα	- (2 mm)	- (0 mm)	- (2 mm)	- (0 mm)	- (2 mm)	- (1 mm)
	2 ημέρες	+ (2.5 mm)	+ (3 mm)	+ (5 mm)	- (4 mm)	- (4 mm)	- (7 mm)
	3 ημέρες	+ (7 mm)	+ (9 mm)	+ (9.5 mm)	+ (10 mm)	+ (10 mm)	+ (9.5 mm)
	4 ημέρες	+ (10 mm)	+ (10 mm)	+ (10 mm)	- (10 mm)	- (10 mm)	- (10 mm)
	5 ημέρες	+ (10 mm*)	+ (10 mm)	+ (10 mm)	- (10 mm)	- (10 mm)	- (10 mm)

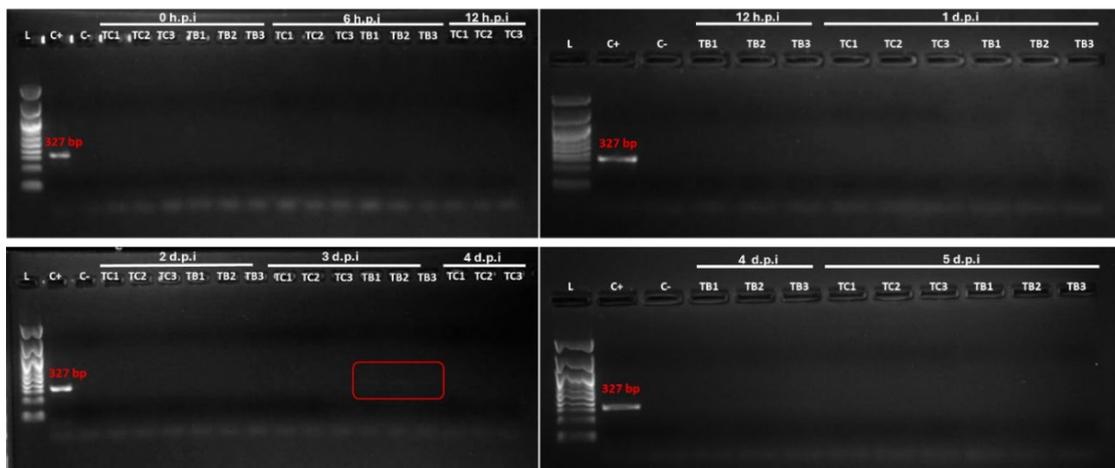
Με «+» συμβολίζεται η επιτυχής ανίχνευση του στόχου ενώ με «-» η μη-ανίχνευσή του. Στην παρένθεση απεικονίζεται η διάμετρος της αναπτυσσόμενης κηλίδας (mm) στο εκάστοτε δείγμα κατά τη χρονική στιγμή που συλλέχθηκε για να αναλυθεί.



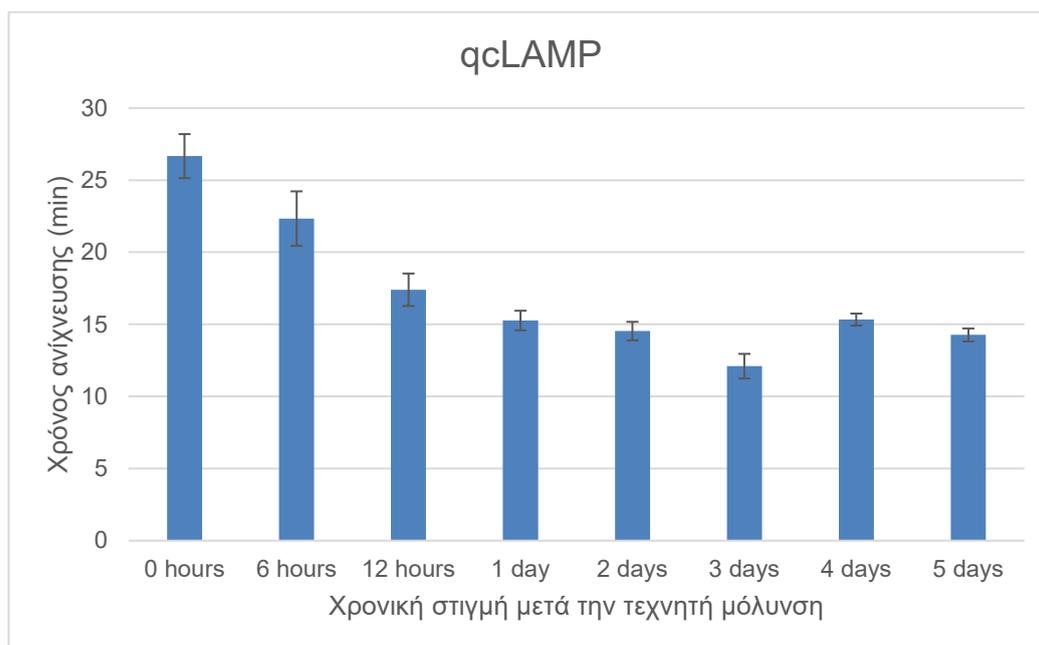
Εικόνα 1.2.1-3. Εξέλιξη της ασθένειας του βοτρυτή σε δισκία φύλλων τομάτας που μολύνθηκαν τεχνητά με το παθογόνο σε οκτώ χρονικές στιγμές από την μόλυνση (0 ώρες, 6 ώρες, 12 ώρες, 1 ημέρα, 2 ημέρες, 3 ημέρες, 4 ημέρες και 5 ημέρες). **A.** Δισκία φύλλου τομάτας αρνητικού μάρτυρα (Tomato Control=TC), και **B.** Δισκία φύλλου τομάτας τεχνητά μολυσμένου με *Botrytis cinerea* (Tomato Botrytis=TB).



Εικόνα 1.2.1-4. Ανίχνευση του παθογόνου *Botrytis cinerea* με συμβατική PCR σε δείγματα ολικού DNA δειγμάτων φύλλων του αρνητικού μάρτυρα-TC (επέμβαση με νερό) καθώς και δειγμάτων που μολύνθηκαν τεχνητά με το παθογόνο-TB, η δειγματοληψία των οποίων πραγματοποιήθηκε σε οκτώ διαφορετικές χρονικές στιγμές από τη μόλυνση (0 ώρες, 6 ώρες, 12 ώρες, 1 ημέρα, 2 ημέρες, 3 ημέρες, 4 ημέρες και 5 ημέρες).



Εικόνα 1.2.1-5. Ανίχνευση του παθογόνου *B. cinerea* σε δείγματα ακατέργαστων εκχυλισμάτων δειγμάτων φύλλων του αρνητικού μάρτυρα-TC (επέμβαση με νερό) καθώς και δειγμάτων που μολύνθηκαν τεχνητά με το παθογόνο-TB, η δειγματοληψία των οποίων πραγματοποιήθηκε σε οκτώ διαφορετικές χρονικές στιγμές (0 ώρες, 6 ώρες, 12 ώρες, 1 ημέρα, 2 ημέρες, 3 ημέρες, 4 ημέρες και 5 ημέρες).



Γράφημα 1.2.1-10. qcLAMP χρόνος ανίχνευσης του παθογόνου *B. cinerea* σε δείγματα ακατέργαστων εκχυλισμάτων δειγμάτων φύλλων η δειγματοληψία των οποίων πραγματοποιήθηκε σε οκτώ διαφορετικές χρονικές στιγμές (0 ώρες, 6 ώρες, 12 ώρες, 1 ημέρα, 2 ημέρες, 3 ημέρες, 4 ημέρες και 5 ημέρες). Πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις σε κάθε χρονική στιγμή.

3.2 Παθοσύστημα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* - Αγγουριά

Για την αξιολόγηση της **έγκαιρης ανιχνευτικής ικανότητας** του *F. o. f.sp. radicis-cucumerinum*, με την qcLAMP, πραγματοποιήθηκε τεχνητή μόλυνση φυτών αγγουριάς (υβρίδιο Jungla RZ F1) με ριζότισμα **40 ml** κονιδιακού αιωρήματος του παθογόνου, συγκέντρωσης **5x10⁶ κονίδια/ml** (Εικόνα 1.2.1-7). Φυτά τα οποία ριζοποτήθηκαν με αποστειρωμένο νερό αποτέλεσαν τους μάρτυρες του πειράματος. Οι δειγματοληψίες των τεχνητά μολυσμένων φυτών

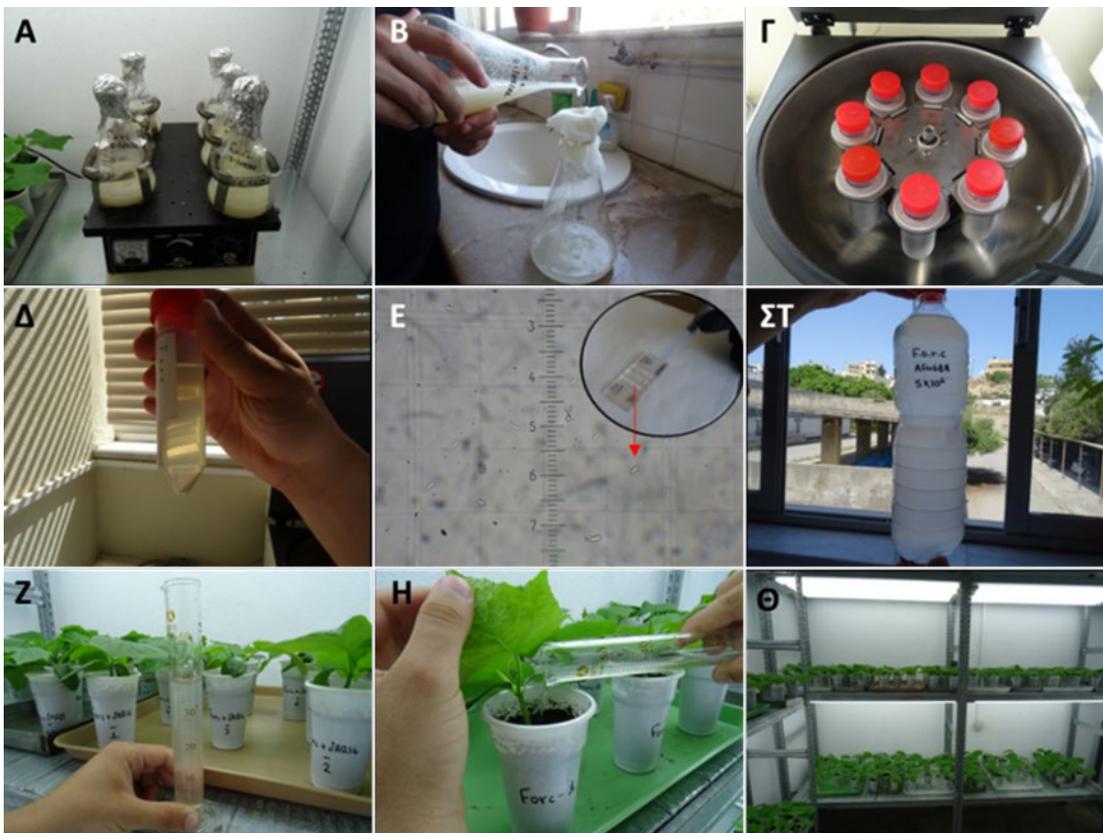
αγγουριάς και των αντίστοιχων μαρτύρων πραγματοποιήθηκαν σε επτά χρονικές στιγμές από τη μόλυνση (5, 8, 12, 16, 20, 23 και 26 ημέρες από τη μόλυνση). Σε κάθε δειγματοληψία (χρονική στιγμή) λήφθηκαν δέκα τεχνητά μολυσμένα φυτά και δέκα φυτά αρνητικού μάρτυρα. Πριν τη συλλογή του, το καθένα φυτό αξιολογήθηκε ως προς την συμπτωματολογική του εικόνα, με τη χρήση μιας 5-βάθμιας κλίμακας (0-4) όπου: 0-υγιές φυτό, 1-φυτό με γενική καχεξία και χλώρωση, 2-φυτό με όλα τα προηγούμενα συμπτώματα και 1 φύλλο μαραμένο, 3-φυτό με όλα τα προηγούμενα συμπτώματα και 2-3 φύλλα μαραμένα και 4-φυτό μερικώς ή εντελώς νεκρωμένο. Ακολούθησε καταστροφική δειγματοληψία και **εξαγωγή ολικού DNA με τη μέθοδο CTAB** (από 5 φυτά της κάθε επέμβασης/χρονική στιγμή) καθώς και **προετοιμασία ακατέργαστων φυτικών εκχυλισμάτων** (από 5 φυτά της κάθε επέμβασης/χρονική στιγμή). Επιπροσθέτως, 16 επιπλέον φυτά τα οποία είχαν μολυνθεί με το παθογόνο και ισάριθμα φυτά μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να καταγράφεται η εξέλιξη της ασθένειας στον χρόνο με τη χρήση της παραπάνω 5-βάθμιας κλίμακας, ώστε να διασφαλιστεί η επιτυχία της μόλυνσης.

Για την ανίχνευση του παθογόνου στα δείγματα ολικού DNA και στα δείγματα ακατέργαστων εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε συμβατική PCR (όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 1) αλλά και qPCR. Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκαν εξειδικευμένοι εκκινητές του παθογόνου (Forc-F1/Forc-R2) και του εσωτερικού γονιδίου αναφοράς COX της αγγουριάς (CyOXID_F/CyOXID_R) που απεικονίζονται στον Πίνακα 1.2.1-1. Η σχετική ποσότητα DNA στα επιμέρους δείγματα προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας την μέθοδο $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak et al., 2001). Όλες οι αντιδράσεις Real-Time PCR πραγματοποιήθηκαν στην συσκευή QuantStudio 3 Real-Time PCR System (ThermoFisher, Waltham, USA) χρησιμοποιώντας το kit PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (ThermoFisher, Waltham, USA) και εφαρμόζοντας το ακόλουθο πρόγραμμα για το *F.o.r.c.*: α. Αρχικό στάδιο μετουσίωσης στους 95°C για 3 λεπτά, ακολουθούμενο από 40 κύκλους με τα στάδια μετουσίωσης, υβριδισμού και ενίσχυσης στους 95°C, 65°C και 72 °C, για 30, 30 και 30 δευτερόλεπτα αντίστοιχα, και β. Για το γονίδιο COX της αγγουριάς: έναρξη της αντίδρασης με ένα αρχικό στάδιο μετουσίωσης στους 95°C για 3 λεπτά, ακολουθούμενο από 40 κύκλους με τα στάδια μετουσίωσης, υβριδισμού και ενίσχυσης στους 95°C, 60°C και 72°C, για 30, 30 και 30 δευτερόλεπτα αντίστοιχα. Τα ενισχυμένα προϊόντα στις επιμέρους αντιδράσεις αξιολογήθηκαν παρατηρώντας τις καμπύλες μετουσίωσης για καθένα δείγμα, ξεκινώντας από τους 60°C για 1 λεπτό και αυξάνοντας τη θερμοκρασία με ρυθμό 0.15°C ανά δευτερόλεπτο, έως τους 95°C. Για την ανάλυση των δεδομένων, οι μέσες τιμές Ct για κάθε γονίδιο υπολογίστηκαν με βάση τα ανεξάρτητα βιολογικά δείγματα ανά επέμβαση.

Βάσει των αποτελεσμάτων της συμβατικής PCR στα δείγματα ολικού DNA, το παθογόνο ανιχνεύθηκε επιτυχώς στις **20 ημέρες από τη μόλυνση σε 2 από τα 5 φυτά** αγγουριάς όπου τα συμπτώματα της ασθένειας ήταν ορατά μακροσκοπικά (δείκτης ασθένειας 2 και 4 αντίστοιχα). Επιπλέον, το παθογόνο ανιχνεύθηκε επιτυχώς στις 23 (4/5 δείγματα) και στις 26 (5/5) ημέρες από τη μόλυνση όταν η ασθένεια ήταν σε αρκετά προχωρημένο στάδιο βάσει των καταγραφών και βάσει της εξέλιξης της ασθένειας του μάρτυρα (Γράφημα 1.2.1-11). Αντίθετα, στις

αντιδράσεις PCR που πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα ακατέργαστων εκχυλισμάτων, το παθογόνο δεν ανιχνεύθηκε σε καμία χρονική στιγμή (Πίνακας 1.2.1-8).

Βάσει των αποτελεσμάτων της qPCR στα δείγματα καθαρού ολικού DNA, το παθογόνο ανιχνεύθηκε επιτυχώς για πρώτη φορά στις **12 ημέρες από τη μόλυνση** σε όλα τα τεχνητά μολυσμένα φυτά αγγουριάς (**5/5**). Κατά την ίδια χρονική στιγμή παρατηρήθηκε και η έναρξη των συμπτωμάτων στα τεχνητά μολυσμένα φυτά που προορίζονταν για την παρακολούθηση της εξέλιξης των συμπτωμάτων της ασθένειας. (Πίνακας 1.2.1-8, Γράφημα 1.2.1-3). Στις 16, 20, 23 και 26 ημέρες από τη μόλυνση η PCR ανίχνευσε ως θετικά 2/5, 4/5, 5/5 και 5/5 φυτά, αντίστοιχα (Πίνακας 1.2.1-8, Γράφημα 1.2.1-11). Βάσει των αποτελεσμάτων της qPCR στα δείγματα ακατέργαστων εκχυλισμάτων, το παθογόνο ανιχνεύθηκε επιτυχώς για πρώτη φορά στις 12 ημέρες από τη μόλυνση σε 1/5 τεχνητά μολυσμένα φυτά, ενώ στις 16, 20, 23 και 26 ημέρες από τη μόλυνση η qPCR ανίχνευσε ως θετικά 5/5, 0/5, 2/5 και 3/5 φυτά, αντίστοιχα (Πίνακας 1.2.1-9, Γράφημα 1.2.1-11). Τέλος μέσω της μεθόδου qCLAMP, το παθογόνο ανιχνεύτηκε πρώτη φορά στις 16 μέρες με συχνότητα 1/5 φυτά, έχοντας ως αρχικό υλικό απομονωμένο DNA, ενώ με το ακατέργαστο εκχύλισμα το παθογόνο ανιχνεύεται πρώτη φορά στις 12 μέρες με συχνότητα 2/5. Τα αποτελέσματα της qCLAMP φαίνονται επίσης στον Πίνακα 1.2.1-8.



Εικόνα 1.2.1-6. Διαδικασία τεχνητή μόλυνσης φυτών αγγουριάς με το παθογόνο *Fusarium oxysporum f.sp. radicle-cucumerinum*.

Πίνακας 1.2.1-8. Αποτελέσματα ανίχνευσης του παθογόνου F.o.r.c. με συμβατική PCR και qCLAMP σε δείγματα ολικού DNA και σε δείγματα ακατέργαστων εκχυλισμάτων φυτών

αγγουριάς που δέχθηκαν επέμβαση με νερό (C-) καθώς και φυτών που μολύνθηκαν τεχνητά με το παθογόνο (FORC). Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκε σε επτά διαφορετικές χρονικές στιγμές (5, 8, 12, 16, 20, 23 και 26 ημέρες από τη μόλυνση). Στην qCLAMP αναφέρεται ο χρόνος σε λεπτά θετικού σήματος στα φυτά όπου ανιχνεύτηκε το παθογόνο.

Αποτελέσματα PCR δειγμάτων ολικού DNA

Επέμβαση	Ημέρες από τη μόλυνση						
	5	8	12	16	20	23	26
H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-
C+	+	+	+	+	+	+	+
C-1	-(0,0)	-(0,0)	-(0,0)	-(0,0)	-(0,0)	-(0,0)	-(0,0)
C-2	-(0,0)	-(0,0)	-(0,0)	-(0,0)	-(0,0)	-(0,0)	-(0,0)
C-3	-(0,0)	-(0,0)	-(0,0)	-(0,0)	-(0,0)	-(0,0)	-(0,0)
C-4	-(0,0)	-(0,0)	-(0,0)	-(0,0)	-(0,0)	-(0,0)	-(0,0)
C-5	-(0,0)	-(0,0)	-(0,0)	-(0,0)	-(0,0)	-(0,0)	-(0,0)
FORC1	-(0,0)	-(0,0)	-(0,5)	-(1,0)	-(4,0)	-(4,0)	+(4,0)
FORC2	-(0,0)	-(0,0)	-(1,0)	-(1,0)	+(4,0)	+(2,5)	+(4,0)
FORC3	-(0,0)	-(0,0)	-(0,5)	-(3,0)	+(2,0)	+(4,0)	+(4,0)
FORC4	-(0,0)	-(0,0)	-(0,0)	-(3,0)	-(1,0)	+(3,5)	+(4,0)
FORC5	-(0,0)	-(0,0)	-(0,5)	-(1,0)	-(3,0)	+(4,0)	+(4,0)

Αποτελέσματα qCLAMP δειγμάτων ολικού DNA

Επέμβαση	Ημέρες από τη μόλυνση						
	5	8	12	16	20	23	26
H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-
C+	+	+	+	+	+	+	+
C-1	-	-	-	-	-	-	-
C-2	-	-	-	-	-	-	-
C-3	-	-	-	-	-	-	-
C-4	-	-	-	-	-	-	-
C-5	-	-	-	-	-	-	-
FORC1	-	-	-	-	+	+	+
					(21,7)	(19,8)	(18,8)
FORC2	-	-	-	-	+	+	+
					(24,8)	(20,5)	(17,2)
FORC3	-	-	-	-	+	+	+
					(24,5)	(17,3)	(16,8)
FORC4	-	-	-	+	-	+	+
				(20,7)	-(0,0)	(22,8)	(17,5)
FORC5	-	-	-	-	+	+	+
					+(26,3)	(17,7)	+(19)

Αποτελέσματα PCR ακατέργαστων εκχυλισμάτων DNA

Επέμβαση	Ημέρες από τη μόλυνση						
	5	8	12	16	20	23	26
H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-
C+	+	+	+	+	+	+	+

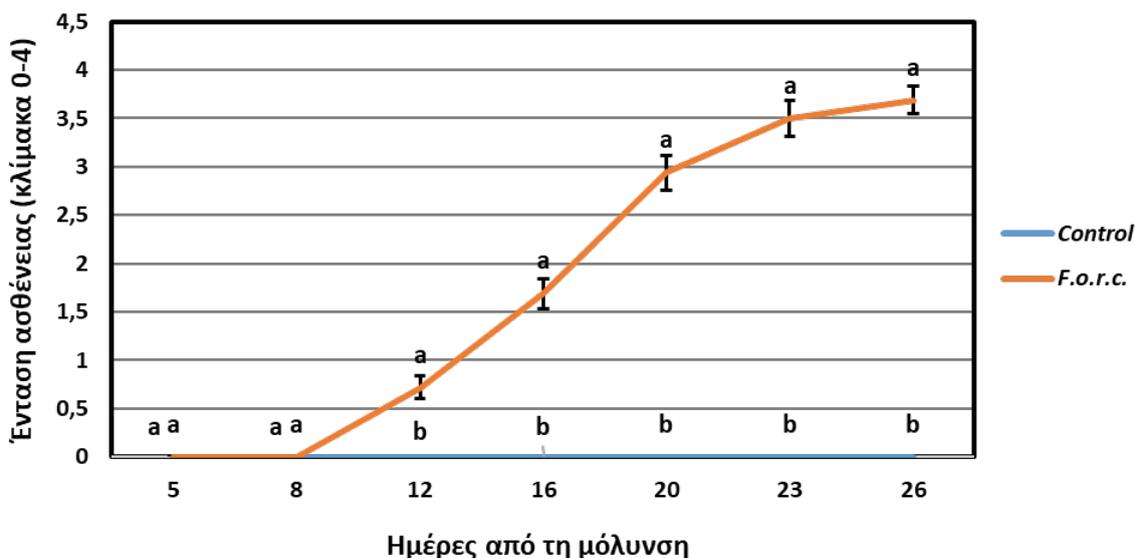
C-1	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)
C-2	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)
C-3	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)
C-4	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)
C-5	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)
FORC1	- (0,0)	- (0,0)	- (1,5)	- (1,0)	- (0,0)	- (4,0)	- (4,0)
FORC2	- (0,0)	- (0,0)	- (1,0)	- (2,0)	- (3,0)	- (3,0)	- (4,0)
FORC3	- (0,0)	- (0,0)	- (0,5)	- (1,0)	- (2,0)	- (3,5)	- (4,0)
FORC4	- (0,0)	- (0,0)	- (1,0)	- (2,0)	- (3,0)	- (4,0)	- (4,0)
FORC5	- (0,0)	- (0,0)	- (0,5)	- (1,0)	- (2,0)	- (3,5)	- (4,0)

Αποτελέσματα qcLAMP ακατέργαστων εκχυλισμάτων DNA

Ημέρες από τη μόλυνση

Επέμβαση	5	8	12	16	20	23	26
H₂O	-	-	-	-	-	-	-
C+	+	+	+	+	+	+	+
C-1	-	-	-	-	-	-	-
C-2	-	-	-	-	-	-	-
C-3	-	-	-	-	-	-	-
C-4	-	-	-	-	-	-	-
C-5	-	-	-	-	-	-	-
FORC1	-	-	+(28)	+(22)	-	+(18)	+(17)
FORC2	-	-	+(31)	-	+(22)	+(25)	+(19)
FORC3	-	-	-	-	+(20)	-	+(22)
FORC4	-	-	-	-	-	+(21,7)	+(19,5)
FORC5	-	-	-	+(28)	-	+(24)	+(20)

Με «+» συμβολίζεται η επιτυχής ανίχνευση του στόχου ενώ με «-» η μη-ανίχνευσή του. Στην παρένθεση απεικονίζεται η ένταση ασθένειας με κλίμακα 0-4 στο εκάστοτε δείγμα κατά τη χρονική στιγμή που συλλέχθηκε για να αναλυθεί.



Γράφημα 1.2.1-11. Αποτελέσματα εξέλιξης της ασθένειας σε φυτά αγγουριάς του αρνητικού μάρτυρα (Control-) και σε τεχνητά μολυσμένα φυτά (F.o.r.c.) στις 5, 8, 12, 16, 20, 23 και 26 ημέρες από τη μόλυνση. Εντός της ίδιας χρονικής στιγμής, τα σημεία των καμπυλών που δεν φέρουν το ίδιο γράμμα, διαφέρουν μεταξύ τους σημαντικά σύμφωνα με τη στατιστική δοκιμασία t-test ($p < 0.05$).

Πίνακας 1.2.1-9. Αποτελέσματα ανίχνευσης του παθογόνου F.o.r.c. με qPCR σε δείγματα ολικού DNA και σε δείγματα ακατέργαστων εκχυλισμάτων φυτών αγγουριάς που δέχθηκαν επέμβαση με νερό (C-) καθώς και φυτών που μολύνθηκαν τεχνητά με το παθογόνο (FORC), η δειγματοληψία των οποίων πραγματοποιήθηκε σε επτά διαφορετικές χρονικές στιγμές (5, 8, 12, 16, 20, 23 και 26 ημέρες από τη μόλυνση). Με έντονη γραφή απεικονίζονται οι τιμές που θεωρούνται ως επιτυχής ποσοτικοποίηση του DNA στόχου.

		Δείγματα ολικού DNA		Ακατέργαστα εκχυλίσματα DNA	
Ημέρες από τη μόλυνση	Επέμβαση	Σχετική ποσότητα DNA	Ένταση ασθένειας (0-4)	Σχετική ποσότητα DNA	Ένταση ασθένειας (0-4)
5 dpi	C-1	0,000	0,0	0,000	0,0
	C-2	0,000	0,0	0,000	0,0
	C-3	0,001	0,0	0,000	0,0
	C-4	0,000	0,0	0,000	0,0
	C-5	0,000	0,0	0,001	0,0
	FORC1	0,000	0,0	0,000	0,0
	FORC2	0,000	0,0	0,001	0,0
	FORC3	0,000	0,0	0,001	0,0
	FORC4	0,000	0,0	0,001	0,0
	FORC5	0,000	0,0	0,000	0,0
8 dpi	C-1	0,000	0,0	0,000	0,0
	C-2	0,001	0,0	0,000	0,0
	C-3	0,000	0,0	0,000	0,0

	C-4	0,001	0,0	0,001	0,0
	C-5	0,001	0,0	0,000	0,0
	FORC1	0,000	0,0	0,000	0,0
	FORC2	0,001	0,0	0,001	0,0
	FORC3	0,000	0,0	0,000	0,0
	FORC4	0,000	0,0	0,000	0,0
	FORC5	0,001	0,0	0,000	0,0
12 dpi	C-1	0,010	0,0	0,001	0,0
	C-2	0,003	0,0	0,001	0,0
	C-3	0,000	0,0	0,000	0,0
	C-4	0,001	0,0	0,001	0,0
	C-5	0,001	0,0	0,000	0,0
	FORC1	0,008	0,5	0,000	1,5
	FORC2	0,008	1,0	0,000	1,0
	FORC3	0,007	0,5	0,000	0,5
	FORC4	0,005	0,0	0,006	1,0
	FORC5	0,014	0,5	0,000	0,5
16dpi	C-1	0,001	0,0	0,000	0,0
	C-2	0,001	0,0	0,001	0,0
	C-3	0,001	0,0	0,000	0,0
	C-4	0,001	0,0	0,001	0,0
	C-5	0,000	0,0	0,001	0,0
	FORC1	0,001	1,0	0,088	1,0
	FORC2	0,000	1,0	0,011	2,0
	FORC3	0,000	3,0	0,058	1,0
	FORC4	0,007	3,0	0,081	2,0
	FORC5	0,006	1,0	0,055	1,0
20dpi	C-1	0,003	0,0	0,001	0,0
	C-2	0,002	0,0	0,002	0,0
	C-3	0,001	0,0	0,002	0,0
	C-4	0,001	0,0	0,003	0,0
	C-5	0,002	0,0	0,003	0,0
	FORC1	0,008	4,0	0,005	0,0
	FORC2	0,758	4,0	0,001	3,0
	FORC3	0,033	2,0	0,002	2,0
	FORC4	0,005	1,0	0,002	3,0
	FORC5	0,004	3,0	0,001	2,0
23dpi	C-1	0,001	0,0	0,001	0,0
	C-2	0,000	0,0	0,002	0,0
	C-3	0,000	0,0	0,002	0,0
	C-4	0,000	0,0	0,002	0,0

	C-5	0,001	0,0	0,001	0,0
	FORC1	0,022	4,0	0,001	4,0
	FORC2	0,016	2,5	0,020	3,0
	FORC3	1,085	4,0	0,006	3,5
	FORC4	0,021	3,5	0,000	4,0
	FORC5	2,279	4,0	0,107	3,5
26dpi	C-1	0,002	0,0	0,003	0,0
	C-2	0,001	0,0	0,003	0,0
	C-3	0,001	0,0	0,002	0,0
	C-4	0,001	0,0	0,002	0,0
	C-5	0,000	0,0	0,002	0,0
	FORC1	0,044	4,0	0,001	4,0
	FORC2	0,320	4,0	0,072	4,0
	FORC3	3,973	4,0	0,254	4,0
	FORC4	1,140	4,0	0,435	4,0
	FORC5	2,213	4,0	0,002	4,0



Εικόνα 1.2.1-7. Εξέλιξη των συμπτωμάτων σε φυτά αγγουριάς τεχνητά μολυσμένων με το μύκητα *Fusarium oxysporum f.sp. radicle cucumerinum*, στις 5, 8, 12, 16, 20, 23 και 26 ημέρες από τη μόλυνση. Στο πράσινο πλαίσιο απεικονίζεται ασυμπτωματικό φυτό στις 5 ημέρες από τη μόλυνση στο οποίο κατέστη δυνατή η προ-συμπτωματική ανίχνευση του παθογόνου με την qCLAMP σε δείγμα ακατέργαστου εκχυλίσματος, ενώ στο κόκκινο πλαίσιο απεικονίζεται ένα ασθενές φυτό στις 16 ημέρες από τη μόλυνση το οποίο εκδήλωσε συμπτώματα για πρώτη φορά κατά τη διάρκεια της βιοδοκιμής.

3.3 Παθοσύστημα *Verticillium dahliae* - Τομάτα

Για την αξιολόγηση της **έγκαιρης ανιχνευτικής ικανότητας** του *V. dahliae* με την qCLAMP, πραγματοποιήθηκε τεχνητή μόλυνση φυτών τομάτας (υβρίδιο Belladonna F1) με ριζότισμα **40 ml** κονιδιακού αιωρήματος του παθογόνου, συγκέντρωσης **5×10⁶ κονίδια/ml** (Εικόνα 1.2.1-9). Φυτά τα οποία ριζοποτήθηκαν με αποστειρωμένο νερό αποτέλεσαν τους μάρτυρες του πειράματος. Οι δειγματοληψίες των τεχνητά μολυσμένων φυτών τομάτας και των αντίστοιχων μαρτύρων πραγματοποιήθηκαν σε επτά χρονικές στιγμές από τη μόλυνση (3, 6, 8, 10, 13, 16 και 20 ημέρες από τη μόλυνση). Σε κάθε δειγματοληψία (χρονική στιγμή) λήφθηκαν δέκα τεχνητά μολυσμένα φυτά και δέκα φυτά αρνητικού μάρτυρα. Πριν τη συλλογή του, το καθένα φυτό αξιολογήθηκε ως προς την συμπτωματολογική του εικόνα, καταγράφοντας τον αριθμό των ασθενών φύλλων προς τον συνολικό αριθμό των φύλλων (έκφραση σε ποσοστό %). Ακολούθησε καταστροφική δειγματοληψία και **εξαγωγή ολικού DNA με τη μέθοδο CTAB**

(από 5 φυτά της κάθε επέμβασης/χρονική στιγμή) καθώς και **προετοιμασία ακατέργαστων φυτικών εκχυλισμάτων** (από 5 φυτά της κάθε επέμβασης/χρονική στιγμή). Επιπροσθέτως, 16 επιπλέον φυτά τα οποία είχαν μολυνθεί με το παθογόνο και ισάριθμα φυτά μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να καταγράφεται η εξέλιξη της ασθένειας στον χρόνο ώστε να διασφαλιστεί η επιτυχία της μόλυνσης.

Για την ανίχνευση του παθογόνου στα δείγματα ολικού DNA και στα δείγματα ακατέργαστων εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε συμβατική PCR (όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 1) αλλά και qPCR. Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκαν εξειδικευμένοι εκκινητές του παθογόνου (VD1_ITS1-F / VD1_ITS2-R) και του εσωτερικού γονιδίου αναφοράς *ACTIN* της τομάτας (SolACT-F/SolACT-R) που απεικονίζονται στον Πίνακα 1.2.1-1. Η σχετική ποσότητα DNA στα επιμέρους δείγματα προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας την μέθοδο $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak et al., 2001). Όλες οι αντιδράσεις Real-Time PCR πραγματοποιήθηκαν στην συσκευή QuantStudio 3 Real-Time PCR System (ThermoFisher, Waltham, USA) χρησιμοποιώντας το kit PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (ThermoFisher, Waltham, USA) και εφαρμόζοντας το ακόλουθο πρόγραμμα για το *V.dahliae*: α. αρχικό στάδιο μετουσίωσης στους 95°C για 3 λεπτά, ακολουθούμενο από 40 κύκλους με τα στάδια μετουσίωσης, υβριδισμού και ενίσχυσης στους 95°C, 60°C και 72 °C, για 30, 30 και 30 δευτερόλεπτα αντίστοιχα, και β. Για το γονίδιο SolACT πραγματοποιήθηκε έναρξη της αντίδρασης με ένα αρχικό στάδιο μετουσίωσης στους 95°C για 3 λεπτά, ακολουθούμενο από 40 κύκλους με τα στάδια μετουσίωσης, υβριδισμού και ενίσχυσης στους 95°C, 60°C και 72°C, για 30, 30 και 30 δευτερόλεπτα αντίστοιχα. Τα ενισχυμένα προϊόντα στις επιμέρους αντιδράσεις αξιολογήθηκαν παρατηρώντας τις καμπύλες μετουσίωσης για καθένα δείγμα, ξεκινώντας από τους 60°C για 1 λεπτό και αυξάνοντας τη θερμοκρασία με ρυθμό 0.15°C ανά δευτερόλεπτο, έως τους 95°C. Για την ανάλυση των δεδομένων, οι μέσες τιμές Ct για κάθε γονίδιο υπολογίστηκαν με βάση τα ανεξάρτητα βιολογικά δείγματα ανά επέμβαση.

Βάσει των αποτελεσμάτων των αντιδράσεων της συμβατικής PCR στα δείγματα ολικού DNA, το παθογόνο ανιχνεύθηκε επιτυχώς στις **13 ημέρες από τη μόλυνση σε 3 από τα 5 φυτά** τομάτας όπου τα συμπτώματα της ασθένειας ήταν ορατά μακροσκοπικά (δείκτης ασθένειας 40, 50 και 60% αντίστοιχα). Επιπλέον, το παθογόνο ανιχνεύθηκε επιτυχώς στις 16 (5/5 δείγματα) και στις 20 (5/5) ημέρες από τη μόλυνση όταν η ασθένεια ήταν σε αρκετά προχωρημένο στάδιο βάσει των καταγραφών και βάσει της εξέλιξης της ασθένειας του μάρτυρα (Γράφημα 1.2.1-4). Αντίθετα, στις αντιδράσεις PCR που πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα ακατέργαστων εκχυλισμάτων, το παθογόνο δεν ανιχνεύθηκε σε καμία χρονική στιγμή (Πίνακας 1.2.1-9).

Βάσει των αποτελεσμάτων της PCR στα δείγματα καθαρού ολικού DNA, το παθογόνο ανιχνεύθηκε επιτυχώς για πρώτη φορά στις **13 ημέρες από τη μόλυνση σε 4 από τα 5 τεχνητά μολυσμένα φυτά τομάτας**. Κατά την ίδια χρονική στιγμή παρατηρήθηκε και η εκθετική φάση της εξέλιξης των συμπτωμάτων στα τεχνητά μολυσμένα φυτά που προορίζονταν για την παρακολούθηση της εξέλιξης των συμπτωμάτων της ασθένειας (Πίνακας 1.2.1-10, Γράφημα

1.2.1-4). Στις 16 και 20 ημέρες από τη μόλυνση η qPCR ανίχνευσε ως θετικά 5/5 και 5/5 φυτά, αντίστοιχα (Πίνακας 1.2.1-10, Γράφημα 1.2.1-12). Βάσει των αποτελεσμάτων της ίδιας μεθόδου (qPCR), στα δείγματα ακατέργαστων εκχυλισμάτων, το παθογόνο ανιχνεύθηκε επιτυχώς για πρώτη φορά στις 13 ημέρες από τη μόλυνση σε 3/5 τεχνητά μολυσμένα φυτά, ενώ στις 16 και 20 ημέρες από τη μόλυνση η qPCR ανίχνευσε ως θετικά, 4/5 και 5/5 φυτά, αντίστοιχα (Πίνακας 1.2.1-10, Γράφημα 1.2.1-12). Τέλος μέσω της μεθόδου qCLAMP, το παθογόνο ανιχνεύτηκε πρώτη φορά στις 3 μέρες με συχνότητα 1/5 φυτά, έχοντας ως αρχικό υλικό απομονωμένο DNA, ενώ με το ακατέργαστο εκχύλισμα το παθογόνο ανιχνεύεται πρώτη φορά επίσης στις 3 μέρες με συχνότητα 2/5. Τα αποτελέσματα της qCLAMP φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 1.2.1-10.



Εικόνα 1.2.1-8. Διαδικασία τεχνητή μόλυνσης φυτών (Solanaceae) με το παθογόνο *V. dahliae*.

Πίνακας 1.2.1-10. Αποτελέσματα ανίχνευσης του παθογόνου *V. dahliae* με συμβατική PCR και qCLAMP σε δείγματα ολικού DNA και σε δείγματα ακατέργαστων εκχυλισμάτων φυτών τομάτας που δέχθηκαν επέμβαση με νερό (C-) καθώς και φυτών που μολύνθηκαν τεχνητά με το παθογόνο (VD). Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκε σε επτά διαφορετικές χρονικές στιγμές (3, 6, 8, 10, 13, 16 και 20 ημέρες από τη μόλυνση). Στην qCLAMP αναφέρεται ο χρόνος σε λεπτά θετικού σήματος στα φυτά όπου ανιχνεύτηκε το παθογόνο.

Αποτελέσματα PCR δειγμάτων ολικού DNA

Ημέρες από τη μόλυνση

Επέμβαση	3	6	8	10	13	16	20
H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-
C+	+	+	+	+	+	+	+
TC1	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)
TC2	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)
TC3	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)
TC4	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)
TC5	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)
VD1	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	+	+	- (50%)

					(40%)	(33%)	
VD2	- (0%)	- (0%)	- (25%)	- (0%)	- (20%)	+ (60%)	-(50%)
VD3	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	+ (50%)	+ (50%)	+ (50%)
VD4	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	+ (60%)	+ (50%)	+ (33%)
VD5	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (25%)	- (25%)	+ (40%)	+ (50%)

Αποτελέσματα PCR ακατέργαστων εκχυλισμάτων DNA

Ημέρες από τη μόλυνση

Επέμβαση	3	6	8	10	13	16	20
H₂O	-	-	-	-	-	-	-
C+	+	+	+	+	+	+	+
TC1	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)
TC2	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)
TC3	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)
TC4	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)
TC5	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)
VD1	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (60%)	- (40%)	- (40%)
VD2	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (25%)	- (60%)	- (40%)	- (40%)
VD3	- (0%)	- (0%)	- (25%)	- (25%)	- (20%)	- (33%)	- (33%)
VD4	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (25%)	- (40%)	- (40%)
VD5	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (50%)	- (40%)	- (60%)	- (60%)

Αποτελέσματα qcLAMP δειγμάτων ολικού DNA

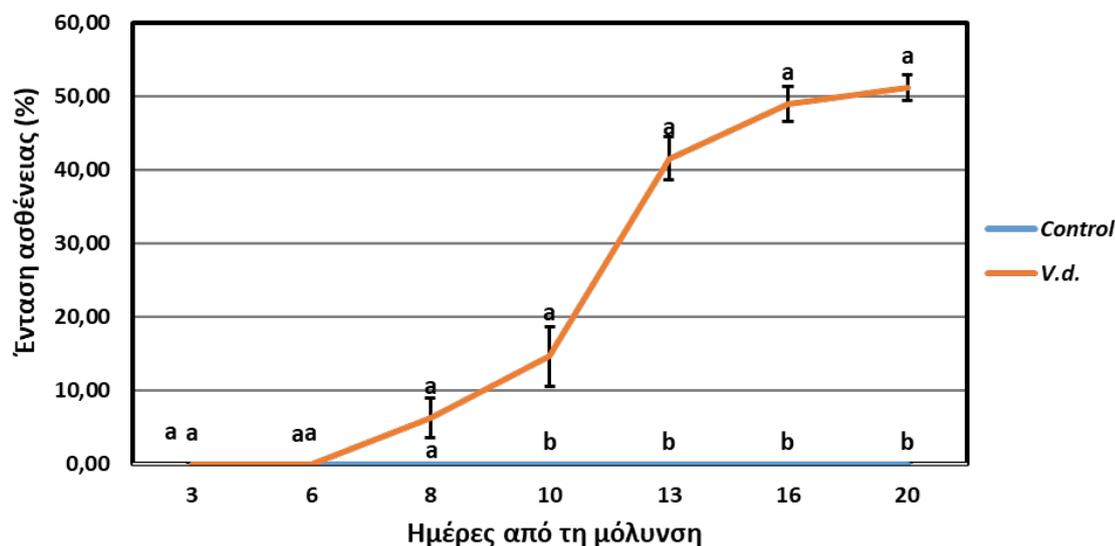
Ημέρες από τη μόλυνση

Επέμβαση	3	6	8	10	13	16	20
H₂O	-	-	-	-	-	-	-
C+	+	+	+	+	+	+	+
TC1	-	-	-	-	-	-	-
TC2	-	-	-	-	-	-	-
TC3	-	-	-	-	-	-	-
TC4	-	-	-	-	-	-	-
TC5	-	-	-	-	-	-	-
VD1	-	+16,7	+17,2	+17	+16,2	+ (33%)	+26
VD2	+16,7	-	-	+15,3	+15	+ (60%)	-
VD3	-	+17,2	+23	+17,5	+16,3	+ (50%)	+19
VD4	-	+17	+17,5	+21,5	+ 16,2	+ (50%)	+17,3
VD5	-	+19,8	-	+24,7	-	+	+16,3

(40%)

Αποτελέσματα qCLAMP ακατέργαστων εκχυλισμάτων DNA							
Ημέρες από τη μόλυνση							
Επέμβαση	3	6	8	10	13	16	20
H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-
C+	+	+	+	+	+	+	+
TC1	-	-	-	-	-	-	-
TC2	-	-	-	-	-	-	-
TC3	-	-	-	-	-	-	-
TC4	-	-	-	-	-	-	-
TC5	-	-	-	-	-	-	-
VD1	-	+20	+22,5	-	+25,5	+26	+22
VD2	-	+20,5	-	-	+28,2	+22,7	+23
VD3	+19	-	+28	+15	+29	-	+23
VD4	+18	+18,5	+17	+19,5	+27,5	+18,5	+20
VD5	-	+17,5	+18,5	+16	+19,5	+20	+23

Με «+» συμβολίζεται η επιτυχής ανίχνευση του στόχου ενώ με «-» η μη-ανίχνευσή του. Στην παρένθεση απεικονίζεται η ένταση ασθένειας (%) στο εκάστοτε δείγμα κατά τη χρονική στιγμή που συλλέχθηκε για να αναλυθεί.



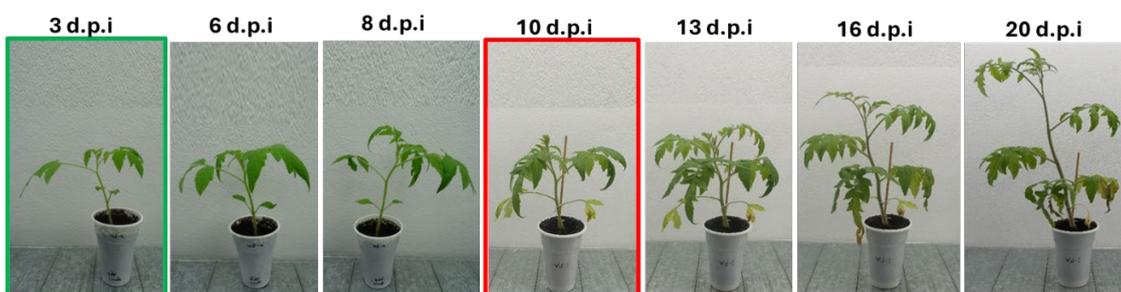
Γράφημα 1.2.1-12. Αποτελέσματα εξέλιξης της ασθένειας σε φυτά τομάτας του αρνητικού μάρτυρα (Control) και σε τεχνητά μολυσμένα φυτά (V.d.) στις 3, 6, 8, 10, 13, 16 και 20 ημέρες από τη μόλυνση. Εντός της ίδιας χρονικής στιγμής, τα σημεία των καμπυλών που δεν φέρουν το ίδιο γράμμα, διαφέρουν μεταξύ τους σημαντικά σύμφωνα με τη στατιστική δοκιμασία t-test ($p < 0.05$).

Πίνακας 1.2.1-11. Αποτελέσματα ανίχνευσης του παθογόνου V.d. με qPCR σε δείγματα ολικού DNA και σε δείγματα ακατέργαστων εκχυλισμάτων φυτών αγγουριάς που δέχθηκαν επέμβαση με νερό (C-) καθώς και φυτών που μολύνθηκαν τεχνητά με το

παθογόνο (VD), η δειγματοληψία των οποίων πραγματοποιήθηκε σε επτά διαφορετικές χρονικές στιγμές (3, 6, 8, 10, 13, 16 και 20 ημέρες από τη μόλυνση). Με έντονη γραφή απεικονίζονται οι τιμές που θεωρούνται ως επιτυχής ποσοτικοποίηση του DNA στόχου.

Ημέρες από τη μόλυνση	Επέμβαση	Δείγματα ολικού DNA		Ακατέργαστα εκχυλίσματα DNA	
		Σχετική ποσότητα DNA	Ένταση ασθένειας (%)	Σχετική ποσότητα DNA	Ένταση ασθένειας (%)
3 dpi	C-1	0,004	0%	0,000	0%
	C-2	0,003	0%	0,002	0%
	C-3	0,002	0%	0,002	0%
	C-4	0,000	0%	0,000	0%
	C-5	0,001	0%	0,000	0%
	VD1	0,000	0%	0,002	0%
	VD2	0,000	0%	0,001	0%
	VD3	0,000	0%	0,001	0%
	VD4	0,002	0%	0,002	0%
	VD5	0,002	0%	0,001	0%
6 dpi	C-1	0,000	0%	0,000	0%
	C-2	0,000	0%	0,000	0%
	C-3	0,002	0%	0,000	0%
	C-4	0,000	0%	0,001	0%
	C-5	0,002	0%	0,002	0%
	VD1	0,003	0%	0,000	0%
	VD2	0,000	0%	0,000	0%
	VD3	0,003	0%	0,000	0%
	VD4	0,000	0%	0,000	0%
	VD5	0,000	0%	0,000	0%
8 dpi	C-1	0,003	0%	0,000	0%
	C-2	0,000	0%	0,000	0%
	C-3	0,000	0%	0,001	0%
	C-4	0,002	0%	0,000	0%
	C-5	0,002	0%	0,000	0%
	VD1	0,001	0%	0,001	0%
	VD2	0,008	25%	0,002	0%
	VD3	0,001	0%	0,002	25%
	VD4	0,001	0%	0,002	0%
	VD5	0,002	0%	0,006	0%
10dpi	C-1	0,001	0%	0,000	0%
	C-2	0,003	0%	0,001	0%
	C-3	0,002	0%	0,000	0%
	C-4	0,001	0%	0,002	0%
	C-5	0,002	0%	0,002	0%
	VD1	0,001	0%	0,001	0%
	VD2	0,002	0%	0,002	25%
	VD3	0,002	0%	0,002	25%

	VD4	0,001	0%	0,003	0%
	VD5	0,004	25%	0,283	50%
13dpi	C-1	0,005	0%	0,001	0%
	C-2	0,003	0%	0,003	0%
	C-3	0,001	0%	0,002	0%
	C-4	0,002	0%	0,001	0%
	C-5	0,001	0%	0,000	0%
	VD1	0,096	40%	0,067	60%
	VD2	0,119	20%	0,129	60%
	VD3	0,090	50%	0,192	20%
	VD4	0,002	60%	0,001	25%
	VD5	0,029	25%	0,003	40%
16dpi	C-1	0,002	0%	0,001	0%
	C-2	0,001	0%	0,000	0%
	C-3	0,001	0%	0,000	0%
	C-4	0,000	0%	0,001	0%
	C-5	0,000	0%	0,001	0%
	VD1	0,044	33%	0,118	40%
	VD2	0,041	60%	0,004	40%
	VD3	0,012	50%	0,377	33%
	VD4	0,071	50%	0,012	40%
	VD5	0,106	40%	0,119	60%
20dpi	C-1	0,000	0%	0,003	0%
	C-2	0,000	0%	0,001	0%
	C-3	0,000	0%	0,001	0%
	C-4	0,002	0%	0,002	0%
	C-5	0,001	0%	0,002	0%
	VD1	0,119	50%	0,974	40%
	VD2	0,076	50%	0,947	40%
	VD3	0,007	50%	0,256	33%
	VD4	0,208	33%	1,566	40%
	VD5	0,205	50%	3,301	60%

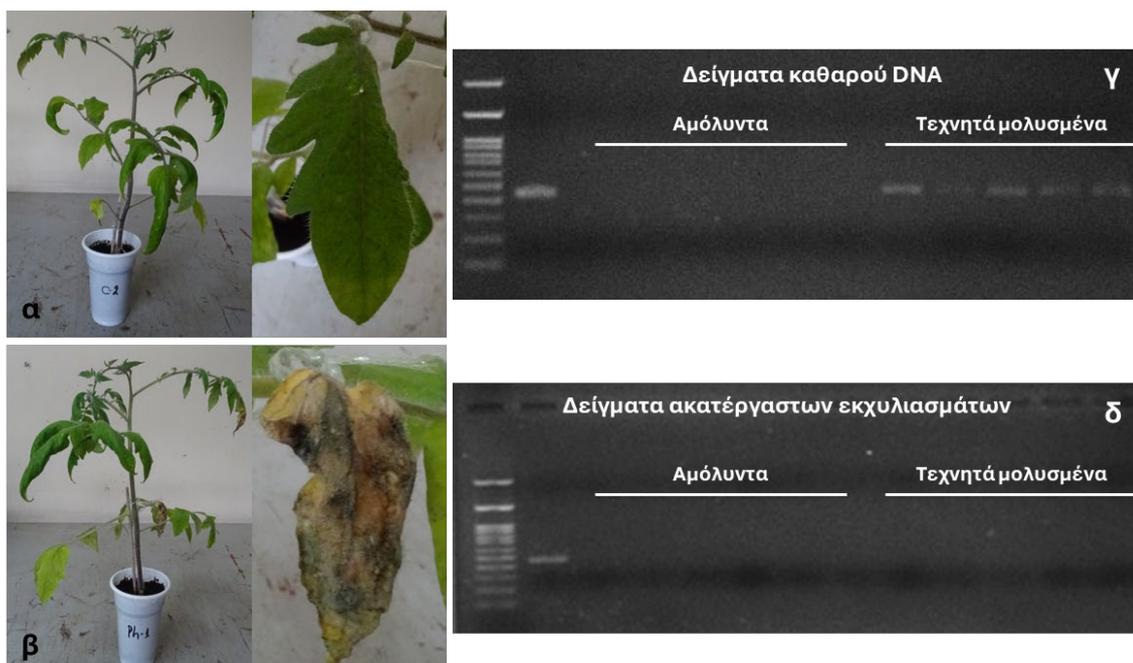


Εικόνα 1.2.1-9. Εξέλιξη των συμπτωμάτων σε φυτά τομάτας τεχνητά μολυσμένων με το μύκητα *Verticillium dahliae*, στις 3, 6, 8, 10, 13, 16 και 20 ημέρες από τη μόλυνση. Στο πράσινο πλαίσιο απεικονίζεται ασυμπτωματικό φυτό στις 5 ημέρες από τη μόλυνση στο οποίο κατέστη δυνατή η προ-συμπτωματική ανίχνευση του παθογόνου με την qcLAMP σε δείγμα ακατέργαστου εκχυλίσματος, ενώ στο κόκκινο πλαίσιο απεικονίζεται ένα ασθενές φυτό στις 10 ημέρες από τη μόλυνση το οποίο εκδήλωσε συμπτώματα για πρώτη φορά κατά τη διάρκεια της βιοδοκιμής.

3.3 Παθοσύστημα *Phytophthora infestans* - Τομάτα

Στο παθοσύστημα *P. infestans*–τομάτα δεν κατέστη δυνατή η διεξαγωγή πειράματος μελέτης της έγκαιρης ανιχνευτικής ικανότητας της μεθόδου, λόγω δυσκολιών που σχετίζονται με τη φύση του παθογόνου (απώλεια παθογόνου ικανότητας μετά από μερικές ανακαλλιέργειες). Ωστόσο, πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικές δοκιμές παθογένειας από τις οποίες συλλέχθηκε και συντηρήθηκε σε βαθιά κατάψυξη (-80°C) ιστός από αμόλυντα (αρνητικός μάρτυρας) και τεχνητά μολυσμένα φυτά τομάτας (υβρίδιο Belladonna F1). Αναφορικά με την τεχνητή μόλυνση, πραγματοποιήθηκε εμβάπτιση των φύλλων εντός σπορειαγγειακού αιωρήματος συγκέντρωσης **1×10⁵ σποριάγγεια/ml**. Έπειτα από την έναρξη εκδήλωσης των συμπτωμάτων της ασθένειας στα φύλλα (2 ημέρες μετά τη μόλυνση) και την παρακολούθηση της ομαλής τους εξέλιξης (έως τις 9 ημέρες από τη μόλυνση), από τα φυλλάρια των μολυσμένων φυτών και από τους αντίστοιχούς μάρτυρες αποκόπηκαν 10 δισκία (διαμέτρου 10 mm) ανά επέμβαση. Από τα πέντε δισκία της εκάστοτε επέμβασης πραγματοποιήθηκε **εξαγωγή ολικού DNA με τη μέθοδο CTAB** και από τα υπόλοιπα πέντε προετοιμάστηκαν **ακατέργαστα εκχυλίσματα**.

Βάσει των αποτελεσμάτων της συμβατικής PCR, το παθογόνο ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα καθαρού ολικού DNA (5/5) που προήλθαν από τεχνητά μολυσμένα φυτά αλλά σε κανένα δείγμα των φυτών του μάρτυρα. Αντιθέτως, με τη συγκεκριμένη μέθοδο δεν ανιχνεύθηκε το παθογόνο σε κανένα δείγμα ακατέργαστου εκχυλίσματος (0/5) (Εικόνα 1.2.1-11). Ωστόσο, με τη μέθοδο qCLAMP, το παθογόνο ανιχνεύτηκε και στα 5 φυτά σε όλα τα ακατέργαστα και στα δείγματα ολικού DNA. Σε κανένα αμόλυντο φυτό δεν ανιχνεύτηκε το παθογόνο (Πίνακας 1.2.1-12).



Εικόνα 1.2.1-10. Αντιπροσωπευτικό φυτό και φυλλάριο (α.) αρνητικού μάρτυρα και (β.) τεχνητά μολυσμένου με το παθογόνο *Phytophthora infestans* τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη προετοιμασία των δειγμάτων καθαρού ολικού DNA και ακατέργαστων εκχυλισμάτων. (γ.) Το παθογόνο ανιχνεύθηκε επιτυχώς σε όλα τα

Δείγματα καθαρού ολικού DNA ενώ (δ.) δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα δείγμα ακατέργαστου εκχυλίσματος.

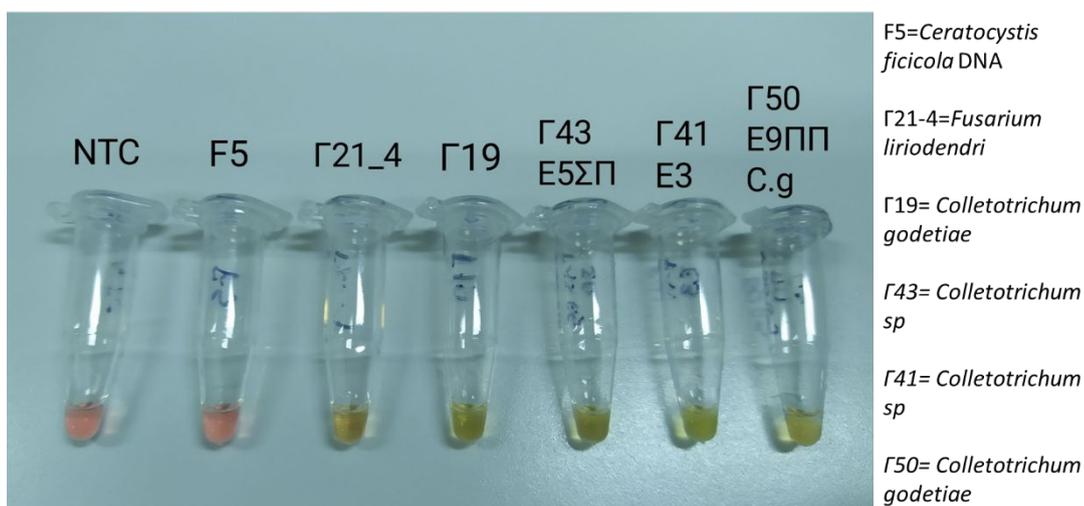
Πίνακας 1.2.1-12. Αποτελέσματα ανίχνευσης του παθογόνου *P. infestans* με qCLAMP σε δείγματα ολικού DNA και σε δείγματα ακατέργαστων εκχυλισμάτων φυτών τομάτας που δέχθηκαν επέμβαση με νερό (C-) καθώς και φυτών που μολύνθηκαν τεχνητά με το παθογόνο (PI). Αναφέρεται ο χρόνος ανίχνευσης σε λεπτά.

Δείγμα	Ολικό DNA	Ακατέργαστο εκχύλισμα
C1	-	-
C2	-	-
C3	-	-
C4	-	-
C5	-	-
PI1	16,7	15,3
PI2	15	15
PI3	15,2	14,5
PI4	17	14,2
PI5	16	14,8

Γ. Μύκητας *Colletrichum sp.*

Εκτίμηση εξειδίκευσης και ευαισθησίας νέων εκκινητών.

Οι εκκινητές *Colletotrichum* spp. αξιολογήθηκαν ως προς την εξειδίκευσή τους σε 20 ng DNA ανά 20 μl αντίδραση από είδη *C. godetiae* και *C. acutatum* σαν οργανισμούς – στόχους και σε *Ceratocystis ficicola*, *Fusarium lirioidendri* σαν οργανισμούς μη στόχους.



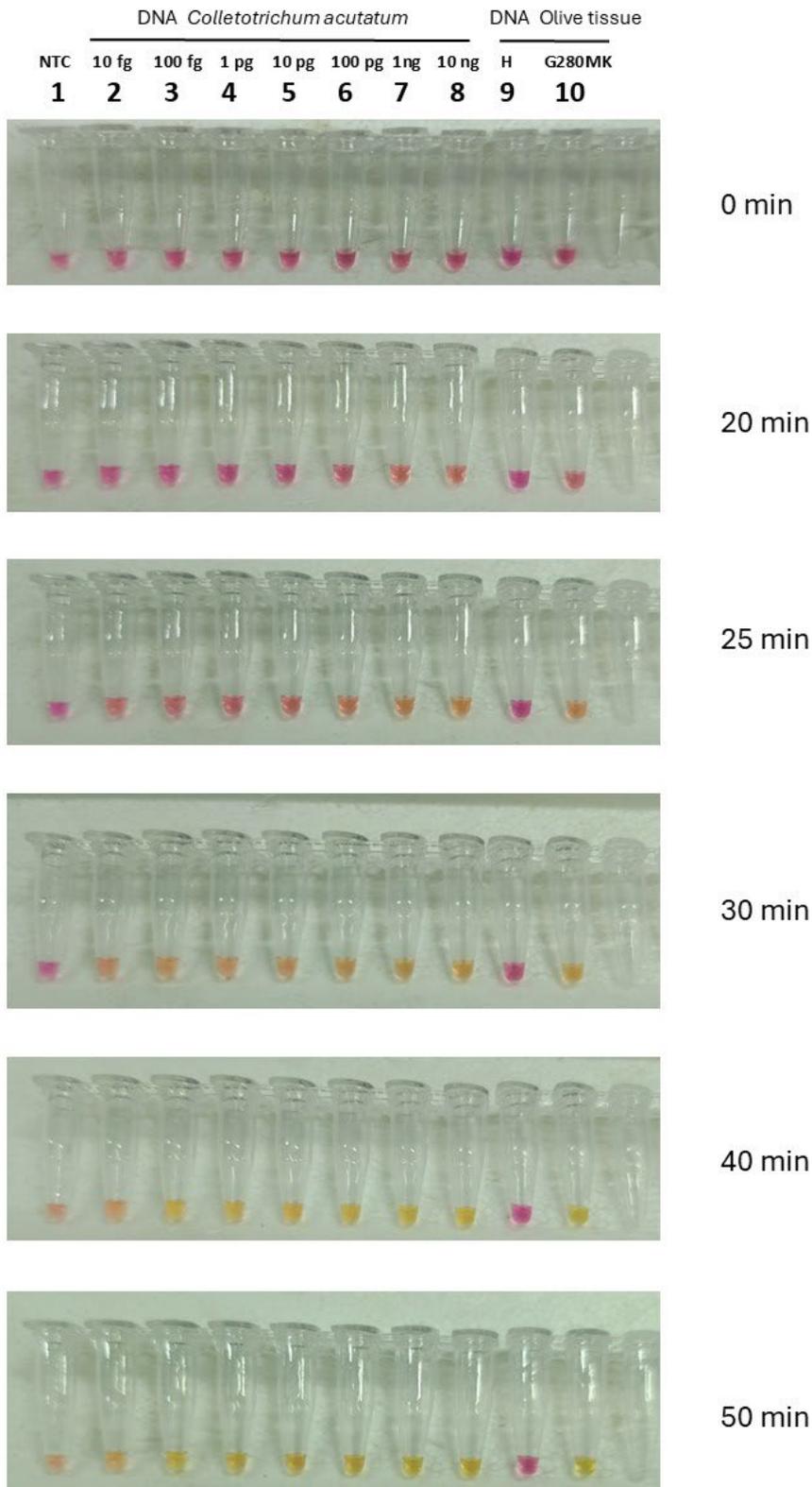
Εικόνα 1.2.1-3: Εξειδίκευση αντίδρασης LAMP για ανίχνευση γλοιοσπορίου σε 20 ng DNA ανά 20 μl αντίδρασης μυκήτων στόχων και μη στόχων 60 min μετά την αντίδραση σε 65°C.

Από τα αποτελέσματα της αντίδρασης φαίνεται ότι οι εκκινητές είναι εξειδικευμένοι για το γένος *Colletotrichum*. Η θετική αντίδραση στο μύκητα *F. lirioidendri*, αποδόθηκε σε πιθανή επιμόλυνση του DNA με DNA γλοιοσπορίου.

Όριο ανίχνευσης των εκκινητών LAMP *Colletotrichum sp.* και ανίχνευση στο DNA φυτικού ιστού ελαιοδέντρου

Για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας των εκκινητών LAMP, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις σε DNA του είδους *C. godetiae* από 10 fg έως 10 ng. Επιπλέον, συμπεριλήφθηκε δείγμα DNA από υγιή ιστό ελιάς και δείγμα ιστού ελιάς στον οποίο είχε ποσοτικοποιηθεί το DNA *Colletotrichum* spp. με TaqMan qPCR. Οι αντιδράσεις LAMP

πραγματοποιήθηκαν σε όγκο 10 μl για σύγκριση με τα αποτελέσματα των αντιδράσεων TaqMan στα ίδια δείγματα.



Εικόνα 1.2.1-4: Αντίδραση LAMP με εκκινητές *Colletotrichum* sp. σε ddH₂O (NTC, σωληνάριο 1), σε σειριακές αραιώσεις DNA *Colletotrichum godetiae* (σωληνάρια 2-8) (για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας) και σε DNA από ιστό ελιάς (σωληνάρια 9-10) για τον προσδιορισμό της ανίχνευσης γλοιοσπορίου σε φυτικό ιστό. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε όγκο αντίδρασης 10 μl. Η αλλαγή χρώματος καταγράφηκε σε διαφορετικά χρονικά σημεία. Η ισοθερμική αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 65 °C.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι εκκινητές LAMP *Colletotrichum* sp. παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία, ανιχνεύοντας έως και 10 fg DNA μυκήτων του γένους *Colletotrichum* sp. σε 30 λεπτά αντίδρασης (Εικόνα 1.2.1-4). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι το *Colletotrichum* sp. ανιχνεύθηκε στον ίδιο χρόνο (30 λεπτά) στο DNA του δείγματος φυτικού ιστού ελιάς (Εικόνα 1.2.1-4, σωληνάριο 10), ενώ δεν παρατηρήθηκε αλλαγή χρώματος στο DNA από υγιή ελιά (Εικόνα 1.2.1-4, σωληνάριο 9). Για λόγους σύγκρισης, το DNA ειδών του γένους *Colletotrichum* sp. ποσοτικοποιήθηκε επίσης στο δείγμα G280MK με εφαρμογή TaqMan qPCR με εκκινητές ειδικούς για το γένος *Colletotrichum* (Garido et al., 2008).

Ανίχνευση ειδών του γένους *Colletotrichum* με εκκινητές LAMP σε μη επεξεργασμένα δείγματα φυτικού ιστού εσπεριδοειδών

Προκειμένου να αξιολογηθούν οι εκκινητές LAMP για το γένος *Colletotrichum* σε φυτικό ιστό εσπεριδοειδών και να βγούνε συμπεράσματα για την παθογένεια των τριών ειδών *Colletotrichum* (*C. acutatum*, *C. godetiae*, *C. nymphaeae*), ακολουθήθηκε ο εξής πειραματικός σχεδιασμός:

Αποστειρώθηκαν τρία είδη εσπεριδοειδών (πορτοκάλια, λεμόνια, μανταρίνια) σε υδατικό διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου (10% εμπορική χλωρίνη) για 10 λεπτά (Εικόνα 1.2.1-5) (προηγουμένως είχαν πλυθεί με σαπουνόνερο για να απομακρυνθούν κήροι και σωματίδια). Για την προετοιμασία των μολυσμάτων, προστέθηκαν 10 ml αποστειρωμένου νερού στην επιφάνεια των τρυβλίων και πραγματοποιήθηκε απόξεση των μυκηλίων με νυστέρι (Εικόνα 1.2.1-6). Στη συνέχεια το αιώρημα φιλτραρίστηκε με αποστειρωμένη γάζα (Εικόνα 1.2.1-7) και μετρήθηκε η συγκέντρωση των κονιδίων σε αιματοκυτταρόμετρο. Η συγκέντρωση των αιωρημάτων κονιδίων ήταν $3 \cdot 10^5$ κονίδια/ml για τα είδη *C. acutatum* και *C. nymphaeae* με τα οποία ψεκάστηκαν καρποί πορτοκαλιού, λεμονιού και μανταρινιού (Εικόνα 1.2.1-8). Για το είδος *C. godetiae* ψεκάστηκαν μόνο πορτοκάλια γιατί δεν είχε αναπτυχθεί καλά η καλλιέργεια στο τρυβλίο. Συμπληρωματικά για τα είδη *C. acutatum* και *C. nymphaeae* πραγματοποιήθηκαν και ψεκασμοί σε πορτοκάλια, μανταρίνια και λεμόνια με τις συγκεντρώσεις $5 \cdot 10^7$. Σε ένα πορτοκάλι πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός με αιώρημα συγκέντρωσης $3 \cdot 10^5$ του είδους *C. acutatum* (Εικόνα 1.2.1-9). Οι καρποί επώαστηκαν στους 25 ° C σε σκοτεινό θάλαμο.



Εικόνα 1.2.1-5: Αποστείρωση εσπεριδοειδών (πορτοκάλια, λεμόνια, μανταρίνια) σε υδατικό διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου (10% εμπορική χλωρίνη) για 10 λεπτά.



Εικόνα 1.2.1-6 & 1.2.1-7: Προετοιμασία μολυσμάτων



Εικόνα 1.2.1-8: μόλυνση εσπεριδοειδών με ψεκασμό αιωρήματος κονιδίων.

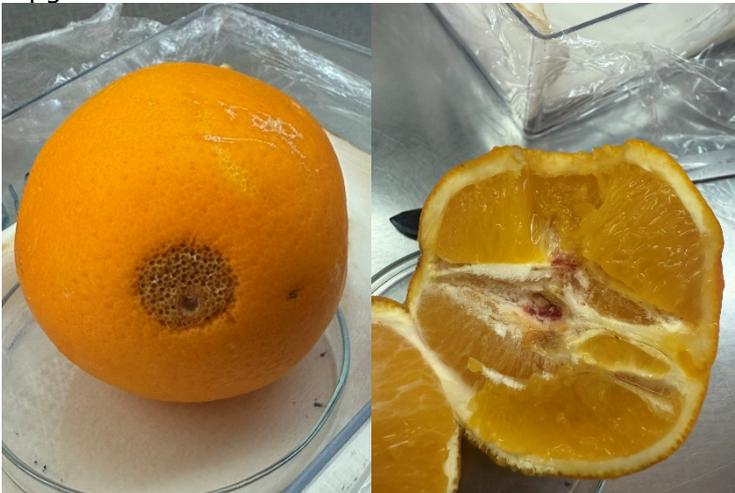


Εικόνα 1.2.1-9: μόλυνση πορτοκαλιού με εμβολιασμό.

Αποτελέσματα

Έξι μέρες μετά την μόλυνση, παρατηρήθηκαν οι καρποί και διαπιστώθηκε ότι είχε προσβληθεί μόνο ο καρπός πορτοκαλιάς στον οποίο είχε γίνει μόλυνση με πληγή (Εικόνα 1.2.1-8). Για την

αξιολόγηση των εκκινητών LAMP για είδη του γένους *Colletotrichum* σε φυτικούς ιστούς εσπεριδοειδών, χρησιμοποιήθηκε ιστός από τον καρπό πορτοκαλιού που έφερε συμπτώματα. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ιστός από την επιδερμίδα του καρπού (Orange lesion) (Εικόνα 1.2.1-10) καθώς και αιώρημα από το μεσοκάρπιο (Orange wound COL) (Εικόνα 1.2.1-10). Στο εκχύλισμα Orange lesion πραγματοποιήθηκαν δύο διαδοχικές αραιώσεις (10^{-1} και 10^{-2}) ενώ στο εκχύλισμα Orange wound έγιναν τρεις διαδοχικές αραιώσεις (10^{-1} , 10^{-2} και 10^{-3}). Για περαιτέρω αξιολόγηση των εκκινητών Lamp λήφθηκε ιστός από την επιδερμίδα ενός καρπού πορτοκαλιού ο οποίος δεν εμφάνιζε συμπτώματα προσβολής από γλοιοσπόριο (Orange treated COL). Πριν την λήψη του ιστού, η επιδερμίδα απολυμάνθηκε ξανά τοπικά με αιθανόλη 70% καθώς είχε προηγηθεί μόλυνση του καρπού με ψεκασμό αιωρήματος κονιδίων. Στο δείγμα Orange treated COL πραγματοποιήθηκαν δύο διαδοχικές αραιώσεις (10^{-1} και 10^{-2}). Τέλος, ως μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε ιστός από επιδερμίδα πορτοκαλιού που είχε συλλεχθεί από τον οπωρώνα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και δεν παρουσίαζε κάποιο σύμπτωμα προσβολής (Health Orange) στον οποίο πραγματοποιήθηκαν τρεις διαδοχικές αραιώσεις. Στην αντίδραση της Lamp προστέθηκε και ένα δείγμα DNA από το είδος *C. acutatum* με συγκέντρωση 5 pg.



(Εικόνα 1.2.1-10: Πορτοκάλι που μολύνθηκε με εμβολιασμό και παρουσιάζει συμπτώματα προσβολής, 6 μέρες μετά την μόλυνση)

Μετά το πέρας της αντίδρασης Lamp παρατηρήθηκε ότι το δείγμα ιστού που συλλέχθηκε από την επιδερμίδα του καρπού (Orange lesion) ανιχνεύτηκε πρώτο στο χρονικό διάστημα των 13 min. Το είδος *C. acutatum* ανιχνεύτηκε επίσης και στον ιστό του μεσοκαρπίου (Orange wound) σε χρόνο 19 min. Αντιθέτως, τα δείγματα που λήφθηκαν από τον ασυμπτωματικό καρπό (Orange treated) και το δείγμα του υγιή καρπού (Health Orange) δεν ανιχνεύτηκαν στην αντίδραση της Lamp.

Από τις διαδοχικές αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση της Lamp, η δεύτερη δεκαδική αραιώση ανιχνεύτηκε με την μεγαλύτερη συχνότητα και στον πιο γρήγορο χρόνο (Εικόνα 1.2.1-11).



Εικόνα 1.2.1-11: Αποτελέσματα αντίδρασης LAMP σε ακατέργαστους φυτικούς ιστούς εσπεριδοειδών, 6 μέρες μετά την μόλυνση

Για περαιτέρω διερεύνηση της λειτουργικότητας των εκκινητών LAMP πραγματοποιήθηκε και μία δεύτερη αντίδραση, δώδεκα ημέρες μετά τη μόλυνση των καρπών με γλοιοσπόριο. Από την παρατήρηση των συμπτωμάτων διαπιστώθηκε ότι το μοναδικό είδος που παρουσίασε παρόμοια συμπτώματα σήψης στην επιδερμίδα, με το δείγμα που είχε μολυνθεί μέσω πληγής, ήταν το είδος *C. nymphaeae* σε συγκέντρωση $3 \cdot 10^5$, σε έναν καρπό μανταρινιού. Πιο συγκεκριμένα, στους τέσσερις καρπούς στους οποίους είχε εφαρμοστεί η συγκεκριμένη μεταχείριση, μόνο ένας παρουσίασε το σύμπτωμα σε ένα εντοπισμένο σημείο της επιδερμίδας (Εικόνα 1.2.1-12).



Εικόνα 1.2.1-12: Μανταρίνι με συμπτώματα προσβολής από *C. nymphaeae*, 12 μέρες μετά την μόλυνση.

Το είδος *C. acutatum* δεν παρουσίασε συμπτώματα προσβολής σε κανέναν καρπό πορτοκαλιού, μανταρινιού ή λεμονιού και σε καμία από τις δύο συγκεντρώσεις κωνιδίων (310^5 και 510^7) που χρησιμοποιήθηκαν. Σε καρπούς λεμονιού που ψεκάστηκαν με τη συγκέντρωση κωνιδίων $3 \cdot 10^5$ παρατηρήθηκε εξάνθηση στις άκρες· ωστόσο, μετά από μικροσκοπική παρατήρηση διαπιστώθηκε ότι επρόκειτο για σαπροφυτικό μύκητα και όχι για το είδος *C. acutatum*. Από την παρατήρηση του πορτοκαλιού που ψεκάστηκε με κωνίδια του είδους *C. godetiaeae* δεν καταγράφηκε κάποιο σύμπτωμα προσβολής.

Το είδος *C. nymphaeae* παρουσίασε συμπτώματα μόλυνσης σε έναν καρπό μανταρινιού, με

συχνότητα ένα μανταρίνι στα τέσσερα στα οποία εφαρμόστηκε η επέμβαση. Στους καρπούς λεμονιού παρατηρήθηκαν πορτοκαλί μεταχρωματισμοί στην επιδερμίδα, ωστόσο μετά από τομή διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρχε σήψη στα κατώτερα στρώματα (Εικόνα 1.2.1-13).



Εικόνα 1.2.1-13: Λεμόνι με συμπτώματα επιδερμικής προσβολής από *C. nymphaeae*, 12 μέρες μετά την μόλυνση.

Για τη λήψη των δειγμάτων, οι καρποί απολυμάνθηκαν εξωτερικά με διάλυμα αιθανόλης 70%, και λήφθηκε ιστός από το μεσοκάρπιο. Όλα τα δείγματα που ελέγχθηκαν στη LAMP προέρχονταν από την επέμβαση με ψεκασμό αιωρήματος κονιδίων 3×10^7 . Ως θετικός μάρτυρας στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 5 ng μυκηλιακού DNA του είδους *C. godetiaeae*.

Μετά την παρατήρηση των αποτελεσμάτων της αντίδρασης LAMP, φαίνεται ότι ανιχνεύτηκε μόνο το είδος *C. nymphaeae* στα 15 min, στον καρπό μανταρινιού που παρουσίασε σύμπτωμα προσβολής. Συνεπώς, φαίνεται ότι τα είδη *C. godetiaeae*, *C. nymphaeae* και *C. acutatum* δεν προσβάλλουν καρπούς εσπεριδοειδών χωρίς την ύπαρξη πληγής.

3 ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Πρώτο βήμα για την ανάπτυξη της μεθόδου ήταν η επιλογή κατάλληλων εκκινητών για ταχεία και εξειδικευμένη ανίχνευση. Έπειτα, αξιολογήθηκε η δυνατότητα της cLAMP να παράγει ποσοτικά αποτελέσματα. Γι' αυτό, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις LAMP χρησιμοποιώντας ως αρχικό υλικό διαδοχικές αραιώσεις από καθαρό γενετικό υλικό του παθογόνου γνωστής συγκέντρωσης. Η χαμηλότερη αρχική συγκέντρωση που δίνει θετικό αποτέλεσμα αποτελεί το όριο ανίχνευσης της μεθόδου. Οι αντιδράσεις αυτές επαναλήφθηκαν τρεις φορές, ώστε να κατασκευαστεί η καμπύλη βαθμονόμησης.

Κατά την παραλαβή του φυτικού υλικού, συλλέγεται σε ένα φιαλίδιο erpenforf το μέρος του φυτού που προσβάλλεται περισσότερο από το παθογόνο (φύλλο ή βλαστός) και λειοτριβείται με χρήση πλαστικού pestle σε ήπιο διάλυμα λύσης. Το φυτικό εκχύλισμα προστέθηκε απευθείας στο μίγμα της αντίδρασης LAMP που περιέχει το ένζυμο, τους ειδικούς εκκινητές του παθογόνου, καθώς και μια χρωστική Phenol Red ή HydroxyNaphthol Blue (HNB), η οποία κατά την παραγωγή του προϊόντος ανίχνευσης, αλλάζει το χρώμα της αντίδρασης. Οι αντιδράσεις LAMP με το φυτικό εκχύλισμα τοποθετήθηκαν στη συσκευή, όπου θερμάνθηκαν στην κατάλληλη θερμοκρασία για τη LAMP. Η κάμερα απέναντι από τα δείγματα κατέγραφε την αλλαγή του χρώματος που αντιστοιχεί στην ανίχνευση του παθογόνου και η αλλαγή αυτή αποτυπώθηκε σε γράφημα πραγματικού χρόνου στο tablet με το οποίο συνδέθηκε η συσκευή. Έτσι, καταγράφηκε ή χρονική στιγμή αλλαγής χρώματος που μεταφράζεται ως χρόνος-προς-θετικό αποτέλεσμα, για την ποσοτικοποίηση της μόλυνσης σε κάθε φυτό.

Με την ανάπτυξη των μεθοδολογιών CmLAMP και AcLAMP για την ανίχνευση των φυτοπαθογόνων βακτηρίων *C. michiganensis* και *A. citruli*, έγινε δυνατή η ανίχνευσή τους με

LoD στα 100 fg ανά αντίδραση, όταν ως εκμαγείο χρησιμοποιείται γενωμικό DNA ενώ σε φυτικά εκχυλίσματα ή εκπλύματα σπόρων το όριο ανίχνευσης αντιστοιχεί σε 10^5 CFU/ml. Και οι δύο μεθοδολογίες παρουσίασαν εξειδίκευση ως προς την ανίχνευση, αφού βακτήρια του ίδιου γένους ή βακτήρια που συχνά απομονώνονται από τα ίδια φυτικά είδη με τα φυτοπαθογόνα βακτήρια δεν επηρέασαν την αξιόπιστη ανίχνευση του φυτοπαθογόνου. Επιπλέον, και οι δύο μεθοδολογίες (CmLAMP και AcLAMP) είναι φιλικές προς την χρήση και μπορούν να εφαρμοστούν στο πεδίο από μη εξειδικευμένο προσωπικό προσφέροντας αξιοπιστία και ταχύτητα ανίχνευσης.

Στην περίπτωση των μυκήτων *Verticillium dahliae*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum f.sp. radicis-cucumerinum*, *Phytophthora infestans*, *Colletotrichum sp.* η LAMP κατάφερε να ανιχνεύσει σε ακατέργαστα δείγματα χωρίς απομόνωση γενετικού υλικού τα παθογόνα έγκαιρα πριν εμφανιστούν ή όταν αρχίζουν να εμφανίζονται τα συμπτώματα. Το όριο ανίχνευσης των αναλύσεων κυμάνθηκε από 10 fg-100pg και η εξειδίκευση της μεθόδου βρέθηκε 100%, αφού τα υπόλοιπα παθογόνα δεν έδωσαν θετικό σήμα στις αντιδράσεις.

4 Βιβλιογραφία

- Chen, A., Hu, J., Sun, S., and Xu, G., 2007. Conservation and divergence of both phosphate- and mycorrhiza-regulated physiological responses and expression patterns of phosphate transporters in solanaceous species. *New Phytologist*, 173, 817–831
- Fan, X., Zhang, J., Yang, L., Wu, M., Chen, W., & Li, G. 2015. Development of PCR-based assays for detecting and differentiating three species of *Botrytis* infecting broad bean. *Plant disease*, 99(5), 691-698.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* (Vol. 25, pp. 402-408).
- Lievens, B., Claes, L., Vakalounakis, D. J., Vanachter, A. C., & Thomma, B. P. 2007. A robust identification and detection assay to discriminate the cucumber pathogens *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* and f. sp. *radicis-cucumerinum*. *Environmental Microbiology*, 9(9), 2145-2161.
- Murray, M. G., Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* (Vol. 8, pp. 4321-4326).
- Nazar, R.N., Hu, X., Schmidt, J., & Culham, D. 1991. Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of verticillium wilt pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39, 1-11.
- Papayiannis, L. C., Harkou, I. S., Markou, Y. M., Demetriou, C. N., & Katis, N. I. 2011. Rapid discrimination of Tomato chlorosis virus, Tomato infectious chlorosis virus and co-amplification of plant internal control using real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* (Vol. 176, pp. 53–59).
- Tomlinson J. A., Dickinson M.J., Boonham N. 2010. Detection of *Botrytis cinerea* by loop-mediated isothermal amplification. *Letters in Applied Microbiology* 51, 650–657.
- Tooley, P. W., Bunyard, B. A., Carras, M. M., & Hatziloukas, E. 1991. Development of PCR primers from internal transcribed spacer region 2 for detection of *Phytophthora* species infecting potatoes. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(4), 1467-1475.