



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

### Παραδοτέο 1.2.2 Μοριακά διαγνωστικά «Ready to Go Lyophilised pellets»

#### Πληροφορίες για το έγγραφο

Αριθμός παραδοτέου: Π1.2.2

Ενότητα εργασίας: ΕΕ1

Επικεφαλής δικαιούχος: ΓΠΑ

Συγγραφείς: Γιάννης Βόντας, Κώστας Μαυρίδης, Κυριακή Μαρία Παπαποστόλου  
Έκδοση: 1.0

Είδος Παραδοτέου: Έκθεση

Ημερομηνία παράδοσης: 31/12/2025

#### 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: ΤΑΕDR-0535675

Ακρωνύμιο έργου: InnoPP

Ημερομηνία έναρξης: 15 Μαΐου 2023

Διάρκεια: 28 Μήνες

Συντονιστής Φορέας: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Συντονιστής/ Επιστημονικός Υπεύθυνος: Ιωάννης Βόντας

## Πίνακας Περιεχομένων

<b>1</b>	<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ</b> .....	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ</b> .....	<b>7</b>
2.1	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	7
2.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	8
<b>3</b>	<b>ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>24</b>
<b>4</b>	<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι-</b> Βιβλιογραφικές Αναφορές.....	<b>25</b>

## 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, αναπτύσσονται αναπτυχθούν μοντέλα πρόβλεψης επιδημιών και καινοτόμα βιοφυτοπροστατευτικά προϊόντα, τα οποία θα αξιολογηθούν για την ασφάλεια τους σε οργανισμούς μη-στόχους. Τέλος, οι νέες τεχνολογίες θα ενσωματωθούν σε συστήματα ολοκληρωμένης διαχείρισης φυτοπροστασίας και θα δοκιμαστούν σε πραγματικές συνθήκες, ενώ αξιολογούνται οι κοινωνικοοικονομικές και περιβαλλοντικές επιπτώσεις τους.

## Σύνοψη της ΕΕ1

Στην ΕΕ1 θα αναπτυχθούν διαγνωστικά εργαλεία και μέθοδοι για την ανίχνευση, ταυτοποίηση και παρακολούθηση των εχθρών και παθογόνων και των χαρακτηριστικών τους (έντομα, ακάρεα, νηματώδεις, φυτοπαθογόνοι οργανισμοί και ζιζάνια), με βάση σύγχρονες ηλεκτρονικές παγίδες, συστήματα επεξεργασίας εικόνων (δορυφορικών και drones) και μοριακές τεχνικές συνδυασμένες με φορητά συστήματα ανίχνευσης. Τα διαγνωστικά θα αφορούν υφιστάμενους και νέους μοριακούς δείκτες που θα προκύψουν από τις δραστηριότητες της ΕΕ1, ενώ θα συμπεριληφθούν και βιοαισθητήρες για ανίχνευση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων και μυκοτοξινών. Οι μοριακές διαγνωστικές πλατφόρμες που θα χρησιμοποιηθούν θα επιλεγούν από αυτές που έχουν ήδη αναπτυχθεί διεθνώς, οι οποίες έχουν δυναμικό για πρακτικές εφαρμογές. Για τον προσδιορισμό των εχθρών και των φυτοπαθογόνων θα χρησιμοποιηθεί η ισοθερμική τεχνολογία LAMP, με διάφορες εναλλακτικές πλατφόρμες ανίχνευσης: "eye detection" – ποιοτική ανίχνευση, ή μέσω φορητών και εύχρηστων μικροσυσκευών για ημιποσοτικό προσδιορισμό στο πεδίο. Για ποσοτικούς και υπερεισθητικούς προσδιορισμούς (για παράδειγμα παρουσία μεταλλαγής ανθεκτικότητας σε πολύ μικρό ποσοστό) θα χρησιμοποιηθούν πρωτότυπα προϊόντα όπως τα "Ready to Go Lyophilised pellets", με ενσωματωμένα όλα τα "probes" και τα ένζυμα που απαιτούνται για την ανάλυση των βιοδεικτών σε "ετοιμόχρηστο" pellet, στο οποίο προστίθεται το βιολογικό υλικό (πχ crude insect homogenate). Για τις ιολογικές – φυτοπαθολογικές, επιδημιολογικές αναλύσεις θα χρησιμοποιηθούν πλατφόρμες Minion - HTD αλληλούχισης νέας γενιάς, για τον πλήρη προσδιορισμό των ιωμάτων.

## Συνοπτική παρουσίαση του παραδοτέου Π1.2.2

Σκοπός του παρόντος παραδοτέου είναι η ανάπτυξη και αξιολόγηση πρωτοκόλλων (>10 νέα) για πολλαπλή ποσοτική μοριακή ανάλυση, τα οποία επιτρέπουν την ανίχνευση τμημάτων DNA (όπως διαγνωστικά για βιοτύπους), μεταλλαγών που σχετίζονται με ανθεκτικότητα, καθώς και την έκφραση γονιδίων, με τις αναλύσεις να πραγματοποιούνται σε μικροσυσκευές real-time PCR, με στόχο την ταυτοποίηση βιοτύπων και την εκτίμηση ανθεκτικότητας σε εντομολογικούς εχθρούς. Όλα τα probes και τα ένζυμα που απαιτούνται για την ανάλυση των στοχευμένων βιοδεικτών έχουν ενσωματωθεί σε «ετοιμόχρηστα» λυοφιλοποιημένα pellets, στα οποία προστίθεται το βιολογικό υλικό, όπως crude insect homogenate. Τα μοριακά διαγνωστικά καλύπτουν

σημαντικούς εντομολογικούς εχθρούς, όπως *Spodoptera frugiperda*, *Ceratitis capitata* (εσπεριδοειδή), *Myzus persicae* (κηπευτικά ή/και ροδακινιά), *Aphis gossypii* (κηπευτικά), *Tuta absoluta* (ντομάτα), *Panonychus citri* και *Tetranychus urticae* (εσπεριδοειδή), *Lobesia botrana* (επιτραπέζιο σταφύλι). Επιπλέον, καλύφθηκαν ζιζάνια και μυκητολογικοί παθογόνοι οργανισμοί για τους οποίους η μέθοδος LAMP δεν επαρκεί και απαιτείται ποσοτική ταυτοποίηση. Αυτό περιλαμβάνει παθογόνα μυκήτων που σχετίζονται με το σύνδρομο παρακμής νεαρών πρέμνων, όπως *Phaeomoniella chlamydospora* καθώς και τον κύριο παθογόνο αδρομυκώσεων των κηπευτικών (*Verticillium dahliae*). Επιπλέον, σχεδιάστηκαν μοριακά διαγνωστικά για την ανίχνευση μεταλλαγών ανθεκτικότητας για τους μύκητες *B. cinerea* και *E. necator*. Τέλος, σχεδιάστηκαν μοριακά διαγνωστικά για τα ζιζάνια *Papaver rhoeas*, *Lolium rigidum* και πραγματοποιήθηκε *in silico* σχεδιασμός για τα *Conyza canadensis* και *Echinochloa crus-galli*.

## 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

Η έγκαιρη ανίχνευση της ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα, μυκητοκτόνα και ζιζανιοκτόνα αποτελεί βασική προϋπόθεση για τη βιώσιμη φυτοπροστασία, καθώς η εμφάνιση ανθεκτικών βιοτύπων μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικές απώλειες παραγωγής και σε περιορισμό των διαθέσιμων αποτελεσματικών δραστικών ουσιών. Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη και αξιολόγηση προηγμένων μοριακών διαγνωστικών εργαλείων που επιτρέπουν την ταχεία, αξιόπιστη και ποσοτική ανίχνευση μοριακών βιοδεικτών ανθεκτικότητας σε εντομολογικούς εχθρούς, μύκητες και ζιζάνια. Στόχος είναι η ενσωμάτωση των probes και ενζύμων που απαιτούνται για την ανάλυση των βιοδεικτών στόχων σε "ετοιμόχρηστο" pellets, στα οποία θα προστίθεται το βιολογικό υλικό και εν συνεχεία, με τη βοήθεια μια φορητής συσκευής qPCR, θα μπορούμε να ανιχνεύσουμε τους εκάστοτε μοριακούς δείκτες. Συνεπώς επιδιώκεται η δημιουργία μιας αποτελεσματικής διαγνωστικής πλατφόρμας που ενισχύει τη λήψη έγκαιρων και τεκμηριωμένων αποφάσεων για την ολοκληρωμένη και ορθολογική διαχείριση της ανθεκτικότητας.

Αναλυτικά, τα TaqMan assays που σχεδιάστηκαν περιλαμβάνουν:

Διαγνωστικά για εντομολογικούς εχθρούς:

- ***Ceratitis capitata***: nChRa6 (K352\*, aG > AT splice site, Q68\*)
- ***Myzus persicae***: kdr (L1014F, M918T, M918L, transposon), nChR (R81T), CYP6CY3 (T71I), Acc (A2666V), Ace1 (S431F)
- ***Aphis gossypii***: kdr (L1014F, M918L, M918V), Ace1 (S431F), A302S, nChR (R81T), Acc (A2001V)
- ***Tuta absoluta***: kdr (F1845Y, V1848I), nChRa6 (G275E), RyR (I4746M, I4746T, I4746K, G4903V, G4903E)
- ***Panonychus citri***: kdr (F1538I),  $\beta$ -2R/OctR (T752C), CHS1 (I1017F), PSST (H110R), Cytb (G126S, A133T)
- ***Tetranychus urticae***: GluCl1 (G314D), GluCl3 (G326E, I321T), Ace1 (G119S,

F331W), PSST (H92R), kdr (L1024V, F1538I), CHS1 (I1017F), Cytb (G126S, S141F, P262T), SdhB (H258Y)

- **Lobesia botrana**: Ace1 (F290V)
- **Spodoptera frugiperda**: RyR (I4790M, I4790K), ABCC2 (R1, R2)

Διαγνωστικά για φυτοπαθογόνους μύκητες:

- **Botrytis cinerea**: sdh (P225H, P225F, N230I, H272R, H272Y, I274V)
- **Erysiphe necator**: sdh (H242R, H242L, I244V, G169D), cytb (G143A), CYP51 (Y136F)

Για τους παθογόνους μύκητες **Verticillium dahliae**, **Phaeoconiella chlamydospora** και **Phaeoacremonium minimum**, πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ δύο μεθόδων, της qPCR και της ddPCR (Παραδοτέο 1.2.3) όσον αφορά την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση τους.

Διαγνωστικά για ζιζάνια:

- **Papaver rhoeas**: ALS γονίδιο: Θέση Pro197 [CCT]> TCT [Pro197Ser], CAT [Pro197His], ACT [Pro197Thr], CGT [Pro197Arg], CTT [Pro197Leu], GCT [Pro197Ala]. Θέση Trp574 [TGG] > TTG [Trp574Leu]
- **Lolium rigidum**: EPSPS γονίδιο: Pro106 [CCA]>Ser [TCA] Thr [ACA] Ala [GCA] Leu [CTG] ACCCase γονίδιο: Ile1781 [ATA] > Leu [TTA/CTA], Val [GTA], Ile2041Asn [ATT>AAT], Val [GTT], Thr [ACT], Asp2078Gly [GAT>GGT], Trp2027Cys [TGG>TGT/TGC], Cys2088Arg [TGC>CGC] ALS γονίδιο: Pro197 [CCG]> Gln [CAG], Ala [GCG], Thr [ACG], Ser [TCG], Leu [CTS] και Trp574 [TGG]> Leu [TTG]

Για τα ζιζάνια **Conyza canadensis** και **Echinochloa crus-galli**, σχεδιάστηκαν primers για την αλληλούχηση των γονιδίων ενδιαφέροντος και έγινε *in silico* design των μοριακών διαγνωστικών.

- **Conyza canadensis**: EPSPS γονίδιο Pro106 [CCA] >Ser [TCA] ALS γονίδιο Trp574 [TGG] > Leu [TTG], Pro197 [CCC] >Ala, [GCC] και Ala205 [GCC] > Val [GTT]
- **Echinochloa crus-galli**: ALS γονίδιο: Ala122 [GCC]> Asn [AAC] or Thr [GAC] or Asp [ACC], Trp574 [TGG] > Leu [TTG], Pro197 [CCC] > Ser [TCC], Ala205 [GCC] > Val [GTC]. ACCCase γονίδιο: Ile1781 [ATA] > Leu [CTA]

Οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση γνωστών δειγμάτων ελέγχου (πλασμίδια) που περιέχουν τα γονίδια-στόχους με σκοπό να πραγματοποιηθεί η βελτιστοποίηση των πρωτοκόλλων. Τα πλασμίδια αυτά καλύπτουν όλους τους πιθανούς γονότυπους (άγριου τύπου [wild type], μεταλλαγμένους [mutant] και ετερόζυγους [heterozygotes]).

**Ο σκοπός του παρόντος εγγράφου** είναι η παρουσίαση των αποτελεσμάτων καινοτόμου έρευνας στα πλαίσια του παραδοτέου Π1.2.2, που αφορά την ανάπτυξη και

την αξιολόγηση πρωτοκόλλων για την ανίχνευση μεταλλαγών που σχετίζονται με ανθεκτικότητα με τη χρήση λυοφιλοποιημένων pellets και το σχεδιασμό Tarman assay. Η έρευνα επικεντρώθηκε σε σχεδιασμό διαγνωστικών για έντομα, μύκητες και ζιζάνια.

Το παρόν έγγραφο **ακολουθεί την παρακάτω δομή:**

**1. Εισαγωγή και Στόχοι:** Παρουσιάζεται το πλαίσιο της έρευνας και οι στόχοι του εγγράφου.

**2. Περιγραφή των Εργασιών:** 2.1. Υλικά και Μέθοδοι, 2.2. Αποτελέσματα και Συζήτηση.

**3. Σύνοψη και Συμπεράσματα:** Βασικά ευρήματα της έρευνας και σχετικά συμπεράσματα.

**4. Παράρτημα:** Βιβλιογραφικές αναφορές.

## 2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

### 2.1 Υλικά και Μέθοδοι

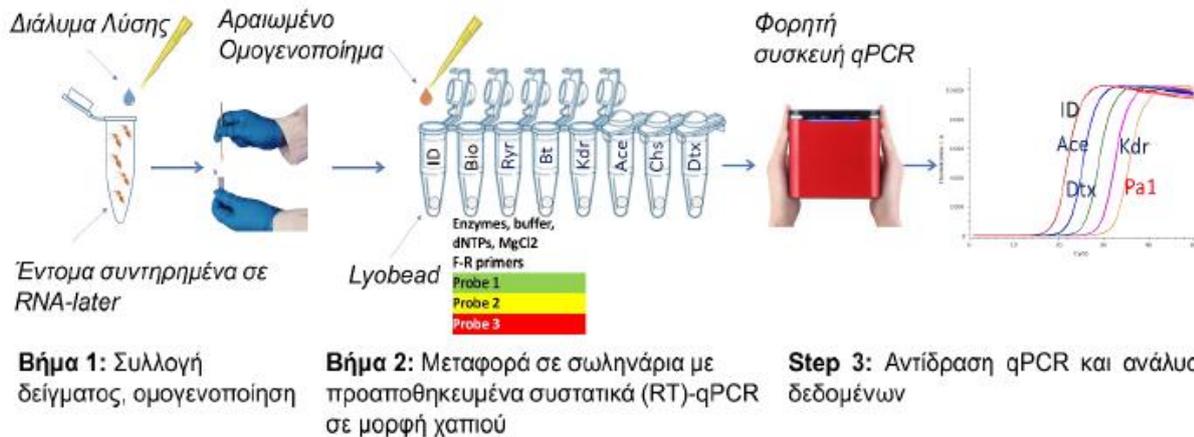
Στην παρούσα έρευνα σχεδιάστηκαν και βελτιστοποιήθηκαν assay για την ανίχνευση μεταλλαγών σε έντομα, μύκητες και ζιζάνια. Στους παρακάτω πίνακες περιγράφονται αναλυτικά οι εκκινητές/probes και οι βέλτιστες συνθήκες των assay, για κάθε οργανισμό ξεχωριστά.

Πιο συγκεκριμένα, τα TaqMan qPCR assays αναπτύχθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν ως προς τις συγκεντρώσεις εκκινητών και ανιχνευτών (probe), χρησιμοποιώντας πλασμιδία ως γονίδια ελέγχου, όπως περιγράφονται στο Manridis et al., 2022. Τα πλασμιδία ελέγχου καλύπτουν όλους τους πιθανούς γονότυπους (άγριου τύπου [wild type], μεταλλαγμένους [mutant] και ετερόζυγους [heterozygotes]). Οι probes άγριου τύπου (WT) σημάνθηκαν με φθορίζουσες χρωστικές HEX, ενώ οι probes των μεταλλαγμένων (mut) σημάνθηκαν με τις φθορίζουσες χρωστικές FAM, TexasRed και Atto647N. Όλοι οι probes έφεραν έναν μη φθορίζοντα αποσβέστη (nonfluorescent quencher) στο 3' άκρο και ένα minor groove binder (MGB) στο 5' άκρο.

Για τα ζιζάνια *Conyza canadensis* και *Echinochloa crus-galli*, επειδή η αλληλουχία πλησίον των μεταλλαγών ανθεκτικότητας δεν ήταν γνωστή ώστε να σχεδιαστούν τα μοριακά διαγνωστικά, προχωρήσαμε σε αλληλούχηση κατά Sanger (Sanger Sequencing) σχεδιάζοντας αρχικά εκκινητές (Πίνακας 1.2.2-17 και Πίνακας 1.2.2-28). Οι PCR αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν για τα ζιζάνια ***Conyza canadensis*** και ***Echinochloa crus-galli*** όπως περιγράφεται παρακάτω: περίπου 10 ng γονιδιωματικού DNA (gDNA) ανά δείγμα χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση. Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν με το kit KAPA Taq PCR Kit (Kapa-Biosystems), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Σε όλες τις αντιδράσεις PCR προστέθηκαν DMSO και 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>. Το θερμικό πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε ήταν το εξής: 5 min στους 95 °C, 40 κύκλοι των 30 s στους 95 °C, 30 s στους 53–59 °C (ανάλογα με το σετ εκκινητών για τη συγκεκριμένη μετάλλαξη ενδιαφέροντος), 30 s στους 72 °C, ακολουθούμενα από τελική επέκταση 5 min στους 72 °C.

Μετά από οπτικοποίηση μικρής ποσότητας του προϊόντος PCR σε πήκτωμα αγαρόζης, το υπόλοιπο προϊόν καθαρίστηκε χρησιμοποιώντας το kit Nucleospin PCR & Gel Clean-Up Kit (Macherey Nagel, Dueren, Germany) και στη συνέχεια υποβλήθηκε σε αλληλούχηση Sanger (GENEWIZ, Azenta Life Sciences, Germany). Οι αλληλουχίες που προέκυψαν αναλύθηκαν με το BioEdit v.7.0.1 (Hall 1999). Η παρουσία ή απουσία μεταλλάξεων βασίστηκε σε οπτική εξέταση των χρωματογραφημάτων.

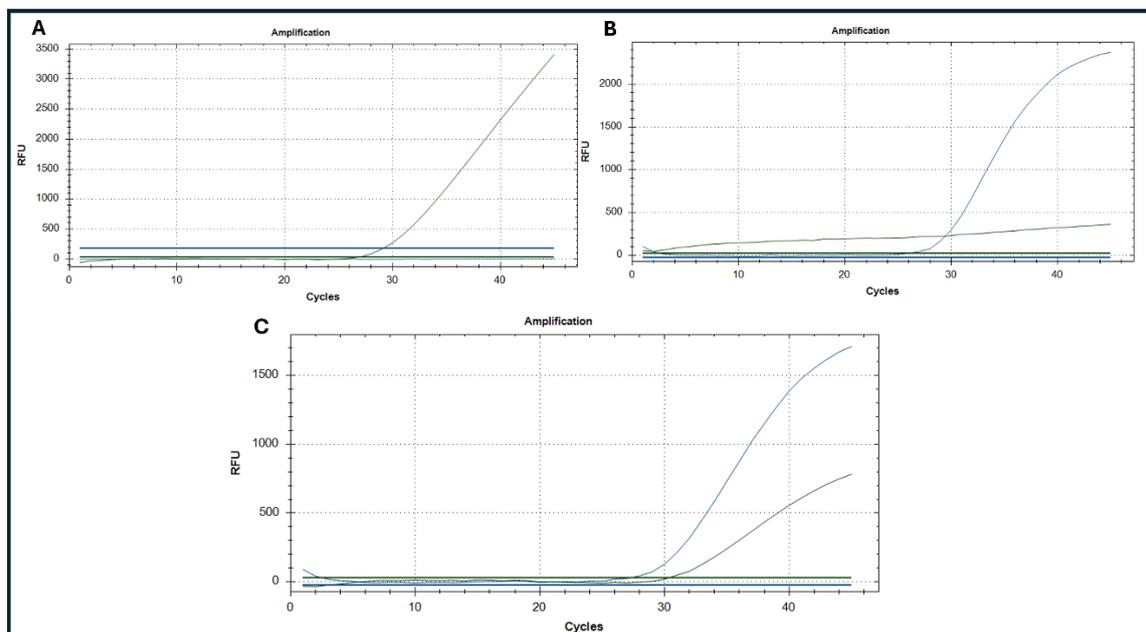
Αναπτύχθηκαν τα παραπάνω διαγνωστικά και ενσωματώθηκαν probes και ένζυμα σε "ετοιμόχρηστο" pellets, στα οποία μετά την προσθήκη βιολογικού υλικού, μπορούμε να ανιχνεύσουμε μοριακούς δείκτες με τη χρήση φορητής συσκευής qPCR. Το workflow φαίνεται στην **Εικόνα 1.2.2-1**.



**Εικόνα 1.2.2-1:** Διαδικασία εφαρμογής των Μοριακών Διαγνωστικών «Ready to Go Lyophilized Pellets» για πολλαπλή ποσοτική μοριακή ανάλυση. Αρχικά, προστίθεται διάλυμα λύσης στο δείγμα των εντόμων, το οποίο στη συνέχεια ομογενοποιείται για να απελευθερωθεί το γενετικό υλικό. Το επεξεργασμένο δείγμα εισάγεται σε ειδικό σωλήνα που περιέχει λυοφιλοποιημένα αντιδραστήρια έτοιμα για χρήση, καθώς και ειδικούς εκκινητές (primers) και ανιχνευτές (probes), τα οποία επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών μοριακών στόχων. Τα σωληνάρια εισάγονται σε μικροσυσκευή real-time PCR, όπου πραγματοποιείται η ανίχνευση των μοριακών δεικτών. Τέλος, τα αποτελέσματα παρουσιάζονται μέσω καμπυλών ενίσχυσης, παρέχοντας ποσοτική απεικόνιση για μοριακούς δείκτες, όπως οι μεταλλάξεις ανθεκτικότητας και τα χαρακτηριστικά βιοτύπων.

## 2.2 Αποτελέσματα και Συζήτηση

Παρακάτω φαίνεται ένα παράδειγμα διαγράμματος φθορισμού HEX έναντι FAM, όπου η αύξηση του σήματος HEX (Εικόνα 1.2.2-2.A) υποδηλώνει δείγμα άγριου τύπου, η αύξηση του σήματος FAM μεταλλαγμένο δείγμα (Εικόνα 1.2.2-2.B), ενώ ενδιάμεση αύξηση και των δύο σημάτων υποδηλώνει ετερόζυγο άτομο (Εικόνα 1.2.2-2.C). Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε για όλους τους οργανισμούς προς μελέτη, χρησιμοποιώντας πλασμίδια (gBlocks) ως γονίδια ελέγχου.



Εικόνα 1.2.2-2: TaqMan assays για την ανίχνευση της μεταλλαγής 1014 του εντόμου

***Myzus persicae***, χρησιμοποιώντας πλασμίδια ως γονίδια ελέγχου. Στο Α) φαίνεται το αγρίου τύπου γονίδιο, στο Β) είναι το μεταλλαγμένο γονίδιο ενώ στο C) είναι το ετερόζυγο γονίδιο. Τα γραφήματα δημιουργήθηκαν με το πρόγραμμα Bio-Rad CFX MAESTRO 2.3.

Ξεκινώντας από τους **εντομολογικούς εχθρούς**

Για το ***Ceratitis capitata***, οι εκκινητές/probes και οι βέλτιστες συνθήκες, φαίνονται στους Πίνακες 1.2.2-1 και 1.2.2-2.

Πίνακας 1.2.2-1: Εκκινητές και probes που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στα TaqMan assays του ***Ceratitis capitata***:

Assay	Mutation	Oligo name	Oligo Sequence 5'→3' (including dyes)
Cc_spin_1	K352*	Cc_532F	GCCATGGATTTTGCATATGG
		Cc_532R	CGATTGCTTAGTAGAATTGTTTTTCG
		Cc_532Pwt	HEX-TCCTGGACGTAAAAT-MGB
		Cc_532Pmut	FAM-TCCTGGACGTAAAT-MGB
Cc_spin_2	Q68*	Cc_3aF	GCCGTTTAATACGAAGGCGA
		Cc_3aR	AACCACGCATTTGTGGTCAG
		Cc_3aPwt	HEX-ATAGGACGAAAAGAATCAGA-MGB
		Cc_68Pmut	FAM-ATAGGACGAAAAGAATTAG-MGB
Cc_spin_3	aG > AT & A200T	Cc_3aF	GCCGTTTAATACGAAGGCGA
		Cc_3aR	AACCACGCATTTGTGGTCAG
		Cc_3aPwt	HEX-ATAGGACGAAAAGAATCAGA-MGB
		Cc_spl_Pmut	FAM-ATATGACGAAAAGATTCAG-MGB

F: Forward primer; R: Reverse primer; Pwt: Wild type probe; Pmut: Mutant probe

Πίνακας 1.2.2-2: Συνθήκες για τα TaqMan assays του ***Ceratitis capitata*** μετά τη βελτιστοποίηση.

N	Assay	SNP	HEX Probe concentration (nM) [vol in 10uL from 10uM]	FAM Probe concentration (nM) [vol in 10uL from 10uM]	Primers concentration (nM) [vol in 10uL from 10uM]	Thermal Protocol
1	Cc_nACHRa6_1	K352*	400 nM [0.4 uL]	200 nM [0.4 uL]	500nM [0.5 uL]	Cycle number: 45, Tm = 60.0°C, Kapa Probe Force thermal
2	Cc_nACHRa6_2	Q68*	300 nM [0.3 uL]	300 nM [0.3 uL]	500nM [0.5 uL]	
3	Cc_nACHRa6_3	splice site	300 nM [0.3 uL]	300 nM [0.3 uL]	500nM [0.5 uL]	



6	ACC	A2666V	400 nM [0.4 uL]	200 nM [0.2 uL]	400 [0.4uL]	Force thermal protocol
7	CYP6CY3	T71I	500 nM [0.5 uL]	100 nM [0.1 uL]	400 [0.4uL]	

Για το άκαρι *Panonychus citri*, οι εκκινητές/probes και οι βέλτιστες συνθήκες, φαίνονται στους Πίνακες 1.2.2-5 και 1.2.2-6.

Πίνακας 1.2.2-5: Εκκινητές και probes που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στα TaqMan assays του *Panonychus citri*:

Mutation	Oligo name	Sequence 5'→3' (including dyes)
I1017F	1017F	TGCTACATCCTCAAGAATTTCACTGT
	1017R	TAACAACGTTCAAATTGATGAGAGAA
	1017Pwt	HEX- ACTTTATTTCCCTTTTCGATTC -MGB
	1017Pmut	FAM-ACTTTATTTCCCTTTTYGTTTC-MGB
T752C	752F	TCAACCTTCAGAATCAGTGTAATCA
	752R	TCACTTGAAGTCCCTCTCTCACT
	752Pwt	HEX-CATTATTTGGTCAACATC-MGB
	752Pmut	FAM- ATTATTTGGCCAACATC-MGB
I1538F	1538F	TGCGATTGATTCTCGTGAAG
	1538R	TCGATAATCACTCCGATAAATAGATT
	1538Pwt	HEX- TTTCGGCTCATTTTTCACCCT-MGB
	1538Pmut	FAM- TTTCGGCTCATTTATCACCT-MGB
H110R	110F	GGTTTAGCTTGTTGTGCTGTTGA
	110R	CGAGGACTTGCTCTGAATAACATTC
	110Pwt	HEX-ATGATGCACATTGC-MGB
	110Pmut	FAM-ATGATGCGCATTGC-MGB
G126S	126_133F	CAGCTTTTTTAGGATATGTTTTACCTTG
	126_133R	ACTGAAAATCCTCCTCAAACCTCAA
	126Pwt	HEX-AGGTCAAATATCTTTTTG -MGB
	126Pmut	FAM-AAGWCAAATATCTTTTTG MGB
A133T	126_133F	CAGCTTTTTTAGGATATGTTTTACCTTG
	126_133R	ACTGAAAATCCTCCTCAAACCTCAA
	133Pwt [rc]	HEX-AGTAATTACAGTAGCTCC -MGB
	133Pmut [rc]	FAM-AGTRATTACAGTAGTTCC -MGB

Πίνακας 1.2.2-6: Συνθήκες των TaqMan assays του *Panonychus citri* μετά τη βελτιστοποίηση.

N	Assay	SNP	HEX Probe concentration (nM) [vol in 10uL from 10uM]	FAM Probe concentration (nM) [vol in 10uL from 10uM]	Primers concentration (nM) [vol in 10uL from 10uM]	Thermal Protocol
1	Pc_CHS1	I1017F	300 nM [0.3 uL]	300 nM [0.3 uL]	500nM [0.5 uL]	Cycle number: 45, Tm = 60.0°C, Kapa Probe Force thermal protocol
2	Pc_OctR	T752C	300 nM [0.3 uL]	300 nM [0.3 uL]	500nM [0.5 uL]	
3	Pc_kdr	F1538I	500nM [0.5 uL]	50 nM [0.05 uL]	500nM [0.5 uL]	
4	Pc_PSST	H110R	300 nM [0.3 uL]	300 nM [0.3 uL]	500nM [0.5 uL]	
5	Pc_cytb_1	G126S	400 nM [0.4 uL]	300 nM [0.3 uL]	500nM [0.5 uL]	
6	Pc_cytb_2	A133T	300 nM [0.3 uL]	300 nM [0.3 uL]	500nM [0.5 uL]	

Για το ***Aphis gossypii***, οι εκκινητές/probes και οι βέλτιστες συνθήκες, φαίνονται στους Πίνακες 1.2.2-7 και 1.2.2-8.

Πίνακας 1.2.2-7: Εκκινητές και probes που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στα TaqMan assays του ***Aphis gossypii***:

Mutation	Oligo name	Sequence 5'→3' (including dyes)
L1014F	1014F	CCATTCTTCTTGGCTACTGTTGTCA
	1014R	CCCTAAGTAATACACATTTATGCATTGTCAGT
	1014Pwt [rc]	HEX-CATACCACAAGGTTACC-MGB
	1014Pmut	FAM-ATACCACAAAGTTACC-MGB
M918L/V	918F	TCTTGGCCCCACACTTAATCTTTTAA
	918R	GATTATGCACAACACAAACGTTAGG
	918Pwt	HEX-ATCAATAATGGGTCGAAC-MGB
	918Pmut	FAM-ATCAATAKTGGGTCGAAC-MGB
R81T	81F	CGAAAAGAGTCAAATAATGAAATCG
	81R	TCTAATACGCCTGATAAGAACTGTTT
	81Pwt	HEX-ACGTTTGGTTGAGACTT-MGB
	81Pmut	FAM-ACGTTTGGTTGACACTT-MGB
A302S	302F	GCAATCCAAACAATGTGACACTTT
	302R	GCAAGTGTAGTGAAACCGAAACG
	302Pwt	HEX-TGAATCGGCCGCG-MGB
	302Pmut	FAM-CGGTGAATCGTCCG-MGB
S431F	431F	GTCGATGGCGCTTTTCTTGAC
	431R	GACACCACCACATTTTCTCC
	431Pwt[rc]	HEX-TGAATAGTAACCCTCTTC-MGB
	431Pmut[rc]	FAM-RAAATAGTAACCCTCTTC-MGB
A2001V	2001F	GGTGAATTGCGAGGAGGAG
	Mp2666R	CGACTATCTGGATCTGCATACATCTCAA
	Mp2666Pwt [rc]	HEX-AGTATCTACAACAGCCCATG-MGB
	Mp2666Pmut [rc]:	FAM- TAGTATCTACAACAACCCATG -MGB

Πίνακας 1.2.2-8: Συνθήκες των TaqMan assays του ***Aphis gossypii*** μετά τη βελτιστοποίηση

N	Assay	SNP	HEX Probe concentration (nM) [vol in 10uL from 10uM]	FAM Probe concentration (nM) [vol in 10uL from 10uM]	Primers concentration (nM) [vol in 10uL from 10uM]	Thermal Protocol
1	kdr_1	L1014F	300 nM [0.3 uL]	300 nM [0.3 uL]	400 [0.4uL]	Cycle number: 45, Tm = 60.0°C, Kapa Probe Force thermal protocol
2	kdr_2	M918L/V	300 nM [0.3 uL]	300 nM [0.3 uL]	400 [0.4uL]	
3	nAChR	R81T	300 nM [0.3 uL]	300 nM [0.3 uL]	400 [0.4uL]	
4	Ace1_1	A302S	500 nM [0.5 uL]	50 nM [0.05 uL]	400 [0.4uL]	
5	Ace1_2	S431F	300 nM [0.3 uL]	100 nM [0.1 uL]	400 [0.4uL]	
6	Acc	A2001V	400 nM [0.4 uL]	200 nM [0.2 uL]	400 [0.4uL]	

Για τον εντομολογικό εχθρό *Tuta absoluta*, οι εκκινητές/probes και οι βέλτιστες συνθήκες, φαίνονται στους Πίνακες 1.2.2-9 και 1.2.2-10.

Πίνακας 1.2.2-9: Εκκινητές και probes που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στα TaqMan assays του *Tuta absoluta*

Mutation	Oligo name	Sequence 5'→3' (including dyes)
G275E	275F	ACACTGTAAGCACAATACTGTTGATCTAAT
	275R	GCCACCATAAACATGATGCAATTGA
	275Pwt	HEX-TGGCAGGGACTTAC-MGB
	275Pmut	FAM-TGGCAGAGACTTAC-MGB
F1845Y	1845F	GGCATCACCTACCTGTTGTCCTA
	1845R	TGACGGCGATGTACATGTTGA
	1845Pwt	HEX-ΤΤΑΤCΤCCTTCCTGATC-MGB
	1845Pmut	FAM-CTCGTTATCTCCTACC-MGB
V1848I	1848F	CCTACCTGTTGTCCTACCTCGTT
	1848R	TGACGGCGATGTACATGTTG
	1848Pwt	HEX-TGATCGTCATCAACATG-MGB
	1848Pmut	FAM-CTGATCATCATCAACATG-MGB
I4746M/T/K	4746F	GCCGCGCTGCATTCC
	4746R	CCTTGAGGTGGTAGTASCCG
	4746Pwt	HEX-TCGTCTCACTCGCCATACT-MGB
	4746_Pmut1M	FAM-GTCTCACTCGCCATGCT-MGB
	4746_Pmut2T	FAM-GTCTCACTCGCCACNCT-MGB
4746_Pmut3K	FAM-CGTCTCACTCGCCAAAC-MGB	
G4903V/E	4903F	TGGTACTTCTCGTTCAGCGTG
	4903R	TGCARRATSGTTCTCAACGTC
	4903Pwt	HEX-TGTCGCTGTTGGGTT-MGB
	4903_Pmut1VE	FAM-ATGTCGCTGTTGWGTT-MGB
	4903_Pmut2E	FAM-ATGTCGCTGTTGAATT-MGB

Πίνακας 1.2.2-10: Συνθήκες των TaqMan assays του *Tuta absoluta* μετά τη βελτιστοποίηση

N	Assay	SNP	HEX Probe concentration	FAM Probe concentration	Primers concentration (nM) [vol in 10uL from 10uM]	Thermal Protocol
1	nAChR_a6	G275E	300 nM	300 nM	800 nM (0.8)	Cycle number: 40, Tm = 60.0°C, FTD thermal protocol
2	RyR_1	G4903V/E	300 nM	150 nM each × 2	800 nM (0.8)	
3	RyR_2	I4746M/T/K	300 nM	150 nM each × 3	800 nM (0.8)	
4	vgsc_1	V1848I	300 nM	200 nM	800 nM (0.8)	
5	vgsc_2	F1845Y	300 nM	200 nM	800 nM (0.8)	

Για το άκαρι *Tetranychus urticae*, οι εκκινητές/probes και οι βέλτιστες συνθήκες, φαίνονται στους Πίνακες 1.2.2-11 και 1.2.2-12.

Πίνακας 1.2.2-11: Εκκινήτες και probes που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στα TaqMan assays του *Tetranychus urticae*

Mutation	Oligo name	Sequence 5'→3' (including dyes)
G314D	314F	CCACCAGTMAGCTACACTAAAGC
	314R	GAGAGCACCRAAAACRAAGATTAAAC
	314Pwt	HEX- TGACATTTGGACAGGTT-MGB
	314Pmut	FAM- ACATTTGGACAGATTG -MGB
G326E	326F	TCCACCGGTCAGTTACATTAAAGC
	326R	CAAACCTCTAGGAGGGCACCAAAA
	326Pwt	HEX- TTGGACCGGAGTCTG -MGB
	326Pmut	FAM- TTTGGACCGAAGTCTG -MGB
I321T	321F	CAAATATCCGGTATAAATGCCTCACT
	321R	AAGGCAGACTYCGGTCCAA
	321Pwt	HEX- TTACATYAAAGCCATTGAT -MGB
	321Pmut	FAM- CATYAAAGCCACYGATG -MGB
G119S	119F	TCGACCTCGTCCCAAATCAG
	119R	KGAACCATCGTAAAARTCAAGTGAYGAG
	119Pwt	HEX- TGGATCTATGGAGGAGGC -MGB
	119Pmut	FAM- ATCTATGGAGGAAGCTT-MGB
F331W	331F	CTGGAAGCAATCGTGATGAG
	331R	CGCGAAATATAAATGCCTTCA
	331Pwt	HEX- AACCTATTWTCTTGTTTACC -MGB
	331Pmut	FAM- AACCTATTGGCTTGTTTA -MGB
H92R	92F	TTTGACTTTTGGATTAGCCTGTTG
	92R	TGCTCTGAATAACATAACCAATCTTTC
	92Pwt	HEX- CGTTGAAATGATGCACA -MGB
	92Pmut	FAM- TTGAAATGATGCGCATAG -MGB
L1024V	1024F	CATTGGTCATCTTGTTATGCTTAACC
	1024R	GGATGCACCGAAAGAGGAAA
	1024Pwt	HEX- TCCTTGCCCTGCTC -MGB
	1024Pmut	FAM- TTCCTTGCCCTGGTC -MGB

<b>Mutation</b>	<b>Oligo name</b>	<b>Sequence 5'→3' (including dyes)</b>
F1538I	1538F	CGTGAAGTCCATCAACAACCA
	1538R	TCAATAATGACTCCAATAAACAGGTTAAG
	1538Pwt	HEX- TTTTGGCTCTTTTTTCAC -MGB
	1538Pmut	FAM- TTTTGGCTCTTTTATC -MGB
I1017F	1017F	CCACAAGAGTTTCACTGTTTATATCCA
	1017R	CCAGAGAATAGATCATAAGTAGAAGGTACATG
	1017Pwt	HEX- TTATTTCTTTTCRATTCCA -MGB
	1017Pmut	FAM- TTTATTTCTTTTCRTTCCA -MGB
S141F	141F	GGATCCGCTTTTATTGGKTATGTTTTACC
	141R	TCTTCCYCAAACCTCAAAAAACAATT
	141Pwt	HEX- TAATATTTTATCTTCAATTCC -MGB
	141Pmut	FAM- CTAATATTTTATTTTCAATTCC -MGB
G126S	126F	AGGTTTCMGCTTTTATTGGKTATG
	126R	GGTAGGATTATCAACGGARAATC
	126Pwt	HEX- ACCTTGAGGACAAATA -MGB
	126Pmut	FAM- ACCTTGAAGACAAATAT -MGB
P262T	262F	CCAGCAGATCCTCTAAATACACCTTTA
	262R	CGGATCGTAAAATTGCGTAAGCA
	262Pwt	HEX- ATTAARCCTGAATGATAC -MGB
	262Pmut	FAM- ATTAARACTGAATGATAC -MGB
H258Y	258F	CTGAAAAAAGGYTGGATCAATTG
	258R	CGACCAGGATTCAAGTTCTTAGGA
	258Pwt	HEX-TCTCACTTTATCGATGYCAT-MGB
	258Pmut	FAM-TCTCACTTTATCGATGYTAT-MGB

Πίνακας 1.2.2-12: Συνθήκες των TaqMan assays του *Tetranychus urticae* μετά τη βελτιστοποίηση

N	Assay	SNP	HEX Probe concentration	FAM Probe concentration	Primers concentration (nM) [vol in 10uL from 10uM]	Thermal Protocol
1	GluCl1	G314D	500 nM	300 nM	800 nM (0.8)	Cycle number: 40, Tm = 60.0°C, FTD thermal protocol
2	GluCl3-A	G326E	400 nM	400 nM	800 nM (0.8)	
3	GluCl3-B	I321T	400 nM	400 nM	800 nM (0.8)	
4	iAChE-A	G119S	500 nM	200 nM	800 nM (0.8)	
5	iAChE-B	F331W	600 nM	400 nM	800 nM (0.8)	
6	PSST	H92R	300 nM	400 nM	800 nM (0.8)	
7	Kdr-A	L1024V	400 nM	400 nM	800 nM (0.8)	
8	Kdr-B	F1538I	400 nM	400 nM	800 nM (0.8)	
9	CHS1	I1017F	400 nM	400 nM	800 nM (0.8)	
10	Cytb-A	S141F	400 nM	400 nM	800 nM (0.8)	
11	Cytb-B	G126S	400 nM	400 nM	800 nM (0.8)	
12	Cytb-C	P262T	400 nM	400 nM	800 nM (0.8)	
13	sdhB	H258Y	400 nM	400 nM	1000 nM (1)	

Για το *Lobesia botrana*, οι εκκινητές/probes και οι βέλτιστες συνθήκες, φαίνονται στους Πίνακες 1.2.2-13 και 1.2.2-14.

Πίνακας 1.2.2-13: Εκκινητές και probes που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στα TaqMan assays του *Lobesia botrana*

Mutation	Oligo name	Sequence 5'→3' (including dyes)
F290V	Lb290_F	TGCAGATGAATTGGTGAATAACG
	Lb290_R	GAACCGTCAATAATGGGAACGA
	Lb290_Pwt	HEX-CATTTGTGAATTTCC-MGB
	Lb290_Pmut	FAM-ATTTGTGAAGTTCCG-MGB

Πίνακας 1.2.2-14: Συνθήκες των TaqMan assays του *Lobesia botrana* μετά τη βελτιστοποίηση

N	Assay	SNP	HEX Probe concentration (nM) [vol in 10uL from 10uM]	FAM Probe concentration (nM) [vol in 10uL from 10uM]	Primers concentration (nM) [vol in 10uL from 10uM]	Thermal Protocol
1	Ace1	F290V	400 nM [0.4 uL]	400 nM [0.4 uL]	800nM [0.8 uL]	Cycle number: 40, Tm = 55.0°C, Kapa Probe Force thermal protocol

Για το *Spodoptera frugiperda*, οι εκκινητές/probes και οι βέλτιστες συνθήκες, φαίνονται στους Πίνακες 1.2.2-15 και 1.2.2-16.

Πίνακας 1.2.2-15: Εκκινητές και probes που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στα TaqMan assays του *Spodoptera frugiperda*

Mutation	Oligo name	Sequence 5'→3' (including dyes)
I4790M/ K	4790F	AGGACGACGATGCACTAGAAG
	4790R	AGACCRTCRAACTCCAATTTACG
	4790Pwt	HEX-CTCGCTATACTCATCG-MGB
	4790PmutM	FAM-TCGCTATGCTCATCG-MGB
	4790PmutK	FAM-CTCGCTAAACTCATCGG-MGB
R1: +GC insertion	R1F	TGGAGGCCGAAGAGAGACA
	R1R	AGGAGTTGACTGACTTCATGTACCT
	R1Pwt	HEX-CCAAGCACATCCCACT-MGB
	R1Pmut	FAM-CAAGCACATCGCCCACT-MGB
R2: A>G SNP	R2F	AGGGTAACGTTTCATTGTGATAATACC
	R2R	CGCTGACTGGAAACATGATTAGTG
	R2Pwt	HEX-CATCCAACAATACTTC-MGB
	R2Pmut	FAM-CCATCCAACAGTACTTC-MGB

Πίνακας 1.2.2-16: Συνθήκες των TaqMan assays του *Spodoptera frugiperda* μετά τη βελτιστοποίηση

N	Assay	SNP	HEX Probe concentration	FAM Probe concentration	Primers concentration (nM) [vol in 10uL from 10uM]	Thermal Protocol
1	RyR	I4790M/K	300 nM	300 nM	500 nM (0.5)	Cycle number: 45, T <sub>m</sub> = 60.0°C, FTD thermal protocol
2	ABCC2 R1	R1: +GC insertion	300 nM	300 nM	500 nM (0.5)	
3	ABCC2 R2	R2: A>G SNP	300 nM	300 nM	500 nM (0.5)	

Συνεχίζοντας στους **μύκητες**

Για τους μύκητες *Botrytis cinerea* και *Erysiphe necator*, προχωρήσαμε μόνο σε ddPCR assays (Παραδοτέο 1.2.3) για την ανίχνευση των μεταλλαγών ανθεκτικότητας μετά το σχεδιασμό των εκκινητών και probes (Πίνακας 1.2.2-17 και Πίνακας 1.2.2-18), καθώς αποδείχθηκε υψίστης σημασίας η ανίχνευση μεταλλαγών ακόμα και σε πολύ χαμηλές συχρότητες, κάτι το οποίο παρέχει η ddPCR.

Πίνακας 1.2.2-17: Οι εκκινητές και probes που σχεδιάστηκαν για τα assays του *Botrytis cinerea*

Mutation	Oligo name	Sequence 5'→3' (including dyes)
P225H/F	225/30F	ACTTGCAATCTAAGGAGGATCG
	225/30R	CTGCAAGCCATCTGTAACCTCT
	P225_WT_NEW	HEX- TCGACATCTTGCCCCT -MGB
	P225_MUT1_H	FAM-TCGACATCTTGCCACT-MGB
	P225_MUT2_F	FAM-TCGACATCTTGCTTC-MGB
N230I	225/30F	ACTTGCAATCTAAGGAGGATCG
	225/30R	CTGCAAGCCATCTGTAACCTCT
	P230_WT	HEX-TGGTGGAAACAGTGAGG-MGB
	P230_MUT_I	FAM-TGGTGGATCAGTGAGG-MGB
H272R/Y	272/4F	ATGGCTTGCAGATTCCCCG
	272/4R	CCAAACCAGGATTCAATCCCT
	P272_WT	HEX-AGTTTGTACAGATGTCACAC-MGB
	P272_MUT1_R	FAM- AGTTTGTACAGATGTGCGA -MGB
	P272_MU2T_Y	FAM-AGTTTGTACAGATGTCTCA-MGB
I274V	272/4F	ATGGCTTGCAGATTCCCCG
	272/4R	CCAAACCAGGATTCAATCCCT
	P274_WT	HEX-ACAGATGTCACACTATT-MGB
	P274_MUT_V	FAM-ACAGATGTCACACTGTT-MGB

Πίνακας 1.2.2-18: Οι TaqMan εκκινητές και probes που σχεδιάστηκαν για τα assays του *Erysiphe necator*

Mutation	Oligo name	Sequence 5'→3' (including dyes)
H242R/L	Erys_242F	CGAAAGAGTGCTCTGGATAATAGTATGA
	Erys_242R	TTAGGACAAGTCCGAGAACAATTTAA
	Erys_242Pwt	HEX-CTCTATCGATGTCATACC-MGB
	Erys_242Pmut1_R	FAM-TCTCTATCGATGTGCTACC-MGB
	Erys_242Pmut2_L	FAM-CTCTATCGATGTCTTACC-MGB
I244V	Erys_244F	CGAAAGAGTGCTCTGGATAATAGTATGA
	Erys_244R	CGAAAGAGTGCTCTGGATAATAGTATGA
	Erys_244Pwt	HEX-TCTATCGATGTCATACCATA-MGB
	Erys_244Pmut	FAM-TCTATCGATGTCATACCGTA-MGB
G169D	Erys_169F	GGACATGGGAAAGGCTTTTACA
	Erys_169R	AAGCTAATGCACTAGAAATACTCAATCC
	Erys_169Pwt	HEX-TGATAAGAACAGGCTGGAT-MGB
	Erys_169Pmut	FAM- TGATAAGAACAGACTGGA-MGB
G143A	Erys_143F	CGCTACAGACTGGGTCACTG
	Erys_143R	AGTCTCTTAGGGCCCCCATT
	Erys_143Pwt	HEX-ATGGGGTGCAACCG-MGB
	Erys_143Pmut	FAM-ATGGGGTGCAACCG-MGB
Y163F	Erys_163F	ACTAATTTAACAACCTCCGGTCTTTGGA
	Erys_163R	ACTCGACCATTTACGGACCTTTTT
	Erys_163Pwt	FAM-TTTGGACAATCATATACAAC-MGB
	Erys_163Pmut	HEX-TTGGACAATCAAATACAAC-MGB

Για τους παθογόνους μύκητες *Phaeomoniella chlamydospora* και *Verticillium dahliae*, έγινε ποσοτικοποίηση με δύο μεθόδους την TaqMan qPCR και τη ddPCR (Παραδοτέο 1.2.3).

Για τα *Phaeomoniella chlamydospora* οι εκκινητές/probes και οι βέλτιστες συνθήκες, φαίνονται στους Πίνακες 1.2.2-19 και 1.2.2-20.

Πίνακας 1.2.2-19: Οι TaqMan εκκινητές και probe που σχεδιάστηκαν για τα assays του *Phaeomoniella chlamydospora*:

Oligo name	Sequence 5'→3' (including dyes)
pchITS417F	TGGCGGCGTCAAGAATGA
Pch pchITS495R	CAATAGGGCCAGGCCAAG
pchFAM	FAM-AGGTGCAGCGAGCAATCAAGCATACTGAGGTGG-BHQ1

Πίνακας 1.2.2-20: Συνθήκες των TaqMan assays του *Phaeomoniella chlamydospora* μετά τη βελτιστοποίηση

N	Assay	FAM Probe concentration	Primers concentration (nM) [vol in 10uL from 10uM]	Thermal Protocol
1	Pch	300 nM	150 nM (0.15)	Cycle number: 50, T <sub>m</sub> = 60.0°C, FTD thermal protocol

Για το *Verticillium dahliae*, οι εκκινητές/probes και οι βέλτιστες συνθήκες, φαίνονται στους Πίνακες 1.2.2-21 και 1.2.2-22.

Πίνακας 1.2.2-21: Οι TaqMan εκκινητές και probe που σχεδιάστηκαν για τα assays του *Verticillium dahliae*

Oligo name	Sequence 5'→3' (including dyes)
Vd-F929-947	CGTTTCCCCTTACTCTTCT
<i>Verticillium dahliae</i> Vd-R1076-1094	GGATTTTCGGCCCAGAACT
Vdhrc	[5' 6-FAM] CACCGCAAGCAGACTCTTGAAAGCCA [3' BHQ1]

Πίνακας 1.2.2-22: Συνθήκες των TaqMan assays του *Verticillium dahliae* μετά τη βελτιστοποίηση

N	Assay	FAM Probe concentration	Primers concentration (nM) [vol in 10uL from 10uM]	Thermal Protocol
1	Vd	100 nM	400 nM (0.4)	95°C for 2 min and 55 cycles at 95°C for 15 s and 62°C for 30 s, in a reaction volume of 25 μl

Για το ζιζάνιο *Papaver rhoeas* δημιουργήθηκε και βελτιστοποιήθηκε ένα 4-plex assay: Pro197Ser/His/Arg και ένα 2-plex assay: Trp574Leu (Πίνακας 1.2.2-23, Πίνακας 1.2.2-24) και πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος εγκυρότητας των assay με γνωστά δείγματα συνθετικού DNA (gblocks).

Πίνακας 1.2.2-23: Οι TaqMan εκκινήτες και probes που σχεδιάστηκαν για τα assays του *Papaver rhoeas*

Mutation	Oligo name	Sequence 5'→3' (including dyes)
P197A/T/R/G (Assay 1)	197F	TCTGGCCCTGGTGCTACTAA
	197R	GCTTCTTTGACAACACGAGGA
	197PwtP	HEX-CTGGTCAAGTACCTAGGAG-MGB
	197P MUT4A	FAM-CTGGTCAAGTAGCTAGGAG-MGB
	197P MUT5T	TexasRed-CTGGTCAAGTAACTAGGAG-MGB
	197P MUT3R	Atto647N-CTGGTCAAGTACGTAGGAG-MGB
P197S/H/L (Assay 2)	197F	TCTGGCCCTGGTGCTACTAA
	197R	GCTTCTTTGACAACACGAGGA
	197PwtP	HEX-CTGGTCAAGTACCTAGGAG-MGB
	197P MUT1S	FAM-ACTGGTCAAGTATCTAGGAG-MGB
	197P MUT2H	TexasRed-CTGGTCAAGTACATAGGAG-MGB
P574L	197P MUT7L	Atto647N-CTGGTCAAGTACTTAGGAG-MGB
	Pr574_F	TGTTGAATAATCAGCATTTGGGTATG
	Pr574_R	AGCCCTGTTTGCCTTATAAAACC
	Pr574_Pwt	HEX-TGTTCAAGTGGGAGGAT-MGB
	Pr574_Pmut	FAM-TTGTTCAGTTGGAGGAT-MGB

Πίνακας 1.2.2-24: Συνθήκες των TaqMan assays του *Papaver rhoeas* μετά τη βελτιστοποίηση

N	Assay	197P MUT4A Probe concentration	197P MUT5T Probe concentration	197P MUT3R Probe concentration	197P MUT6G Probe concentration	197P MUT1S Probe concentration	197P MUT2H Probe concentration	197P MUT7L Probe concentration	Pr574_Pwt Probe concentration	Pr574_Pmut Probe concentration	Prime rs concentration (nM) [vol in 10uL from 10uM]	Thermal Protocol
1	P197 A/T/R/G (Assay 1)	100	400	400	600	-	-	-	-	-	400 nM (0.4)	Cycl e number: 50, Tm = 62. 0°C, FTD thermal protocol
2	P197 S/H/L (Assay 2)	-	-	-	-	250	400	400	-	-	400 nM (0.4)	

3	P574L	-	-	-	-	-	-	-	250	250	400 nM (0.4)	Cycle number: 50, Tm = 60. 0°C, FTD thermal protocol
---	-------	---	---	---	---	---	---	---	-----	-----	--------------------	---

Όσον αφορά το ζιζάνιο ***Lolium rigidum***, προχωρήσαμε σε σχεδιασμό εκκινητών και probe για την ανίχνευση των παρακάτω μεταλλαγών στα γονίδια ενδιαφέροντος (Πίνακας 1.2.2-25 και Πίνακας 1.2.2-26).

Πίνακας 1.2.2-25: Οι TaqMan εκκινητές και probes που σχεδιάστηκαν για τα assays του ***Lolium rigidum***

Assay (Mutation)	Oligo name	Sequence 5'→3' (including dyes)
ESPS gene (P106S/T/A)	Lr_106F	CAAGGAGGAAGTMAAGCTCTT
	Lr_106R	CATTTCCACCRGCAGCTACTA
	Lr_106Pwt	HEX-TGCGGCCATTGAC-MGB
	Lr_106Pmut1S	FAM- ATGCGGTCATTGAC -MGB
	Lr_106Pmut2T	TexasRed-TGCGGACATTGAC-MGB
	Lr_106Pmut3A	Atto647N-TGCGGGCATTGAC-MGB
ACCcase gene (I1781L)	Lr_1781F	GTGGGCAAGGAGGATGGACTA
	Lr_1781R	TAGAATACGCACTGGCAATAGCA
	Lr_1781Pwt	HEX-TGTGGAGAAYATACATG-MGB
	Lr_1781Pmut	FAM-CTTCCATGTARRTTCTC-MGB
ACCcase gene (T2027C)	Lr_2027F	CGTGAAGGGTTACCTCTGTTCAT
	Lr_2027R	GCCTGCAGADYTCCTTCAAAA
	Lr_2027Pwt	HEX-CTTGCTAACTGGAGAGG-MGB
	Lr_2027Pmut	FAM-TTGCTAACTGYAGAGGC-MGB
ACCcase gene (I2041A)	Lr_2041F	TGGTGGGCAAAGAGACCTTT
	Lr_2041R	TRTATRTCCTAAGGTTCTCAACAATTG
	Lr_2041Pwt	HEX-AAGGAATTCTGCAGGCT-MGB
	Lr_2041Pmut	FAM-AAGGAAATCTGCAGGCT-MGB
ACCcase gene (A2078G)	Lr_2078F	CCAAGGCTGCAGAGCTWCGT
	Lr_2078R	GCRCTCAATGCGATCTGGATT
	Lr_2078Pwt	HEX-TCGTGATTGATAGCAAGA-MGB
	Lr_2078Pmut	FAM-TCGTGATTGGTAGCAAG-MGB
ACCcase gene (C2088A)	Lr_2088F	GGGTCGTGATTGRTAGCAAGATAA
	Lr_2088R	GGCTCAAGAACATTCSCSTTTTG
	Lr_2088Pwt	HEX-ATCGCATTGAGTGCT-MGB
	Lr_2088Pmut	FAM-AGATCGCATTGAGCGC-MGB
ALS gene (P197G/S)	Lr_197F	GCCACCAACCTCGTCTCC
	Lr_197R	GATGGGCGTCTCCTGGAAG
	Lr_197Pwt	HEX-TCCCGCGCCGCAT-MGB
	Lr_197PMut1Q	FAM-TCCAGCGCCGCATG-MGB

	Lr_197Pmut2S	Atto647N-TCTCGCGCCGCATG-MGB
ALS gene (T574L)	Lr_574F Lr_574R Lr_574Pwt Lr_574Pmut	GATATTGAACAACCAACATCTTGGAA CCGATTGGCCTTGTAACC HEX-TGGTGCAGTGGGAG-MGB FAM-TGGTGCAGTTGGAG-MGB

Στον Πίνακα 1.2.2-26, φαίνονται οι βέλτιστες συνθήκες όλων των assay του ***Lolium rigidum***.

Πίνακας 1.2.2-26: Συνθήκες των TaqMan assays του ***Lolium rigidum*** μετά τη βελτιστοποίηση

Assay	F/R (nM)	HEX (nM)	FAM (nM)	Tx Red (nM)	ATTO647N (nM)	Tm °C
Pro197/Gln/Ser	400/400	300		-	100	62
Trp574/Leu	400/400	250	250	-	-	60
Ile1781/Leu	400/400	250	200	-	-	62
Trp2027/Cys	400/400	250	250	-	-	60
Ile2041/Cys	400/400	250	250	-	-	60
Asp2078/Gly	400/400	250	200	-	-	63,4
Cys2088/Arg	400/400	250	250	-	-	60
Pro106/Ser/Thr/Ala	400/400	300	100	250	100	63,4

Για το ζιζάνιο ***Conyza canadensis***, σχεδιάστηκαν διάφορα σετ εκκινήτων (Πίνακας 1.2.2-27) για να προχωρήσουμε σε αλληλούχηση κατά Sanger με σκοπό την ανίχνευση μεταλλαγμένων αλληλομόρφων στα γονίδια EPSPS (Pro106Ser) και ALS (Trp574Leu, Pro197Ala και Ala205Val) αλλά και την αλληλουχία πλησίων αυτών ώστε να προχωρήσουμε με το σχεδιασμό μοριακών διαγνωστικών.

Πίνακας 1.2.2-27: Σετ εκκινήτων που σχεδιάστηκαν για το ζιζάνιο ***Conyza canadensis*** και το μέγεθος του προϊόντος που αναμένουμε.

Gene	Mutation	Primer Name	Sequence	Product length
EPSPS	Pro106Ser	Con106_F1seq	GGACTACTGTTGTAGACAACTTG	223 bp
		Con106_R2seq	GTAACGGCAGCAGTCAATGG	
ALS	Pro197Ala και Ala205Val	Con197/205_F2seq	CTGTATAGCCACTTCCGGTCC	244 bp
		Con197/205_R2seq	CGACCGGGCAAGATAAAAAGC	
	Trp574Leu	Con574_Fseq	ATGAACGTTCAAGAGTTAGC	~355 bp
		Con574_Rseq	CCTTCGGTGATCACATCCTTGAA	

Τα δείγματα του ζιζανίου ***Conyza canadensis*** προέρχονται από το ΓΠΑ και προχωρήσαμε σε αλληλούχηση κατά Sanger για τις μεταλλαγές στα γονίδια ESTS και ALS.

Για το ζιζάνιο ***Echinochloa crus-galli*** σχεδιάστηκαν εκκινήτες (1.2.2-28) για τις μεταλλαγές στα γονίδια ALS και Accase. Πιο συγκεκριμένα, στο ALS γονίδιο: Ala122 [GCC] > Asn [AAC] or Thr [GAC] or Asp [ACC], Trp574 [TGG] > Leu [TTG], Pro197 [CCC] > Ser [TCC], Ala205 [GCC] > Val [GTC] ενώ στο ACCase γονίδιο: Ile1781 [ATA] > Leu [CTA]. Δείγματα ζιζανίων στάλθηκαν για αλληλούχηση κατά Sanger με σκοπό το

σχεδιασμό μοριακών διαγνωστικών για τις μεταλλαγές ενδιαφέροντος.

Πίνακας 1.2.2-28: Σετ εκκινήτων που σχεδιάστηκαν για το ζιζάνιο *Echinochloa crus-galli* και το μέγεθος του προϊόντος που αναμένουμε:

Primer Name	Sequence	Product length	Tm (°C)
Ech_1781Fseq	GATTGGCATAGCCGATGAAG	474 bp [Ile1781]	57
Ech_1781Rseq	TGGACAACACCATTGGTAGC		
EchAla122_F	CGACGTCTTCGCCTACCC	328 bp [Ala122]	59
EchAla122_R	GTTGTGCTTGGTGATGGAGC		
EchDomAD_F	CATCACCAACCACCTCTTCC	385 bp [Pro197; Ala205]	55
EchDomAD_R	AGCCATCTGCTGTTGGATGT		
EchDomBE_F	GTTGGGCAGCACCCAGATGT	782 bp [Trp574]	55
EchDomBE_R	AAGCTACTTAAGATTACCATACCAGAGT		

### 3 ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα έρευνα έδειξε τη δυνατότητα ανίχνευσης μεταλλαγών ανθεκτικότητας σε έντομα, ζιζάνια και μύκητες, καλύπτοντας ένα μεγάλο φάσμα αυτών των κατηγοριών εχθρών, με σκοπό την έγκαιρη ανίχνευση ανθεκτικότητας αλλά και την ποσοτικοποίησή τους.

Πραγματοποιήθηκε επιτυχώς ο σχεδιασμός και ανάπτυξη μοριακών διαγνωστικών εργαλείων με τη μορφή λυοφιλοποιημένων pellets, στοχεύοντας σε εντομολογικούς εχθρούς, φυτοπαθογόνους μύκητες και ανθεκτικά ζιζάνια. Πιο συγκεκριμένα, προχωρήσαμε σε σχεδιασμό και βελτιστοποίηση TaqMan assay για τους εντομολογικούς εχθρούς *Ceratitis capitata*, *Myzus persicae*, *Aphis gossypii*, *Tuta absoluta*, *Panonychus citri*, *Tetranychus urticae*, *Lobesia botrana* και *Spodoptera frugiperda*. Επίσης προχωρήσαμε σε σχεδιασμό TaqMan assay για μεταλλαγές ανθεκτικότητας στους μύκητες *Botrytis cinerea*, *Erysiphe necator* και ποσοτικοποίησης στους μύκητες *Verticillium dahliae* και *Phaeomoniella chlamydospora*. Τέλος, για τα ζιζάνια σχεδιάσαμε TaqMan assays για το *Papaver rhoeas* και το *Lolium rigidum* ενώ τα ζιζάνια *Conyza canadensis* και *Echinochloa crus-galli*, σχεδιάστηκαν εκκινητές και προχωρήσαμε σε Sanger αλληλούχηση με σκοπό τον τελικό σχεδιασμό μοριακών διαγνωστικών.

## 4 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

### Βιβλιογραφικές Αναφορές

Mavridis K, Papapostolou KM, Riga M, Ilias A, Michaelidou K, Bass C et al., Multiple TaqMan qPCR and droplet digital PCR (ddPCR) diagnostics for pesticide resistance monitoring and management, in the major agricultural pest *Tetranychus urticae*. *Pest Manag Sci* 78: 263–273 (2022).

Hall TA, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95–98 (1999).