



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

Παραδοτέο 1.2.3 Μοριακά διαγνωστικά υπερευαίσθητης πλατφόρμας ανίχνευσης ddPCR

Πληροφορίες για το έγγραφο

Αριθμός παραδοτέου: Π1.2.3

Ενότητα εργασίας: ΕΕ1

Επικεφαλής δικαιούχος: ΙΤΕ

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: ΤΑΕΔΡ-0535675

Ακρωνύμιο έργου: InnoPP

Ημερομηνία έναρξης: 15 Μαΐου 2023

Διάρκεια: 28 Μήνες

Συντονιστής Φορέας: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Συντονιστής/ Επιστημονικός Υπεύθυνος: Ιωάννης Βόντας

Πίνακας Περιεχομένων

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ	4
2	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ	6
2.1	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	6
2.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	7
3	ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	12
4	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι- Βιβλιογραφικές Αναφορές	13

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 υπερευαίσθητους προσδιορισμούς (για παράδειγμα παρουσία μεταλλαγής ανθεκτικότητας σε πολύ μικρό ποσοστό) θα χρησιμοποιηθούν πρωτότυπα προϊόντα όπως τα "Ready to Go Lyorhyllised 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 Π1.2.3

Σκοπός του παρόντος παραδοτέου είναι τα ήδη αξιολογημένα πρωτόκολλα με γνωστά δείγματα να εφαρμοστούν και να ενταχθούν σε μια υπερευαίσθητη πλατφόρμα ανίχνευσης παθογόνων και μοριακών δεικτών ταυτοποίησης βιοτύπων και ανθεκτικότητας, με βάση την τεχνολογία της ψηφιακής σταγόνας (ddPCR). Τα διαγνωστικά αφορούν τους εντομολογικούς εχθρούς (*Ceratitis capitata* – εσπεριδοειδή, *Myzus persicae* κηπευτικά ή/και ροδακινιά και *Aphis gossypii*- κηπευτικά, Ψευδόκοκκοι – εσπεριδοειδή, *Tuta absoluta* – ντομάτα, *Panonychus citri* και *Tetranychus urticae* – εσπεριδοειδή). Επίσης, για τους μύκητες *Botrytis cinerea* και *Erysiphe necator* πραγματοποιήθηκε ανίχνευση μεταλλαγών ενώ για τους παθογόνους μύκητες

Verticillium dahlia και *Phaeomoniella chlamydospore* έγινε ποσοτικοποίηση δειγμάτων και πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ δύο μεθόδων, της qPCR και της ddPCR. Τέλος, συμπεριλήφθηκαν και τα ζιζάνια *Papaver rhoeas* και *Lolium rigidum*.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

Η έγκαιρη διάγνωση της ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα, μυκητοκτόνα και ζιζανιοκτόνα αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την εφαρμογή ολοκληρωμένων και βιώσιμων στρατηγικών φυτοπροστασίας. Η εγκαθίδρυση ανθεκτικών πληθυσμών δύναται να προκαλέσει σοβαρή μείωση της γεωργικής παραγωγικότητας και να περιορίσει το φάσμα των διαθέσιμων και αποτελεσματικών μέσων χημικής αντιμετώπισης. Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η μεταφορά της τεχνογνωσίας που έχει αναπτυχθεί στο παραδοτέο 1.2.2 σε μία υπερευαίσθητη πλατφόρμα ανίχνευσης παθογόνων και μοριακών δεικτών ταυτοποίησης βιοτύπων και ανθεκτικότητας. Η Droplet Digital PCR (ddPCR) αποτελεί μια ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδο ακριβούς καταμέτρησης μορίων DNA/RNA, μέσω της κατάτμησης του δείγματος σε χιλιάδες μικροσκοπικές σταγόνες, καθεμία από τις οποίες λειτουργεί ως ανεξάρτητη αντίδραση PCR. Η προσέγγιση αυτή επιτρέπει την απόλυτη ποσοτικοποίηση χωρίς την ανάγκη πρότυπης καμπύλης, καθιστώντας την ιδανική για την ανίχνευση σπάνιων μορίων-στόχων, τη μέτρηση αριθμού αντιγράφων (CNVs) και την υψηλής ακρίβειας ανάλυση SNPs. Η τεχνολογία βασίζεται σε μέτρηση θετικών/αρνητικών σταγονιδίων στο τελικό στάδιο της αντίδρασης, παρακάμπτοντας τις διακυμάνσεις αποτελεσματικότητας που συναντώνται στις παραδοσιακές qPCR. Η ddPCR επιτρέπει την ακριβή ανίχνευση πολύ μικρών ποσοτήτων DNA-στόχου σε δείγματα με μεγάλο αριθμό αλληλομόρφων (Whale et al., 2016; Zink et al., 2017), καθιστώντας την ιδανική για πρώιμη ανίχνευση ανθεκτικότητας (Mavridis et al., 2021; Mavridis et al., 2022; Mavridis et al., 2023; Van Leeuwen et al., 2020).

Τα διαγνωστικά αφορούν εντομολογικούς εχθρούς (*Ceratitis capitata* – εσπεριδοειδή, *Myzus persicae* κηπευτικά ή/και ροδακινιά και *Aphis gossypii*- κηπευτικά, *Tuta absoluta* – ντομάτα, *Panonychus citri* και *Tetranychus urticae* – εσπεριδοειδή) και μύκητες (*Phaeomoniella chlamydospora*, *Verticillium dahliae*, *Botrytis cinerea* and *Erysiphe necator*). Για τους εντομολογικούς εχθρούς *Spodoptera frugiperda* και *Lobesia botrana* και τα ζιζάνια *Papaver rhoeas* και *Lolium rigidum* τα διαθέσιμα assays που αναπτύχθηκαν *in silico* στο Παραδοτέο 1.2.2 δεν προωθήθηκαν περαιτέρω σε στάδιο πειραματικής βελτιστοποίησης με ddPCR, καθώς η παρακολούθηση (Ενότητα Εργασίας 2) μπορούσε να πραγματοποιηθεί αποτελεσματικά χωρίς την ανάγκη ανάπτυξης πιο προηγμένης τεχνολογίας στις συγκεκριμένες περιπτώσεις. Με βάση την αξιολόγηση των αναγκών του έργου και των χαρακτηριστικών των στοχευόμενων παραμέτρων, κρίθηκε ότι τα εργαλεία που αναπτύχθηκαν στο Παραδοτέο 1.2.2, παρείχαν επαρκή ακρίβεια και αξιοπιστία για την επιτυχία του συστήματος παρακολούθησης, χωρίς να απαιτείται πρόσθετη, πιο πολύπλοκη πειραματική διερεύνηση.

Στο παραδοτέο 1.2.2 σχεδιάστηκαν και βελτιστοποιήθηκαν οι συνθήκες για τα διαγνωστικά με qPCR με τη χρήση γνωστών δειγμάτων ελέγχου (πλασμίδια), που περιείχαν τα γονίδια-στόχους και στο παραδοτέο 1.2.2 φαίνονται και οι στόχοι οι οποίοι εξετάστηκαν.

Ο σκοπός του παρόντος εγγράφου είναι η παρουσίαση των αποτελεσμάτων καινοτόμου έρευνας στα πλαίσια του παραδοτέου Π1.2.3, που αφορούν την μεταφορά

των πρωτοκόλλων των assay του Παραδοτέου 1.2.2 σε μοριακά διαγνωστικά με τη χρήση της ddPCR 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

Οι εκκινητές και οι probes σχεδιάστηκαν στο παραδοτέο Π1.2.2 και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν σε set up κατάλληλο για τη ddPCR. Πιο συγκεκριμένα, μία αντίδραση ddPCR πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας ένα limiting dilution ώστε να κατανεμηθούν τα μόρια νουκλεϊκού οξέος σε περίπου 20.000 μεμονωμένα, νανο-σταγονίδια νερού-σε-λάδι. Αυτή η «διαμερισμάτωση» (partitioning) έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μικροσταγονιδίων που περιέχουν ένα (ή λίγα) αντίγραφα του στόχου, και κάποιων που δεν περιέχουν κανένα. Τα σταγονίδια που περιέχουν και τα αντιδραστήρια, τα οποία όπως και στην qPCR, παράγουν φθορίζον σήμα κατά την παρουσία της αλληλουχίας-στόχου όταν υποβάλλονται σε θερμικό κύκλο. Στη συνέχεια, τα σταγονίδια αναλύονται ένα προς ένα σε μια εξειδικευμένη συσκευή και χαρακτηρίζονται ως θετικά (αυξημένη ένταση φθορισμού) ή αρνητικά (βασικό επίπεδο σήματος). Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται εφαρμόζοντας στατιστική Poisson, η οποία επιτρέπει τον υπολογισμό της απόλυτης ποσότητας του DNA-στόχου στο συνολικό μείγμα της αντίδρασης (Hindson et al., 2011, McDermott et al., 2013). Στην παρούσα μελέτη, η ddPCR πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το σύστημα QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad, Hercules, CA). Συνθετικές δίκλωνες αλληλουχίες DNA (gBlocks™ gene fragments) με γνωστό αριθμό αντιγράφων των αγρίου τύπου (wild type) ή των μεταλλαγμένων αλληλουχιών (mutant) χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες για τη βελτιστοποίηση όλων των αντιδράσεων ddPCR ως προς την ειδικότητα, ευαισθησία, ένταση φθορισμού και διακριτική ικανότητα (βέλτιστο διαχωρισμό αρνητικών και θετικών σταγονιδίων).

Οι ακόλουθες παράμετροι βελτιστοποιήθηκαν για κάθε assay: συγκέντρωση των probes, ποσότητα dsDNA, θερμοκρασία υβριδοποίησης (annealing), αριθμός κύκλων PCR. Οι βελτιστοποιημένες συνθήκες παρατίθενται στους παρακάτω πίνακες. Οι αντιδράσεις περιλάμβαναν 1× ddPCR Supermix για probes, 5 U του περιοριστικού ενζύμου EcoRI-HF® (New England Biolabs), 0.1–10 ng dsDNA, και τους εκκινητές και probes που εμπεριέχονται στο παραδοτέο Π1.2.2. Οι αντιδράσεις είχαν τελικό όγκο 20,0 μL με νερό DEPC. Τα δείγματα αναμείχθηκαν με 70,0 μL ελαίου δημιουργίας σταγονιδίων για probes (Bio-Rad), εισήχθησαν στον QX200 droplet generator (Bio-Rad) και μεταφέρθηκαν σε 96-well plates (Bio-Rad), όπου η PCR πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή C1000 Touch (Bio-Rad). Το πρωτόκολλο θερμικού κύκλου περιλάμβανε: 95 °C για 10 min, και 50–55 κύκλους των 94 °C για 30 s, 47–61 °C (ανάλογα την αντίδραση) για 1 min, και 98 °C για 10 min. Η τελική (endpoint) φθορίζουσα εκπομπή μετρήθηκε στα κανάλια FAM, HEX, TexasRed και Atto647N στον αναγνώστη σταγονιδίων QX200 (Bio-Rad), και τα δεδομένα αναλύθηκαν με το λογισμικό QuantaSoft Analysis Pro (v.1.0.596) για την ταξινόμηση θετικών και αρνητικών σταγονιδίων και την παροχή απόλυτης ποσοτικοποίησης των μορίων στόχου ως αντίγραφα στόχου/μL αντίδρασης για τα αγρίου τύπου (HEX) και τα μεταλλαγμένα (FAM/ TexasRed/ Atto647N) αλληλόμορφα. Όλα τα παραπάνω περιγράφονται αναλυτικά στο Mavridis et al., 2022. Η συμφωνία μεταξύ των πραγματικών και των μετρημένων με ddPCR συχνοτήτων του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου (Mutant Allelic Frequencies: MAFs) αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας το συντελεστή συσχέτισης συμφωνίας (concordance correlation coefficient) (Lin. 1989, McBride. 2005). Η πορεία ανάλυσης δειγμάτων με ddPCR φαίνεται στην Εικόνα 1.2.3-1.

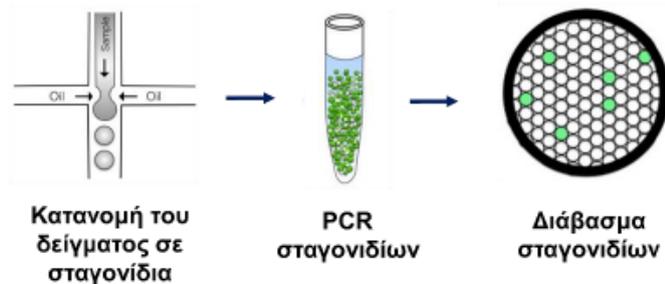
Βήμα 1: Συλλογή Δείγματος Εντόμων



Βήμα 2: Μαζική συγκέντρωση δειγμάτων και εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων

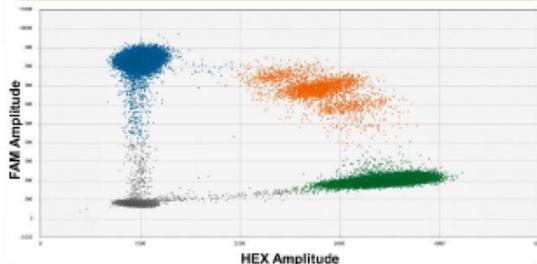


Βήμα 3: Αντιδράσεις ddPCR



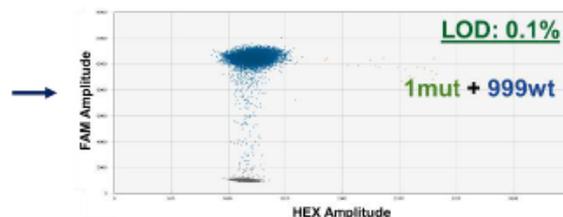
Βήμα 4: Ανάλυση αποτελεσμάτων

Αναγνώριση είδους / Ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα



Species ID / Biotype

Ειδικά για το είδος/βιοτύπο SNPs



Insecticide resistance target site mutations

Μεταλλάξεις της θέσης στόχου ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα (πχ kdr, ACE-1, Ryr etc)

Εικόνα 1.2.3-1: Πορεία ανάλυσης δειγμάτων με μοριακά διαγνωστικά υπερευαίσθητης πλατφόρμας ανίχνευσης ddPCR. Η εικόνα παρουσιάζει τη συνολική πορεία ανάλυσης για δείγματα εντόμων, ξεκινώντας από τη συλλογή και την επεξεργασία του δείγματος, την απομόνωση RNA/DNA, τη χρήση μικροσταγονιδίων για την ποσοτική ανάλυση και καταλήγοντας στην ταυτοποίηση είδους ή βιοτύπου και στην ανίχνευση μεταλλαγών ανθεκτικότητας. Η προσέγγιση αυτή προσφέρει εξαιρετική ακρίβεια και ευαισθησία, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη αποτελεσματικών στρατηγικών διαχείρισης.

2.2 Αποτελέσματα και Συζήτηση

Ξεκινώντας με τον εντομολογικό εχθρό *Myzus persicae*, στο παραδοτέο 1.2.2 σχεδιάστηκαν εκκινητές και probes, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν στις ddPCR και οι συνθήκες βελτιστοποιήθηκαν ως προς τις συγκεντρώσεις εκκινητών και probe, τη συγκέντρωση του DNA σε κάθε αντίδραση, τη θερμοκρασία υβριδοποίησης και τους κύκλους κάθε αντίδρασης (Πίνακας 1.2.3-1). Οι μεταλλαγές προς μελέτη ήταν οι

παρακάτω: kdr (L1014F, M918T, M918L, transposon), nAChR (R81T), CYP6CY3 (T71I), Acc (A2666V), Ace1 (S431F).

Πίνακας 1.2.3-1: Συγκεντρώσεις εκκινητών και probe που χρησιμοποιήθηκαν στις ddPCR αντιδράσεις του *Myzus persicae*, η συγκέντρωση του DNA σε κάθε αντίδραση, η θερμοκρασία υβριδοποίησης, οι κύκλοι κάθε αντίδρασης και το τελικό πρωτόκολλο.

N	Assay	SNP	Tm (°C)	Cycle number	HEX Probe concentration (nM) [vol in 20uL from 10uM]	FAM Probe concentration (nM) [vol in 20uL from 10uM]	Primers concentration (nM) [vol in 20uL from 10uM]	dsDNA quantity	Thermal Protocol
1	kdr_1	L1014F	56	50	500 nM [1.0 uL]	500 nM [1.0 uL]	1200 nM [2.4 uL]	10 ng	Ramp rate: 1.5° C /sec Annealing-Extension time: 1.5 min Incubate droplets O/N at 12°C
2	kdr_2	M918T	52	50	600 nM [1.2 uL]	200 nM [0.4 uL]	1200 nM [2.4 uL]	10 ng	
3	Ace1	S431F	56	50	500 nM [1.0 uL]	500 nM [1.0 uL]	1200 nM [2.4 uL]	10 ng	
4	nAChR β1	R81T	54	50	500 nM [1.0 uL]	500 nM [1.0 uL]	1200 nM [2.4 uL]	10 ng	
5	ACC	A2666V	58	50	600 nM [1.2 uL]	300 nM [0.6 uL]	1200 nM [2.4 uL]	10 ng	
6	CYP6CY3	T71I	56	50	600 nM [1.2 uL]	300 nM [0.6 uL]	1200 nM [2.4 uL]	10 ng	

Για τον εντομολογικό εχθρό *Aphis gossypii*, σχεδιάστηκαν εκκινητές και probes στο Παραδοτέο 1.2.2 για τις μεταλλαγές kdr (L1014F, M918L, M918V), Ace1 (S431F), A302S, nAChR (R81T), Acc (A2001V). Οι εκκινητές και probes αυτοί χρησιμοποιήθηκαν στις ddPCR και οι συνθήκες βελτιστοποιήθηκαν ως προς τις συγκεντρώσεις εκκινητών και probe, τη συγκέντρωση του DNA σε κάθε αντίδραση, τη θερμοκρασία υβριδοποίησης και τους κύκλους κάθε αντίδρασης (Πίνακας 1.2.3-2).

Πίνακας 1.2.3-2: Συγκεντρώσεις εκκινητών και probe που χρησιμοποιήθηκαν στις ddPCR αντιδράσεις του *Aphis gossypii*, η συγκέντρωση του DNA σε κάθε αντίδραση, η θερμοκρασία υβριδοποίησης, οι κύκλοι κάθε αντίδρασης και το τελικό πρωτόκολλο.

N	Assay	SNP	Tm (°C)	Cycle number	HEX Probe concentration (nM) [vol in 20uL from 10uM]	FAM Probe concentration (nM) [vol in 20uL from 10uM]	Primers concentration (nM) [vol in 20uL from 10uM]	dsDNA quantity	Thermal Protocol
1	kdr_1	L1014F	56	50	500 nM [1.0 uL]	500 nM [1.0 uL]	1200 nM [2.4 uL]	10 ng	Ramp rate: 1.5° C /sec Annealing-Extension time: 1.5 min Incubate droplets O/N at 12°C
2	kdr_2	M918L/V	47	50	500 nM [1.0 uL]	500 nM [1.0 uL]	1200 nM [2.4 uL]	10 ng	
3	nAChR	R81T	56	50	500 nM [1.0 uL]	500 nM [1.0 uL]	1200 nM [2.4 uL]	10 ng	
4	Ace1_1	A302S	58	50	600 nM [1.2 uL]	200 nM [0.4 uL]	1200 nM [2.4 uL]	10 ng	
5	Ace1_2	S431F	50	50	600 nM [1.2 uL]	200 nM [0.4 uL]	1200 nM [2.4 uL]	10 ng	
6	Acc	A2001V	58	50	600 nM [1.2 uL]	300 nM [0.6 uL]	1200 nM [2.4 uL]	10 ng	

Για τον εντομολογικό εχθρό *Tuta absoluta*, σχεδιάστηκαν εκκινητές και probes στο Παραδοτέο 1.2.2 για τις μεταλλαγές kdr (F1845Y, V1848I), nAChRa6 (G275E), RyR (I4746M, I4746T, I4746K, G4903V, G4903E). Οι εκκινητές και probes αυτοί χρησιμοποιήθηκαν στις ddPCR και οι συνθήκες βελτιστοποιήθηκαν ως προς τις συγκεντρώσεις εκκινητών και probe, τη συγκέντρωση του DNA σε κάθε αντίδραση, τη θερμοκρασία υβριδοποίησης και τους κύκλους κάθε αντίδρασης (Πίνακας 1.2.3-3).

Πίνακας 1.2.3-3: Συγκεντρώσεις εκκινητών και probe που χρησιμοποιήθηκαν στις ddPCR αντιδράσεις του *Tuta absoluta*, η συγκέντρωση του DNA σε κάθε αντίδραση, η θερμοκρασία υβριδοποίησης, οι κύκλοι κάθε αντίδρασης και το τελικό πρωτόκολλο.

N	Assay	SNP	Tm (°C)	Cycle number	HEX Probe concentration	FAM Probe concentration	Primers concentration	dsDNA quantity	Thermal Protocol
1	nAChR_a6	G275E	56	50	500 nM	500 nM	1200 nM	5 ng	Ramp rate: 1.5° C /sec Annealing-Extension time: 1.5 min Incubate droplets O/N at 12°C
2	RyR_1	G4903V/E	56	50	600 nM	300 nM mutV; 300nM mut E	1200 nM	5 ng	
3	RyR_2	I4746M/T/K	61	50	500 nM	500 nM mutM; 300nM mut T; 300 nM mut K	1200 nM	5 ng	
4	vgsc_1	V1848I	58	50	500 nM	500 nM	1200 nM	5 ng	
5	vgsc_2	F1845Y	52	50	600 nM	300 nM	1200 nM	5 ng	
6	nAChR_a6	F238del	58	50	500 nM	500 nM	1200 nM	5 ng	

Για τον εντομολογικό εχθρό *Panonychus citri*, σχεδιάστηκαν εκκινητές και probes στο Παραδοτέο 1.2.2 για τις μεταλλαγές kdr (F1538I), β-2R/OctR (T752C), CHS1 (I1017F), PSST (H110R), Cytb (G126S, A133T). Οι εκκινητές και probes αυτοί χρησιμοποιήθηκαν στις ddPCR και οι συνθήκες βελτιστοποιήθηκαν ως προς τις συγκεντρώσεις εκκινητών και probe, τη συγκέντρωση του DNA σε κάθε αντίδραση, τη θερμοκρασία υβριδοποίησης και τους κύκλους κάθε αντίδρασης (Πίνακας 1.2.3-4).

Πίνακας 1.2.3-4: Συγκεντρώσεις εκκινητών και probe που χρησιμοποιήθηκαν στις ddPCR αντιδράσεις του *Panonychus citri*, η συγκέντρωση του DNA σε κάθε αντίδραση, η θερμοκρασία υβριδοποίησης, οι κύκλοι κάθε αντίδρασης και το τελικό πρωτόκολλο.

N	Assay	SNP	Tm (°C)	Cycle number	HEX Probe concentration	FAM Probe concentration	Primers concentration	dsDNA quantity	Thermal Protocol
1	Pc-CHS1	I1017F	53	50	500 nM	500 nM	1200 nM	2 ng	Ramp rate: 1.5° C /sec Annealing-Extension time: 1.5 min Incubate droplets O/N at 12°C
2	Pc-OctR	752	56	50	500 nM	500 nM	1200 nM	2 ng	
3	Pc-kdr	F1538I	58 or 60	50	600 nM	200 nM	1200 nM	2 ng	
4	Pc-PSST	H110R	56	50	500 nM	500 nM	1200 nM	2 ng	
5	Pc-cytb_1	G126S	56	50	500 nM	400 nM	1200 nM	0.1 ng	
6	Pc-cytb_2	A133T	56	50	500 nM	500 nM	1200 nM	0.1 ng	

Για τον εντομολογικό εχθρό *Tetranychus urticae*, σχεδιάστηκαν εκκινητές και probes στο Παραδοτέο 1.2.2 για τις μεταλλαγές GluCl1 (G314D), GluCl3 (G326E, I321T), Ace1 (G119S, F331W), PSST (H92R), kdr (L1024V, F1538I), CHS1 (I1017F), Cytb (G126S, S141F, P262T), SdhB (H258Y). Οι εκκινητές και probes αυτοί χρησιμοποιήθηκαν στις ddPCR και οι συνθήκες βελτιστοποιήθηκαν ως προς τις συγκεντρώσεις εκκινητών και probe, τη συγκέντρωση του DNA σε κάθε αντίδραση, τη θερμοκρασία υβριδοποίησης και τους κύκλους κάθε αντίδρασης (Πίνακας 1.2.3-5).

Πίνακας 1.2.3-5: Συγκεντρώσεις εκκινητών και probe που χρησιμοποιήθηκαν στις ddPCR αντιδράσεις του *Tetranychus urticae*, η συγκέντρωση του DNA σε κάθε αντίδραση, η θερμοκρασία υβριδοποίησης, οι κύκλοι κάθε αντίδρασης και το τελικό πρωτόκολλο.

N	Assay	SNP	Tm (°C)	Cycle number	HEX Probe concentration	FAM Probe concentration	Primers concentration	dsDNA quantity	Thermal Protocol
1	Tu-GluCl1	G314D	60	50	625nM [1.25 uL]	375 [0.75 uL]	1200 [2.4 uL]	10 ng	Ramp rate: 1.5° C /sec Annealing-Extension time:1.5 min Incubate droplets O/N at 12°C
2	Tu-GluCl3	G326E	60	50	500nM [1.00 uL]	500 [1.0 uL]	1200 [2.4 uL]	10 ng	
3	Tu-GluCl3	I321T	54	50	500 nM [1.00 uL]	500 [1.0 uL]	1200 [2.4 uL]	10 ng	
4	Tu-kdr1	F1538I	58	50	500nM [1.00 uL]	500 [1.0 uL]	1200 [2.4 uL]	10 ng	
5	Tu-kdr2	L1024V	56	50	500nM [1.00 uL]	500 [1.0 uL]	1200 [2.4 uL]	10 ng	
6	Tu-CHS1	I1017F	56	50	500nM [1.00 uL]	500 [1.0 uL]	1200 [2.4 uL]	10 ng	
7	Tu-cytb1	G126S	56	50	500nM [1.00 uL]	500 [1.0 uL]	1200 [2.4 uL]	0.1ng	
8	Tu-cytb2	S141F	52	50	500nM [1.00 uL]	500 [1.0 uL]	1200 [2.4 uL]	0.1ng	
9	Tu-cytb3	P262T	48	50	600nM [1.20 uL]	600 [1.20 uL]	1200 [2.4 uL]	0.1ng	

Για τον εντομολογικό εχθρό *Ceratitis capitata*, σχεδιάστηκαν εκκινητές και probes στο Παραδοτέο 1.2.2 για τις nAChRa6 (K352*, aG > AT splice site, Q68*). Οι εκκινητές και probes αυτοί χρησιμοποιήθηκαν στις ddPCR και οι συνθήκες βελτιστοποιήθηκαν ως προς τις συγκεντρώσεις εκκινητών και probe, τη συγκέντρωση του DNA σε κάθε αντίδραση, τη θερμοκρασία υβριδοποίησης και τους κύκλους κάθε αντίδρασης (Πίνακας 1.2.3-6).

Πίνακας 1.2.3-6: Συγκεντρώσεις εκκινητών και probe που χρησιμοποιήθηκαν στις ddPCR αντιδράσεις του *Ceratitis capitata*, η συγκέντρωση του DNA σε κάθε αντίδραση, η θερμοκρασία υβριδοποίησης, οι κύκλοι κάθε αντίδρασης και το τελικό πρωτόκολλο.

N	Assay	SNP	Tm °C	Cycle number	HEX Probe concentration	FAM Probe concentration	Primers concentration	dsDNA quantity	Thermal Protocol
1	Cc_spin_1	K352*	60	50	500nM [1.00uL]	400 [0.8 uL]	1200 [2.4 uL]	10 ng	Ramp rate: 1.5° C /sec Annealing-Extension time:1.5 min Incubate droplets O/N at 12°C
2	Cc_spin_2	Q68*	56	50	500nM [1.00 uL]	500 [1.0 uL]	1200 [2.4 uL]	10 ng	
3	Cc_spin_3	aG > AT & A200T	58	50	500 nM [1.00 uL]	500 [1.0 uL]	1200 [2.4 uL]	10 ng	

Για τους μύκητες, και συγκεκριμένα για το *Botrytis cinerea* σχεδιάστηκαν εκκινητές και probes στο Παραδοτέο 1.2.2 για τις μεταλλαγές sdh (P225H, P225F, N230I, H272R, H272Y, I274V). Οι εκκινητές και probes αυτοί χρησιμοποιήθηκαν στις ddPCR και οι συνθήκες βελτιστοποιήθηκαν ως προς τις συγκεντρώσεις εκκινητών και probe, τη συγκέντρωση του DNA σε κάθε αντίδραση, τη θερμοκρασία υβριδοποίησης και τους

κύκλους κάθε αντίδρασης (Πίνακας 1.2.3-7).

Πίνακας 1.2.3-7: Συγκεντρώσεις εκκινητών και probe που χρησιμοποιήθηκαν στις ddPCR αντιδράσεις του *Botrytis cinerea*, η συγκέντρωση του DNA σε κάθε αντίδραση, η θερμοκρασία υβριδοποίησης, οι κύκλοι κάθε αντίδρασης και το τελικό πρωτόκολλο.

N	Assay	SNP	T _m (°C)	Cycle number	HEX Probe concentration (nM) [vol in 20uL from 10uM]	FAM Probe concentration (nM) [vol in 20uL from 10uM]	Primers concentration (nM) [vol in 20uL from 10uM]	dsDNA quantity	Thermal Protocol
1	Bc_SDH1	P225H+ P225F	56	50	500 nM [1.0 uL]	P225_MUT1_H→250 nM [0.5 uL] P225_MUT2_F→200 nM [0.4 uL]	1200 nM [2.4 uL]	~2 ng	Ramp rate: 1.5° C /sec Annealing-Extension time: 1.5 min Incubate droplets O/N at 12°C
2	Bc_SDH3	N230I	56	50	500 nM [1.0 uL]	500 nM [1.0 uL]	1200 nM [2.4 uL]	~2 ng	
3	Bc_SDH4	H272R+ H272Y	56	50	500 nM [1.0 uL]	P225_MUT1_R→250 nM [0.5 uL] P225_MUT2_Y→200 nM [0.4 uL]	1200 nM [2.4 uL]	~2 ng	
4	Bc_SDH6	I274V	56	50	500 nM [1.0 uL]	500 nM [1.0 uL]	1200 nM [2.4 uL]	~2 ng	

Για το μύκητα *Erysiphe necator* σχεδιάστηκαν εκκινητές και probes στο Παραδοτέο 1.2.2. Οι εκκινητές και probes αυτοί χρησιμοποιήθηκαν στις ddPCR και οι συνθήκες βελτιστοποιήθηκαν ως προς τις συγκεντρώσεις εκκινητών και probe, τη συγκέντρωση του DNA σε κάθε αντίδραση, τη θερμοκρασία υβριδοποίησης και τους κύκλους κάθε αντίδρασης (Πίνακας 1.2.3-8).

Πίνακας 1.2.3-8: Συγκεντρώσεις εκκινητών και probe που χρησιμοποιήθηκαν στις ddPCR αντιδράσεις του *Erysiphe necator*, η συγκέντρωση του DNA σε κάθε αντίδραση, η θερμοκρασία υβριδοποίησης, οι κύκλοι κάθε αντίδρασης και το τελικό πρωτόκολλο.

N	Assay	SNP	T _m (°C)	Cycle number	HEX Probe concentration (nM) [vol in 20uL from 10uM]	FAM Probe concentration (nM) [vol in 20uL from 10uM]	Primers concentration (nM) [vol in 20uL from 10uM]	dsDNA quantity	Thermal Protocol
1	Erys_SDHB-I	H242R/L	60	50	500 nM [1.0 uL]	P242_R→300 nM [0.6 uL] P242_L→500 nM [1.0 uL]	1200 nM [2.4 uL]	~2 ng	Ramp rate: 1.5° C /sec Annealing-Extension time: 1.5 min Incubate droplets O/N at 12°C
2	Erys_SDHB-II	I244V	46	50	500 nM [1.0 uL]	500 nM [1.0 uL]	1200 nM [2.4 uL]	~2 ng	
3	Erys_SDHC	G169D	58	50	500 nM [1.0 uL]	500 nM [1.0 uL]	1200 nM [2.4 uL]	~2 ng	
4	Erys_CYP51	Y136F	60	50	500 nM [1.0 uL]	500 nM [1.0 uL]	1200 nM [2.4 uL]	~2 ng	

Για το μύκητα *Verticillium dahliae* σχεδιάστηκαν εκκινητές και probes στο Παραδοτέο 1.2.2. Οι εκκινητές και probes αυτοί χρησιμοποιήθηκαν στις ddPCR και οι συνθήκες βελτιστοποιήθηκαν ως προς τις συγκεντρώσεις εκκινητών και probe, τη συγκέντρωση του DNA σε κάθε αντίδραση, τη θερμοκρασία υβριδοποίησης και τους κύκλους κάθε αντίδρασης (Πίνακας 1.2.3-9).

Πίνακας 1.2.3-9: Συγκεντρώσεις εκκινητών και probe που χρησιμοποιήθηκαν στις ddPCR αντιδράσεις του *Verticillium dahliae*, η συγκέντρωση του DNA σε κάθε αντίδραση, η θερμοκρασία υβριδοποίησης, οι κύκλοι κάθε αντίδρασης και το τελικό πρωτόκολλο.

N	Assay	Tm (°C)	Cycle number	FAM Probe concentration (nM) [vol in 20uL from 10uM]	Primers concentration (nM) [vol in 20uL from 10uM]	dsDNA quantity	Thermal Protocol
1	Vd	54	50	500 nM [1.0 uL]	1200 nM [2.4 uL]	~2 ng	Ramp rate: 1.5° C /sec Annealing-Extension time:1.5 min Incubate droplets O/N at 12°C

Για τους μύκητες *Phaeomoniella chlamydospora* και *Phaeoacremonium minimum* σχεδιάστηκαν εκκινητές και probes στο Παραδοτέο 1.2.2. Οι εκκινητές και probes αυτοί χρησιμοποιήθηκαν στις ddPCR και οι συνθήκες βελτιστοποιήθηκαν ως προς τις συγκεντρώσεις εκκινητών και probe, τη συγκέντρωση του DNA σε κάθε αντίδραση, τη θερμοκρασία υβριδοποίησης και τους κύκλους κάθε αντίδρασης (Πίνακας 1.2.3-10).

Πίνακας 1.2.3-10: Συγκεντρώσεις εκκινητών και probe που χρησιμοποιήθηκαν στις ddPCR αντιδράσεις των *Phaeomoniella chlamydospora* και *Phaeoacremonium minimum*, η συγκέντρωση του DNA σε κάθε αντίδραση, η θερμοκρασία υβριδοποίησης, οι κύκλοι κάθε αντίδρασης και το τελικό πρωτόκολλο.

N	Assay	Tm (°C)	Cycle number	FAM Probe concentration (nM) [vol in 20uL from 10uM]	Primers concentration (nM) [vol in 20uL from 10uM]	dsDNA quantity	Thermal Protocol
1	Pc	58	50	500 nM [1.0 uL]	1200 nM [2.4 uL]	~10 ng	Ramp rate: 1.5° C /sec Annealing-Extension time:1.5 min Incubate droplets O/N at 12°C

3 ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην ενότητα αυτή μεταφέρθηκε η ανάπτυξη διαγνωστικών με TaqMan του παραδοτέου 1.2.2 σε σχεδιασμό και βελτιστοποίηση στην πλατφόρμα ddPCR. Πιο συγκεκριμένα, τα πρωτόκολλα βελτιστοποιήθηκαν για εντομολογικούς εχθρούς (*Myzus persicae*, *Aphis gossypii*, *Tuta absoluta*, *Tetranychus urticae*, *Ceratitis capitata*), μύκητες (*Botrytis cinerea*, *Erysiphe necator*) και ζιζάνια (*Verticillium dahliae*, *Phaeomoniella chlamydospora*).

Τα assays που αναπτύχθηκαν στο Παραδοτέο 1.2.2 προσαρμόστηκαν επιτυχώς στην τεχνολογία ddPCR και, μετά από εκτενή βελτιστοποίηση των κρίσιμων παραμέτρων για κάθε εφαρμογή, επιτεύχθηκαν υψηλά επίπεδα ακρίβειας και επαναληψιμότητας. Η προσέγγιση αυτή προσφέρει σημαντικές δυνατότητες για την έγκαιρη ανίχνευση της ανθεκτικότητας, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις πρώτης εφαρμογής φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε νέες γεωγραφικές περιοχές. Η ddPCR είναι μία πλατφόρμα για εξαιρετικά ευαίσθητη και ακριβή διάγνωση, ακόμα και όταν τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα είναι σε πολύ χαμηλή συχνότητα ή η συγκέντρωση παθογόνων είναι τόσο χαμηλή που ξεπερνά τα όρια ανίχνευσης των TaqMan assay.

Τα νέα ddPCR assays χαρακτηρίζονται από αυξημένη πρακτικότητα σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους, καθώς μειώνουν σημαντικά τον απαιτούμενο χρόνο, τον φόρτο εργασίας και τη χρήση πόρων. Επιπλέον, η τεχνολογία ddPCR δεν απαιτεί καμπύλες αναφοράς ή δείγματα βαθμονόμησης (calibrator samples), γεγονός που ενισχύει

περαιτέρω τη λειτουργικότητα της μεθόδου. Τα παραπάνω πλεονεκτήματα συμβάλλουν στη βελτίωση της αποτελεσματικότητας των συστημάτων παρακολούθησης και υποστηρίζουν τη βιώσιμη διαχείριση της ανθεκτικότητας. Τέλος, η χρήση αξιόπιστων και επαληθευμένων μοριακών δεικτών αποτελεί βασικό πυλώνα της ολοκληρωμένης διαχείρισης της ανθεκτικότητας (IRM). Για τον λόγο αυτό, κρίνεται απαραίτητη η συστηματική αξιολόγηση της συσχέτισης μεταξύ ανθεκτικότητας και μοριακών δεικτών σε διαφορετικά χωρικά και χρονικά πλαίσια, ώστε να διασφαλίζεται η εγκυρότητα και η χρησιμότητά τους στην πράξη.

4 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Βιβλιογραφικές Αναφορές

Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ et al., High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem* 83: 8604–8610 (2011).

Lin LI, A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics* 45:255–268 (1989).

Mavridis K, Michaelidou K and Vontas J, Highly sensitive droplet digital PCR-based diagnostics for the surveillance of malaria vector populations in low transmission and incipient resistance settings. *Expert Rev Mol Diagn* 21:1105–1114 (2021).

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).

Mavridis, Konstantinos et al. "Molecular diagnostics for monitoring insecticide resistance in the western flower thrips *Frankliniella occidentalis*." *Pest management science* vol. 79,4 (2023): 1615-1622. doi:10.1002/ps.7336

McBride GB, A proposal for strength-of-agreement criteria for Lin's concordance correlation coefficient. NIWA Client Report HAM2005-062 (2005)

McDermott GP, Do D, Litterst CM, Maar D, Hindson CM, Steenblock ER et al., Multiplexed target detection using DNA-binding dye chemistry in droplet digital PCR. *Anal Chem* 85:11619–11627 (2013).

Van Leeuwen T, Dermauw W, Mavridis K and Vontas J, Significance and interpretation of molecular diagnostics for insecticide resistance management of agricultural pests. *Curr Opin Insect Sci* 39:69–76 (2020).

Whale AS, Huggett JF and Tzonev S, Fundamentals of multiplexing with digital PCR. *Biomol Detect Quantif* 10:15–23 (2016).

Zink FA, Tembrock LR, Timm AE, Farris RE, Perera OP and Gilligan TM, A droplet digital PCR (ddPCR) assay to detect *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in bulk trap samples. *PLoS One* 12: e0178704 (2017).