



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

Παραδοτέο Π.1.2.4: Προσδιορισμός ωομυκήτων σε φυτά τομάτας με εφαρμογή τεχνολογίας αλληλούχησης DNA τρίτης γενεάς

Πληροφορίες για το έγγραφο

Αριθμός παραδοτέου: Π.1.2.4

Ενότητα εργασίας: ΕΕ1

Επικεφαλής δικαιούχος: ΜΦΙ

Συγγραφείς: Δρ Δημοσθένης Κίζης, Δρ Ιωάννης Θεολογίδης

Έκδοση: 1.1

Είδος Παραδοτέου: Έκθεση

Ημερομηνία παράδοσης: [14 - 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	<u>ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ</u>	4
2	<u>ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ</u>	5
2.1	ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΤΕΧΝΗΤΗΣ ΟΜΑΔΑΣ ΕΙΔΩΝ ΩΜΟΥΚΗΤΩΝ ΚΑΙ ΜΥΚΗΤΩΝ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ PCR.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
2.2	ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΣΕ ΔΟΚΙΜΗ ΑΠΟΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ DNA ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΠΛΑΤΦΟΡΜΑΣ ONT MINION	8
2.3	ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΠΙΘΑΝΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΣΕ ΔΟΚΙΜΗ ONT MINION.....	13
2.4	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ <i>RHYTORHTHORA</i> SPP ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΦΥΤΩΝ ΤΟΜΑΤΑΣ.....	15
3	<u>ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</u>	25
4	<u>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</u>	26

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 κιτ «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

Σκοπός του παραδοτέου Π1.2.4 είναι η ανάπτυξη διαγνωστικού πρωτοκόλλου για την ανίχνευση φυτοπαθογόνων ωομυκήτων των γενών *Phytophthora* και *Pythium* σε καλλιεργούμενα φυτά τομάτας, με βάση την πλατφόρμα πολλαπλής νουκλεοτιδικής αλληλούχισης DNA 3ης γενεάς ONT-MinION για την ανάπτυξη μεθόδου μεταγονιδιοματικής με μοριακούς κωδικούς σήμανσης (metabarcoding).

Συνοπτικά, τα σημαντικότερα αποτελέσματα στα πλαίσια του Π1.2.4 αποτελούν ο έλεγχος διαφορετικών ζευγών εκκινήτων για την ανίχνευση ειδών ωομυκήτων σε τεχνητή ομάδα διαφορετικών στελεχών, ο προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών των αντιδράσεων PCR ως μέρος της μεθοδολογίας, η ανάπτυξη και αξιολόγηση του πρωτοκόλλου ανάλυσης ως προς την ανίχνευση των ωομυκήτων σε επίπεδο είδους, η αξιολόγηση πιθανής αναστολής λόγω υποστρώματος, και ο έλεγχος της μεθόδου ως προς την ανίχνευση ειδών ωομυκήτων σε φυτά τομάτας.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

Η ανάπτυξη καινοτόμων συστημάτων έγκαιρης ανίχνευσης φυτοπαθογόνων μυκήτων για την *in-situ* πολλαπλή ανίχνευση τους γίνεται ολοένα και περισσότερο επιτακτική στο πλαίσιο της πρόγνωσης των ασθενειών. Ειδικότερα, η εφαρμογή προσεγγίσεων Αποκωδικοποίησης Νουκλεοτιδικών Αλληλουχιών με συστήματα Υψηλής Απόδοσης (High Throughput Sequencing, HTS), καθώς και μεταγονιδιοματικής για τον προσδιορισμό φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών, αποτελεί ένα ταχέως εξελισσόμενο πεδίο έρευνας.

Στο πλαίσιο της συγκεκριμένης εμβληματικής δράσης, προτάθηκε και υλοποιήθηκε η ανάπτυξη μεθοδολογίας μεταγονιδιοματικής ανάλυσης για τον προσδιορισμό ωομυκήτων των γενών *Phytophthora* και *Pythium* σε επίπεδο είδους σε καλλιεργούμενα φυτά τομάτας, με χρήση της πλατφόρμας νουκλεοτικής αλληλούχισης Oxford Nanopore Technologies MinION (ONT-MinION). Η ONT MinION αποτελεί πλατφόρμα νουκλεοτιδικής αλληλούχισης 3^{ης} γενιάς με αρχή λειτουργίας που βασίζεται στην καινοτόμο χρήση βιολογικών μορίων (νανο-πόρων) ακινητοποιημένων πάνω στην επιφάνεια ενός αδρανούς υλικού. Η φορητότητα της πλατφόρμας επιτρέπει επίσης τη χρήση της και εκτός εργαστηρίου στο πεδίο, ενώ επιπλέον σημαντικά πλεονεκτήματα αποτελούν η αλληλούχιση γονιδιομάτων πολύ μεγάλου μήκους, η λήψη αποτελεσμάτων σε πραγματικό χρόνο και η δυνατότητα εφαρμογής πολυπλεξίας (multiplexing) και χρήσης μοριακών κωδικών σήμανσης (metabarcoding). Επιπρόσθετα, υπάρχει η δυνατότητα χρήσης ελεύθερα διαθέσιμων πακέτων λογισμικού για την υποστήριξη των αναλύσεων των τελικών δεδομένων.

Το εργαστήριο Μυκητολογίας του ΜΦΙ συμμετείχε στο παρελθόν σε διεθνές ερευνητικό έργο με συναφή εφαρμογή μεταγονιδιοματικής για την ανίχνευση ωομυκήτων σε περιβαλλοντικά δείγματα (ύδατα και έδαφος) με χρήση της πλατφόρμας Illumina. Αντίστοιχη με την συγκεκριμένη προτεινόμενη προσέγγιση έχει εφαρμοστεί από τους συμμετέχοντες και συγγραφείς του Π1.2.4 σε πρότερο ερευνητικό πρόγραμμα (Εμβληματική Δράση «Δρόμοι της Ελιάς»), για την ανάπτυξη μεθόδου ανίχνευσης μυκήτων σε φυτικούς ιστούς (Theologidis I et al., 2023; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37998924/>). Συγκεκριμένα, αναπτύχθηκε μέθοδος για την ανίχνευση φυτοπαθογόνων και ενδοφυτικών μυκήτων σε δείγματα νεαρών βλαστών ελιάς με χρήση της πλατφόρμας ONT-MinION και in-house μεθοδολογίας βιοπληροφορικής ανάλυσης (pipeline), με την οποία ταυτοποιήθηκαν μύκητες των γενών *Cladosporium*, *Phoma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, των ειδών *Verticillium dahliae*, *Alternaria alternata* καθώς και άλλων ειδών, σε εμβολιασμένα δείγματα και σε δείγματα νεαρών βλαστών ελιάς φυσικά μολυσμένων με φυτοπαθογόνους μύκητες.

Στο Π.1.2.4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάπτυξης και αξιολόγησης της μεθόδου, και συγκεκριμένα της αξιολόγησης επιλεγμένων εκκινητών αντίδρασης PCR για την ανίχνευση ωομυκήτων με χρήση τεχνητής ομάδας διαφορετικών στελεχών ειδών ωομυκήτων και μυκήτων, ο προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών των αντιδράσεων PCR, η ανάπτυξη και αξιολόγηση του πρωτοκόλλου ανάλυσης ως προς την ανίχνευση των ωομυκήτων σε επίπεδο είδους, η αξιολόγηση δυνητικής αναστολής λόγω υποστρώματος, και ο έλεγχος της μεθόδου ως προς την ανίχνευση ειδών ωομυκήτων σε φυτά τομάτας. Επίσης προτείνονται μελλοντικές δράσεις για την βελτιστοποίηση της μεθόδου και πιστοποίησή της κάτω από διαφορετικές συνθήκες.

2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

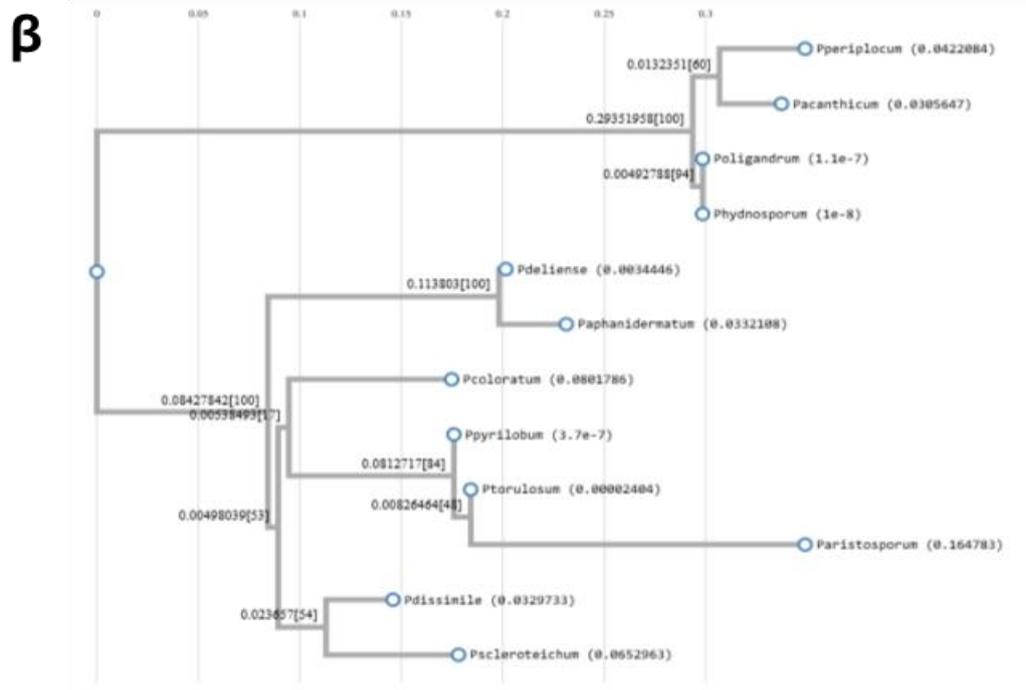
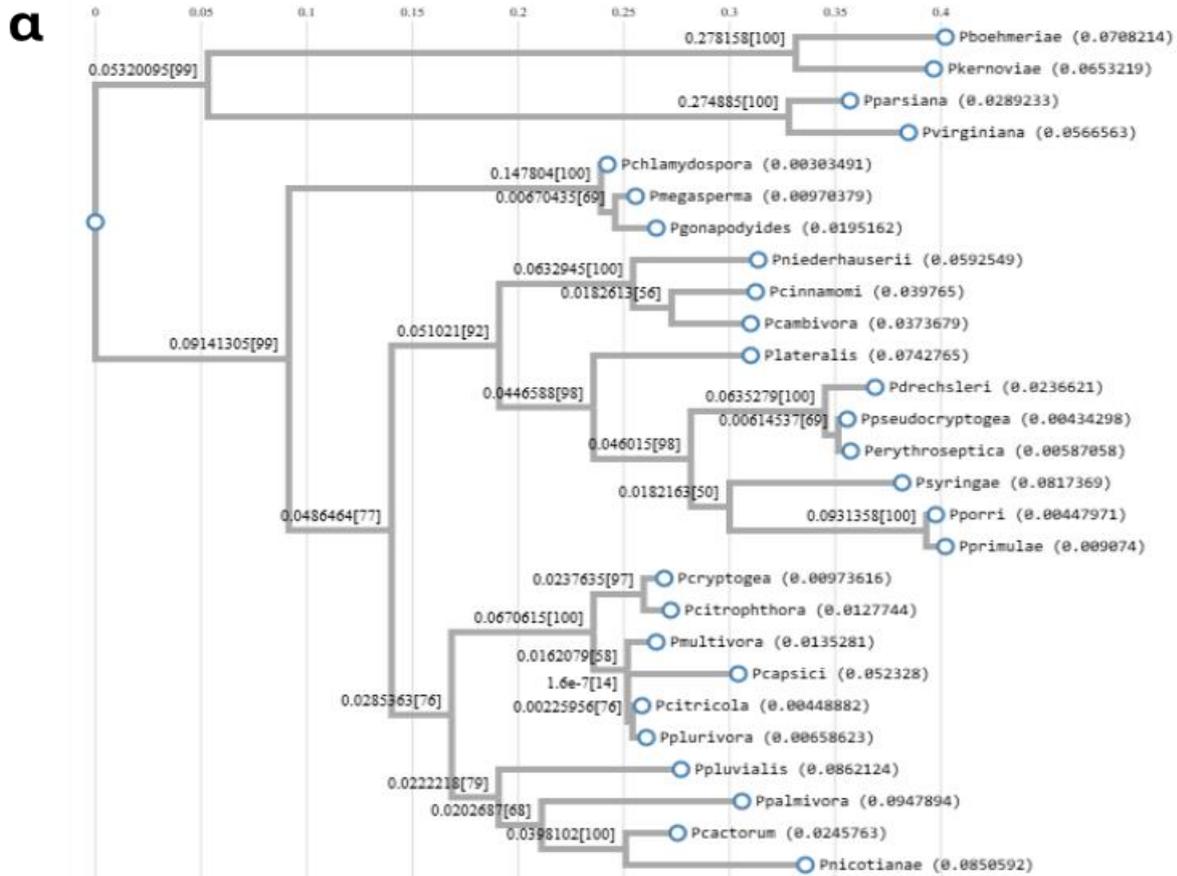
2.1 Δημιουργία τεχνητής ομάδας ειδών ωομυκήτων και μυκήτων και αξιολόγηση συνθηκών αντιδράσεων PCR

Η συγκεκριμένη δράση περιλάμβανε: **α)** την επιλογή και αξιολόγηση εξειδικευμένων εκκινητών σε αντιδράσεις αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) για ανίχνευση ωομυκήτων και μυκήτων του γένους *Phytophthora*, **β)** την συγκέντρωση και μοριακή ταυτοποίηση απομονώσεων ειδών *Phytophthora* spp, *Pythium* spp, και ενδεικτικών ειδών μυκήτων (ως αρνητικοί μάρτυρες) για την δημιουργία τεχνητής ομάδας ελέγχου (mock community), και **γ)** τον έλεγχο και εύρεση των βέλτιστων συνθηκών (θερμοκρασία υβριδισμού, κύκλοι) των διαφορετικών PCR.

Η επιλογή των γονιδιακών τόπων γενομικού/μιτοχονδριακού DNA και εκκινητών προς επιλογή βασίστηκαν αμφότερες σε εκτενή βιβλιογραφική ανασκόπηση, τη δυνατότητα πιθανών συνδυασμών τους για την ανίχνευση συγκεκριμένων ειδών, και in silico σχεδιασμού και ελέγχου νέων εκκινητών. Από το σύνολο των εκκινητών επιλέχθηκαν 6 ζεύγη, 3 για ειδική ανίχνευση ωομυκήτων (εφεξής Oom1-Oom3) και 3 για ειδική ανίχνευση μυκήτων του γένους *Phytophthora* (εφεξής Phy1-Phy3).

Για την δημιουργία της τεχνητής ομάδας ελέγχου ειδών ωομυκήτων-μυκήτων (Mock Community Species, MCS) επιλέχθηκαν 43 στελέχη (**Πίνακας 1.2.4-1**) εκ των οποίων 27 είδη *Phytophthora* που εκπροσωπούν 9 από τους 10 εξελικτικούς κλάδους του γένους, 12 είδη *Pythium* και 3 είδη (4 στελέχη) εδαφογενών μυκήτων που θα χρησιμοποιούνταν ως αρνητικοί μάρτυρες (outgroup controls). Από αυτά τα στελέχη 19 είδη *Phytophthora*, τα είδη *Pythium* και τα είδη των μυκήτων προήλθαν από την επίσημη συλλογή μυκήτων και ωομυκήτων του ΜΦΙ (BPIC), ενώ τα υπόλοιπα 8 στελέχη χορηγήθηκαν από την επίσημη συλλογή του Forest Research Institute (FRI) στην Σκωτία. Για τα στελέχη 1-19 πραγματοποιήθηκε μοριακός χαρακτηρισμός, αρχικά μέσω RFLP και στη συνέχεια με Sanger sequencing, και για τα στελέχη 28-39 μέσω Sanger sequencing. Στις **Εικόνες 1.2.4-1α και 1.2.4-1β** παρουσιάζονται φυλογενετικά δέντρα ειδών *Phytophthora* spp και *Pythium* spp αντίστοιχα που χρησιμοποιούνται για την δημιουργία του MCS (**Πίνακας 1.2.4-1**).

Εν συνεχεία, για την επαλήθευση των συγκεκριμένων στελεχών και της εξειδίκευσης των εκκινητών πραγματοποιήθηκε έλεγχος των 43 επιλεγμένων στελεχών αναφοράς ωομυκήτων και μυκήτων με 2 ζεύγη εκκινητών (Oom1 για ωομύκητες και Phy1 *Phytophthora* αντίστοιχα), καθώς και με το ζεύγος εκκινητών ITS1/4 (ανίχνευση πλείστων μυκήτων και ωομυκήτων), με συμβατική PCR και Taq πολυμεράση. Στην **Εικόνα 1.2.4-2α** παρουσιάζονται ενδεικτικά αποτελέσματα για 11 στελέχη *Phytophthora*, 10 στελέχη *Pythium* και τα 4 στελέχη μυκήτων. Οι εκκινητές παρουσιάζουν απόλυτη εξειδίκευση για όλα τα είδη που χρησιμοποιήθηκαν στις συγκεκριμένες αντιδράσεις, και συγκεκριμένα, το ζεύγος Phy1 ανιχνεύει τα είδη *Phytophthora*, το Oom1 όλα τα είδη *Phytophthora* και *Pythium* ενώ το ITS1/4 τα είδη μυκήτων και ωομυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν.

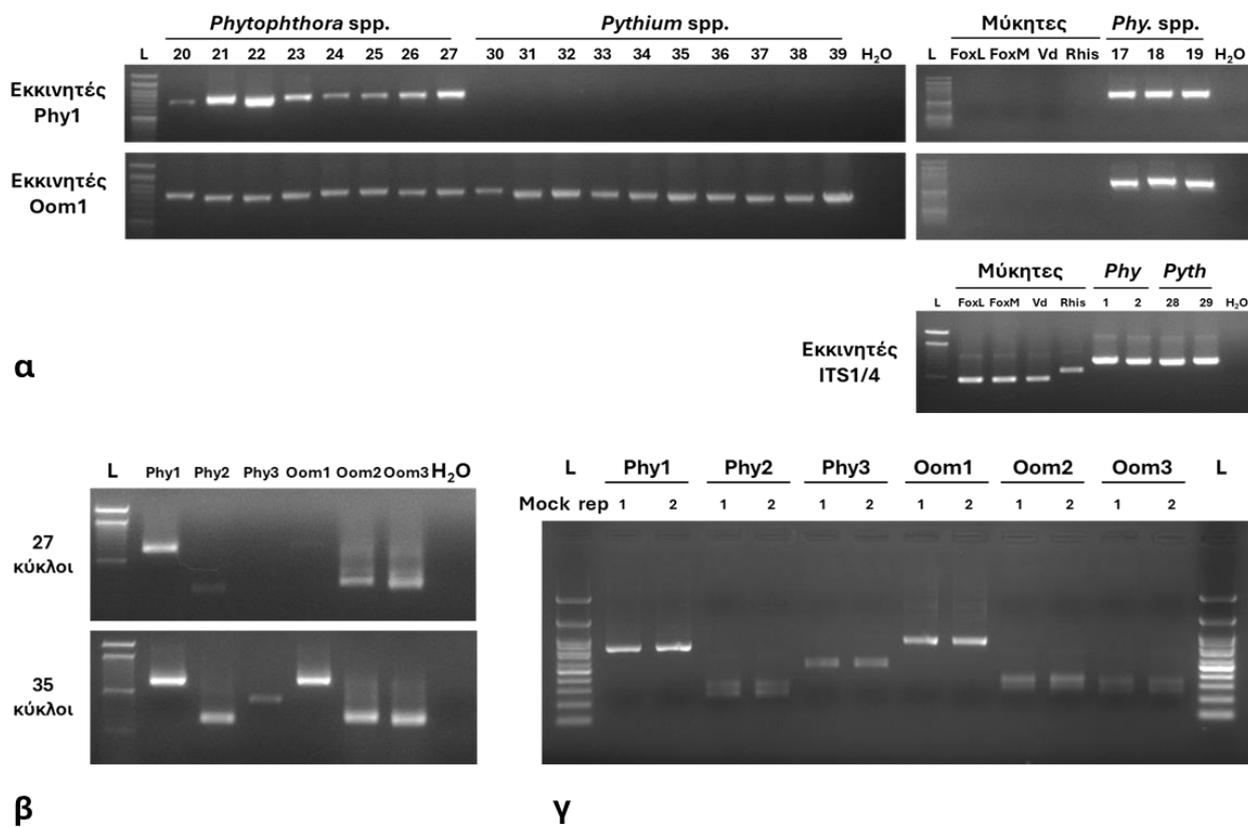


Εικόνα 1.2.4-1. Φυλογενετικά δέντρα ειδών ωομυκήτων (α) *Phytophthora* spp. και (β) *Pythium* spp. Η στοιχισή των αλληλουχιών και τα φυλογενετικά δέντρα πραγματοποιήθηκαν μέσω των συναρτήσεων "build" ETE3 3.1.3 (Huerta-Cepas et al., 2016) και PhyML v20160115 του προγράμματος ClustalW. Οι αποστάσεις των κλάδων υπολογίστηκαν μετά από ανακατασκευή με επανάθεση (bootstrap) 100 φυλογενετικών δέντρων.

Πίνακας 1.2.4-1. Στελέχη ειδών Ωομυκήτων και Μυκήτων που χρησιμοποιούνται για την δημιουργία της τεχνητής ομάδας ελέγχου (MCS).

α/α	Είδος <i>Phytophthora</i>	Κλάδος κατάταξης	Κωδικός Απομόνωσης	α/α	Είδος <i>Pythium</i>	Κωδικός Απομόνωσης
1	<i>Phytophthora boehmeriae</i>	10	BPIC 1908	28	<i>Pythium acanthicum</i>	BPIC 1149
2	<i>P. cactorum</i>	1	BPIC 1168	29	<i>P. aristosporum</i>	BPIC 1214
3	<i>P. cambivora</i>	7	BPIC 1173	30	<i>P. aphanidermatum</i>	BPIC 1286
4	<i>P. capsici</i>	2b	BPIC 1131	31	<i>P. coloratum</i>	BPIC 1154
5	<i>P. cinnamomi</i>	7	BPIC 1132	32	<i>P. deliense</i>	BPIC 1220
6	<i>P. citricola</i>	2	BPIC 1907	33	<i>P. dissimile</i>	BPIC 1217
7	<i>P. citrophthora</i>	2	BPIC 1915	34	<i>P. hydnosporum</i>	BPIC 1160
8	<i>P. cryptogea</i>	8a	BPIC 1192	35	<i>P. oligandrum</i>	BPIC 1296
9	<i>P. drechsleri</i>	8a	BPIC 1135	36	<i>P. periplocum</i>	BPIC 1165
10	<i>P. erythroseptica</i>	8	BPIC 1197	37	<i>P. pyrilobum</i>	BPIC 1166
11	<i>P. megasperma</i>	6	BPIC 1203	38	<i>P. scleroteichum</i>	BPIC 1224
12	<i>P. nicotianae</i>	1	BPIC 2500	39	<i>P. torulosum</i>	BPIC 1228
13	<i>P. palmivora</i>	4	BPIC 1907	α/α	Είδος Μύκητα	Κωδικός Απομόνωσης
14	<i>P. porri</i>	8	BPIC 1988			
15	<i>P. primulae</i>	8	BPIC 2584	40	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. lycopersici Snyder & Hansen	BPIC 2551
16	<i>P. syringae</i>	8	BPIC 2514			
17	<i>P. niederhauserii</i>	7b	BPIC 2754	41	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. melongenae Matuo & K. Ishig.	BPIC 2651
18	<i>P. virginiana</i>	9a	BPIC UNR1			
19	<i>P. parsiana</i>	9	BPIC UNR2	42	<i>Verticillium dahliae</i> Klebahn	BPIC 2681
20	<i>P. multivora</i>	2	FRI 19#1	43	<i>Rhizoctonia solani</i> Kühn	BPIC 2531
21	<i>P. plurivora</i>	2	FRI RG192			
22	<i>P. pluvialis</i>	3	FRI 5110			
23	<i>P. gonapodyides</i>	6	FRI RG25			
24	<i>P. chlamydospora</i>	6	FRI RG27			
25	<i>P. lateralis isolate</i>	8	FRI 5014 GC03			
26	<i>P. pseudocryptogea</i>	8	FRI N009			
27	<i>P. kernoviae isolate</i>	10	FRI P1957			

Στην επόμενη δράση πραγματοποιήθηκε έλεγχος των αντιδράσεων PCR για τα 6 διαφορετικά ζεύγη εκκινητών με χρήση ενός αρχικού ισομοριακού μίγματος ελέγχου από 17 DNAs ωομυκήτων και μυκήτων (test-mock community pooled DNAs sample) και του KAPA HiFi 2x hotstart ready mix, σε συνδυασμούς διαφορετικών συνθηκών θερμοκρασίας Tm (εύρος 60°-66°C) και κύκλων πολυμερισμού (21-40 κύκλοι), με στόχο την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών αντίδρασης PCR για το εκάστοτε ζεύγος εκκινητών. Στην **Εικόνα 1.2.4-2β** παρουσιάζονται ενδεικτικά 2 από τους συνδυασμούς κύκλων και θερμοκρασιών Tm που ελέγχθηκαν, και συγκεκριμένα στους 60°C και 27 και 35 κύκλους πολυμερισμού. Στην συνέχεια δημιουργήθηκε το τελικό ισομοριακό δείγμα (mock community pooled DNAs sample) με DNA και των 43 στελεχών αναφοράς, με το οποίο ως μήτρα πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές αντιδράσεις PCR για όλα τα ζεύγη εκκινητών. Για κάθε ζεύγος εκκινητών (αντίστοιχα amplicons) δημιουργήθηκαν 2 τελικά δείγματα ως μίγματα μεμονωμένων αντιδράσεων PCR (συνολικά 12 δείγματα) (**Εικόνα 1.2.4-2γ**), προς χρήση για την δημιουργία της ενιαίας βιβλιοθήκης με ραβδογραμμωτή μοριακή σήμανση των εκάστοτε amplicons (12 ραβδογραμμωτές μοριακές σημάνσεις, δυο ανά διαφορετικό PCR amplicon (2x6)).



Εικόνα 1.2.4-2. Ηλεκτροφόρησης amplicons ωομυκήτων και μυκήτων σε πηκτή αγαρόζης 1,3%.

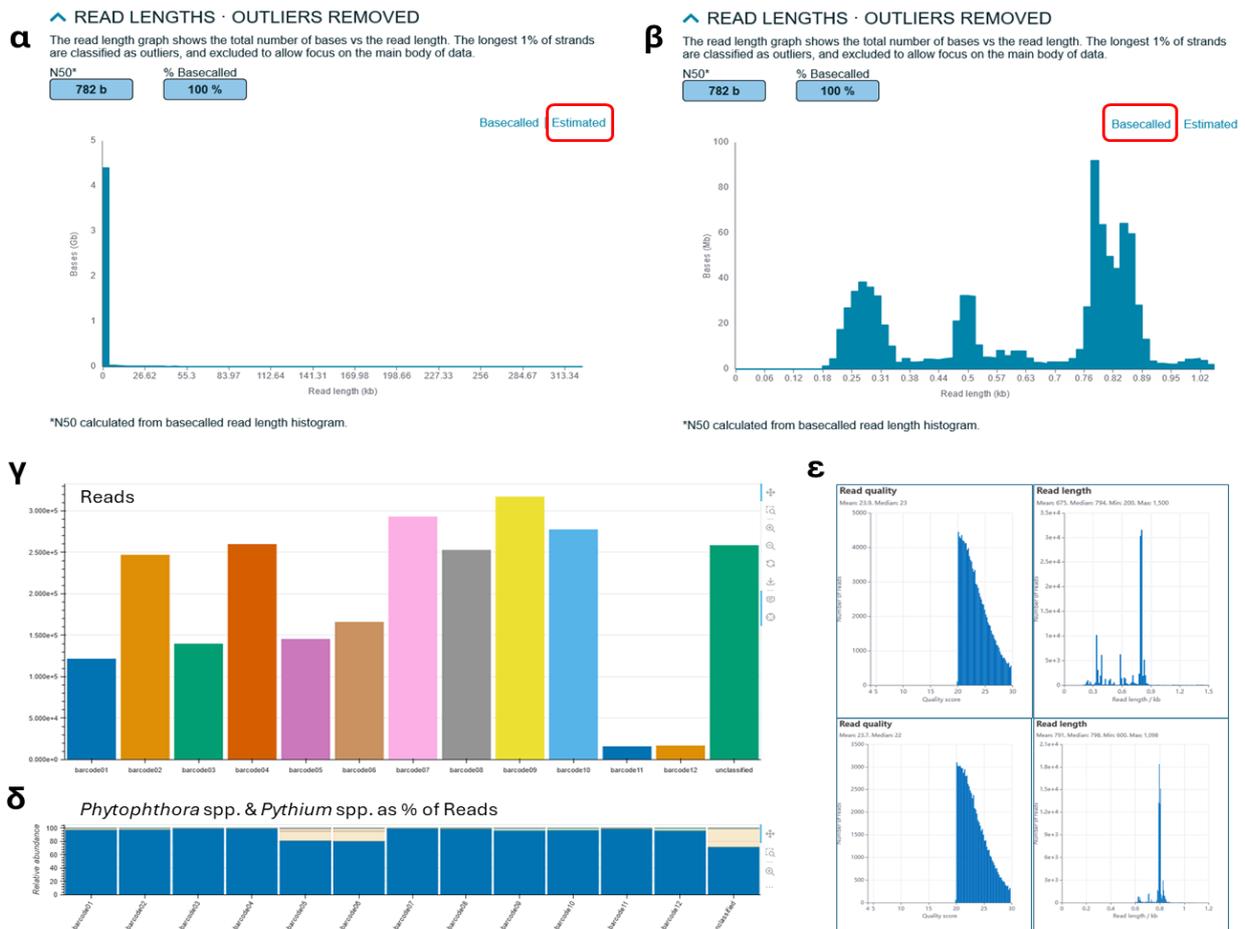
α) Έλεγχος στελεχών ωομυκήτων και μυκήτων με ζεύγη εκκινητών για ειδική ανίχνευση ωομυκήτων, ωομυκήτων του γένους *Phytophthora*, καθώς και πλείστων μυκήτων και ωομυκήτων. Η κωδικοποίηση των στελεχών ακολουθεί αυτή που παρουσιάζεται στον **Πίνακα 1.2.4-1**. **β)** Έλεγχος των διαφορετικών ζευγών εκκινητών σε δείγμα ελέγχου (test-mock community pooled DNAs sample) σε συνδυασμούς διαφορετικών θερμοκρασίας Tm (ενδεικτικά 27 και 35 κύκλοι σε Tm 60°C). **γ)** Τελικά δείγματα amplicons (6x2 pooled PCR amplicons) όπως προέκυψαν από το τελικό δείγμα όλων των DNAs των στελεχών αναφοράς (mock community pooled DNAs sample (MCS)), για την δημιουργία της ενιαίας βιβλιοθήκης με ραβδογραμμωτή μοριακή σήμανση. **L:** FastGene 100bp DNA ladder, **H₂O:** αρνητικός μάρτυρας αντιδράσεων PCR.

2.2 Αξιολόγηση των επιλεγμένων εκκινητών σε δοκιμή αποκωδικοποίησης αλληλουχιών DNA με χρήση της πλατφόρμας ONT minION

Για την αξιολόγηση των επιλεγμένων εκκινητών σε αντιδράσεις HTS με την πλατφόρμα ONT minION, πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση της ενιαίας βιβλιοθήκης amplicon με ραβδογραμμωτές σημάνσεις με χρήση των SQK-NBD114.24 kit, R10.4.1 flow cell, και MinKNOW24.11.10 software. Το συγκεκριμένο πείραμα (**run ONT minion**) κωδικοποιήθηκε ως "**Oomycetes-1; Oom-1**". Το σύνολο των νουκλεοτιδικών βάσεων που αναγνώστηκαν για το Oom-1 ανήρθε περίπου στα 4,5 Gb (**Εικόνα 1.2.4-3α**) και οι κατανομές των μεγεθών των αναγνωσμένων αλληλουχιών ακολούθησε πρακτικά 3 ομαδοποιημένες κατανομές (κατά προσέγγιση: 180-300bp; 440-570bp; 700-900bp (**Εικόνα 1.2.4-3β**), οι οποίες ακολουθούν τα μεγέθη των amplicons για τα 6 διαφορετικά ζεύγη εκκινητών.

Ακολούθησε ανάλυση με το λογισμικό EPI2ME labs και διαφορετικά workflows

("metagenomics", "amplicons", "16S") σε συνδυασμό με διαφορετικές βάσεις δεδομένων ("ncbi_16s_18s", "SILVA"), και προσαρμοσμένες παραμετροποιήσεις για το εκάστοτε barcoded-amplicon. Στην **Εικόνα 1.2.4-3γ-ε** παρουσιάζεται ενδεικτικά μέρος των αποτελεσμάτων που αφορά στο wf-metagenomics. Στην **Εικόνα 1.2.4-3γ** παρουσιάζεται ο συνολικός αριθμός των αναγνωσμένων αλληλουχιών (reads) με Q-score >20 ανά barcode, και στην **Εικόνα 1.2.4-3δ** το ποσοστό (μπλε χρώμα) των οποίων προσδιορίζεται ως "*Phytophthora*" & "*Pythium*" (επίπεδο γένους), με την πλειονότητα των περιπτώσεων να αγγίζει ποσοστό 100%.

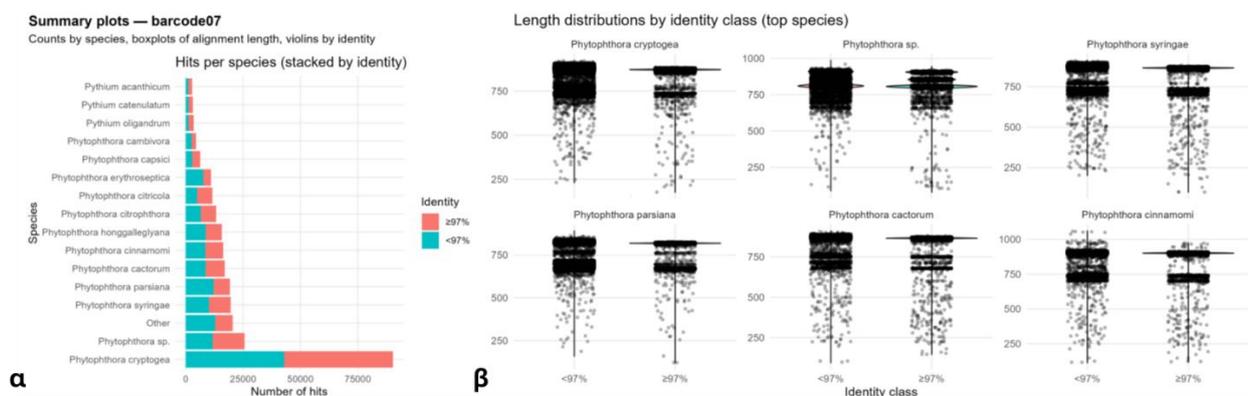


Εικόνα 1.2.4-3. Κατανομή μεγεθών αναγνωσμένων αλληλουχιών και αποτελέσματα ποιοτικού ελέγχου αναγνωσμένων και ταυτοποιημένων αλληλουχιών του πειράματος Oom-1 μέσω του EPI2ME wf-Metagenomics. α) Εκτιμώμενο σύνολο βάσεων, **β)** Κατανομές των μεγεθών των αναγνωσμένων αλληλουχιών. Διακρίνονται τρεις ομαδοποιημένες κατανομές (κατά προσέγγιση 180-300bp, 440-570bp και 700-900bp) οι οποίες ακολουθούν τα μεγέθη των amplicons για τα 6 διαφορετικά ζεύγη εκκινητών, **γ)** Συνολικός αριθμός αναγνωσμένων αλληλουχιών (reads) με Q-score >20 ανά barcode, **δ)** Ποσοστό αλληλουχιών που προσδιορίζεται ως "*Phytophthora*" & "*Pythium*" (επίπεδο γένους, μπλε χρώμα), **ε)** Αλληλουχίες του barcode 1 με Q-score >20 και αντίστοιχη κατανομή μεγεθών πριν (πάνω) και μετά (κάτω) την παραμετροποίηση για το εύρος μεγεθών από 600 έως 1100 bp.

Ο ποιοτικός έλεγχος των αλληλουχιών συνεχίστηκε με την παραμετροποίηση των δεδομένων θέτοντας ως ελάχιστη τιμή για το Q-score το 20, και απορρίπτοντας αλληλουχίες μικρότερες των 150bp και μεγαλύτερες των 1100. Στην **Εικόνα 1.2.4-3ε** παρουσιάζονται αναλυτικά για τις αλληλουχίες του barcode 1 ο αριθμός των αλληλουχιών (reads) με Q-score >20, και η αντίστοιχη κατανομή μεγεθών πριν και μετά την παραμετροποίηση (filtering) για το εύρος μεγεθών από 600 έως 1100 bp.

Η βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τον αλγόριθμο BLAST+, προγραμματισμό σε γλώσσα R και bash, και χρήση της βάσης δεδομένων NCBI, με στόχο την συστηματική ταξινόμηση των ωομυκήτων σε επίπεδο είδους. Εκτός από το blast+(bash), χρησιμοποιήθηκαν τα πακέτα dplyr, readr, stringr και ggplot2 (R). Η κατάταξη και επιλογή των ταυτοποιημένων αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε κατά σειρά με βάση τις παραμέτρους: bitscore, evalue, sequence length και sequence identity. Για τον προσδιορισμό της στατιστικής σημαντικότητας των αποτελεσμάτων προσδιορίστηκε ο αριθμός των αλληλουχιών που εμφανίζει ομολογία σε επίπεδο είδους για ποσοστά 97%, 98%, 99% και 99,9% με αλληλουχίες της βάσης δεδομένων NCBI. Στόχος ήταν να προσδιοριστούν: α) το ελάχιστο ποσοστό ομολογίας που θα μπορεί να δώσει αξιόπιστα αποτελέσματα ως προς τον αριθμό των διαφορετικών ειδών του mock community που ανιχνεύονται ανά barcode και κατ'επέκταση ανά διαφορετικό ζεύγος εκκινήτων, β) ο ελάχιστος αριθμός αλληλουχιών που απαιτείται ανά διαφορετικό ποσοστό ομολογίας, και γ) η ύπαρξη ψευδώς θετικών (διαφορετικά είδη που ανιχνεύονται) αποτελεσμάτων.

Στην **Εικόνα 1.2.4-4** παρουσιάζονται ενδεικτικά αποτελέσματα για το barcode 7 και για ποσοστό ομολογίας <97% και ≥97%. Βάσει βιβλιογραφίας το ποσοστό ομολογίας μιας αλληλουχίας DNA για τον προσδιορισμό σε επίπεδο είδους δεν μπορεί να είναι μικρότερο του 95% (Li, Y. et al., 2021). Στην **Εικόνα 1.2.4-4α** είναι εμφανές ότι από το σύνολο των αλληλουχιών του barcode 7 που αντιστοιχούν στην ταξινόμησή ανά διαφορετικό είδος βάσει του BLAST+, ένα ποσοστό μικρότερο ή μεγαλύτερο του 50% ανά περίπτωση παρουσιάζει ομολογία ≥97% και μπορεί να αξιοποιηθεί στα επόμενα στάδια της ανάλυσης, ενώ το υπόλοιπο μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για την κατάταξη των αλληλουχιών σε επίπεδο γένους. Στην **Εικόνα 1.2.4-4β** παρουσιάζονται ενδεικτικά και οι κατανομές των μεγεθών των αντίστοιχων αλληλουχιών για τα είδη με τον μεγαλύτερο αριθμό αλληλουχιών. Το μεγαλύτερο μέρος των μεγεθών κατανέμεται σε ζώνες κοντά στο θεωρητικά αναμενόμενο μέγεθος των amplicons (700-900bp) ενώ ένας μικρός αριθμός αλληλουχιών (μεμονωμένες κουκίδες) αφορά σε μικρότερα μεγέθη, γεγονός που δείχνει ότι είναι πιθανά αναγκαία η επιβολή συγκεκριμένων ορίων μεγεθών ως προς τα προς ανάλυση amplicons σε επόμενα βήματα της μεθόδου.



Εικόνα 1.2.4-4. Κατανομές αριθμού ταυτοποιημένων αλληλουχιών και μεγεθών ανά είδος ωομυκήτητα για το δείγμα barcode 7. α) Ραβδόγραμμα με κατανομές του αριθμού αλληλουχιών με ποσοστό ομολογίας <97% και ≥97% ανά είδος ωομυκήτητα (ενδεικτικά είδη που ανιχνεύονται). **β)** Γράφημα Manhattan με κατανομές μεγεθών amplicons για ενδεικτικά είδη ωομυκήτων.

Στον **Πίνακα 1.2.4-2** παρουσιάζονται ανά ζεύγος εκκινήτων και barcode οι αριθμοί των αλληλουχιών όπως αυτοί κατανέμονται με βάση το ποσοστό ομολογίας των αλληλουχιών για τα είδη ωμοκλήτων, καθώς και ο αριθμός των διαφορετικών ειδών ωμοκλήτων που ανιχνεύονται. Τα ζεύγη εκκινήτων Phy2 και Oom2 ήταν αυτά με τα οποία ανιχνευτήκαν τα περισσότερα είδη MCS με ποσοστά ομολογίας μεγαλύτερο του 99%, 37 και 35 από το θεωρητικό μέγιστο των 39, με εξίσου μεγάλο αριθμό ειδών με ποσοστό ομολογίας μεγαλύτερο του 99,9% (33 και 31 αντίστοιχα). Τα συγκεκριμένα ποσοστά δείχνουν το υψηλό ποσοστό ακρίβειας ως προς τον προσδιορισμό σε επίπεδο είδους, περιορίζοντας την αναντιστοιχία νουκλεοτιδίων της κάθε αλληλουχίας σε σχέση με αλληλουχίες της βάσης δεδομένων σε 1 στα 100 και 1 στα 1000 αντίστοιχα. Θα πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι για τα συγκεκριμένα ζεύγη εκκινήτων (και δείγματα/barcodes) αναφέρεται (ως annotated) και ένας σχετικά υψηλός αριθμός ειδών ωμοκλήτων που δεν αποτελούν μέρος του MCS. Οι πιθανοί λόγοι που αναφέρονται είναι είτε ομολογία με άλλα συγγενή είδη σε τέτοιο βαθμό που δεν είναι δυνατός ο διαχωρισμός τους με βάση την συγκεκριμένη αλληλουχία, πολλαπλές καταχωρήσεις με νουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς, ή λανθασμένη παλαιότερη καταχώρηση στην βάση δεδομένων και μη επικαιροποίηση της καταχώρησης. Με δεδομένο το ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό ομολογίας ($\geq 99\%$, $\geq 99,9\%$), η πιθανότητα του να αναφέρονται αυτά τα είδη λόγω λάθους κατά την διαδικασία προσδιορισμού/ανάγνωσης των βάσεων (basecalling) στο στάδιο διέλευσης μέσω νανοπόρων είναι ιδιαίτερα μικρή.

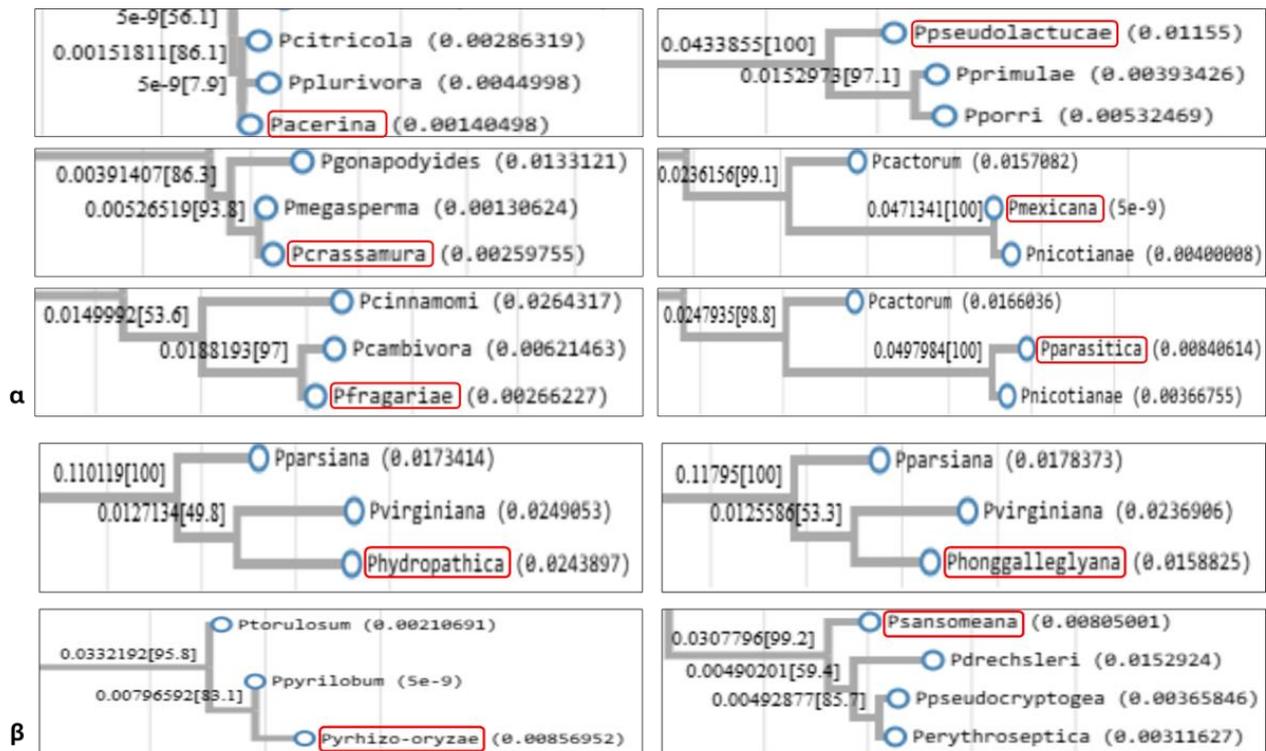
Πίνακας 1.2.4-2. Κατάταξη του αριθμού των ταυτοποιημένων αλληλουχιών και ειδών ωμοκλήτων που ανιχνεύονται ανά ζεύγος εκκινήτη και barcode του πειράματος "Oom-1". Με έντονη γραμματοσειρά παρουσιάζονται οι αριθμοί των ειδών ωμοκλήτων που αφορούν στα barcodes-δείγματα από τα ζεύγη εκκινήτων που εμφανίζουν τους δύο μέγιστους αριθμούς MCS (Phy2 και Oom2) και δύο ελάχιστους αριθμούς non-MCS (Phy1, Oom1, Oom3) για τις δυο κατηγορίες ποσοστών ομολογίας ($\geq 99,9\%$ και $\geq 99,9\%$).

	Phy1		Phy2		Phy3		Oom1		Oom2		Oom3	
	bar_01	bar_02	bar_03	bar_04	bar_05	bar_06	bar_07	bar_08	bar_09	bar_10	bar_11	bar_12
Total reads	137580	279682	233948	445998	194444	210426	280224	280802	552816	474693	41740	28391
Reads lt_97	47523	99361	85469	167565	77760	82019	143532	135862	242329	205166	15100	6281
Reads ge_97	90057	180321	148479	278433	116684	128407	136692	144940	310487	269527	26640	18437
Reads ge_99	22246	43661	54342	99853	26224	29183	16487	18513	91388	80091	9264	6335
Reads ge_99.9	454	771	16434	29402	745	751	181	195	19028	16940	2598	1840
MCS Reads ge_99	22215	43568	45039	80606	22930	22525	14214	15957	64841	56521	7630	5245
MCS Reads ge_99.9	452	771	13058	22557	713	715	162	176	14150	12638	2002	1441
MCS_max theoretical	27	27	39	39	39	39	39	39	39	39	39	39
MCS identified in ge_97	19	20	38	38	35	35	36	37	37	34	36	36
MCS identified in ge_99	17	15	36	37	30	32	32	33	35	34	30	31
MCS identified in 99.9	8	8	33	33	22	22	19	17	31	30	24	26
non-MCS identified in ge_99	6	11	21	27	19	21	17	17	31	27	8	8
non-MCS identified in 99.9	0	0	11	14	7	9	4	5	23	24	7	5

Index. MCS: Mock Community Species; lt: lower than; ge: equal or greater than; 97 to 99.9: 97 to 99.9% homology percentages

Τα ζεύγη εκκινήτων Phy1, Oom1 και Oom3 είναι αυτά τα οποία εμφανίζουν τα λιγότερα non-MCS, με κανένα non-MCS να αναφέρεται στην κατηγορία $\geq 99,9\%$ για το Phy1. Θα πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι ο αυξανόμενος αριθμός non-MCS αναφορών ενδέχεται να σχετίζεται: α) και με τον συνολικό αριθμό των αλληλουχιών (total reads, MCS reads) όπου στις περιπτώσεις των barcodes 3, 4, 9, και 10 είναι αναλογικά περισσότερες από αυτές των barcodes 1, 2, 11, και 12, και β) με το μέγεθος των αλληλουχιών, όπου για τα μεγαλύτερα τμήματα (barcodes 1, 2, 7 και 8) ο αριθμός των non-MCS στην κατηγορία $\geq 99,9\%$ (όπου υπάρχει ιδιαίτερα υψηλή πιστότητα αλληλούχισης) είναι 0 και 6 αντίστοιχα.

Για τα non-MCS που ανήκουν στις κατηγορίες με ποσοστά ομολογίας $\geq 99\%$ και $\geq 99,9\%$ πραγματοποιήθηκε στοίχιση αλληλουχιών μέσω του προγράμματος CLUSTALW με τα MCS, με σκοπό να προσδιοριστούν τα φυλογενετικά πιο συγγενή είδη και ο αριθμός νουκλεοτιδίων στα οποία διαφέρουν. Στην **Εικόνα 1.2.4-5** παρουσιάζονται ενδεικτικά κλάδοι από φυλογενετικά δέντρα που αφορούν στα non-MCS των barcode 1 και barcode 8 για τις κατηγορίες $\geq 99\%$ και $\geq 99,9\%$ αντίστοιχα, και στον **Πίνακα 1.2.4-3** τα φυλογενετικά συγγενή είδη και ο αριθμός των διαφορετικών νουκλεοτιδίων με το πιο κοντινό φυλογενετικά είδος για τα non-MCS που αναφέρονται στα δύο barcodes-δείγματα.



Εικόνα 1.2.4-5. Φυλογενετική συσχέτιση non-MCS και MCS αλληλουχιών. Παρουσιάζεται η φυλογενετική συσχέτιση των non-MCS των δειγμάτων-barcode 1 (α) & 8 (β) με τα MCS μετά την ευθυγράμμιση των αλληλουχιών DNA για τις κατηγορίες με ποσοστά ομολογίας $\geq 99\%$ και $\geq 99,9\%$ αντίστοιχα. Οι στοίχισεις των αλληλουχιών πραγματοποιήθηκαν για κάθε ένα non-MCS με όλα τα MCS με το πρόγραμμα CLUSTALW. Παρουσιάζονται οι κλάδοι κάθε φυλογενετικού δέντρου που αφορούν την συσχέτιση του εκάστοτε non-MCS με τα πιο κοντινά φυλογενετικά σε αυτά MCS.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του πειράματος Oom-1 έδειξε ότι από τα 3 ζεύγη εκκινητών (Phy1-Phy3) επιλεγμένα για εξειδικευμένη ανίχνευση ειδών *Phytophthora* μόνο το Phy1 λειτούργησε εκλεκτικά για το συγκεκριμένο γένος. Τα άλλα δύο (Phy2 και Phy3) μπορούν να λειτουργήσουν ως εκκινητές για την ανίχνευση ωμοκυκλών όπως και τα υπόλοιπα τρία ζεύγη εκκινητών (Oom1-Oom3). Από τα 6 ζεύγη εκκινητών τα Phy1 και Oom1 εμφάνισαν επίσης τα λιγότερα non-MCS συγκριτικά με τα υπόλοιπα (**Πίνακας 1.2.4-2**), κυρίως στην κατηγορία με ποσοστό ομολογίας αλληλουχιών $\geq 99,9\%$. Τα περισσότερα ζεύγη εκκινητών (Phy2, Phy3, Oom1-3) ήταν σε θέση να ανιχνεύσουν την πλειονότητα των MCS στα αντίστοιχα δείγματα όπως αυτό φαίνεται στην κατηγορία με ποσοστό ομολογίας αλληλουχιών $\geq 97\%$, με τα ζεύγη Phy2 και Oom2 να διατηρούν αυτήν την ιδιότητα και στις κατηγορίες με ποσοστό ομολογίας $\geq 99\%$ και $\geq 99,9\%$. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων του πειράματος Oom-1 προκύπτει ότι

τα συγκεκριμένα ποσοστά ομολογίας είναι τα ελάχιστα που πρέπει να εφαρμόζονται ως παράμετρος της συγκεκριμένης μεθοδολογίας για την ταυτοποίηση των ειδών, με το ποσοστό 99,9% να είναι πιθανά το επικρατέστερο ώστε να μειώνεται παράλληλα ο αριθμός ψευδώς θετικών καταχωρήσεων. Παρ' όλα αυτά, το συγκεκριμένο κριτήριο πρέπει να συν-αξιολογείται παράλληλα με τον αριθμό των αλληλουχιών (reads) ανά καταχώρηση είδους ωμοκύητα. Όπως φαίνεται και από τον **Πίνακα 1.2.4-3** οι περισσότερες καταχωρήσεις (number of reads) των non-MCS είναι λιγότερες από 5 ανά περίπτωση.

Πίνακας 1.2.4-3. Ομολογία των non-MCS ειδών που αναφέρονται στα barcodes-δείγματα 1 και 8 με ωμοκύητες του MCS του πειράματος "Oom-1". Παρατίθενται ο αριθμός των αλληλουχιών για κάθε non-MCS και ο αριθμός που διαφορετικών νουκλεοτιδίων και κενών των non-MCS για κάθε ομολογία με το κοντινότερο φυλογενετικά MCS.

Barcode 1				Barcode 8			
non-MCS ≥ 99%	No of reads	MCS	nt/gaps	non-MCS ≥ 99,9%	No of reads	MCS	nt/gaps
<i>P. acerina</i>	1	<i>P. citricola</i>	2	<i>P. hydropathica</i>	1	<i>P. virginiana</i>	>10
<i>P. crassamura</i>	3	<i>P. megasperma</i>	3	<i>Phonggalleglyana</i>	8	<i>P. virginiana</i>	>10
<i>P. fragariae</i>	1	<i>P. cambivora</i>	7	<i>Psansomeana</i>	1	<i>P. pseudocryptogea</i>	>10
<i>P. mexicana</i>	1	<i>P. nicotianae</i>	2	<i>P. lagoariana</i>	1	<i>P. parsiana</i>	>10
<i>P. parasitica</i>	1	<i>P. nicotianae</i>	10	<i>P. rhizo-oryzae</i>	4	<i>P. pyrilibum</i>	6
<i>P. pseudolactucaae</i>	18	<i>P. primulae</i>	>10				

Ο αριθμός των διαφορετικών νουκλεοτιδίων ανά σύγκριση non-MCS με MCS αλληλουχίες (nt/gaps) για τις κατηγορίες με ποσοστό ομολογίας αλληλουχιών $\geq 99\%$ και $\geq 99,9\%$, φαίνεται να κυμαίνεται στα αναμενόμενα όρια αναφορικά με τον αριθμό nt/gaps ανά μέγεθος αλληλουχίας (μέσο μέγεθος amplicon 800nts) για την κατηγορία $\geq 99\%$ (<8 βάσει ποσοστού για 800nts) για το barcode 1, όχι όμως και για την κατηγορία $\geq 99,9\%$ (barcode 8) όπου το θεωρητικά αποδεκτό θα ήταν τυπικά 1 διαφορετικό nt/gap ανά σύγκριση non-MCS με MCS αλληλουχίες. Η ύπαρξη τέτοιων διαφοροποιήσεων από το θεωρητικά αναμενόμενο πιθανά να οφείλεται και σε παλαιότερες ή/και μη-αναθεωρημένες καταχωρήσεις αλληλουχιών στην βάση NCBI.

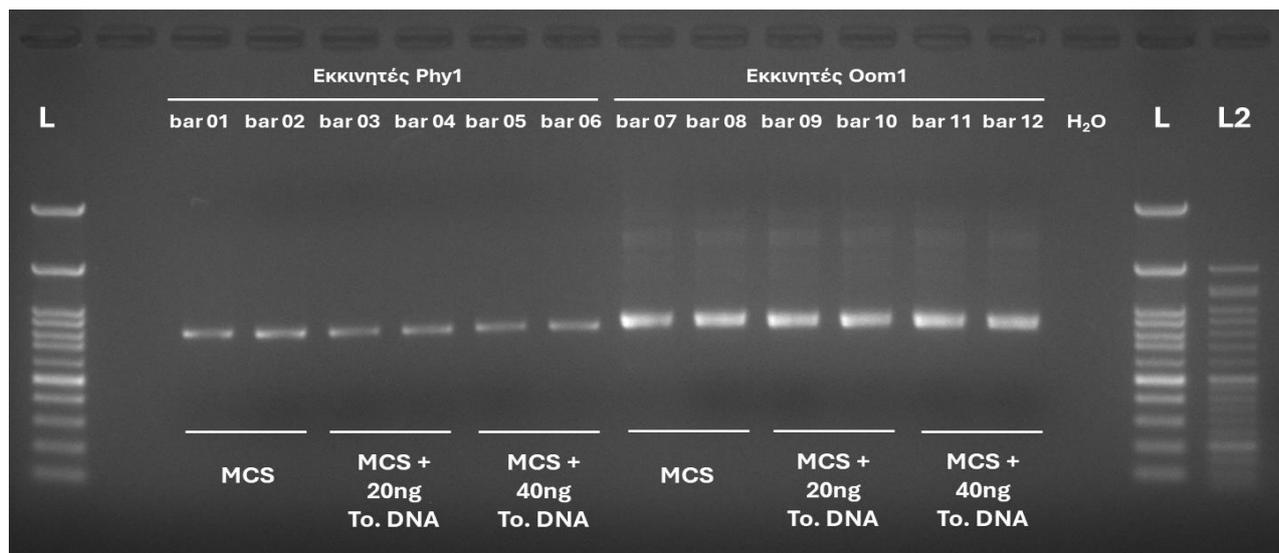
Η δημιουργία και χρήση μίας in-house πρότυπης βάσης πιστοποιημένων αλληλουχιών για είδη ωμοκύητων θα μπορούσε να λειτουργήσει συνδυαστικά με την εφαρμογή της επιλογής εκκινητών για εξειδικευμένη ανίχνευση ειδών *Phytophthora* (εκκινητές Phy1) ή ωμοκύητων (π.χ. εκκινητές Oom1), και ελάχιστων ποσοστών ομολογίας (πιθανά $\geq 99,9\%$) και αριθμού reads (π.χ. ≥ 20).

2.3 Αξιολόγηση πιθανής αναστολής υποστρώματος σε δοκιμή ONT minION

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα και τα συμπεράσματα που εξήχθησαν από το πείραμα Oom-1 έγινε επιλογή των εκκινητών Phy1 και Oom1 για περαιτέρω αξιολόγησή τους σε επόμενο πείραμα ελέγχου πιθανής αναστολής των αντιδράσεων PCR και των αντιδράσεων HTS με την πλατφόρμα ONT minION, λόγω υποστρώματος.

Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε αρχικός έλεγχος σε αντιδράσεις συμβατικής PCR του μίγματος MCS με τα δυο ζεύγη εκκινητών, παρουσία ή όχι ποσότητας εκχυλίσματος DNA από την περιοχή του λαιμού-ρίζας υγείων φυτών τομάτας, με χρήση του KAPA HiFi 2x hotstart ready mix, και εφαρμογή των βέλτιστων συνθηκών θερμοκρασίας Tm και κύκλων πολυμερισμού όπως αυτές είχαν προσδιοριστεί στο

προηγούμενο πείραμα. Χρησιμοποιήθηκαν 12 barcodes, 6 για κάθε ζεύγος εκκινητών, και ανά 2 για κάθε διαφορετική συνθήκη. Διαμορφώθηκαν 3 συνθήκες συνολικά: (i) DNA MCS (barcodes 1, 2, 7, και 8), (ii) DNA MCS με 20ng DNA τομάτας (barcodes 3, 4, 9, και 10), και (iii) DNA MCS με 40ng (2x) DNA τομάτας (barcodes 5, 6, 11, και 12). Για κάθε barcode πραγματοποιήθηκαν 3 μεμονωμένες αντιδράσεις PCR τα amplicons των οποίων συνενώθηκαν σε ένα τελικό δείγμα ανά barcode, τα οποία στη συνέχεια ποσοτικοποιήθηκαν. Μέρος του όγκου (2μl) του τελικού δείγματος, ανεξαρτήτως συγκέντρωσης DNA, χρησιμοποιήθηκε για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης με στόχο την λήψη μιας πρώτης οπτικής ένδειξης και αξιολόγησης πιθανής ύπαρξης αναστολής λόγω υποστρώματος στα δείγματα στα οποία είχε προστεθεί εκχύλισμα DNA τομάτας. Στην **Εικόνα 1.2.4-6** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τα 12 τελικά δείγματα. Οι ζώνες των 6 διαφορετικών amplicons ανά ζεύγος εκκινητών παρουσιάζονται ομοιογενείς ποιοτικά και ποσοτικά μεταξύ τους, δίνοντας μια πρώτη ένδειξη ότι δεν υπάρχει αναστολή των αντιδράσεων PCR από πιθανή μεταφορά αναστολέων μέσω του εκχυλίσματος DNA από φυτά (περιοχή λαιμού-ρίζας) τομάτας, ή λόγω της ποσότητας DNA (20ng και 40ng) τομάτας που προστίθεται, και για τα δύο ζεύγη εκκινητών.



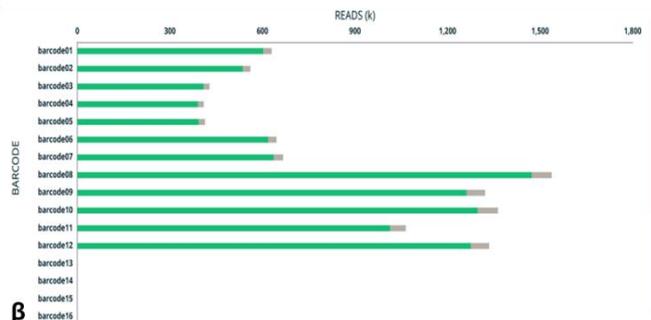
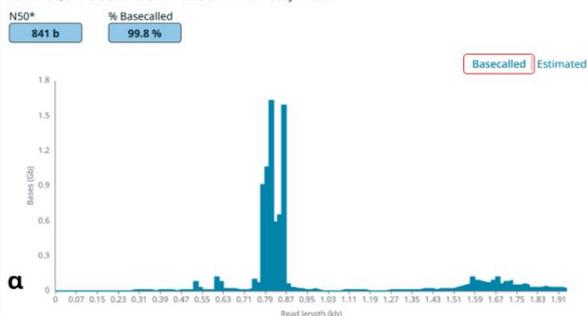
Εικόνα 1.2.4-6. Ηλεκτροφόρηση amplicons του MCS σε πηκτή αгарόζης 1,3%. Phy1: Ζεύγος εκκινητών για εξειδικευμένη ανίχνευση *Phytophthora* spp; **Oom1:** Ζεύγος εκκινητών για εξειδικευμένη ανίχνευση ωμοκυκίων; **Bar 01-12:** barcodes δειγμάτων; **MCS:** Μίγμα DNAs του Mock Community Species; **To:** Tomato; **L:** FastGene 100bp DNA ladder, **L2:** FastGene 50bp DNA ladder, **H₂O:** Αρνητικός μάρτυρας αντιδράσεων PCR.

Για την αξιολόγηση πιθανής αναστολής υποστρώματος στις μετέπειτα μοριακές αντιδράσεις HTS της πλατφόρμας ONT minION, δημιουργήθηκε ενιαία βιβλιοθήκη με των 12 amplicons με ραβδογραμμωτές μοριακές σημάσεις, και πραγματοποιήθηκε αλληλούχισή της με χρήση των SQK-NBD114.24 kit, R10.4.1 flow cell, και MinKNOW24.11.10 software. Το συγκεκριμένο πείραμα (**run ONT minion**) κωδικοποιήθηκε ως "**Oomycetes-2; Oom-2**". Το σύνολο των νουκλεοτιδικών βάσεων που αναγνώστηκαν στο Oom-2 ανήρθε στα 10,92 Gb τα οποία αντιστοιχούν συνολικά σε 10,6M αναγνωσμένες αλληλουχίες. Στην **Εικόνα 1.2.4-7** παρουσιάζονται οι κατανομές των μεγεθών των αναγνωσμένων αλληλουχιών με την κύρια ομάδα των μετέπειτα επιλεγμένων αλληλουχιών μεταξύ 700-900bp (**Εικόνα 1.2.4-7α**), και οι κατανομές των αλληλουχιών ανά barcode (**Εικόνα 1.2.4-7β**).

Sequence output

READ LENGTHS · OUTLIERS REMOVED

The read length graph shows the total number of bases vs the read length. The longest 1% of strands are classified as outliers, and excluded to allow focus on the main body of data.



Εικόνα 1.2.4-7. Κατανομές μεγεθών και αριθμών αναγνωσμένων αλληλουχιών ανά barcode του πειράματος Oom-2. α) Κατανομή των μεγεθών των αναγνωσμένων αλληλουχιών. Διακρίνεται η κύρια ομάδα μεγεθών (700-900bp) που επιλέχθηκε για περαιτέρω ανάλυση, **β)** Κατανομή των αναγνωσμένων αλληλουχιών (reads) ανά barcode.

Στον **Πίνακα 1.2.4-4** παρουσιάζονται ο συνολικός αριθμός των ταυτοποιημένων αλληλουχιών ανά δείγμα-barcode για τα δυο ζεύγη εκκινητών Phy1 και Oom1, καθώς και οι επιμέρους κατανομές τους στις κατηγορίες με διαφορετικά ποσοστά ομολογίας. Στα δείγματα στα οποία έχει προστεθεί DNA τομάτας (barcodes 3-8 & 9-12) οι αριθμοί των ταυτοποιημένων αλληλουχιών δεν φαίνεται να επηρεάζονται και παραμένουν στην ίδια τάξη μεγέθους με αυτούς στα δείγματα όπου υπάρχει μόνο το MCS DNA (barcodes 1-2 & 7-8). Ανάλογο αποτέλεσμα παρατηρείται και στις επιμέρους κατανομές, το οποίο δείχνει ότι δεν παρατηρείται αναστολή των μοριακών αντιδράσεων που αφορούν στο HTS και τη διαδικασία basecalling του minION λόγω του εκχυλίσματος ή/και της ποσότητας DNA τομάτας.

Πίνακας 1.2.4-4. Κατάταξη του αριθμού των ταυτοποιημένων αλληλουχιών που ανιχνεύονται ανά δείγμα-barcode για τα ζεύγη εκκινητών Phy1 & Oom1 του πειράματος "Oom-2".

	Phy1						Oom1					
	MCS DNA		MCS DNA+20ngtDNA		MCS DNA+40ngtDNA		MCS DNA		MCS DNA+20ngtDNA		MCS DNA+40ngtDNA	
	bar_01	bar_02	bar_03	bar_04	bar_05	bar_06	bar_07	bar_08	bar_09	bar_10	bar_11	bar_12
Total reads	521080	457654	350790	344642	339029	544141	545037	1231594	1100404	1082972	897240	1105854
Reads lt_99	244009	217514	189027	183913	183047	290166	377378	877986	296716	305148	249816	303988
Reads ge_99	277071	240140	161723	160729	155982	253975	167659	353608	803688	777824	647424	801866
Reads ge_99.9	29737	24712	21388	20500	20365	30536	9322	13831	12111	12783	10017	11986
% Reads ge_99	53%	52%	46%	47%	46%	47%	31%	29%	73%	72%	72%	73%
% Reads ge_99.9	6%	5%	6%	6%	6%	6%	2%	1%	1%	1%	1%	1%

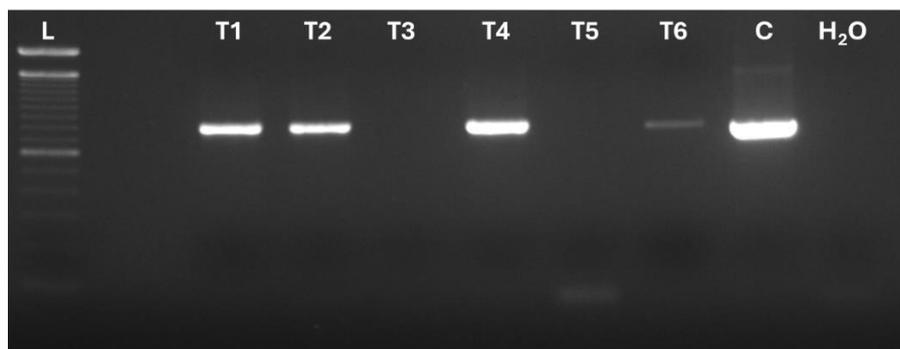
Index. lt: lower than; ge: equal or greater than; 97 to 99.9: homology percentages 97% & 99.9%

2.4 Ανίχνευση *Phytophthora* spp σε δείγματα φυτών τομάτας

Ο έλεγχος της μεθόδου για την ανίχνευση ειδών ωομυκήτων σε φυτικούς ιστούς πραγματοποιήθηκε σε δείγματα φυτών τομάτας. Δώδεκα δείγματα φυτών τομάτας που εμφάνιζαν συμπτώματα προσβολής στην περιοχή του λαιμού του κεντρικού στελέχους και των ριζών χορηγήθηκαν από την Υπηρεσία Δειγμάτων του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου (ΜΦΙ), την Διεύθυνση Αγροτικής Οικονομίας και Κτηνιατρικής Δράμας (ΔΑΟΚ Δράμας, Δρ Κ. Σίμογλου) και το Εργαστήριο Βιοτεχνολογικών Εφαρμογών και Φυτοπροστασίας του Τμήματος Γεωπονίας του Ελληνικού Μεσογειακού Πανεπιστημίου (ΕΒΕΦ ΕΛΜΕΠΑ, Δρ Ε. Μαρκάκης). Από μικροβιολογικές απομονώσεις που πραγματοποιήθηκαν, για τα δείγματα που

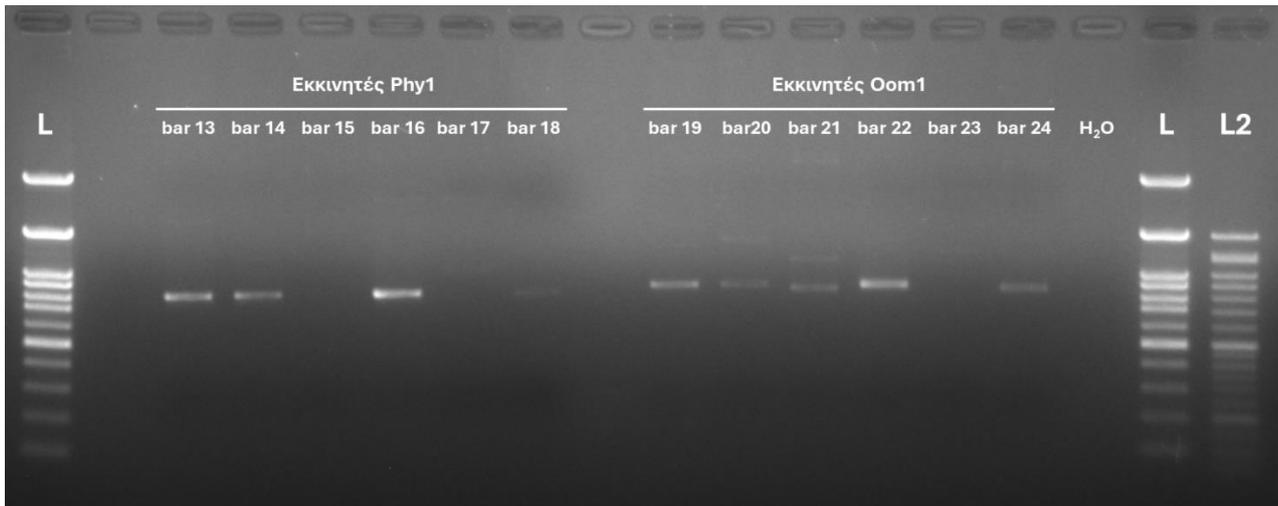
προέρχονται από το ΕΒΕΦ προέκυψαν απομονώσεις του γένους *Phytophthora* (επικοινωνία Δρ Ε. Μαρκάκης), ενώ για τα υπόλοιπα (ΜΦΙ και ΔΑΟΚ Δράμας) δεν προέκυψαν απομονώσεις ωομυκήτων. Δεν κατέστη εφικτή η εύρεση δειγμάτων φυτών τομάτας μολυσμένων από είδη του γένους *Pythium*.

Από δυο δείγματα (πολλαπλά φυτά) προερχόμενα από το ΕΒΕΦ επιλέχθηκαν έξι φυτά τομάτας με εμφανή και μη-εμφανή οπτικά συμπτώματα στα οποία πραγματοποιήθηκε εκχύλιση DNA από τμήματα της περιοχής του λαιμού του κεντρικού στελέχους μαζί με τμήματα ριζών. Τα ολικά DNAs των έξι διαφορετικών φυτών (T1-T6) ελέγχθηκαν αρχικά σε αντίδραση συμβατικής PCR με το ζεύγος εκκινητών I2/A2 (Drenth A. et al., 2006) για ανίχνευση ειδών του γένους *Phytophthora*. Στην **Εικόνα 1.2.4-8** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων PCR για τα συγκεκριμένα δείγματα, στα οποία υπάρχει προϊόν αντίδρασης (και συνεκδοχικά ανιχνεύεται *Phytophthora*) σε 4 από τα 6 με μία εκ των αντιδράσεων να δίνει ασθενέστερη ποσοτικά ζώνη σε σχέση με τις άλλες 3, ενώ δεν υπάρχει προϊόν PCR στα υπόλοιπα 2 δείγματα.



Εικόνα 1.2.4-8. Ηλεκτροφόρηση amplicons δειγμάτων DNA φυτών τομάτας σε πηκτή αγαρόζης 1,3%. L: FastGene 100bp DNA ladder; **T1-T6:** Δείγματα DNA από φυτά τομάτας; **C:** Θετικός μάρτυρας αντιδράσεων PCR; **H₂O:** Αρνητικός μάρτυρας αντιδράσεων PCR.

Για τα συγκεκριμένα δείγματα πραγματοποιήθηκαν στην συνέχεια αντιδράσεις PCR με χρήση του KAPA HiFi 2x hotstart ready mix, χρησιμοποιώντας τα ζεύγη εκκινητών Phy1 και Oom1 και εφαρμογή των βέλτιστων συνθηκών θερμοκρασίας Tm και κύκλων πολυμερισμού όπως προαναφέρονται. Χρησιμοποιήθηκαν 12 barcodes, 6 για κάθε ζεύγος εκκινητών, ένα για κάθε διαφορετικό δείγμα (barcodes 13-18 για τους Phy1, barcodes 19-24 για τους Oom1). Για κάθε barcode πραγματοποιήθηκαν 2 μεμονωμένες αντιδράσεις PCR τα amplicons των οποίων συνενώθηκαν σε ένα τελικό δείγμα ανά barcode. Τα τελικά δείγματα ποσοτικοποιήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης 1,3% (**Εικόνα 1.2.4-9**), στη συνέχεια δημιουργήθηκε ενιαία βιβλιοθήκη των 12 amplicons με ραβδογραμμωτές μοριακές σημάνσεις, και πραγματοποιήθηκε αλληλούχισή της με χρήση των SQK-NBD114.24 kit, R10.4.1 flow cell, και MinKNOW24.11.10 software. Το συγκεκριμένο πείραμα (**run ONT minion**) κωδικοποιήθηκε ως "**Oomycetes-3; Oom-3**". Το σύνολο των νουκλεοτιδικών βάσεων που αναγνώστηκαν στο Oom-3 ανήρθε στα 5,27 Gb τα οποία αντιστοιχούν συνολικά σε 4,44M αναγνωσμένες αλληλουχίες. Στην **Εικόνα 1.2.4-10** παρουσιάζονται ο συνολικός αριθμός αναγνωσμένων αλληλουχιών (**Εικόνα 1.2.4-10α**), οι κατανομές των μεγεθών τους (**Εικόνα 1.2.4-10β**), και οι κατανομές των αλληλουχιών ανά barcode (**Εικόνα 1.2.4-10γ**).

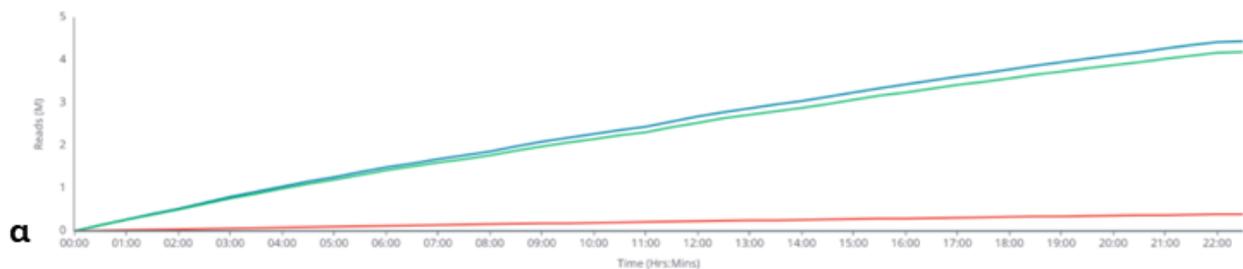


Εικόνα 1.2.4-9. Ηλεκτροφόρηση amplicons του MCS σε ηλεκτική αгарόζης 1,3%. Phy1: Ζεύγος εκκινητών για εξειδικευμένη ανίχνευση *Phytophthora* spp; **Oom1:** Ζεύγος εκκινητών για εξειδικευμένη ανίχνευση ωμοκυκτών; **Bar 13-24:** barcodes δειγμάτων T1-T6; **L:** FastGene 100bp DNA ladder, **L2:** FastGene 50bp DNA ladder, **H₂O:** Αρνητικός μάρτυρας αντιδράσεων PCR.

Reads

Legend

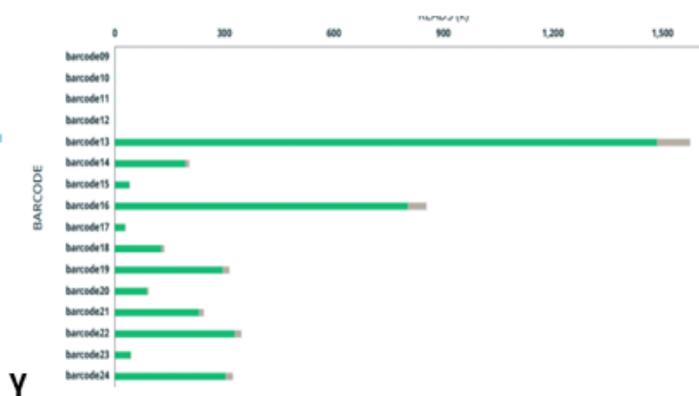
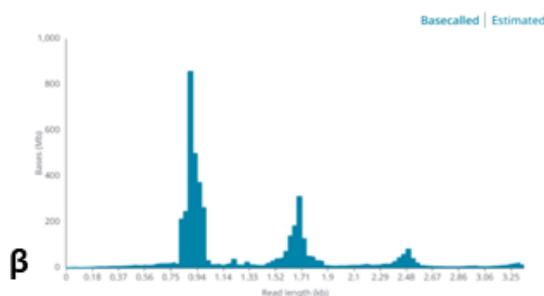
- Total
Total number of reads, including passed, failed and skipped.
- Passed
Reads equal to or above the quality score threshold.
- Failed
Reads below the quality score threshold.
- Skipped
Reads that will not be basecalled. Post run basecalling is possible.



READ LENGTHS - OUTLIERS REMOVED

The read length graph shows the total number of bases vs the read length. The longest 1% of strands are classified as outliers, and excluded to allow focus on the main body of data.

NS0* **982 b** % Basecalled **100 %**



Εικόνα 1.2.4-10. Κατανομές αριθμών και μεγεθών και αναγνωσμένων αλληλουχιών ανά barcode του πειράματος Oom-3. α) Προοδευτικό άθροισμα σε συνάρτηση του χρόνου των συνολικών αναγνωσμένων αλληλουχιών, και των αλληλουχιών που παίρνουν ή όχι το ελάχιστο ποιοτικό όριο Q-score ≥ 10 κατά τη διαδικασία basecalling, **(β)** Κατανομή των μεγεθών των αναγνωσμένων αλληλουχιών. Διακρίνεται η κύρια ομάδα μεγεθών (700-900bp) που επιλέχθηκε για περαιτέρω ανάλυση, **(γ)** Κατανομή των αναγνωσμένων αλληλουχιών (reads) ανά barcode.

Στον **Πίνακα 1.2.4-5** παρουσιάζονται ο συνολικός αριθμός των ταυτοποιημένων αλληλουχιών ανά δείγμα-barcode για τα δυο ζεύγη εκκινητών Phy1 και Oom1 και οι επιμέρους κατανομές τους στις κατηγορίες με διαφορετικά ποσοστά ομολογίας (άνω μέρος του πίνακα), καθώς και ο αριθμός των ταυτοποιημένων αλληλουχιών για το είδος ωομύκητα που κατατάσσεται πρώτο κατά φθίνουσα σειρά (κάτω μέρος του πίνακα), μαζί με το αντίστοιχο ποσοστό που καταλαμβάνουν οι συγκεκριμένες αλληλουχίες επί του συνόλου στην συγκεκριμένη κατηγορία ομολογίας ($\geq 99\%$ και $\geq 99,9\%$).

Για το ζεύγος εκκινητών Phy1 σε τέσσερα από τα δείγματα (T1, T2, T4 και T6) τα ποσοστά που καταλαμβάνει το κυρίαρχο είδος ωομύκητα και στις δυο κατηγορίες ξεπερνά αυτό του 99%, ενώ στα δείγματα T3 και T5 (τα οποία δεν έδωσαν εμφανή ζώνη amplicon όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1.2.4-9**) τα ποσοστά κυμαίνονται σε εξίσου υψηλά επίπεδα μεταξύ 87%-93% και 90%-97% αντίστοιχα για τις δυο κατηγορίες. Για το ζεύγος εκκινητών Oom1 στα ίδια δείγματα (T1-T6) τα ποσοστά τα οποία καταλαμβάνουν τα εκάστοτε είδη ωομυκήτων που κατατάσσονται ως πρώτα κυμαίνονται μεταξύ 35%-50% για τέσσερα δείγματα (T1, T2, T4 και T5), ενώ στα υπόλοιπα (T3, T6) τα ποσοστά είναι πολύ υψηλά, μεταξύ 86%-96%.

Πίνακας 1.2.4-5. Κατάταξη του αριθμού των ταυτοποιημένων αλληλουχιών που ανιχνεύονται ανά δείγμα-barcode για τα ζεύγη εκκινητών Phy1 & Oom1 του πειράματος "Oom-3". Παρατίθενται οι αριθμοί των ταυτοποιημένων αλληλουχιών (reads) ανά δείγμα (T1-T6) και αντίστοιχα barcodes για τα δυο ζεύγη εκκινητών Phy1 και Oom1, και οι επιμέρους κατανομές τους στις κατηγορίες με διαφορετικά ποσοστά ομολογίας ($\geq 99\%$ και $\geq 99,9\%$). Δίδονται επίσης ο αριθμός των ταυτοποιημένων αλληλουχιών για το είδος ωομύκητα που κατατάσσεται πρώτο κατά φθίνουσα σειρά (Top sp.), μαζί με το αντίστοιχο ποσοστό που καταλαμβάνουν οι συγκεκριμένες αλληλουχίες (reads) επί του συνόλου στην συγκεκριμένη κατηγορία ομολογίας ($\geq 99\%$ και $\geq 99,9\%$).

	Phy1						Oom1					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T1	T2	T3	T4	T5	T6
	bar_13	bar_14	bar_015	bar_16	bar_17	bar_18	bar_19	bar_20	bar_21	bar_22	bar_23	bar_24
Total reads	1398991	169920	1947	757343	1005	95426	237211	57601	135207	282944	1556	242503
Reads<lt_99	573985	67886	890	306089	450	39717	106660	26543	54040	127008	665	101624
Reads<ge_99	825006	102034	1057	451254	555	55709	130551	31058	81167	155936	891	140879
Reads<ge_99.9	41693	6212	42	30773	32	3392	3074	819	6729	5771	72	5252
%Reads<ge_99	59%	60%	54%	60%	55%	58%	55%	54%	60%	55%	57%	58%
%Reads<ge_99.9	3%	4%	2%	4%	3%	4%	1%	1%	5%	2%	5%	2%
Top sp. in<ge_99	823899	101830	991	450632	484	55607	69669	15581	75032	60898	442	135449
%Reads of Top sp. in<ge_99	99,87%	99,80%	93,76%	99,86%	87,21%	99,82%	53,37%	50,17%	92,44%	39,05%	49,61%	96,15%
Top sp. in<ge_99.9	41662	6201	41	30751	29	3389	1105	307	5848	2578	37	4782
%Reads of Top sp. in<ge_99.9	99,93%	99,82%	97,62%	99,93%	90,63%	99,91%	35,95%	37,48%	86,91%	44,67%	51,39%	91,05%

Index. lt: lower than; <ge: equal or greater than; 97 to 99,9: 97 to 99,9% homology percentages; Top sp.: Top species

Στον **Πίνακα 1.2.4-6** παρουσιάζονται αναλυτικά τα είδη των ωομυκήτων ως κατάταξη με φθίνουσα σειρά βάσει του αριθμού ταυτοποιημένων αλληλουχιών τους, ανά δείγμα για τα δυο ζεύγη εκκινητών Phy1 και Oom1 (αντίστοιχα barcodes) και στις επιμέρους κατηγορίες ποσοστού ομολογίας ($\geq 99\%$ και $\geq 99,9\%$).

Για το ζεύγος εκκινητών Phy1 το είδος ωομύκητα που ανιχνεύεται και στα έξι δείγματα (T1-T6) με βάσει την κατάταξη και στις δύο κατηγορίες ποσοστού ομολογίας ($\geq 99\%$ και $\geq 99,9\%$) είναι το *Phytophthora nicotianae*. Τα υπόλοιπα είδη που αναφέρονται και κατατάσσονται στις θέσεις 2 έως 5, έχουνε πολύ μικρότερο αριθμό αλληλουχιών που καταγράφονται (π.χ. διαφορά 4 και 3 τάξεων μεγέθους στα T1, T2, T4 και T6) ή και με μονοψήφιο ή μηδενικό αριθμό αλληλουχιών ειδικά στην κατηγορία ομολογίας με ποσοστό $\geq 99,9\%$. Πολλά δε από τα είδη που αναφέρονται (*P. parasitica*, *P. palmivora*) είναι πολύ κοντά φυλογενετικά με το *P. nicotianae*.

Πίνακας 1.2.4-6. Κατάταξη ειδών ωομυκήτων με βάση του αριθμού ταυτοποιημένων αλληλουχιών τους για τα δείγματα T1-T6 και τα δυο ζεύγη εκκινητών Phy1 και Oom1. Κατάταξη με φθίνουσα σειρά βάσει του αριθμού ταυτοποιημένων αλληλουχιών (reads), ανά δείγμα (T1-T6), για τα Phy1 και Oom1, και τις επιμέρους κατηγορίες ποσοστού ομολογίας ($\geq 99\%$ και $\geq 99,9\%$).

		T1			
		Phy1		Oom1	
		Species	Reads	Species	Reads
$\geq 99\%$	Phytophthora nicotianae	823899	Phytophthora palmivora	69669	
	Phytophthora parasitica	380	Phytophthora parasitica	34449	
	Pythium aphanidermatum	362	Phytophthora nicotianae	26384	
	Phytophthora palmivora	233	Pythium aphanidermatum	36	
	Phytophthora citrophthora	93	Pythium deliense	9	
	Pythium deliense	27	Phytophthora citrophthora	1	
$\geq 99,9\%$	Phytophthora nicotianae	41662	Phytophthora palmivora	1105	
	Pythium aphanidermatum	14	Phytophthora parasitica	1061	
	Phytophthora parasitica	7	Phytophthora nicotianae	906	
	Phytophthora palmivora	6	Pythium aphanidermatum	1	
	Pythium deliense	4	Pythium deliense	1	
	Phytophthora citrophthora	0	Phytophthora infestans	0	

		T2			
		Phy1		Oom1	
		Species	Reads	Species	Reads
$\geq 99\%$	Phytophthora nicotianae	101830	Phytophthora parasitica	15581	
	Pythium aphanidermatum	75	Phytophthora palmivora	8314	
	Phytophthora parasitica	70	Phytophthora nicotianae	7089	
	Phytophthora palmivora	48	Pythium aphanidermatum	69	
	Phytophthora citrophthora	5	Pythium deliense	3	
	Phytophthora colocasiae	0	Phytophthora citrophthora	1	
$\geq 99,9\%$	Phytophthora nicotianae	6201	Phytophthora palmivora	307	
	Pythium aphanidermatum	7	Phytophthora parasitica	259	
	Phytophthora palmivora	4	Phytophthora nicotianae	249	
	Phytophthora parasitica	0	Pythium aphanidermatum	4	
	Phytophthora citrophthora	0	Pythium deliense	0	
	Phytophthora colocasiae	0	Phytophthora cactorum	0	

		T3			
		Phy1		Oom1	
		Species	Reads	Species	Reads
$\geq 99\%$	Phytophthora nicotianae	991	Pythium aphanidermatum	75032	
	Pythium aphanidermatum	23	Pythium deliense	5341	
	Phytophthora parasitica	21	Phytophthora nicotianae	539	
	Phytophthora palmivora	15	Pythium sp.	184	
	Pythium ultimum	3	Phytophthora palmivora	39	
	Globisporangium spinosum	1	Phytophthora parasitica	30	
$\geq 99,9\%$	Phytophthora nicotianae	41	Pythium aphanidermatum	5848	
	Pythium aphanidermatum	1	Pythium deliense	827	
	Phytophthora parasitica	0	Phytophthora nicotianae	37	
	Phytophthora palmivora	0	Pythium sp.	15	
	Pythium ultimum	0	Phytophthora parasitica	2	
	Globisporangium spinosum	0	Phytophthora palmivora	0	

		T4			
		Phy1		Oom1	
		Species	Reads	Species	Reads
$\geq 99\%$	Phytophthora nicotianae	450632	Phytophthora parasitica	60898	
	Phytophthora parasitica	268	Phytophthora palmivora	48009	
	Pythium aphanidermatum	194	Phytophthora nicotianae	43709	
	Phytophthora palmivora	118	Pythium ultimum	1757	
	Phytophthora citrophthora	22	Pythium sp.	639	
	Pythium deliense	12	Globisporangium camurandrum	342	
$\geq 99,9\%$	Phytophthora nicotianae	30751	Phytophthora palmivora	2578	
	Pythium aphanidermatum	10	Phytophthora nicotianae	1627	
	Phytophthora parasitica	5	Phytophthora parasitica	1388	
	Phytophthora palmivora	4	Pythium ultimum	155	
	Pythium deliense	2	Globisporangium spinosum	10	
	Pythium ultimum	1	Pythium oligandrum	9	

		T5			
		Phy1		Oom1	
		Species	Reads	Species	Reads
$\geq 99\%$	Phytophthora nicotianae	484	Phytophthora nicotianae	442	
	Phytophthora parasitica	26	Pythium aphanidermatum	346	
	Pythium aphanidermatum	20	Pythium deliense	30	
	Phytophthora palmivora	21	Hyaloperonospora nasturtii	26	
	Pythium deliense	2	Phytophthora palmivora	24	
	Pythium ultimum	2	Phytophthora parasitica	17	
$\geq 99,9\%$	Phytophthora nicotianae	29	Phytophthora nicotianae	37	
	Phytophthora parasitica	1	Pythium aphanidermatum	31	
	Pythium aphanidermatum	1	Pythium deliense	3	
	Pythium ultimum	1	Hyaloperonospora nasturtii-aqu	1	
	Phytophthora palmivora	0	Phytophthora palmivora	0	
	Pythium deliense	0	Phytophthora parasitica	0	

		T6			
		Phy1		Oom1	
		Species	Reads	Species	Reads
$\geq 99\%$	Phytophthora nicotianae	55607	Pythium aphanidermatum	135449	
	Phytophthora parasitica	40	Pythium deliense	2574	
	Pythium aphanidermatum	26	Phytophthora nicotianae	1142	
	Phytophthora palmivora	25	Phytophthora palmivora	850	
	Pythium deliense	5	Phytophthora parasitica	793	
	Phytophthora citrophthora	3	Pythium sp.	68	
$\geq 99,9\%$	Phytophthora nicotianae	3389	Pythium aphanidermatum	4782	
	Phytophthora parasitica	1	Pythium deliense	394	
	Phytophthora palmivora	1	Phytophthora nicotianae	52	
	Pythium deliense	1	Phytophthora palmivora	14	
	Pythium aphanidermatum	0	Phytophthora parasitica	7	
	Phytophthora citrophthora	0	Pythium sp.	3	

Από τα παραπάνω δεδομένα και αποτελέσματα εξάγεται το συμπέρασμα ότι η συγκεκριμένη μεθοδολογία μεταγονιδιοματικής με μοριακούς κωδικούς σήμανσης (metabarcoding) με χρήση του ζεύγους εκκινητών Phy1 είναι σε θέση να προσδιορίζει ωομυκήτες του γένους *Phytophthora* σε επίπεδο είδους σε δείγματα τομάτας.

Αυτό φαίνεται να ισχύει επίσης και σε περιπτώσεις δειγμάτων (T3 και T5) όπου δεν υπάρχει εμφανής ζώνη amplicon κατά την ηλεκτροφόρηση, και πιθανά υπάρχει μικρό μυκητολογικό φορτίο και έλλειψη εμφανών συμπτωμάτων στο φυτό (ασυμπτωματικά μολυσμένα φυτά). Στα συγκεκριμένα δείγματα (T3 και T5) αν και ο αριθμός των ταυτοποιημένων αλληλουχιών είναι σχετικά μικρός για το συγκεκριμένο είδος ωομυκήτα (*P. nicotianae*), στην κατηγορία όπου το ποσοστό ομολογίας που τίθεται ως παράμετρος για την ανάλυση των αποτελεσμάτων είναι $\geq 99,9\%$ (μια ιδιαίτερα αυστηρή συνθήκη) τα υπόλοιπα είδη που αναφέρονται δεν εκπροσωπούνται (0 reads) ή έχουν στατιστικά αμελητέο αριθμό αλληλουχιών (1 read).

Είναι άξιο αναφοράς επίσης ότι το Phy1 είναι το μόνο ζεύγος εκκινητών που έδειξε (πείραμα "Oom-1") εξειδικευμένη ανίχνευση ειδών του γένους *Phytophthora*, γεγονός που φαίνεται και στα αποτελέσματα του πειράματος "Oom-3".

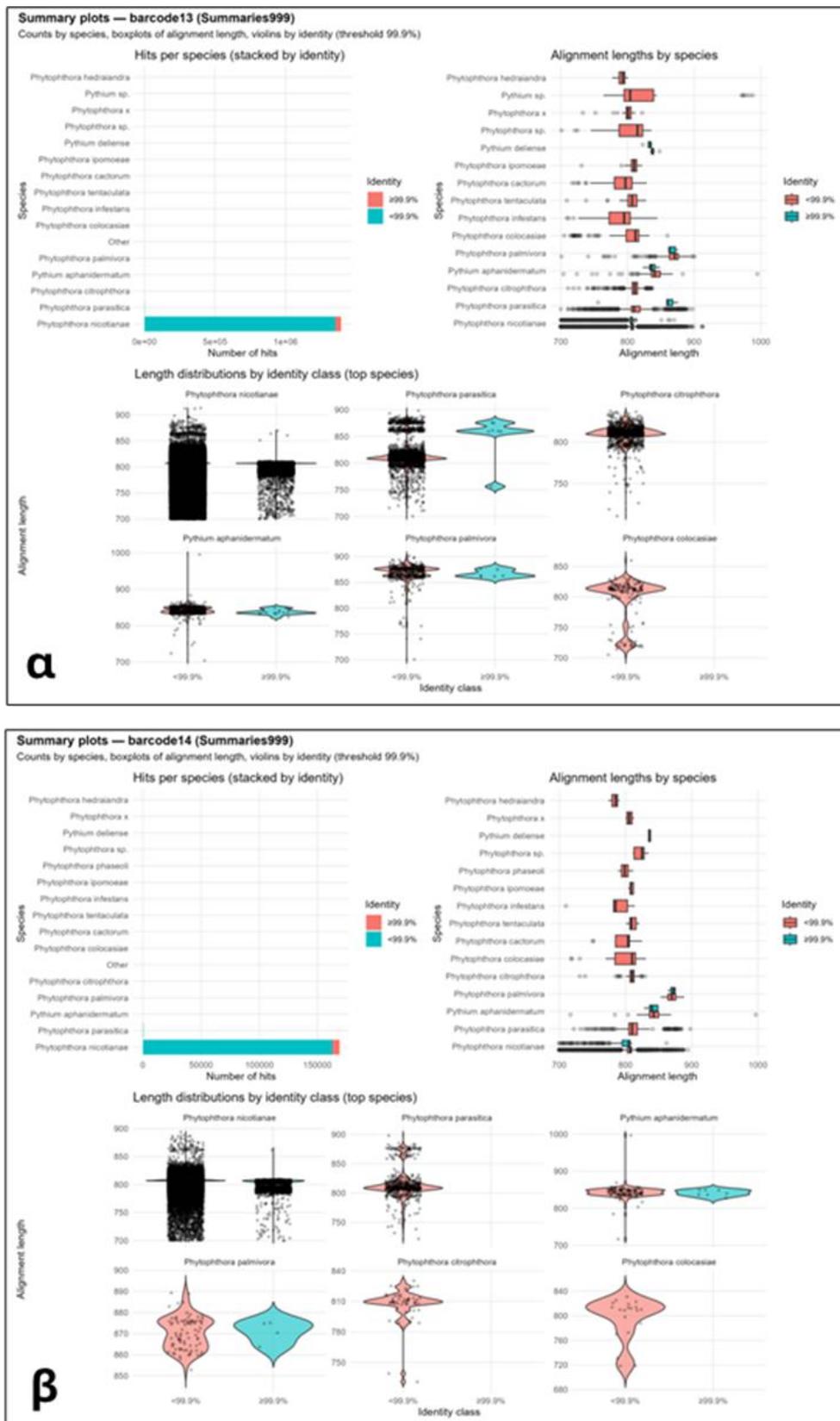
Για το ζεύγος εκκινητών Oom1 τα είδη ωομύκητων που ανιχνεύονται στα δείγματα T1-T6 και εκπροσωπούνται στις αντίστοιχες κατατάξεις με σημαντικό αριθμό αλληλουχιών αφορούν είδη του γένους *Phytophthora* και του γένους *Pythium*. Για τρία δείγματα (T1, T2, T4) τα είδη *P. parasitica*, *P. nicotianae* και *P. palmivora* εκπροσωπούνται εξ ίσου με ίδια τάξη μεγέθους αριθμό αλληλουχιών και στις δύο κατηγορίες ποσοστού ομολογίας ($\geq 99\%$ και $\geq 99,9\%$). Αν και είναι πιθανό στον ίδιο ξενιστή να συνυπάρχουν περισσότερα από ένα είδος διαφορετικού ωομύκητα (Labuschagne N et al., 2003; Ma M et al., 2023), του ίδιου ή και διαφορετικού γένους, θα πρέπει να εξεταστεί περαιτέρω η περίπτωση συγγενών ταξινομικά ειδών με υψηλό ποσοστό ομολογίας όπως η συγκεκριμένη, τόσο σε επίπεδο ομολογίας αλληλουχιών, καθώς και σε επίπεδο μη επικαιροποιημένων καταχωρήσεων στη βάση δεδομένων.

Στην περίπτωση των δειγμάτων T3 και T6 για το ζεύγος εκκινητών Oom1 το είδος ωομύκητα που κατατάσσεται πρώτο αφορά στο γένος *Pythium* και συγκεκριμένα το *P. aphanidermatum*. Για τα συγκεκριμένα δείγματα πρέπει να αναφερθεί ότι ανιχνεύεται επίσης το είδος *P. nicotianae* το οποίο αναφερόταν ως πρώτο στα αντίστοιχα δείγματα με χρήση του Phy1. Το γεγονός ότι το Oom1 ανιχνεύει εξειδικευμένα ωομύκητες ενώ το Phy1 είδη του γένους *Phytophthora* εξηγεί λογικά και την διαφορά στα αποτελέσματα στα συγκεκριμένα δείγματα μεταξύ Phy1 και Oom1. Είναι επίσης άξιο αναφοράς το ότι το *P. aphanidermatum* εκπροσωπείται με πολύ υψηλό αριθμό αλληλουχιών στα δείγματα T3 και T6 (δύο τάξεις μεγέθους διαφορά) σε σχέση με τα είδη *Phytophthora* και του *P. nicotianae* συγκεκριμένα. Πιθανά το *P. aphanidermatum* είναι το πρωτογενές παθογόνο και το *P. nicotianae* να έχει επίσης μολύνει τα συγκεκριμένα δείγματα, γεγονός που δεν θα μπορούσε να προσδιοριστεί με χρήση του Phy1.

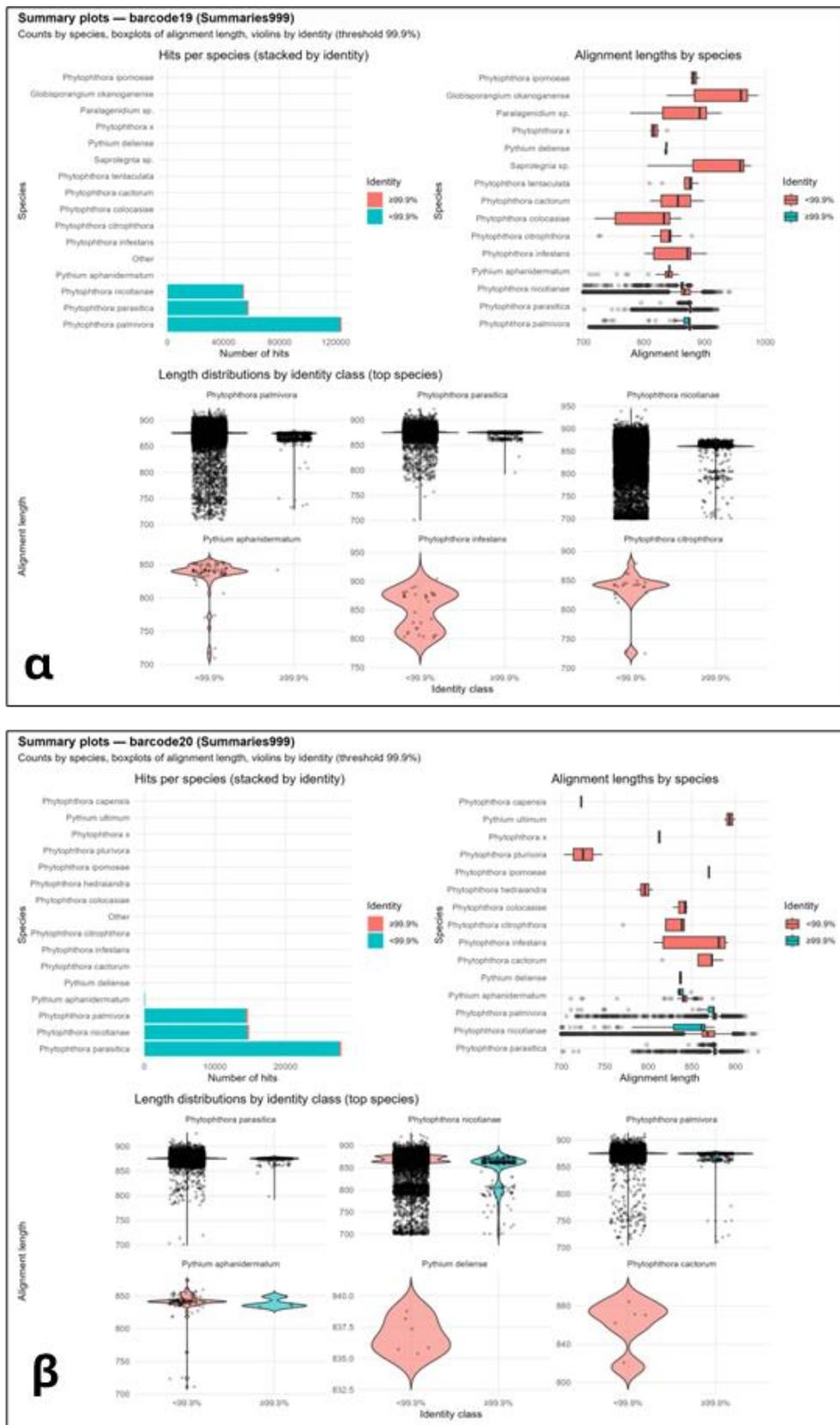
Στα προαναφερθέντα δείγματα (T3, T6) αναφέρεται επίσης και το είδος *Pythium delicense*, αν και με μικρότερο αριθμό ταυτοποιημένων αλληλουχιών σε σχέση με αυτόν του *P. aphanidermatum*. Όπως και στην περίπτωση των *P. parasitica*, *P. nicotianae* και *P. palmivora*, το *P. delicense* είναι ταξινομικά συγγενές του *P. aphanidermatum*, και θα πρέπει να εξεταστεί περαιτέρω το επίπεδο ομολογίας των συγκεκριμένων αλληλουχιών και η πιθανότητα μη επικαιροποιημένων καταχωρήσεων στην βάση δεδομένων.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα εξάγεται το συμπέρασμα ότι η συγκεκριμένη μεθοδολογία μεταγονιδιοματικής με μοριακούς κωδικούς σήμανσης (metabarcoding) με χρήση του ζεύγους εκκινητών Oom1 είναι σε θέση να προσδιορίζει ωομύκητες των γένων *Phytophthora* και *Pythium* σε επίπεδο είδους σε δείγματα τομάτας.

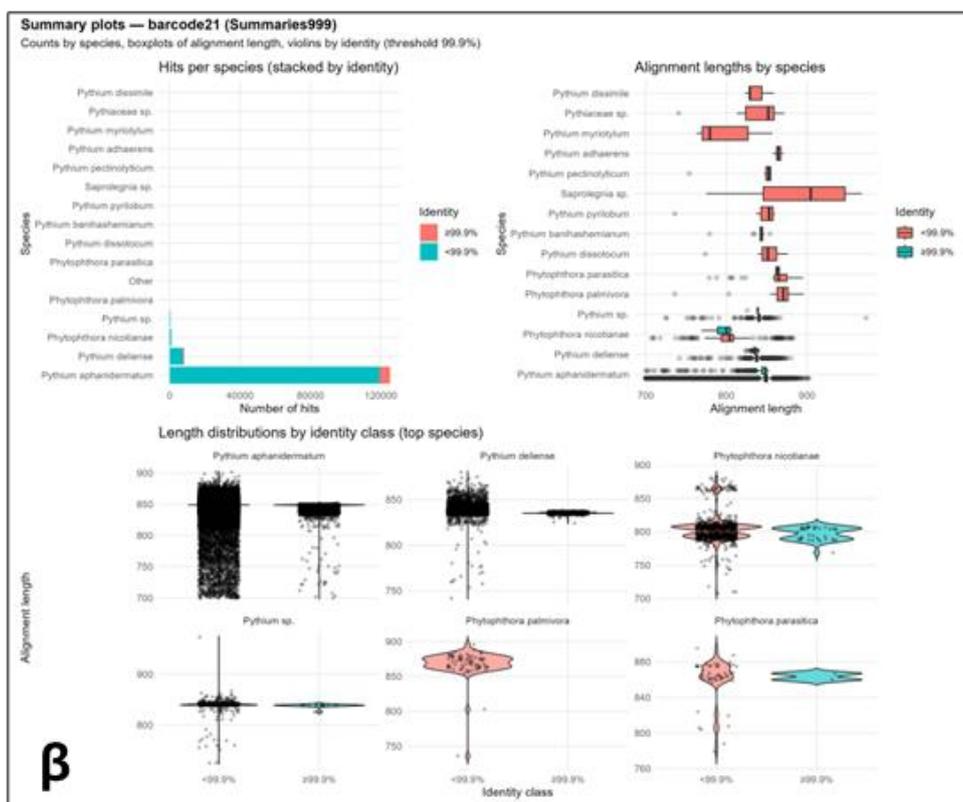
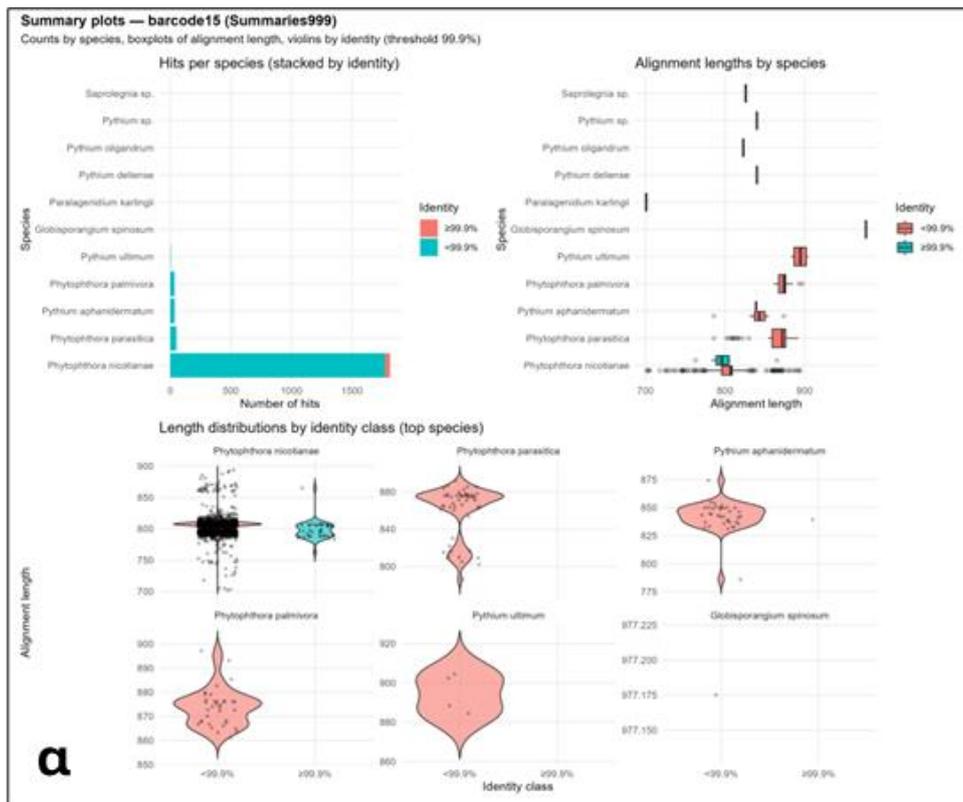
Στις **Εικόνες 1.2.4-11 έως 1.2.4-14** παρουσιάζονται σχηματικά τα αποτελέσματα που αναφέρονται στους **Πίνακες 1.2.4-5 και 1.2.4-6** ενδεικτικά για τα δείγματα T1 (barcodes 13 & 19), T2 (barcodes 14 & 20), T3 (barcodes 15 & 21) και T5 (barcodes 17 & 23). Παρουσιάζονται σε ραβδόγραμμα ο αριθμός των αλληλουχιών ανά είδος και ανά κατηγορία ποσοστού ομολογίας ($< 99,9\%$ & $\geq 99,9\%$), το μήκος των αλληλουχιών ανά είδος και κατηγορία ποσοστού ομολογίας ($< 99,9\%$ & $\geq 99,9\%$) σε θηκόγραμμα (box plot), και οι κατανομές τους ανά κατηγορία ποσοστού ομολογίας ($< 99,9\%$ & $\geq 99,9\%$) για τα έξι πρώτα είδη σε κάθε κατάταξη σε γράφημα τύπου "Manhattan-violin".



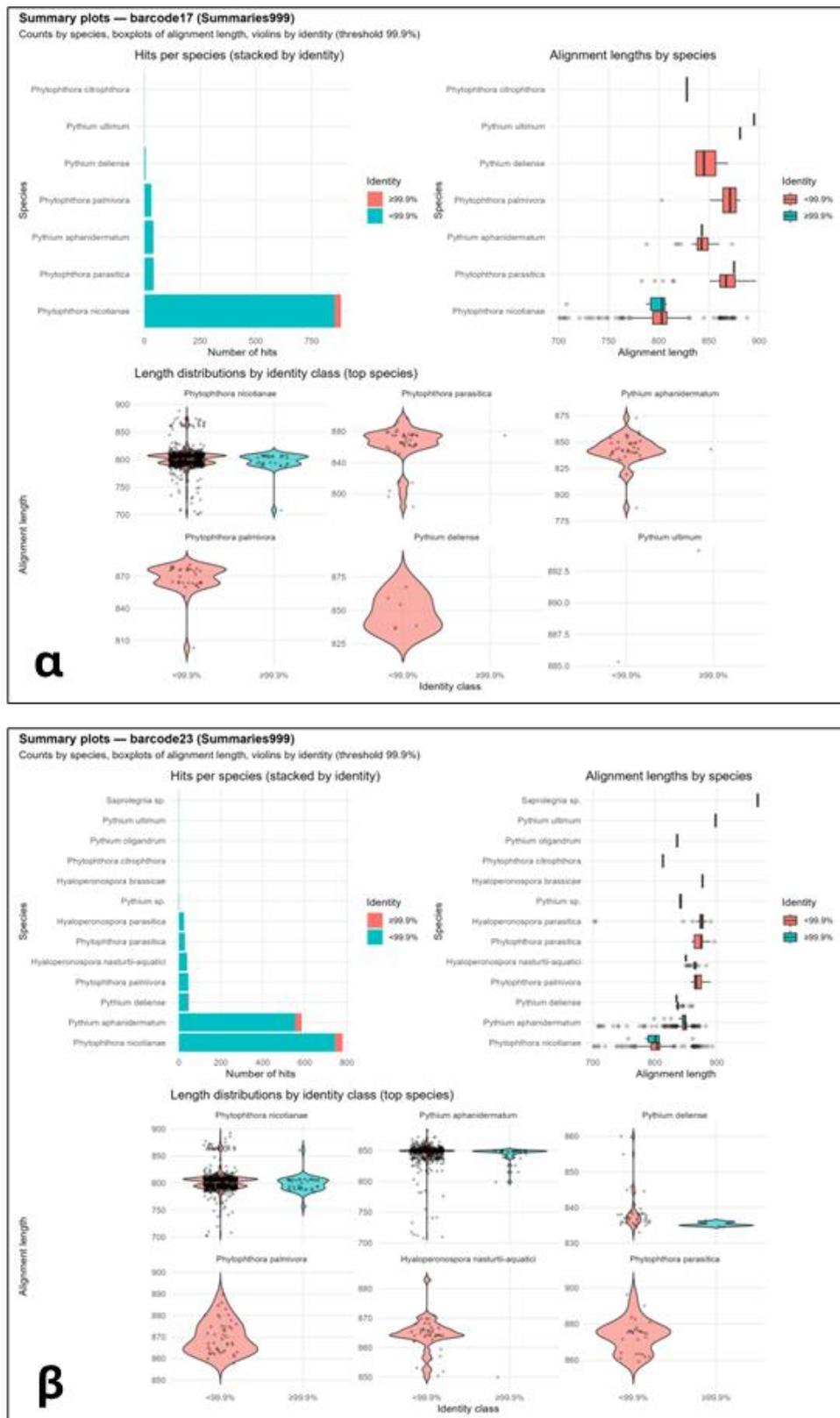
Εικόνα 1.2.4-11. Γραφική αναπαράσταση του αριθμητικών δεδομένων του πειράματος Oom-3 για το δείγμα T1 και τα ζεύγη εκκινητών (α) Phy 1 (barcode 13) και (β) Oom1 (barcode 19). Παρουσιάζονται ο αριθμός των αλληλουχιών ανά είδος (ραβδόγραμμα), το μήκος των αλληλουχιών ανά είδος (θηκόγραμμα, Box plot), και των κατανομών τους για τα έξι πρώτα είδη σε κάθε κατάταξη (Manhattan-violin plot)”, ανά κατηγορία ποσοστού ομολογίας (<math>< 99,9\%</math> & $\geq 99,9\%$).



Εικόνα 1.2.4-12. Γραφική αναπαράσταση του αριθμητικών δεδομένων του πειράματος Oom-3 για το δείγμα T2 και τα ζεύγη εκκινητών (α) Phy 1 (barcode 14) και (β) Oom1 (barcode 20). Παρουσιάζονται ο αριθμός των αλληλουχιών ανά είδος (ραβδόγραμμα), το μήκος των αλληλουχιών ανά είδος (θηκόγραμμα, Box plot), και των κατανομών τους για τα έξι πρώτα είδη σε κάθε κατάσταση (Manhattan-violin plot)”, ανά κατηγορία ποσοστού ομολογίας (<math>< 99.9\%</math> & $\geq 99.9\%$).



Εικόνα 1.2.4-13. Γραφική αναπαράσταση του αριθμητικών δεδομένων του πειράματος Oom-3 για το δείγμα T3 και τα ζεύγη εκκινητών (α) Phy 1 (barcode 15) και (β) Oom1 (barcode 21). Παρουσιάζονται ο αριθμός των αλληλουχιών ανά είδος (ραβδόγραμμα), το μήκος των αλληλουχιών ανά είδος (θηκόγραμμα, Box plot), και των κατανομών τους για τα έξι πρώτα είδη σε κάθε κατάταξη (Manhattan-violin plot)”, ανά κατηγορία ποσοστού ομολογίας (<99,9% & ≥99,9%).



Εικόνα 1.2.4-14. Γραφική αναπαράσταση του αριθμητικών δεδομένων του πειράματος Oom-3 για το δείγμα T5 και τα ζεύγη εκκινητών (α) Phy 1 (barcode 17) και (β) Oom1 (barcode 23). Παρουσιάζονται ο αριθμός των αλληλουχιών ανά είδος (ραβδόγραμμα), το μήκος των αλληλουχιών ανά είδος (θηκόγραμμα, Box plot), και των κατανομών τους για τα έξι πρώτα είδη σε κάθε κατάσταση (Manhattan-violin plot)”, ανά κατηγορία ποσοστού ομολογίας (<99,9% & ≥99,9%).

3 ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στο πλαίσιο του παραδοτέου Π1.2.4 έγινε ανάπτυξη διαγνωστικής μεθόδου μεταγονιδιοματικής με μοριακούς κωδικούς σήμανσης (metabarcoding) για την ανίχνευση ωμοκύκτων των γενών *Phytophthora* και *Pythium* σε επίπεδο είδους, σε καλλιεργούμενα φυτά τομάτας. Η μέθοδος αναπτύχθηκε με βάση την πλατφόρμα πολλαπλής νουκλεοτιδικής αλληλούχισης DNA 3ης γενεάς ONT-MinION, με τεχνολογία αλληλούχισης μέσω νανοπόρων, χρήση προγραμμάτων ανάλυσης δεδομένων της Oxford Nanopore Technologies. Ακολούθησε δημιουργία πρωτοκόλλου in-house βιοπληροφορικής ανάλυσης με τη χρήση του αλγορίθμου blastn+ σε προσαρμοσμένη βάση δεδομένων από το NCBI. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε περιβάλλοντα Linux και Windows με γραμμές εντολών σε γλώσσα προγραμματισμού R και σε bash. Εκτός από το blast+(bash), χρησιμοποιήθηκαν τα πακέτα *dplyr*, *readr*, *stringr* και *ggplot2* (R). Η κατάταξη και επιλογή των ταυτοποιημένων αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε κατά σειρά με βάση τις παραμέτρους: bitscore, evalue, sequence length και sequence identity.

Συμπεράσματα

- Από τα 6 ζεύγη εκκινητών (Phy1-Phy3 & Oom1-Oom3) που αξιολογήθηκαν στο πλαίσιο της ανάπτυξης της μεθόδου, το Phy1 λειτούργησε εξειδικευμένα για την ανίχνευση του γένους *Phytophthora* και τα υπόλοιπα (Phy2, Phy3, Oom1-Oom3) για ανίχνευση ωμοκύκτων των γενών *Phytophthora* και *Pythium*.
- Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου με χρήση τεχνητής ομάδας ελέγχου ωμοκύκτων και μυκήτων οι εκκινητές Phy1 και Oom1 έδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με την ανίχνευση διαφορετικών ειδών και την ελαχιστοποίηση πιθανών ψευδώς θετικών καταχωρήσεων.
- Το ελάχιστο όριο του ποσοστού ομολογίας των αναγνωσμένων αλληλουχιών με αυτές της βάσης δεδομένων κρίνεται το 99% με βέλτιστο το 99,9%.
- Δεν παρατηρήθηκε αναστολή των μοριακών αντιδράσεων που αφορούν στο HTS και τη διαδικασία basecalling του minION λόγω του εκχυλίσματος ή/και της ποσότητας DNA τομάτας.
- Η συγκεκριμένη μεθοδολογία μεταγονιδιοματικής με μοριακούς κωδικούς σήμανσης για υψηλής απόδοσης αλληλούχιση DNA amplicons μέσω νανοπόρων (nanopore-metabarcoding) είναι σε θέση να προσδιορίζει ωμοκύκτες του γένους *Phytophthora* σε επίπεδο είδους με χρήση του ζεύγους εκκινητών Phy1, και ωμοκύκτες των γενών *Phytophthora* και *Pythium* σε επίπεδο είδους με χρήση του ζεύγους εκκινητών Oom1 σε δείγματα τομάτας.

Μελλοντικές δράσεις

- Έλεγχος και πιστοποίηση της μεθόδου με δείγματα διαφορετικών ξενιστών και περιβαλλοντικά (ύδατα, έδαφος) δείγματα.
- Βελτιστοποίηση και αυτοματισμός του πρωτοκόλλου βιοπληροφορικής ανάλυσης.
- Προσαρμογή διαφορετικών σταδίων της μεθόδου (εκχύλιση DNA, αντιδράσεις πολυμερισμού, κ.α.) και έλεγχος σε συνθήκες πεδίου (on-site/by-site).
- Διάχυση αποτελεσμάτων σε επιστημονικά συνέδρια και δημοσίευση τους.

4 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Βιβλιογραφικές Αναφορές

1. Theologidis, I.; Karamitros, T.; Vichou, A.-E.; Kizis, D. Nanopore-Sequencing Metabarcoding for Identification of Phytopathogenic and Endophytic Fungi in Olive (*Olea europaea*) Twigs. *J. Fungi* 2023, 9, 1119. <https://doi.org/10.3390/jof9111119>
2. Li Y, Steenwyk JL, Chang Y, Wang Y, James TY, Stajich JE, Spatafora JW, Groenewald M, Dunn CW, Hittinger CT, Shen XX, Rokas A. A genome-scale phylogeny of the kingdom Fungi. *Curr Biol.* 2021 Apr 26;31(8):1653-1665.e5. doi: 10.1016/j.cub.2021.01.074. Epub 2021 Feb 18. PMID: 33607033; PMCID: PMC8347878.
3. Drenth, A., Wagels, G., Smith, B. et al. Development of a DNA-based method for detection and identification of *Phytophthora* species. *Australasian Plant Pathology* 35, 147–159 (2006). <https://doi.org/10.1071/AP06018>
4. Labuschagne, Nico & Thompson, A. & Botha, W.. (2003). First Report of Stem and Root Rot of Tomato Caused by *Phytophthora capsici* in South Africa. *Plant Disease - PLANT DIS.* 87. 1540-1540. 10.1094/PDIS.2003.87.12.1540A.
5. Ma M, Taylor PWJ, Chen D, Vaghefi N, He JZ. Major Soilborne Pathogens of Field Processing Tomatoes and Management Strategies. *Microorganisms.* 2023 Jan 19;11(2):263. doi: 10.3390/microorganisms11020263. PMID: 36838227; PMCID: PMC9958975.