



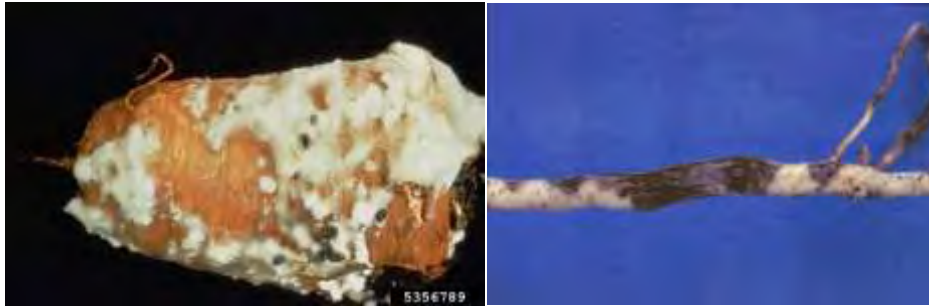
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σχολή Επιστημών Υγείας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος

**Εκτίμηση του πληθυσμού εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων σε
εδάφη από κηπευτικές καλλιέργειες με τη χρήση PCR πραγματικού
χρόνου**



Διπλωματική Εργασία του φοιτητή Παπαδημητρίου Αλέξανδρου

Λάρισα, 2015

**Εκτίμηση του πληθυσμού εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων σε
εδάφη από κηπευτικές καλλιέργειες με τη χρήση PCR πραγματικού
χρόνου**

**Evaluation of the population of soilborne plant pathogenic fungi in
horticultural crops with the use of Real Time PCR**

Τριμελής Επιτροπή

Καρπούζας Δημήτριος: Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Παπαδοπούλου Καλλιόπη: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μόσιαλος Δημήτριος: Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Περίληψη

Το αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η εκτίμηση του μεγέθους των πληθυσμών των μυκήτων *Sclerotinia Sclerotiorum* και *Pyrenochaeta lycopersici* σε δείγματα εδαφών από οπωροκηπευτικές καλλιέργειες, με τη χρήση της μεθόδου της PCR πραγματικού χρόνου. Οι μύκητες αυτοί είναι παθογόνοι για τα φυτά και προκαλούν σημαντικές ζημιές κάθε χρόνο σε καλλιεργητές.

Συγκεκριμένα, ελήφθησαν δείγματα χώματος από τη ριζόσφαιρα φυτών από διαφορετικές καλλιέργειες, έγινε απομόνωση DNA και ακολούθησε η ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλουχιών χαρακτηριστικών για τον κάθε μύκητα. Στη συνέχεια έγινε η κλωνοποίηση των τμημάτων αυτών σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς και η εισαγωγή τους σε βακτήριακά στελέχη. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε η απομόνωση των πλασμιδίων αυτών και ο υπολογισμός της ποσότητας των συγκεκριμένων κομματιών στα δείγματα με την εφαρμογή PCR πραγματικού χρόνου.

Η γνώση αυτή είναι πολύ σπουδαία, καθώς θα μπορέσει να οδηγήσει σε καλύτερη προστασία των καλλιεργειών, αποτρέποντας με αυτόν τον τρόπο τις οικονομικές ζημιές που δυνητικά θα δημιουργούνταν.

Abstract

The aim of the present study is to evaluate the size of the populations of the *Sclerotinia Sclerotiorum* and *Pyrenochaeta lycopersici* fungi in soil samples of horticultural crops, using the Real Time PCR method. These fungi are plant pathogens and are the cause a serious amount of damage every year in farmers.

Specifically, soil samples from the rhizosphere of plants from different crops, then the DNA was extracted and specific sequences, that are unique in every different fungus, were amplified. For the next step these DNA parts were cloned in proper plasmid vectors, which were later inserted in bacteria. Following that, the plasmids were extracted and the amount of these specific DNA sequences was quantified with the use of the Real Time PCR method.

This knowledge is very important, as it can lead to a better protection of the crops, averting in this way the possible economic damage that could happen.

Ευχαριστίες

Μέσω αυτού του μικρού κειμένου θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους εκείνους που με βοήθησαν και με στήριξαν για την περάτωση αυτής της διπλωματικής εργασίας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Δημήτριο Καρπούζα ο οποίος μου έδωσε τη δυνατότητα για την εκπόνηση αυτής της εργασίας, καθώς και τη βοήθεια του κατά την πραγματοποίηση και συγγραφή αυτής.

Επιπλέον, ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα Αθανασία Κατσούλα, η οποία με τη βοήθεια της, τις συμβουλές της και την υπομονή της συνέβαλε τα μέγιστα στην περαίωση αυτής της εργασίας. Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ και σε όλα τα παιδιά του εργαστηρίου για την πολύτιμη βοήθεια τους και τις στιγμές γέλιου που μου χάρισαν.

Στους γονείς μου Παπαδημητρίου Χαράλαμπο και Μπαλάση Πολυχρονία χρωστώ ένα ευχαριστώ για όλα όσα έχουν κάνει για μένα. Τις ηθικές αξίες που μου εμφύσησαν, τη δυνατότητα που μου παρείχαν για να σπουδάσω και για την εμπύχωση σε όλες τις δύσκολες στιγμές όλα αυτά τα χρόνια.

Περιεχόμενα

1.Εισαγωγή	10
1.1 Γενικά.....	10
1.2 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	11
1.3 <i>Pyrenochaeta lycopersici</i>	12
1.4 Σκοπός της παρούσας εργασίας	13
2. Μέθοδοι και Υλικά	14
2.1 Συλλογή δειγμάτων	14
2.3. Κατασκευή καμπύλης αναφοράς για την PCR πραγματικού χρόνου	16
2.3 PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση της αφθονίας των μυκήτων στο έδαφος	21
2.4 Ανάλυση Αποτελεσμάτων.....	22
3. Αποτελέσματα.....	23
3.1 Ενίσχυση αλληλουχίας με PCR.....	23
3.2 Απομόνωση ανασυνδυασμένου πλασμιδίου	25
3.3. Εκτίμηση της αφθονίας των μυκήτων με PCR πραγματικού χρόνου	26
3.3.1 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	26
3.3.2 <i>Pyrenochaeta lycopersici</i> τύπος I.....	29
3.3.3 <i>Pyrenochaeta lycopersici</i> τύπος II.....	32
4.Συζήτηση.....	36
5.Βιβλιογραφία	40
5.1 Άρθρα	40
5.2 Ιστοσελίδες	41
5.4 Εικόνες	41

1.Εισαγωγή

1.1 Γενικά

Η καλλιέργεια της γης, κατά τους προϊστορικούς χρόνους, έδωσε το έναυσμα για την ανάπτυξη οργανωμένων κοινωνιών και τη δημιουργία του ανθρώπινου πολιτισμού, όπως τον γνωρίζουμε. Από εκείνα τα χρόνια και μέχρι σήμερα σημαντικό πρόβλημα για τους γεωργούς αποτελούν οι διάφορες ασθένειες των φυτών, οι οποίες προκαλούν μεγάλες απώλειες στις σοδειές. Ένα μέρος αυτών των ασθενειών προκαλείται από διάφορους εδαφογενείς μύκητες, που προσβάλλουν τη ρίζα του φυτού. Δύο πολύ σπουδαίοι φυτοπαθογόνοι μύκητες είναι ο *Sclerotinia sclerotiorum* και ο *Pyrenochaeta lycopersici*.

Μέχρι πρόσφατα η ανίχνευση της παρουσίας των εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων στο έδαφος γίνονταν με την χρήση μεθόδων καλλιέργειας σε εκλεκτικά θρεπτικά μέσα. Η χρήση μεθόδων που βασίζονται στην καλλιέργεια των μικροοργανισμών σε εκλεκτικά θρεπτικά μέσα παρουσιάζει αρκετά προβλήματα καθώς τα θρεπτικά μέσα δεν παρουσιάζουν πλήρη εκλεκτικότητα και επιτρέπουν και την ανάπτυξη άλλων συγγενών μυκήτων που δεν είναι απαραίτητα φυτοπαθογόνοι. Παράλληλα είναι σήμερα γνωστό ότι μόνο 1-5% των μικροοργανισμών που υπάρχουν στο περιβάλλον μπορούν να καλλιεργηθούν στα σήμερα γνωστά θρεπτικά μέσα (Torvsik & Ovreas, 2002). Τα δύο αυτά βασικά προβλήματα οδήγησαν τα τελευταία χρόνια στην ανάπτυξη διαγνωστικών μοριακών μεθόδων για την ανίχνευση των εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων. Πλέον με την χρήση της PCR πραγματικού χρόνου είναι δυνατή η εκτίμηση της αφθονίας συγκεκριμένων φυτοπαθογόνων μυκήτων στο έδαφος όπως *Pythium ultimum* (Spies et al. 2011), *Rhizoctonia solani* (Lievens et al. 2005), *Verticillium dahliae* (Debode et al. 2011) και *Fusarium oxysporum* (Li et al. 2014). Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των μορίων-στόχων σε ένα δείγμα τόσο περισσότερα πολλαπλασιαζόμενα μόρια θα υπάρχουν μετά από κάθε βήμα της αντίδρασης. Κατά την αρχική φάση της αντίδρασης δεν είναι ανιχνεύσιμο το προϊόν της PCR, καθώς δεν βρίσκεται σε ικανή ποσότητα. Στην συνέχεια ακολουθεί μια εκθετική φάση κατά την οποία το προϊόν αυξάνεται σε ποσότητα. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των

μορίων στην αρχή τόσο λιγότεροι κύκλοι θα χρειαστούν για να αρχίσει η εκθετική φάση. Τέλος, μετά από σύγκριση του αριθμού των κύκλων που απαιτούνται για την έλευση της εκθετικής φάσης σε διάφορες αντιδράσεις μπορεί να γίνει προσδιορισμός της ποσότητας των μορίων που χρησιμοποιήθηκαν σαν μήτρα στις αντιδράσεις. Για τον λόγο αυτό προετοιμάζεται μια καμπύλη αναφοράς με σειρά διαδοχικών αραιώσεων πλασμιδίου που περιέχει γνωστό αριθμό αντιγράφων του γονιδίου-στόχου. Με βάση την καμπύλη αναφοράς μπορεί στην συνέχεια να εκτιμηθεί ο αριθμός αντιγράφων του γονιδίου-στόχου στα περιβαλλοντικά μας δείγματα.

1.2 *Sclerotinia sclerotiorum*

Ο *Sclerotinia sclerotiorum* είναι ένας ασκομύκητας του εδάφους που είναι υπεύθυνος για την ασθένεια “σκληροτινίαση”. Προσβάλλει ένα εύρος 400 φυτών όπως τα καρότα, ο ηλίανθος, το λάχανο και το φασόλι (Boland & Hall, 1994). Προσβάλλει κυρίως ανεπτυγμένα φυτά στην περιοχή του λαιμού, στο στέλεχος και τους καρπούς. Μπορεί να επιβιώσει για μεγάλες χρονικές περιόδους στο έδαφος με την μορφή σκληρώτιων και σε φυτικά υπολείμματα χωρίς να βλαστήσει. Κάτω από ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες οδηγείται στην καρποφορία και την παραγωγή ασκοσπορίων τα οποία προσβάλλουν υγιή φυτά. Ποιες είναι ακριβώς οι συνθήκες υπό τις οποίες γίνεται η καρποφορία αυτή δεν είναι γνωστό, καθώς φαίνεται να υπάρχει μεγάλη απόκλιση ανάμεσα σε διαφορετικούς πληθυσμούς του μύκητα. Τα ασκοσπόρια αυτά μολύνουν ιστούς όπως τα πέταλα και μέσα από την παραγωγή οξαλοξικού οξέος και ενζύμων που διασπούν τα κυτταρικά τοιχώματα του φυτού, σκοτώνοντας έτσι μια περιοχή του φυτού στην οποία ο μύκητας μπορεί να εγκατασταθεί και να αναπτυχθεί. (Hedegus et al, 2005)



Εικόνα 1: Φυτό φράουλας προσβεβλημένο από το μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum*

Η καταπολέμηση του συγκεκριμένου μύκητα γίνεται κυρίως με την χρήση γεωργικών φαρμάκων καθώς δεν υπάρχουν σήμερα γνωστές ποικιλίες φυτών ανθεκτικές στο συγκεκριμένο μύκητα (Hegedus & Rimmer, 2007).

1.3 *Pyrenochaeta lycopersici*

Ένας άλλος πολύ συχνός παράγοντας που προκαλεί ασθένειες σε φυτά είναι ο μύκητας *Pyrenochaeta lycopersici*. Είναι πολύ σημαντικός στην καλλιέργεια της ντομάτας και προκαλεί την ασθένεια που είναι γνωστή ως “Φελλώδης σηψιρριζία”/. Εισέρχεται στο φυτό από πληγές στις ρίζες και προκαλεί σήψη του φλοιού, καστανό μεταχρωματισμό καθώς και αποφέλλωση στις μεγαλύτερες σε ηλικία ρίζες. Οι ιδανικές συνθήκες για την ανάπτυξη του μύκητα είναι οι 15-20°C. Ο εντοπισμός της ασθένειας ειδικά σε πρώιμα στάδια είναι πολύ δύσκολος. Με βάση τα μοριακά και μορφογενετικά χαρακτηριστικά έχουν ταυτοποιηθεί δύο τύποι: ο τύπος I και ο τύπος II (Infantino and Pucci 2005).



Εικόνα 2: Ρίζα φυτού προσβεβλημένη από το μύκητα *Pyrenochaeta lycopersici*.

Η διάγνωση του συγκεκριμένου μύκητα είναι ιδιαίτερα δύσκολη καθώς αρκετές φορές δεν παράγει σπόρια στο τριβλίο ενώ στο έδαφος και στις ρίζες των φυτών η παρουσία του συνδυάζεται με την παρουσία αρκετών σαπροφυτικών μυκήτων κάνοντας δύσκολη την διάγνωση της ασθένειας (Hockey and Jevess, 1984). Η χρήση εκλεκτικών υποστρωμάτων καλλιέργειας του μύκητα έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές περιπτώσεις αλλά και πάλι τα αποτελέσματα δεν ήταν πάντα ικανοποιητικά (Cascone et al., 2000). Η χρήση μοριακών τεχνικών βασισμένων σε PCR πρωτο-χρησιμοποιήθηκε από τους Infantino and Pucci (2005) οι οποίοι ανέπτυξαν μια διαγνωστική μέθοδο για την ανίχνευση της *P. lycopersici* σε φυτικούς ιστούς. Παρ' όλαυτα σήμερα δεν υπάρχει διαθέσιμη μοριακή μέθοδος για την εκτίμηση του πληθυσμού του συγκεκριμένου μύκητα σε αγροτικά εδάφη. Μια τέτοια εκτίμηση θα μπορούσε να δώσει πληροφορίες στους παραγωγούς για τον κίνδυνο εκδήλωσης ασθένειας στην καλλιέργεια και την προετοιμασία ενός στοχευμένου προγράμματος φυτοπροστασίας για την έγκαιρη καταπολέμηση του φυτοπαθογόνου μύκητα.

1.4 Σκοπός της παρούσας εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο ποσοτικός προσδιορισμός των πληθυσμών των μυκήτων αυτών σε εδάφη από κηπευτικές καλλιέργειες με τη χρήση PCR πραγματικού χρόνου (*Real Time* ή *qPCR*).

2. Μέθοδοι και Υλικά

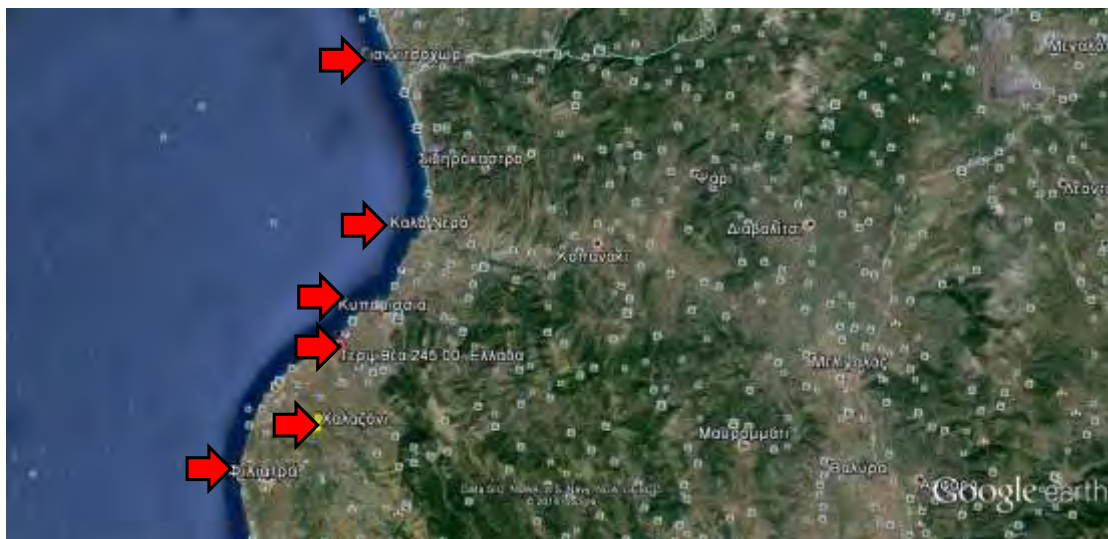
2.1 Συλλογή δειγμάτων

Τα δείγματα εδάφους που αναλύθηκαν συλλέχθηκαν την περίοδο 9 - 11/7/2014 από 24 θερμοκήπια σύμφωνα με προκαθορισμένο πρωτόκολλο δειγματοληψίας. Πιο συγκεκριμένα, από κάθε αγρό συλλέχθηκαν 8-10 υποδείγματα από όλη την έκταση του θερμοκηπίου και αναμίχθηκαν σε ένα ενιαίο δείγμα ανά θερμοκήπιο/αγρό. Τα δείγματα απεστάλησαν άμεσα στο εργαστήριο της ερευνητικής ομάδας κατάλληλα συσκευασμένα με παγοκύστες ώστε να μην επηρεαστεί σε σημαντικό βαθμό το μικροβιακό τους φορτίο. Τα δείγματα συλλέχθηκαν σε δύο ημέρες, τα πρώτα 16 το Σάββατο 12/7/2014 και τα υπόλοιπα την Τρίτη 15/7/2014. Αμέσως με την παραλαβή τους τα δείγματα καταγράφηκαν, αναμίχθηκαν ενδελεχώς με το χέρι για περαιτέρω ομογενοποίηση τους και αφού διαχωρίστηκαν σε 4 υποδείγματα (3 προς ανάλυση και ένα ως backup) που αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι να ξεκινήσει η επεξεργασία τους. Επιπρόσθετα πριν την αποθήκευση τους προσδιορίστηκε η υγρασία των εδαφών ώστε να τα αποτελέσματα να προσαρμοστούν ανά ξηρό βάρος εδάφους. Η τοποθεσία από όπου συλλέχθηκαν τα διάφορα δείγματα καθώς και εγκατεστημένη καλλιέργεια κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Στην Εικόνα 1 παρουσιάζονται στο χάρτη οι τοποθεσίες από όπου συλλέχθηκαν τα δείγματα εδάφους.

Πίνακας 1: Η τοποθεσία και η εγκατεστημένη καλλιέργεια που υπήρχε στο θερμοκήπιο κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας

Αρίθμηση Δειγμάτων ΠΘ	Περιοχή	Εγκατεστημένη Καλλιέργεια
1	Τερψιθέα	Αγγούρι
2	Φιλιατρά	Αγγούρι
3	Φιλιατρά	Αγγούρι
4	Γιαννιτσοχώρι	Αγγούρι
5	Γιαννιτσοχώρι	Αγγούρι
6	Τερψιθέα	φασόλι
7	Τερψιθέα	Πιπεριά

8	Γιαννιτσοχώρι	Τομάτα
9	Σανί Κυπαρισσίας	Αγγούρι
10	Ελαία	Τομάτα
11	Γιαννιτσοχώρι	Τομάτα/πιπεριά
12	Τερψιθέα	Τομάτα
13	Γιαννιτσοχώρι	Τομάτα
14	Γιαννιτσοχώρι	Τομάτα
15	Φιλιατρά	Αγγούρι
16	Τερψιθέα	Τομάτα
17	Τερψιθέα	Τομάτα
18	Φιλιατρά	Τομάτα
19	Φιλιατρά	Τομάτα
20	Κυπαρισσία	Αγγούρι
21	Χαλαζόνι	Τομάτα
22	Φιλιατρά	Αγγούρι
23	Φιλιατρά	Τομάτα
24	Καλό Νερό	Τομάτα



Εικόνα 3: Χάρτης όπου φαίνονται οι περιοχές της Δυτικής Πελοποννήσου όπου και συλλέχθηκαν τα δείγματα εδάφους που αναλύθηκαν στην παρούσα εργασία.

2.2. Εξαγωγή DNA από δείγματα εδάφους

Η απομόνωση DNA από τα δείγματα εδάφους πραγματοποιήθηκε με το kit PowerSoil®DNA Isolation Kit της εταιρίας Mo-Bio. Η διαδικασία έγινε με βάση τις οδηγίες του εγχειριδίου. Το DNA που συλλέχτηκε φυλάχθηκε σε θερμοκρασία -20°C.

2.3. Κατασκευή καμπύλης αναφοράς για την PCR πραγματικού χρόνου

Για την δημιουργία εξωτερικής πρότυπης καμπύλης αναφοράς που απαιτείται για την ποσοτικοποίηση του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου-στόχου στα περιβαλλοντικά δείγματα χρησιμοποιήθηκαν είτε καλλιέργειες των αντίστοιχων μυκήτων στόχων είτε σε περίπτωση που δεν υπήρχε αντίστοιχη καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου σε κάποια από τα παραπάνω εδάφη και τα προϊόντα που ενισχύθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς ύστερα από ένθεση σε πλασμιδιακό φορέα.

Έτσι στην περίπτωση του μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum* όπου υπήρχε καλλιέργεια του συγκεκριμένου μύκητα διαθέσιμη πραγματοποιήθηκε εξαγωγή DNA με την χρήση του εμπορικού κιτ Nucleospin Tissue (Macherey-Nagel) και ακολούθησε ενίσχυση του ιντρονίου της μικρής υπομονάδας του rRNA και του ORF1 με PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιώντας τους εκκινητές *mtSSF* (5'-AGGTAACAAGTCAGAAGATGATCGAAAGAGTT-3') και *mtSSRev* (5'-GCATTAAGCCTGTCCCTAAAAACAAGG-3' (Rogers *et al*,2009). Το τμήμα που ενισχύεται έχει συνολικό μέγεθος 125 bp. Για την ενίσχυση του συγκεκριμένου γονιδιακού τόπου με PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιήθηκε οι ακόλουθες θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες: ένας κύκλος των 3 λεπτών στους 95°C ακολουθούμενος από 45 κύκλους των 15 δευτερολέπτων στους 95°C, 30 δευτερολέπτων στους 53°C, 30 δευτερολέπτων στους 72°C και τέλος ένας κύκλος του ενός λεπτού στους 95°C, 30 δευτερολέπτων στους 55°C, 30 δευτερολέπτων στους 95°C.

Για τον μύκητα *P. lycopersici* δεν υπήρχε διαθέσιμη καλλιέργεια του μύκητα. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε PCR σε DNA εδάφους από τα περιβαλλοντικά δείγματα και το προϊόν που ενισχύθηκε χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή πρότυπη καμπύλης αναφοράς. Έτσι για τον τύπο I του μύκητα *Pyrenochaeta lycopersici* ενισχύθηκε η ITS περιοχή με τους εκκινητές *Plyc1-F* (5'-GTAGGATTGCGTGCTTTGGT-3') και *Plyc1-R* (AGTTTTCTGACGCTGATTGC-3') (*Infantino and Pucci 2005*). Το τμήμα που απομονώθηκε έχει μέγεθος 147 bp. Οι συνθήκες PCR που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του συγκεκριμένου γονιδιακού τόπου στα δείγματα DNA του εδάφους ήταν οι ακόλουθες: ένας κύκλος των 2 λεπτών στους 95°C ακολουθούμενος από 35 κύκλους των 30 δευτερολέπτων στους 95°C, 30 δευτερολέπτων στους 53°C, 20 δευτερολέπτων στους 72°C και τέλος έναν κύκλο των 5 λεπτών στους 72°C.

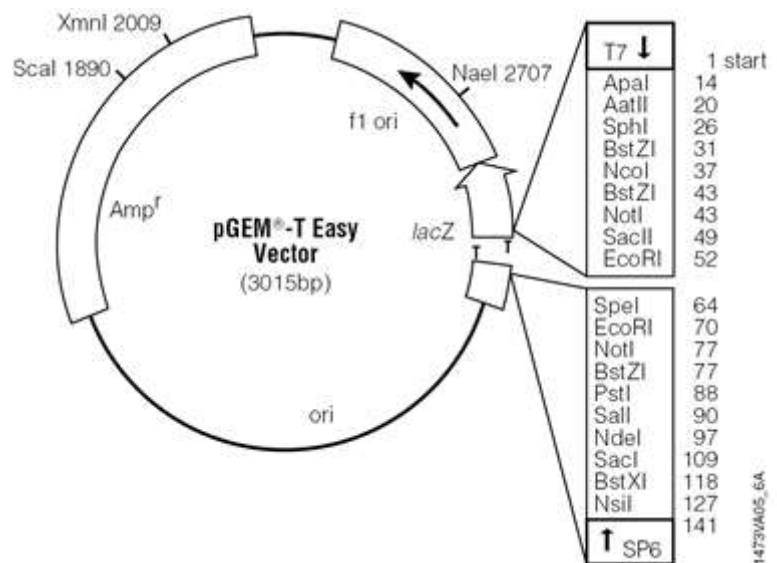
Για τον τύπο II του *Pyrenochaeta lycopersici* ενισχύθηκε και πάλι η ITS περιοχή του ριβοσωμικού DNA με την χρήση των εκκινητών *Plyc2-F* με αλληλουχία 5'-CTGCAACATTGGGGGCTGGT-3' και *Plyc2-R* με αλληλουχία 5'-CGATGCCAGAACCAAGAGAT-3' (*Infantino and Pucci 2005*). Το τμήμα που ενισχύθηκε είχε μέγεθος 209 bp. Οι PCR συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του συγκεκριμένου γονιδιακού τόπου στα δείγματα DNA εδάφους ήταν οι ακόλουθες: ένας κύκλος των 2 λεπτών στους 95°C ακολουθούμενος από 35 κύκλους των 30 δευτερολέπτων στους 95°C, 30 δευτερολέπτων στους 56°C, 20 δευτερολέπτων στους 72°C και τέλος έναν κύκλο των 2 λεπτών στους 72°C. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στις παραπάνω PCR αντιδράσεις παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου στόχου για τον μύκητα *P. lycopersici* σε DNA από δείγματα εδάφους

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Buffer 10x	5μl
dNTPs	1μl
Forward Primer	1μl
Reverse Primer	1μl
KapaTaq (5u/μl)	0,2μl

ddH ₂ Ost	40,8μl
DNA	1μl
Total	50μl

Ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτή αγαρόζης 1%, στα 100V, με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου για τη χρώση του DNA. Για την ανάλυση του μεγέθους του ενισχυμένου μορίου DNA προστέθηκε ο δείκτης μοριακών μεγεθών Quick-Load® 2-Log DNA Ladder(0,1-10kb) της εταιρίας New England Biolabs. Η συγκεκριμένη διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για να γίνει μια επιβεβαίωση πως έχει ενισχυθεί το επιθυμητό προϊόν PCR. Ακολούθησε καθαρισμός του PCR προϊόντος με τη βοήθεια του kit Nucleospin® Gel and PCR Clean-up Kit της εταιρίας Macherey-Nagel και εκ νέου ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% στα 100V. Η ένταση της ζώνης σε σχέση με τον δείκτη μοριακών μεγεθών χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της συγκέντρωσης του DNA στο προϊόν μας.



Εικόνα 4: pGEM-T Easy Vector

Το καθαρισμένο προϊόν PCR εντέθηκε σε πλασμιδιακό φορέα pGEM®- T Easy Vector της εταιρείας Promega. Ο φορέας αυτός έχει μήκος 3.000bp. Συγκεκριμένα η αντίδραση περιελάμβανε: το φορέα κλωνοποίησης, το ένθεμα και το ένζυμο λιγάση, το οποίο ενώνει τμήματα DNA μεταξύ τους, με κατάλληλο

ρυθμιστικό διάλυμα. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε κατά την διάρκεια της νύχτας στους 4°C. Τα υλικά της αντίδρασης ένθεσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3: Συστατικά της αντίδρασης ένθεσης

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
10x Buffer	1μl
pGEM-T Easy Vector (50 ng)	0,5μl
T4 ligase	1μl
Insert DNA	X
ddH ₂ Ost	Μέχρι να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος
Total	10μl

Στην αντίδραση ένθεσης η αναλογία πλασμιδίου και ενθέματος ρυθμίστηκε στο 1:3, ώστε να εξασφαλιστεί η όσο το δυνατόν μεγαλύτερη πιθανότητα ενσωμάτωσης του ενθέματος στο πλασμίδιο. Ο υπολογισμός των ng του ενθέματος έγινε σύμφωνα με τον τύπο:

$$ng\ of\ insert = \frac{ng\ of\ vector * kb\ size\ of\ insert}{kb\ size\ of\ vector} * \frac{insert}{vector} molar\ ratio$$

Το επόμενο στάδιο είναι ο μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων. Τα δεκτικά αυτά κύτταρα είναι τα DH5-A στελέχη του *E. coli*. Ο μετασχηματισμός πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο τους θερμικού σοκ, κατά την οποία τα κύτταρα μεταφέρονται από θερμοκρασία 0°C στους 42°C για ένα μικρό χρονικό διάστημα. Για το διαχωρισμό των ανασυνδυασμένων από τις μη ανασυνδυασμένες αποικίες έγινε προσθήκη X-gal (2%) και IPTG (0,1M). Το δεύτερο είναι υπεύθυνο για την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης, που βρίσκεται στο πλασμίδιο, και το X-gal προσδίδει ένα γαλάζιο χρώμα στις μη ανασυνδυασμένες αποικίες, ενώ οι ανασυνδυασμένες θα είναι λευκές εξαιτίας της παρουσίας του πλασμιδίου. Τα βακτήρια επιστρώνονται σε τρυβλία LB agar με αμπικιλίνη και γίνεται ολονύχτια επώαση στους 37°C. Αναλυτικά τα στάδια του μετασχηματισμού ήταν:

- Ξεπάγωμα των δεκτικών κυττάρων
- Σε 80μl δεκτικών κυττάρων προσθήκη 2μl πλασμιδίων και παραμονή στον πάγο για 30min
- Επώαση στους 42°C για 1 λεπτό
- Παραμονή στον πάγο για 2 λεπτά
- Προσθήκη 200μl LB
- Επώαση στους 37°C για 60 λεπτά
- Προσθήκη 50μl X-gal (2%) και 10 μl IPTG (0,1M)
- Στρώσιμο όλης της ποσότητας της αντίδρασης σε τρυβλία petri με θρεπτικό διάλυμα LB agar με αμπικιλίνη.
- Ολονύχτια επώαση στους 37°C

Οι ανασυνδυασμένες λευκές αποκίες εμβολιάζονται σε υγρή καλλιέργεια LB, η οποία αφήνεται να αναπτυχθεί. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του πλασμιδίου από το kit NucleoSpin® Plasmid της Macherey- Nagel. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1,5% στα 100V. Επιπλέον έγινε και αποθήκευση των υγρών αποικιών στους -80°C, για μελλοντική χρήση. Τα πλασμίδια που απομονώθηκαν απεστάλησαν για αλληλούχιση στην εταιρεία CEMIA ώστε να επιβεβαιωθεί η ενίσχυση του επιθυμητού προϊόντος.

Αμέσως μετά την επιβεβαίωση ενίσχυσης του επιθυμητού προϊόντος για τους δύο μύκητες – στόχους ακολούθησε ποσοτικοποίηση του πλασμιδίου για τον κάθε μύκητα στόχο με την χρήση του φθορισμομέτρου Qubit® σύμφωνα με τις οδηγίες του προμηθευτή. Ακολούθως η συγκέντρωση του πλασμιδίου (ng/μl) μετατράπηκε σε αριθμό αντιγράφων (copies) με την χρήση του παρακάτω τύπου:

$$DNAcopies = \frac{6,02 * 10^{23} * DNAamount(g)}{DNAlength(bp) * 600(\frac{g}{mol*bp})}$$

Όπου:

- DNA amount(g): η ποσότητα του DNA που προσδιορίστηκε με το Qubit
- DNA length (bp): το μέγεθος του πλασμιδιακού φορέα

Η ποσότητα των αντιγράφων του DNA που βρέθηκε ήταν εκφρασμένη σε δύναμη του 10. Με βάση αυτό δημιουργήθηκαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις του πλασμιδίου, μέχρι τη μηδενική συγκέντρωση.

2.3 PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση της αφθονίας των μυκήτων στο έδαφος

Η αντίδραση της q-PCR πραγματοποιήθηκε σε σύστημα MX 3005 P™ της Stratagene. Για την ανίχνευση των μόνων του DNA κατά την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε η χρωστική SYBRGreen, ενώ σαν χρωστική αναφοράς προστέθηκε η χρωστική Rox. Για την PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι εκκινητές όπως και παραπάνω.

Για τον *Sclerotinia* οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: : ένας κύκλος των 3 λεπτών στους 95°C ακολουθούμενος από 45 κύκλους των 15 δευτερολέπτων στους 95°C, 30 δευτερολέπτων στους 53°C, 30 δευτερολέπτων στους 72°C και τέλος ένας κύκλος του ενός λεπτού στους 95°C, 30 δευτερολέπτων στους 55°C, 30 δευτερολέπτων στους 95°C.

Για τον τύπο I του *Pyrenochaeta* οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: ένας κύκλος των 3 λεπτών στους 95°C ακολουθούμενος από 45 κύκλους των 15 δευτερολέπτων στους 95°C, 20 δευτερολέπτων στους 63°C, 1 δευτερολέπτων στους 72°C και τέλος ένας κύκλος του ενός λεπτού στους 95°C, 30 δευτερολέπτων στους 55°C, 30 δευτερολέπτων στους 95°C.

Για τον τύπο II του *Pyrenochaeta* οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: : ένας κύκλος των 3 λεπτών στους 95°C ακολουθούμενος από 45 κύκλους των 15 δευτερολέπτων στους 95°C, 20 δευτερολέπτων στους 58°C, 11 δευτερολέπτων στους 72°C και τέλος ένας κύκλος του ενός λεπτού στους 95°C, 30 δευτερολέπτων στους 55°C, 30 δευτερολέπτων στους 95°C.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στις παραπάνω αντιδράσεις παρουσιάζονται στο Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην q-PCR για τους μύκητες *P. lycopersici* τύπος I & II, και *S. sclerotiorum*

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
Mix	5μl
Forward Primer	0,1μl
Reverse Primer	0,1μl
Rox	0,2μl
BSA	0,2μl
ddH ₂ Ost	3,4μl
DNA	1μl
Total	10μl

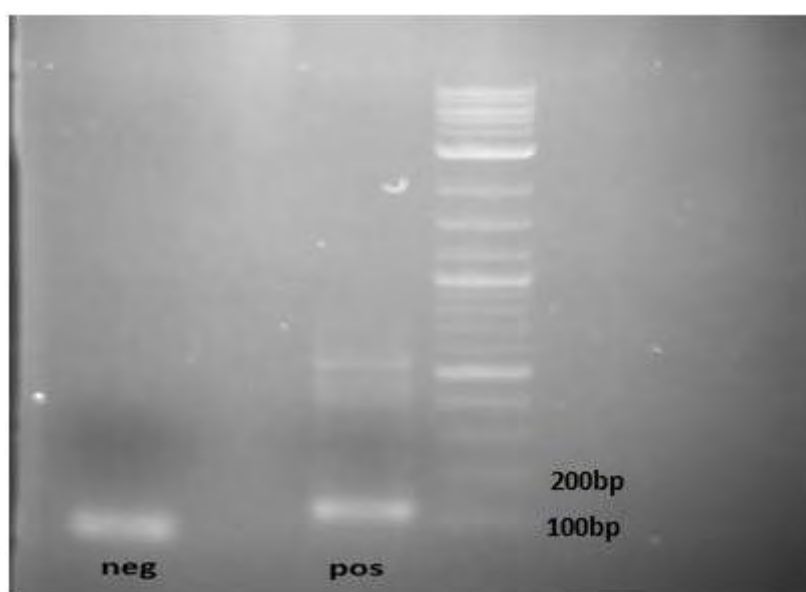
2.4 Ανάλυση Αποτελεσμάτων

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικές καμπύλες, οι οποίες δημιουργήθηκαν από το MXPro™. Η πρώτη είναι η καμπύλη ενίσχυσης (Amplification plots), η οποία αναπαριστά την συγκέντρωση του προϊόντος κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Η δεύτερη είναι η καμπύλη αποδιάταξης (Dissociation curve), η οποία δείχνει κατά την οποία παρατηρείτε η θερμοκρασία κατά την οποία υπάρχει λιώσιμο δίκλωνου DNA, και δίνει μια χαρακτηριστική κορυφή. Η Τρίτη καμπύλη είναι η πρότυπη καμπύλη (Standard curve), η οποία δημιουργείτε από τις γνωστές συγκεντρώσεις των standard διαλυμάτων και διευκολύνει στον υπολογισμό της ποσότητας DNA στα άγνωστα δείγματα. Για τους τελικούς υπολογισμούς απορρίφθηκαν οι τιμές που ήταν εκτός ορίων της καμπύλης αναφοράς ή υπήρχε ενίσχυση διαφορετικού από το επιθυμητό τμήματος DNA. Αυτό ήταν εμφανές καθώς στην καμπύλη αποδιάταξης δινόταν κορυφή σε διαφορετική θερμοκρασία από αυτή που δίνει το κομμάτι που ενισχύθηκε.

3. Αποτελέσματα

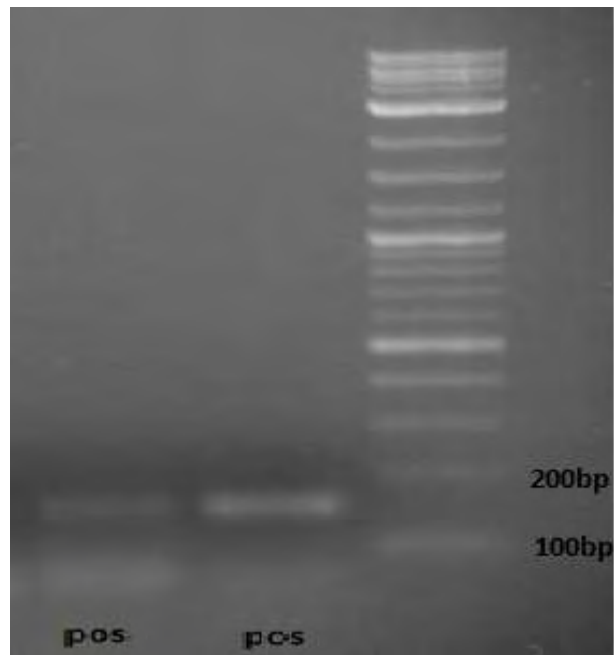
3.1 Ενίσχυση αλληλουχίας με PCR

Μετά την απομόνωση του DNA από τον μύκητα *S. sclerotiorum* και από τα δείγματα εδάφους πραγματοποιήθηκε ενίσχυση των αντιστοιχών γονιδίων-στόχων όπως έχουν ήδη περιγραφεί παραπάνω με PCR. Έτσι το τμήμα του DNA ενισχύθηκε από το ολικό DNA του μύκητα *S. sclerotiorum* ήταν μεγέθους 125 bp όπως και αναμένονταν (Εικόνα 4).

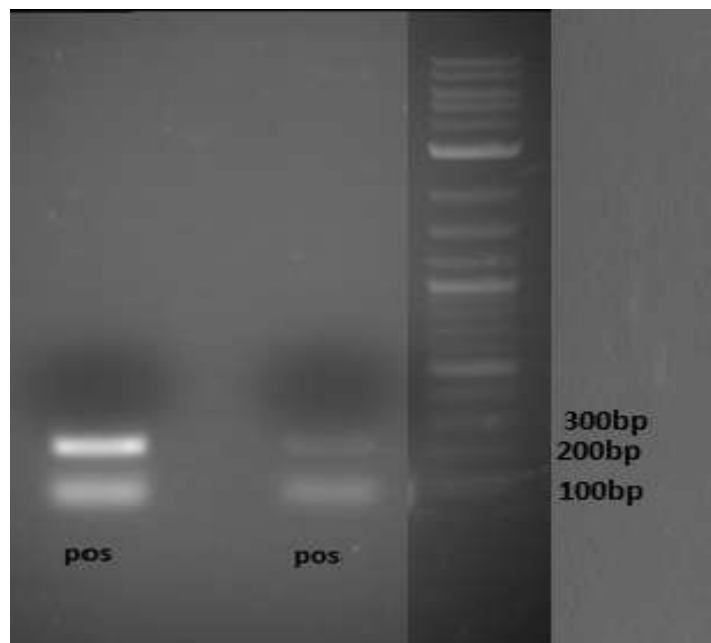


Εικόνα 5: Ηλεκτροφόρηση του PCR προϊόντος από την ενίσχυση του ιντρονίου της μικρής ριβοσωμικής υπομονόδας και του ORF1 από το ολικό DNA του μύκητα *S. sclerotiorum*. Με neg συμβολίζεται το τυφλό δείγμα και με pos το δείγμα που προέκυψε από την ενίσχυση του DNA του μύκητα.

Για την παραλαβή του κατάλληλου προϊόντος PCR για τους μύκητες *P. lycopersici* χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο DNA εδάφους. Έτσι για τους τύπου I μύκητες του είδους *P. lycopersici* ενισχύθηκε ένα προϊόν μεγέθους 147 bp (Εικόνα 5) ενώ για τους τύπου II ενισχύθηκε ένα προϊόν μεγέθους 209 bp (Εικόνα 6).



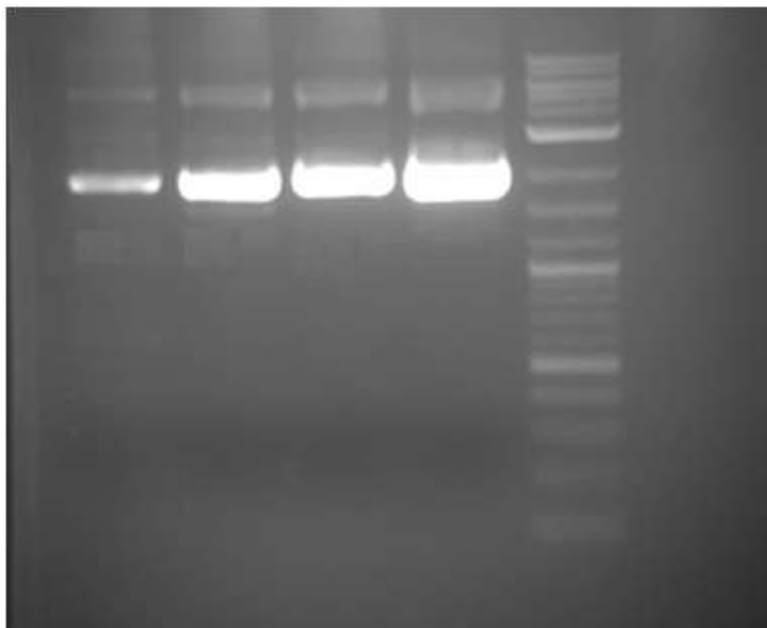
Εικόνα 6: Ηλεκτροφόρηση PCR *P. Lycopersici* τύπου I. Με pos συμβολίζονται τα δείγματα από τα οποία απομονώθηκε τμήμα που εικάζεται πως ανήκει στον επιθυμητό μύκητα. Κάτω από το κατώτερο όριο του ladder διακρίνονται διμερή εκκινητών, και διάφορα παραπροϊόντα της αντίδρασης.



Εικόνα 7: Ηλεκτροφόρηση PCR *P. Lycopersici* τύπου II. Με pos συμβολίζονται τα δείγματα από τα οποία απομονώθηκε τμήμα που εικάζεται πως ανήκει στον επιθυμητό μύκητα. Κάτω από το κατώτερο όριο του ladder διακρίνονται διμερή εκκινητών.

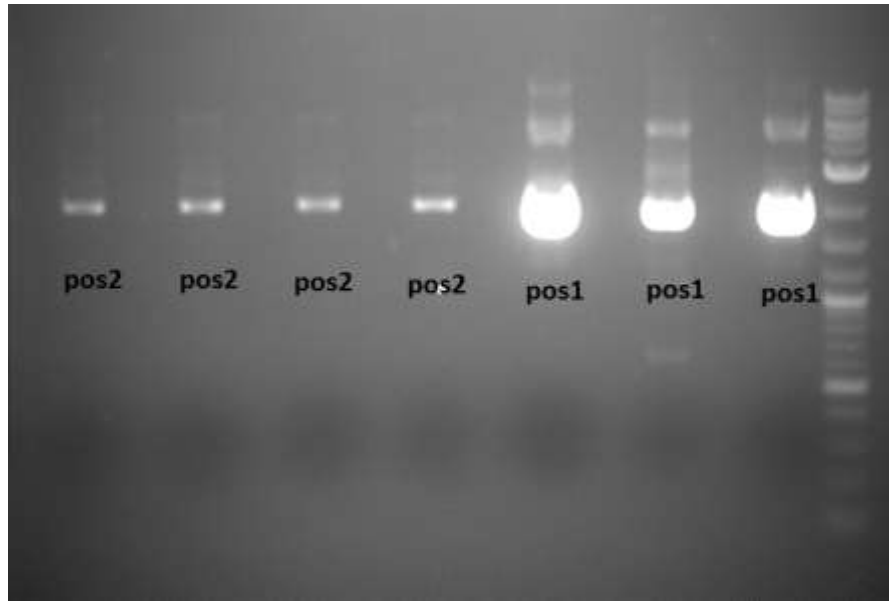
3.2 Απομόνωση ανασυνδυασμένου πλασμιδίου

Μετά την ένθεση και την ολοκλήρωση της κλωνοποίησης παραλήφθησαν ανασυνδυασμένες αποικίες για του μύκητες στόχους και ακολούθησε απομόνωση των πλασμιδίων. Ο φορέας κλωνοποίησης είχε μήκος 3000 bp, οπότε κατά την ηλεκτροφόρηση του δείγματος αναμένεται να παρουσιαστεί μια ζώνη λίγο παραπάνω από τις 3kb (Εικόνα 7).



Εικόνα 8: Ηλεκτροφόρηση ανασυνδυασμένου πλασμιδίου που φέρει ένθεμα με το γονίδιο-στόχο για τον μύκητα *S. sclerotiorum*

Αντίστοιχα ήταν τα αποτελέσματα για την παραλαβή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με το ITS ένθεμα από τους μύκητες *P. lycopersici* τύπο I και τύπο II.

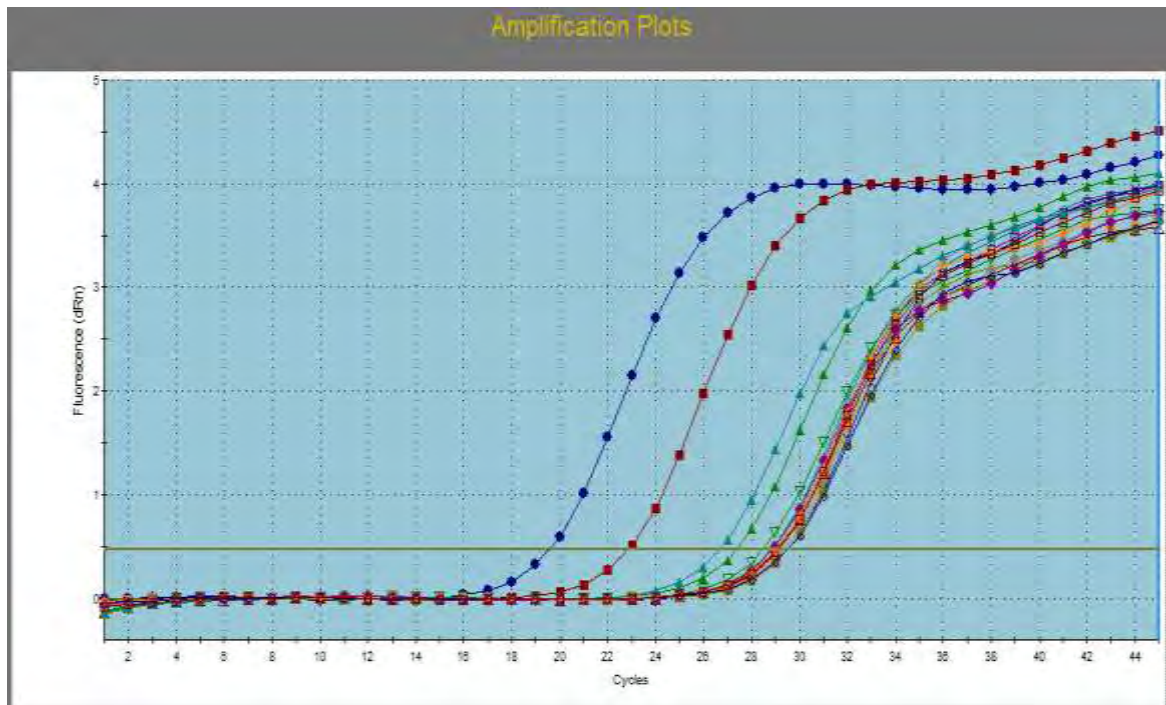


Εικόνα 9: Ηλεκτροφόρηση Plasmid prep *P. Lycopersici* τύπου 1 και τύπου 2. Με pos1 συμβολίζονται τα δείγματα του τύπου I και με pos2 τα δείγματα του τύπου II.

3.3. Εκτίμηση της αφθονίας των μυκήτων με PCR πραγματικού χρόνου

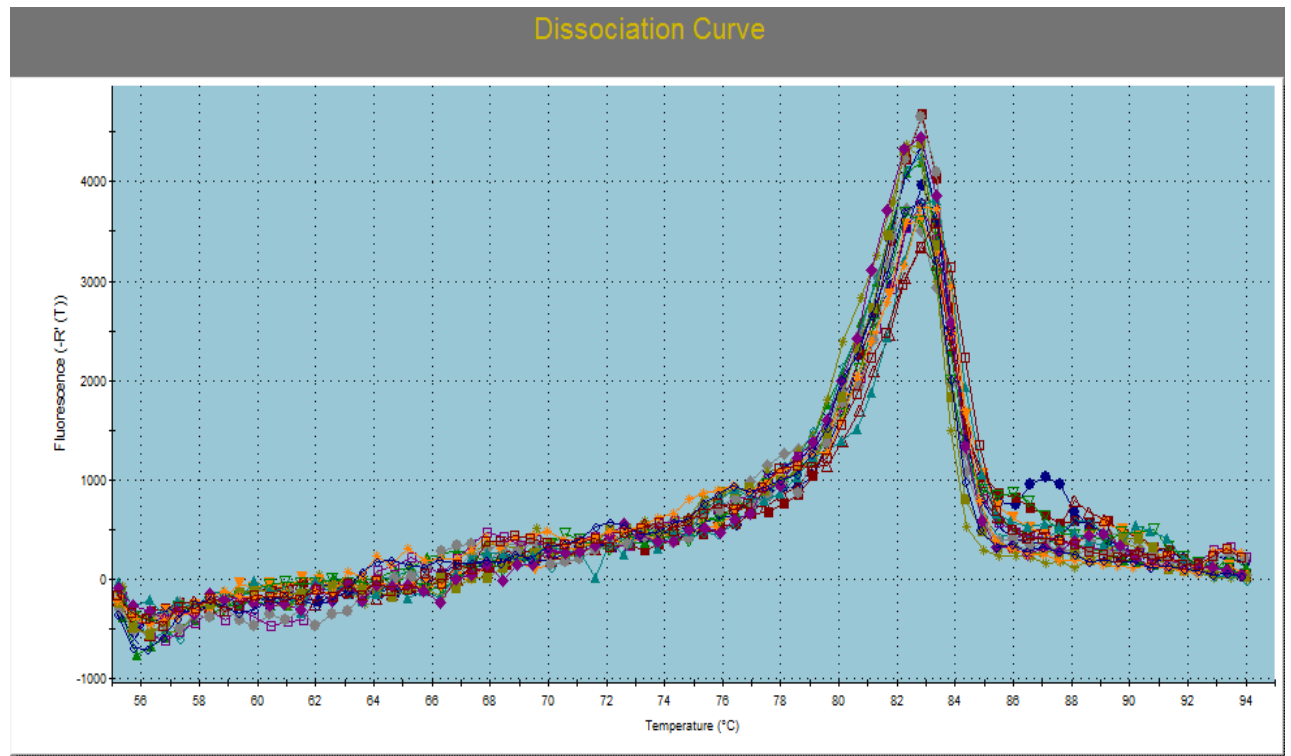
3.3.1 *Sclerotinia sclerotiorum*

Παρακάτω παρουσιάζονται οι καμπύλες ενίσχυσης (Εικόνα 9), αποδιάταξης (Εικόνα 10) και αναφοράς (Εικόνα 11) για την PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού των μυκήτων του είδους *S. sclerotiorum*.

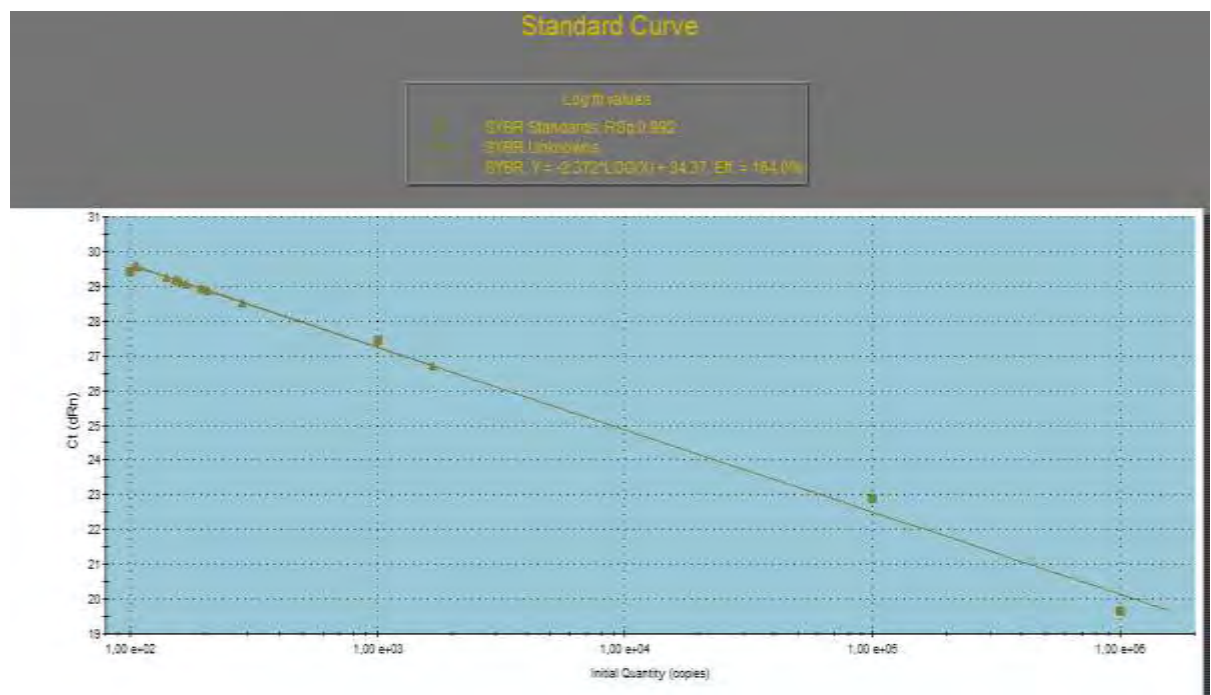


Εικόνα 10: Καμπύλη ενίσχυσης *S. sclerotiorum*

Όπως φαίνεται από την καμπύλη αποδιάταξης παρατηρήθηκε στην συντριπτική πλειοψηφία των δειγμάτων μια κορυφή στους 83°C που αντιστοιχεί στο προϊόν - στόχο (όπως βεβαιώθηκε και με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων που προέκυψαν από την PCR πραγματικού χρόνου). Επίσης η καμπύλη αναφοράς εμφάνιση ικανοποιητική γραμμικότητα ($r^2 = 0,992$) σε εύρος αντιγράφων από 10^2 ως και 10^6 αντίγραφα του γονιδίου-στόχου. Το όριο ανίχνευσης της συγκεκριμένης μεθόδου ήταν 10^4 αντίγραφα του γονιδίου-στόχου / g εδάφους (ξ.β.).



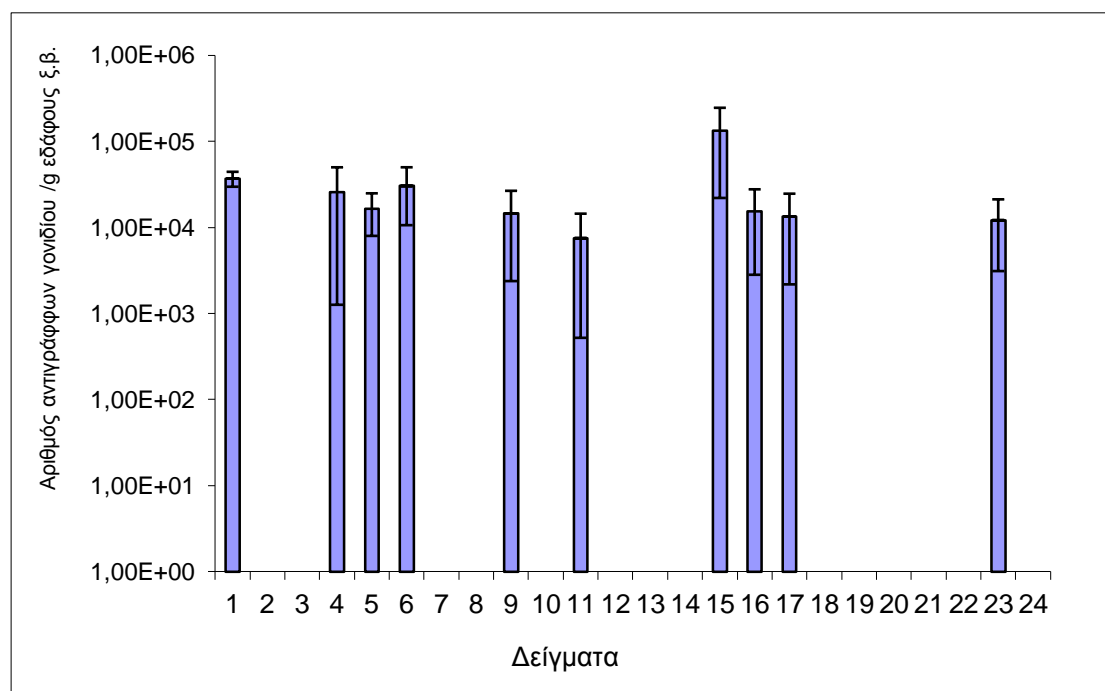
Εικόνα 11: Καμπύλη αποδιάταξης *S. Sclerotiorum*



Εικόνα 12: Πρότυπη καμπύλη *S. sclerotiorum*

Με βάση την παραπάνω καμπύλη αναφοράς εκτιμήθηκε η αφθονία του μύκητα *S. sclerotiorum* στα δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν από 24 αγρούς στην

περιοχή Κυπαρισσία της Δυτικής Πελοποννήσου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συνολικά στο Διάγραμμα 1. Γενικά στο έδαφος 10 από τα 24 θερμοκήπια που μελετήθηκαν ανιχνεύθηκε πληθυσμοί του μύκητα *S. sclerotiorum* σε επίπεδο υψηλότερα από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου. Ειδικότερα στα δείγματα από το θερμοκήπιο 11 από την περιοχή του Γιαννιτσοχωρίου καταγράφηκαν τα χαμηλότερα επίπεδα αφθονίας του μύκητα (10^4 αντίγραφα του γονιδίου-στόχου/g εδάφους) και στα δείγματα από το θερμοκήπιο 15 στην περιοχή των Φιλιατρών τα υψηλότερα επίπεδα αφθονίας του μύκητα *S. sclerotiorum* (1.3×10^5 αντίγραφα/g εδάφους).

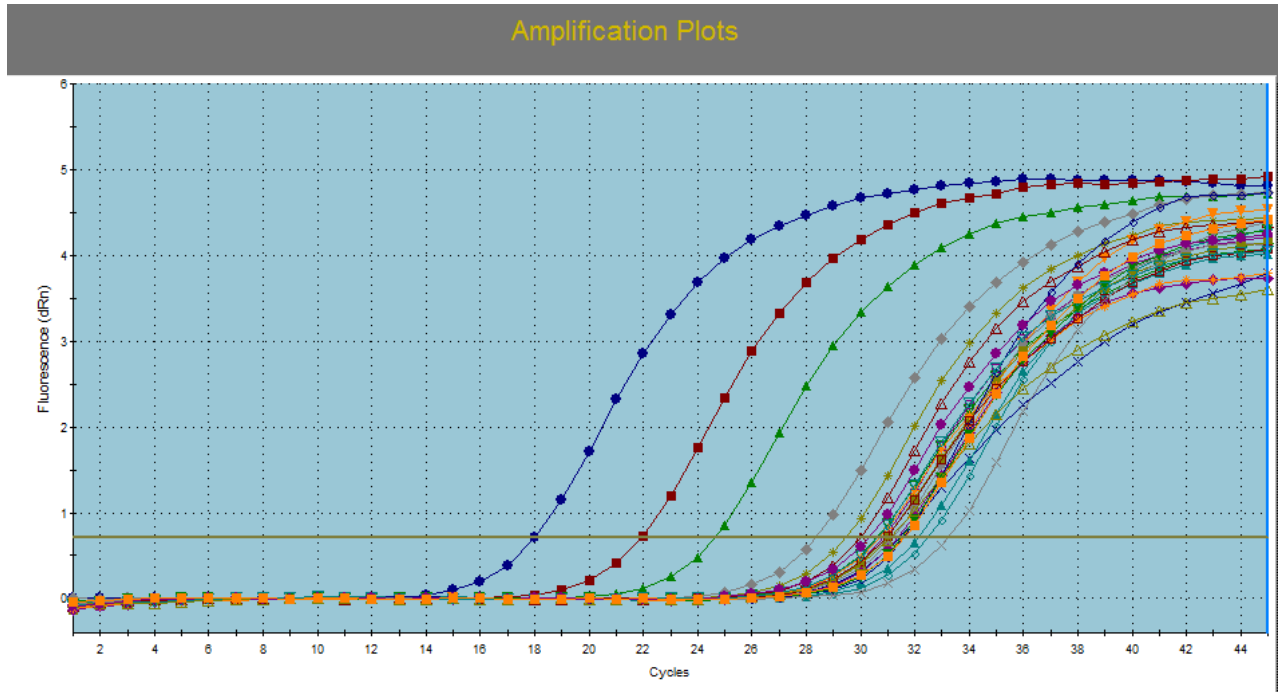


Διάγραμμα 1: Η αφθονία του μύκητα *S. sclerotiorum* στα δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν από θερμοκήπια της Δ. Πελοποννήσου όπως εκτιμήθηκε με βάση τον αριθμό αντιγράφων του γονιδίου στόχου στο έδαφος. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων + την τυπική απόκλιση.

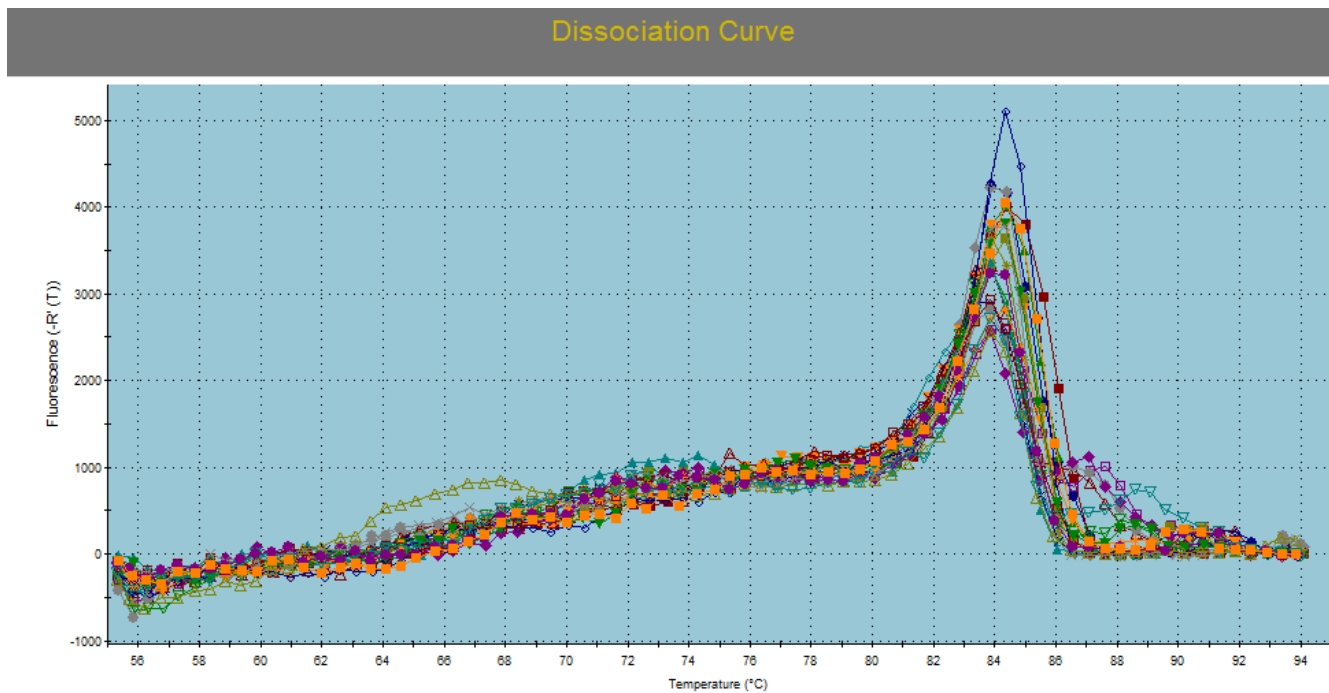
3.3.2 *Pyrenochaeta lycopersici* τύπος I

Παρακάτω παρουσιάζονται οι καμπύλες ενίσχυσης (Εικόνα 12), αποδιάταξης (Εικόνα 13) και αναφοράς (Εικόνα 14) για την PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού των μυκήτων του είδους *P. lycopersici* τύπος I. Όπως φαίνεται από την καμπύλη αποδιάταξης παρατηρήθηκε στην συντριπτική πλειοψηφία των δειγμάτων μια κορυφή στους 84C που αντιστοιχεί στο προϊόν - στόχο (όπως βεβαιώθηκε και με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων που προέκυψαν από την PCR

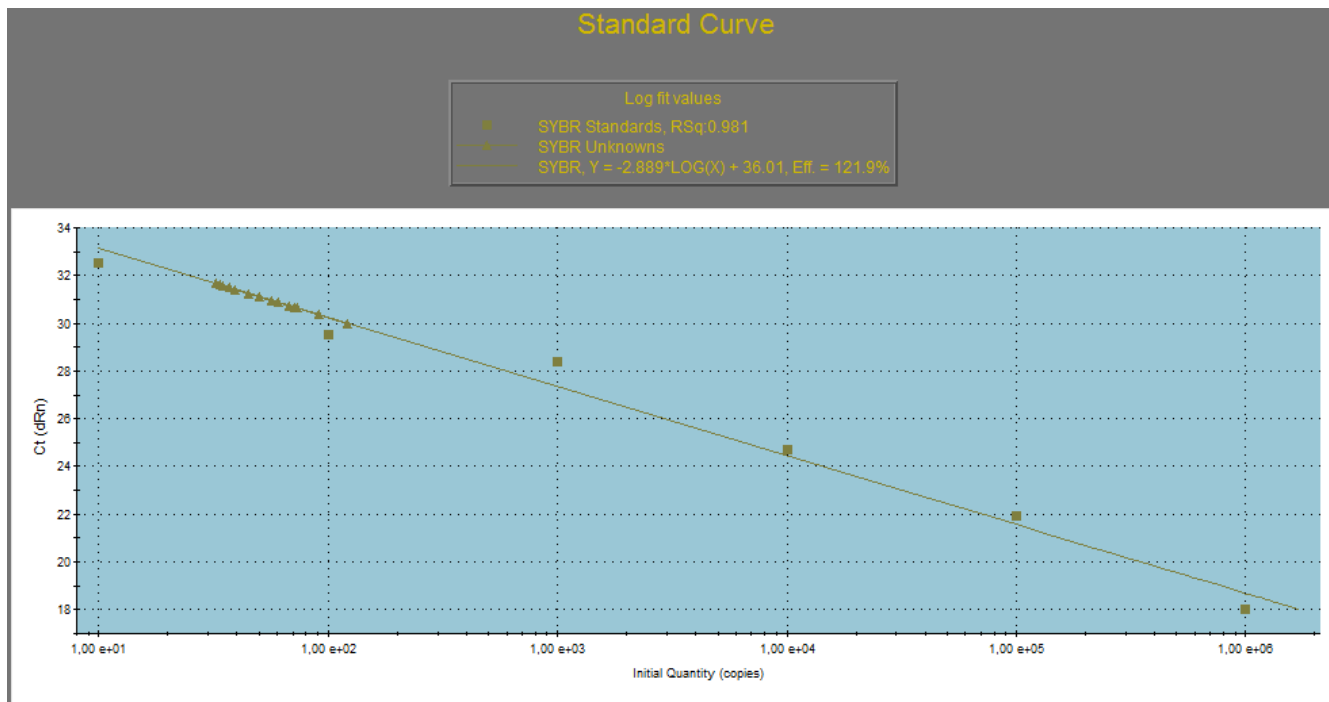
πραγματικού χρόνου). Επίσης η καμπύλη αναφοράς εμφάνιση ικανοποιητική γραμμικότητα ($r^2 = 0,982$) σε εύρος αντιγράφων από 10^1 ως και 10^6 αντίγραφα του γονιδίου ITS. Το όριο ανίχνευσης της συγκεκριμένης μεθόδου ήταν 10^3 αντίγραφα του γονιδίου ITS / g εδάφους (ξ.β.).



Εικόνα 13: Καμπύλη ενίσχυσης για τον μύκητα *P. lycopersici* τύπος I

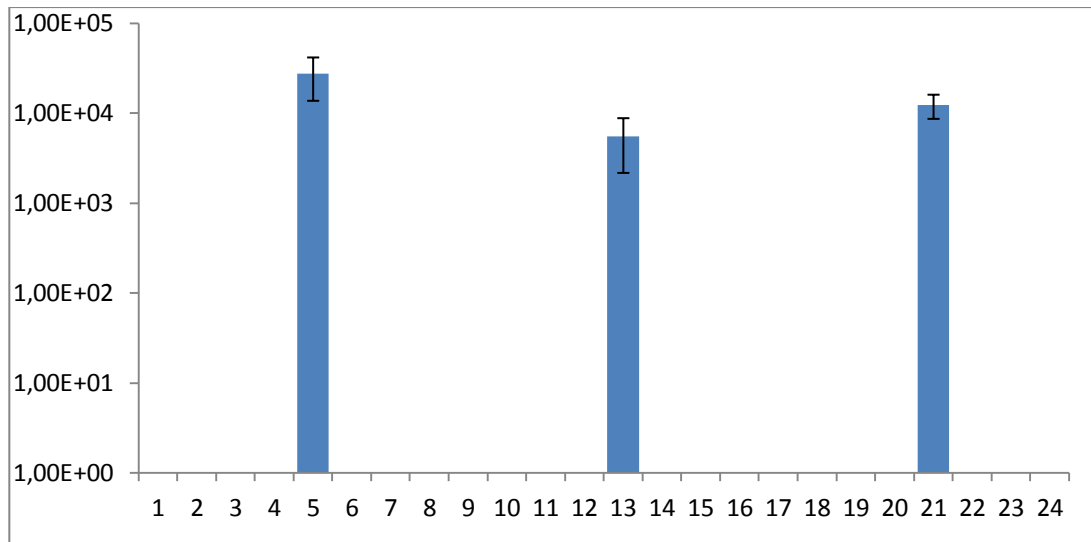


Εικόνα 14: Καμπύλη αποδιάταξης για τον μύκητα *P. lycopersici* τύπος I



Εικόνα 15: Πρότυπη καμπύλη για τον μύκητα *P. lycopersici* τύπος I

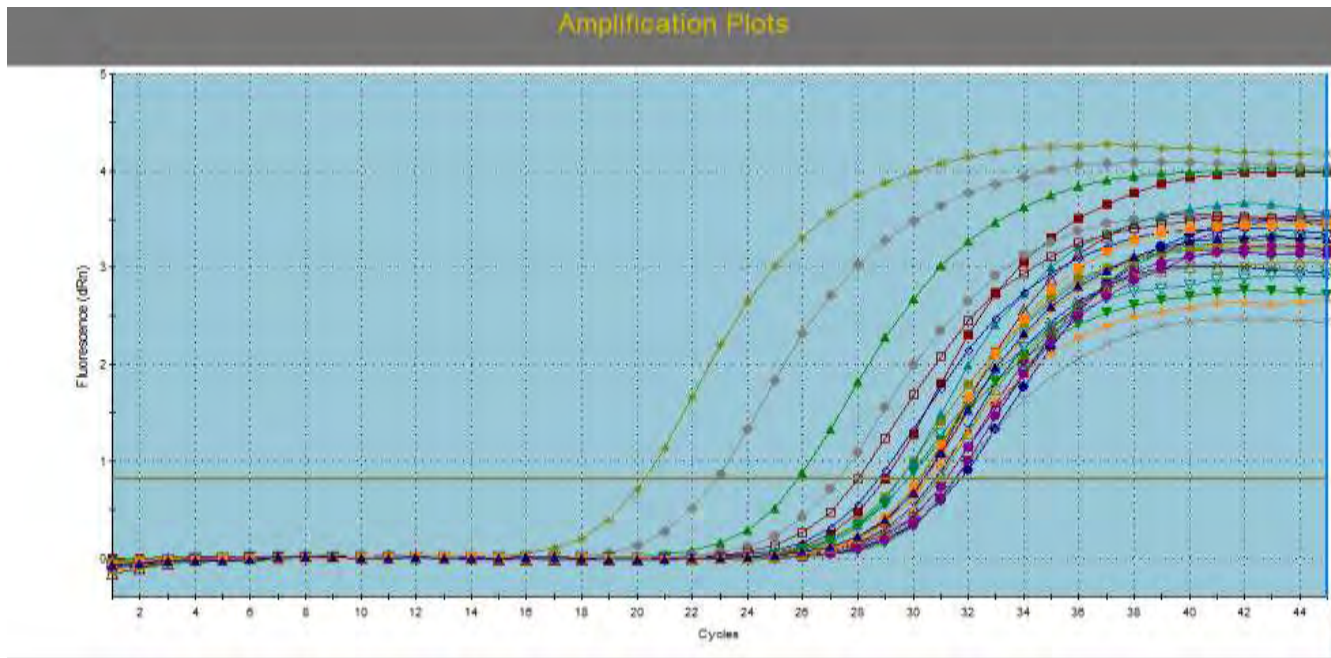
Με βάση την παραπάνω καμπύλη αναφοράς εκτιμήθηκε η αφθονία του μύκητα *P. lycopersici* τύπος I στα δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν από 24 αγρούς στην περιοχή Κυπαρισσία της Δυτικής Πελοποννήσου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συνολικά στο Διάγραμμα 2. Μόνο σε 3 από τα 24 θερμοκήπια που αξιολογήθηκαν ανιχνεύθηκε σε επίπεδο υψηλότερο από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου πληθυσμός του μύκητα *P. lycopersici* τύπου I. Οι υψηλότερες τιμές καταγράφηκαν σε δείγματα εδάφους από το θερμοκήπιο 5 της περιοχής Γιαννιτσοχωρίου με τιμές 2.8×10^4 αντίγραφα του γονιδίου ITS/g εδάφους και οι χαμηλότερες τιμές στο θερμοκήπιο 13 και πάλι από την περιοχή Γιαννιτσοχωρίου με τιμές 5.5×10^3 αντίγραφα του ITS/g εδάφους.



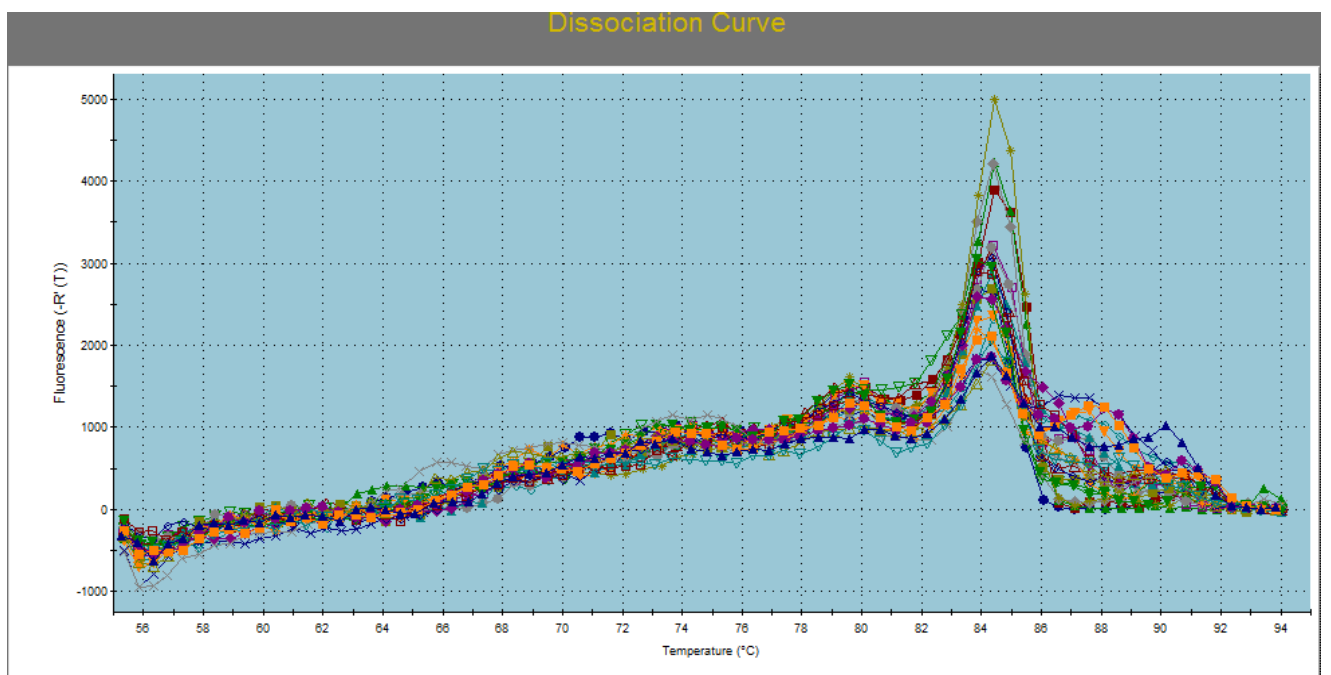
Διάγραμμα 2. Η αφθονία του μύκητα *P. lycopersici* τύπος I στα δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν από θερμοκήπια της Δ. Πελοποννήσου όπως εκτιμήθηκε με βάση τον αριθμό αντιγράφων του γονιδίου στόχου στο έδαφος. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων + την τυπική απόκλιση

3.3.3 *Pyrenochaeta lycopersici* τύπος II

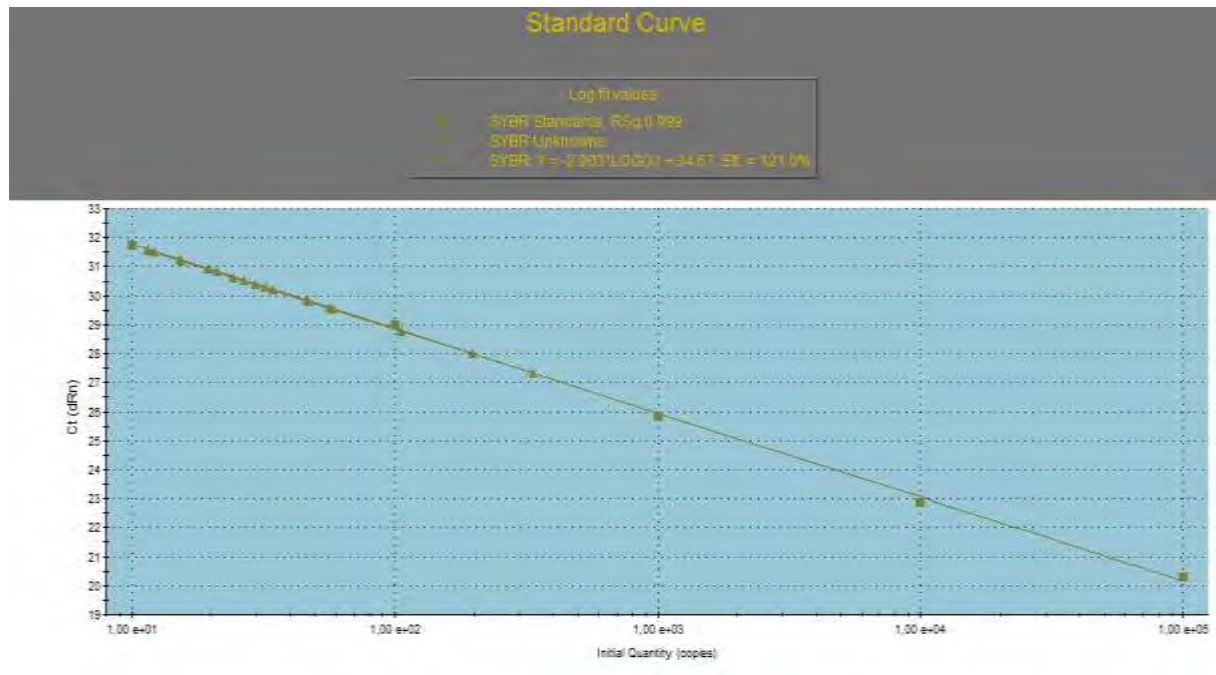
Παρακάτω παρουσιάζονται οι καμπύλες ενίσχυσης (Εικόνα 15), αποδιάταξης (Εικόνα 16) και αναφοράς (Εικόνα 17) για την PCR πραγματικού χρόνου για την εκτίμηση του πληθυσμού των μυκήτων του είδους *P. lycopersici* τύπος II. Όπως φαίνεται από την καμπύλη αποδιάταξης παρατηρήθηκε στην συντριπτική πλειοψηφία των δειγμάτων μια κορυφή στους 84°C που αντιστοιχεί στο προϊόν - στόχο (όπως βεβαιώθηκε και με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων που προέκυψαν από την PCR πραγματικού χρόνου). Επίσης η καμπύλη αναφοράς εμφάνιση ικανοποιητική γραμμικότητα ($r^2 = 0,999$) σε εύρος αντιγράφων από 10^1 ως και 10^6 αντίγραφα του γονιδίου ITS. Το όριο ανίχνευσης της συγκεκριμένης μεθόδου ήταν 10^3 αντίγραφα του γονιδίου ITS / g εδάφους (ξ.β.).



Εικόνα 16: Καμπύλη ενίσχυσης για τον μύκητα *P. lycopersici* τύπος II

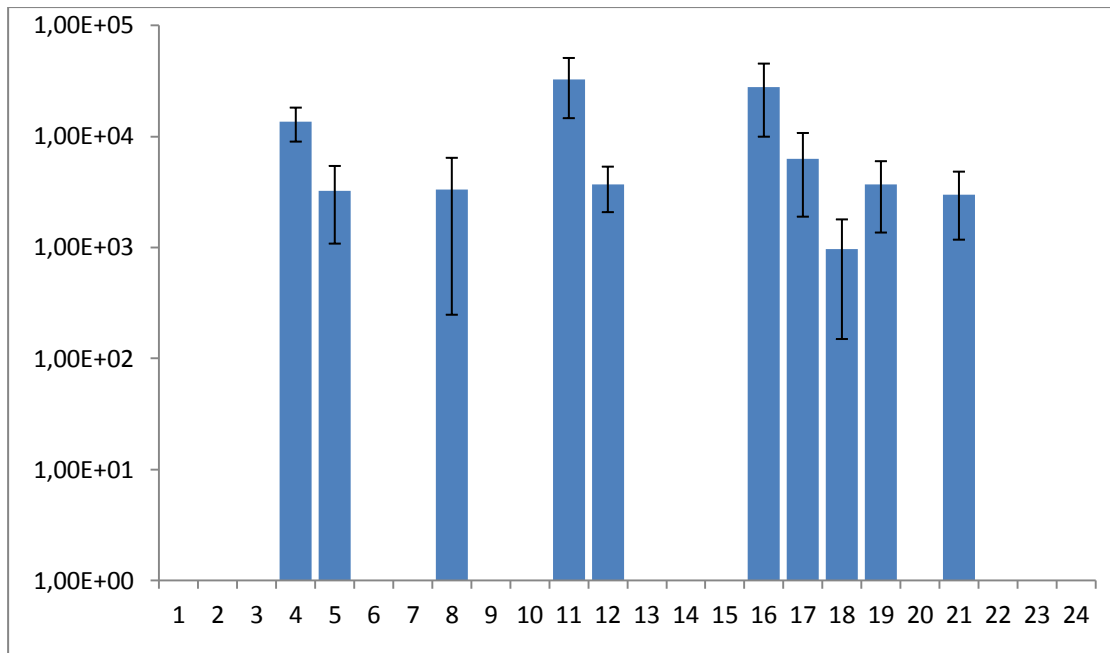


Εικόνα 17: Καμπύλη αποδιάταξης για τον μύκητα *P. lycopersici* τύπος II



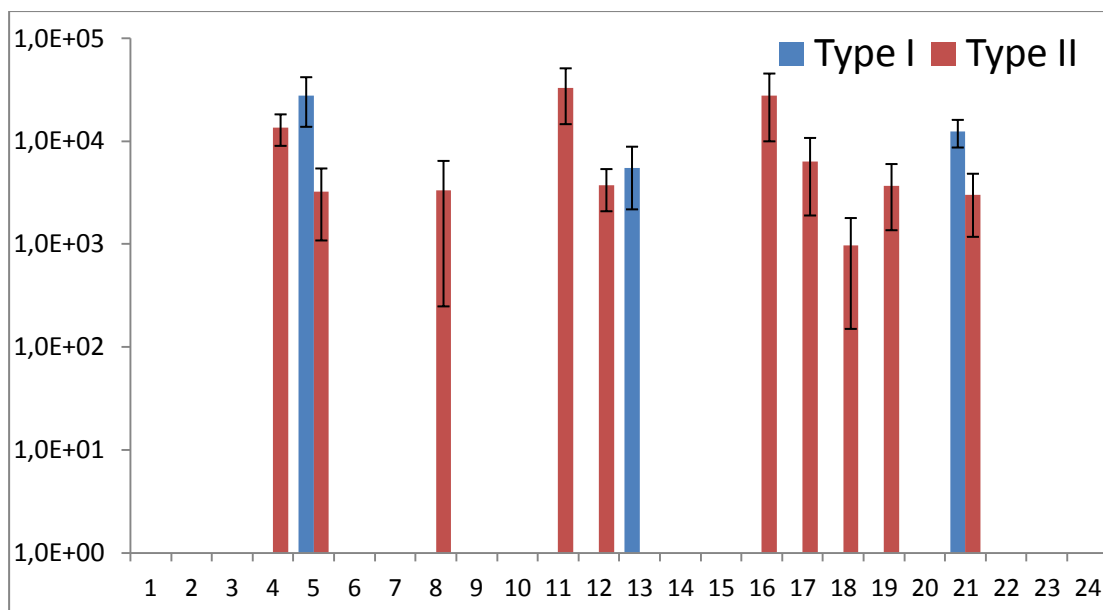
Εικόνα 18: Πρότυπη καμπύλη για τον μύκητα *P. lycopersici* τύπος II

Με βάση την παραπάνω καμπύλη αναφοράς εκτιμήθηκε η αφθονία του μύκητα *P. lycopersici* τύπος II στα δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν από 24 αγρούς στην περιοχή Κυπαρισσία της Δυτικής Πελοποννήσου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συνολικά στο Διάγραμμα 3. Σε 10 από τα 24 θερμοκήπια που αξιολογήθηκαν ανιχνεύθηκε σε επίπεδο υψηλότερο από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου πληθυσμός του μύκητα *P. lycopersici* τύπου II. Οι τιμές του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου ITS για τον συγκεκριμένο μύκητα κυμάνθηκαν από 10^3 αντίγραφα/g εδάφους στο Δείγμα 18 ως και 3.2×10^4 αντίγραφα/g εδάφους στο Δείγμα 11 από την περιοχή του Γιαννιτσοχωρίου.



Διάγραμμα 3: Η αφθονία του μύκητα *P. lycopersici* τύπος II στα δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν από θερμοκήπια της Δ. Πελοποννήσου όπως εκτιμήθηκε με βάση τον αριθμό αντιγράφων του γονιδίου στόχου στο έδαφος. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση

Θα πρέπει να τονιστεί ότι στα δείγματα 5 και 21 ανιχνεύθηκαν και οι δύο τύποι του μύκητα *P. lycopersici* σε επίπεδα άνω του όριου ανίχνευσης των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν (Διάγραμμα 4). Τα δύο αυτά δείγματα συλλέχθηκαν από θερμοκήπια της περιοχής Γιαντισοχωρίου και Χαλαζονίου αντίστοιχα. Με εξαίρεση τα δείγματα που συλλέχθηκαν από τα θερμοκήπια 4 και 5 που η πιο πρόσφατη καλλιέργεια ήταν αγγούρι, σε όλα τα υπόλοιπα θερμοκήπια που ανιχνεύθηκε υψηλή αφθονία του μύκητα *P. lycopersici* η κύρια καλλιέργεια ήταν τομάτα που αποτελεί και τον κύριο ξενιστή του συγκεκριμένου μύκητα.



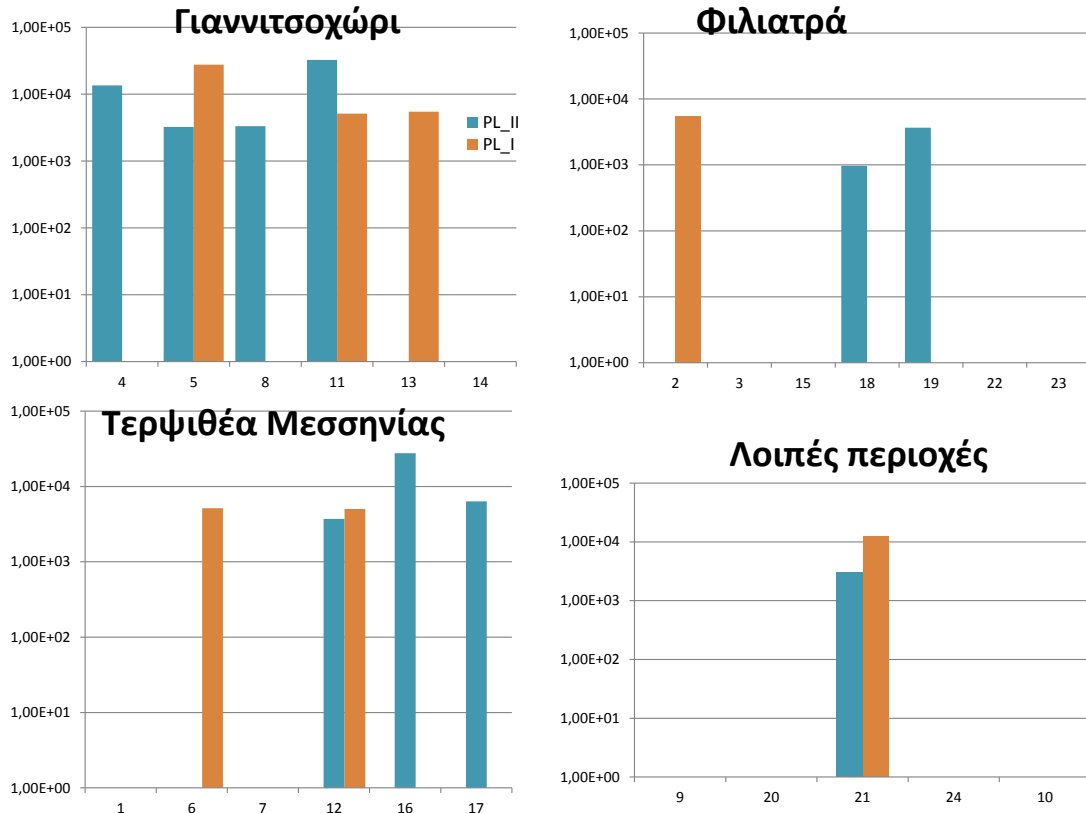
Διάγραμμα 4: Η αφθονία του μύκητα *P. lycopersici* τύπος I και II στα δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν από θερμοκήπια της Δ. Πελοποννήσου όπως εκτιμήθηκε με βάση τον αριθμό αντιγράφων του γονιδίου στόχου στο έδαφος. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση

4.Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία έγινε εκτίμηση του πληθυσμού των εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων *S. sclerotiorum* και *P. lycopersici* σε δείγματα εδάφους από 24 θερμοκήπια της Δ. Πελοποννήσου που αποτελεί και μια από τις πιο δυναμικές περιοχές καλλιέργειας κηπευτικών υπό κάλυψη. Για την εκτίμηση της αφθονίας των δύο συγκεκριμένων μυκήτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της PCR πραγματικού χρόνου με την χρήση εκκινήτων που στόχευαν σε συντηρημένες περιοχές του γονιδιώματος των δύο αυτών μυκήτων. Θα πρέπει να τονιστεί ότι οι μέθοδοι που αναπτύχθηκαν στηρίχθηκαν σε ήδη υπάρχοντα πρωτόκολλα τα οποία όμως είχαν αναπτυχθεί είτε για την εκτίμηση της αφθονίας του *S. sclerotiorum* σε δείγματα αέρα (Rogers et al. 2009) είτε για την PCR ανίχνευση των *P. lycopersici* σε φυτικούς ιστούς (Infantino and Pucci 2005). Έτσι στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται δεδομένα που αποδεικνύουν ότι με κατάλληλες προσαρμογές τα συγκεκριμένα πρωτόκολλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την εκτίμηση της αφθονίας των δύο συγκεκριμένων φυτοπαθογόνων μυκήτων σε δείγματα εδάφους.

Συνολικά οι μετρήσεις μας έδειξαν την παρουσία και των δύο μυκήτων στο έδαφος περίπου των μισών από τα θερμοκήπια που αξιολογήθηκαν. Γενικότερα ο μύκητας *Sclerotinia sclerotiorum* ανιχνεύθηκε σε θερμοκήπια με ποικιλία κηπευτικών καλλιεργειών όπως τομάτα, αγγούρι, φασόλι και πιπεριά κάτι που είναι σύμφωνο με το ευρύ φάσμα ξενιστών που παρουσιάζει ο συγκεκριμένος μύκητας (Bolton et al, 2006). Αντίθετα ο μύκητας *P. lycopersici* ανιχνεύθηκε κυρίως σε εδάφη θερμοκηπίων που καλλιεργούνταν με τομάτα που αποτελεί τον βασικό ξενιστή του συγκεκριμένου παθογόνου μύκητα (Pohronezny and Volin, 1991). Στα εδάφη που εξετάστηκαν κυριάρχησε ο τύπος II του μύκητα *P. lycopersici* κάτι που συνάδει απόλυτα με τα ευρήματα των Infantino and Pucci (2005) που βρήκαν κυρίως τον τύπο II σε δείγματα από προσβεβλημένους ιστούς φυτών τομάτας. Οι δύο τύποι του μύκητα *P. lycopersici* παρουσιάζουν φυσιολογικές και μοριακές διαφορές χωρίς όμως μέχρι σήμερα να είναι εξακριβωμένο εάν εμφανίζουν και διαφορές στην μολυσματικότητα τους ή στο εύρος ξενιστών που προσβάλλουν (Sugiura et al 2003).

Περαιτέρω μελετήθηκε η συσχέτιση μεταξύ της γεωγραφικής κατανομής των δειγμάτων – θερμοκηπίων που αξιολογήθηκαν και της αφθονίας των μυκήτων. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 5 οι υψηλότεροι πληθυσμοί του μύκητα *P. lycopersici* καταγράφηκαν στην περιοχή του Γιαννιτσοχωρίου ακολουθούμενοι από την Τερψιθέα και την περιοχή των Φιλιατρών. Ανάλογη εικόνα παρουσίασε και η γεωγραφική κατανομή του έτερου μύκητα που μελετήθηκε καταδεικνύοντας του υψηλούς πληθυσμούς και των δύο μυκήτων στην περιοχή του Γιαννιτσοχωρίου. Αυτό το αποτέλεσμα δεν αποτελεί έκπληξη δεδομένης των γενικότερων πλημμελών φυτοπροστατευτικών πρακτικών που ακολουθούνται στην συγκεκριμένη περιοχή σύμφωνα με τους υπεύθυνους της Διεύθυνσης Αγροτικής Παραγωγής της Ηλείας σε σχέση με τις υπόλοιπες περιοχές που μελετήθηκαν.



Διάγραμμα 5. Η αφθονία του μύκητα *P. lycopersici* τύπος I και τύπος II στις τρεις βασικές περιοχές από τις οποίες λήφθηκαν δείγματα δηλαδή Γιαννιτσοχώρι, Φιλιατρά και Τερψιθέα, ενώ στο τελευταίο διάγραμμα παρουσιάζεται η αφθονία των μυκήτων στα υπόλοιπα δείγματα που δεν ανήκουν στις παραπάνω τρεις κύριες περιοχές.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι οι μεθοδολογίες που αναπτύχθηκαν παρέχουν μια εκτίμηση του πληθυσμού των συγκεκριμένων μυκήτων η οποία δεν μπορεί από μόνη της να συνεπάγεται και εκδήλωση της ασθένειας στον αγρό. Για να γίνει αυτό θα πρέπει η παρούσα μελέτη να επεκταθεί σε μεγάλο αριθμό θερμοκηπίων όπου η μέτρηση της αφθονίας των συγκεκριμένων μυκήτων θα συνοδεύεται από αντίστοιχη παρακολούθηση της εμφάνισης της ασθένειας στην καλλιέργεια που θα εγκατασταθεί στον κάθε θερμοκήπιο. Έτσι θα αποκτήσουμε την δυνατότητα να συσχετίσουμε τα επίπεδα των μυκήτων που ανιχνεύουμε στο έδαφος με PCR πραγματικού χρόνου με τον κίνδυνο εκδήλωσης της ασθένειας στον αγρό θέτοντας όρια επικινδυνότητας για την αφθονία των μυκήτων στο έδαφος. Όταν από τις μετρήσεις μας προκύπτουν τιμές υψηλότερες από τα συγκεκριμένα όρια επικινδυνότητας τότε θα ενημερώνεται ο παραγωγός ότι υπάρχει σοβαρός κίνδυνος προσβολής της καλλιέργειας από τον

συγκεκριμένο μύκητα. Έτσι η συγκεκριμένη μελέτη αποτελεί βάση για την δημιουργία ενός διαγνωστικού τεστ εκτίμησης της αφθονίας των κυριότερων εδαφογενών φυτοπαθογόνων μυκήτων σε αγροτικά εδάφη ώστε να γνωρίζουν οι παραγωγοί ποια εδαφογενή παθογόνα είναι πιθανό να δημιουργούν προβλήματα στην καλλιέργεια τους ώστε στοχευμένα στην συνέχεια να καταπολεμήσουν τα συγκεκριμένα φυτοπαθογόνα εδάφους μειώνοντας έτσι τις εισροές διαφόρων γεωργικών φαρμάκων.

5.Βιβλιογραφία

5.1 Άρθρα

- Detection and quantification of airborne inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum* using quantitative PCR S. L. Rogers, S. D. Atkins and J. S. West (2009), Rothamsted Research, Harpenden, AL5 2JQ, UK
- A PCR-based assay for the detection and identification of *Pyrenochaeta lycopersici* Alessandro Infantino and Nicoletta Pucci (2005), Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale (I.S.Pa.Ve.), Via C.G. Bertero 22, 00156, Rome, Italy
- *Sclerotinia sclerotiorum*: When “to be or not to be” a pathogen? Dwayne D. Hegedus *, S. Roger Rimmer (2005) Agriculture and Agri-Food Canada, Molecular Genetics Section, 107 Science Place, Saskatoon, Saskatchewan, Canada S7N 0X2
- *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen Melvin D. Bolton , Bart P. H. J. Thomma and Berlin V. Nelson (2006) Laboratory of Phytopathology, Wageningen University, Binnenhaven 5, 6709 PD Wageningen, The Netherlands Department of Plant Pathology, North Dakota State University, 306 Walster Hall, Fargo, ND 58105-5012, US
- Biocontrol Traits and Antagonistic Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* Strain NJZJSB3 Against *Sclerotinia sclerotiorum*, a Causal Agent of Canola Stem Rot (2014) Yuncheng Wu, Jun Yuan, Waseem Raza, Qirong Shen and Qiwei Huang National Engineering Research Center for Organic-based Fertilizers, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, P. R. China Jiangsu Collaborative Innovation Center for Solid Organic Waste Utilization, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, P. R. China Key Laboratory of Plant Nutrition and Fertilization in Low-Middle Reaches of the Yangtze River, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, P. R. China
- A Model for *Sclerotinia sclerotiorum* Infection and Disease Development in Lettuce, Based on the Effects of Temperature, Relative Humidity and Ascospore Density John P. Clarkson, Laura Fawcett, Steven G. Anthony, Caroline Young (2014) Warwick Crop Centre, School of Life Sciences, University of Warwick, Wellesbourne, Warwick, United Kingdom, ADAS UK Ltd, Pendeford House, Pendeford, Wolverhampton, United Kingdom, ADAS UK Ltd, ADAS Drayton, Defra Drayton, Stratford upon Avon, United Kingdom
- Host Range and Survival in Soil of *Pyrenochaeta lycopersici* G.G. Grove and R.N. Campel (1987) University of California
- The relationship between brown and corky root rot caused by *Pyrenochaeta lycopersici* and yield loss in tomatoes established by the use of artificially infested soils R. W.POLLEY

- (1985) Agricultural Development and Advisory Service, Harpenden Laboratory, Hatchin[^] Green, Harpenden. HcttsAL5 2BD, UK
- The Corky Root Rot Pathogen *Pyrenochaeta lycopersici* Secretes a Proteinaceous Inducer of Cell Death Affecting Host Plants Differentially Pierre-Henri Clergeot, Herwig Schuler, Ejvind Mørtz, Maja Brus, Simina Vintila, and Sophia Ekengren (2012) First, fourth, fifth, and sixth authors: Växtnfysiologi, Botaniska Institutionen, Stockholms Universitet, Stockholm; second author: Karolinska Institutet, Stockholm; and third author: Alphalyse A/S, Odense, Denmark
 - Biological Control of Corky Root in Tomato G. Fiume and F. Fiume (2008) Centro di Ricerca per l'Orticoltura (CRA - Roma) via Cavallegeri 25, IT-84098 Pontecagnano (Salerno), Italy
 - Torsvik V & Ovreas L (2002) Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol* **5**: 240-245
 - Boland GJ, Hall R, 1994. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **16**, 93–108
 - Hegedus DD, Rimmer SR, 2007. *Sclerotinia sclerotiorum*: when 'to be or not to be' a pathogen? *FEMS Microbiology Letters* **251**, 177–84.
 - Hockey AG and Jeves TM (1984) Isolation and identification of *Pyrenochaeta lycopersici*, causal agent of tomato brown root rot. *Transactions of the British Mycological Society* **82**: 151–152.
 - Cascone G, D'Emilio A, Polizzi G and Grillo R (2000) Effectiveness of greenhouse soil solarization with different plastic mulches in controlling corky root and root-knot on tomato plants. *Acta Horticulturae* **532**: 145–150
 - Pohronezny KL and Volin RB (1991). Corky root rot. In: Jones JB, Jones JP, Stall RE and Zitter TA (eds) *Compendium of Tomato Diseases* (pp 12–13) APS Press, St. Paul, Minnesota, USA
 - Sugiura T, Horinouchi H, Taguchi Y and Hyahamachi M, (2003). Two types of *Pyrenochaeta lycopersici*, causal pathogen of corky root of tomato. *Proceedings of the 8th International Congress of Plant Pathology, Christchurch, New Zealand 2–7 February 2003*, p. 346

5.2 Ιστοσελίδες

- <http://informatics.aua.gr:8080/scam/2/resource/564>
- <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/WhiteMold.aspx>
- <http://www.mn-net.com/>

5.4 Εικόνες

- <http://www.apsnet.org/publications/imageresources/Pages/IW000063.aspx>
- http://www.bitkisagligi.net/Domates_Pyrenochaeta_Hastalik_Etmeni.htm
- https://worldwide.promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem_t-easy-vector-systems/