

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



Διδακτορική διατριβή

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ, ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΩΝ ΚΥΣΤΟΓΟΝΩΝ ΝΗΜΑΤΩΔΩΝ ΤΗΣ ΠΑΤΑΤΑΣ ΣΤΗΝ ΚΥΠΡΟ

Μιχαλάκης Χριστοφόρου

Λεμεσός 2013

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

**ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ, ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ
ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΩΝ ΚΥΣΤΟΓΟΝΩΝ
ΝΗΜΑΤΩΔΩΝ ΤΗΣ ΠΑΤΑΤΑΣ ΣΤΗΝ ΚΥΠΡΟ**

του

Μιχαλάκη Χριστοφόρου

Λεμεσός 2013

ΕΝΤΥΠΟ ΕΓΚΡΙΣΗΣ

Διδακτορική διατριβή

**ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ, ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ
ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΩΝ ΚΥΣΤΟΓΟΝΩΝ ΝΗΜΑΤΩΔΩΝ
ΤΗΣ ΠΑΤΑΤΑΣ ΣΤΗΝ ΚΥΠΡΟ**

Παρουσιάστηκε από τον

Μιχαλάκη Χριστοφόρου

Επιβλέπων καθηγητής: Καθ. Νικόλας Ιωάννου

Μέλος επιτροπής (Πρόεδρος): Καθ. Ανδρέας Κατσιώτης

Μέλος επιτροπής: Καθ. Γεώργιος Παπαδούλης

Μέλος επιτροπής: Επικ. Καθ. Δημήτρης Τσάλτας

Μέλος επιτροπής: Δρ. Γιώργος Νεοφύτου

Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου

2013

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Μιχαλάκης Χριστοφόρου, 2013

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Γεωπονικών Επιστημών, Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

Μέρος της διδακτορικής διατριβής υποστηρίχθηκε
οικονομικά από το Ίδρυμα Προώθησης Έρευνας (ΙΠΕ)
στο πλαίσιο του προγράμματος ΠΕΝΕΚ/ΕΝΙΣΧ/ 0308/55



ΚΥΠΡΙΑΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ



ΔΙΑΦΘΩΤΙΚΑ ΤΑΜΕΙΑ
της Ευρωπαϊκής Ένωσης στην Κύπρο
οι ιδέες μας, πράξη και ανάπτυξη



ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ

Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στα εργαστήρια του Τμήματος Γεωπονικών Επιστημών, Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου κατά τα έτη 2008-2013, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Νικόλα Ιωάννου. Για την υλοποίηση της διδακτορικής διατριβής, σημαντικό παράγοντα αποτέλεσε η χρηματοδότηση μεγάλου μέρους της έρευνας από το Ίδρυμα Προώθησης Έρευνας (ΙΠΕ) στο πλαίσιο του προγράμματος ΠΕΝΕΚ (ΕΝΙΣΧ – 0308/55).

Εκφράζω τη βαθιά μου ευγνωμοσύνη στον ακαδημαϊκό μου «πατέρα» και επιβλέποντα καθηγητή Δρ. Νικόλα Ιωάννου για την εμπιστοσύνη που επέδειξε αναθέτοντάς μου ένα πολύ σημαντικό θέμα που ταλανίζει την κυπριακή γεωργία. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τη συνεχή επιστημονική καθοδήγηση, την άποψη συνεργασία και την αμέριστη υποστήριξη που μου παρείχε, η οποία αρκετές φορές υπερέβη τις σχέσεις επιβλέποντα καθηγητή και φοιτητή. Κατά την εκπαίδευση μου ως υποψήφιου διδάκτορα, με μύησε στις επιστήμες της Φυτοπαθολογίας και Νηματωδολογίας και μου έδωσε την ευκαιρία να συμμετάσχω στο διδακτικό έργο του Τμήματος, ως βοηθού διδασκαλίας σε πληθώρα θεωρητικών και εργαστηριακών μαθημάτων. Επιπλέον, θέλω να τον ευχαριστήσω για τη διόρθωση του τελικού κειμένου της διατριβής. Οι παρεμβάσεις του και η επισήμανση λαθών βελτίωσε σε σημαντικό βαθμό το τελικό κείμενο.

Θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Επίκουρο Καθηγητή Δημήτρη Τσάλτα που στάθηκε δίπλα μου καθ' όλη τη διάρκεια της διδακτορικής διατριβής μου τόσο ως ακαδημαϊκός, όσο και ως φίλος. Πάντα παρών σε κάθε δυσκολία, ο Δρ. Τσάλτας συνέτεινε με τη μεθοδικότητα που τον χαρακτηρίζει και την εργαστηριακή εμπειρία του, στο να αντεπεξέλθω όλων των εμποδίων που παρουσιάστηκαν στη διάρκεια του εργαστηριακού μέρους της διατριβής μου, διδάσκοντας μου τον τρόπο επίλυσης των διαφόρων προβλημάτων. Επιπλέον, θέλω να τον ευχαριστήσω για τη διόρθωση των κεφαλαίων 3 και 4 της διατριβής, όπου με ουσιαστικές παρεμβάσεις και με την επισήμανση λαθών βελτιώθηκε σημαντικά το τελικό κείμενο.

Επίσης ευχαριστώ όλα τα μέλη της πενταμελούς εξεταστικής επιτροπής για το χρόνο που διέθεσαν για την ανάγνωση της διατριβής μου, και για τις συστάσεις τους που συνέβαλαν στη βελτίωση του κειμένου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω το ερευνητικό προσωπικό του Τμήματος, το οποίο σε αρκετές περιπτώσεις βοήθησε με τις συμβουλές του στη διεκπεραίωση των πειραμάτων. Πιο συγκεκριμένα θα ήθελα να ευχαριστήσω το Δρ. Michael Orford, ο οποίος με εκπαίδευσε στο μοριακό μέρος της διατριβής και βοήθησε στην επίλυση αρκετών προβλημάτων, τόσο με τις

γνώσεις του όσο και με την άμεση εμπλοκή του. Επιπλέον, θέλω να ευχαριστήσω θερμά τους Δρ. Ιάκωβο Παντελίδη και Δρ. Λουκά Κανέτη για την καθοδήγηση που μου παρείχαν στο μέρος της μοριακής ποσοτικοποίησης με τη μέθοδο PMA. Επίσης, τους ευχαριστώ για τη συμμετοχή που είχαν στη συγγραφή των δημοσιεύσεων. Ευχαριστώ επίσης το Δρ. Λάμπρο Παπαγιάννη, για την καθοδήγηση που μου παρείχε κατά τη μοριακή ταυτοποίηση με τη μέθοδο Taqman.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συναδέλφους Δρ. Βασίλη Βασιλείου και Άντρη Ιωάννου, για τη βοήθεια που μου παρείχαν στη διόρθωση των κεφαλαίων 2,5 και 6 καθώς και τους Δρ. Γιώργο Μπότσαρη και Άντια Ορφανίδη για τις συμβουλές που μου παρείχαν στην ανάλυση των αποτελεσμάτων. Ιδιαίτερα σημαντική ήταν η συμβολή της Άντιας κατά την επεξεργασία των στατιστικών δεδομένων.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στους Δρ. Γιώργο Νεοφύτου, Πασχάλη Φελλά και Τρύφωνα Παπατρύφωνος, για τη βοήθεια και συμπαράσταση που μου παρείχαν κατά τη διεξαγωγή διαφόρων πειραμάτων θερμοκηπίου και αγρού, τα οποία έλαβαν χώρα στις εγκαταστάσεις του Τμήματος Γεωργίας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Γιώργο Ιωάννου και Δρ. Άθω Αγαπίου για την εκπαίδευση που μου παρείχαν στην εφαρμογή του συστήματος γεωπληροφορικής, ArcGIS. Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους νηματοδολόγους Δρ. Simon Gowen, Barbara Pembrok, Δρ. Vivian Block, Δρ. Susan Turner, Δρ Colin Fleming και Martin Trevor για τις πολύτιμες συμβουλές τους στην υλοποίηση των πειραμάτων.

Καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, είχα την αμέριστη συμπαράσταση της οικογένειάς μου η οποία με στήριζε και με στηρίζει ακόμα ηθικά και οικονομικά. Οι γονείς μου Αργύρης και Χρύσω στάθηκαν στυλοβάτες στην όλη προσπάθειά μου και με βοήθησαν να αντεπεξέλθω των όποιων δυσκολιών είχα να αντιμετωπίσω τα τελευταία πέντε χρόνια.

Κατά τη διάρκεια του τελευταίου και πιο δύσκολου χρόνου είχα την τύχη να έχω δίπλα μου ένα υπέροχο άνθρωπο ο οποίος με στήριζε ψυχολογικά και μου συμπαραστεκόταν στις δύσκολες στιγμές. Γεωργία μου, σε ευχαριστώ για την αγάπη που μου δείχνεις και κυρίως για την υπομονή που επέδειξες κατά τη διάρκεια της συγγραφής της διδακτορικής διατριβής μου.

Τον περισσότερο χρόνο των τελευταίων πέντε ετών τον πέρασα στα εργαστήρια του Τμήματος μαζί με εξαιρετικούς ανθρώπους. Με το Λάμπρο, τη Χρυστάλλα, τη Γιώτα, τη Μαρία-Δήμητρα, τον Ιάκωβο, το Λούκα, το Mike, την Άντια, την Άντρη, την κα Ειρήνη, το Δημήτρη, τον Jack, το Φώτη, την Anja, την Beata, τη Magda, την Ειρήνη, τη Σωτηρούλα, το Μενέλαο και τη Μάρθα πέρασα πολλές χαρούμενες και συγκινητικές στιγμές.

Ήταν και θα είναι οι εργαστηριακοί μου φίλοι!

Περίληψη

Οι μελέτες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα στην Κύπρο, αναφορικά με τους κυστογόνους νηματώδεις της πατάτας (ΚΝΠ), είναι πολύ περιορισμένες και χρονολογούνται μέχρι το 1996. Στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής ταυτοποιήθηκαν με μοριακές και μορφολογικές τεχνικές τα δύο είδη των ΚΝΠ στην Κύπρο, *Globodera rostochiensis* και *G. pallida*, και προσδιορίστηκαν οι παθότυποι τους με τη μέθοδο της τεχνητής μόλυνσης διαφορεικών ξενιστών. Τα αποτελέσματα έδειξαν την παρουσία των δύο ειδών στις επαρχίες Λάρνακας και Αμμοχώστου (περιοχή Κοκκινοχωριών). Τα πειράματα με τους διαφορεικούς ξενιστές έδειξαν την παρουσία των παθότυπων Ro1 και Pa2, Pa3 και Pa2/3 για τον *G. rostochiensis* (Ro) και τον *G. pallida* (Pa), αντίστοιχα. Ο επακριβής προσδιορισμός των ειδών και των παθότυπων είναι εξαιρετικά σημαντικός για την ορθολογική διαχείριση των ΚΝΠ, και κυρίως για τον περιορισμό της εξάπλωσής τους. Τα πιο πάνω αποτελέσματα εισήχθησαν σε ένα σύστημα γεωπληροφορικής (ArcGIS), μέσω του οποίου απεικονίστηκαν σε ψηφιακούς χάρτες η παρουσία, η διασπορά και η γεωγραφική εξάπλωση των ειδών και των παθότυπων των ΚΝΠ, στις επαρχίες Λάρνακας και Αμμοχώστου.

Η ταυτοποίηση των ειδών των ΚΝΠ στηρίζεται πλέον σε μοριακές τεχνικές και κυρίως στη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Η ανάγκη για εφαρμογή μοριακών τεχνικών, που να είναι σε θέση να επεξεργάζονται μεγάλο αριθμό δειγμάτων σε σύντομο χρονικό διάστημα και με χαμηλό κόστος, υπήρξε το έναυσμα για το σχεδιασμό εξειδικευμένων εκκινητών και Taqman ανιχνευτών, οι οποίοι διαχωρίζουν τα δύο είδη σε μικτές αντιδράσεις PCR (Duplex Real-Time PCR). Οι εκκινητές και οι ανιχνευτές συγκρίθηκαν με πρόσφατα δημοσιευμένους εκκινητές και ανιχνευτές των Nakhla *et al.* (2010) και Parayiannis *et al.* (2013), ως προς την εξειδίκευση και την απόδοση τους σε αντιδράσεις Duplex Real-Time PCR. Το υψηλό κόστος και ο μεγάλος χρόνος που απαιτείται για την εξαγωγή DNA από κύστες, αποτελεί επίσης εμπόδιο στην εφαρμογή της PCR για την ταυτοποίηση των ΚΝΠ σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων. Χρησιμοποιώντας τους εκκινητές και τους Taqman ανιχνευτές των Parayiannis *et al.* (2013) καθώς και μετρήσεις καθαρότητας του DNA στο φασματοφωτόμετρο, αξιολογήθηκαν 5 διαφορετικές μέθοδοι εξαγωγής γονιδιακού DNA των ΚΝΠ: (Α) προσρόφηση του DNA σε στήλες πυριτίου, (Β) προσκόλληση του DNA σε μαγνητικά σφαιρίδια, (Γ) καθαρισμός του DNA με το χηλικό υλικό Chelex, (Δ) καθαρισμός του DNA

με χλωροφόρμιο/οξικό νάτριο και (E) απλή λειοτριβήση των κύστεων. Οι 5 μέθοδοι αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας καθαρές κύστεις καθώς και κύστεις που είχαν αναμειχθεί με οργανικά υπολείμματα εδάφους. Η φασματοφωτομετρία εκχυλισμένου DNA από καθαρές κύστεις έδειξε ότι το καθαρότερο προϊόν εξάχθηκε με τη μέθοδο των στηλών πυριτίου (A), των μαγνητικών σφαιριδίων (B) και του Chelex (Γ). Το προϊόν από τις 3 αυτές μεθόδους παρουσίασε χαμηλούς οριακούς κύκλους (Threshold cycle, Ct) κατά την ενίσχυση του DNA σε αντιδράσεις Duplex Real-Time PCR. Η μέθοδος E (απλή λειοτριβήση των κύστεων) έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα, αντίστοιχα με τις μεθόδους A, B και Γ, μόνο σε αντιδράσεις Real-Time PCR ενώ δεν παρουσίασε καθόλου ενίσχυση σε αντιδράσεις συμβατικής PCR. Τέλος, η μέθοδος Δ (χλωροφόρμιο/οξικό νάτριο) δεν παρουσίασε ενίσχυση ούτε σε αντιδράσεις συμβατικής PCR ούτε και σε αντιδράσεις Real-Time PCR.

Η διάκριση μεταξύ ζωντανών και νεκρών εγκυστωμένων αυγών στο έδαφος, αποτελεί μεγάλη πρόκληση, αφού ο υπολογισμός του ζωντανού μολύσματος ανά γραμμάριο εδάφους είναι απαραίτητος για την ορθολογική διαχείριση των ΚΝΠ. Η πιο κοινή μέχρι σήμερα μέθοδος προσδιορισμού των ζωντανών ΚΝΠ, είναι η μικροσκοπική παρατήρηση εμβρυωμένων νηματωδών, μετά από χρώση με Meldola Blue. Η μέθοδος αυτή, όμως, είναι χρονοβόρα και συχνά οδηγεί σε εσφαλμένη εκτίμηση του ζωντανού μολύσματος στο έδαφος. Πρόσφατες έρευνες ανέδειξαν τη χημική ουσία Propidium Monoazide (PMA) ως μέσο διαχωρισμού των ζωντανών από τα νεκρά κύτταρα διαφόρων μικροοργανισμών.

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η χρήση της χρωστικής PMA σε συνδυασμό με την Duplex Real-Time PCR, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές και τους Taqman ανιχνευτές των Parayiannis *et al.* (2013). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μέθοδος αυτή επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό των ζωντανών εγκυστωμένων αυγών των ΚΝΠ στο έδαφος, αφού η χρωστική PMA έχει την ικανότητα να δεσμεύει το DNA των νεκρών αυγών, επιτρέποντας την ενίσχυση του DNA που προέρχεται μόνο από ζωντανά αυγά. Η νέα αυτή μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού του ζωντανού μολύσματος των ΚΝΠ στο έδαφος, που αναπτύχθηκε για πρώτη φορά στην παρούσα μελέτη, αποτελεί σημαντική καινοτομία τόσο στην Κύπρο όσο και διεθνώς, καθώς επίσης και σημαντικό εργαλείο για μελέτες βιωσιμότητας των ΚΝΠ στο έδαφος αλλά και για την αποτελεσματικότερη διαχείριση τους.

Abstract

Potato cyst nematodes (PCN) of the genus *Globodera* cause major economic damage to potato crops in Cyprus. PCN investigations, in Cyprus are limited and the most recent one was reported back in 1996. The main objectives of the present study were: i) identification of the PCN species present in potato fields in Cyprus using molecular (PCR & Real Time PCR) and morphometric techniques, ii) differentiation of their pathotypes using differential clones, iii) mapping of the species and pathotype distribution using geographical information systems (GIS), iv) molecular quantification of the number of eggs within cysts in soil using TaqMan[®] technology and v) the discrimination of live from dead encysted eggs using Propidium Monoazide (PMA) in combination with Real-Time PCR.

Results demonstrate the presence of the two species, *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*, only in the southeastern part of Cyprus (Kokkinochoria area). Pathotypes present in this area include Ro1 of *G. rostochiensis* and Pa2, Pa3 and Pa2/3 of *G. pallida*. The presence and distribution of PCN species and pathotypes were mapped using GIS which is a potentially valuable tool in the monitoring process from the State Authorities, allowing them to enforce control measures and plan strategies for effective containment of the pathogen.

A multiplex TaqMan[®] real-time fluorescent PCR assay was developed and evaluated, for the high-throughput discrimination and identification of the two *Globodera* species, and was compared with recently reported Taqman assays by Nakhla *et al.* (2010) and Papayiannis *et al.* (2013). The best results were provided by the primers and Taqman probes designed by Papayiannis *et al.* (2013).

Damage caused by PCN is related to nematode population densities in soil prior to planting. Routine estimations, presented as eggs/g soil, are made to support decision making for the management of PCN. The standard method for nematologists to determine the viability status of PCN combines microscopic visualization of nematodes stained with the vital Meldola's Blue (MB) stain (Devine and Jones 2001). Although MB seems to be reliable in staining embryonated juveniles within eggs and cysts, it is a time and labour consuming assay, which also tends to overestimate the potential infectivity of PCN juveniles. Furthermore, molecular assays cannot directly assess the viability of PCN

inocula, since DNA of both live and dead cells can be amplified. In the present work, we report a Real-Time PCR based method for determining the viability of PCN with the aid of Propidium Monoazide (PMA), a photoreactive, DNA-intercalating dye. The novelty of the method lies in the fact that PMA is almost completely cell membrane-impermeable, thus it can be selectively used to intercalate only exposed, unbound DNA from dead cells, rendering it unable to amplify. Thus, only DNA from viable/intact cells is PCR-amplified and detected.

To our knowledge, this is the first report of differentiating live/dead nematodes with the use of the photoreactive DNA binding dye, PMA. This method appears to be simple, more reliable and less time consuming compared to the current available staining methods. PMA tests, as described in this work, may be useful in estimating the density of live/effective inocula following soil solarisation, fallow or other soil treatments. In addition, when linked with the use of a duplex Real-Time PCR assay, the present PMA-based method reduced significantly the required time for analysis of samples. Most important, quantitative Real-Time PCR in combination with the PMA-based method allowed the determination of the actual number of live eggs/J2 within PCN cysts.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Κατάλογος πινάκων	xv
Κατάλογος εικόνων	xvii
Κατάλογος χαρτών.....	xxi
Πρόλογος	xxv
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Γενική βιβλιογραφική ανασκόπηση των κυστογόνων νηματωδών της πατάτας	1
1.1 Προέλευση και εξέλιξη των ΚΝΠ	1
1.2 Διασπορά και εξάπλωση των ΚΝΠ	3
1.3 Βιολογία των ΚΝΠ	5
1.3.1 Ταξινόμηση	5
1.3.2 Παθότυποι	7
1.3.3 Βιολογικός κύκλος.....	8
1.3.4 Μορφολογικά χαρακτηριστικά των ΚΝΠ	10
1.4 Αντιμετώπιση.....	13
1.4.1 Χημική αντιμετώπιση	14
1.4.2 Βιολογική αντιμετώπιση	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Ανίχνευση και ταυτοποίηση των κυστογόνων νηματωδών της πατάτας στην Κύπρο με μορφολογικές και μοριακές μεθόδους	23
2.1 Περίληψη	23
2.2 Εισαγωγή.....	24
2.3 Υλικά και Μέθοδοι	29
2.3.1 Δειγματοληψίες εδάφους	29
2.3.2 Εξαγωγή κύστεων	30
2.3.3 Μέτρηση κύστεων και εγκυστωμένων αυγών	30
2.3.4 Μοριακή ταυτοποίηση	31
2.3.5 Μορφολογική – μορφομετρική ταυτοποίηση	33

2.4	Αποτελέσματα.....	36
2.4.1	Ανίχνευση	36
2.4.2	Μοριακή ταυτοποίηση	37
2.4.3	Μορφολογική – μορφομετρική ταυτοποίηση κύστεων	39
2.4.4	Μορφολογική – μορφομετρική ταυτοποίηση προνυμφών 2 ^{ου} σταδίου.....	39
2.5	Συζήτηση.....	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Μοριακός χαρακτηρισμός των κυστογόνων νηματωδών της πατάτας με τη χρήση τεχνολογίας Taqman® Real-Time PCR και αξιολόγηση μεθόδων εξαγωγής γονιδιακού DNA από κύστεις.....		
3.1	Περίληψη	43
3.2	Εισαγωγή.....	45
3.3	Υλικά και Μέθοδοι	48
3.3.1	Πληθυσμοί των ΚΝΠ.....	48
3.3.2	Σχεδιασμός εκκινητών και Taqman® ανιχνευτών.....	48
3.3.3	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των εκκινητών και Taqman® ανιχνευτών.....	49
3.3.4	Αξιολόγηση εκκινητών και Taqman® ανιχνευτών ως προς την εξειδίκευση, αποδοτικότητα και ευαισθησία τους.....	50
3.3.5	Μέθοδοι εξαγωγής DNA	51
3.3.6	Σύγκριση των 5 μεθόδων εξαγωγής DNA ως προς την ανάκτηση των νουκλεϊκών οξέων, το βαθμό δυσκολίας και το κόστος εφαρμογής τους.....	52
3.3.7	Σύγκριση μεταξύ συμβατικής και Real – Time PCR ως προς την εξειδίκευση και την ευαισθησία της κάθε μεθόδου.....	52
3.3.8	Στατιστική Ανάλυση	53
3.4	Αποτελέσματα.....	54
3.4.1	Σχεδιασμός εκκινητών και Taqman® ανιχνευτών.....	54
3.4.2	Προσδιορισμός συγκέντρωσης εκκινητών και Taqman® ανιχνευτών.....	55
3.4.3	Αξιολόγηση εκκινητών και Taqman® ανιχνευτών ως προς την εξειδίκευση, την αποδοτικότητα και την ευαισθησία τους.....	55

3.4.4	Αξιολόγηση της καθαρότητας του DNA από τις πέντε μεθόδους εξαγωγής	59
3.4.5	Σύγκριση του υλικού εκχύλισης από τις 5 μεθόδους εξαγωγής DNA με Co- και Real – Time PCR.	60
3.4.6	Σύγκριση των 5 μεθόδων εξαγωγής DNA ως προς το βαθμό δυσκολίας και το κόστος εφαρμογής.....	63
3.4.7	Αναλυτική και διαγνωστική ευαισθησία, εξειδίκευση και ακρίβεια των δύο μεθόδων ταυτοποίησης, Co- & Real Time (Taqman®) PCR.....	64
3.5	Συζήτηση.....	66
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Ανάπτυξη μιας νέας μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ζωντανών εγκυστωμένων αυγών των κυστογόνων νηματωδών της πατάτας		69
4.1	Περίληψη	69
4.2	Εισαγωγή.....	71
4.3	Υλικά και Μέθοδοι	78
4.3.1	Συλλογή κύστεων και παραγωγή νέου μολύσματος.....	78
4.3.2	Προετοιμασία δειγμάτων	78
4.3.3	Θερμική επεξεργασία των ΚΝΠ.....	78
4.3.4	Έλεγχος βιωσιμότητας των αυγών και J2 με τη χρωστική Meldola Blue	79
4.3.5	Εφαρμογή της χρωστικής PMA.....	79
4.3.6	Εξαγωγή DNA	80
4.3.7	Ενίσχυση της 16S rDNA γονιδιακής περιοχής με PCR.....	80
4.3.8	Real – time PCR.....	81
4.3.9	Κατασκευή πρότυπης καμπύλης για την ποσοτικοποίηση με Real – time PCR	81
4.3.10	Έλεγχος βιωσιμότητας εγκυστωμένων αυγών διαφορετικών ηλικιών	82
4.3.11	Στατιστική ανάλυση.....	82
4.4	Αποτελέσματα.....	83
4.4.1	Έλεγχος βιωσιμότητας με Meldola Blue	83
4.4.2	Ποσοτικοποίηση των ΚΝΠ με qPCR	83

4.4.3 Έλεγχος βιωσιμότητας και ποσοτικοποίηση των ΚΝΠ με qPCR, μετά από χρώση με PMA	85
4.4.4 Έλεγχος βιωσιμότητας εγκυστωμένων αυγών διαφορετικών ηλικιών	86
4.5 Συζήτηση.....	90
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Διαφοροποίηση των παθότυπων των κυστογόνων νηματωδών της πατάτας.97	
5.1 Περίληψη	97
5.2 Εισαγωγή.....	98
5.3 Υλικά και Μέθοδοι	101
5.3.1 Επιλογή αγροτεμαχίων για δειγματοληψίες εδάφους	101
5.3.2 Έλεγχος εκκόλαψης προνυμφών 2 ^{ου} σταδίου (J2) των ΚΝΠ.	101
5.3.3 Μοριακή ταυτοποίηση	102
5.3.4 Πολλαπλασιασμός των διαφορετικών ξενιστών με τη μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας..	102
5.3.5 Παραγωγή αρχικού μολύσματος (Pi).....	104
5.3.6 Μόλυνση των διαφορετικών ξενιστών με κύστεις.....	105
5.3.7 Μέτρηση τελικού μολύσματος και τρόπος καθορισμού των παθότυπων.....	106
5.4 Αποτελέσματα.....	107
5.4.1 Έλεγχος εκκόλαψης προνυμφών 2 ^{ου} σταδίου (J2).....	107
5.4.2 Μοριακή ταυτοποίηση των δυο ειδών ΚΝΠ	109
5.4.3 Ταυτοποίηση παθότυπων	110
5.5 Συζήτηση.....	114
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Χαρτογράφηση της γεωγραφικής εξάπλωσης των κυστογόνων νηματωδών της πατάτας στην Κύπρο	
6.1 Περίληψη	119
6.2 Εισαγωγή.....	120
6.3 Υλικά και μέθοδοι.....	123
6.3.1 Εξασφάλιση χωρικών δεδομένων της περιοχής ενδιαφέροντος	123
6.3.2 Δημιουργία γεωγραφικής βάσης δεδομένων ArcGIS	123

6.3.3	Καταχώριση δεδομένων ταυτοποίησης των ειδών και των παθότυπων των ΚΝΠ στη γεωγραφική βάση δεδομένων ArcGIS.....	123
6.3.4	Απεικόνιση δεδομένων ταυτοποίησης των ειδών και των παθότυπων των ΚΝΠ σε θεματικούς χάρτες.....	125
6.4	Αποτελέσματα.....	126
6.4.1	Χαρτογράφηση της γεωγραφικής κατανομής των ΚΝΠ σε ψηφιακούς χάρτες.....	126
6.5	Συζήτηση.....	133
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Γενική συζήτηση και συμπεράσματα.....	135
	Βιβλιογραφία.....	143
	Παραρτήματα.....	159
	Δημοσιεύσεις σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά.....	169

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1. Είδη του γένους <i>Globodera</i>	6
Πίνακας 2. Διαχωρισμός των παθότυπων των κυστογόνων νηματωδών της πατάτας με βάση το πρότυπο που προτάθηκε από τον Kort <i>et al.</i> (1977)	7
Πίνακας 3. Μορφομετρικά χαρακτηριστικά κύστεων του γένους <i>Globodera</i>	11
Πίνακας 4. Μορφομετρικές μετρήσεις κύστεων και προνυμφών 2 ^{ου} σταδίου (J2) των κυστογόνων νηματωδών <i>Globodera rostochiensis</i> και <i>G. pallida</i> σε κυπριακούς πληθυσμούς.	40
Πίνακας 5. Διαβάθμιση του χρώματος των ζωνών DNA σε πήγμα αγαρόζης από προϊόντα που προήλθαν από τη συμβατική PCR,.....	53
Πίνακας 6. Εκκινητές και Taqman® ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις της Real – Time PCR	56
Πίνακας 7. Σύγκριση των 5 μεθόδων εξαγωγής DNA με βάση το λόγο των απορροφήσεων 260/280 και 260/230 nm στο φασματοφωτόμετρο.....	60
Πίνακας 8. Σύγκριση μεταξύ συμβατικής (Co-PCR) και Real – Time Taqman® PCR (qPCR) ως προς την ευαισθησία της κάθε μεθόδου για την ανίχνευση των ειδών <i>Globodera rostochiensis</i> και <i>G. pallida</i>	62
Πίνακας 9. Σύγκριση των 5 μεθόδων εξαγωγής DNA ως προς το κόστος, το χρόνο και τη δυσκολία εφαρμογής.....	63
Πίνακας 10. Σύγκριση διαγνωστικής εξειδίκευσης, ευαισθησίας και ακρίβειας μεταξύ των δύο μοριακών μεθόδων ταυτοποίησης Real – Time (Taqman®) PCR και Co-PCR.....	65
Πίνακας 11. Αποτελέσματα βιωσιμότητας νηματωδών που χρώστηκαν με Meldola Blue, αφού εκτέθηκαν σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (25, 45 και 65 °C).....	83
Πίνακας 12. Ποσοτικοποίηση αυγών και προνυμφών (J2) των <i>Globodera rostochiensis</i> και <i>G. pallida</i> , που είχαν εκτεθεί στους 25, 45 και 65 °C, μετά από χρώση με PMA.	85
Πίνακας 13. Ποσοτικοποίηση αυγών και προνυμφών (J2) των παλαιών και νεοσχηματιζόμενων κύστεων του <i>Globodera rostochiensis</i> μετά από μεταχείριση με Meldola blue και PMA.....	88

Πίνακας 14. Ποσοτικοποίηση αυγών και προνυμφών (J2s) των ειδών <i>Globodera rostochiensis</i> και <i>G. pallida</i> μετά από έκθεση τους στους 25, 45 και 65 °C και διαχωρισμό των ζωντανών/νεκρών νηματωδών με Meldola Blue και Propidium Monoazide (PMA).	88
Πίνακας 15. Πρότυπο διαχωρισμού των παθότυπων των ΚΝΠ.....	106
Πίνακας 16. Ταυτοποίηση των παθότυπων του <i>Globodera rostochiensis</i> από τεμάχια 6 περιοχών που βρέθηκαν μολυσμένα με αμιγείς πληθυσμούς του είδους αυτού.	112
Πίνακας 17. Ταυτοποίηση των παθότυπων του <i>Globodera pallida</i> από τεμάχια 3 περιοχών που βρέθηκαν μολυσμένα με αμιγείς πληθυσμούς του είδους αυτού.	113
Πίνακας 18. Ανθεκτικότητα των διαφορετικών ξενιστών του γένους <i>Solanum</i> που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα ταυτοποίησης των παθότυπων του <i>Globodera rostochiensis</i> και <i>G.pallida</i>	113
Πίνακας 19. Αποτελέσματα διαχωρισμού των παθότυπων του <i>Globodera rostochiensis</i> με τη χρήση τεχνητής μόλυνσης διαφορετικών ξενιστών	162
Πίνακας 20. Αποτελέσματα διαχωρισμού των παθότυπων του <i>Globodera rostochiensis</i> με τη χρήση τεχνητής μόλυνσης διαφορετικών ξενιστών	163
Πίνακας 21. Αποτελέσματα ταυτοποίησης των ειδών και των παθότυπων του <i>Globodera rostochiensis</i> και <i>G. pallida</i> στην περιοχή Ξυλοτύμπου	163
Πίνακας 22. Αποτελέσματα ταυτοποίησης των ειδών και των παθότυπων του <i>Globodera rostochiensis</i> και <i>G. pallida</i> στην περιοχή Ορμήδειας	164
Πίνακας 23. Αποτελέσματα ταυτοποίησης των ειδών και των παθότυπων του <i>Globodera rostochiensis</i> και <i>G. pallida</i> στην περιοχή Ξυλοφάγου	165
Πίνακας 24. Αποτελέσματα ταυτοποίησης των ειδών και των παθότυπων του <i>Globodera rostochiensis</i> και <i>G. pallida</i> στην περιοχή Λιοπέτρι	166
Πίνακας 25. Αποτελέσματα ταυτοποίησης των ειδών και των παθότυπων του <i>Globodera rostochiensis</i> και <i>G. pallida</i> στην περιοχή Άχνα	166
Πίνακας 26. Αποτελέσματα ταυτοποίησης των ειδών και των παθότυπων του <i>Globodera rostochiensis</i> και <i>G. pallida</i> στην περιοχή Σωτήρα.....	167
Πίνακας 27. Αποτελέσματα ταυτοποίησης των ειδών και των παθότυπων του <i>Globodera rostochiensis</i> και <i>G. pallida</i> στην περιοχή Αυγόρου	167

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1. Εδώδιμοι κόνδυλοι άγριων ποικιλιών πατάτας (Πηγή: GoodFood World, October 31st, 2010)	3
Εικόνα 2. Συγκομισμένοι κόνδυλοι (αριστερά), Κύστη μέσα σε οφθαλμό κονδύλου πατάτας (δεξιά) Πηγή: AFBI, 2009.	4
Εικόνα 3. Βιολογικός κύκλος των ΚΝΠ.....	10
Εικόνα 4. Κύστεις των <i>Globodera</i> (αριστερά), των <i>Heterodera</i> (κέντρο) και των <i>Puctodera</i> (δεξιά). Πηγή: AFBI.	12
Εικόνα 5. Περινεϊκή περιοχή του <i>G. rostochiensis</i> (αριστερά). και <i>G. pallida</i> (δεξιά).	12
Εικόνα 6. Στιλέτα τεσσάρων ειδών του γένους <i>Globodera</i>	12
Εικόνα 7. Κεφαλική περιοχή του <i>G. pallida</i> (αριστερά) και <i>G. rostochiensis</i> (δεξιά). Πηγή: AFBI.	13
Εικόνα 8. Τρόποι δειγματοληψίας από τεμάχιο μολυσμένο με ΚΝΠ	25
Εικόνα 9. Σωλήνας δειγματοληψίας εδάφους τύπου ‘core’.	25
Εικόνα 10. Μοντέλο διασποράς των ΚΝΠ σε μολυσμένο αγροτεμάχιο μετά από 5 χρόνια εντατικής καλλιέργειας.	25
Εικόνα 11. Μέθοδοι εξαγωγής κύστεων από χώμα.	26
Εικόνα 12. Κύστεις των ΚΝΠ (Μ. Χριστοφόρου, 2008, ΤΕΠΑΚ).....	28
Εικόνα 13. Διαδικασία εξαγωγής κύστεων με τη μέθοδο Fenwick can.	31
Εικόνα 14. Σφαιρική κύστη του γένους <i>Globodera</i> (Bajaj <i>et al.</i> , 2011).	34
Εικόνα 15. Διεργασία κοπής της περινεϊκής περιοχής (Bajaj <i>et al.</i> , 2011).	34
Εικόνα 16. Συγκριτική μέτρηση κύστεων και αυγών των ΚΝΠ	36
Εικόνα 17. Γραφική αναπαράσταση της διασποράς των ΚΝΠ στα χωριά των επαρχιών Λάρνακας και Αμμοχώστου.	38
Εικόνα 18. Περινεϊκή περιοχή κύστεων των ΚΝΠ.	39
Εικόνα 19. Απεικόνιση αλληλουχίας DNA (κάτω σειρά), εκκινητών (Primers F) και Taqman® ανιχνευτή (TaqMan Probe).....	46

Εικόνα 20. Ευθυγράμμιση των αλληλουχιών ITS1 & ITS2 του <i>G. pallida</i> (Query) και <i>G. rostochiensis</i> (Sbjct) με τη βοήθεια του προγράμματος BLAST (blastp) της ιστοσελίδας http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	54
Εικόνα 21. Γραφική απεικόνιση των αντιδράσεων της Real – Time PCR που πραγματοποιήθηκε με τους εκκινητές και Taqman® ανιχνευτές που σχεδιάστηκαν σε αυτή την εργασία.....	57
Εικόνα 22. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων που ενισχύθηκαν μετά από συνδυασμό των εκκινητών των Nakhla <i>et al.</i> (2010) σε Singleplex (A – M) και Duplex (N-Ξ) συμβατική PCR.....	57
Εικόνα 23. Γραφική απεικόνιση των αντιδράσεων της Real – Time PCR που πραγματοποιήθηκε με τους εκκινητές και Taqman® ανιχνευτές που σχεδιάστηκαν από τους Parayiannis <i>et al.</i> (2013).	59
Εικόνα 24. Σύγκριση των 5 μεθόδων εξαγωγής DNA (A-E) από μονές κύστεις των δύο ειδών ΚΝΠ, <i>Globodera rostochiensis</i> (G.rost) και <i>G pallida</i> (G.pall) με βάση τις τιμές του οριακού κύκλου (Ct) της Real – Time PCR, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές και Taqman® ανιχνευτές που σχεδιάστηκαν από τους Parayiannis <i>et al.</i> (2013).....	61
Εικόνα 25. Απεικόνιση των διαφόρων στρωμάτων του εξωσκελετού ενός ενήλικου νηματώδη (Blaxter <i>et al.</i> , 1998).....	73
Εικόνα 26. Διαδικασία προσκόλλησης του PMA πάνω στο ελεύθερο DNA των νεκρών κυττάρων και ενίσχυση του DNA των ζωντανών κυττάρων μετά την εκχύλιση των νουκλεϊκών οξέων.....	77
Εικόνα 27. Κατασκευή πρότυπων καμπυλών των δύο ειδών ΚΝΠ για την ποσοτικοποίηση τους.....	84
Εικόνα 28. Αυγά του <i>Globodera rostochiensis</i> σε μεγέθυνση 40X μετά από χρώση με Meldola Blue.....	86
Εικόνα 29. Έλεγχος βιωσιμότητας κύστεων του <i>Globodera rostochiensis</i> που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου από το 1976, 1990, 2007 και 2010, με τις μεθόδους χρώσης Meldola blue και Propidium Monoazide (PMA).....	89
Εικόνα 30. Διηθητικό χαρτί που περιέχει κύστεις με οργανικά υλικά που εξάχθηκαν από το χώμα με τη μέθοδο Fenwick.....	101
Εικόνα 31. Πλαστικά δίκτυα με οπές διαμέτρου 100 μm που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο εκκόλαψης των ειδών των ΚΝΠ.....	102

Εικόνα 32. Πολλαπλασιασμός διαφορετικών ξενιστών και παραγωγή νέου μολύσματος των ΚΝΠ.....	104
Εικόνα 33. Ανάπτυξη διαφορετικών ξενιστών σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών.....	105
Εικόνα 34. Εκκόλαψη προνυμφών 2 ^{ου} σταδίου (J2), σε εκκρίματα ριζών πατάτας (PRD) για 11 εβδομάδες από τις περιοχές που είχαν αμιγείς πληθυσμούς του <i>G. rostochiensis</i>	108
Εικόνα 35. Εκκόλαψη προνυμφών 2 ^{ου} σταδίου (J2), σε εκκρίματα ριζών πατάτας (PRD) για 11 εβδομάδες από τις περιοχές που είχαν αμιγείς πληθυσμούς του <i>G. pallida</i>	108
Εικόνα 36. Επιβεβαίωση της παρουσίας αμιγών πληθυσμών του <i>Globodera rostochiensis</i> στα τεμάχια προσδιορισμού των παθότυπων.	109
Εικόνα 37. Επιβεβαίωση της παρουσίας αμιγών πληθυσμών του <i>Globodera pallida</i> στα τεμάχια προσδιορισμού των παθότυπων.	110

Κατάλογος χαρτών

Χάρτης 1. Οροσειρά των Άνδεων, Νότια Αμερική (Πηγή: AFBI)	2
Χάρτης 2. Παγκόσμιος χάρτης διασποράς των κυστογόνων νηματωδών της πατάτας από την περιοχή προέλευσής τους (Marks, 1998).	4
Χάρτης 3. Δορυφορικός χάρτης της Κύπρου.	28
Χάρτης 4. Δορυφορικός χάρτης της Κύπρου όπου παρουσιάζονται οι περιοχές δειγματοληψίας εδάφους.	29
Χάρτης 5. Εισαγωγή χωρικών και μη χωρικών δεδομένων στο σύστημα ArcGIS για τη δημιουργία βάσης δεδομένων (γεωβάση).....	124
Χάρτης 6. Καταχώριση των μη χωρικών δεδομένων στα πεδία της γεωβάσης του ArcGIS.	124
Χάρτης 7. Απεικόνιση των περιγραφικών δεδομένων σε θεματικούς χάρτες.....	125
Χάρτης 8. Χαρτογράφηση της γεωγραφικής κατανομής των πληθυσμών των ΚΝΠ <i>Globodera rostochiensis</i> και <i>G. pallida</i> σε επίπεδο περιοχής.	127
Χάρτης 9. Χαρτογράφηση της γεωγραφικής κατανομής των πληθυσμών των δύο ειδών ΚΝΠ <i>Globodera rostochiensis</i> και <i>G. pallida</i> σε επίπεδο τεμαχίου.	128
Χάρτης 10. Χαρτογράφηση της ποσοστιαίας κατανομής των πληθυσμών των δύο ειδών ΚΝΠ <i>Globodera rostochiensis</i> και <i>G. pallida</i> σε επίπεδο τεμαχίου.	129
Χάρτης 11. Χαρτογράφηση της γεωγραφικής της κατανομής των δύο ειδών ΚΝΠ, <i>Globodera rostochiensis</i> και <i>G. pallida</i> , σε επίπεδο τεμαχίου (δορυφορική εικόνα).	130
Χάρτης 12. Χαρτογράφηση της γεωγραφικής κατανομής των παθότυπων Pa2/3 και Ro1 των δύο ειδών ΚΝΠ <i>Globodera rostochiensis</i> και <i>G. pallida</i> , αντίστοιχα.....	131
Χάρτης 13. Δορυφορικός χάρτης της Κύπρου © Google Earth όπου απεικονίζονται οι κύριες περιοχές καλλιέργειας πατατών	135

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AFBI	Agri - Food and Biosciences Institute
ANOVA	Analysis of Variance
Avr (genes)	Γονίδια μολυσματικότητας
CE	Τριχοειδείς Ηλεκτροφόριση Υψηλής Απόδοσης
Co-PCR	Conventional PCR
cv.	Cultivar
DAGP	Diacetylphloroglucinol
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
DNA	Deoxyribonucleic acid
EEC	European Economic Community
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPPO	European and Mediterranean Plant Protection Organization
G	Gravity (Βαρύτητα)
Gr	Γραμμάριο
<i>G. pallida</i>	<i>Globodera pallida</i>
<i>G. rostochiensis</i>	<i>Globodera rostochiensis</i>
G	Granular
GIS	Geographical Information Systems
ha (Hectare)	Εκτάριο (10000 m ²)
IEF	Isoelectric Focusing,
ITS	Internal Transcribe Spacer
J1 – 4	Προνύμφη 1 ^{ου} -4 ^{ου} σταδίου
LSD	Least Significant Difference
°C	Βαθμοί Κελσίου
P	Φωσφόρο
Pa	Παθότυπος του <i>G. pallida</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pf	Τελικό μόλυσμα
pH	Πεχά
Pi	Αρχικό μόλυσμα
PMA	Propidium monoazide
PRD	Potato Root Diffusates

qPCR	Quantitative PCR
R (genes)	Γονίδια ανθεκτικότητας
Real-Time PCR	PCR Πραγματικού χρόνου
Ro	Παθότυπος του <i>G. rostochiensis</i>
SC	Soluble Concentrate liquid
SKW	Stylet Knob Width
SL	Stylet Length
t (Tones)	Τόνοι
TAE	Tris base, Acetic acid and EDTA
WG	Wettable Granules
WP	Wettable Powder
E.E.	Ευρωπαϊκή Ένωση
K	Κάλιο
ΚΝΠ	Κυστογόνοι Νηματώδεις της Πατάτας
ΚΦ	Καλλιεργούμενα Φυτά
N	Άζωτο
ΣΥ	Σχετική υγρασία

ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ

Amphids	Αμφίδια
Anhydrobiosis	Ανυδροβίωση
Diapause	Διάπαυση
Differential hosts	Διαφορικοί ξενιστές
Dormancy	Αδράνεια
Kits	Εμπορικά σκευάσματα
Quiescence	Αποσιώπηση
Real-Time PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου
Stylet knobs	Μύες που στηρίζουν το στυλέτο
Syncytium	Σύμπλοκο γιγαντιαίων φυτικών κυττάρων (Συγχύτο)
Vulval basin	Γεννητική περιοχή

Πρόλογος

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση της παρουσίας των ΚΝΠ στην Κύπρο από μηδενική βάση, αφού τα τελευταία δεδομένα που αφορούν τα συγκεκριμένα παθογόνα χρονολογούνται από το 1996. Οι απώλειες που προκαλούν οι ΚΝΠ στην παραγωγή πατατών αλλά και οι αρνητικές επιπτώσεις που προκαλεί η αλόγιστη εφαρμογή χημικών νηματοδοκτόνων για την αντιμετώπισή τους, επιτείνουν την ανάγκη εξεύρεσης νέων μεθόδων για γρήγορη, οικονομική και αξιόπιστη ταυτοποίηση των ειδών και των παθότυπων, αλλά και για ποσοτικοποίηση του ζωντανού εδαφικού μολύσματος, έτσι ώστε να είναι εφικτή η εφαρμογή μιας ολοκληρωμένης και αποτελεσματικής μεθόδου αντιμετώπισης των παθογόνων.

Στο Κεφάλαιο 1 γίνεται μια γενική βιβλιογραφική ανασκόπηση των ΚΝΠ, με εκτενή αναφορά στην προέλευση, εξέλιξη και εξάπλωση των παθογόνων αυτών στον πλανήτη και στην Κύπρο ειδικότερα. Επίσης, γίνεται εκτενής αναφορά στη βιολογία, την ταξινόμηση (είδη και παθότυποι) και στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των ΚΝΠ, καθώς και στις διάφορες χημικές και βιολογικές μεθόδους για την αντιμετώπισή τους.

Στο Κεφάλαιο 2 περιγράφεται η πειραματική διαδικασία και τα αποτελέσματα των μελετών ανίχνευσης και ταυτοποίησης των δύο ειδών ΚΝΠ στην Κύπρο, με τις καθιερωμένες μοριακές και μορφολογικές μεθόδους. Στόχος της εργασίας αυτής ήταν να διαπιστωθεί η υφιστάμενη κατάσταση αναφορικά με το πρόβλημα των ΚΝΠ στην Κύπρο και να δημιουργηθεί το απαραίτητο υπόβαθρο για τη διεξαγωγή περαιτέρω μελετών, όπως περιγράφονται πιο κάτω.

Στο Κεφάλαιο 3 παρουσιάζονται οι μελέτες που έγιναν με σκοπό την ανάπτυξη νέων και πιο γρήγορων και αξιόπιστων μεθόδων ταυτοποίησης των ΚΝΠ, με την εφαρμογή της τεχνολογίας Taqman σε αντιδράσεις duplex Real-Time PCR. Στο πλαίσιο της εργασίας αυτής έγινε σχεδιασμός νέων εκκινητών και Taqman ανιχνευτών, οι οποίοι αξιολογήθηκαν σε σύγκριση με αντίστοιχους εκκινητές και ανιχνευτές που δημοσιεύτηκαν πρόσφατα. Παράλληλα, αξιολογήθηκαν 5 μέθοδοι εξαγωγής DNA από κύστες, για ενίσχυση τόσο με συμβατική PCR (Co-PCR) όσο και με Real-Time PCR.

Στο Κεφάλαιο 4 παρουσιάζεται για πρώτη φορά μια νέα μοριακή μέθοδος ποσοτικοποίησης των ζωντανών αυγών που βρίσκονται μέσα στις κύστες των ΚΝΠ στο

έδαφος. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη συνδυασμένη εφαρμογή της μεθόδου duplex Real-Time PCR και της χρωστικής PMA (propidium monoazide), η οποία δεσμεύει το ελεύθερο DNA των νεκρών κυττάρων, παρεμποδίζοντας έτσι την ενίσχυση του κατά την PCR.

Στο Κεφάλαιο 5 παρουσιάζονται οι μελέτες που έγιναν με τη μέθοδο της τεχνητής μόλυνσης διαφορετικών ξενιστών, για τον προσδιορισμό των παθότυπων των ΚΝΠ που απαντώνται στην Κύπρο. Ο προσδιορισμός αυτός είναι απαραίτητος για την ορθολογική αξιοποίηση των διαθέσιμων ανθεκτικών ποικιλιών πατάτας, δεδομένου ότι η ανθεκτικότητα αυτή περιορίζεται σε συγκεκριμένους παθότυπους.

Τέλος, στο Κεφάλαιο 6 γίνεται χαρτογράφηση της γεωγραφικής κατανομής των ΚΝΠ με τη χρήση συστημάτων γεωπληροφορικής (Geographical Information Systems, GIS). Τα αποτελέσματα των μελετών ταυτοποίησης μεταφέρονται σε ψηφιακούς χάρτες, απεικονίζοντας έτσι την εξάπλωση και τη διασπορά των ειδών και των παθότυπων των ΚΝΠ στις μολυσμένες περιοχές της Κύπρου. Η χαρτογράφηση αναμένεται να αποτελέσει σημαντικό εργαλείο για περιορισμό της εξάπλωσης των παθογόνων στο νησί και για τη στοχευμένη αντιμετώπιση τους σε επίπεδο αγροτεμαχίου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Γενική βιβλιογραφική ανασκόπηση των κυστογόνων νηματώδων της πατάτας

(Προέλευση, εξέλιξη, διασπορά, βιολογία και αντιμετώπιση)

Οι κυστογόνοι νηματώδεις της πατάτας (ΚΝΠ) είναι δύο συγγενικά είδη φυτοпараσιτικών νηματώδων του γένους *Globodera* που παρασιτούν τις ρίζες των σολανωδών φυτών και κυρίως της πατάτας (*Solanum tuberosum* L.). Οι ΚΝΠ προκαλούν σημαντικές ζημιές στην πατατοκαλλιέργεια και στην εμπορία των πατατών, τόσο σε χώρες της Ε.Ε όσο και σε τρίτες χώρες, αφού σύμφωνα με την οδηγία 2007/33/EC, τα δύο είδη *Globodera rostochiensis* (Woll.) Behrens και *G. pallida* (Stone) Behrens, συγκαταλέγονται στα παθογόνα καραντίνας για όλες τις ευρωπαϊκές χώρες, συμπεριλαμβανομένης και της Κύπρου (Anonymous, 2009). Οι ΚΝΠ προκαλούν σοβαρές ποσοτικές και ποιοτικές απώλειες που συχνά φθάνουν το 100%, με αποτέλεσμα να παρατηρείται ακόμη και εγκατάλειψη προσβεβλημένων φυτειών (Hodda & Cook, 2009). Ο συστηματικός έλεγχος της διασποράς των ΚΝΠ, καθώς και η μελέτη της βιολογίας των δύο αυτών ειδών, κρίνονται απαραίτητα στοιχεία για την καλύτερη διαχείριση και πιο αποτελεσματική αντιμετώπιση τους.

1.1 Προέλευση και εξέλιξη των ΚΝΠ

Τα δύο είδη ΚΝΠ θεωρούνται γηγενείς οργανισμοί της Λατινικής Αμερικής (Grenier *et al.*, 2001), των οποίων η εξέλιξη είναι δύσκολο να διασαφηνιστεί, καθότι και τα δύο είδη αναπτύχθηκαν στο ίδιο οικοσύστημα και επομένως διαχρονικά είχαν παράλληλη εξέλιξη (Stone, 1979). Οι Evans *et al.* (1975), αναφέρουν σε εργασία τους με θέμα τη διασπορά των ΚΝΠ στην περιοχή των Άνδεων της Λατινικής Αμερικής, ότι το είδος *G. rostochiensis* κυριαρχούσε στο νότιο γεωγραφικό πλάτος του Περού και των Βολιβιανών Άνδεων, ενώ στο βόρειο γεωγραφικό πλάτος της ίδιας περιοχής εντοπίστηκε μόνο το είδος *G. pallida*. Κατά καιρούς, έχουν αναπτυχθεί διάφορες υποθέσεις για τις αιτίες που οδήγησαν στην εξέλιξη των δύο ειδών και στο διαχωρισμό τους. Παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η φωτοπερίοδος, η αλληλεπίδραση με τον ξενιστή και ο τρόπος καλλιέργειας, συνέβαλαν στην εμφάνιση των δύο ειδών και στην εξέλιξη τους (Evans *et al.*, 1975). Επιπλέον, ο διαφορετικός τρόπος καλλιέργειας που ανέπτυξαν οι

πατατοκαλλιεργητές της Λατινικής Αμερικής, οι διαφορετικές ποικιλίες που καλλιεργούσαν και η περιορισμένη διακίνηση εδώδιμου ή πολλαπλασιαστικού υλικού (κονδύλων) παλαιότερα, πιστεύεται ότι συνέβαλαν στην εξέλιξη των ΚΝΠ και στο διαχωρισμό τους σε δύο διαφορετικά είδη. Μελέτη ταυτοποίησης και διαχωρισμού των πρωτεϊνών των ΚΝΠ υποστηρίζει ότι ο διαχωρισμός των δύο ειδών επήλθε πριν από εκατομμύρια χρόνια, χωρίς να παρουσιάζεται οποιαδήποτε ταυτόχρονη μορφολογική διαφορά μεταξύ τους (Bakker & Bouwman-Smits, 1988).

Στο ερώτημα «ποιο είδος πρωτο-υπήρχε», ο Stone (1972) θεωρεί ότι πρώτος εμφανίστηκε ο *G. rostochiensis* στη βορειοδυτική Αργεντινή και ότι στη συνέχεια μετακινήθηκε βόρεια προς το Περού. Δεδομένο θεωρείται το γεγονός ότι, ο *G. pallida* είναι το κυρίαρχο είδος στη Βολιβία, ενώ η πλειονότητα των άγριων ειδών πατάτας που δεν παρουσιάζουν γονίδια ανθεκτικότητας στους ΚΝΠ, καταγράφηκε στην Αργεντινή (Turner *et al.*, 1998). Η διαχρονική εξειδίκευση και αλληλεπίδραση μεταξύ των ΚΝΠ και των σολανωδών φυτών-ξενιστών τους, είναι παράγοντες που υποκίνησαν την εξελικτική πορεία τους και είχαν ως αποτέλεσμα τόσο τη δημιουργία νέων ειδών πατάτας που φέρουν ανθεκτικότητα στους ΚΝΠ, όσο και τη δημιουργία δύο διαφορετικών ειδών ΚΝΠ, αλλά και την περαιτέρω διαφοροποίηση διαφορετικών παθότυπων σε κάθε ένα από τα δύο είδη (Canto Saenz *et al.*, 1977).



Χάρτης 1. Οροσειρά των Άνδεων, Νότια Αμερική
(Πηγή: AFBI)

Εκτός από την καλλιεργούμενη πατάτα *S. tuberosum*, υπάρχουν και άλλα έξι είδη που καλλιεργούνται αποκλειστικά στις Άνδεις. Επιπρόσθετα, το 2001 καταγράφηκαν 199 άγρια είδη πατάτας (Εικ. 1), τα οποία ενδημούν μόνο στην Αμερική και εκτείνονται από τις νοτιοδυτικές Ηνωμένες Πολιτείες μέχρι την κεντρική Αργεντινή, τη Βολιβία, το Περού και τη Χιλή (Hijmans & Spooner, 2001).



Εικόνα 1. Εδώδιμοι κόνδυλοι άγριων ποικιλιών πατάτας
(Πηγή: GoodFood World, October 31st, 2010)

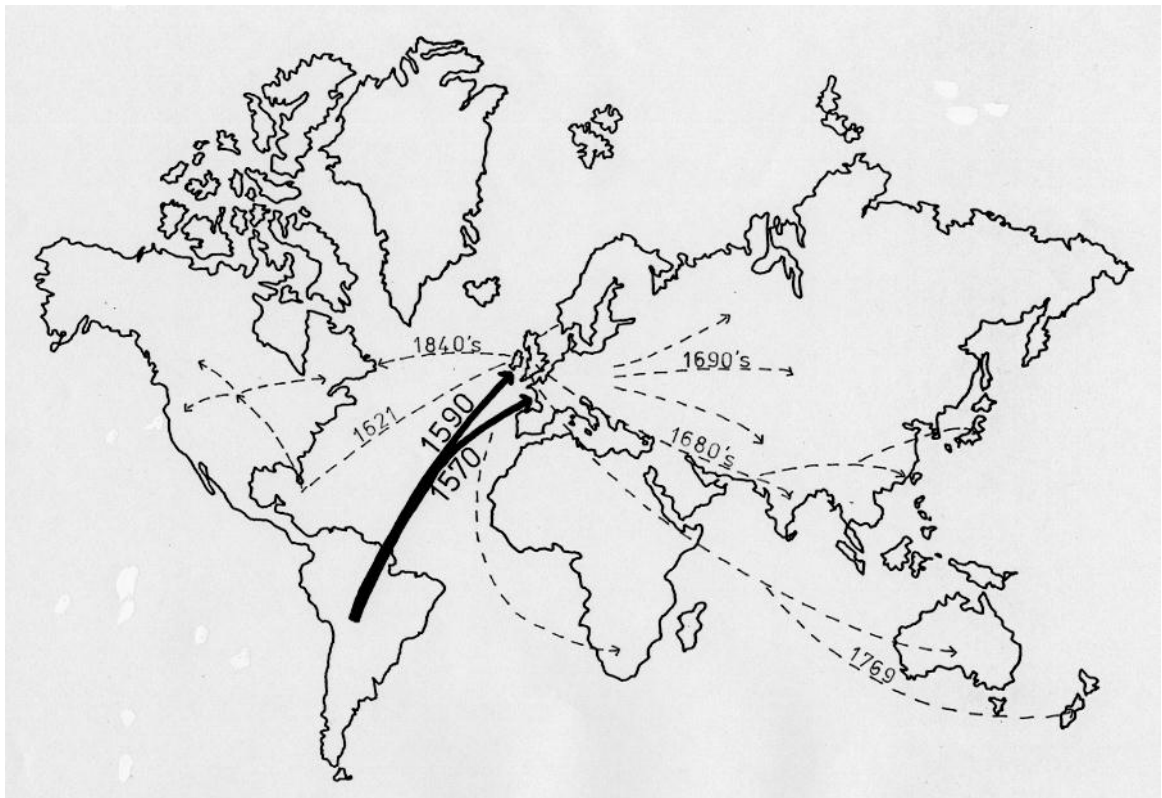
1.2 Διασπορά και εξάπλωση των ΚΝΠ

Μετά την ανακάλυψη της Αμερικής, τον 15^ο αιώνα, οι ΚΝΠ μετακινήθηκαν από την περιοχή προέλευσής τους (περιοχή των Άνδεων στη Λατινική Αμερική) προς την Ευρώπη και μετέπειτα εξαπλώθηκαν σε ολόκληρο τον πλανήτη (Χάρτης 2). Η διασπορά τους οφείλεται κυρίως στη διάδοση και εμπορία της πατάτας, του κύριου ξενιστή των ΚΝΠ, αφού λόγω του μικρού μεγέθους τους, προσκολλώνται στην επιφάνεια των κονδύλων μαζί με υπολείμματα του εδάφους ή εγκλωβίζονται μέσα στους οφθαλμούς των κονδύλων, γεγονός που τους καθιστά εξαιρετικά δύσκολα αντιληπτούς (Εικ. 2). Επιπλέον, διασπείρονται με κάθε μετακίνηση εδάφους με διάφορους τρόπους, όπως εργαλεία, ζώα, νερό κλπ. Η παρουσία των ΚΝΠ έχει αναφερθεί σε περισσότερες από 65 χώρες, εκ των οποίων 42 με μικτούς πληθυσμούς των δύο ειδών και οι υπόλοιπες με αμιγείς πληθυσμούς του *G. rostochiensis* (Anonymous, 2009).

Η πρώτη αναφορά για παρουσία κυστογόνων νηματωδών σε φυτά πατάτας στην Ευρώπη, έγινε από τον Kuhn (1881), ο οποίος παρατήρησε κύστες του φυτοπαρασιτικού νηματώδη των τεύτλων, *Heterodera schachtii* (Marks, 1998). Το 1923, ο Wollenweber διαχώρισε το νηματώδη της πατάτας από το νηματώδη των τεύτλων, ονομάζοντας τον

Heterodera rostochiensis, εξαιτίας της περιοχής Rostock στη Γερμανία, όπου είχε εντοπίσει το είδος (Marks, 1998).

Στην Κύπρο, οι ΚΝΠ αναφέρθηκαν για πρώτη φορά από τον Morris (1971). Η μορφομετρική ταυτοποίηση των δύο ειδών (*G. pallida* και *G. rostochiensis*), πραγματοποιήθηκε μια δεκαετία αργότερα από τον Philis (1981). Ο ακριβής χρόνος εισόδου των ΚΝΠ στην Κύπρο δεν είναι γνωστός, όπως και η χώρα προέλευσης τους (Zaheer *et al.*, 1996b).



Χάρτης 2. Παγκόσμιος χάρτης διασποράς των κυστογόνων νηματωδών της πατάτας από την περιοχή προέλευσης τους (Marks, 1998).

1.3 Βιολογία των ΚΝΠ

Οι ΚΝΠ είναι υποχρεωτικά φυτοπαράσιτα των σολανωδών φυτών. Η παράλληλη εξέλιξη τους με τα φυτά-ξενιστές τους, η εύκολη προσαρμοστικότητα τους σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, ο υψηλός ρυθμός αναπαραγωγής και η επιτυχής επιβίωση τους εντός των κύστεων για μεγάλο χρονικό διάστημα (>20 χρόνια), τους καθιστά ίσως τα πιο επικίνδυνα παθογόνα των σολανωδών φυτών και κυρίως της πατάτας (Urwin *et al.*, 2002; Lilley *et al.*, 2004). Τα δύο είδη ΚΝΠ θεωρούνται εδαφογενή παθογόνα, καθώς προσβάλλουν το ριζικό σύστημα των φυτών και, σε υψηλούς πληθυσμούς, προσβάλλουν επιπλέον τους κονδύλους και το λαιμό του φυτού (Evans & Stone, 1977; Marks, 1998; Turner *et al.*, 1998).

1.3.1 Ταξινόμηση

Οι ΚΝΠ συγκαταλέγονται στο γένος *Globodera* το οποίο περιλαμβάνει 14 είδη κυστογόνων νηματώδων (Πίνακας 1). Εξαιτίας των μορφολογικών και βιολογικών ομοιοτήτων που παρουσίαζαν τα δύο είδη ΚΝΠ, αυτά θεωρούνταν για πολλά χρόνια ως ένα και μοναδικό είδος, το *Heterodera rostochiensis*. Ο *H. rostochiensis* περιγράφηκε αρχικά από τον Wollenweber (1923), ο οποίος τον διαφοροποίησε από τα υπόλοιπα είδη του γένους και συγκεκριμένα από τον κυστογόνο νηματώδη των τεύτλων *H. schachtii*, εξαιτίας των μορφολογικών και μορφομετρικών διαφορών που παρουσίαζε, καθώς και της εξειδίκευσης του ως υποχρεωτικού παρασίτου της πατάτας. Αρκετά χρόνια αργότερα, παρατηρήθηκαν επιπρόσθετες μορφολογικές διαφορές ανάμεσα στα άτομα του *H. rostochiensis* (Guile, 1970; Jones *et al.*, 1970; Jones, 1970; Bouwman & Ross, 1972). Κύρια διαφορά αποτέλεσε το διαφορετικό χρώμα που παρουσίαζαν τα θηλυκά άτομα στο σώμα τους, μετά τη γονιμοποίηση και πριν την ολοκλήρωση της ανάπτυξης των εγκυστωμένων αυγών. Ο Guile (1970) παρατήρησε χρυσό χρώμα (Golden nematode) στο σώμα κάποιων θηλυκών ατόμων κατά το στάδιο της ανάπτυξης τους, ενώ σε κάποια άλλα παρατήρησε ότι το χρώμα ήταν λευκό (Pale nematode). Αυτή η διαφοροποίηση, οδήγησε στη διαίρεση του *H. rostochiensis* σε δύο είδη. Τα δεδομένα της τότε εποχής ώθησαν τους ερευνητές να μελετήσουν σε βάθος τη μορφολογία και βιολογία των δύο ειδών, με στόχο τον εντοπισμό περισσότερων διαφορών ανάμεσα στα δύο είδη. Αρκετές διαφορές βρέθηκαν τόσο στα μορφομετρικά χαρακτηριστικά, όπως είναι το μέγεθος του σώματος των προνυμφών 2^{ου} σταδίου (J2) και η περινεϊκή περιοχή των κύστεων (Green, 1971; Mulvey & Golden, 1983; Golden, 1986), όσο και σε βιολογικές παραμέτρους, αφού

παρουσιάστηκαν διαφορές στην προσβολή ή/και στην ανάπτυξη των δύο ειδών σε κλώνους και ποικιλίες ξενιστών που παρασιτούσαν (Kort *et al.*, 1977). Επιπλέον, τα δύο είδη παρουσίασαν διαφορές και στο χρόνο εκκόλαψης τους μετά την τοποθέτησή τους σε εκκρίματα ριζών πατάτας (Potato Root Diffusates, PRD). Με βάση τις νέες παρατηρήσεις, τα δύο είδη *H. rostochiensis* και *H. pallida*, πήραν την κοινή ονομασία «χρυσονηματώδης» και «λευκός νηματώδης», αντίστοιχα.

Στη δεκαετία του 1970, τα δύο είδη εντάχθηκαν στο γένος *Globodera* και μετονομάστηκαν σε *Globodera rostochiensis* και *G. pallida* (Behrens, 1975). Έκτοτε, εντάχθηκαν και άλλα είδη στο γένος *Globodera*, όπως οι *G. tabacum*, *G. achilleae* και *G. artemisiae*, τα οποία παρασιτούν τον καπνό (*Nicotiana tabacum*), ζιζάνια της οικογένειας *Solanaceae* και την αρτεμισία (*Artemisia vulgaris*), αντίστοιχα, όχι όμως την πατάτα (*Solanum tuberosum*) (Hesling, 1982; Mulvey & Golden, 1983; Golden, 1986). Για πολλά χρόνια, τα μη παρασιτικά στην πατάτα είδη του γένους *Globodera* συγγέονταν μορφολογικά με τους ΚΝΠ, γεγονός που συχνά οδηγούσε σε λανθασμένη διάγνωση, με αποτέλεσμα να εφαρμόζονται λανθασμένα και αχρείαστα μέτρα αντιμετώπισης.

Οι ερευνητές, στην προσπάθειά τους να κατανοήσουν τη βιολογία και την οικολογία των δύο ειδών ΚΝΠ, εντόπισαν σημαντικές διαφορές στις γονιδιακές αλληλεπιδράσεις που παρουσίαζαν με τους ξενιστές τους. Το κάθε είδος παρουσίαζε διαφορετικό βαθμό αναπαραγωγής σε διαφορετικά φυτά-ξενιστές (είδη και ποικιλίες του γένους *Solanum*), με αποτέλεσμα να γίνεται περαιτέρω διαχωρισμός του κάθε είδους σε παθότυπους (Kort *et al.*, 1977; Lidwine *et al.*, 1987; Nijboer H. & Parievliet J. E., 1990; Greco *et al.*, 2007; Turner *et al.*, 2009).

Πίνακας 1. Είδη του γένους *Globodera*

I. <i>Globodera achilleae</i>	II. <i>Globodera achilleae</i>
III. <i>Globodera artemisiae</i>	IV. <i>Globodera pseudorostochiensis</i>
V. <i>Globodera chaubattia</i>	VI. <i>Globodera rostochiensis</i>
VII. <i>Globodera hypolysi</i>	VIII. <i>Globodera tabacum solanacearum</i>
IX. <i>Globodera leptonepia</i>	X. <i>Globodera tabacum tabacum</i>
XI. <i>Globodera millefolii</i>	XII. <i>Globodera tabacum virginiae</i>
XIII. <i>Globodera mirabilis</i>	XIV. <i>Globodera zelandica</i>
XV. <i>Globodera pallida</i>	

1.3.2 Παθότυποι

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, η δημιουργία των ειδών *G. pallida* και *G. rostochiensis*, αλλά και η δημιουργία διαφορετικών παθότυπων σε κάθε ένα από τα δύο είδη, ήταν αποτέλεσμα της παρατεταμένης συμβίωσης μεταξύ των ΚΝΠ και των ειδών *Solanum* (Guile, 1970; McKenna & Winslow, 1972; Fuller *et al.*, 1977; Kort *et al.*, 1977). Η διαφοροποίηση των παθότυπων του κάθε είδους βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό προσβολής και αναπαραγωγής του κάθε παθότυπου επί συγκεκριμένων «διαφορικών» ξενιστών (differential hosts) του γένους *Solanum*. Οι Kort *et al.* (1977) δημοσίευσαν το πρώτο πρωτόκολλο διαχωρισμού των παθότυπων των ΚΝΠ με τη χρήση διαφορικών ξενιστών πατάτας. Το πρωτόκολλο αυτό, με κάποιες τροποποιήσεις, αποτελεί το μοναδικό εργαλείο διαχωρισμού των παθότυπων των ΚΝΠ μέχρι σήμερα (Πίνακας 2). Τις τελευταίες δεκαετίες γίνονται αρκετές προσπάθειες για εξεύρεση νέων μεθόδων διαφοροποίησης των παθότυπων σε μοριακό και βιοχημικό επίπεδο, όπως π.χ. με τη γενετική αλληλούχιση νουκλεϊκών οξέων, αμινοξέων και πρωτεϊνών (Bakker & Bouwman-Smits, 1988; Bakker *et al.*, 1992), την ηλεκτροφόριση στήλης υψηλής απόδοσης (High Performance Capillary Electrophoresis, HPCE) (Hinch *et al.*, 1998) και την ισοηλεκτρική εστίαση της υπεροξειδικής δισμουτάσης (Superoxide dismutase isoelectric focusing, IEF) (Molinari *et al.*, 2010).

Πίνακας 2. Διαχωρισμός των παθότυπων των κυστογόνων νηματώδων της πατάτας με βάση το πρότυπο που προτάθηκε από τον Kort *et al.* (1977)

Διαφορικοί ξενιστές του γένους <i>Solanum</i>	<i>Globodera rostochiensis</i>					<i>G. pallida</i>		
	Ro1	Ro2	Ro3	Ro4	Ro5	Pa1	Pa2	Pa3
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> (H ₁)	-	+	+	-	+	+	+	+
<i>S. kurtzianum</i> KTT 60.21.19	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>S. vernei</i> G-LKS 58.1642/4	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>S. vernei</i> (VT ^b) 62.33.3	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>S. vernei</i> 65.346/19	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>S. tuberosum</i> <i>multidissectum</i> (H ₂)	?	?	?	?	?	-	+	+

+ : Ευπαθής ποικιλία και μολυσματικός παθότυπος ($Pf/Pi > 1.0$),

- : Ανθεκτική ποικιλία και μη μολυσματικός παθότυπος ($Pf/Pi < 1.0$),

όπου Pi = αρχικός πληθυσμός νηματώδη και Pf = τελικός πληθυσμός νηματώδη

?: δεν υπάρχουν σαφείς πληροφορίες.

Στην Ευρώπη, παρατηρήθηκαν πέντε παθότυποι του είδους *Globodera rostochiensis* (Ro1, Ro2, Ro3, Ro4 και Ro5) και τρεις παθότυποι του είδους *G. pallida* (Pa1, Pa2 και Pa3) (Πίνακας 2). Η ταυτοποίηση των παθότυπων κρίνεται αναγκαία για την ορθή

αξιοποίηση του γενετικού υλικού πατάτας, ανάλογα με την ανθεκτικότητα του στους παθότυπους που υπάρχουν σε κάθε περιοχή. Επιπλέον, ο προσδιορισμός και η χαρτογράφηση των παθότυπων αποτελούν ένα ισχυρό εργαλείο για τη λήψη κατάλληλων μέτρων αποτροπής της εισόδου και της εξάπλωσης νέων παθότυπων σε μια χώρα ή περιοχή, μέσω της εισαγωγής βρώσιμης πατάτας και πατατοσπόρου, της μετακίνησης γεωργικών μηχανημάτων και εξοπλισμού και της μεταφοράς μολυσμένου εδάφους.

1.3.3 Βιολογικός κύκλος

Τα δύο είδη ΚΝΠ, ως υποχρεωτικά παράσιτα των σολανωδών φυτών, αρχίζουν το βιολογικό τους κύκλο ανταποκρινόμενα στην παρουσία διεγερτικών ουσιών, όπως π.χ. η solanoeclerpin A στο *Solanum tuberosum* (Benningshof, 2001), που εκκρίνονται από τις ρίζες των σολανωδών φυτών (root exudates ή root diffusates, PRD) (Rawsthorne & Brodie, 1986). Παρόλο που τα δύο είδη ΚΝΠ έχουν παρόμοιο βιολογικό κύκλο, εντούτοις διαφέρουν ως προς το βαθμό μολυσματικότητας επί των διαφόρων ποικιλιών πατάτας, το χρόνο εκκόλαψης των προνυμφών δευτέρου σταδίου J2 στην παρουσία ξενιστή και τον αριθμό των εγκυστωμένων αυγών μετά τη γονιμοποίηση (Turner & Stone, 1981; Gurr, 1992; Fukuzawa, 2007; Fuller *et al.*, 2008; Turner *et al.*, 2009; Scurrah, May 1981).

Το κινητό στάδιο του βιολογικού κύκλου ξεκινά από τα εγκυστωμένα αυγά (προνύμφες δευτέρου σταδίου, J2), τα οποία εκκολάπτονται στην παρουσία των PRD που εκκρίνονται από τις ρίζες του ξενιστή (Εικ. 3). Το ποσοστό εκκόλαψης των J2 στην παρουσία ξενιστή, φτάνει το 80% των εγκυστωμένων αυγών (Fenwick, 1940). Στην απουσία ξενιστή, οι J2 μπορούν να επιβιώσουν στο έδαφος χωρίς τροφή για περίοδο 2 εβδομάδων (Robinson *et al.*, 1987). Οι εκκολαπτόμενες J2 κατευθύνονται χημειοτακτικά προς τις ρίζες των φυτών-ξενιστών, χρησιμοποιώντας τα αμφίδια (amphids), δηλαδή τα αισθητήρια όργανα που βρίσκονται στην κεφαλική περιοχή, και ακολούθως διατρύπουν τα κυτταρικά τοιχώματα των επιδερμικών κυττάρων της ρίζας με παλινδρομικές κινήσεις του στιλέτου, σε συνδυασμό με την έκκριση πηκτινολυτικών ενζύμων και κινούνται ενδοκυτταρικά διαμέσου του φλοιώματος προς τις αγγειακές δέσμες (Cook *et al.*, 1992; Castelli *et al.*, 2006).

Αφού επιλέξουν το σημείο διατροφής τους, οι J2 ακινητοποιούνται εκκρίνοντας διαμέσου του στιλέτου διάφορα ένζυμα (κυτταρινάσες και πηκτινάσες) προς τα φυτικά κύτταρα που περιβάλλουν την κεφαλή του νηματώδη. Τα ένζυμα διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες και προκαλούν αποδιοργάνωση των πλείστων φυτικών κυττάρων

(Jones, 2008). Μικρός αριθμός κυττάρων που δεν αποδιοργανώνονται, διεγείρονται και σχηματίζουν ένα σύμπλοκο γιγάντιων κυττάρων θρέψης, το συγγύτιο (syncytium), το οποίο τροφοδοτεί το νηματώδη με θρεπτικά συστατικά (Castelli *et al.*, 2006; Jones, 2008). Αφού σχηματιστούν τα συγγύτια, οι J2 υφίστανται δύο διαδοχικές εκδύσεις και, μετά το τέταρτο προνυμφικό στάδιο, διαμορφώνονται σε αρσενικά και θηλυκά άτομα. Ο διαχωρισμός των δύο φύλων στους ΚΝΠ εξαρτάται από την ποιότητα και την ποσότητα της τροφής τους κατά τα προνυμφικά στάδια. Προνύμφες που εισέρχονται σε πλευρικές ρίζες συνήθως μετατρέπονται σε αρσενικά άτομα (Trudgill, 1967; Storey, 1984).

Μετά το 4^ο προνυμφικό στάδιο (J4), τα ενήλικα αρσενικά εξέρχονται από τις ρίζες και κινούνται προς αναζήτηση θηλυκών, χρόνος που ενδέχεται να διαρκέσει μέχρι και 10 ημέρες (Evans, 1970). Τα θηλυκά διαρρηγνύουν την επιδερμίδα και προβάλλουν τη γεννητική τους περιοχή (vulval basin) προς τα έξω, εκκρίνοντας φερομόνες για να προσελκύσουν τα αρσενικά, ενώ διατηρούν το κεφάλι ενσωματωμένο στο συγγύτιο (Greet *et al.*, 1968). Ακολούθως, τα γονιμοποιημένα θηλυκά αυξάνονται σε μέγεθος και γίνονται ευδιάκριτα ως λευκές ή χρυσές κύστεις, μορφολογικό χαρακτηριστικό για τον *G. pallida* και *G. rostochiensis*, αντίστοιχα. Σ' αυτό το στάδιο, το σώμα των γονιμοποιημένων θηλυκών αυξάνεται σημαντικά σε μέγεθος, αποκτώντας σφαιρικό σχήμα. Μέσα στη σφαιρική αυτή κατασκευή σχηματίζονται 100 - 500 αυγά. Μετά το θάνατο του ενήλικου θηλυκού ολόκληρο το σώμα του μετατρέπεται σε κύστη.

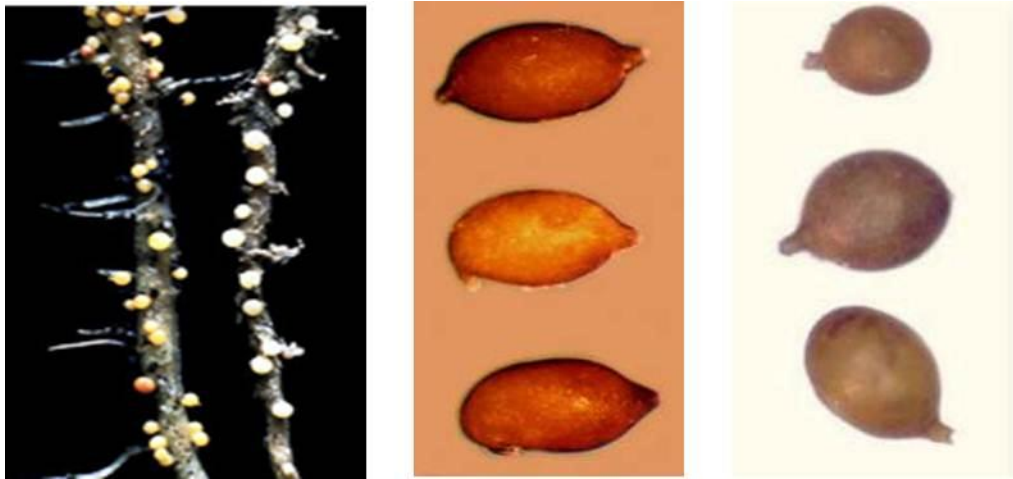
Οι ώριμες κύστεις απομακρύνονται εύκολα από τις ρίζες και πέφτουν στο έδαφος. Τα αυγά παραμένουν μέσα στις κύστεις ως προνύμφες πρώτου σταδίου (J1) και σταδιακά διέρχονται από την πρώτη έκδυση, μετατρέπόμενα σε εγκυστωμένα J2, τα οποία εισέρχονται σε κατάσταση αδράνειας (dormancy), που χωρίζεται σε δύο φάσεις: i) προσωρινής αδράνειας (quiescence) και ii) διάπαυσης (diapause) (Evans & Perry, 1976). Κατά τη φάση της προσωρινής αδράνειας, οι J2 παραμένουν αδρανείς σε μη ευνοϊκές περιόδους (π.χ. έλλειψη υγρασίας, υψηλές ή/και χαμηλές θερμοκρασίες), και στη συνέχεια εκκολάπτονται στην παρουσία εκκριμάτων ριζών πατάτας (potato root diffusates, PRD). Κατά τη φάση της διάπαυσης, οι J2 παραμένουν αδρανείς ακόμη και όταν επικρατούν ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες ή και στην παρουσία PRD. Ο διαχωρισμός ανάμεσα στις προνύμφες 2^{ov} σταδίου που είναι σε κατάσταση προσωρινής αδράνειας ή διάπαυσης δεν είναι εφικτός μέχρι τη στιγμή της εκκόλαψης, οπότε αυτά που δεν θα εκκολαφθούν θα είναι σε κατάσταση διάπαυσης.

Ο διαχωρισμός μεταξύ των δύο ειδών ΚΝΠ γίνεται με βάση τα μορφολογικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τους. Τα γονιμοποιημένα θηλυκά έχουν διαφορετικό χρώμα πριν από την ωρίμανση τους, χρυσό για τον *G. rostochiensis* και λευκό για τον *G. pallida*, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε σκούρο καφέ και στα δύο είδη (Guile, 1970).

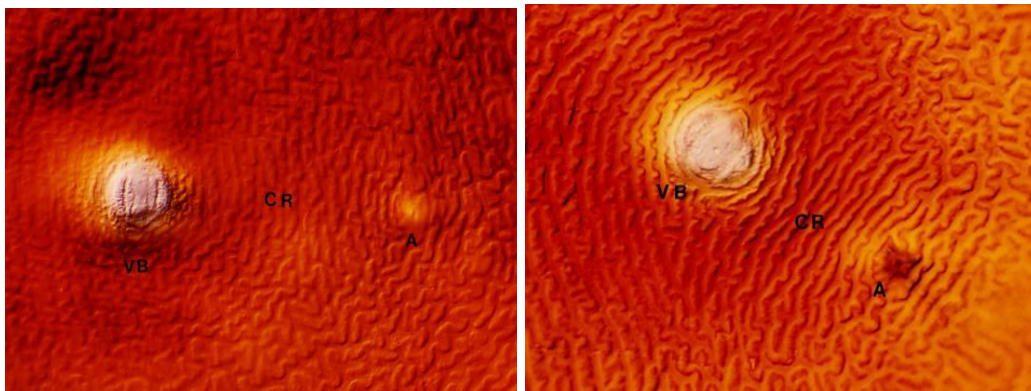
Πριν από την εισαγωγή των μοριακών τεχνικών για σκοπούς ταυτοποίησης των ΚΝΠ, εφαρμοζόταν η μορφολογική μέθοδος, η οποία περιελάμβανε: i) μετρήσεις στην περινεϊκή περιοχή των κύστεων και ii) μετρήσεις του σώματος των προνυμφών δευτέρου σταδίου (J2). Οι πιο χαρακτηριστικές μορφολογικές – μορφολογικές διαφορές μεταξύ των κύστεων των δύο ειδών ΚΝΠ εντοπίζονται στην περινεϊκή περιοχή, ανάμεσα στον γεννητικό οπλισμό (vulva) και την έδρα (anus) (Εικ. 5), όπου ο αριθμός των γραμμώσεων και η απόσταση των δύο σημείων διαφέρει ανάμεσα στα είδη του γένους *Globodera* (Green, 1971; Hesling, 1982; Golden, 1986; Skantar *et al.*, 2007) (Πίνακας 3).

Οι κυριότερες διαφορές μεταξύ των προνυμφών των δύο ειδών του γένους *Globodera* εντοπίζονται στην κεφαλική περιοχή, κυρίως στο μήκος του στυλέτου (Εικ. 6) και στους μύες που το στηρίζουν (knobs, SKW). Το στυλέτο του *G. rostochiensis* έχει μήκος 21-23μm (stylet length, SL) και οι μύες εμφανίζονται στην κοιλιακή περιοχή του σώματος, ενώ το στυλέτο του *G. pallida* έχει μήκος 21-26 μm (Πίνακας 3) και οι μύες εμφανίζονται στη νωτιαία περιοχή του σώματος (Εικ. 7) (Green, 1971; Bouwman & Ross, 1972; Hesling, 1982; Skantar *et al.*, 2007).

Πίνακας 3. Μορφολογικά χαρακτηριστικά κύστεων του γένους <i>Globodera</i> . Οι μετρήσεις (σε μm) δείχνουν το εύρος των τιμών και τον μέσο όρο σε παρένθεση.					
Species	J2 stylet length	No. of cuticular ridges between anus and vulval	Vulval basin diameter	Distance from anus to vulval basin	Granek's ratio
<i>G. rostochiensis</i>	21-23 (22)	12-31 (>14)	8-20 (<19)	37-77 (>55)	1.3-9.5 (>3)
<i>G. pallida</i>	21-26 (>23)	8-20 (<14)	18-21 (>19)	22-67 (<50)	1.2-3.5 (<3)
<i>G. tabacum</i>	19-28 (23-24)	10-14	12-33	28-85	1-4.2 (<2.8)
<i>G. achilleae</i>	24-25.5 (25)	4-5	12-18 (16)	22-34 (27)	1.3-1.9 (1.6)
Πηγή: Marks and Brodie, 1998, Chapter 6: PCN diagnostics, C. Fleming & T. Powers					

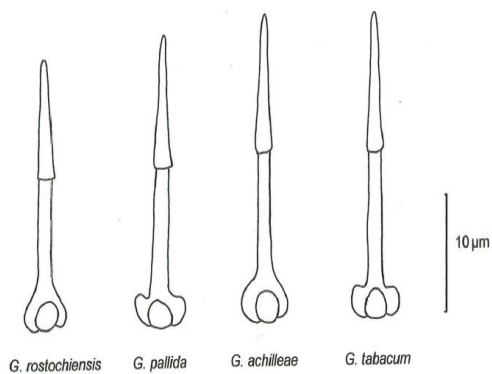


Εικόνα 4. Κύστεις των *Globodera* (αριστερά), των *Heterodera* (κέντρο) και των *Plectodera* (δεξιά).
Πηγή: AFBI.



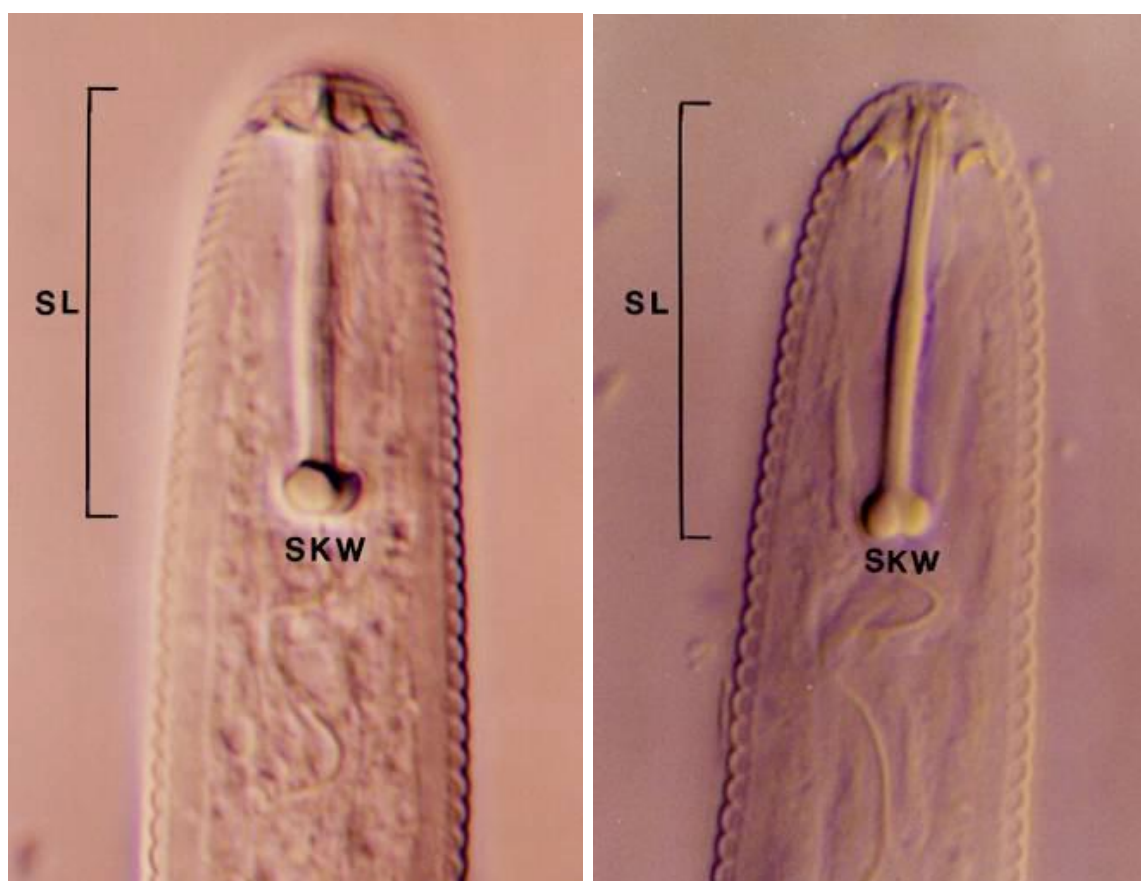
Εικόνα 5. Περινεϊκή περιοχή του *G. rostochiensis* (αριστερά) και *G. pallida* (δεξιά).

Απεικονίζονται οι γραμμώσεις (cuticular ridges, CR) μεταξύ του γεννητικού οπλισμού (Vulval Basin, VB) και έδρας (Anus, A). Πηγή: Μ. Χριστοφόρου, 2009. AFBI.



Εικόνα 6. Στιλέτα τεσσάρων ειδών του γένους *Globodera*.

Πηγή: Marks & Brodie, 1998, Chapter 6: PCN Diagnostics, C. Fleming & T. Powers.



Εικόνα 7. Κεφαλική περιοχή του *G. pallida* (αριστερά) και *G. rostochiensis* (δεξιά). Πηγή: AFBI.

1.4 Αντιμετώπιση

Μολονότι οι ΚΝΠ, αν και προσβάλλουν αρκετά είδη σολανωδών φυτών, όπως την πατάτα, ντομάτα, πιπεριά και μελιτζάνα, εντούτοις θεωρούνται ζημιογόνα παθογόνα μόνο στην καλλιέργεια της πατάτας. Σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό και Μεσογειακό Οργανισμό Φυτοπροστασίας (European and Mediterranean Plant Protection Organization, EPPO), ο βαθμός προσβολής από ΚΝΠ μετριέται με βάση τον αριθμό των αυγών ανά γραμμάριο εδάφους (Anonymous, 2009). Ο Brown (1969) αναφέρει πως το ύψος της ζημιάς, που αντιστοιχεί σε απώλεια βάρους των κονδύλων, συσχετίζεται με τον αριθμό των εγκυστωμένων αυγών ανά μονάδα εδάφους. Συγκεκριμένα, εκτίμησε ότι η απώλεια παραγωγής σε μια πατατοφυτεία ανέρχεται σε 2t/ha για κάθε 20 αυγά gr^{-1} μολυσμένου εδάφους.

Η αντιμετώπιση των ΚΝΠ εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως είναι το είδος ή τα είδη ΚΝΠ που υπάρχουν, ο βαθμός ανεκτικότητας ή ανθεκτικότητας των ποικιλιών πατάτας, η αποτελεσματικότητα των διαθέσιμων νηματωδοκτόνων, η εποχή εφαρμογής

των μέτρων αντιμετώπισης και οι κλιματικές συνθήκες στην περιοχή ανάπτυξης των ΚΝΠ (Scholte & Vos, 2000; Kerry *et al.*, 2002; Haydock *et al.*, 2006; EU, 2007; Fukuzawa, 2007; Bhattarai *et al.*, 2010).

1.4.1 Χημική αντιμετώπιση

Η χημική αντιμετώπιση των ΚΝΠ επιτυγχάνεται με τη χρήση κοκκωδών νηματωδοκτόνων, που ανήκουν κυρίως στις κατηγορίες των καρβαμιδικών και οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων (EU Pesticides Database, 2012; Τμήμα Γεωργίας, 2012). Η δυνατότητα μελλοντικής χρήσης τέτοιων χημικών ουσιών είναι αμφίβολη, καθώς έχει ήδη τροχοδρομηθεί από το 2009 η απόσυρση αρκετών νηματωδοκτόνων από την Ευρωπαϊκή αγορά, λόγω της υψηλής τοξικότητας τους προς οργανισμούς μη στόχους, της παρουσίας υπολειμμάτων στα εδάφιμα προϊόντα και των αρνητικών επιπτώσεων τους στο περιβάλλον και στην υγεία του ανθρώπου (EU, 2009). Ως εκ τούτου, υπάρχει άμεση και πιεστική ανάγκη για εξεύρεση εναλλακτικών μεθόδων και μέσων αντιμετώπισης των ΚΝΠ, που να είναι συμβατές με το περιβάλλον και να είναι αποδεκτές από την κοινωνία (Cook *et al.*, 1987; Minnis *et al.*, 2004; Osborn *et al.*, 2010).

Τα νηματωδοκτόνα που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση των ΚΝΠ και άλλων φυτοπαρασιτικών νηματωδών, εφαρμόζονται στο έδαφος κατά τη φύτευση των κονδύλων, κυρίως υπό τη μορφή κόκκων βραδείας απελευθέρωσης. Στην Κύπρο, για την αντιμετώπιση των ΚΝΠ χρησιμοποιούνται κυρίως δύο χημικά νηματωδοκτόνα σε κοκκώδη μορφή, το καρβαμιδικό oxamyl και το οργανοφωσφορικό fosthiazate. Τα δύο αυτά νηματωδοκτόνα δεν παρέχουν πλήρη προστασία στην καλλιέργεια, καθότι είναι πτητικά και εξατμίζονται σε σύντομο χρονικό διάστημα. Επομένως, τα εγκυστωμένα αυγά που δεν εκκολάπτονται κατά το σύντομο αυτό χρονικό διάστημα, διαφεύγουν της δράσης του νηματωδοκτόνου, με αποτέλεσμα να προσβάλλουν το φυτό-ξενιστή. Σε πειράματα εκκόλαψης, οι Evans *et al.* (1982) παρατήρησαν ότι ο *G. rostochiensis* εκκολάπτεται περίπου μια εβδομάδα μετά την εμβάπτιση του σε εκκρίματα ριζών πατάτας, ενώ ο *G. pallida* εκκολάπτεται περίπου 2-3 εβδομάδες αργότερα (Whitehead, 1992). Στο πλαίσιο της ολοκληρωμένης διαχείρισης των ΚΝΠ, ενδείκνυται όπως τα χημικά νηματωδοκτόνα εφαρμόζονται σε συνδυασμό με ποικιλίες που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στους ΚΝΠ (Minnis *et al.*, 2004).

1.4.2 Βιολογική αντιμετώπιση

Τα φυτά-παγίδες, οι ανθεκτικές ποικιλίες και η χρήση ωφέλιμων «νηματοδοφάγων» μικροοργανισμών, όπως βακτήρια και μύκητες, αποτελούν σημαντικά εργαλεία στη βιολογική αντιμετώπιση των ΚΝΠ (Scholte & Vos, 2000; Twomey *et al.*, 2002; Atkins *et al.*, 2003; Turner *et al.*, 2006; Pylypenko *et al.*, 2008; Tobin *et al.*, 2008). Υπό τις σημερινές συνθήκες, υπάρχει ανάγκη για εξεύρεση νέων μεθόδων αντιμετώπισης των ΚΝΠ που να είναι εκσυγχρονισμένες με τις απαιτήσεις των σημερινών αναγκών και συμβατές με το περιβάλλον και τη διασφάλιση της υγείας του ανθρώπου. Η ανάγκη αυτή επιτείνεται εξαιτίας της αυξημένης ευαισθησίας των καταναλωτών σε θέματα ποιότητας και ασφάλειας των τροφίμων, προστασίας του περιβάλλοντος και αειφορικής χρήσης των φυσικών πόρων.

1.4.2.1 Φυτά-παγίδες

Φυτά-παγίδες καλούνται τα φυτά τα οποία είτε επιδρούν αρνητικά πάνω στο βιολογικό κύκλο ενός επιβλαβούς οργανισμού, είτε τον προσελκύουν ώστε να αποφευχθεί η εξάπλωση του και η προσβολή στην κυρίως καλλιέργεια (Shelton & Badenes-Perez, 2006). Στην περίπτωση των ΚΝΠ, ως φυτά-παγίδες χρησιμοποιούνται διάφορα άγρια σολανώδη (πχ. *Solanum sysimbrifolium*, *S. nigrum*), τα οποία καλλιεργούνται σε ένα μολυσμένο αγροτεμάχιο και αφού διεγείρουν την εκκόλαψη των εγκυστωμένων αυγών, καταστρέφονται προτού προλάβει ο νηματώδης να ολοκληρώσει το βιολογικό του κύκλο και προτού το φυτό-παγίδα σποροποιήσει και καταστεί ζιζάνιο (Scholte & Vos, 2000; Scholte, 2000; Turner *et al.*, 2006). Η χρήση φυτών-παγίδων βοηθά στη μείωση του αρχικού πληθυσμού των ΚΝΠ στο έδαφος, πριν από τη φύτευση της πατάτας. Παρόλο που η χρήση φυτών πατάτας ως φυτών-παγίδων θα μπορούσε να συντελέσει στην αντιμετώπιση των ΚΝΠ αφού, ως ο κύριος ξενιστής τους, διεγείρει σε μεγάλο βαθμό την εκκόλαψη των αυγών (Turner *et al.*, 2006), εντούτοις αυτό δεν είναι οικονομικά εφικτό, λόγω του υψηλού κόστους αγοράς του πατατοσπόρου (Webley & Jones, 1981). Σε χώρες όπως η Κύπρος, ενδεχομένως να είναι εφικτή η χρήση πρώιμων ποικιλιών πατάτας, οι οποίες προορίζονται για κατανάλωση σε μικρά μεγέθη κονδύλων (25-45mm) και οι οποίες αναπτύσσονται και εκριζώνονται σε σύντομο χρονικό διάστημα, πριν οι ΚΝΠ ολοκληρώσουν το βιολογικό τους κύκλο. Σύμφωνα με τους Webley *et al.* (1981), ιδιαίτερης προσοχής χρήζει η εφαρμογή πρώιμων ποικιλιών για την αντιμετώπιση του *G. pallida*, ο οποίος εκκολάπτεται 3-4 εβδομάδες μετά τη φύτευση, οπότε η εκρίζωση των

πρώιμων κονδύλων 2 μήνες μετά τη φύτευση δεν θα επέτρεπε στο παθογόνο να ολοκληρώσει το βιολογικό του κύκλο.

Διάφορα άλλα φυτά της οικογένειας των σολανωδών, όπως π.χ. το ζιζάνιο αγριοντοματιά (*Solanum sisymbriifolium* και *S. nigrum*), αν και δεν παράγουν τη διεγερτική ουσία Solanoeclerin A, εντούτοις προκαλούν τη διέγερση των ΚΝΠ σε μεγαλύτερα ποσοστά από ότι η κοινή πατάτα (Sasaki-Crawley *et al.*, 2010). Όμως, σε περιπτώσεις μη έγκαιρης καταστροφής της αγριοντοματιάς, υπάρχει κίνδυνος εξάπλωσης του ζιζανίου στην περιοχή (Scholte & Vos, 2000; Scholte, 2000; Scholte, 2000). Ενθαρρυντικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί κατά καιρούς αναφορικά με τη χρήση φυτών-παγίδων για την αντιμετώπιση των ΚΝΠ (Scholte & Vos, 2000). Στη Γαλλία καταγράφηκε μείωση του τελικού πληθυσμού των ΚΠΝ κατά 80%, μετά την εφαρμογή φυτών-παγίδων του είδους *Solanum tuberosum ssp. andigena*, ενώ με το συνδυασμό φυτών-παγίδων και νηματοδοκτόνων, ο τελικός πληθυσμός μειώθηκε κατά 98,5% (Mugnieri *et al.*, 1984). Σύμφωνα με τους Shelton & Badenes-Perez (2006), η επιλογή ενός "φυτού-παγίδα" για την αντιμετώπιση των ΚΝΠ, θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη την ευπάθεια του σε άλλες ασθένειες και εχθρούς της πατάτας και τον κίνδυνο να καταστεί εστία μόλυνσης μιας μελλοντικής πατατοφυτείας.

1.4.2.2 Χρήση ανθεκτικών ή/και ανεκτικών ποικιλιών πατάτας

Η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών θεωρείται ως η πιο οικονομική, αποτελεσματική και φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος, στην ορθολογική αντιμετώπιση εχθρών και ασθενειών της πατάτας. Ως ανθεκτική, χαρακτηρίζεται η ποικιλία που παρεμποδίζει την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του νηματώδη στο φυτό, ενώ ανεκτική χαρακτηρίζεται η ποικιλία που, αν και επιτρέπει την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του νηματώδη, εντούτοις παρουσιάζει ικανοποιητική παραγωγή (Trudgill, 1991). Ο Ellenby (1954) παρατήρησε ότι σε κάποιες ποικιλίες του είδους *Solanum tuberosum ssp. andigena* καθώς και στο άγριο είδος *S. vernei*, δεν προκαλείται μόλυνση ή η μόλυνση δεν καταλήγει σε πολλαπλασιασμό των ΚΝΠ. Την αντίδραση αυτή θεώρησε ως ανθεκτικότητα των συγκεκριμένων ειδών/ποικιλιών προς τους ΚΝΠ, οι οποίοι την περίοδο εκείνη θεωρούνταν ότι ανήκουν σε ένα είδος, το *Heterodera rostochiensis*. Με αφορμή αυτές τις παρατηρήσεις, οι ερευνητές προχώρησαν στη διερεύνηση της αιτίας που δεν επέτρεπε την ανάπτυξη κάποιων πληθυσμών ΚΝΠ σε συγκεκριμένα είδη/ποικιλίες πατάτας καθώς και το αντίθετο. Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών κατέδειξαν, λίγα χρόνια αργότερα, την ύπαρξη δύο διαφορετικών ειδών ανάμεσα στους ΚΝΠ, του *H. rostochiensis* και του *H.*

pallida. Επιπλέον, από το κάθε είδος ΚΝΠ προέκυψαν διαφορετικοί παθότυποι, χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο διαχωρισμού με τα ανθεκτικά είδη φυτών πατάτας (Jones *et al.*, 1970; Fuller *et al.*, 1977; Kort *et al.*, 1977).

Μέχρι σήμερα, έχουν καταγραφεί τρία γονίδια ανθεκτικότητας (resistance genes, R) σε συγκεκριμένους παθότυπους των ΚΝΠ. Η παρουσία των R γονιδίων προσδίδει προστασία στο φυτό-ξενιστή, κωδικοποιώντας πρωτεΐνες που δρουν κατασταλτικά στις πρωτεΐνες παθογένειας των νηματωδών, οι οποίοι φέρουν τα αντίστοιχα γονίδια μολυσματικότητας (Vir genes) (Cabrera Poch *et al.*, 2006). Η έκφραση ανθεκτικότητας σε συγκεκριμένους παθότυπους, μέσω της σχέσης γόνου προς γόνο που παρουσιάζουν τα R γονίδια των φυτών με τα Vir γονίδια των νηματωδών, οδήγησε στη διερεύνηση του αιτίου έκφρασης της ανθεκτικότητας στο γονιδίωμα των ανθεκτικών ειδών πατάτας, όπου καταδείχτηκαν τρία γονίδια γνωστά ως H₁, H₂ και H₃. Το γονίδιο H₁ προέρχεται από το είδος *S. tuberosum* ssp. *andigena* CPC1673 (Toxopeus & Huijsman, 1953) και φέρει ανθεκτικότητα στους παθότυπους Ro1 και Ro4 του *G. rostochiensis*, το γονίδιο H₂ προέρχεται από το είδος *S. multidissectum* PH1366 (Dunnett, 1957) και προσδίδει ανθεκτικότητα έναντι του παθότυπου Pa1 του *G. pallida* και το γονίδιο H₃ προέρχεται από το είδος *S. tuberosum* ssp. *andigena* CPC2802 και CPC2775 (Fuller & Howard, 1974) και προσδίδει ανθεκτικότητα έναντι των τριών Ευρωπαϊκών παθότυπων του *G. pallida*.

Η ύπαρξη μηχανισμών ανθεκτικότητας στην πατάτα, έναντι των παθότυπων των ΚΝΠ, ήταν γνωστή από τη δεκαετία του 1950 (Ellenby, 1954). Όμως, οι έρευνες για την εξακρίβωση του τρόπου έκφρασης της ανθεκτικότητας, προχώρησαν μετά τη δεκαετία του 1970, οπότε διαπιστώθηκαν ανατομικές και ιστολογικές αλλαγές εντός του ριζικού συστήματος της πατάτας και πιο συγκεκριμένα στο σημείο θρέψης (συνγχύτιο) των προνυμφών των ΚΝΠ (Rice *et al.*, 1985; Golinowski *et al.*, 1997; Goverse, 1999). Οι Rice *et al.* (1985) παρατήρησαν αντιδράσεις υπερευαισθησίας που οδηγούσαν σε εκφυλισμό και αλυσιδωτή νέκρωση των γειτονικών κυττάρων στο σημείο θρέψης, σε φυτά που είχαν το γονίδιο H₁ κατά την προσβολή τους από τους παθότυπους Ro1 και Ro4 του *G. rostochiensis*. Στις περιπτώσεις αυτές σταματούσε η μεταφορά των θρεπτικών συστατικών από το φυτό στο σημείο θρέψης, με αποτέλεσμα το θάνατο του νηματώδη από αστία.

Μέσω της γενετικής βελτίωσης, υλοποιούνται προγράμματα δημιουργίας ποικιλιών πατάτας που φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας, προσδίδοντας στις νέες ποικιλίες πατάτας μεγάλο ή μέτριο βαθμό ανθεκτικότητας ή ανεκτικότητας σε ορισμένους παθότυπους των ΚΝΠ (Huijsman, 1970). Η δημιουργία ανθεκτικών ποικιλιών πατάτας που προορίζονται

για καλλιέργεια, είναι αποτέλεσμα διασταυρώσεων μεταξύ άγριων ειδών πατάτας που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στους ΚΝΠ (*Solanum tuberosum* ssp. *andigena*, *S. vernei*, *S. spagazzini*, *S. gourlavi*, *S. sparsipilum*, *S. multidissectum*, *S. kurtzianum*, *S. michoacanum*, *S. oplocense*, *S. chacoense*) και ποικιλιών που παρουσιάζουν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά μιας εδωδιμης ποικιλίας. Η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας ποικιλιών πατάτας έναντι των ΚΝΠ, στηρίζεται στο ρυθμό πολλαπλασιασμού (multiplication rate) των ΚΝΠ επί των ποικιλιών αυτών. Ο βαθμός ανθεκτικότητας μιας ποικιλίας εκφράζεται από τη σχέση Pf/Pi, όπου Pf είναι το ποσό του τελικού μολύσματος στο έδαφος και Pi το ποσό του αρχικού μολύσματος στο έδαφος. Ως ανθεκτικές θεωρούνται οι ποικιλίες στις οποίες ο λόγος Pf/Pi είναι μικρότερος της μονάδας (Anonymous, 2009).

Για την εξεύρεση νέων μηχανισμών ανθεκτικότητας, οι ερευνητές έστρεψαν το ενδιαφέρον τους στη γενετική παραλλακτικότητα άγριων ειδών *Solanum* που ενδημούν στην περιοχή των Άνδεων στη Λατινική Αμερική, με σκοπό τον εντοπισμό γονιδίων που εκφράζουν ανθεκτικότητα στα δύο είδη των ΚΝΠ (Grenier *et al.*, 2001; Bradshaw *et al.*, 2006; Frusciante *et al.*, 2006). Η εντατική χρήση εμπορικών ποικιλιών πατάτας με ανθεκτικότητα στους ΚΝΠ, ξεκίνησε το 1967 με την καλλιέργεια της ποικιλίας cv. Maris piper, η οποία φέρει ανθεκτικότητα στους παθότυπους Ro1 και Ro4 του *G. rostochiensis* (Huijsman, 1970). Έκτοτε έχουν δημιουργηθεί πολλές νέες ποικιλίες που φέρουν μερική ή πλήρη ανθεκτικότητα στον *G. rostochiensis*. Αντίθετα, ο αριθμός των ανθεκτικών ποικιλιών στον *G. pallida* που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση είναι περιορισμένος. Πρόσφατα, έχει εγγραφεί στη Γαλλία η ποικιλία πατάτας Pedher, η οποία παρουσιάζει πλήρη ανθεκτικότητα στους ευρωπαϊκούς παθότυπους του *G. pallida* (Pa1, Pa2 και Pa3) (Grocep, 2009).

Η ανάγκη για αξιοποίηση των ανθεκτικών ποικιλιών εντείνεται και από τη νέα Ευρωπαϊκή Οδηγία 2007/33/ΕΚ, όπου γίνεται αποδεκτό πλέον από όλα τα κράτη μέλη ότι είναι απαραίτητη η προώθηση τέτοιων ποικιλιών μέσω ολοκληρωμένων προγραμμάτων αντιμετώπισης των ΚΝΠ.

1.4.2.3 Χρήση ωφέλιμων οργανισμών

Στο περιβάλλον των ΚΝΠ υπάρχουν αρκετοί οργανισμοί που διαβιούν στο έδαφος, και πιο συγκεκριμένα στη ριζόσφαιρα των ξενιστών τους, οι οποίοι δρουν ως εχθροί ή ως βιολογικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη βιολογία και τη συμπεριφορά των ΚΝΠ. Οι βιολογικοί εχθροί των ΚΝΠ, όπως ζωικοί οργανισμοί (π.χ. αρπακτικά ακάρεα, κολέμπολα

κ.α), ή μικρόβια (π.χ. *Pochonia chlamydosporia*), είτε παρασιτούν τα εγκυστωμένα αυγά ή τις εκκολαπτόμενες προνύμφες (J2) που κινούνται προς τη ρίζα του ξενιστή είτε συμβιώνουν στις ρίζες των ξενιστών (π.χ. μυκόριζες), εμποδίζοντας την είσοδο των J2 (Ryan & Jones, 2003; Ryan & Jones, 2004; Deliopoulos *et al.*, 2007). Επιπλέον, ορισμένοι μικροοργανισμοί του εδάφους εκκρίνουν διάφορες ουσίες που διεγείρουν την εκκόλαψη των ΚΝΠ στην απουσία ξενιστή (Devine & Jones, 2000) ή επιταχύνουν την εκκόλαψη των J2 στην παρουσία ξενιστή, με αποτέλεσμα να εκτίθεται μεγαλύτερος αριθμός J2 στα χημικά νηματωδοκτόνα (Ryan *et al.*, 2000). Στελέχη του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* M. F113, παράγουν την τοξική για τους ΚΝΠ ουσία διακετυλοφλορογλουκινόλη (DAPG), που παρεμποδίζει την εκκόλαψη και τη μετακίνηση των J2 του *G. rostochiensis* προς τις ρίζες του φυτού ξενιστή (Cronin *et al.*, 1997).

Η εισαγωγή ωφέλιμων οργανισμών από μια χώρα σε άλλη και η χρήση τους ως παραγόντων βιολογικής αντιμετώπισης εχθρών και ασθενειών, δεν είναι πάντοτε εφικτή, ειδικά στις περιπτώσεις όπου οι ωφέλιμοι οργανισμοί δεν είναι γηγενείς στη χώρα εισαγωγής (Howarth, 1991). Για αυτό το λόγο, η έρευνα στράφηκε προς τη διερεύνηση και εξεύρεση γηγενών βιολογικών παραγόντων οι οποίοι να μειώνουν τους πληθυσμούς των ΚΝΠ στο έδαφος. Ο έλεγχος των ΚΝΠ μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση «νηματωδοφάγων» μυκήτων, όπως είναι ο *Pochonia chlamydosporia*, και *Plectosphaerella cucumerina* (Deliopoulos *et al.*, 2007). Πειράματα αγρού έδειξαν ότι ο μύκητας *Plectosphaerella cucumerina* μπορεί να μειώσει τον πληθυσμό των ΚΝΠ, μέχρι και 60% (Tobin *et al.*, 2008).

Η εφαρμογή οργανισμών που δρουν ως παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης των ΚΝΠ έχει πολλά μειονεκτήματα όπως: i) υψηλό κόστος μαζικής παραγωγής που συνεπάγεται και υψηλό κόστος αγοράς τους, ii) ευαισθησία της αποτελεσματικότητας τους στις κλιματικές συνθήκες, iii) παρουσία εναλλακτικής λείας στο περιβάλλον τους και, iv) πιθανή δράση τους κατά των φυτών ξενιστών (Velvis & Kamp, 1996).

1.4.2.4 Καλλιεργητικές πρακτικές

Η διαχείριση μιας πατατοφυτείας προσβεβλημένης με ΚΝΠ εναπόκειται πάντοτε στον παραγωγό και τον επιστήμονα-σύμβουλο φυτοπροστασίας. Οι παραγωγοί λαμβάνουν γραπτώς τα αποτελέσματα των επισκοπήσεων που διεξάγονται από τις υπηρεσίες του Κράτους και ανάλογα αποφασίζονται τα μέτρα που θα ληφθούν για την ορθολογική διαχείριση του προβλήματος. Οι Κύπριοι πατατοπαραγωγοί που αντιμετωπίζουν

προβλήματα με την παρουσία των ΚΝΠ στα αγροτεμάχια τους, εκτός από τη χημική μέθοδο με νηματοδοκτόνα, έχουν τη δυνατότητα να αξιοποιήσουν και άλλες μεθόδους όπως: i) αποτροπή ή περιορισμός της διασποράς των ΚΝΠ, ii) αναστροφή του εδάφους, κυρίως κατά την καλοκαιρινή περίοδο, iii) αμειψισπορά, iv) αγρανάπαυση για τουλάχιστον επτά έτη και v) χρήση πρώιμων ποικιλιών πατάτας. Αυτές οι μέθοδοι εντάσσονται στις καλλιεργητικές πρακτικές που μπορούν να υιοθετηθούν από τους παραγωγούς, με σκοπό την παρεμπόδιση και τον περιορισμό ή μείωση της προσβολής από τους ΚΝΠ (Jones, 1970; LaMondia & Brodie, 1984; Whitehead, 1998; EU, 2007).

Η διασπορά των ΚΝΠ μπορεί να αποφευχθεί ή να περιοριστεί με την εφαρμογή μέτρων και κανονισμών από μέρους του Κράτους και των ομάδων παραγωγών. Τα μέτρα αποφυγής της διασποράς των ΚΝΠ περιλαμβάνουν τη χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού (πιστοποιημένου πατατόσπορου), την απαγόρευση μετακίνησης μολυσμένου εδάφους ή κονδύλων σε αμόλυντες περιοχές καθώς και τον καθαρισμό/απολύμανση των γεωργικών μηχανημάτων πριν και μετά τη χρήση τους.

Η αναστροφή του εδάφους αποσκοπεί στην έκθεση των κύστεων στην ηλιακή ακτινοβολία και στις υψηλές θερμοκρασίες (>30 °C) κατά τους καλοκαιρινούς μήνες, με σκοπό τη θανάτωση των εγκυστωμένων αυγών που δημιουργούνται εντός των κύστεων (Lewis & Mai, 1960). Στην Κύπρο, η θερμοκρασία κατά την καλοκαιρινή περίοδο κυμαίνεται γύρω στους 35 °C. Για 60 ημέρες η θερμοκρασία υπερβαίνει τους 35 °C, ενώ σε κάποιες ημέρες πλησιάζει τους 45 °C υπό σκιά (Giannakopoulos *et al.*, 2010). Οι θερμοκρασίες αυτές θεωρούνται θανατηφόρες για τους ΚΝΠ που βρίσκονται στα επιφανειακά στρώματα του εδάφους (<10 cm) (LaMondia & Brodie, 1984). Επομένως, η αναστροφή του εδάφους τουλάχιστο 2-3 φορές κατά την καλοκαιρινή περίοδο ενδεχομένως να μειώνει την ποσότητα του μολύσματος σε σημαντικό βαθμό.

Η εναλλαγή καλλιεργειών με φυτά μη ξενιστές, στο πλαίσιο προγραμμάτων αμειψισποράς, συμβάλλει στη θανάτωση περίπου του 20-30% των εγκυστωμένων αυγών κάθε χρόνο, εξαιτίας της αυθόρμητης εκκόλαψης, της εκκόλαψης λόγω των διεγερτικών ουσιών που παράγονται από μικροοργανισμούς που διαβιούν στο έδαφος καθώς και της προσβολής των ΚΝΠ από παράσιτα (Kerry, 1995; Marks, 1998; Jacobs *et al.*, 2003). Η εφαρμογή της αγρανάπαυσης για επτά τουλάχιστο έτη, μπορεί να μειώσει το αρχικό μόλυσμα κατά 90%, λόγω του ότι κάθε χρόνο εκκολάπτεται αυθόρμητα περίπου το 10% των εγκυστωμένων αυγών των ΚΝΠ (Winfield, 1965). Οι προνύμφες που εκκολάπτονται αυθόρμητα δεν βρίσκουν ξενιστή, με αποτέλεσμα να πεθαίνουν από ασιτία. Κατά την

αγρανάπαυση θα πρέπει να καταστρέφονται τα ζιζάνια της οικογένειας των σολανωδών, τα οποία ενδεχομένως να είναι ξενιστές των ΚΝΠ (Evans & Stone, 1977).

1.4.2.5 Ολοκληρωμένη διαχείριση

Σκοπός της ολοκληρωμένης διαχείρισης της παραγωγής και της ολοκληρωμένης φυτοπροστασίας είναι η μείωση ή η ελαχιστοποίηση ή ακόμα και ο αποκλεισμός (όπου είναι εφικτό) της χρήσης επικίνδυνων χημικών εισροών και η υιοθέτηση μεθόδων φιλικών προς το περιβάλλον και τον άνθρωπο. Σύμφωνα με την οδηγία 2007/33/EC της Ευρωπαϊκής Ένωσης, τα κράτη μέλη πρέπει να υιοθετούν και να λαμβάνουν μέτρα για την ορθολογική διαχείριση των ΚΝΠ, ώστε να παρεμποδίζουν την εξάπλωση τους σε αμόλυντα εδάφη. Στο πλαίσιο της ολοκληρωμένης διαχείρισης των ΚΝΠ, οι αρμόδιοι φορείς, όπως το Τμήμα Γεωργίας του Υπουργείου Γεωργίας, Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος, συστήνουν στους παραγωγούς την εφαρμογή των ακόλουθων μέτρων (EU, 2007):

- I. Χρήση ανθεκτικών ποικιλιών.
- II. Χρήση νηματωδοκτόνων ουσιών στις συνιστώμενες ή μειωμένες δόσεις.
- III. Εφαρμογή τριετούς αμειψισποράς.
- IV. Εφαρμογή επταετούς αγρανάπαυσης (σε περιπτώσεις έντονων προσβολών).
- V. Εφαρμογή μέτρων υγιεινής για αποφυγή της μετακίνησης των ΚΝΠ.
- VI. Απαγόρευση μετακίνησης εδάφους και πολλαπλασιαστικού υλικού σε αμόλυντες περιοχές.

Λανθασμένες ενέργειες από μέρους των παραγωγών, όπως π.χ. η αποκλειστική εφαρμογή είτε των ανθεκτικών ποικιλιών είτε των νηματωδοκτόνων, θα πρέπει να αποφεύγονται αφού: i) λόγω της υψηλής πίεσης επιλογής των ανθεκτικών ποικιλιών, αυξάνεται ο κίνδυνος εμφάνισης νέων παθότυπων, με αποτέλεσμα την απώλεια της ανθεκτικότητας, ii) με αποκλειστική εφαρμογή νηματωδοκτόνων υπάρχει κίνδυνος να αναπτυχθούν ανθεκτικοί πληθυσμοί στα νηματωδοκτόνα. Στο πλαίσιο ενός ολοκληρωμένου συστήματος διαχείρισης της πατάτας από προσβολές με ΚΝΠ, συστήνεται η συνδυασμένη εφαρμογή των δύο αυτών μεθόδων. Απαραίτητες προϋποθέσεις για την ορθή χρήση των ανθεκτικών ποικιλιών και την ορθολογική εφαρμογή των νηματωδοκτόνων, είναι ο καθορισμός των ειδών και η ταυτοποίηση των παθότυπων των ΚΝΠ καθώς και ο ποσοτικός προσδιορισμός του ζωντανού μολύσματος

των ΚΝΠ στο έδαφος. Οι πιο πάνω προϋποθέσεις εντάσσονται και στην οδηγία της Ε.Ε., 2007/33/ΕC που συντάχθηκε στις 11 Ιουνίου του 2007 για την αντιμετώπιση των ΚΝΠ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Ανίχνευση και ταυτοποίηση των κυστογόνων νηματωδών της πατάτας στην Κύπρο με μορφολογικές και μοριακές μεθόδους

2.1 Περίληψη

Η πιο πρόσφατη μελέτη ταυτοποίησης των ΚΝΠ στην Κύπρο πραγματοποιήθηκε την δεκαετία του 1990 (Zaheer *et al.*, 1996b). Από τότε, γίνονται επισκοπήσεις ανά τακτά χρονικά διαστήματα σε τεμάχια που καλλιεργούνται με πατάτες, με σκοπό την ανίχνευση κύστεων. Για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες εδάφους σε ολόκληρη την ελεύθερη Κύπρο από αγροτεμάχια που καλλιεργούνται εντατικά με πατάτα, με στόχο την ταυτοποίηση των ειδών των ΚΝΠ, με δύο μεθόδους: i) τη μορφολογική – μορφομετρική και ii) τη μοριακή. Στη μορφολογική-μορφομετρική μέθοδο έγιναν παρατηρήσεις στην περινεϊκή περιοχή των κύστεων και μέτρηση των γραμμώσεων μεταξύ του γεννητικού οπλισμού και της έδρας, καθώς επίσης και μετρήσεις του μεγέθους του σώματος και του στιλέτου των εγκυστωμένων προνυμφών δευτέρου σταδίου (J2). Η μοριακή μέθοδος ταυτοποίησης περιλάμβανε αντιδράσεις συμβατικής PCR (Co-PCR), κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν οι εξειδικευμένοι εκκινητές PITSr3 για τον *G. rostochiensis* και PITSr4 για τον *G. pallida*, σε συνδυασμό με τον εκκινητή ITS5. Οι εκκινητές αυτοί διαφοροποιούν τα δύο είδη και δίνουν προϊόν στις 434 και 256 βάσεις ,αντίστοιχα (Bulman & Marshall, 1997). Τα αποτελέσματα έδειξαν την παρουσία και των δύο ειδών ΚΝΠ στις ακόλουθες περιοχές: Ορμήδεια, Ξυλοφάγου, Λιοπέτρι, Σωτήρα, Άχνα, Ξυλοτύμπου και Αυγόρου.

2.2 Εισαγωγή

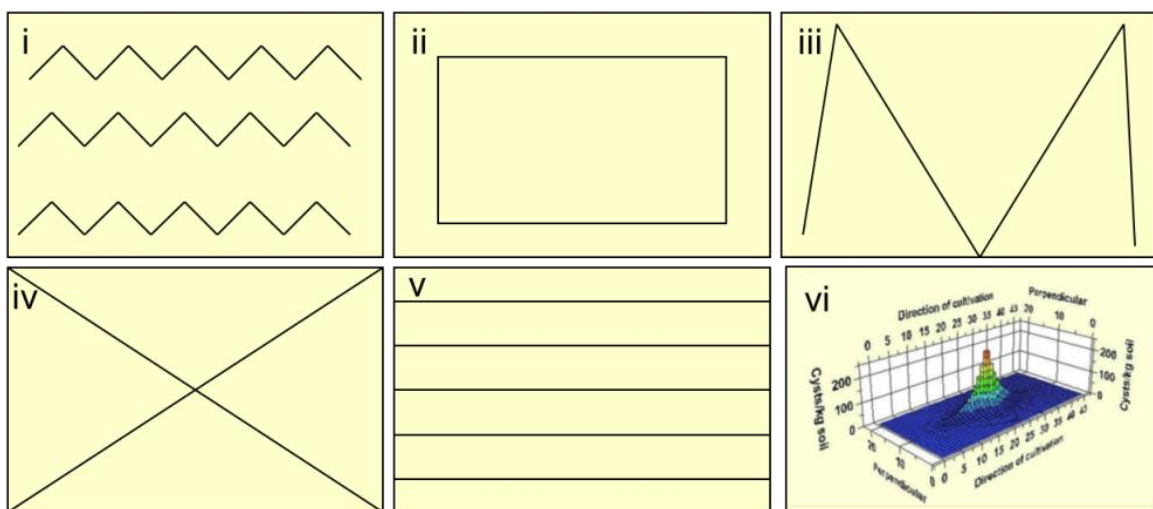
Οι ΚΝΠ είναι παθογόνα εδάφους τα οποία δε διακρίνονται εύκολα με γυμνό μάτι. Η ανίχνευση και ταυτοποίηση τους είναι χρονοβόρα και έχει υψηλό κόστος και απαιτήσεις σε εξειδικευμένο ανθρώπινο δυναμικό (Perry, 1994). Ο Ευρωπαϊκός και Μεσογειακός Οργανισμός Προστασίας Φυτών (EPPO), αναγνωρίζει και προτείνει δύο μεθόδους ανίχνευσης των *Globodera rostochiensis* και *G. pallida*: i) δειγματοληψίες εδάφους και ii) δειγματοληψίες φυτών για παρατήρηση ανάπτυξης θηλυκών νηματωδών στις ρίζες (Anonymous, 2009). Η πρώτη μέθοδος είναι η πιο κοινή και χρησιμοποιείται σχεδόν από όλα τα εργαστήρια παγκοσμίως.

Οι δειγματοληψίες εδάφους γίνονται με σκοπό: i) να ανιχνευθεί και ταυτοποιηθεί το παθογόνο, ii) να προσδιοριστεί η ποσότητα του μολύσματος των ΚΝΠ σε ένα αγροτεμάχιο, σε περίπτωση ανίχνευσης του και iii) να προταθούν μέτρα για την αντιμετώπιση του προβλήματος (Anonymous, 2009). Κατά τη δειγματοληψία λαμβάνονται υπόψη παράγοντες όπως η ποσότητα του εδάφους των δειγμάτων, το βάθος δειγματοληψίας, η απόσταση μεταξύ των σημείων δειγματοληψίας και η πορεία λήψης των δειγμάτων (οριζόντια δειγματοληψία) (Southey, 1974).

Σε δειγματοληψίες εδάφους που στοχεύουν στην ανίχνευση των ΚΝΠ, λαμβάνεται ποσότητα εδάφους ίση με 1500 gr/εκτάριο από τουλάχιστον 100 σημεία εντός του τεμαχίου (15 γραμμάρια ανά σημείο) (Anonymous, 2009). Στην Κύπρο, η ποσότητα εδάφους που λαμβάνεται είναι ίση με 250 gr/δεκάριο, εξαιτίας του μικρού μεγέθους των αγροτεμαχίων (Τμήμα Γεωργίας, 2005). Η δειγματοληψία γίνεται σε βάθος 10 cm, ώστε να ληφθούν κύστει που να περιέχουν ζωντανό μολύσμα, καθότι στα επιφανειακά στρώματα οι νηματώδεις ενδέχεται να είναι νεκροί, εξαιτίας της έκθεσης τους στην έντονη ηλιακή ακτινοβολία και στις υψηλές θερμοκρασίες του καλοκαιριού (Been & Schomaker, 2000).

Η πορεία δειγματοληψίας σε ένα αγροτεμάχιο λαμβάνει υπόψη το σχήμα και το μέγεθος του τεμαχίου, την ποσότητα εδάφους που θα ληφθεί και την κατεύθυνση των γεωργικών μηχανημάτων κατά την καλλιέργεια. Για τη δειγματοληψία εδάφους έχουν εφαρμοστεί πέντε διαφορετικοί τρόποι: i) ζιγκ-ζαγκ, ii) περιμετρικά του τεμαχίου, iii) σχήμα W, iv) χιαστή (X) και v) γραμμικό (Εικ. 8) (Turner, 1993). Σε δειγματοληψίες ρουτίνας χρησιμοποιείται η μέθοδος W, ενώ σε αγροτεμάχιο όπου υπάρχει υποψία για την παρουσία ΚΝΠ, χρησιμοποιείται η μέθοδος ζιγκ ζαγκ (Εικ. 8). Κατά καιρούς έχουν

προταθεί διάφοροι τρόποι δειγματοληψίας, οι οποίοι περιλαμβάνουν διαφορετική ποσότητα εδάφους και απόσταση μεταξύ των σημείων. Το πιο κοινό εργαλείο συλλογής εδάφους είναι ο δειγματολήπτης εδάφους τύπου ‘core’ (Εικ. 9). Ο αριθμός των σημείων δειγματοληψίας σε κάθε αγροτεμάχιο εξαρτάται κυρίως από τη διάμετρο του σωλήνα, τον τύπο του εδάφους και το μέγεθος του τεμαχίου, έτσι ώστε να λαμβάνεται η απαιτούμενη ποσότητα εδάφους ανά τεμάχιο (Turner, 1993; Been & Schomaker, 2000).

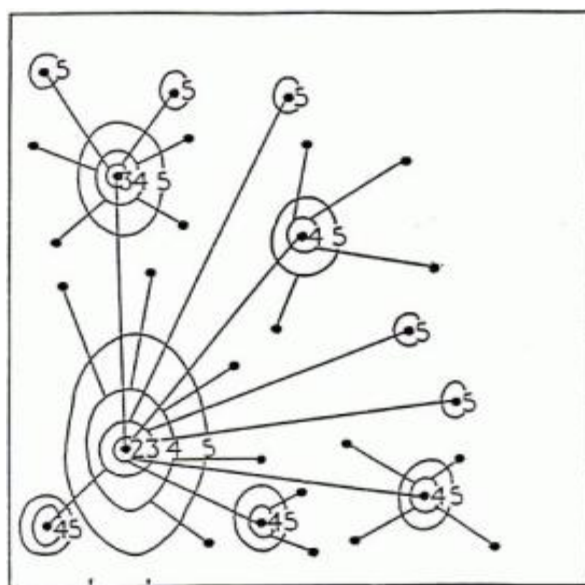


Εικόνα 8. Τρόποι δειγματοληψίας από τεμάχιο μολυσμένο με ΚΝΠ

i) ζιγκ ζαγκ, ii) περιμετρικά του τεμαχίου, iii) σχήμα W, iv) χιαστή (X), v) γραμμικό και vi) κλιμακωτή διασπορά των ΚΝΠ.



Εικόνα 9. Σωλήνας δειγματοληψίας εδάφους τύπου ‘core’.



Εικόνα 10. Μοντέλο διασποράς των ΚΝΠ σε μολυσμένο αγροτεμάχιο μετά από 5 χρόνια εντατικής καλλιέργειας.

Το σημείο 1^η δείχνει την πρώτη γενεά ενώ το σημείο 5 δείχνει την πέμπτη γενεά.

Η εξαγωγή κύστεων από το έδαφος στηρίζεται εξολοκλήρου στην ιδιότητα τους να επιπλέουν, αφού η βαρύτητα των ώριμων κύστεων είναι μικρότερη από αυτή του νερού (Andersen, 1956; Kimpinski & Platt, 1983). Σε περιπτώσεις που ένα δείγμα περιέχει μεγάλο ποσοστό οργανικής ουσίας, η οποία επιπλέει μαζί με τις κύστες, αντί για νερό χρησιμοποιείται οργανικός διαλύτης, πχ. ακετόνη ή αιθανόλη (Seinhorst, 1974). Το έδαφος πρέπει να είναι πλήρως αποξηραμένο και απαλλαγμένο από μεγάλους σβώλους (Εικ. 11-3). Τα εργαλεία εξαγωγής κύστεων ποικίλουν, τόσο στην περιπλοκότητα τους όσο και στην αποτελεσματικότητά τους. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται από τα πλείστα εργαστήρια για την εξαγωγή των κύστεων είναι: (i) Beaker method, (ii) Fenwick can, (iii) Wye washer, (iv) Schuiling centrifuge και (v) Automated carousel (Εικ. 12) (Fenwick, 1940; Southey, 1986; Bellvert *et al.*, 2008). Η συλλογή των κύστεων και η καταμέτρηση των εγκυστωμένων αυγών γίνονται κάτω από το στερεοσκόπιο σε μεγέθυνση 10X και 40X, αντίστοιχα.



Εικόνα 11. Μέθοδοι εξαγωγής κύστεων από χώμα.

1. Beaker, 2. Fenwick can, 3. Αποξήρανση εδάφους, 4. Schuiling centrifuge, 5. Automated carousel και 6. Συλλογή κύστεων και οργανικής ύλης από διηθητικό χαρτί.

Η ταυτοποίηση των ΚΝΠ παλαιότερα γινόταν με τη χρήση διαφορικών ξενιστών του γένους *Solanum* (Jones *et al.*, 1970), καθώς και με βάση μορφολογικά / μορφομετρικά χαρακτηριστικά των κύστεων και των προνυμφών δευτέρου σταδίου (J2) (Bouwman & Ross, 1972; Mulvey & Golden, 1983). Η ταυτοποίηση και η διαφοροποίηση των δύο ειδών ΚΝΠ, *Globodera rostochiensis* και *G. pallida*, αλλά και ο διαχωρισμός τους από άλλα είδη του γένους *Globodera*, επιτυγχάνεται με τη χρήση βιοχημικών, ορολογικών και μοριακών μεθόδων, όπως η εστίαση ισοηλεκτρικού σημείου (Isoelectric focusing, IEF), οι ανοσοενζυμικές δοκιμές (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA) και η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) (Ibrahim *et al.*, 2001).

Σήμερα, η επικρατέστερη μέθοδος ταυτοποίησης των ΚΝΠ είναι η PCR, η οποία αποδείχθηκε το καταλληλότερο εργαλείο για πολλά διαγνωστικά εργαστήρια, λόγω της ταχύτητας, της αξιοπιστίας, της ευελιξίας και του σχετικά χαμηλού κόστους, αν ληφθεί υπόψη ο χρόνος που εξοικονομείται σε σύγκριση με τη χρήση της μορφολογικής ταυτοποίησης. Για βελτιστοποίηση της μεθόδου, αρκετοί ερευνητές σχεδίασαν εκκινητές στοχεύοντας στις περιοχές ITS1, ITS2, 5.8S, 18S και 28S rRNA (Ferris *et al.*, 1995; Donn *et al.*, 2008; Holterman, 2008).

Τα προϊόντα της PCR, μετά από πέψη με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων (restriction enzymes), δίνουν πολλαπλά προϊόντα διαφόρων μοριακών βαρών. Η διαφοροποίηση των ειδών προκύπτει από τις διαφορές που έχουν τα μοριακά βάρη σε πηκτή αгарόζης (Bulman & Marshall, 1997; Bendezu *et al.*, 1998; Fullaondo *et al.*, 1999; Reid, 2009). Οι Bulman & Marshall (1998) για το κάθε είδος ΚΝΠ, δημοσίευσαν εξειδικευμένους εκκινητές τους οποίους χρησιμοποίησαν σε αντιδράσεις πολλαπλής PCR (multiplex PCR). Οι εκκινητές αυτοί στόχευαν στην ITS περιοχή του γονιδιακού DNA, ενισχύοντας προϊόν 256 και 434 βάσεων για τον *G. pallida* και *G. rostochiensis*, αντίστοιχα.

Οι ενέργειες που πραγματοποιούνται μέχρι σήμερα στην Κύπρο για τον εντοπισμό των ΚΝΠ σε αγροτεμάχια όπου καλλιεργείται η πατάτα, αρκούνται στη δειγματοληψία εδάφους και τη συλλογή και καταμέτρηση των κύστεων. Για την ορθολογική διαχείριση των ΚΝΠ, όμως, είναι απαραίτητη η ορθή ταυτοποίηση των ειδών, η ποσοτικοποίηση του μολύσματος και ο διαχωρισμός και ταυτοποίηση των παθότυπων. Η ορθή διάγνωση της ταυτότητας του/των παθογόνου/ων που αναπτύσσονται σε ένα αγροτεμάχιο, θα βοηθήσει στη σωστή καθοδήγηση των παραγωγών για αποτελεσματική αντιμετώπιση των δύο φυτοπαρασιτικών νηματωδών.

Η εργασία που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2, είχε ως σκοπό την ανίχνευση και ταυτοποίηση των δύο ειδών ΚΝΠ σε αγροτεμάχια όπου καλλιεργούνται πατάτες, στις κυριότερες περιοχές παραγωγής πατατών της ελεύθερης Κύπρου (Χάρτης 3). Για το σκοπό αυτό έγιναν τόσο μορφολογικές / μορφομετρικές παρατηρήσεις κύστεων (Εικ. 12) και προνυμφών δευτέρου σταδίου (J2), όσο και μοριακός χαρακτηρισμός των δύο ειδών σε αντιδράσεις συμβατικής PCR (Co-PCR) με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών.



Χάρτης 3. Δορυφορικός χάρτης της Κύπρου.

Η κόκκινη γραμμή διαχωρίζει τις ελεύθερες περιοχές (νότια) από τις κατεχόμενες περιοχές (βόρεια) της Κύπρου. Οι λευκές γραμμές απεικονίζουν τα σύνορα των επαρχιών. (Google Earth, 2012).



Εικόνα 12. Κύστεις των ΚΝΠ (Μ. Χριστοφόρου, 2008, ΤΕΠΑΚ).

2.3 Υλικά και Μέθοδοι

2.3.1 Δειγματοληψίες εδάφους

Τα δείγματα εδάφους λήφθηκαν κατά την περίοδο Ιανουαρίου – Ιουνίου 2008, από πατατοφυτείες στις ακόλουθες περιοχές: i) 70 δείγματα από 4 κοινότητες στην επαρχία Λευκωσίας: Ακάκι (20), Περιστερώνα (15), Ορούντα (15) και Αστρομερίτης (20), ii) 3 δείγματα από την κοινότητα Αχέλιας στην επαρχία Πάφου, iii) 3 δείγματα από την κοινότητα Κολοσσιού στην επαρχία Λεμεσού, iv) 124 δείγματα από 4 κοινότητες στην επαρχία Λάρνακας: Άχνα (13), Ξυλοτύμπου (10), Ορμήδεια (45) και Ξυλοφάγου (56) και v) 76 δείγματα από 3 κοινότητες στην επαρχία Αμμοχώστου: Λιοπέτρι (23), Σωτήρα (27) και Αυγόρου (26) (Χάρτης 4). Ο αριθμός, το φύλλο/σχέδιο (Φ/Σ) και η γεωγραφική θέση του κάθε τεμαχίου καταγράφονταν με τη βοήθεια Συστήματος Θεσιθεσίας (Global Positioning System, GPS) και συστήματος ArcGIS, στο οποίο αργότερα προστέθηκαν και όλες οι σχετικές πληροφορίες που αφορούσαν τους ΚΝΠ.



Χάρτης 4. Δορυφορικός χάρτης της Κύπρου όπου παρουσιάζονται οι περιοχές δειγματοληψίας εδάφους.

Για τη διεξαγωγή της δειγματοληψίας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ζγκ ζαγκ. Οι αποστάσεις μεταξύ των σημείων δειγματοληψίας ήταν περίπου 5m (8 βήματα). Η συλλογή του εδάφους από κάθε τεμάχιο γινόταν σε βάθος 10-20 cm, με τη βοήθεια δειγματολήπτη

εδάφους χωρητικότητας 25 ml. Κάθε δείγμα τύγγανε ομογενοποίησης σε πλαστικό δοχείο χωρητικότητας 2L, ενώ για την εξαγωγή των κύστεων χρησιμοποιήθηκε ποσότητα εδάφους 1kg/δεκάριο. Ακολούθως, όλα τα δείγματα εδάφους μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο Νηματοδολογίας του Τμήματος Γεωργίας (Υπουργείο Γεωργίας, Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος), όπου αποξηράνθηκαν και κρατήθηκαν για περαιτέρω μελέτη.

2.3.2 Εξαγωγή κύστεων

Για την εξαγωγή των κύστεων από τα αποξηραμένα δείγματα εδάφους, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Fenwick can (Fenwick, 1940). Με τη μέθοδο αυτή, κάθε δείγμα εδάφους τοποθετείται σε κόσκινο διαμετρήματος 850 μm της συσκευής Fenwick (Εικ. 13. 1Α). Με συνεχή ροή νερού, οι κύστεις και όλα τα υλικά που έχουν διάμετρο μικρότερη των 850 μm διέρχονται από το κόσκινο και καταλήγουν στο εσωτερικό της συσκευής (Εικ. 13. 1Β). Τα διάφορα ανόργανα σωματίδια του εδάφους καθιζάνουν λόγω βαρύτητας ενώ τα οργανικά υλικά (κύστεις, σπόροι, φυτικά υπολείμματα κλπ), επειδή επιπλέουν, εξέρχονται από το στόμιο εκροής (Εικ. 13. 1Γ) και καταλήγουν σε δεύτερο κόσκινο διαμέτρου 250 μm (Εικ. 13. 1Δ). Τα οργανικά υλικά που συλλέγονται στο δεύτερο κόσκινο, οδηγούνται με τη βοήθεια νερού, σε χωνί με διηθητικό χαρτί (Εικ. 13. 2). Αφού ηρεμήσει το υπερκείμενο μέσα στο διηθητικό χαρτί, προστίθεται μία σταγόνα απορρυπαντικού Tween 20, για να μετακινηθούν οι κύστεις προς τα τοιχώματα του διηθητικού χαρτιού. Τέλος, το διηθητικό χαρτί στο οποίο παρέμειναν οι κύστεις και τα οργανικά κατάλοιπα, αφήνεται να αποξηραθεί. Ακολούθως, με τη βοήθεια στερεοσκοπίου συλλέγονται οι κύστεις (Εικ. 13. 3-4) και αποθηκεύονται σε θερμοκρασία 4 °C.

2.3.3 Μέτρηση κύστεων και εγκυστωμένων αυγών

Οι κύστεις που εξάχθηκαν από το έδαφος (βλ. 2.3.2) μετρήθηκαν κάτω από στερεοσκόπιο σε μεγέθυνση 10X. Ακολούθως, συλλέχθηκαν κύστεις που αναλογούσαν σε 100 gr εδάφους και χρησιμοποιήθηκαν για την καταμέτρηση των εγκυστωμένων αυγών. Οι κύστεις διαρρηγνύονταν με τη χρήση νυστεριού σε τρυβλία Petri που περιείχαν 3,5 ml αποστειρωμένου νερού. Τα τρυβλία που χρησιμοποιήθηκαν ήσαν χαραγμένα με τετράγωνα εμβαδού 0,5 cm² (counting dish). Ο αριθμός των αυγών μετρήθηκε με μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 40X και οι τιμές που καταγράφηκαν εκφράστηκαν ως αυγά/γραμμάριο εδάφους.



Εικόνα 13. Διαδικασία εξαγωγής κύστεων με τη μέθοδο Fenwick can.

(1) συσκευή Fenwick, (2) συλλογή των υλικών επίπλευσης σε διηθητικό χαρτί, (3) συλλογή κύστεων κάτω από το στερεοσκόπιο και (4) παρατήρηση κύστεων σε στερεοσκόπιο μεγέθυνσης 10X. (Μ. Χριστοφόρου, 2009, AFBI).

2.3.4 Μοριακή ταυτοποίηση

Εξαγωγή DNA: Η εξαγωγή ολικού DNA έγινε με τη μέθοδο των σπηλών πυριτίου χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο του εμπορικού σκευάσματος DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen Ltd, West Sussex, UK). Από κάθε δείγμα εδάφους που βρέθηκε μολυσμένο, συλλέχθηκαν 20 κύστεις, οι οποίες τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένους μικροσωλήνες

(Eppendorf), χωρητικότητας 1,5 ml. Σε κάθε μικροσωλήνα προστέθηκαν 50 µl Buffer ATL και οι κύστει διαρρήχθηκαν με αποστειρωμένο νυστέρι για να απελευθερωθούν τα αυγά. Στη συνέχεια, τα δείγματα εμβαπτίστηκαν σε υγρό άζωτο για 1 min και ακολούθως τοποθετήθηκαν σε θερμική πλάκα στους 100 °C για 2 min. Η διαδικασία υγρού αζώτου-θέρμανσης επαναλήφθηκε 5 φορές, με ενδιάμεση ομογενοποίηση (vortex) των δειγμάτων, με στόχο τη διάρρηξη όλων των κυττάρων του σώματος των νηματωδών και την εξαγωγή ολόκληρης της ποσότητας DNA. Στη συνέχεια, σε κάθε μικροσωλήνα προστέθηκαν 130 µl Buffer ATL, για λύση των κυττάρων και ελευθέρωση του DNA, και 20 µl πρωτεΐνωση K, η οποία προφυλάσσει το DNA από τις εξωνουκλεάσες και υδρολύει τις πρωτεΐνες που ενδέχεται να δρουν ως παρεμποδιστές στην PCR. Ακολούθησε ομογενοποίηση του μείγματος και επώαση στους 56 °C για δύο ώρες, ώστε τα κύτταρα των νηματωδών να υποστούν πλήρη λύση. Ανά 30 λεπτά γινόταν ομογενοποίηση των υλικών. Μετά την επώαση, προστέθηκαν 200 µl Buffer AL (χλωριούχο άλας της γουανιδίνης), το οποίο δεσμεύει το DNA, και ακολούθησε ομογενοποίηση για 15s. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 200 µl αιθανόλης (96 – 100%) και ακολούθησε ομογενοποίηση για 15s, για απομάκρυνση των οργανικών υλικών (πρωτεϊνών, λιπιδίων κλπ) από το δείγμα.

Το υλικό μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένους σωλήνες - κολώνες που περιείχαν μεμβράνη πυριτίου (silica-membrane spin columns), χωρητικότητας 100 µg DNA. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 6.000 x g για ένα λεπτό. Οι κολώνες τοποθετήθηκαν σε καθαρούς σωλήνες και μέσα στις κολώνες προστέθηκαν 500 µl Buffer AW1 (guanidine hydrochloride), για καθαρισμό της μεμβράνης και απομάκρυνση ανεπιθύμητων ουσιών, όπως πρωτεΐνες, ένζυμα καθώς και άλλοι παρεμποδιστές της PCR. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 6.000 x g για ένα λεπτό. Οι κολώνες τοποθετήθηκαν εκ νέου σε καθαρούς σωλήνες, μέσα στους οποίους προστέθηκαν 500 µl Buffer AW2 για περαιτέρω καθαρισμό της μεμβράνης, και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 20.000 x g για 3 λεπτά. Τέλος, προστέθηκαν σε κάθε σωλήνα, 100 µl διαλύματος εκχύλισης AE, το οποίο αποδεσμεύει το DNA από τη μεμβράνη πυριτίου. Με φυγοκέντρηση στις 6.000 x g για ένα λεπτό, το ολικό DNA εκχυλίστηκε σε αποστειρωμένο σωλήνα και αποθηκεύτηκε στους -20 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης – PCR: Για τις αντιδράσεις της PCR χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές (primers) από τη ριβοσωμική περιοχή του γονιδιακού DNA (Internal Transcribe Spacer, ITS). Οι PITSr3 (5'-AGCGCAGACATGCCGCAA-3') και PITSr4 (5'-ACAACAGCAATCGTTCGAG-3') χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση

του *G. rostochiensis* και *G. pallida*, αντίστοιχα, σε συνδυασμό με τον εκκινητή ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (Bulman & Marshall, 1997). Ποσότητα 2 μl (5-10 ng/μl) DNA χρησιμοποιήθηκε σε αντιδράσεις της PCR που περιείχαν 1 μl (0,6 mM) από τον κάθε εκκινητή, 2,5 μl 10x PCR buffer, 1,6 μl (1,25 mM) μείγμα νουκλεοτιδίων (dNTPs), 2,5 μl MgCl₂ (2 mM), 0,1 μl Hotstart Taq DNA polymerase (100units/20μl, Qiagen) και αποστειρωμένο – απιονισμένο νερό σε τελικό όγκο 25 μl.

Πρωτόκολλο ενίσχυσης και πολλαπλασιασμού του DNA (DNA amplification): Η PCR πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή (C1000™ Thermal cycler, Biorad). Η ενίσχυση και ο πολλαπλασιασμός του DNA έγινε σε τρία στάδια: i) στάδιο της αποδιάταξης του εκμαγείου DNA στους 94 °C για 5 λεπτά στον πρώτο κύκλο και για 30s στους υπόλοιπους 39 κύκλους, ii) στάδιο επανασύνδεσης του εκμαγείου με τους εκκινητές στους 57°C για 30s και iii) στάδιο της επιμήκυνσης των δεσμευμένων εκκινητών στους 72°C για 30s. Τα τρία στάδια της ενίσχυσης επαναλήφθηκαν για 39 κύκλους.

Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων της PCR σε πηκτή αγαρόζης: Τα προϊόντα της PCR αναμείχθηκαν με διάλυμα φόρτωσης (loading buffer) (0,1% bromophenol blue, 50% γλυκερίνη, 10 mM Tris-HCl pH 8) πυκνότητας 6X. Ως σταθερά χρησιμοποιήθηκε η κλίμακα μοριακών βαρών 100 bp DNA ladder (Invitrogen). Το πήγμα ηλεκτροφόρησης περιείχε 1,2 % αγαρόζη (Molecular Biology Agarose, Biorad) και 5 μl/100ml χρωστικής SYBR Safe™ DNA gel stain (Invitrogen), σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X (Tris base, Acetic acid and EDTA). Η ηλεκτροφόρηση του πηγματος πραγματοποιήθηκε στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα με εφαρμογή τάσης 100 V στα άκρα της συσκευής ηλεκτροφόρησης για 55 λεπτά. Η απεικόνιση των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε σε UV τράπεζα απεικόνισης πηγμάτων αγαρόζης.

Στις περιπτώσεις όπου δείγματα DNA παρουσίαζαν αρνητικό αποτέλεσμα το οποίο μπορεί να οφειλόταν στην παρουσία παρεμποδιστών της PCR (Bessetti, 2007), γινόταν καθαρισμός τους με διάλυμα φαινόλης-χλωροφορμίου 1:1 και ακολουθούσε καθαρισμός με χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη. Τα δείγματα αυτά έτυχαν εκ νέου ενίσχυσης με τη διαδικασία της PCR.

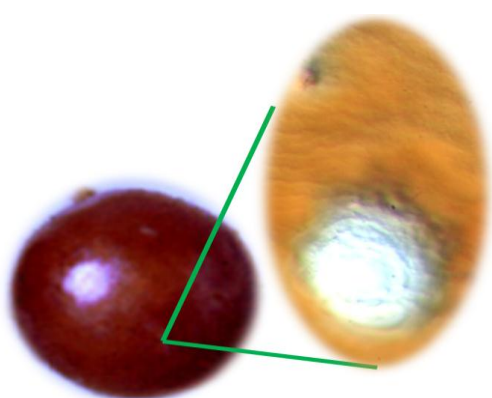
2.3.5 Μορφολογική – μορφομετρική ταυτοποίηση

Για τη μορφολογική ταυτοποίηση των κυπριακών πληθυσμών ΚΝΠ χρησιμοποιήθηκαν κύστεις και προνύμφες δευτέρου σταδίου (J2) από δείγματα εδάφους

που παρουσίασαν πληθυσμούς ενός μόνο είδους κατά τη μοριακή ταυτοποίηση με PCR. Συνολικά επιλέχθηκαν 30 δείγματα εκ των οποίων 15 ήσαν *G. rostochiensis* (Gr) και 15 *G. pallida* (Gr). Χρησιμοποιήθηκαν κύστεις από την Άχνα (2 δείγματα του Gr), Ξυλοτύμπου (2 του Gr), Ορμήδεια (2 του Gr και 2 του Gr), Ξυλοφάγου (5 του Gr), Λιοπέτρι (2 του Gr και 3 του Gr), Σωτήρα (10 του Gr) και Αυγόρου (2 του Gr). Από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 2 κύστεις.

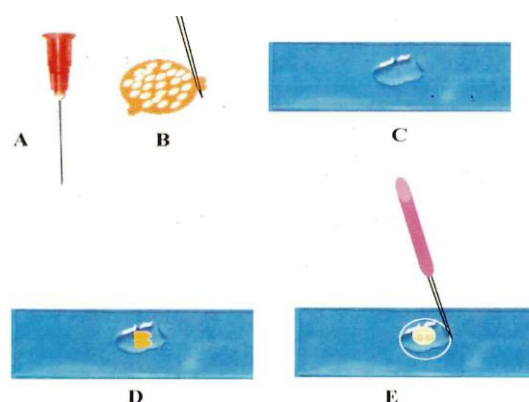
Η επιλογή και συλλογή των κύστεων από τα δείγματα στηρίχθηκε στη μορφή και τη σωματική κατάσταση τους, επιλέγοντας πάντοτε κύστεις που ήταν στρογγυλές και άθικτες. Οι ίδιες κύστεις χρησιμοποιήθηκαν για το χαρακτηρισμό 3 προνυμφών ανά κύστη. Αρχικά οι κύστεις ξεπλύθηκαν 2 φορές με αιθανόλη, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν οργανικά υλικά από το σώμα τους, και ακολούθως ξεπλύθηκαν με αποστειρωμένο νερό και τοποθετήθηκαν για 24h σε τρυβλίο Petri που περιείχε αποστειρωμένο νερό.

Μικροσκοπική παρατήρηση κύστεων: Κάθε κύστη τοποθετείτο σε στερεοσκόπιο μεγέθυνσης 20X και, με τη χρήση λαβίδας και νυστεριού, διενεργείτο λεπτή τομή σε σχήμα ‘κώνου’ στην περινεϊκή περιοχή της. Στη συνέχεια αφαιρείτο η επιπλέον επιφάνεια και παρέμενε μόνο η περινεϊκή περιοχή, η οποία μεταφερόταν σε αντικειμενοφόρο πλάκα, στο κέντρο της οποίας είχε τοποθετηθεί σταγόνα λιωμένου ζελέ γλυκερίνης (Εικ. 14 & 15). Κατά την μικροσκοπική παρατήρηση της περινεϊκής περιοχής των κύστεων γινόταν μέτρηση του αριθμού των κυματοειδών γραμμώσεων και της απόστασης, μεταξύ του γεννητικού οπλισμού και της έδρας (Skantar *et al.*, 2007).



Εικόνα 14. Σφαιρική κύστη του γένους *Globodera* (Bajaj *et al.*, 2011).

Σε μεγέθυνση η περινεϊκή περιοχή των κύστεων.



Εικόνα 15. Διεργασία κοπής της περινεϊκής περιοχής (Bajaj *et al.*, 2011).

A. Βελόνα, B. κοπή κωνικής περιοχής της κύστης, C. Αντικειμενοφόρος με σταγόνα από λιωμένο ζελέ γλυκερόλης, D. τοποθέτηση κώνου στο ζελέ γλυκερόλης, E. Οριοθέτηση κώνου και τοποθέτηση καλυπτρίδας.

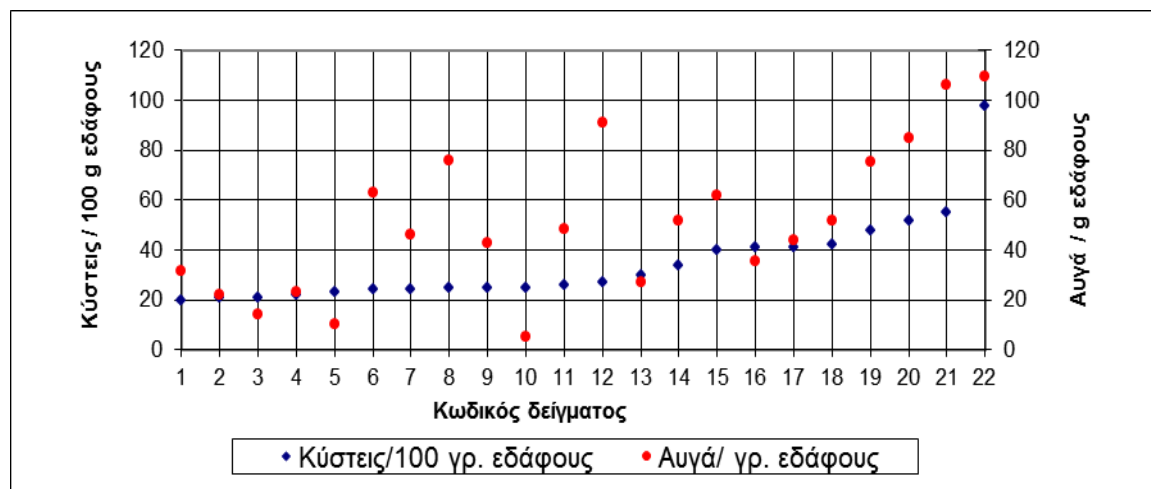
Μικροσκοπική παρατήρηση προνυμφών 2^{ου} σταδίου: Για τη μορφομέτρηση των προνυμφών 2^{ου} σταδίου χρησιμοποιήθηκαν τα εγκυστωμένα αυγά που ελευθερώνονταν κατά την τομή των κύστεων στη μορφομετρική παρατήρηση της περινεϊκής περιοχής. Τα αυγά κάθε κύστης συλλέγονταν από το υδατικό διάλυμα, χρησιμοποιώντας πιπέττα, και τοποθετήθηκαν σε μικροσωλήνα με προσθήκη ανάλογης ποσότητας φορμαλίνης 8%. Το δείγμα αναδευόταν έντονα για να βγουν οι προνύμφες από το κέλυφος του αυγού και ακολούθως μια μικρή ποσότητα μεταφερόταν στο κέντρο μιας αντικειμενοφόρου, η οποία εκτείθετο πάνω από φλόγα για 4-5 sec, με σκοπό τη θανάτωση των νηματωδών και την ευθυγράμμιση του σώματος τους. Ακολούθως προστίθετο μικρή σταγόνα γλυκερόλης και καλυπτρίδα, και γινόταν η παρατήρηση και μορφομέτρηση των νηματωδών σε μικροσκόπιο μεγέθυνσης 40X με σταυρόνημα 10μm / 4 χαρακιές. Οι μετρήσεις των προνυμφών 2^{ου} σταδίου περιλάμβαναν: i) το μήκος του σώματος που ξεκινά από τη χειλική περιοχή της κεφαλής και φτάνει μέχρι το άκρο της ουράς και ii) το μήκος του στίλετου που ξεκινά από την άκρη του κωνικού μέρους και φτάνει μέχρι την βάση των εξογκωμάτων (knobs) (Hesling, 1982; Skantar *et al.*, 2007).

2.4 Αποτελέσματα

2.4.1 Ανίχνευση

Τα αποτελέσματα έδειξαν την παρουσία κύστεων των ΚΝΠ στα δείγματα εδάφους που λήφθηκαν από τα χωριά των επαρχιών Λάρνακας και Αμμοχώστου, ενώ τα δείγματα που λήφθηκαν από τις επαρχίες Λεμεσού, Πάφου και Λευκωσίας ήσαν απαλλαγμένα από ΚΝΠ. Σε ένα μόνο αγροτεμάχιο, στο χωριό Ακάκι της επαρχίας Λευκωσίας, εντοπίστηκαν κύστεις λεμονοειδούς σχήματος, οι οποίες ταυτοποιήθηκαν με PCR ως ο κυστογόνος νηματώδης των σιτηρών, *Heterodera latipons*. Στα δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν από κοινότητες της επαρχίας Λάρνακας ανιχνεύτηκαν κύστεις ως ακολούθως: Άχνα 10/13, Ξυλοτύμπου 10/10, Ορμήδεια 45/45 και Ξυλοφάγου 55/56. Στα δείγματα που συλλέχθηκαν από κοινότητες της επαρχίας Αμμοχώστου εντοπίστηκαν κύστεις ως ακολούθως: Λιοπέτρι 17/23, Σωτήρα 27/27 και Αυγόρου 15/26.

Ο αριθμός των εγκυστωμένων αυγών που καταμετρήθηκαν ήταν διαφορετικός σε κάθε δείγμα και ανάμεσα στις κύστεις του κάθε δείγματος (Εικ. 16). Οι αριθμοί των κύστεων και των αυγών που καταμετρήθηκαν σε κάθε περιοχή αναφέρονται στους πίνακες 21-27 του παραρτήματος. Τα αποτελέσματα της ανίχνευσης των ΚΝΠ χρησιμοποιήθηκαν στη χαρτογράφηση των αγροτεμαχίων από όπου έγιναν οι δειγματοληψίες (Κεφάλαιο 6).



Εικόνα 16. Συγκριτική μέτρηση κύστεων και αυγών των ΚΝΠ

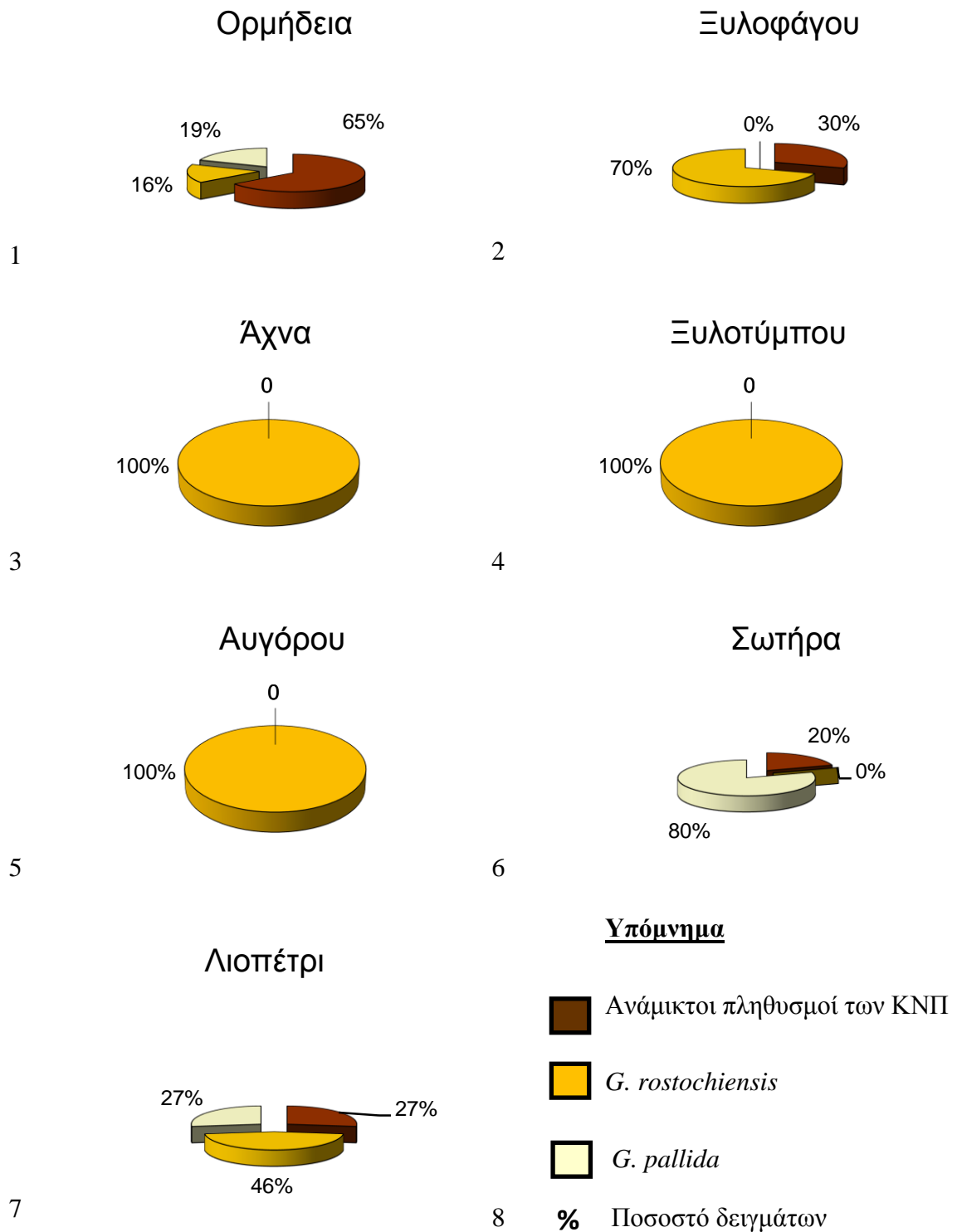
2.4.2 Μοριακή ταυτοποίηση

Τα αποτελέσματα της μοριακής ταυτοποίησης των ΚΝΠ επιβεβαίωσαν την παρουσία του *G. pallida* και του *G. rostochiensis* στην Κύπρο. Τα δύο είδη εντοπίστηκαν, τόσο στα εδάφη της επαρχίας Λάρνακας όσο και σε αυτά της επαρχίας Αμμοχώστου, με σημαντική διαφοροποίηση στη γεωγραφική τους κατανομή.

Για τον *G. rostochiensis*, κατά την PCR ενισχύθηκε τμήμα 434 βάσεων του γονιδιακού DNA, ενώ για τον *G. pallida* ενισχύθηκε τμήμα 265 βάσεων. Στα δείγματα όπου δεν παρατηρήθηκε ενίσχυση, πραγματοποιήθηκε εκ νέου καθαρισμός των δειγμάτων με φαινόλη-χλωροφόρμιο για την απομάκρυνση τυχόν παρεμποδιστών και τα δείγματα ενισχύθηκαν ξανά στην PCR.

Συγκεκριμένα, στο χωριό Ορμήδεια (επαρχία Λάρνακας), οι πληθυσμοί ήταν ανάμεικτοι σε ποσοστό 65% των δειγμάτων. Το 16% των δειγμάτων έδειξαν την παρουσία αμιγών πληθυσμών του *G. rostochiensis* και το 19% την παρουσία αμιγών πληθυσμών του *G. pallida*. Στην Ξυλοφάγου (επαρχία Λάρνακας), διαπιστώθηκε η παρουσία αμιγών πληθυσμών του *G. rostochiensis* στο 70% των τεμαχίων, ενώ στο υπόλοιπο 30% των τεμαχίων οι πληθυσμοί ήταν ανάμεικτοι. Στην Άχνα (επαρχία Αμμοχώστου) και την Ξυλότυμπου (επαρχία Λάρνακας), διαπιστώθηκε μόνο η παρουσία αμιγών πληθυσμών του *G. rostochiensis*.

Στο Λιοπέτρι (επαρχία Αμμοχώστου) οι πληθυσμοί ήταν ανάμεικτοι σε ποσοστό 27% των δειγμάτων. Το 46% και 27% των δειγμάτων έδειξαν την παρουσία αμιγών πληθυσμών του *G. rostochiensis* και του *G. pallida*, αντίστοιχα. Στη Σωτήρα (επαρχία Αμμοχώστου) εντοπίστηκε η παρουσία αμιγών πληθυσμών του *G. pallida* στο 80% των τεμαχίων ενώ στο υπόλοιπο 20% των τεμαχίων οι πληθυσμοί ήταν ανάμεικτοι. Τέλος, στο Αυγόρου (επαρχία Αμμοχώστου) διαπιστώθηκε μόνο η παρουσία αμιγών πληθυσμών του *G. rostochiensis* (Εικ. 17).

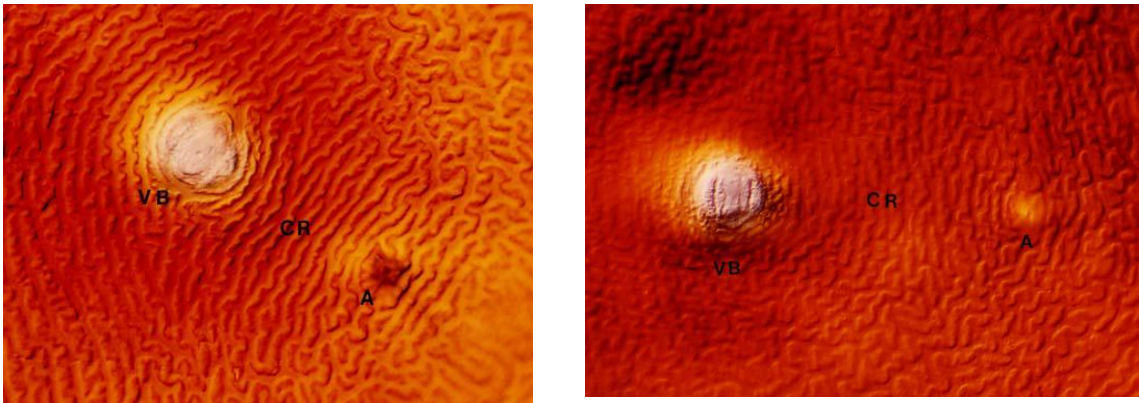


Εικόνα 17. Γραφική αναπαράσταση της διασποράς των ΚΝΠ στα χωριά των επαρχιών Λάρνακας και Αμμοχώστου.

Η ταυτοποίηση των ΚΝΠ έδειξε ότι: 1) στην περιοχή Ορμήδειας: το 16% του πληθυσμού ήταν *G. rostochiensis*, 19% ήταν *G. pallida* και 65% ήταν ανάμικτοι πληθυσμοί των δύο ειδών, 2) στην περιοχή Ξυλοφάγου: 70% του πληθυσμού ήταν *G. rostochiensis* και 30% ήταν ανάμικτοι πληθυσμοί των δύο ειδών, 3, 4 και 5) περιοχές Άχνα Ξυλοτύμπου και Αυγόρου, εντοπίστηκε μόνο ο *G. rostochiensis*, 6) στην περιοχή Σωτήρας: το 80% του πληθυσμού ήταν *G. pallida* και 20% ήταν ανάμικτοι πληθυσμοί των δύο ειδών, 7) στην περιοχή Λιοπέτρι: 27% του πληθυσμού ήταν *G. rostochiensis*, 27% ήταν *G. pallida* και 46% ήταν ανάμικτοι πληθυσμοί των δύο ειδών.

2.4.3 Μορφολογική – μορφομετρική ταυτοποίηση κύστεων

Οι παρατηρήσεις στην περινεϊκή περιοχή των κύστεων περιλάμβαναν μετρήσεις στον αριθμό των γραμμώσεων και στην απόσταση μεταξύ γεννητικού οπλισμού και έδρας, συνολικά από 30 κύστεις για κάθε είδος. Ο αριθμός των γραμμώσεων (Εικ. 18) μεταξύ του γεννητικού οπλισμού και της έδρας κυμάνθηκε μεταξύ 18-10 και 28-22 για τον *G. pallida* και *G. rostochiensis*, αντίστοιχα. Η απόσταση μεταξύ του γεννητικού οπλισμού και της έδρας κυμάνθηκε μεταξύ 55-35 μm και 78-56 μm για τον *G. pallida* και *G. rostochiensis*, αντίστοιχα. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.



Εικόνα 18. Περινεϊκή περιοχή κύστεων των ΚΝΠ.

Αριστερά του *Globodera pallida* και δεξιά του *G. rostochiensis*. VB = Vulval basin (γεννητικός οπλισμός), CR = Cuticular ridges (κυματοειδείς γραμμώσεις) και A = Anus (έδρα).

2.4.4 Μορφολογική – μορφομετρική ταυτοποίηση προνυμφών 2^{ου} σταδίου

Οι μορφολογικές παρατηρήσεις στις προνύμφες 2^{ου} σταδίου περιλάμβαναν μετρήσεις στο μήκος σώματος και στο μήκος του στιλέτου. Για κάθε είδος λήφθηκαν μετρήσεις από 45 προνύμφες. Το μήκος σώματος κυμάνθηκε μεταξύ 488-498 μm και 449-501 μm για τον *G. rostochiensis* και *G. pallida*, αντίστοιχα. Το μήκος του στιλέτου κυμάνθηκε μεταξύ 19,5 - 22,5 μm και 22 - 24,5 μm για τον *G. rostochiensis* και *G. pallida*, αντίστοιχα. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των τιμών παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Μορφομετρικές μετρήσεις κύστεων και προνυμφών 2^{ου} σταδίου (J2) των κυστογόνων νηματωδών *Globodera rostochiensis* και *G. pallida* σε κυπριακούς πληθυσμούς.

	n ^a	<i>G. rostochiensis</i>			<i>G. pallida</i>			
		Εύρος	Μέσος όρος	SD ^b	Εύρος	ΜΟ ^c	SD	
Κύστεις	Απόσταση μεταξύ γεννητικού οπλισμού και έδρας (μm)	30	56-78	67	±5,15	35-55	46,2	±3,69
	Αριθμός γραμμώσεων μεταξύ γεννητικού οπλισμού και έδρας	30	22-28	24,6	±1,19	10-18	13,07	±0,84
J2	Μήκος σώματος (μm)	45	448-498	476,34	±6,24	449-501	470,33	±10,55
	Μήκος στιλέτου (μm)	45	19,5-22,5	21,04	±0,65	22-24,5	23,2	±0,48

^a n = αριθμός επαναλήψεων

^bSD = Standard deviation (τυπική απόκλιση)

ΜΟ^c = Μέσος όρος

2.5 Συζήτηση

Τα δύο είδη των ΚΝΠ, *Globodera rostochiensis* και *G. pallida*, είχαν ανιχνευτεί και ταυτοποιηθεί στην Κύπρο, τις δεκαετίες 1970 και 1980, στο χωριό Ξυλοφάγου της επαρχίας Λάρνακας (Philis, 1981). Η ταυτοποίηση των ΚΝΠ είχε πραγματοποιηθεί με μορφολογικές - μορφομετρικές μετρήσεις καθώς και με μολύνσεις διαφορετικών ξενιστών πατάτας. Κυρίαρχο είδος ήταν ο *G. rostochiensis*, ενώ υπήρχε υποψία για την παρουσία και του *G. pallida*. Στην παρούσα εργασία, τα δύο είδη ανιχνεύτηκαν σε 7 χωριά της περιοχής των Κοκκινοχωριών (Ξυλοτύμπου, Ορμήδεια και Ξυλοφάγου της επαρχίας Λάρνακας και Άχνα, Λιοπέτρι, Σωτήρα και Αυγόρου, της επαρχίας Αμμοχώστου). Σημαντικό ρόλο στη μετακίνηση και διασπορά των ΚΝΠ πιστεύεται ότι διαδραμάτισε η μαζική μετακίνηση εδάφους κατά την δεκαετία του 1980, από την Ξυλοφάγου προς τα γειτονικά χωριά, με σκοπό τη δημιουργία γόνιμης κοκκινογής σε άγονες και πετρώδεις περιοχές (κυρίως παραθαλάσσιες), με σκοπό την αύξηση της παραγωγής πρώιμων πατατών και την αποφυγή παγετών, εξαιτίας του ευνοϊκότερου κλίματος των παραθαλάσσιων περιοχών (Savvides, 2012). Επιπλέον, η μεταφορά μολυσμένου ντόπιου πατατόσπορου εξαιτίας της άγνοιας των παραγωγών, συνέβαλε στη μετακίνηση και διασπορά των ΚΝΠ στην ευρύτερη περιοχή των Κοκκινοχωριών.

Η ταυτοποίηση των ΚΝΠ, τόσο με μορφολογικές όσο και με μοριακές μεθόδους, έδειξε ανομοιόμορφη διασπορά των δύο ειδών στις περιοχές όπου ανιχνεύτηκαν. Ο *G. rostochiensis* βρέθηκε σε όλες τις περιοχές που διερευνήθηκαν, ενώ ο *G. pallida* εντοπίστηκε μόνο στα χωριά Ορμήδεια, Ξυλοφάγου, Σωτήρα και Λιοπέτρι. Μεταξύ των δύο ειδών ΚΝΠ, ο *G. rostochiensis* θεωρείται κυρίαρχο είδος επειδή: i) εκκολάπτεται νωρίτερα από τον *G. pallida*, με αποτέλεσμα να καταλαμβάνει πρώτος τις ρίζες του ξενιστή (Robinson *et al.*, 1987) και ii) παράγει διπλάσιο ή/και τριπλάσιο αριθμό αυγών από ότι ο *G. pallida* (Greco *et al.*, 1982). Στην περιοχή του χωριού Σωτήρα ανιχνεύτηκαν σε ποσοστό 80% των δειγμάτων αμιγείς πληθυσμοί του είδους *G. pallida*, ενώ στο υπόλοιπο 20% οι πληθυσμοί ήσαν ανάμικτοι. Στοιχεία που δόθηκαν από τον Οργανισμό Γεωργικής Ασφάλισης (ΟΓΑ) της Κύπρου, δείχνουν ότι οι παραγωγοί που καλλιεργούν πατάτες στο χωριό Σωτήρα έχουν ιδιαίτερη προτίμηση στις πρώιμες ποικιλίες (κιτρινόσαρκες σαλατοπατάτες, πχ. Nicola), οι οποίες φέρουν το γονίδιο ανθεκτικότητας H_1 (ΟΓΑ, 2010). Οι ποικιλίες που φέρουν το γονίδιο H_1 , είναι ανθεκτικές στους παθότυπους Ro1 και Ro4 του *G. rostochiensis*. Είναι πλέον προφανές ότι η εντατική καλλιέργεια ποικιλιών πατάτας που είναι ανθεκτικές μόνο στον *G. rostochiensis* και όχι

στον *G. pallida*, προκαλούν τη μείωση του πληθυσμού του πρώτου και σταδιακή αύξηση του δεύτερου είδους (Brown & Sykes, 1983; Turner, 1996). Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε τόσο στο Ηνωμένο Βασίλειο όσο και στην Ιρλανδία, όπου κυρίαρχο είδος είναι πλέον ο *G. pallida*, εξαιτίας της εντατικής χρήσης ποικιλιών που φέρουν το γονίδιο H_1 (πχ. Maris Piper) (Brown & Sykes, 1983; Turner, 1996).

Η εξάπλωση των ΚΝΠ στην ευρύτερη περιοχή των Κοκκινοχωριών χρήζει ιδιαίτερου προβληματισμού, τόσο για την επιλογή των ανθεκτικών ποικιλιών πατάτας που καλλιεργούνται στην περιοχή όσο και για τις γνώσεις των Κύπριων πατατοπαραγωγών στο πρόβλημα που καλούνται να αντιμετωπίσουν. Σε χώρες όπως η Ολλανδία, προσφέρονται τεχνογνωσία και συμβουλές στους πατατοπαραγωγούς που αντιμετωπίζουν προβλήματα με ΚΝΠ, μέσω ενός λογισμικού προγράμματος που φέρει την επωνυμία NemaDecide (<http://www.nemadecide.com>). Με βάση το ιστορικό του τεμαχίου και τον αριθμό του είδους ή των ειδών των νηματωδών που καταγράφηκαν σε μια πατατοκαλλιέργεια τη δεδομένη στιγμή, το πρόγραμμα NemaDecide δίνει στον παραγωγό τις απαραίτητες συμβουλές ως προς την ανθεκτική ποικιλία που πρέπει να καλλιεργήσει, καθώς και την ποσότητα του νηματωδοκτόνου που θα χρησιμοποιεί. Η εφαρμογή ενός αντίστοιχου προγράμματος στην Κύπρο θα βοηθούσε σε μεγάλο βαθμό τους παραγωγούς να λάβουν τις ορθές αποφάσεις για την αντιμετώπιση των ΚΝΠ, μειώνοντας ταυτόχρονα την υπερβολική χρήση χημικών νηματωδοκτόνων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Μοριακός χαρακτηρισμός των κυστογόνων νηματωδών της πατάτας με τη χρήση τεχνολογίας Taqman® Real-Time PCR και αξιολόγηση μεθόδων εξαγωγής γονιδιακού DNA από κύστες.

3.1 Περίληψη

Ο διαχωρισμός των δύο ειδών ΚΝΠ, *Globodera rostochiensis* και *G. pallida*, τόσο μεταξύ τους όσο και από τα άλλα είδη του γένους, είναι δύσκολος όταν βασίζεται μόνο σε μορφολογικές παρατηρήσεις. Παρά το γεγονός ότι αρκετές μοριακές και βιοχημικές μέθοδοι έχουν προταθεί για το χαρακτηρισμό των δύο ειδών, και μερικές από αυτές, όπως η PCR, έχουν ευρεία χρήση, εντούτοις υπάρχει ακόμη επιτακτική ανάγκη για περαιτέρω βελτιώσεις των μεθόδων ταυτοποίησης, ως προς το χρόνο και το κόστος εφαρμογής, την ικανότητα χειρισμού μεγάλου αριθμού δειγμάτων και την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Προς το σκοπό αυτό, στην παρούσα εργασία διεξήχθησαν δύο μελέτες:

I) Σχεδιασμός εκκινητών και Taqman® ανιχνευτών, για το διαχωρισμό των δύο ειδών μεταξύ τους και μεταξύ άλλων ειδών του γένους *Globodera*, και αξιολόγηση τους με εκκινητές και Taqman® ανιχνευτές που σχεδιάστηκαν από άλλους ερευνητές (Nakhla *et al.*, 2010; Papayiannis *et al.*, 2013), σε αντιδράσεις αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, τόσο συμβατικής (Co-PCR) όσο και πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR). II) Αξιολόγηση πέντε μεθόδων εξαγωγής γονιδιακού DNA των ΚΝΠ, ως ακολούθως: Α) προσρόφηση του DNA σε στήλες πυριτίου, Β) προσκόλληση του DNA σε μαγνητικά σφαιρίδια, Γ) καθαρισμός του DNA με το χηλικό υλικό Chelex, Δ) καθαρισμός του DNA με χλωροφόρμιο/οξικό νάτριο και Ε) απλή λειοτρίβηση των κύστεων. Για την αξιολόγηση των 5 αυτών μεθόδων, χρησιμοποιήθηκαν τόσο καθαρές κύστες όσο και κύστες που είχαν αναμειχθεί με οργανικά υπολείμματα εδάφους.

Τα αποτελέσματα της Real-Time PCR έδειξαν ότι οι Taqman® ανιχνευτές που σχεδιάστηκαν στην παρούσα μελέτη, διαχώρισαν τα δύο είδη *G. rostochiensis* και *G. pallida* με ποσοστό αποδοτικότητας $E=101\%$ ($R^2=0,998$) για τον *G. rostochiensis* και $E=111,9\%$ ($R^2=0,996$) για τον *G. pallida*. Αντίθετα, οι Taqman® ανιχνευτές που δημοσιεύτηκαν από τους Nakhla *et al.* (2010), μετά την πάροδο 27 κύκλων της PCR,

παρουσίασαν ακανόνιστο φθορισμό και στα δύο είδη. Επίσης, καταγράφηκαν πολλαπλά τμήματα DNA κατά την απεικόνιση τους σε πήγμα αγαρόζης, υποδεικνύοντας ότι οι εκκινητές αυτοί δεν είχαν επαρκή εξειδίκευση στα δύο είδη των ΚΝΠ. Την καλύτερη αποτελεσματικότητα και εξειδίκευση, έδειξαν οι εκκινητές και Taqman® ανιχνευτές που δημοσιεύτηκαν από τους Papayiannis *et al.* (2013), αφού η αντίδραση της Real-Time PCR στην περίπτωση αυτή παρουσίασε την καλύτερη αποδοτικότητα, με ποσοστό $E=100\%$ ($R^2=0,99$) για τον *G. rostochiensis* και $E=109,7\%$ ($R^2= 0,99$) για τον *G. pallida*.

Η φασματοφωτομετρία του DNA από καθαρές κύστεις έδειξε ότι το καθαρότερο προϊόν εξάχθηκε με την μέθοδο των στηλών πυριτίου (Α). Ελαφρά χαμηλότερης καθαρότητας ήταν το προϊόν που εξάχθηκε με τις μεθόδους των μαγνητικών σφαιριδίων (Β) και του Chelex (Γ), αν και οι διαφορές μεταξύ των τριών μεθόδων δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Το προϊόν και των τριών αυτών μεθόδων, παρουσίασε χαμηλούς οριακούς κύκλους (Threshold cycle, Ct) και τα τμήματα DNA που ενισχύθηκαν σε συμβατική PCR έδειξαν έντονες ζώνες DNA, όταν απεικονίστηκαν σε πήγμα αγαρόζης. Η μέθοδος Ε (απλή λειοτρίβιση των κύστεων) παρουσίασε εξίσου καλά αποτελέσματα με τις μεθόδους Α, Β και Γ, όταν το προϊόν της ενισχύθηκε σε αντιδράσεις Real-Time PCR, αλλά δεν παρουσίασε καθόλου ενίσχυση σε αντιδράσεις συμβατικής PCR. Η μέθοδος Δ καθώς και όλες οι μέθοδοι εξαγωγής γονιδιακού DNA από κύστεις αναμειγμένες με οργανικά υπολείμματα εδάφους, δεν παρουσίασαν ενίσχυση στην Real-Time PCR ούτε και στην συμβατική PCR.

Με βάση τα πιο πάνω αποτελέσματα, για το μοριακό χαρακτηρισμό των ΚΝΠ προκρίθηκαν οι εκκινητές και οι Taqman ανιχνευτές που σχεδιάστηκαν από τους Papayiannis *et al* (2010). Αναφορικά με τη μεθοδολογία εξαγωγής DNA από τις κύστεις των ΚΝΠ, κρίνεται απαραίτητος ο σχολαστικός καθαρισμός των κύστεων από τα υπολείμματα εδάφους πριν από την επεξεργασία τους. Για φυλογενετικές και άλλες μελέτες, όπου απαιτείται η χρήση DNA υψηλής καθαρότητας, ως καταλληλότερη μέθοδος εξαγωγής φαίνεται να είναι η προσρόφηση του DNA σε στήλες πυριτίου (μέθοδος Α). Εντούτοις, για αναλύσεις ρουτίνας που περιλαμβάνουν την επεξεργασία μεγάλου αριθμού δειγμάτων, η πλέον κατάλληλη μέθοδος είναι η απλή λειοτρίβιση των κύστεων (Ε), σε συνδυασμό με τη Real-Time PCR, αφού υπερτερεί όλων των άλλων σε ασφάλεια για το χρήστη, ταχύτητα και κόστος εφαρμογής.

3.2 Εισαγωγή

Η ακριβής ταυτοποίηση των ΚΝΠ είναι αναγκαία για την ορθή λήψη αποφάσεων, τόσο για την αποτροπή της διασποράς τους όσο και για την αντιμετώπιση τους. Οι μορφολογικές μέθοδοι που στηρίζονται σε μορφομετρικές μετρήσεις των κύστεων, καθώς και των προνυμφών δευτέρου σταδίου, είναι επίπονες, χρονοβόρες και απαιτούν εξειδικευμένο και έμπειρο επιστημονικό προσωπικό (Golden, 1986). Αρκετές μοριακές και βιοχημικές μέθοδοι έχουν προταθεί τις τελευταίες δεκαετίες, μερικές από τις οποίες τυγχάνουν ευρείας εφαρμογής. Οι τεχνικές αυτές περιλαμβάνουν την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) (Bulman & Marshall, 1997; Fleming *et al.*, 1998; Fullaondo *et al.*, 1999; Madani *et al.*, 2005; Madani *et al.*, 2008; Nowaczyk *et al.*, 2008; Nakhla *et al.*, 2010; Madani *et al.*, 2010), τον πολυμορφισμό μήκους περιοριστικού κλάσματος (Restriction fragment length polymorphism, RFLP) (Schnick *et al.*, 1990; Subbotin *et al.*, 1999; Subbotin *et al.*, 2000), καθώς και αλληλούχιση και φυλογενετική ανάλυση του γονιδιώματος των ΚΝΠ (Griffiths *et al.*, 2006; Plantard *et al.*, 2008; Jex *et al.*, 2010).

Πρόσφατα, έχει αναπτυχθεί προηγμένη μοριακή τεχνολογία, όπως η τεχνολογία Taqman, η οποία σε αντιδράσεις Real-Time PCR δίνει αξιόπιστα και ακριβή αποτελέσματα σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα και με αποδεκτό κόστος εφαρμογής. Η μέθοδος αυτή μπορεί να ταυτοποιήσει ταυτόχρονα περισσότερα από ένα είδη ΚΝΠ σε μικτούς πληθυσμούς και παράλληλα να δώσει ποσοτικά αποτελέσματα για τον πληθυσμό του κάθε είδους (Mauchline *et al.*, 2002; Atkins *et al.*, 2003; MacMillan *et al.*, 2006; Lievens & Thomma, 2007; Berry *et al.*, 2008; Schochetman *et al.*, 1988; Kubista *et al.*, 2006). Η τεχνολογία αυτή έχει βρει ευρεία πρακτική εφαρμογή στη διαγνωστική και ποσοτικοποίηση φυτοπαθογόνων καραντίνας συμπεριλαμβανομένων και των ΚΝΠ. Η Real-Time PCR έχει εφαρμοστεί στους ΚΝΠ τόσο με τη φθορίζουσα χρωστική SYBR green όσο και με την τεχνολογία Taqman® (Madani *et al.*, 2005; Nowaczyk *et al.*, 2008; Nakhla *et al.*, 2010; Papayiannis *et al.*, 2013).

Η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των ΚΝΠ με τη χρήση της Real-Time PCR, σε συνδυασμό με τη χρωστική SYBR green, βρήκε ευρεία πρακτική εφαρμογή κατά την περασμένη δεκαετία. Οι Madani *et al.* (2005) ταυτοποίησαν και ποσοτικοποίησαν τον *G. pallida* και τον *Heterodera schachtii*, χρησιμοποιώντας SYBR Green. Παρόμοια εργασία, πραγματοποίησαν οι Madani *et al.* (2008), ταυτοποιώντας τους *G. rostochiensis*, *G. pallida*

και *G. tabacum*. Η τεχνολογία αυτή, όμως, παρουσιάζει δύο βασικά μειονεκτήματα: α) για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των ΚΝΠ σε μικτούς πληθυσμούς, μετά την ολοκλήρωση των κύκλων της PCR, απαιτείται ένα επιπλέον στάδιο για τον υπολογισμό του ύψους των καμπυλών αποδιάταξης του DNA (melting curve) του κάθε είδους και β) η χρωστική SYBR Green ενδέχεται να προσκολληθεί και σε μόρια DNA οργανισμών μη στόχων, δίνοντας λανθασμένα αποτελέσματα (Jamnikar Ciglenecki *et al.*, 2008).

Οι Taqman® αποτελούνται από εξειδικευμένους ανιχνευτές, στο 5' άκρο των οποίων προσδένεται η φθορίζουσα χρωστική αναφοράς (πχ. FAM, Cy5 και TET) και στο 3' άκρο η χρωστική απόσβεσης φθορισμού (Quencher fluorophore) (Εικ. 19). Η εξειδίκευση των Taqman® επιτρέπει την άμεση ανίχνευση και ποσοτικοποίηση περισσότερων του ενός είδους σε αντιδράσεις που περιέχουν μικτούς πληθυσμούς (multiplex reactions). Ένα σημαντικό πρόβλημα που παρουσιάζει η τεχνολογία Taqman®, είναι το μικρό μέγεθος των ανιχνευτών, το οποίο αντιστοιχεί σε μικρό αριθμό βάσεων στόχων. Το μειονέκτημα αυτό επιτείνεται από τον πολυμορφισμό που παρουσιάζουν οι πληθυσμοί των ΚΝΠ στις διάφορες γεωγραφικές περιοχές του πλανήτη. Για το λόγο αυτό, κατά το σχεδιασμό των Taqman® ανιχνευτών πρέπει να ελέγχεται η εξειδίκευσή τους, όχι μόνο στους γηγενείς αλλά και σε ποικίλους πληθυσμούς άλλων γεωγραφικών περιοχών (Lao *et al.*, 2006).



Εικόνα 19. Απεικόνιση αλληλουχίας DNA (κάτω σειρά), εκκινητών (Primers F) και Taqman® ανιχνευτή (TaqMan Probe).

Ο Taqman® ανιχνευτής είναι σημασμένος με τη φθορίζουσα χρωστική αναφοράς, R και τη χρωστική απόσβεσης φθορισμού, Q.

Η εφαρμογή της PCR στην ταυτοποίηση των ΚΝΠ προϋποθέτει την εξαγωγή και εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων, με τη χρήση είτε έτοιμων εμπορικών σκευασμάτων είτε διαλυμάτων που παρασκευάζονται στο εργαστήριο, με σκοπό την εκχύλιση προϊόντων υψηλής καθαρότητας. Η διαδικασία αυτή, αν και επιβαρύνει την εφαρμογή της μοριακής

ταυτοποίησης με επιπλέον χρόνο και κόστος, είναι εντελώς απαραίτητη προκειμένου να απαλλαγεί το εκχυλισμένο υλικό από διάφορους παρεμποδιστές, όπως ένζυμα, πρωτεΐνες, λιπίδια κλπ., οι οποίοι ελευθερώνονται από τα αυγά κατά τη λειοτρίβιση των κύστεων των ΚΝΠ. Οι Walsh *et al.* (1991) ανέπτυξαν μια μέθοδο εξαγωγής DNA, χρησιμοποιώντας ένα πολυμερές ρητίνης, το Chelex resin. Η μέθοδος Chelex αποδείχθηκε ακίνδυνη, καθώς δεν περιλαμβάνει οργανικούς διαλύτες, και είναι γρήγορη, αφού η όλη διαδικασία πραγματοποιείται σε ένα μόνο μικροσωλήνα. Επιπρόσθετα, η μέθοδος Chelex φαίνεται να απομακρύνει τα μόρια που δρουν ως παρεμποδιστές της PCR (Walsh *et al.*, 1991). Άλλες μέθοδοι, που έχουν χρησιμοποιηθεί για εξαγωγή και εκχύλιση DNA, περιλαμβάνουν την προσρόφηση του DNA σε στήλες πυριτίου (Qiagen's DNeasy Blood and Tissue kit), την προσκόλληση του DNA σε μαγνητικά μικροσφαιρίδια (Invitrogen's Charge Switch Micro Tissue kit), και τον καθαρισμό του DNA με χλωροφόρμιο/οξικό νάτριο (Cenis *et al.*, 1993).

Η χρήση τη νέας τεχνολογίας Taqman στις αντιδράσεις Real-Time PCR, επιβάλλει την επαναξιολόγηση των μεθόδων εξαγωγής DNA, αφού η υψηλή ευαισθησία της μεθόδου αυτής είναι δυνατό να επιτρέπει την αποτελεσματική ανίχνευση των ΚΝΠ, ακόμη και στην παρουσία παρεμποδιστών της PCR. Συνεπώς, επιβάλλεται να μελετηθεί η δυνατότητα εφαρμογής μεθόδων εξαγωγής DNA που να δίνουν αξιόπιστα αποτελέσματα, με το χαμηλότερο δυνατό κόστος και τη μεγαλύτερη δυνατή ασφάλεια για το χρήστη.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η βελτιστοποίηση της μεθοδολογίας μοριακής ανίχνευσης και ταυτοποίησης των ΚΝΠ, αναφορικά με την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων και την ταχύτητα και το κόστος εφαρμογής. Για το σκοπό αυτό, σχεδιάστηκαν εξειδικευμένοι εκκινητές και Taqman® ανιχνευτές για τα δύο είδη των ΚΝΠ, *G. rostochiensis* και *G. pallida*, που υπάρχουν στην Κύπρο. Οι εκκινητές αυτοί συγκρίθηκαν με τους εκκινητές που σχεδίασαν οι Nakhla *et al.* (2010) και Papayiannis *et al.* (2013), τόσο για την ικανότητα τους να ξεχωρίζουν τα δύο είδη σε αντιδράσεις μικτών πληθυσμών όσο και για το βαθμό ευαισθησίας που παρουσιάζουν κατά την ανίχνευση και ενίσχυση του DNA. Παράλληλα, έγινε αξιολόγηση 5 διαφορετικών μεθόδων εξαγωγής γονιδιακού DNA από κύστες των δύο ειδών ΚΝΠ, ως προς την ποσότητα και καθαρότητα των εκχυλισμένων νουκλεϊκών οξέων, καθώς και το βαθμό δυσκολίας και το κόστος εφαρμογής της κάθε μεθόδου.

3.3 Υλικά και Μέθοδοι

3.3.1 Πληθυσμοί των ΚΝΠ

Χρησιμοποιήθηκαν κύστεις από συνολικά 17 πληθυσμούς των δύο ειδών ΚΝΠ, *G. rostochiensis* και *G. pallida*. Σε ορισμένα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν επίσης κύστεις του συγγενικού είδους *G. tabacum*, για να επιβεβαιωθεί η αναλυτική εξειδίκευση των μεθόδων ταυτοποίησης στα δύο είδη ΚΝΠ. Οι πληθυσμοί που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από: i) τη συλλογή Κυπριακών πληθυσμών (βλ. 2.3.2), ii) το Ινστιτούτο Γεωργικών Ερευνών της Σλοβενίας, iii) το Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο της Ελλάδας και iv) το Ινστιτούτο Βελτίωσης Φυτών της Πολωνίας.

3.3.2 Σχεδιασμός εκκινητών και Taqman® ανιχνευτών

Για το σχεδιασμό των εκκινητών και Taqman® ανιχνευτών, ευθυγραμμίστηκαν πολλαπλές αλληλουχίες (alignments) των περιοχών ITS1 και ITS2 των ειδών του γένους *Globodera*, που λήφθηκαν από τη βάση δεδομένων GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI). Ο σχεδιασμός των εκκινητών και των Taqman® ανιχνευτών πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή του προγράμματος Primer Select του λογισμικού πακέτου Lasergene v8.0 (DNASTAR, Inc., Madison, USA). Για τον *G. rostochiensis* χρησιμοποιήθηκαν οι αλληλουχίες: HM159430, HM584981, DQ847119, EF622513, EF622515, EU517119, JF907552, GQ294512, GQ294520, FJ212162, FJ212163 και GU084810 και για τον *G. pallida* οι αλληλουχίες: AJ606687, EF153835, HM159429, GQ294523, DQ847109, FJ212165, EU006704, HQ670290, GU084818, GU084817, GU084813, GU084814, GU084812, GU084811, GU084805 και GU084797.

Οι Taqman® ανιχνευτές για τον *G. rostochiensis* και *G. pallida*, σημάνθηκαν στο 5' ακρο με τις φθορίζουσες χρωστικές FAM (6-carboxy fluorescein) και TET (6-carboxy-1,4-dichloro-2',7'-dichlorofluorescein), αντίστοιχα. Σημάνθηκαν επίσης στο 3' ακρο, με τις χρωστικές απόσβεσης φθορισμού BHQ1 (Black Hole Quencher1) και BHQ2 για τον *G. rostochiensis* και *G. pallida*, αντίστοιχα.

Κατά το σχεδιασμό των εκκινητών και των Taqman® ανιχνευτών λήφθηκαν υπόψη τα παρακάτω κριτήρια (Wang *et al.*, 2006):

- i. Η θερμοκρασία αποδιάταξης των εκκινητών (melting temperature, T_m) πρέπει να είναι μεταξύ 58-60°C και των Taqman® ανιχνευτών περίπου 10°C πάνω από την T_m των εκκινητών. Η T_m των εκκινητών για τα δύο είδη ΚΝΠ πρέπει να είναι ίδια.
- ii. Το μήκος των εκκινητών πρέπει να είναι μεταξύ 15-30 βάσεων (bp).
- iii. Η ποσότητα των βάσεων G και C πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 40-60%.
- iv. Το μέγεθος της αλληλουχίας πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 50 και 400 bp. Ιδανικό μέγεθος είναι από 50-150 bp.
- v. Το νουκλεοτίδιο G δεν πρέπει να επαναλαμβάνεται πάνω από 3 συνεχόμενες φορές και να μην υπάρχει στο 5' άκρο του Taqman® ανιχνευτή.
- vi. Ο Taqman® ανιχνευτής πρέπει να είναι 8-10 νουκλεοτίδια μακριά από τον εκκινητή.
- vii. Τα 5 τελευταία νουκλεοτίδια των εκκινητών δεν πρέπει να έχουν περισσότερα από 2 G ή C στο 3' άκρο.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών και των Taqman® ανιχνευτών που σχεδιάστηκαν σε αυτή την εργασία, καθώς και οι αλληλουχίες από τις εργασίες των Nakhla *et al.* (2010) και Papayiannis *et al.* (2013), παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

3.3.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των εκκινητών και Taqman® ανιχνευτών

Για τον προσδιορισμό της βέλτιστης συγκέντρωσης των εκκινητών που θα χρησιμοποιούνταν στις αντιδράσεις της Real – Time (Taqman®) PCR, αξιολογήθηκαν 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις (600, 300, 100 και 50 nM), επί 3 επαναλήψεις η κάθε μια. Το μίγμα των αντιδράσεων περιείχε σε τελικό όγκο των 20 μ l: 10 μ l 2 \times iQ Multiplex Powermix, το οποίο περιέχει dNTPs, 12 mM MgCl₂, iTaq DNA polymerase και σταθεροποιητές (Bio-Rad Laboratories, Inc.), X μ M εκκινητές, X μ M από τον κάθε Taqman® ανιχνευτή και 1 μ l DNA που προέκυψε από την εκχύλιση γονιδιακού DNA μιας κύστης με τη μέθοδο των στηλών πυριτίου (Qiagen's DNeasy Blood and Tissue kit), (βλ. 2.3.3).

Το πρωτόκολλο της Real – Time PCR αποτελείται από τις εξής παραμέτρους:

- i. Ενεργοποίηση της Taq πολυμεράσης στους 94°C για 4 min
- ii. Ακολουθούν 40 κύκλοι που περιλαμβάνουν δύο στάδια:
 1. Αποδιάταξη του DNA στους 94°C για 10s
 2. Υβριδοποίηση εκκινητών και Taq πολυμεράσης στους 60°C για 30s.

Για την ολοκλήρωση των αντιδράσεων Real – Time (Taqman®) PCR χρησιμοποιήθηκε ο θερμοκυκλοποιητής IQ™5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Ως βέλτιστη συγκέντρωση των εκκινητών θεωρήθηκε η ποσότητα που έδωσε τη μεγαλύτερη εκπομπή φθορισμού στους λιγότερους κύκλους, κατά την αντίδραση της Real – Time PCR. Η βέλτιστη συγκέντρωση των εκκινητών και των Taqman® ανιχνευτών επιλέχθηκε για την μετέπειτα σύγκριση τους με τους εκκινητές που σχεδιάστηκαν από τους Nakhla *et al.* (2010) και Parayiannis *et al.* (2013).

3.3.4 Αξιολόγηση εκκινητών και Taqman® ανιχνευτών ως προς την εξειδίκευση, αποδοτικότητα και ευαισθησία τους

Οι εκκινητές και οι Taqman® ανιχνευτές που σχεδιάστηκαν στην παρούσα εργασία για ανίχνευση και ταυτοποίηση των δύο ειδών ΚΝΠ, αξιολογήθηκαν σε σύγκριση με τους δημοσιευμένους εκκινητές και Taqman® ανιχνευτές που σχεδιάστηκαν από τους Nakhla *et al.* (2010) και Parayiannis *et al.* (2013). Για την κάθε ομάδα εκκινητών, χρησιμοποιήθηκε το αντίστοιχο πρωτόκολλο των κύκλων της Real – Time (Taqman®) PCR και η αντίστοιχη προτεινόμενη ποσότητα εκκινητών και Taqman® ανιχνευτών. Το μίγμα των αντιδράσεων περιείχε σε τελικό όγκο 20 µl: 10 µl 2× iQ Multiplex Powermix, το οποίο περιέχει dNTPs, 12 mM MgCl₂, iTaq DNA polymerase και σταθεροποιητές (Bio-Rad Laboratories, Inc.), 300 µM εκκινητές, 100 µM από τον κάθε Taqman® ανιχνευτή και 1 µl DNA (~ 5-10 ng). Από το κάθε είδος ΚΝΠ συλλέχθηκαν 1000 προνύμφες 2^{ov} σταδίου και χρησιμοποιήθηκαν για εξαγωγή DNA με τη μέθοδο των στηλών πυριτίου (Qiagen's DNeasy Blood and Tissue kit), (βλ. 2.3.3). Το υλικό εκχύλισης που προέκυψε από το κάθε είδος ΚΝΠ, υποβλήθηκε σε πέντε διαδοχικές αραιώσεις και χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση των εκκινητών και Taqman® ανιχνευτών που σχεδιάστηκαν σε αυτή την εργασία, σε σύγκριση με αυτούς που σχεδιάστηκαν από τους Nakhla *et al.* (2010) και Parayiannis *et al.* (2013).

Για την ολοκλήρωση των αντιδράσεων της Real – Time (Taqman®) PCR, χρησιμοποιήθηκε ο θερμοκυκλοποιητής IQ™ 5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Η ομάδα εκκινητών και Taqman® ανιχνευτών που

είχε τη μεγαλύτερη εξειδίκευση, την καλύτερη απόδοση και τη μεγαλύτερη ευαισθησία, επιλέγθηκε για την αξιολόγηση των πέντε μεθόδων εξαγωγής DNA (βλ. 3.3.5). Επίσης, χρησιμοποιήθηκε στα μετέπειτα πειράματα ποσοτικοποίησης και μοριακού διαχωρισμού των ζωντανών/νεκρών αυγών των ΚΝΠ (βλ. 4.3).

3.3.5 Μέθοδοι εξαγωγής DNA

DNA απομονώθηκε από κύστεις των δύο ειδών ΚΝΠ, *G. rostochiensis* και *G. pallida*, εφαρμόζοντας 5 διαφορετικές μεθόδους εξαγωγής νουκλεϊκών οξέων. Κάθε μεταχείριση περιείχε μία κύστη. Για κάθε μέθοδο χρησιμοποιήθηκαν 25 κύστεις από το κάθε είδος ΚΝΠ, επί τρεις επαναλήψεις. Η διαδικασία εξαγωγής DNA σε κάθε μέθοδο πραγματοποιήθηκε με: i) καθαρές κύστεις και ii) κύστεις ανεμιγμένες με οργανικά υλικά που προκύπτουν κατά την εξαγωγή των κύστεων με τη χρήση της συσκευής Fenwick. Σκοπός της χρήσης κύστεων που ήταν αναμιγμένες με οργανικά υλικά, ήταν η διερεύνηση της ενίσχυσης DNA των ΚΝΠ σε αντιδράσεις PCR, χωρίς την ανάγκη συλλογής κύστεων με τη χρήση στερεοσκοπίου.

Οι 5 μέθοδοι απομόνωσης και εξαγωγής γονιδιακού DNA περιλάμβαναν:

A. Προσρόφηση του DNA σε στήλες πυριτίου (Qiagen's DNeasy Blood and Tissue kit) (βλ. 2.3.3)

B. Προσκόλληση του DNA σε μαγνητικά σφαιρίδια (Invitrogen's Charge Switch Micro Tissue kit)

Γ. Καθαρισμό με το χηλικό υλικό Chelex (Chelex® 100 resin, Sigma, C-7901): η κύστη θερμαίνεται στους 95 °C για 5 min σε υδατικό διάλυμα Chelex 10% και ακολούθως το δείγμα φυγοκεντρείται για να διαχωριστεί το Chelex και τα οργανικά υλικά από το DNA,

Δ. Καθαρισμό με χλωροφόρμιο και οξικό νάτριο (βλ. Παράρτημα 9.1)

E. Λειοτρίβιση των κύστεων σε 80 μl ρυθμιστικού διαλύματος TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH: 8) και φυγοκέντρηση 5000 x g για 5 min.

Οι 5 μέθοδοι εξαγωγής DNA αξιολογήθηκαν ως προς:

- i. την ανάκτηση και καθαρότητα του DNA με φασματοφωτομετρία,
- ii. το βαθμό δυσκολίας και το κόστος της κάθε μεθόδου,
- iii. την ενίσχυση του DNA σε αντιδράσεις συμβατικής και Real – Time PCR.

3.3.6 Σύγκριση των 5 μεθόδων εξαγωγής DNA ως προς την ανάκτηση των νουκλεϊκών οξέων, το βαθμό δυσκολίας και το κόστος εφαρμογής τους

Η συγκέντρωση του DNA που εξήχθηκε με κάθε μια από τις μεθόδους (A-E), υπολογίστηκε με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων στα 260 nm, σε φασματοφωτόμετρο Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Inc., DE, USA). Η οπτική απορρόφηση στα 260 nm, που είναι ίση με τη μονάδα ($O.D_{260} = 1,0$), αντιστοιχεί σε συγκέντρωση DNA ίση με 50 $\mu\text{g/ml}$. Συνεπώς, η συγκέντρωση DNA υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση: $50 \mu\text{g/ml (DNA)} \times O.D_{260}$ του δείγματος \times Συντελεστή Αραιώσης.

Η καθαρότητα των δειγμάτων (template) καθορίστηκε με βάση την απορρόφηση: i) στα 260 και 280 nm για τον έλεγχο της παρουσίας πρωτεϊνών και ii) στα 260 και 230 nm για τον έλεγχο της παρουσίας άλλων οργανικών ουσιών, όπως υδρογονάνθρακες.

Ο βαθμός δυσκολίας της κάθε μεθόδου προσδιορίστηκε με βάση το χρόνο και το βαθμό εξειδίκευσης που απαιτείται για τη διεξαγωγή της κάθε μεθόδου από το χειριστή. Τέλος, το κόστος κάθε μεθόδου υπολογίστηκε από το κόστος που αναλογεί για κάθε δείγμα συν τον απαιτούμενο χρόνο για διεξαγωγή της μεθόδου, όταν αυτή πραγματοποιείται από ένα μόνο χειριστή.






3.3.7 Σύγκριση μεταξύ συμβατικής και Real – Time PCR ως προς την εξειδίκευση και την ευαισθησία της κάθε μεθόδου.

Ο βαθμός εξειδίκευσης (analytical specificity, Asp) και ευαισθησίας (analytical sensitivity, Ase) συγκρίθηκε μεταξύ αντιδράσεων συμβατικής PCR (Co-PCR) και Real – Time PCR. Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν διαδοχικές αραιώσεις 10X από DNA που απομονώθηκε από μια και μόνη κύστη. Το σημείο του οριακού κύκλου (C_t) από τη Real – Time PCR συγκρίθηκε με την παρουσία/απουσία ζωνών DNA σε πήγμα αγαρόζης από τα προϊόντα Co-PCR. Κατασκευάστηκε κλίμακα με βάση τη διαβάθμιση του λευκού χρώματος εμφάνισης των ζωνών DNA (πίνακας 5).

Στις αντιδράσεις της Co-PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές G.rost1 (5'-GCAAGCC-CAGCGTCAGCAAC-3') και G.rost2 (5'-GAACATCAACCTCCTATCGG-3') για τον *G. rostochiensis*, ενώ για τον *G. pallida* οι Gpall1 (5'-TGTCATTCCTCTCCACCAG-3') και Gpall2 (5'-CCGCTTCCCCATTGCTTTTCG-3') (Fullaondo *et al.*, 1999). Για την εφαρμογή της Co-PCR χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.3.3. και στις αντιδράσεις της Real – Time PCR

χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές και οι Taqman® ανιχνευτές που σχεδιάστηκαν από τους Parayiannis *et al.* (2013).

Πίνακας 5. Διαβάθμιση του χρώματος των ζωνών DNA σε πήγμα αγαρόζης από προϊόντα που προήλθαν από τη συμβατική PCR,

I.	+++		Έντονη
II.	++		Ήπια
III.	+		Αμυδρή
IV.	+/-		Πολύ αμυδρή
V.	-		Ανύπαρκτη

Ο βαθμός διαγνωστικής ευαισθησίας (diagnostic sensitivity, Dse), διαγνωστικής εξειδίκευσης (diagnostic specificity, Dsp) και ακρίβειας (Accuracy, Acc) υπολογίστηκαν από 199 DNA δείγματα του *G. pallida* και 180 DNA δείγματα του *G. rostochiensis*, χρησιμοποιώντας τις ακόλουθες εξισώσεις (Martin, 1984; Mattocks *et al.*, 2010):

- I. $Dse \% = \left[\frac{\text{αριθμός πραγματικά θετικών δειγμάτων}}{\text{αριθμός πραγματικά θετικών δειγμάτων} + \text{αριθμός εσφαλμένα αρνητικών δειγμάτων}} \right] \times 100$
- II. $Dsp \% = \left[\frac{\text{αριθμός πραγματικά αρνητικών δειγμάτων}}{\text{αριθμός πραγματικά αρνητικών δειγμάτων} + \text{αριθμός εσφαλμένα θετικών δειγμάτων}} \right] \times 100$
- III. $Acc \% = \left[\frac{\text{αριθμός πραγματικά αρνητικών δειγμάτων} + \text{αριθμός πραγματικά θετικών δειγμάτων}}{\text{αριθμός πραγματικά αρνητικών δειγμάτων} + \text{αριθμός πραγματικά θετικών δειγμάτων} + \text{αριθμός εσφαλμένα αρνητικών δειγμάτων} + \text{αριθμός εσφαλμένα θετικών δειγμάτων}} \right] \times 100$

3.3.8 Στατιστική Ανάλυση

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το στατιστικό πακέτο R (R Development core team 2011, www.R-project.org), χρησιμοποιώντας τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων (Least square Differences, LSD) στο επίπεδο σημαντικότητας 0.05.

3.4.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης εκκινητών και Taqman® ανιχνευτών

Οι εκκινητές και οι Taqman® ανιχνευτές που σχεδιάστηκαν στην παρούσα μελέτη (βλ. 3.3.2 και 3.4.1), υποβλήθηκαν σε αντιδράσεις Real – Time PCR με σκοπό τον προσδιορισμό της βέλτιστης συγκέντρωσης τους και ταυτόχρονα την βελτιστοποίηση της αντίδρασης. Η συγκέντρωση των εκκινητών και των Taqman® ανιχνευτών που εξέπεμψε τον υψηλότερο φθορισμό και παρουσίασε τις χαμηλότερες τιμές οριακού κύκλου (Ct) ήταν 300 nM για τους εκκινητές και 100 nM για τους Taqman® ανιχνευτές, τόσο για τον *G. rostochiensis* όσο και για τον *G. pallida*.

3.4.3 Αξιολόγηση εκκινητών και Taqman® ανιχνευτών ως προς την εξειδίκευση, την αποδοτικότητα και την ευαισθησία τους

Οι εκκινητές και οι Taqman® ανιχνευτές που σχεδιάστηκαν σε αυτή την εργασία, καθώς και αυτοί που σχεδιάστηκαν από τους Nakhla *et al.* (2010) και Papayiannis *et al.* (2013), παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

Τα δύο σετ εκκινητών και Taqman® ανιχνευτών που σχεδιάστηκαν σε αυτή την εργασία για τα δύο είδη ΚΝΠ, δεν παρουσίασαν αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Επιπλέον, το κάθε σετ εκκινητών και Taqman® ανιχνευτών παρουσίασε εξειδίκευση στο είδος για το οποίο σχεδιάστηκε. Οι τιμές Ct που λήφθηκαν από την Real – Time PCR, χρησιμοποιώντας μόνο το ένα σετ εκκινητών και Taqman® ανιχνευτών (Singleplex), δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές από τις τιμές Ct που λήφθηκαν κατά την ανάμιξη των δύο σετ (Duplex), αποδεικνύοντας την εξειδίκευση του κάθε σετ στην ανίχνευση και τον διαχωρισμό του αντίστοιχου είδους ΚΝΠ, σε μικτές αντιδράσεις.

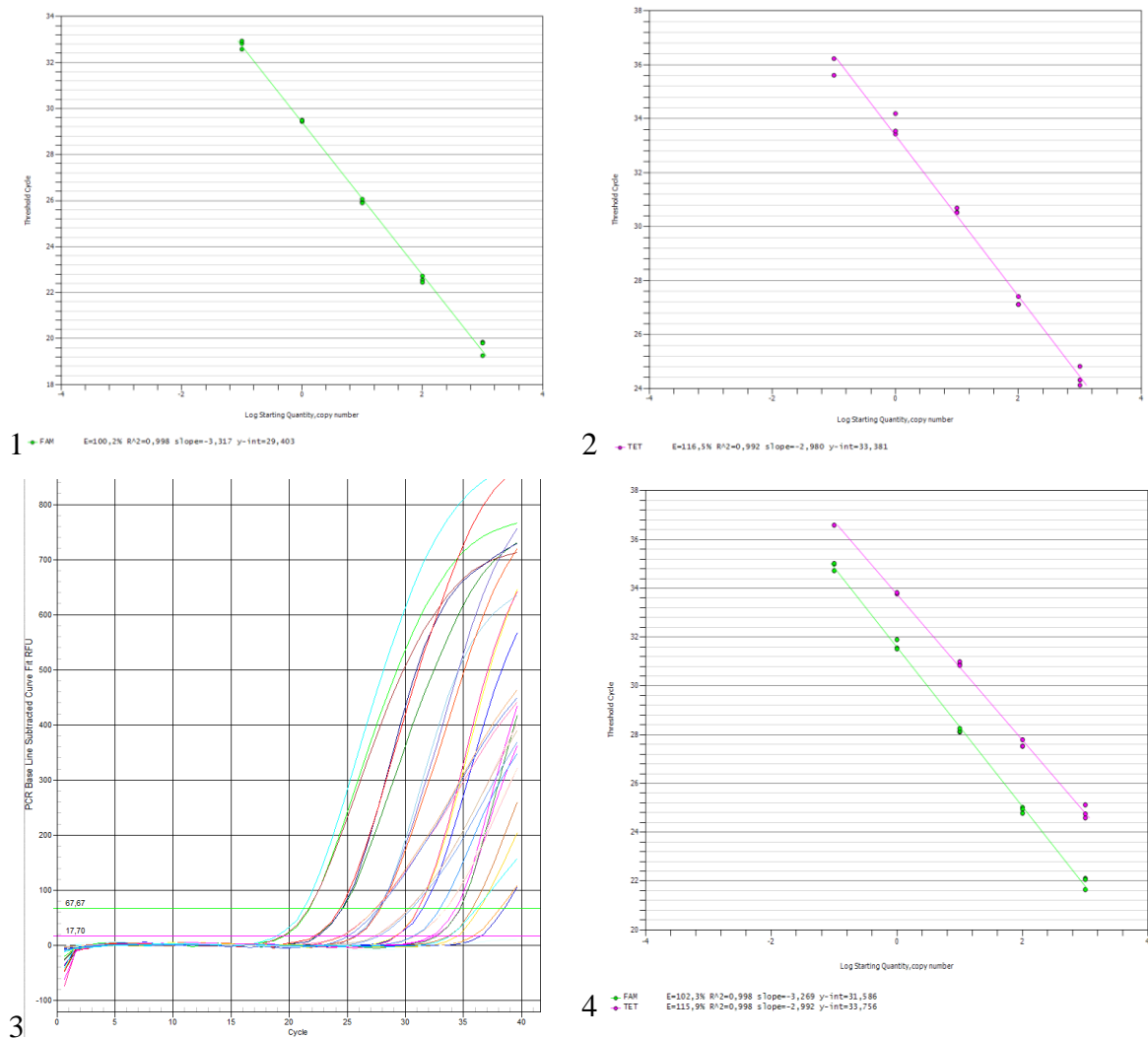
Η απόδοση των αντιδράσεων, όταν υποβλήθηκαν σε Singleplex Real – Time PCR, ήταν 100,2 % ($R^2 = 0.998$) και 116,5 % ($R^2 = 0.992$) για τον *G. rostochiensis* (FAM) και *G. pallida* (Cy5), αντίστοιχα. Στις Duplex αντιδράσεις, η απόδοση των αντιδράσεων ήταν 101,7 % ($R^2 = 0.998$) και 117,9 % ($R^2 = 0.992$) για τον *G. rostochiensis* και *G. pallida*, αντίστοιχα (Εικ. 21). Ο μέσος όρος των τιμών Ct για τον *G. rostochiensis* ήταν 21,94 για 1000 J2, 24,91 για 100 J2, 28,17 για 10 J2, 31,66 για 1 J2 και 34,91 για 0,1 J2. Ο μέσος όρος των τιμών Ct για τον *G. pallida* ήταν 24,79 για 1000 J2, 27,58 για 100 J2, 30,88 για 10 J2, 34,03 για 1 J2 και 36,77 για 0,1 J2.

Πίνακας 6. Εκκινητές και Taqman® ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις της Real – Time PCR

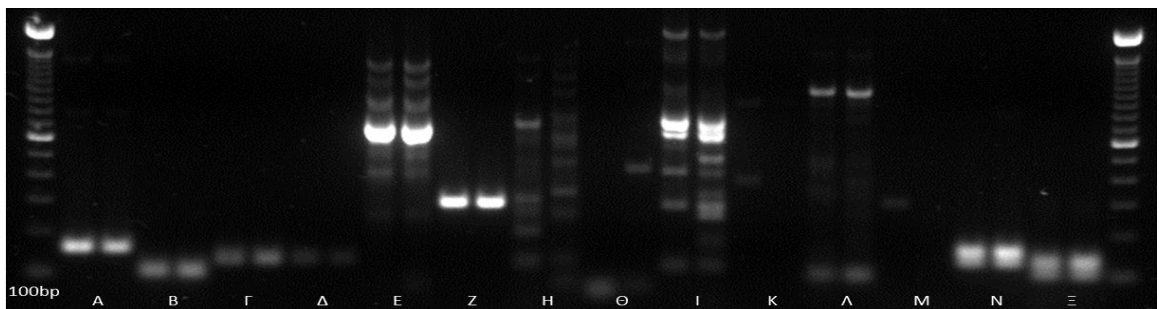
Primer name	Primer sequence (5' – 3')	Reference
GLOBOFOR	CACATGCCTCCGTTTGTGT	Papayiannis <i>et al.</i> 2013
ROSTOTAQ	*FAM/CATATGCCCACTGTGTATGGGCTGGC/**BHQ1	Papayiannis <i>et al.</i> 2013
ROSTOREV	GGCGCTGTCCGTACATTGTT	Papayiannis <i>et al.</i> 2013
GLOBOFOR	CACATGCCTCCGTTTGTGT	Papayiannis <i>et al.</i> 2013
PALLITAQ	Cy5/CACATGCCCGCTATGTTTGGGCTG/BHQ2	Papayiannis <i>et al.</i> 2013
PALLIREV	GCGCTGTCCATACATTGTTGA	Papayiannis <i>et al.</i> 2013
PITSpf,	ACGGACACATGCCCGCTA	Nakhla <i>et al.</i> 2010
GFAMp	FAM/ACATGAGTGTTGGGGTGTAAC/BHQ-1	Nakhla <i>et al.</i> 2010
PITS4	ACAACAGCAATCGTCGAG	Nakhla <i>et al.</i> 2010
PGrtf	TCTGTGCGTCGTTGAGC	Nakhla <i>et al.</i> 2010
GTETp	TET/CGCAGATATGCTAACATGGAGTGTAG/BHQ-2	Nakhla <i>et al.</i> 2010
Prostor	CGCAGACATGCCGCAA	Nakhla <i>et al.</i> 2010
Glob_pall_F	TGAGCGGTTGTTGCGCCTTGCG	Παρούσα εργασία
Pallida_TP	TET/TACGGCACGTACGACATGGAATAGCAGC/BHQ-2	Παρούσα εργασία
Pallida_R	ACACATCCGCTGACTTGCCGCGY	Παρούσα εργασία
Rostoch_F	GGGTCATTGCGCCATCGGAGGAA	Παρούσα εργασία
Rostoch_TP	FAM/CAACAACCGCTCAACGACGCACAGA/BHQ-1	Παρούσα εργασία
Rostoch_R	CGGGAGGCCATGTTAGCGTATCTG	Παρούσα εργασία

*FAM, Cy5 και TET = Χρωστικές εκπομπής φθορισμού. ** BHQ-1 και BHQ-2 = Χρωστικές απόσβεσης φθορισμού (Quencher fluorophore)

Κεφάλαιο 3: Ανίχνευση και ταυτοποίηση των ΚΝΠ στην Κύπρο



Εικόνα 21. Γραφική απεικόνιση των αντιδράσεων της Real – Time PCR που πραγματοποιήθηκε με τους εκκινητές και Taqman® ανιχνευτές που σχεδιάστηκαν σε αυτή την εργασία. Στα διαγράμματα 1 και 2 απεικονίζονται οι πρότυπες καμπύλες από την Singleplex PCR για τον *G. rostochiensis* και *G. pallida*, αντίστοιχα. Στον άξονα των X απεικονίζεται ο λογάριθμος του αριθμού των αυγών (1000, 100, ..., 0.1 J2) ενώ στον άξονα Ψ απεικονίζονται οι τιμές του οριακού κύκλου. Στο διάγραμμα 3 απεικονίζεται η καμπύλη ενίσχυσης της Duplex PCR σε πραγματικό χρόνο. Η πράσινη (FAM) και ροζ (TET) οριζόντια γραμμή αντιστοιχεί στην γραμμή του οριακού κύκλου και τα σημεία όπου τέμνουν οι καμπύλες την κάθε γραμμή αποτελούν τις τιμές Ct. Στο διάγραμμα 4 απεικονίζεται η πρότυπη καμπύλη των δύο ειδών ΚΝΠ σε Duplex PCR.

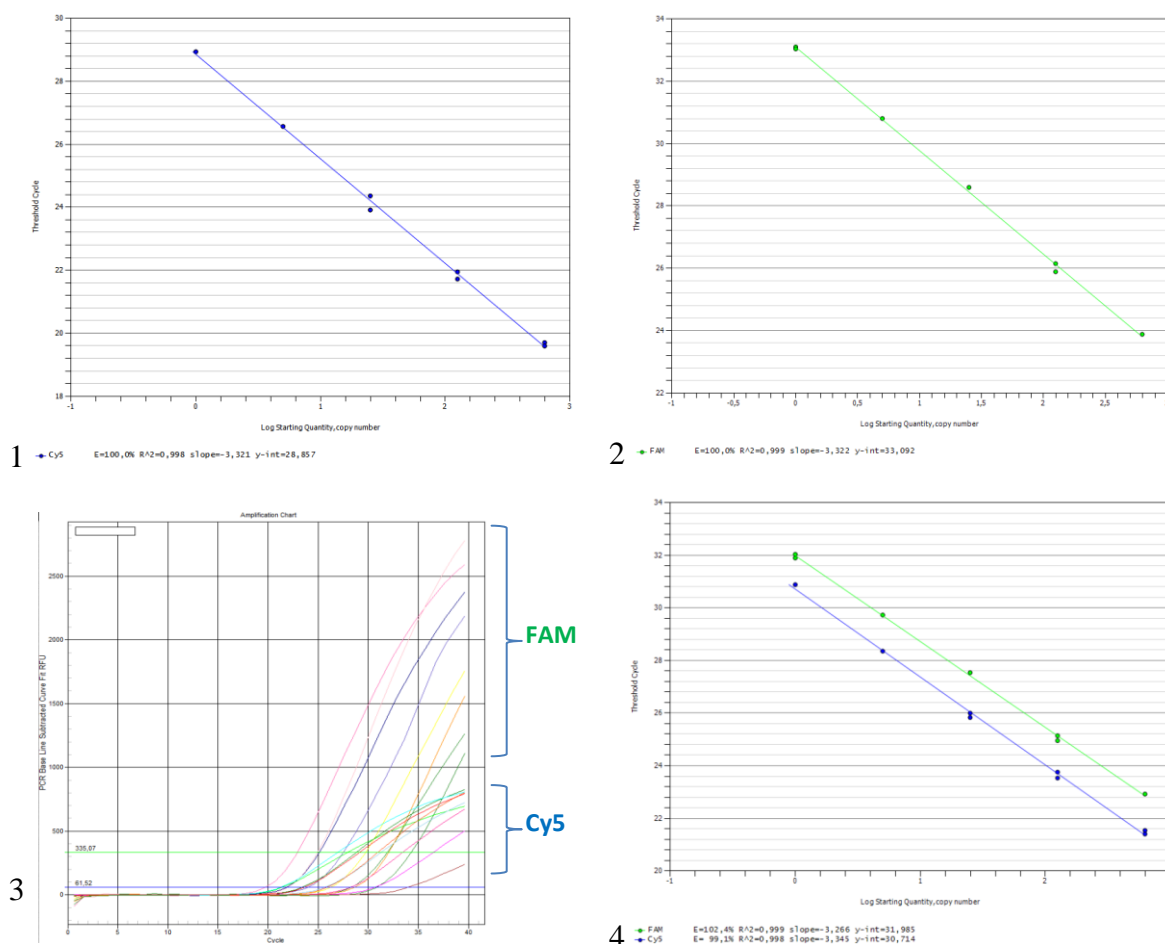


Εικόνα 22. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων που ενισχύθηκαν μετά από συνδυασμό των εκκινητών των Nakhla *et al.* (2010) σε Singleplex (A – M) και Duplex (N-Ξ) συμβατική PCR.

Υπό τις συνθήκες των πειραμάτων μας, οι εκκινητές και οι Taqman® ανιχνευτές που δημοσιεύτηκαν από τους Nakhla *et al.* (2010) δεν παρουσίασαν εξειδίκευση ως προς τα δύο είδη και δεν είχαν σταθερή απόδοση όταν υποβλήθηκαν σε Singleplex ή Duplex Real – Time PCR. Σε διάφορες επαναλήψεις των αντιδράσεων Real – Time PCR, τόσο σε Singleplex όσο και σε Duplex, η απόδοση ήταν ασταθής και κυμαινόταν από 56% μέχρι 338%. Οι εκκινητές υποβλήθηκαν σε συμβατική PCR (Co-PCR) με 14 διαφορετικούς συνδυασμούς των εκκινητών, προκειμένου να διερευνηθεί η εξειδίκευση τους στο κάθε είδος ΚΝΠ. Τα προϊόντα της Co-PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήγμα αγαρόζης, όπου διαπιστώθηκε ότι οι εκκινητές δεν είχαν καμία εξειδίκευση προς τα δύο είδη ΚΝΠ, αφού παρατηρήθηκαν πολλαπλές ζώνες DNA (Εικ. 22). Με βάση τα πιο πάνω αποτελέσματα, οι εκκινητές και οι Taqman® ανιχνευτές που δημοσιεύτηκαν από τους Nakhla *et al.* (2010) αποκλείστηκαν από τις μετέπειτα εργασίες αυτής της μελέτης.

Οι εκκινητές και οι Taqman® ανιχνευτές που σχεδιάστηκαν από τους Papaïannīs *et al.* (2013) δεν παρουσίασαν αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Αντίθετα, παρουσίασαν εξειδίκευση προς το είδος για το οποίο σχεδιάστηκαν, χωρίς να παρατηρηθεί αλληλεπίδραση εκκινητών ή Taqman® ανιχνευτών με την αλληλουχία του άλλου είδους. Οι Ct τιμές που λήφθηκαν από την Singleplex Real – Time PCR δεν διέφεραν σημαντικά από τις τιμές Ct που λήφθηκαν κατά την Duplex Real – Time PCR, δείχνοντας την εξειδίκευση των δύο σετ εκκινητών και Taqman® ανιχνευτών στην ανίχνευση και το διαχωρισμό των δύο ειδών ΚΝΠ σε μεικτές αντιδράσεις.

Η απόδοση των αντιδράσεων, όταν υποβλήθηκαν σε Singleplex Real – Time PCR, ήταν 100 % ($R^2 = 0.99$) τόσο για τον *G. rostochiensis* (FAM) όσο και για τον *G. pallida* (Cy5). Κατά τις Duplex αντιδράσεις, η απόδοση των αντιδράσεων ήταν 102,4 % ($R^2 = 0.999$) και 99,1 % ($R^2 = 0.998$) για τον *G. rostochiensis* και *G. pallida*, αντίστοιχα (Εικ. 23). Ο μέσος όρος των τιμών Ct για τον *G. rostochiensis* ήταν 22.50 για 1000 J2, 24.90 για 100 J2, 27.54 για 10 J2, 29.93 για 1 J2 και 31.90 για 0,1 J2. Ο μέσος όρος των τιμών Ct για τον *G. pallida* ήταν 21.40 για 1000 J2, 23.53 για 100 J2, 25.85 για 10 J2, 28.36 για 1 J2 και 30.88 για 0,1 J2.



Εικόνα 23. Γραφική απεικόνιση των αντιδράσεων της Real – Time PCR που πραγματοποιήθηκε με τους εκκινητές και Taqman® ανιχνευτές που σχεδιάστηκαν από τους Parayiannis *et al.* (2013).

Στα διαγράμματα 1 και 2 απεικονίζονται οι πρότυπες καμπύλες από την Singleplex PCR για τον *G. pallida* και *G. rostochiensis*, αντίστοιχα. Στον άξονα των Χ απεικονίζεται ο λογάριθμος της ποσότητας των αυγών (1000, 100, ..., 0.1J2) ενώ στον άξονα Ψ απεικονίζονται οι τιμές του οριακού κύκλου. Στο διάγραμμα 3 απεικονίζεται η καμπύλη ενίσχυσης της Duplex PCR σε πραγματικό χρόνο. Η πράσινη (FAM) και μπλε (Cy5) οριζόντια γραμμή αντιστοιχεί στην γραμμή του οριακού κύκλου και τα σημεία όπου τέμνουν οι καμπύλες την κάθε γραμμή, αποτελούν τις τιμές Ct. Στο σημείο 4 απεικονίζονται οι πρότυπες καμπύλες των δύο ειδών ΚΝΠ σε Duplex PCR.

3.4.4 Αξιολόγηση της καθαρότητας του DNA από τις πέντε μεθόδους εξαγωγής

Οι μέσοι όροι των τιμών οπτικής πυκνότητας του εκχυλισμένου DNA, που λήφθηκαν από το φασματοφωτόμετρο (Nanodrop) για κάθε μια από τις πέντε μεθόδους, παρουσιάζονται στον Πίνακα 7. Ο λόγος των απορροφήσεων 260/280 nm καταδεικνύει πως, η πιο καθαρή εκχύλιση DNA προέκυψε από τη μέθοδο Γ (καθαρισμός με το χηλικό υλικό Chelex), ακολουθούμενη από τη μέθοδο Α (προσρόφηση του DNA σε στήλες πυριτίου) και μετά τη μέθοδο Β (προσκόλληση του DNA σε μαγνητικά μικροσφαιρίδια). Οι διαφορές μεταξύ των τριών μεθόδων δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ($P>0,05$). Η

χειρότερη μέθοδος, ως προς την καθαρότητα του DNA, ήταν η Δ (καθαρισμός με χλωροφόρμιο και οξικό νάτριο), η οποία παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές από τις Α, Β και Γ ($P < 0,05$). Ενδιάμεσα αποτελέσματα, μεταξύ των μεθόδων Β και Δ, έδωσε η μέθοδος Ε (απλή λειοτριβίση των κύστεων σε 80 μl ρυθμιστικού διαλύματος ΤΕ), η οποία δεν διέφερε στατιστικά από τις μεθόδους Α, Β, Γ και Δ.

Πίνακας 7. Σύγκριση των 5 μεθόδων εξαγωγής DNA με βάση το λόγο των απορροφήσεων 260/280 και 260/230 nm στο φασματοφωτόμετρο.

Nanodrop Απορρόφηση	Μέθοδοι εξαγωγής DNA				
	A*	B	Γ	Δ	E
260/280 nm	1,61 ** (0,12) ^a	1,48 (0,13) ^a	1,69 (0,17) ^a	1,21 (0,12) ^b	1,34 (0,12) ^{a,b}
260/230 nm	1,33 (0,14) ^a	1,25 (0,11) ^a	0,86 (0,12) ^b	0,54 (0,10) ^c	0,61 (0,11) ^c

*Α, Β, Γ, Δ και Ε: Μέθοδοι εξαγωγής DNA, Α= Προσρόφηση του DNA σε στήλες πυριτίου, Β = Προσκόλληση του DNA σε μαγνητικά σφαιρίδια, Γ= Καθαρισμό με το χηλικό υλικό Chelex, Δ= Καθαρισμό με χλωροφόρμιο και οξικό νάτριο, Ε= Λειοτριβίση των κύστεων σε 80 μl ρυθμιστικού διαλύματος ΤΕ.

**Τυπικό σφάλμα ($n=25$). ^{a, b, & c}: Σύγκριση μέσων όρων. Στα σημεία που επαναλαμβάνεται το ίδιο γράμμα ^{a, b}, ή ^c, οι τιμές δεν διαφέρουν σημαντικά ($P > 0,05$) ενώ όπου το γράμμα ^{a, b}, ή ^c είναι διαφορετικό οι τιμές διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$).

Ο λόγος των απορροφήσεων 260/230 nm δείχνει τις μεθόδους Α και Β να δίνουν τις υψηλότερες και συνάμα επιθυμητές τιμές, χωρίς να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($P > 0,05$). Η μέθοδος Γ παρουσίασε σημαντικά χαμηλότερες τιμές από τις Α και Β αλλά σημαντικά υψηλότερες από τις Δ και Ε. Οι δύο τελευταίες έδωσαν τις χαμηλότερες τιμές χωρίς να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους.

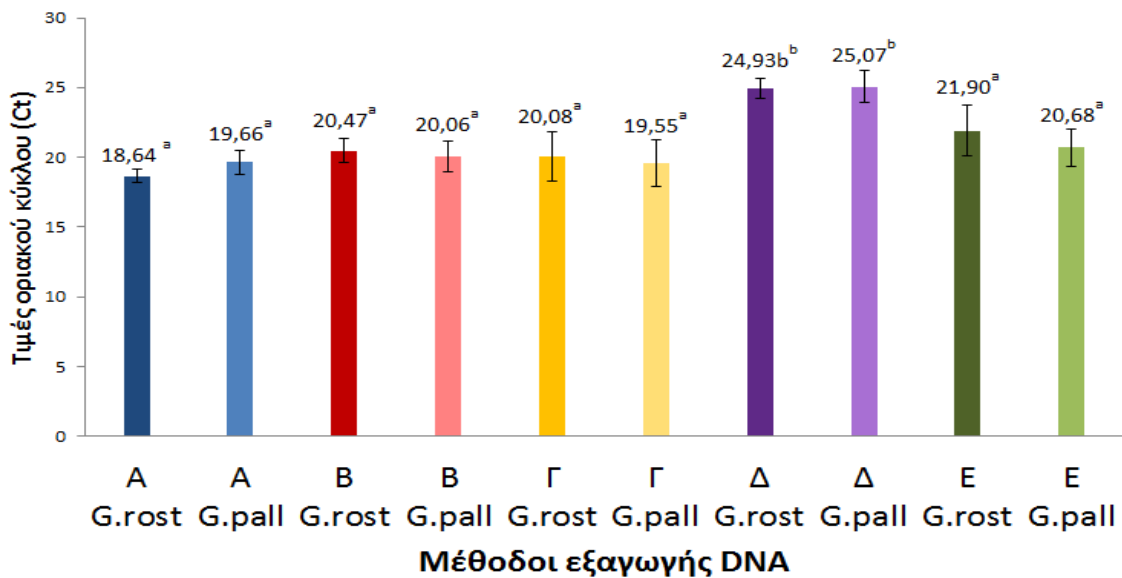
3.4.5 Σύγκριση του υλικού εκχύλισης από τις 5 μεθόδους εξαγωγής DNA με Co- και Real – Time PCR.

Real – Time PCR: Το υλικό εκχύλισης που προέκυψε από τη μέθοδο Α παρουσίασε τις χαμηλότερες τιμές Ct, σε σύγκριση με όλες τις άλλες μεθόδους. Τις υψηλότερες τιμές Ct έδωσε το υλικό εκχύλισης της μεθόδου Δ, με στατιστικά σημαντικές διαφορές (κατά 5-6 κύκλους) από το υλικό που προέκυψε από τις υπόλοιπες μεθόδους Α, Β, Γ και Ε ($P < 0,05$) (Εικ. 24). Ο βαθμός ευαισθησίας της Real – Time PCR ήταν υψηλότερος στις μεθόδους Α, Β, Γ και Ε, αφού ενισχύθηκε προϊόν και ανιχνεύτηκε σε αραιώσεις της τάξης

του 10^{-5} , σε αντίθεση με τη μέθοδο Δ, όπου η ανίχνευση παρατηρήθηκε μόνο μέχρι την αραιώση 10^{-4} (Πίνακας 8).

Co-PCR: Τα αποτελέσματα της Co-PCR απεικονίσθηκαν σε πήγμα αγαρόζης και η παρατήρηση των ζωνών DNA πραγματοποιήθηκε σε UV τράπεζα απεικόνισης πηγμάτων αγαρόζης. Στις μεθόδους Α, Β και Γ παρατηρήθηκαν έντονες ζώνες, σε αντίθεση με τις μεθόδους Δ και Ε, όπου οι ζώνες κυμαίνονταν από αμυδρές έως ανύπαρκτες.

Τα αποτελέσματα της Co-PCR, σε σύγκριση με την Real-Time PCR (qPCR), παρουσιάζονται στον Πίνακα 8. Από τη σύγκριση των δύο μεθόδων ταυτοποίησης διαφαίνεται ότι η Real – Time PCR είναι 3-5 φορές πιο ευαίσθητη από την Co-PCR.



Εικόνα 24. Σύγκριση των 5 μεθόδων εξαγωγής DNA (Α-Ε) από μονές κύστεις των δύο ειδών ΚΝΠ, *Globodera rostochiensis* (G.rost) και *G pallida* (G.pall) με βάση τις τιμές του οριακού κύκλου (Ct) της Real – Time PCR, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές και Taqman® ανιχνευτές που σχεδιάστηκαν από τους Parayiannis *et al.* (2013).

Οι 5 μέθοδοι εξαγωγής DNA (Α-Ε) περιλαμβάνουν: Α. Προσρόφηση του DNA σε στήλες πυριτίου, Β. Προσκόλληση του DNA σε μαγνητικά σφαιρίδια, Γ. Καθαρισμό με το χηλικό υλικό Chelex, Δ. Καθαρισμό με χλωροφόρμιο και οξικό νάτριο, Ε. Λειοτρίβιση των κύστεων σε 80 μl ρυθμιστικού διαλύματος TE.

^a & ^b: Σύγκριση μέσων όρων. Στις στήλες όπου επαναλαμβάνεται το ίδιο γράμμα ^a ή ^b, οι τιμές δεν διαφέρουν σημαντικά ($P > 0,05$) ενώ όπου το γράμμα ^a ή ^b είναι διαφορετικό οι τιμές διαφέρουν σημαντικά ($P < 0,05$).

Πίνακας 8. Σύγκριση μεταξύ συμβατικής (Co-PCR) και Real – Time Taqman® PCR (qPCR) ως προς την ευαισθησία της κάθε μεθόδου για την ανίχνευση των ειδών *Globodera rostochiensis* και *G. pallida*.

Διαδοχικές αραιώσεις DNA από μονή κύστη ^a	Μέθοδοι εξαγωγής DNA ^b									
	Μέθοδος Α		Μέθοδος Β		Μέθοδος Γ		Μέθοδος Δ		Μέθοδος Ε	
<i>G. rostochiensis</i>	CoPCR ^c	qPCR ^d	CoPCR	qPCR	CoPCR	qPCR	CoPCR	qPCR	CoPCR	qPCR
10 ⁰	+++	19.4	+++	20.3	+++	20.3	++	25.0	+	21.9
10 ⁻¹	++	22.7	++	23.4	++	23.7	+/-	28.4	-	25.1
10 ⁻²	+	26.0	+	26.7	+/-	27.0	-	32.1	-	28.4
10 ⁻³	-	29.3	-	29.9	-	30.2	-	35.2	-	31.7
10 ⁻⁴	-	32.5	-	33.2	-	33.5	-	38.6	-	35.0
10 ⁻⁵	-	35.3	-	36.5	-	37.2	-	-	-	38.4
<i>G. pallida</i>										
10 ⁰	+++	18.7	+++	19.9	+++	20.5	++	24.9	+	21.2
10 ⁻¹	++	22.3	++	23.1	++	23.7	+/-	28.3	-	24.6
10 ⁻²	+	25.5	+	26.4	+/-	27.1	-	31.9	-	27.7
10 ⁻³	-	28.9	-	29.9	-	30.4	-	35.5	-	30.0
10 ⁻⁴	-	32.1	-	33.1	-	33.7	-	38.8	-	33.4
10 ⁻⁵	-	35.2	-	36.3	-	37.4	-	-	-	37.1

^aΗ εκχύλιση DNA από κάθε μέθοδο υποβλήθηκε σε διαδοχικές αραιώσεις από 10⁰ - 10⁻⁵

^bΟι 5 μέθοδοι εξαγωγής DNA (Α-Ε) περιλαμβάνουν: Α. Προσρόφηση του DNA σε στήλες πυριτίου, Β. Προσκόλληση του DNA σε μαγνητικά σφαιρίδια, Γ. Καθαρισμό με το χηλικό υλικό Chelex, Δ. Καθαρισμό με χλωροφόρμιο και οξικό νάτριο, Ε. Λειοτριβίση των κύστεων σε 80 μl ρυθμιστικού διαλύματος TE.

^cΚάθε αραιώση υποβλήθηκε σε CoPCR και qPCR με 3 επαναλήψεις. Η κατηγοριοποίηση των ζωνών που ενισχύθηκαν στην CoPCR έχει ως εξής: +++ έντονη, ++ ήπια, + αμυδρή, +/- πολύ αμυδρή και - ανύπαρκτη.

^dΟι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους του οριακού κύκλου (Ct) που προέκυψαν από 5 δείγματα των 3 επαναλήψεων για κάθε αραιώση.

3.4.6 Σύγκριση των 5 μεθόδων εξαγωγής DNA ως προς το βαθμό δυσκολίας και το κόστος εφαρμογής

Από τις 5 μεθόδους εξαγωγής DNA, η πιο γρήγορη στην εφαρμογή και με το χαμηλότερο κόστος αποδείχτηκε η μέθοδος της απλής λειοτρίβισης των κύστεων σε 80 μl ρυθμιστικού διαλύματος TE (Μέθοδος Ε). Όμως, η διατήρηση του DNA σε τέτοιου τύπου υδατικά διαλύματα δε διαρκεί για μεγάλο χρονικό διάστημα, εξαιτίας της μετουσίωσης του από ένζυμα και μικροοργανισμούς (MacMillan *et al.*, 2006). Η μέθοδος Γ (καθαρισμός με το χηλικό υλικό Chelex), ήταν επίσης χαμηλού κόστους, εύκολη και γρήγορη στην εφαρμογή (Πίνακας 9). Η μέθοδος Δ (καθαρισμός με χλωροφόρμιο και οξικό νάτριο), ήταν επίσης χαμηλού κόστους (ελαφρά υψηλότερο από τη μέθοδο Γ), αλλά αποδείχθηκε η πιο απαιτητική, χρονοβόρα και δύσκολη στην εφαρμογή. Τέλος, οι μέθοδοι Α (προσρόφηση του DNA σε στήλες πυριτίου) και Β (προσκόλληση του DNA σε μαγνητικά σφαιρίδια), είχαν το υψηλότερο κόστος εφαρμογής και ήσαν πιο αργές από τις άλλες 3 μεθόδους, αφού περιλάμβαναν επιπλέον στάδια λύσης των κυττάρων και καθαρισμού του υλικού, πριν από την εκχύλιση του. Όμως, από τις 2 αυτές μεθόδους εκχυλίστηκε ποιοτικά το καλύτερο DNA. Σημειώνεται επίσης ότι τόσο οι μέθοδοι Α και Β, όσο και η μέθοδος Δ, απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό για την υλοποίησή τους.

Πίνακας 9. Σύγκριση των 5 μεθόδων εξαγωγής DNA ως προς το κόστος, το χρόνο και τη δυσκολία εφαρμογής.

Μέθοδοι εξαγωγής DNA	Κόστος / δείγμα ^a	Χρόνος εφαρμογής (h)		Δυσκολία εφαρμογής	Καθαρότητα DNA
		1 δείγμα	12 δείγματα		
A. DNeasy blood and tissue kit	3	2:05	2:30	++	++++
B. ChargeSwitch micro tissue kit	3	2:15	2:40	++	+++
Γ. Chelex resin	0.5	0:20	2:05	+	+++
Δ. Chloroform/Sodium acetate	0.75	2:00	2:20	+++	+
E. TE Buffer	0.2	0:15	0:25	+	+

^aΤο κόστος εφαρμογής της κάθε μεθόδου παρουσιάζεται σε ευρώ ανά δείγμα.

3.4.7 Αναλυτική και διαγνωστική ευαισθησία, εξειδίκευση και ακρίβεια των δύο μεθόδων ταυτοποίησης, Co- & Real Time (Taqman®) PCR

Αναλυτική εξειδίκευση και ευαισθησία: Η αναλυτική εξειδίκευση των δύο μεθόδων ταυτοποίησης, Co-PCR και Real – Time (Taqman®) PCR, αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας κύστες των ειδών *G. rostochiensis*, *G. pallida* και *G. tabacum*, από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Κατά την εφαρμογή της Real – Time (Taqman®) PCR, όπου χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές και Taqman® ανιχνευτές των Παπαγιάννης *et al.* (2013), δεν παρουσιάστηκε οποιαδήποτε αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο σετ εκκινητών, ούτε και μεταξύ εκκινητών και DNA διαφορετικού είδους. Το ζευγάρι εκκινητών Globofor/Rostren και ο ανιχνευτής RostoTaq ενίσχυσαν και παρήγαγαν φθορισμό, μόνο στα δείγματα του *G. rostochiensis*. Αντίστοιχα, το ζευγάρι εκκινητών Globofor/Palliren και ο ανιχνευτής PalliTaq ενίσχυσαν και παρήγαγαν φθορισμό, μόνο στα δείγματα του *G. pallida*. Στα δείγματα που περιείχαν DNA του συγγενικού είδους *G. tabacum* και σε αυτά που δεν περιείχαν DNA (αρνητικός μάρτυρας) δεν παρουσιάστηκε ενίσχυση προϊόντος ούτε φθορισμός.

Στις αντιδράσεις όπου χρησιμοποιήθηκε καλής ποιότητας DNA, από τις μεθόδους Α και Β, η Real – Time (Taqman®) PCR ήταν κατά 1000 φορές πιο ευαίσθητη από την Co-PCR. Όμως, ακόμη και στις αντιδράσεις όπου χρησιμοποιήθηκε μέτριας ποιότητας DNA από τις μεθόδους Γ, Δ και Ε, η Real – Time (Taqman®) PCR ήταν τουλάχιστο κατά 100 φορές πιο ευαίσθητη από την Co-PCR. Επιπρόσθετα, στις αντιδράσεις όπου χρησιμοποιήθηκε DNA από τη μέθοδο Ε, χωρίς καμιά επεξεργασία ή καθαρισμό, με την Co-PCR απεικονίστηκε ζώνη στο πήγμα αγαρόζης μόνο στο μη αραιωμένο δείγμα, ενώ με τη Real – Time (Taqman®) PCR παρατηρήθηκε ανίχνευση και ενίσχυση του DNA στόχου, ακόμη και σε αραιώσεις της τάξης του 10^{-5} (Πίνακας 8).

Διαγνωστική εξειδίκευση (Dsp), ευαισθησία (Dse) και ακρίβεια (Acc): Δεδομένου ότι η Real – Time (Taqman®) PCR ταυτοποίησε με ακρίβεια όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν, χωρίς να παρουσιαστούν ψευδώς θετικά ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, οι τιμές Dsp και Dse της μεθόδου έφτασαν το 100% για όλα τα δείγματα που περιείχαν *G. rostochiensis* και *G. pallida*. Στις αντιδράσεις της Co-PCR, όπου η ενίσχυση των προϊόντων απεικονίστηκε σε πήγμα αγαρόζης και καταγραφόταν η ύπαρξη ή απουσία των ζωνών DNA, ο μέσος όρος της Dsp υπολογίστηκε περίπου στο 94 και 97%, ενώ οι αντίστοιχοι μέσοι όροι της Dse υπολογίστηκαν περίπου στο 87 και 88%, για τον *G. pallida*

και *G. rostochiensis*, αντίστοιχα. Με βάση τα πιο πάνω αποτελέσματα, η ακρίβεια (Acc) της Real – Time (Taqman®) PCR ήταν 100% και για τα δύο είδη, ενώ η Acc της Co-PCR υπολογίστηκε στο 90 και 93% για τον *G. pallida* και *G. rostochiensis*, αντίστοιχα (Πίνακας 10).

Πίνακας 10. Σύγκριση διαγνωστικής εξειδίκευσης, ευαισθησίας και ακρίβειας μεταξύ των δύο μοριακών μεθόδων ταυτοποίησης Real – Time (Taqman®) PCR και Co-PCR

		<i>Globodera rostochiensis</i>	<i>Globodera pallida</i>
Real – Time (Taqman®) PCR	Πραγματικά θετικά	160 (160)	199 (199)
	Ψευδώς θετικά	0 (160)	0 (199)
	Πραγματικά αρνητικά	222 (222)	183 (183)
	Ψευδώς αρνητικά	0 (222)	0 (183)
	Dse	100 %	100 %
	Dsp	100 %	100 %
	Acc	100 %	100 %
Co-PCR	Πραγματικά θετικά	145 (160)	165 (199)
	Ψευδώς θετικά	7 (160)	11 (199)
	Πραγματικά αρνητικά	215 (222)	178 (183)
	Ψευδώς αρνητικά	19 (222)	25 (183)
	Dse	88 %	87 %
	Dsp	97 %	94 %
	Acc	93 %	90 %

^aΣτην παρένθεση αναγράφεται ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων που εξετάστηκαν.

3.5 Συζήτηση

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες αναπτύχθηκε με ραγδαίους ρυθμούς η εφαρμογή μοριακών τεχνικών για σκοπούς διάγνωσης φυτοπαθογόνων οργανισμών (Parayiannis *et al.*, (2013). Η πιο ευρέως διαδεδομένη διαγνωστική τεχνική είναι η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), η οποία χαρακτηρίζεται από μεγάλη εξειδίκευση, αφού χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση οργανισμών που παρουσιάζουν πολλά όμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά, όπως π.χ. τα δύο είδη των ΚΝΠ, *G. rostochiensis* και *G. pallida*. Άλλο πλεονέκτημα της PCR, είναι ο σύντομος χρόνος εφαρμογής και ο μεγάλος αριθμός δειγμάτων που μπορούν να αξιολογηθούν (96-384 δείγματα ανά αντίδραση). Οι μοριακές τεχνικές, και ειδικότερα η PCR, διδάσκονται στα πλείστα ανώτερα και ανώτατα εκπαιδευτικά ιδρύματα και επομένως, δεν αποτελεί πλέον πρόβλημα η εξεύρεση εξειδικευμένου προσωπικού για την εφαρμογή της. Εκτός από τη συμβατική PCR (Co-PCR), έχουν αναπτυχθεί βελτιωμένες τεχνικές PCR, όπως είναι η Real – Time (Taqman® ή SYBR Green) PCR (qPCR), οι οποίες αποτελούν ακόμη πιο ισχυρά εργαλεία στη διάγνωση των φυτοπαθογόνων οργανισμών. Μέσα από την παρούσα εργασία, η qPCR αποδείχθηκε πολύ πιο ευαίσθητη, ακριβής και με μεγαλύτερη εξειδίκευση από τη Co-PCR για την ταυτοποίηση των δύο ειδών ΚΝΠ.

Ένα μειονέκτημα και των δύο μεθόδων PCR (Co-PCR και qPCR) αποτελεί η ύπαρξη παραλλακτικότητας και πολυμορφισμού στο γονιδίωμα των οργανισμών στόχων που προέρχονται από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές ή/και περιβάλλοντα (Bekal *et al.*, 1997). Σε αυτό τον παράγοντα ίσως να οφείλεται η αποτυχία που διαπιστώθηκε στην παρούσα εργασία, αναφορικά με την εξειδίκευση των εκκινητών και Taqman® ανιχνευτών που σχεδιάστηκαν και δημοσιεύτηκαν από τους Nakhla *et al.* (2010), οι οποίοι δεν παρουσίασαν εξειδίκευση ως προς τα δύο είδη των ΚΝΠ. Συγκεκριμένα, οι εκκινητές αυτοί αλληλεπιδρούσαν μεταξύ τους, δίνοντας ζώνες DNA σε όλους τους πιθανούς συνδυασμούς. Έτσι, δεν ήσαν σε θέση να διαχωρίσουν τα δύο είδη των ΚΝΠ, όταν χρησιμοποιήθηκαν σε αντιδράσεις PCR που περιείχαν DNA από κύστες που προήλθαν είτε από κυπριακές είτε από πολωνικές και ιρλανδικές απομονώσεις. Επιπλέον, κατά την εισαγωγή των εκκινητών και των Taqman® ανιχνευτών στο πρόγραμμα Primer Select, παρατηρήθηκε ότι η θερμοκρασία αποδιάταξης (Tm) των εκκινητών ήταν ίδια με την Tm των Taqman® ανιχνευτών. Για τους πιο πάνω λόγους, το σετ εκκινητών και Taqman® ανιχνευτών που δημοσιεύτηκαν από τους Nakhla *et al.* (2010) δεν χρησιμοποιήθηκε περαιτέρω στην παρούσα εργασία.

Οι εκκινητές και Taqman® ανιχνευτές που σχεδιάστηκαν σε αυτή την εργασία, καθώς και εκείνοι των Parayiannis *et al.* (2013), έδειξαν υψηλό βαθμό εξειδίκευσης, ανιχνεύοντας και διαχωρίζοντας τα δύο είδη σε μικτές αντιδράσεις (duplex) PCR. Μεταξύ των δύο σετ εκκινητών και Taqman® ανιχνευτών, τα καλύτερα αποτελέσματα έδωσε το σετ που δημοσιεύτηκε από τους Parayiannis *et al.* (2013), παρουσιάζοντας υψηλότερη απόδοση (Efficiency, E=100%), τόσο σε singleplex όσο και σε duplex αντιδράσεις. Όμως, παρά τη σχετικά χαμηλότερη απόδοση τους, οι εκκινητές και Taqman® ανιχνευτές που σχεδιάστηκαν σε αυτή την εργασία, όπως βέβαια και αυτοί που δημοσιεύτηκαν από τους Parayiannis *et al.* (2013), μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά σε διαγνώσεις ρουτίνας για την ταυτοποίηση των ΚΝΠ που υπάρχουν στην Κύπρο.

Η απομόνωση και εκχύλιση υψηλής ποιότητας DNA θεωρείται απαραίτητη για την αποτελεσματική εφαρμογή αντιδράσεων της PCR, επομένως η επιλογή της ορθής μεθόδου εξαγωγής DNA είναι πολύ σημαντική για την επιτυχή διεκπεραίωση της μεθόδου (Dauphin *et al.*, 2009; Psifidi *et al.*, 2010). Η εκχύλιση ολικού DNA από κύστες των ΚΝΠ είναι δύσκολη, παρά το μικρό μέγεθος τους (~500 μm). Το περιεχόμενο των κύστεων αποτελείται από αυγά τα οποία εσωκλείουν προνύμφες 2^{ου} σταδίου, καθώς και από δισακχαρίτες, όπως η γλυκερόλη και η τρεχαλόζη (Shannon *et al.*, 2005). Η παρουσία των δισακχαριτών έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί παρεμπόδιση στις αντιδράσεις της PCR, γεγονός που καθιστά επιτακτική τη βελτιστοποίηση των μεθόδων εξαγωγής DNA από κύστες (Wilson, 1997; Tichopad *et al.*, 2004).

Από τις 5 μεθόδους εξαγωγής DNA που αξιολογήθηκαν, θετικές προοπτικές για μελλοντική εφαρμογή και με τις δύο μεθόδους PCR (Co-PCR και qPCR), έχουν οι μέθοδοι: (Α) Προσρόφηση του DNA σε στήλες πυριτίου, (Β) Προσκόλληση του DNA σε μαγνητικά μικροσφαιρίδια και (Γ) Καθαρισμός με το χηλικό υλικό Chelex. Και οι τρεις αυτές μέθοδοι παρουσίασαν υψηλό ποσοστό φθορισμού σε χαμηλό Ct (18.7 – 21.9) στις αντιδράσεις της qPCR, καθώς επίσης και έντονες ζώνες DNA (+++) στις αντιδράσεις Co-PCR. Ανάμεσα στις τρεις αυτές μεθόδους, το πιο καθαρό εκχύλισμα DNA έδωσαν οι μέθοδοι Α και Β, με βάση τα αποτελέσματα της οπτικής απορρόφησης στο φασματοφωτόμετρο (260/280 nm), ενώ η μέθοδος Γ υπερέφερε των άλλων δύο όσον αφορά το κόστος εφαρμογής. Επομένως, η εξαγωγή DNA από κύστες η/και αυγά των ΚΝΠ συστήνεται όπως πραγματοποιείται με τις μεθόδους Α ή Β, όταν τα δείγματα θα χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω μελέτες στο εργαστήριο (φυλογενετικές αναλύσεις, ποσοτικοποίηση με qPCR, κ.α.), οπότε θα πρέπει να αποθηκευτούν για μεγάλο χρονικό

διάστημα. Όμως, για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των ΚΝΠ σε δειγματοληπτικούς ελέγχους ρουτίνας, συστήνεται η εφαρμογή της μεθόδου Chelex (Γ), που έχει χαμηλότερο κόστος. Ακόμη χαμηλότερο κόστος έχει η μέθοδος της απλής λειοτρίβισης των κύστεων (Ε), η οποία συστήνεται ως η πλέον κατάλληλη όταν η ταυτοποίηση θα πραγματοποιηθεί με qPCR. Όταν όμως η ταυτοποίηση θα πραγματοποιηθεί με Co-PCR, για την εξαγωγή DNA ενδείκνυται η χρήση της μεθόδου Γ η οποία, όπως αποδείχθηκε στην παρούσα μελέτη, παρουσιάζει υψηλό βαθμό εξειδίκευσης και ευαισθησίας.

Οι εκκινητές και οι Taqman® ανιχνευτές που σχεδιάστηκαν από τους Papayiannis *et al.* (2013) επιλέγηκαν για τα μετέπειτα πειράματα που περιλάμβαναν αντιδράσεις qPCR στην παρούσα εργασία, αφού παρουσίασαν υψηλή αναλυτική ευαισθησία και εξειδίκευση. Επειδή τα χαρακτηριστικά αυτά δεν αντιστοιχούν απαραίτητα σε ορθή διαγνωστική ευαισθησία και εξειδίκευση (Saah & Hoover, 1997), εξετάστηκε χωριστά η διαγνωστική ευαισθησία (Dse), εξειδίκευση (Dsp) και ακρίβεια (Acc) των εκκινητών και Taqman® ανιχνευτών των Papayiannis *et al.* (2013) σε αντιδράσεις qPCR. Και στις τρεις περιπτώσεις (Dse, Dsp και Acc), τα αποτελέσματα έδειξαν τιμές ίσες με 100%, σε αντίθεση με τους παραδοσιακούς εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε αντιδράσεις Co-PCR, οι οποίοι έδειξαν τιμές Dse 88/87%, Dsp 97/94% και Acc 93/90%, για τη διάγνωση του *G. rostochiensis* και *G. pallida*, αντίστοιχα. Τα δεδομένα που προέκυψαν από την παρούσα εργασία αποδεικνύουν ότι η χρήση της τεχνολογίας Taqman® που προτείνουν οι Papayiannis *et al.* (2013) πλεονεκτεί έναντι άλλων μεθόδων, αφού μπορεί να ανιχνεύσει και να διαχωρίσει τα δύο είδη σε δείγματα που αραιώθηκαν μέχρι και 1000 φορές. Η μέθοδος της qPCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για την ποσοτικοποίηση των ΚΝΠ σε δείγματα εδάφους (MacMillan *et al.*, 2006). Επομένως, ο συνδυασμός της ανίχνευσης των ΚΝΠ με τη χρήση της τεχνολογίας Taqman® και η εφαρμογή της ποσοτικοποίησης που προσφέρει η μέθοδος της qPCR, μπορούν από κοινού να δώσουν τη λύση σε δύο καίρια προβλήματα που αντιμετωπίζουν τα εργαστήρια νηματωδολογίας, δηλαδή αφενός τη γρήγορη και έγκυρη ταυτοποίηση και αφετέρου την ποσοτικοποίηση των ΚΝΠ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Ανάπτυξη μιας νέας μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ζωντανών εγκυστωμένων αυγών των κυστογόνων νηματωδών της πατάτας

4.1 Περίληψη

Το μέγεθος της προσβολής από τους κυστογόνους νηματώδεις της πατάτας στο έδαφος, εκτιμάται με βάση τον αριθμό των νηματωδών που βρίσκονται εγκυστωμένοι στο εδαφικό μόλυσμα. Κάθε κύστη των ΚΝΠ περιέχει μέχρι και 500 αυγά, μέρος των οποίων, στην απουσία ξενιστή, μπορούν να παραμείνουν ζωντανά έως 20 χρόνια στο έδαφος. Κατά το διάστημα αυτό, το ποσοστό των ζωντανών αυγών φθίνει σταδιακά, ενώ το ποσοστό των νεκρών αυγών αυξάνεται συνεχώς (Jones, 1970). Επομένως, για την ορθολογική διαχείριση των ΚΝΠ, είναι απαραίτητος ο υπολογισμός των ζωντανών αυγών ανά γραμμάριο εδάφους. Η πιο κοινή μέχρι σήμερα μέθοδος προσδιορισμού των ζωντανών ΚΝΠ, είναι η μικροσκοπική παρατήρηση εμβρυωμένων νηματωδών, μετά από χρώση με τη χρωστική ουσία Meldola Blue. Όμως, η μέθοδος αυτή είναι χρονοβόρα, απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό και συχνά οδηγεί σε εσφαλμένη εκτίμηση του ζωντανού μολύσματος στο έδαφος (Nijboer H. & Parievliet J. E., 1990; Zaheer *et al.*, 1996b; Greco *et al.*, 2007). Αντίστοιχα, η μοριακή ποσοτικοποίηση των νηματωδών χρησιμοποιώντας Taqman ανιχνευτές με τη μέθοδο της qPCR, ανιχνεύει το DNA τόσο των ζωντανών όσο και των νεκρών νηματωδών, και συνεπώς έχει μεγάλη πιθανότητα σφάλματος.

Σε πρόσφατες έρευνες, η χρήση της ουσίας Propidium Monoazide (PMA) οδήγησε στον επιτυχή διαχωρισμό ζωντανών-νεκρών κυττάρων διαφόρων μικροοργανισμών (Nocker *et al.*, 2006; Nocker *et al.*, 2007). Το PMA δεν διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες των ζωντανών κυττάρων αλλά δεσμεύει το ελεύθερο DNA των νεκρών κυττάρων, αφού εγκαθίσταται ανάμεσα στις βάσεις (ένα μόριο PMA ανά 4-5 βάσεις) χωρίς να παρουσιάζει προτίμηση στην αλληλουχία, παρεμποδίζοντας την ενίσχυση του κατά την PCR (Nocker *et al.*, 2006). Στην παρούσα εργασία περιγράφεται για πρώτη φορά η ανάπτυξη μιας νέας μεθόδου για την ποσοτικοποίηση των ζωντανών εγκυστωμένων αυγών των ΚΝΠ με τη χρήση του PMA, σε συνδυασμό με εξειδικευμένους εκκινητές και Taqman ανιχνευτές, σε αντιδράσεις Real-Time PCR. Η επιτυχημένη αφαίρεση του ελεύθερου DNA των νεκρών νηματωδών με τη χρήση του PMA, και η ποσοτικοποίηση

των ΚΝΠ με qPCR, επέτρεψαν τον επακριβή ποσοτικό προσδιορισμό των ζωντανών εγκυστωμένων αυγών, τα οποία αντιπροσωπεύουν το πραγματικό (ζωντανό) εδαφικό μόλυσμα των ΚΝΠ. Η νέα μέθοδος είναι πιο γρήγορη, εύχρηστη και αξιόπιστη σε σύγκριση με τις κλασσικές μεθόδους.

4.2 Εισαγωγή

Οι κυστογόνοι νηματώδεις της πατάτας (ΚΝΠ), *Globodera pallida* (Stone) Behrens και *G. rostochiensis* (Woll.) Behrens, είναι φυτοпараσιτικοί νηματώδεις των σολανωδών φυτών. Στην Ε.Ε. οι ΚΝΠ συγκαταλέγονται στα φυτοπαθογόνα καραντίνας και θεωρούνται εξαιρετικά επικίνδυνα εξαιτίας της γρήγορης διασποράς τους μέσω της εμπορίας πατατών και πατατοσπόρου, των δυσκολιών που παρουσιάζονται στην αντιμετώπιση τους, αλλά και των τεράστιων απωλειών που προκαλούν στην πατατοκαλλιέργεια (Evans *et al.*, 1992). Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία, απαγορεύεται η καλλιέργεια και παραγωγή πατατοσπόρου σε αγροτεμάχια μολυσμένα με ΚΝΠ, ενώ στην περίπτωση παραγωγής εδώδιμων πατατών επιβάλλεται ο συστηματικός έλεγχος, με δειγματοληψίες εδάφους, για τον προσδιορισμό της ποσότητας και της έκτασης της διασποράς των δύο ειδών στο έδαφος (EU, 2007). Τα κυριότερα μέτρα αντιμετώπισης των ΚΝΠ περιλαμβάνουν την εφαρμογή νηματοδοκτόνων εδάφους, τη χρήση ανθεκτικών ποικιλιών και την εφαρμογή αγρανάπαυσης ή/και αμειψισποράς. Η ορθή εφαρμογή των πιο πάνω μέτρων προϋποθέτει επακριβή γνώση της ταυτότητας του είδους ή των ειδών των ΚΝΠ, όπως επίσης και του/των παθότυπου/παθότυπων και κυρίως, της ποσότητας του ζωντανού μολύσματος που είναι εγκατεστημένο στο έδαφος του αγροτεμαχίου. Μέχρι πρόσφατα, η ταυτοποίηση των ειδών των ΚΝΠ, ο προσδιορισμός των παθότυπων και η ποσοτικοποίηση του μολύσματος στο έδαφος γίνονταν ξεχωριστά, γεγονός που συνεπάγετο υψηλό κόστος, χρονοβόρες διαδικασίες και μεγάλες απαιτήσεις σε έμπειρο προσωπικό, εκπαιδευμένο σε διαφορετικές εργαστηριακές τεχνικές μοριακής βιολογίας και νηματοδολογίας.

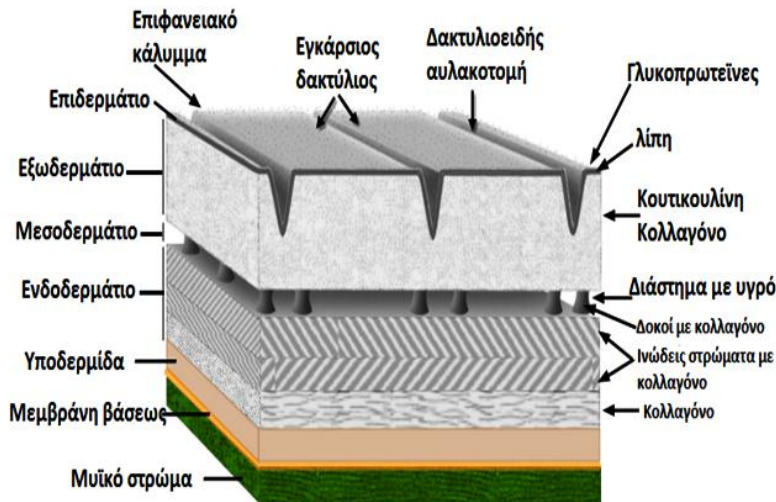
Είναι πλέον αποδεκτό ότι στην απουσία ξενιστή, οι ΚΝΠ παραμένουν ζωντανοί στο έδαφος με τη μορφή εγκυστωμένων αυγών που βρίσκονται σε διάπαυση (diapause), για περισσότερο από 20 χρόνια (Jones, 1970). Τα εγκυστωμένα αυγά είναι καλά προστατευμένα μέσα στο σώμα του νεκρού θηλυκού, το οποίο καλείται κύστη, εξαιτίας του σκληρού χιτινισμένου περιβλήματος της και των δισακχαριτών που αποτελούν το κύριο συστατικό του εμβρυικού υγρού που περιβάλλει τις προνύμφες μέσα στο κέλυφος των αυγών (Shannon *et al.*, 2005). Ο ακριβής υπολογισμός των ζωντανών αυγών ή/και προνυμφών 2^{ου} σταδίου στο εσωτερικό της κύστης έχει μεγάλη σημασία, κυρίως κατά τη λήψη αποφάσεων για ορθολογική διαχείριση των ΚΝΠ. Για το λόγο αυτό, μόνο τα ζωντανά αυγά ή/και προνύμφες 2^{ου} σταδίου θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά τη μέτρηση ενός πληθυσμού των ΚΝΠ στο έδαφος. Η μέτρηση του ζωντανού μολύσματος

των ΚΝΠ, παραδοσιακά γινόταν με την εφαρμογή διαφόρων χρωστικών όπως το Meldola Blue (MB), Chrysoidin, Phloxine B και το Nile Blue A, οι οποίες έδιδαν διαφορετικό χρώμα στα νεκρά από ότι στα ζωντανά αυγά (Goffart, 1965; Ogiga & Estey, 1974; Shepherd, 1986) καθώς και με την εφαρμογή *in vitro* τεχνικών, όπως ο έλεγχος εκκόλαψης των προνυμφών 2^{ου} σταδίου (Devine *et al.*, 2001).

Ο έλεγχος εκκόλαψης των προνυμφών 2^{ου} σταδίου αποτέλεσε για αρκετά χρόνια αποδεκτή μέθοδο για τον προσδιορισμό του ζωντανού μολύσματος. Όμως, με τη μέθοδο αυτή, μετρίεται μόνο ο αριθμός των αυγών που εκκολάφθηκαν τη δεδομένη στιγμή και όχι το σύνολο των ζωντανών νηματωδών, αφού κάποιες προνύμφες ενδέχεται να βρίσκονται σε κατάσταση διάπαυσης και επομένως να μην είναι σε θέση να εκκολαφθούν (Hominick *et al.*, 1985; Devine & Jones, 2001). Επίσης, η εκκόλαψη των εγκυστωμένων αυγών εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως η διεγερτική ουσία που προκαλεί την εκκόλαψη και η σταθερότητα της στο διάλυμα, η θερμοκρασία, το είδος και το μέγεθος του πληθυσμού, ο τύπος του εδάφους και, τέλος, η ηλικία της κύστης (Turner & Stone, 1981; Stanton & Sartori, 1990; Folkertsma *et al.*, 1997; Byrne *et al.*, 1998; Devine & Jones, 2000; Devine *et al.*, 2001; Ryan & Jones, 2003; Ryan & Jones, 2004; Fukuzawa, 2007). Επιπρόσθετα, η εφαρμογή του ελέγχου εκκόλαψης είναι χρονοβόρα και απαιτεί μεγάλο αριθμό εξειδικευμένου τεχνικού προσωπικού, γεγονός που συνεπάγεται υψηλό κόστος. Τα προβλήματα αυτά είναι εντονότερα σε χώρες όπως η Κύπρος, όπου λόγω του μικροτεμαχισμού του γεωργικού κλήρου, θα πρέπει να διεξάγονται έλεγχοι σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων.

Σε αντίθεση με τους ελέγχους εκκόλαψης, η εφαρμογή διαφόρων μεθόδων χρώσης έχει βρει ευρεία πρακτική εφαρμογή σε πολλά εργαστήρια, καθώς μέχρι σήμερα θεωρείται η πιο ακριβής και αξιόπιστη τεχνική διαχωρισμού των ζωντανών από τα νεκρά αυγά των ΚΝΠ. Οι μέθοδοι χρώσης συστήνονται από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Προστασίας Φυτών (European Plant Protection Organization, EPPO), για εφαρμογή σε ελέγχους ρουτίνας, που αποσκοπούν στον προσδιορισμό του ζωντανού μολύσματος των ΚΝΠ σε δείγματα εδάφους (Anonymous, 2009). Η αποτελεσματικότητα των μεθόδων χρώσης εξαρτάται κυρίως από τη διαπερατότητα του εξωσκελετού των νηματωδών, ο οποίος αποτελείται από τη μεμβράνη βάσεως, την υποδερμίδα και το δερμάτιο (Εικ. 25) (Weinstein & Stauber, 1960; Hollis, 1961; Ogiga & Estey, 1974). Η διαπερατότητα του εξωσκελετού στις χρωστικές, και συνεπώς η αποτελεσματικότητα της μεθόδου επηρεάζεται από το χρόνο και τον τρόπο θανάτου των νηματωδών, π.χ. έκθεση σε

νηματώδοκτα ή σε υψηλές θερμοκρασίες, μηχανικός διαμελισμός, προσβολή από παθογόνα κ.α. (Meyer *et al.*, 1988).



Εικόνα 25. Απεικόνιση των διαφόρων στρωμάτων του εξωσκελετού ενός ενήλικου νηματώδη (Blaxter *et al.*, 1998).

Παρόλο που μέχρι σήμερα η τεχνική της χρώσης των νηματωδών είναι η μόνη αποδεκτή μέθοδος διαχωρισμού των ζωντανών από τα νεκρά άτομα, εντούτοις παρουσιάζει και αυτή μερικά σοβαρά μειονεκτήματα. Ένα τέτοιο μειονέκτημα είναι η μερική χρώση ζωντανών νηματωδών, κυρίως στην περιοχή μεταξύ εντέρου και ουράς που οφείλεται στο γεγονός ότι η χρωστική διέρχεται μέσα από τα φυσικά ανοίγματα του σώματος των νηματωδών, και πολλές φορές οδηγεί σε λανθασμένη εκτίμηση του ζωντανού μολύσματος (Ogiga & Estey, 1974; Meyer *et al.*, 1988). Επιπλέον, οι Ogiga & Estey (1974) αναφέρουν ότι η χρωστική New Blue R κατέστη τοξική στους νηματώδεις 48 ώρες μετά τη χρώση. Οι ίδιοι ερευνητές αναφέρουν ότι η χρωστική Chrysoidin (0.005%) εισχωρούσε μέσα σε 24 h στο σώμα των νηματωδών που επωάζονταν σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ νηματώδεις που τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη με σκοπό το θάνατό τους, έλαβαν χρώμα 48 h μετά τη χρώση και χρειάστηκε η παρατήρησή τους σε μικροσκόπιο μεγέθυνσης 150X αντί 40X. Ο Doliwa (1956) αναφέρει ότι σε ζωντανούς νηματώδεις η χρωστική Chrysoidin χρωματίζει με κίτρινο-καφέ προς πορτοκαλί την περιοχή μεταξύ εντέρου και ουράς, αφήνοντας την υπόλοιπη περιοχή άχρωμη, ενώ οι νεκροί νηματώδεις χρωματίζονται εξολοκλήρου με κίτρινο χρώμα. Σημειώνεται ότι η χρήση της χρωστικής Chrysoidin απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή από το χρήστη αφού θεωρείται ύποπτη για πρόκληση καρκίνου σε ψαράδες που χρησιμοποιούν σκουλήκια χρωματισμένα με αυτή τη χρωστική ως δολώματα (Cartwright *et al.*, 1983; Massey *et al.*, 1984; Searle & Teale, 1982; Sole & Sorahan, 1985).

Ο Moriarty (1964) σύγκρινε τις χρωστικές Phloxine B, New Blue R και Chrysoidin, χρησιμοποιώντας τον κυστογόνο νηματώδη των τεύτλων, *Heterodera schachtii*. Η Phloxine B παρουσίασε ανακριβή αποτελέσματα όταν τα αυγά και οι προνύμφες εκτέθηκαν σε ψηλές θερμοκρασίες για να θανατωθούν και ήταν λιγότερο ακριβής από την Chrysoidin όταν δοκιμάστηκαν σε πειράματα εκκόλαψης. Οι Ogiga & Estey (1974) χαρακτήρισαν την Phloxine B ως «όχι πλήρως ικανοποιητική» επειδή δεν χρωμάτιζε κάποια νεκρά άτομα ενώ χρωμάτιζε αντίστοιχα κάποια ζωντανά.

Ο Shepherd (1962) αναφέρει πως η New Blue R ξεχώριζε τα νεκρά άτομα του *G. rostochiensis* δύο εβδομάδες αφότου θανατώθηκαν με έκθεση τους σε νηματοδοκτόνα. Αντίστοιχα, ο Goffart (1965) αναφέρει την New Blue R ως κατάλληλη χρωστική για το διαχωρισμό των ζωντανών/νεκρών νηματωδών ενώ, αντίθετα, ο Moriarty (1964) δηλώνει ότι η New Blue R απέτυχε να διαχωρίσει τα ζωντανά από τα νεκρά αυγά του *H. Schachtii*, που είχαν αποθηκευτεί στο έδαφος για δύο χρόνια. Επίσης, οι Ogiga & Estey (1974) αναφέρουν ότι η New Blue R δε χρωμάτιζε όλα τα νεκρά ενώ χρωμάτιζε και μερικά ζωντανά άτομα νηματωδών. Αντίστοιχη παρατήρηση έκαναν και οι Meyer *et al.* (1988), συγκρίνοντας τις χρωστικές Chrysoidin, Eosin Y, New Blue R and Nile Blue, σε πειράματα με αυγά του νηματώδη *H. glycines*. Ο Shepherd (1986) και οι Been & Schomaker (2001) υποστηρίζουν ότι οι χρωστικές New Blue R και Meldola Blue είναι το ίδιο προϊόν, ενώ ο Goffart (1965) αναφέρει ότι οι δύο χρωστικές διαφέρουν μόνο ως προς μια υπομονάδα, έχοντας αιθύλιο και μεθύλιο, αντίστοιχα. Σημειώνεται ότι η χρωστική New Blue R δεν είναι πλέον διαθέσιμη στην αγορά ενώ η Meldola Blue διατίθεται μόνο από την εταιρία Aldrich, Poole, Dorset, UK.

Ο Goffart (1965) έκανε σύγκριση μεταξύ της New Blue R και της Meldola Blue και αποφάνθηκε ότι οι δύο χρωστικές είναι εξίσου αποτελεσματικές. Το μόνο μειονέκτημα των δύο χρωστικών είναι το μεγάλο χρονικό διάστημα (>7 μέρες) που χρειάζεται να εμβαπτιστούν οι κύστες του *G. rostochiensis* μέσα σε διάλυμα της κάθε χρωστικής για να χρωματιστούν. Επιπλέον, σε περίπτωση που χρησιμοποιηθούν ξηρές κύστες, αυτές θα πρέπει να ενυδατωθούν για αρκετές ημέρες πριν από την χρώση. Οι Ogiga & Estey (1975), συγκρίνοντας τις χρωστικές Meldola Blue, Nile Blue A, Phloxine B, New Blue R και Chrysoidin, ως προς την ικανότητα τους να διαχωρίζουν τα ζωντανά από τα νεκρά αυγά των νηματωδών, παρατήρησαν ότι η Meldola Blue σε συγκέντρωση 0.025% δεν χρωμάτιζε τα ζωντανά άτομα ή χρωμάτιζε μόνο την περιοχή μεταξύ εντέρου και ουράς, ενώ τα νεκρά άτομα χρωματίζονταν ομοιόμορφα με βαθύ μπλε χρώμα. Η εργασία αυτή

περιλάμβανε επτά διαφορετικά είδη φυτοπαρασιτικών νηματωδών, όχι όμως των ΚΝΠ. Η ένταση της χρώσης διέφερε ως προς τον τρόπο θανάτωσης των νηματωδών, το είδος των νηματωδών αλλά και μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους. Παρόλα αυτά, οι συγγραφείς θεωρούν τις χρωστικές Meldola Blue και Nile Blue A ως ανώτερες των Phloxine B, New Blue R και Chrysoidin. Επιπλέον, τα αυγά και οι προνύμφες που χρώστηκαν με Meldola Blue είχαν πιο σκούρο χρώμα που τα διέκρινε καλύτερα από ότι η Nile Blue A.

Οι μέθοδοι χρώσης έχουν βρει ευρεία πρακτική εφαρμογή από την πλειοψηφία των εργαστηρίων νηματοδολογίας. Εντούτοις, οι προσπάθειες συνεχίζονται με στόχο την εξεύρεση νέων μεθόδων διαχωρισμού ζωντανών/νεκρών αυγών και προνυμφών των νηματωδών, οι οποίες να συνδυάζουν ταυτόχρονα ποσοτικοποίηση του μολύσματος, ασφάλεια του χρήστη, ταχύτητα εφαρμογής και αξιοπιστία. Οι Atkinson και Ballantyne (1977) παρουσίασαν μια νέα μέθοδο υπολογισμού του αριθμού των εγκυστωμένων αυγών, μετρώντας την ποσότητα της τριφωσφορικής αδενοσίνης (adenosine triphosphate, ATP) με τη χρήση βιοφωτισμού (bioluminescence). Παρόλο που η μέθοδος αυτή φαινόταν υποσχόμενη, δεν υιοθετήθηκε από τα εργαστήρια νηματοδολογίας ούτε αξιοποιήθηκε σε κάποια δημοσιευμένη ερευνητική εργασία.

Πολύ πρόσφατα, οι Van den Elsen *et al.* (2011) παρουσίασαν μια εντελώς πρωτοποριακή μέθοδο υπολογισμού των ζωντανών εγκυστωμένων νηματωδών, η οποία βασίζεται στην ποσοτικοποίηση της τρεχαλόζης (α -D-glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside), έχοντας ως δεδομένο ότι ένα αυγό των ΚΠΝ περιέχει ~34 Μ τρεχαλόζης (Womersley & Smith, 1981). Η τρεχαλόζη είναι ένας δισακχαρίτης που περιβάλλει την προνύμφη των εγκυστωμένων νηματωδών (1^{ου} και 2^{ου} σταδίου) μέσα στο αυγό, διατηρώντας το κέλυφος – μεμβράνη του ακέραιο και συνεπώς την προνύμφη ζωντανή.

Όπως προαναφέρθηκε και στα κεφάλαια 2 και 3, η ανίχνευση και η ταυτοποίηση των ΚΝΠ πραγματοποιείται πλέον με μοριακές τεχνικές και κυρίως, με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR). Χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές PCR, όπως η συμβατική PCR (conventional PCR, Co-PCR) (Bulman & Marshall, 1997; Fleming *et al.*, 1998; Fullaondo *et al.*, 1999) και η PCR πραγματικού χρόνου (Real - Time PCR), με τη χρήση χρωστικής SYBR Green (Madani *et al.*, 2005) ή της τεχνολογίας Taqman probes (Nowaczyk *et al.*, 2008; Nakhla *et al.*, 2010). Παρόλο που η χρήση του DNA ως μέσου ποσοτικοποίησης μικροοργανισμών έχει γίνει αποδεκτή και έχει βρει ευρεία πρακτική εφαρμογή, εντούτοις το DNA παραμένει ένα σταθερό μόριο στη διάρκεια του χρόνου, με

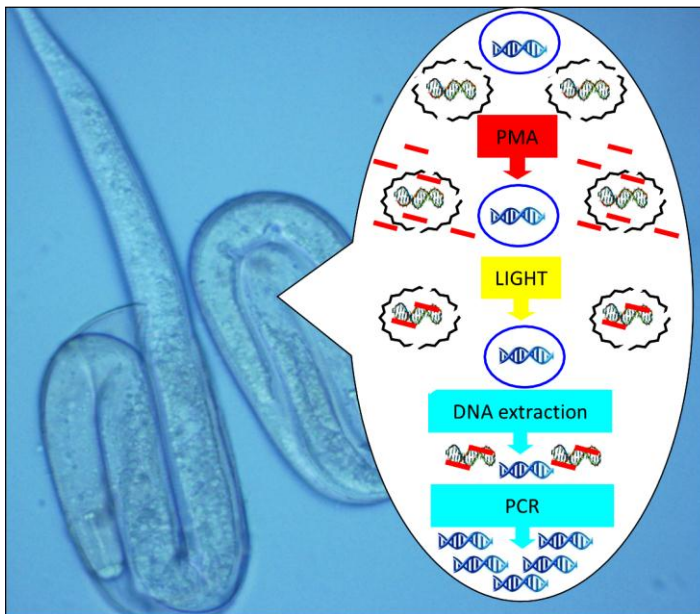
αποτέλεσμα να μη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέσο διαχωρισμού και ποσοτικοποίησης των ζωντανών/νεκρών αυγών και προνυμφών των νηματωδών. Οι MacMillan *et al.* (2006), αναφέρουν ότι το DNA του νηματώδη *Phasmarhabditis hermaphrodita* παρέμεινε άθικτο και ανιχνεύσιμο σε μη αποστειρωμένο χώμα για περίοδο 6 ημερών. Τα δεδομένα που αναφέρουν οι MacMillan *et al.* (2006), αφορούν νηματώδη που διαβιεί στο έδαφος με το σώμα του εκτεθειμένο στη μικροχλωρίδα του εδάφους και επομένως δε μπορεί να συγκριθεί με τους κυστογόνους νηματώδεις, των οποίων οι προνύμφες είναι καλά προστατευμένες μέσα στην κύστη και το χιτινώδες περίβλημα του αυγού.

Στις κύστες των ΚΝΠ παρατηρούνται πολύ συχνά νεκρά αυγά, των οποίων ο θάνατος πιθανό να προήλθε από την έκθεση τους σε ψηλές θερμοκρασίες ή την προσβολή τους από νηματωδοφάγους μύκητες ή/και βακτήρια. Ο θάνατος των νηματωδών υπό αυτές τις συνθήκες αναφέρεται ως “in-egg mortality” (Devine & Jones, 2001; Morton *et al.*, 2003; Tobin *et al.*, 2008).

Μια νέα χημική ουσία με την ονομασία Propidium Monoazide (PMA), που χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Nocker *et al.* (2006) για την ποσοτικοποίηση ζωντανών βακτηριακών κυττάρων, έχει ανατρέψει την άποψη ότι το DNA δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης βιωσιμότητας ζωντανών/νεκρών οργανισμών, εξαιτίας της σταθερότητας του μορίου του στην πάροδο του χρόνου. Το PMA είναι μια φωτοευαίσθητη χημική ουσία, η οποία έχει την ιδιότητα να προσκολλάται ομοιοπολικά πάνω στο DNA και να παρεμποδίζει την ενίσχυση του σε αντιδράσεις PCR (Nocker *et al.*, 2006; Vesper *et al.*, 2008). Το PMA αποτελεί τη βελτιωμένη έκδοση της χρωστικής propidium iodide (PI), στην οποία προστέθηκε ένα επιπλέον αζίδιο στο δακτύλιο της φαινανθριδίνης, επιτρέποντας έτσι τη μονόδρομη-μόνιμη προσκόλληση της χρωστικής πάνω στο DNA, μετά από έκθεση της σε έντονο φως, αποτρέποντας έτσι την ενίσχυση του DNA στην PCR. Επιπλέον, το PI όπως και το PMA δεν μπορούν να περάσουν τις άθικτες κυτταρικές μεμβράνες των ζωντανών οργανισμών (Nocker *et al.*, 2006; Vesper *et al.*, 2008). Επομένως, όταν το PMA εκτεθεί σε διάλυμα με ζωντανά και νεκρά κύτταρα, θα προσκολληθεί μόνο στο DNA των νεκρών κυττάρων, αφήνοντας άθικτο το DNA των ζωντανών κυττάρων. Έτσι, από εκχύλιση του γενετικού υλικού, μόνο το DNA των ζωντανών κυττάρων μπορεί να ενισχυθεί σε αντιδράσεις της PCR (Nocker *et al.*, 2006) (Εικ. 26).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη μεθόδου ποσοτικοποίησης των ζωντανών εγκυστωμένων αυγών και προνυμφών των κυστογόνων νηματωδών της

πατάτας, χρησιμοποιώντας την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (quantitative Real – Time PCR, qPCR) σε συνδιασμό με την εφαρμογή της φωτοευαίσθητης χρωστικής PMA. Η ανάπτυξη μιας τέτοιας μεθόδου θα συνιστούσε σημαντική καινοτομία σε διεθνές επίπεδο, αφού για πρώτη φορά θα ήταν εφικτή η ανίχνευση, ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση μόνο του ζωντανού μολύσματος από κύστει των ΚΝΠ. Η μέθοδος PMA συγκρίθηκε με την κλασική μέθοδο Meldola Blue, χρησιμοποιώντας νεοσχηματιζόμενες κύστει των δύο ειδών ΚΝΠ καθώς και παλαιές κύστει του *G. rostochiensis* που είχαν συλλεχθεί το 1976, το 1990 και το 2007, και έκτοτε παρέμειναν αποθηκευμένες σε θερμοκρασία δωματίου.



Εικόνα 26. Διαδικασία προσκόλλησης του PMA πάνω στο ελεύθερο DNA των νεκρών κυττάρων και ενίσχυση του DNA των ζωντανών κυττάρων μετά την εκχύλιση των νουκλεϊκών οξέων.

4.3 Υλικά και Μέθοδοι

4.3.1 Συλλογή κύστεων και παραγωγή νέου μολύσματος

Κύστεις του *G. pallida* και του *G. rostochiensis* απομονώθηκαν από αγροτεμάχια με γνωστό ιστορικό προσβολής με αμιγείς πληθυσμούς του κάθε είδους, στην περιοχή των Κοκκινοχωριών. Οι κύστεις ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο της PCR, χρησιμοποιώντας εξειδικευμένους εκκινητές (βλ. 2.2.3). Ακολούθως, τοποθετήθηκαν σε δίκτυ με διάμετρο οπών 100 μm και χρησιμοποιήθηκαν για τη μόλυνση ευπαθών ποικιλιών πατάτας, Sprunta για τον *G. rostochiensis* και Cara για τον *G. pallida*, με σκοπό την παραγωγή νέων κύστεων. Μετά την πάροδο 4 μηνών, οι νεοσχηματισθείσες κύστεις συλλέχθηκαν με τη χρήση της συσκευής Fenwick. Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν επίσης, παλαιές κύστεις του *G. rostochiensis* που χρονολογούνται από το 1976 και 1990 και χορηγήθηκαν από το Τμήμα Γεωργίας του Υπουργείου Γεωργίας Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης κύστεις που παράχθηκαν στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του ΤΕΠΑΚ, το 2007. Όλες οι πιο πάνω κύστεις, αφότου συλλέχθηκαν, παρέμειναν αποθηκευμένες σε θερμοκρασία δωματίου.

4.3.2 Προετοιμασία δειγμάτων

Εκατό νεοσχηματισθείσες κύστεις από το κάθε είδος ΚΝΠ τοποθετήθηκαν σε ξεχωριστούς μικροσωλήνες των 2 ml, που περιείχαν αποστειρωμένο νερό, και διαρρήχθηκαν προσεχτικά με λαβίδα για να ελευθερωθούν τα αυγά. Τα αυγά και οι προνύμφες 2^{ου} σταδίου τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο, όπου προστέθηκαν επιπλέον 3 ml αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια συλλέχθηκαν περίπου 100 νηματώδεις / 80 μl , χρησιμοποιώντας πιπέτα χωρητικότητας 100 μl κάτω από μικροσκόπιο μεγέθυνσης 40X, και τοποθετήθηκαν σε μικροσωλήνες χωρητικότητας 1,5 ml. Συνολικά προετοιμάστηκαν 36 μικροσωλήνες για το κάθε είδος ΚΝΠ ξεχωριστά, που περιείχαν περίπου 100 νηματώδεις ο κάθε ένας.

4.3.3 Θερμική επεξεργασία των ΚΝΠ

Μικροσωλήνες που περιείχαν ≈ 100 αυγά ή/και J2, ξεχωριστά για το κάθε είδος ΚΝΠ (βλ.4.3.2), εκτέθηκαν για 1 h σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες: 25, 45 και 65 °C. Οι τρεις θερμοκρασίες σκοπό είχαν να καλύψουν το εύρος θερμοκρασιών, όπου η μεγάλη πλειονότητα των νηματωδών θα παρέμεναν ζωντανοί (25 °C) ή θα πέθαιναν (65 °C). Για κάθε θερμοκρασία χρησιμοποιήθηκαν 12 μικροσωλήνες από το κάθε είδος, οι οποίοι

υποβλήθηκαν σε θερμική επεξεργασία για 1h σε θερμική πλάκα και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε πάγο. Ακολούθως, 6 μικροσωλήνες από το κάθε είδος και θερμοκρασία χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα χρώσης με MB (βλ.4.3.4) και τα υπόλοιπα 6 για τα πειράματα χρώσης με PMA (βλ.4.3.5).

4.3.4 Έλεγχος βιωσιμότητας των αυγών και J2 με τη χρωστική Meldola Blue

Σε κάθε μικροσωλήνα που περιείχε αιώρημα 100 J2 / 80 μ l προστέθηκαν 20 μ l υδατικού διαλύματος MB συγκέντρωσης 0.05 % (8-Dimethylamino-2,3-benzophenoxazine, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany), ώστε η τελική συγκέντρωση MB στο αιώρημα να είναι 0.01%, όπως προτείνεται από τους Ogiga and Estey (1974). Ακολούθησε ανάδευση των μικροσωλήνων για 2h σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να εισέλθει το MB στο σώμα των νεκρών J2. Στη συνέχεια, τα δείγματα αφέθηκαν ακίνητα για 10 min για να καθιζάνουν οι J2 στο αιώρημα, αφαιρέθηκαν προσεκτικά 80 μ l διαλύματος MB από κάθε μικροσωλήνα και προστέθηκαν 3 ml H₂O. Τα αιωρήματα αναμείχθηκαν προσεκτικά και μεταφέρθηκαν το κάθε ένα σε διαφορετικό τρυβλίο, για καταμέτρηση των J2 σε μικροσκόπιο με μεγέθυνση 40X (βλ. 2.2.2). Τα αυγά και οι προνύμφες που χρώστηκαν με μπλε βαθύ χρώμα καταγράφηκαν ως νεκρά, ενώ όσα παρέμειναν άχρωμα ή έλαβαν χρώση μόνο στην περιοχή μεταξύ εντέρου και ουράς, καταγράφηκαν ως ζωντανά (Ogiga & Estey, 1974).

4.3.5 Εφαρμογή της χρωστικής PMA

Η εφαρμογή της χρωστικής PMA έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Nocker *et al.* (2006). Ένα mg PMA (phenanthridium, 3-amino-8-azido-5-[3-(diethylmethylammonio)propyl]-6-phenyl dichloride; Biotium, Inc., Hayward, California, USA) διαλύθηκε σε 1,96 ml διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) 20% για την ανάκτηση τελικής συγκέντρωσης 1mM PMA. Στο μισό αριθμό μικροσωλήνων που προορίζονταν για χρώση με PMA προστέθηκαν 10 μ l (1 mM) PMA, με τελική συγκέντρωση στο αιώρημα 50 μ M. Στους υπόλοιπους 3 μικροσωλήνες προστέθηκαν 10 μ l DMSO και χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Σύμφωνα με τους Susan *et al.* (1988), το DMSO δεν είναι τοξικό στους νηματώδεις, ούτε επηρεάζει τη βιωσιμότητα τους. Οι μικροσωλήνες επώαστηκαν στο σκοτάδι για 30 min σε συνεχή ανάδευση, επιτρέποντας στο PMA να εισέλθει στα κύτταρα των νεκρών νηματωδών. Στη συνέχεια, οι μικροσωλήνες τοποθετήθηκαν οριζόντια σε πάγο, που βρισκόταν σε αναδευτήρα (orbital shaker), και σε απόσταση 20 cm από τους μικροσωλήνες τοποθετήθηκε λάμπα αλογόνου των 650W. Τα αιωρήματα εκτέθηκαν στο

φώς για 10 min με στόχο τη φωτόλυση του PMA, κατά την οποία η ομάδα αζιδίου του PMA μετατρέπεται σε ρίζες νιτρενίου, οι οποίες σχηματίζουν ισχυρό ομοιοπολικό δεσμό με το ελεύθερο δίκλωνο DNA (light induced cross – linking). Τα πλεονάζοντα μόρια του PMA αντιδρούν με τα μόρια του νερού σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο (υδροξυλαμίνη) το οποίο δε μπορεί να προσκολληθεί στο DNA. Κατά την έκθεση των μικροσωλήνων στο φως, παρακολουθείτο η θερμοκρασία των μικροσωλήνων με τη χρήση θερμομέτρου, το οποίο είχε τοποθετηθεί στο κέντρο του πάγου, μεταξύ των μικροσωλήνων. Μετά την έκθεση στο φως, τα αιωρήματα φυγοκεντρήθηκαν στις 5,000 x g για 5 min, πριν από την εξαγωγή του DNA (Nocker *et al.*, 2006).

4.3.6 Εξαγωγή DNA

Οι μικροσωλήνες που περιείχαν αιώρημα νηματωδών (αυγών και προνυμφών) εμβαπτίστηκαν σε υγρό άζωτο για 1 min και ακολούθως τοποθετήθηκαν σε θερμική πλάκα στους 100 °C για 2 min. Η διαδικασία απότομης ψύξης και θέρμανσης επαναλήφθηκε 5 φορές, με ενδιάμεση ομογενοποίηση (vortex) των δειγμάτων για 10 sec, με στόχο τη διάρρηξη των κυττάρων του σώματος των νηματωδών και την εξαγωγή ολόκληρης της ποσότητας DNA. Η εξαγωγή ολικού DNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen Ltd, West Sussex, UK) (βλ. 2.3.3). Το ολικό DNA εκχυλίστηκε σε 100 µl AE (elution buffer = 10 mM Tris HCl, 0.5 mM EDTA, pH 9.0) και αποθηκεύτηκε στους -20 °C.

4.3.7 Ενίσχυση της 16S rDNA γονιδιακής περιοχής με PCR

Για τις αντιδράσεις της PCR χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές (primers) από τη ριβοσωμική περιοχή του γονιδιακού DNA (Internal Transcribe Spacer, ITS). Οι PITSr3 (5'- AGCGCAGACATGCCGCAA-3') και PITSp4 (5'-ACAACAGCAATCGTCGAG-3') χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση του *G. rostochiensis* και *G. pallida*, αντίστοιχα (Bulman & Marshall, 1997), σε συνδυασμό με τον εκκινητή ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White 1990). Οι εκκινητές αυτοί ενισχύουν προϊόν 434 bp και 265 bp, αντίστοιχα. Ποσότητα 2 µl (5-10 ng/µl) DNA χρησιμοποιήθηκε σε αντιδράσεις της PCR που περιείχαν 0,3µM από τον κάθε εκκινητή, 10x PCR buffer, 250 µM από κάθε νουκλεοτίδιο (dATP, dTTP, dCTP και dGTP), 2,5 mM MgCl₂ (2), 1u HotStarTaq Plus DNA Polymerase (Qiagen Ltd, West Sussex, UK) και αποστειρωμένο – απιονισμένο νερό σε τελικό όγκο 25 µl. Η ενίσχυση και ο πολλαπλασιασμός του DNA πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή (C1000TM Thermal cycler, Bio-Rad

Laboratories, Inc), ακολουθώντας τρία στάδια ενίσχυσης για 39 κύκλους (βλ. 2.4.2). Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήγμα αγαρόζης 1,2 % για 55 min και απεικονίσθηκαν σε UV τράπεζα απεικόνισης πηγμάτων αγαρόζης (βλ. 2.4.2).

4.3.8 Real – time PCR

Οι εκκινητές και οι Taqman® ανιχνευτές που σχεδιάστηκαν από τους Parayiannis *et al.* (2013) χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις Real – Time (Taqman®) PCR. Το μίγμα των αντιδράσεων περιείχε σε τελικό όγκο 20 μl: 10 μl 2× iQ Multiplex Powermix, το οποίο περιέχει dNTPs, 12 mM MgCl₂, iTaq DNA polymerase και σταθεροποιητές (Bio-Rad Laboratories, Inc.), 0.3 μM εκκινητές, 0.1 μM από τον κάθε Taqman® ανιχνευτή και 2 μl DNA. Στις αντιδράσεις Real-time PCR χρησιμοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις για κάθε δείγμα DNA.

Το πρωτόκολλο της Real – Time PCR αποτελείται από τις εξής παραμέτρους:

- i. Ενεργοποίηση της Taq πολυμεράσης στους 94°C για 2 min,
- ii. Ακολουθούν 40 κύκλοι που περιλαμβάνουν δύο στάδια
 1. Αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 15s
 2. Υβριδοποίηση εκκινητών και Taq πολυμεράσης στους 60°C για 60s

Για την ολοκλήρωση των αντιδράσεων της Real – Time (Taqman®) PCR χρησιμοποιήθηκε ο θερμοκυκλοποιητής IQ™5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

4.3.9 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης για την ποσοτικοποίηση με Real – time PCR

Οι πρότυπες καμπύλες κατασκευάστηκαν με γονιδιωματικό DNA που απομονώθηκε από αυγά και προνύμφες 2^{ov} σταδίου (J2s) νεοσχηματιζόμενων κύστεων (βλ. 4.3.1). Η Real-Time PCR διενεργήθηκε σε δύο διαφορετικές αντιδράσεις με τρεις επαναλήψεις στη κάθε αντίδραση. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, εισήχθηκαν οι τιμές του οριακού κύκλου Ct στον άξονα των Ψ και ο λογάριθμος της ποσότητας DNA που απομονώθηκε από 1, 5, 25, 125 και 625 αυγά ή/και J2s για τον *G. rostochiensis* και *G. pallida*, χωριστά, στον άξονα των X. Η απόδοση της κάθε αντίδρασης (amplification efficiency, *E*), υπολογίστηκε με βάση την κλίση της πρότυπης καμπύλης εφαρμόζοντας την εξίσωση: $E=10^{[-1/\text{slope}]} - 1$ (Pfaffl, 2001).

4.3.10 Έλεγχος βιωσιμότητας εγκυστωμένων αυγών διαφορετικών ηλικιών

Από τις παλαιές κύστες που είχαν εξαχθεί από μολυσμένα εδάφη της περιοχής των Κοκκινοχωριών το 1976, 1990 και 2007 (βλ. 4.3.1), και είχαν έκτοτε αποθηκευτεί σε θερμοκρασία δωματίου, υπολογίστηκε ο αριθμός των εγκυστωμένων αυγών χρησιμοποιώντας τις μεθόδους χρώσης με Meldola Blue και PMA. Εννέα κύστες ανά χρονολογία συλλογής, τοποθετήθηκαν σε μικροσωλήνες χωρητικότητας 1.5 ml και οι κύστες διαρρήχθηκαν με αποστειρωμένη λαβίδα για να ελευθερωθούν τα αυγά και οι J2. Από το σύνολο των 9 κύστεων ανά χρονολογία συλλογής, χρησιμοποιήθηκαν 3 κύστες για χρώση με Meldola Blue (βλ. 4.3.4) και 6 κύστες για χρώση με PMA (3 με PMA και 3 με DMSO, βλ. 4.3.5).

4.3.11 Στατιστική ανάλυση

Όλα τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το στατιστικό πακέτο SPSS. Οι στατιστικές διαφορές μεταξύ των τριών θερμοκρασιών (25, 45 και 65 °C), στις οποίες υποβλήθηκαν τα δύο είδη των ΚΝΠ και χρώστηκαν με Meldola Blue και PMA, αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο One Way ANOVA. Οι μέσοι όροι διαχωρίστηκαν με πολλαπλή δοκιμή κατά Tukey (Tukey's multiple range test).

4.4 Αποτελέσματα

4.4.1 Έλεγχος βιωσιμότητας με Meldola Blue

Ο διαχωρισμός μεταξύ ζωντανών και νεκρών αυγών η/και προνυμφών 2^{ου} σταδίου (J2), μετά από χρώση με Meldola Blue, στηρίζεται στην αλλαγή του χρώματος στο σώμα των νηματωδών, όπου τα νεκρά άτομα χρωματίζονται με σκούρο μπλε χρώμα ενώ τα ζωντανά άτομα παραμένουν άχρωμα (Ogiga & Estey, 1974). Τα αποτελέσματα της δοκιμής αυτής έδειξαν ότι δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα δύο είδη ΚΝΠ, όταν αυτά εκτέθηκαν στις ίδιες θερμοκρασίες ($P > 0.05$), ενώ σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν ανάμεσα στις 3 ομάδες αυγών/J2 του κάθε είδους που είχαν εκτεθεί σε 3 διαφορετικές θερμοκρασίες ($P < 0.05$) (Πίνακας 11). Τα αυγά και οι J2 που επωάστηκαν στους 25°C παρέμειναν άχρωμα, και επομένως θεωρήθηκαν ζωντανά, σε ποσοστό 95.44% και 97.52% για τον *G. rostochiensis* και *G. pallida*, αντίστοιχα. Η θνησιμότητα των νηματωδών αυξήθηκε όταν αυτοί εκτέθηκαν στους 45 °C, όπου το ποσοστό των ζωντανών ατόμων ήταν 23.83 % και 29.50 % για τον *G. rostochiensis* και *G. pallida*, αντίστοιχα. Τέλος, όταν τα δύο είδη εκτέθηκαν στους 65 °C, το 99,53 % και 99.56 % των αυγών και των J2 του *G. rostochiensis* και *G. pallida*, αντίστοιχα, είχαν χρωστεί ομοιόμορφα με μπλε χρώμα, υποδεικνύοντας ότι σχεδόν όλοι οι νηματώδεις ήσαν νεκροί (Πίνακας 11).

Πίνακας 11. Αποτελέσματα βιωσιμότητας νηματωδών που χρώστηκαν με Meldola Blue, αφού εκτέθηκαν σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (25, 45 και 65 °C)

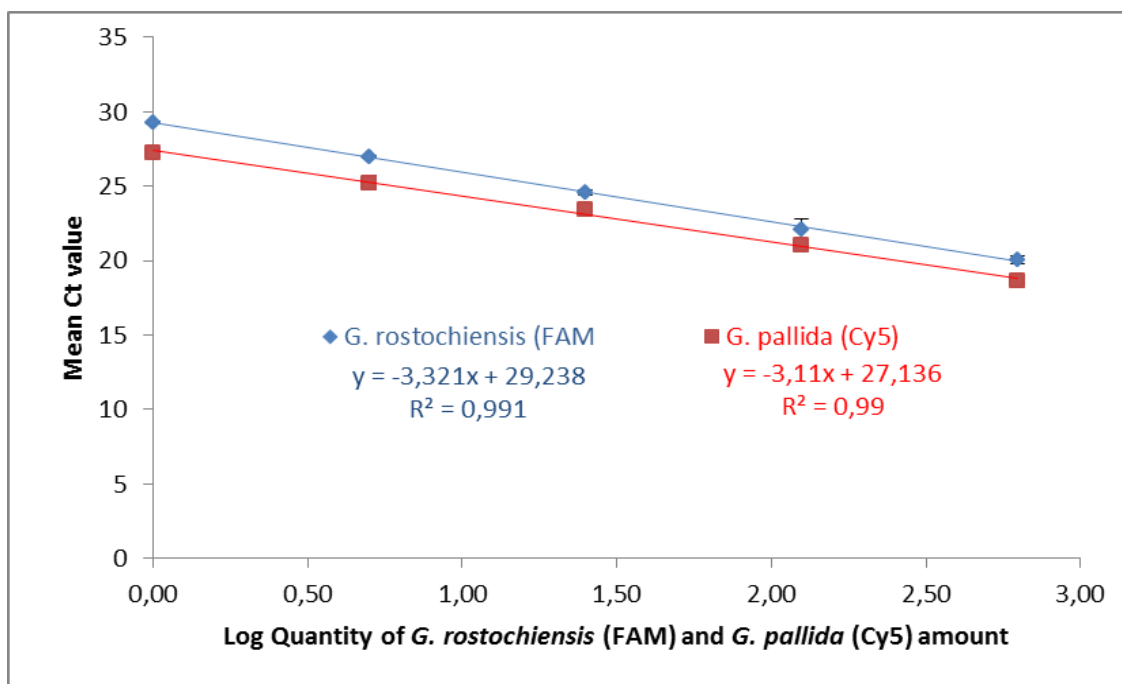
Είδη	Θερμ. (°C)	Μέσος όρος αυγών η/και προνυμφών 2 ^{ου} σταδίου		
		Νεκρά	Ζωντανά	% ζωντανά
<i>G. rostochiensis</i>	25	4,67 (±3,50)*	97,67 (±4,55)	95,44 (±3,37)
<i>G. rostochiensis</i>	45	80,00 (±12,36)	23,83 (±8,50)	23,15 (±8,81)
<i>G. rostochiensis</i>	65	104,67 (±6,50)	0,50 (±0,84)	0,47 (±0,78)
<i>G. pallida</i>	25	2,50 (±2,51)	99,33 (±4,46)	97,52 (±2,51)
<i>G. pallida</i>	45	68,50 (±8,89)	29,50 (±9,57)	30,01 (±9,26)
<i>G. pallida</i>	65	102,17 (±5,42)	0,50 (±1,22)	0,44 (±1,08)

$F > F_{crit} (0.05, 2, 15)$, $P < 0,005$, $n=6$
 *±SD = Standard deviation (τυπική απόκλιση από το μέσο όρο)

4.4.2 Ποσοτικοποίηση των ΚΝΠ με qPCR

Η ποσοτικοποίηση των ζωντανών νηματωδών πραγματοποιήθηκε σε αντιδράσεις duplex qPCR (Εικ. 27). Οι πρότυπες καμπύλες των δύο ειδών ΚΝΠ κατασκευάστηκαν συγκρίνοντας τον μέσο οριακό κύκλο (Ct) από την qPCR, ως προς τον λογάριθμο της ποσότητας DNA που απομονώθηκε από 1, 5, 25, 125 και 625 αυγά ή/και J2 για τον *G. rostochiensis* και *G. pallida*, αντίστοιχα. Η εξίσωση της ευθείας του κάθε είδους ήταν

$y_{(G.rost., FAM)} = -3.321x + 29.238$ και $y_{(G.pall., Cy5)} = -3.11x + 27.136$ για τον *G. rostochiensis* και *G. pallida*, αντίστοιχα. Η μέση τιμή Ct (\pm SD) που καταγράφηκε από τη χρήση του εξειδικευμένου ανιχνευτή ROSTOTAQ-FAM, ήταν 29.25 (\pm 0.08), 26.97 (\pm 0.12), 24.58 (\pm 0.2), 22.12 (\pm 0.7) και 20.06 (\pm 0.24) για το 1, 5, 25, 125 και 625 αυγά η/και J2s, αντίστοιχα. Η μέση τιμή Ct (\pm SD) που καταγράφηκε από τη χρήση του εξειδικευμένου ανιχνευτή PALLITAQ-Cy5, ήταν 27.28 (\pm 0.23), 25.22 (\pm 0.48), 23.45 (\pm 0.11), 21.05 (\pm 0.23) και 18.63 (\pm 0.18) για το 1, 5, 25, 125 και 625 αυγά η/και J2s, αντίστοιχα. Ο συντελεστής προσδιορισμού R^2 (coefficient of determination) των πρότυπων καμπυλών ήταν 0,991, και στα δύο είδη. Επιπλέον, η απόδοση της κάθε αντίδρασης (amplification efficiency, E), υπολογίστηκε με βάση την κλίση της κάθε πρότυπης καμπύλης, εφαρμόζοντας την εξίσωση: $E = 10^{[-1/\text{slope}]} - 1$, και βρέθηκε να είναι 100 % και 109.7 % για τον *G. rostochiensis* και *G. pallida*, αντίστοιχα. Η ευαισθησία της duplex qPCR και οι παράμετροι της ευθείας για την κάθε πρότυπη καμπύλη, επέτρεψαν την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση δειγμάτων που περιείχαν «άγνωστο» αριθμό αυγών ή/και J2s των ΚΝΠ. Κατά τις αντιδράσεις duplex qPCR δεν παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ των Taqman ανιχνευτών, ούτε και φθορισμός από δείγματα που δεν περιείχαν DNA (non-template control, NTC).



Εικόνα 27. Κατασκευή πρότυπων καμπυλών των δύο ειδών ΚΝΠ για την ποσοτικοποίησή τους. Κατά τις αντιδράσεις multiplex real time PCR κατασκευάστηκαν πρότυπες καμπύλες με 5 σημεία, χρησιμοποιώντας DNA που απομονώθηκε από 1 μέχρι 625 νηματώδεις. Οι μέσες τιμές Ct ($\times 3$) ανταποκρίνονται στον αριθμό των κύκλων της PCR προς τον λογάριθμο της ποσότητας DNA των νηματωδών.

4.4.3 Έλεγχος βιωσιμότητας και ποσοτικοποίηση των ΚΝΠ με qPCR, μετά από χρώση με PMA

Η ποσοτικοποίηση του ζωντανού μολύσματος των ΚΝΠ με qPCR, μετά από χρώση με PMA, παρουσιάζεται στον Πίνακα 12. Οι νηματώδεις που εκτέθηκαν στους 25°C, στην απουσία PMA, παρουσίασαν χαμηλές τιμές Ct (\pm SD), των οποίων ο μέσος όρος ήταν 22.32 (\pm 0.06) και 21.40 (\pm 0.11), που αντιστοιχεί σε 121 (\pm 5.2) και 99.33 (\pm 7.67) αυγά ή/και J2s για τον *G. rostochiensis* και *G. pallida*, αντίστοιχα. Οι νηματώδεις που εκτέθηκαν στους 25°C, στην παρουσία PMA, παρουσίασαν επίσης χαμηλές τιμές Ct των οποίων ο μέσος όρος ήταν 22.31 (\pm 0.06) και 21.39 (\pm 0.18), που αντιστοιχεί σε 121.67 (\pm 4.93) και 93 (\pm 12.12) αυγά ή/και J2s για τον *G. rostochiensis* και *G. pallida*, αντίστοιχα. Παρόμοια αποτελέσματα καταγράφηκαν και στα δείγματα που εκτέθηκαν στους 45 και 65°C στην απουσία PMA, καταδεικνύοντας την αδυναμία της μεθόδου να διαχωρίσει τους ζωντανούς από τους νεκρούς νηματώδεις. Αντίθετα, οι νηματώδεις που υποβλήθηκαν σε μεταχείριση με PMA στους 45 °C κατέγραψαν σχετικά υψηλές τιμές Ct, ίσες με 25.35 (\pm 0.24) και 22.14 (\pm 0.17), που αντιστοιχούν σε 15 (\pm 2.65) και 52.67 (\pm 6.66) αυγά ή/και J2s για τον *G. rostochiensis* και *G. pallida*, αντίστοιχα. Ιδιαίτερα, οι νηματώδεις που εκτέθηκαν στη θανατηφόρα θερμοκρασία των 65 °C στην παρουσία PMA, κατέγραψαν πολύ υψηλές τιμές Ct ίσες με 29.04 (\pm 1.34) και 28.91 (\pm 0.06), που αντιστοιχούν σε 1.33 (\pm 1.53) και 0 αυγά ή/και J2s για τον *G. rostochiensis* και *G. pallida*, αντίστοιχα (Πίνακας 12). Οι τιμές Ct που καταγράφηκαν στη θανατηφόρα θερμοκρασία των 65 °C στην παρουσία PMA, καταδεικνύουν την ελάχιστη παρουσία η/και παντελή απουσία DNA, αφού κυμαίνονταν σε τιμές ίσες ή μικρότερες του ενός νηματώδη, με βάση την πρότυπη καμπύλη του κάθε είδους.

Πίνακας 12. Ποσοτικοποίηση αυγών και προνυμφών (J2) των *Globodera rostochiensis* και *G. pallida*, που είχαν εκτεθεί στους 25, 45 και 65 °C, μετά από χρώση με PMA.

Είδη των ΚΝΠ	Θερμοκρασία °C	Μεταχειρίσεις με PMA							
		Χωρίς PMA				Με PMA			
		Ct ¹ M.O ²	SD ³	M.O αυγών	SD	Ct M.O	SD	M.O αυγών	SD
<i>G. rostochiensis</i>	25	22.32	\pm 0.06	121.00	\pm 5.20	22.31	\pm 0.06	121.67	\pm 4.93
	45	22.28	\pm 0.05	124.00	\pm 4.00	25.35	\pm 0.24	15.00	\pm 2.65
	65	22.29	\pm 0.08	123.33	\pm 7.02	29.04	\pm 1.34	1.33	\pm 1.53
<i>G. pallida</i>	25	21.40	\pm 0.11	91.33	\pm 7.64	21.39	\pm 0.18	93.00	\pm 12.12
	45	21.26	\pm 0.09	99.67	\pm 6.11	22.14	\pm 0.17	52.67	\pm 6.66
	65	21.34	\pm 0.22	96.00	\pm 16.64	28.91	\pm 0.06	0.00	\pm 0.00

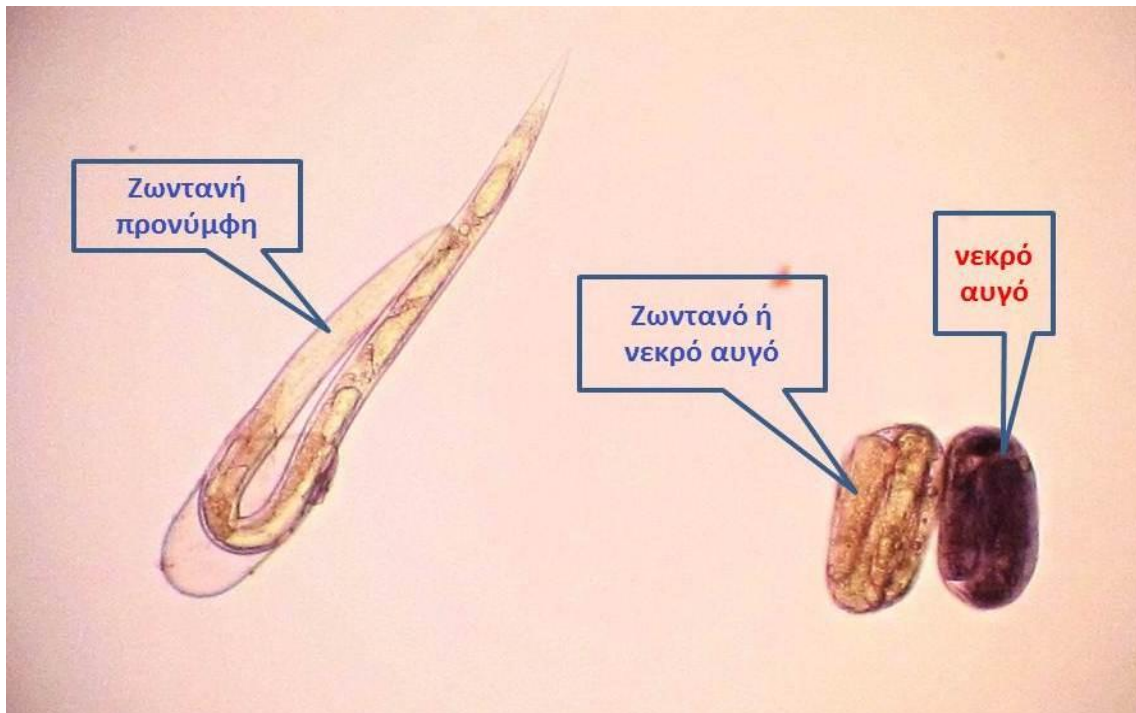
¹Ct = Threshold cycle, οριακός κύκλος

²M.O = Μέσος όρος

³SD = Standard deviation, τυπική απόκλιση

4.4.4 Έλεγχος βιωσιμότητας εγκυστεωμένων αυγών διαφορετικών ηλικιών

Στους πληθυσμούς του *G. rostochiense* που ήταν αποθηκευμένοι σε θερμοκρασία δωματίου από το 1976, το 1990 και το 2007, καθώς και σε νεοσχηματισθείσες κύστεις που παράχθηκαν το 2010, πραγματοποιήθηκε έλεγχος βιωσιμότητας με τις μεθόδους Meldola Blue και qPCR-PMA. Για κάθε χρονική περίοδο χρησιμοποιήθηκαν 9 κύστεις, εκ των οποίων 3 έτυχαν μεταχείρισης με Meldola Blue και 6 με qPCR-PMA (βλ. 4.3.5). Κατά τη διάρρηξη των κύστεων παρατηρήθηκαν αυγά σε όλες τις κύστεις όλων των χρονικών περιόδων (Πίνακας 13, Εικ. 29. Α).



Εικόνα 28. Αυγά του *Globodera rostochiense* σε μεγέθυνση 40X μετά από χρώση με Meldola Blue.

Αριστερά απεικονίζεται άχρωμη ζωντανή προνύμφη η οποία εξέρχεται από το κέλυφος του αυγού και δεξιά δύο αυγά εκ των οποίων στο άχρωμο δεν ήταν εφικτή η διάκριση μεταξύ νεκρού και ζωντανού ενώ το νεκρό (δεξιά) έχει λάβει σκούρο μπλε χρώμα.

Με τη μέθοδο Meldola Blue, στις κύστεις του 1976 καταμετρήθηκαν κατά μέσο όρο 12.67 αυγά ανά κύστη, τα οποία εκτιμήθηκαν ως νεκρά, αφού χρώστηκαν με σκούρο μπλε χρώμα. Στις κύστεις του 1990, ο μέσος όρος των νεκρών αυγών/κύστη ήταν 184.33, ενώ καταγράφηκαν και 16 αυγά/κύστη τα οποία παρουσίασαν κίτρινο χρώμα. Τα κίτρινα αυτά αυγά θεωρήθηκαν νεκρά, αφού είχαν ενδεικτικά σημεία θνησιμότητας, όπως θολερότητα, σκούρο χρώμα στην εντερο-γενετική περιοχή και προς την ουρά, συρρικνωμένο σώμα και

ακανόνιστο σχήμα. Από τις κύστες του 1990, μόνο ένα αυγό σε μία μόνο κύστη ήταν άχρωμο αλλά δεν παρουσίασε σημεία ζωής, ακόμα και όταν τοποθετήθηκε σε εκκρίματα ριζών πατάτας. Ο μέσος όρος των αυγών που παρατηρήθηκαν στις κύστες του 2007 ήταν 256 αυγά/κύστη, εκ των οποίων 184.67 χρώστηκαν με βαθύ μπλε χρώμα, 15.67 είχαν κίτρινο χρώμα και 135.33 παρέμειναν άχρωμα και καταγράφηκαν ως ζωντανά. Τέλος, νεοσχηματισθείσες κύστες που παράχθηκαν το 2010 είχαν κατά μέσο όρο 304 αυγά/κύστη, εκ των οποίων 24.33 χρώστηκαν μπλε και καταγράφηκαν ως νεκρά, ενώ 280.33 παρέμειναν άχρωμα και θεωρήθηκαν ζωντανά (Εικ. 28).

Όσον αφορά τα αποτελέσματα της μεθόδου qPCR-PMA, στις μεταχειρίσεις όπου δεν προστέθηκε PMA καταγράφηκαν κατά μέσο όρο 12.33, 16, 107.67 και 341 αυγά η/και J2s ανά κύστη για τις χρονολογίες 1976, 1990, 2007 και 2010, αντίστοιχα, επιβεβαιώνοντας την παρουσία γονιδιακού DNA του *G. rostochienseis*, ακόμα και στις κύστες του 1976 και 1990. Στις μεταχειρίσεις όπου προστέθηκε PMA, ο μέσος όρος αυγών/κύστη που καταγράφηκε από τη qPCR ήταν 0.33, 1.67, 27.67 και 409.33 αυγά η/και J2s, για τις χρονολογίες 1976, 1990, 2007 και 2010, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα της qPCR-PMA καταδεικνύουν τη δραστική μείωση του DNA μέσα στις κύστες με την πάροδο του χρόνου, αλλά και την αποτελεσματική απομάκρυνση του DNA από τα αυγά που χρονολογούνται από το 1976 και 1990, όταν προστέθηκε στα αιωρήματα των κύστεων PMA (Πίνακας 13, Εικ. 29.B).

Στην εικόνα 29.Γ, παρουσιάζεται πήγμα αγαρόζης στο οποίο απεικονίζονται δύο δείγματα ανά μεταχείριση. Η μείωση του DNA μέσα στις κύστες με την πάροδο του χρόνου, επιβεβαιώνεται και από τις αντιδράσεις Co-PCR, όπου οι ζώνες DNA που παρατηρήθηκαν σε πήγμα αγαρόζης από την ενίσχυση του DNA που εκχυλίστηκε από κύστες του 1976, ήταν πολύ αμυδρές σε σύγκριση με τις νεότερες κύστες. Όμως, η παρουσία έστω και πολύ αμυδρών ζωνών στις 465 bp, επιβεβαιώνει την παρουσία του DNA, ακόμα και στις κύστες που συλλέχθηκαν πριν από 34 χρόνια (Εικ 29. Γ, σημεία A1 και A2). Η εκχύλιση DNA από αιωρήματα κύστεων του 1976, στα οποία προστέθηκε PMA, δεν παρουσίασε προϊόν κατά την ενίσχυση του στην Co-PCR (Εικ. 29 Γ, σημεία A3 και A4), επιβεβαιώνοντας την απομάκρυνση του DNA από τα νεκρά αυγά. Αντίστοιχα αποτελέσματα απεικονίστηκαν από τα εκχυλίσματα DNA των κύστεων που χρονολογούνται από το 1990. Στην απουσία PMA παρατηρήθηκαν ζώνες DNA στις 465 bp (Εικ 29. Γ, σημεία B1 και B2), ενώ στην παρουσία PMA δεν παρατηρήθηκαν ζώνες DNA (Εικ 29. Γ, σημεία B3 και B4). Οι κύστες που προήλθαν από τις χρονολογίες 2007

και 2010, παρουσίασαν έντονο προϊόν κατά την απεικόνιση τους στο πήγμα αγαρόζης, τόσο στην παρουσία PMA όσο και στην απουσία PMA, τεκμηριώνοντας έτσι την παρουσία ζωντανών νηματωδών μέσα στις κύστεις (Εικ 29. Γ, σημεία C1-C4 και D1-D4).

Πίνακας 13. Ποσοτικοποίηση αυγών και προνυμφών (J2) των παλαιών και νεοσχηματιζόμενων κύστεων του *Globodera rostochiensis* μετά από μεταχείριση με Meldola blue και PMA.

Ηλικία κύστεων	Meldola blue			qPCR-PMA	
	Μπλε	Κίτρινα	Άχρωμα	Απουσία PMA*	Παρουσία PMA
1976	22	0	0	4	0
	7	0	0	14	1
	9	1	0	19	0
Μέσος όρος*	12.67 (±8.14)**	0.33 (±0.58)	0	12.33 (±7.64)	0.33 (±0.58)
1990	182	15	0	13	1
	157	3	0	16	3
	214	30	1	19	1
Μέσος όρος	184.33 (±28.57)	16 (±13.53)	0.33 (±0.58)	16 (±3)	1.67 (±1.15)
2007	208	15	87	111	41
	165	10	191	41	36
	181	22	128	171	6
Μέσος όρος	184.67 (±21.73)	15.67 (±6.03)	135.33 (±52.39)	107.67 (±65.06)	27.67 (±18.93)
2010	25	0	400	272	303
	31	0	169	374	389
	17	0	272	377	536
Μέσος όρος	24.33 (±7.02)	0	280.33 (±115.73)	341 (±59.77)	409.33 (±117.82)

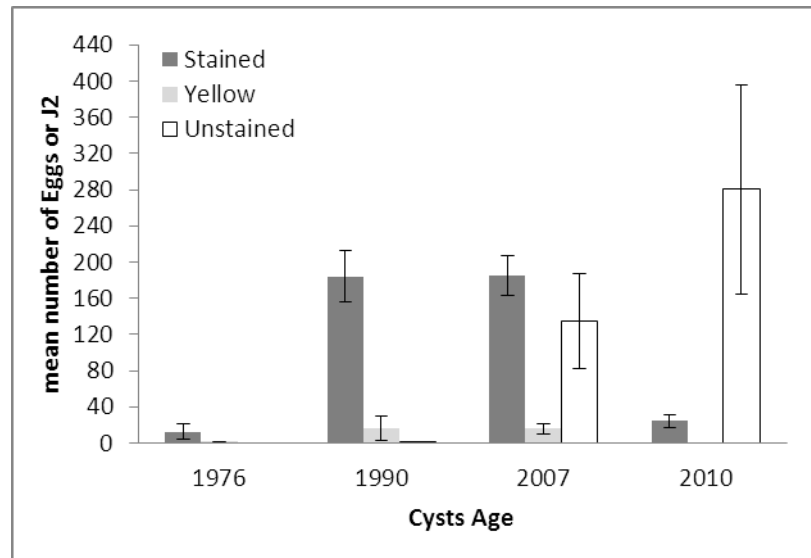
* Μέσος όρος αυγών που προέκυψαν από σύνολο 3 κύστεων (n=3) για κάθε χρονολογική περίοδο

**Standard deviation (SD) = τυπική απόκλιση από το μέσο όρο

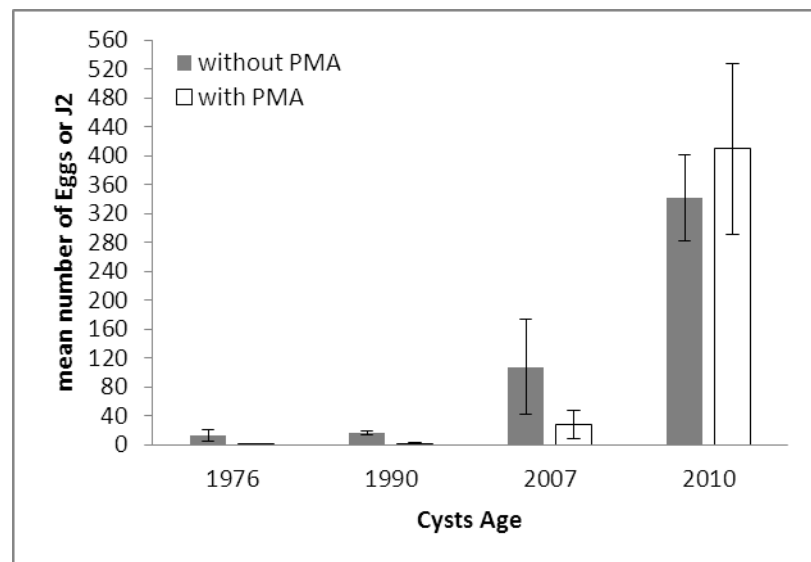
Πίνακας 14. Ποσοτικοποίηση αυγών και προνυμφών (J2) των ειδών *Globodera rostochiensis* και *G. pallida* μετά από έκθεση τους στους 25, 45 και 65 °C και διαχωρισμό των ζωντανών/νεκρών νηματωδών με Meldola Blue και Propidium Monoazide (PMA).

Είδη	°C	Χρώση	Meldola Blue			PMA			
			SEM	Άχρωμα	SEM	Απουσία PMA	SEM	Παρουσία PMA	SEM
<i>G. rostochiensis</i>	25	4.67	± 1.43	97.67	± 1.86	121.00	± 3.00	121.67	± 2.85
	45	80.00	± 5.05	23.83	± 3.47	124.00	± 2.31	15.00	± 1.53
	65	104.67	± 2.65	0.50	± 0.34	123.33	± 4.06	1.33	± 0.88
<i>G. pallida</i>	25	2.50	± 1.02	99.33	± 1.82	91.33	± 4.41	93.00	± 7.00
	45	68.50	± 3.63	29.50	± 3.91	99.67	± 3.53	52.67	± 3.84
	65	102.17	± 2.21	0.50	± 0.50	96.00	± 9.61	0.00	± 0.00

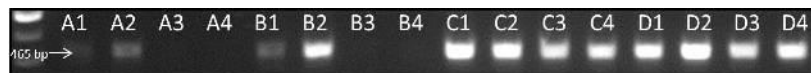
A



B



Γ



Εικόνα 29. Έλεγχος βιωσιμότητας κύστεων του *Globodera rostochiensis* που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου από το 1976, 1990, 2007 και 2010, με τις μεθόδους χρώσης Meldola blue και Propidium Monoazide (PMA).

(A) Μέσος όρος αυγών που μετρήθηκε στο μικροσκόπιο μετά από χρώση με Meldola Blue. Αυγά η προνύμφες που χρώστηκαν με μπλε χρώμα η διατήρησαν κίτρινο χρώμα θεωρήθηκαν νεκρά ενώ όσα άτομα παρέμειναν άχρωμα θεωρήθηκαν ζωντανά. (B) Μέσος όρος αυγών που ποσοτικοποιήθηκαν με qPCR αφού έτυχαν μεταχείρισης με ή χωρίς PMA. Τα αποτελέσματα των μεταχειρίσεων απουσία PMA αποτελούν το σύνολο των ζωντανών και νεκρών αυγών ενώ τα αποτελέσματα των μεταχειρίσεων παρουσία PMA αποτελούν το σύνολο μόνο των ζωντανών νηματωδών. (Γ) Πήγμα αγαρόζης με προϊόντα που ενισχύθηκαν μετά από εκχύλιση γονδιακού DNA που προήλθε από μεταχειρίσεις με ή χωρίς PMA. (1976: απουσία-PMA A1 και A2, παρουσία PMA A3 και A4, 1990 : απουσία -PMA B1 και B2, παρουσία PMA B3 και B4, 2007: απουσία -PMA C1 και C2, παρουσία PMA C3 και C4, 2010: απουσία -PMA D1 και D2, παρουσία PMA D3 και D4).

4.5 Συζήτηση

Για τον καθορισμό των ζωντανών αυγών των ΚΝΠ που βρίσκονται μέσα στο περίβλημα των κύστεων στο έδαφος έχουν προταθεί πολλές και διαφορετικές μέθοδοι, όπως ο μορφολογικός χαρακτηρισμός με ή χωρίς τη χρήση διαφόρων χρωστικών, η μέτρηση ποσοτήτων τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) και η ποσοτικοποίηση δισακχαριτών, όπως η τρεχαλόζη. Η χρήση του DNA ως μέσου για διαχωρισμό των ζωντανών/νεκρών αυγών των ΚΝΠ, μέχρι τώρα δεν ήταν πρακτικά εφικτή, καθώς το DNA παραμένει σταθερό για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα, ειδικά όταν είναι καλά προστατευμένο, και επομένως ανιχνεύεται και ενισχύεται κατά τις αντιδράσεις PCR.

Στην παρούσα εργασία, αναφέρεται για πρώτη φορά σε διεθνές επίπεδο, η δυνατότητα διαχωρισμού των ζωντανών/νεκρών νηματωδών των ΚΝΠ από κύστες, με τη χρήση μοριακών μεθόδων που στηρίζονται στην ενίσχυση του DNA που εκχυλίζεται από ζωντανά αυγά ή/και J2s. Για να είναι εφικτή η ενίσχυση του DNA των ζωντανών νηματωδών μόνο, πρέπει να απομακρυνθεί από το δείγμα το DNA των νεκρών αυγών. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας καταδεικνύουν ότι η απομάκρυνση του DNA των νεκρών νηματωδών είναι πλέον εφικτή με τη χρήση της χρωστικής PMA, η οποία έχει την ικανότητα να προσκολλάται στο ελεύθερο DNA και έτσι να αποτρέπει την ενίσχυση του κατά τις αντιδράσεις της PCR. Το PMA δεν προσκολλάται στο DNA των ζωντανών νηματωδών αφού: i) δε μπορεί να διαπεράσει τις κυτταρικές μεμβράνες των ζωντανών νηματωδών και ii) είναι φωτοευαίσθητο και αντιδρά με τα μόρια του νερού σχηματίζοντας σύμπλοκο υδροξυλαμίνης κατά την έκθεση του στο φως, πριν από τη διαδικασία εξαγωγής του DNA. Επιπλέον, ο συνδυασμός της μεθόδου PMA και της τεχνολογίας Taqman σε αντιδράσεις duplex qPCR, επιτρέπει την ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση των ζωντανών νηματωδών και των δύο ειδών ΚΝΠ.

Σε μια πατατοκαλλιέργεια, ο έλεγχος βιωσιμότητας των ΚΝΠ πραγματοποιείται πριν τη φύτευση του πατατοσπόρου ή μετά τη συγκομιδή των κονδύλων και περιλαμβάνει τη μέτρηση των ζωντανών αυγών που εντοπίζονται μέσα στις κύστες. Η ποσοτικοποίηση του μολύσματος που βρίσκεται μέσα σε μια κύστη, έχει μεγάλη σημασία, αφού ο αριθμός των νηματωδών σε μια κύστη μειώνεται με την πάροδο του χρόνου, είτε εξαιτίας της εκκόλαψης των προνυμφών 2^{ου} σταδίου στην παρουσία διεγερτών που εκκρίνονται από τις ρίζες, είτε εξαιτίας της αυθόρμητης εκκόλαψης. Παρόλα αυτά, ένα ποσοστό

εγκυστωμένων αυγών παραμένει ζωντανό μέσα στις κύστεις σε κατάσταση διάπαυσης (Hominick *et al.*, 1985; Devine & Jones, 2001).

Οι MacMilan *et al.* (2006), αναφέρουν τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης των παρασιτικών νηματωδών των σαλιγκαριών, *Phasmarhabditis hermaphrodita*, ενισχύοντας DNA που εκχυλίστηκε απευθείας από το έδαφος, σε αντιδράσεις qPCR. Επιπλέον, ο χρόνος αποδόμησης του DNA νεκρών νηματωδών του *P. hermaphrodita*, αφότου εκτέθηκαν σε μη αποστειρωμένο έδαφος, βρέθηκε να είναι μόνο 6 ημέρες. Οι κύστεις των ΚΝΠ, αν και βρίσκονται μέσα στο έδαφος, εντούτοις προστατεύουν αρκετά καλά τα εγκυστωμένα αυγά από το εδαφικό περιβάλλον. Με την πάροδο του χρόνου, σημαντικός αριθμός εγκυστωμένων αυγών πεθαίνει (in-egg mortality), με αποτέλεσμα οι κύστεις μεγάλης ηλικίας να περιέχουν τόσο ζωντανά όσο και νεκρά αυγά. Ο χρόνος αποδόμησης του DNA ενός νεκρού εγκυστωμένου αυγού, δεν είναι γνωστός.

Ο έλεγχος βιωσιμότητας των ΚΝΠ με τη μέθοδο χρώσης Meldola Blue προτείνεται από την EPPO ως η κύρια μέθοδος διαχωρισμού ζωντανών / νεκρών αυγών των ΚΝΠ (Anonymous, 2009). Οι Ogiga & Estey (1975) συμπέραναν πως η χρωστική Meldola Blue είναι σε θέση να διαχωρίσει τα ζωντανά από τα νεκρά αυγά των ΚΝΠ, ως άχρωμα και έγχρωμα (μπλε βαθύ χρώμα), αντίστοιχα, παρατηρώντας τις διαφορές αυτές στο μικροσκόπιο σε χαμηλή μεγέθυνση. Στην παρούσα εργασία, όμως, η μέθοδος αυτή παρουσίασε προβλήματα όταν χρησιμοποιήθηκε σε δείγματα μεγάλης ηλικίας, λόγω του κίτρινου χρώματος που παρατηρήθηκε σε αρκετά αυγά. Τα μειονεκτήματα που παρουσιάζει η μέθοδος Meldola Blue είναι: i) εμφάνιση μπλε χρώματος σε ζωντανά αυγά και προνύμφες στην εντερο-γεννητική περιοχή, ii) νεκρά αυγά που εντοπίζονται σε παλαιές κύστεις δε λαμβάνουν τη χρωστική και iii) είναι μέθοδος χρονοβόρα και απαιτεί εξειδικευμένο επιστημονικό και τεχνικό προσωπικό για τη διεξαγωγή της. Παρά τα πιο πάνω μειονεκτήματα, η χρωστική Meldola Blue παραμένει η πιο διαδεδομένη μέθοδος ποσοτικοποίησης ζωντανού μολύσματος σε πληθυσμούς των ΚΝΠ, κυρίως για σκοπούς διαχείρισης των παθογόνων (Twomey *et al.*, 2000).

Στην παρούσα εργασία, η πιο πάνω κλασσική μέθοδος χρώσης με Meldola Blue αξιολογήθηκε σε σύγκριση με την προτεινόμενη νέα μοριακή μέθοδο, που στηρίζεται στην εφαρμογή της φωτοευαίσθητης χρωστικής PMA, σε συνδυασμό με την duplex qPCR. Η αξιολόγηση των δύο μεθόδων, πραγματοποιήθηκε σε δύο διαφορετικά πειράματα. Στο πρώτο πείραμα, η βιωσιμότητα των ΚΝΠ εξετάστηκε μετά από έκθεση των αυγών και των J2s σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (25, 45 και 65 °C), ενώ στο δεύτερο πείραμα

εξετάστηκε η βιωσιμότητα των εγκυστωμένων αυγών του είδους *G. rostochiensis* που προέρχονταν από διαφορετικές χρονολογικές περιόδους συλλογής (1976, 1990, 2007 και 2010).

Η duplex qPCR παρουσίασε υψηλή απόδοση ενίσχυσης ($R^2=0,99$), μεγάλη ευαισθησία και εξειδίκευση. Επιπλέον, η αντίδραση ήταν ακριβής στην ποσοτική εκτίμηση των αυγών του *G. pallida*, υπερεκτίμησε όμως την ποσότητα των αυγών του *G. rostochiensis* κατά 10 με 20 αυγά, συγκρινόμενη με τις μετρήσεις της μεθόδου Meldola Blue (Πίνακας 14). Οι πρότυπες καμπύλες της qPCR κατασκευάστηκαν από νηματώδεις που συλλέχθηκαν στο μικροσκόπιο και όχι από διαδοχικές αραιώσεις μεγάλου αριθμού νηματωδών. Τα δείγματα είχαν προετοιμαστεί να περιέχουν περίπου 100 αυγά, με ανοχή $\pm 10\%$ λόγω τυχόν σφαλμάτων κατά τη συλλογή των αυγών με την πιπέττα. Ο μέγιστος αριθμός αυγών του *G. rostochiensis* που καταγράφηκε στο στερεοσκόπιο με τη μέθοδο Meldola Blue, ήταν 110 αυγά ενώ ο κατώτατος αριθμός αυγών που εκτιμήθηκε με τη qPCR ήταν 115. Η διαφορά που παρατηρήθηκε στον αριθμό αυγών μεταξύ των δύο μεθόδων, οφείλεται είτε στην ανομοιόμορφη συλλογή αυγών με τη χρήση πιπέττας είτε σε σφάλμα της πρότυπης καμπύλης στην qPCR, αφού μικρές κλασματικές διαφορές στις τιμές του οριακού κύκλου αντανακλούν σε μεγάλο αριθμό αυγών.

Η μέθοδος χρώσης με Meldola Blue έδειξε ότι οι νηματώδεις και των δύο ειδών ΚΝΠ, παρέμειναν ζωντανοί (άχρωμοι) όταν εκτέθηκαν στους 25 °C, ενώ οι νηματώδεις που εκτέθηκαν στους 65 °C για 1h είχαν χρωστεί με μπλε σκούρο χρώμα, δείχνοντας ότι ήσαν νεκροί. Παρόμοια αποτελέσματα καταγράφηκαν κατά τις μεταχειρίσεις με PMA στις αντίστοιχες θερμοκρασίες. Όταν τα δύο είδη εκτέθηκαν στους 45 °C, θερμοκρασία η οποία προσομοιάζει τις ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας εδάφους κατά την καλοκαιρινή περίοδο στην Κύπρο, περίπου το 20-30 % των αυγών καταγράφηκαν ως άχρωμα (ζωντανά) χωρίς να υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ειδών. Παρόλα αυτά, όταν τα δείγματα που είχαν εκτεθεί στους 45 °C έτυχαν μεταχείρισης με PMA, η εκτίμηση της βιωσιμότητας των αυγών διέφερε μεταξύ των δυο ειδών ΚΝΠ. Πιο συγκεκριμένα, το ποσοστό των ζωντανών αυγών στη qPCR ήταν 12 % για τον *G. rostochiensis* ενώ για τον *G. pallida* ήταν 53%. Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι νηματώδεις των 2 ειδών συλλέχθηκαν τυχαία, ομογενοποιήθηκαν (το κάθε είδος ξεχωριστά) και έτυχαν ακριβώς της ίδιας μεταχείρισης (θέρμανσης), τα πιο πάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι ο *G. rostochiensis* μπορεί να είναι πιο ευαίσθητος στις ψηλές θερμοκρασίες από ότι ο *G. pallida*.

Τα αποτελέσματα του ελέγχου βιωσιμότητας παλαιών και νέων κύστεων ήσαν τα αναμενόμενα, τόσο με τη μέθοδο Meldola Blue όσο και με τη χρήση PMA. Οι νεοσχηματιζόμενες κύστεις παρουσίασαν υψηλό αριθμό ζωντανών αυγών ενώ οι κύστεις άνω των 3 ετών (2007) είχαν ζωντανά και νεκρά αυγά. Στις παλαιές κύστεις του 1990 και 1976 δεν εντοπίστηκαν ζωντανά αυγά. Απρόσμενη ήταν η παρουσία αυγών μέσα στις κύστεις του 1976. Τα αυγά ήσαν νεκρά, αφού έδειχναν συρρικνωμένα, και το σώμα των προνυμφών, παρόλο που φαινόταν άθικτο, εντούτοις ήταν άδειο. Ευδιάκριτο ήταν το στίλετο και ο εξωσκελετός. Απρόσμενη ήταν επίσης η ανίχνευση μορίων DNA στις κύστεις του 1976, γεγονός που δείχνει ότι τα μόρια του DNA παραμένουν σταθερά μέσα στα αυγά των ΚΝΠ για τουλάχιστο 36 χρόνια σε συνθήκες δωματίου. Το γεγονός αυτό έρχεται σε αντίθεση με την αναφορά των MacMillan *et al.* (2006), ότι το DNA των νηματώδων είναι ανιχνεύσιμο μόνο μέχρι 6 μέρες μετά το θάνατο τους. Η διαφορά ανάμεσα στην εργασία των MacMillan *et al.* (2006) και στην παρούσα εργασία, είναι το είδος του νηματώδη και ο τρόπος που αυτός εκτίθεται στο έδαφος μετά το θάνατό του. Ο *P. hermaphrodita* ζει ως προνύμφη στο έδαφος και επομένως το σώμα του είναι εκτεθειμένο στη μικροχλωρίδα του εδάφους, η οποία μετά το θάνατο του νηματώδη λειτουργεί ως καταλύτης στην αποικοδόμηση του. Αντίθετα, οι κυστογόνοι νηματώδεις είναι καλά προστατευμένοι μέσα στις κύστεις και επιπλέον είναι εσώκλειστοι μέσα στο κέλυφος των αυγών. Επομένως, οι προνύμφες που πεθαίνουν ενώ είναι εγκυστεωμένες μέσα στο αυγό, εξακολουθούν να προστατεύονται από το περίβλημα της κύστης και το κέλυφος του αυγού.

Αντίστοιχα αποτελέσματα έδωσαν και οι κύστεις του 1990, οι οποίες περιείχαν μεγάλο αριθμό αυγών. Όλα τα αυγά χαρακτηρίστηκαν ως νεκρά, αφού παρουσίασαν σημάδια απόπτωσης, το σώμα των προνυμφών ήταν σκελετωμένο και η πλειοψηφία των αυγών χρώστηκε με βαθύ μπλε χρώμα κατά την εφαρμογή της μεθόδου Meldola Blue. Ένας μικρός αριθμός αυγών που δεν έλαβαν τη χρωστική και είχαν τυπικό σκουροκίτρινο χρώμα, καταγράφηκαν ως νεκρά αφού το εσωτερικό του σώματος τους δεν είχε οργανωμένο περιεχόμενο, έδειχνε σημάδια απόπτωσης και συρρίκνωσης και η εντερογεννητική περιοχή διατηρούσε σκούρο χρώμα, χωρίς εμφανές περιεχόμενο. Η παρατήρηση και ο διαχωρισμός των αυγών που παρουσίασαν κίτρινο χρώμα, ως νεκρά ή ζωντανά, έγινε με βάση το διαγνωστικό πρωτόκολλο της EPPO (EPPO PM 7/40 2009).

Η νέα μέθοδος, που στηρίζεται στη χρωστική PMA σε συνδυασμό με την πιο διαδεδομένη μέθοδο μοριακής ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης, τη qPCR, ήταν ικανή

να διαχωρίσει τους νεκρούς νηματώδεις από τους ζωντανούς, εξαιτίας του αδιαπέραστου των κυτταρικών μεμβρανών από τη φωτοευαίσθητη χημική ουσία PMA, αλλά και της ικανότητας του PMA να προσκολλάται στο δίκλωνο DNA, μη επιτρέποντας του να ενισχύεται κατά τις αντιδράσεις της PCR (Nocker *et al.*, 2006; Vesper *et al.*, 2008). Με βάση τα πιο πάνω, το PMA επιτρέπει μόνο την ανίχνευση και ενίσχυση του DNA που εκχυλίζεται από ζωντανούς οργανισμούς. Έτσι, είναι πλέον εφικτή η ποσοτικοποίηση του ζωντανού μολύσματος των κυστογόνων νηματωδών μέσω της qPCR, αφού το DNA που θα ενισχύεται με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών και ανιχνευτών, προέρχεται από ζωντανά άτομα των νηματωδών στόχων (Madani *et al.*, 2005; Nowaczyk *et al.*, 2008; Nakhla *et al.*, 2010).

Η νέα μέθοδος είναι πιο γρήγορη από τις κλασσικές μεθόδους χρώσης και παρατήρησης στο μικροσκόπιο, αφού προσθέτει μόνο μια διεργασία 40 min, πριν από την εξαγωγή και προετοιμασία του DNA για τις αντιδράσεις qPCR. Επιπλέον, ο συνδυασμός PMA με duplex qPCR, επιτρέπει την εξέταση μεγάλου αριθμού δειγμάτων, ακόμα και όταν αυτά αποτελούν μικτούς πληθυσμούς των δύο ειδών ΚΝΠ, αφού η τεχνολογία Taqman® επιτρέπει την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση μικτών πληθυσμών σε κάθε δείγμα. Επιπρόσθετα, η Taqman® -qPCR αποφεύγει την ανάγκη απεικόνισης των προϊόντων σε πήγμα αγαρόζης.

Ο διαχωρισμός των ζωντανών / νεκρών νηματωδών με τη χρήση της μεθόδου PMA, προσφέρει στα εργαστήρια που ασχολούνται με την παρουσία και το επίπεδο του μολύσματος των ΚΝΠ, ένα ισχυρό εργαλείο στην ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση του ζωντανού μολύσματος των παθογόνων καραντίνας, όπως οι ΚΝΠ. Μέσα από την παρούσα εργασία αποδείχθηκε η δυνατότητα διαχωρισμού ζωντανών / νεκρών νηματωδών που εκτέθηκαν σε θερμοκρασίες άνω των 45 °C, και αυτό δίνει την ευκαιρία ποσοτικοποίησης του ζωντανού μολύσματος σε μολυσμένα τεμάχια με ΚΝΠ, τα οποία εκτίθενται σε υψηλές θερμοκρασίες (<40 °C) κατά την καλοκαιρινή περίοδο ή μετά από ηλιοαπολύμανση του εδάφους.

Έχοντας υπόψη το γεγονός ότι το PMA προσδένεται στο ελεύθερο DNA που υπάρχει σε ένα δείγμα, τίθεται το ερώτημα κατά πόσο η μέθοδος PMA θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε νηματώδεις που θανατώθηκαν με διάφορους τρόπους, στους οποίους η κυτταρική μεμβράνη δεν διαταράχθηκε αμέσως μετά το θάνατο τους, όπως η έκθεση σε νηματοδοκτόνα ή σε ακτινοβολία UV, η προσβολή από βιολογικούς παράγοντες ή ο θάνατος από αστία. Στην απάντηση του πιο πάνω ερωτήματος, σημαντικό ρόλο έχει η

αποδόμηση και διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης μετά το θάνατο του νηματώδη, αλλά και ο χρόνος που χρειάζεται ο νηματώδης για να θανατωθεί. Σε κάθε περίπτωση, τα ερωτήματα αυτά θα πρέπει να απαντηθούν μέσω περαιτέρω πειραματικής εργασίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Διαφοροποίηση των παθότυπων των κυστογόνων νηματωδών της πατάτας

5.1 Περίληψη

Η συνεχής αλληλεπίδραση μεταξύ των πληθυσμών των ΚΝΠ και των σολανωδών φυτών ξενιστών τους, οδήγησε στη διαφοροποίηση τους σε δύο είδη, καθώς και σε οκτώ παθότυπους, τρεις (Pa1, Pa2 και Pa3) για τον *G. pallida* και πέντε (Ro1, Ro2, Ro3, Ro4 και Ro5) για τον *G. rostochiensis* (Kort *et al.*, 1977). Η διαφοροποίηση αυτή, διαφαίνεται κατά την προσβολή και ανάπτυξη του μολύσματος των ΚΝΠ σε άγριους κλώνους πατάτας που φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας. Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται ο διαχωρισμός των κυπριακών παθότυπων σε πληθυσμούς των ΚΝΠ που συλλέχθηκαν από αγροτεμάχια μολυσμένα με αμιγείς πληθυσμούς, είτε του *G. rostochiensis* είτε του *G. pallida*. Το είδος των ΚΝΠ σε κάθε δείγμα προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), ενώ ο διαχωρισμός των παθότυπων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο των Kort *et al.* (1977), που περιλαμβάνει την τεχνητή μόλυνση συγκεκριμένων διαφορικών ξενιστών. Πρόκειται για διάφορα είδη, υβρίδια, κλώνους και ποικιλίες του γένους *Solanum*, τα οποία παρουσιάζουν διαφορετικό βαθμό ευπάθειας στους παθότυπους των ΚΝΠ. Η αντίδραση (A) των διαφορικών ξενιστών στις διάφορες απομονώσεις των ΚΝΠ υπολογίστηκε από τη σχέση $A = Pf/Pi$, όπου Pf ο τελικός πληθυσμός και Pi ο αρχικός πληθυσμός των ΚΝΠ στο έδαφος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στην περιοχή των Κοκκινοχωριών επικρατούν οι παθότυποι Ro1 του *G. rostochiensis* και Pa2 και Pa3 του *G. pallida*. Για τον προσδιορισμό των παθότυπων του *G. pallida* εξετάστηκαν 17 δείγματα από ισάριθμα αγροτεμάχια, εκ των οποίων 2 προσδιορίστηκαν ως Pa3, ένα ως Pa2 και τα υπόλοιπα ως μικτοί πληθυσμοί Pa2/3.

5.2 Εισαγωγή

Η καλλιέργεια της πατάτας θεωρείται ένα σημαντικό μέρος της κυπριακής γεωργίας. Οι κυστογόνοι νηματώδεις της πατάτας (ΚΝΠ), *Globodera rostochiensis* και *G. pallida*, αποτελούν ίσως το σοβαρότερο πρόβλημα στην καλλιέργεια και εμπορία της κυπριακής πατάτας. Η αντιμετώπιση τους θεωρείται δύσκολη, επειδή οι προνύμφες 2^{ου} σταδίου (J2) (παρασιτικό στάδιο), βρίσκονται εντός του σώματος των νεκρών θηλυκών (κύστεις). Η ανεξέλεγκτη χρήση χημικών ουσιών ενέχει σοβαρούς κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία, προκαλεί ρύπανση του περιβάλλοντος και μακροπρόθεσμα καθιστά τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα αναποτελεσματικά. Γι' αυτούς τους λόγους έχουν αποσυρθεί από την αγορά αρκετά χημικά νηματωδοκτόνα, όπως π.χ. το βρωμιούχο μεθύλιο (EU, 2009). Αντίθετα, η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών είναι πολύ πιο ασφαλής και μπορεί να μειώσει το ποσό του μολύσματος μέχρι και 70% μέσα σε μια καλλιέργητική περίοδο (Ellenby, 1954; Anonymus, 2006). Επειδή η ανθεκτικότητα της πατάτας στους ΚΝΠ αφορά μόνο συγκεκριμένο είδος και παθότυπο, για την ορθή χρήση των διαθέσιμων ανθεκτικών ποικιλιών είναι απαραίτητη η γνώση του είδους και του παθότυπου που υπάρχει σε ένα αγροτεμάχιο, πριν από τη φύτευση μιας ανθεκτικής ποικιλίας. Επιπλέον, η μη ύπαρξη εμπορεύσιμων ανθεκτικών ποικιλιών για όλους τους παθότυπους των δύο ειδών ΚΝΠ, είναι ένα σοβαρό πρόβλημα, αφού η συνεχής χρήση ποικιλιών με ανθεκτικότητα σε ένα συγκεκριμένο παθότυπο ενθαρρύνει την ανάπτυξη άλλων παθότυπων, για τους οποίους πιθανόν να μην έχουν δημιουργηθεί ακόμη ανθεκτικές ποικιλίες.

Ο όρος «παθότυπος» προτάθηκε από τον Howard (1965) και αντικατέστησε τον όρο «βιότυπος» που χρησιμοποιείτο παλαιότερα (Johanssen, 1909). Ο διαχωρισμός των πληθυσμών των ΚΝΠ σε παθότυπους δεν είναι πλήρως αποδεκτός, καθώς η ταυτοποίηση των παθότυπων είναι δύσκολη και στηρίζεται στο βαθμό αναπαραγωγής των νηματωδών επί συγκεκριμένων διαφορικών ξενιστών (Fuller *et al.*, 1977; Kort *et al.*, 1977; Zaheer *et al.*, 1996b; Hinch *et al.*, 1998; Greco *et al.*, 2007; Molinari *et al.*, 2010). Διαφορές σε επίπεδο γονιδιώματος, που να διαχωρίζουν τους παθότυπους των ΚΝΠ, δεν έχουν ακόμα εξευρεθεί. Στο προσεχές μέλλον, ίσως αυτό γίνει εφικτό, αφού το πλήρες γονιδίωμα του *G. pallida* έχει είδη δημοσιευτεί και του *G.rostochiensis* είναι στη διαδικασία αλληλούχισης και χαρακτηρισμού των γονιδίων (<http://www.sanger.ac.uk>).

Βάσει του άρθρου 12 της οδηγίας 2007/33/EC του Συμβουλίου της Ευρωπαϊκής Ένωσης (EU, 2007), η ταυτοποίηση των παθότυπων των ΚΝΠ είναι μία διαδικασία που πρέπει να διεξάγεται σε όλες τις μολυσμένες με ΚΝΠ περιοχές. Στην Ευρώπη έχουν

εντοπιστεί και καταγραφεί τα δύο είδη των ΚΝΠ, *G. rostochiensis* και *G. pallida*, καθώς και οι παθότυποι Ro1-5 και Pa1-3, αντίστοιχα (Kort *et al.*, 1977; Zaheer *et al.*, 1993; Greco *et al.*, 2007). Οι ευρωπαϊκοί παθότυποι ομοιάζουν γενετικά με τους παθότυπους της Λατινικής Αμερικής από όπου πιστεύεται ότι εισήχθησαν στην Ευρώπη. Η άποψη ότι δημιουργήθηκαν νέοι παθότυποι στην Ευρώπη, εξαιτίας του διαφορετικού κλίματος, δε φαίνεται να ευσταθεί (Canto Saenz *et al.*, 1977).

Ο διαχωρισμός των παθότυπων πραγματοποιείται με τη χρήση τεχνητής μόλυνσης διαφορετικών ξενιστών, επί των οποίων τα δύο είδη παρουσιάζουν διαφορετικό βαθμό προσβολής και ανάπτυξης. Η τεχνική αυτή προτάθηκε από τους Kort *et al.* (1977) και αποτελεί τη μοναδική αποτελεσματική μέθοδο που χρησιμοποιείται για το σκοπό αυτό, μέχρι σήμερα. Ως διαφορετικοί ξενιστές χρησιμοποιούνται διάφορα είδη, ποικιλίες, υβρίδια και κλώνοι του γένους *Solanum*, τα οποία παρουσιάζουν διαφορετικό βαθμό ευπάθειας στους διάφορους παθότυπους των ΚΝΠ. Οι κυριότεροι διαφορετικοί ξενιστές είναι οι ακόλουθοι: *Solanum vernei* (VTⁿ)2 62.33.3, *S. vernei* GLKS 58.1642.4, *S. kurtzianum* KTT/60.21.19, *S. vernei* hybrid 65.346/19, *S. tuberosum* cv. Saturna και cv. Spunta ή Dessire για τον *G. rostochiensis*, ενώ για τον *G. pallida* οι ξενιστές *S. vernei* (VTⁿ)2 62.33.3, AM 78-3778, *S. multidissectum* hybrid P 55/7 και Spunta ή Dessire (Fuller *et al.*, 1977; Kort *et al.*, 1977; Zaheer *et al.*, 1996b; Hinch *et al.*, 1998; Greco *et al.*, 2007; Molinari *et al.*, 2010).

Η μέθοδος των Kort *et al.* (1977) στηρίζεται στην αντίδραση των διαφορετικών ξενιστών στις διάφορες απομονώσεις των ΚΝΠ. Συγκεκριμένα, μετριέται ο αρχικός και τελικός πληθυσμός των ΚΝΠ (με τη μορφή κύστεων ή αυγών) στο έδαφος και υπολογίζεται η σχέση Pf/Pi, όπου Pf = τελικός πληθυσμός των ΚΝΠ στο έδαφος κατά το στάδιο της συγκομιδής και Pi = αρχικός πληθυσμός των ΚΝΠ στο έδαφος κατά τη φύτευση. Όταν το πηλίκο Pf/Pi >1, παρατηρείται αύξηση του μολύσματος των ΚΝΠ στο έδαφος κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου, και επομένως η ποικιλία θεωρείται ευπαθής και ο παθότυπος μολυσματικός. Όταν Pf/Pi <1, παρατηρείται μείωση του μολύσματος των ΚΝΠ στο έδαφος κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου και επομένως η ποικιλία θεωρείται ανθεκτική και ο παθότυπος μη μολυσματικός.

Στην Κύπρο είχε γίνει στο παρελθόν περιορισμένης έκτασης εργασία διαχωρισμού των παθότυπων των ΚΝΠ σε μια από τις σημαντικές πατατοπαραγωγικές περιοχές του νησιού, τη Ξυλοφάγου, καθώς επίσης και στην ορεινή περιοχή Τροόδους (Zaheer *et al.*, 1996b).

Στην εργασία αυτή είχε καταγραφεί η παρουσία του Ro1 και Pa 2/3 για το *G. rostochiensis* και *G. pallida*, αντίστοιχα.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν ο προσδιορισμός των παθότυπων των ΚΝΠ στις πιο σημαντικές περιοχές παραγωγής πατατών στην Κύπρο, με τη χρήση των διαφορικών ξενιστών πατάτας, όπως αυτοί αναφέρονται από τους Kort *et al.* (1977). Η ταυτοποίηση των παθότυπων θα υποδείξει τη νέα κατάσταση πραγμάτων στην Κύπρο αναφορικά με τους παθότυπους και θα αποτελέσει ένα ισχυρό εργαλείο διαχείρισης του προβλήματος των ΚΝΠ στην πατατοκαλλιέργεια της χώρας, αφού: i) θα επιτρέψει την ορθολογική αξιοποίηση των διαθέσιμων ανθεκτικών ποικιλιών, στο πλαίσιο ενός ολοκληρωμένου προγράμματος διαχείρισης των ΚΝΠ, ii) θα καταστήσει ικανές τις αρμόδιες υπηρεσίες φυτοϋγειονομικού ελέγχου της Κυπριακής Δημοκρατίας να παρεμποδίσουν την είσοδο και εξάπλωση νέων παθότυπων των ΚΝΠ μέσω των εισαγωγών πατατοσπόρου από το εξωτερικό και iii) θα διευκολύνει την εξαγωγή κυπριακών πατατών σε χώρες που φέρουν τα ίδια είδη και παθότυπους που υπάρχουν στην Κύπρο.

5.3 Υλικά και Μέθοδοι

5.3.1 Επιλογή αγροτεμαχίων για δειγματοληψίες εδάφους

Από μολυσμένα εδάφη σε επτά χωριά της περιοχής των Κοκκινοχωριών (Εικ. 15, βλ. 2.3.1), στα οποία εμφανίζονται αμιγείς πληθυσμοί των δύο ειδών ΚΝΠ (βλ. 2.4), λήφθηκαν δείγματα εδάφους, τα οποία αποξηράνθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για εξαγωγή κύστεων με τη μέθοδο Fenwick (βλ. 2.3.2). Οι κύστεις συλλέγονταν με τη βοήθεια στερεοσκοπίου (Εικ.30) και τοποθετούνταν στους 4 °C για 4 μήνες, με σκοπό την διακοπή της διάπαυσης των προνυμφών 2^{ου} σταδίου (Hominick *et al.*, 1985). Η ταυτοποίηση των παθότυπων του *G. rostochiensis* πραγματοποιήθηκε σε 5 τεμάχια από το χωριό Άχνα, 5 από τη Ξυλοτύμπου, 13 από την Ορμήδεια, 10 από την Ξυλοφάγου, 8 από το Λιοπέτρι και 8 από το Αυγόρου (Πίνακας 16). Η ταυτοποίηση των παθότυπων του *G. pallida* πραγματοποιήθηκε σε 7 τεμάχια από το χωριό Ορμήδεια, 3 από το Λιοπέτρι και 7 από τη Σωτήρα.



Εικόνα 30. Διηθητικό χαρτί που περιέχει κύστεις με οργανικά υλικά που εξάχθηκαν από το χώμα με τη μέθοδο Fenwick.

5.3.2 Έλεγχος εκκόλαψης προνυμφών 2^{ου} σταδίου (J2) των ΚΝΠ.

Για τον έλεγχο της εκκόλαψης των προνυμφών 2^{ου} σταδίου (J2) χρησιμοποιήθηκαν 10 κύστεις του κάθε είδους ΚΝΠ ανά τεμάχιο. Οι κύστεις τοποθετήθηκαν σε πλαστικά δίκτυα με σπές διαμέτρου 100 μm (Εικ 31) και στη συνέχεια τα δίκτυα τοποθετήθηκαν για επτά ημέρες σε νερό, μέσα σε σωλήνες Falcon χωρητικότητας 45 ml, για να μαλακώσει το εξωτερικό περιβάλλον των κύστεων και να διευκολυνθεί η εκκόλαψη. Με το πέρας των επτά ημερών, το νερό αφαιρέθηκε από τους σωλήνες και καταμετρήθηκε ο αριθμός των προνυμφών που εκκόλαφθηκαν, με τη χρήση μικροσκοπίου μεγέθυνσης 40X. Στη συνέχεια, σε κάθε σωλήνα Falcon προστέθηκαν 10 ml διαλύματος από εκκρίματα ριζών

φυτών πατάτας (Potato Root Diffusates, PRD), με σκοπό τη διέγερση της εκκόλαψης των J2. Οι κύστεις παρέμειναν στο διάλυμα PRD για επτά μέρες και στη συνέχεια καταμετρήθηκε ο αριθμός των J2 που εκκολάφθηκαν. Η προσθήκη PRD στους σωλήνες Falcon και η καταμέτρηση των J2, επαναλαμβανόταν ανά 7 ημέρες και η όλη διαδικασία εκκόλαψης διήρκησε 11 εβδομάδες, μετά από τις οποίες δεν παρατηρήθηκε περαιτέρω εκκόλαψη (Turner & Stone, 1981; Ryan *et al.*, 2000; Deliopoulos *et al.*, 2007).



Εικόνα 31. Πλαστικά δίχτυα με οπές διαμέτρου 100 μm που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο εκκόλαψης των ειδών των ΚΝΠ.

5.3.3 Μοριακή ταυτοποίηση

Για επιβεβαίωση της ύπαρξης αμιγών πληθυσμών στα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο εκκόλαψης (βλ. 5.3.2), οι J2 που εκκολάπτονταν συγκεντρώνονταν σε μικροσωλήνες χωρητικότητας 2 ml και φυλάσσονταν στους -80°C. Τα είδη των ΚΝΠ ταυτοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τη συμβατική PCR (Co-PCR) και τους εξειδικευμένους εκκινητές που δημοσιεύτηκαν από τους Bulman & Marshal (1997), όπως περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 2.3.3.

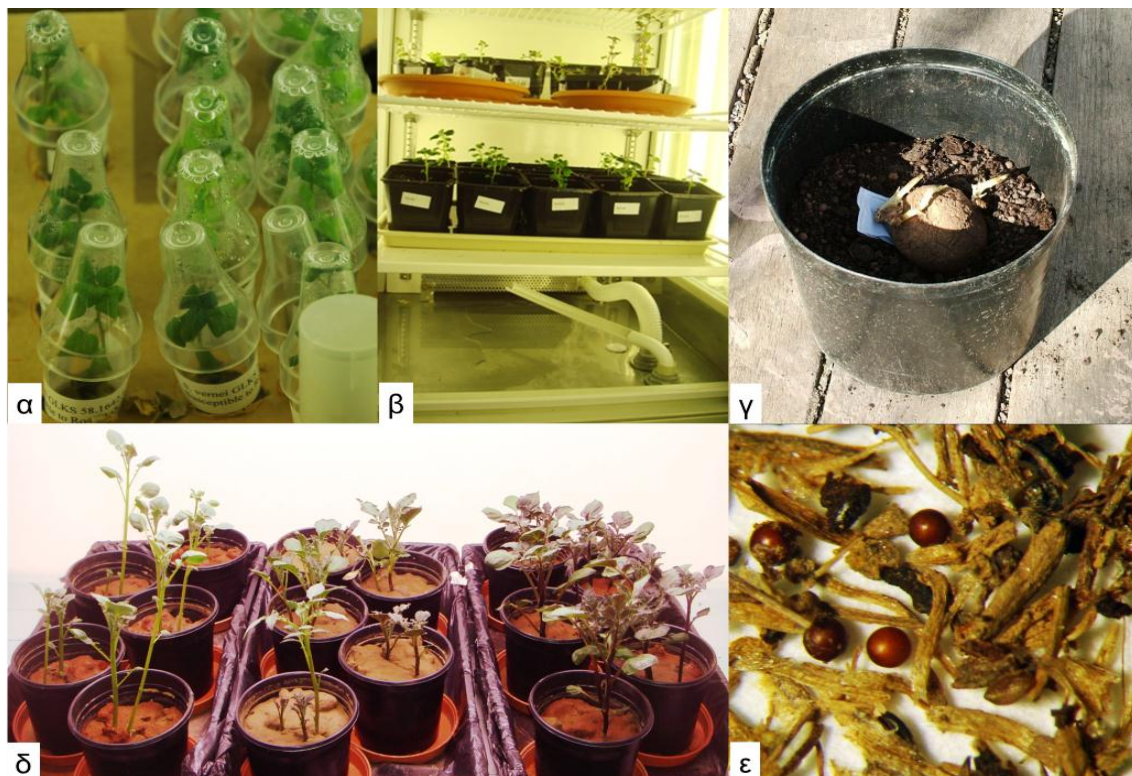
5.3.4 Πολλαπλασιασμός των διαφορικών ξενιστών με τη μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας.

Οι διαφορικοί ξενιστές του γένους *Solanum* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη (βλ. 5.3.6) εξασφαλίσθηκαν από το Ινστιτούτο Γεωργίας, Τροφίμων και Βιοεπιστημών της Ιρλανδίας (Agri-Food and Bioscience Institute, AFBI). Η εισαγωγή τους στην Κύπρο έγινε σε δυάδες, με τη μορφή μικροφύτων μέσα σε πλαστικούς σωλήνες ιστοκαλλιέργειας. Για τον πολλαπλασιασμό τους χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ιστοκαλλιέργειας (Murashige & Skoog, 1962), με σκοπό την παραγωγή μικροκονδύλων που θα αποτελούσαν το φυτικό υλικό των πειραμάτων ταυτοποίησης των παθότυπων.

Μέθοδος ιστοκαλλιέργειας: Για την ανάπτυξη των μικροφύτων χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα των Murashige & Skoog (MS) (1962), το οποίο περιείχε σε τελικό όγκο 1L H₂O: 4 g MS Medium Including Vitamins (Duchefa Biochemie), 0,7 g MS Medium Basal Salt Mixture, (Duchefa Biochemie), 8 g Plant Agar (Duchefa Biochemie) και 32 g σακχαρόζη. Το θρεπτικό υπόστρωμα αποστειρώθηκε στους 121 °C για 20 λεπτά και στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένους γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες διαστάσεων 2,5x15 cm εφοδιασμένους με πόμα. Σε κάθε σωλήνα τοποθετήθηκαν 10 ml υποστρώματος με τη χρήση πιπέτας.

Τα μικρόφυτα τεμαχίστηκαν σε μικρά τεμάχια βλαστών με δύο οφθαλμούς στο κάθε ένα, εμβαπτίστηκαν σε χλωρίνη 15% και τοποθετήθηκαν σε αναδευτήρα για 15 λεπτά. Ακολούθως, ξεπλύθηκαν με αποστειρωμένο νερό στον πάγκο νηματικής ροής και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα τρυβλία. Χρησιμοποιώντας αποστειρωμένες λαβίδες, κάθε τεμάχιο βλαστού τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη των μικροφύτων. Η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες που περιείχαν τα μικρόφυτα, τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών, σε θερμοκρασία 21 °C και φωτοπερίοδο 16:8h. Η πιο πάνω διαδικασία επαναλήφθηκε πολλές φορές, για την παραγωγή του απαιτούμενου αριθμού μικροφύτων.

Παραγωγή μικροκονδύλων: Τα μικρόφυτα χρησιμοποιούνταν όταν αποκτούσαν ύψος 8-10 cm (Εικ. 32α). Μέρος των μικροφύτων χρησιμοποιείτο για σκοπούς αναπαραγωγής και διατήρησης του πρωτογενούς υλικού, και τα υπόλοιπα μεταφυτεύονταν σε φυτοδοχεία χωρητικότητας 250 ml που περιείχαν φυτόχωμα και περλίτη σε αναλογία 4:1. Τα φυτοδοχεία μεταφέρονταν σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών με φωτοπερίοδο 16:8h, σχετική υγρασία 70% και θερμοκρασία 21 °C, για 3 μήνες (Εικ. 32β). Στη συνέχεια, συλλέγονταν οι μικροκόνδυλοι και τοποθετούνταν στους 7 °C, μέχρι να χρησιμοποιηθούν αργότερα στα πειράματα ταυτοποίησης των παθότυπων.



Εικόνα 32. Πολλαπλασιασμός διαφορετικών ξενιστών και παραγωγή νέου μολύσματος των ΚΝΠ

α) Πολλαπλασιασμός διαφορετικών ξενιστών με τη μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας, β) Παραγωγή μίνι κονδύλων σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών, γ) φύτευση μίνι κονδύλου και προσθήκη μολύσματος σε δικτυωτό φάκελο, δ) Παραγωγή νέου μολύσματος επι της ευπαθούς ποικιλίας Sprunta και ε) Συλλογή κύστεων με τη χρήση στερεοσκοπίου.

5.3.5 Παραγωγή αρχικού μολύσματος (Pi)

Οι κύστεις που συλλέχθηκαν από τα αγροτεμάχια με αμιγείς πληθυσμούς των δύο ειδών ΚΝΠ (βλ.5.3.1), πολλαπλασιάστηκαν σε ευπαθή ξενιστή πατάτας της ποικιλίας Sprunta, για παραγωγή νέου μολύσματος (Εικ. 32δ). Οι κύστεις τοποθετήθηκαν σε δικτυωτή θήκη με οπές διαμέτρου 100 μm, η οποία στη συνέχεια τοποθετήθηκε δίπλα από τον κόνδυλο, μέσα σε πλαστικό φυτοδοχείο του 1L, που περιείχε αποστειρωμένη άμμο, απαλλαγμένη από φυτικά υπολείμματα (Εικ. 32γ). Η ανάπτυξη των φυτών του ευπαθούς ξενιστή και η παραγωγή νέου μολύσματος, πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών, με φωτοπερίοδο 16:8h, σχετική υγρασία 70% και θερμοκρασία 21 °C, για 4 μήνες. Καθ' όλη τη διάρκεια ανάπτυξης τους τα φυτά αρδεύονταν κάθε 3-4 ημέρες, ενώ λάμβαναν υδατοδιαλυτό λίπασμα τύπου 20-10-10 κάθε 3 εβδομάδες. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκαν κίτρινες κολλητικές παγίδες για τη σύλληψη εντομολογικών εχθρών όπως θρίπες, αλευρώδεις, αφίδες κλπ, για να αποφευχθούν τυχόν ζημιές από τα έντομα ή από τη μετάδοση ιώσεων στα φυτά. Στη συνέχεια, αφού το υπέργειο μέρος των φυτών αφαιρέθηκε, το έδαφος αποξηρανθηκε και χρησιμοποιήθηκε για εξαγωγή των κύστεων με τη μέθοδο Fenwick. Οι νεοσηματισθείσες κύστεις τοποθετήθηκαν στους 4 °C για να διακοπεί η διάπαυση των εγκυστωμένων προνυμφών 2^{ου} σταδίου.

5.3.6 Μόλυνση των διαφορικών ξενιστών με κύστεις

Για την ταυτοποίηση των παθότυπων του *G. rostochiensis* χρησιμοποιήθηκαν οι ξενιστές: *Solanum vernei* (VTⁿ)2 62.33.3, *S. vernei* GLKS 58.1642.4, *S. kurtzianum* KTT/60.21.19, *S. vernei* hybrid 65.346/19, *S. tuberosum* cv. Saturna και η ποικιλία *S. tuberosum* cv. Sprunta ως μάρτυρας. Για την ταυτοποίηση των παθότυπων του *G. pallida* χρησιμοποιήθηκαν οι ξενιστές: *S. vernei* (VTⁿ)2 62.33.3, AM 78-3778, *S. multidissectum* hybrid P 55/7 και η ποικιλία *S. tuberosum* cv. Sprunta ως μάρτυρας.

Για τη μόλυνση των διαφορικών ξενιστών χρησιμοποιήθηκαν οι νεοσχηματισθείσες κύστεις που παράχθηκαν όπως περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 5.3.5, και τοποθετήθηκαν ανά 15 (~5000 αυγά) σε δικτυωτούς φακέλους με οπές διαμέτρου 100 μm. Οι μικροκόνδυλοι των διαφορικών ξενιστών που παράχθηκαν με τη μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας (βλ. 5.3.4), απολυμάνθηκαν με εμβάπτιση σε διάλυμα χλωρίνης 15% και στη συνέχεια εμβαπίστηκαν σε διάλυμα γιβερελλίνης 0.1%, για διακοπή του λήθαργου και γρήγορη και ομοιόμορφη βλάστηση. Οι μικροκόνδυλοι και οι δικτυωτοί φάκελοι με τις κύστεις, τοποθετήθηκαν σε φυτοδοχεία χωρητικότητας 1L που περιείχαν αποστειρωμένη άμμο, απαλλαγμένη από φυτικά υπολείμματα. Στη συνέχεια τα φυτοδοχεία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών με φωτοπερίοδο 16:8 h, θερμοκρασία 20 ± 2 °C και σχετική υγρασία 40 ± 5 % (Εικ. 33). Το πειραματικό σχέδιο διάταξης των φυτοδοχείων ήταν πλήρως τυχαίο και ο κάθε ξενιστής αποτελούσε μια μεταχείριση με 8 επαναλήψεις. Η θρέψη των φυτών και τα μέτρα φυτοπροστασίας έγιναν όπως περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 5.3.5. Με την πάροδο 3 μηνών, αφαιρέθηκε το υπέργειο μέρος των φυτών και τα φυτοδοχεία τοποθετήθηκαν σε ξηρό δωμάτιο με θερμοκρασία 25 °C, για αποξήρανση του εδάφους και εξαγωγή των κύστεων με τη μέθοδο Fenwick (βλ. 2.3.2).



Εικόνα 33. Ανάπτυξη διαφορικών ξενιστών σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών.

5.3.7 Μέτρηση τελικού μολύσματος και τρόπος καθορισμού των παθότυπων

Ο διαχωρισμός των παθότυπων έγινε με βάση το βαθμό ανθεκτικότητας των διαφορικών ξενιστών με κριτήριο τη σχέση Pf/Pi, όπου Pf = τελικό μόλυσμα και Pi = αρχικό μόλυσμα (Kort *et al.*, 1977; EU, 2007; Greco *et al.*, 2007). Ως αρχικό μόλυσμα (Pi) θεωρήθηκε ο αριθμός των κύστεων που τοποθετήθηκαν σε κάθε φυτοδοχείο κατά τη φύτευση των διαφορικών ξενιστών ενώ ο αριθμός των νέων κύστεων που σχηματίστηκαν επί των ριζών των διαφορικών ξενιστών θεωρήθηκε ως ο τελικός πληθυσμός (Pf) για κάθε μεταχείριση. Για τον προσδιορισμό των παθότυπων χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο διαχωρισμού των Ευρωπαϊκών παθότυπων (Kort *et al.*, 1977), σύμφωνα με το οποίο η αναλογία του τελικού πληθυσμού σε σχέση με τον αρχικό, αποτελεί το μόνο κριτήριο για τον καθορισμό των παθότυπων (Πίνακας 15).

Πίνακας 15. Πρότυπο διαχωρισμού των παθότυπων των ΚΝΠ.

Ξενιστές	<i>Globodera rostochiensis</i>					<i>Globodera pallida</i>		
	Ro1	Ro2	Ro3	Ro4	Ro5	Pa1	Pa2	Pa3
<i>Solanum tuberosum</i> cv. Spunta	+ ¹	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. vernei</i> hybrid 65.346/19	- ²	-	-	-	-	+	+	+
<i>Solanum tuberosum</i> cv Saturna	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. kurtzianum</i> KTT 60.21.19	-	-	(+) ³	(+)	(+)	+	+	+
<i>S. vernei</i> GLKS 58.1642.4	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>S. vernei</i> Vt ⁿ 62.33.3	-	-	-	-	+	-	-	+
AM 78-3778	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>S. multidisectum</i> hybrid P55/7	+	+	+	+	+	-	+	+

¹+ : Ευπαθής ποικιλία και μολυσματικός παθότυπος (Pf/Pi > 1.0),

²- : ανθεκτική ποικιλία και μη μολυσματικός παθότυπος (Pf/Pi < 1.0),

³(+): μερική ευπάθεια της ποικιλίας.

Όπου Pi = αρχικός πληθυσμός και Pf = τελικός πληθυσμός νηματωδών

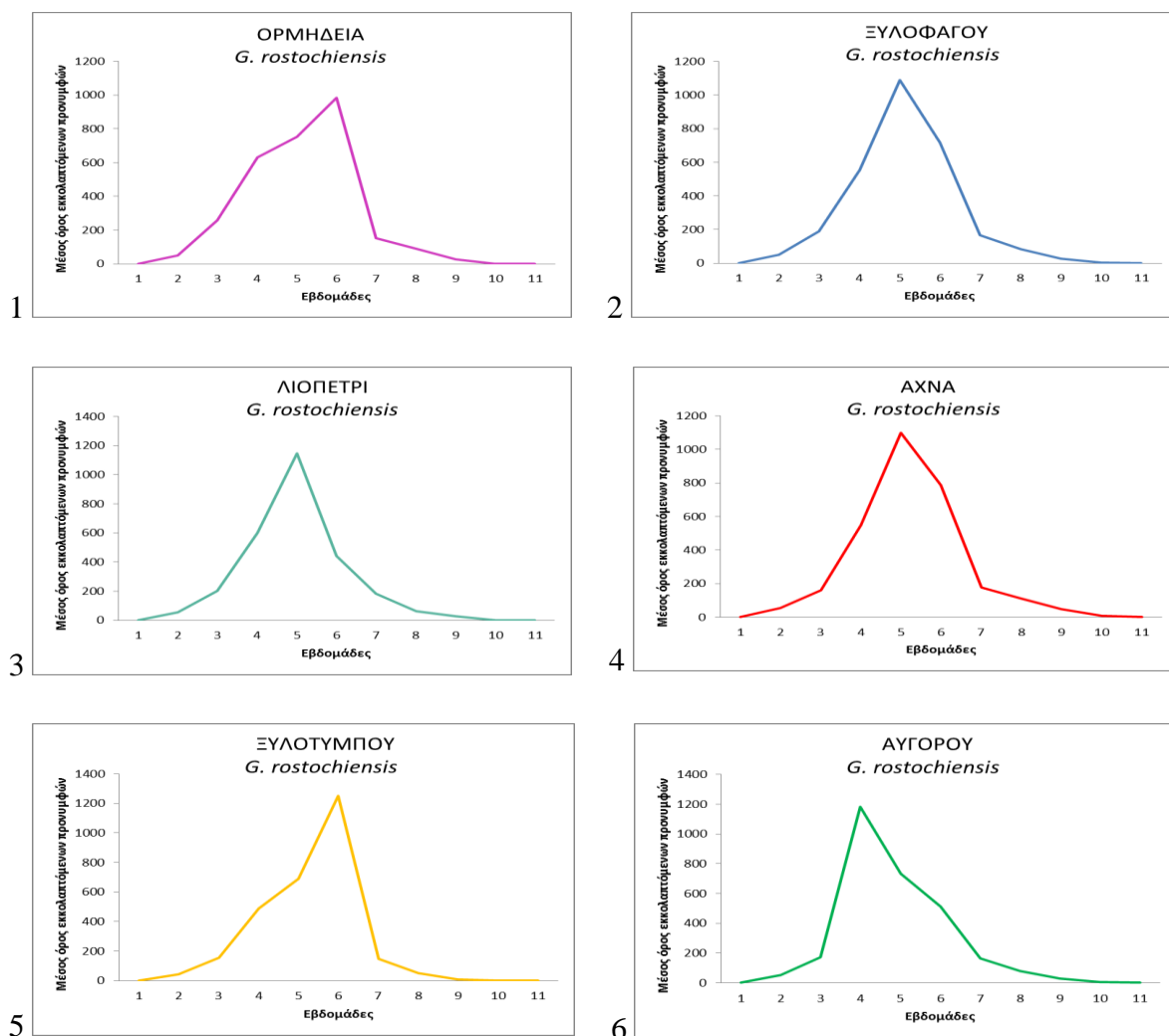
5.4 Αποτελέσματα

5.4.1 Έλεγχος εκκόλαψης προνυμφών 2^{ου} σταδίου (J2)

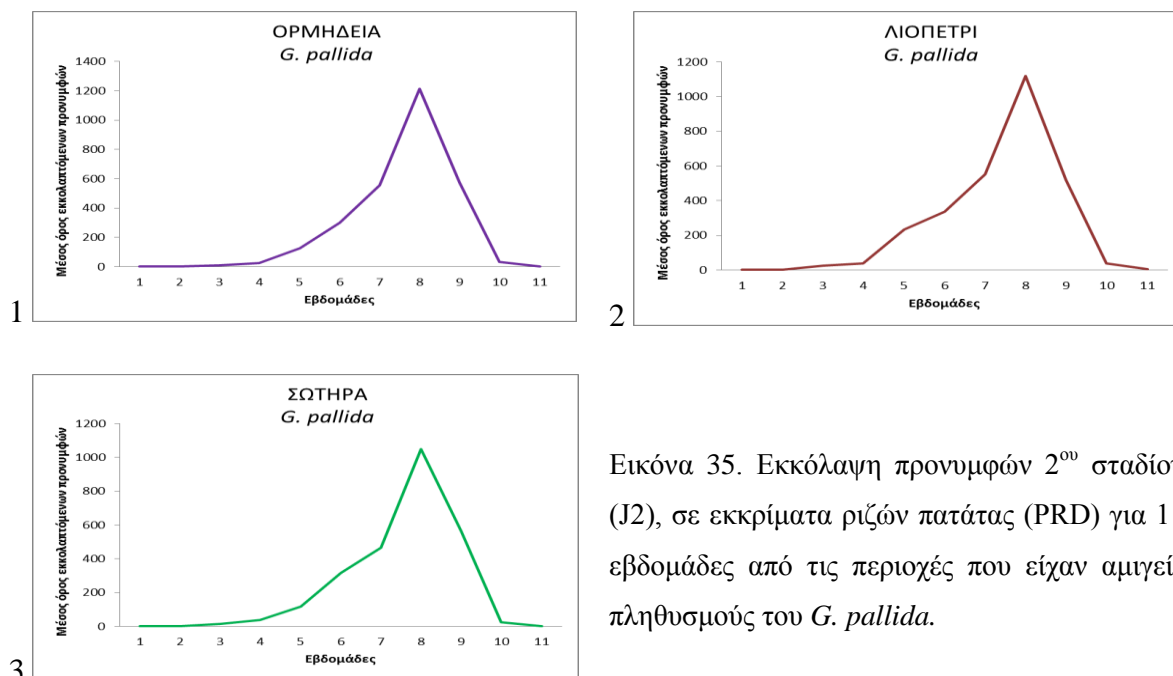
Για τον έλεγχο της εκκόλαψης των προνυμφών 2^{ου} σταδίου (J2), χρησιμοποιήθηκαν 10 κύστεις από το κάθε είδος ΚΝΠ, και από κάθε ένα από τα αγροτεμάχια που μελετήθηκαν. Οι κύστεις τοποθετήθηκαν σε διάλυμα PRD για 11 εβδομάδες και η καταμέτρηση των εκκολαπτόμενων προνυμφών γινόταν ανά 7 ημέρες, με ταυτόχρονη αντικατάσταση του PRD. Τα αποτελέσματα των δοκιμών εκκόλαψης J2 από τις 6 υπό μελέτη περιοχές που είχαν αμιγείς πληθυσμούς του *G. rostochiensis* παρουσιάζονται στην εικόνα 34. Οι κύστεις που είχαν εμβαπτιστεί σε PRD άρχισαν να εκκολάπτονται από τη 2^η εβδομάδα. Ο μέγιστος αριθμός εκκόλαψης παρατηρήθηκε την 4^η εβδομάδα στις κύστεις της περιοχής Αυγόρου, την 5^η εβδομάδα στις κύστεις των περιοχών Ξυλοφάγου, Άχνας και Λιοπετρίου και την 6^η εβδομάδα στις κύστεις των περιοχών Ορμήδειας και Ξυλοτύμπου. Από την 7^η μέχρι την 10^η εβδομάδα η εκκόλαψη μειώθηκε σημαντικά σε όλες τις περιοχές, ενώ την 11^η εβδομάδα ήταν μηδενική σε όλες τις περιοχές.

Τα αποτελέσματα της εκκόλαψης των J2 από τις 3 περιοχές που είχαν αμιγείς πληθυσμούς του *G. pallida* παρουσιάζονται στην εικόνα 35. Την 1^η εβδομάδα δεν παρατηρήθηκε καμία εκκόλαψη των J2, ενώ τη 2η εβδομάδα παρατηρήθηκε μηδενική έως ελάχιστη εκκόλαψη (<10). Την 3^η εβδομάδα παρατηρήθηκε μηδενική έως μερική εκκόλαψη (<49), ενώ από την 4^η εβδομάδα παρατηρήθηκε εκκόλαψη σε όλα τα δείγματα. Ο μέγιστος αριθμός εκκόλαψης παρατηρήθηκε την 8^η εβδομάδα και για τις τρεις περιοχές, Λιοπέτρι, Ορμήδεια και Σωτήρα. Από την 9^η μέχρι την 10^η εβδομάδα, η εκκόλαψη των J2 άρχισε να μειώνεται σημαντικά, ενώ κατά την 10^η και 11^η εβδομάδα, η εκκόλαψη ήταν ελάχιστη έως μηδενική. Ο μέσος όρος εκκόλαψης των J2 ανά κύστη ήταν 288,5 (\pm 34 SD) για τον *G. rostochiensis* και 274,5 (\pm 27,8 SD), για τον *G. pallida*.

Κεφάλαιο 5: Διαφοροποίηση των παθότυπων των ΚΝΠ



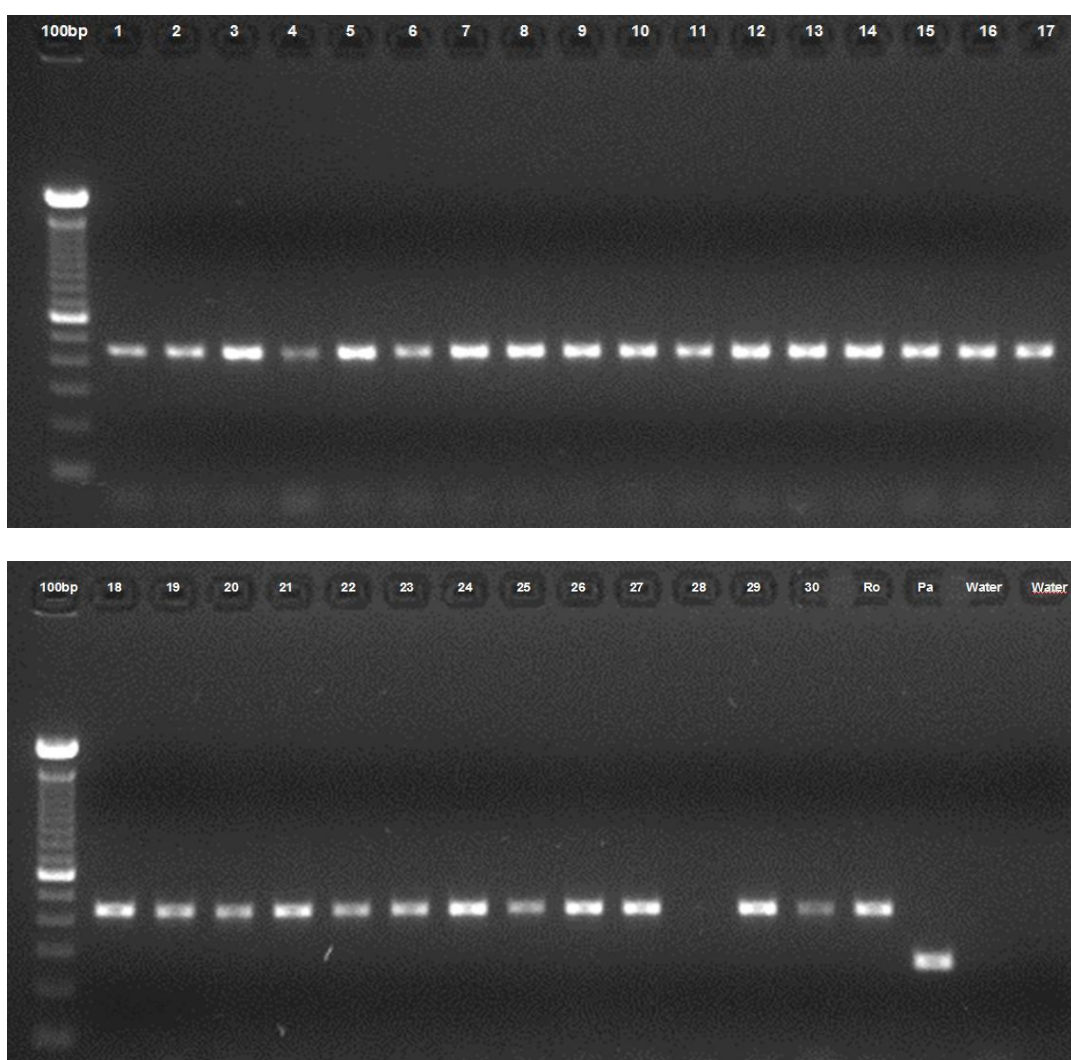
Εικόνα 34. Εκκόλαψη προνυμφών 2^{ου} σταδίου (J2), σε εκκρίματα ριζών πατάτας (PRD) για 11 εβδομάδες από τις περιοχές που είχαν αμιγείς πληθυσμούς του *G. rostochiensis*.



Εικόνα 35. Εκκόλαψη προνυμφών 2^{ου} σταδίου (J2), σε εκκρίματα ριζών πατάτας (PRD) για 11 εβδομάδες από τις περιοχές που είχαν αμιγείς πληθυσμούς του *G. pallida*.

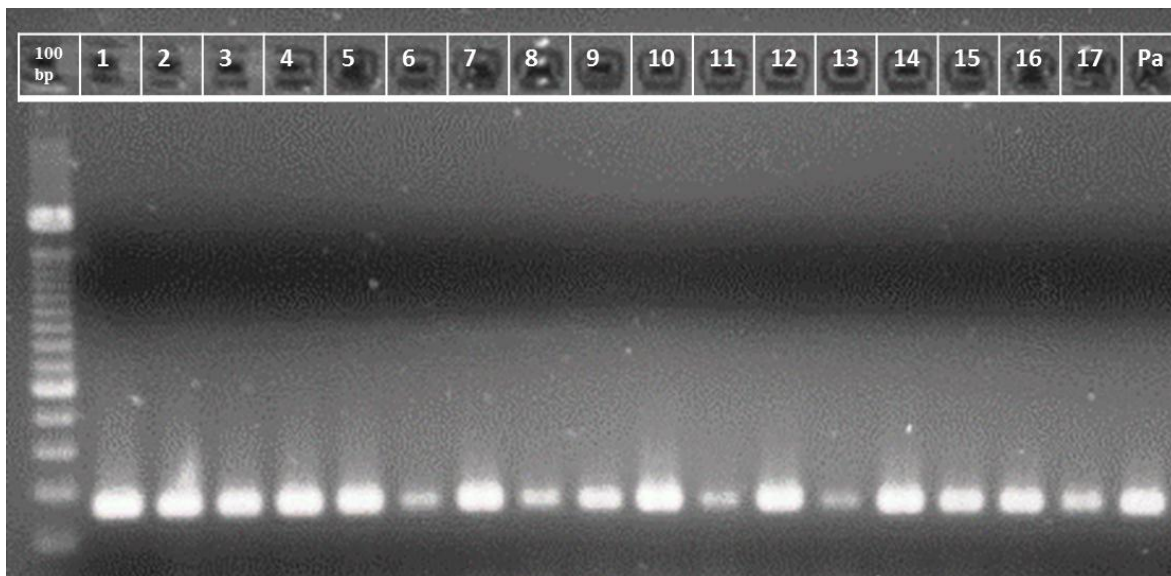
5.4.2 Μοριακή ταυτοποίηση των δυο ειδών ΚΝΠ

Από τις προνύμφες 2^{ου} σταδίου που εκκολάφθηκαν (βλ. 5.4.1) εκχυλίστηκε γονιδιωματικό DNA, το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε αντιδράσεις Co-PCR, με σκοπό την επιβεβαίωση αμιγών πληθυσμών του *G. rostochiensis* και *G. pallida*, στα τεμάχια που επελέγησαν για την ταυτοποίηση των παθότυπων. Στις εικόνες 36 και 37 απεικονίζονται τα προϊόντα ενίσχυσης της co-PCR από τα τεμάχια που είχαν αμιγείς πληθυσμούς του *G. rostochiensis* και *G. pallida*, αντίστοιχα. Η απεικόνιση προϊόντων μεγέθους 434 βάσεων στην ηλεκτροφόριση της πηκτής αγαρόζης, επιβεβαιώνει την παρουσία αμιγών πληθυσμών του *G. rostochiensis*, ενώ η απεικόνιση προϊόντων 256 βάσεων επιβεβαιώνει την παρουσία αμιγών πληθυσμών του *G. pallida*.



Εικόνα 36. Επιβεβαίωση της παρουσίας αμιγών πληθυσμών του *Globodera rostochiensis* στα τεμάχια προσδιορισμού των παθότυπων.

Ηλεκτροφορητική κατανομή των προϊόντων της PCR σε πήγμα αγαρόζης 1,5%. Στήλες 1-30: άγνωστα δείγματα για τον προσδιορισμό των ειδών. Στήλη 100bp: μοριακά βάρη 100 βάσεων. Στήλη Ro: γνωστό δείγμα *G. rostochiensis*. Στήλη Pa: γνωστό δείγμα *G. pallida*. Στήλη water: δείγματα χωρίς DNA (Νερό).



Εικόνα 37. Επιβεβαίωση της παρουσίας αμιγών πληθυσμών του *Globodera pallida* στα τεμάχια προσδιορισμού των παθότυπων.

Ηλεκτροφορητική κατανομή των προϊόντων της PCR σε πήγμα αγαρόζης 1,5%. Στήλες 1-17: άγνωστα δείγματα για τον προσδιορισμό των ειδών. Στήλες 100bp: μοριακά βάρη 100 βάσεων. Στήλη Pa: γνωστό δείγμα *G. pallida*.

5.4.3 Ταυτοποίηση παθότυπων

Οι ταυτοποίηση των παθότυπων βασίστηκε στη μέθοδο της τεχνητής μόλυνσης διαφορικών ξενιστών του γένους *Solanum*, με διαφορετικό βαθμό ανθεκτικότητας στους ΚΝΠ (Πίνακας 15). Ο διαχωρισμός των παθότυπων έγινε με κριτήριο τη σχέση Pf/Pi, όπου Pf είναι το τελικό μόλυσμα και Pi το αρχικό μόλυσμα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στην Κύπρο υπάρχουν οι παθότυποι Ro1 και Pa2, Pa3 και Pa2/3 (Πίνακας 16). Κατά την ταυτοποίηση των παθότυπων του *G. rostochiensis*, σε δύο δείγματα από την Ορμήδεια (τεμάχιο 1) και Ξυλοφάγου (τεμάχιο 4) παρατηρήθηκε μερική ανάπτυξη του μολύσματος επί της ποικιλίας Saturna, η οποία φέρει ανθεκτικότητα μόνο στον παθότυπο Ro1 με τιμές Pf/Pi 1.34 και 1.36, αντίστοιχα. Λαμβάνοντας υπόψη ότι δεν παρουσιάστηκε ανάπτυξη στον ξενιστή *S. vernei* GLKS 58.1642.4, αποκλείστηκε ο παθότυπος Ro4. Έτσι, τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να ερμηνευτούν ως ένδειξη ενδεχόμενης παρουσίας του παθότυπου Ro2. Η εισήγηση αυτή γίνεται με επιφύλαξη λόγω της οριακής τιμής των αποτελεσμάτων, χωρίς ωστόσο να αποκλείεται η συνύπαρξη του Ro2 με τον Ro1. Οι μέσες τιμές Pf/Pi των υπόλοιπων δειγμάτων στην ποικιλία Saturna, κυμάνθηκαν από 0 έως 0.93.

Στις ποικιλίες VTn 62-33-3, GLKS 58-1642-4, 65346/19 και KTT 60-21-19 οι τιμές Pf/Pi κυμάνθηκαν από 0 – 0.2, 0 – 0.26, 0 – 0.24 και 0 – 0.36, αντίστοιχα (Πίνακας 16).

Η ευπαθής ποικιλία Sprunta (μάρτυρας) επέτρεψε την ανάπτυξη και αναπαραγωγή τόσο των πληθυσμών του *G. rostochiensis*, όσο και του *G. pallida*, γεγονός που επιβεβαιώνει τη βιωσιμότητα των κύστεων που χρησιμοποιήθηκαν και την επιτυχή διεκπεραίωση όλων των διαδικασιών του πειράματος. Οι τιμές Pf/Pi στην ποικιλία Sprunta για όλα τα δείγματα του *G. rostochiensis*, κυμάνθηκαν από 5.7 μέχρι 41.7 ($Pf/Pi > 1,0$). Κατά περιοχή, οι μέσοι όροι των τιμών Pf/Pi για τον *G. rostochiensis* ήταν: Ορμήδεια 21.98, Ξυλοφάγου 26.69, Λιοπέτρι 13.96, Αχνα 22.02, Ξυλοτύπου 22.49 και Αυγόρου 23.82 (Πίνακας 16). Οι κατά περιοχή μέσοι όροι Pf/Pi για τον *G. pallida* ήταν: Ορμήδεια 16.37, Λιοπέτρι 16.59 και Σωτήρα 17.46 (Πίνακα 17).

Τα αποτελέσματα από τα 17 δείγματα που ήταν μολυσμένα με αμιγείς πληθυσμούς του *G. pallida*, κατέδειξαν την παρουσία του Pa3 σε 2 τεμάχια της περιοχής Ορμήδεια και του Pa2 σε ένα τεμάχιο της περιοχής Λιοπετρίου. Τα υπόλοιπα 14 δείγματα θεωρήθηκαν ως μικτοί πληθυσμοί των Pa2 και Pa3, αφού δεν ήταν σαφής η διάκριση των παθότυπων στην αξιολόγηση των δειγμάτων επί του ξενιστή VTⁿ 62.33.3. Οι τιμές Pf/Pi σε όλες τις επαναλήψεις (φυτοδοχεία) κυμαίνονταν από 0.38- 1.57 (Πίνακας 17).

Κεφάλαιο 5: Διαφοροποίηση των παθότυπων των ΚΝΠ

Πίνακας 16. Ταυτοποίηση των παθότυπων του *Globodera rostochiensis* από τεμάχια 6 περιοχών που βρέθηκαν μολυσμένα με αμιγείς πληθυσμούς του είδους αυτού.

Οι τιμές εκφράζουν τους μέσους όρους του βαθμού ανάπτυξης των νηματωδών, επί των διαφορικών ξενιστών του γένους *Solanum*: Pf = τελικός πληθυσμός και Pi = αρχικός πληθυσμός.

Περιοχή	Διαφορικοί ξενιστές (Κλώνοι και ποικιλίες του γένους <i>Solanum</i>)							ΠΑΘΟΤΥΠΟΣ
	Αριθμός Τεμαχίου	<i>S. tuberosum</i> cv. Spunta	<i>S. tuberosum</i> cv. Saturna	<i>S. kurtzianum</i> KTT 60.21.19	<i>S. vernei</i> GLKS 58.1642.4	<i>S. vernei</i> Vtn 62.33.3	<i>S. vernei</i> 65346/19	
ΟΡΜΗΔΕΙΑ	1	20,85*	1,34	0,18	0,12	0,15	0,11	Ro1/2
	2	23,21	0,93	0,11	0,08	0,12	0,03	Ro1
	3	30,83	0,87	0,14	0,12	0,20	0,06	Ro1
	4	35,19	0,67	0,17	0,26	0,06	0,13	Ro1
	5	31,63	0,63	0,14	0,23	0,12	0,24	Ro1
	6	31,27	0,51	0,13	0,13	0,01	0,15	Ro1
	7	32,65	0,78	0,03	0,19	0,08	0,01	Ro1
	8	16,27	0,20	0,03	0,00	0,00	0,00	Ro1
	9	12,57	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	Ro1
	10	15,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Ro1
	11	8,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Ro1
	12	11,00	0,02	0,00	0,03	0,03	0,00	Ro1
	13	17,08	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	Ro1
ΕΥΛΟΦΑΓΟΥ	1	37,21	0,35	0,20	0,00	0,00	0,00	Ro1
	2	19,84	0,18	0,17	0,55	0,05	0,00	Ro1
	3	23,44	0,90	0,30	0,05	0,00	0,00	Ro1
	4	41,76	1,36	0,19	0,12	0,11	0,08	Ro1/2
	5	31,63	0,80	0,14	0,23	0,12	0,24	Ro1
	6	28,87	0,48	0,22	0,05	0,04	0,08	Ro1
	7	14,35	0,23	0,00	0,00	0,03	0,04	Ro1
	8	28,67	0,93	0,08	0,13	0,12	0,00	Ro1
	9	6,33	0,00	0,00	0,01	0,03	0,01	Ro1
	10	34,83	0,58	0,00	0,00	0,02	0,01	Ro1
ΛΙΟΠΕΤΡΙ	1	11,65	0,29	0,07	0,03	0,12	0,00	Ro1
	2	6,38	0,03	0,00	0,01	0,03	0,00	Ro1
	3	25,53	0,68	0,15	0,06	0,13	0,03	Ro1
	4	9,20	0,48	0,15	0,00	0,13	0,00	Ro1
	5	10,93	0,33	0,13	0,00	0,03	0,06	Ro1
	6	31,53	0,85	0,23	0,00	0,05	0,06	Ro1
	7	5,73	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Ro1
	8	10,77	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Ro1
ΑΧΝΑ	1	25,23	0,26	0,16	0,08	0,12	0,20	Ro1
	2	18,35	0,43	0,00	0,05	0,00	0,03	Ro1
	3	24,75	0,20	0,00	0,00	0,00	0,02	Ro1
	4	25,47	0,00	0,08	0,00	0,12	0,00	Ro1
	5	16,33	0,00	0,00	0,00	0,15	0,01	Ro1
ΑΥΤΟΡΟΥ	1	14,63	0,93	0,13	0,00	0,03	0,06	Ro1
	2	26,53	0,45	0,00	0,00	0,20	0,06	Ro1
	3	25,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Ro1
	4	30,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Ro1
	5	25,45	0,23	0,00	0,01	0,00	0,00	Ro1
	6	26,22	0,46	0,00	0,10	0,00	0,00	Ro1
	7	18,67	0,34	0,16	0,00	0,00	0,00	Ro1
	8	23,70	0,00	0,14	0,00	0,00	0,00	Ro1
ΕΥΛΟΤΥΜΠΟΥ	1	22,83	0,00	0,00	0,00	0,11	0,00	Ro1
	2	18,81	0,00	0,27	0,12	0,14	0,00	Ro1
	3	26,33	0,23	0,36	0,01	0,00	0,00	Ro1
	4	15,58	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	Ro1
	5	28,90	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Ro1

*Μέσος όρος Pf/Pi (n=8)

Πίνακας 17. Ταυτοποίηση των παθότυπων του *Globodera pallida* από τεμάχια 3 περιοχών που βρέθηκαν μολυσμένα με αμιγείς πληθυσμούς του είδους αυτού.

Οι τιμές εκφράζουν τους μέσους όρους του βαθμού ανάπτυξης των νηματωδών, επί των διαφορικών ξενιστών του γένους *Solanum*: Pf = τελικός πληθυσμός και Pi = αρχικός πληθυσμός.

Περιοχή	Διαφορικοί ξενιστές (Κλώνοι και ποικιλίες του γένους <i>Solanum</i>)					ΠΑΘΟΤΥΠΟΣ
	Αριθμός Τεμαχίου	<i>S. tuberosum</i> cv. Spunta	<i>S. vernei</i> Vtn 62.33.3	<i>S. multidissectum</i> P55/7	<i>S. vernei</i> AM 78.3778	
ΟΡΜΗΔΕΙΑ	1	14,05*	0,46	1,14	0,11	Pa 2/3
	2	14,78	0,38	2,68	0,13	Pa 2/3
	3	18,39	1,57	7,74	0,22	Pa 2/3
	4	18,20	1,36	12,45	0,08	Pa 2/3
	5	15,79	1,43	5,64	0,00	Pa 2/3
	6	15,79	2,59	5,64	0,03	Pa 3
	7	17,58	4,80	10,44	0,00	Pa 3
ΛΙΟΠΕΤΡΙ	1	10,54	0,82	1,26	0,13	Pa 2/3
	2	26,24	0,07	2,23	0,09	Pa 2
	3	12,98	0,84	1,31	0,08	Pa 2/3
ΣΩΤΗΡΑ	1	25,78	0,78	12,11	0,02	Pa 2/3
	2	12,24	0,60	2,30	0,03	Pa 2/3
	3	9,69	0,82	1,69	0,09	Pa 2/3
	4	27,23	1,11	3,01	0,08	Pa 2/3
	5	15,98	0,91	2,91	0,00	Pa 2/3
	6	12,26	1,35	5,51	0,00	Pa 2/3
	7	19,06	1,28	6,31	0,09	Pa 2/3

*Μέσος όρος Pf/Pi (n=8)

Πίνακας 18. Ανθεκτικότητα των διαφορικών ξενιστών του γένους *Solanum* που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα ταυτοποίησης των παθότυπων του *Globodera rostochiensis* και *G.pallida*.

Διαφορικοί ξενιστές		Ανθεκτικότητα
Είδος	Ποικιλία / Υβρίδιο / Κλώνος	
<i>Solanum tuberosum</i>	SPUNTA	-
<i>Solanum tuberosum</i>	SATURNA	*Ro1, Ro4
<i>Solanum kurtzianum</i>	KTT/60.21.19	Ro1, Ro2
<i>Solanum vernei</i>	GLKS-58.1642.4	Ro1, Ro2, Ro3
<i>Solanum vernei</i>	65346/19	Ro1, Ro2, Ro3, Ro4 & Ro5
<i>Solanum vernei</i>	Vt ⁿ 62.33.3	Ro1, Ro2, Ro3, Ro4, Pa1 & Pa2
<i>Solanum multidissectum</i>	P55/7	**Pa1
<i>Solanum vernei</i>	AM78.3778	Pa2 Pa3

*Ro 1- 4 = παθότυποι του *G. rostochiensis*
 **Pa 1-3 = παθότυποι του *G. pallida*

5.5 Συζήτηση

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζεται ο διαχωρισμός των Κυπριακών παθότυπων των δύο ειδών ΚΝΠ, *G. rostochiensis* και *G. pallida*, με τη μοναδική μέχρι σήμερα αποδεκτή μέθοδο της τεχνητής μόλυνσης διαφορεικών ξενιστών του γένους *Solanum* (Kort *et al.*, 1977). Για την ταυτοποίηση των κυπριακών παθότυπων πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες εδάφους από 66 τεμάχια με ιστορικό μόλυνσης από αμιγείς πληθυσμούς των ΚΝΠ, σε 7 σημαντικές πατατοπαραγωγικές περιοχές των Κοκκινοχωριών. Για την επιβεβαίωση της παρουσίας αμιγών πληθυσμών στα υπό μελέτη τεμάχια, πραγματοποιήθηκε μοριακή ταυτοποίηση των δύο ειδών ΚΝΠ με ενίσχυση της ITS περιοχής του γονιδιακού DNA, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές που δημοσίευσαν οι Bulman & Marshal (1997). Παράλληλα, ελέγχθηκε η βιωσιμότητα του μολύσματος που συλλέχθηκε από τα 66 τεμάχια με δοκιμές εκκόλαψης των προνυμφών 2^{ου} σταδίου (J2) μετά από εμφύσηση τους σε PRD. Οι δοκιμές αυτές κατέδειξαν το υψηλό ποσοστό ζωντανού μολύσματος μέσα στις κύστες, αλλά και τη σημαντική διαφορά των δύο ειδών όσον αφορά την περίοδο εκκόλαψης τους, αφού ο μέγιστος αριθμός των J2 του είδους *G. rostochiensis* εκκολάφθηκε 2 εβδομάδες ενωρίτερα από τους J2 του *G. pallida*. Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώνουν παρόμοια αποτελέσματα που δημοσιεύτηκαν από τους (Ryan *et al.*, 2000).

Ο πρώτος διαχωρισμός των κυπριακών παθότυπων έγινε από τους Zaheer *et al.* (1996), οι οποίοι κατέγραψαν την παρουσία του Ro1 και Pa2/3 για τον *G. rostochiensis* και *G. pallida*, αντίστοιχα. Η αναφορά αυτή επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας. Οι υποψίες όμως που διατύπωσαν οι Zaheer *et al.* (1996) για πιθανή ύπαρξη των Ro3 η Ro5 αντί του Ro1 σε κάποια δείγματα, δεν επιβεβαιώθηκαν στην παρούσα εργασία. Αντίθετα, σε δύο τεμάχια υπάρχουν ενδείξεις για ύπαρξη του *G. rostochiensis* Ro2. Επιπλέον, σε αυτή την εργασία, σε πληθυσμούς 3 τεμαχίων πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός των παθότυπων Pa2/3 σε Pa2 και Pa3, πράγμα που δεν είχε γίνει εφικτό από τους Zaheer *et al.* (1996). Σημειώνεται ακόμη ότι οι δειγματοληψίες που έγιναν στην παρούσα μελέτη ήταν πολύ μεγαλύτερης έκτασης και έδωσαν πληροφορίες για τη γεωγραφική διασπορά των παθότυπων σε επτά περιοχές, έναντι δύο μόνο περιοχών που αναφέρουν οι Zaheer *et al.* (1996), εκ των οποίων μόνο μία (Ξυλοφάγου) θεωρείται σημαντική για την πατατοκαλλιέργεια. Επιπλέον, ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με κύστες που προέρχονταν από αμιγείς πληθυσμούς των δύο ειδών και όχι από μικτούς πληθυσμούς, όπως είχαν χρησιμοποιήσει οι Zaheer *et al.* (1996).

Η μέθοδος της τεχνητής μόλυνσης διαφορικών ξενιστών για το διαχωρισμό των παθότυπων, αποδείχθηκε χρονοβόρα και δύσκολη στην εφαρμογή της. Επίσης, η διαδικασία εξαγωγής κύστεων, σε συνδυασμό με την ταυτοποίηση, την ποσοτικοποίηση και τον έλεγχο βιωσιμότητας, είναι επίσης πολύπλοκη και χρονοβόρα, με μεγάλες απαιτήσεις σε εξειδικευμένο προσωπικό. Προβλήματα επίσης δημιουργούνται λόγω του μικρού αριθμού γονιδίων ανθεκτικότητας εναντίον του *G. pallida*, καθώς και λόγω του γεγονότος ότι η ανθεκτικότητα-ευπάθεια των διαφορικών ξενιστών επηρεάζεται άμεσα από περιβαλλοντικούς παράγοντες (Browder, 1985). Τέλος, σημειώνεται ότι ο προσδιορισμός των παθότυπων είναι προβληματικός όταν οι τιμές Pf/Pi είναι πολύ κοντά στην οριακή τιμή 1. Παρόμοιες αμφιβολίες εξέφρασαν οι Trudgill *et al.* (1985) και Flening & Powers (1998).

Επειδή η χρήση διαφορικών ξενιστών δε θεωρείται ιδιαίτερα αξιόπιστη μέθοδος, ενώ παράλληλα είναι χρονοβόρα και οικονομικά ασύμφορη, τα τελευταία 30 χρόνια γίνονται προσπάθειες για διαχωρισμό των παθότυπων με τη χρήση διαφόρων μοριακών και βιοχημικών τεχνικών, όπως: α) το ισοηλεκτρικό σημείο εστίασης (isoelectric focusing, IEF), β) η ανοσοενζυμική δοκιμή (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA), γ) η ισοενζυμική ανάλυση (isozyme analysis) και δ) η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Οι τεχνικές αυτές δεν έχουν δώσει ακόμη έγκυρα και αξιόπιστα αποτελέσματα (Fleming, Dolan 1986, Zaheer, Fleming & Turner 1993, Hinch *et al.* 1998, Ibrahim *et al.* 2001). Οι διαφορές ανάμεσα στους παθότυπους που κατατέθηκαν από τα αποτελέσματα των πιο πάνω μεθόδων κρίνονται ως ανεπαρκείς για αξιόπιστη διαφοροποίηση των παθότυπων (Bakker *et al.*, 1992).

Οι Hinch *et al.* (1998) χρησιμοποίησαν τη μέθοδο της Τριχοειδούς Ηλεκτροφόρισης Υψηλής Απόδοσης (CE), η οποία διαχωρίζει πρωτεΐνες, πεπτίδια, ολιγονουκλεοτίδια και ολιγοσακχαρίτες, για να διαχωρίσουν τους Αυστραλιανούς και τους Ευρωπαϊκούς παθότυπους. Παρόλο που είχαν μερικά θετικά και υποσχόμενα αποτελέσματα, εντούτοις δε μπόρεσαν να προσδιορίσουν τον παθότυπο *G. rostochiensis* Ro3. Τα διαγράμματα των Pa1 και Pa2/3 έδειξαν ομοιότητες στα σημεία (χρόνους) απορρόφησης αλλά διέφεραν στο ύψος των καμπύλων απορρόφησης και επομένως μπόρεσαν να διαχωριστούν. Η μέθοδος αυτή δεν προσφέρεται για γενική χρήση, επειδή απαιτεί μεγάλη ποσότητα πρωτεϊνών, η οποία πρέπει να είναι ισόποση σε όλους τους παθότυπους, καθώς και στις επαναλήψεις του κάθε παθότυπου (Hinch *et al.*, 1998). Παρόμοια μελέτη, που βασίζεται στο διαχωρισμό πρωτεϊνών, έγινε από τους Molinari *et al.* (2010), οι οποίοι χρησιμοποίησαν τη μέθοδο της ισοηλεκτρικής εστίασης (isoelectric focusing, IEF), για να μελετήσουν την

υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), καθώς και εστεράσες και ισομεράσες της 6-φωσφορικής γλυκόζης (GPI). Και σε αυτή την περίπτωση δεν κατέστη εφικτός ο διαχωρισμός όλων των παθότυπων. Μεταξύ των παθότυπων του *G. rostochiensis*, ο Ro1 διαχωρίστηκε ξεκάθαρα από τους Ro2/3 και Ro4/5 αλλά οι Ro2 και Ro4 παρουσίασαν ομοιότητες με τους Ro3 και Ro5, αντίστοιχα.. Καμία διαφοροποίηση δεν ήταν δυνατή ανάμεσα στους παθότυπους του *G. pallida* (Molinari *et al.*, 2010). Τέλος, οι Fox και Atkinson (1985) εξέτασαν 65 διαφορετικά ένζυμα με τη μέθοδο IEF και εντόπισαν αρκετές και σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους παθότυπους. Οι παθότυποι Ro4 και Ro5 διαχωρίστηκαν από τους υπόλοιπους δείχνοντας διαφορετικές ζώνες, ενώ ο Ro3 διέφερε από όλους τους παθότυπους όσον αφορά την ποσότητα της οξειδάσης της γλυκόζης (Fox & Atkinson, 1985). Τα αποτελέσματα των μεθόδων CE (Hinch *et al.*, 1998) και IEF (Molinari *et al.*, 2010), που χρησιμοποιούν ως βάση τις πρωτεΐνες, θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν για την εξεύρεση γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες που εξετάστηκαν στις δύο πιο πάνω μελέτες, με σκοπό τον εντοπισμό διαφορών στις αλληλουχίες των γονιδίων.

Το γεγονός ότι καμία από τις μοριακές και ενζυμικές μεθόδους που προτάθηκαν μέχρι σήμερα, δεν ήταν ικανή να διαχωρίσει όλους του παθότυπους, ίσως να είναι και ο λόγος που δεν υιοθετήθηκαν από τα εργαστήρια που πραγματοποιούν ελέγχους ρουτίνας για τον διαχωρισμό των παθότυπων των ΚΝΠ. Επομένως, παρά τις προσπάθειες εξεύρεσης μιας έγκυρης και γρήγορης εργαστηριακής μεθόδου διαφοροποίησης των παθότυπων των ΚΝΠ, η χρήση διαφορικών ξενιστών παραμένει μέχρι σήμερα ως η μοναδική αποδεκτή μέθοδος διαφοροποίησης τους.

Με βάση την οδηγία της Ευρωπαϊκής Ένωσης 69/465/EEC, ο διαχωρισμός των παθότυπων των ΚΝΠ είναι υποχρεωτικός και αποσκοπεί στην ορθή αξιοποίηση των καλλιεργούμενων και νέων ποικιλιών πατάτας, ανάλογα με τον βαθμό ανθεκτικότητας που παρουσιάζουν στους παθότυπους που επικρατούν σε μια περιοχή. Τυχόν λανθασμένη χρήση των διαθέσιμων ανθεκτικών ποικιλιών ενδέχεται να επιφέρει αρνητικά αποτελέσματα και επιδείνωση του προβλήματος των ΚΝΠ (Turner, 1996; Zaheer *et al.*, 1996a). Με βάση τον παθότυπο που εντοπίζεται σε κάθε αγροτεμάχιο, οι παραγωγοί θα πρέπει να χρησιμοποιούν τις κατάλληλες ποικιλίες που φέρουν ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο παθότυπο, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η αποτελεσματική αντιμετώπιση του προβλήματος των ΚΝΠ και μείωση του μολύσματος που υπάρχει στο έδαφος (Ellenby, 1954; Whitehead *et al.*, 1984; Anonymous, 2006; Scurrah, May 1981).

Παρατεταμένη χρήση της ίδιας ανθεκτικής ποικιλίας, μπορεί να επιφέρει αρνητικά αποτελέσματα σε βάθος χρόνου, αφού υπάρχει ο κίνδυνος ανάπτυξης άλλων παθότυπων που δεν είχαν εντοπιστεί σε αρχικό στάδιο (Zaheer *et al.*, 1993; Turner, 1996). Επομένως, στο πλαίσιο ενός ολοκληρωμένου προγράμματος διαχείρισης των ΚΝΠ, συνιστάται η χρήση των κατάλληλων ανθεκτικών ποικιλιών (ανάλογα με τα είδη και τους παθότυπους που εντοπίστηκαν σε κάθε περιοχή) σε συνδυασμό με χαμηλές δόσεις νηματωδοκτόνων, για αντιμετώπιση παθότυπων που τυχόν δεν ανιχνεύτηκαν λόγω πολύ χαμηλής συγκέντρωσης του μολύσματος τους στο έδαφος.

Επιπλέον, η ταυτοποίηση των παθότυπων θα βοηθήσει στην προσπάθεια παρεμπόδισης της εισόδου και της εξάπλωσης των ΚΝΠ σε περιοχές που είναι είτε αμόλυντες είτε μολυσμένες με ένα μόνο είδος ή παθότυπο. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η παρεμπόδιση μετακίνησης των παθότυπων του είδους *G. pallida*, για τους οποίους δεν υπάρχουν αρκετές ανθεκτικές ποικιλίες με εμπορικό ενδιαφέρον, ώστε να χρησιμοποιηθούν για την αντιμετώπιση τους.

Εν κατακλείδι, ο προσδιορισμός των παθότυπων θα αποτελέσει ισχυρό εργαλείο για την Κυπριακή Δημοκρατία στην προσπάθεια παρεμπόδισης της εισόδου και εξάπλωσης στα εδάφη της, νέων παθότυπων μέσω των εισαγωγών πατατοσπόρου. Αντίθετα, η εξαγωγή των Κυπριακών πατατών δεν θα εμποδίζεται στις χώρες που έχουν τους ίδιους παθότυπους που απαντώνται και στην Κύπρο, με αποτέλεσμα να υπάρχει η δυνατότητα εξαγωγής πατατών σε περισσότερες Ευρωπαϊκές χώρες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Χαρτογράφηση της γεωγραφικής εξάπλωσης των κυστογόνων νηματωδών της πατάτας στην Κύπρο

6.1 Περίληψη

Η χαρτογράφηση της γεωγραφικής εξάπλωσης παθογόνων και εχθρών των φυτών, είναι αναγκαία για τη συνεχή παρακολούθηση της διασποράς τους αλλά και ισχυρό εργαλείο για την αντιμετώπιση τους. Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται και παρουσιάζεται η χαρτογράφηση των ΚΝΠ, αξιοποιώντας τα αποτελέσματα των μελετών ταυτοποίησης των ειδών και των παθότυπων τους. Τα αποτελέσματα ενσωματώθηκαν σε ένα Σύστημα Γεωγραφικών Πληροφοριών (ArcGIS), το οποίο συνδυάζει δορυφορικές εικόνες και γεωγραφικούς χάρτες που επιτρέπουν την αποθήκευση, ανάκληση και γεωγραφική ανάλυση βιολογικών δεδομένων, όπως τα είδη και οι παθότυποι των ΚΝΠ. Η ψηφιακή χαρτογράφηση των ΚΝΠ βοηθά στην καλύτερη απεικόνιση της έκτασης και της γεωγραφικής κατανομής τους στην Κύπρο, στην εκτίμηση του κινδύνου εξάπλωσης τους και συνεπώς στην πρόβλεψη/πρόγνωση νέων προσβολών και στη διαχείριση των υφιστάμενων. Όλα τα παραπάνω, μπορούν να ενταχθούν σε ένα νέο εργαλείο της σύγχρονης γεωργίας που καλείται Γεωργία Ακριβείας (Precision Agriculture). Ταυτόχρονα, όλες αυτές οι πληροφορίες και εργαλεία μπορούν να βοηθήσουν στην οικοδόμηση Συστημάτων Λήψης Αποφάσεων (Decision Support Systems), μέσω των οποίων θα είναι εφικτή η ορθολογική διαχείριση των ΚΝΠ, αφού θα παρέχουν στους επαγγελματίες (γεωπόνους & παραγωγούς) τις απαραίτητες πληροφορίες για τη σωστή, έγκυρη και έγκαιρη λήψη αποφάσεων.

6.2 Εισαγωγή

Η μετακίνηση των κυστογόνων νηματωδών της πατάτας (ΚΝΠ) επιτυγχάνεται με διάφορους τρόπους, μέσω του εδάφους, του νερού, του αέρα και της αυτόνομης μετακίνησης των προνυμφών 2^{ου} σταδίου (J2). Η αυτόνομη μετακίνηση των J2 πραγματοποιείται μόνο στην παρουσία του φυτού ξενιστή και εκτείνεται μόνο μερικά εκατοστά (Whitehead, 1992). Η εξάπλωση των ΚΝΠ σε μεγάλες αποστάσεις οφείλεται κυρίως στον ανθρώπινο παράγοντα. Μέσω της εμπορίας κονδύλων πατάτας, οι ΚΝΠ με τη μορφή κύστεων, μετακινήθηκαν σχεδόν σε ολόκληρο τον πλανήτη (Evans & Stone, 1977). Η μετακίνηση των ΚΝΠ από τεμάχιο σε τεμάχιο και από περιοχή σε περιοχή, γίνεται κυρίως με τη μεταφορά εδάφους μέσω των γεωργικών ελκυστήρων και των παρελκόμενων.

Σύμφωνα με την οδηγία της Ε.Ε (2007/33/EC), απαγορεύεται η μετακίνηση πατατοσπόρου και εδάφους από περιοχές μολυσμένες με ΚΝΠ. Στην Κύπρο, η εφαρμογή της οδηγίας προωθείται από τις υπηρεσίες του Κράτους, αντιμετωπίζοντας αρκετά προβλήματα και δυσκολίες. Η άγνοια των παραγωγών για την ύπαρξη των ΚΝΠ, αλλά και των προβλημάτων που θα επιφέρει η τυχόν εγκατάστασή τους σε ένα αμόλυντο τεμάχιο, είναι παράγοντες που βοηθούν στην εξάπλωση των παθογόνων. Επιπλέον, ο πολυτεμαχισμός του γεωργικού κλήρου ενισχύει τη γρήγορη εξάπλωση των ΚΝΠ, αφού η καλλιέργεια του κάθε παραγωγού δεν είναι μεμονωμένη σε μια περιοχή, αλλά εκτείνεται σε πολλά και μικρά τεμάχια τα οποία πολλές φορές είναι αρκετά απομακρυσμένα το ένα από το άλλο.

Για την αποτροπή της μετακίνησης των ΚΝΠ από μολυσμένες περιοχές σε αμόλυντες, κρίνεται αναγκαία η χαρτογράφηση των μολυσμένων τεμαχίων, καταχωρώντας επί του χάρτη αναγκαίες πληροφορίες, όπως η ταυτότητα των ειδών και των παθότυπων που αναπτύσσονται σε αυτά. Η δυνατότητα αυτή προσφέρεται από τα Γεωγραφικά Συστήματα Πληροφοριών (Geographical Information Systems, GIS), τα οποία έχουν ευρεία εφαρμογή στη γεωργία, τόσο για σκοπούς παρακολούθησης της παραγωγής όσο και για σκοπούς φυτοπροστασίας (Goddard *et al.*, 1996; Ellsbury *et al.*, 2000; Schröder, 2006). Το GIS είναι σύστημα διαχείρισης χωρικών δεδομένων, στο οποίο μπορούν να ενσωματωθούν, αναλυθούν και αποθηκευτούν πρόσθετες περιγραφικές πληροφορίες, σε σχέση με τη γεωγραφική τους θέση. Σε ένα σύστημα GIS μπορούν να καταχωρηθούν όλες οι πληροφορίες που αφορούν μια γεωργική εκμετάλλευση ή μια καλλιέργεια που είναι εγκατεστημένη σε μια ευρύτερη περιοχή ή ακόμα και σε ολόκληρη τη χώρα. Οι

καταχωρημένες πληροφορίες μπορούν να αποδοθούν με αναλογικά ή ψηφιακά μέσα, όπως απεικόνιση σε έντυπους και ηλεκτρονικούς χάρτες, ώστε να αποτελέσουν ένα συνδυασμό χωρικών (κτηματολογικός χάρτης) και περιγραφικών δεδομένων (καταχωρημένες πληροφορίες, πχ. ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των ΚΝΠ).

Στην Κύπρο, η τεχνολογία GIS έχει πολλές δυνατότητες εφαρμογής κυρίως στην παρακολούθηση των υδατοφραγμάτων και στον έλεγχο ανάπτυξης των άλγεων σε αυτά (Hadjimitsis *et al.*, 2007), στην παρακολούθηση της διαπνοής των φυτών σε φυτά μεγάλης καλλιέργειας μέσω των συστημάτων τηλεπισκόπησης (Papa David *et al.*, 2011), καθώς και στον εντοπισμό υπεδάφινων αρχαιολογικών καταλοίπων, χρησιμοποιώντας δορυφορικές εικόνες σε συνδυασμό με την παρατήρηση του φαινολογικού κύκλου των σιτηρών, *Hordeum vulgare* (Agariou *et al.*, 2012). Το GIS αποτελεί ένα πολύ ισχυρό εργαλείο, το οποίο βοηθά μηχανικούς και επιστήμονες διαφόρων ειδικοτήτων στη λήψη αποφάσεων, αφού εξομοιώνει διάφορα σενάρια και τα αποτελέσματά τους. Με τη βοήθεια του GIS μπορούμε να μετρήσουμε αποστάσεις, εμβαδόν επιφάνειας αλλά και να προσδιορίσουμε το ακριβές στίγμα οποιουδήποτε σημείου πάνω στη γη και με αυτό τον τρόπο να έχουμε ένα πλήρες αρχείο για τις περιοχές που μας ενδιαφέρουν (ESRI, 2012).

Στη βάση δεδομένων του GIS μπορεί να έχουμε υφιστάμενους χάρτες, δορυφορικές εικόνες και αεροφωτογραφίες, καθώς και άλλα επικουρικά στοιχεία. Στην ίδια βάση μπορεί να ενσωματωθούν και νέα δεδομένα, τα οποία προκύπτουν από την πορεία εργασιών. Τα αποτελέσματα τα οποία προκύπτουν από τη σύνθεση των δεδομένων θα οδηγήσουν στη δημιουργία νέων χαρτών και πληροφοριών (Zieler & Zeiler, 2000).

Η εισαγωγή παθογόνων και εχθρών καραντίνας στην Κύπρο έχει σοβαρές κοινωνικό-οικονομικές και περιβαλλοντικές επιπτώσεις, λόγω των απωλειών στην αγροτική παραγωγή, του αυξανόμενου κόστους καταπολέμησης τους, αλλά και της επιβάρυνσης του περιβάλλοντος εξαιτίας της υπερβολικής χρήσης χημικών φυτοφαρμάκων για την αντιμετώπιση τους. Επομένως, η παρακολούθηση των παθογόνων και των εχθρών των φυτών με κατάλληλα συστήματα παρακολούθησης είναι επιβεβλημένη, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις παθογόνων/εχθρών καραντίνας των οποίων η πλήρης εξάλειψη είναι αδύνατη και η μόνη εφικτή λύση είναι ο περιορισμός τους. Ο περιορισμός είναι εφικτός, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις όπου η μετακίνηση του παθογόνου/εχθρού γίνεται με τη συμβολή του ανθρώπου. Κλασικό παράδειγμα τέτοιας μετακίνησης αποτελούν τα εδαφογενή παθογόνα, όπως οι κυστογόνοι νηματώδεις.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η χαρτογράφηση των ΚΝΠ, χρησιμοποιώντας το σύστημα ArcGIS (ESRI, 2012) και εισάγοντας στο σύστημα αυτό, αφενός μεν τη βάση δεδομένων που περιλαμβάνει τα κτηματολογικά σχέδια (αριθμός τεμαχίου και φύλλο / σχέδιο), αφετέρου δε τα βιολογικά δεδομένα που προέκυψαν από τα κεφάλαια 2, 4 και 5, αναφορικά με την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των ειδών των ΚΝΠ και το διαχωρισμό των παθότυπων τους. Ένα τέτοιο σύστημα θα έχει τη δυνατότητα δημιουργίας θεματικών χαρτών για όλες τις ομάδες αποτελεσμάτων αυτής της εργασίας. Ειδικότερα, θα υπάρχει δυνατότητα να καταγράφονται οι επίσημα δηλωμένες πατατοφυτείες και οι ποικιλίες τους, το γεωγραφικό στίγμα των σημείων δειγματοληψίας εδάφους, καθώς και τα αποτελέσματα ανίχνευσης και ταυτοποίησης των ειδών και των παθότυπων των ΚΝΠ. Τα αποτελέσματα θα μπορούν να απεικονίζονται σε διάφορα επίπεδα ή συνδυασμούς θεματικών επιπέδων, όπως απεικόνιση: α) του είδους *Globodera rostochiensis*, β) του είδους *G. pallida*, γ) μεικτών πληθυσμών των δύο ειδών, δ) των παθότυπων και των διαφόρων συνδυασμών τους, κ.α.

Στόχος είναι όπως το τελικό προϊόν αποτελείται από ψηφιακούς χάρτες στους οποίους θα μπορούν να έχουν πρόσβαση τόσο το επιστημονικό και τεχνικό προσωπικό των κρατικών υπηρεσιών (Υπουργείο Γεωργίας, Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος) όσο και οι πατατοπαραγωγοί, μέσω ιστοσελίδας που θα δημιουργηθεί για τη σωστή και έγκαιρη πληροφόρηση τους.

6.3 Υλικά και μέθοδοι

6.3.1 Εξασφάλιση χωρικών δεδομένων της περιοχής ενδιαφέροντος

Τα χωρικά δεδομένα (αριθμός τεμαχίου και φύλλο σχέδιο) των αγροτεμαχίων που καλλιεργήθηκαν με πατάτες, από το 2003 μέχρι το 2010, εξασφαλίστηκαν από τον Οργανισμό Γεωργικής Ασφάλισης (ΟΓΑ) ενώ τα χωρικά δεδομένα των αγροτεμαχίων που ήταν μολυσμένα με ΚΝΠ εξασφαλίστηκαν από το Τμήμα Γεωργίας. Τα κτηματολογικά δεδομένα που θα αποτελέσουν τη βάση δεδομένων, δόθηκαν από το Σύστημα Πληροφοριών Γης (ΣΠΓ) του Τμήματος Κτηματολογίου και Χωρομετρίας. Για τη χαρτογράφηση της γεωγραφικής κατανομής των ΚΝΠ χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα ArcGIS (ESRI, 2012).

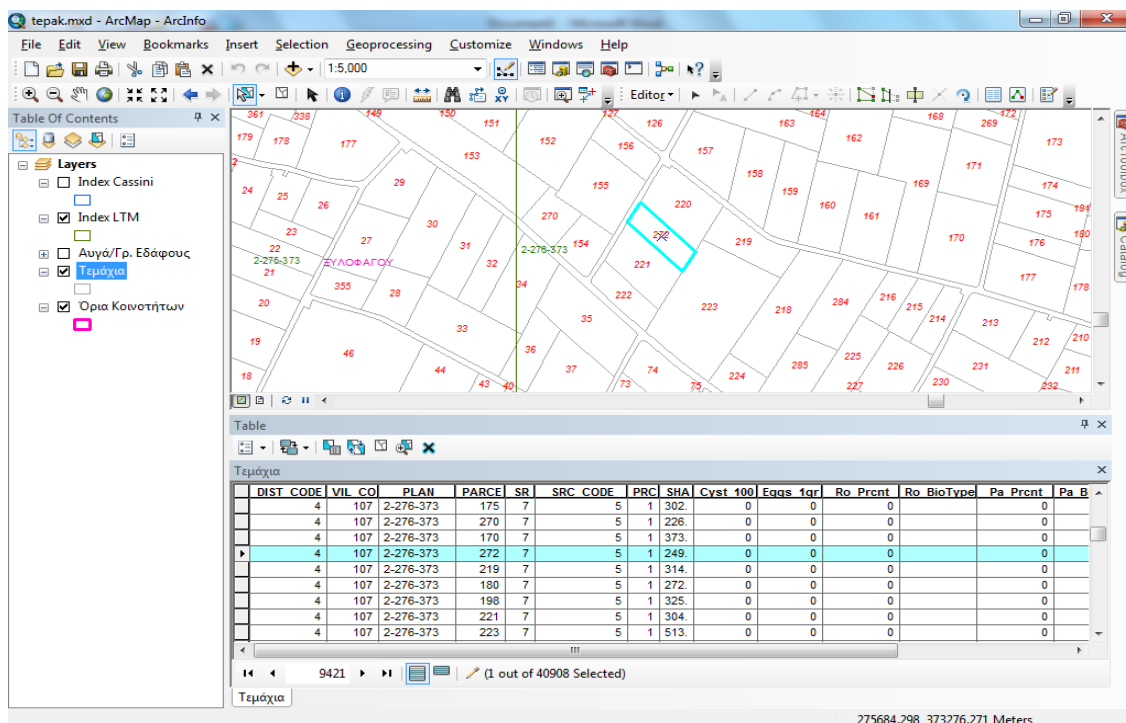
6.3.2 Δημιουργία γεωγραφικής βάσης δεδομένων ArcGIS

Στη γεωγραφική βάση δεδομένων του ArcGIS εισήχθηκαν τα κτηματολογικά δεδομένα των περιοχών που καλλιεργούνται με πατάτες. Ακολούθως, δημιουργήθηκαν επιπρόσθετα πεδία που δεν συμπεριλαμβάνονταν στα χωρικά δεδομένα όπως: i) είδη των ΚΝΠ, ii) αριθμός κύστεων ανά 100 γραμμάρια εδάφους, iii) αριθμός αυγών ανά γραμμάριο εδάφους, iv) παρουσία των ειδών επί τις εκατό και v) ταυτότητα παθότυπων. Στη συνέχεια εντοπίστηκαν σχέδια πεδίου (κτηματολογικοί χάρτες με πολύγωνα) για τον εντοπισμό των τεμαχίων που επιλέγηκαν για τις δειγματοληψίες εδάφους (Χάρτης 5).

6.3.3 Καταχώριση δεδομένων ταυτοποίησης των ειδών και των παθότυπων των ΚΝΠ στη γεωγραφική βάση δεδομένων ArcGIS

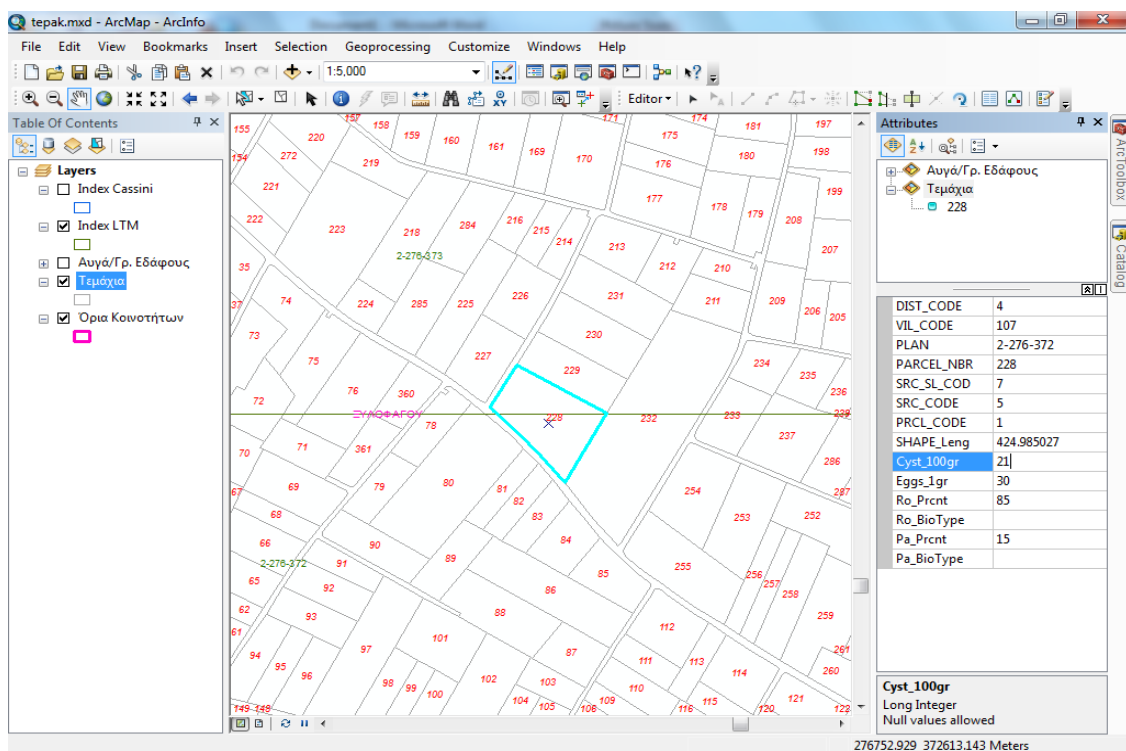
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των ειδών και το διαχωρισμό των παθότυπων των ΚΝΠ, εισήχθηκαν στη γεωγραφική βάση δεδομένων που δημιουργήθηκε στο σύστημα ArcGIS, ως μη χωρικά δεδομένα. Τα μη χωρικά δεδομένα εισήχθηκαν στα πεδία που κατασκευάστηκαν (βλ. 6.3.2) για το κάθε τεμάχιο χωριστά (Χάρτης 6). Η ταυτότητα και η ποσοστιαία αναλογία του κάθε είδους καταγράφονταν στα πεδία Ro_Prcnt και Pa_Prcnt για τον *G. rostochiensis* και *G. pallida*, αντίστοιχα. Η ταυτότητα των παθότυπων καταγραφόταν στα πεδία Ro_BioType και Pa_BioType για τον *G. rostochiensis* και *G. pallida*, αντίστοιχα. Οι αριθμοί των κύστεων και των αυγών καταγράφονταν στα πεδία Cyst_100gr και Eggs_1gr, αντίστοιχα.

Κεφάλαιο 6: Χαρτογράφηση και γεωγραφική διασπορά των ΚΝΠ



Χάρτης 5. Εισαγωγή χωρικών και μη χωρικών δεδομένων στο σύστημα ArcGIS για τη δημιουργία βάσης δεδομένων (γεωβάση).

Στη γεωβάση εισήχθησαν τα χωρικά δεδομένα φύλλο/σχέδιο και αριθμός τεμαχίου καθώς και τα επιπρόσθετα πεδία: ii) αριθμός κύστεων ανά 100 γραμμάρια εδάφους, iii) αριθμός αυγών ανά γραμμάριο εδάφους, iv) παρουσία των ειδών επί τις εκατό και v) ταυτότητα παθότυπων.

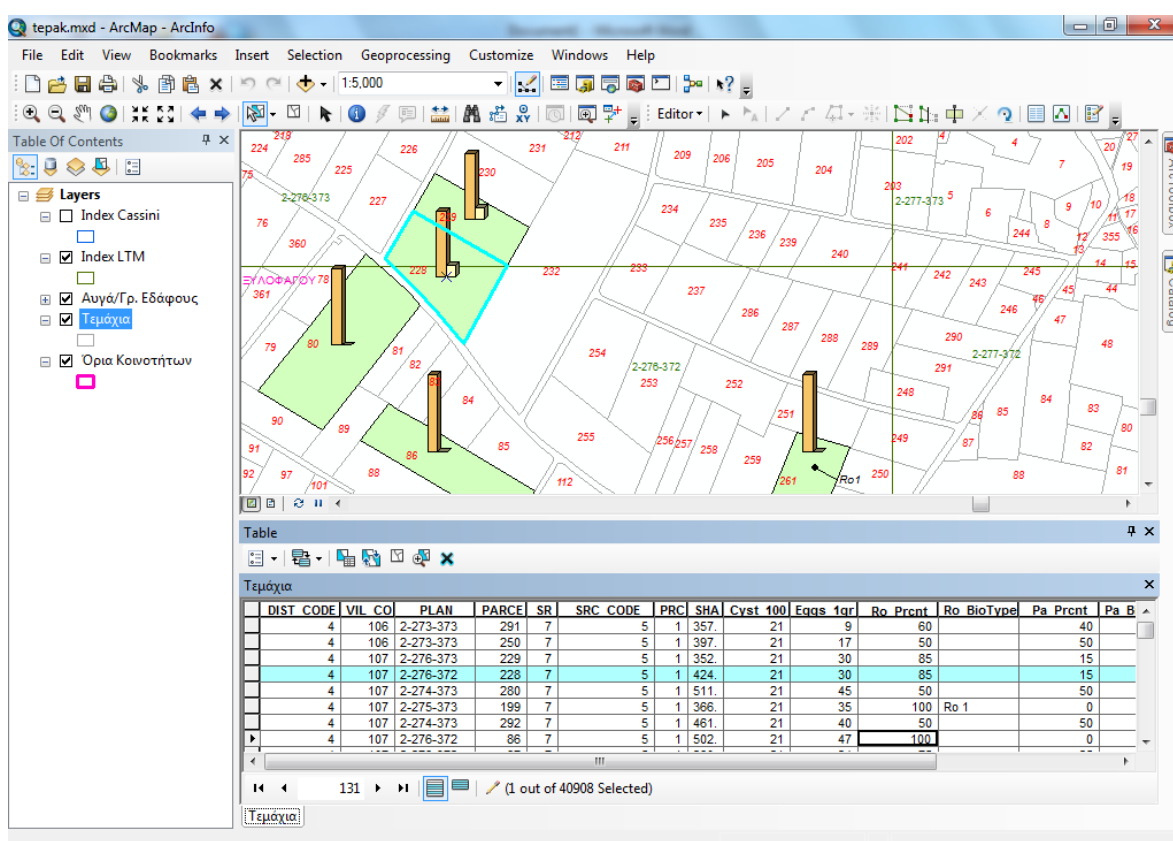


Χάρτης 6. Καταχώριση των μη χωρικών δεδομένων στα πεδία της γεωβάσης του ArcGIS.

Στον πίνακα δεξιά (Attributes) απεικονίζεται η προσθήκη των μη χωρικών δεδομένων (ταυτότητα είδους, ταυτότητα παθότυπου και ποσότητες κύστεων και αυγών), στο τεμάχιο 229, το οποίο εντοπίζεται στο ψηφιακό χάρτη με το γαλάζιο πολύγωνο.

6.3.4 Απεικόνιση δεδομένων ταυτοποίησης των ειδών και των παθότυπων των ΚΝΠ σε θεματικούς χάρτες

Τα μη χωρικά δεδομένα (αποτελέσματα της παρούσας εργασίας) που καταχωρήθηκαν στα πεδία της γεωγραφικής βάσης του συστήματος ArcGIS απεικονίζονται πάνω στα χωρικά δεδομένα (πολύγωνα τεμαχίων), δίνοντας τις πληροφορίες για το κάθε τεμάχιο χωριστά πάνω στον χάρτη. Τα πολύγωνα με πράσινο χρώμα αποτελούν τα μολυσμένα με ΚΝΠ τεμάχια. Στο κέντρο των πολυγώνων παρουσιάζονται με στήλες τα ποσοστά παρουσίας των δύο ειδών ΚΝΠ, *G. rostochiensis* (κίτρινο χρώμα) και *G. pallida* (μπεζ). Με την ένδειξη RoN και PaN (όπου N ο αριθμός του παθότυπου), απεικονίζονται οι παθότυποι των *G. rostochiensis* και *G. pallida*, αντίστοιχα (Χάρτης 7).



Χάρτης 7. Απεικόνιση των περιγραφικών δεδομένων σε θεματικούς χάρτες.

Πολύγωνα με πράσινο χρώμα = τεμάχια μολυσμένα με ΚΝΠ. Στήλες με κίτρινο και μπεζ χρώμα = ποσοστιαία παρουσία του *G. rostochiensis* και *G. pallida*, αντίστοιχα. RoN και PaN* = οι παθότυποι των *G. rostochiensis* και *G. pallida*, αντίστοιχα.

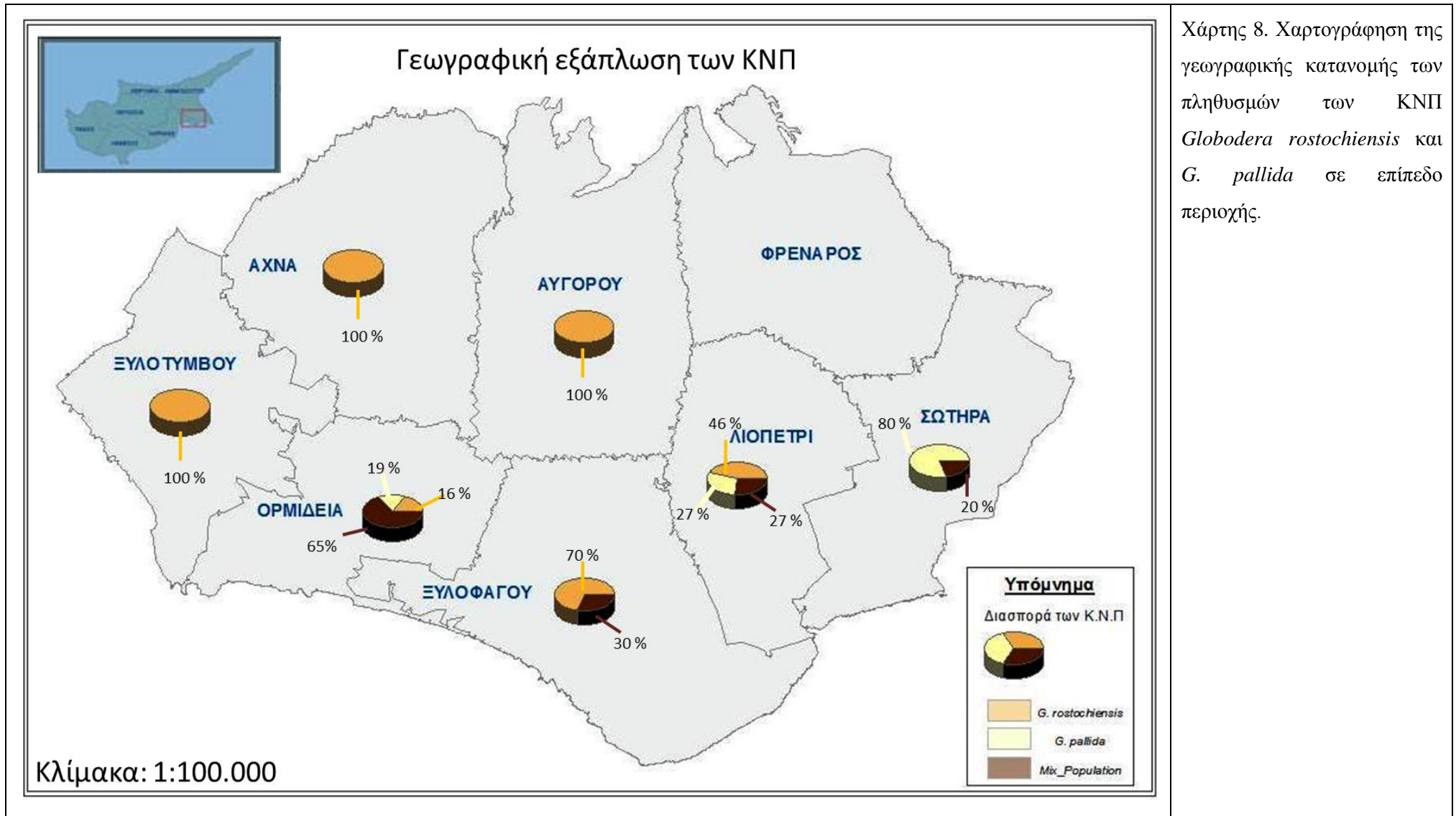
*N ο αριθμός του παθότυπου

6.4 Αποτελέσματα

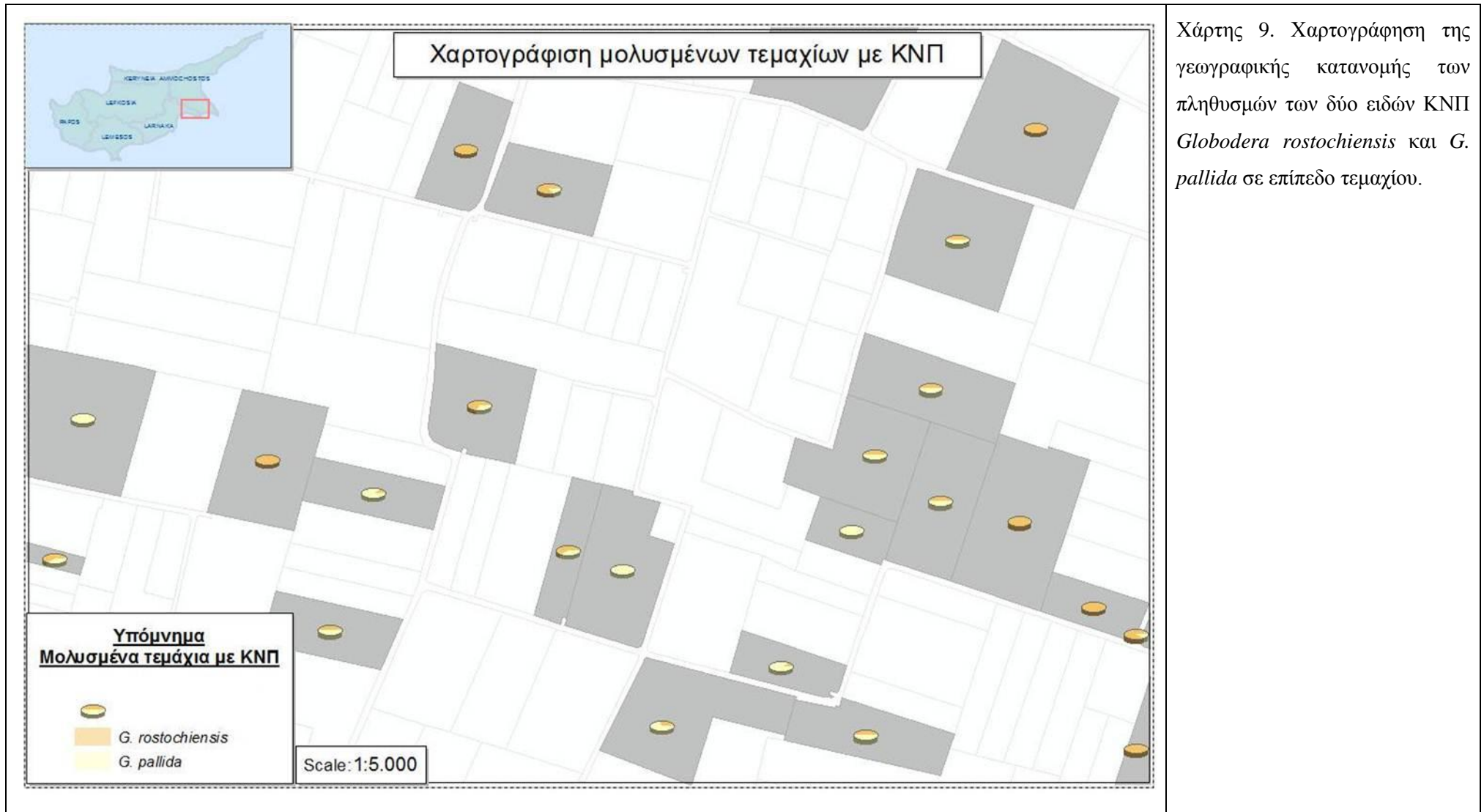
6.4.1 Χαρτογράφηση της γεωγραφικής κατανομής των ΚΝΠ σε ψηφιακούς χάρτες

Η χαρτογράφηση της γεωγραφικής κατανομής των ΚΝΠ με τη χρήση συστημάτων GIS, πραγματοποιήθηκε με την εισαγωγή των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τα κεφάλαια 2, 4 και 5 στο σύστημα ArcGIS με σκοπό: α) την προβολή της πληθυσμιακής κατανομής των ΚΝΠ σε επίπεδο περιοχής (Χάρτης 8), β) την προβολή της πληθυσμιακής κατανομής των ΚΝΠ σε επίπεδο τεμαχίου (Χάρτης 9) και γ) την ποσοστιαία κατανομή των δύο ειδών των ΚΝΠ σε επίπεδο τεμαχίου (Χάρτες 10 και 11). Τέλος, στο Χάρτη 12, παρουσιάζεται η ποσοστιαία κατανομή τόσο των ειδών όσο και των παθότυπων των ΚΝΠ σε επίπεδο τεμαχίου.

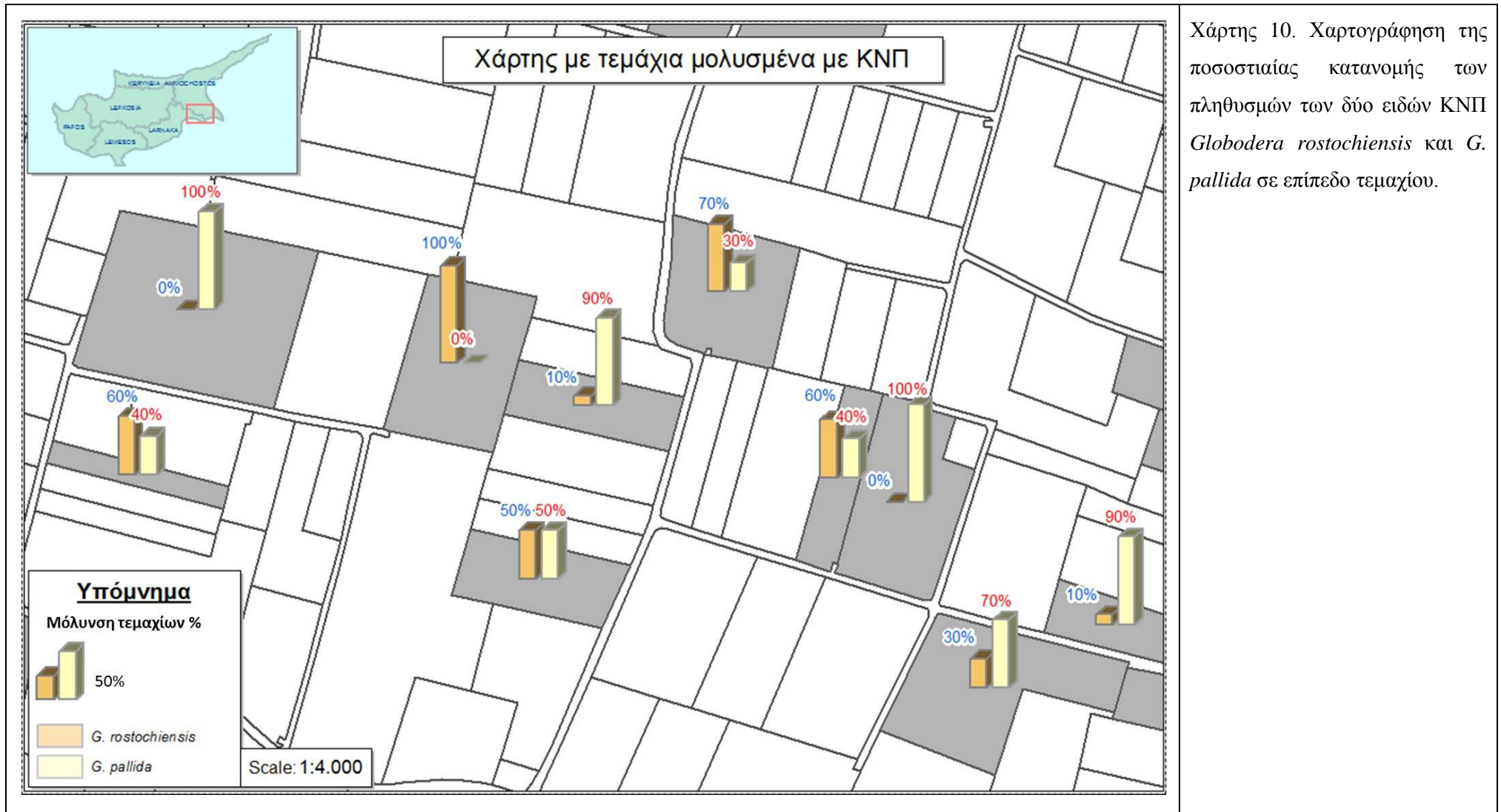
Οι ψηφιακοί χάρτες παρουσιάζονται υπό τη μορφή πολυγώνων, μέσα στα οποία περιγράφονται με αριθμούς ή με σχήματα τα βιολογικά δεδομένα – αποτελέσματα της παρούσας εργασίας. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα τεμάχια στα οποία έγιναν δειγματοληψίες. Τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης των ειδών παρουσιάζονται στους ψηφιακούς χάρτες με χρώμα κίτρινο και μπλε για τον *G. rostochiensis* και τον *G. pallida*, αντίστοιχα, ενώ οι ανάμεικτοι πληθυσμοί παρουσιάζονται με καφέ χρώμα. Οι παθότυποι παρουσιάζονται με τους χαρακτήρες Ro και Pa για τον *G. rostochiensis* και τον *G. pallida*, αντίστοιχα. Ο αριθμός των κύστεων και των αυγών παρουσιάζεται με αριθμούς μέσα στο πολύγωνο. Το ύψος των στηλών δείχνει το ποσοστό εμφάνισης του κάθε είδους στο αντίστοιχο τεμάχιο. Τα δεδομένα στους ψηφιακούς χάρτες απεικονίζονται και σε δορυφορικές εικόνες, δείχνοντας έτσι τα αποτελέσματα σε πραγματική εικόνα.



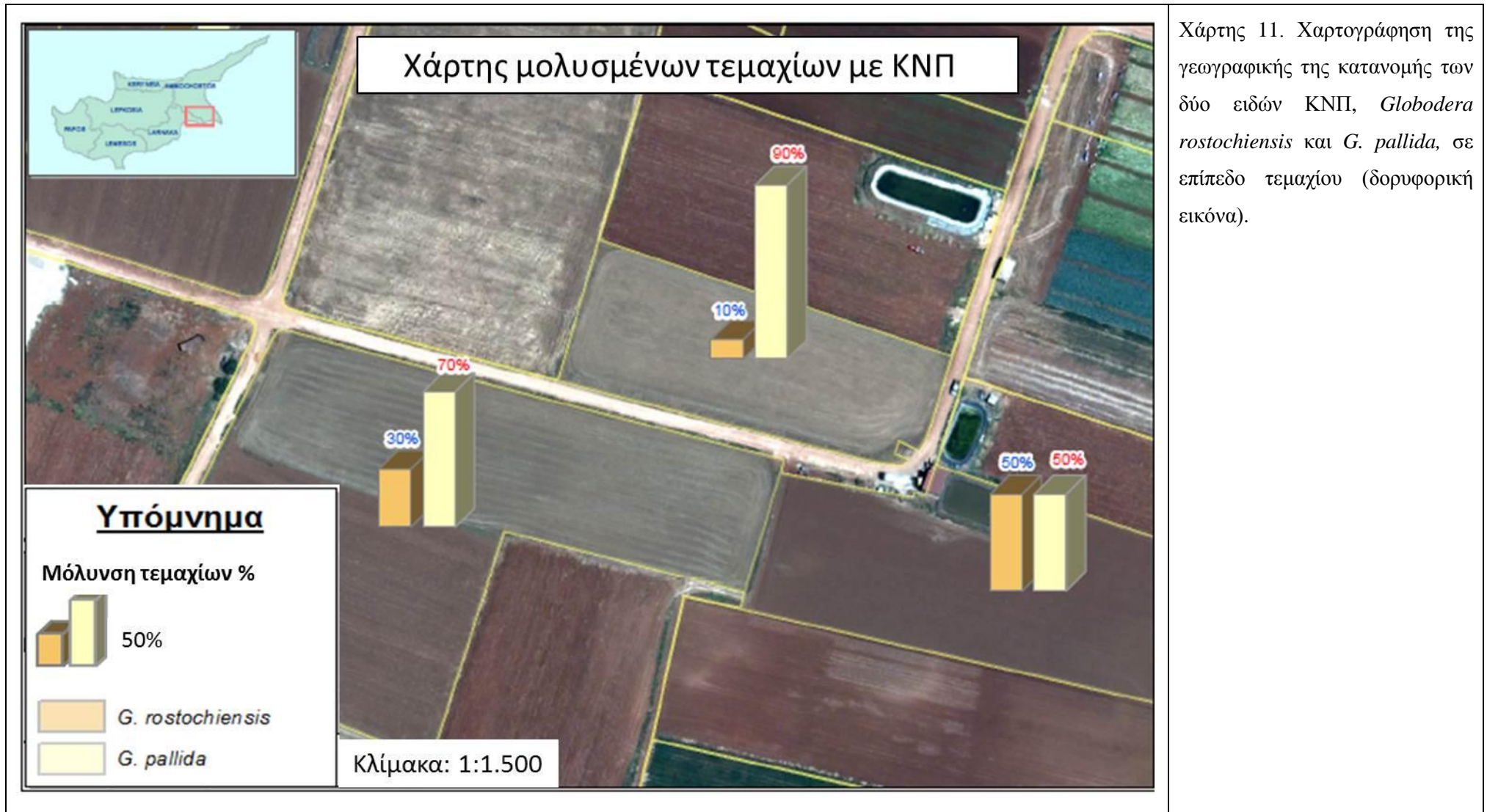
Χάρτης 8. Χαρτογράφηση της γεωγραφικής κατανομής των πληθυσμών των ΚΝΠ *Globodera rostochiensis* και *G. pallida* σε επίπεδο περιοχής.

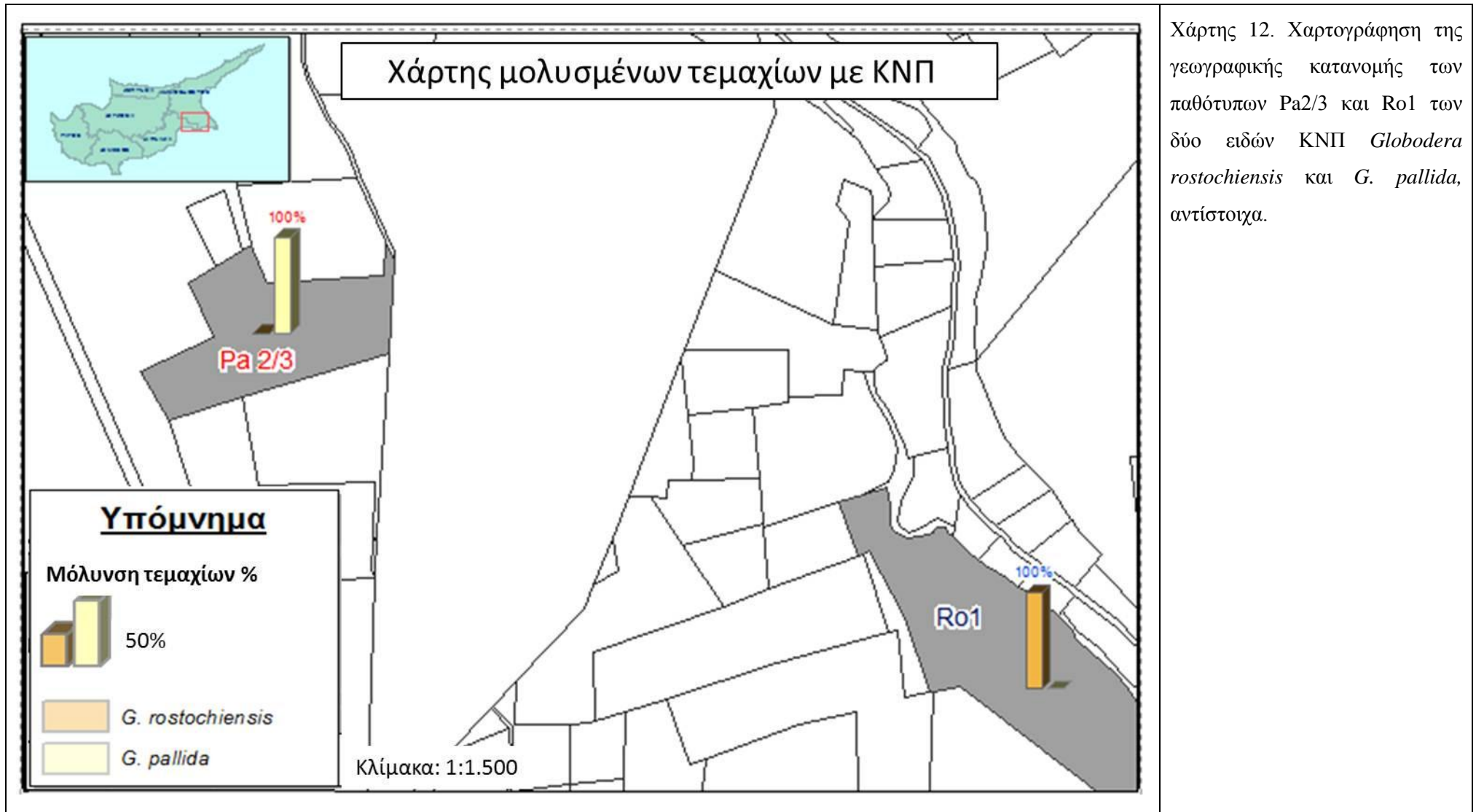


Χάρτης 9. Χαρτογράφηση της γεωγραφικής κατανομής των πληθυσμών των δύο ειδών ΚΝΠ *Globodera rostochiensis* και *G. pallida* σε επίπεδο τεμαχίου.



Χάρτης 10. Χαρτογράφηση της ποσοστιαίας κατανομής των πληθυσμών των δύο ειδών ΚΝΠ *Globodera rostochiensis* και *G. pallida* σε επίπεδο τεμαχίου.





6.5 Συζήτηση

Η χρήση των Συστημάτων Γεωγραφικών Πληροφοριών (GIS) αποδείχθηκε ισχυρό εργαλείο για τη γρήγορη και εύστοχη χαρτογράφηση της γεωγραφικής εξάπλωσης των ΚΝΠ. Η απλοποίηση των συστημάτων GIS επιτρέπει σε μη εξειδικευμένους χρήστες, τη δημιουργία νέων πεδίων στο λογισμικό πρόγραμμα, όπου μπορούν να καταχωρήσουν πληροφορίες και δεδομένα που αφορούν ένα συγκεκριμένο πεδίο (τεμάχιο). Τα δεδομένα που εισάγονται στο σύστημα GIS μπορούν να αναλυθούν, να αποθηκευτούν και να απεικονιστούν σε ψηφιακούς χάρτες, δίνοντας έτσι τις απαραίτητες πληροφορίες σε ένα γεωγραφικό υπόβαθρο.

Η εργασία που παρουσιάζεται στο κεφάλαιο αυτό, κατέδειξε ότι η εξάπλωση και η διασπορά των ειδών και των παθότυπων των ΚΝΠ μπορεί να χαρτογραφηθεί, δίνοντας χρήσιμες πληροφορίες και δεδομένα σε επίπεδο αγροτεμαχίου. Η παρουσίαση των δεδομένων μπορεί να προβληθεί με διάφορους τρόπους, έτσι ώστε να είναι χρήσιμες και κατανοητές οι πληροφορίες προς τους άμεσα ενδιαφερόμενους φορείς. Το αρχείο που δημιουργήθηκε στο σύστημα ArcGIS σε αυτή την εργασία, πληροφορεί τους αναγνώστες μέσω χαρτογραφικής απεικόνισης, για την πληθυσμιακή κατανομή των ΚΝΠ και την ποσοστιαία κατανομή και παρουσία των ειδών και των παθότυπων, σε επίπεδο περιοχής και αγροτεμαχίων

Το σύστημα ArcGIS είναι σε θέση να δεχτεί πληροφορίες και δεδομένα για άλλους εχθρούς και ασθένειες της πατάτας ή οποιασδήποτε άλλης καλλιέργειας, καθώς και πληροφορίες που αφορούν το ιστορικό του υπό εξέταση τεμαχίου. Αυτή η δυνατότητα δίνει την ευχέρεια στο χρήστη να έχει μια ολοκληρωμένη εικόνα του ιστορικού ενός τεμαχίου και έτσι διευκολύνεται η αντιμετώπιση διαφόρων προβλημάτων φυτοπροστασίας και ανάπτυξης φυτών.

Επιπλέον, η δημοσιοποίηση της ψηφιακής χαρτογράφησης των ΚΝΠ θα βοηθήσει τους γεωπόνους και τους συμβούλους φυτοπροστασίας να ενημερώνουν τους πατατοπαραγωγούς ως προς την ενδεικνυόμενη επιλογή ανθεκτικών ποικιλιών αλλά και την ενδεικνυόμενη ποσότητα των χημικών νηματοδοκτόνων που συνιστάται να εφαρμόσουν, όπου και όταν χρειάζεται. Επιπρόσθετα, οι πατατοπαραγωγοί θα είναι σε θέση να γνωρίζουν τις μολυσμένες περιοχές και έτσι να λαμβάνουν τα απαραίτητα μέτρα για να παρεμποδίζουν την εξάπλωση των ΚΝΠ σε αμόλυντες περιοχές. Τέλος, η χαρτογράφηση της γεωγραφικής εξάπλωσης των ΚΝΠ θα βοηθήσει στην αύξηση των

Κεφάλαιο 6: Χαρτογράφηση και γεωγραφική διασπορά των ΚΝΠ
εξαγωγών των πατατών, κυρίως προς τις Σκανδιναβικές χώρες, οι οποίες δεν επιτρέπουν
την εισαγωγή πατατών από περιοχές μολυσμένες με ΚΝΠ. Η οριοθέτηση των μολυσμένων
περιοχών σε επίπεδο τεμαχίου θα επιτρέψει την εμπορία πατατών που προέρχονται από
αμόλυντα τεμάχια αλλά βρίσκονται εντός μιας μολυσμένης περιοχής.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Γενική συζήτηση και συμπεράσματα

Η πατάτα αποτελεί σημαντική καλλιέργεια για περισσότερες από 100 χώρες παγκοσμίως, μεταξύ των οποίων και η Κύπρος (FAOSTAT, 2012). Είναι κατά παράδοση η κύρια καλλιέργεια του νησιού και το μεγαλύτερο ποσοστό της παραγωγής εξάγεται κάθε χρόνο σε χώρες-μέλη της Ε.Ε. ή σε τρίτες χώρες. Η αυξημένη ζήτηση της κυπριακής πατάτας από χώρες της Ε.Ε. και οι κλιματικές συνθήκες της Κύπρου, οι οποίες επιτρέπουν την καλλιέργεια της πατάτας δύο φορές το χρόνο, οδήγησαν στη ραγδαία επέκταση και εντατικοποίηση της καλλιέργειας, καταλαμβάνοντας μεγάλες εκτάσεις γης κυρίως στην περιοχή των Κοκκινοχωριών (Λάρνακα και Αμμόχωστο) καθώς και στην επαρχία Λευκωσίας (Χάρτης 13). Η επέκταση και εντατικοποίηση της πατατοκαλλιέργειας απέφερε πολλά οικονομικά οφέλη στους πατατοπαραγωγούς, αλλά συνάμα συνέβαλε και στην εμφάνιση πολλών και σοβαρών φυτοπαθολογικών και εδαφολογικών προβλημάτων.



Χάρτης 13. Δορυφορικός χάρτης της Κύπρου © Google Earth όπου απεικονίζονται οι κύριες περιοχές καλλιέργειας πατατών

1. Δυτική Λευκωσία, 2. Κοκκινοχώρια, 3. Περιοχή Κιτίου, 4. Ακρωτήρι-Κολόσσι, 5. Αχέλεια και
6. Περιοχή Πιτσιλιάς.

Ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα που αντιμετωπίζει σήμερα η κυπριακή πατατοκαλλιέργεια, είναι το μεγάλο ποσοστό μολυσμένων εδαφών από τους κυστογόνους νηματώδεις της πατάτας (ΚΝΠ), *Globodera rostochiensis* και *G. pallida*. Οι ΚΝΠ προκαλούν σημαντικές απώλειες τόσο στην παραγωγή όσο και στην εμπορία των κονδύλων και κατατάσσονται στους εχθρούς φυτοκαραντίνας από όλες τις χώρες της Ε.Ε. Οι ΚΝΠ, αποτέλεσαν αντικείμενο έρευνας στην Κύπρο από το 1971, οπότε και ανιχνεύτηκαν για πρώτη φορά τα δύο είδη και ταυτοποιήθηκαν με μορφολογικές μεθόδους (Morris, 1971), μέχρι και το 1996, οπότε διαχωρίστηκαν για πρώτη φορά οι παθότυποι σε μια σημαντική πατατοπαραγωγική περιοχή (Ξυλοφάγου) καθώς και στην ορεινή περιοχή του Τροόδους (Zaheer *et al.*, 1996b). Έκτοτε, δεν υπάρχουν οποιαδήποτε στοιχεία ταυτοποίησης ή ποσοτικοποίησης των ειδών και των παθότυπων στην Κύπρο.

Στην παρούσα εργασία έγινε μια ολοκληρωμένη μελέτη των κυπριακών πληθυσμών των ΚΝΠ, στις σημαντικότερες περιοχές καλλιέργειας της πατάτας. Αρχικά, ανιχνεύτηκαν και ταυτοποιήθηκαν τα δύο είδη των ΚΝΠ, τόσο με μορφολογικές όσο και με μοριακές μεθόδους, και ακολούθως διαχωρίστηκαν οι παθότυποι με τη μέθοδο της τεχνητής μόλυνσης διαφορετικών ξενιστών του γένους *Solanum*. Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν, εισήχθησαν σε σύστημα γεωπληροφορικής, δημιουργώντας ηλεκτρονική βάση δεδομένων, μέσω της οποίας κατασκευάστηκαν ηλεκτρονικοί χάρτες που παρουσιάζουν τη γεωγραφική εξάπλωση και διασπορά των ΚΝΠ στις μολυσμένες περιοχές.

Μια από τις καινοτομίες της παρούσας μελέτης έγκειται στην ταυτοποίηση των δύο ειδών ΚΝΠ με την τεχνολογία Taqman. Συγκεκριμένα, σχεδιάστηκαν εξειδικευμένοι εκκινητές και Taqman ανιχνευτές στην ITS περιοχή του γονιδιακού DNA και συγκρίθηκαν με αντίστοιχους που έχουν δημοσιευτεί τα τελευταία δύο χρόνια. Επιλέγοντας τους καλύτερους εκκινητές και ανιχνευτές, πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά στην Κύπρο, μοριακή ταυτοποίηση των ΚΝΠ αλλά και ποσοτικοποίηση των εγκυστωμένων αυγών και προνυμφών 2^{ου} σταδίου με qPCR. Μια άλλη σημαντική καινοτομία είναι ότι ποσοτικοποιήθηκε, για πρώτη φορά παγκοσμίως, ο αριθμός των ζωντανών εγκυστωμένων αυγών, χρησιμοποιώντας τη φωτοευαίσθητη χρωστική Propidium Monoazide (PMA) σε αντιδράσεις qPCR.

Πιο αναλυτικά, οι στόχοι της παρούσας διατριβής, ο βαθμός επίτευξης τους και η πρακτική σημασία των αποτελεσμάτων έχουν ως εξής:

Πρώτος στόχος ήταν η ανίχνευση και η ταυτοποίηση των ειδών και των παθότυπων των ΚΝΠ στην Κύπρο. Από ένα σύνολο 276 αγροτεμαχίων, από τα οποία συλλέχθηκαν δείγματα εδάφους, στις επαρχίες Πάφου, Λεμεσού, Λάρνακας, Αμμοχώστου και Λευκωσίας, μόνο σε 200 αγροτεμάχια εντοπίστηκαν κύστεις των ΚΝΠ, όλα στις επαρχίες Λάρνακας και Αμμοχώστου. Η μοριακή και μορφολογική ταυτοποίηση έδειξε την παρουσία των δύο ειδών ΚΝΠ στα χωριά Ξυλοτύπου, Ορμήδεια και Ξυλοφάγου, της επαρχίας Λάρνακας, και Άχνα, Λιοπέτρι, Σωτήρα και Αυγόρου, της επαρχίας Αμμοχώστου. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την παρουσία των δύο ειδών ΚΝΠ στην Κύπρο (Morris, 1971). Ο Philis (1981), αναφέρει την παρουσία κυρίως του *G. rostochiensis* στην περιοχή της Ξυλοφάγου, ενώ υπήρχαν υποψίες και για την παρουσία του *G. pallida*. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσίασαν και οι Zaheer *et al.* (1996), προσθέτοντας επιπλέον την περιοχή Τροόδους. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι η εξάπλωση των δύο ειδών στην περιοχή των Κοκκινοχωριών δεν είναι ομοιόμορφη, καθώς εντοπίστηκαν τόσο αμιγείς πληθυσμοί όσο και μικτοί πληθυσμοί των δύο ειδών. Ο *G. rostochiensis* βρέθηκε σε όλες τις περιοχές, ενώ ο *G. pallida* εντοπίστηκε μόνο στα χωριά Ορμήδεια, Ξυλοφάγου, Σωτήρα και Λιοπέτρι.

Ο διαχωρισμός των παθότυπων πραγματοποιήθηκε μόνο στα αγροτεμάχια που βρέθηκαν μολυσμένα με αμιγείς πληθυσμούς των ΚΝΠ (49 τεμάχια μολυσμένα με *G. rostochiensis* και 17 τεμάχια μολυσμένα με *G. pallida*), χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της τεχνητής μόλυνσης διαφορετικών ξενιστών. Τα αποτελέσματα έδειξαν την παρουσία των παθότυπων Ro1 για τον *G. rostochiensis* και Pa2, Pa3 και Pa2/3 για τον *G. pallida*. Σε ένα τεμάχιο στην Ορμήδεια, καθώς και σε ένα στην Ξυλοφάγου, υπήρχαν ενδείξεις συνύπαρξης των παθότυπων Ro1 και Ro2. Οι παθότυποι Pa2/3 διαχωρίστηκαν σε Pa2 και Pa3 μόνο σε 3 τεμάχια: 2 στην περιοχή Ορμήδειας, όπου ταυτοποιήθηκε ο Pa3, και ένα στην περιοχή Λιοπετρίου όπου ταυτοποιήθηκε ο Pa2. Ο προσδιορισμός των παθότυπων έγινε σε επτά σημαντικές πατατοπαραγωγικές περιοχές, έναντι δύο που αναφέρουν οι Zaheer *et al.* (1996), εκ των οποίων μόνο μία (Ξυλοφάγου) είναι σημαντική για την καλλιέργεια της πατάτας.

Με βάση την Οδηγία 2007/33/ΕΚ, ο διαχωρισμός των παθότυπων είναι υποχρεωτικός και στοχεύει στην ορθολογική αντιμετώπιση των ΚΝΠ μέσω της επιλογής κατάλληλων ανθεκτικών ποικιλιών πατάτας. Στις περιοχές όπου ο *G. rostochiensis* απαντάται σε αμιγείς πληθυσμούς, η αντιμετώπιση του μπορεί να επιτευχθεί με νέες εμπορικές ποικιλίες πατάτας που φέρουν πλήρη ανθεκτικότητα στον *G. rostochiensis* (www.potato.nl) σε

συνδυασμό με μειωμένη χρήση χημικών νηματωδοκτόνων. Στην περιοχή Σωτήρας, όπου εντοπίζεται ο *G. pallida* σε αμιγείς πληθυσμούς, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν επίσης ανθεκτικές ποικιλίες (πχ. Liedher), που φέρουν πλήρη ανθεκτικότητα στο είδος αυτό (Grocer, 2009). Στις περιπτώσεις όπου τα δύο είδη εντοπίστηκαν σε ανάμικτους πληθυσμούς, η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών θεωρείται δύσκολη και γι' αυτό πρέπει να χρησιμοποιούνται χημικά νηματωδοκτόνα για την αντιμετώπιση του προβλήματος.

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης θα βοηθήσουν τους παραγωγούς και τους σύμβουλους φυτοπροστασίας να λάβουν τα απαραίτητα μέτρα, ώστε να χρησιμοποιούνται οι σωστές ανθεκτικές ποικιλίες, ανάλογα με το είδος και τον παθότυπο που είναι εγκατεστημένοι σε κάθε μολυσμένο αγροτεμάχιο. Λανθασμένη χρήση των ανθεκτικών ποικιλιών, ιδίως αυτών που φέρουν το γονίδιο H₁ το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα στους παθότυπους R01 και R04 του *G. rostochiensis*, ενδέχεται να οδηγήσει σε ανεπιθύμητα αποτελέσματα, όπως π.χ. η σταδιακή ανάπτυξη του *G. pallida*. Το φαινόμενο αυτό παρουσιάστηκε και στο Ηνωμένο Βασίλειο, όπου η εντατική χρήση της ποικιλίας Maris Piper, που φέρει ανθεκτικότητα στους παθότυπους R01 και R04 του *G. rostochiensis*, οδήγησε στη σταδιακή ανάπτυξη του *G. pallida* (Brown & Sykes, 1983; Turner, 1996). Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποδεικνύουν ότι κάτι αντίστοιχο πιθανόν να έχει συμβεί και στην περιοχή Σωτήρας, όπου οι παραγωγοί χρησιμοποιούν εντατικά τις ποικιλίες Νικόλα και Αλλιανς, επίσης ανθεκτικές στους παθότυπους R01 και R04 του *G. rostochiensis*.

Η ταυτοποίηση των ειδών και των παθότυπων βοηθά επίσης στην προσπάθεια παρεμπόδισης της εισόδου καθώς και της εξάπλωσης των ΚΝΠ, σε περιοχές που είναι είτε αμόλυντες είτε μολυσμένες με ένα μόνο είδος ή παθότυπο. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η λήψη μέτρων για παρεμπόδιση της μετακίνησης των παθότυπων του είδους *G. pallida*, για τους οποίους ο αριθμός των ανθεκτικών ποικιλιών με εμπορικό ενδιαφέρον είναι πολύ περιορισμένος. Επομένως, με την αξιοποίηση των αποτελεσμάτων αυτής της εργασίας θα διευκολυνθεί και η εμπορία των Κυπριακών πατατών, αφού δεν θα εμποδίζεται η εξαγωγή τους στις χώρες που έχουν τους ίδιους παθότυπους που απαντώνται και στην Κύπρο, ενώ επιπλέον, θα υπάρχει η δυνατότητα εξαγωγής πατατών σε περισσότερες Ευρωπαϊκές χώρες.

Ο δεύτερος στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη μεθόδου ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης του ζωντανού μολύσματος των ΚΝΠ. Ο στόχος αυτός επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-

Time PCR, qPCR), μέσω της τεχνολογίας Taqman® και σε συνδυασμό με τη χρωστική Propidium Monoazide (PMA). Παρόλο που οι εκκινητές και οι Taqman® ανιχνευτές που σχεδιάστηκαν σε αυτή την εργασία έδειξαν υψηλή εξειδίκευση, ανιχνεύοντας και διαχωρίζοντας τα δύο είδη σε μικτές αντιδράσεις (duplex) PCR, εντούτοις οι εκκινητές και οι ανιχνευτές των Parayiannis *et al.* (2013) παρουσίασαν ελαφρώς καλύτερα αποτελέσματα, και γι' αυτό επιλέγηκαν για τις αντιδράσεις ποσοτικοποίησης των ΚΝΠ. Επιπλέον, αξιολογήθηκαν 5 διαφορετικές μέθοδοι εξαγωγής DNA ώστε να βελτιστοποιηθεί η τεχνική από άποψη καθαρότητας του DNA και αξιοποίησης των αποτελεσμάτων, αλλά και ταχύτητας και κόστους της όλης διαδικασίας ταυτοποίησης. Τα καλύτερα αποτελέσματα ως προς την καθαρότητα του εκχυλισμένου DNA παρουσίασε η μέθοδος Α (προσρόφηση του DNA σε στήλες πυριτίου), η οποία και επιλέγηκε για τις αντιδράσεις ποσοτικοποίησης των ΚΝΠ. Ικανοποιητικά αποτελέσματα έδειξαν επίσης οι μέθοδοι Β (προσκόλληση του DNA σε μαγνητικά σφαιρίδια), Γ (καθαρισμό με το χηλικό υλικό Chelex) και Ε (απλή λειοτρίβιση των κύστεων σε 80 μl ρυθμιστικού διαλύματος TE). Η μέθοδος Δ (καθαρισμός με χλωροφόρμιο και οξικό νάτριο) δεν έδειξε καθόλου αποτελέσματα εξού και απορρίφθηκε. Σε αντιδράσεις ταυτοποίησης των ΚΝΠ με qPCR (Parayiannis *et al.*, 2013) συστήνεται η εφαρμογή της μεθόδου Ε η οποία, εκτός από αποτελεσματική, είναι η πιο γρήγορη, εύκολη και οικονομική.

Οι MacMilan *et al.* (2006) αναφέρουν τη μοριακή ποσοτικοποίηση παρασιτικών νηματωδών των σαλιγκαριών (*Phasmarhabditis hermaphrodita*), σε αντιδράσεις qPCR, μετά από ενίσχυση του ολικού DNA που εκχυλίστηκε απευθείας από το έδαφος. Η μέθοδος αυτή αναφέρεται σε νηματώδεις που διαβιούν στο έδαφος ως προνύμφες και οι οποίες μπορούν να ανιχνευτούν στο έδαφος με μοριακές μεθόδους (qPCR), μόνο μέχρι 6 μέρες μετά το θάνατο τους. Αυτή η μέθοδος ποσοτικοποίησης δε μπορεί να εφαρμοστεί στην περίπτωση των ΚΝΠ, αφού οι εγκυστωμένες προνύμφες βρίσκονται καλά προστατευμένες μέσα στο κέλυφος των αυγών και έτσι δεν είναι εφικτή η αποδόμηση του DNA των νεκρών ατόμων. Αυτό επιβεβαιώθηκε από ειδική μελέτη που διεξήχθη στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, σε κύστες που χρονολογούνται από το 1976 και είχαν αποθηκευτεί σε θερμοκρασία δωματίου (~ 25 °C). Διαπιστώθηκε ότι οι κύστες αυτές περιείχαν νεκρά αυγά, από τα οποία εκχυλίστηκε DNA και ανιχνευτηκε με PCR. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν πως μόνο με ανίχνευση του DNA, δεν είναι εφικτή η ποσοτικοποίηση ζωντανών ΚΝΠ, αφού το μόριο του DNA παραμένει σταθερό για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Η πιο πάνω δυσκολία μπορεί να υπερπηδηθεί με την εφαρμογή της χρωστικής PMA, η οποία έχει την ιδιότητα να δεσμεύει το ελεύθερο DNA (των νεκρών ΚΝΠ) και να αποτρέπει την ενίσχυση του κατά τις αντιδράσεις της PCR. Με αυτό το τρόπο ενισχύεται μόνο το DNA που βρίσκεται εντός των ζωντανών κυττάρων, αφού το PMA δε μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη. Η ανακάλυψη της χρωστικής PMA από τους Nocker *et al.* (2006) επέτρεψε τη χρήση του DNA ως μέσου για διαχωρισμό των ζωντανών από τα νεκρά κύτταρα διαφόρων ειδών βακτηρίων. Επιπλέον, η μέθοδος PMA χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό νεκρών/ζωντανών σπορίων διαφόρων ειδών μυκήτων (Vesper *et al.*, 2008). Η χρήση του PMA ως μέσου για διαχωρισμό νεκρών/ζωντανών νηματωδών, συγκεκριμένα των εγκυστωμένων αυγών των ΚΝΠ, αναφέρεται για πρώτη φορά στην παρούσα εργασία, αφού δεν έχει εντοπιστεί οποιαδήποτε άλλη αναφορά. Ο συνδυασμός της μεθόδου PMA και της τεχνολογίας Taqman, σε αντιδράσεις duplex qPCR, επέτρεψε την ποσοτικοποίηση ζωντανών νηματωδών που είχαν εκτεθεί σε 3 διαφορετικές θερμοκρασίες (25, 45 και 65 °C), καθώς επίσης και ζωντανών αυγών μέσα σε παλαιές κύστες που χρονολογούνται από το 1976. Η μέθοδος qPCR-PMA ήταν σε θέση να διαχωρίσει τα ζωντανά/νεκρά αυγά των ΚΝΠ με μεγάλη ακρίβεια τόσο στις επεμβάσεις με τις 3 θερμοκρασίες όσο και στις παλαιές κύστες.

Τα πιο πάνω αποτελέσματα επαληθεύτηκαν και με τη χρήση της χρωστικής Meldola Blue, που αποτελεί την κλασική μέθοδο ελέγχου βιωσιμότητας των ΚΝΠ. Παρόλο που η μέθοδος Meldola Blue παρουσιάζει μειονεκτήματα, όπως η μερική χρώση του σώματος των ζωντανών προνυμφών (Ogiga & Estey, 1974), εντούτοις προτείνεται από την ΕΡΡΟ ως η πιο αποτελεσματική μέθοδος διαχωρισμού ζωντανών / νεκρών αυγών των ΚΝΠ. Ένα πρόσθετο πρόβλημα που υπάρχει σήμερα με την εφαρμογή της μεθόδου αυτής, είναι η δυσκολία στην εξεύρεση της χρωστικής αυτής στη διεθνή αγορά. Σημειώνεται ότι για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήσαμε χρωστική από εργαστήριο του AFBI. Η δυνατότητα ελέγχου της βιωσιμότητας των ΚΝΠ που παρέχει η νέα μέθοδος που περιγράφεται εδώ είναι καίριας σημασίας, αφού η αντιμετώπιση τους βασίζεται στην ποσότητα του μολύσματος που υπάρχει στο έδαφος προφυτρωτικά. Η μέτρηση των εγκυστωμένων αυγών δε θεωρείται αποτελεσματική μέθοδος αφού δεν είναι όλα τα αυγά μέσα σε μια κύστη ζωντανά (Devine & Jones, 2001). Με την πάροδο του χρόνου, σημαντικός αριθμός εγκυστωμένων αυγών πεθαίνει (in-egg mortality), με αποτέλεσμα οι κύστες μεγάλης ηλικίας να περιέχουν τόσο ζωντανά όσο και νεκρά αυγά (Devine & Jones, 2001). Ο έλεγχος βιωσιμότητας μέσω της εκκόλαψης των προνυμφών 2^{ου} σταδίου σε εκκρίματα ριζών πατάτας (PRD), κρίνεται επίσης αναποτελεσματικός, αφού σημαντικός

αριθμός εγκυστωμένων αυγών (~10-20 %) παραμένουν ζωντανά μέσα στις κύστες ενώ βρίσκονται σε κατάσταση διάπαυσης και δεν εκκολάπτονται (Hominick *et al.*, 1985; Devine & Jones, 2001).

Μέσα από την παρούσα εργασία προκύπτει το συμπέρασμα ότι η νέα μέθοδος qPCR-PMA μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά κατά τους ελέγχους ρουτίνας που πραγματοποιούν οι κρατικές υπηρεσίες για την ανίχνευση των ΚΝΠ, προσθέτοντας τα απαραίτητα στοιχεία της ταυτοποίησης των ειδών και της ποσοτικοποίησης του ζωντανού μολύσματος. Τα πειράματα θανάτωσης των ΚΝΠ με τη χρήση θερμότητας έγιναν με σκοπό την προσομοίωση των κλιματικών συνθηκών της Κύπρου, κυρίως κατά την καλοκαιρινή περίοδο, όπου οι θερμοκρασίες συχνά φτάνουν τους 45 °C υπό σκιά (Giannakopoulos *et al.*, 2010). Επιπλέον, η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί και στην ποσοτικοποίηση εδαφογενών παθογόνων σε θερμοκήπια, όπου εφαρμόζεται η μέθοδος της ηλιαπολύμανσης (Ioannou & Ioannou, 2000; Neophytou *et al.*, 2002).

Με τη μέθοδο PMA επιτεύχθηκε η απομάκρυνση του DNA των νεκρών κυττάρων των ΚΝΠ, όταν αυτά εκτέθηκαν σε υψηλές θερμοκρασίες. Η νέκρωση ενός κυττάρου και συνάμα η διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες, όπως ο τύπος του κυττάρου, η φυσική κατάσταση του κυττάρου, η θερμοκρασία επώασης και ο χρόνος θανάτου του οργανισμού (Wharton *et al.*, 1988). Επιπλέον, ο εξωσκελετός των νηματωδών αποτελείται από χιτίνη και κουτικουλίνη και η διαπερατότητα του επηρεάζεται από διάφορα ένζυμα όπως χιτινάσες, κυτταρινάσες, κολλαγενάσες και πρωτεάσες (Yang *et al.*, 2005), καθώς και από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Για τους πιο πάνω λόγους κρίνεται απαραίτητη η περαιτέρω διερεύνηση της διαπερατότητας του PMA μέσω του εξωσκελετού των νηματωδών, όταν αυτοί δεν θανατώνονται με θέρμανση αλλά από άλλες αιτίες, όπως η έκθεση σε νηματωδοκτόνα, έκθεση σε ακτινοβολία UV, προσβολή από βιολογικούς παράγοντες ή θάνατος από ασιτία.

Ο τρίτος και τελευταίος στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η δημιουργία θεματικών-ψηφιακών χαρτών που να απεικονίζουν τη γεωγραφική εξάπλωση των ΚΝΠ στις μολυσμένες περιοχές, καθώς και τη διασπορά τους μεταξύ των αγροτεμαχίων. Οι χάρτες δημιουργήθηκαν από τα δεδομένα της ταυτοποίησης και της ποσοτικοποίησης των ΚΝΠ, τα οποία εισήχθησαν στο σύστημα γεωπληροφορικής ArcGIS. Η δημοσιοποίηση των ψηφιακών χαρτών θα βοηθήσει τους πατατοπαραγωγούς να εφαρμόσουν σωστά τις κοινοτικές οδηγίες για την ορθολογική αντιμετώπιση των ΚΝΠ, επιλέγοντας τις κατάλληλες ανθεκτικές ποικιλίες. Επιπλέον, η απεικόνιση των τεμαχίων που είναι

μολυσμένα με μικτούς πληθυσμούς θα αποτρέψει την ανάπτυξη του ενός εκ των δύο ειδών, αφού με την καλλιέργεια ανθεκτικών ποικιλιών θα δίνονται οδηγίες και για εφαρμογή μειωμένων δόσεων νηματοδοκτόνων σε προφυτρωτικό στάδιο. Τέλος, η χαρτογράφηση των ΚΝΠ και η απεικόνιση της έκτασης και της γεωγραφικής κατανομής τους, συμβάλλουν στην εκτίμηση του κινδύνου εξάπλωσης τους και συνεπώς στην πρόβλεψη/πρόγνωση νέων προσβολών, καθώς και στη διαχείριση των υφιστάμενων προσβολών.

Μέσω της παρούσας διατριβής πιστεύουμε ότι επιτεύχθηκε η ολιστική διερεύνηση των ΚΝΠ στην Κύπρο, παρουσιάζοντας τα είδη και τους παθότυπους που υπάρχουν στο νησί καθώς και τη γεωγραφική εξάπλωση και διασπορά τους. Οι μοριακές τεχνικές που αναπτύχθηκαν επιτρέπουν τη γρήγορη, έγκαιρη και έγκυρη εξασφάλιση αποτελεσμάτων ταυτοποίησης από μεγάλο αριθμό δειγμάτων, σε σύντομο χρόνο και με το χαμηλότερο δυνατό κόστος εφαρμογής. Επιπλέον, η ποσοτικοποίηση του ζωντανού μολύσματος θα βελτιώσει και θα βοηθήσει τη λήψη αποφάσεων κατά την εφαρμογή μέτρων αντιμετώπισης των ΚΝΠ. Επίσης, θα αποτελέσει τη βάση για μελλοντικές έρευνες που θα αφορούν την εκτίμηση του ζωντανού μολύσματος των ΚΝΠ σε διάφορα βάθη στο έδαφος και στη διερεύνηση της βιωσιμότητας των ΚΝΠ κάτω από το μεγάλο εύρος θερμοκρασιών που επικρατούν στην Κύπρο.

Βιβλιογραφία

- Agapiou A, Hadjimitsis DG, Alexakis DD, Papadavid G, 2012. Examining the Phenological Cycle of Barley (*Hordeum vulgare*) Using Satellite and in situ Spectroradiometer Measurements for the Detection of Buried Archaeological Remains. *GIScience & Remote Sensing* 49, 854-72.
- Andersen S, 1956. Collection of cysts of *Heterodera major* and estimation of the cyst content. *Nematologica* 1, 303-6.
- Anonymous, 2006. Testing of potato varieties to assess resistance to *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. *OEPP/EPPO* 36, 419-20.
- Anonymous, 2009. *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. *European Plant Protection Organization (EPPO)* EPPO Bulletin 39, 354-368.
- Atkins SD, Clark IM, Sosnowska D, Hirsch PR, Kerry BR, 2003. Detection and quantification of *Plectosphaerella cucumerina*, a potential biological control agent of potato cyst nematodes, by using conventional PCR, real-time PCR, selective media, and baiting. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 4788.
- Bajaj KB, Kanwar RS, Gupta. D.C., 2011. *Handbook of Practical Nematology*. India: Scientific Publishers.
- Bakker J, Bouwman-Smits L, 1988. Genetic variation in polypeptide maps of two *Globodera rostochiensis* pathotypes. *Phytopathology* 78, 894-900.
- Bakker J, Bouwman-Smits L, Gommers F, 1992. Genetic relationships between *Globodera pallida* pathotypes in Europe assessed by using two dimensional gel electrophoresis of proteins. *Fundam.Appl.Nematol* 15, 481-90.
- Been T, Schomaker C, 2000. Development and evaluation of sampling methods for fields with infestation foci of potato cyst nematodes (*Globodera rostochiensis* and *G. pallida*). *Phytopathology* 90, 647-56.
- Behrens E, 1975. *Globodera* Skarbilovich, 1959, eine selbständige Gattung in der Unterfamilie Herteroderinae Skarbilovich, 1947 (Nematoda: Heteroderidae). *Vortragstagung (1) zu aktuellen Problemen der Phytonematologie am 29*, 12-26.
- Bekal S, Gauthier J, Rivoal R, 1997. Genetic diversity among a complex of cereal cyst nematodes inferred from RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer region. *Genome* 40, 479-86.

- Bellvert J, Horgan FG, Crombie K, Bellvert J, 2008. Effect of sample size on cyst recovery by flotation methods: Recommendations for sample processing during EU monitoring of potato cyst nematodes (*Globodera spp.*) [electronic resource]. *EPPO bulletin* 38, 205-10.
- Bendezu I, Evans K, Burrows P, De Pomerai D, Canto-Saenz M, 1998. Inter and intra-specific genomic variability of the potato cyst nematodes *Globodera pallida* and *G. rostochiensis* from Europe and South America using RAPD-PCR. *Nematologica* 44, 49-61.
- Benningshof JCJ, 2001. Studies towards the total synthesis of solanoecelepin A: synthesis of analogues containing the tetracyclic left-hand substructure.
- Berry SD, Fargette M, Spaul V, Morand S, Cadet P, 2008. Detection and quantification of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*), lesion nematode (*Pratylenchus zaeae*) and dagger nematode (*Xiphinema elongatum*) parasites of sugarcane using real-time PCR. *Molecular and cellular probes* 22, 168-76.
- Bessetti J, 2007. An introduction to PCR inhibitors. *J.Microbiol.Meth* 28, 159-67.
- Bhattarai S, Haydock PPJ, Back MA, Hare MC, Lankford WT, 2010. Interactions between field populations of the potato cyst nematode *Globodera pallida* and *Rhizoctonia solani* diseases of potatoes under controlled environment and glasshouse conditions. *Nematology* 12, 783-90.
- Blaxter ML, Robertson WM, Perry R, Wright D, 1998. The cuticle. *The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes.*, 25-48.
- Bouwman L, Ross H, 1972. Differentiation between *Heterodera rostochiensis* and an undescribed allied species by female colour, morphometrics and pathogenicity. *Nematologica* 18, 265-9.
- Bradshaw JE, Bryan GJ, Ramsay G, 2006. Genetic resources (including wild and cultivated *Solanum* species) and progress in their utilisation in potato breeding. *Potato Research* 49, 49-65.
- Browder L, 1985. Parasite: host: environment specificity in the cereal rusts. *Annual Review of Phytopathology* 23, 201-22.
- Brown E, Sykes G, 1983. Assessment of the losses caused to potatoes by the potato cyst nematodes, *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Annals of Applied Biology* 103, 271-6.
- Bulman SR, Marshall JW, 1997. Differentiation of Australasian potato cyst nematode (PCN) populations using the polymerase chain reaction (PCR). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 25, 123-9.
- Byrne J, Twomey U, Maher N, Devine K, Jones P, 1998. Detection of hatching inhibitors and hatching factor stimulants for golden potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, in potato root leachate. *Annals of applied biology* 132, 463-72.

- Cabrera Poch H, Manzanilla López R, Kanyuka K, 2006. Functionality of resistance gene Hero, which controls plant root-infecting potato cyst nematodes, in leaves of tomato. *Plant, Cell & Environment* 29, 1372-8.
- Canto Saenz M, Scurrah D, Mayer M, 1977. Races of the potato cyst nematode in the Andean region and a new system of classification. *Nematologica* 23, 340-9.
- Castelli L, Bryan G, Blok VG, Ramsay G, Sobczak M, Gillespie T, Phillips MS, 2006. Investigations of *Globodera pallida* invasion and syncytia formation within roots of the susceptible potato cultivar Désirée and resistant species *Solanum canasense*. *Nematology* 8, 103-10.
- Cenis J, Perez P, Fereres A, 1993. Identification of aphid (Homoptera: Aphididae) species and clones by random amplified polymorphic DNA. *Annals of the Entomological Society of America* 86, 545-50.
- Cook R, Evans K, Brown R, Kerry B, 1987. Resistance and tolerance. *Principles and practice of nematode control in crops.*, 179-231.
- Cook R, Thomas B, Mizen K, 1992. X-ray microanalysis of feeding syncytia induced in plants by cyst nematodes. *Nematologica*, 38 1, 36-49.
- Cronin D, Moenne-Loccoz Y, Fenton A, Dunne C, Dowling DN, O'Gara F, 1997. Role of 2, 4-diacetylphloroglucinol in the interactions of the biocontrol pseudomonad strain F113 with the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 1357.
- Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM, 1992. Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology* 54, 579-99.
- Dauphin LA, Moser BD, Bowen MD, 2009. Evaluation of five commercial nucleic acid extraction kits for their ability to inactivate *Bacillus anthracis* spores and comparison of DNA yields from spores and spiked environmental samples. *Journal of microbiological methods* 76, 30-7.
- Deliopoulos T, Devine KJ, Haydock PPJ, Jones PW, 2007. Studies on the effect of mycorrhization of potato roots on the hatching activity of potato root leachate towards the potato cyst nematodes, *Globodera pallida* and *G. rostochiensis*. *Nematology* 9, 719-29.
- Devine KJ, Byrne J, Jones PW, 2001. In vitro studies on the relative availability and mobility in soil of natural hatching factors for the potato cyst nematodes, *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Nematology* 3, 75-83.
- Devine KJ, Jones PW, 2000. Purification and partial characterisation of hatching factors for the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* from potato root leachate. *Nematology* 2, 231-6.

- Devine KJ, Jones PW, 2001. Effects of hatching factors on potato cyst nematode hatch and in-egg mortality in soil and in vitro. *Nematology* 3, 65-74.
- Donn S, Griffiths BS, Neilson R, Daniell TJ, 2008. DNA extraction from soil nematodes for multi-sample community studies. *Applied Soil Ecology* 38, 20-6.
- Dunnett J, 1957. Variation in pathogenicity of the potato root eelworm (*Heterodera rostochiensis* woll.) and its significance in potato breeding. *Euphytica* 6, 77-89.
- Ellenby C, 1954. Tuber forming species and varieties of the genus *Solanum* tested for resistance to the potato root eelworm *Heterodera rostochiensis* Wollenweber. *Euphytica* 3, 195-202.
- Ellsbury M, Clay S, Fleischer S, Chandler L, Schneider S, Kennedy G, Sutton T, 2000. Use of GIS/GPS systems in IPM: progress and reality. In: Anonymous Emerging technologies for integrated pest management: concepts, research, and implementation. Proceedings of a Conference, Raleigh, North Carolina, USA, 8-10 March, 1999.: American Phytopathological Society (APS Press), 419-38.
- ESRI U, 2012. Understanding our world. 2012.
- EU, 2007. Council Directive 2007/33/EC of 11 June 2007 on the control of potato cyst nematodes and repealing Directive 69/465/EEC. Official Journal of the European Union L 156, 12-22.
- EU, 2009. Directive 2009/128/EC of the European parliament and of the council of 21 October 2009.
- EU Pesticides Database, 2012. European Commission, Health and Consumers. 2012.
- Evans A, Perry R, 1976. Survival strategies in nematodes. *The Organisation of Nematodes*, 383-424.
- Evans K, 1970. Longevity of males and fertilisation of females of *Heterodera rostochiensis*. *Nematologica* 16, 369-74.
- Evans K, Franco J, De Scurrah MM, 1975. Distribution of species of potato cyst-nematodes in South America. *Nematologica* 21, 365-9.
- Evans K, Stone A, 1977. A review of the distribution and biology of the potato cyst-nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *International Journal of Pest Management* 23, 178-89.
- Evans K, Trudgill D, Harris P, 1992. Pest aspects of potato production. Part 1. The nematode pest of potatoes. The potato crop: the scientific basis for improvement. 2nd Edition., 438-75.

- FAOSTAT, 2012. International year of the potato. *FAO* 2012.
- Fenwick DW, 1940. Methods for the recovery and counting of cysts of *Heterodera schachtii* from soil. *Journal of helminthology* 18, 155-72.
- Ferris VR, Miller LI, Faghihi J, Ferris JM, 1995. Ribosomal DNA comparisons of *Globodera* from two continents. *Journal of Nematology* 27, 273.
- Fleming CC, Turner SJ, Powers TO, Szalansky AL, 1998. Diagnostics of cyst nematodes: use of the polymerase chain reaction to determine species and estimate population levels. *Aspects of Applied Biology* 52, 375-82.
- Folkertsma R, Helder J, Gommers F, Bakker J, 1997. Storage of potato cyst nematodes at 80 C. *Fundamental and Applied Nematology* 20, 299-302.
- Fox P, Atkinson H, 1985. Enzyme variation in pathotypes of the potato cyst nematodes. *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Parasitology* 91, 499-506.
- Frusciante L, Barone A, Nunziata A, Ruggieri V, 2006. Allele mining at the locus GRO 1 in *Solanum* wild species. In: Anonymous *VI International Solanaceae Conference: Genomics Meets Biodiversity 745*: ISHS, 449-56.
- Fukuzawa A, 2007. Eco-Chemical Control of the Potato Cyst Nematode by a Hatching Stimulator from Solanaceae Plants., 211-5.
- Fullaondo A, Barrena E, Viribay M, Barrena I, Salazar A, Ritter E, 1999. Identification of potato cyst nematode species *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* by PCR using specific primer combinations. *Nematology* 1, 157-63.
- Fuller JM, Howard HW, Stone AR, 1977. A new pathotype of the potato cyst nematode *Globodera pallida*. *Plant Pathology* 26, 135-8.
- Fuller J, Howard H, 1974. Breeding for resistance to the white potato cyst-nematode, *Heterodera pallida*. *Annals of Applied Biology* 77, 121-8.
- Fuller VL, Lilley CJ, Urwin PE, 2008. Nematode resistance. *New Phytologist* 180, 27-44.
- Giannakopoulos C, Hadjinicolaou P, Kostopoulou E, Varotsos K, Zerefos C, 2010. Precipitation and temperature regime over Cyprus as a result of global climate change. *Advances in Geosciences* 23, 17-24.
- Goddard T, Kryzanowski L, Cannon K, Izaurralde C, Martin T, 1996. Potential for integrated GIS-agriculture models for precision farming systems. In: Anonymous *Proc. Int. Conf./Workshop on Integrating GIS and Environmental Modeling, Proceedings, 3rd, Santa Fe, NM*, 21-5.

- Goffart H, 1965. Vergleichende Versuche über die Färbung mit Meldola-Blau und Neublau-R als Vitalitätstest für pflanzenparasitäre Nematoden. *Nematologica* 11, 155-.
- Golden AM, 1986. Morphology and identification of cyst nematodes. *NATO advanced science institutes series: Series A: Life sciences (USA)*.
- Golinowski W, Sobczak M, Kurek W, Grymaszewska G, 1997. The structure of syncytia. *Developments in plant pathology*, 80-97.
- Goverse A, 1999. *Cyst nematode-induced changes in plant development*. : Wageningen Universiteit.
- Greco N, Brandonisio A, De Cosmis P, 2007. Pathotypes and heterogeneity of Italian populations of *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Nematologia Mediterranea* 35, 137.
- Greco N, Di Vito M, Brandonisio A, Giordano I, De Marinis G, 1982. The effect of *Globodera pallida* and *G. rostochiensis* on potato yield. *Nematologica* 28, 379-86.
- Green C, 1971. The morphology of the terminal area of the round-cyst nematodes, SG *Heterodera rostochiensis* and allied species. *Nematologica* 17, 34-46.
- Greet D, Green C, Poulton M, 1968. Extraction, standardization and assessment of the volatility of the sex attractants of *Heterodera rostochiensis* Woll. and *H. schachtii* Schtn. *Annals of Applied Biology* 61, 511-9.
- Grenier E, Bossis M, Fouville D, Renault L, Mugniéry D, 2001. Molecular approaches to the taxonomic position of Peruvian potato cyst nematodes and gene pool similarities in indigenous and imported populations of *Globodera*. *Heredity* 86, 277-90.
- Griffiths BS, Donn S, Neilson R, Daniell TJ, 2006. Molecular sequencing and morphological analysis of a nematode community. *Applied Soil Ecology* 32, 325-37.
- Grocep F, 2009. French potatoes official catalogue. 2009.
- Guile C, 1970. Further observations on cyst colour changes in potato cyst eelworm pathotypes. *Plant Pathology* 19, 1-6.
- Gurr GM, 1992. Control of potato cyst nematode (*Globodera pallida*) by host plant resistance and nematicide. *Annals of Applied Biology* 121, 167-73.
- Hadjimitsis D, Toullos L, Hadjimitsis M, Vryonides P, Papadopoulos P, Clayton C, Lazakidou A, 2007. Satellite Remote Sensing for Water Quality Assessment and Monitoring-an Overview on Current Concepts, Deficits and Future Tasks. *WSEAS Trans.Signal Processing* 3.

- Haydock PPJ, Woods SR, Grove IG, Hare MC, 2006. Chemical control of nematodes. *Plant nematology*. CAB International, Wallingford, 392–410.
- Hesling RS, 1982. Cyst nematodes: morphology and identification of *Heterodera*, *Globodera* and *Puctodera*. *Plant nematology*, 125-155.
- Hijmans RJ, Spooner DM, 2001. Geographic distribution of wild potato species. *American Journal of Botany* 88, 2101-12.
- Hinch JM, Alberdi F, Smith SC, Woodward JR, Evans K, 1998. Discrimination of European and Australian *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* pathotypes by high performance capillary electrophoresis. *Fundamental and Applied Nematology* 21, 123-8.
- Hodda M, Cook D, 2009. Economic impact from unrestricted spread of potato cyst nematodes in Australia. *Phytopathology* 99, 1387-93.
- Hollis JP, 1961. Nematode reactions to coal-tar dyes. *Nematologica* 6, 315-25.
- Holterman M, 2008. Phylogenetic Relationships Within the Phylum Nematoda as Revealed by Ribosomal DNA, and Their Biological Implications. : Wageningen Universiteit.
- Hominick W, Forrest J, Evans A, 1985. Diapause in *Globodera rostochiensis* and variability in hatching trials. *Nematologica* 31, 159-70.
- Howarth FG, 1991. Environmental impacts of classical biological control. *Annual Review of Entomology* 36, 485-509.
- Huijsman C, 1970. Present state of breeding work for resistance to *Heterodera rostochiensis* (Wollenweber) in the Netherlands. In: Anonymous *Proc. Int. Nematol. Symp.(9th)*, Warsaw, August 21-24, 1967., 255-258.
- Ibrahim SK, Minnis ST, Barker ADP, Russell MD, Haydock PPJ, Evans K, Grove IG, Woods SR, Wilcox A, 2001. Evaluation of PCR, IEF and ELISA techniques for the detection and identification of potato cyst nematodes from field soil samples in England and Wales. *Pest management science* 57, 1068-74.
- Ioannou N, Ioannou M, 2000. Integrated management of soil-borne pathogens of greenhouse tomato in Cyprus. In: Anonymous *II Balkan Symposium on Vegetables and Potatoes* 579, 433-8.
- Jacobs H, Gray SN, Crump DH, 2003. Interactions between nematophagous fungi and consequences for their potential as biological agents for the control of potato cyst nematodes. *Mycological Research* 107, 47-56.
- Jamnkar Ciglenecki U, Grom J, Toplak I, Jemersic L, Barlic-Maganja D, 2008. Real-time RT-PCR assay for rapid and specific detection of classical swine fever virus: comparison

- of SYBR Green and TaqMan MGB detection methods using novel MGB probes. *Journal of virological methods* 147, 257-64.
- Jex AR, Littlewood D, Timothy J, Gasser RB, 2010. Toward next-generation sequencing of mitochondrial genomes — Focus on parasitic worms of animals and biotechnological implications. *Biotechnology Advances* 28, 151-9.
- Johanssen W, 1909. Elemente der exacten Erblchkeitslehre. Jena. *Gustav Fischer*.
- Jones F, 1970. The control of the potato cyst-nematode. *JR Soc.Arts*. 118, 179-96.
- Jones F, Carpenter J, Parrott DM, Stone A, Trudgill D, 1970. Potato Cyst Nematode: One Species or Two?.
- Jones M, 2008. Host cell responses to endoparasitic nematode attack: structure and function of giant cells and syncytia. *Annals of Applied Biology* 97, 353-72.
- Kerry B, Barker A, Evans K, 2002. Investigation of potato cyst nematode control.
- Kerry B, 1995. Ecological considerations for the use of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium*, to control plant parasitic nematodes. *Canadian Journal of Botany* 73, 65-70.
- Kimpinski J, Platt H, 1983. Washing of potatoes to remove nematodes and to observe effect on storage rot diseases. *Canadian Plant Disease Survey* 63, 45-6.
- Kort J, Ross H, Rumpfenhorst H, Stone A, 1977. An international scheme for identifying and classifying pathotypes of potato cyst-nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Nematologica* 23, 333-9.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine* 27, 95-125.
- LaMondia J, Brodie B, 1984. Control of *Globodera rostochiensis* by solar heat. *Plant Disease* 68, 474-6.
- Lao O, Duijn K, Kersbergen P, Knijff P, Kayser M, 2006. Proportioning whole-genome single-nucleotide-polymorphism diversity for the identification of geographic population structure and genetic ancestry. *The American Journal of Human Genetics* 78, 680-90.
- Lewis F, Mai W, 1960. Survival of encysted and free larvae of the golden nematode in relation to temperature and relative humidity. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 27, 80-5.

- Lidwine M, Dellaert W, and Vinke JH, 1987. Testing potatoes for resistance to *Globodera pallida* pathotype Pa-3; resistance spectra of plant genotypes and virulence spectra of Pa-3 isolates. *Revue Nématol* 10, 445-453.
- Lievens B, Thomma B, 2007. Quantification in multiplex format as a challenging goal for plant pathogen molecular diagnostic assays. *Pest Technology* 1, 17-26.
- Lilley CJ, Urwin PE, Johnston KA, Atkinson HJ, 2004. Preferential expression of a plant cystatin at nematode feeding sites confers resistance to *Meloidogyne incognita* and *Globodera pallida*. *Plant Biotechnology Journal* 2, 3-12.
- MacMillan K, Blok V, Young I, Crawford J, Wilson MJ, 2006. Quantification of the slug parasitic nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* from soil samples using real time qPCR. *International journal for parasitology* 36, 1453-61.
- Madani M, Subbotin SA, Moens M, 2005. Quantitative detection of the potato cyst nematode, *Globodera pallida*, and the beet cyst nematode, *Heterodera schachtii*, using Real-Time PCR with SYBR green I dye. *Molecular and cellular probes* 19, 81-6.
- Madani M, Subbotin S, Ward L, Li X, De Boer S, 2010. Molecular characterization of Canadian populations of potato cyst nematodes, *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* using ribosomal nuclear RNA and cytochrome b genes. *Canadian Journal of Plant Pathology* 32, 252-63.
- Madani M, Ward LJ, De Boer SH, 2008. Multiplex real-time polymerase chain reaction for identifying potato cyst nematodes, *Globodera pallida* and *Globodera rostochiensis*, and the tobacco cyst nematode, *Globodera tabacum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 30, 554-64.
- Marks RJ:B, B.B., ed, 1998. *Potato Cyst Nematodes, Biology, Distribution and Control*. UK: CAB International.
- Martin SW, 1984. Estimating disease prevalence and the interpretation of screening. *Preventive veterinary medicine* 2, 463-72.
- Mattocks CJ, Morris MA, Matthijs G, Swinnen E, Corveleyn A, Dequeker E, Müller CR, Pratt V, Wallace A, 2010. A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. *European Journal of Human Genetics* 18, 1276-88.
- Mauchline T, Kerry B, Hirsch P, 2002. Quantification in soil and the rhizosphere of the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* by competitive PCR and comparison with selective plating. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1846-53.
- McKenna LA, Winslow RD, 1972. Differences in hatch and development rates of potato cyst nematode pathotypes. *Annals of Applied Biology* 71, 274-8.

- Meyer SKF, Sayre RM, Huettel RN, 1988. Comparisons of Selected Stains for Distinguishing Between Live and Dead Eggs of the Plant-parasitic Nematode *Heterodem glycines*1.
- Minnis ST, Haydock PPJ, Evans K, Minnis ST, 2004. Control of potato cyst nematodes and economic benefits of application of 1,3-dichloropropene and granular nematicides. *Annals of applied biology* 145, 145-56.
- Molinari S, Greco N, Zouhar M, 2010. Superoxide dismutase isoelectric focusing patterns as a tool to differentiate pathotypes of *Globodera spp.* *Nematology* 12, 751-8.
- Morris RF, 1971. Distribution and biology of the golden nematode *Globodera rostochiensis* in Cyprus. *Nematologica* 26:, 637- 639.
- Morton CO, Mauchline TH, Kerry R, Hirsch PR, 2003. PCR-based DNA fingerprinting indicates host-related genetic variation in the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. *Mycological Research* 107, 198-205.
- Mugniery D, Balandras C, Oger M, 1984. Examen des possibilités d'éradication du nématode à kystes, *Globodera pallida* Stone. *Agronomie* 4, 773-8.
- Mulvey R, Golden AM, 1983. An illustrated key to the cyst-forming genera and species of Heteroderidae in the western hemisphere with species morphometrics and distribution. *Journal of Nematology* 15, 1.
- Murashige T, Skoog F, 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473-97.
- Nakhla KM, Owens KJ, Wei WLG, Skantar AM, Levy L, 2010,. Multiplex Real-Time PCR Assays for the Identification of the Potato Cyst and Tobacco Cyst Nematodes. *Plant Disease* 94, Number 8, 959-65.
- Neophytou G, Ioannou N, Wright D, 2002. Alternatives to methyl bromide method for the management of root-knot nematodes (*Meloidogyne spp.*) in greenhouse-grown tomato. In: Anonymous *The BCPC Conference: Pests and diseases, Volumes 1 and 2. Proceedings of an international conference held at the Brighton Hilton Metropole Hotel, Brighton, UK, 18-21 November 2002.*: British Crop Protection Council, 733-6.
- Nijboer H., Parievliet J. E., 1990. Pathotype-specificity in potato cyst nematodes, a reconsideration. *Euphytica : Netherlands journal of plant breeding* 49, 39-47.
- Nocker A, Cheung CY, Camper AK, 2006. Comparison of Propidium Monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of microbiological methods* 67, 310-20.

- Nocker A, Sossa KE, Camper AK, 2007. Molecular monitoring of disinfection efficacy using Propidium Monoazide in combination with quantitative PCR. *Journal of microbiological methods* 70, 252-60.
- Nowaczyk K, Dobosz R, Kornobis S, Obrepalska-Steplowska A, 2008. TaqMan REAL-Time PCR-based approach for differentiation between *Globodera rostochiensis* (golden nematode) and *Globodera artemisiae* species. *Parasitology research* 103, 577-81.
- Ogiga I, Estey R, 1974. The use of meldola blue and Nile blue A, for distinguishing dead from living nematodes. *Nematologica* 20, 271-6.
- Osborn RK, Edwards SG, Wilcox A, Haydock PPJ, 2010. Potential enhancement of degradation of the nematicides aldicarb, oxamyl and fosthiazate in UK agricultural soils through repeated applications. *Pest management science* 66, 253-61.
- Papadavid G, Hadjimitsis D, Michaelides S, Nisantzi A, 2011. Crop evapotranspiration estimation using remote sensing and the existing network of meteorological stations in Cyprus. *Adv.Geosci* 30, 39-44.
- Papayiannis LC, Christoforou M, Markou Y, Tsaltas D, 2013. Molecular typing of cyst-forming nematodes *Globodera pallida* and *G. rostochiensis*, using real-time PCR and evaluation of five methods for template preparation. *Journal of Phytopathology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2011.03.031>
- Perry J, 1994. Sampling and applied statistics for pests and diseases. *Aspects of Applied Biology*.
- Pfaffl M, 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.
- Philis J, 1981. Species of potato cyst nematode from the Xylophagou area in Cyprus. *Nematol.medit* 9, 57-61.
- Plantard O, Picard D, Valette S, Scurrah M, Grenier E, Mugniéry D, 2008. Origin and genetic diversity of Western European populations of the potato cyst nematode (*Globodera pallida*) inferred from mitochondrial sequences and microsatellite loci. *Molecular ecology* 17, 2208-18.
- Psifidi A, Dovas CI, Banos G, 2010. A comparison of six methods for genomic DNA extraction suitable for PCR-based genotyping applications using ovine milk samples. *Molecular and cellular probes* 24, 93-8.
- Pylypenko LA, Phillips MS, Blok VC, 2008. Characterisation of two Ukrainian populations of *Globodera pallida* in terms of their virulence and mtDNA, and the biological assessment of a new resistant cultivar Vales Everest. *Nematology* 10, 585-90.

Rawsthorne D, Brodie B, 1986. Relationship between root growth of potato, root diffusate production, and hatching of *Globodera rostochiensis*. *Journal of Nematology* 18, 379.

Reid A, 2009. PCR Detection of Potato Cyst Nematode. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 508, 289 - 294.

Rice SL, Leadbeater B, Stone A, 1985. Changes in cell structure in roots of resistant potatoes parasitized by potato cyst-nematodes. I. Potatoes with resistance gene H1 derived from *Solanum tuberosum ssp.andigena*. *Physiological plant pathology* 27, 219-34.

Robinson MP, Atkinson HJ, Perry RN, 1987. The influence of soil moisture and storage time on the persistence and infectivity of second stage juveniles of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Revue Nématol* 10, 343-348.

Ryan A, Jones P, 2004. The effect of mycorrhization of potato roots on the hatching chemicals active towards the potato cyst nematodes, *Globodera pallida* and *G. rostochiensis*. *Nematology* 6, 335-42.

Ryan NA, Jones PW, 2003. Effect of tuber-borne micro-organisms on hatching activity of potato root leachate towards potato cyst nematodes. *Nematology* 5, 55-63.

Ryan NA, Duffy EM, Cassells AC, Jones PW, 2000. The effect of mycorrhizal fungi on the hatch of potato cyst nematodes. *Applied Soil Ecology* 15, 233-40.

Saah AJ, Hoover DR, 1997. " Sensitivity" and" Specificity" Reconsidered: The Meaning of These Terms in Analytical and Diagnostic Settings. *Annals of Internal Medicine* 126, 91-4.

Sasaki-Crawley A, Curtis R, Birkett M, Powers S, Papadopoulos A, Pickett J, Blackshaw R, Kerry B, 2010. Signalling and behaviour of potato cyst nematode in the rhizosphere of the trap crop, *Solanum sisymbriifolium*. In: Anonymous *Proceedings of the 3rd symposium on potato cyst nematodes, Harper Adams University College, UK, 14-15 September 2010.*: Association of Applied Biologists, 45-51.

Savvides A, 2012. Growing Cyprus potatoes in red soils.

Schnick D, Rumpfenhorst H, Burgermeister W, 1990. Differentiation of closely related *Globodera pallida* (Stone) populations by means of DNA restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). *Journal of Phytopathology* 130, 127-36.

Schochetman G, Ou CY, Jones WK, 1988. Polymerase chain reaction. *The Journal of infectious diseases*, 1154-7.

Scholte K, 2000. Growth and development of plants with potential for use as trap crops for potato cyst nematodes and their effects on the numbers of juveniles in cysts. *Annals of Applied Biology* 137, 31-42.

- Scholte K, Vos J, 2000. Effects of potnetial trap crops and planting date on soil infestation with potato cyst nematodes and root-knot nematodes. *Annals of Applied Biology* 137, 153-64.
- Schröder W, 2006. GIS, geostatistics, metadata banking, and tree-based models for data analysis and mapping in environmental monitoring and epidemiology. *International Journal of Medical Microbiology* 296, 23-36.
- Scurrah MM, May 1981. Evaluating Resistance to Potato Cyst Nematodes. *International Potato Center. technical Information Bulletin* 10, 1-16.
- Seinhorst J, 1974. : Separation of *Heterodera* cysts from dry organic debris using ethanol. *Nematologica* 20, 367-9.
- Shannon AJ, Browne JA, Boyd J, Fitzpatrick DA, Burnell AM, 2005. The anhydrobiotic potential and molecular phylogenetics of species and strains of *Panagrolaimus* (Nematoda, Panagrolaimidae). *Journal of experimental biology* 208, 2433-45.
- Shelton A, Badenes-Perez F, 2006. Concepts and applications of trap cropping in pest management. *Annu.Rev.Entomol.* 51, 285-308.
- Shepherd AM, 1986. Extraction and estimation of cyst nematodes. *Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes*, 31–49.
- Skantar A, Handoo Z, Carta L, Chitwood D, 2007. Morphological and molecular identification of *Globodera pallida* associated with potato in Idaho. *Journal of Nematology* 39, 133.
- Southey JF, 1974. Methods for Detection of Potato Cyst Nematodes1. *EPPO Bulletin* 4, 463-73.
- Southey JF, 1986. *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes.* : HMSO Books.
- Stanton J, Sartori M, 1990. Hatching and reproduction of the potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, from potato fields in Western Australia as influenced by soil temperature. *Nematologica*, 36 1, 457-64.
- Stone A, 1979. Co-evolution of nematodes and plants [review]. *Symbolae Botanicae Upsalienses* 22, 46-61.
- Storey RMJ, 1984. The relationship between neutral lipid reserves and infectivity for hatched and dormant juveniles of *Globodera spp.* *Annals of applied Biology* 104, 511-20.
- Subbotin SA, Halford PD, Perry RN, 1999. Identification of populations of potato cyst nematodes from Russia using protein electrophoresis, rDNA-RFLPs and RAPDs. *Russian Journal of Nematology* 7, 57-64.

- Subbotin SA, Waeyenberge L, Moens M, 2000. Identification of cyst forming nematodes of the genus *Heterodera* (Nematoda: Heteroderidae) based on the ribosomal DNA-RFLP. *Nematology* 2, 153-64.
- Tichopad A, Didier A, Pfaffl MW, 2004. Inhibition of real-time RT-PCR quantification due to tissue-specific contaminants. *Molecular and cellular probes* 18, 45-50.
- Tobin JD, Woods SR, Crump DH, Haydock PPJ, Hare MC, Tobin JD, 2008. Effect of the fungus *Pochonia chlamydosporia* and fosthiazate on the multiplication rate of potato cyst nematodes (*Globodera pallida* and *G. rostochiensis*) in potato crops grown under UK field conditions [electronic resource]. *Biological control: theory and application in pest management* 46, 194-201.
- Toxopeus H, Huijsman C, 1953. Breeding for resistance to potato root eelworm. *Euphytica* 2, 180-6.
- Trudgill D, 1967. The effect of environment on sex determination in *Heterodera rostochiensis*. *Nematologica* 13, 263-72.
- Trudgill D, 1991. Resistance to and tolerance of plant parasitic nematodes in plants. *Annual Review of Phytopathology* 29, 167-92.
- Turner SJ, 1993. Soil sampling to detect potato cyst-nematodes (*Globodera* spp.). *Annals of applied biology* 123, 349-57.
- Turner SJ, 1996. Population decline of potato cyst nematodes (*Globodera rostochiensis*, *G. pallida*) in field soils in Northern Ireland. *Annals of applied biology* 129, 315-22.
- Turner SJ, Fleming CC, Moreland BP, Martin TJG, 2009. Variation in hatch among pathotypes of the potato cyst nematodes, *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*, in response to potato root diffusate from *Solanum* spp. I. Preliminary assessments to establish optimal testing conditions. *Nematology* 11, 749-56.
- Turner SJ, Stone AR, 1981. Hatching of potato cyst-nematodes (*Globodera rostochiensis*, *G. pallida*) in root exudates of *Solanum vernei* hybrids. *Nematologica* 27, 315-8.
- Turner SJ, Evans K, Marks RJ, Brodie BB, 1998. The origins, global distribution and biology of potato cyst nematodes (*Globodera rostochiensis* (Woll.) and *Globodera pallida* Stone). *Potato cyst nematodes, biology, distribution and control.*, 7-26.
- Turner SJ, Martin TJG, McAleavey PBW, Fleming CC, 2006. The management of potato cyst nematodes using resistant Solanaceae potato clones as trap crops [electronic resource]. *Annals of applied biology* 149, 271-80.
- Twomey U, Rolfe RN, Warrior P, Perry RN, 2002. Effects of the biological nematicide, DiTera, on movement and sensory responses of second stage juveniles of *Globodera*

- rostochiensis*, and stylet activity of *G. rostochiensis* and fourth stage juveniles of *Ditylenchus dipsaci*. *Nematology* 4, 909-15.
- Twomey U, Warrior P, Kerry BR, Perry RN, 2000. Effects of the biological nematicide, DiTera, on hatching of *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Nematology* 2, 355-62.
- Urwin P, Lilley CJ, Atkinson HJ, 2002. Ingestion of double-stranded RNA by preparasitic juvenile cyst nematodes leads to RNA interference. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15, 747-52.
- Velvis H, Kamp P, 1996. Suppression of potato cyst nematode root penetration by the endoparasitic nematophagous fungus *Hirsutella rhossiliensis*. *European Journal of Plant Pathology* 102, 115-22.
- Vesper S, McKinstry C, Hartmann C, Neace M, Yoder S, Vesper A, 2008. Quantifying fungal viability in air and water samples using quantitative PCR after treatment with Propidium Monoazide (PMA). *Journal of microbiological methods* 72, 180-4.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R, 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 10, 506.
- Wang X, Seed B, Tefvik Dorak M, 2006. High-throughput primer and probe design. *Real-time PCR* 1, 93-106.
- Webley D, Jones F, 1981. Observations on *Globodera pallida* and *G. rostochiensis* on early potatoes. *Plant Pathology* 30, 217-24.
- Weinstein P, Stauber L, 1960. Excretory mechanisms and excretory products of nematodes: an appraisal. *Host influence on parasite physiology.*, 65-92.
- Wharton D, Preston C, Barrett J, Perry R, 1988. Changes in cuticular permeability associated with recovery from anhydrobiosis in the plant parasitic nematode, *Ditylenchus dipsaci*. *Parasitology* 97, 317-30.
- Whitehead AG, 1998. *Plant nematode control.* : London.
- Whitehead AG, Tite DJ, Fraser JE, Nichols AJF, 1984. Differential control of potato cyst-nematodes, *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* by oxamyl and the yields of resistant and susceptible potatoes in treated and untreated soils. *Annals of Applied Biology* 105, 231-44.
- Whitehead A, 1992. Emergence of juvenile potato cyst-nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* and the control of *G. pallida*. *Annals of applied biology* 120, 471-86.
- Wilson IG, 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3741.

- Winfield A, 1965. Potato root eelworm in Holland, Lincolnshire. *NAAS Quarterly Review*, 110-7.
- Womersley C, Smith L, 1981. Anhydrobiosis in nematodes—I. The role of glycerol myoinositol and trehalose during desiccation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 70, 579-86.
- Yang J, Huang X, Tian B, Wang M, Niu Q, Zhang K, 2005. Isolation and characterization of a serine protease from the nematophagous fungus, *Lecanicillium psalliotae*, displaying nematicidal activity. *Biotechnology Letters* 27, 1123-8.
- Zaheer K, Fleming C, Turner S, 1996a. Genetic variation in potato cyst nematodes in Northern Ireland. *Biochemical systematics and ecology* 24, 509-19.
- Zaheer K, Fleming C, Turner S, Philis J, 1996b. Genetic variation and pathotype response in potato cyst-nematode from Cyprus. *Nematologia mediterranea* 24, 161-8.
- Zaheer K, Fleming CC, Turner SJ, 1993. Distribution and frequency of occurrence of potato cyst nematode pathotypes in Northern Ireland. *Plant Pathology* 42, 609-16.
- Zieler M, Zeiler M, 2000. *Modeling our world: the ESRI guide to geodatabase design*. : ESRI press.
- ΟΓΑ, 2010. Έκταση τεμαχίων που καλλιεργούνται με πατάτες στα χωριά Ξυλοφάγου, Ορμήδεια, Λιοπέτρι, Σωτήρα, Αχνα, Ξυλοτύμπου και Αυγόρου.
- Τμήμα Γεωργίας, 2005. Κυστογόνοι Νηματώδεις της Πατάτας. Επισκόπηση στην περιοχή Κοκκινοχωριών.
- Τμήμα Γεωργίας, 2012. Αδειοδοτούμενα Φυτοπροστατευτικά προϊόντα.

Παραρτήματα

Πρωτόκολλα

Ζελέ γλυκερίνης

Προστίθενται 8 γραμμάρια ζελατίνης σε 42 ml νερό. Ακολουθεί ανάδευση για 2h και μετά προστίθενται 50 ml γλυκερίνης και 1 ml φαινόλης. Το δείγμα ζεσταίνεται σε θερμικό υδατόλουτρο μέχρι να ομογενοποιηθεί.

Worm Lysis Buffer (WLB)

Το WLB χρησιμοποιείται για την εξαγωγή DNA από προνύμφες νηματωδών.

Υλικά: 50mm KCl, 10 mm Tris pH 8.2, 2.5 mm MgCl₂, 60μg /mL proteinase K, 0.45% NP40, 0.45% Tween 20 και 0.01% gelatine.

Μέθοδος:

1. Προνύμφες 2^{ου} σταδίου τοποθετούνται σε μικροσωλήνες που περιέχουν 15μL WLB χωρίς πρωτεΐνάση K.
2. Ο μικροσωλήνας βυθίζεται για 1 min σε υγρό άζωτο και μετά τοποθετείται σε θερμική πλάκα στους 100 °C για 2 min. Ακολουθεί ανάδευση και επανάληψη της διαδικασίας για 5 φορές.
3. Ο σωλήνας φυγοκεντρείται στις 13 500 rpm για 2 min.
4. Στο μικροσωλήνα προστίθενται ακόμα 35μL WLB και 10 μL πρωτεΐνάση K.
5. Ακολούθως τοποθετείται σε θερμική πλάκα στους 60 °C για 1h. Ο μικροσωλήνας αναδεύεται για 10s κάθε 20 min.
6. Ο μικροσωλήνας τοποθετείται σε θερμική πλάκα στους 90 °C για 10 min με σκοπό την απενεργοποίηση του ενζύμου πρωτεΐνάση K.
7. Ο μικροσωλήνας τοποθετείται στους -20°C.

Καθαρισμός με χλωροφόρμιο και οξικό νάτριο (Cenis *et al.* 1993)

Το δείγμα (κύστη ή μείγμα με κύστης με χόμα) λειοτριβείται σε 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος (200 mM Tris-HCl, pH: 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5 % SDS). Στη συνέχεια προστίθενται 50 μl οξικού Νατρίου 3M (CH₃COONa), pH: 5.2, το δείγμα αναδεύεται και τοποθετείται στους -20 °C για 30 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 5000 x g για 10 min, ανάληψη και μεταφορά 80 μl από το υπερκείμενο που περιέχει το DNA, σε καθαρό μικροσωλήνα. Ισόποση ποσότητα (80 μl) χλωροφορμίου: isoamyl alcohol (24:1) προστίθεται στον μικροσωλήνα που περιέχει το DNA και ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 10000 x g για 10 min. 60 μl από το υπερκείμενο μεταφέρονται σε καθαρό μικροσωλήνα που περιέχει ισόποση ποσότητα ψυγμένης ισοπροπανόλης και αφήνονται για επώαση στους 25 °C για 25 min. Η καθίζηση του DNA επήλθε μετά από φυγοκέντρηση στις 12000 x g για 20 min, ακολούθησε καθαρισμός με 70 % αιθανόλη, εξάτμιση της αιθανόλης σε θάλαμο νηματικής ροής και επαναδιάλυση του DNA pellet σε 80 μl ρυθμιστικό διάλυμα TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH: 8)

Επιπρόσθετα αποτελέσματα

Ποσοτικοποίηση αυγών και προνυμφών (J2) του *Globodera rostochiensis* από κύστει διαφόρων ηλικιών με τις μεθόδους Meldola blue και qPCR-PMA

Ηλικία κύστεων	Meldola Blue			PMA			
	Σκούρο μπλε	Κίτρινο	Άχρωμο	Απουσία PMA		PMA	
	J2s	J2s	J2s	J2s	Ct*	J2s	Ct
1976	22	0	0	4	28.12	0	32.26
	7	0	0	14	26.27	1	28.95
	9	1	0	19	25.87	0	35.63
1990	182	15	0	13	26.42	1	29.69
	157	3	0	16	26.14	3	28.67
	214	30	1	19	25.87	1	29.63
2007	208	15	87	111	23.32	41	24.76
	165	10	191	41	24.75	36	24.94
	181	22	128	171	22.7	6	27.62
2010	25	0	400	272	22.03	303	21.88
	31	0	169	374	21.58	389	21.52
	17	0	272	377	21.57	536	21.06

*Ct= Threshold cycle (Οριακός κύκλος στην qPCR)

Παράρτημα

Πίνακας 19. Αποτελέσματα διαχωρισμού των παθότυπων του *Globodera rostochiensis* με τη χρήση τεχνητής μόλυνσης διαφορετικών ξενιστών

ΠΕΡΙΟΧΗ	SPUNTA	SATURNA	KTT 60.21.19	GLKS 58.1642.4	Vtn 62.33.3	65346/19	ΠΑΘΟΤΥΠΟΣ
ΟΡΜΗΔΕΙΑ	20,85	1,34	0,18	0,12	0,15	0,11	Ro1/2
ΟΡΜΗΔΕΙΑ	23,21	0,93	0,11	0,08	0,12	0,03	Ro1
ΟΡΜΗΔΕΙΑ	30,83	0,87	0,14	0,12	0,20	0,06	Ro1
ΟΡΜΗΔΕΙΑ	35,19	0,67	0,17	0,26	0,06	0,13	Ro1
ΟΡΜΗΔΕΙΑ	31,63	0,63	0,14	0,23	0,12	0,24	Ro1
ΟΡΜΗΔΕΙΑ	31,27	0,51	0,13	0,13	0,01	0,15	Ro1
ΟΡΜΗΔΕΙΑ	32,65	0,78	0,03	0,19	0,08	0,01	Ro1
ΟΡΜΗΔΕΙΑ	16,27	0,20	0,03	0,00	0,00	0,00	Ro1
ΟΡΜΗΔΕΙΑ	12,57	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	Ro1
ΟΡΜΗΔΕΙΑ	15,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Ro1
ΟΡΜΗΔΕΙΑ	8,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Ro1
ΟΡΜΗΔΕΙΑ	11,00	0,02	0,00	0,03	0,03	0,00	Ro1
ΟΡΜΗΔΕΙΑ	17,08	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	Ro1
mean	21,98	0,48	0,07	0,09	0,06	0,06	
ΕΥΛΟΦΑΓΟΥ	37,21	0,35	0,20	0,00	0,00	0,00	Ro1
ΕΥΛΟΦΑΓΟΥ	19,84	0,18	0,17	0,55	0,05	0,00	Ro1
ΕΥΛΟΦΑΓΟΥ	23,44	0,90	0,30	0,05	0,00	0,00	Ro1
ΕΥΛΟΦΑΓΟΥ	41,76	1,36	0,19	0,12	0,11	0,08	Ro1
ΕΥΛΟΦΑΓΟΥ	31,63	0,80	0,14	0,23	0,12	0,24	Ro1
ΕΥΛΟΦΑΓΟΥ	28,87	0,48	0,22	0,05	0,04	0,08	Ro1
ΕΥΛΟΦΑΓΟΥ	14,35	0,23	0,00	0,00	0,03	0,04	Ro1
ΕΥΛΟΦΑΓΟΥ	28,67	0,93	0,08	0,13	0,12	0,00	Ro1/2
ΕΥΛΟΦΑΓΟΥ	6,33	0,00	0,00	0,01	0,03	0,01	Ro1
ΕΥΛΟΦΑΓΟΥ	34,83	0,58	0,00	0,00	0,02	0,01	Ro1
mean	26,69	0,58	0,13	0,11	0,05	0,05	
ΛΙΟΠΕΤΡΙ	11,65	0,29	0,07	0,03	0,12	0,00	Ro1
ΛΙΟΠΕΤΡΙ	6,38	0,03	0,00	0,01	0,03	0,00	Ro1
ΛΙΟΠΕΤΡΙ	25,53	0,68	0,15	0,06	0,13	0,03	Ro1
ΛΙΟΠΕΤΡΙ	9,20	0,48	0,15	0,00	0,13	0,00	Ro1
ΛΙΟΠΕΤΡΙ	10,93	0,33	0,13	0,00	0,03	0,06	Ro1
ΛΙΟΠΕΤΡΙ	31,53	0,85	0,23	0,00	0,05	0,06	Ro1
ΛΙΟΠΕΤΡΙ	5,73	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Ro1
ΛΙΟΠΕΤΡΙ	10,77	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Ro1
mean	13,96	0,33	0,09	0,01	0,06	0,02	
ΑΧΝΑ	25,23	0,26	0,16	0,08	0,12	0,20	Ro1
ΑΧΝΑ	18,35	0,43	0,00	0,05	0,00	0,03	Ro1
ΑΧΝΑ	24,75	0,20	0,00	0,00	0,00	0,02	Ro1
ΑΧΝΑ	25,47	0,00	0,08	0,00	0,12	0,00	Ro1
ΑΧΝΑ	16,33	0,00	0,00	0,00	0,15	0,01	Ro1
mean	22,02	0,18	0,05	0,03	0,08	0,05	
ΕΥΛΟΤΥΜΠΟΥ	22,83	0,00	0,00	0,00	0,11	0,00	Ro1
ΕΥΛΟΤΥΜΠΟΥ	18,81	0,00	0,27	0,12	0,14	0,00	Ro1
ΕΥΛΟΤΥΜΠΟΥ	26,33	0,23	0,36	0,01	0,00	0,00	Ro1
ΕΥΛΟΤΥΜΠΟΥ	15,58	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	Ro1
ΕΥΛΟΤΥΜΠΟΥ	28,90	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Ro1
mean	22,49	0,05	0,13	0,03	0,05	0,00	
ΑΥΓΟΡΟΥ	14,63	0,93	0,13	0,00	0,03	0,06	Ro1
ΑΥΓΟΡΟΥ	26,53	0,45	0,00	0,00	0,20	0,06	Ro1
ΑΥΓΟΡΟΥ	25,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Ro1
ΑΥΓΟΡΟΥ	30,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Ro1
ΑΥΓΟΡΟΥ	25,45	0,23	0,00	0,01	0,00	0,00	Ro1
ΑΥΓΟΡΟΥ	26,22	0,46	0,00	0,10	0,00	0,00	Ro1
ΑΥΓΟΡΟΥ	18,67	0,34	0,16	0,00	0,00	0,00	Ro1
ΑΥΓΟΡΟΥ	23,70	0,00	0,14	0,00	0,00	0,00	Ro1
mean	23,82	0,30	0,05	0,01	0,03	0,01	

Παράρτημα

Πίνακας 20. Αποτελέσματα διαχωρισμού των παθότυπων του *Globodera rostochiensis* με τη χρήση τεχνητής μόλυνσης διαφορετικών ξενιστών

ΠΕΡΙΟΧΗ	SPUNTA	Vtn 62.33.3	P55/7	AM 78.3778	ΠΑΘΟΥΤΥΠΟΣ
ΟΡΜΗΔΕΙΑ	14,05	0,46	1,14	0,11	Pa 2/3
ΟΡΜΗΔΕΙΑ	14,78	0,38	2,68	0,13	Pa 2/3
ΟΡΜΗΔΕΙΑ	18,39	1,57	7,74	0,22	Pa 2/3
ΟΡΜΗΔΕΙΑ	18,20	1,36	12,45	0,08	Pa 2/3
ΟΡΜΗΔΕΙΑ	15,79	1,43	5,64	0,00	Pa 2/3
ΟΡΜΗΔΕΙΑ	15,79	2,59	5,64	0,03	Pa 3
ΟΡΜΗΔΕΙΑ	17,58	4,80	10,44	0,00	Pa 3
mean	16,37	1,80	6,53	0,08	
ΛΙΟΠΕΤΡΙ	10,54	0,82	1,26	0,13	Pa 2/3
ΛΙΟΠΕΤΡΙ	26,24	0,07	2,23	0,09	Pa 2
ΛΙΟΠΕΤΡΙ	12,98	0,84	1,31	0,08	Pa 2/3
mean	16,59	0,58	1,60	0,10	
ΣΩΤΗΡΑ	25,78	0,78	12,11	0,02	Pa 2/3
ΣΩΤΗΡΑ	12,24	0,60	2,30	0,03	Pa 2/3
ΣΩΤΗΡΑ	9,69	0,82	1,69	0,09	Pa 2/3
ΣΩΤΗΡΑ	27,23	1,11	3,01	0,08	Pa 2/3
ΣΩΤΗΡΑ	15,98	0,91	2,91	0,00	Pa 2/3
ΣΩΤΗΡΑ	12,26	1,35	5,51	0,00	Pa 2/3
ΣΩΤΗΡΑ	19,06	1,28	6,31	0,09	Pa 2/3
mean	17,46	0,98	4,83	0,04	

Πίνακας 21. Αποτελέσματα ταυτοποίησης των ειδών και των παθότυπων του *Globodera rostochiensis* και *G. pallida* στην περιοχή Ξυλοτύμπου

Φ/Σ ¹	Αρ. Τεμ ²	ΕΚΤΑΣΗ (δεκάρια)	Κύστες / 100 γρ. εδάφους ³	Αυγά/γρ εδάφους ⁴	Είδος ⁵	Παθότυπος
3260E1	0012	2	16	13	R	Ro 1
3260E1	0012	2	25	15	R	Ro 1
3260E1	0039	2,5	26	15	R	Ro 1
3260E1	0034B	2	7	11	R	Ro 1
3261E1	0282	3	12	5	R	Ro 1
3261E1	0337	2	13	16	R	Ro 1
3602E1	0005	2	18	21	R	Ro 1
3252E2	0134	2,7	20	20	R	Ro 1
4113W2	0016	1	12	22	R	Ro 1
4113W2	1254	4	15	18	R	Ro 1

¹Φ/Σ: Φύλλο/Σχέδιο, ²Αριθμός Τεμαχίου, ³Κύστες / 100 γρ. εδάφους: Μέτρηση στο στερεοσκόπιο, ⁴Αυγά/γρ εδάφους: Μέτρηση στο μικροσκόπιο, ⁵Είδος: R= *G. rostochiensis* & P= *G. pallida*

Πίνακας 22. Αποτελέσματα ταυτοποίησης των ειδών και των παθότυπων του *Globodera rostochiensis* και *G. pallida* στην περιοχή Ορμήδειας

Φ/Σ ¹	Αρ. Τεμ ²	ΕΚΤΑΣΗ (δεκάρια)	Κύστες / 100 γρ. εδάφους ³	Αυγά/γρ εδάφους ⁴	Είδος ⁵		Παθότυπος
2-274-375	41	24	55	106		R	Rol/2
2-273-373	156	16	20	31		R	Rol
2-274-374	139	12	21	22	P	R	
2-274-373	174	8	25	76		R	Rol
2-274-374	91	18	26	49	P	R	
2-274-374	83	5	41	36		R	Rol
2-274-374	77	8	42	52		R	Rol
2-273-374	377	16	22	23	P	R	
2-272-374	356	20	24	63	P	R	
2-272-374	352	16	48	75	P	R	
2-273-374	389	24	25	43	P	R	
2-273-374	390	24	25	43	P	R	
2-273-374	378	20	27	91	P		Pa 2/3
2-272-375	159	14	52	85	P		Pa 2/3
2-273-375	151	8	98	109	P		Pa 2/3
2-273-374	149	12	21	14	P	R	
2-272-373	310	3	23	10	P	R	
2-273-374	405	14	25	5	P	R	
2-272-373	311	5	30	26	P	R	
2-272-373	312	2	30	26		R	Rol
2-273-373	155	18	34	52		R	Rol
2-273-374	143	8	40	62		R	Rol
2-273-374	429	16	41	44	P		Pa 2/3
2-274-375	50	5	42	4	P	R	
2-268-372	45	5	40	100	P	R	
2-274-373	205	6	20	3	P	R	
2-273-373	250	8	21	17	P	R	
2-274-373	283	13	22	9	P	R	
2-273-373	226	20	22	10	P	R	
2-274-373	212	15	26	20	P	R	
2-274-373	206	14	28	10	P		Pa 2/3
2-274-373	201	12	33	4	P	R	
2-274-373	285	3	36	25	P		Pa 3
2-274-373	282	13	41	23	P	R	
2-273-373	254	7	53	84	P	R	
2-273-373	244	12	21	50	P	R	
2-273-373	291	3	21	9	P	R	
2-273-373	281	25	32	13	P		Pa 3
2-274-373	211	5	20	26	P	R	
2-274-373	175	9	52	130	P	R	
2-273-373	271	9	25	20		R	Rol
2-273-373	272	8	25	20		R	Rol
2-273-373	273	8	27	25		R	Rol
2-273-373	274	17	35	65		R	Rol
2-273-373	270	7	25	12		R	Rol

¹Φ/Σ: Φύλλο/Σχέδιο, ²Αριθμός Τεμαχίου, ³Κύστες / 100 γρ. εδάφους: Μέτρηση στο στερεοσκόπιο, ⁴Αυγά/γρ εδάφους: Μέτρηση στο μικροσκόπιο, ⁵Είδος: R= *G. rostochiensis* & P= *G. pallida*

Δημοσιεύσεις

Πίνακας 23. Αποτελέσματα ταυτοποίησης των ειδών και των παθότυπων του *Globodera rostochiensis* και *G. pallida* στην περιοχή Ξυλοφάγου

Φ/Σ ¹	Αρ. Τεμ ²	ΕΚΤΑΣΗ (δεκάρια)	Κύστες / 100 γρ. εδάφους ³	Αυγά/γρ εδάφους ⁴	Είδος ⁵		Παθότυπος
2-275-375	79	36	25	50	P	R	
2-275-374	116	6	20	46		R	Ro 1
2-275-374	107	4	21	60		R	
2-275-374	130	6	30	82		R	
2-275-374	131	5	30	80		R	
2-275-374	340	6	30	75		R	Ro 1
2-275-374	146	6	30	75	P	R	
2-275-374	127	4	41	52		R	
2-275-374	138	16	44	90		R	
2-274-373	280	16	21	45	P	R	
2-274-373	292	4	21	40	P	R	
2-274-373	284	12	28	55	P	R	
2-274-373	329	4	30	63		R	Ro 1
2-274-373	301	10	30	70		R	
2-274-373	282	12	50	90	P	R	
2-275-373	1	12	60	50		R	Ro 1
2-275-373	199	8	21	35		R	Ro 1
2-275-373	45	12	21	5	P	R	
2-275-373	2	16	23	50		R	Ro 1
2-275-373	308	3	25	42	P	R	
2-274-373	305	28	25	38		R	
2-275-373	267	8	25	25	P	R	
2-274-373	243	12	25	15	P	R	
2-275-373	182	3	25	50		R	
2-274-373	271	18	30	63	P	R	
2-275-373	181	6	30	35		R	
2-275-373	3	4	31	50		R	
2-275-373	260	4	41	105		R	
2-275-373	189	4	41	40		R	
2-275-373	253	3	42	36	P	R	
2-274-373	273	12	50	102		R	Ro 1
2-275-373	165	4	60	25	P	R	
2-275-373	196	16	60	30		R	
2-275-373	229	3	65	26	P	R	
2-275-373	191	4	75	95		R	Ro 1/2
2-275-372	13	2	22	5	P	R	
2-275-372	350	3	30	7	P	R	
2-275-372	15	8	60	5	P	R	
2-276-373	164	9	20	70		R	Ro 1
2-276-373	207	12	25	15	P	R	
2-276-373	163	8	25	74		R	
2-276-373	176	4	25	80		R	
2-276-372/3	228	4	21	30	P	R	
2-276-372/3	229	4	21	30	P	R	
2-276-372	87	4	21	24	P	R	
2-276-372	146	7	21	25	P	R	
2-276-372	86	16	21	47		R	
2-276-372	66	3	41	20	P	R	
2-276-372	148	4	41	22	P	R	
2-276-372	80	18	48	87		R	
2-275-372	51	20	50	50	P	R	
2-275-372	232	4	50	80		R	
2-276-372	147	5	50	50	P	R	

Δημοσιεύσεις

2-276-372	65	4	53	50	P	R	
2-276-372	261	12	60	78		R	Ro 1
¹ Φ/Σ: Φύλλο/Σχέδιο, ² Αριθμός Τεμαχίου, ³ Κύστες / 100 γρ. εδάφους: Μέτρηση στο στερεοσκόπιο, ⁴ Αυγά/γρ εδάφους: Μέτρηση στο μικροσκόπιο, ⁵ Είδος: R= <i>G. rostochiensis</i> & P= <i>G. pallida</i>							

Πίνακας 24. Αποτελέσματα ταυτοποίησης των ειδών και των παθότυπων του *Globodera rostochiensis* και *G. pallida* στην περιοχή Λιοπέτρι

Φ/Σ ¹	Αρ. Τεμ ²	ΕΚΤΑΣΗ (δεκάρια)	Κύστες / 100 γρ. εδάφους ³	Αυγά/γρ εδάφους ⁴	Είδος ⁵		Παθότυπος
2-282-375	251	18	20	30	P	R	
2-282-373	160, 161	18	21	20	P		Pa 2/3
2-281-372	213	8	22	35		R	Ro 1
2-282-374	56	20	22	16	P		
2-280-372	155	10	23	42		R	Ro 1
2-279-372	212	16	26	31	P		Pa 2
2-280-373	62	38	30	26	P		Pa 2/3
2-281-374	328	10	31	35	P	R	
2-282-376	316, 326,	30	32	10	P	R	
	327, 328,						
2-283-376	329, 330	30	32	38	P	R	
2-281-373	310	28	34	6	P	R	
2-280-375	285	15	44	37		R	Ro 1
2-282-376	282	4	50	53		R	Ro 1
2-280-378	175, 174, 173, 171	35	53	74		R	Ro 1
2-281-374	181	15	53	87		R	Ro 1
2-279-374	27	20	83	69		R	Ro 1
2-282-376	292	30	32	24		R	Ro 1
¹ Φ/Σ: Φύλλο/Σχέδιο, ² Αριθμός Τεμαχίου, ³ Κύστες / 100 γρ. εδάφους: Μέτρηση στο στερεοσκόπιο, ⁴ Αυγά/γρ εδάφους: Μέτρηση στο μικροσκόπιο, ⁵ Είδος: R= <i>G. rostochiensis</i> & P= <i>G. pallida</i>							

Πίνακας 25. Αποτελέσματα ταυτοποίησης των ειδών και των παθότυπων του *Globodera rostochiensis* και *G. pallida* στην περιοχή Άχνα

Φ/Σ ¹	Αρ. Τεμ ²	ΕΚΤΑΣΗ (δεκάρια)	Κύστες / 100 γρ. εδάφους ³	Αυγά/γρ εδάφους ⁴	Είδος ⁵		Παθότυπος
3247E1	0338	2,6	10	10		R	Ro 1
3247E1	0378	3,7	23	26		R	Ro 1
3255E1	0256	3	12	8		R	Ro 1
3255E1	0266	2	16	5		R	Ro 1
3262E1	0116	3,68	42	35		R	Ro 1
3262E1	0117	12	21	11		R	Ro 1
3254W1	0020	2	25	60		R	Ro 1
3254W1	0596	4	25	43		R	Ro 1
3262W2	0053	7	21	6		R	Ro 1
3262W2	0064	6	37	24		R	Ro 1
4107E1	0081	6	34	21		R	Ro 1
4107E1	0251	3	15	25		R	Ro 1
4107E2	0054A	2,68	20	24		R	Ro 1
¹ Φ/Σ: Φύλλο/Σχέδιο, ² Αριθμός Τεμαχίου, ³ Κύστες / 100 γρ. εδάφους: Μέτρηση στο στερεοσκόπιο, ⁴ Αυγά/γρ εδάφους: Μέτρηση στο μικροσκόπιο, ⁵ Είδος: R= <i>G. rostochiensis</i> & P= <i>G. pallida</i>							

Πίνακας 26. Αποτελέσματα ταυτοποίησης των ειδών και των παθότυπων του *Globodera rostochiensis* και *G. pallida* στην περιοχή Σωτήρα

Φ/Σ ¹	Αρ. Τεμ ²	ΕΚΤΑΣΗ (δεκάρια)	Κύστες / 100 γρ. εδάφους ³	Αυγά/γρ εδάφους ⁴	Είδος ⁵		Παθότυπος
2-283-373	199	4	23	15	P		
2-282-373	152	4	55	30	P	R	
2-284-374	344	4	31	45	P		Pa 2/3
2-284-373	54	4	34	26	P	R	
2-282-374	71	3	23	34	P		Pa 2/3
2-283-374	249	3	21	11	P	R	
2-283-374	240	3	44	66	P		Pa 2/3
2-283-374	102	3	30	15	P		
2-284-374	100	5	45	10	P		Pa 2/3
2-284-374	101	5	45	29	P		
2-284-374	344	4	23	25	P		
2-283-373	196	3	32	40	P		
2-283-373	184	3	42	58	P		Pa 2/3
2-283-374	340	3	40	35	P		Pa 2/3
2-283-373	141	3	21	10	P	R	
2-282-374	87	5	21	27	P		
2-282-374	84	4	21	30	P		
2-284-374	99	4	33	20	P		Pa 2/3
2-282-375	268	3	32	17	P	R	
2-285-373	127	3	23	16	P	R	
2-282-374	56	4	30	24	P	R	
2-284-374	11	4	23	25	P		
2-284-374	13	3	21	20	P		
2-284-374	13	3	21	20	P		
2-282-374	108	4	24	12	P	R	
2-282-373	160	2	25	17	P		Pa 2/3
2-282-373	161	2	25	16	P		Pa 2/3

¹Φ/Σ: Φύλλο/Σχέδιο, ²Αριθμός Τεμαχίου, ³Κύστες / 100 γρ. εδάφους: Μέτρηση στο στερεοσκόπιο, ⁴Αυγά/γρ εδάφους: Μέτρηση στο μικροσκόπιο, ⁵Είδος: R= *G. rostochiensis* & P= *G. pallida*

Πίνακας 27. Αποτελέσματα ταυτοποίησης των ειδών και των παθότυπων του *Globodera rostochiensis* και *G. pallida* στην περιοχή Αυγούρου

Φ/Σ ¹	Αρ. Τεμ ²	ΕΚΤΑΣΗ (δεκάρια)	Κύστες / 100 γρ. εδάφους ³	Αυγά/γρ εδάφους ⁴	Είδος ⁵		Παθότυπος
3260E1	0012	2	16	13		R	Ro 1
3260E1	0012	2	25	15		R	Ro 1
3260E1	0039	2,5	26	15		R	Ro 1
3260E1	0034B	2	7	11		R	Ro 1
3261E1	0282	3	12	5		R	Ro 1
3261E1	0337	2	13	16		R	Ro 1
3602E1	0005	2	18	21		R	Ro 1
3252E2	0134	2,7	20	20		R	Ro 1
4113W2	0016	1	12	22		R	Ro 1
4113W2	1254	4	15	18		R	Ro 1
3357W2	0371	2	4	3		R	Ro 1
3357W2	0372	4	11	13		R	Ro 1
3357W2	0373	2	3	6		R	Ro 1
3357W2	1115	1,5	15	16		R	Ro 1
3357E1	0224	2,2	22	42		R	Ro 1

¹Φ/Σ: Φύλλο/Σχέδιο, ²Αριθμός Τεμαχίου, ³Κύστες / 100 γρ. εδάφους: Μέτρηση στο στερεοσκόπιο, ⁴Αυγά/γρ εδάφους: Μέτρηση στο μικροσκόπιο, ⁵Είδος: R= *G. rostochiensis* & P= *G. pallida*

Δημοσιεύσεις σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά