

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΔΥΟ ΒΗΜΑΤΩΝ (PCR-RFLP) ΓΙΑ ΕΓΚΑΙΡΟ ΔΙΑΦΟΡΙΚΟ
ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΚΑΙ ΑΔΡΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΤΗΣ
ΠΑΤΑΤΑΣ ΕΦΑΡΜΟΣΙΜΗ ΣΕ ΑΠΟΚΕΝΤΡΩΜΕΝΕΣ ΜΟΝΑΔΕΣ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ
ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ**

Μ. Ε. Καμπούρης¹, Ι. Μανουσόπουλος¹, Γ. Ματσιανίκας², Α. Παπανίκου²,
Μ. Μαραγκάκη², Σ. Κρητικού³, Α. Μηλιώνη³, Σ. Μαντζούκας¹, Α. Βελεγράκη³

1 Ινστιτούτο Προστασίας Φυτών Πάτρας ΝΕΟ & Αμερικής, Πάτρα 26004

2 Demo S.A. Pharmaceutical Industry 21^ο χμ ΕΟ Αθηνών-Λαμίας, Αθήνα 14568

3 Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Μ Ασίας 75-77, Αθήνα 11527
mekambouris@yahoo.com, Τηλ: 2610421264

Περίληψη

Η προσβολή της καλλιέργειας της πατάτας από φυτοπαθογόνους μύκητες μπορεί να επιφέρει σημαντικές οικονομικές απώλειες, με πιθανή παράλληλη κοινωνική διάσταση, σε περίπτωση σοβαρών επιδημιών ή υποβάθμισης του παραγόμενου προϊόντος, ιδίως σε περιοχές όπου παραδοσιακά καλλιεργείται η πατάτα. Η αδυναμία έγκαιρης ταυτοποίησης του παθογόνου συμβάλλει στην αλόγιστη χρήση φυτοφαρμάκων για προληπτική αντιμετώπιση ή γενικευμένη καταστολή της ασθένειας που πολλές φορές γίνεται με τη συχνή χρήση πολλαπλών συνδυασμών μυκητοκτόνων. Οι πρακτικές αυτές, εκτός του ότι εγκυμονούν σοβαρότατους κινδύνους για την υγεία του παραγωγού και του καταναλωτή λόγω της χρήσης τοξικών ουσιών για την καταστολή των ασθενειών που επιβαρύνουν τα προϊόντα, εγκυμονούν παράλληλα τεράστιους κινδύνους για το περιβάλλον, λόγω της εισόδου των ουσιών αυτών ή των προϊόντων διάσπασής τους στην τροφική αλυσίδα, αλλά και της δημιουργίας ανθεκτικότητας ευκαιριακών ανθρωποπαθογόνων μυκήτων σε ομάδες μυκητοκτόνων που χρησιμοποιούνται από κοινού για την καταστολή τους. Η ταχεία διαφοροδιάγνωση μπορεί να συμβάλλει στην μείωση των ανωτέρω κινδύνων με σημαντικά περιβαλλοντικά και οικονομικά οφέλη, ιδίως στην περίπτωση πρόληψης εισόδου και εξάπλωσης νεοαναδυόμενων παθογόνων ή παθογόνων καραντίνας είτε μέσω της καταστολής σημαντικών επιδημιών εν τη γενέσει τους, είτε μέσω της διασφάλισης της εφαρμογής ορθής γεωπονικής πρακτικής, ιδιαίτερα ως μέρος ενός ευρύτερου δικτύου ανταλλαγής πληροφοριών φυτοπροστασίας σε πραγματικό χρόνο. Η διαφοροδιάγνωση, ιδίως στο επίπεδο της διαγνωστικής ρουτίνας, διευκολύνεται όταν λαμβάνονται υπόψη οι τροπισμοί των παθογόνων. Η χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) για ενίσχυση αλληλουχιών πολλαπλών αντιγράφων και χαρακτηριστικών για τους μύκητες (εκκινητές ITS-1/ITS4 που στοχεύουν το πολυμορφικότερο τμήμα του μείζονος συμπλέγματος του ριβοσωμικού DNA) επιτρέπει τον διαφορικό εντοπισμό των μυκήτων έναντι άλλων παθογόνων της πατάτας. Η αδρή ταυτοποίηση με βάση το ηλεκτροφορητικό πρότυπο του προϊόντος PCR είναι εφικτή χάρη στον εγγενή πολυμορφισμό των επιλεγμένων αλληλουχιών, ενώ η ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους, είναι επιτεύξιμη με βάση το περιοριστικό πρότυπο του προϊόντος αυτού με τις ενδονουκλεάσες *MspI* ή/και *Hae III*.

Λέξεις-κλειδιά: μοριακή διάγνωση φυτονόσων, μυκητιάσεις πατάτας, ταυτοποίηση με περιοριστικές πέψεις.

Εισαγωγή

Διεθνώς, σύμφωνα με την Αμερικανική Φυτοπαθολογική Εταιρεία (APS) έχουν αναγνωρισθεί 27 γένη μυκήτων -με την ευρεία έννοια- με ένα ή περισσότερα είδη να

προκαλούν 29 φυτονόσους στην πατάτα. Εξ αυτών έχουν επιλεγεί οι μυκητιακής αιτιολογίας φυτονόσοι της πατάτας που εμφανίζονται στην Ελλάδα και αποδίδονται σε αυτή την εργασία στον Πίνακα 1 σύμφωνα με την επικρατούσα ορολογία φυτοπαθολογικών όρων.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Φυτονόσοι με επίπτωση σε ελληνικά καλλιεργητικά πεδία πατάτας και οι ενεχόμενοι φυτοπαθογόνοι μύκητες.

Ασθένεια (ελλ.)	Disease	Παθογόνος μύκητας (Ανάμορφος)	Παθογόνος μύκητας (Τελειόμορφος)	Φύλο
Ανθράκωση/Μελανή στιγματώση	Black dot	<i>Colletotrichum coccodes</i>	<i>Glomerella</i>	Ασκομύκητας
Καστανή κηλίδωση και μελανή βοθρίωση	Brown spot and Black pit	<i>Alternaria alternata</i>		Ασκομυκητιακός Δευτερομύκητας
Αλτερναρίωση	Early blight	<i>Alternaria solani</i>		Ασκομυκητιακός Δευτερομύκητας
Ξηρή σήψη	Fusarium dry rot	<i>Fusarium oxysporum</i>		Ασκομυκητιακός Δευτερομύκητας
Αδρομυκητίαση (μάρανση) από Φουζάριο (Φουζαρίωση)	Fusarium wilt	<i>F. solani</i>	<i>Gibberella pulicaris</i>	Ασκομύκητας
Γάγγραινα	Gangrene	<i>Phoma solanicola, P. exigua</i>		Ασκομυκητιακός Δευτερομύκητας
Σπογγοσπορίαση	Powdery Scab	<i>Spongospora subterranean</i>		Μυξομύκητας
Περονόσπορος	Late blight		<i>Phytophthora infestans</i>	Ωομύκητας
Φυτοφθορίαση/Ρόδινη σήψη	Pink rot		<i>Phytophthora</i> spp	Ωομύκητας
Ριζοκτονίαση/ μαύρη λέπρωση	Rhizoctonia canker and black scurf	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Thanatephorus cucumeris</i>	Βασιδιομύκητας
Αδρομυκητίαση-μάρανση από Βερτισίλιο (βερτισιλίωση)	Verticillium wilt	<i>Verticillium dahliae, V. albo-atrum</i>		Ασκομυκητιακός Δευτερομύκητας
Καρκίνωση της πατάτας	Wart		<i>Synchytrium endobioticum</i>	Χυτριομύκητας
Αργυρόχρωμη κηλίδωση των κονδύλων ή αργυρά λέπρωση	Silver scurf	<i>Spondylocladium atrovirens = Helminthosporium solani</i>		Ασκομυκητιακός Δευτερομύκητας
Σκωρίαση Κοινή/ Παραμορφωτική	Common /Deforming rust		<i>Puccinia pittieriana Aecidium cantensis#</i>	Βασιδιομύκητας
Υγρή σήψη	Leak		<i>Pythium</i> spp	Ωομύκητας
Σκληρωτίαση, σήψη βλαστού	Stem rot	<i>Sclerotium rolfsii</i>	<i>Athelia rolfsii</i>	Βασιδιομύκητας
Σκληρωτινίαση	White mold		<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Ασκομύκητας
Ιώδης σηψιρριζία	Violet root rot	<i>Rhizoctonia violaceae</i>	<i>Helicobasidium purpureum</i>	Βασιδιομύκητας
Ανθρακώδης σήψη	Charcoal rot	<i>Macrophomina phaseolum</i>		Ασκομυκητιακός Δευτερομύκητας
Ωοσπορίαση	Skin spot	<i>Polyscytalum (Oospora) pustulans</i>		Ασκομύκητας
Ωίδιο	Powdery Mildew	<i>Ovulariopsis/Oidium</i>	<i>Leveillula taurica/ Erysiphe cichoracearum</i>	Ασκομύκητας

Σύμφωνα με το www.informatics.aua.gr:8080/scam/2/resource/592 και με το www.plantprotection.hu/modulok/gorog/potato

\$ Δεν ενδημεί στις μεσογειακές περιοχές, σύμφωνα με το www.plantprotection.hu/modulok/gorog/potato

Δεν ενδημεί στην ΕΕ κατά το EL/06/96/21420000.P00 (EN) ΓΠ/γπ.

Οι μυκητιακές ασθένειες της πατάτας προκαλούν σημαντική θετική και αποθετική ζημιά με πιθανή παράλληλη κοινωνική διάσταση: απώλεια ή υποβάθμιση εσοδείας αλλά και μείωση ζήτησης και αγοραίας αξίας και αύξηση κόστους παραγωγής λόγω μέτρων προληπτικής καταστολής (1). Η ταχεία διαφοροδιάγνωση μπορεί να επιτρέψει την άμεση ταχεία εστιασμένη αντιμετώπιση επιδημιών εν τη γενέσει τους, με αποτέλεσμα την μείωση του κόστους πρόληψης, την υποβάθμιση του προϊόντος (πχ μειωμένη τιμή συμβατικής εσοδείας έναντι ομοειδούς «βιολογικής» όμως καλλιέργειας) εξαιτίας των αδιάκριτων μέτρων πρόληψης και καταστολής με μυκητοκτόνα και της συνεπαγόμενης περιβαλλοντικής επιβάρυνσης που αυτά επιφέρουν. Σε αυτό προστίθεται η παράμετρος της Δημόσιας Υγείας, λόγω δημιουργίας αντοχών σε περιβαλλοντικά είδη μυκήτων που αποτελούν ευκαιριακούς ανθρωποπαθογόνους παράγοντες. Η διαφοροδιάγνωση των ασθενειών, ιδίως στο επίπεδο της διαγνωστικής ρουτίνας, διευκολύνεται όταν λαμβάνονται υπόψη οι τροπισμοί των παθογόνων ιδίως ως προς το είδος αλλά και τα όργανα του φυτού, αν και νεοεμφανιζόμενα παθογόνα μπορούν να ανατρέψουν τις διαγνωστικές συσχετίσεις (2). Περεταίρω σύμπτωση γίνεται βάσει της παρατηρημένης επίπτωσης των παθογόνων σε ελληνικές καλλιέργειες (πχ το γένος *Helicobasidium* δεν είναι συνηθισμένο στην Ελλάδα, ενώ η ασθένεια του ωιδίου είναι πολύ συνήθης σε ελληνικές καλλιέργειες τομάτας αλλά όχι πατάτας).

Ταυτόχρονα, η παρουσία μυκήτων μπορεί να έχει ουδέτερη ή θετική σημασία για τα φυτά. Ουδέτερη για κοινούς σαπροφυτικούς μύκητες που δεν παρουσιάζουν τροπισμό για το *S. tuberosum* και θετική για εντομοπαθογόνους μύκητες που πιθανώς να χρησιμοποιηθούν για βιολογική καταπολέμηση των επιβλαβών εντόμων, όπως συμβαίνει σε άλλα καλλιεργούμενα είδη (3). Η πρώτη κατηγορία, λόγω σαπροφυτικής διαβίωσης δεν αναμένεται να προκαλεί σημαντική παρεμβολή στην παρούσα μέθοδο, λόγω της πολύ μικρότερης παρουσίας της σε σύγκριση με τα ταχέως αναπτυσσόμενα, λόγω εξειδίκευσης με τον ξενιστή, φυτοπαθογόνα, αλλά και λόγω απάλειψης ή ελαχιστοποίησης της ως συνέπεια των μεθόδων εξέτασης και επεξεργασίας του του προσκομιζόμενου φυτοπαθολογικού δείγματος. Η δεύτερη κατηγορία όμως, που σε πιθανές εφαρμογές θα ψεκάζεται-διασπείρεται σε σημαντικό αριθμό φυτών και θα παράγει σημαντικό σήμα, ίσως να μην μπορεί να απομακρυνθεί με την κατεργασία του δείγματος. Για το λόγο αυτό στον διαφοροδιαγνωστικό κατάλογο περιελήφθησαν και τρεις πολλά υποσχόμενοι εντομοπαθογόνοι ενδόφυτοι ασκομύκητες, και συγκεκριμένα τα είδη *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* και *Metarhizium robertsii*.

Σε αυτό το πλαίσιο, πλέον δόκιμη θεωρείται μια προσέγγιση βασισμένη στην ενίσχυση με PCR αλληλουχιών-στόχων χαρακτηριστικών για τους μύκητες, προκειμένου να ταυτοποιηθεί αρχικά η παρουσία μύκητα. Η προσέγγιση αυτή ευνοείται από την ελαχιστοποίηση του εύρους των υπό αναζήτηση παθογόνων λόγω της διαφοροποίησης των σημείων και συμπτωμάτων της φυτονόσου αλλά και των κλιματικών και γεωγραφικών συνθηκών που περιορίζουν σημαντικά το εύρος των πιθανών παθογόνων. μειώνοντας ή και σε μερικές περιπτώσεις μηδενίζοντας σημαντικά το διαγνωστικό πρόβλημα. Στις περιπτώσεις που η εξακρίβωση μυκητιακής αιτιολογίας δημιουργεί απαίτηση διαφοροδιάγνωσης, απαιτείται η δυνατότητα περεταίρω επεξεργασίας του προϊόντος της αντίδρασης ενίσχυσης προκειμένου, μέσω ειδικών διαφορικών προϊόντων, να επιτυγχάνεται διάκριση και αδρή ταυτοποίηση. Η χρήση του προϊόντος της αρχικής PCR έχει θετικό οικονομικό αντίκτυπο καθώς αξιοποιείται ένας έτοιμος και –μετά την ηλεκτροφόρηση-πλεονασματικός πόρος που προκύπτει από μια σημαντική επένδυση (έξοδα απομόνωσης γενετικού υλικού και αντίδρασης PCR). Αντίθετα, η λύση της χρήσης ειδικών εκκινητών για επόμενα βήματα διαφοροποίησης,

με υπόστρωμα το αρχικό εκχύλισμα DNA επιφέρει πολλαπλασιασμό του κόστους ανίχνευσης.

Η ανάλυση του προϊόντος ενέχει δύο παραμέτρους: την ενδογενή αναλυτική δυναμική που εμπεριέχει το εξειδικευμένο αποτύπωμα και την τεχνική που θα επιτύχει την υλοποίηση, την δημιουργία δηλαδή του αποτυπώματος. Η διαφοροποίηση στις αλληλουχίες πυρινηκών οξέων εστιάζεται είτε στην σύσταση της αλληλουχίας είτε στο μήκος είτε στον συνδυασμό και των δύο. Για παράδειγμα η διαφορά μήκους, μέσα βέβαια σε συγκεκριμένα πλαίσια, επιτρέπει τον εξειδικευμένο διαχωρισμό κάποιων προϊόντων που αντανάκλα το γένος ή είδος του μύκητα από όπου προέρχονται. Ως εκ τούτου μια δυνατότητα διάκρισης ενυπάρχει ήδη στο βήμα της αρχικής PCR, αν το προϊόν ενίσχυσης αναλύεται με ηλεκτροφόρηση, προσέγγιση που φυσικά αποτελεί την απλούστερη, κοινότερη και οικονομικότερη επιλογή.

Κατά τα ανωτέρω, ως βασικός στόχος ενίσχυσης επελέγη η περιοχή του μείζονος συμπλέγματος του ριβοσωμικού RNA, καθώς δεν εντοπίζεται σε βακτήρια και ιούς, ενώ είναι κοινή αλλά όχι ίδια σε όλους τους μύκητες. Παράλληλα στην προσέγγιση αυτή συμβάλλει το γεγονός ότι κατά το παρελθόν έχει αποθησαυριστεί σημαντική εμπειρία και τεχνογνωσία που μεταφράζεται και σε κατατεθειμένες αλληλουχίες σε βάσεις δεδομένων ελεύθερης πρόσβασης (αναγκαία για ακριβή καθορισμό κριτηρίων για αξιολόγηση του ηλεκτροφορητικού αποτελέσματος της PCR). Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι το προϊόν ενίσχυσης της περιοχής αυτής με εκκινητές ITS-1/4 (4) χρησιμοποιείται επισήμως και ευρύτατα για αναλυτική μοριακή περιγραφή και ταυτοποίηση μυκήτων (γραμμοκωδικοποίηση/ barcoding), λόγω της αναλογικότητας πολυμορφισμού και φυλογενετικής απόστασης που έχει παρατηρηθεί σε ορισμένες ταξινομικές βαθμίδες (taxa), ενίοτε και ως το επίπεδο του είδους (2).

Μέθοδοι

Έγινε εξόρυξη αλληλουχιών DNA από την αντίστοιχη βάση δεδομένων του NCBI η οποία ενημερώνεται διαρκώς και τυγχάνει καθολικού κύρους και αποδοχής για τους προς εξέταση μύκητες. Από τις ανασυρθείσες αλληλουχίες επελέγησαν αυτές που περιείχαν την πλήρη περιοχή κωδικοποίησης του ριβοσωμικού RNA (18sRNA- ITS1-5,8sRNA -ITS2 -28sRNA) υπό την προϋπόθεση ότι διέθεταν και τις πλευρικές συντηρούμενες αλληλουχίες σε ικανοποιητικό εύρος, ώστε να διακριβώνονται οι θέσεις-στόχοι των εκκινητών ITS-1 ITS-4, και ότι υπήρχε σαφής αναφορά των ορίων λειτουργικής και διαχωριστικής περιοχής, καθώς ο πολυμορφισμός εκτείνεται και στα δύο είδη περιοχών και δεν επιτρέπει την αξιόπιστη διάκρισή τους χωρίς γνώση των λογισμικών εργαλείων του χαρακτηρισμού τους. Η εργασία προέβλεπε σήμανση -με βάση τις πληροφορίες καταθέτη- των διαχωριστικών περιοχών ITS1 και ITS2 και προσδιορισμό του μεγέθους τους με χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής. Οι μετρήσεις συγκεντρώθηκαν σε πίνακα (**Πίνακας 2**) για να επιβεβαιωθεί η δυνατότητα επαρκούς διαχωρισμού και η δημιουργία ικανοποιητικού διαφοροδιαγνωστικού αποτυπώματος των μυκήτων ενδιαφέροντος.

Σε αρκετές περιπτώσεις δεν βρέθηκαν αλληλουχίες επαρκώς εκτενείς για τον επιθυμητό μύκητα. Στις περιπτώσεις αυτές έγιναν αποδεκτές αλληλουχίες με ελλιπή στοιχεία, και τα μεγέθη εκτιμήθηκαν κατά προσέγγιση με βάση τα αντίστοιχα μεγέθη και άλλα χαρακτηριστικά (π.χ ομολογία αλληλουχιών) συγγενών μυκήτων για τους οποίους ήταν διαθέσιμες οι πλήρεις αλληλουχίες (εμφανίζονται με «~» στη στήλη μεγεθών προϊόντος ITS-1/4).

Η ανομοιομορφία των διαφόρων ταξινομικών βαθμίδων ως προς τη έκταση και κατανομή της ετερογένειας αποτέλεσε σημαντικό μειονέκτημα που οδήγησε στην

αναγκαιότητα χρήσης ολόκληρης της περιοχής, για διασφάλιση της μεγιστοποίησης της πιθανότητας διαφοροποίησης των αλληλουχιών, ιδίως ως προς την ομολογία (και δευτερευόντως κατά μήκος), και διευκόλυνση της εξεύρεσης πολυμορφικών στόχων για περιοριστικές πέψεις. Το γεγονός αυτό υποβαθμίζει σημαντικά την διακριτική ισχύ της τεχνικής, καθώς περιορίζεται η δυνατότητα εστίασης σε μια από τις δύο διαχωριστικές περιοχές, οπότε θα ήταν δυνατός ο διαχωρισμός αλληλουχιών που διαφέρουν έστω και κατά ένα ζεύγος βάσεων με χρήση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης.. Πράγματι η χρήση ολόκληρης της περιοχής επιβάλλει ανάλυση με πηκτώματα αγαρόζης τα οποία όμως έχουν κυμαινόμενη διακριτική ισχύ μερικών δεκάδων βάσεων (μεταβαλλόμενη ανάλογα με το ολικό μήκος του προϊόντος).

Στη συνέχεια, επελέγησαν οι κατάλληλες περιοριστικές αλληλουχίες (restriction sites) στο προϊόν της PCR με κριτήρια, το κόστος των αντίστοιχων περιοριστικών ενζύμων που έπρεπε, κατά τα ανωτέρω, να διατηρείται χαμηλό, και τη διασφάλιση της δημιουργίας ικανοποιητικού διαφοροδιαγνωστικού αποτυπώματος. Ως περιοχές που ικανοποιούν τα ανωτέρω κριτήρια αναγνωρίστηκαν αυτές που αντιστοιχούν στα περιοριστικά ένζυμα *AluI*, *HaeIII*, *MspI*, και οι οποίες εκτός των άλλων είχαν εμφανίσει αποδεκτά επίπεδα πολυμορφισμού σε προηγούμενες μελέτες (5) με περιοχές ITS ανθρωποπαθογόνων μυκήτων. Για τις περιοχές αυτές ελέγχθηκαν ο αριθμός, η κατανομή και η θέση τους στα προϊόντα ενίσχυσης ώστε να είναι δυνατή η ταυτοποίηση σύμφωνα με το ανωτέρω περιγραφόμενο διαφοροδιαγνωστικό μοντέλο.

Αποτελέσματα

Ο Πίνακας 2 παρουσιάζει αναλυτικά τα αποτελέσματα της διερεύνησης, και μπορεί να χωριστεί σε δύο ιεραρχημένες περιοχές: την περιοχή όπου το μήκος των προϊόντων της αντίδρασης αρκεί για την διαφοροποίηση, και την περιοχή όπου απαιτείται ο συνδυασμός του με περιοριστική πέψη για επιτυχή διαχωρισμό. Η πρώτη περιοχή αναλύεται σαφώς σε 3 συστάδες, με τους ωομύκητες (O) να έχουν προϊόν >800 ζευγών βάσεων, τους δύο βασιδιομύκητες (B) και τον χυτριομύκητα (C) 600 <> 700 και τους ασκομύκητες (A), που αποτελούν την πλειοψηφία, <600 ζ.β., μαζί με το μυξομύκητα (M).

Η δεύτερη συστάδα, που είναι και η μικρότερη, επιλύεται άμεσα με πέψη με *Msp I* αφού το μεγαλύτερο θραύσμα των τριών μυκήτων είναι 370, 540 και 650 ζ.β., αντίστοιχα, μεγέθη που διακρίνονται ευχερώς και διαχωρίζονται ασφαλώς μεταξύ τους σε ηλεκτροφόρηση αγαρόζης με ενδείκτη μοριακών μεγεθών βήματος 100 ζ.β. Στην πρώτη συστάδα η ίδια πέψη διαχωρίζει σαφώς τα δύο είδη *Phytophthora* μεταξύ τους (η διαφορά μεταξύ 400 και 370 βάσεων είναι σχετικώς ευδιάκριτη, ιδίως επειδή η *P. nicotiana* έχει και τις δύο ζώνες ενώ η *P. infestans* μόνο την δεύτερη) ενώ τα δύο είδη Πύθιου παραμένουν άπεπτα. Αυτό θεωρητικά αρκεί για να διαχωρίσει και τα δύο είδη Πύθιου μεταξύ τους αφού τα άπεπτα προϊόντα ενίσχυσης έχουν 920 και 860 ζ.β. Όμως η διαφορά των 60 βάσεων σε σύγκριση με το μήκος τους δεν επιτρέπει διάκριση με βεβαιότητα σε πηκτώματα αγαρόζης. Αντίθετα, η εξαρχής πέψη με *HaeIII* δίνει άπεπτο προϊόν ενός είδους ενώ τα προϊόντα των άλλων τριών ειδών πέπτονται, έχοντας ευδιάκριτα και χαρακτηριστικά μέγιστα θραύσματα (740, 620 και 450 ζ.β.). Εναλλακτικά, για να μην διαφοροποιείται το πρωτόκολλο με διαζευκτική χρήση ενζύμων και να ακολουθείται τυποποιημένη διαδικασία κατά το δυνατόν, η πέψη με *HaeIII* μπορεί να επιτελεστεί ως ακόλουθη πέψη (δηλαδή να διεξάγεται επί ηλεκτροφορητικής τεκμηρίωσης απέπτου προϊόντος με *MspI*) προκειμένου να επιτευχθεί η επιθυμητή διάκριση.

Η τρίτη συστάδα είναι η πλέον πολυπληθής και δυσχερής. Η-σπάνια- έλλειψη έστω και μίας περιοριστικής θέσης για *MspI* ταυτοποιεί αρνητικά το *Helminthosporium solani*, και η επιβεβαίωση με *Hae III* καθιστά την ταυτοποίηση ασφαλή. Το μείζον θραύσμα των 430 ζ.β. ταυτοποιεί ασφαλώς και το *Colletotrichum coccodes*. Το *F. solani* ταυτοποιείται από το ενιαίο, δθζωνικό του πρότυπο, που όμως είναι αρκετά παρόμοιο με αυτό της *S. sclerotiorum*. Η χρήση *HaeIII* όπου η δεύτερη έχει μείζον θραύσμα 430 ζ.β. έναντι 240 ζ.β. του *F. solani* επιλύει πλήρως το θέμα. Ομοίως, το μόλις 240 ζ.β. μείζον θραύσμα του *V. dahliae*, που μπορεί να μην είναι καν ορατό σε συνήθη ηλεκτροφόρηση αгарόζης, είναι χαρακτηριστικό ως απώλεια του προϊόντος ενίσχυσης.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Ανάλυση πολυμορφικότητας των αλληλουχιών ITS για 15 παθογόνους μύκητες της πατάτας

Μύκητας	GenBank Acc #	ITS1	ITS2	Taxon	ITS-1/4	<i>Msp I</i>	<i>HaeIII</i>
<i>Helminthosporium solani</i>	KC106739.1	168	161	A	569	569	540, 40
<i>Colletotrichum coccodes</i>	JQ005775.1	173	155	A	578	140, 430	112, 10, 170, 280
<i>Phoma exigua</i>	HQ713781.1	138	158	A	~ 540	140, 390	~540
<i>Alternaria solani</i>	KC584217.1	171	167	A	577	60, 140, 370	365, 140, 65
<i>Fusarium solani</i>	EU326207.1	151	167	A	568	210, 340	240, 120,90, 85, 15, 10
<i>Verticillium dahliae</i>	AF104926.1	128	166	A	540	240, 200, 100	340, 150, 30, 25
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	JQ739461.1	148	146	A	540	235, 307	430, 110
<i>Isaria fumosorosea</i>	AF368805.1	182	157	A#	580	X	260, ...
<i>Metarhizium robertsii</i>	KC355183.1	132	175	A#	560	360, 100, 100	416, 140
<i>Beauveria bassiana</i>	KC688689.1	159	155	A#	565	X	345, 120, 85, 55, 20
<i>Sclerotium rolfsii</i>	KC292637.1	240	234	B	690	130, 540	
<i>Rhizoctonia solani</i>	KM013471.1	205	239	B	688	70, 650	
<i>Synchytrium endobioticum</i>	KF160870.1	224	172	C	633	270, 370	600, 30
<i>Spongospora subterranea</i>	AF104308.1	150	125	M	548	45, 45, 80, 370	548
<i>Pythium ultimum</i>	JN695787.1	230	435	O	~920	~920	450, 280, 180
<i>Pythium aphanidermatum</i>	KF561235.1	174	443	O	~860	~860	620, 240
<i>Phytophthora nicotianae</i>	KF601194.1	226	415	O	~890	120, 370, 400	740, 150
<i>Phytophthora infestans</i>	AJ854292.1	218	415	O	~880	370, 225, 280	~880

X: Αδυναμία εντοπισμού θραυσμάτων λόγω μικρού μεγέθους, ~: μέγεθος εκ συναγωγής, κίτρινο φόντο: χαρακτηριστικό θραύσμα ή συνδυασμός θραυσμάτων για την διαφοροποίηση εντός συστάδας. Τα ομοιόχρωμα πρότυπα εμφανίζουν προβλήματα διάκρισης στην τρίτη συστάδα, #: εντομοπαθογόνοι ασκομύκητες.
Ωομύκητες (O), βασιδιομύκητες (B), χυτριομύκητας (C), ασκομύκητες (A), μυξομύκητας (M).

Τέλος, σε αгарόζη δεν μπορεί να διακριθεί κάποιο από τα *A. solani*, *Phoma exigua* και *S. subterranea*, καθώς τα ήσσονα θραύσματα με *MspI* είναι μη ανιχνεύσιμα και τα μείζονα ταυτόσημα ή παραπλήσια, πολύ κάτω από τη διακριτική ικανότητα τέτοιων

πηκτωμάτων. Η εξαρχής πέψη με *HaeIII* διαφοροποιεί μόνο την *A. solani* που δίνει μείζον θραύσμα 365 ζ.β., ενώ τα προϊόντα των άλλων δύο - καθόλου συγγενικών- ειδών *Phoma exigua* και *S. subterranea* παραμένουν άπεπτα.

Μικτές πέψεις ή εξαρχής πέψη με *AluI* δεν διαχωρίζουν τα δύο είδη, παρά μόνο όταν εμφανίζεται το ήσσον θραύσμα 270 ζ.β., της *S. subterranea*, που αν ανιχνευθεί σε πήκτωμα αγαρόζης, μπορεί να τα διαφοροποιήσει. Αν και η εμφάνισή του θραύσματος αυτού έχει εξαιρετικά υψηλή θετική διαγνωστική αξία, η μη εμφάνισή του πρέπει να αξιολογείται μόνο σε πηκτώματα υψηλής ποιότητας και παρουσία θετικών και αρνητικών, ποσοτικά σταθμισμένων μαρτύρων από προηγούμενα πειράματα. Από τους εντομοπαθογόνους ασκομύκητες, οι *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* πέπτονται με τέτοια πολλαπλότητα από το *MspI*, που το προϊόν ενίσχυσης εξαφανίζεται χωρίς ορατό στην αγαρόζη προϊόν. Αντίθετα, από το *Metarhizium robertsii* προκύπτει ένα μάλλον τυπικό μείζον θραύσμα 360 ζ.β., αλλά με *HaeIII* προκύπτει διαφοροποιό θραύσμα 416 ζ.β.

Το επιλεγμένο δείγμα μυκήτων επιλύεται χωρίς χρήση πολυακρυλαμιδίου ή σταθμικού παράγοντα (πλην της γεωγραφικής κατανομής και συχνότητας, που περιόρισε εξ' αρχής τα γένη). Σε περίπτωση που ληφθούν υπόψη και μερικά συγγενή είδη των εξετασθέντων μυκήτων, (όπως *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Verticillium albo-atum*), πιθανόν να χρειαστούν σταθμικοί παράγοντες ή έστω περισσότερα είδη ενδονουκλεασών.

Συμπεράσματα

Το διαγνωστικό πρόβλημα που περιγράφεται, διευκολύνεται θεωρητικά με τη χρήση του σταθμικού παράγοντα του τροπισμού και της ανατομικής εξειδίκευσης του παθογόνου μύκητα, σε συνδυασμό με τα συμπτώματα στο προσβεβλημένο φυτό. Για παράδειγμα η Ωσπορίαση, ως νόσος αποθήκευσης, δεν παρουσιάζει πιθανότητα σύγχυσης και δεν απαιτεί μεθοδολογία ανίχνευσης βασισμένη σε πυρηνικά οξέα για διαφοροδιάγνωση. Παράλληλα, η αναλυτική διαγνωστική προσέγγιση θα μπορούσε να προβλέπει την πλήρη ταυτοποίηση καθ' είδος του εμπλεκόμενου μύκητα από δείγμα φυτικού ιστού (6-11), χωρίς στάθμιση, λόγω τροπισμού. Μια τέτοια προσέγγιση αν και επιστημονικώς άρτια είναι από διαφοροδιαγνωστική άποψη υπερβολική. Η πλήρης ταυτοποίηση πολλών, πολύ διαφορετικών μεταξύ τους μυκήτων (έχουν αναφερθεί τουλάχιστον 10 ως ενεχόμενοι σε ελληνικά κρούσματα σύμφωνα με το «www.plantprotection.hu/modulok/gorog/potato» ενώ η μαξιμαλιστική προσέγγιση που ακολουθήθηκε από την ιστοσελίδα «www.informatics.aul.gr:8080/scam/2/resource/592» περιλαμβάνει 17) απαιτεί πολυφασική προσέγγιση επειδή ο βαθμός ταξινομικής διαφοροποίησης μεταξύ δύο στελεχών δεν είναι γραμμική συνάρτηση των διαφορών των συγκεκριμένων αλληλουχιών καθενός εξ' αυτών (5). Επιπλέον, γραμμικές σχέσεις μεταξύ ταξινομικής διαφοροποίησης και διαφοράς αλληλουχίας εμφανίζονται με διαφορετικές κλίσεις σε διαφορετικές μυκητιακές ταξινομικές βαθμίδες (2): Μπορεί ένα γένος να παρουσιάζει πολύ μικρές διαφοροποιήσεις αλληλουχίας μεταξύ των ειδών του και ένα άλλο γένος, σε φυλογενετική εγγύτητα, να παρουσιάζει εντονότερες διαφορές αλληλουχίας μεταξύ των ειδών του, που να προσεγγίζουν τις αποκλίσεις μεταξύ ανώτερων ταξινομικών βαθμίδων. Ως παράδειγμα τέτοιας ασυνέχειας υποδεικνύονται, στον Πίνακα 2, τα ωομυκητιακά Γένη *Phytophthora* και *Pythium* αντίστοιχα.

Η μεθοδολογία που στηρίζεται στη χρήση κοινών για όλους τους μύκητες αλληλουχιών ως στόχων ενίσχυσης με PCR για τον εντοπισμό γενικευμένης μυκητιακής παρουσίας

και τη συνεπακόλουθη ταυτοποίηση της αλληλουχίας με βάση το προϊόν της ενίσχυσης, υπερτερεί σημαντικά σε σχέση με τις συνηθέστερες προσεγγίσεις που αφορούν ειδικές αλληλουχίες-στόχους για κάθε είδος (1). Οι υψηλής εξειδίκευσης, στενού φάσματος αντιδράσεις PCR απαιτούν εκτενές γνωσιολογικό υπόβαθρο και σημαντική επένδυση σε εκκινητές, για χρήση ρουτίνας, ενώ απαιτούν αυξημένο χρόνο διεξαγωγής ολοκληρωμένης εξέτασης προκειμένου να διεξαχθούν σειριακά αντιδράσεις PCR για όλους τους ύποπτους μύκητες. Αυτό, αν ληφθεί υπόψη η πιθανότητα απαίτησης διάκρισης όχι μόνο μεταξύ πιθανά ενεχόμενων μυκήτων, αλλά και έναντι άλλης κατηγορίας παθογόνων, όπως για παράδειγμα βακτηρίων και ιών, δημιουργεί την ανάγκη για σημαντικό αριθμό αντιδράσεων, που αυξάνει το κόστος και το χρόνο κάνοντας πιθανότατα ασύμφορη την προσέγγιση για εφαρμογή σε αποκεντρωμένες μονάδες με λιτό προϋπολογισμό και ελλιπή στελέχωση. Η δυνατότητα διαζευκτικών πολυπλεκτικών προσεγγίσεων (πολλά ειδικά ζεύγη εκκινητών για την εξέταση ενός δείγματος σε μια αντίδραση, όπου αναμένεται τυπικά ένα προϊόν, από τον ενεχόμενο μεταξύ των υπόπτων στόχων) ενώ μειώνει τον αριθμό, το χρόνο και το κόστος τέτοιων αντιδράσεων, απαιτεί σημαντικούς συμβιβασμούς ως προς τη σχεδίαση των εκκινητών ώστε να έχουν πολύ στενό εύρος θερμοκρασιών υβριδισμού, να μην παρουσιάζουν μεταξύ τους παραγωγικές αλληλεπιδράσεις και να είναι περίπου παρόμοιοι μεγέθους ώστε να μην ευνοούνται κάποια προϊόντα λόγω μικρότερου μεγέθους. Και φυσικά, πρέπει να διατηρούν την εξειδίκευσή τους όχι μόνο ανά καθορισμένα ζεύγη αλλά και ανά ανασυνδυαστικά ζεύγη, να παρουσιάζουν διακριτά προϊόντα ώστε να υπάρχει δυνατότητα διαφοροποίησης, αλλά όχι σε μεγάλο βαθμό, ώστε να μην παρουσιάζονται φαινόμενα ασύμμετρης ενίσχυσης ενός τύπου έναντι άλλου. Ακόμη και αν χρησιμοποιηθούν τεχνικές σήμανσης ανεξάρτητες του μήκους, που ενέχουν σημαντικότατο κόστος σε αναλώσιμα και εξοπλισμό, όλα τα υπόλοιπα προβλήματα παραμένουν και καθιστούν δυσχερείς τις πολυπλεκτικές PCR.

Επιπλέον διαφοροποίηση, ως προς την αλληλουχία, μπορεί να επέλθει με αλληλούχηση, με περιοριστικές πέψεις, με επάλληλη PCR και με υβριδισμό σημασμένου ή άλλως ανιχνεύσιμου ιχνηθέτη (probe) κινητής ή ακινητοποιημένης φάσης. Η αλληλούχηση, αν και σε κόστος έχει μειωθεί, απαιτεί είτε αποστολή δειγμάτων είτε προμήθεια ακριβού εξοπλισμού, υποδομής και αναλωσίμων και αντίστοιχα εκπαιδευμένου προσωπικού. Επίσης ενέχει τον κίνδυνο μικροδιαφοροποιήσεων σε μη συντηρημένες περιοχές, που απαιτούν ανάπτυξη ειδικών αλγορίθμων για ασφαλή ερμηνεία των αποτελεσμάτων τόσο στην ερμηνεία της αλληλουχίας πρωτογενώς, δηλαδή στην φάση της τεχνικής αναγνώρισης βάσεως, όσο και στην φάση της ευθυγράμμισης και σύγκρισης αλληλουχιών. Η αλληλούχηση απαιτεί σημαντική εμπειρία από τους χρήστες και μερικές φορές είναι αναγκαία η διαφοροποίηση των κριτηρίων αναγνώρισης των νουκλεοτιδίων με επέμβαση στο λογισμικό των αυτόματων αλληλουχοποιητών, μια διαδικασία όχι μόνο απαιτητική και πολύπλοκη, αλλά και αίτιο τριβών με τις κατασκευάστριες εταιρείες για την απίθανη περίπτωση που μπορεί ένα εργαστήριο να την υλοποιήσει.

Τα ίδια μειονεκτήματα και πολύ λιγότερα πλεονεκτήματα απορρέουν από τη χρήση της μεθόδου του διαμορφωτικού πολυμορφισμού μονήρους αλυσίδας (SSCP) που είναι ασταθέστερη και δεν ποσοτικοποιεί ή καθορίζει τις θέσεις όπου εστιάζεται η διαφορά μεταξύ δύο αλληλουχιών. Η μέθοδος είναι εξίσου ευαίσθητη(υπερευαίσθητη) σε ασήμαντες μεταλλάξεις/πολυμορφισμούς μιας αλληλουχίας χωρίς να έχει την ιεραρχικότητα και την εξειδίκευση αναλυτική ισχύ της αλληλούχησης που επιτρέπει χρήση αλγορίθμων σύνταξης δένδρογραμμάτων και λοιπών φυλογενετικών και ταξινομικών απεικονίσεων.

Επί προσθέτως, καθώς η μέθοδος της επάλληλης PCR περιορίζει ελάχιστα τα μειονεκτήματα της πολυπλεκτικής PCR ενώ είναι κατάλληλη για ακόμη μικρότερο εύρος αλληλουχιών-στόχων δεν θεωρείται από άποψη επιχειρησιακού κινδύνου, κόστους και απόδοσης η ενδεδειγμένη προσέγγιση για την διαφοροδιάγνωση ασθενειών. Η χρήση ιχνηθετών θα μπορούσε να αξιολογηθεί, αν και απαιτεί χρήση ενός ιχνηθέτη ανά είδος, αυξάνοντας έτσι το κόστος, και εξειδικευμένη υποδομή ανάλυσης σήματος, που περιλαμβάνει μεγάλο κόστος υποδομής και αναλωσίμων, εξειδίκευσης προσωπικού (χειρισμός τεχνολογίας σήμανσης, ουδός λόγου σήματος/υποβάθρου, καμπύλη υποβάθμισης σήματος κλπ). Με βάση τα ανωτέρω, μια ελκυστική λύση φαίνεται να αποτελεί η χρήση περιοριστικών πένσεων, που αξιοποιεί τις υπάρχουσες υποδομές και το προϊόν της PCR, και δεν απαιτεί την εκ νέου χρήση κοστοβόρων αναλώσιμων για επανάληψη αντιδράσεων PCR. Επιπλέον, η προσεκτική επιλογή ενζύμου μπορεί να κρατήσει το κόστος χαμηλά και να αποδώσει το επιθυμητό διαφοροδιαγνωστικό αποτέλεσμα. Τέλος, η διακριτική ισχύς μπορεί να αυξηθεί με μικτές πέψεις, ταυτόχρονες ή διαδοχικές ανάλογα με τις απαιτήσεις των ενζύμων σε χημικό περιβάλλον.

Η εξέταση των κατατεθειμένων αλληλουχιών έδειξε ότι υπάρχουν, σε μερικές περιπτώσεις, διαφοροποιήσεις στην αλληλουχία-στόχο του εκκινητή ITS-1 (στην λειτουργική περιοχή 18S). Αν και η φύση των περισσοτέρων πολυμορφισμών που παρατηρήθηκαν μπορεί να ερμηνευθεί ως λάθος στον χαρακτηρισμό των βάσεων από τον αυτόματο αλληλοχρησιμοποιητή που χρησιμοποιούν οι καταθέτουσες ομάδες (αδύνατο να επιβεβαιωθεί χωρίς τα χρωμογράμματα) και χωρίς συνέπειες για τη πρόσδεση του εκκινητή, η οποιαδήποτε σχετική πειραματική/αναπτυξιακή εφαρμογή επωφελείται από την εγγενή ύπαρξη εναλλακτικής λύσης. Μια τέτοια λύση αποτελεί ο εκκινητής ITS-5 (12), που προσδένεται ανοδικά σε σχέση με τον ITS-1 ακριβώς προ αυτού και βιβλιογραφικά θεωρείται περισσότερο αξιόπιστος, ενώ τα περιοριστικά πρότυπα μεταβάλλονται μόνο κατά την αύξηση ενός θραύσματος κατά 20 ζ.β.

Βιβλιογραφία

1. Tooley PW, Bunyard BA, Carras MM, Hatziloukas E. (1997). «Development of PCR primers from internal transcribed spacer region 2 for detection of *Phytophthora* species infecting potatoes.» *Appl Environ Microbiol* 63(4): 1467-70.
2. Balajee SA, Borman AM, Brandt ME, Cano J, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, Guarro J, Haase G, Kibbler CC, Meyer W, O'Donnell K, Petti CA, Rodriguez-Tudela JL, Sutton D, Velegriaki A, Wickes BL. (2009) «Sequence-based identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and Mucorales in the clinical mycology laboratory: Where are we and where should we go from here?» *J Clin Microbiol.* 47(4): 877–884.
3. Mantzoukas S, Milonas P, Kontodimas D, Angelopoulos K. (2013). «Interaction between the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and two entomopathogenic fungus in bio-control of *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre) (Lepidoptera: Noctuidae).» *Ann Micro* 63: 1083-1091.
4. White TJ, Bruns T, Lee S. and Taylor J. 1990. In : Innis MA, Gelfand D H, Sninsky JJ, White TJ. (Eds): "PCR Protocols. A guide to methods and applications". Academic Press Inc., San Diego, 315-22.
5. Velegriaki A, Kambouris M E, Skiniotis G, Savala M, Mitroussia- Ziouva A and Legakis NJ. (1999). "Identification of medically significant fungal genera by Polymerase Chain

- Reaction followed by Restriction Enzyme Analysis". *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 23: 303-12.
6. Errampalli D, Saunders J, Cullen D. (2001). «A PCR-based method for detection of potato pathogen, *Helminthosporium solani*, in silver scurf infected tuber tissue and soils. *J Microbiol Methods* 44(1):59-68.
 7. Cullen DW, Toth IK, Boonham N, Walsh K, Barker I, Lees AK. (2007). «Development and Validation of Conventional and Quantitative Polymerase Chain Reaction Assays for the Detection of Storage Rot Potato Pathogens, *Phytophthora erythroseptica*, *Phytophthora ultimum* and *Phoma foveata*.» *J Phytopathol* 155(5): 309–315
 8. Cullen DW, Toth IK, Pitkin Y, Boonham N, Walsh K, Barker I, Lees AK. (2005). «Use of Quantitative Molecular Diagnostic Assays to Investigate *Fusarium* Dry Rot in Potato Stocks and Soil». *J Phytopathol* 95(12):1462-71.
 9. Lees AK, Sullivan L, Lynott JS, Cullen DW. (2012). «Development of a quantitative real-time PCR assay for *Phytophthora infestans* and its applicability to leaf, tuber and soil samples». *Plant Pathol* 61: 867–876.
 10. Lees AK & Hilton AJ. (2003). «Black dot (*Colletotrichum coccodes*): an increasingly important disease of potato». *Plant Pathol* 52: 3–12.
 11. Lees AK, Cullen DW, Sullivan L, Nicolson J. (2002). «Development of conventional and quantitative real-time PCR assays for the detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG-3 in potato and soil». *Plant Pathol* 51: 293–302.
 12. Irinyi L, Serena C, Garcia-Hermoso D, Arabatzis M, Desnos-Ollivier M. et al. (2015). «International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database—the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi» *Med Mycol* 53(4):313-337.

Ευχαριστίες

Η ανωτέρω χρηματοδοτήθηκε μερικώς από τα Έργα Ροπαfung (ΚΥΠΕ 3312/90 στον Μ. Ε. Καμπούρη) και Pathaphid (ΚΥΠΕ 3526/177 στον Σ. Μαντζούκα), του Ινστιτούτου Προστασίας Φυτών Πάτρας (Υπεύθυνος Παρακολούθησης Δρ Ι. Μανουσόπουλος) της Πράξης «Εκπόνηση σχεδίων Ερευνητικών & Τεχνολογικών Αναπτυξιακών Έργων Καινοτομίας (ΑγροΕΤΑΚ)» MIS 453350, στο πλαίσιο του ΕΠ «ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ, (ΕΠΑΝΑΔ,ΕΣΠΑ 2007-2013)». με συγχρηματοδότηση από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο (ΕΚΤ) και από Εθνικούς πόρους (ΕΣΠΑ 2007-2014), και υπό τον συντονισμό του ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ.

**TWO-STEP MOLECULAR METHODOLOGY (PCR-RFLP) FOR DIFFERENTIAL
DETECTION AND BROAD IDENTIFICATION OF AGRICULTURALLY-IMPORTANT
FUNGI APPLICABLE IN DECENTRALIZED UNITS OF AGRICULTURAL DEVELOPMENT**

M E Kambouris¹, J Manousopoulos¹, G Matsianikas², A Papanikou²,
M Maragaki², S Kritikou³, A Milioni³, S Mantzoukas¹, A Velegraki³

1 Plant Protection Institute of Patras, NEO & Amerikis Ave., Patras 26004 GREECE

2 Demo S.A. Pharmaceutical Industry, 21st km Nat Road Athens-Lamia, Athens 14568 GREECE

3 Laboratory of Microbiology, Medical School, National & Kapodistrian University of Athens, 75-77
Mikras Asias st., Athens 11527 GREECE, mekambouris@yahoo.com, Tel : ++302610421264

Abstract

Potato diseases caused by fungal pathogens are agents of massive economic loss sometimes igniting social upheaval not only whenever occurring, by destroying/degrading the production, but also even without occurring, due to the diminishing of the commercial value brought about by precautions and measures taken to forestall fungal growth, such as spraying crops with antifungals compared to biological practices. The prompt differential diagnosis of fungal pathogens by molecular methodologies may allow early diagnosis and response with correct geponic practices, bringing about significant economic and environmental profit, especially when intercepting quarantine or emerging pathogens. Differential diagnosis may be facilitated in terms of routine performance if pathogen preferences are taken into account. The use of PCR to amplify multi-copy fungal sequences defined by the ITS-1/4 primer pair allows the selective detection of fungi over viruses, nematodes and bacteria while the inherent polymorphism of the target sequence allows a rough classification by the amplicon length and a more detailed one, down to species level, by restriction digestion profiling using the *Msp* I and the *Hae* III endonucleases.

Keywords: molecular diagnosis of plant disease, potato fungal disease, identification by restriction digestion.