

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ-ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

Μελέτη βακτηριακής χλωρίδας στο έντομο
Cydia pomonella (καρπόκαψα)



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ ΧΑΤΖΗ ΙΩΑΝΝΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2010



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 8113/1

Ημερ. Εισ.: 23-03-2010

Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: Δ

595.78

ΧΑΤ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087117

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
Αρ.θ. Πρωτ. 13
Ημερομηνία 16-2-10

Μελέτη βακτηριακής χλωρίδας στο έντομο
Cydia pomonella (καρπόκαψα)

Πηγή της εικόνας του εξώφυλλου - www.insectscience.co.za/index.cfm?Aid=1885886237

Τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής είναι:

Μαρκουλάτος Παναγιώτης, Καθηγητής του τμήματος Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ματθιόπουλος Κων/ντίνος, Αναπλ. Καθηγητής του τμήματος Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μόσιαλος Δημήτριος, Λέκτορας του τμήματος Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ημερομηνία κατάθεσης πτυχιακής εργασίας: 12/2/2010

Το εργαστηριακό – πειραματικό μέρος της πτυχιακής εργασίας με τίτλο «Μελέτη βακτηριακής χλωρίδας στο έντομο *Cydia pomonella* (καρπόκαψα)» πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας το χρονικό διάστημα Μάρτιος – Νοέμβριος (2009).

Ο επιβλέπων καθηγητής της πτυχιακής εργασίας είναι ο καθηγητής του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Μαρκουλάτος Παναγιώτης.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου και μου ανέθεσε το συγκεκριμένο ερευνητικό έργο καθώς και για την δυνατότητα που μου έδωσε να αποκτήσω την πολύτιμη αυτή εργαστηριακή εμπειρία.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Δρ. Μαργαριτόπουλο Ιωάννη (τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, Παν/μιο Θεσσαλίας), για την πολύτιμη βοήθειά του σε όλη τη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος και την εύρυθμη συνεργασία μας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους Κουσκουρίδα Κωνσταντίνο και Αργυρούλη Κωνσταντίνο για την πολύμηνη φιλοξενία μου στους αγρούς τους, καθώς και σε όλα τα μέλη των εργαστηρίων όπου απαιτήθηκε να εργαστώ, για τις χρήσιμες συμβουλές τους και το φιλικό κλίμα συνεργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 Στοιχεία βιολογίας της <i>Cydia pomonella</i>	8
1.2 Συμβιωτικές σχέσεις.....	14
1.2.1 Μελέτη και Ταυτοποίηση συμβιωτικών βακτηρίων.....	15
1.2.2 Αλληλεπίδραση.....	16
1.2.3 Επίδραση στον ξενιστή.....	17
1.2.4 Επίδραση στο βακτήριο.....	20
1.3 Σκοπός της εργασίας.....	22
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	23
2.1 Δειγματοληψία.....	23
2.1.1 Παγίδες φερομόνης.....	23
2.1.2. Παγίδες κυματοειδούς χάρτου.....	24
2.2 Υλικά και μέσα καλλιέργειας βακτηρίων.....	25
Tryptone Soy Broth.....	25
Tryptone Soy Agar.....	26
McConkey Agar.....	27
2.3 Stock γλυκερόλης.....	27
2.4 Διαδικασία ομογενοποίησης των εντόμων και επίστρωση σε τριβλία με θρεπτικό μέσο.....	28
2.5 Μοριακή ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών.....	29
2.6 Απομόνωση DNA.....	29
2.6.1 Πρωτόκολλο Απομόνωσης DNA κατά Spilker.....	29
2.6.2 Πρωτόκολλο Απομόνωσης DNA από έντομο με 5% Chelex 100 (Bio-Rad)....	30
2.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	31
2.8 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	32
2.9 Καθαρισμός προϊόντων PCR.....	33
2.10 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας DNA ανά δείγμα.....	34
2.11 Αλληλούχιση του 16S rRNA γονιδίου και ανάλυση των αλληλουχιών.....	35

2.12 Κατασκευή Φυλογενετικού Δέντρου.....	36
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	37
3.1 Μοριακή ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών.....	37
3.2 Χαρακτηρισμός των απομονωθέντων βακτηρίων σε επίπεδο είδους.....	42
3.3 Χαρακτηρισμός των απομονωθέντων βακτηρίων σε επίπεδο γένους.....	45
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	51
4.1 Προβληματισμοί.....	53
4.2 Κατευθύνσεις για το μέλλον.....	54
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	56
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....	66
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ.....	69

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Στοιχεία βιολογίας της *Cydia pomonella*

Cydia pomonella (L.)

(*Carposcapa pomonella*, *Laspeyresia pomonella*)

(Lepidoptera, Tortricidae)

Καρπόκαψα ή σκουλήκι των μήλων



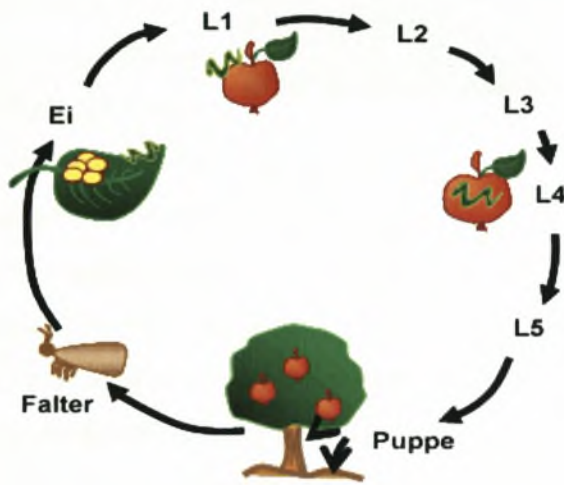
Εικ.1.ενήλικο άτομο καρπόκαψας
(File: 2000 x 1333 - 698k - jpg
commons.wikimedia.org)

i) Περιγραφή εντόμου Έχει μήκος 7-10 mm, άνοιγμα πτερύγων 14-24 mm και χρωματισμό χαρακτηριστικό που δεν συγγέεται με άλλα είδη που προσβάλλουν γιγαρτόκαρπα, παρά μόνο με ένα άλλο είδος της ίδιας οικογένειας, το *Laspeyresia pyginnora*. Οι πρόσθιες πτέρυγες έχουν γενικό χρώμα τεφρό ή τεφροκάστανο και λεπτές εγκάρσιες ή καστανόμαυρες γραμμώσεις. Σε πολλά άτομα, το βασικό 1/3 περίπου μέρος των πρόσθιων πτερύγων είναι σαφώς πιο σκοτεινό από το μεσαίο. Κοντά στην κορυφή και προς την πυγαία γωνία τους, οι πρόσθιες πτέρυγες έχουν μια σχετικά μεγάλη σκοτεινόχρωμη κηλίδα, που ονομάζεται speculum. Η χαρακτηριστική αυτή κηλίδα έχει βασικό χρώμα καστανό, και πλαισιώνεται από δύο μπρούτζινες και λαμπερές γραμμές σε σχήμα παρένθεσης. Η εσωτερική (προς το κέντρο της πτέρυγας) γραμμή έχει δίπλα και κατά μήκος της μια στενή μαύρη ζώνη. Κατά μήκος της πρόσθιας παρυφής (costa) των πρόσθιων πτερύγων, υπάρχουν μικρές σκοτεινές καμπύλες γραμμές σε σχήμα κόμματος, που γίνονται πιο έντονες στο ακραίο ήμισυ της πτέρυγας. Οι κροσσοί είναι χρώματος χρυσαφί. Οι οπίσθιες πτέρυγες έχουν χρώμα καστανό προς χαλκόχρουν με χρυσιζουσες ανταύγειες. Είναι σκοτεινότερες προς την περίμετρο, και έχουν στη βάση τους μια ομάδα μακρών σκοτεινών τριχών σε σχήμα λαβίδας (cubitus). Στην κοιλιακή (κάτω) επιφάνειά τους, και τα δύο ζεύγη πτερύγων έχουν στο θηλυκό το ίδιο χρώμα, τεφροκάστανο με χαλκόχρωμες ανταύγειες, ενώ στο αρσενικό οι πρόσθιες πτέρυγες έχουν στη μέση και προς τα εμπρός μια σκοτεινόχρωμη κηλίδα σχεδόν ορθογώνιου σχήματος (Εικ.1).

ii) Ξενιστές. Μηλιά, αχλαδιά, κυδωνιά, καρυδιά, βερικοκιά, ροδακινιά, αμυγδαλιά, δαμασκηνιά. Προσβάλλει συνήθως τους καρπούς των 5 πρώτων ειδών. Κατ'

εξαίρεση, η προνύμφη μπορεί να αναπτυχθεί και σε καρπούς λωτού, σορβιάς, καστανιάς, μουσμουλιάς, ροδιάς, πορτοκαλιάς (Bovey 1966).

iii) Βιολογικός κύκλος (Εικ.2). Ο αριθμός των γενεών ποικίλλει με το κλίμα της περιοχής. Στην Ελλάδα συνήθως έχει 2-3 γενεές το έτος, ενώ σε ψυχρές χώρες μια γενεά. Διαχειμάζει ως αναπτυγμένη προνύμφη σε βομβύκιο κάτω από ξερούς φλοιούς και ρωγμές του κορμού και των κλάδων, ή σε διάφορα άλλα κοντινά καταφύγια και στο έδαφος. Σε



Εικ.2. Ο βιολογικός κύκλος της καρπόκαμας
Puppe=νύμφη, falter= ενήλικο, Ei=αυγά, L1-L5=
εμφάνιση προνυμφών, είσοδος στους καρπούς,
ανάπτυξη, έξοδος, νύμφωση.(Entwicklungszyklus
314 x 305 - 10k- gifapfelwickler.de)

δέντρα με φλοιό λείο, που δεν προσφέρουν αρκετά καταφύγια διαχείμασης, το ποσοστό του προνυμφικού πληθυσμού που διαχειμάζει στο έδαφος είναι μεγαλύτερο. Η νύμφωση γίνεται την άνοιξη και τα ενήλικα εμφανίζονται Απρίλιο-Μάιο. Στη βόρεια Ελλάδα εμφανίζονται κυρίως τον Μάιο, και το μέγιστο του ενήλικου πληθυσμού παρατηρείται περίπου 1-2 εβδομάδες μετά την πτώση των πετάλων της μηλιάς (εξαρτάται από την ποικιλία του δέντρου). Το θηλυκό τοποθετεί τα αυγά του στα φύλλα, τους μικρούς βλαστούς, ή τους μικρούς καρπούς.

Η νεαρή προνύμφη (Εικ.3) αφού βαδίζει και φτάσει σε ένα νεαρό καρπό, μπαίνει μέσα στον καρπό συνήθως από τον κάλυκα. Μπορεί όμως να μπει και από άλλα σημεία, ιδίως δε όπου ο καρπός ακουμπά σε γειτονικό καρπό, φύλλο ή βλαστό



Εικ.3. Η προνύμφη της καρπόκαμας
(www.papillon-Poitou charentes.org/
Cydia-pomon.)

Η προνύμφη κατευθύνεται προς το κέντρο του καρπού όπου βρίσκονται οι σπόροι και τρώει τους τρυφερούς τότε σπόρους και τη σάρκα του καρπού.

Έχει τη συνήθεια να απομακρύνει τα κοκκώδη περιττώματά της από τη στοά της. Για να το επιτύχει, ή διευρύνει την οπή και τη στοά εισόδου της, ή ανοίγει άλλη στοά, συνήθως στα πλάγια του καρπού. Η οπή αυτή με τα σκοτεινά περιττώματα, που

συνήθως συγκρατείται γύρω της, είναι εμφανής και προδίδει την παρουσία της προνύμφης στον καρπό (Εικ.4). Συνήθως ένας μικρός καρπός δεν αρκεί για τη διατροφή της προνύμφης και αναφέρεται ότι η προνύμφη της 1ης γενεάς προσβάλλει και δεύτερο καρπό πριν συμπληρώσει την ανάπτυξή της (Avidon and Hargraz, 1969). Η πλήρως αναπτυγμένη προνύμφη βγαίνει από τον καρπό και νυμφώνεται πάντα μέσα σε υπόλευκο βομβύκιο, κάτω από ξερούς φλοιούς ή σε ρωγμές του φλοιού του κορμού του δέντρου, ή στην ανάγκη και στο έδαφος. Τα ενήλικα γενεάς αυτής (πρώτης), βγαίνουν συνήθως τον Ιούλιο και τα θηλυκά ωοτοκούν κυρίως πάνω στους καρπούς και, σύμφωνα με ορισμένους συγγραφείς, και σε βλαστούς και σε φύλλα.



Εικ.4. Προσβολή καρπού από προνύμφη (www.ento.vt.edu/Fruitfiles/codlinmoth.html)

Η νεαρή προνύμφη της 2ης γενεάς μπαίνει στον καρπό συνήθως από σημείο επαφής του με άλλον καρπό, βλαστό ή φύλλο. Συμπληρώνει την ανάπτυξή της στον ίδιο καρπό και υφαίνει το βομβύκιο διαχείμασης σε προφυλαγμένες θέσεις του δέντρου ή και στο έδαφος. Σε περιοχές σχετικά ζεστές, και όπου η παρουσία καρπών στα δέντρα το επιτρέπει, θεωρείται ότι υπάρχει και 3η γενεά. (Silvestri 1943).

Η καρπόκασα είναι γενικά ο σοβαρότερος διεθνώς εχθρός της μηλιάς και αχλαδιάς (Εικ.5). Οι προσβεβλημένοι καρποί ή πέφτουν πρόωρα, ή είναι ακατάλληλοι για την αγορά. Ο παραγωγός πρέπει κάθε χρόνο να προγραμματίζει την καταπολέμηση του εντόμου αυτού. Ο κίνδυνος για την παραγωγή εξαρτάται από την πυκνότητα του πληθυσμού του εντόμου, τη δραστηριότητα και την εξέλιξη του (που εξαρτώνται κυρίως από παράγοντες κλιματικούς) και από την αφθονία των καρπών στα δέντρα.



Εικ. 5. Η *Cydia pomonella* εμφανίζεται σε όλο τον κόσμο όπου υπάρχει καλλιέργεια μηλοειδών με εξαίρεση την Ιαπωνία και τη Δυτ. Αυστραλία. Αν δεν ελεγχθεί, είναι ικανή να προσβάλει έως και το 100% της καλλιέργειας φρούτων (agspsrv34.agric.wa.gov.au/ento/Surveillance/C)

iv) Καταπολέμηση

Α. Χημική. Γίνεται συνήθως κατά την περίοδο δραστηριότητας του εντόμου, για να σκοτωθούν οι νεαρές προνύμφες πριν μπουν στους καρπούς, ή προτού εκκολαφθούν από τα αυγά (θανάτωση στο εμβρυακό στάδιο). Χειμερινός ψεκασμός των δέντρων και των χώρων και υλικών συσκευασίας, για θανάτωση των πλήρως αναπτυγμένων προνυμφών που διαχειμάζουν, συνήθως δεν αρκεί και συνιστάται μόνο σε δέντρα σχετικά μεγάλης ηλικίας όπου το πλείστο του πληθυσμού διαχειμάζει σε προστατευμένες θέσεις του φλοιού και όχι στο έδαφος. Υπάρχει μεγάλη ποικιλία διαθέσιμων χημικών. Η χρήση ουσιών με διαφορετικό μηχανισμό δράσης και διάρκεια πρέπει να προσαρμόζονται στα στάδια ανάπτυξης του εντόμου. Τα ενήλικα άτομα καταπολεμούνται με πυρεθροειδή (Alfamgin) και αέρια χημικά (Diklorfosz). Τα αυγά και οι προνύμφες καταπολεμούνται με εντομοκτόνα που δρουν ως παρεμποδιστές σύνθεσης χιτίνης (Fenoxycarb). Στην καταπολέμηση, τα πυρεθροειδή που προαναφέρθηκαν είναι αποτελεσματικά ενάντια στις προνύμφες, όπως είναι και οι οργανικοί φωσφορικοί εστέρες. Ο *Bacillus thuringiensis* αποτελεί ένα βιολογικό εντομοκτόνο και μπορεί να εναλλάσσεται με τη χρήση χημικών (Πίν.1 Παράρτ-1).

Δύο είδη σφήκας που είναι φυσικοί εχθροί της καρπόκαψας πρέπει να αναφερθούν εδώ, το παράσιτο αυγών *Trichogamma cacociae* και η προνύμφη του παρασίτου *Dibrachys canus*. Ο κατάλληλος χρόνος για επέμβαση εναντίον του εντόμου καθορίζεται συνήθως με παρακολούθηση της πορείας του ενήλικου πληθυσμού, σε συνδυασμό με την εκκόλαψη των πρώτων προνυμφών κάθε γενεάς. Άλλος τρόπος είναι ημερολογιακά, σε συνδυασμό με ορισμένο στάδιο έκπτυξης των ανθέων των δέντρων-ξενιστών.

1. Παρακολούθηση του ενήλικου πληθυσμού και των ωοτοκιών.

α) Με φερομονικές παγίδες που τοποθετούνται στον οπωρώνα, παρακολουθείται η πορεία του αρσενικού ενήλικου πληθυσμού. Μετά τις πρώτες συλλήψεις αρσενικών στις παγίδες, παρακολουθείται κατά το λυκόφως η θερμοκρασία και η σχετική υγρασία. Όταν ξεπεράσουν τους 15° C και 60% αντίστοιχα, αρχίζουν τακτικές δειγματοληψίες φύλλων και καρπών για διαπίστωση αυγών και εκκολάψεων (Knight et al., 2002).

β) Ο χρόνος εμφάνισης (εξόδου) των ενηλίκων της γενεάς που διαχείμασε μπορεί να διαπιστωθεί και με "λουρίδες νύμφωσης". Την εποχή της συγκομιδής των μήλων, τοποθετούμε γύρω από τους κορμούς των δέντρων, σε απόσταση 30-40 cm από το

έδαφος, λουρίδες πλάτους 7-10 cm κατάλληλου ρυτιδωμένου χαρτιού, δηλαδή χαρτιού αυλακωτού (κυματοειδούς) συσκευασίας, με σωληνίσκους μεγέθους τέτοιου που να χωρούν άνετα οι προνύμφες της καρπόκαψας. Οι λουρίδες αυτές θα πρέπει να εφαρμόζουν καλά στον κορμό (συνήθως δένονται με ένα σπάγγο ή σύρμα). Αν οι λουρίδες αυτές τοποθετηθούν έγκαιρα και σωστά, ένα μεγάλο ποσοστό των προνυμφών που εγκαταλείπει τους καρπούς για να βρει καταφύγιο διαχείμασης θα μπει στους σωληνίσκους (οπές) των λουριδών. Κατά το τέλος του χειμώνα, πριν αρχίσει η έκπτυξη των οφθαλμών των γιγαρτόκαρπων δέντρων, αφαιρούνται οι λουρίδες από τους κορμούς.

Λουρίδες νύμφωσης έχουν χρησιμοποιηθεί και για προσδιορισμό του χρόνου επέμβασης εναντίον της 2ης (θερινής) γενεάς του εντόμου. Τότε, συνιστάται ψεκασμός λίγες μέρες μετά το μέγιστο των εξόδων ενηλίκων από τις εγκλωβισμένες λουρίδες.

γ) Άλλος τρόπος για τον προσδιορισμό του χρόνου εξόδου των ενηλίκων της γενεάς που διαχείμασε και του χρόνου εκκόλαψης των προνυμφών της 1ης γενεάς είναι με τη μέθοδο του "αθροίσματος θερμοκρασιών". Μετά την περάτωση της χειμερινής διάπαυσης, η νύμφωση, η διάρκεια του νυμφικού σταδίου και, συνεπώς, η έξοδος των ενηλίκων, πραγματοποιούνται όταν συμπληρωθεί ορισμένο, για τη συγκεκριμένη περιοχή ή πληθυσμό, άθροισμα ημεροβαθμών πάνω από τη θερμοκρασία-ουδό ανάπτυξης. Γνωρίζοντας τη θερμική σταθερά (K), υπολογίζεται ο αριθμός των αναγκαίων ημερών (Y) για τη συμπλήρωση ορισμένου σταδίου του εντόμου από τον τύπο $K=y(t-a)$ όπου t η επικρατούσα θερμοκρασία και a η θερμοκρασία-ουδός ανάπτυξης του συγκεκριμένου σταδίου (Τζανακάκης 1995). Στη συνέχεια, με τον ίδιο τρόπο, προσδιορίζεται το πότε αρχίζει η εκκόλαψη των προνυμφών.

2. Ημερολογιακά. Εναντίον των νεαρών προνυμφών της 1ης γενεάς συνιστώνται τρεις ψεκασμοί ανά 10-15 ημέρες. Ο πρώτος γίνεται 10 ημέρες από την πτώση των πετάλων της μηλιάς ποικιλίας Red Delicious, ή 20 ημέρες από την πτώση των πετάλων της αχλαδιάς. Εναντίον των προνυμφών της 2ης γενεάς, ο πρώτος ψεκασμός γίνεται τις αρχές Ιουλίου και ακολουθούν ψεκασμοί ανά 10-15 ημέρες ως τα μέσα Αυγούστου (Ανώνυμοι 1973). Στον τελευταίο ψεκασμό, το εντομοκτόνο πρέπει να είναι μικρής υπολειμματικής διάρκειας ώστε να μην αφήσει ανεπιθύμητα υπολείμματα στους καρπούς κατά τη συγκομιδή. Οι επεμβάσεις ημερολογιακά, έχουν το μειονέκτημα ότι γίνονται άσχετα με την ύπαρξη επικίνδυνου πληθυσμού του εντόμου και ότι είναι περισσότερες από όσες γίνονται στα πλαίσια μιας

διευθυνόμενης καταπολέμησης με βάση τις συστάσεις των υπηρεσιών γεωργικών προειδοποιήσεων. Συνεπώς, μειώνουν σε μεγαλύτερο βαθμό τους πληθυσμούς ωφέλιμων αρθροπόδων στον οπωρώνα και ρυπαίνουν περισσότερο το περιβάλλον. Όπου εξακολουθούν να γίνονται ημερολογιακά, χρειάζεται τουλάχιστον επιλογή του κατάλληλου εντομοκτόνου, ώστε η βλάβη αυτή να μην είναι υπερβολική.

Β. Εξόντωση των αρσενικών. Δοκιμάστηκε με επιτυχία σε απομονωμένους οπωρώνες της Ελβετίας πυκνόρρευστο αιώρημα που περιέχει ελκυστική φερομένη και το συνθετικό πυρεθροειδές permethrin, εφαρμόστηκε σε 1 ή 2 χοντρές σταγόνες στο φύλλωμα δύο φορές κατά την βλαστική περίοδο, με σκοπό την προσέλκυση και θανάτωση των αρσενικών. Αυτό είχε ως συνέπεια την έλλειψη συζεύξεων και την απόθεση άγονων αυγών από τα θηλυκά. Το ποσοστό προσβεβλημένων καρπών κατά την συγκομιδή ήταν κάτω του ανεκτού ορίου (Charmillot et al. 1997b).

Γ. Παρεμπόδιση συνάντησης των δύο φύλων. Η μέθοδος αυτή, γνωστή και ως παρεμπόδιση σύζευξης ή σύγχυση των αρσενικών, δοκιμάστηκε με επιτυχία, επίσης στην Ελβετία. Συνίσταται σε κατανομή στον οπωρώνα εξαμιστήρων ελκυστικής φερομόνης. Στους πλείστους από 40 μηλεώνες δεν χρειάστηκε ψεκάσμος με εντομοκτόνα και το ποσοστό προσβεβλημένων καρπών κατά τη συγκομιδή ήταν από μηδέν ως 1% (Charmillot et al 1997c).

Δ. Εξαπόλυση στειρωμένων πληθυσμών του ίδιου είδους. Εφαρμόστηκε με επιτυχία και παραδεκτό κόστος σε άλλες χώρες όπως στον Καναδά, στην Αφρική, όχι όμως στη χώρα μας. Δεν διαδόθηκε, προφανώς λόγω των απαιτήσεων της σε εγκαταστάσεις και ειδικευμένο προσωπικό.

Ε. Άλλα μέτρα. Ως συμπληρωματικό μέτρο εναντίον της καρπόκαψας συνιστάται η τοποθέτηση στους κορμούς λουρίδες νύμφωσης με εντομοκτόνο ή χωρίς και η έγκαιρη καταστροφή των εκεί προνυμφών ή νυμφών. Επίσης, έγκαιρη συλλογή και χορήγηση στα ζώα των προσβεβλημένων καρπών.

1.2 Συμβιωτικές σχέσεις

Ο όρος συμβίωση χρησιμοποιείται για να εκφράσει τη σχέση ανάμεσα σε δύο είδη έμβιων όντων, όταν και τα δύο είδη ωφελούνται αμοιβαία από τη σχέση αυτή. Πρέπει να τονιστεί ότι η χρήση του όρου συμβίωση με την σημασία που αναφέρεται παραπάνω δεν βρίσκει σύμφωνους όλους τους επιστήμονες. Θεωρείται ότι ταυτίζεται με την αμοιβαιότητα, παρόλο ότι ο όρος αυτός εκφράζει τις περιπτώσεις που κανένα από τα ωφελούμενα είδη δεν αντιλαμβάνεται τη βοήθεια που δέχεται από το άλλο, όπως μεταξύ εντομοφάγων πτηνών και φυτών που προσβάλλονται από έντομα, και τις περιπτώσεις που η σχέση ανάμεσα στα δύο ωφελούμενα είδη έχει καταλήξει σε πλήρη εξάρτηση, όπως μεταξύ κάποιων φυτών και των αντίστοιχων εντόμων που μεταφέρουν τη γύρη του. Για μερικούς επιστήμονες ο όρος συμβίωση έχει πολύ πιο πλατιά σημασία εκφράζοντας το σύνολο των θετικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα σε είδη. Περιλαμβάνει δηλαδή τον ομοσιτισμό, κατά τον οποίο το ένα είδος ωφελείται, ενώ το άλλο ούτε ωφελείται ούτε βλάπτεται, τη συνεργασία κατά την οποία τα δύο είδη ωφελούνται αλλά η σχέση τους δεν είναι υποχρεωτική και την αμοιβαιότητα. Τέλος, όπως αναφέρθηκε ήδη, υπάρχουν επιστήμονες που χρησιμοποιούν τον όρο κυριολεκτώντας χωρίς να ενδιαφέρονται να εκφράσουν με αυτόν την οποιαδήποτε σχέση που τυχόν αναπτύσσεται ανάμεσα ατά είδη που ζουν μαζί.

Όλοι οι πολυκύτταροι οργανισμοί προήλθαν από ομάδες απλούστερων μονάδων που παρουσιάζουν σήμερα υψηλή συνεργασία και είναι σχεδόν ελεύθεροι συγκρούσεων. Αυτή η συνεργασία πρέπει να ληφθεί ως καθοριστικό χαρακτηριστικό των οργανισμών για την εξέλιξή τους. Στη συνένωση αυτή συμπεριλαμβάνονται ορισμένες κατηγορίες κοινωνικών εντόμων, κάποιες μικροβιακές ομάδες όπως και σχέσεις ιών με τους ξενιστές τους (Queller et al., 2009).

Οι σχέσεις μεταξύ ζώων και μικροοργανισμών είναι ιδιαίτερα πολύπλοκες και μπορεί να ποικίλουν. Η συμβίωση είτε δεν είναι υποχρεωτική για την επιβίωση και των δύο ειδών αλλά απλώς αυξάνει τις δυνατότητες επιβίωσης τους, είτε είναι ζωτική για την επιβίωση και των δύο. Αυτού του είδους οι σχέσεις, όπως φαίνεται από την έως τώρα μελέτη τους, επηρεάζουν κυρίως θέματα διατροφής, προστασίας και αναπαραγωγής (Bronstein et al., 2006). Το σημαντικό όφελος που προσφέρει η συμβίωση στα μετέχοντα είδη, έχει οδηγήσει πολλά ζεύγη οργανισμών στη διαμόρφωση πολύπλοκων μορφολογικών, φυσιολογικών και ηθολογικών προσαρμογών.

Έτσι ένας συνηθισμένος τύπος συμβίωσης δημιουργείται, όταν το ένα είδος προσφέρει τροφή και το άλλο προστασία. Επίσης κάποιες ομάδες ζώων στερούνται βασικές μεταβολικές ικανότητες, συμπεριλαμβανομένης της ικανότητας να συνθέσουν απαραίτητα αμινοξέα και βιταμίνες. Οπότε έχουν επιλύσει τους μεταβολικούς περιορισμούς τους, αναπτύσσοντας συμβιωτικές σχέσεις με μικροοργανισμούς που παρέχουν απαραίτητα θρεπτικά συστατικά.

Πολυάριθμοι πληθυσμοί μικροοργανισμών κατοικούν στον πεπτικό σωλήνα των ζώων και σχηματίζουν μία σχεδόν ολοκληρωμένη οικολογική μονάδα με τον οργανισμό-ξενιστή τους. Αυτή η σύνθετη οντότητα, αποτελούμενη από βακτήρια και άλλα είδη μικροοργανισμών, μπορεί να θεωρηθεί ως το καλύτερο μεταβολικά προσαρμοσμένο και γρήγορα ανανεώσιμο όργανο του σώματος, ένα όργανο που έχει ζωτικό ρόλο στις φυσιολογικές, διατροφικές, ανοσολογικές και προστατευτικές λειτουργίες του ξενιστή.

Οι συμβιωτικές σχέσεις μπορούν να χαρακτηριστούν και από τον τρόπο που επηρεάζουν τους οργανισμούς που συμβιώνουν. Έτσι σε μια σχέση τέτοιου είδους μπορεί να ασκείται επίδραση μόνο στον ξενιστή, ή μόνο στους οργανισμούς που συμβιώνουν με τον ξενιστή ή να παρατηρείται το φαινόμενο της αλληλεπίδρασης μεταξύ τους.

1.2.1 Μελέτη και Ταυτοποίηση συμβιωτικών βακτηρίων

Πολλές είναι οι επιστημονικές εργασίες που περιγράφουν συμβιωτικές σχέσεις βακτηρίων ιδιαίτερης γεωργικής και οικονομικής σημασίας, όπως η μελέτη των συμβιωτικών βακτηρίων στο έντομο *Frankliniella occidentalis* (Chanbusarakum et al., 2008), αλλά και η ταυτοποίηση του βακτηρίου *Acetobacter tropicalis* ως τον κύριο συμβιώτη στην μύγα του ελαιόκαρπου *Bactrocera oleae* (Kounatidis et al., 2009).

Στην ίδια κατεύθυνση σημαντική υπήρξε και η γονιδιακή ανάλυση της μύγας της Μεσογείου. Η *Ceratitis capitata* είναι ένας ιδιαίτερα διαδεδομένος γεωργικός εχθρός ώστε αποτελεί ένα πρότυπο έντομο για την ανάπτυξη προγραμμάτων βιολογικού ελέγχου. Αυτή η μελέτη παρείχε βασικές πληροφορίες για την υποστήριξη της έρευνας που σκοπό είχε να απαντήσει σε πολλά ερωτήματα σχετικά με τη βιολογία της Μεσογειακής μύγας καθώς και συναφών ειδών. Αποτέλεσε ένα πολύτιμο εργαλείο για τον σχολιασμό των ακολουθιών του πλήρους γονιδιώματος (Gomulski et

al.,2008) σε συνδυασμό με την έρευνα για τη γονιδιωματική οργάνωση και τον χαρακτηρισμό του « λευκού γονιδιακού τόπου » στο ίδιο έντομο (Gomulski et al.,2001).

Ένα σημαντικό κομμάτι του φαινομένου «συμβίωση», είναι η κληρονομικότητα, δηλαδή η εγκαθίδρυση των συμβιωτικών παραγόντων στον ξενιστή και η μεταφορά τους στους απογόνους μέσω της αναπαραγωγικής διαδικασίας. Μεταξύ των πιο σημαντικών επιπτώσεων της κληρονομούμενης συμβίωσης είναι ότι μπορεί να προωθηθεί η ειδογένεση, με την αύξηση της αναπαραγωγής και την οικολογική απομόνωση των πληθυσμών των ξενιστών, ενώ παράλληλα παρέχει αποτελεσματικά μέσα για τη μεταφορά των γενετικών πληροφοριών μεταξύ ξενιστών (Moran et al., 2008).

Τα έντομα έχουν κληρονομούμενα συμβιωτικά βακτήρια και πρόσφατες πειραματικές προσεγγίσεις απέφεραν μια βαθύτερη κατανόηση των ποικίλων βιολογικών ρόλων τους. Ολοένα και περισσότερο, τα κοινά στοιχεία μεταξύ των κατηγοριών των συμβιωτικών μικροοργανισμών ανακαλύπτονται και έτσι μια ουσιαστική κατάταξη θα μπορούσε να είναι η εξής: Υποχρεωτικά συμβιωτικοί οργανισμοί (συμβάλλουν στην παροχή θρεπτικών συστατικών), προαιρετικά συμβιωτικοί (παρέχουν προστασία από εχθρούς), και συμβιωτικοί όπως η *Wolbachia spp* που χειραγωγεί το αναπαραγωγικό σύστημα.

1.2.2 Αλληλεπίδραση

Οι συμβιωτικές σχέσεις των υποχρεωτικά ενδοκυττάρων βακτηρίων με τα έντομα, έχουν προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια λόγω των συνεπειών στην εξέλιξη της γονιδιωματικής δομής. Ωστόσο, πολύ λιγότερη προσοχή έχει δοθεί στις μεταβολικές προεκτάσεις για τους εν λόγω ενδοσυμβιωτικούς μικροοργανισμούς, που έχουν να ανταγωνιστούν με, αλλά και να προσαρμοστούν σε έναν άλλο μεταβολισμό, αυτόν του κυττάρου του ξενιστή. Έτσι έγιναν προσπάθειες για τεκμηριωμένες γνώσεις σχετικά με τις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις και την φυσιολογική εξέλιξη των μεταβολικών οδών μεταξύ συμβιωτικών βακτηρίων των αφίδων, των μυρμηγκιών, και των μυγών tsetse και των εντόμων ξενιστών τους (Zientz et al., 2004).

Η σχέση ανάμεσα σε έντομο και συμβιωτικά βακτήρια μπορεί να επηρεαστεί από τη διατροφή του ξενιστή, καθώς μελέτες αναφέρουν πως οι θρεπτικές ουσίες φυτών έχουν επιπτώσεις στη σχέση φυτοφάγου εντόμου και βακτηρίων που ζουν μαζί του. Συγκεκριμένα αμινοξέα είναι υπεύθυνα για τη δομή της βακτηριακής κοινότητας αυτών των εντόμων και η αυξομείωσή καθορισμένων θρεπτικών συστατικών στη διατροφή τους διαταράσσει την υπάρχουσα ισορροπία στη βακτηριακή χλωρίδα (Chandler et al., 2008).

1.2.3 Επίδραση στον ξενιστή

Η υποχρεωτικά συμβιωτική *Wigglesworthia glossinidia* επηρεάζει την αναπαραγωγή, την πέψη και τις ανοσολογικές αποκρίσεις του ξενιστή της, της μύγας tsetse. Αξιολογήθηκε η αναπαραγωγική δραστηριότητα, η μακροβιότητα και η πέψη, των μυγών που στερούνταν *Wigglesworthia*. Η απουσία *Wigglesworthia* κατέστησε στείρα τα θηλυκά. Τόσο οι αρσενικοί ενήλικοι απόγονοι όσο και οι θηλυκοί που ήταν ελεύθεροι της *Wigglesworthia*, εμφάνισαν μειωμένη μακροζωία αλλά και μειωμένη ικανότητα πέψης. Ακόμη η απουσία της *Wigglesworthia* έδειξε αυξημένη ευαισθησία των μεγαλύτερων ηλικιακά μυγών σε μολύνσεις τρυπανοσώματος, γεγονός που δείχνει την επίδραση της συμβίωσης και στο ανοσοποιητικό σύστημα των ξενιστών (Pais et al., 2008).

Η διαχείριση της μικροβιακής χλωρίδας σε μαζικά εκτρεφόμενες μύγες Μεσογείου *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), αποδείχθηκε πως μπορεί να βελτιώσει τη σεξουαλική απόδοση σε στείρα αρσενικά άτομα. Η τεχνική (SIT) στειρών εντόμων είναι μια μέθοδος βιολογικού ελέγχου με την οποία μπορεί να γίνει έλεγχος των πληθυσμών της Μεσογειακής μύγας. Αρσενικά έντομα μετά από έκθεση τους σε ακτινοβολία στερώνονται και απελευθερώνονται στο πεδίο για να ζευγαρώσουν με άγρια θηλυκά. Δεδομένου ότι τα βακτήρια είναι σημαντικοί εταίροι στον κύκλο ζωής της μύγας, χρησιμοποιήθηκαν μοριακές μέθοδοι ανάλυσης για τη μελέτη της δομής της μικροβιακής κοινότητας στο έντερο στειρών αρσενικών. Διαπιστώθηκε ότι η διαδικασία στειρώσεως με ακτινοβολία επηρεάζει την βακτηριακή κοινότητα του εντέρου της μεσογειακής μύγας. Έτσι μπορεί να αναφερθεί το γεγονός πως αν και η οικογένεια *Enterobacteriaceae* παρέμεινε κυρίαρχη βακτηριακή ομάδα στο έντερο, τα επίπεδα της *Klebsiella* μειώθηκαν σημαντικά τις ημέρες μετά την στειρώση, ενώ αντίθετα τα επίπεδα των δυνητικά παθογόνων *Pseudomonas* ήταν αυξημένα.

Επιπλέον σημαντικό ήταν το συμπέρασμα ότι η προσθήκη των βακτηριακών ειδών *Klebsiella oxytoca* στη διατροφή επέτρεψε τον αποικισμό αυτών των βακτηρίων στο έντερο, με αποτέλεσμα την μείωση των επιπέδων της *Pseudomonas sp.* Έτσι η διατροφή με συγκεκριμένες δίαιτες που περιέχουν βακτήρια, και η αναζωογόνηση της αρχικής μικροβιακής κοινότητας θα μπορούσε να οδηγήσει στην ενίσχυση της ανταγωνιστικότητας και των επιδόσεων των στείρων αρσενικών ατόμων της Μεσογειακής μύγας (Ami et al., 2009).

Επίσης έρευνα πραγματοποιήθηκε για τη μύγα *Ceratitis capitata*, με στόχο τον προσδιορισμό της εντεροβακτηριακής κοινότητας και τις επιπτώσεις της στη μακροζωία του ξενιστή της. Στο πεπτικό σύστημα της Μεσογειακής μύγας παρατηρήθηκε μια σταθερή βακτηριακή κοινότητα, που αποτελείται κυρίως από μέλη των *Enterobacteriaceae*. Ωστόσο βρέθηκε ότι στο εσωτερικό του εντέρου του εντόμου συμβιώνει και το *Pseudomonas spp.* Αυτά περιλαμβάνουν *P. aeruginosa* που αποτελεί ένα γνωστό παθογόνο των αρθροπόδων αλλά και του ανθρώπου. Πειραματικός ενοφθαλμισμός της *P. aeruginosa* οδήγησε σε μείωση της μακροβιότητας της μύγας, ενώ ενοφθαλμισμός με τα μέλη του *Enterobacteriaceae* οδήγησε σε παράταση της ζωής της μύγας. Κατά συνέπεια, προτάθηκε ότι εκτός από την πιθανή συμβολή τους στον μεταβολισμό του αζώτου και του άνθρακα της μύγας, την ανάπτυξη και την αναπαραγωγική επιτυχία (όπως φαίνεται σε προηγούμενες μελέτες), η κοινότητα των *Enterobacteriaceae* εντός του εντέρου της μύγας μπορεί επίσης να έχει έμμεση συμβολή στην υγεία του ξενιστή, αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό παθογόνων βακτηρίων. Σε αντίθεση με τις προβλέψεις, η αντιβιοτική θεραπεία δεν επηρέασε τη μακροζωία (τόσο στα αρσενικά όσο και στα θηλυκά άτομα) και το ποσοστό θνησιμότητας στις μύγες που τρέφονταν συνέχεια με βακτήρια (Behar et al., 2008).

Συμβιωτικά βακτήρια εντόμων μπορούν να επιτρέψουν στον ξενιστή τους να χρησιμοποιήσει μια διατροφικά ανεπαρκή δίαιτα. Τα βασικά αποτελέσματα από αυτή τη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στις αφίδες του μπιζελιού, είναι ότι η παροχή των βασικών αμινοξέων που υπάρχουν στο χυμό του φυτού τον οποίο και απομυζούν (Douglas et al., 2006) είναι γενικά ανεπαρκής για να στηρίξει την ανάπτυξη των αφίδων. Το έλλειμμα μπορεί να καλυφθεί σε μεγάλο βαθμό από τα βασικά αμινοξέα (εκτός της μεθειονίνης) που παράγονται λόγω της βιοσυνθετικής ικανότητας ενός συμβιωτικού βακτηρίου των αφίδων, του *Buchnera aphidicola* (Gündüz et al., 2009; Baumann P., 2005). Επίσης τα συμβιωτικά βακτήρια του γένους *Buchnera* έχουν

εμπλακεί σε διάφορες μη θρεπτικές λειτουργίες. Από αυτές, μόνο μία έχει ισχυρή πειραματική υποστήριξη: η προώθηση της μετάδοσης ιών στις αφίδες (Douglas A., 1998).

Μία ακόμη έρευνα σχετική με τη διατροφή, πραγματοποιήθηκε και στην περίπτωση της συμβίωσης της *Erwinia sp.* με θρίπες των λουλουδιών, σύμφωνα με την οποία το κόστος ή το όφελος του ξενιστή από τη συμβίωση με την *Erwinia sp.* εξαρτάται από τη διατροφή του εντόμου (de Vries et al., 2004).

Το άζωτο, αν και βρίσκεται άφθονο στην ατμόσφαιρα, είναι παραδόξως ένας περιορισμένος πόρος για πολυκύτταρους οργανισμούς. Μελέτη έδειξε πως τα εντεροβακτήρια σε φυσικούς πληθυσμούς του εντόμου *Ceratitis capitata*, μπορεί να συμβάλουν σημαντικά στην πρόσληψη αζώτου από την μύγα. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στον κύκλο του αζώτου (Behar et al., 2005).

Τα αποτελέσματα μιας πολύ πρόσφατης μελέτης έδειξαν πως η φυσική κατάσταση του δάκου της ελιάς μπορεί να επηρεαστεί από τα συμβιωτικά του βακτήρια, όταν το έντομο υπόκειται σε μεταβαλλόμενη διαίτα. Τα βακτήρια ήταν σε θέση να αντισταθμίσουν το έλλειμμα της διαίτας σε αμινοξέα, οπότε η παρουσία τους θα μπορούσε να χαρακτηριστεί απαραίτητη για τα ενήλικα άτομα του *Bactrocera oleae*, που επιβιώνουν κυρίως με πόρους φτωχούς σε άζωτο, όπως είναι το μελίτωμα (Yosef et al., 2010).

Οι αφίδες εμφανίζουν υποχρεωτική συμβίωση με το βακτήριο *Buchnera aphidicola*, που έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλει άμεσα στην υγεία του ξενιστή τους. Επιπλέον στις αφίδες μπορεί να διαβιβάζονται και άλλα συμβιωτικά βακτήρια μέσω κάποιων φορέων, για τα οποία λίγα οφέλη αυτής της μόλυνσης έχουν τεκμηριωθεί στο παρελθόν. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα για να καθορίσουν τις συνέπειες αυτών των προαιρετικά συμβιωτικών βακτηρίων στο έντομο *Pisum acyrthosiphon* σχετικά με την ευπάθεια της αφίδας σε ένα παράσιτο υμενόπτερον, το *Aphidius ervi*. Τα αποτελέσματά έδειξαν ότι, σε ελεγχόμενο γενετικό υπόβαθρο, η παρουσία των συγκεκριμένων βακτηρίων, προσδίδει αντοχή στην επίθεση του παρασίτου προκαλώντας υψηλή θνησιμότητα των αναπτυσσόμενων προνυμφών του. Αυτή η ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ ενός συμβιωτικού βακτηρίου και ενός φυσικού εχθρού αποτελεί ένα σημαντικό κίνητρο για την εγκατάσταση και την εξάπλωση των συμβιωτικών βακτηρίων (Oliver et al., 2003).

Σε ανάλογο αποτέλεσμα κατέληξε και μία ακόμη έρευνα που πραγματοποιήθηκε πολύ πρόσφατα . Ανέδειξε την ανθεκτικότητα που προσφέρει στις αφίδες ενάντια σε παράσιτα, το συμβιωτικό στέλεχος *Regiella insecticola* (Vorburger et al., 2010).

Μια σειρά από πρόσφατες εμπειρικές και θεωρητικές μελέτες έδειξαν ότι οι κάθετα διαβιβαζόμενοι συμβιωτικοί οργανισμοί μπορούν να προστατεύσουν τους ξενιστές τους από παθογόνους οργανισμούς (Haine et al., 2008). Ένα ιδιαίτερα σημαντικό κομμάτι αποτελεί και η πρόληψη μεταδιδόμενων ασθενειών από έντομα ή παράσιτα. Αυτό έχει μελετηθεί με την προσέγγιση δημιουργίας διαγονιδιακών συμβιωτικών βακτηρίων. Η έκφραση μορίων με αντιπαρασιτική δραστηριότητα από γενετικά τροποποιημένα συμβιωτικά βακτήρια που προέρχονται από έντομα που είναι φορείς ασθενειών μπορεί να χρησιμεύσει για τον έλεγχο ορισμένων ασθενειών που προκαλούνται από παράσιτα όπως το *Trypanosoma cruzi* που αποτελεί τον αιτιολογικό παράγοντα της ασθένειας τρυπανοσωμίαση σε ανθρώπους και ζώα (Beard et al., 1993) (Durvasula et al., 1997) (Durvasula et al., 2008).

Ένα πολύ σημαντικό στοιχείο για την επίδραση συμβιωτικών βακτηρίων σε έντομα ξενιστές, είναι το αποτέλεσμα έρευνας που έδειξε πως υποχρεωτικά συμβιωτικοί οργανισμοί συμμετέχουν στο καθεστώς παρασιτισμού του εντόμου-ξενιστή. Οι επιστήμονες κατέληξαν στο γεγονός ότι ο γονότυπος των συμβιωτικών οργανισμών επηρεάζει σε μεγαλύτερο βαθμό αυτή την ιδιότητα του εντόμου, σε σχέση με τον γονότυπο του ίδιου του εντόμου (Hosokawa et al., 2007).

Τέλος η ίδια ερευνητική ομάδα κατέληξε στο συμπέρασμα πως η συμπεριφορά νυμφών του εντόμου *Megacopta punctatissima*, επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την επιτυχία ή την αποτυχία τους να αποκτήσουν συμβιωτικά βακτήρια. Η δραστηριότητά τους είναι άμεσα εξαρτημένη από τον τρόπο που θα αποκτήσουν τα βακτήρια αυτά, καθώς σχετίζεται με την κατανάλωση μεγαλύτερων ή μικρότερων ποσών ενέργειας (Hosokawa et al., 2008).

1.2.4 Επίδραση στο βακτήριο

Κατά τη διάρκεια της μεταφοράς τους, οι συμβιωτικοί πληθυσμοί βακτηρίων υφίστανται σημαντικές γενετικές και γονιδιωματικές αλλαγές προκειμένου να προσαρμοστούν στο περιβάλλον του ξενιστή. Οι αλλαγές αυτές μπορεί να επηρεάσουν σημαντικά τη συμβίωση των *Streptomyces* με μέλισσες (beewolf)

αυξάνοντας την γενετική παρέκκλιση και την συσσώρευση ήπια καταστροφικών μεταλλάξεων στο γονιδίωμα τους (Kaltenpoth et al., 2010).

Αναφέρεται επίσης και το παράδειγμα της απώλειας γονιδίων σε υποχρεωτικά συμβιωτικά βακτήρια. Το συμβιωτικά γ-πρωτεοβακτήρια των εντόμων είναι μια ομάδα πρότυπο για συγκριτικές μελέτες της μείωσης του γονιδιώματος. Η φυλογενετική εγγύτητα των εν λόγω μειωμένων γονιδιωμάτων προς τα καλά μελετημένα μεγαλύτερα γονιδιώματα των βακτηρίων που ζουν ελεύθερα, επέτρεψε μεγαλύτερη κατανόηση της διαδικασίας με την οποία «χάνονται» τα γονίδια και το DNA. Τρεις αλληλουχίες γονιδιώματος είναι διαθέσιμες για το *Buchnera aphidicola*. Ανάλυση του γονιδιώματος του *Buchnera aphidicola* σε σύγκριση με γονιδιώματα σχετικών εντεροβακτηρίων, δείχνουν ότι εκτεταμένες αλλαγές (συμπεριλαμβανομένων και των χρωμοσωμικών ανακατατάξεων που σημειώθηκαν αρχικά), ακολουθούνται από ακραία στασιμότητα στη σειρά των γονιδίων και από αργή εξάλειψη των επιπλέον γονιδίων. Αυτή η εικόνα φαίνεται να είναι χαρακτηριστική της συμβιωτικής εξέλιξης (Moran, 2003).

Ακόμη μία μελέτη σκοπό της είχε να δείξει πώς και πόσο επηρεάζεται το γονιδίωμα των συμβιωτικών βακτηρίων από το περιβάλλον των εντόμων-ξενιστών. Με τη χρήση μικροσυστοιχιών DNA έγινε προσπάθεια να συγκριθούν τα γονιδιώματα δύο βακτηρίων. Πρόκειται για τα είδη *Sodalis glossinidius* συμβιωτικό βακτήριο της μύγας tsetse (Diptera, *Glossina spp.*) και *Sitophilus oryzae* πρωτογενές ενδοσυμβιωτικό του σκαθαριού του ρυζιού (Coleoptera, *Sitophilus oryzae*). Σύγκριση του γονιδιώματος μεταξύ των δύο μικροβίων δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές στη διατήρηση των γονιδίων που εμπλέκονται στον καταβολισμό των οργανικών ενώσεων, στον μεταβολισμό της ενέργειας, και στον μεταβολισμό λιπαρών οξέων (Rio et al., 2003).

Το ενδοσυμβιωτικό βακτήριο "*Candidatus Erwinia dacicola*" του δάκου της ελιάς, έχει την ικανότητα να μεταβαίνει από ενδοκυττάρια σε εξωκυττάρια διαβίωση και να μεταβάλει το περιεχόμενο G+C νουκλεοτιδίων στο γονιδίωμα του προσεγγίζοντας αυτό συγγενικών ειδών που ζουν ελεύθερα. Αυτά τα χαρακτηριστικά μπορούν να διευκολύνουν την επιβίωση σε ένα μεταβαλλόμενο περιβάλλον, κατά τη διάρκεια ανάπτυξης ενός πολυφάγου, ολομετάβολου ξενιστή. Οι ίδιοι ερευνητές πρότειναν την κατάταξη των συμβιωτικών βακτηρίων ανάλογα με το περιβάλλον που προσφέρει ο ξενιστής-έντομο (Estes et al., 2009).

Για την επίδραση της διατροφής του ξενιστή στη συμβιωτική σχέση υπάρχει μελέτη στην περίπτωση των υποχρεωτικά συμβιωτικών βακτηρίων *Buchnera aphidicola* και των προαιρετικά συμβιωτικών *Serratia symbiotica* των αφίδων *Acyrtosiphon pisum*. Τα αποτελέσματα έδειξαν άμεση εξάρτηση της πυκνότητας των βακτηριακών πληθυσμών από τα επίπεδα αζώτου που περιέχονται στις διατροφικές επιλογές του ξενιστή (Wilkinson et al., 2007).

1.3 Σκοπός της εργασίας

Η καρπόκαψα αποτελεί έναν εχθρό των μηλοειδών, μέγιστης οικονομικής σημασίας (Geier 1963, Barnes 1992; Saethre and Hofsvang 2002; Evenden and McClaughlin 2005; Kührt et al. 2006). Η χρήση χημικών ουσιών δίνει λύσεις και εξασφαλίζει αύξηση της παραγωγής, δημιουργώντας ταυτόχρονα και σημαντικά οικολογικά προβλήματα. Όμως στα πλαίσια ανάπτυξης μιας αειφόρου γεωργίας με σεβασμό στον άνθρωπο και το περιβάλλον, επιβάλλεται η μείωση της χρήσης χημικών σκευασμάτων.

Επιπλέον, πληθώρα επιστημονικών μελετών αποκαλύπτουν τόσο την ύπαρξη συμβιωτικών σχέσεων μεταξύ βακτηρίων και εντόμων, όσο και το ρόλο τους. Η παρουσία των βακτηρίων είναι ικανή να επηρεάσει την οικολογία και φυσιολογία των εντόμων ξενιστών. Αυτό το γεγονός προσελκύει το ενδιαφέρον των επιστημόνων καθώς ο χειρισμός των συμβιωτικών σχέσεων μπορεί να γίνει ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο, προσφέροντας ένα νέο, φιλικό προς το περιβάλλον, τρόπο ελέγχου των οικονομικά σημαντικών εντόμων.

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι η μελέτη της βακτηριακής χλωρίδας της *Cydia pomonella*, καθώς δεν υπάρχουν μέχρι αυτή τη στιγμή σχετικές αναφορές.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δειγματοληψία

Φυσικοί πληθυσμοί της καρπόκαψας συλλέχθηκαν από δύο διαφορετικές περιοχές στην περιφέρεια Θεσσαλίας. Στην περιοχή της Αγιάς επιλέχτηκε ένας αγρός βιολογικής καλλιέργειας μήλου (ποικ. Red Delicious) καθώς και ένας συμβατικής καλλιέργειας μήλου (ποικ. Gr. Smith), ενώ στην περιοχή Βελεστίνου ένας αγρός βιολογικής καλλιέργειας αχλαδιών (ποικ. Κοντούλα). Η βακτηριακή χλωρίδα μελετήθηκε σε δύο αναπτυξιακά στάδια του εντόμου (ενήλικο και προνύμφη). Τοποθετήθηκαν φερομονικές παγίδες τον Απρίλη του 2009 με σκοπό τη σύλληψη ενήλικων ατόμων, ενώ τον Μάιο του ίδιου έτους τοποθετήθηκαν παγίδες κυματοειδούς χάρτου στους κορμούς των δέντρων, ώστε να πραγματοποιηθεί και η σύλληψη των προνυμφών.

2.1.1 Παγίδες φερομόνης

Οι φερομόνες είναι ουσίες που παράγονται από έντομα ή άλλα ζώα, ελευθερώνονται στην επιφάνεια του σώματός τους ή στο περιβάλλον και προκαλούν χαρακτηριστικές αντιδράσεις συμπεριφοράς ή φυσιολογίας σε άλλα άτομα του ίδιου κατά κανόνα είδους. Ο ρόλος τους είναι πολύ σημαντικός στην επικοινωνία μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους και επιπλέον είναι ικανές να επηρεάσουν τη σύζευξη, την ωοτοκία, την άμυνα, τη συνάθροιση και την ανεύρεση ή την επιλογή της τροφής.

Οι σεξουαλικές φερομόνες δρουν δια μέσου των αισθητηρίων της όσφρησης διεγείρουν το κεντρικό νευρικό σύστημα του εντόμου, με συνέπεια τις τυπικές για κάθε περίπτωση εκδηλώσεις. Επειδή δρουν σε σχετικά μεγάλη απόσταση, έχουν πρακτική χρησιμότητα, για την καταπολέμηση ορισμένων επιβλαβών ειδών .



Εικ.6. Φερομονική παγίδα.
(www.biobest.be/.../Attractferomoon.htm)

Μορφή της φερομόνικης παγίδας

Έχει μορφή ημίκλειστου δακτυλίου εμποτισμένου με τη φερομόνη φύλου της καρπόκαψα. Δεν είναι επιβλαβής για τις καλλιέργειες, τον άνθρωπο ή το περιβάλλον. Επιπλέον, δεν σκοτώνει φυσικούς εχθρούς.

Εγγυημένη σύνθεση

8, 10 δωδεκαδιενόλη 0,28% β/β, βοηθητικές ουσίες 99,71% β/β

Πυκνότητα τοποθέτησης των παγίδων

Ομοιογενείς οπωρώνες : Κάθε 30 στρέμματα μία παγίδα.

Ανομοιογενείς οπωρώνες : Κάθε 10 στρέμματα μία παγίδα.

Χρόνος εφαρμογής

Οι παγίδες αναρτώνται τον πιθανό χρόνο εμφάνισης των πρώτων ακμαίων. Για την πρώτη γενεά η εποχή αυτή είναι από τα μέσα Απριλίου έως τα μέσα Μαΐου (ανάλογα με τις καιρικές και τις κλιματολογικές συνθήκες). Για τη δεύτερη γενεά η εποχή εμφάνισης είναι από τα μέσα Ιουνίου έως τις αρχές Ιουλίου.

Αντικατάσταση ελκυστικής ουσίας και συντήρηση παγίδων

Μετά από κάθε παρατήρηση αφαιρούνται τα έντομα που έχουν συλληφθεί και ελέγχεται η λειτουργικότητα των παγίδων. Η φερομόνη αντικαθίσταται κάθε 6 εβδομάδες ή και νωρίτερα, ανάλογα με τις κλιματικές συνθήκες. Οι κολλώδεις βάσεις των παγίδων αντικαθίστανται κάθε 6 εβδομάδες ή και νωρίτερα, εφόσον έχουν χάσει την κολλητικότητα τους λόγω υψηλών αριθμών συλλήψεων ή σκόνης.

Στο συγκεκριμένο πείραμα τοποθετήθηκαν 2 φερομονικές παγίδες (τύπου «Δέλτα» Εικ.6) σε κάθε αγρό παρά το γεγονός ότι κανένας δεν ξεπερνούσε τα 10 στρ. Η πρώτη σύλληψη ενήλικων αρσενικών ατόμων παρατηρήθηκε στα μέσα Μαΐου 2009, σχεδόν ταυτόχρονα και στις 2 περιοχές (Αγιά και Βελεστίνο).

2.1.2. Παγίδες κυματοειδούς χάρτου

Πρόκειται για απλό κυματοειδές χαρτόνι συσκευασίας το οποίο κόβεται σε λουρίδες πλάτους 7-10 cm ή καλύτερα σε μέγεθος ανάλογου του κορμού ή του βραχίονα που πρόκειται να καλύψει και τοποθετείται σε απόσταση 30-40 cm από το έδαφος. Οι σωληνίσκοι έχουν τέτοιο άνοιγμα ώστε να χωρούν άνετα οι προνύμφες της καρπόκαψα. Οι λουρίδες αυτές θα πρέπει να εφαρμόζουν καλά στον κορμό (συνήθως δένονται με ένα σπάγγο ή σύρμα). Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η

παγίδευση της προνύμφης που φτάνει εκεί επιλέγοντας την παγίδα ως κατάλληλη θέση προφύλαξης και διαχείμασης.

Οι συγκεκριμένες παγίδες τοποθετήθηκαν στα τέλη Μαΐου. Υπολογίζεται ότι τοποθετήθηκαν περίπου 30 παγίδες αυτού του είδους στον κάθε αγρό με σκοπό την εύκολη και ταχύτερη σύλληψη των προνυμφών. Η παρακολούθησή τους γινόταν σε τακτικά χρονικά διαστήματα, τουλάχιστον 2 φορές την εβδομάδα. Τα άτομα που συλλέχθηκαν διατηρήθηκαν στους 4°C το καθένα σε ξεχωριστό αποστειρωμένο erpendorf που περιείχε καθαρή αιθανόλη 96%. Επίσης σε κάθε erpendorf σημειώθηκε η ημερομηνία και ο τόπος συλλογής. Η συλλογή των εντόμων ολοκληρώθηκε στα τέλη Σεπτεμβρίου του 2009.

2.2 Υλικά και μέσα καλλιέργειας βακτηρίων

Τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν για την αρχική ανάπτυξη των βακτηρίων μετά την απομόνωσή τους από το αποστειρωμένα άτομα της καρπόκαψας, περιγράφονται παρακάτω:

• *Tryptone Soy Broth*

Το Tryptone Soy Broth (TSB) είναι ένα πλούσιο θρεπτικό μέσο το οποίο υποστηρίζει την ανάπτυξη μεγάλης ποικιλίας αερόβιων και δυνητικά αναερόβιων μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων μυκήτων και άλλων οργανισμών. Η σύστασή του φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1: σύσταση TSB σε g/l

Συστατικά	g/litre
Casein peptone	17
Soya peptone	3
Glucose(Dextrose)	2.5
Sodium Chloride(NaCl)	5
Dipotassium hydrogen phosphate ($1 < K_2HPO_4$)	2.5

Παρασκευή

Για την παρασκευή 1000 ml Tryptone soy Broth (της εταιρίας Lab M), 30 g θρεπτικού μέσου προστέθηκαν σε 1 litre απιονισμένου νερού και αφού το διάλυμα αναμιχθεί καλά για λίγα λεπτά, αποστειρώνεται στους 120⁰ C για 25 min.

• *Tryptone Soy Agar*

Το Tryptone Soy Agar (TSA) είναι ένα στερεό θρεπτικό μέσο γενικευμένης χρήσεως, το οποίο χρησιμοποιείται ευρύτατα για την καλλιέργεια και απομόνωση μικροοργανισμών με σύνθετες διατροφικές ανάγκες καθώς και αυτών με περιορισμένες διατροφικές απαιτήσεις. Είναι κατάλληλο για την ανάπτυξη αερόβιων και δυνητικά αναερόβιων οργανισμών και μικροοργανισμών όπως οι Streptococci, Pneumococci και μέλη του γένους Neisseria, Brucella, Corynebacteria, Listeria, Pasteurella και Vibrio.

Πίνακας 2 : σύσταση TSA σε g/litre

Συστατικά	g/litre
Casein peptone	15
Soya peptone	5
Sodium chloride(NaCl)	5
Agar	15
Τελικό pH	7,3+/- 0,2 στους 37 ⁰ C

Παρασκευή

Για την παρασκευή 1000ml TSA (της εταιρίας Lab M), 40 g θρεπτικού μέσου προστέθηκαν σε 1litre απιονισμένου νερού και αφού το διάλυμα αναμιχθεί καλά για λίγα λεπτά, αποστειρώθηκε στους 120⁰ C για 25 min. Όταν ολοκληρώθηκε η διαδικασία της αποστείρωσης, το μέσο ψύχθηκε έως ότου προσεγγίσει την θερμοκρασία των 45-50⁰ C και ακολούθως, προτού στερεοποιηθεί, διανεμήθηκε σε αποστειρωμένα τριβλία Petri.

- **McConkey Agar**

Πίνακας 3 : σύσταση του McConkey Agar σε g/litre

Συστατικά	g/litre
Πεπτόνη	17g
Πολυπεπτόνη	3 g
Λακτόζη	10 g
Χολικά άλατα	1,5 g
Χλωριούχο νάτριο	5 g
Άγαρ	13,5 g
Ουδέτερο ερυθρό	0,03 g
Κρυσταλλικά ιώδες	0,001 g
Απεσταγμένο νερό μέχρι	1000 g
Τελικό pH	7,1

Είναι διαφορο-διαχωριστικό υλικό για τα Εντεροβακτήρια. Τα χολικά άλατα και το κρυσταλλικό ιώδες αναστέλλουν την ανάπτυξη των Gram θετικών και μερικών απαιτητικών Gram αρνητικών βακτηρίων. Τα διασπώντα τη λακτόζη παράγουν αποικίες κόκκινες ποικίλης εντάσεως που οφείλεται στο ερυθρό της φαινόλης που παίρνει το κόκκινο χρώμα σε pH κάτω των 6,8. Τα μη ζυμώντα τη λακτόζη εντεροβακτηριακά παράγουν αποικίες έγχρωμες διαφανείς.

Εντεροβακτηριακά που ζυμώνουν τη λακτόζη όπως οι *E.coli*, *Klebsiella* και *Enterobacter* παράγουν αποικίες κόκκινες που περιβάλλοντα από μία ζώνη θολερή λόγω καθιζήσεως των χολικών αλάτων.

2.3 Stock γλυκερόλης

Προκειμένου να μην είναι αναγκαία η συνεχής ανακαλλιέργεια των στελεχών και για να διατηρηθούν όσο το δυνατόν περισσότερα βακτήρια ζωντανά έγινε stock γλυκερόλης των καλλιεργειών αυτών, αφού προηγουμένως είχε γίνει ανακαλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών σε φρέσκο θρεπτικό μέσο (TSA).

- ◆ Υγρό θρεπτικό μέσο TSB τοποθετήθηκε σε vials (γυάλινα μπουκαλάκια με πάμα-χωρητικότητα 20 ml). Μοιράστηκε η ποσότητα των 5ml στο κάθε vials όπου αποστειρώθηκε και εκεί τελικά μεταφέρθηκαν με αποστειρωμένες οδοντογλυφίδες οι πρόσφατα αναπτυγμένες αποικίες των βακτηρίων.
- ◆ Οι υγρές καλλιέργειες επωάστηκαν στους 28⁰C για 48h.
- ◆ Έπειτα σε αποστειρωμένα erpendorf μεταφέρθηκε η ποσότητα των 1,5 ml από το κάθε γυάλινο μπουκαλάκι και έγινε φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm × 5 min.
- ◆ Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε 1 ml από μίγμα TSB και γλυκερόλης (τελικής συγκέντρωσης σε γλυκερόλη 15-20%).
- ◆ Μετά την προσθήκη γλυκερόλης, πραγματοποιήθηκε πολύ καλό vortex.
- ◆ Τέλος έγινε μεταφορά όλης της ποσότητας των erpendorfs σε νέα καθαρά erpendorfs , τα οποία παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 1h και στη συνέχεια διατηρήθηκαν στους -80⁰C, όπου και παρέμειναν σε όλη την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Σημείωση

Χρησιμοποιήθηκε υλικό από τα γυάλινα vials και με την βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου επιστρώθηκαν τριβλία που περιείχαν φρέσκο, αποστειρωμένο θρεπτικό TSA ώστε να είναι δυνατή η απομόνωση χρωμοσωμικού DNA. Οι νέες αποικίες αναπτύχθηκαν και πάλι στους 28⁰C × 48h.

2.4 Διαδικασία ομογενοποίησης των εντόμων και επίστρωση σε τριβλία με θρεπτικό μέσο

Από αποστειρωμένα έντομα απομακρύνθηκαν όλα τα εξαρτήματα (κεραίες, πτέρυγες και πόδια) καθώς ενδιαφέρον παρουσίαζε η μελέτη της βακτηριακής χλωρίδας στο εσωτερικό των εντόμων. Έπειτα το σώμα των εντόμων τοποθετήθηκε σε erpendorf με 200 μl TSB και ομογενοποιήθηκε με αποστειρωμένα πλαστικά εμβολάκια. Πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις 10⁻¹ – 10⁻⁶ και επιστρώθηκε η καθεμία (ποσότητα: 50μl) σε τριβλίο Petri που περιείχε ήδη TSA. Όλη η παραπάνω διαδικασία έλαβε χώρα σε συσκευή κάθετης νηματικής ροής για την εξασφάλιση πλήρως αποστειρωμένων συνθηκών. Τα τριβλία Petri επωάστηκαν στους 28⁰C για 48h και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στους 4⁰C.

2.5 Μοριακή ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών

Η ταυτοποίηση των στελεχών που απομονώθηκαν πραγματοποιήθηκε με μια σειρά πειραματικών διαδικασιών:

- ◆ Απομόνωση DNA από βακτηριακές αποικίες
- ◆ Ενίσχυση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) του γενετικού τόπου του 16S rRNA
- ◆ Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης
- ◆ Καθαρισμός των προϊόντων PCR
- ◆ Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας DNA ανά δείγμα
- ◆ Αλληλούχιση

2.6 Απομόνωση DNA από βακτηριακές αποικίες

2.6.1 Πρωτόκολλο Απομόνωσης DNA κατά Spilker

Για την παρούσα μελέτη ήταν αναγκαία η απομόνωση επαρκούς ποσότητας βακτηριακού DNA, η οποία βασίστηκε στο πρωτόκολλο που προτείνουν οι Spilker et al (2004). Η πειραματική διαδικασία απαιτούσε προηγουμένως την καλλιέργεια των στελεχών σε τριβλία Petri που περιείχαν στερεό θρεπτικό μέσο Tryptone Soy Agar (TSA), από stock γλυκερόλης που φυλάσσονταν στους -80°C , για την απόκτηση αμιγών βακτηριακών αποικιών. Ακολούθησαν τα παρακάτω βήματα:

- Αρχικά 20 μl Lysis buffer (SDS 0,25%, NaOH 0,05N) προστέθηκαν σε erpendorf του 1,5 ml
- Διακριτές αποικίες, μία για κάθε στέλεχος, απομονώθηκαν από τα τριβλία και εμβαπτίστηκαν στα erpendorf που περιείχαν Lysis buffer
- Τα δείγματα, αφού αναδεύτηκαν καλά, τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 95°C για 15min.
- Ακολούθως προστέθηκαν 180 μl αποστειρωμένου απιονισμένου νερού (dH₂O).
- Αφού αναδεύτηκαν καλά, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 12,000 rpm για 3min στους 15°C . Με τον τρόπο αυτό όλα τα πρωτεϊνικά κατάλοιπα καταβυθίστηκαν ενώ τα νουκλειικά οξέα παρέμειναν διαλυμένα στο υπερκείμενο.
- Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, αποθηκεύτηκαν στους -20°C για μελλοντική χρήση.

2.6.2 Πρωτόκολλο Απομόνωσης DNA από έντομο με 5% Chelex 100 (Bio-Rad) (Malloch et al., 2006)

1. Υλικά

- Chelex 100 (Bio-Rad)
- Αποστειρωμένο, απεσταγμένο νερό

2. Εκτέλεση

- Ομογενοποιούμε σε eppendorf tube με 50μl (5-10% Chelex 100 σε νερό) ένα ενήλικο άτομο *Cydia pomonella*
- Vortex για 5-10 sec
- Επώαση στους 56°C για 35 min
- Στην συνέχεια επώαση στους 95°C για 15 min
- Τοποθέτηση στον πάγο για 2 min
- Vortex για 5-10 sec
- Φυγοκέντρηση στις 1200rpm για 2 min
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο tube
- Αποθήκευση στον -80°C

Η Chelex 100 μοριακή ρητίνη βιολογικού βαθμού, είναι μία εξαιρετικά καθαρή χηλική ρητίνη ειδικά σχεδιασμένη και πιστοποιημένη για εξαγωγή του DNA – στόχου ώστε να είναι έτοιμο προς PCR. Η Chelex 100 εξασφαλίζει την ποιότητα του PCR προϊόντος πετυχαίνοντας την πλήρη απομάκρυνση των αναστολέων της PCR. Άλλα χαρακτηριστικά του Chelex 100 είναι: ότι δεν φράζει τα tips στην πιπέτα, κάθε φιάλη συνοδεύεται από πιστοποιητικό ανάλυσης, έχει δοκιμασμένο pH για να εξασφαλίσει αλκαλικές συνθήκες που βοηθούν τη λύση των κυττάρων και αυξάνει το ποσό του ενισχυμένου προϊόντος.

2.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η ενίσχυση του γενετικού τόπου του 16S rRNA επιτεύχθηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Ο συγκεκριμένος γενετικός τόπος επιλέχθηκε επειδή σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία είναι ο πιο συντηρημένος μεταξύ των βακτηριακών στελεχών και επομένως ο πιο κατάλληλος για την ταυτοποίηση τους. Η πειραματική διαδικασία βασίστηκε στα δημοσιεύματα των Spilker et al (2004) καθώς και των L.Mazzon et al (2008). Για την ενίσχυση όλων των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν ένας «forward primer» ο fD1 και ένας «reverse primer» ο rP1. Το μέγεθος του τμήματος που ενισχύθηκε από τους συγκεκριμένους primers ήταν της τάξης των 1500bp.

Πίνακας 4: Εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR

Εκκινητές	Αλληλουχίες	Ενισχυμένο τμήμα (bp)
fD1	5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG- 3'	1500
rP1	5 ACG GTT ACC TTG TTA CGA CTT 3'	

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25μl, όπου περιέχονταν 2 μl DNA στόχου, 200 μM dNTPs, 0,8 μM από τον κάθε εκκινητή, 1U Taq DNA πολυμεράσης (HyTest, UK), 2 μM MgCl₂ και 1 μl 10 × PCR buffer όπως προβλέπεται από τον κατασκευαστή. Η σύσταση του μίγματος (master mix) που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση 7 αντιδράσεων PCR φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 5: σύσταση master mix για την αντίδραση PCR

Συστατικά	Ποσότητα
dNTPs (25mM each)	1,60μl
MgCl ₂ (50mM)	8,00μl
Buffer 10×	20,00μl
Primer fD1 24,4 μM	6,56μl
Primer rP1 27,3 μM	5,90μl
Taq DNA polymerase 5 υ/μl	1,60μl
DNA template	16,00 μl
ddH ₂ O	140.34 μl
Τελικός όγκος	200 μl

Προκειμένου να καθοριστούν η βέλτιστη συγκέντρωση του DNA και ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης, πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικοί έλεγχοι με τη χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων του DNA-στόχου (0,5/1/2/3/4 μ l) και την εφαρμογή διαδοχικά αυξανόμενου αριθμού κύκλων PCR. Η κάθε αντίδραση τελικά επαναλήφθηκε για 35 κύκλους και χρησιμοποιήθηκε κυρίως η συγκέντρωση των 2 μ l, όπως φαίνεται και στον πίνακα 5. Η διαφορά που προκαλούσε η μεταβολή της ποσότητας του DNA στόχου στον τελικό όγκο του master mix, καλυπτόταν κατά περίπτωση με την προσθήκη ή αφαίρεση κατάλληλης ποσότητας απιονισμένου H₂O. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf Master Cycler.

Οι συνθήκες ενίσχυσης του γενετικού τόπου του 16S rRNA είναι οι εξής:

- **Αρχική αποδιάταξη : 95⁰ C για 2 min**
- Αποδιάταξη: 96⁰ C για 30 sec
- Υβριδοποίηση εκκινητών : 56⁰ C για 30 sec
- Επιμήκυνση: 72⁰ C για 90 sec
- **Τελική επιμήκυνση: 72⁰ C για 10 min**

Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε για **35 κύκλους**.

Μετά το πέρας της αντίδρασης, τα PCR προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης.

2.8 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθος τους. Το μέγεθος των τμημάτων εκτιμάται με βάση κάποιο μάρτυρα μοριακών μεγεθών τμημάτων DNA. Στην προκειμένη περίπτωση η ηλεκτροφόρηση έγινε για να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα της αντίδρασης PCR, δηλαδή η ενίσχυση του επιθυμητού γενετικού τόπου μεγέθους 1500bp. Η προετοιμασία της πηκτής αγαρόζης έγινε με την εξής διαδικασία:

- 0,8 g αγαρόζης διαλύθηκαν σε 100 ml διαλύματος TBE 1x (τελική συγκέντρωση 0,8% w/v). Το αρχικό διάλυμα TBE 10x είχε προηγουμένως αραιωθεί (10ml TBE+90ml H₂O).
- Το διάλυμα αναδεύτηκε και θερμάνθηκε για 2 min έως ότου διαλυθεί πλήρως όλη η ποσότητα αγαρόζης.

- Προστέθηκαν 10 μl βρωμιούχου αιθιδίου, για να είναι εμφανείς οι ζώνες του DNA κατά την παρατήρηση της πηκτής σε λάμπα υπεριώδους φωτός.
- Το διάλυμα προστέθηκε σε ειδικό καλούπι όπου παρέμεινε μέχρι να πολυμεριστεί.
- Η πηκτή τοποθετήθηκε στη συνέχεια στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία περιείχε 70 ml TBE 1× και 630 ml H₂O.

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων απαιτείται η προσθήκη Loading buffer σε αυτά. Σε 5μl κάθε PCR προϊόντος προστέθηκαν 2μl Loading buffer και αναδεύτηκαν. Μαζί με τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκε και ένας μάρτυρας μεγέθους τμημάτων DNA. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 100 volts και ακολούθησε παρατήρηση της πηκτής σε λάμπα υπεριώδους Φωτός.

Τα δείγματα που έδωσαν τα επιθυμητά αποτελέσματα, συγκεντρώθηκαν και κωδικοποιήθηκαν με σκοπό των καθαρισμό τους. Η κωδικοποίησής τους έγινε ως εξής

- Το πρώτο γράμμα αναφέρεται στο αναπτυξιακό στάδιο του εντόμου :
A για ενήλικο, L για προνύμφη
- το δεύτερο γράμμα στον ξενιστή
A για μήλο, P για αχλάδι
- και το τρίτο γράμμα αναφέρεται στην καλλιεργητική μέθοδο που εφαρμόζεται στον αγρό
B για βιολογικό και C για συμβατικό (Πίν.1-Παρ.ΙΙ) .

2.9 Καθαρισμός προϊόντων PCR

Αφού πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR, απαιτήθηκε ο καθαρισμός αυτών προκειμένου να ακολουθήσει η διαδικασία της αλληλούχισης. Τα προϊόντα καθαρίστηκαν από τους εκκινητές ,τα νουκλεοτίδια, την πολυμεράση και διάφορα άλατα με την χρήση QIAquick PCR purification Kit της εταιρίας QIAGEN ακολουθώντας την παρακάτω διαδικασία:

► Αρχικά προστέθηκαν 200μl buffer PBI σε 40μl PCR δείγματος(ολική ποσότητα PCR προϊόντος που είχαμε) και αναδεύτηκαν καλά.

Επιβεβαιώθηκε ότι το χρώμα του μίγματος ήταν κίτρινο, όμοιο δηλαδή με αυτό του buffer PBI χωρίς το δείγμα PCR.

- ▶ Σε erpendorf των 2 ml τοποθετήθηκε από μία ειδική στήλη QIAquick.
- ▶ Τα δείγματα φορτώθηκαν στις ειδικές στήλες που βρίσκονταν στο εσωτερικό των erpendorf και φυγοκεντρήθηκαν για 30-60 sec, προκειμένου να συγκρατηθεί το DNA και τα υπόλοιπα συστατικά να καταβυθιστούν.
- ▶ Το περιεχόμενο των erpendorf απορρίφθηκε αφού απομακρύνθηκαν από αυτά οι ειδικές στήλες. Στη συνέχεια οι στήλες επανατοποθετήθηκαν στο εσωτερικό αυτών.
- ▶ Για την έκπλυση των στηλών, προστέθηκαν σε κάθε μία από αυτές 0,75 ml buffer PE και φυγοκεντρήθηκαν πάλι για 30-60 sec.
- ▶ Επαναλήφθηκε η ίδια διαδικασία με πριν, απορρίφθηκε δηλαδή το περιεχόμενο των erpendorf που είχε καταβυθιστεί σε αυτά μετά την φυγοκέντρηση, αφού είχαν προηγουμένως αφαιρεθεί από αυτά οι στήλες. Στη συνέχεια οι στήλες τοποθετήθηκαν πάλι στο εσωτερικό των erpendorf και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για ένα ακόμα λεπτό.
- ▶ Οι ειδικές στήλες τοποθετήθηκαν ακολούθως σε καθαρά erpendorf των 1,5ml.
- ▶ Για την εξαγωγή του DNA, προστέθηκαν 30μl buffer EB (10Mm TrisCl, pH 8,5) στο κέντρο της μεμβράνης κάθε στήλης και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1min. Εναλλακτικά, για αυξημένη συγκέντρωση DNA, προστίθενται 50μl elution buffer στο κέντρο της μεμβράνης κάθε στήλης, οι στήλες αφήνονται για 1min και ακολουθεί φυγοκέντρηση αυτών.

Είναι σημαντικό να επιβεβαιωθεί ότι το elution buffer έχει διανεμηθεί απευθείας επάνω στη μεμβράνη των στηλών, για την ολοκληρωμένη εξαγωγή του προσδεδεμένου στις στήλες DNA.

2.10 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας DNA ανά δείγμα

Τον καθαρισμό των PCR προϊόντων ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός αυτών με φωτομέτρηση, προκειμένου να διαπιστωθεί η συνολική ποσότητα DNA (ng/μl DNA) που περιεχόταν σε κάθε δείγμα.

Η φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε στα 260nm, μετά από αραιώση 5μl PCR προϊόντος σε 495μl ddH₂O (αραιώση 1/100). Οι τιμές της απορρόφησης στα 260nm ανάγονται σε συγκέντρωση DNA, η οποία στην προκειμένη περίπτωση έπρεπε να είναι τουλάχιστον 50 ng/μl για τις ανάγκες της αλληλούχισης. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων (Πίν.2 Παρ-II) προέκυψαν από την εφαρμογή του παρακάτω τύπου:

$$C \text{ (mg/ml)} = OD_{260\text{nm}} \times \text{dilution factor (100)} \times 50$$

Συγκέντρωση DNA = οπτική απορρόφηση_{260 nm} × συντελεστής αραίωσης(100)× 50

2.11 Αλληλούχιση του 16S rRNA γονιδίου και ανάλυση των αλληλουχιών

Τα προϊόντα PCR, αφού υπέστησαν κατάλληλη προετοιμασία, στάλθηκαν για αλληλούχιση στην εταιρία **MACROGENE** στην Κορέα, με σκοπό τον ακριβή προσδιορισμό της αλληλουχίας του γενετικού τύπου του 16S rRNA κάθε βακτηριακού στελέχους.

Μετά την αλληλούχιση ακολούθησε η σύγκριση των αλληλουχιών με βάση δεδομένων, χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο **BLAST**, με τελικό στόχο την ταξινόμηση, εάν αυτή ήταν δυνατή, των απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών σε κάποιο γένος ή είδος.

Ο αλγόριθμος **BLAST** (*Basic Local Alignment Search Tool*) χρησιμοποιείται για τη σύγκριση μιας αλληλουχίας νουκλεοτιδίων με μια βάση δεδομένων ώστε να βρεθούν οι αλληλουχίες με την μεγαλύτερη ομολογία (ομοιότητα) (Altschul et al, 1990).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- ◆ Πληκτρολογήσαμε στο διαδίκτυο τη διεύθυνση <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- ◆ Επιλέξαμε **BLAST with bacterial genomes**
- ◆ Εισαγάγαμε την επιθυμητή αλληλουχία
- ◆ Επιλέξαμε **Bacteria → BLAST ALL**
- ◆ Επιλέξαμε **View report** και μετά από λίγα λεπτά αναζήτησης εμφανίστηκαν τα αποτελέσματα **sequences producing significant alignments**, ενώ ταυτόχρονα εμφανίζονται και οι τιμές **score** και **E value**.

2.12 Κατασκευή Φυλογενετικού Δέντρου

Η κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Μεγίστης Πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood - <http://hcv.lanl.gov/tmp/findodel/68ef0e/otherinfo.html>). Βασίζεται αρχικά στην δημιουργία υποτιθέμενων δέντρων και βάση αυτών επιλέγεται το μέγεθος των κλάδων από το οποίο μεγιστοποιείται η πιθανότητα τα μοριακά δεδομένα να δίνουν ένα τέτοιο δέντρο. Το σύνολο όλων αυτών των πιθανοτήτων τελικά συγκρίνεται για όλα τα πιθανά δέντρα και το δέντρο με την μεγαλύτερη πιθανότητα θεωρείται ως η καλύτερη εκτίμηση. Το μοντέλο που επιλέχθηκε ήταν το GTR+c.

Επίσης προκειμένου να κατασκευαστεί το δέντρο, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα PHYLIP 3.6C (the *PHY*Logeny Inference Package) (Felsenstein, 2004). Είναι ένα πακέτο προγραμμάτων για φυλογενετικές αναλύσεις (εξελικτικά δέντρα). Μπορεί να χειριστεί δεδομένα με τη μορφή αλληλουχιών, γονιδιακών συχνοτήτων, θέσεων αναγνώρισης από ενδονουκλεάσες περιορισμού και μήτρας γενετικών αποστάσεων. Προσφέρει τη δυνατότητα διαφόρων μεθόδων ανάλυσης, όπως μήτρας γενετικών αποστάσεων, φειδωλότητας, μέγιστης πιθανοφάνειας και δημιουργία εξελικτικών δέντρων με τη μέθοδο bootstrap. Είναι διαθέσιμο στην ηλεκτρονική διεύθυνση : <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>. Η πιθανότητα του κάθε κλάδου να αντιπροσωπεύει ένα πραγματικό διαχωρισμό ελέγχθηκε με τη μέθοδο bootstrap. Πραγματοποιήθηκαν 100 bootstrap επαναλήψεις.

Το Φυλογενετικό δέντρο παρουσιάζεται στην ενότητα των αποτελεσμάτων (σελ. 42).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Παρά το γεγονός ότι ο αριθμός των βακτηριακών αποικιών που κατάφεραν να αναπτυχθούν σε τριβλία Petri υπήρξε μεγάλος, εξετάστηκαν τελικά 29 αποικίες. Επί της ουσίας αυτές ήταν που εμφάνισαν σημαντικές μορφολογικές διαφορές μεταξύ τους, ενώ προσπάθεια έγινε να συμπεριληφθούν στα τελικά δείγματα αποικίες που αντιπροσώπευαν τα δύο υπό μελέτη αναπτυξιακά στάδια του εντόμου και ταυτόχρονα έντομα από όλους τους διαθέσιμους αγρούς. Το σύστημα των διαδοχικών αραιώσεων έδωσε καλύτερα αποτελέσματα στις αραιώσεις $10^{-1}/10^{-2}/10^{-3}/10^{-4}$, καθώς ο αριθμός των αποικιών ήταν μεγαλύτερος και η ανάπτυξη τους ολοκληρωνόταν εντός των 48h και στην προβλεπόμενη θερμοκρασία των 28°C.

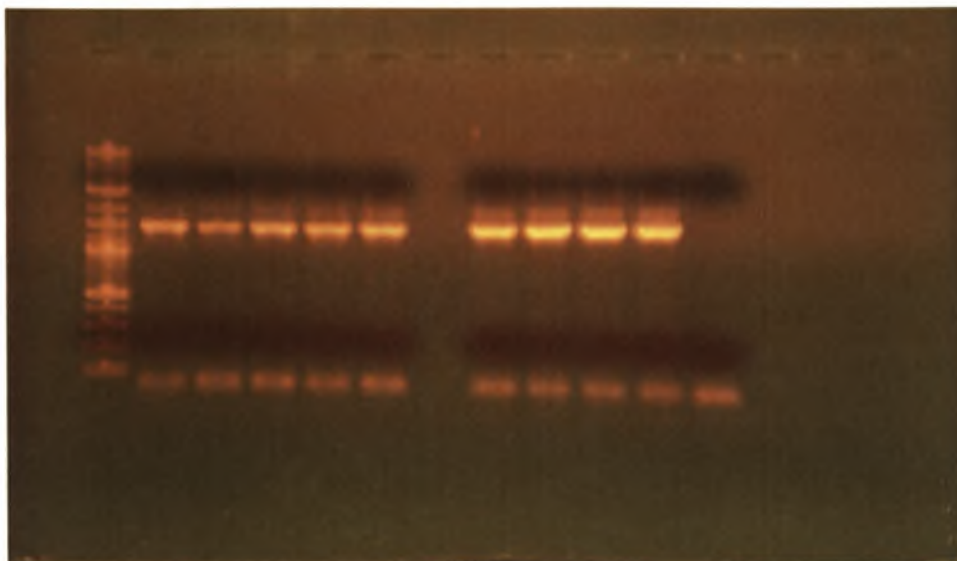
3.1 Μοριακή ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών

Η ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών, που απομονώθηκαν βασίστηκε αρχικά στην ενίσχυση του γενετικού τύπου του 16S rRNA με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και στην αλληλούχιση αυτού για τον ακριβή προσδιορισμό της αλληλουχίας του.

Επιπρόσθετα, προτού τα προϊόντα αναλυθούν ως προς την αλληλουχία τους, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση αυτών σε πηκτή αγαρόζης, για να διαπιστωθεί εάν είχε ενισχυθεί το επιθυμητό τμήμα μεγέθους 1500bp. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή αγαρόζης παρατηρήθηκε σε λάμπα υπεριώδους φωτός και βάσει ενός μάρτυρα μοριακού βάρους που ηλεκτροφορήθηκε μαζί με τα προϊόντα PCR εξακριβώθηκε το αποτέλεσμα της αντίδρασης, η ενίσχυση δηλαδή του γενετικού τύπου του 16S rRNA.

Στην παρακάτω εικόνα (Εικ.7) παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποια από τα προϊόντα που προέκυψαν ανάμεσα στο σύνολο των αποτελεσμάτων. Τα προϊόντα κατά την ηλεκτροφόρηση στο πήκτωμα της αγαρόζης εμφανίστηκαν στο αναμενόμενο ύψος των 1500 βάσεων. Επίσης στο τελευταίο πηγαδάκι «φορτώθηκε» το δείγμα που δεν περιείχε DNA-μήτρα (negative control) και κατά συνέπεια δεν αναμενόταν εμφάνιση προϊόντος. Αντίθετο αποτέλεσμα θα ήταν ανεπιθύμητο καθώς θα επιβεβαίωνε επιμόλυνση.

1500 pb→



← τελευταία θέση
Neg. control

Εικ. 7 Σε κάθε πηγαδάκι στο gel αγαρόζης περιέχονται από αριστερά προς δεξιά: **Marker, 1, 2, 3, 4μl DNA-στόχου** από το δείγμα **LAB-1 errendorf(A)** (προνόμφη βιολογικού μήλου, απομονώθηκε DNA από αποικία που αναπτύχθηκε σε TSA από την αραιώση 10^{-1}), **2 μl** από το δείγμα **AAB-5** (που είχε δώσει αποτελέσματα σε προηγούμενες PCR και χρησιμοποιείται εδώ ως **Positive control**), **1, 2, 3, 4μl DNA-στόχου** από το DNA του δείγματος **LAB-1** που περιέχονταν σε διαφορετικό **errendorf (B)** από το προηγούμενο και τέλος το **Negative control**.

Ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων από τα υπόλοιπα συστατικά της αντίδρασης PCR και φωτομετρικός προσδιορισμός της συνολικής ποσότητας DNA (ng/μl DNA) κάθε δείγματος (Πίν.2- Παρ.ΙΙ). Στη συνέχεια όλα τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση. Τα αποτελέσματα για κάθε δείγμα υπέστησαν κατάλληλη επεξεργασία, η forward αλληλουχία του 16S rRNA κάθε στελέχους συγκρίθηκε, με την βοήθεια του προγράμματος BLAST (οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν και τα αποτελέσματα αυτής της διαδικασίας είναι διαθέσιμα στο Παρ-ΙΙ), με την αντίστοιχη αλληλουχία όλων των γνωστών βακτηριακών γονιδιωμάτων και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη σύγκριση αυτή φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 6. Χαρακτηρισμός των βακτηρίων που απομονώθηκαν, με τη βοήθεια της 16S rDNA ανάλυσης αλληλουχίας

Χαρακτηρισμός ¹	μήκος αλληλουχίας ²	Δείγμα	Η ομοιότητα της 16S rDNA αλληλουχίας ³	
			Κοντινότεροι συγγενείς	% Ομοιότητα
<i>Flavibacter sp.</i>	700	AAB-1	<i>C. michiganensis subsp. sepedonicus</i>	96.0
<i>Flavibacter sp.</i>	650	AAB-2	<i>C. michiganensis subsp. sepedonicus</i>	95.4
<i>Flavibacter sp.</i>	700	AAB-3	<i>C. michiganensis subsp. sepedonicus</i>	97.1
<i>Cyprinobacillus sp.</i>	650	AAB-4	<i>L. sphaericus C3-41</i>	84.7
<i>Cyprinobacillus sp.</i>	800	AAB-5	<i>L. sphaericus C3-41</i>	83.0
<i>Flavibacter sp.</i>	650	AAB-6	<i>C. michiganensis subsp. sepedonicus</i>	95.1
<i>Flavibacter sp.</i>	700	AAB-7	<i>C. michiganensis subsp. sepedonicus</i>	98.3
<i>Cyprinobacillus sp.</i>	650	AAB-8	<i>L. sphaericus C3-41</i>	80.5
<i>Flavibacter sp.</i>	650	AAB-9	<i>C. michiganensis subsp. sepedonicus</i>	96.7
<i>Flavibacter sp.</i>	650	AAB-10	<i>C. michiganensis subsp. sepedonicus</i>	95.6
<i>Flavibacter sp.</i>	650	AAB-11	<i>C. michiganensis subsp. sepedonicus</i>	98.1
<i>Marine actinobacterium sp.</i>	700	AAB-12	<i>M. actinobacterium PHSC20C1</i>	97.4
<i>Erwinia sp.</i>	700	APB-1	<i>E. tasmaniensis Et1/99</i>	97.7
<i>Erwinia sp.</i>	700	APB-2	<i>E. tasmaniensis Et1/99</i>	96.3
<i>Erwinia sp.</i>	650	APB-3	<i>E. tasmaniensis Et1/99</i>	93.8
<i>Erwinia sp.</i>	650	APB-4	<i>E. tasmaniensis Et1/99</i>	93.7
<i>Erwinia sp.</i>	600	AAC-1	<i>E. tasmaniensis Et1/99</i>	95.8
<i>Enterobacter sp.</i>	650	AAC-2	<i>Enterobacter sp. 638</i>	99.0
<i>Erwinia sp.</i>	700	AAC-3	<i>E. tasmaniensis Et1/99</i>	95.7
<i>Erwinia sp.</i>	600	AAC-4	<i>E. tasmaniensis Et1/99</i>	95.5
<i>Erwinia sp.</i>	650	AAC-5	<i>E. tasmaniensis Et1/99</i>	95.7
<i>Paracoccus sp.</i>	700	LAC-3	<i>P. denitrificans PD1222 chromosome2</i>	97.1
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	650	LAC-4	<i>E. casseliflavus EC10 cont1.23</i>	100.0
<i>Enterococcus sp.</i>	650	LAC-5	<i>E. casseliflavus EC10 cont1.23</i>	95.6
<i>Erwinia sp.</i>	600	LAB-1	<i>E. tasmaniensis Et1/99</i>	96.0
<i>Erwinia sp.</i>	650	LAB-2	<i>E. tasmaniensis Et1/99</i>	96.0
<i>Erwinia sp.</i>	700	LAB-3	<i>E. tasmaniensis Et1/99</i>	96.6
<i>Erwinia sp.</i>	700	LAB-4	<i>E. tasmaniensis Et1/99</i>	96.1
<i>Erwinia sp.</i>	700	LAB-5	<i>E. tasmaniensis Et1/99</i>	96.1

1. Χαρακτηρισμός των στελεχών βασισμένος στην 16S rDNA αλληλουχία τους. Για ορισμένα στελέχη ο χαρακτηρισμός σε επίπεδο είδους είναι δύσκολος εξαιτίας της υψηλής ομοιότητας της αλληλουχίας με περισσότερες της μίας αλληλουχίας στη βάση δεδομένων όπου εισάγεται (BLAST).

2. Το μήκος της συγκρινόμενης αλληλουχίας με τη χρήση BLASTN

3. Στενότερος συγγενής που προκύπτει από τη σύγκριση με τη βάση δεδομένων EMBL. Επίσης δίνονται τα ποσοστά ομοιότητας με τις πλησιέστερες σχετικές καταχωρήσεις στη βάση δεδομένων.

Ο πίνακας 6 παρουσιάζει τα αποτελέσματα της ανάλυσης των 16S rDNA αλληλουχιών. Η 16S rRNA ανάλυση είναι μία πολύ σημαντική διαδικασία βακτηριακής ταξινόμησης. Δύο στελέχη που δείχνουν ομολογία στις 16S rDNA ακολουθίες της τάξης του 97,5% ή χαμηλότερα, θα έχουν λιγότερο από το 60 με 70% ομοιότητα του DNA και, συνεπώς, δεν ανήκουν στο ίδιο είδος. Υποτίθεται ότι μόνο στελέχη βακτηρίων που παρουσιάζουν πολύ μεγάλη ομοιότητα $\geq 99\%$, έχουν ένα αξιόπιστο προσδιορισμό σε επίπεδο είδους. Οργανισμοί που δε μπορούν να ταξινομηθούν λόγω της χαμηλής σχέσης τους ως προς τα ήδη περιγραφόμενα είδη και εξαιτίας της μοναδικής φυλογενετικής θέσης τους, χρειάζονται νέα έρευνα προκειμένου να λάβουν ειδικό ταξινομικό χαρακτήρα (Stackebrandt et al., 1994).

Σύμφωνα με την παραπάνω αρχή, ο χαρακτηρισμός σε επίπεδο είδους δεν ήταν εφικτός στις περισσότερες περιπτώσεις, και αρκετά βακτηριακά στελέχη ήταν δυνατόν να χαρακτηριστούν μόνο σε επίπεδο γένους. Σε επίπεδο είδους ταυτοποιήθηκαν τα βακτήρια *Enterococcus casseliflavus* EC10 cont1.23 (LAC-4, 100%) και *Enterobacter* sp.638 (AAC-2, 99%) με τα υψηλότερα ποσοστά ομοιότητας των αλληλουχιών τους προς τις αντίστοιχες αλληλουχίες βακτηρίων που είναι καταχωρημένες στη βάση δεδομένων (EMBL).

Όσον αφορά τα υπόλοιπα στελέχη, αυτά δεν παρουσίασαν τόσο σημαντική ομολογία με την αλληλουχία του 16S rRNA κάποιου γνωστού βακτηριακού είδους, επομένως η ταξινόμηση τους περιορίστηκε στο πλησιέστερο κατά περίπτωση γένος από τα ήδη γνωστά και διαθέσιμα στη βάση δεδομένων. Με αυτόν τον τρόπο προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα: *Clavibacter* sp. (98,3% και 98,1%), *Erwinia* sp. (97,7%), *Actinobacterium* sp. (97,4%), *Paracoccus* sp. (97,1%). Στα δείγματα κυριάρχησε το γένος *Erwinia* μεταξύ των απομονωθέντων βακτηρίων, καθώς το 45% των βακτηριακών στελεχών φάνηκε να είναι στενά συνδεδεμένο μαζί του, ενώ το 28% των στελεχών ήταν στενά συνδεδεμένο με *Clavibacter* sp., αποτελέσματα που έδειξαν ξεκάθαρα τον επιπολασμό αυτών των δύο ομάδων στο σύνολο της βακτηριακής κοινότητας της καρπόκαψας.

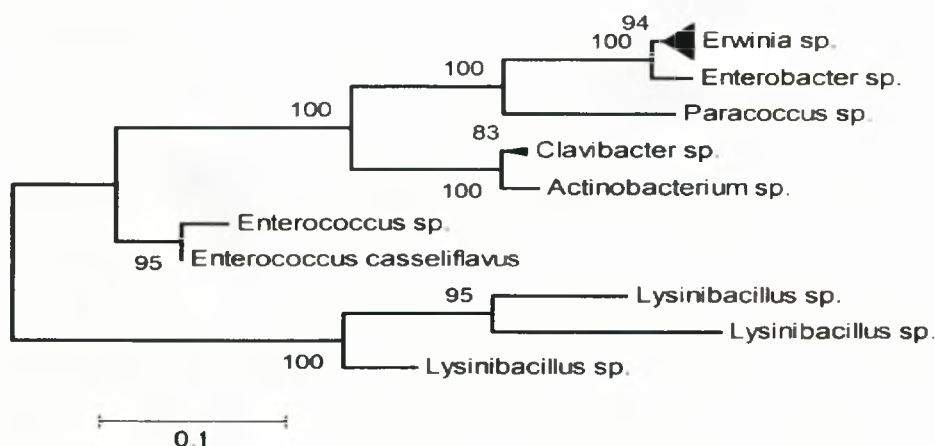
Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και από την σύγκριση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των αποικιών που αναπτύχθηκαν στα τριβλία στη διάρκεια του πειράματος, με τα επίσημα καταγεγραμμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά των αποικιών του κάθε γένους και είδους. Πολλά από τα είδη του *Paracoccus* παράγουν καρροτενοειδή εξ ου και ο πορτοκαλί-ροζ χρωματισμός των αποικιών (Hirschber et al., 1999, Tsubokura et al., 1999b), και κάποια παράγουν καρροτενοειδή όπως η

ζεαξανθίνη η οποία οδηγεί σε κίτρινη-πορτοκαλί χρώση αποικίας (Berry et al., 2003). Το βακτηριακό στελέχος με τον κωδικό LAC-3 ανέπτυξε αποικίες που είχαν μορφή κυκλική, ολόκληρη, επίπεδη και με χαρακτηριστικά έντονο πορτοκαλί χρωματισμό. Τελικά φάνηκε να ανήκει στο γένος *Paracoccus* με ποσοστό 97,1%. Επιπλέον πρέπει να σημειωθεί πως οι αποικίες του αναπτύσσονταν με ταχύ ρυθμό στο θρεπτικό μέσο TSA ακόμη και σε πολύ χαμηλότερες θερμοκρασίες από αυτή των 28°C (ίσως και στη συντήρηση του ψυγείου, στους 4°C όπου διατηρούνταν τα τριβλία).

Οι εντερόκοκκοι καλλιεργούνται ευκολότερα από τους άλλους στρεπτόκοκκους σε κοινό άγαρ και παράγουν μικρές λευκές αποικίες. Αυτή ακριβώς τη μορφή είχαν και οι αποικίες του στελέχους με κωδικό LAC-4 που τελικά προσδιορίστηκε ως *Enterococcus casseliflavus* με το μεγαλύτερο δυνατό ποσοστό (100%).

Τέλος στην περίπτωση του *Enterobacter* sp.638 με ποσοστό ομοιότητας 99%, οι αποικίες του εμφανίστηκαν όπως περιγράφονται οι χαρακτηριστικές αποικίες των *Enterobacter*. Άσπρες και συχνά βλενώδεις λόγω ελύτρου.

Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια να καθοριστούν οι φυλογενετικές σχέσεις των βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν. Σχεδιάστηκε φυλογενετικό δέντρο που απεικονίζει τις σχέσεις των στελεχών με την χρήση του προγράμματος PHYLIP 3.6C (the *PHY*Logeny Inference Package) όπως φαίνεται στην Εικ.8.



Εικ. 8. Φυλογενετικό δέντρο της βακτηριακής κοινότητας, που βασίζεται στην 16S rDNA ανάλυση αλληλουχίας της βακτηριακής χλωρίδας της *Cydia pomonella*. Η ράβδος με κλίμακα 0.1 δηλώνει το ποσοστό της εκτιμώμενης απόκλισης της ακολουθίας (0,1=10% απόκλιση).

Το φυλογενετικό δέντρο απεικονίζει συγκεντρωμένα σε ομάδες τα βακτήρια που ταυτοποιήθηκαν, παρέχοντας μια εικόνα των πιθανών φυλογενετικών τους σχέσεων καθώς και των αποστάσεων μεταξύ των ομάδων.

Ταυτοποιήθηκαν αρκετά στελέχη ως *Erwinia* sp., και κατά την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου σχεδόν υπήρξε αλληλοεπικάλυψη, γεγονός που δείχνει ότι πιθανότατα πρόκειται για το ίδιο στέλεχος, μολονότι απομονώθηκε το καθένα από διαφορετικό άτομο, διαφορετικούς ξενιστές και αγρούς. Οπότε εμφανίζονται ομαδοποιημένα όλα τα βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Erwinia* και μάλιστα πολύ κοντά στα βακτηριακά στελέχη που χαρακτηρίστηκαν ως *Enterobacter* sp., καθώς όλα τα παραπάνω είναι εντεροβακτήρια. Στην ίδια πλευρά του δέντρου, βρίσκεται και το προσδιορισμένο σε επίπεδο είδους *Enterococcus casseliflavus* με ποσοστό ομολογίας 100% ,τοποθετημένο δίπλα ακριβώς στο γένος του, *Enterococcus* sp. Τα βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν ως *Clavibacter* sp. εμφανίστηκαν σε μεγάλη συχνότητα στο σύνολο των αποτελεσμάτων και τοποθετήθηκαν κοντά στα *Actinobacterium* sp. Τέλος, τα βακτήρια που φάνηκε να συγκλίνουν στα Gram θετικά *Lysinibacillus* sp., εμφανίζονται ομαδοποιημένα, σημείωσαν όμως πολύ μικρά ποσοστά ομολογίας (80.5%, 83.0%, 84.7%) ώστε να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα και να μπορέσει να γίνει οποιοσδήποτε χαρακτηρισμός, ακόμη και σε επίπεδο γένους. Τα τρία αυτά στελέχη είναι πιθανό να ανήκουν σε διαφορετικά είδη, σύμφωνα με την μεταξύ τους τοποθέτηση στο φυλογενετικό δέντρο.

3.2 Χαρακτηρισμός των απομονωθέντων βακτηρίων σε επίπεδο είδους

Ο προσδιορισμός σε επίπεδο είδους πραγματοποιήθηκε για δύο βακτηριακά στελέχη όπως προαναφέρθηκε, που προσδιορίζονται ως *Enterococcus casseliflavus* (LAC-4) και ως *Enterobacter* sp.638 (AAC-2) με ποσοστά ομοιότητας 100% και 99% αντίστοιχα. Τα δυο παραπάνω βακτήρια αποτελούν μέλη της εντερικής μικροχλωρίδας.

Enterococcus casseliflavus

(Bacteria/Firmicutes/Bacilli/Lactobacillales/Enterococcaceae/ Enterococcus)

Οι εντερόκοκκοι είναι gram-θετικά, αρνητικά στην καταλάση, προαιρετικά αναερόβια βακτήρια που αναπτύσσονται ως διπλόκοκκοι σε κοντές αλυσίδες. Το γένος *Enterococcus* περιλαμβάνει 17 είδη. Η ονομασία εντερόκοκκος οφείλεται στο ότι αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις προκαλούν βακτηριακή ενδοκαρδίτιδα και ουρολοιμώξεις.

Τα ανθρώπινα κλινικά στελέχη οφείλονται είτε στο *E. faecalis* (74-90%) ή στο *E. faecium* (5-16%). Περιστασιακά, ανθρώπινες λοιμώξεις μπορεί να οφείλονται σε *Enterococcus raffinosus*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus durans*, ή *Enterococcus avium*. Οι εντερόκοκκοι αποτελούν φυσιολογική χλωρίδα του γαστρεντερικού σωλήνα των ανθρώπων και των ζώων. Επίσης, μπορούν να βρεθούν στις εκκρίσεις του στόματος, των ανώτερων αναπνευστικών οδών, του δέρματος και του κόλπου.

Το *Enterococcus casseliflavus* είναι gram-θετικό βακτήριο που έχει αναφερθεί σπάνια σε λοίμωξη του ανθρώπου. Μία ιδιαίτερη περίπτωση παρατηρήθηκε όταν ένας υγιής άνθρωπος είχε πόνο και μειωμένη όραση στο αριστερό του μάτι, ενώ δύο ημέρες νωρίτερα χτυπήθηκε σε όλο το πρόσωπό του, από την ουρά ενός αλόγου. Τα αποτελέσματα των εξετάσεων αποκάλυψαν ότι η αιτία των συμπτωμάτων που εμφάνισε, ήταν το βακτήριο *Enterococcus casseliflavus* (Khurana et al., 2009).

Κινητικοί Enterococci είναι σπάνιες αιτίες της βακτηριαμίας (Patel et al., 1998). Έχει περιγραφεί περίπτωση πολυμικροβιακής βακτηριαμίας συμπεριλαμβανομένων και των *Enterococcus casseliflavus*, *Escherichia coli*, και *Morganella morganii*. Έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες σχετικά με τα μοναδικά γενετικά χαρακτηριστικά τους και την κλινική σημασία αυτών των απομονώσεων, όπως η είναι η εγγενής αντοχή τους στη βανκομυκίνη και η χαμηλή λοιμογόνος δύναμή τους. Περαιτέρω μελέτη των μηχανισμών της ανθεκτικότητας των Enterococci στη βανκομυκίνη θα μπορούσε να αποφέρει πιθανώς χρήσιμες πληροφορίες για την επίτευξη νέων τρόπων αντιμετώπισής τους (Pappas et al., 2004). Το γεννητικό και ουροποιητικό σύστημα των ενήλικων ατόμων είναι το πιο κοινό σημείο εισόδου για τα μικρόβια που προκαλούν βακτηριαμία, αλλά έχει εμπλακεί πολύ λιγότερο στην αιτιολογία της βακτηριαμίας σε παιδιά. Ωστόσο, σε μελέτη φάνηκε η μόλυνση από το ουροποιητικό

σύστημα να είναι η αιτιολογία του 12% των ενδονοσοκομειακών επεισοδίων της βακτηριαιμίας σε παιδιά (Reid et al., 1999).

Enterobacter sp. 638

(Bacteria/Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Enterobacteriales/Enterobacteriaceae)

Η οικογένεια Enterobacteriaceae περιλαμβάνει 12 γένη. Πολλά από αυτά βρίσκονται στη φυσιολογική χλωρίδα και είναι δυνητικά παθογόνα, γιατί απομονώνονται πολύ συχνά από λοιμώξεις του ανθρώπου. Η οικογένεια αποτελείται από Gram-αρνητικά βακτηρίδια, τα οποία αναπτύσσονται αεροβίως και προαιρετικά αναεροβίως, είναι άσπορα, κινητά ή ακίνητα ανάλογα με το αν φέρουν ή όχι μαστίγια., προκαλούν ζύμωση της γλυκόζης με ή χωρίς παραγωγή αερίου, παράγουν καταλάση, ανάγουν τα νιτρικά άλατα σε νιτρώδη και τέλος δεν παράγουν οξειδάση. Ορισμένα παράγουν υδρόθειο.

Τα εντερικά βακτηρίδια έχουν θεωρηθεί ύποπτα για την πρόκληση οξείας και χρόνιας γαστροεντερικής πάθησης. Οι οργανισμοί μπορούν να ανακτηθούν από φυσικά περιβάλλοντα όπως τα δάση και το γλυκό νερό όπου βρίσκονται ως κανονική μικροχλωρίδα. Μπορούν να ανακτηθούν και από τα περιττώματα υγιών ατόμων χωρίς συμπτώματα της ασθένειας. Το σχετικό ποσοστό των παθογόνων και μη παθογόνων στελεχών είναι άγνωστο. Επίσης έχουν ανακτηθεί από τροφές όπως είναι τα γαλακτοκομικά προϊόντα, ακατέργαστα οστρακόδερμα, και φρέσκα ακατέργαστα λαχανικά και επομένως μπορούν να θεωρηθούν επικίνδυνα για την υγεία. Τα εντεροβακτήρια είναι θερμοευαίσθητα και θανατώνονται με θέρμανση (πάνω από 70°C). Το κατάλληλο μαγείρεμα και ο υγιεινός χειρισμός των τροφίμων μπορούν να προλάβουν τις εντεροβακτηριακές μολύνσεις σε έναν μεγάλο βαθμό.

Το βακτήριο Enterobacter sp. 638 απομονώθηκε από το φυτό *Trichocarpa populus x deltoides* με το οποίο και ζει συμβιωτικά. Αποτελεί ένα ενδοφυτικό βακτήριο που συνδέεται με το δέντρο λεύκα. Ανάλυση του γονιδιώματος έδειξε ότι αυτό το στέλεχος είναι στενά συνδεδεμένο με την ανάπτυξη των φυτών και την προώθηση των βακτηρίων *Pantoea* sp. και *Buttiauxella* sp. Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι τα βακτήρια που ανήκουν στην τάξη Enterobacteriales μπορεί να επηρεάζουν τον σχηματισμό φυμάτων στα όσπρια (Benhizia et al., 2004). Επιπλέον, αυτού του είδους τα βακτήρια μπορούν να δεσμεύσουν το άζωτο, να παράγουν φυτικές ορμόνες και να έχουν ένα σύνθετο μονοπάτι σηματοδότησης το οποίο ελέγχεται από σηματοδοτικά

μόρια της Ν-ακυλολακτόνης της ομοσερίνης (Veselova et al., 2003). Η οικογένεια Enterobacteriaceae περιλαμβάνει βακτήρια που ζουν ελεύθερα ή συμβιωτικά καθώς και παθογόνα βακτήρια, με ένα μεγάλο εύρος ξενιστών που κυμαίνονται από φυτά έως τον άνθρωπο.

3.3 Χαρακτηρισμός των απομονωθέντων βακτηρίων σε επίπεδο γένους

Clavibacter sp.

(Bacteria/Actinobacteria/Actinomycetales/Micrococccineae/Microbacteriaceae)

Μετά την ταυτοποίηση τα βακτηριακά στελέχη AAB-7 (98.3%) και AAB-11 (98.1%), έδειξαν τη μεγαλύτερη ομολογία σε επίπεδο 16S rRNA γονιδίου, με το *Clavibacter* sp. Στο σύνολο των 29 στελεχών που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη, τα 8 φάνηκε να ανήκουν στο γένος *Clavibacter* και πιο συγκεκριμένα εμφάνισαν ως πλησιέστερο είδος το *Clavibacter michiganensis*.

Το *Clavibacter michiganensis* είναι ένα αερόβιο Gram-θετικό παθογόνο βακτήριο που αποτελεί σήμερα το μόνο είδος εντός του γένους. Τα πρώην άλλα είδη του *Clavibacter* αναταξινομήθηκαν στα γένη *Leifsonia*, *Rathayibacter* και *Curtobacterium*. Το *Clavibacter michiganensis* σήμερα περιλαμβάνει πέντε υποείδη: *Cm* subsp. *insidiosus*, *C.m* subsp. *michiganensis*, *C.m* subsp. *nebraskensis*, *C.m* subsp. *sepedonicus* και *C.m* subsp. *tesselarius*. Αυτό οργανισμός φαίνεται να περιορίζεται σε μεγάλο βαθμό σε ενδοφυτικό τρόπο ζωής.

Το *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms), αποτελεί επίσης ένα φυτοπαθογόνο βακτήριο καραντίνας. Προκαλεί την ασθένεια ‘Δακτυλιωτή σήψη’ της πατάτας. Φυτά ξενιστές που προσβάλλει: πατάτα (*Solanum tuberosum* L.) και το ζαχαρότευτλο (*Beta vulgaris* L.) (φυσικές μολύνσεις). Μετά από τεχνητή μόλυνση προσβάλλονται επίσης τα φυτά: τομάτα (*Lycopersicon esculentum* Mill.), μελιτζάνα (*S. melongena* L.), ελαιοκράμβη (*Brassica napus* L.), αγριοκαρπουζιά (*S. rostratum*), τσουκνίδα (*Urtica dioica*). Για το συγκεκριμένο βακτήριο μελετήθηκε και ο κίνδυνος διάδοσής του μέσω των επιφανειακών υδάτων και η μόλυνση των καλλιεργειών πατάτας από την άρδευση. Προέκυψε το συμπέρασμα ότι η μόλυνση των επιφανειακών υδάτων με Cms αποτελεί απειλή για την παραγωγή πατάτας μόνο αν

στα υδρόβια φυτά υποδοχής μπορεί να πολλαπλασιαστεί το *Cms* σε υψηλές πυκνότητες (Van der Wolf et al.,2004).

Στο *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) έχει καταχωρηθεί στη λίστα EPPO των παθογόνων καραντίνας καθώς προκαλεί το βακτηριακό έλκος της πατάτας που είναι μία σοβαρή ασθένεια που απαντάται παγκοσμίως. Είναι θετικό κατά Gram, με βακτηριακά κύτταρα κορνοειδούς σχήματος, δεν έχει αυτόνομη κίνηση, είναι βραδείας ανάπτυξης ενώ έχει άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης 24-28 °C. Σχηματίζει αποικίες άσπρου, κίτρινου και ροζ χρώματος, από τις οποίες μόνο οι άσπρες και οι κίτρινες είναι οι παθογόνες (MacNab,2004). Το εύρος των ξενιστών του *C. michiganensis* περιλαμβάνει την τομάτα, την πιπεριά και διάφορα άγρια σολανώδη είδη.

Ένα ακόμη είδος του γένους *Clavibacter* σχετικό με τις ασθένειες του φυτού είναι το *Cm* subsp. *insidiosus*, το οποίο προκαλεί τη βακτηριακή μάρανση στη μηδική. Ανακαλύφθηκε συγκεκριμένη ταχεία μέθοδος, η οποία στοχεύει ειδικά σε αυτό το παθογόνο φυτών. Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συχνότητας της μετάδοσης των παθογόνων παραγόντων στους σπόρους μηδικής (Samac et al.,1998).

Erwinia sp

(Bacteria/Proteobacteria/GammaProteobacteria/Enterobacteriales/Enterobacteriaceae)

Μεταξύ των απομονωθέντων βακτηρίων, το 45% των βακτηριακών στελεχών φάνηκε να είναι στενά συνδεδεμένο με το γένος *Erwinia* sp. Έτσι 13/29 βακτήρια (APB-1/APB-2/APB-3/APB-4/AAC-1/AAC-3/AAC-4/AAC-5/LAB-1/LAB-2/LAB-3/LAB-4/LAB-5) με ποσοστά ομολογίας που κυμάνθηκαν από 93.7% έως 97.7% έδειξαν ότι πιθανόν ανήκουν στο γένος *Erwinia* sp. Το γένος *Erwinia* αποτελείται από 12 είδη τα οποία είναι συνδεδεμένα με τα φυτά ως παθογόνοι παράγοντες, αλλά, οι περιπτώσεις που αναφέρονται ως κλινικά στελέχη είναι υπερβολικά σπάνιες.

Το *Erwinia* sp. *tasmaniensis* Et1/99 στέλεχος φάνηκε να είναι ο στενότερος συγγενής και στις 13 απομονώσεις. Το στέλεχος *Erwinia* sp. *tasmaniensis*. πρόσφατα απομονώθηκε από λουλούδια και φλοιό σε δέντρα μηλιάς και αχλαδιάς σε τρεις τοποθεσίες στην Αυστραλία. Το βακτήριο δεν ήταν παθογόνο για τα μήλα και τα αχλάδια. Από τον DNA-DNA κινητικό υβριδισμό, τα μικροβιολογικά χαρακτηριστικά και τις αναλύσεις των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, το είδος αυτό

φάνηκε να έχει σχέση με τα παθογόνα είδη, *Erwinia*, αλλά και με τα επιφυτικά είδη *Erwinia billingiae* (Geider et al., 2006).

Είναι ένα μη παθογόνο βακτήριο, το οποίο έχει την ικανότητα να εκκρίνει ινδόλυλο-3-οξικό οξύ για την αύξηση της διαθεσιμότητας των θρεπτικών ουσιών στην επιφάνεια του φυτού σε σχέση με την ποσότητα που προβλέπεται. Γι αυτά τα θρεπτικά συστατικά αρχικά αυξάνεται η πρόσληψη και στη συνέχεια μεταβολίζονται. Τα εκκριτικά συστήματα περιλαμβάνουν την υπερευαίσθητη αντίδραση τύπου III που είναι παρούσα σε πολλά παθογόνα. Διαφορές ή εκλιπόντα τμήματα στους παράγοντες παθογένειας διακρίνουν το Et1/99 στέλεχος από παθογόνα μικρόβια, όπως *Pectobacterium atrosepticum* και τα σχετικά *Erwinia spp.* Επιπλέον από το στέλεχος Et1/99 λείπει εντελώς η σορβιτόλη, στο γεγονός αυτό οφείλεται και η αδυναμία της να εισβάλει στα φυτά ξενιστές. Η λοιμογόνος δύναμη του *Erwinia amylovora* σε αντίθεση, εξαρτάται από την αξιοποίηση της σορβιτόλης. Η παρουσία άλλων συναφών παραγόντων παθογένειας στο Et1/99 αποκαλύπτουν το προγονικό γονιδιακό υπόβαθρο πολλών βακτηρίων (Kube et al., 2008).

Αν και όπως προαναφέρθηκε οι περιπτώσεις παθογένειας στον άνθρωπο είναι σχεδόν ανύπαρκτες, το *Erwinia persicina*, έχει απομονωθεί από τα ούρα μιας γυναίκας με ουρολοίμωξη, ενώ ιδιαίτερη αίσθηση έκανε το γεγονός ότι το βακτήριο *Erwinia tasmaniensis* απομονώθηκε από ιστό ενός ασθενούς με αυχενική λεμφαδενίτιδα. Αυτή ήταν και η πρώτη περίπτωση λοίμωξης ανθρώπου από το *Erwinia tasmaniensis* (Shin et al., 2008).

Θαλάσσιο *Actinobacterium* sp.

(Domain: Bacteria/ Phylum: Actinobacteria / Class: Actinobacteria)

Στο γένος *Actinobacterium* sp. κατατάχθηκε μετά την ταυτοποίησή του το στέλεχος AAB-12 αφού εμφάνισε ομολογία προς αυτό, σε επίπεδο 16S rRNA γονιδίου, κατά 97.4%. Επίσης το πλησιέστερο είδος ήταν το *Actinobacterium PHSC20C1*.

Έπειτα από πολλές μελέτες υποστηρίζεται πως στην εξερεύνηση νέων πηγών βιοδραστικών φυσικών προϊόντων, το θαλάσσιο περιβάλλον αξίζει ιδιαίτερη προσοχή, λόγω της αξιοσημείωτης ποικιλομορφίας των μικροοργανισμών και των προϊόντων που εμφανίζει (Bull et al., 2007) (Ward et al., 2006). Τα θαλάσσια

Actinobacteria βρίσκονται σε ιζήματα, στο νερό, καθώς και σε άλλες βιομάζες (μαγκρόβιων βιοτόπων) και σε υποστρώματα (ζώων). Πολλές προηγούμενες μελέτες στους οργανισμούς αυτούς, περιορίζονται μόνο στις εύκρατες περιοχές. Σε τροπικό περιβάλλον έρευνες πραγματοποιούνται τις δύο τελευταίες δεκαετίες. Στην πλειοψηφία των επιστημονικών ερευνών φάνηκε ξεκάθαρα η μεγάλη ποικιλομορφία αυτών των μικροοργανισμών στα θαλάσσια περιβάλλοντα. (Bull et al., 2005) (Stach et al., 2005) (Zhiyong L., 2009).

Το στέλεχος *Actinobacterium str. PHSC20C1* απομονώθηκε από δείγμα επιφανειακού ύδατος στην Ανταρκτική. Πρόκειται για Gram+ αερόβιο βακτήριο, ραβδοειδές. ψυχρόφιλο, ελεύθερο από συμβιωτικές σχέσεις και χωρίς να εμφανίζει μέχρι στιγμή παθογένεια. Τα χαρακτηριστικά των ακτινοβακτηρίων στα οποία οφείλεται η ικανότητα τους να επιβιώνουν στο κρύο, είναι προς το παρόν άγνωστα. Ωστόσο η μελέτη του γονιδιώματος αυτών των οργανισμών υπόσχεται να αποκαλύψει πληροφορίες σχετικά με τις φυσιολογικές προσαρμογές τους, την εξελικτική ιστορία, και το συνολικό περιεχόμενο του γονιδιώματος χρήσιμο σε συγκριτικές μελέτες του γονιδιώματος με μικροοργανισμούς που προέρχονται από χαμηλότερα γεωγραφικά πλάτη (Murray A., 2004).

Paracoccus sp.

(Bacteria/Proteobacteria/Alphaproteobacteria/Rhodobacterales/Rhodobacteraceae)

Το βακτηριακό στέλεχος LAC-3 προσδιορίστηκε με ένα ποσοστό ομολογίας 97.1% , ότι ανήκει στο γένος των *Paracoccus*, με το είδος *P. denitrificans* PD1222 να επικρατεί ως κοντινότερος συγγενής του.

Το *Paracoccus denitrificans* είναι ένα Gram-αρνητικό βακτήριο. Παλαιότερα ήταν γνωστό ως *Micrococcus denitrificans*, απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1910 από τον M. Beijerinck. Μετονομάστηκε το 1969 σε *Paracoccus denitrificans* από τον Davis. Πολλά χαρακτηριστικά του βρέθηκαν επίσης στα μιτοχόνδρια και εξαιτίας αυτού, το *Paracoccus denitrificans* θεωρείται να είναι πιθανός πρόγονος των ευκαρυωτικών μιτοχονδρίων. Το γονιδιώμα του αλληλουχήθηκε το 2004. Ζει στο έδαφος σε αερόβια ή αναερόβια περιβάλλοντα. Είναι υπεύθυνο για την απώλεια των αζωτούχων λιπασμάτων στο γεωργικό έδαφος. Δεν είναι γνωστές παθολογικές επιπτώσεις αυτού του βακτηρίου στον άνθρωπο.

Δύο πλασμίδια, χαμηλού αριθμού αντιγράφων, των 9 και 16 kb βρέθηκε να περιλαμβάνουν το εξωχρωμοσωμικό DNA ενός στελέχους *Paracoccus*. Μείωση των νιτρικών από το πλασμιδιακά-θεραπευτικά κύτταρα οδήγησε σε σημαντική ενδιάμεση συσσώρευση νιτρωδών σε σύγκριση με τα άγριου-τύπου κύτταρα. Εξετάζοντας τη νιτρική μείωση, διαπιστώθηκε ότι οφειλόταν κυρίως στο πλασμίδιο των 9kb, που ορίστηκε ως pYR1 (Barak et al., 2006).

Ένα βακτήριο (*Paracoccus* sp. YM3) ικανό να αποικοδομήσει το γεωργικό φάρμακο carbofuran το οποίο χαρακτηρίζεται από υψηλή υπολειμματικότητα δημιουργώντας σοβαρά περιβαλλοντικά προβλήματα, απομονώθηκε από ιλύ μολυσμένη από carbofuran. Το στέλεχος αυτό φαίνεται να μεταβολίζει carbofuran (50 mg L^{-1}) σε carbofuran-7-φαινόλη σε ελάχιστο αλατούχο μέσο στο οποίο η μόνη πηγή άνθρακα ήταν το φυτοφάρμακο και σε διάστημα 6 ημερών. Το Carbofuran και οι κύριοι μεταβολίτες του, αναλύθηκαν με τη μέθοδο HPLC. Η προσθήκη μιας άλλης πηγής άνθρακα οδήγησε σε επιτάχυνση της βιοαποικοδόμησης. Ένα πείραμα καπνού έδειξε ότι το YM3 θα μπορούσε να εξαλείψει το carbofuran στο έδαφος αποτελεσματικά και με ασφάλεια (Peng et al., 2008).

Το Methomyl, είναι ένα εξαιρετικά τοξικό φυτοφάρμακο που χρησιμοποιείται επίσης ευρέως στη γεωργία. Βρέθηκε πως ένα βακτηριακό στέλεχος που ονομάζεται mdw-1 μπορεί να αποικοδομήσει γρήγορα το methomyl. Η βέλτιστη θερμοκρασία και το pH για την ανάπτυξή του αλλά και για την βιοαποικοδόμηση του methomyl έδειξαν να είναι οι τιμές 30°C και 7,0 αντίστοιχα. Θα μπορούσε να αξιοποιήσει το methomyl ως μοναδική πηγή άνθρακα ή αζώτου. Το βακτήριο αυτό προσδιορίστηκε ως *Paracoccus* sp. σύμφωνα με τα μορφολογικά, φυσιολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του, και την φυλογενετική ανάλυση με βάση την αλληλουχία του 16S rDNA (Xu et al, 2009).

Paracoccus sp. BC74171. Πρόκειται για αερόβιο βακτήριο, μη-κινητό, Gram-αρνητικό, με πορτοκαλί-χρώση, ραβδοειδούς μορφής, παραγωγό ασταξανθίνης. Είναι θαλάσσιο βακτήριο που απομονώθηκε από την ακτή Haeundae στην Κορέα. Όλα τα στελέχη του γένους *Paracoccus* συγκρίθηκαν με το στέλεχος BC74171 χρησιμοποιώντας: ανάλυση των αλληλουχιών του 16S rRNA γονιδίου, τη μέθοδο των λιπαρών οξέων και τα προφίλ φυσιολογικής αντίδρασης. Με βάση τα αποτελέσματα των αναλύσεων αυτών, προτάθηκε ότι το BC74171 στέλεχος αποτελεί ένα είδος, το *Paracoccus* sp *haeundaensis* (Hyung Lee et al, 2004)

Lysinibacillus sp.

(Βακτήρια/Firmicutes/ Bacillales/Planococcaceae/Lysinibacillus)

Τα βακτήρια AAB-4, AAB-5, AAB-8 που ταυτοποιήθηκαν και έδειξαν να συγκλίνουν στα Gram θετικά *Lysinibacillus sp.*, σημείωσαν πολύ μικρά ποσοστά ομολογίας (84.7%, 83.0%, 80.5%) ώστε να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα και να μπορέσει να γίνει οποιοσδήποτε χαρακτηρισμός, ακόμη και σε επίπεδο γένους. Στενότερο συγγενή τους ωστόσο έδειξαν να έχουν το στέλεχος *L. sphaericus C3-41*.

Το *Lysinibacillus sphaericus* στέλεχος C3-41, παλαιότερα γνωστό ως *Bacillus sphaericus* C3-41, είναι ένα αερόβιο, μεσόφιλο, βακτήριο. Φέρει μαστίγια δεν αποτελεί ανθρώπινο παθογόνο, αντίθετα είναι παθογόνο των εντόμων. Για αυτή του την ιδιότητα χρησιμοποιείται ευρέως στην Κίνα ως εμπορικό εντομοκτόνο για τον έλεγχο των προνυμφών των κουνουπιών. Οι ιδιότητες του να καταπολεμά τα κουνούπια, οφείλονται κυρίως στα δυαδικά τοξικά του γονίδια binA και binB που έχουν τη μορφή κρυσταλλικών εγκλεισμάτων κατά τη διάρκεια της φάσης των σπορίων. Ανήκει στον ορότυπο H5a5b, δεν είναι σε θέση να μεταβολίζει πολυσακχαρίτες πιθανότατα λόγω έλλειψης των μεταφορέων και των βασικών ενζύμων, αλλά μπορεί να μεταβολίζει μια μεγάλη ποικιλία από άλλες οργανικές ενώσεις καθώς και τα αμινοξέα. (Hu et al., 2008).

Το στέλεχος *Lysinibacillus sp.* 70038 μπορεί να αποικοδομήσει PCL. Το PCL είναι ένα από τα εμπορικά βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά και βιοσυμβατούς πολυεστέρες που μπορούν να εξομοιωθούν από τους μικροοργανισμούς *Lysinibacillus sp.* 70038 (Xu et al., 2007).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως βακτήριο που ανήκει στο γένος *Lysinibacillus sp.* βρέθηκε να αποικοδομεί ένα γεωργικό φάρμακο το fomesafen που αποτελεί ένα επικίνδυνο ζιζανιοκτόνο και ανήκει στην κατηγορία των διφαινυλαιθέρων. Το αποικοδομητικό βακτήριο ZB-1 απομονώθηκε από μολυσμένο έδαφος, επιβαρυνόμενο από το fomesafen. Ταυτοποιήθηκε ως *Lysinibacillus sp.* με βάση τη συγκριτική ανάλυση του 16S rRNA γονιδίου (Bo et al., 2009).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αυτή η εργασία αποτελεί την πρώτη προσπάθεια για τη μελέτη της βακτηριακής χλωρίδας της *Cydia pomonella*. Η καρπόκαψα είναι ο σημαντικότερος εχθρός της μηλιάς και για τον έλεγχό της απαιτείται ένας μεγάλος αριθμός χημικών σκευασμάτων με υψηλό κόστος και τεράστια οικολογική επιβάρυνση. Οι σχέσεις συμβίωσης επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τους οργανισμούς που συμμετέχουν, καθώς μπορούν να μεταβάλλουν την οικολογία, την φυσιολογία και σε μερικές περιπτώσεις ακόμη και την μορφολογία τους. Επομένως η καλύτερη γνώση των συμβιωτικών σχέσεων και η δυνατότητα χειρισμού τους ενδέχεται να προσφέρει νέους τρόπους αντιμετώπισης σημαντικών εχθρών, περισσότερο φιλικούς για το περιβάλλον.

Φυσικοί πληθυσμοί της καρπόκαψας συλλέχθηκαν από δύο διαφορετικές περιοχές στην περιφέρεια Θεσσαλίας (Αγιά-μήλα και Βελεστίνο-αχλάδια). Η βακτηριακή χλωρίδα μελετήθηκε σε δύο αναπτυξιακά στάδια του εντόμου, τόσο σε ενήλικο επίπεδο όσο και σε προνυμφικό, στους δύο ξενιστές (μήλο και αχλάδι) και σε δύο τύπους αγρών (βιολογικό και συμβατικό). Τοποθετήθηκαν φερομονικές παγίδες τον Απρίλη (2009) με σκοπό τη σύλληψη των ενήλικων ατόμων, ενώ τον Μάιο (2009) παγίδες κυματοειδούς χάρτου τοποθετήθηκαν στους κορμούς των δέντρων ώστε να γίνει δυνατή και η σύλληψη των προνυμφών.

Ακολούθησε διαδικασία ομογενοποίησης των εντόμων και επίστρωση σε τριβλία με θρεπτικό μέσο TSA όπου και αναπτύχθηκαν οι αποικίες των βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν και μελετήθηκαν. Σκοπός της πειραματικής εργασίας ήταν η μοριακή ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών και αυτό πραγματοποιήθηκε με τα εξής βήματα:

- ◆ Απομόνωση DNA από βακτηριακές αποικίες
- ◆ Ενίσχυση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) του γενετικού τόπου του 16S rRNA
- ◆ Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης
- ◆ Καθαρισμός των προϊόντων PCR
- ◆ Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας DNA ανά δείγμα
- ◆ Αλληλούχιση

Μετά την παραπάνω διαδικασία τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τον αλγόριθμο **BLAST** που χρησιμοποιείται για τη σύγκριση μιας ακολουθίας με μια βάση δεδομένων (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Επιπλέον κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο με τη χρήση του προγράμματος PHYLIP 3.6C ώστε να καθοριστούν οι φυλογενετικές σχέσεις των βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν.

Τα τελικά αποτελέσματα έδειξαν πως ο χαρακτηρισμός σε επίπεδο είδους δεν ήταν εφικτός στις περισσότερες περιπτώσεις, και κάποια βακτηριακά στελέχη ήταν δυνατόν να χαρακτηριστούν μόνο σε επίπεδο γένους. Σε επίπεδο είδους ταυτοποιήθηκαν τα βακτήρια *Enterococcus casseliflavus* (100%) και *Enterobacter* sp.638 (99%) με τα υψηλότερα ποσοστά ομοιότητας των αλληλουχιών τους προς το σύνολο των αλληλουχιών που είναι καταχωρημένες στη βάση δεδομένων (EMBL).

Σε επίπεδο γένους προσδιορίστηκαν ως *Clavibacter* sp (98,3% και 98,1%), *Actinobacterium* sp (97,4%), *Erwinia* sp (97,7%), *Paracoccus* sp (97,1%). Τα τρία στελέχη που έκλιναν προς το γένος *Lysinibacillus* παρουσίασαν πολύ χαμηλά ποσοστά ομολογίας ώστε να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για την ταυτοποίησή τους ακόμη και σε επίπεδο γένους. Στα δείγματα κυριάρχησε το γένος *Erwinia* μεταξύ των απομονωθέντων βακτηρίων, καθώς το 45% των βακτηριακών στελεχών φάνηκε να είναι στενά συνδεδεμένο με αυτό το γένος, ενώ το 28% των στελεχών ήταν στενά συνδεδεμένο με *Clavibacter* sp.

Κάποια από τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και από την σύγκριση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των αποικιών που αναπτύχθηκαν στα τριβλία στη διάρκεια του πειράματος, με τα επίσημα καταγεγραμμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά των αποικιών του κάθε γένους και είδους.

Από το σύνολο των ταυτοποιημένων βακτηρίων που βρέθηκαν να συμβιώνουν με το έντομο *Cydia pomonella* ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση του *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms), που αποτελεί ένα φυτοπαθογόνο βακτήριο καραντίνας καθώς προκαλεί μία σοβαρή ασθένεια, την 'Δακτυλιωτή σήψη' της πατάτας. Το γεγονός αυτό ήταν απρόσμενο και η μόνη λογική εξήγηση που θα μπορούσε να του αποδοθεί είναι ότι το Cms αποτελεί πιθανότατα ένα παροδικό βακτήριο στην καρπόκαψα αφού δεν έχει αναφερθεί έως τώρα σχέση του εντόμου με το φυτό της πατάτας. Ακόμη πιο έντονο προβληματισμό προκαλεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων του στο σύνολο των απομονώσεων, όπως και τα σχετικά υψηλά ποσοστά που σημείωσε.

Ακόμη μία περίπτωση που αξίζει περαιτέρω μελέτης είναι αυτή του βακτηριακού στελέχους που απομονώθηκε από προνύμφη σε συμβατική καλλιέργεια μήλου (LAC-4) και ταυτοποιήθηκε με το υψηλότερο ποσοστό 100% ως *Enterococcus casseliflavus*

και αυτό γιατί το γένος των *Enterococcus* έχει αποδειχθεί πως εμπλέκεται σε σοβαρές λοιμώξεις του ανθρώπινου είδους. Το συγκεκριμένο γένος περιλαμβάνει 17 είδη. Τα ανθρώπινα κλινικά στελέχη οφείλονται είτε στο *E. faecalis* (74-90%) ή στο *E. faecium* (5-16%), ενώ αναφέρονται και περιπτώσεις περιστασιακών ανθρώπινων λοιμώξεων οφειλόμενων στο *Enterococcus casseliflavus*.

4.1 Προβληματισμοί

Η απόκλιση στον προσδιορισμό σε επίπεδο είδους θα μπορούσε να αποδοθεί σε διάφορους λόγους. Ένας βασικός λόγος είναι ότι η βάση δεδομένων δεν περιλαμβάνει τα προφίλ όλων των ειδών. Επίσης οι αλληλουχίες πολλών από τα απομονωμένα στελέχη έδειξαν χαμηλό ποσοστό ομοιότητας σε σχέση με εκείνες των στενότερων συγγενών τους που είναι εγγεγραμμένοι στη βάση δεδομένων, γεγονός που αποτελεί ένδειξη για την παρουσία νέων ειδών ή υποειδών μεταξύ των απομονωθέντων στελεχών. Τέλος, η ανακρίβεια θα μπορούσε να οφείλεται και σε τεχνικούς λόγους.

Η εφαρμογή της μοριακής μεθόδου PCR, με την ενίσχυση του γενετικού τόπου του 16S rRNA μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης είχε πλεονεκτήματα , όπως το γεγονός ότι το 16S rRNA γονίδιο είναι ένα πολύ καλά συντηρημένο μόριο και ότι η ίδια η μέθοδος χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευαισθησία.

Η εφαρμογή της μεθόδου PCR έδωσε αποτελέσματα για τα βακτηριακά στελέχη που κατάφεραν να αναπτυχθούν στα θρεπτικά υποστρώματα που επιλέχθηκαν. Το γεγονός αυτό αποτελεί περιοριστικό παράγοντα καθώς δεν είναι δυνατόν να αναπτυχθούν όλων των ειδών τα βακτήρια στα συγκεκριμένα θρεπτικά υποστρώματα. Επομένως εάν είχαν προκύψει προϊόντα PCR από ολικό DNA εντόμων, τότε πιθανότατα θα είχαν ταυτοποιηθεί περισσότερα συμβιωτικά βακτήρια της καρπόκαψας.

4.2 Κατευθύνσεις για το μέλλον

Τα βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν ως *Clavibacter* sp. (98,3% και 98,1%) έδειξαν μεγαλύτερη συγγένεια με το *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Τα παραπάνω ποσοστά δεν είναι ικανά να προσφέρουν έναν ασφαλή προσδιορισμό σε επίπεδο είδους. Το γεγονός ότι δεν πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση του απομονωθέντους στελέχους με κανένα από τα ήδη προσδιορισμένα και διαθέσιμα σε βάσεις δεδομένων βακτηριακά είδη, σε συνάρτηση με την απρόσμενη παρουσία ενός βακτηρίου σε έντομο, που φαίνεται ως τώρα να σχετίζεται μόνο με μία ασθένεια στην πατάτα, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πιθανότατα πρόκειται για ένα νέο βακτηριακό είδος.

Για να αποδειχθεί αυτή η παραδοχή απαιτούνται επανειλημμένες ερευνητικές προσπάθειες με πολύ καλό σχεδιασμό της μεθοδολογίας τους αλλά και ο αποκλεισμός της περίπτωσης πως πρόκειται για το παθογόνο βακτήριο της πατάτας *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Με αυτή τη λογική θα μπορούσαν να προκληθούν τεχνητές μολύνσεις με το νέο βακτηριακό στέλεχος σε φυτά πατάτας.

Επίσης η διαδικασία της ταυτοποίησης θα μπορούσε να διεξαχθεί και με άλλες βιοχημικές μεθόδους ή με τη μέθοδο του προφίλ των λιπαρών οξέων. Αρκετές μελέτες φαίνεται να χρησιμοποιούν τη μέθοδο των λιπαρών οξέων για τον χαρακτηρισμό των βακτηρίων (González et al., 1999, Laiz et al., 1999, Heyrman et al., 1999) και λιγότερες στηρίζουν τα αποτελέσματά τους μόνο στις τεχνικές με βάση το DNA. Ο συνδυασμός των δύο μεθόδων οδηγεί σε πιο αξιόπιστα συμπεράσματα για τον χαρακτηρισμό υπό μελέτη βακτηριακών στελεχών, καθώς η μία μέθοδος συμπληρώνει την άλλη. Η προσέγγιση αυτή χρησιμοποιείται ώστε να προκύψει μια αρχική ένδειξη για τα απομονωθέντα στελέχη και στη συνέχεια για την ομαδοποίηση των ίδιων βακτηρίων, όσων δηλαδή θα παρουσιάσουν παρόμοιο προφίλ λιπαρών οξέων στη σύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων τους. Μετά από αυτή τη διαδικασία μπορεί να εφαρμοστεί η τεχνική της ανάλυσης των 16S rDNA αλληλουχιών.

Ως εναλλακτική μέθοδος στη διαδικασία απομόνωσης του DNA στο συγκεκριμένο πείραμα, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί η τεχνική της ολικής απομόνωσης DNA από τα έντομα, η ενίσχυση του τμήματος 16S rRNA μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) και εν συνεχεία η εφαρμογή της μεθόδου των μικροσυτοιχιών (philo chips) στα αποτελέσματα με σκοπό των υβριδισμού τους.

Η εφεύρεση των μικροσυστοιχιών DNA αποτέλεσε τη βάση για μια μορφή υβριδοποίησης που επιτρέπει την πιο σωστή κατάταξη των δειγμάτων και την παράλληλη ανίχνευση πολύπλοκων μικροβιακών κοινοτήτων στο περιβάλλον. Η υβριδοποίηση που χρησιμοποιείται για την ανάλυση μικροβιακής κοινότητας, έχει συνήθως στόχο της το ριβοσωματικό μόριο RNA (γονίδιο). Τα RNA γονίδια αποτελούνται από εξαιρετικά συντηρημένες αλλά και μεταβλητές περιοχές στην αλληλουχία τους. Οι περιοχές αυτές στην αλληλουχία του ίδιου ή διαφορετικού βαθμού διατήρησης της ακολουθίας μπορούν να αξιοποιηθούν για το σχεδιασμό πολλαπλών ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών, για την ανίχνευση οργανισμών-στόχων σε διαφορετικό ή στο ίδιο φυλογενετικό επίπεδο. Εξ ορισμού, τα PhyloChips είναι μικροσυστοιχίες DNA που αποτελούνται από rRNA στοχευμένους ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές. Το μεγάλο πλεονέκτημα του υβριδισμού PhyloChip είναι ότι η αξιοπιστία της αναγνώρισης ενισχύεται έντονα, διότι όλοι οι μικροοργανισμοί που παρουσιάζουν ενδιαφέρον, μπορούν να ανιχνευθούν σε μία και μόνο δοκιμασία με πολλαπλής ιεραρχίας ανιχνευτές και σε όμοια επίπεδα εξειδίκευσης (Guschin et al., 1997, Wilson et al., 2002, Zhou J. et al., 2002, Chandler et al., 2003,).

Τέλος αξίζει να αναφερθεί η μέθοδος Ηλεκτροφόρησης Πηκτώματος Κλιμακούμενης Αποδιάταξης (DGGE) η οποία αποτελεί μορφή ηλεκτροφόρησης που χαρακτηρίζεται από χημική διαβάθμιση στο πήκτωμα. Η DGGE είναι χρήσιμη για την ανάλυση νουκλεϊκών οξέων όπως το RNA και DNA. Εφαρμόζοντας ένα μικρό δείγμα του DNA (ή RNA) στο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης που περιέχει μια ουσία μετουσίωσης, οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι αυτό είναι ικανό να προκαλέσει την τήξη του DNA σε διάφορα στάδια. Ως αποτέλεσμα αυτής της τήξης, το DNA εξαπλώνεται μέσω του πηκτώματος και μπορεί να αναλυθεί για μεμονωμένα τμήματα, ακόμη και για εκείνα των 200-700 ζευγών βάσεων. Με την τοποθέτηση δύο δειγμάτων δίπλα-δίπλα στο πήκτωμα, επιτρέποντάς τους να μετουσιωθούν μαζί, οι ερευνητές μπορούν να δουν εύκολα ακόμα και τις μικρότερες διαφορές στα δύο δείγματα ή τμήματα του DNA. Αυτή η διαδικασία είναι μοναδική γιατί έρχεται σε άμεση αντίθεση με τον τρόπο που μετουσιώνεται το DNA in vivo (Fischer et al., 1979, Fischer et al., 1980, Fischer et al., 1983).

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W. and Lipman D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J of Mol. Biol.* Vol. 215, Issue 3: 403-410
2. Ami E.B., Yuval B. and Jurkevitch E. (2009). Manipulation of the microbiota of mass-reared Mediterranean fruit flies *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) improves sterile male sexual. *J. of Intern. Soc. for Microb. Ecol.* 1–10
3. Avidov Z. and Harpaz I. (1969). Plant Pests of Israel. Israel Univ. Press, Jerusalem.
4. Barak Y., Yarmus M., Shapira R., van Rijn J. (2006). Nitrite reduction in *Paracoccus* sp. is affected by a novel plasmid pYR1. *FEMS Microbiol. Letters.* Vol. 208 Issue 1:111 – 116
5. Barnes M.M., Millar J G., Kirsch P.A., Hawks D.C. (1992). Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae) Control by Dissemination of Synthetic Female Sex Pheromone. Source: *J. of Econ. Ent.*, Vol. 85, Number 4:1274-1277(4)
6. Baumann P. (2005). Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *An. Review of Micr.*, Vol. 59: 155-189
7. Beard C.B, O'Neill S.L, Tesh R.B, Richards F.F., Aksoy S.(1993) Modification of arthropod vector competence via symbiotic bacteria. *Par. Tod.* ;9(5):179-83
8. Behar A., Yuval B., Jurkevitch E. (2005). Enterobacteria-mediated nitrogen fixation in natural populations of the fruit fly *Ceratitis capitata*. *Mol. Ecol.* 14:2637-2643
9. Behar A., Yuval B., Jurkevitch E. (2008). Gut bacterial communities in the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) and their impact on host longevity. *J. of In. Phys.* Vol. 54: 1377–1383
10. Benhizia Y., Benhizia H., Benguedouar A., Muresu R., Giacomini A., Squartini A. (2004). Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Syst. Appl. Microbiol.* 27: 462-468
11. Berry A., Janssens D., Humbelin M., Jore J., Hoste B., Cleenwerck I., Vancanneyt M., Bretzel W., Mayer A., Ulibarri R., Shanmugam B., Swings J. Pasamontes L. (2003). *Paracoccus zeaxanthinifaciens* sp. nov., a zeaxanthin-producing bacterium. *Int. J. of Syst. and Evol. Microb.* 53: 231–238

12. Bo L., Peng L., Huihui L., Rong L., Shunpeng L., Xing H.(2009). Biodegradation of fomesafen by strain *Lysinibacillus* sp. ZB-1 isolated from soil. *Sc. direct.* Vol. 77, Issue 11: 1614-1619
13. Bovey P. (1966). Super-famille des Tortricoidea. In A.S. Balachowsky (ed.), pp.456-458
14. Bronstein J., Alarcón R., Geber M. (2006). The evolution of plant–insect mutualisms. *New Phytol.* Vol. 172 Issue 3: 412 – 428
15. Bull AT, Stach JE, Ward AC, Goodfellow M. (2005) Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Ant. Van Leeuw.* 87(1):65-79
16. Bull A. T., James E.M. (2007). Stach Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *Tr. in Microbiol.*, Vol. 15, Issue 11: 491-499
17. Chanbusarakum L., Ullman D. (2008). Characterization of bacterial symbionts in *Frankliniella occidentalis* (Pergande), Western flower thrips. *J. of Invert. Pathol.* , Vol. 99, Issue 3: 318-325
18. Chandler D. P., Newton G. J., Small J. A. and Daly D. S. (2003). Sequence versus Structure for the Direct Detection of 16S rRNA on Planar Oligonucleotide Microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2950-8
19. Chandler S. M., Wilkinson T.L. and Douglas A.E. (2008). Impact of plant nutrients on the relationship between a herbivorous insect and its symbiotic bacteria. *Proc. R. Soc. Lond. B* 275:565-570.
20. Charmillot, P.J., D. Pasquier, A. Scalco, Hofer D. (1997). Lutte contre le carpocapse *Cydia pomonella* L. par un procédé attracticide. *Rev. Suisse de Viticult., Arboricult.,Horticult.* 29: 111-117.
21. Douglas A. E. (1998). Nutritional interactions in insect – microbial symbioses: Aphids and Their Symbiotic Bacteria *Buchnera*. *An. Review of Entomol.*, Vol. 43: 17-37
22. Douglas, A.E. (1998). Host benefit and the evolution of specialization in symbiosis. *Heredity* 81:599-603.
23. Douglas, A. E. (2006). Phloem-sap feeding by animals: problems and solutions. *J. Exp. Bot.* 57:747-754
24. Durvasula R.V., Gumbs A., Panackal A., Kruglov O., Aksoy S., Merrifield R.B., Richards F.F. and Beard C.B. (1997). Prevention of insect-borne disease:

- An approach using transgenic symbiotic bacteria. *PNAS*, vol. 94 no. 7 3274-3278
25. Durvasula R.V., Sundaram R.K., Kirsch P., Hurwitz I., Crawford C.V., Dotson E., Beard C.B. (2008). Genetic transformation of a Corynebacterial symbiont from the Chagas disease vector *Triatoma infestans*. *Exp Parasitol.*; 119(1): 94–98
 26. Estes, A. M., Hearn, D. J., Bronstein, J. L., Pierson, E. A. (2009). The Olive Fly Endosymbiont, "Candidatus *Erwinia dacicola*," Switches from an Intracellular Existence to an Extracellular Existence during Host Insect Development. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 7097-7106
 27. Evenden M.L., McClaughlin J.R. (2005). Male Oriental Fruit Moth Response to a Combined Pheromone-Based Attracticide Formulation Targeting Both Oriental Fruit Moth and Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae). *J. of Econ. Entomol.* Vol. 98, Issue 2: 317-325
 28. Felsenstein, J. (2004) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author., Seattle, WA Department of Genomic Sciences, University of Washington.
 29. Fischer S.G., Lerman L.S. (1979). Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell.* 16(1):191-200
 30. Fischer S.G., Lerman L.S. (1980). "Separation of random fragments of DNA according to properties of their sequences". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, , 77, 4420-4424.
 31. Fischer S.G., Lerman L.S. (1983). "DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory" . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 1579-1583.
 32. Geider K., Auling G., Du Z., Jakovljevic V., Jock S., Völksch B. (2006). *Erwinia tasmaniensis* sp. nov., a non-phytopathogenic bacterium from apple and pear trees. *Int J Syst Evol Microbiol.*; 56 2937-2943
 33. Geier PW. (1963). The life history of Codling Moth, *Cydia pomonella* (L) (Lepidoptera: Tortricidae), in the Australian Capital Territory. *Austral. J. of Zool.* 11(3): 323 – 367

34. Gomulski L., Pitts R., Costa S., Saccone G., Torti C., Polito L., Gasperi G., Malacrida A., Kafatos F., Zwiebel L. (2001). Genomic organization and characterization of the white locus of the Mediterranean fruitfly, *Ceratitidis capitata*. *Genetics*.157(3): 1245–1255
35. Gomulski L., Dimopoulos G., Xi Z., Soares M., Bonaldo M., Malacrida A and Gasperi G. (2008). Gene discovery in an invasive tephritid model pest species, the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* . *Genomics*, Vol. 9BMC:243
36. Gonzalez I., Laiz L., Hermosin B., Caballero B., Incerti C., Saiz-Jimenez C. (1999). Bacteria isolated from rock art paintings: the case of Atlanterra shelter (south Spain). *J. Microbiol. Meth.* 36: 123–127
37. Gündüz Akman E., Douglas A.E. (2009). Symbiotic bacteria enable insect to use a nutritionally inadequate diet. *Proc. R. Soc. B* 276: 987- 991
38. Guschin D. Y., Mobarry B. K., Proudnikov D., Stahl D. A., Rittmann B. E. and Mirzabekov A. D. (1997). Oligonucleotide microchips as genosensors for determinative and environmental studies in microbiology. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2397-2402.
39. Haine, E. R. (2008). Symbiont-mediated protection. *Proc. R. Soc. Lond. B* 275:353-361
40. Heyrman J., Mergaert J., Denys R., Swings J. (1999) The use of fatty acid methyl ester analysis (FAME) for the identification of heterotrophic bacteria present on three mural paintings showing severe damage by microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 181, 55–62
41. Hosokawa, T., Y. Kikuchi, M. Shimada, Fukatsu T. (2007). Obligate symbiont involved in pest status of host insect. *Proc. R. Soc. Lond. B* 274:1979-1984
42. Hosokawa T., Kikuchi Y., Shimada M., and Fukatsu T. (2008). Symbiont acquisition alters behaviour of stinkbug nymphs. *Biol Lett.* 4:45-48
43. Hu X., Fan W., Han B., Liu H., Zheng D., Li Q., Dong W., Yan J., Gao M., Berry C., Yuan Z. (2008). Complete Genome Sequence of the Mosquitocidal Bacterium *Bacillus sphaericus* C3-41 and Comparison with Those of Closely Related Bacillus Species. *J. of Bacteriol.*, Vol. 190, No. 8: 2892-2902
44. Hyung J.L., Sook Y. K., Choi T., Lee W. J., Tae Y. K. (2004). *Paracoccus haeundaensis* sp. nov., a Gram-negative, halophilic, astaxanthin-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol.* 54: 1699-1702

45. Kaltenpoth M., Goettler W., Koehler S., StrohmLife E. (2010). Cycle and population dynamics of a protective insect symbiont reveal severe bottlenecks during vertical transmission. *Evolut. Ecol.* 24(2):463-477
46. Khurana RN, Leder HA, Nguyen QD, Do DV.(2009).*Enterococcus casseliflavus* endophthalmitis associated with a horse tail injury. *Arch Ophthalmol.*;127(11):1551-2
47. Knight A.L., Potting R.P.J., Light D. and DeJong T.M. (2002). Modeling the impact of a sex pheromone/kairomone attracticide for management of codling moth (*Cydia pomonella*). *Acta Horticult.* 584:215-220
48. Kounatidis I, Crotti E., Sapountzis P., Sacchi L., Rizzi A., Chouaia B., Bandi C., Alma A., Daffonchio D., Mavragani-Tsipidou P., Bourtzis K. (2009). *Acetobacter tropicalis* Is a Major Symbiont of the Olive Fruit Fly (*Bactrocera oleae*). *Appl. and Environ. Microbiol.*, Vol. 75, No. 10: 3281-3288
49. Kube M, Migdoll AM, Müller I, Kuhl H, Beck A, Reinhardt R, Geider K. (2008).The genome of *Erwinia tasmaniensis* strain Et1/99, a non-pathogenic bacterium in the genus *Erwinia*. *Environ Microbiol.*;10(9):2211-22
50. Kührt U., Samietz J., Höhn H., Dorn S. (2006). Modelling the phenology of codling moth: Influence of habitat and thermoregulation. *Agricult. Ecosyst. & Envir.* Vol. 117, Issue 1: 29-38
51. Laiz L., Groth I., Gonzalez I., Saiz-Jimenez C. (1999). Microbiological study of the dripping waters in Altamira cave (Santillana del Mar, Spain). *J. Microbiol. Methods* 36: 129–138
52. Malloch, G., Hight F., Kasprowicz L., Pickup J., Neilson R., Fentonl B. (2006). Microsatellite marker analysis of pzeach-potato aphids (*Myzus persicae*, Homoptera: Aphididae) from Scottish suction traps. *Rul. of Entomol. Res.* 96: 1-10
53. Mazzon L., Pisedda A., Simonato M., Martinez-Sanudo I., Squartini and Girolami V. (2008). Presence of specific symbiotic bacteria in flies of the subfamily Tephritidae (Diptera Tephritidae) and their phylogenetic relationships: proposal of *Canditatus Stammerula tephritidis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, Vol 58:1277-1287
54. Moran N.A. (2003). Tracing the evolution of gene loss in obligate bacterial symbionts. *Cur. Opin. in Microbiol.* Vol. 6, Issue 5: 512-518

55. Moran N.A. (1992). The Evolutionary Maintenance of Alternative Phenotypes. *Am Nat* Vol. 139: 971
56. Murray A. (2004). Genome Sequencing of two Antarctic bacteria - a *Marine Actinobacterium*, str. PHSC20C1 and a sea-ice associated bacterium, *Polaribacter irgensii*. 23-P Project Period: September. *Research Projects, Supported by: The Marine Microbiology Initiative Program at the Gordon and Betty Moore Foundation*
57. Oliver K., Russell J., Moran N., Hunter M. (2003). Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *PNAS* Vol. 100 no. 4: 1803–1807
58. Pais, R., Lohs, C., Wu, Y., Wang, J., Aksoy, S. (2008). The Obligate Mutualist *Wigglesworthia glossinidia* Influences Reproduction, Digestion, and Immunity Processes of Its Host, the *Tsetse* Fly. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 5965-5974
59. Pappas G., Liberopoulos E., Tsianos E., Elisaf M. (2004). *Enterococcus casseliflavus* bacteremia. Case report and literature review. *J. of Infect.*, Vol. 48, Issue 2: 206-208
60. Patel R., Piper K.E., Rouse M.S., Steckelberg J.M., Uhl J.R., Kohner P., Hopkins M.K., Cockerill F.R. III, Kline B.C. (1998). Determination of 16S rRNA Sequences of Enterococci and Application to Species Identification of Nonmotile *Enterococcus gallinarum* Isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36: 3399-3407
61. Peng X., Zhang J.S., Li Y.Y., Li W., Xu G.M., Yan Y.C. (2008). Biodegradation of insecticide carbofuran by *Paracoccus* sp. YM3. *J. of Environ. Sc. and Health, Part B*, Vol. 43, Issue 7: 588 – 594
62. Queller D.C. and Strassmann J.E. (2009). Beyond society: the evolution of organismality. *Phil Trans R Soc B* 364: 3143-3155
63. Reid KC., Cockerill F., Patel R. (1999). *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus* Bacteremia: a Review of 19 Cases. *Abstr Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother.* 26-29; 39: 644 (abstract no. 1722)
64. Rio R. V. M., Lefevre C., Heddi A., Aksoy S. (2003). Comparative Genomics of Insect-Symbiotic Bacteria: Influence of Host Environment on Microbial Genome Composition. *Appl. and Environ. Microbiol.*, Vol. 69, No. 11: 6825-6832

65. Saethre M.G. and Hofsvang T. (2002). Effect of Temperature on Oviposition Behavior, Fecundity, and Fertility in Two Northern European Populations of the Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae). *Environ. Entomol.* : Vol. 31, Issue 5: 804-815
66. Samac D., Paul St., Nix R. and Oleson A. (1998). Transmission Frequency of *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* to Alfalfa Seed and Identification of the Bacterium by PCR. *Plant Dis.* Vol. 82, Number 12: 1362-1367
67. Shin S.Y., Song J.H. and Ko K.S. (2008). First Report of Human Infection Due to *Erwinia tasmaniensis*-Like Organism. *Intern. J. of Infect. Dis.* Vol. 12, Supplement 1: e329-e330
68. Silvestri F. 1934-1951. Compendio di Entomologia Applicata. Parte Spec., Portici. Vol.I 1934, 1939-1940, Vol.II 1943, 1951
69. Sivakumar K. , Sahu M. K., Thangaradjou T. and Kannan L. (2007). Research on marine actinobacteria in India. *Ind. J. of Microbiol.* Vol. 47, Number 3: 186-196
70. Spilker T., Coenye T., Vandamme P. and LiPuma J.J. (2004). PCR-Based Assay for Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* Species Recovered from Cystic Fibrosis Patients. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 42: 2074-2079
71. Stach E.M. and Bull A. T. (2005). Estimating and comparing the diversity of marine actinobacteria. *Anton. van Leeuw.* , Vol. 87, Number 1: 3-9
72. Stackebrandt, E. & Goebel, B. M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44: 846-849
73. Tsubokura A., Yoneda H. and Mizuta H. (1999). *Paracoccus carotinifaciens* sp. nov., a new aerobic Gram-negative astaxanthin-producing bacterium. *Int J Syst Bacteriol.* 49: 277-282
74. Τζανακάκης Μ.Ε.(1995). (Φερομόνες - ελκυστικές φερομόνες). *Εντομολογία.* 1995: 139-140, 142
75. Τζανακάκης Μ.Ε., Κατσόγιαννος Β.Ι., (2003).(*Cydia pomonella*, *Laspeyresia pomonella*)(Lepidoptera, Tortricidae). *Έντομα Καρποφόρων Δένδρων & Αμπέλου* 2003: 125-132

76. Van der Wolf J.M. and van Beckhoven J.R.C.M. (2004). Factors Affecting Survival of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in Water. *J. of Phytopath.* Vol. 152 Issue 3: 161 - 168
77. Veselova M., Kholmeckaya M., Klein S., Voronina E., Lipasova V., Metlitskaya A., Mayatskaya A., Lobanok E., Khmel I. and Chernin L. (2003). Production of N-acylhomoserine lactone signal molecules by gram-negative soil-borne and plant-associated bacteria. *Folia Microbiol (Praha)* 48: 794-798
78. Vorburger C., Gehrler L., Rodriguez P. (2010). A strain of the bacterial symbiont *Regiella insecticola* protects aphids against parasitoids. *Biol. Letters* 6(1): 109-111
79. Vries E. J., Jacobs G., Sabelis M.W., Menken S. B. J. and Breeuwer J. A. J. (2004). Diet-dependent effects of gut bacteria on their insect host: the symbiosis of *Erwinia* sp and western flower thrips. *Proc. R. Soc. Lond. B* 271: 2171-2178
80. Ward A.C. and Bora N. (2006). Diversity and biogeography of marine actinobacteria. *Cur. Opin. in Microbiol. Ecol. and indust. Microbial. Techniques* Vol. 9, Issue 3: 279-286
81. Wilkinson L. T., Koga R., and Fukatsu T. (2007). Role of Host Nutrition in Symbiont Regulation: Impact of Dietary Nitrogen on Proliferation of Obligate and Facultative Bacterial Endosymbionts of the Pea Aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Appl. Envir. Microbiol.*, 73(4): 1362 - 1366.
82. Wilson K. H., Wilson W. J., Radosevich J. L., DeSantis T. Z., Viswanathan V. S., Kuczmarski T. A. and Andersen G. L. (2002). High-density microarray of small-subunit ribosomal DNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2535-2541
83. Xu S, Yamaguchi T, Osawa S, Suye S. (2007). Biodegradation of poly (epsilon-caprolactone) film in the presence of *Lysinibacillus* sp. 70038 and characterization of the degraded film. *Biocontrol Sci.* 12(3):119-22
84. Xu, J. L., Wu, J., Wang, Z. C., Wang, K., Li, M. Y., Jiang, J. D., He, J. and Li, S. P. (2009). Isolation and characterization of a methomyl-degrading *Paracoccus* sp. mdw-1. *Pedosphere.* 19(2): 238-243

85. Yosef M.B., Aharon Y., Jurkevitch E. and Yuval B. (2010). Give us the tools and we will do the job: symbiotic bacteria affect olive fly fitness in a diet-dependent fashion. *Proc R Soc B*; rspb.2102v1.
86. Zhiyong L. (2009). Advances in Marine Microbial Symbionts in the China Sea and Related Pharmaceutical Metabolites. *Mar. Drugs.*, 7: 113-129
87. Zhou J. and Thompson D. K. (2002). Challenges in applying microarrays to environmental studies. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 204-207
88. Zientz E., Dandekar T., and Gross R. (2004). Metabolic Interdependence of Obligate Intracellular Bacteria and Their Insect Hosts. *Microbiol. and Molec. Biol. Rev.*, Vol. 68, No. 4 : 745-770

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ

1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
2. www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18462403
3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15971359>
4. http://www.env.uoi.gr/index.php?option=com_content&task=view&id=170&Itemid=192
5. www.plantprotection.hu/.../canker_tom.htm
6. http://www.greekagribiotech.com/joomla/index.php?option=com_content&task=view&id=49&Itemid=31
7. <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Enterobacter>
8. http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Paracoccus_denitrificans
9. [Ijs.sgmjournals.org/cgi/content/abstract/56/12/2937](http://ijs.sgmjournals.org/cgi/content/abstract/56/12/2937)
10. <http://www.straininfo.net/taxa/370280;jsessionid=D039E981E89AF851C09251BBBBF389F26>
11. http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B7CPT-4V642M6-TY&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1112633242&_rerunOrigin=google&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=73006cc92fb0a037a8aecbd6168ae16e
12. http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TD0-4R2XCJC-1&_user=10&_coverDate=11%2F30%2F2007&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=browse&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=761f6b580c0de0badb70e9289d0f800d
13. <http://www.springerlink.com/content/pp25327862xp1211/>
14. <http://www.moore.org/microgenome/detail.aspx?id=47>
15. www.bio.uth.gr/index.php?option=com_docman&task=doc...gid...
16. <http://hcv.lanl.gov/tmp/findmodel/68ef0e/otherinfo.htm>
17. <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ – Ι

Πίνακας.1 Χημικά και βιολογικά σκευάσματα που χρησιμοποιούνται στον έλεγχο της *Cydia pomonella*

Καρπόκαψα (<i>Cydia pomonella</i> Linnaeus)					
Δραστική ουσία	Τρόπος Δράσης	Όνομα προϊόντος	Δοσολογία	Χρόνος αναμονής	Χρήση στην ολοκληρωμένη φυτοπροστασία
Triflumuron	Επαφής	Alsystem	0,4 – 0,5 kg/ha	35	Πράσινα
Bacillus Thuringiensis	Επαφής	Bactucid P.	0,5 – 1,0 kg/ha	1	Πράσινα
Diazinon	Διασυστημικό	Basudin 600 EW	1,5 l/ha	10	Κίτρινο
Dimetoát	Διασυστημικό	BI 58 EC	0,8 – 1,0 l/ha	7	Κόκκινο
Tiakloprid	Διασυστημικό	Calypso 480 SC	0,24 – 0,45 l/ha	14	-
Permetrin + Tetra Metrin + PBO	Επαφής	Chinetrin 25 EC	0,3 – 0,5 l/ha	4	Κόκκινο
Alfametrin	Επαφής	Fendona 10 EC	0,12 l/ha	7	Κόκκινο
Béta-Ciflutrin	Επαφής	Bulldock 25 EC	0,3 – 0,5 l/ha	7	Κόκκινο
Béta-Cipermetrin	Επαφής	Chinmix 5 SC (ME)	0,25 l/ha	7	Κόκκινο
Cipermetrin	Επαφής	Ripcord 20 EC	0,2 – 0,3 l/ha	10	Κόκκινο
Lambda-Cihalotrin +	Επαφής	Judo	1,0 – 1,2 kg/ha	10	Κόκκινο
Diklórfosz	Αέριο	Unifosz 50 EC	1,0 l/ha	5	Κόκκινο
Endosulfán	Επαφής	Thiodan 35 EC	1,2 – 2,0 l/ha	30	Κίτρινο
Foszalon	Τοπικά συστηματικό	Zolone 35 EC	1,75 l/ha	21	Κίτρινο
Metidation	Τοπικά συστηματικό	Ultracid 40 WP 40 EC	0,05 – 0,1 %	14	Κόκκινο
Fenoxikarb	Επαφής	Insegar	0,3 – 0,6 kg/ha	21	Πράσινα
Diflubenzuron	Επαφής	Dimilin 25 WP	0,05 – 1,0 %	14	Πράσινα
Flufenoxuron	Επαφής	Cascade 5 EC	1,0 – 1,5 l/ha	30	Πράσινα
Teflubenzuron	Επαφής	Nomolt 15 SC	0,5 – 0,75 l/ha	14	Πράσινα
Bacillus Thuringiensis	Επαφής	Dipel	1,5 – 2,0 kg/ha	-	Πράσινα

πράσινο: Μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ολοκληρωμένη φυτοπροστασία χωρίς τον κίνδυνο ανάπτυξης ανθεκτικότητας.

Κίτρινο: Μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ολοκληρωμένη φυτοπροστασία με περιορισμούς

Κόκκινο: Μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ολοκληρωμένη φυτοπροστασία μόνο με υπηρεσίες προστασίας του εδάφους και των φυτών.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ - ΙΙ

Πίνακας.1 Επεξήγηση των κωδικών των δειγμάτων

Κωδικός	Στάδιο ανάπτυξης	Ξενιστής	Χαρακτηρισμός του αγρού, ως προς την καλλιεργητική μέθοδο
AAB-1	ενήλικο	μήλο	βιολογικό
AAB-2	ενήλικο	μήλο	βιολογικό
AAB-3	ενήλικο	μήλο	βιολογικό
AAB-4	ενήλικο	μήλο	βιολογικό
AAB-5	ενήλικο	μήλο	βιολογικό
AAB-6	ενήλικο	μήλο	βιολογικό
AAB-7	ενήλικο	μήλο	βιολογικό
AAB-8	ενήλικο	μήλο	βιολογικό
AAB-9	ενήλικο	μήλο	βιολογικό
AAB-10	ενήλικο	μήλο	βιολογικό
AAB-11	ενήλικο	μήλο	βιολογικό
AAB-12	ενήλικο	μήλο	βιολογικό
APB-1	ενήλικο	αχλάδι	βιολογικό
APB-2	ενήλικο	αχλάδι	βιολογικό
APB-3	ενήλικο	αχλάδι	βιολογικό
APB-4	ενήλικο	αχλάδι	βιολογικό
AAC-1	ενήλικο	μήλο	συμβατικό
AAC-2	ενήλικο	μήλο	συμβατικό
AAC-3	ενήλικο	μήλο	συμβατικό
AAC-4	ενήλικο	μήλο	συμβατικό
AAC-5	ενήλικο	μήλο	συμβατικό
LAC-3	προνούμφη	μήλο	συμβατικό
LAC-4	προνούμφη	μήλο	συμβατικό
LAC-5	προνούμφη	μήλο	συμβατικό
LAB-1	προνούμφη	μήλο	βιολογικό
LAB-2	προνούμφη	μήλο	βιολογικό
LAB-3	προνούμφη	μήλο	βιολογικό
LAB-4	προνούμφη	μήλο	βιολογικό
LAB-5	προνούμφη	μήλο	βιολογικό

Πίνακας.2 Αποτελέσματα που προέκυψαν κατά τη διαδικασία προσδιορισμού της συγκέντρωσης DNA των δειγμάτων με τη βοήθεια φωτομέτρου.

Δείγμα	Συγκέντρωση (ng/μl)	A _{260nm}
AAB-1	130	0.026
AAB-2	60	0.012
AAB-3	80	0.016
AAB-4	90	0.018
AAB-5	60	0.012
AAB-6	65	0.013
AAB-7	125	0.025
AAB-8	145	0.029
AAB-9	65	0.013
AAB-10	95	0.019
AAB-11	105	0.021
AAB-12	160	0.032
APB-1	175	0.035
APB-2	150	0.030
APB-3	90	0.018
APB-4	80	0.016
AAC-1	125	0.025
AAC-2	60	0.012
AAC-3	100	0.020
AAC-4	95	0.019
AAC-5	100	0.020
LAC-3	95	0.019
LAC-4	160	0.032
LAC-5	145	0.029
LAB-1	95	0.019
LAB-2	80	0.016
LAB-3	60	0.012
LAB-4	75	0.015
LAB-5	90	0.018

*Οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν στην κατασκευή
του Φυλογενετικού Δέντρου*

>AAB-1 (700 letters)

TAGCGATCGCATGGTCAGTTACTGGAAAGATTTTTGGTTGGGGAT
GGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGT
CGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGG
GCGGAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTT
GTAAACCTCTTTTAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAA
AAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGC
AAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGGTTTGTCTG
CGTCTGCTGTGAAATCCCGAGGCTCAACCTCGGGCCTGCAGTGGGTACGG
GCAGACTAGAGTGCGGTAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGA
ATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGATCTCTGGGC
CGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGGGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
ACCCTGGTAGTCCACCCCGTAAACGTTGGGAACTAGTTGTGGGGACCATT
CCACGGATTCCGTGACGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGT
ACTGCCGCGA

>AAB-3 (700 letters)

TCGCGGCCTATCAGCTTGTGGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGT
CGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGG
GCGGAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTT
GTAAACCTCTTTTAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAA
AAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGC
AAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGGTTTGTCTG
CGTCTGCTGTGAAATCCCGAGGCTCAACCTCGGGCCTGCAGTGGGTACGG
GCAGACTAGAGTGCGGTAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGA
ATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGATCTCTGGGC
CGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGGATGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
ACCCTGGTAGTCCACCCCGTAAACGTTGGGAACTAGTTGTGGGGTCCATT
CCACGGATTCCGTGACGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGT
ACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGC
GGCGGAGCATG

>AAB-4 (650 letters)

CTTGCACCTTTAAAATTTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGG
GTAACCTACCTTATAGATTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACC
GAATAATACTTTTTAACTCATGTTTGAAAGTTGAAAGACGGTTTCGCTTGT
CCCTATAGAAGGGCCCCCGGCGCATTACTAGTTTGGGAAGGTAACGGTC
ACCCAAGGGAACGATCGGTACCCAACCTGAAAGGGGGATCGGCCCCCT
GGGCTGGAAAACCGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC
TCCCCAAGGGACAAAAGCCTGATGGAGCAACCCCCGGGGTGGAAAAA
GGATTTGCGTTCTAAAAATCTGTTTGCAAGGGAAAAACAAGTACGGTATA
AACTGGGCTTCCCTTGACGGACCCTTATTA AAAAGCCCCGGCTAACTACT
GGCCAGCAGCCCGGAATACCTAAGTTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTTTG

GGCCGTAAAGGCGCGCCAGGGGTTCTTAATCTCTGATGTGAAACCCCCG
GTCTAACCGGGAGGGTCTTTGAAATGGGGACTTTGAGTGCAAAAAGGTAT
AGGGAATTTCCATGTAACGGGAAATGGCGTAAAGATTGGAGGAAACCCA
TGGGCAA

>AAB-5 (800 letters)

GCTTGACCTTTAAAATTTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTG
GGTAACCTACCTTATAGATTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATAC
CGAATAATACTTTTTAACTCATGTTTTAAAGTTGAAAGACGGTTTCGCTTG
TCCTTTTAAAATGGGCCCCCGGCCATTACCTAGTTGGTGAGGTAACGGTC
CCCCAAGGGAACGATGCGTACCCAACCTGAAAGGGGGATCGGCCCCCCTG
GGACTGAAAACCGGCCCAAATCCCTACGGGAGGCACCATTAGGGAATTTT
CCACAAGGGACAAAATCCTGATGGACCAACCCCCCGGGGGGAAAAAGG
ATTTGCGTTCTAAAACCTCTGTTTGAAGGGAAAAACAAGTAACGTATTAC
CGGGGCCTCCCTTGACGGTACCTTGTTAAAAAGCCCCGGTTAATTACGTGC
CAACAGCCCCGGGAATACCCTAGTGGCCAAGGGTTGTCCGGAATTTTGGGC
CGTAAAGGCGCGCCAGGGGGTTCCTTAATCCGAAAGGGAAAGCCCCCGGT
TCAACCGGGGAGGGTCAATTGAAACGGGGAACTTTGAGTCAAAAAAGGA
TAGTGGAATTCCAAGTGACGGTGAATGCGTTAGATTTGGAGGAAACCCCT
GGGCAGAGCGAACTGCTCGGTCTGTACCTACACTGAAGGCGCAAACCTGG
GGGAAGCAAACGGAATTAGATCCCTGTAGCCCACCCGTAAACGATGAGG
GCTAATGGTTGGGGTTTCGCCCTCATGGCTGCAGCTACGCATTAGCCATT
CGC

>AAB-7 (700 letters)

TCACGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGA
CGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGG
GCGAAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTT
GTAAACCTCTTTTAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAA
AAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAA
GCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTCCGG
TCTGCTGTGAAATCCCAGAGGCTCAACCTCGGGTCTGCAGTGGGTACGGGC
AGACTAGAGTGTGGTAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAAT
GCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGATCTCTGGGCCA
TTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGGCGCTAGATGTGGGGACCATTCC
ACGGTTTCCGTGTCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTAC
GGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGG
CGGAGCATG

>AAB-8 (650 letters)

TGCTTGACCTTTAAAATTTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGT
GGGTAACCTACCTTATAGATTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATA
CCGAATAATACTTTTTAACTCATGTTTAAAGTTGAAAGACGGTTTCGCTT
GTCCCTTTAAAAGGGCCCCCGGCCATTACTTATTTGGGAGGGTAACGG
CTCCCCAAGGCACCATGCCGTACCCAACCTGGAGGGGGGATCGGCCCCCCT
GGGACTGGAAAACCGGCCCAAATCCCTACGGGAGGCACCATAAGGGAAC
TTTCCCAATGGGACAAAAGCTGAAGGGACCAACCCCCCTGGGTGAAAAA
AGGATTTGCGTTTCGTAAAATTTTTTTGCAAGGGAAAAACAATTACGGAAT
AACTGGGGCTTCCCTTGACGGACCCTTTTTAAAAGCCCCGGTTAATTACT

GGCCACCACCCCGGGAATACCTTAGTGGGAAAGGTTGTCCCAGGAATTTTG
GGCCGTAAACGCGCGCCAGTGGGTTCCCTTATTTCGATGTGAAAACCCCC
GGTCCAACCGGGAAGGGTCATTTGAAATGGGGAAATTTGAGTGCAAAAA
GGAAGGGAATTTCCAGTGTCCGGTAATGCGCGTAGATTTTGAGGAACCC
AGGGC

>AAB-9 (650 letters)

ATGGGCAGGTAAGATTTTTGGTTGGGGATGGGCTCGCGG
CCTATCAGGTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGTCGACGGGTAG
CCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCT
GATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCT
TTTAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAGCGCCGG
CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCC
GGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGGTCTGCTGTG
AAATCCCAGGGCTCAACCTCGGGTCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAG
TGCGGTAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATA
TCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGATCTCTGGGCCGTAACCTGACG
CTGAGGAGCGAAAGGGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
CCACCCCGTAAACGTTGGGAACTAGTGTGTGGGGACCATTCCACGGATTC
CGTGGACGC

>AAB-10 (650 letters)

GCGATCGCATGGTCAGTACTGGAAAGATTTTTGGTTGGGGATGG
GCTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGTCG
ACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGC
GGAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGT
AAACCTCTTTTAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAA
AGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAA
GCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGG
TCTGCTGTGAAATCCCGAGGCTCAACCTCGGGCCTGCAGTGGGTACGGGC
AGACTAGAGTGCGGTAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAAT
GCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGATCTCTGGGCCG
TAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGGGTGGGGAGCAAACAGGCTTAGATAC
CCTGGTAGTCCACCCCGTAAACGTTGGGAACTAGTTGTGGGGTCCATTCC
ACGGATTCCG

>AAB-11 (650 letters)

GGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGAC
GGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGA
AAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAA
ACCTCTTTTAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAG
CACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGAAGCG
TTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGGTCTG
CTGTGAAATCCCAGGGCTCAACCTCGGGTCTGCAGTGGGTACGGGCAGAC
TAGAGTGTGGTAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGC
AGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGATCTCTGGGCCATTACT
GACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG

TAGTCCATGCCGTAACGTTGGGCGCTAGATGTGGGGACCATTCCACGGT
TTCCGTGTTCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCG
CAAGGCT

>AAB-12 (701 letters)

GAACGGGTGAGTAGCACGTGAGTAACCTGCCCTTACTCTGGAATA
AGCGCTGGAAACGGCGTCTAATACCGGATACGAGCTTCAGCCGCATGGCT
AGGAGTTGGAAAGAATTTTCGGTCAAGGATGGACTCGCGGCCTATCTACTA
GTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAG
AGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCAA
CGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTAGTAGGG
AAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAGCACCGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTTCGCGTCTGCTGTGAAATCTGGGG
GCTCAACCCCCAGCCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCGGTAGGG
GAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAA
CACCGATGGCGAAGGCAGATCTCTGGGCCGTAACCTGACGCTGAGGAGCG
AAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAA
ACGTTGGGAA

>APB-1 (700 letters)

GATTAGCTAGTAGGGCGGGTAATGGCCACCTAGGGCAGCAGATCCCT
AGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCA
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGC
CTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTA
CTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATGGGGTTAATAACCCTGTCGATTGACGT
TACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAG
GCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGC
ATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGT
GTAGCGGTGAAATGCGTATAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCG
GCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAA
CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCGACTTGTAG
GCTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTCTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCG
CCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGTCGGGGGC
CCGCACACG

>APB-2 (700 letters)

TAGAGGGGGATAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAACG
TCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCACTATCGGATGAGCC
CAGATGGGATTAGCTAGTAGGCGGGGTAATGGCCACCTAGGCGACGATC
CCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTACGACACGGTC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAA
GCCTGATGCACCCATGCCGCGTGTATGAAAAGGCCTTCGGGTTGTAAAG
TACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATGGGGTTAATAACCCTGTCGATTGAC
GTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTA
TACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCA
GGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCCGGGAACTG
CATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTTGTGTAGGGGGGTAGAATTCCAGG

TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGC
GGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACAATGTCGACTTGTA
GGTTGTTT

>APB-3 (650 letters)

CAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCACTATCGGATGAACCCAGA
TGGGATTATCTAGTAGGCGGGGTAATGGCCCACCTAGGCGACAATCCCTA
GCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCACA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTG
ATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTT
TCAGCGGGGAGGAAGGCGATGGGGTTAATAACCCTGTCGATTGACGTTAC
CCGCAAAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
GAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGC
GGTCTGTGAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAAGTGCAT
TTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTTGTAGAGGGGGGTATAATTCTCGGTGT
AACGGTCAAATGCGTATAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGC
CCCCTGGACACATACTGACGCTCACGCGCGAAAGCGTGGGGAGTAACAG
GAGTAGATACCCTGGCAGCCACACCCTAACGATGTCGACTTGTAGGCGT
TCCTCGAGA

>APB-4 (650 letters)

AGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCACTATCGGATGAACC
CAGATGGGATTAGCTAGTAGGCGGGGTAATGGCCCACCTAGGCGACAATC
CTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCC
CACACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAA
GCCTGATGCGGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAG
TACTTTCTGCGGGGAGGAAGGCGACGGGGTTAATAACCCTGTCGATTGAC
GTTACCCGCAGAAAAACACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
TACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCA
GGCGGGCTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAAGT
CATTTGAAACTGTGAGGCTTGAGTCTTGTGTAGGGGGGTAGAATTCCAGG
TGTAACGGTCAAATGCGTATAGATCTGGAGGAATACCGGTGGGGAAGGC
GCTCCCCTGGACAAACACTGACGCTCACGTGCGAAAGCGTGGGGAGTAAA
CAGGGAGTAGATACCCTGGTAGTCCACACCCTAACGATGTCGACTTGT
AGGCTGT

>AAB-2 (650 letters)

TCGCATGGTCAGTACTGGAAAGATTTTTTGGTTGGGGATGGGCTC
GCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGTGGTAAATGGCTCACCAAGGCGTCGACGG
GTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGAA
GCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAAC
CTCTTTTAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAGCG
CCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTT
ATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGGTCTGC
TGTGAAATCCCAGGGCTCAACCTCGGGCCTGCAGTGGGTACGGGCAGACT
AGAGTGCGGTAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCA
GATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGATCTCTGGGCCGTAAC
GACGCTGAGGAGCGAAAGGGTGGGGAGCAAACAGGCTTANATACCCTGG

TAGTCCACCCCGTAAACGTTGGGAACTAGTTGTGGGGTCCATTCTACGGA
TTCCGTGAC

>AAB-6 (650 letters)

TCTGGGATAACCTCCGGAAACGGTGGCTAATACTGGATATCTAACA
CGATCGCATGGTCTGTGTTTGGAAAGATTTTTTGGTTATGGATCGGCTCAC
GGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGACGGGT
AGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGC
CTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCT
CTTTTAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAGCACC
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGT
CCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGTTTGTGCGGTCTGCTG
TGAAATCCCAGGGCTCAACCTCGGGTCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAG
AGTGTGGTAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGA
TATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGATCTCTGGGCCATTACTGAC
GCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
TCCATGC

>AAC-1 (600 letters)

GTCTTGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGGATCT
GCCCCGATAGAGGGGGATAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAA
CGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCACTATCGGATGAG
CCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGCGGGGTAATGGCCACCTAGGCGACGA
TCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGG
TCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCA
AGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAA
GTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGACGGGGTTAATAACCCTGTGATTGA
CGTACCCCGCAGAAAAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGC
AGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAACT
GCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAG
GTGTA

>AAC-2 (650 letters)

GGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCT
AATACCGCATAATGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTG
CCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCA
CCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGA
ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGC
ACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCT
TCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGAGGAGGAAGGCATTGTGGTTAATAAC
CGCAGTGATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCG
TAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTC
AACCTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTTGTAGAGGGGG
GTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACC
GGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAG
CGTGGG

>AAC-3 (700 letters)

TCTTGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGGATCTG
CCCGATAGAGGGGGATAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAAC
GTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCACTATCGGATGAGC
CCAGATGGGATTAGCTAGTAGGCGGGGTAATGGCCCACCTAGGCGACAAT
CCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGT
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCA
AGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTA
GTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGACGGGGTTAATAACCCTGTTCGATTGA
CGTTACCCGCAGAAAAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGC
AGGCGGTCTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAACT
GCATTTGAAACTGTGAGGCTTGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCTCG
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGG
CGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCA
AACAGGAT

>AAC-4 (600 letters)

CTTGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGGATCTG
CCCGATAGAGGGGGATAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAAC
GTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCACTATCGGATGAGC
CCAGATGGGATTAGCTAGTAGGCGGGGTAATGGCCCACCTAGGCGACAAT
CCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGT
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCA
AGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAAAAGGCCTTCGGGTTGTA
GTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATGGGGTTAATAACCCTGTTCGATTGA
CGTTACCCGCAGAAAAAACACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGC
AGGCGGTCTGTAACTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACT
GCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTTGTGCAGGGGGGGTATACTTCTA
GGTGTA

>AAC-5 (650 letters)

AGCTTGCTCTTGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGG
GGATCTGCCCCGATAGAGGGGGATAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACC
GCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCACTATCG
GATGAGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGCGGGGTAATGGGCCACCTAG
GCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGA
GACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAAT
GGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGG
TTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGACGGGGTTAATAACCCTGT
CGATTGACGTTACCCGCAGAAAAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAG
CGCACGCAGGCGGTCTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCT
GGGAACTGCATTTGAAACTGTGAGGCTTGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGA
ATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGG
CGAAAG

>LAC-3 (700 letters)

AGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAACGTGCCCTTCTCTAC
GGAATAGCCCCGGGAAACTGGGAGTAATACCGTATACGCCCTTGGGGGA
AAGATTTATCGGAGAAGGATCGGCCCGCGTTGGATTAGGTAGTTGGTGGG
GTAATGGCCCACCAAGCCGACGATCCATAGCTGGTTTGAGAGGATGATCA
GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGAATCTTAGACAATGGGGGCAACCCTGATCTAGCCATGCCGCGTGAG
TGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAGCTCTTTCAGCTGGGAAGATAATGAC
GGTACCAGCAGAAGAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGGAGGGGGCTAGCGTTGTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGT
AGGCGGACTGGAAAGTCAGAGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCTTGGAAC
TGCCTTTGAAACTATCAGTCTGGAGTTCGAGAGAGGTGAGTGGAATCCG
AGTGATAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAG
GCGGCTCACTGGCTCGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGGAGC
AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCCAG
ACGTCGGCA

>LAC-4 (650 letters)

ACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATA
CCGTATAACACTATTTTCCGCATGGAAGAAAGTTGAAAGGCGCTTTTGC
TCACTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC
TCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACT
GGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC
TTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAA
GGTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGT
AAAATGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTAT
TGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCC
CGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAA
GAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAG
GAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCT
CGAAAGCG

>LAC-5 (650 letters)

CCCAAAGAAGCTATAGGTACCACCAAGGTAGCTGTAGAGTCTCGC
GATGGAAACCTGCCCATCTCAAGGGGATAACACTTGTCAAACAGGTGCTA
ATACCGTATAAAACTATTTTCCGCTTGTAAAAAAGTTGAAAGGTGCTTTTG
CTTCATTGATGTTTGGACCCGCTTTGTTTTATCTACTTGGTGAGGTAACGG
CTCACCAAGGGAAGCATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACTC
TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
CTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGA
AGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAG
TAAAATGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTA
TTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC
CCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGA
AAAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAAATTTATGGA
GGAATA

>LAB-1 (600 letters)

CTTGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGGATCTG
CCCGATAGAGGGGGATAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAAC
GTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCACTATCGGATGAGC
CCAGATGGGATTAGCTAGTAGGCGGGGTAATGGCCACCTAGGCGACGAT
CCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGT
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCA
AGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAAAAGGCCTTCGGGTTGTAAA
GTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATGGGGTTAATAACCCTGTTCGATTGA
CGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGC
AGGCGGTCTGTTAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTAACCTGGGAACT
GCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTTGTGCAGGGGGGTAGAATTCCAG
GTGTAAC

>LAB-2 (650 letters)

TTGCTCTTGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGGA
TCTGCCCGATAGAGGGGGATAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCAT
AACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCACTATCGGATG
AGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGCGGGGTAATGGCCACCTAGGCGAC
AATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGAC
GGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGC
GCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGT
AAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATGGGGTTAATAACCCTGTTCGAT
TGACGTTACCCGCAGAAAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCA
CGCAGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGA
ACTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTC
CAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGA
AAGCGG

>LAB-3 (700 letters)

CTTGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGGATCTG
CCCGATAGAGGGGGATAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAAC
GTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCACTATCGGATGAGC
CCAGATGGGATTAGCTAGTAGGCGGGGTAATGGCCACCTAGGCGACGAT
CCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGT
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCA
AGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAA
GTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATGGGGTTAATAACCCTGTTCGATTGA
CGTTACCCGCAGAAAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGC
AGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAACT
GCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAG
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGG
CGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCA
AACAGGATT

>LAB-4 (700 letters)

TGGTCTTGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGGAT
CTGCCCCGATAGAGGGGGATAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATA
ACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCACTATCGGATGA
GCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGGCGGGTAATGGCCCACCTAGGCGACA
ATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACAG
GTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGC
AAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAA
AGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGACGGGGTTAATAACCCTGTCGATTG
ACGTTACCCGCAGAAAAACACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCAC
GCAGGCGGTCTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAA
CTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGTAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCC
AGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAA
GGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAG
CAAACAG

>LAB-5 (700 letters)

GGGGATAACCCCTGGAAACGGGGGGTAATACCGCATAACGTCGCA
AGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCACTATCGGATGAGCCCAGAT
GGGATTAGCTAGTAGGGCGGGTAATGGCCCACCTAGGCGACGATCCCCAG
CTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGAC
TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTG
ATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTT
TCAGCGGGGAGGAAGGCGATGGGGTTAATAACCCTGTCGATTGACGTTAC
CCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
GAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGC
GGTCTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCAT
TTGAAACTGGCAGGCTTGTAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGC
CCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGTGGAGCAAACA
GGATTAGATACCCTGGGAGTCTACGCCGTAACGATGTGACTTGTAGGT
TGTTCCCTTG

**Αποτελέσματα της επεξεργασίας των αλληλουχιών με BLAST
και τα πλησιέστερα συγγενικά βακτηριακά είδη**

>**AAB-1** Nucleotide Sequence (700 letters) *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, complete genome Length=3258645 Features in this part of subject sequence: rRNA-16S ribosomal RNA Score = 1120 bits (606), Expect = 0.0 Identities = 666/694 (95%), Gaps = 7/694 (1%) Strand=Plus/Plus 95.7

>**AAB-2** Nucleotide Sequence (650 letters) *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, complete genome Length=3258645 Features in this part of subject sequence: rRNA-16S ribosomal RNA Score = 1029 bits (557), Expect = 0.0 Identities = 620/650 (95%), Gaps = 7/650 (1%)

>**AAB-3** Nucleotide Sequence (700 letters) *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, complete genome Length=3258645 Features in this part of subject sequence: rRNA-16S ribosomal RNA Score = 1182 bits (640), Expect = 0.0 Identities = 682/702 (97%) Gaps = 4/702(0%)

>**AAB-4** Nucleotide Sequence(650 letters) *Lysinibacillus sphaericus* C3-41, complete genome Length=4639821 Length=4639821 Features in this part of subject sequence: rRNA-16S ribosomal RNA Score = 601 bits (325), Expect = 6e-169 Identities = 558/659 (84%), Gaps = 61/659 (9%) Strand=Plus/Plus 84.7

>**AAB-5** Nucleotide Sequence (800 letters) *Lysinibacillus sphaericus* C3-41, complete genome Length=4639821 Features in this part of subject sequence: rRNA-16S ribosomal RNA Score = 664 bits (359), Expect = 0.0 Identities = 676/814 (83%), Gaps = 69/814 (8%)

>**AAB-6** Nucleotide Sequence (650 letters) *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, complete genome Length=3258645 Features in this part of subject sequence: rRNA-16S ribosomal RNA Score = 1022 bits (553), Expect = 0.0 Identities = 623/655 (95%), Gaps = 11/655 (1%)

>**AAB-7** Nucleotide Sequence (700 letters) *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, complete genome Length=3258645 Features in this part of subject sequence: rRNA-16S ribosomal RNA Score = 1221 bits (661), Expect = 0.0 Identities = 685/697 (98%), Gaps = 0/697 (0%)

>**AAB-8** Nucleotide Sequence(650 letters) *Lysinibacillus sphaericus* C3-41, complete genome Length=4639821 Features in this part of subject sequence: rRNA-16S ribosomal RNA Score = 444 bits (240), Expect = 1e-121 Identities = 539/669 (80%), Gaps = 68/669 (10%) Strand=Plus/Plus

>**AAB-9** Nucleotide Sequence (650 letters) *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* complete genome Length=3258645 Features in this part of subject sequence: rRNA-16S ribosomal RNA Score = 1051 bits (569), Expect = 0.0 Identities = 614/635 (96%), Gaps = 6/635(0%) Strand=Plus/Plus 96.7

>**AAB-10** Nucleotide Sequence (650 letters) *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, complete genome Length=3258645 Features in this part of subject sequence: rRNA-16S ribosomal RNA Score = 1035 bits (560), Expect = 0.0 Identities = 615/641 (95%), Gaps = 5/641 (0%)

>**AAB-11** Nucleotide Sequence (650 letters) *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, complete genome Length=3258645 Features in this part of subject sequence: rRNA-16S ribosomal RNA Score = 1134 bits (614), Expect = 0.0 Identities = 638/650 (98%), Gaps = 0/650 (0%) Strand=Plus/Plus 98.1

>**AAB-12** Nucleotide Sequence (701 letters) *Marine actinobacterium* PHSC20C1 1099646003187, whole genome shotgun Sequence Length=311031 Features in this part of subject sequence: rRNA-16S ribosomal RNA Score = 1195 bits (647), Expect = 0.0 Identities = 684/702 (97%), Gaps = 2/702 (0%)

>**APB-1** Nucleotide Sequence (700 letters) *Erwinia tasmaniensis* Et1/99, complete genome Length=3883467 Features in this part of subject sequence: rRNA-16S ribosomal RNA Score = 1199 bits (649), Expect = 0.0 Identities = 682/698 (97%), Gaps = 2/698 (0%)

>**APB-2** Nucleotide Sequence (700 letters) *Erwinia tasmaniensis* Et1/99, complete genome Length=3883467 Features in this part of subject sequence: rRNA-16S ribosomal RNA Score = 1146 bits (620), Expect = 0.0 Identities = 674/700 (96%), Gaps = 4/700 (0%)

>**APB-3** Nucleotide Sequence (650 letters) *Erwinia tasmaniensis* Et1/99, complete genome Length=3883467 Features in this part of subject sequence: rRNA-16S ribosomal RNA Score = 970 bits (525), Expect = 0.0 Identities = 609/649 (93%), Gaps = 7/649 (1%)

>**APB-4** Nucleotide Sequence (650 letters) *Erwinia tasmaniensis* Et1/99, complete genome Length=3883467 Features in this part of subject sequence: rRNA-16S ribosomal RNA Score = 972 bits (526), Expect = 0.0 Identities = 612/653 (93%), Gaps = 8/653 (1%)

>**AAC-1** Nucleotide Sequence (600 letters) *Erwinia tasmaniensis* Et1/99, complete genome Length=3883467 Features in this part of subject sequence: rRNA-16S ribosomal RNA Score = 968 bits (524), Expect = 0.0 Identities = 575/600 (95%), Gaps = 2/600 (0%)

>**AAC-2** Nucleotide Sequence (650 letters) *Enterobacter sp. 638*, complete genome Length=4518712 Features in this part of subject sequence: rRNA-16S ribosomal RNA Score = 1168 bits (632), Expect = 0.0 Identities = 644/650 (99%), Gaps = 0/650 (0%)

>**AAC-3** Nucleotide Sequence (700 letters) *Erwinia tasmaniensis* Et1/99, complete genome Length=3883467 Features in this part of subject sequence: rRNA-16S ribosomal RNA Score = 1127 bits (610), Expect = 0.0 Identities = 673/703 (95%), Gaps = 6/703 (0%)

>**AAC-4** Nucleotide Sequence (600 letters) *Erwinia tasmaniensis* Et1/99, complete genome Length=3883467 Features in this part of subject sequence: rRNA-16S ribosomal RNA Score = 915 bits (495), Expect = 0.0 Identities = 548/574 (95%), Gaps = 2/574 (0%)

>**AAC-5** Nucleotide Sequence (650 letters) *Erwinia tasmaniensis* Et1/99, complete genome Length=3883467 Features in this part of subject sequence: rRNA-16S ribosomal RNA Score = 1042 bits (564), Expect = 0.0 Identities = 623/651 (95%), Gaps = 6/651 (0%)

>**LAC-3** Nucleotide Sequence (700 letters) *Paracoccus denitrificans* PD1222 chromosome 2, complete sequence Length=1730097 Features in this part of subject sequence: rRNA-16S ribosomal RNA Score = 1177 bits (637), Expect = 0.0 Identities = 680/700 (97%), Gaps = 5/700 (0%)

>**LAC-4** Nucleotide Sequence (650 letters) *Enterococcus casseliflavus* EC10 cont1.23, whole genome shotgun sequence Length=1802 Score = 1201 bits (650), Expect = 0.0 Identities = 650/650 (100%), Gaps = 0/650 (0%)

>**LAC-5** Nucleotide Sequence (650 letters) *Enterococcus casseliflavus* EC10 cont1.23, whole genome shotgun sequence Length=1802 Score = 957 bits (518), Expect = 0.0 Identities = 572/598 (95%), Gaps = 3/598 (0%)

>**LAB-1** Nucleotide Sequence (600 letters) *Erwinia tasmaniensis* Et1/99, complete genome Length=3883467 Features in this part of subject sequence: rRNA-16S ribosomal RNA Score = 972 bits (526), Expect = 0.0 Identities = 576/600 (96%), Gaps = 4/600 (0%)

>**LAB-2** Nucleotide Sequence (650 letters) *Erwinia tasmaniensis* Et1/99, complete genome Length=3883467 Features in this part of subject sequence: rRNA-16S ribosomal RNA Score = 1057 bits (572), Expect = 0.0 Identities = 625/651 (96%), Gaps = 2/651 (0%)

>**LAB-3** Nucleotide Sequence (700 letters) *Erwinia tasmaniensis* Et1/99, complete genome Length=3883467 Features in this part of subject sequence: rRNA-16S ribosomal RNA Score = 1160 bits (628), Expect = 0.0 Identities = 677/701 (96%), Gaps = 2/701 (0%)

>**LAB-4** Nucleotide Sequence (700 letters) *Erwinia tasmaniensis* Et1/99, complete genome Length=3883467 Features in this part of subject sequence: rRNA-16S ribosomal RNA Score = 1138 bits (616), Expect = 0.0 Identities = 671/698 (96%), Gaps = 2/698 (0%)

>**LAB-5** Nucleotide Sequence (700 letters) *Erwinia tasmaniensis* Et1/99, complete genome Length=3883467 Features in this part of subject sequence: rRNA-16S ribosomal RNA Score = 1138 bits (616), Expect = 0.0 Identities = 671/698 (96%), Gaps = 2/698 (0%)