

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ  
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**Μεταγονιδιωματική ανάλυση της βακτηριακής χλωρίδας  
του εντόμου *Cydia pomonella* με την χρήση βιβλιοθηκών  
16S rRNA.**



**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΝΙΚΟΝΟΒΑ ΟΛΕΝΑ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2012**

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

**Μόσιαλος Δημήτριος**, Επίκουρος Καθηγητής του τμήματος Βιοχημείας &  
Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

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

**Καρπούζας Δημήτριος**, Επίκουρος Καθηγητής του τμήματος Βιοχημείας &  
Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΑΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

**Μόσιαλος Δημήτριος**

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Μόσιαλο Δημήτρη κυρίως για εμπιστοσύνη και την κατανόηση που μου έδειξε. Όπως και για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση του, σε όλη την διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη και τον κ. Καρπούζα Δημήτρη για την συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή.

Θα θελα επίσης να απευθύνω τις ευχαριστίες μου σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Μικροβιολογίας-Ιολογίας, όπου είχα την τύχη να εργαστώ, για το φιλικό κλίμα και χρήσιμες συμβουλές τους, και ιδιαίτερα την Κατερίνα Νικολούλη, χωρίς την οποία δεν θα τα κατάφερνα.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>   | <b>5</b>  |
| 1.1 Έντομο <i>Cydia pomonella</i> .....                                 | 6         |
| 1.1.1 Στοιχεία βιολογίας.....   | 6         |
| 1.1.2 Βιολογικός κύκλος.....  | 6         |
| 1.1.3 Εξάπλωση.....   | 8         |
| 1.1.4 Καταπολέμηση.....   | 9         |
| 1.2 Συμβιωτικές σχέσεις.....  | 10        |
| 1.2.1 Αλληλεπίδραση εντόμου-βακτηρίου.....                              | 12        |
| 1.2.2 Μέθοδοι ταυτοποίησης βακτηρίων. Μεταγονιδιωματική προσέγγιση..... | 14        |
| 1.3 Σκοπός της εργασίας.....  | 16        |
| <br>  |           |
| <b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>  | <b>17</b> |
| 2.1 Κατάταξη δειγμάτων.....   | 18        |
| 2.2 Απομόνωση DNA από τα έντομα.....                                    | 19        |
| 2.2.1 Τομή και ομογενοποίηση του εντόμου.....                           | 19        |
| 2.2.2 Πρωτόκολλο απομόνωσης DNA με NucleoSpin Tissue Kit.....           | 20        |
| 2.2.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....                        | 21        |
| 2.2.3.1 Προετοιμασία – διαδικασία ηλεκτροφόρησης.....                   | 22        |
| 2.2.3.2 Αποτελέσματα οπτικοποίησης γενωμικού DNA με ηλεκτροφόρηση.....  | 22        |
| 2.3 Δημιουργία βιβλιοθηκών 16S rRNA.....                                | 23        |
| 2.3.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....                        | 23        |
| 2.3.2 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR.....                                  | 25        |
| 2.3.3 Καθαρισμός DNA προϊόντος.....                                     | 26        |
| 2.3.4 Κλωνοποίηση με το Kit της StrataClone.....                        | 27        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 2.3.4.1   | Επιλογή ανασυνδυασμένων βακτηρίων.....   | 28        |
| 2.3.4.2   | Στρατηγική της κλωνοποίησης.....   | 29        |
| 2.3.4.3   | Πρωτόκολλο κλωνοποίησης με StrataClone.....  | 29        |
| 2.3.5     | Δημιουργία 16S DNA βιβλιοθηκών.....  | 30        |
| 2.4       | Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....  | 30        |
| 2.4.1     | Προσδιορισμός συγκέντρωσης πλασμιδιακού DNA με<br>ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης..... | 31        |
| 2.5       | Αλληλούχιση κατά Sanger και ανάλυση δεδομένων.....                                       | 32        |
| <b>3.</b> | <b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>   | <b>34</b> |
| 3.1       | Δημιουργία 16S rRNA βιβλιοθηκών για ταυτοποίηση βακτηριακών<br>στελεχών.....             | 35        |
| 3.2       | Ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχισης.....  | 39        |
| <b>4.</b> | <b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>   | <b>44</b> |
| <b>5.</b> | <b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>   | <b>49</b> |
|           | <b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....</b>  | <b>58</b> |

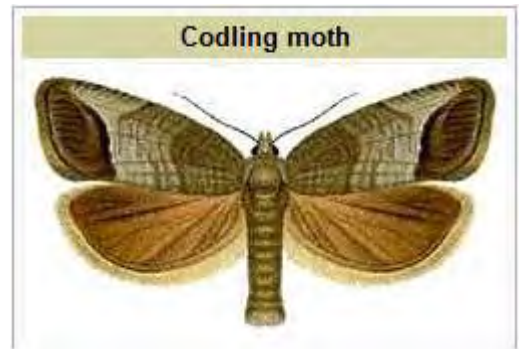
# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

## 1.1 Έντομο *Cydia pomonella*

### 1.1.1 Στοιχεία βιολογίας.

Η *Cydia pomonella*, γνωστή ως καρπόκαφα των μήλων, είναι μέλος της τάξης Λεπιδόπτερα, οικογένειας *Tortricidae* (Εικ.1) και αποτελεί ένα ευρέως διαδεδομένο έντομο-παράσιτο των φυλλοβόλων δέντρων. Εκτός από τις καλλιέργειες μήλου το έντομο συνήθως προσβάλλει και αχλαδιά, βερικοκιά, ροδακινιά αμυγδαλιά, δαμασκηνιά. Όταν δεν χρησιμοποιούνται κατάλληλες στρατηγικές έλεγχου του πληθυσμού, καρπόκαφες είναι ικανές να καταστρέψουν πάνω από 80% καλλιέργειας μήλου και 40-60% της καλλιέργειας αχλαδιού, ετησίως.



Εικ.1. Το ενήλικο άτομο καρπόκαφας

Τα αυγά τους έχουν σχήμα δίσκου και μέγεθος 2mm. Αμέσως μετά την εναπόθεση τους είναι ημιδιαφανές, ενώ στη συνέχεια αποκτούν λευκό χρώμα. Η πλήρως αναπτυγμένη προνύμφη έχει 15-18mm μήκος κάμπιας, το πίσω μέρος της οποίας είναι κοκκινωπό ενώ το κοιλιακό μέρος είναι λευκοκίτρινο (Εικ.2)



Το ενήλικο άτομο της καρπόκαφας έχει μήκος 7-12mm. Το άνοιγμα των φτερών της είναι 14-24mm. Τα μπροστινά φτερά είναι καφετιά σε μπλε-γρι βάση. Κοντά στην κορυφή τους, οι πρόσθιες πτέρυγες έχουν μια χαρακτηριστική μπρονζέ κηλίδα, που ονομάζεται *speculum* και διαχωρίζει την καρπόκαφα από άλλα είδη εντόμων που προσβάλλουν τα μήλα (Τζανακάκης & Κατσόγιαννος, 2003). Κατά μήκος της πρόσθιας παρυφής (*costa*) των πρόσθιων πτερύγων, υπάρχουν μικρές σκοτεινές καμπύλες γραμμές, που γίνονται πιο έντονες στο ακραίο ήμισυ της πτέρυγας. Τα πίσω φτερά είναι καφέ-γρι και λιγότερο έντονα. Στη κοιλιακή (κάτω)

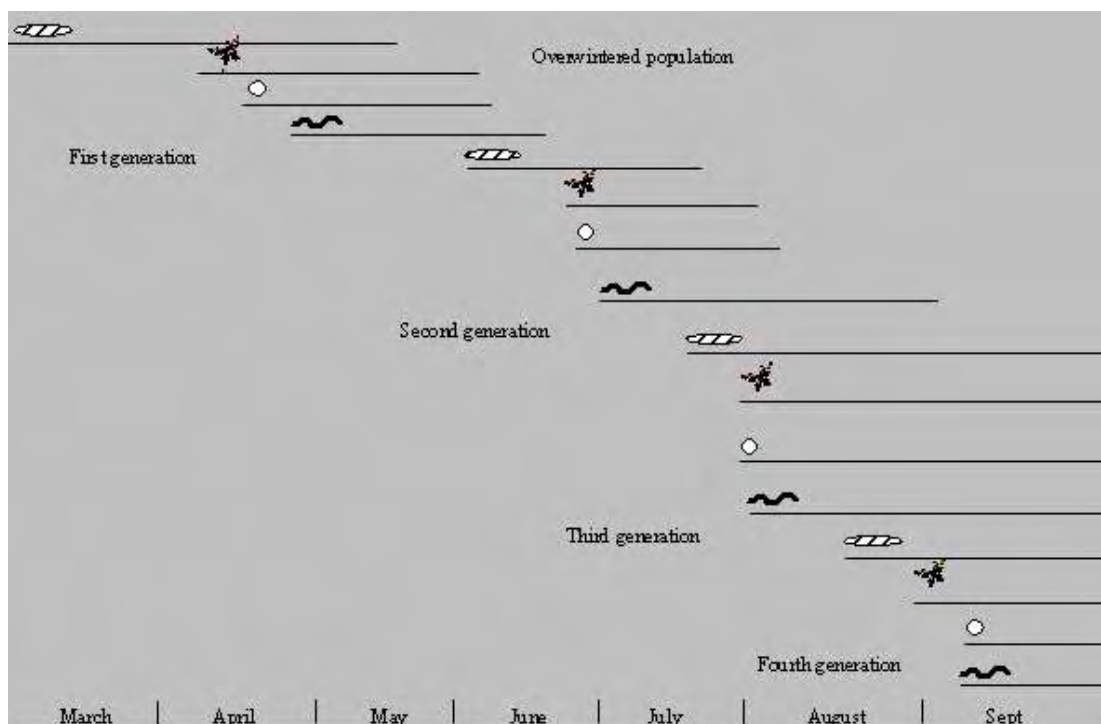
Εικ.2 Προνύμφη και αυγό της *Cydia pomonella*

επιφάνειά τους, και τα δυο 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. Οι πτέρυγες είναι γενικά πλατειές, με κρόσσους μήκος μικρότερου από το πλάτος των πτερύγων. Κατά την διάρκεια της ημέρας καρπόκαφες κρύβονται στις ρωγμές του κορμού και αρχίζουν της πτήσεις μόνο όταν σκοτεινιάσει.

### 1.1.2 Βιολογικός κύκλος

Η *Cydia pomonella* διαθέτει αξιοσημείωτη ικανότητα να συγχρονίζει το βιολογικό της κύκλο με τον περίοδο καρποφορίας του ξενιστή. Ανάλογα με το γεωγραφικό πλάτος και το υψόμετρο της περιοχής καρπόκαφα μπορεί να ολοκληρώσει ένα (Καναδάς, Ενωμένο Βασίλειο και κάποια μέρη της Ρωσίας), δυο (Βορειοδυτικοί

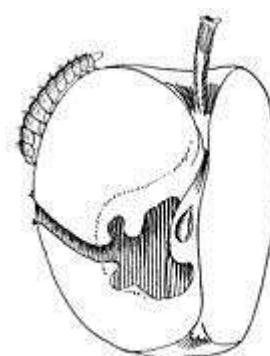
Αμερική (Setyobudi,1989), Νότια Αφρική (Nel,1985), Πακιστάν ( Bajwa,1985),κτλ.), τρία/τέσσερα (Καλιφόρνια (Benthall, 1978)), ή πέντε (Ισραήλ (Janjua,1958)) γενιές το χρόνο. Στην Ελλάδα συνήθως έχει 2-3 γενιές το έτος (Εικ,3)



**Εικ.3** Βιολογικός κύκλος της καρπόκαψας στη Καλιφόρνια. Ολοκληρώνονται τέσσερις γενιές. Φαίνονται μήνες εμφάνισης ατόμων κάθε αναπτυξιακού σταδίου (νύμφη, ενήλικο, αυγό, προνύμφη). Εικόνα προέρχεται από Codling Moth Information Support System (CMISS) (<http://ipmnet.org/codlingmoth/>)

Καρπόκαψα διαχειμάζει σε μορφή αναπτυγμένης προνύμφης σε βομβύκιο κάτω από ξερούς φλοιούς και ρωγμές του κορμού και των κλάδων του δέντρου ή και στο έδαφος. Την άνοιξη, οι πρώτες ενήλικες καρπόκοψες εμφανίζονται προς το τέλος του Απριλίου, αλλά ο χρόνος εμφάνισης ποικίλει ανάλογα με την περιοχή και την χρονιά. Οι μαζικές πτήσεις διαρκούν από τα μέσα Μαΐου μέχρι το τέλος Ιουνίου.

Μετά το ζευγάρισμα, το θηλυκό εναποθέτει περίπου 25-150 αυγά στα φύλλα και στους μικρούς καρπούς. Τα αυγά εκκολάπτονται σε 5-12 μέρες (το χρονικό διάστημα εξαρτάται από θερμοκρασία) και νεαρές προνύμφες εισβάλουν το αναπτυσσόμενο φρούτο μέσα σε λίγες ώρες, βρίσκοντας το κατάλληλο μέρος στην επιφάνεια του καρπού για να διεισδύσουν ( Εικ.4). Η πρώτη διείσδυση γίνεται συνήθως από τον κάλυκα, ενώ η δεύτερη φτάνει μέχρι τον πυρήνα. Όταν φτάσει εκεί, η προνύμφη καταστρέφει τα κουκούτσια και δημιουργεί μασώντας ένα κανάλι εξόδου. Από αυτήν την τρύπα απομακρύνει τα αποχωρήματα της και τα αφήνει εκεί για να βρει ένα νέο καρπό ή ένα κατάλληλο μέρος για να μεταμορφωθεί σε χρυσαλίδα.



**Εικ.4** Σχηματική απεικόνιση διείσδυσης της προνύμφης στο μήλο.

Η οπή του εξόδου που βρίσκεται συνήθως στα πλάγια του καρπού περιβαλλόμενη από σκοτεινά αποχωρήματα, είναι εμφανής και προδίδει την παρουσία της προνύμφης στον καρπό (Εικ.5). Το χρονικό διάστημα



κατά το οποίο η προνύμφη τρέφεται με το καρπό αποτελεί περίπου 16-24 μέρες, και εξαρτάται όχι μόνο από την θερμοκρασία, αλλά και από το είδος του μήλου με το οποίο τρέφεται (Goonewardene et.al.,1984) Το στάδιο μεταμόρφωσης σε χρυσαλλίδα παίρνει 18-45 μέρες, και επίσης εξαρτάται από θερμοκρασία.



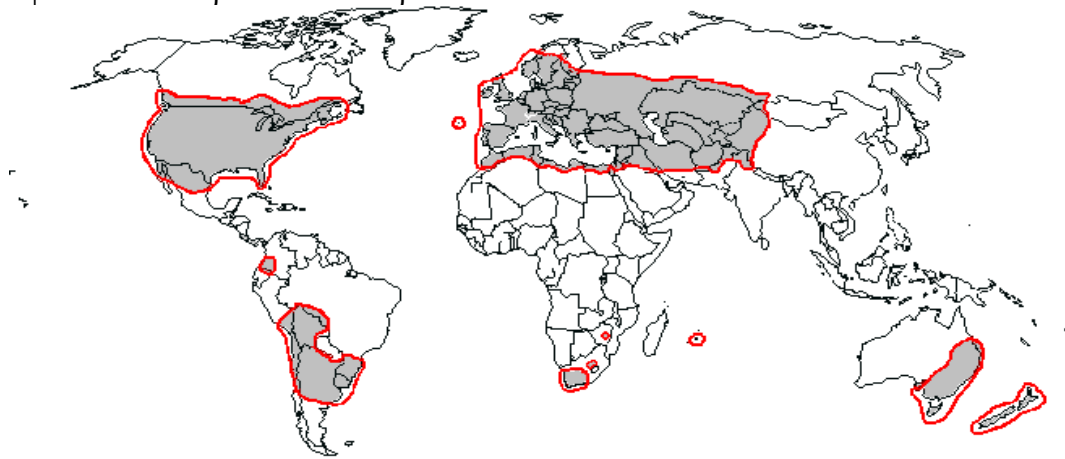
Τα ενήλικα που προκύπτουν από τις διαχειμάζουσες γενιές προνυμφών εμφανίζονται συνήθως το Ιούλιο (όσον αναφορά την Ελλάδα). Από αυτά προκύπτει η πρώτη καλοκαιρινή γενιά. Η προνύμφη δεύτερης γενιάς φτάνει στη ωριμότητα κατά την διάρκεια Αυγούστου- Σεπτεμβρίου, και αν το ευνοούν οι κλιματικές συνθήκες, τα ενήλικα αυτής της γενιάς δίνουν τα αυγά της τρίτης. Οι γενιές συχνά αλληλεπικαλύπτονται. Η εξήγηση για αυτό είναι ότι οι πτήσεις συνήθως διαρκούν μεγάλο χρονικό διάστημα και ο καιρός μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την ένταση των πτήσεων. Έτσι, ενήλικα άτομα της καρπόκαψας δεν μπορούν να ωοτοκήσουν αν θερμοκρασία πέφτει κάτω από 15<sup>0</sup>C και αν το κρύο διαρκεί πάνω από 2-3 εβδομάδες τα θηλυκά πεθαίνουν χωρίς να αφήσουν απογόνους. Rock και Shaffer (1983) βρήκαν πως ιδανική θερμοκρασία για την ανάπτυξη της καρπόκαψας αποτελεί 27<sup>0</sup>C.

**Εικ.5** Προσβολή καρπού από προνύμφη

Επίσης, ενήλικα άτομα της καρπόκαψας δεν μπορούν να ωοτοκήσουν αν θερμοκρασία πέφτει κάτω από 15<sup>0</sup>C και αν το κρύο διαρκεί πάνω από 2-3 εβδομάδες τα θηλυκά πεθαίνουν χωρίς να αφήσουν απογόνους. Rock και Shaffer (1983) βρήκαν πως ιδανική θερμοκρασία για την ανάπτυξη της καρπόκαψας αποτελεί 27<sup>0</sup>C.

### 1.1.3 Εξάπλωση.

Το έντομο θεωρείται γηγενές είδος της νοτιοανατολικής Ευρώπης, αλλά χάρη στη ανεξέλικτη μετακίνηση των φρέσκων φρούτων από μια χώρα στην άλλη, σύντομα έχει επεκταθεί σε κάποτε μη προσβεβλημένες περιοχές. Η αυξημένη ικανότητα της καρποκαψας να προσαρμόζεται στο ευρύ φάσμα κλιματικών συνθηκών και να χρησιμοποιεί πλήθος φρούτων για την εκτέλεση του βιολογικού της κύκλου, έκανε την εξάπλωση του εντόμου εξαιρετικά επιτυχή. Τώρα *Cydia pomonella* εμφανίζεται σε όλο τον κόσμο όπου υπάρχει καλλιέργεια μηνοειδών με εξαίρεση την Ιαπωνία και την Δυτική Αυστραλία. (Εικ.6) Ο κίνδυνος για την παραγωγή εξαρτάται από την πυκνότητα πληθυσμού του εντόμου, τη δραστηριότητα και την εξέλιξη του πληθυσμού (που εξαρτώνται κυρίως από παράγοντες κλιματικούς) και από την αφθονία των καρπών στα δέντρα.



**Εικ.6** Χάρτης εμφάνισης της *Cydia pomonella*. Εμφανίζεται σε όλο τον κόσμο όπου υπάρχει καλλιέργεια μηνοειδών. (πηγή εικόνας <http://ipmnet.org/codlingmoth/bionomics/cmdistri.html>)

#### 1.1.4 Καταπολέμηση

Η προστασία των καρποφόρων δέντρων από τα φυτοφάγα έντομα για να είναι αποτελεσματική, οικονομική και ασφαλής, πρέπει να γίνεται με τις κατάλληλες στρατηγικές, στις οποίες συγκαταλέγονται η ημερολογιακή ή σχηματική, η δευθυνομένη ή κατευθυνόμενη και η ολοκληρωμένη. Μεταξύ των μεθόδων καταπολέμησης συγκαταλέγονται η χημική (με κλασσικά ή άλλα εντομοκτόνα), οι βιολογικές, βιοτεχνικές και βιοτεχνολογικές μέθοδοι.

##### Ημερολογιακή ή σχηματική καταπολέμηση

Διενεργούνται συχνοί ψεκασμοί με βάση ορισμένες ημερομηνίες, ή σύμφωνα με τα βλαστικά στάδια των δέντρων, ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι εχθρών, συνήθως με φυτοφάρμακα ευρέως φάσματος δράσης (Bajwa, 1996). Η τακτική αυτή είναι η πλέον εύκολη και απλή στην εφαρμογή της και κατά συνέπεια ευρέως διαδεδομένη. Ωμως, η ανάπτυξη από τα έντομα ανθεκτικότητας σε ορισμένα εντομοκτόνα εξαιτίας της συχνής χρήσης τους, αποτελεί ένα σοβαρό πρόβλημα και καθιστά τη στρατηγική αυτή συχνά μην αποτελεσματική (Varela et.al., 1993; Knight et.al., 1994)

##### Διευθυνόμενη ή κατευθυνόμενη καταπολέμηση.

Συνιστάται στη έγκαιρη καταπολέμηση ορισμένων εχθρών μόνο όταν αυτοί υπάρχουν στον οπωρώνα. Κατά την εφαρμογή της στρατηγικής αυτής, χρησιμοποιούνται φυτοφάρμακα με κατά το δυνατόν εκλεκτική δράση, ώστε να έχουν τις ελάχιστες βλαβερές επιδράσεις στους ωφέλιμους οργανισμούς και το περιβάλλον και ταυτόχρονα να αντιμετωπίζουν αποτελεσματικά τους βλαβερούς για τα φυτά οργανισμούς. (Croft, 1992)

##### Ολοκληρωμένη καταπολέμηση

Είναι ένα σύστημα οικολογικά προσανατολισμένης διαχείρισης των πληθυσμών των βλαβερών για τα φυτά οργανισμών που χρησιμοποιεί όλες τις κατάλληλες τεχνικές και μεθόδους με ένα συνδυασμένο τρόπο, τέτοιο ώστε η πυκνότητα του πληθυσμού τους να συγκρατείται σε επίπεδα κατώτερα από εκείνα που θα μπορούσαν να προκαλέσουν οικονομική ζημιά στη καλλιέργεια.

Μέθοδοι που εφαρμόζονται για την καταπολέμηση των εντόμων είναι:

##### Χημική μέθοδοι

Χρήση εκλεκτικών εντομοκτόνων, ώστε να μην εξοντώνουν τα ωφέλιμα εντομοφάγα κα ακαρεοφάγα αρθρόποδα. Αν δεν υπάρχει εκλεκτικό εντομοκτόνο χρησιμοποιείται μη εκλεκτικό, αλλά με τη μικρότερη δυνατή δόση και με μικρή υπολειμματική δράση. Ο χημικός έλεγχος ενάντια στα ενήλικα και στα αυγά αναμένεται να ξεκινήσει μία εβδομάδα μετά την παρατήρηση του κρίσιμου αριθμού εκδύσεων, ενώ στην περίπτωση των προνυμφών το διάστημα είναι 10-14 ημέρες. Από τις ανασταλτικές της ανάπτυξης ή της εξέλιξης των εντόμων ουσίες, έχουν χρησιμοποιηθεί κατά της καρπόκαψας οι ditlubenzuron, fenoxycarb, hexaflumuron, teflubenzuron και triflumuron. Οι ουσίες αυτές έχουν και ωοκτόνο και προνυμφοκτόνο δράση, εκτός από το fenoxycarb, που δρα στην καρπόκαψα κυρίως ως ωοκτόνο, παρεμποδίζοντας την σύνθεση της χιτίνης (Charmillot & Brunner, 1990; de Reede et.al., 1986). Ακόμα, χημική καταπολέμηση ενάντια προνυμφών δεν είναι πάντα επιτυχής λόγω μικρού χρονικού διαστήματος κατά το οποίο νεαρές λαύρες είναι εκτεθειμένες στο

φυτοφάρμακο και της μικρής ποσότητας τροφής την οποία καταναλώνουν πριν την εισβολή στο φρούτο.

#### Βιολογικές μέθοδοι

Σε αυτές χρησιμοποιούνται φυσικοί εχθροί των βλαβερών οργανισμών, κυρίως εντομοφάγα έντομα και ακάρεα, εντομοπαθογόνοι μικροοργανισμοί, ιοί, κτλ. (Croft & McRae, 1993). Δύο είδη σφήκας που είναι φυσικοί εχθροί της καρπόκαμψας πρέπει να αναφερθούν εδώ, το παράσιτο αυγών *Trichogramma Cacoeciae* και η προνύμφη του παρασίτου *Dibrachys Cavus*. Επίσης η καρπόκαμψα καταπολεμήθηκε ικανοποιητικά σε μηλιές και αχλαδιές με το ιό γρανούλωσης (GV). Ο ιός αυτός είναι εκλεκτικός. Επηρεάζει λίγα μόνο άλλα *Tortricidae*, όπως το *Grapholitha molesta* (Τσαπικούνης & Φάνης, 1999). Όσες προνύμφες φανέ ψεκασμένη φυτική επιφάνεια ψοφούν σε περίπου 48 ώρες.

#### Βιοτεχνικές μέθοδοι

Στην κατηγορία αυτή υπάγονται μέθοδοι και τεχνικές που εκμεταλλεύονται ορισμένα χαρακτηριστικά τις συμπεριφοράς των εντόμων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν παγίδες φερομόνης, οποίες επιτρέπουν εκτός από τον έλεγχο του πληθυσμού και την ακριβή παρατήρηση των πτήσεων των αρσενικών, βάση αποτελεσμάτων οποίας καθορίζεται η ημέρα του πρώτου ψεκασμού. (Whalon & Croft, 1984; Vickers & Rothschild, 1991). Ένας άλλος μέθοδος για έλεγχο και παρακολούθηση του πληθυσμού είναι "trunk banding" - παγίδες κυματοειδούς χαρτιού στους κορμούς των δέντρων. Με αυτό το τρόπο επιτυγχάνεται η παγίδευση της προνύμφης που φτάνει εκεί, επιλέγοντας την παγίδα ως κατάλληλη θέση προφύλαξης και διαχείμασης.

#### Βιοτεχνολογικοί μέθοδοι

Βασίζονται στην χρήση μεταλλαγμένων εντόμων ή φυτών, με βοήθεια της γενετικής μηχανικής. Αν και συγκεκριμένη μέθοδος καταπολέμησης απαιτεί περαιτέρω αναλύσεις, προκειμένου να υπολογιστούν οι μελλοντικές επιπτώσεις τέτοιας χρήσης στη ισορροπία του περιβάλλοντος.

### **1.2 Συμβιωτικές σχέσεις**

Οι προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί ήταν αυτοί που πρώτοι εξελιχθήκαν και κατέλαβαν ένα πλήθος οικοτόπων πολύ πριν την εμφάνιση των μεγαλύτερων και πολυπλοκότερων πολυκυττάρων ευκαρυωτικών οργανισμών. Στη συνέχεια, οι ίδιοι αυτοί πολύπλοκοι ευκαρυωτικοί οργανισμοί έγιναν ένας αρκετά ελκυστικός οικοτόπος για διάφορους μικροοργανισμούς ως σταθεροί και πλούσιοι σε θρεπτικά συστατικά χώροι. Το αποτέλεσμα αυτής της συνύπαρξης είναι η διαρκής αλληλεπίδραση των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών (είτε πρόκειται για φυτά, είτε για ζώα) με τους προκαρυωτικούς. Αρχικά είχε δοθεί έμφαση στη μελέτη εκείνων των αλληλεπιδράσεων στις οποίες οι μικροοργανισμοί είναι παθογόνοι. Συνεπώς, οι μικροοργανισμοί θεωρούνταν είτε ότι είναι παράσιτα που ζουν εις βάρος του ξενιστή τους είτε, στην καλύτερη περίπτωση, ότι έχουν αναπτύξει μια σχέση ομοσιτισμού (commensalism) με τον ξενιστή τους. Η αντίληψη αυτή έχει αλλάξει αρκετά τα τελευταία 15 περίπου χρόνια, αφού έχει αυξηθεί το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών στη μελέτη αλληλεπιδράσεων, οι οποίες ωφελούν τόσο τον ευκαρυωτικό

ξενιστή όσο και το μικροοργανισμό. Οι αλληλεπιδράσεις αυτού του τύπου ονομάζονται συμβιωτικές (αμοιβαία ωφέλιμες).

Ο όρος συμβίωση (symbiosis) χρησιμοποιείται για να εκφράσει τη σχέση συνύπαρξης ενός οργανισμού με έναν άλλο σε διάφορους βαθμούς συσχέτισης (Bourtzis&Miller, 2003; Moran,2006) Ο όρος συμβίωση χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1879 από το γερμανό επιστήμονα Heinrich Antode Bary, ο οποίος όρισε τη συμβίωση ως: "να ζουν μαζί δυο ανόμοιοι οργανισμοί". (Douglas,1994; Wilkinson,2001)

Οι συμβιωτικές σχέσεις διακρίνονται (α) σε σχέσης "εξωσυμβίωσης" (ectosymbiosis) όταν ο ένας συμβιώτης ζει "πάνω" στον άλλο και (β) σε σχέσεις "ένδοσυμβίωσης" (endosymbiosis) όταν ο ένας συμβιώτης ζει "μέσα" στον άλλο. Επίσης διακρίνονται σε (α) "υποχρεωτικές", δηλαδή σχέσεις που είναι απαραίτητες για την επιβίωση τουλάχιστον του ενός συμβιώτη και (β) "προαιρετικές", όπου η συμβιωτική σχέση είναι χρήσιμη, αλλά μη ζωτικής σημασίας (Moran,2006; Ahmadjian&Paracer,2000). Σύμφωνα με τους Tanada και Kaya (1993), μια συμβιωτική σχέση μπορεί να χαρακτηρίζεται από:

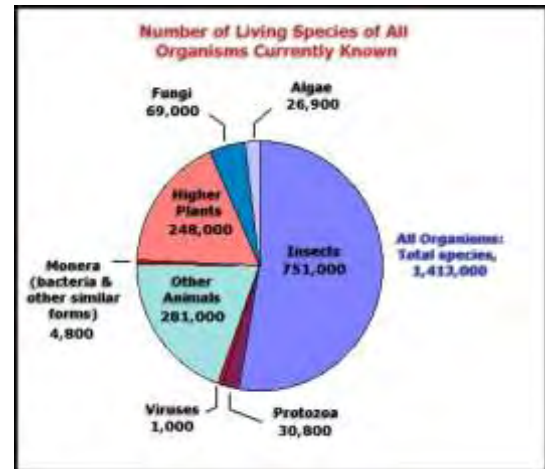
- *Αμοιβαιότητα* (Mutualism), χαρακτηρίζει τις συμβιωτικές σχέσεις μεταξύ ατόμων διαφορετικών ειδών κατά τις οποίες και οι δυο συμβιώτες ωφελούνται (Ahmadjian&Paracer,2000)
- *Ομοσιτισμό* (Commensalism), χαρακτηρίζει τις συμβιωτικές σχέσεις μεταξύ οργανισμών κατά τις οποίες ο ένας συμβιώτης ωφελείται, ενώ ο άλλος δεν αποκομίζει ιδιαίτερο όφελος (Ahmadjian&Paracer,2000)
- *Παρασιτισμό* (Parasitism), χαρακτηρίζει τις συμβιωτικές σχέσεις μεταξύ δυο οργανισμών κατά τις οποίες ο ένας συμβιώτης ωφελείται, ενώ ο άλλος βλάπτεται (Ahmadjian&Paracer,2000)

Πολλά βακτήρια έχουν αναπτύξει συμβιωτικές σχέσεις αμοιβαιότητας με ανώτερους ευκαριωτικούς οργανισμούς, όπως φυτά, ζώα και άνθρωπο. Οι συμβιωτικοί αυτοί μικροοργανισμοί (χλωρίδα) ζουν στο εσωτερικό κάθε ζωικού οργανισμού στα όργανα που έρχονται σε επαφή με το περιβάλλον, όπως έντερο, βρόχοι, κόλπος, μήτρα κτλ. Για παράδειγμα, η μικροβιακή κοινότητα του εντερικού συστήματος στον άνθρωπο υπολογίζεται ότι ξεπερνά στον αριθμό το σύνολο των σωματικών κυττάρων (Savage,1977) και μεταβολική της δραστηριότητα θεωρείται ισοδύναμη αυτής του ήπατος (Breg,1996).

Πολλά είδη εντόμων επίσης παρουσιάζουν συμβιωτική σχέση με μεγάλο αριθμό διαφόρων μικροοργανισμών (Brooks,1963; Bucher,1965; Dasch et.al.,1984; Lysenko,1985; Tanada&Kaya,1993). Παρόλα αυτά, υπάρχουν εντυπωσιακά λίγες μελέτες για τον λειτουργικό ρολό της εντερικής μικροχλωρίδας (Campbell,1990). Εξαιρέση αποτελούν οι λεπτομερές μελέτες της μικροχλωρίδας των τερμιτών (Bignell,2000; Berznak,2000; Brune,1998).

### 1.2.1 Αλληλεπίδραση εντόμου – βακτηρίου

Τα έντομα είναι η τάξη εκείνη των ζώων που παρουσιάζει τη μεγαλύτερη βιοποικιλότητα περιέχοντας πάνω από 1.000.000 είδη (δηλαδή πάνω από τα μισά είδη που είναι γνωστά σε αυτόν τον πλανήτη) (Εικ.7). Τα έντομα απαντούν σε πλήθος οικοτόπων. Αυτό οφείλεται στη ικανότητα των εντόμων να τρέφονται με διαφορετικούς τύπους τροφής το οποίο με τη σειρά του οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, στους συμβιωτικούς μικροοργανισμούς τους (Ishikawa,2003). Οι συμβιωτικοί αυτοί μικροοργανισμοί προέρχονται από αρκετά διαφορετικές ομάδες και επηρεάζουν τη βιολογία, την οικολογία και τη φυσιολογία του ξενιστή (Buchner,1965; Dale&Moran,2006).



**Εικ.7** Διάγραμμα όλων των γνωστών ζώντων ειδών του πλανήτη. Τα έντομα αποτελούν τους πιο πολυπληθείς οργανισμούς του πλανήτη.

Τα περισσότερα κοινά βακτήρια της μικροχλωρίδας του πεπτικού σωλήνα των υγιών εντόμων είναι αρνητικοί κατά Gram μικροί ράβδοι. Για παράδειγμα, το *Streptococcus faecalis* είναι το κυρίαρχο βακτήριο της χλωρίδας του εντέρου του *Galleria mellonella* και του *Agrotis Segetum*. Παρόλα αυτά, στην *Drosophila melanogaster* τις κυρίαρχες μορφές συνιστούν θετικά κατά Gram βακτήρια.

Υποχρεωτική συμβίωση και συνεξέλιξη με βακτήρια έχει εντοπιστεί σε αφίδες (Baumann et.al.,1995), μέλισσες (Munson et.al.,1992), whiteflies (έντομο της οικογένειας *Aleyrodidae*) (Clark et.al.,1992), ξυλοφάγα μυρμήγκια (Schroder et.al.,1996), σιταρόψειρες (Campbell et.al.,1992), κατσαρίδες και τερμίτες (Bandi et.al.,1994), όπως και σε πολλά άλλα είδη εντόμων. Ο αριθμός και το είδος των μικροοργανισμών, ευρισκόμενων στις εξωτερικές και εσωτερικές επιφάνειες του εντόμου, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την κατοικία του (Breznak,2004).

Διακρίνονται σε πρωτεύοντες και δευτερεύοντες συμβιωτικούς μικροοργανισμούς ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της συμβιωτικής σχέσης.

Οι πρωτεύοντες συμβιωτικοί μικροοργανισμοί (ο καλύτερα μελετημένος είναι το γένος *Buchera* (Baumann et.al.,1995), που είναι το πρωτεύον συμβιωτικό βακτήριο των αφίδων) βρίσκονται εσωκυττάρια σε εξειδικευμένα όργανα που προέρχονται από τον ξενιστή και ονομάζονται βακτηριώματα (bacteriomes). Αφίδες κληρονομούν το βακτήριο μητρικά (Douglas,1998). Η *Buchera* έχει τη ικανότητα να παρέχει στον ξενιστή της διάφορα θρεπτικά που δεν μπορούν να βρουν οι αφίδες μέσω της κανονικής τους διαίτας, όπως για παράδειγμα βιταμίνες και βασικά αμινοξέα (λευκίνη και θρυπτοφάνη), (Douglas,2003; Baumann,2005; Dale&Moran 2006).

Οι δευτερεύοντες συμβιωτικοί μικροοργανισμοί βρίσκονται εξωκυττάρια και κληρονομούνται κυρίως μητρικά, αν και η μετάδοση τους σε μη μολυσμένους ξενιστές γίνεται και μέσω οριζόντιας μεταφοράς (Dale&Moran,2006). Οι συμβιωτικές σχέσεις που αναπτύσσονται με τους ξενιστές τους αυτοί οι μικροοργανισμοί κυμαίνονται από παρασιτικές μέχρι αμοιβαία ωφέλιμες. Οι ξενιστές τους συνήθως ωφελούνται επειδή τους προσδίδουν ανθεκτικότητα σε

αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες (π.χ. υψηλή θερμοκρασία), προστασία έναντι εχθρών (π.χ. παρασιτοειδή ή ιούς) ή τους παρέχουν τη δυνατότητα να εκμεταλλευτούν συγκεκριμένους τύπους τροφής (Dale&Moran,2006; Hedges et.al.,2008)

Η ποικιλομορφία της μικροχλωρίδας σχετίζεται εν μέρει με την ποικιλία των εξειδικευμένων δομών που υπάρχουν στο έντερο και επηρεάζεται από το pH, συνθήκες οξειδοαναγωγής, παρουσία πεπτικών ενζύμων και την διατροφή του ξενιστή (Chandler et.al.,2008). Η αλληλεπίδραση μεταξύ εντόμων και συμβιωτικών βακτηρίων τους μπορεί να επηρεαστεί από το είδος του φυτού με το οποίο το έντομο εκτρέφεται, άλλα οι μηχανισμοί που κρύβονται πίσω από αυτό δεν έχουν κατανοηθεί ακόμα (Chandler et.al.,2008). Η ίδια ερευνητική ομάδα διαπίστωσε πως οι αφίδες του είδους *Aphis fabae* μεγαλώνουν με χαμηλότερους ρυθμούς στο φυτό *Lamium purpureum* από ότι στο εναλλακτικό ξενιστή τους - *Vicia faba*. Η αρνητική επίδραση του *L.purpureum* στη ανάπτυξη των αφίδων έχει βρεθεί να επιδεινώνεται από δευτερεύοντα συμβιωτικά βακτήρια *Regiella insecticole* και *Hamitonella defensa*, τα οποία υπεραναπτύσσονται στις αφίδες που τρέφονται με *L.purpureum* (Chandler et.al.,2008).

Τα έντομα εκτός από ότι προσφέρουν στα βακτήρια ένα σταθερό περιβάλλον για ανάπτυξη, τους παρέχουν και ένα ευρύ φάσμα μεταβολιτών για την ολοκλήρωση βιολογικού τους κύκλου. Εντούτοις, η παρουσία βακτηρίων στους ξενιστές φαίνεται να είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση τους. Έτσι, η απουσία κάποιων ειδών βακτηρίων από το έντομο εκδηλώνεται με διάφορους τρόπους, όπως μείωση της ανάπτυξης, δυσκολίες στην έκδυση και την μεταμόρφωση, μείωση της αναπαραγωγικής ικανότητας και θάνατο σε ορισμένες περιπτώσεις (Τσαπικούνης&Φάνης,1999).

Είναι αποδεδειγμένες τουλάχιστον δυο βασικές λειτουργίες που εξυπηρετούνται από τα βακτήρια της μικροχλωρίδας: βιοσύνθεση θρεπτικών στοιχείων και αποικοδόμηση βιομάζας.

Η διατροφική λειτουργία των ενδοσυμβιωτών έχει μελετηθεί αρκετά, μέσω πειραμάτων διατροφής εντόμων με μη-ισορροπημένη (χαμηλή σε βασικά αμινοξέα και βιταμίνες) τροφή (Douglas,1998). Τα πειράματα αυτά έδειξαν πως τα βακτήρια βοηθάνε στη παραγωγή θρεπτικών που δεν λαμβάνονται από έντομα μέσω της διαίτας (Khachane et.al.,2007; Tamas et.al.,2002; van Ham et.al.,2003). Για παράδειγμα, η αλληλούχιση του γονιδιώματος ενός υποχρεωτικού συμβιώτη της *Wiggsworthia glossiniolia* αποκάλυψε πολλά γονίδια υπεύθυνα για βιοσύνθεση και μεταφορά των θρεπτικών στοιχείων (Akman et.al.,2002) 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).

Γενικά οι συμβιωτικοί μικροοργανισμοί φαίνεται να προμηθεύουν στα έντομα βιταμίνες, ένζυμα, αμινοξέα, και πιθανόν κάποιες ορμόνες. Άλλες λειτουργίες στις οποίες πιθανόν να λαμβάνουν μέρος είναι ο μεταβολισμός των ουρικών αλάτων, η ρύθμιση του pH, η δέσμευση του ατμοσφαιρικού αζώτου και η παραγωγή φερομόνων και στερολών (Douglas,1998; Cruden&Markovetz,1987) Σύμφωνα με τους Tanada

και Kaya (1993), ορισμένα βακτήρια στο έντερο των τερμιτών είναι ικανά να δεσμεύουν ατμοσφαιρικό άζωτο, ενώ κάποια άλλα βρέθηκε να παράγουν φερομόνες.

Η συμβολή των συμβιωτικών βακτηρίων στη αποικοδόμηση βιομάζας καθορίστηκε πρόσφατα από διάφορες μελέτες στο επίπεδο γονιδιώματος. Έχει βρεθεί πως οι συμβιώτες βοηθάνε στη αποικοδόμηση λιγνοκυτταρίνης (lignocellulose) με υψηλή αποδοτικότητα (Ohkuma,2003). Επίσης τα βακτήρια είναι ικανά να αποτοξικοποιήσουν φυτοτοξίνες, μυκοτοξίνες και εντομοκτόνα. Στην *Calliphora erythrocephala* μερικά βακτήρια ευρισκόμενα στο κηρώδες στρώμα του επιδέρματος (*Streptococcus spp.* και *Micrococcus spp.*) βρέθηκαν πως μεταβολίζουν το εντομοκτόνο dieldrin (Singh,1981). Αξίζει να σημειωθεί πως συμβιωτικά βακτήρια που απομονώθηκαν από διάφορα είδη εντόμων έδειξαν να είναι μια νέα πιθανή πηγή παραγωγής αντιμικροβιακών ουσιών (Kenny et.al.,1989), ενώ υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση εναντίων παθογόνων μικροοργανισμών των εντόμων (Shivokene&Malukas,1988)

Εξίσου σημαντικό ρόλο παίζει η ικανότητα των υποχρεωτικών συμβιώντων να προλαμβάνουν μολύνσεις του μεσεντέρου από παθογόνους μικροοργανισμούς (Breg,1996). Μια πρόσφατη έρευνα ανέδειξε την ανθεκτικότητα που προσφέρει στις αφίδες ενάντια σε παράσιτα, το συμβιωτικό στέλεχος *Regiella insecticola* (Vorburger et.al.,2010)

Οι λειτουργίες αυτές των συμβιωτικών βακτηρίων θα μπορούσαν να έχουν βιοτεχνολογικές εφαρμογές (Shi et.al.,2010). Από την μια πλευρά, ίσως θα ήταν δυνατή η ανάπτυξη καινούριων στρατηγικών για καταπολέμηση επιβλαβών εντόμων μέσω έλεγχου της μικροχλωρίδας τους. Από την άλλη πλευρά, η ταυτοποίηση μικροχλωρίδας των εντόμων θα μπορούσε να βοηθήσει στην ανακάλυψη νέων βακτηριακών στελεχών. Όμως επειδή η απομόνωση και η καλλιέργεια των συμβιώντων μικροοργανισμών είναι αρκετά δύσκολη και όχι πάντα επιτυχής (Smith&Douglas,1987), απαιτείται χρήση άλλων στρατηγικών μελέτης, όπως αυτής της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης.

### **1.2.2 Μέθοδοι ταυτοποίησης βακτηρίων. Μεταγονιδιωματική προσέγγιση.**

Παλιότερες μελέτες της βακτηριακής μικροχλωρίδας βασίζονται στο μέθοδο καλλιέργειας βακτηρίων για ταυτοποίηση τους βάση φαινοτύπου (Dasch et.al.,1984; Lysenko,1985). Αλλά αυτή η μέθοδος δίνει περιορισμένη πληροφορία σχετικά με την ποικιλομορφία και τη λειτουργία της μικροχλωρίδας των εντόμων (Dillon&Dillon,2004). Έτσι, η μελέτη των συμβιωτικών βακτηρίων με μοριακούς μεθόδους έχει αποκαλύψει την μεγάλη ποικιλομορφία των βακτηρίων στο έντερο των εντόμων σε αντιδιαστολή με την περιορισμένη ποικιλότητα των καλλιεργούμενων βακτηρίων (Head et.al.,1998; Pace,1997). Τώρα είναι γνωστό ότι σχεδόν 99% των βακτηρίων είναι μην καλλιεργήσιμα στα κοινά θρεπτικά μέσα (Amann et.al.,1995). Και αυτό επειδή η κατασκευή ενός μέσου καλλιέργειας απαιτεί πλήρης γνώση των περιβαλλοντικών παραγόντων (όπως το pH και η παρουσία θρεπτικών στοιχείων) που αντιμετωπίζουν τα βακτήρια στο εντερικό σωλήνα των εντόμων. Το 1909 ο Petri ήταν ο πρώτος που παρακολούθησε και περιέγραψε τα

συμβιωτικά βακτήρια του Δάκου της ελιάς (*Bacterocera oleae*), βασιζόμενος στην μικροσκοπική παρατήρηση, και πρότεινε ότι τα βακτήρια μπορούν να βρίσκονται σε μην καλλιεργούμενη κατάσταση (VBNC), οπότε χρειάζεται ανακάλυψη διαφορετικών μεθόδων για ταυτοποίηση τους.

Με βάση τα παραπάνω προκύπτει ότι η καλλιέργεια βακτηρίων μας επιτρέπει να έχουμε πρόσβαση σε ένα μικρό μόνο μέρος της ποικιλότητας που βρίσκεται στην μικροχλωρίδα (Oliver,2000). Εξαιτίας των περιορισμών που θέτουν οι μέθοδοι βασισμένοι στη καλλιέργεια των βακτηρίων ήταν αναμενόμενο ότι τα περισσότερα βακτήρια της μικροχλωρίδας των εντόμων παρέμεναν άγνωστα (Stokes et.al.,2001). Και επειδή η καλλιέργεια και η απομόνωση βακτηρίων *ex situ* δεν δίνει πλήρης εικόνα, αυτό οδηγεί σε επιλογή των μην καλλιεργούμενων μεθόδων (Caruzzo et.al.,2005)

Η τεχνική αυτή ονομάζεται μεταγονιδιωματική και βασίζεται στη κλωνοποίηση και αλληλούχιση των ριβοσωμικών RNA (rRNA) γονιδίων ολόκληρου του πληθυσμού της βακτηριακής κοινότητας (Garcia-Armisen et.al.,2010). Μεταγονιδιωματική (metagenomics) μπορεί να οριστεί ως η μελέτη του μεταγονιδιώματος (metagenome), δηλαδή του συνόλου του γενετικού υλικού που αντιστοιχεί σε ένα μικροβιακό πληθυσμό, ο οποίος υπάρχει σε συγκριμένο περιβαλλοντικό δείγμα (Sleator et.al.,2008).

Οι Kane και Pierce (1994) ήταν από τους πρώτους που χρησιμοποίησαν αλληλούχιση ριβοσωμικού DNA χρησιμοποιώντας την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), για να μελετήσουν την βακτηριακή κοινότητα των εντόμων. Αργότερα, ο McKillip και οι συνεργάτες του ανέλυσαν τη σύσταση του μικροβιώματος στο μεσέντερο της *Panolemis pyrusana* τόσο με PCR, όσο και με μεθόδους καλλιέργειας (McKillip et.al.,1997). Πολλές από τις 16S rRNAs αλληλουχίες βρέθηκαν πως δεν σχετίζονται με κανένα από τα γνωστά βακτηριακά είδη, υποδεικνύοντας την ύπαρξη μεγάλου αριθμού μην ταυτοποιημένων βακτηρίων. Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι τα δυο τρίτα των 16S rRNAs που απομονώθηκαν από την μικροχλωρίδα των τερμιτών (*Reticulitermes speratus*) έχουν μικρότερη του 90% ομοιότητα με γνωστά βακτηριακά είδη, ενώ δέκα από αυτούς τους κλώνους δεν έδειξαν στενή ομοιότητα με κανένα από τα γνωστά βακτηριακά φύλα (Ohkuma&Kudo,1996).

Υπάρχουν δυο στρατηγικές μεταγονιδιωματικής ανάλυσης:

- Προσέγγιση βασισμένη στη αλληλουχία (sequences-based metagenomics ) που περιλαμβάνει αλληλούχιση μεταγονιδιώματος και συγκριτική ανάλυση αποτελεσμάτων με ήδη γνωστά γονιδιώματα.
- Λειτουργική μεταγονιδιωματική (functional metagenomics) που περιλαμβάνει σάρωση των DNA ή cDNA βιβλιοθηκών για ανακάλυψη νέων γονιδίων.

Η δημιουργία των 16S rRNA βιβλιοθηκών πραγματοποιείται με ενίσχυση του γονιδιακού τόπου 16S rRNA με εκκινητές που ενισχύουν το 16S rRNA γονίδιο σε όλα τα βακτήρια. Αυτός ο γονιδιακός τόπος είναι ο πιο συντηρημένος μεταξύ



βακτηριακών στελεχών και επομένως ο πιο κατάλληλος για την ταυτοποίηση τους. Αλληλούχηση τέτοιων 16S rRNA γενωμικών βιβλιοθηκών προσφέρει σχεδόν ολοκληρωμένη κάλυψη γονιδιώματος, και αποτελεί κατάλληλο εργαλείο για απόκτηση πιο ξεκάθαρης εικόνας της ποικιλομορφίας των ειδών που βρίσκονται στο δείγμα (Garcia-Armisen et.al.,2010). Η μεταγονιδιωματική προσέγγιση επιτρέπει τη ανάλυση και ταυτοποίηση μικροβιακού πληθυσμού του εντόμου, καθώς βοηθά και στην κατανόηση συνεξέλιξης του ξενιστή και των συμβιώντων του προς διαφορετικές πηγές διατροφής (Baumann et.al.,2001; de Vriest et.al.,2001; Hogg&Lehane,2001; Paster et.al.,1996; Toth et.al.,2001)

Επιπλέον, αποδείχτηκε πως τα βακτήρια που αναπτύσσονται σε κοινά θρεπτικά μέσα δεν αποτελούν τις κυρίαρχες μορφές στο φυσικό οικότυπο (Smalla,2004). Το βασικό πρόβλημα φαίνεται να είναι ότι τα βακτήρια, τα οποία βρίσκονται σε αφθονία στη μικροχλωρίδα μεγαλώνουν πιο αργά από ότι οι λιγότερο κυρίαρχες μορφές. Μάλιστα, κάποια από τα κυρίαρχα βακτηριακά είδη μπορεί να μη αναπτυχθούν καθόλου. Αυτό οδηγεί την απομόνωση μόνο αυτών των πληθυσμών που είναι λιγότερα πολυάριθμοι και ταχύτερα αναπτυσσόμενοι.

### **1.3 Σκοπός της εργασίας**

Η καρπόκαμα αποτελεί έναν εχθρό των μηλοειδών, μεγίστης οικονομικής σημασίας (Geier,1963, Barnes,1992; Saethre and Hofsvang,2002; Evenden and McCloughlin, 2005; Kührt et.al.,2006). Η χρήση χημικών ουσιών δίνει λύσεις και εξασφαλίζει αύξηση της παραγωγής, όμως δημιουργεί ταυτόχρονα και σημαντικά οικολογικά προβλήματα.

Επιπλέον, πληθώρα επιστημονικών μελετών αποκαλύπτουν τόσο την ύπαρξη συμβιωτικών σχέσεων μεταξύ βακτηρίων και εντόμων, όσο και τον ρόλο τους. Φαίνεται πως η παρουσία των βακτηρίων είναι ικανή να επηρεάσει σημαντικά την οικολογία και φυσιολογία των εντόμων ξενιστών.

Ο στόχος των τρεχόντων ερευνητικών προσπαθειών ήταν η μελέτη και η ταυτοποίηση της βακτηριακής χλωρίδας της *Cydia pomonella* με την χρήση βιβλιοθηκών 16S rRNA, καθώς και τον εντοπισμό κυρίαρχων βακτηριακών στελεχών σε έντομα που προέρχονται από διαφορετικού τύπου καλλιέργειες μήλου (συμβατική και βιολογική). Η μελλοντική προοπτική της ερευνάς είναι η ανάπτυξη νέων βιοτεχνολογικών μεθόδων, φιλικών προς το περιβάλλον, για τον έλεγχο επιβλαβών ειδών εντόμων με στόχο τον περιορισμό ή/και την εξάλειψη της χρήσης χημικών εντομοκτόνων.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

---

## 2.1 Κατάταξη δειγμάτων.

Ενήλικα άτομα της καρπόκοπας συλλέχτηκαν από δυο διαφορετικές περιοχές της περιφέρειας 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). Με σκοπό τη σύλληψη ενήλικων ατόμων τον Απρίλη 2009 τοποθετήθηκαν φερομονικές παγίδες τύπου «Δέλτα» (Εικ.8)

Η λειτουργία των παγίδων βασίζεται στην έκκριση χημικά συνθεμένων φερομονικών ουσιών. Οι φερομόνες (pheromones) στη φύση αποτελούν τον βασικότερο τρόπο επικοινωνίας μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους. Ουσιαστικά είναι χημικές ουσίες που παράγονται στο ένα φύλο και δρώντας μέσω της όσφρησης του άλλου φύλου διεγείρουν το κεντρικό νευρικό σύστημα και ως συνέπια επηρεάζουν την συμπεριφορά του. Υπάρχουν φερομόνες κινδύνου, εντοπισμού τροφής, σεξουαλικές κλπ.



**Εικ.8** Φερομονική παγίδα.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε παγίδες εμπλουτισμένες με φερομόνη θηλυκού φύλου (Coldemon) της καρπόκοπας οι οποίες θα προσελκύσουν τα αρσενικά ενήλικα άτομα του φυσικού πληθυσμού, χωρίς να υφίσταται βλάβη για της καλλιέργειες, τον άνθρωπο ή το περιβάλλον.

Μετά την αφαίρεση εντόμων από την παγίδα τα άτομα διατηρήθηκαν σε 98%αιθανολη σε θερμοκρασία 4°C με σκοπό την αποφυγή τυχών μολύνσεων από ξένο DNA και για την καλύτερη διατήρηση γενωμικού DNA του εντόμου.

Δείγματα που είχαν την καλύτερη απόδοση ( μεγαλύτερη συγκέντρωση του DNA μετά το καθορισμό) και τελικός χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στο πίνακα 1.

| Αγρός       | Τύπος καλλιέργειας | Ημερομηνία σύλληψης | Συντομογραφία ατόμου |
|-------------|--------------------|---------------------|----------------------|
| Αγιάς (X-2) | Βιολογικό μήλο     | 25/7/09             | BA1                  |
| Αγιάς (X-1) | Βιολογικό μήλο     | 12/7/09             | BA2                  |
| Αγιάς       | Συμβατικό μήλο     | 25/07/09            | CA                   |
| Βελεστίνου  | Βιολογικό αχλάδι   | 24/05/09            | BP                   |

**Πιν.1** Καταγραφή ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη

## 2.2 Απομόνωση DNA από έντομα

Απομόνωση γενωμικού DNA ξεκινάει με την ομογενοποίηση των ιστών του εντόμου και στην συνέχεια ακολουθεί μια διαδικασία πολλών βημάτων που έχει ως σκοπό τον καθορισμό και την απομόνωση του γενωμικού DNA. Η διαδικασία αυτή μπορεί να διαχωριστεί σε δυο βασικά στάδια:

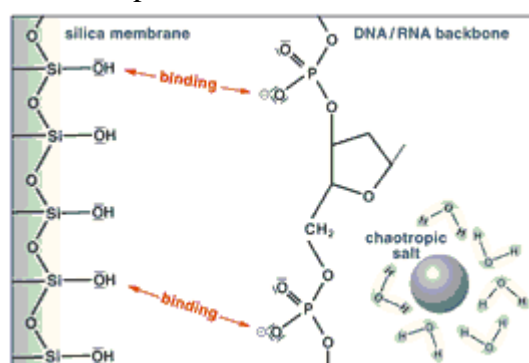
- 1) Ελευθέρωση του DNA σε διαλυτή μορφή μετά από ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών καθώς και μεμβρανών υποκυττάρων οργανιδίων, όπως οι πυρήνες.
- 2) Διαχωρισμός του DNA από άλλα μακρομόρια.

Καθορισμός στη παρόν μελέτη έγινε με την βοήθεια του NucleoSpin Tissue Kit της εταιρίας Macherey-Nagel. Λύση των κυττάρων επιτυγχάνεται με επώαση του δείγματος σε μείγμα προτεΐνάσης K και SDS, τα οποία διασπούν τα μεμβρανικά τοιχώματα. Κατάλληλες συνθήκες για σύνδεση του DNA με μεμβράνη πυριτίου δημιουργούνται με προσθήκη χαιοτροπικών (chaotropic) αλάτων και αιθανόλης. ( Εικ.9). Για απομάκρυνση υπολειμμάτων χρειάζεται έκλυση με δυο διαφορετικά buffers. Τέλος, ακολουθεί η κατακρήμνιση του DNA κάτω από χαμηλές ιοντικές συνθήκες ( Εικ.10). Η απομόνωση αυτή αποφέρει DNA με υψηλό βαθμό καθαρότητας που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω πειραματικές διεργασίες, όπως PCR ανάλυση.

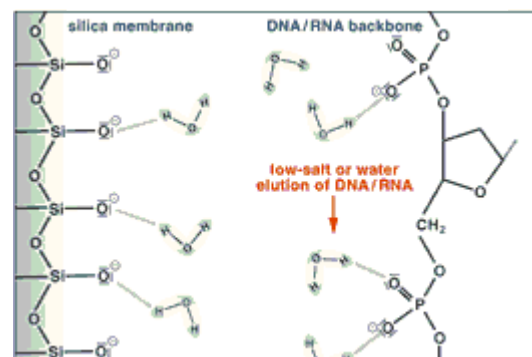
Μετά την έκλυση του DNA, ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων με σκοπό την οπτικοποίηση (visualization) του DNA που περιέχεται στο δείγμα. Ας δούμε την διαδικασία ανά βήμα.

### 2.2.1 Τομή και ομογενοποίηση των εντόμων

Το πρώτο βήμα της διαδικασίας αποτελεί η τομή του εντόμου, που πραγματοποιείται σε αποστειρωμένες συνθήκες. Με βοήθεια μεταλλικού εργαλείου, που προηγουμένως πέρασε από τη φλόγα για αποστείρωση, το έντομο προσεκτικά τοποθετείται σε ένα πιάτο Petri που περιέχει αιθανόλη 100%. Έπειτα από το άτομο απομακρύνονται όλα τα εξαρτήματα (κεραίες, πτέρυγες και πόδια) καθώς ενδιαφέρον παρουσίαζε η μελέτη εντερικής μικροχλωρίδας. Στη συνέχεια το σώμα του εντόμου τοποθετείται σε erppendorf με 50μl ddH<sub>2</sub>O και ακλουθεί λύση με αποστειρωμένα πλαστικά εμβολάκια μέχρι την πλήρη ομογενοποίηση του εντόμου.



Εικ.9 Αρχή της δέσμευσης



Εικ.10 Αρχή της έκλυσης

## 2.2.2 Πρωτόκολλο Απομόνωσης DNA με NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel)

Ακολουθούμε τα βήματα του πρωτοκόλλου που αναγράφεται από την εταιρία.

- Αρχικά στο διάλυμα ομογενοποιημένου εντόμου προστίθεται 180 μl Buffer T1 και 25 μl πρωτεϊνάσης K. Vortex για 5 -10 sec.
- Επώαση στο υδατόλουτρο 56 °C για 3 ώρες με Vortex ανά μισή ώρα.
- Αν μετά την επώαση απομένουν αδιάλυτα ορατά τμήματα, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στη υψηλή ταχύτητα (12.000 rpm) για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καινούριο eppendorf.
- Πρόσθεση 200 μl Buffer B3. Vortex. Ακολουθεί επώαση στους 70 °C για 10 λεπτά. Γρήγορο Vortex.
- Προσθήκη 210 μl αιθανόλης 98% στο δείγμα. Δυνατό Vortex.
- Κάθε δείγμα μεταφέρεται σε διαφορετικό NusleoSpin Tissue Column και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στους 12.000 rpm. Το υπερκείμενο απομακρύνεται.
- Ακολούθως γίνεται πλύση, που αποτελείται από δυο βήματα:

1<sup>ο</sup> βήμα: Πρόσθεση 500μl Buffer BW στην στήλη. Φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 1 λεπτό.

2<sup>ο</sup> βήμα: Πρόσθεση 600μl Wash Buffer B5 στην στήλη. Φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 1 λεπτό.

- Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στους 12.000rpm, για απομόνωση υπολειμμάτων αιθανόλης, που μπορούν στη συνέχεια να εμποδίσουν την PCR.
- Η NusleoSpin Tissue Column τοποθετείται σε αποστειρωμένο eppendorf.
- Έκλυση γίνεται με προσθήκη 100 μl Elution Buffer BE (70 °C).
- Αφού ολοκληρωθεί η επώαση ενός λεπτού σε θερμοκρασία δωματίου το δείγμα φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στους 12.000rpm.

- Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, αποθηκεύεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για μελλοντική χρήση.

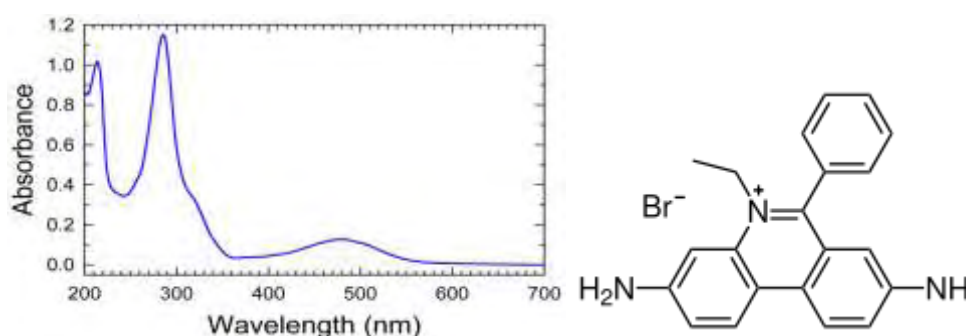
### 2.2.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον καθαρισμό κομματιών DNA είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η τεχνική στηρίζεται σε δύο ιδιότητες των νουκλεϊκών οξέων:

- 1) Το αρνητικό φορτίο που προσδίνεται από φωσφορικές ομάδες δεσοξυνουκλεοτιδίων. Όταν το DNA τοποθετείται σε ηλεκτρικό πεδίο, παρουσία διαλύματος TBE ( Tris-HCl pH7, βορικό οξύ και EDTA), κινείται από αρνητικό προς θετικό πόλο.
- 2) Το διαφορετικό μήκος (σε ζεύγη βάσεων -bp). Για το διαχωρισμό μορίων DNA ανάλογα με το μέγεθος τους χρησιμοποιείται πήκτωμα αγαρόζης που δημιουργεί ένα πλέγμα μέσω του οποίου τα μικρά μόρια κινούνται με μεγαλύτερη ταχύτητα από τα μεγαλύτερα (εγκλωβισμός στο πλέγμα). Επιπλέον, χρησιμοποιώντας πήκτωμα διαφορετικής συγκέντρωσης αγαρόζης επιτυγχάνουμε τον επιθυμητό διαχωρισμό ανάλογα με το εύρος των βάσεων που θέλουμε να ξεχωρίσουμε.

Κατά την προετοιμασία της μεθόδου τα δείγματα αναμιγνύονται με μια χρωστική (loading buffer). Η χρωστική έχει διπλό ρόλο: βοηθάει τα δείγματα να παραμείνουν στα πηγαδάκια και δείχνει την πορεία της ηλεκτροφόρησης καθώς περιέχει τις χρωστικές μπλε της βρωμοφαινόλης και κυανού της ξυλόλης, ενώσεις που παρουσιάζουν κινητικότητα παρόμοια με ένα τμήμα DNA. Επιπλέον, μαζί με τα δείγματα ηλεκτροφορείται και ένας μάρτυρας μοριακού βάρους, ο οποίος δίνει πολλές ζώνες με γνωστό μέγεθος, γεγονός χρήσιμο για τον εντοπισμό και χαρακτηρισμό των άγνωστων ζωνών καθώς και την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων.

Η οπτικοποίηση DNA επιτυγχάνεται με ενσωμάτωση σε πήκτωμα αγαρόζης του βρωμιούχου αιθιδίου, μιας χρωστικής που φθορίζει κάτω από υπεριώδες φως όταν συνδέεται με DNA. (Εικ. 11)



**Εικ.11** Μέγιστο απορρόφησης και δομή του βρωμιούχου αιθιδίου

### 2.2.3.1 Προετοιμασία - διαδικασία ηλεκτροφόρησης

Τα πηκτώματα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν συγκέντρωση 0,8%, ώστε να είναι δυνατός ο διαχωρισμός τμημάτων μεγέθους μικρότερου των 500bp. Η προετοιμασία της πηκτής αγαρόζης έγινε με την εξής διαδικασία:

- Ζυγίζονται 0,8g αγαρόζης, μεταφέρονται σε κωνική φιάλη και προσθέτονται 100 ml TBE 1X
- Το διάλυμα αναδεύεται και θερμαίνεται για 2 min, μέχρι την πλήρη διάλυση αγαρόζης και την δημιουργία διαυγούς διαλύματος.
- Προσθήκη 10μl βρωμιούχου αιθιδίου (10mg/ml). Ανάδευση.
- Το διάλυμα μεταφέρεται σε ειδικό στατό ηλεκτροφόρησης όπου παραμένει μέχρι να σταθεροποιηθεί.
- Η πηκτή τοποθετείται στη συνέχεια στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία περιείχε 70 ml TBE 10× και 630 ml H<sub>2</sub>O.

Η διάρκεια ηλεκτροφόρησης αποτελεί 25-30 λεπτά, και το ηλεκτρικό πεδίο συνεχούς ρεύματος τάσης είναι 120V. Το παραπάνω πρωτόκολλο είναι στανταρισμένο και χρησιμοποιείται για όλες της ηλεκτροφορήσεις που έγιναν στην παρούσα μελέτη.

### 2.2.3.2 Αποτελέσματα οπτικοποίησης γενωμικού DNA με ηλεκτροφόρηση.

Για να προσδιορίσουμε αν διαδικασία απομόνωσης ήταν επιτυχής πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης.

Σε 8μl κάθε δείγματος DNA προστέθηκαν 3μl Loading buffer και αναδεύτηκαν. Στην συνέχεια, τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση φορτώθηκαν στα πηγαδάκια Μαζί με τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκε και ένας μάρτυρας μεγέθους τμημάτων DNA. Μετά τη λήξη της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε συσκευή εκπομπής UV ακτινοβολίας. Δείγματα τα οποία έδωσαν επιθυμητό αποτέλεσμα συγκεντρώθηκαν και κωδικοποιήθηκαν για περαιτέρω ανάλυση ( Πίν.1).

## 2.3 Δημιουργία βιβλιοθηκών 16S rRNA

Η βασική διαδικασία για παρασκευή DNA βιβλιοθηκών περιλαμβάνει πέντε βήματα, τα οποία εδώ περιγράφονται συνοπτικά:

- 1) Το πρώτο βήμα αφορά την επιλογή του DNA που πρόκειται να κλωνοποιηθεί. Στην περίπτωση μας πρόκειται για μια συντηρημένη αλληλουχία, που κωδικοποιεί την 16S υπομονάδα του ριβοσωμικού RNA στους προκαρυώτες.

- 2) Το δεύτερο βήμα περιλαμβάνει την ενίσχυση του γενετικού τόπου με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).
- 3) Το τρίτο βήμα αφορά την ένθεση του DNA στο φορέα. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση DNA λιγάσης, η οποία καταλύει την ομοιοπολική σύνδεση του υπό κλωνοποίηση τμήματος DNA με το φορέα.
- 4) Κατά το τέταρτο βήμα, οι φορείς με το ένθεμα εισάγονται σε έναν πληθυσμό βακτηρίων. Το βήμα αυτό ονομάζεται *μετασχηματισμός*.
- 5) Το πέμπτο βήμα είναι ο προσδιορισμός των αποικιών που περιέχουν την αλληλουχία που μας ενδιαφέρει και αποθήκευση τους.

### 2.3.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για την ενίσχυση του γενετικού τόπου του 16S rRNA χρησιμοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Η τεχνική PCR εκμεταλλεύεται τη ικανότητα της DNA πολυμεράσης να χρησιμοποιεί μονόκλωνο DNA ως εκμαγείο για την σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου. Ωστόσο, η χρήση οποιασδήποτε πολυμεράσης δεν είναι δυνατή στη PCR, καθώς η αντίδραση περιλαμβάνει στάδια με πολύ υψηλές θερμοκρασίες, που καταστρέφουν το ενζύμο. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιείται κυρίως Taq πολυμεράση (Taq pol) που προέρχεται από θερμοφιλο βακτήριο - *Thermus aquaticus*, στο οποίο οφείλει και το όνομα της. Στην παρόν μελέτη χρησιμοποιήσαμε Taq pol TAKARA (Ex-Taq), η οποία παρουσιάζει μεγαλύτερη πιστότητα αντιγραφής από κοινές Taq πολυμεράσες.

Όμως, καμία πολυμεράση δεν είναι ικανή να ξεκινήσει μόνη της την αντιγραφή, καθώς απαιτείται ένα μικρό τμήμα δίκλωνου DNA που θα λειτουργηθεί ως εκκινητήρας (primer). Επιλογή κατάλληλου ζεύγους primers είναι ιδιόκτητη για κάθε περίπτωση, καθώς εκκινητές έχουν δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA στόχου, το καθένα αντίστοιχα προς το ένα κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση.

Εκτός από την ειδική DNA πολυμεράση και ένα ζεύγος εναρκτήριων ολιγονουκλεοτιδίων για την αντίδραση απαιτείται και ένα σύνολο άλλων συμπαραγόντων, όπως δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) που συνιστούν τα δομικά υλικά των μορίων DNA,  $MgCl_2$ , το οποίο συμμετέχει στη διαδικασία υβριδισμού των εκκινητών και PCR Buffer που ορίζει το ιοντικό περιβάλλον (κυρίως το pH) της αντίδρασης στο βέλτιστο για την δράση της πολυμεράσης.

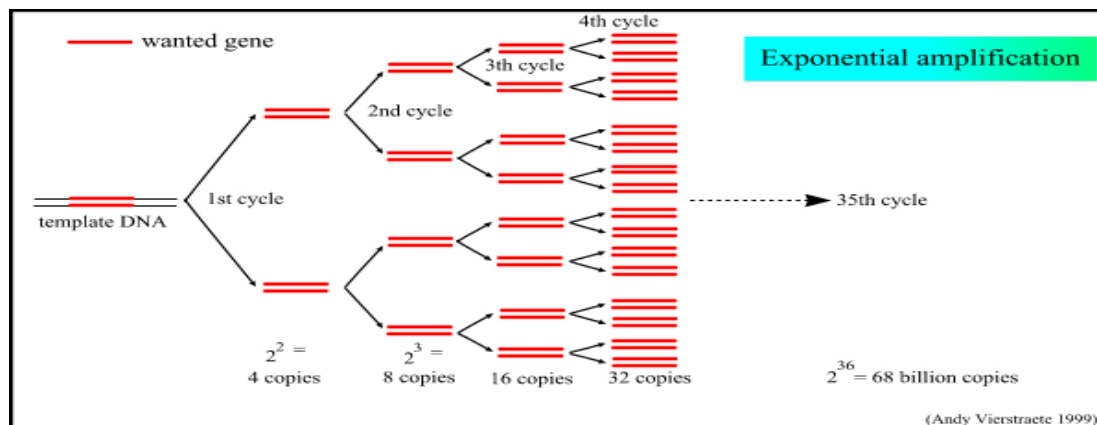
Για να παραχθεί το επιθυμητό προϊόν πρέπει ο κύκλος της αντιγραφής του DNA να επαναληφθεί πολλές φορές. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- *Αναδιάταξη*. Διαχωρισμός των δυο κλώνων με θέρμανση στους  $94^{\circ}C-95^{\circ}C$ .
- *Υβριδοποίηση*. Ψύξη του μίγματος στους  $50-65^{\circ}C$ , ώστε να υβριδοποιηθούν οι εκκινητές με τις αποδιαταγμένες αλυσίδες DNA.



- *Επέκταση*. Θέρμανση του μίγματος στους 72<sup>0</sup>C, που είναι βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της συγκεκριμένης πολυμεράσης, οπότε λαμβάνει χώρα η σύνθεση του DNA από τα 3'ελεύθερα άκρα των εκκινητών.

Η αντίδραση είναι εκθετική (Εικ.12). Ένα μόριο DNA δίνει, μετά από 30 επαναλήψεις της αντίδρασης, 2<sup>30</sup> (περίπου 10<sup>9</sup>) μόρια DNA.



**Εικ.12** Εκθετική ενίσχυση προϊόντος στην PCR

Για την ενίσχυση όλων των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν ένας "forward primer" ο fd1 και ένας "reverse primer" ο rP1 (Weisburg et.al.1991). Αυτοί οι εκκινητές είναι ειδικοί για το γενετικό τόπο του 16S rRNA, οποίος επιλέχτηκε επειδή, σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, είναι ο πιο συντηρημένος μεταξύ βακτηριακών στελεχών και επομένως ο πιο κατάλληλος για την ταυτοποίησή τους (Mazzon L. et.al., 2008; Garcia-Armisen et.al., 2010) Το μέγεθος του τμήματος που ενισχύθηκε ήταν της τάξης των 1500bp.

| Εκκινητές  | Αλληλουχίες                       | Ενισχυμένο τμήμα (bp) |
|------------|-----------------------------------|-----------------------|
| <b>fd1</b> | 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG- 3' | <b>1500</b>           |
| <b>rP1</b> | 5' ACG GTT ACC TTG TTA CGA CTT 3' |                       |

**Πιν.2** Εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25μl. Η πειραματική διαδικασία βασίστηκε στο δημοσίευμα του Tsiamis G. et.al., (2008). Ποσότητες ανά αντίδραση PCR αναγράφονται στο πίνακα 3.

| Αντιδραστήρια           | Αρχικές συγκεντρώσεις           | Τελικές συγκεντρώσεις | Συγκεντρώσεις ανά αντίδραση |
|-------------------------|---------------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| <b>PCR Buffer</b>       | 10X                             | 1X                    | 2,5 μl                      |
| <b>dNTPs</b>            | 2,5mM                           | 250μM                 | 2,5 μl                      |
| <b>fd1</b>              | 24,4μM                          | 0,4μM                 | 0,4 μl                      |
| <b>rP1</b>              | 27,3μM                          | 0,4μM                 | 0,36 μl                     |
| <b>Taq pol</b>          | 5u/μl                           | 1u                    | 0,2 μl                      |
| <b>Υπόστρωμα DNA</b>    |                                 |                       | 3μl                         |
| <b>ddH<sub>2</sub>O</b> | Συμπλήρωση μέχρι το τελικό όγκο |                       |                             |

**Πιν.3** Συγκεντρώσεις της αντίδρασης PCR

**ΣΗΜΕΙΩΣΗ:** Στον PCR Buffer της Taq pol TAKARA ήδη υπάρχει  $MgCl_2$ , οπότε δεν απαιτείται επιπλέον προσθήκη.

Σε κάθε αντίδραση PCR είναι απαραίτητη η παρουσία ενός αρνητικού και ενός θετικού μάρτυρα. Ο αρνητικός μάρτυρας (negative control) δεν περιέχει DNA, οπότε σε περίπτωση εμφάνισης προϊόντος αποτελεί σήμα μόλυνσης της αντίδρασης. Θετικός μάρτυρας (positive control) περιέχει DNA ενός γνωστού βακτηρίου (στην προκειμένη περίπτωση του *Pseudomonas entomofila*) και αναμένεται να δώσει προϊόν στις 1500bp.

Προετοιμασία του positive control γίνεται ως εξής:

- Προσθήκη 20  $\mu$ l SDS-NaOH σε ένα eppendrof
- Από καλλιέργεια της *Ps. ent.* παίρνουμε μικρή ποσότητα κύτταρων από μια αποικία και τα τοποθετούμε σε eppendrof
- Επώαση στο υδατόλουτρο ( $95^{\circ}C$ ) για 15 λεπτά.
- Προσθήκη 180 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O. Ανάμιξη με πιπέτα.
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στους 4000rpm
- Δείγμα διατηρείται στους  $-20^{\circ}C$ , και παραμένει λειτουργικό για χρονικό διάστημα των δυο εβδομάδων.

Καθώς μελετάμε εντερική μικροχλωρίδα του εντόμου με σκοπό την ταυτοποίηση της μικροβιακής κοινότητας, το μεταγενωμικό DNA πρέπει να καλύπτει όσο το δυνατόν περισσότερα βακτηριακά είδη. Αυτό επιτυγχάνεται με επαναληπτικές PCR, όπου θερμοκρασία υβριδοποίησης μειώνεται σταδιακά. Τεχνική αυτή ονομάζεται Gradient PCR και μας επιτρέπει να "πιάσουμε" όλους τους βακτηριακούς πληθυσμούς, που σε υψηλότερη θερμοκρασία, λόγω μικρής διαφοράς στην 16S αλληλουχία, θα μπορούσαν να μη ενισχυθούν. Gradient PCR έγινε για 5 βαθμούς θερμοκρασίας.

Τα στάδια της αντίδρασης ήταν

- Αρχική αναδιάταξη  $95^{\circ}C$  για 5 λεπτά
  - Αποδιάταξη  $94^{\circ}C$  για 1 λεπτό
  - Υβριδοποίηση
    - βιολογικό μήλο  $55-50^{\circ}C$
    - συμβατικό μήλο  $56-50^{\circ}C$
    - βιολογικό αγλάδι  $57-52^{\circ}C$
  - Επέκταση  $72^{\circ}C$  για 2 λεπτά
  - Τελική επέκταση  $72^{\circ}C$  για 10 λεπτά.
- } 30 κύκλοι

### 2.3.2 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR

Για να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα της αντίδρασης PCR, δηλαδή η ενίσχυση του επιθυμητού γενετικού τύπου μεγέθους 1500bp, έγινε ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αγαρόζης, οποία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με παράγραφο 2.2.3.1

Ποσότητες ηλεκτροφορούμενου DNA ήταν - 6 $\mu$ l για negative control, και 4  $\mu$ l για τα υπόλοιπα PCR προϊόντα. Πριν την φόρτωση δειγμάτων σε καθένα από αυτά προστεθήκαν 2 $\mu$ l loading buffer και αναδεύτηκαν. Μετά την παρατήρηση αποτελεσμάτων ηλεκτροφόρησης σε μηχανήμα UV, τα δείγματα που έδωσαν επιθυμητό αποτέλεσμα προσδιορίστηκαν για καθαρισμό.

### 2.3.3 Καθαρισμός DNA προϊόντος

Ωστε να απομακρυνθούν οι πιθανοί αναστολείς των επόμενων βημάτων κλωνοποίησης, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός PCR προϊόντων. Για συμβατικό (CA) και βιολογικό μήλο (BA1) καθαρισμός έγινε απευθείας από το μίγμα PCR, όμως για βιολογικό μήλο (BA2) και βιολογικό αγλάδι (BP) χρησιμοποιήθηκε απομόνωση από πήκτωμα αγαρόζης, καθώς υπήρξαν παραπροϊόντα (μεγέθους περίπου 500bp).

Καθαρισμός DNA απευθείας από PCR product έγινε με την χρήση NucleoSpin Extract II Kit της εταιρίας Macheray-Nagel.

Αρχική ποσότητα PCR προϊόντων ήταν για BA1 => 80μl  
για CA => 120μl

- Αρχικά στο μίγμα προστέθηκε Buffer NT. Ποσότητα του πρέπει να είναι δυο φορές μεγαλύτερη από αυτήν του προς καθαρισμό δείγματος. Έτσι για BA1 προστέθηκαν 160μl και για CA - 240μl, αντιστοίχως.
- Ειδικές στήλες ( Nucleo Spin ExtrastII Column) τοποθετήθηκαν σε στήλες συλλογής (collection tube) και ακλούθησε φόρτωση δειγμάτων.
- Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στους 12.000rpm, προκειμένου να συγκρατηθεί το DNA και τα υπόλοιπα συστατικά να καταβυθιστούν. Απόχυση του υπερκειμένου.
- Για την πλύση των στηλών, προστέθηκαν 700μl Buffer NT3. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στους 12.000rpm.
- Προκειμένου να απομακρυνθεί πλήρως το Buffer NT3, που περιέχει αιθανόλη, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στους 12.000rpm για 2 λεπτά.
- Οι ειδικές στήλες τοποθετήθηκαν ακολούθως σε αποστειρωμένα erpendorfs των 1,5ml
- Έκλουση έγινε με προσθήκη του Buffer NE( 30μl για BA1, 40μl για CA) και επώαση στη θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό. Τελική φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στους 12.000rpm, μετά από την οποία έχουμε 60μl καθαρισμένου DNA από BA1 και 80μl από CA.

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

Απομόνωση και καθαρισμός DNA από πήκτη αγαρόζης με χρήση QIAquick Gel Extraction Kit της Qiagen. Το πρωτόκολλο βασίζεται σε χρήση αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξης που λειώνει στους 50°C.

Ολόκληρη η ποσότητα του PCR που διαθέταμε (20μl από κάθε annealing temperature) ηλεκτροφορήθηκε και από το πήκτωμα αγαρόζης, με χρήση νυστεριού, έγινε τομή της ζώνης που αντιστοιχούσε στο προϊόν (1500bp). Στην συνέχεια ζώνες τοποθετήθηκαν σε eppendorfs των 1,5ml και ζυγίστηκαν. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε παρουσιάζεται συνοπτικά παρακάτω.

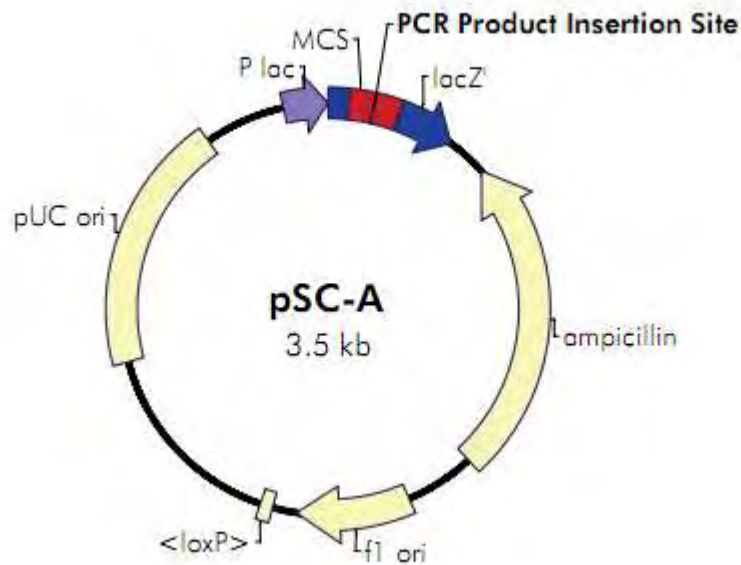
- Προσθήκη Buffer QG (~3μl/mg)
- Επώση στους 50°C για 10 λεπτά (ανάδευση ανά 2-3min στο vortex),κατόπιν ελέγχεται το χρώμα του διαλύματος, το οποίο πρέπει να έχει κίτρινη απόχρωση.
- "Φόρτωση" δειγμάτων σε ειδικές στήλες (QIAquick Column), φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στους 12.000rpm.Απομάκρυνση υπερκειμένου.
- Προσθήκη 500μl Buffer QG, φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στους 12.000rpm. Με αυτό το βήμα επιτυγχάνεται απομάκρυνση υπολειμμάτων αγαρόζης.
- Προσθήκη 750μl Buffer PE,Φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στους 12.000rpm. Απόχυση του υπερκειμένου.
- Επανάληψη φυγοκέντρωσης 1 λεπτό στους 12.000rpm.
- Τοποθέτηση των ειδικών στήλων σε αποστειρωμένα eppendorfs των 1,5ml
- Έκλυση με Buffer EB σε τελικό όγκο 30μl. Επώση στη θερμοκρασία δοματίου για 1 λεπτό και φυγοκέντρωση στους 12.000rpm για 1 λεπτό.

Όλα τα δείγματα αποθηκεύθηκαν στους -20°C.

### 2.3.4 Κλωνοποίηση με το Kit της Strata Clone

Η μοριακή κλωνοποίηση είναι διαδικασία απομόνωσης, αναπαραγωγής και πολλαπλασιασμού ενός μορίου DNA. Το κλειδί στην υπόθεση της κλωνοποίησης είναι η ένωση (σύνδεση) του γονιδίου με έναν φορέα-μόριο DNA. Οι περισσότεροι φορείς κλωνοποίησης που χρησιμοποιούνται με τους μικροοργανισμούς είναι εξωχρωμοσωμικά, αυτόνομα διπλασιαζόμενα κυκλικά τμήματα DNA που ονομάζονται πλασμίδια. Τα πλασμίδια αποτελούν, γενικά, ένα μικρό μόνο μέρος του ολικού κυτταρικού DNA του ξενιστή, αλλά μπορούν να διαχωριστούν εύκολα βάσει του μικρού τους μεγέθους από το χρωμοσωμικό DNA, το οποίο είναι μεγάλο και κατακρημνίζεται ως ίζημα κατά τη φυγοκέντρωση. Το πλασμίδιο που χρησιμοποιήσαμε ονομάζεται **pSC-A** και έχει μέγεθος 3.5kb.

Στο χάρτη του πλασμιδίου( Εικ.13) διακρίνονται εξής περιοχές



**Εικ.13** Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα **pSC-A**

- 1) *Αφετηρία αντιγραφής ori* - σημείο από τον οποίο αρχίζει η αντιγραφή του πλασμιδιακού DNA, διασφαλίζοντας το πολλαπλασιασμό στο κύτταρο ξενιστή.
- 2) *Γονίδιο Amp<sup>R</sup>* (ampicillin resistance) που προσφέρει αντίσταση κατά του αντιβιοτικού αμπικιλίνη.
- 3) *Γονίδιο LacZ*, που κωδικοποιεί την β-γαλακτοσιδάση και ο προαγωγέας του που επιτρέπει την έκφραση του lacZ.
- 4) Μέσα στο γονίδιο LacZ βρίσκεται η *αλληλουχία πολλαπλής σύνδεσης* (MCS, multiple cloning site), η οποία περιέχει τις θέσεις τομής για πολλές ενδονουκλεάσεις περιορισμού.
- 6) Η *περιοχή εισαγωγής του ξένου DNA* βρίσκεται μέσα στη πολλαπλή αλληλουχία.

#### 2.3.4.1 Επιλογή ανασυνδυασμένων βακτηρίων

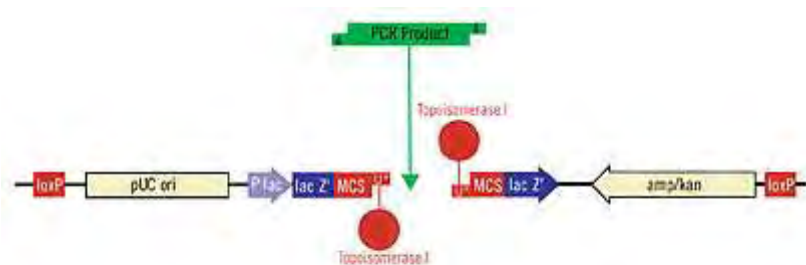
Η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας του μετασχηματισμού είναι πολλή χαμηλή και έτσι είναι απαραίτητη η παρουσία των δεικτών επιλογής.

- Το γονίδιο αντίστασης στην αμπικιλίνη (Amp<sup>R</sup>), οποίο εκφράζεται από το πλασμίδιο, δίνει την δυνατότητα καλλιέργειας βακτηρίων παρουσία αμπικιλίνης στο θρεπτικό μέσο, επομένως βακτήρια τα οποία δεν πήραν το πλασμίδιο δεν θα επιζήσουν.
- Το γονίδιο LacZ επιτρέπει την επιλογή των βακτηρίων που περιέχουν ανασυνδυασμένα πλασμίδια ως εξής: η πολλαπλή αλληλουχία περιέχεται στο LacZ με αποτέλεσμα όταν εισάγεται το ξένο DNA στο πλασμίδιο να διακόπτεται η αλληλουχία του lacZ και να μην μπορεί να σχηματιστεί β-γαλακτοσιδάση. Αν ληφθή υπόψη ότι β-γαλακτοσιδάση καταλύει τη μετατροπή της άχρωμης ουσίας x-gal σε μπλε ίζημα, τότε είναι προφανές ότι κατά την καλλιέργεια βακτηρίων σε τρυβλία παρουσία x-gal οι αποικίες που περιέχουν άθικτα πλασμίδια θα χρωματιστούν μπλε, ενώ οι αποικίες που περιέχουν πλασμίδια με ξένο DNA θα είναι άχρωμες.

### 2.3.4.2 Στρατηγική κλωνοποίησης.

Η στρατηγική του Strata Clone βασίζεται σε συνδυασμένη δράση της τοποϊσομεράσης I από ιό Vaccinia και ρεκομπινάσης Cre από βακτηριοφάγο P1. Strata Clone Vector Mix περιέχει 2 βραχίονες DNA με τοποϊσομεράση στον ένα άκρο και περιοχή loxP στο άλλο.

(Εικ.14) Το άκρο κατειλημμένο από ενζυμο διαθέτει πολύ-U ουρά που είναι συμπληρωματική προς 3' πολυ-A ουρά του PCR προϊόντος. Η αδενίνης στο 3'άκρο προστίθενται από Taq πολυμεράση. Τα συμπληρωματικά αυτά άκρα ενώνονται από τοποϊσομεράση I που έχει ιδιότητες λιγάσης.



Εικ.14 Αντίδραση σύνδεσης (ligation) με StrataClone

Μετά την αντίδραση σύνδεσης (ligation) γραμμικό μόριο DNA εισάγεται σε ειδική σειρά δεκτικών κυττάρων (competent cells), τα οποία είναι σχεδιασμένα για να εκφράζουν ρεκομπινάση Cre. Το ενζυμο επάγει τον ανασυνδυασμό μεταξύ θέσεων loxP, ως αποτέλεσμα την παραγωγή κυκλικού μορίου DNA. Η εισαγωγή DNA επιτυγχάνεται με θερμικό σοκ (heat-shock), κατά τον οποίο εκφράζεται μια ομάδα ειδικών πρωτεϊνών, οι οποίες ονομάζονται πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat shock proteins, hsp) και είναι εύρητα γνωστές ως "μοριακή συνοδοί" (molecular chaperons). Ταυτόχρονα, το σοκ αυξάνει την διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης με αποτέλεσμα αρκετά από τα κύτταρα δείκτες να δέχονται το ξένο DNA.

### 2.3.4.3 Πρωτόκολλο κλωνοποίησης με Strata Clone.

Το μίγμα της αντίδρασης σύνδεσης (ligation reaction) παρασκευάστηκε ως εξής

- Έγινε αραιώση του PCR προϊόντος - 2μl DNA προστέθηκαν σε εppendrofs με 18 μl ddH<sub>2</sub>O. Ανάδευση.
- Σε ένα άλλο αποστειρωμένο εppendrof προστέθηκαν
  - 3μl StrataClone Cloning Buffer
  - 2μl από αραιωμένο PCR προϊόν
  - 1μl StrataClone Vector Mix
- Ακλούθησε απαλή ανάδευση με πιπετάρισμα και το μίγμα επώαστηκε στη θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Κατόπιν το μίγμα τοποθετήθηκε σε πάγο.
- Για κάθε μίγμα αντίδρασης ξεπαγώσαμε από ένα σωληνάριο με StrataClone competent cells, που κανονικά διατηρούνται στους -80°C.
- Στη συνέχεια προσθέσαμε 2μl από μίγμα κλωνοποίησης σε δεκτικά κύτταρα. Ανακατεύσαμε απαλά, χωρίς πεπιτάρισμα.
- Το μίγμα μετασχηματισμού αφήσαμε στο πάγο για 20 λεπτά. Κατά την διάρκεια της επώασης, LB broth θερμάνθηκε στους 42°C.
- Θερμικό σοκ στους 42°C για 45sec στο υδατόλουτρο.
- Επώαση στο πάγο για 2 λεπτά.

- Τέλος, έγινε προσθήκη 250μl LB broth στο μίγμα και ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στους 37<sup>0</sup>C. Σε αυτό το στάδιο τα κύτταρα αντιγράφονται και αρχίζει η έκφραση των γονιδίων ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη.

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας μετασχηματισμού, τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία Petri (από 50μl ανά πιάτο καλλιέργειας), οποία στο θρεπτικό τους μέσο περιείχαν αμπικιλίνη και X-Gal. Στερεές καλλιέργειες διατηρήθηκαν στο επωαστήριο στους 37<sup>0</sup>C για 18 ώρες στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στους 4<sup>0</sup>C.

### 2.3.5 Δημιουργία 16S DNAβιβλιοθηκών.

Κάθε αρχικό βακτηριακό κύτταρο που μετασχηματίστηκε με τον ανασυνδυασμένο φορέα θα περιέχει ένα διαφορετικό τμήμα της 16S rRNA αλληλουχίας. Οι απόγονοι κάθε τέτοιου βακτηρίου θα κληρονομήσουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο και θα σχηματίσουν μια μικρή αποικία πάνω σε τρυβλίο, η οποία περιλαμβάνει μόνο έναν κλώνο, που προήρθε από κύτταρο πρόγονο. Ένα τέτοιο πλασμίδιο περιέχει ένα *γενωμικό DNA κλώνο* και ολόκληρη η συλλογή των πλασμιδίων αποτελεί τη *γενωμική DNA βιβλιοθήκη*.

Η παρασκευή μιας DNA βιβλιοθήκης αποτελείται από εξής βήματα

- Ως θρεπτικό μέσο χρησιμοποιείται LB-γλυκερόλη 20%, όπου προστίθεται αμπικιλίνη (100ng/ml) για την αποφυγή επιμόλυνσης από άλλα βακτηριακά στελέχη.
- Σε πιάτα Tissue Culture microtipe plates-96 προστίθενται 200μl θρεπτικού μέσου σε κάθε πηγαδάκι.
- Επιλέγονται άσπρες, διακριτές αποικίες και μεταφέρονται στο plate-96. Κάθε πηγαδάκι πρέπει να περιέχει μια μόνο βακτηριακή αποικία, που αντιστοιχεί σε ένα γενωμικό DNA κλώνο.
- Όλη η παραπάνω διαδικασία λαμβάνει χώρα σε συσκευή κάθετης νηματικής ροής για εξασφάλιση πλήρως αποστειρωμένων συνθηκών.
- Ακολουθεί επώαση στους 37<sup>0</sup>C για 18 ώρες, και στην συνέχεια τα microtipe plates-96 αποθηκεύονται στους -80<sup>0</sup>C.

### 2.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Καθώς το ενδιαφέρον παρουσίαζε η συγκριτική μελέτη μικροχλωρίδας της *Cydia pomonella* από συμβατική και βιολογική καλλιέργεια μήλου, έγινε απομόνωση πλασμιδιακού DNA από αντίστοιχες βιβλιοθήκες, με σκοπό την αλληλούχιση και ταυτοποίηση συμβατικών βακτηρίων.

Εφ' όσον το πλασμιδιακό DNA αποτελεί μόνο ένα μικρό κομμάτι του ολικού γενωμικού DNA του κυττάρου-δείκτη, το πρώτο βήμα της διαδικασίας είναι η επανακαλλιέργεια κυττάρων σε μεγαλύτερο όγκο:

- Σε γυάλινα δοχεία προσθέτουμε από 5 ml LB Broth
- Μετά την αποστείρωση, αφήνουμε τα δοχεία να κρυώσουν
- Προσθέτουμε 5ml αμπεκιλλίνης(100μg/ml)
- Ξεπαγώνουμε τα κύτταρα της DNA βιβλιοθήκης και προσθέτουμε 6ml από κάθε DNA κλώνο σε αντίστοιχο μπουκαλάκι.
- Αφήνουμε τα κύτταρα να καλλιεργηθούν για 18 ώρες στους 37<sup>0</sup>C σε 200 στροφές.

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA έγινε με NucleoSpin Plasmid Kit Macherey-Nagel. Λειτουργία του Kit βασίζεται σε αλκαλική λύση (alkaline lysis), που συνιστάται στη αποδιάταξη, παρουσία SDS και NaOH, του χρωμοσωμικού DNA και των πρωτεϊνών που το συνοδεύουν. Περιληπτικά το πρωτόκολλο αναγράφεται παρακάτω.

- 1,5ml από την καλλιέργεια προσθέτονται σε αποστειρωμένο eppendorf (2ml). Φυγοκέντρωση για 30 δευτερόλεπτα στους 12.000rpm. Απομάκρυνση όσο το δυνατόν περισσότερου υπερκείμενου.
- Επανάληψη προηγούμενου βήματος.
- Προσθήκη 250 μl Buffer A1. Επαναδιάλυση του ιζήματος με Vortex.
- Προσθήκη 250μl Buffer A2. Απαλό ανακάτεμα, για αποφυγή διάσπασης του γενωμικού DNA. Στην συνέχεια ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- Προσθήκη 300μl Buffer A3. Απαλό ανακάτεμα.
- Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στους 12.000 rpm.
- Μεταφορά του υπερκείμενου( με ανώτατο όριο των 750μl) σε ειδικές στήλες( NucleoSpin Plasmid Columns) οι οποίες έχουν εγκαίρως τοποθετηθεί σε στήλες συλλογής.
- Φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στους 12.000 rpm. Απομάκρυνση υπερκείμενου από την στήλη συλλογής.
- Έκπλυση με 500μl Buffer AW, που έχει υποστεί θέρμανση στους 50<sup>0</sup>C. Φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στους 12.000 rpm
- Η έκπλυση συνεχίζεται με 600μl Buffer A4, το οποίο περιέχει αιθανόλη. Φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στους 12.000 rpm. Απομάκρυνση υπερκείμενου από την στήλη συλλογής.
- Επανάληψη φυγοκέντρωσης για 2 λεπτά στους 12.000 rpm
- Οι ειδικές στήλες τοποθετούνται σε αποστειρωμένα eppendrofs και ακολουθεί έκλυση του πλασμιδιακού DNA σε 40μl Buffer AE. Στην συνέχεια τα δείγματα επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό και φυγοκεντρώνονται για 1 λεπτό στους 12.000rpm.

#### **2.4.1 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πλασμιδιακού DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης.**

Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα βρωμιούχου αιθιδίου να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και να φθορίζει όταν ακτινοβολείται με UV. Συγκρίνοντας τον φθορισμό του άγνωστου δείγματος με τον φθορισμό DNA



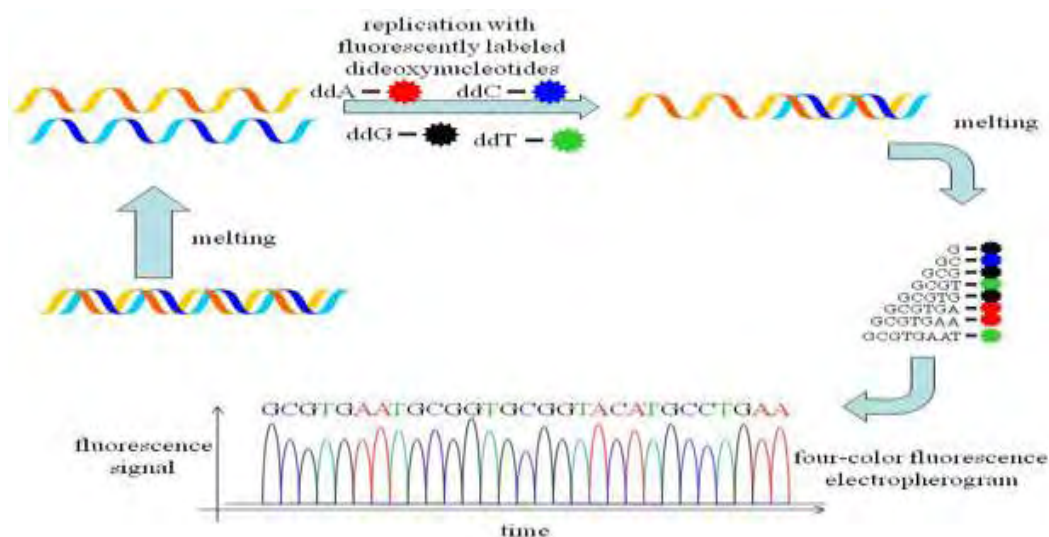
γνωστής συγκέντρωσης μπορεί να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του άγνωστου DNA.

Διαδικασία παρασκευής της πήκτης αгарόζης και συνθήκες ηλεκτροφόρησης αναγράφονται στο παράγραφο 2.2.3.1. Από το απομονωμένο πλασμιδιακό DNA επιλέξαμε τυχαία 35 δείγματα . 2μl από κάθε δείγμα αναμιχτήκαν με 2μl loading buffer και ηλεκτροφορήθηκαν παρουσία ενός μάρτυρα μοριακού μεγέθους τμημάτων DNA.

## 2.5 Αλληλούχιση κατά Sanger και ανάλυση δεδομένων.

Οι πλασμιδιακή κλωνοί, αφού υπέστησαν κατάλληλη προετοιμασία, στάλθηκαν για αλληλούχιση στο Αγρινιο, σε συνεργασία με το κ. Τσίαμη και τον κ. Μπούρτζη, με σκοπό τον ακριβή προσδιορισμό της αλληλουχίας του γενετικού τόπου του 16S rRNA κάθε βακτηριακού στελέχους.

Η ακριβής νουκλεοτιδική αλληλουχία ενός κλωνοποιημένου τμήματος DNA μπορεί να προσδιοριστεί άμεσα. Η πιο αποτελεσματική τεχνική, μέθοδος Sanger (Εικ.15), αποτελεί μια ενζυμική προσέγγιση. Το κλειδί σ'αυτήν την μέθοδο είναι η χρήση των διδεοξυριβονουκλεοζιτών, όπου η ομάδα 3'-OH της δεοξυριβόζης που υπάρχει στα κανονικά νουκλεοτίδια λείπει. Όταν ένα τέτοιο τροποποιημένο νουκλεοτίδιο ενσωματώνεται σε μια αλυσίδα DNA, παρεμποδίζει την προσθήκη του επόμενου νουκλεοτιδίου. Το τελικό αποτέλεσμα είναι μια κλίμακα ζωνών, από την οποία μπορεί να αναγνωστεί άμεσα η αλληλουχία του DNA.



Εικ.15 Ενζυμική μέθοδος ανάλυσης της αλληλουχίας DNA

Ο αλγόριθμος **BLAST** (*Basic Local Alignment Search Tool*) χρησιμοποιήθηκε για την αναζήτηση στη βάση δεδομένων του GenBank (<http://vivo.cornell.edu/display/individual881>), ώστε να βρεθούν οι αλληλουχίες με την μεγαλύτερη ομολογία (ομοιότητα), με τελικό σκοπό την ταυτοποίηση, εάν αυτή

είναι δυνατή, των απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών σε κάποιο γνωστό είδος ή γένος. Επιλέχτηκε **BLAST with bacterial genomes** (blastn) και μαζί με τα αποτελέσματα (**sequences producing significant alignments**) εμφανίστηκαν ταυτόχρονα και οι τιμές score και E value (“αναμενόμενη τιμή”). Πρέπει να σημειωθεί, ότι η τιμή ομοιότητας πρέπει να είναι τουλάχιστον 99%, ώστε οι αλληλουχίες να θεωρηθούν ότι ανήκουν στο ίδιο είδος (ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους.) και τουλάχιστον 97% ώστε να ανήκουν στο ίδιο γένος.

Επίσης, για ταξινόμηση των αλληλουχιών χρησιμοποιήσαμε ανάλυση με το Ribosomal Database Project (RDP, <http://rdp.cme.msu.edu/>), μια βάση δεδομένων, η οποία περιέχει αλληλουχίες της μικρής υπομονάδας 16S rRNA των βακτηρίων και αρχαίων. Από τα διαθέσιμα εργαλεία ανάλυσης επιλέξαμε το CLASSIFIER και το SEQMATCH.

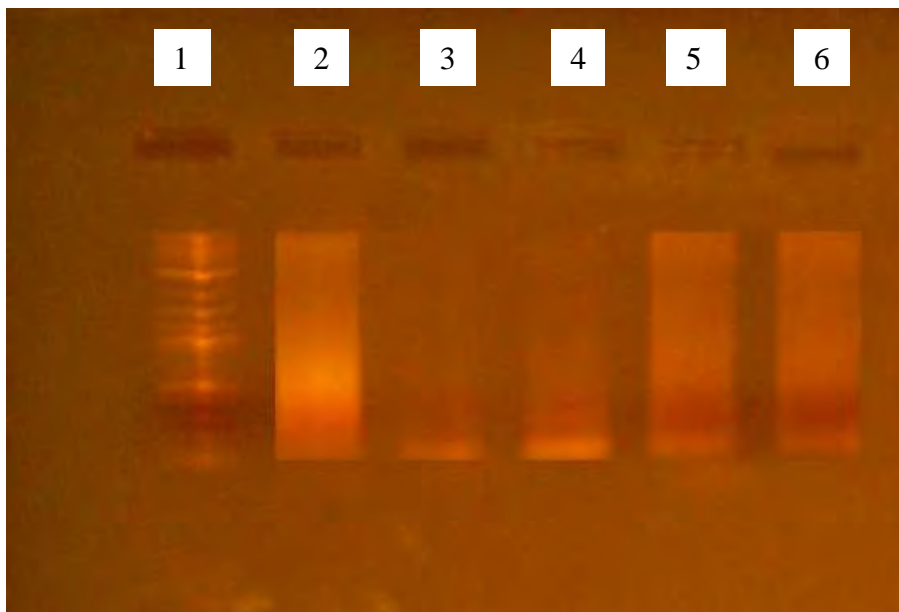
## *ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ*

---

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της μικροχλωρίδας σε άτομα της καρπόκαψας των μήλων, της *Cydia pomonella*, μέσω δημιουργίας 16S rRNA βιβλιοθηκών. Τα ενήλικα άτομα από φυσικό πληθυσμό της καρπόκαψας συλλέχτηκαν από δυο διαφορετικές περιοχές στη περιφέρεια Θεσσαλίας ( Αγιά - μήλα και Βελεστίνο - αχλάδια). Οι βιβλιοθήκες 16S rRNA παρασκευάστηκαν για τους δυο ξενιστές (μήλο και αχλάδι). Για αλληλούχιση προσδιορίστηκαν έντομα από δυο τύπους αγρών της μηλιάς ( βιολογικό και συμβατικό). Τα άτομα με τις καλύτερης ποιότητας αλληλουχίες αναλύθηκαν και προσδιορίστηκαν σε επίπεδο γένους ή/και είδους (οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν είναι διαθέσιμα στο Παράρτ-Ι). Δεδομένου ότι η βακτηριακή μικροχλωρίδα μεταβάλλεται ανάλογα με περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως ο τύπος διατροφής του εντόμου (Chandler et.al.,2008), το ενδιαφέρον παρουσίαζε η διαπίστωση της διαφοράς στη ποικιλότητα μεταξύ της βακτηριακής κοινότητας σε έντομα που είχαν αναπτυχθεί παρουσία και απουσία εντομοκτόνων ουσιών.

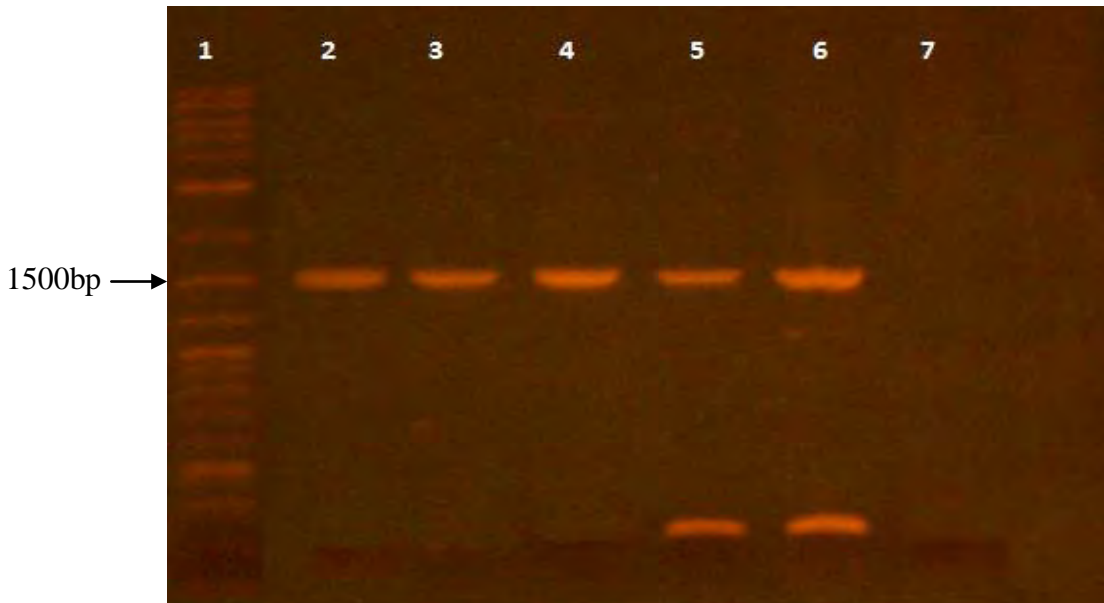
### 3.1 Δημιουργία 16S rRNA βιβλιοθηκών για ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών.

Τα ενήλικα άτομα της καρπόκαψας , τα οποία συλλέχτηκαν με βοήθεια φερομονικών παγίδων και αποθηκεύτηκαν σε 96% αιθανόλη, ομογενοποιήθηκαν και έγινε απομόνωση του ολικού τους DNA. Για να διαπιστωθεί εάν η απομόνωση ήταν επιτυχής πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση δειγμάτων σε πήκτη αγαρόζης. Το αποτέλεσμα που πήραμε μετά την παρατήρηση του πηκτώματος σε λάμπα υπεριώδους φωτός φαίνεται στην εικόνα 16. Τα δείγματα δεν έδειξαν μια ξεχωριστή μπάνα, αντιθέτως παρουσιάστηκε ένα smear κατά μήκος του ηλεκτροφορούμενου DNA. Τέτοιο αποτέλεσμα ήταν αναμενόμενο, καθώς στο ολικό DNA του εντόμου συμπεριλαμβάνονται τμήματα διαφορετικού μεγέθους, που αποτελούν κομμάτια γενωμικού, μιτοχονδριακού, καθώς και του DNA των συμβιωτών μικροοργανισμών (μυκήτων και βακτηρίων). Τα δείγματα που έδωσαν το καλύτερο αποτέλεσμα (πιο έντονο φθορισμό) επιλέχτηκαν ως τα πιο κατάλληλα για περαιτέρω ανάλυση (πινάκας1).



**Εικ.16** Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης ολικού DNA των εντόμων. Από αριστερά προς δεξιά πηγαδάκια περιέχουν: 1 - **Marker**, 2 έως 6 - 8μl DNA από τα οποία 2,5,6 περιλαμβάνουν DNA των ατόμων **BAI, CA, BP** αντίστοιχα. Το 3 και 4 δεν χρησιμοποιήθηκαν καθώς δεν έδειξαν να έχουν αρκετή ποσότητα DNA.

Η δημιουργία των βιβλιοθηκών 16S rRNA βασίστηκε αρχικά στην ενίσχυση του γενετικού τόπου, που κωδικοποιεί 16S υπομονάδα του ριβοσώματος, με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Ωστε να επιτευχθεί η κάλυψη όσο το δυνατόν περισσότερων βακτηριακών ειδών PCR πραγματοποιήθηκε σε 5 διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδισμού (Gradient PCR). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ενισχύουν το 16S rRNA γονίδιο σε όλα τα βακτήρια, και το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος υπολογίζεται στους 1500bp. Στη παρακάτω εικόνα (Εικ.17) παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποια από τα προϊόντα που προέκυψαν ανάμεσα στο σύνολο των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης.



**Εικ.17** Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR. Τα πηγαδάκια περιέχουν: 1 - Marker, 2- Positive control, 3 – BA1, 4 – BA2, 5 – CA, 6 – BP, 7 – Negative control. Ποσότητα ηλεκτροφορούμενου DNA ήταν 4μl. Δείγματα 5,6 εμφανίζουν παραπροϊόντα.

Για εξακρίβωση των αποτελεσμάτων της αντίδρασης μαζί με τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκε ένας μάρτυρας μοριακού βάρους, καθώς και ένας θετικός μάρτυρας που περιείχε DNA ενός γνωστού βακτηρίου - *Ps.entomophila*. Επίσης στο τελευταίο πηγαδάκι "φορτώθηκε" το δείγμα που δεν περιείχε DNA-μήτρα (negative control), οπότε σε περίπτωση εμφάνισης προϊόντος θα αποτελούσε ένδειξη επιμόλυνσης της αντίδρασης.

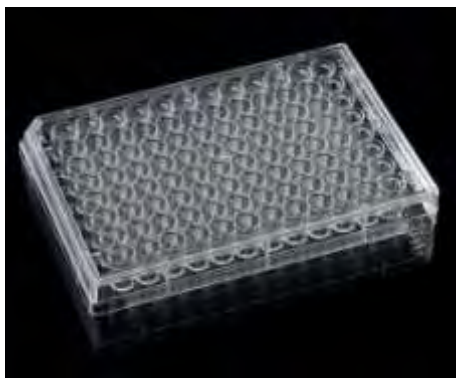
Ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων από τα υπόλοιπα συστατικά της αντίδρασης PCR και στη συνέχεια τα δείγματα κλωνοποιήθηκαν σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα και μεταφέρθηκαν σε δεκτικά κύτταρα μέσω θερμικού σοκ (heat-shock). Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, μετασηματισμένα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο που περιείχαν αμπικιλίνη (100mg/ml) και X-Gal (40mg/ml), και έμειναν στο επωαστήριο στους 37°C

για 18 ώρες. Αφ' όσον έχει ολοκληρωθεί η ανάπτυξη των βακτηρίων, επιλέχθηκαν εκείνα που περιείχαν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Η επιλογή βασίζεται στην ικανότητα β-γαλακτοσιδάσης, οποία



**Εικ.18** Καλλιέργεια μετασηματισμένων κυττάρων παρουσία X-Gal στο θρεπτικό μέσο. Κύτταρα, που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, είναι άσπρα.

κωδικοποιείται από γονίδιο LacZ εβρισκόμενο στο πλασμίδιο, να μετατρέπει την άχρωμη ουσία x-gal σε μπλε ίζημα. Με εισαγωγή του ξένου DNA στο πλασμίδιο η αλληλουχία του LacZ διακόπτεται με αποτέλεσμα να μην μπορεί να σχηματιστεί β-γαλακτοσιδάση. Δεδομένου αυτών, είναι προφανές πως κατά την καλλιέργεια βακτηρίων σε τρυβλία παρουσία x-gal οι αποικίες που περιέχουν άθικτα πλασμίδια θα χρωματιστούν μπλε, ενώ οι αποικίες που περιέχουν πλασμίδιο με το ξένο DNA θα είναι άχρωμες (Εικ.18)



**Εικ.19** Πιάτο καλλιέργειας (Tissue Culture testplate-96), που χρησιμοποιείται για δημιουργία DNA βιβλιοθηκών.

Διαλέγονται άσπρες, διακριτές αποικίες, καθεμία από τις οποίες περιλαμβάνει μόνο έναν γενωμικό κλώνο, και τοποθετούνται σε Tissue Culture testplate-96 (Εικ.19), παρουσία LB-γλυκερόλης (20%) και αμικικιλίνης (100mg/ml).

Οι βιβλιοθήκες 16S rRNA αποθηκεύονται στους  $-80^{\circ}\text{C}$  και μπορούν μελλοντικά να χρησιμοποιηθούν για απομόνωση επιθυμητών κλώνων και αλληλούχηση τους για προσδιορισμό της ακριβής αλληλουχίας. Στο

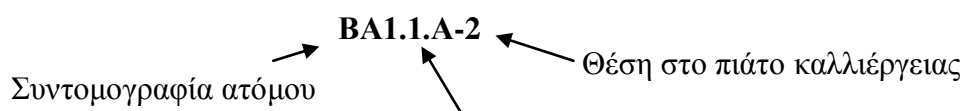
παρακάτω πίνακα (Πιν.4) αναγράφονται DNA βιβλιοθήκες που δημιουργήσαμε για κάθε άτομο της καρπόκαψας, καθώς και ο τελικός αριθμός κλώνων που διαθέτουμε. Συνολικά έχουν παρασκευαστεί 3 16S rRNA βιβλιοθήκες με πάνω από 1000 πλασμιδιακούς κλώνους για άτομα συμβατικής και βιολογικής καλλιέργειας μήλου και βιολογικής καλλιέργειας

αχλαδιού.

| Άτομα της <i>Cydia pomonella</i> | Συνομογραφία | Θερμοκρασία υβριδισμού  | Αριθμός πιάτων | Αριθμός κλώνων |
|----------------------------------|--------------|-------------------------|----------------|----------------|
| Βιολογικό μήλου                  | BA1          | $55^{\circ}\text{C}$    | 1              | 480            |
|                                  | BA2          | $54-50^{\circ}\text{C}$ | 4              |                |
| Συμβατικό μήλου                  | CA           | $56-51^{\circ}\text{C}$ | 4              | 384            |
| Βιολογικό αχλαδιού               | BP           | $57-52^{\circ}\text{C}$ | 4              | 384            |

**Πιν.4** Καταγραφή DNA βιβλιοθηκών που δημιουργήσαμε κατά την μελέτη

Για ταυτοποίηση και χαρακτηρισμό των βακτηριακών στελεχών της *Cydia pomonella* που προέρχονται από συμβατική και βιολογική καλλιέργεια μήλου, απομονώθηκαν πλασμιδιακοί κλώνοι από αντίστοιχες DNA βιβλιοθήκες. Τίτλοποίηση των κλώνων έγινε βάση των θέσεων τους στο πιάτο καλλιέργειας. (Πιν.5). Π.χ.



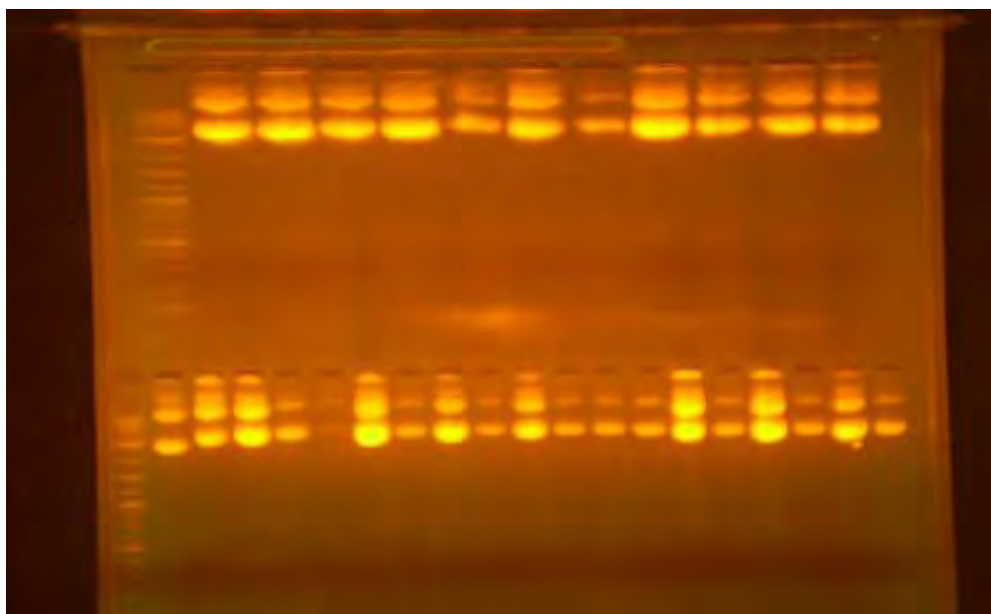
Αριθμός πιάτου

| Ατομο της <i>Cydia pomonella</i> | Αριθμός της DNAβιβλιοθήκης | Κλώνοι   | Σύνολο απομονωμένων κλώνων |
|----------------------------------|----------------------------|--|----------------------------|
| BA1                              | № 1                        | A1, A2, A3, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12, B2, B3, B5, B6, B7, B8, B9, B10, B11, B12, C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C10, C12, D1, D2, D4, D5, D6, D7, D8, D9, D10, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8. | 48                         |
| CA                               | №1                         | A1, A2, A3, A4, A7, A8, A9, A10, A11, A12, B1, B2, B5, B6, B7, B8, B9, B10, B12, C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9, D10, D11, D12, E1, E2, E3, E4.   | 48                         |

**Πιν.5** Αναγραφή πλασμιδιακών κλώνων που απομονώθηκαν κατά την μελέτη

Ακλούθησε προσδιορισμός συγκέντρωσης πλασμιδιακού DNA με ηλεκτροφόρηση δε πήκτωμα αγαρόζης (Εικ.20). Ανάλογα με ένταση του φθορισμού που δίνει το DNA άγνωστης συγκέντρωσης σε σύγκριση με φθορισμό του DNA γνωστής συγκέντρωσης μπορεί να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του άγνωστου DNA.

Στη συνέχεια όλα τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση στο Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων πανεπιστημίου Δυτικής Ελλάδας με έδρα στο Αργίνιο σε συνεργασία με τον κ. Γ. Τσίαμη και τον κ.Μπούρτζη.



**Εικ.20** Ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακού DNA. Αριστερά φαίνεται μάρτυρας μοριακού μεγέθους. Κάθε δείγμα αντιπροσωπεύεται από δυο ζώνες – μια των 1500bp, που αντιστοιχεί στο ένθεμα, και μια μεγαλύτερη των 2000bp που αποτελεί το DNA του πλασμιδίου.

### 3.2. Ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχισης

Τα αποτελέσματα του κάθε δείγματος υπέστησαν κατάλληλη επεξεργασία και οι αλληλουχίες του 16S rRNA κάθε βακτηριακού στελέχους συγκρίθηκαν με βοήθεια του αλγόριθμου BLAST και των εργαλείων ανάλυσης CLASSIFIER και SEQMATCH του Ribosomal Database Project (RDP) με την αντίστοιχη αλληλουχία όλων των γνωστών βακτηριακών γονιδιωμάτων στη βάση δεδομένων (. Η 16S rRNA ανάλυση είναι μια πολύ σημαντική διαδικασία βακτηρίωσης ταξινόμησης. Τα στελέχη βακτηρίων που παρουσιάζουν πολύ μεγάλη ομοιότητα  $\geq 99\%$  μπορούν, με μεγάλη αξιοπιστία να προσδιοριστούν σε επίπεδο είδους. Η υψηλή τιμή της ομοιότητας στην προκειμένη περίπτωση εξηγείται με το γεγονός ότι ο γονιδιακός τύπος 16S rRNA είναι πολύ συντηρημένος μεταξύ βακτηρίων του ίδιου είδους (Weisburg et.al.,1991). Δυο στελέχη που δείχνουν ομολογία στις 16S rRNA ακολουθίες της τάξης 97,5% ή χαμηλότερα, θα έχουν λιγότερο από το 60 με 70% ομοιότητα του DNA και συνεπώς δεν ανήκουν στο ίδιο είδος. Τιμές ομολογίας  $\geq 97\%$  δείχνουν πως τα βακτήρια πιθανόν ανήκουν στο ίδιο γένος.

Το μέγεθος των αλληλουχιών που αναλύσαμε κυμάνετε μεταξύ 400 με 690 βάσεων. Ο πίνακας 6 παρουσιάζει τα αποτελέσματα της ανάλυσης των 16S rDNA αλληλουχιών του ατόμου της βιολογικής καλλιέργειας μήλου.

| Χαρακτηρισμός         | Μήκος αλληλουχίας | Δείγμα     | Η ομοιότητα της 16S rRNA αλληλουχίας |                |          |           |
|-----------------------|-------------------|------------|--------------------------------------|----------------|----------|-----------|
|                       |                   |            | Κοντινότεροι συγγενείς               | Query coverage | E value  | Max ident |
| Pseudomonas sp.       | 440               | BA1.1.A-2  | Pseudomonas sp. UK4                  | 91%            | 0.0      | 99%       |
| Pseudomonas sp.       | 604               | BA1.1.A-3  | Pseudomonas sp. UK4                  | 89%            | 0.0      | 99%       |
| Pseudomonas sp.       | 531               | BA1.1.A-5  | Pseudomonas sp. UK4                  | 100%           | 0.0      | 98%       |
| Escherichia sp.       | 470               | BA1.1.A-7  | Escherichia coli                     | 85%            | 0.0      | 99%       |
| Unclassified Bacteria | 538               | BA1.1.A-8  | Clostridium nexile DSM 1787          | 25%            | 8.00E-48 | 93%       |
| Pseudomonas sp.       | 480               | BA1.1.A-9  | Pseudomonas sp. UK4                  | 85%            | 0.0      | 99%       |
| Pseudomonas sp.       | 559               | BA1.1.A-10 | Pseudomonas fluorescens Pf0-1        | 98%            | 0.0      | 98%       |
| Pseudomonas sp.       | 575               | BA1.1.A-11 | Pseudomonas sp. UK4                  | 93%            | 0.0      | 99%       |
| Pseudomonas sp.       | 608               | BA1.1.A-12 | Pseudomonas aeruginosa 39016         | 90%            | 0.0      | 98%       |
| Pseudomonas sp.       | 471               | BA1.1.B-3  | Pseudomonas sp. UK4                  | 86%            | 0.0      | 99%       |



|                                 |     |            |                             |      |          |     |
|---------------------------------|-----|------------|-----------------------------|------|----------|-----|
| Pseudomonas sp.                 | 474 | BA1.1.B-5  | Pseudomonas sp. UK4         | 85%  | 0.0      | 99% |
| Pseudomonas sp.                 | 464 | BA1.1.B-7  | Pseudomonas sp. UK4         | 88%  | 0.0      | 98% |
| Pseudomonas sp.                 | 446 | BA1.1.B-9  | Pseudomonas sp. UK4         | 92%  | 0.0      | 98% |
| Pseudomonas sp.                 | 642 | BA1.1.B-11 | Pseudomonas sp. UK4         | 92%  | 0.0      | 96% |
| Unclassified Bacteria           | 545 | BA1.1.B-12 | Clostridium nexile DSM 1787 | 35%  | 6.00E-79 | 93% |
| Pseudomonas sp.                 | 629 | BA1.1.C-1  | Pseudomonas sp. UK4         | 87%  | 0.0      | 99% |
| Pseudomonas sp.                 | 580 | BA1.1.C-7  | Pseudomonas sp. UK4         | 97%  | 0.0      | 98% |
| Pseudomonas sp.                 | 582 | BA1.1.C-8  | Pseudomonas sp. UK4         | 100% | 0.0      | 97% |
| Pseudomonas sp.                 | 522 | BA1.1.C-12 | Pseudomonas sp. UK4         | 87%  | 0.0      | 99% |
| Pseudomonas sp.                 | 587 | BA1.1.D-2  | Pseudomonas sp. UK4         | 99%  | 0.0      | 97% |
| Pseudomonas sp.                 | 592 | BA1.1.D-4  | Pseudomonas sp. UK4         | 98%  | 0.0      | 98% |
| Pseudomonas sp.                 | 522 | BA1.1.D-5  | Pseudomonas sp. UK4         | 87%  | 0.0      | 99% |
| Pseudomonas sp.                 | 584 | BA1.1.D-6  | Pseudomonas sp. UK4         | 99%  | 0.0      | 98% |
| Pseudomonas sp.                 | 624 | BA1.1.D-7  | Pseudomonas sp. UK4         | 92%  | 0.0      | 98% |
| Pseudomonas sp.                 | 600 | BA1.1.D-8  | Pseudomonas sp. UK4         | 96%  | 0.0      | 98% |
| Pseudomonas sp.                 | 630 | BA1.1.D-9  | Pseudomonas sp. UK4         | 94%  | 0.0      | 98% |
| Pseudomonas sp.                 | 627 | BA1.1.E-3  | Pseudomonas sp. UK4         | 95%  | 0.0      | 98% |
| Unclassified Bacteria           | 623 | BA1.1.E-5  | Clostridium nexile DSM 1787 | 29%  | 3.00E-62 | 88% |
| Pseudomonas sp.                 | 516 | BA1.1.E-6  | Pseudomonas sp. UK4         | 87%  | 0.0      | 97% |
| Unclassified Enterobacteriaceae | 629 | BA1.1.E-7  | Salmonella enterica         | 94%  | 0.0      | 96% |
| Pseudomonas sp.                 | 648 | BA1.1.E-8  | Pseudomonas sp. UK4         | 94%  | 0.0      | 98% |

**Πιν.6** Χαρακτηρισμός των βακτηριακών στελεχών από μόνον βιολογικής καλλιέργειας μήλου σύμφωνα με τα αποτελέσματα ανάλυσης με αλγόριθμο BLAST. Επίσης δίνονται τα ποσοστά ομοιότητας και κάλυψης με τις πλησιέστερες σχετικές καταχωρήσεις στη βάση δεδομένων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που πήραμε μετά την ανάλυση αλληλουχιών με αλγόριθμο BLAST οι 26 γενωμικοί DNA κλώνοι χαρακτηρίστηκαν ως *Pseudomonas sp.*, ο χαρακτηρισμός επιβεβαιώθηκε και με εργαλεία ανάλυσης CLASSIFIER και το SEQMATCH του Ribosomal Database Project (RDP) που έδειξαν ως πιθανότερο γένος το *Pseudomonas* (Proteobacteria/ Gammaproteobacteria/ Pseudomonadales/ Pseudomonadaceae/Pseudomonas).

Τρεις ακολουθίες (BA1.1.A-8; BA1.1.AB-12; BA1.1.E-5) ορίστηκαν ως αταξινόμητα βακτήρια (Unclassified Bacteria ) από RDP, καθώς ούτε ο αλγόριθμος BLAST έδωσε κάποιο αξιόπιστο αποτέλεσμα , αναδεικνύοντας ως πλησιέστερο είδος το *Clostridium nexile*, αλλά με τόσο χαμηλά ποσοστά κάλυψης που δεν είναι δυνατόν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα σχετικά με το γένος αυτών των βακτηρίων. Μια αλληλουχία (BA1.1.A-7) και με τα δυο προγράμματα ανάλυσης χαρακτηρίστηκε ως *Escherichia sp.* με το πλησιέστερο είδος την *Escherichia coli*, αλλά εξαιτίας της υψηλής ομοιότητας της ακολουθίας με περισσότερες της μιας αλληλουχίας στη βάση δεδομένων ο ακριβής προσδιορισμός του βακτηριακού στελέχους δεν ήταν εφικτός. Ένας άλλος γενωμικός κλώνος (BA1.1.E-7) από το CLASSIFIER ταχτοποιήθηκε ως ένα άγνωστο γένος της οικογένειας *Enterobacteriaceae*, ενώ οι ανάλυση με BLAST ανέδειξε ως πλησιέστερο είδος την *Salmonella enterica*.

Σε επίπεδο είδους κατάφεραν να ταυτοποιηθούν μόνο τα βακτήρια *Pseudomonas sp.* UK4 (μέχρι και 99% ομοιότητα σε ορισμένες περιπτώσεις), ενώ για τα περισσότερα βακτηριακά στελέχη, που δεν παρουσίαζαν τόσο σημαντική ομολογία με την αλληλουχία του 16S rRNA κάποιου γνωστού βακτηριακού είδους, η ταυτοποίηση περιορίστηκε στο πλησιέστερο κατά περίπτωση γένος. Με αυτόν τον τρόπο στο επίπεδο γένους προσδιορίστηκαν *Pseudomonas sp.* και *Escherichia sp.* Οι αλληλουχίες που δεν μπόρεσαν να ταξινομηθούν ούτε σε επίπεδο είδους, ούτε σε επίπεδο γένους απαιτούν νέα έρευνα, προκειμένου να καθοριστεί ο βακτηριακός τους στέλεχος.

Ο πίνακας 7 παρουσιάζει τα αποτελέσματα της ανάλυσης των 16S rDNA αλληλουχιών του ατόμου της συμβατικής καλλιέργειας μήλου.

| Χαρακτηρισμός         | Μήκος αλληλουχίας | Δείγμα    | Η ομοιότητα της 16S rRNA αλληλουχίας         |                |          |           |
|-----------------------|-------------------|-----------|--|----------------|----------|-----------|
|                       |                   |           | Κοντινότεροι συγγενείς                       | Query coverage | E value  | Max ident |
| Halotalea sp.         | 604               | CA.1.A-2  | Halotalea alkalilenta strain AW-7            | 93%            | 0.0      | 98%       |
| Halotalea sp.         | 591               | CA.1.A-3  | Halotalea alkalilenta strain AW-7            | 89%            | 0.0      | 95%       |
| Halotalea sp.         | 601               | CA1.A-7   | Halotalea alkalilenta strain AW-7            | 93%            | 0.0      | 97%       |
| Halotalea sp.         | 627               | CA.1.A-9  | Halotalea alkalilenta strain AW-7            | 89%            | 0.0      | 95%       |
| Unclassified Bacteria | 580               | CA.1.A-12 | Uncultured delta proteobacterium clone PL 73 | 7%             | 4.00E-11 | 100%      |
| Rubrobacter sp.       | 513               | CA.1.B-1  | Uncultured bacterium clone Uday0-65          | 87%            | 0.0      | 99%       |
| Halotalea sp.         | 650               | CA.1.B-2  | Halotalea alkalilenta strain AW-7            | 93%            | 0.0      | 95%       |
| Halotalea sp.         | 637               | CA.1.B-5  | Halotalea alkalilenta strain AW-7            | 94%            | 0.0      | 97%       |
| Halotalea sp.         | 628               | CA.1.B-6  | Halotalea alkalilenta strain AW-7            | 94%            | 0.0      | 95%       |
| Halotalea sp.         | 630               | CA.1.B-7  | Halotalea alkalilenta strain AW-7            | 94%            | 0.0      | 96%       |

|                       |     |           |                                   |     |          |      |
|-----------------------|-----|-----------|-----------------------------------|-----|----------|------|
| Halotalea sp.         | 636 | CA.1.B-8  | Halotalea alkalilenta strain AW-7 | 92% | 0.0      | 97%  |
| Halotalea sp.         | 630 | CA.1.B-9  | Halotalea alkalilenta strain AW-7 | 93% | 0.0      | 95%  |
| Halotalea sp.         | 650 | CA.1.B-10 | Halotalea alkalilenta strain AW-7 | 93% | 0.0      | 98%  |
| Halotalea sp.         | 637 | CA.1.B-12 | Halotalea alkalilenta strain AW-7 | 90% | 0.0      | 93%  |
| Unclassified Bacteria | 629 | CA.1.C-2  | Uncultured Bifidobacterium sp.    | 6%  | 4.00E-11 | 100% |
| Halotalea sp.         | 670 | CA.1.C-3  | Halotalea alkalilenta strain AW-7 | 92% | 0.0      | 96%  |
| Halotalea sp.         | 689 | CA.1.C-4  | Halotalea alkalilenta strain AW-7 | 92% | 0.0      | 95%  |
| Halotalea sp.         | 682 | CA.1.C-5  | Halotalea alkalilenta strain AW-7 | 92% | 0.0      | 95%  |
| Halotalea sp.         | 609 | CA.1.C-6  | Halotalea alkalilenta strain AW-7 | 89% | 0.0      | 93%  |
| Halotalea sp.         | 580 | CA.1.C-7  | Halotalea alkalilenta strain AW-7 | 89% | 0.0      | 95%  |
| Halotalea sp.         | 663 | CA.1.C-8  | Halotalea alkalilenta strain AW-7 | 94% | 0.0      | 94%  |
| Halotalea sp.         | 666 | CA.1.C-9  | Halotalea alkalilenta strain AW-7 | 93% | 0.0      | 95%  |
| Halotalea sp.         | 662 | CA.1.C-10 | Halotalea alkalilenta strain AW-7 | 94% | 0.0      | 96%  |
| Halotalea sp.         | 670 | CA.1.C-11 | Halotalea alkalilenta strain AW-7 | 94% | 0.0      | 96%  |
| Halotalea sp.         | 634 | CA.1.D-1  | Halotalea alkalilenta strain AW-7 | 94% | 0.0      | 97%  |
| Halotalea sp.         | 668 | CA.1.D-2  | Halotalea alkalilenta strain AW-7 | 91% | 0.0      | 93%  |
| Halotalea sp.         | 671 | CA.1.D-3  | Halotalea alkalilenta strain AW-7 | 94% | 0.0      | 97%  |
| Halotalea sp.         | 670 | CA.1.D-4  | Halotalea alkalilenta strain AW-7 | 93% | 0.0      | 96%  |
| Halotalea sp.         | 418 | CA.1.D-6  | Halotalea alkalilenta strain AW-7 | 91% | 0.0      | 98%  |
| Halotalea sp.         | 475 | CA.1.D-8  | Halotalea alkalilenta strain AW-7 | 88% | 0.0      | 98%  |
| Halotalea sp.         | 436 | CA.1.D-10 | Halotalea alkalilenta strain AW-7 | 92% | 0.0      | 99%  |
| Halotalea sp.         | 499 | CA.1.E-2  | Halotalea alkalilenta strain AW-7 | 86% | 0.0      | 96%  |
| Halotalea sp.         | 515 | CA.1.E-4  | Halotalea alkalilenta strain AW-7 | 93% | 0.0      | 97%  |

Πιν.7 Χαρακτηρισμός των βακτηριακών στελεχών απόμου συμβατικής καλλιέργειας μήλου σύμφωνα με τα αποτελέσματα ανάλυσης με αλγόριθμο BLAST.

Το κυρίαρχο βακτηριακό στέλεχος στα έντομα που προέρχονται από συμβατική καλλιέργεια μήλου φαίνεται να είναι *Halotalea alkalilenta*, που δίνει έως και 99% ομοιότητα αλληλουχίας. Πάνω από 30 γενωμικοί DNA κλώνοι χαρακτηρίστηκαν, μετά από την ανάλυση με CLASSIFIER (RDP), ως στελέχη του γένους *Halotalea* (Proteobacteria/Gammaproteobacteria/Oceanospirillales/Halomonadaceae/Halotalea), ενώ η ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχισης με BLAST επιβεβαίωσε πως πρόκειται για είδος *Halotalea alkalilenta strain AW-7*. Όμως, από τα βακτηριακά στελέχη που έδειξαν ως πλησιέστερο είδος την *Halotalea alkalilenta* δεν κατάφεραν να

ταυτοποιηθούν όλα σε επίπεδο είδους, κάποια από αυτά ήταν δυνατόν να χαρακτηριστούν μονό σε επίπεδο γένους (*Halotalea sp.*).

Μια ακολουθία (CA.1.B-1) έδειξε στενή συγγένεια με ένα μη-καλλιεργούμενο στέλεχος (Uncultured bacterium clone Uday0-65) μετά από την ανάλυση με αλγόριθμο BLAST, καθώς το CLASSIFIER (RDP) χαρακτήρισε το βακτηριακό στέλεχος ως *Rubrobacter sp.* Άλλες δυο αλληλουχίες δεν κατάφεραν να χαρακτηριστούν από το CLASSIFIER (RDP), και ορίστηκαν ως άγνωστα βακτήρια, ενώ ούτε το BLAST ξεκαθάριζε την εικόνα, δίνοντας εξαιρετικά μικρή κάλυψη (τάξης 6-7%) που κάνει το αποτέλεσμα αναξιόπιστο. Για αυτά τα βακτηριακά στελέχη είναι αδύνατον να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα και να μπορέσει να γίνει οποιοσδήποτε χαρακτηρισμός, ακόμη και σε επίπεδο γένους.

Στα δείγματα των εντομών από βιολογική καλλιέργεια μήλου, κυριάρχησε το γένος *Pseudomonas sp.* μεταξύ των απομονωθέντων βακτηρίων, καθώς το 85% των βακτηριακών στελεχών φάνηκε να είναι στενά συνδεδεμένο μαζί του, ενώ τελείως διαφορετική εικόνα ποικιλότητας φαίνεται να υπάρχει στο άτομο της συμβατικής καλλιέργειας μήλου, όπου το προεξέχων βακτηριακό γένος είναι *Halotalea sp.*, με 92% των στελεχών να είναι στενά συνδεδεμένα με το γένος αυτό.

Το κύριο προβληματισμό για τους ερευνητές αποτελεί το ερώτημα: πόσο καλά τα δείγματα αντανακλούν την “πραγματική” ποικιλότητα της μικροχλωρίδας. Για αξιολόγηση της μικροβιακής κοινότητας έχει αναπτυχθεί μια πληθώρα στατιστικών αναλύσεων (Hughes et.al.,2001).

Μια κατηγορία των μεθόδων εκτίμησης της βακτηριακής κοινότητας, μη παραμετρική εκτίμηση, είναι η πλέον κατάλληλη για μελέτες μικροβίων. Ένας από αυτούς τους στατιστικούς δείκτες, ο Chao1, έχει χρησιμοποιηθεί στη παρόν μελέτη για εκτίμηση της αφθονίας στο δείγμα με προσθήκη ενός συντελεστή διόρθωσης (Chao,1984; Chao et.al.,1993). Ο δείκτης Chao1 είναι ιδιαίτερα χρήσιμος για ανάλυση δειγμάτων μικρού μεγέθους.

Με χρήση εργαλείων ανάλυσης που προσφέρει το σύστημα Mothur προσδιορίστηκε ο δείκτης Chao1, που υπολογιστικέ να είναι παρόμοιου επιπέδου και για τις δυο κοινότητες ( άτομα από βιολογική και συμβατική καλλιέργεια μήλου). Επίσης προσδιορίστηκε και το ποσοστό κάλυψης βιβλιοθηκών σε επίπεδο γένους, που βρέθηκε να είναι ικανοποιητικό (93,4% και 94,3% για κάθε βιβλιοθήκη, αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα στατιστικών αναλύσεων παρουσιάζονται στο πίνακα 8.

| Βιβλιοθήκη     | Κλώνοι που αλληλουχήθηκαν | Chao1 Index (95% CI) | % Coverege (genus level-95%) | H' (95% CI) |
|----------------|---------------------------|----------------------|------------------------------|-------------|
| Βιολογικό μήλο | 26                        | 4                    | 93.4                         | 0.71        |
| Συμβατικό μήλο | 38                        | 4                    | 94.3                         | 0.43        |

**Πιν.8** Στατιστικοί δείκτες βιοποικιλότητας στις 16S rRNA βιβλιοθήκες.

# ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---

Η *Cydia pomonella*, γνωστή ως καρπόκαψα των μήλων, είναι ο κύριος εχθρός των γιγαρτόκαρπων δέντρων και προκαλεί τεράστια ζημία στη γεωργία, καταστρέφοντας έως 80% καλλιεργειών, ετησίως. Χάρη στην ικανότητα της να προσαρμόζεται στο εύρη φάσμα κλιματικών συνθηκών και να χρησιμοποιεί πλήθος φρούτων για την εκτέλεση του βιολογικού της κύκλου, έχει εξαπλωθεί σε όλο τον κόσμο, όπου υπάρχει καλλιέργεια μηνοειδών.

Μέχρι τώρα η καταπολέμηση της βασίζεται στη χρήση χημικών σκευασμάτων, που εκτός από το υψηλό κόστος έχουν και τεράστια περιβαλλοντική επιβάρυνση. Στη προσπάθεια μείωσης της χρήσης των εντομοκτόνων ουσιών και ελαχιστοποίησης των βλαβερών επιδράσεων τους στους ωφέλιμους οργανισμούς και το περιβάλλον, έχουν εφαρμοστεί διάφοροι βιολογικοί και βιοτεχνολογικοί μέθοδοι καταπολέμησης, όπως η χρήση των φυσικών εχθρών της καρπόκαψας και η τοποθέτηση φερομονικών παγίδων. Όμως, καμία από τις μεθόδους αυτές δεν έχει απόλυτη επιτυχία, καθώς οι προνύμφες του εντόμου αποτελούν ένα δύσκολο στόχο καταπολέμησης, λόγω του μικρού χρονικού διαστήματος κατά το οποίο παραμένουν εκτεθειμένες και μικρής ποσότητας τροφής την οποία καταναλώνουν πριν την εισβολή στο αναπτυσσόμενο φρούτο. Έτσι, είναι σημαντικό να βρεθεί ένας πιο αποτελεσματικός, αλλά και πιο φιλικός προς το περιβάλλον, τρόπος καταπολέμησης.

Καλύτερη αντιμετώπιση σημαντικών εχθρών ενδέχεται να προσφέρει η μελέτη των συμβιωτικών βακτηρίων των εντόμων. Οι σχέσεις συμβίωσης επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τους οργανισμούς που συμμετέχουν, καθώς μπορούν να μεταβάλλουν την βιολογία, την οικολογία και την φυσιολογία του ξενιστή (Buchner, 1965). Έτσι, η απουσία κάποιων ειδών βακτηρίων από το έντομο εκδηλώνεται με μείωση της ανάπτυξης, δυσκολίες στη έκδυση ή και μείωση της αναπαραγωγικής ικανότητας (Feldhaar et al., 2011). Έχει βρεθεί πως τα βακτήρια της χλωρίδας βοηθάνε στη βιοσύνθεση θρεπτικών στοιχείων και αποικοδόμηση βιομάζας. Γενικά οι συμβιωτικοί μικροοργανισμοί φαίνεται να προμηθεύουν στους ξενιστές τους βιταμίνες, ενζύμα, αμινοξέα και πιθανόν κάποιες ορμόνες (Douglas, 1998). Εξίσου σημαντικό ρόλο παίζει η ικανότητα των συμβιώντων να προλαμβάνουν μολύνσεις του μεσεντέρου από παθογόνους μικροοργανισμούς (Breg, 1996). Οι λειτουργίες αυτές των συμβιωτικών βακτηρίων θα μπορούσαν να οδηγήσουν στη ανάπτυξη καινούριων στρατηγικών καταπολέμησης επιβλαβών εντόμων, μέσω έλεγχου της μικροχλωρίδας.

Προηγουμένως έχει γίνει μια προσπάθεια ανακάλυψης των συμβιωτών της εντερικής χλωρίδας της καρπόκαψας με μέθοδο καλλιέργειας βακτηρίων σε διάφορα θρεπτικά μέσα (Χατζή, 2010). Αλλά η καλλιέργεια βακτηρίων επιτρέπει την πρόσβαση σε ένα μικρό μονό μέρος της ποικιλότητας που βρίσκεται στη μικροχλωρίδα (Oliver, 2000). Η παρούσα εργασία αποτελεί την πρώτη προσπάθεια για τη μελέτη της βακτηριακής χλωρίδας της *Cydia pomonella* με μεθόδους μεταγονιδιωματικής ανάλυσης. Η μεταγονιδιωματική βασίζεται στη κλωνοποίηση και αλληλούχιση των 16S ριβοσωμικών RNA (rRNA) γονιδίων ολόκληρου του πληθυσμού της βακτηριακής κοινότητας, που προέρχεται από ένα δείγμα. Επιπλέον, αποτελεί κατάλληλο εργαλείο για απόκτηση πιο ξεκάθαρης εικόνας της

"πραγματικής" ποικιλότητας των ειδών που συμβιώνουν με το έντομο (Garcia-Armisen et.al.,2010).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών, που αποτελούν τις κυρίαρχες μορφές της μικροχλωρίδας σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια. Πιθανών η παρουσία των βακτηρίων αυτών στους ξενιστές είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση τους.

Ανάλυση των αποτελεσμάτων αλληλούχισης, που έγινε σε άτομα της καρπόκαψας από δυο τύπους αγρών της μηλιάς (βιολογικό και συμβατικό), ανέδειξε σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δυο μικροβιακές κοινότητες. Στο άτομο από βιολογική καλλιέργεια μήλου κυριάρχησε το γένος *Pseudomonas sp.* μεταξύ απομονωθέντων βακτηρίων, με 85% των βακτηριακών στελεχών να είναι στενά συνδεδεμένα μαζί του. Τελείως διαφορετική εικόνα ποικιλότητας φαίνεται να υπάρχει στο άτομο από συμβατική καλλιέργεια μήλου, όπου *Pseudomonas sp.* δεν εμφανίστηκε καθόλου, ενώ το προεξέχον βακτηριακό γένος ήταν *Halotalea sp.* (92% των δειγμάτων) με *Halotalea alkalilenta* να είναι το πλησιέστερο συγγενικό είδος (μέχρι και 99% ομοιότητα σε ορισμένες περιπτώσεις). Δεδομένου ότι βακτηριακή χλωρίδα μεταβάλλεται ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Feldhaar et.al.,2011), το κύριο ερώτημα είναι εάν η διαφορά στη ποικιλότητα μεταξύ δυο κοινοτήτων οφείλεται στην επίδραση των εντομοκτόνων ουσιών. Για να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα σχετικά με αυτό απαιτούνται περαιτέρω μελέτες και ανάλυση περισσότερων γονιδιακών κλώνων.

Από το σύνολο των ταυτοποιημένων βακτηρίων που βρέθηκαν να συμβιώνουν με το έντομο *Cydia pomonella* με μέθοδο καλλιέργειας (Χατζή, 2010), κυριάρχησε το γένος *Erwina sp.* (45% των απομονωθέντων στελεχών) και το γένος *Clavibacter sp.* ( 28% των απομονωθέντων στελεχών), ενώ κανένας από τα βακτηριακά στελέχη, που ταυτοποιήθηκαν μετά την σάρωση 16S rDNA βιβλιοθηκών, δεν έχει εντοπιστεί. Η λογική εξήγηση που θα μπορούσε να δοθεί για αυτό είναι ότι τα βακτήρια που αναπτύσσονται σε κοινά θρεπτικά μέσα δεν αποτελούν τις κυρίαρχες μορφές στο φυσικό οικοτύπο, είτε επειδή βρίσκονται σε μη-καλλιεργήσιμη κατάσταση, είτε επειδή μεγαλώνουν πιο αργά από ότι οι λιγότερο κυρίαρχες μορφές (Smalla,2004).

Τα υψηλά ποσοστά κάλυψης των DNA βιβλιοθηκών ( 93,4-94,3%), αλλά και η αφθονία αυτών των βακτηριακών στελεχών στα δείγματα, χαρακτηρίζουν το *Pseudomonas sp.* και τη *Halotalea sp.* ως πιθανότατα κυρίαρχες μορφές βακτηρίων στα έντομα από βιολογική και συμβατική καλλιέργεια μήλου, αντίστοιχα.

Το γένος *Pseudomonas* ανήκει σε οικογένεια *Pseudomonadaceae* και περιλαμβάνει 191 περιγραφόμενα είδη (Euzebay,1997). Όλα τα μελή του γένους είναι Gram-αρνητικοί ράβδοι, που παρουσιάζουν μεγάλη μεταβολική ποικιλότητα και συνεπώς είναι ικανά να επιζήσουν σε εύρη φάσμα περιβαλλοντικών πόρων, όπως έδαφος, νερό, φυτικοί και ζωικοί ιστοί (Madigian, 2005). Αρκετά είδη αυτού του γένους είναι παθογόνα ευκαριωτικών οργανισμών και επηρεάζουν ζώα, φυτά και άνθρωπο. Τα καλύτερα μελετημένα είδη είναι *P.aeruginosa* που είναι παθογόνο βακτήριο του ανθρώπινου είδους (van Eldere,2003), το παθογόνο των φυτών *P.syringae* και το βακτήριο του εδάφους *P.putida*. Περισσότερα *Pseudomonas sp.* είναι υποχρεωτικά αερόβιοι οργανισμοί, ωστόσο κάποια στελέχη έχουν ικανότητα να χρησιμοποιούν NO<sub>3</sub> αντί O<sub>2</sub>. Επίσης *Pseudomonas sp.* συνήθως δίνει θετικό αποτέλεσμα στη δοκιμή οξιδάσης

(oxidase test), που χρησιμοποιείται στη μικροβιολογία για να προσδιοριστεί αν τα βακτήρια παράγουν οξειδάσεις κυτοχρώματος c.

Πολλά είδη του γένους μπορούν να προκαλέσουν αλλοίωση των τροφίμων. Π.χ. μούχλα στα αυγά επιφέρεται από *P.taetrolens* και *P.mudicolens* (Levine&Anderson,1932), ενώ *P.lundensis* προκαλεί αλλοίωση του γάλακτος, τυριών και κρεάτων (Gennari&Dragotto,1992). Κάποια μέλη του *Pseudomonas sp.* έχουν την ικανότητα μεταβολισμού χημικών ρυπογόνων. Για παράδειγμα, *P.veronii* φαίνεται να εποικοδομεί κάποιες απλές αρωματικές ενώσεις (Nam et.al.,2003; Onaca et.al.,2007), ενώ μελέτες έχουν αποδείξει πως *P.fluorescens* εποικοδομεί στυρόλιο(styrene), TNT και πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (Bangera&Thomashow,1999).

Επιπλέον, είδη του γένους *Pseudomonas* έχουν αναπτύξει στενή σχέση με διάφορα είδη εντόμων. Ο *Pseudomonas entomofila* είναι ένα γνωστό παράσιτο των μυγών *Drosophilla melanogaster*, που προκαλεί θνησιμότητα στις προνύμφες και ενήλικα άτομα (Vodovar et.al.,2006). Ένα συμβιωτικό βακτήριο *P.mneltophthora* βρέθηκε να συνθέτει αμινοξέα στο έντομο *Rhagoletis pomonella* (Δίπτερα) (Miyazaki et.al.,1968), ενώ ένας μη-καλλιεργούμενο είδος του *Pseudomonas*, που έχει εντοπιστεί πρόσφατα, είναι πιθανός παραγωγός του polyketide pederin, ενός τοξικού αμιδίου, στα σκαθάρια *Paederus fuscipes* (Piel et al 2002).

Προκειμένου να χαρακτηριστεί το στελέχη *Pseudomonas sp.*, στα άτομα βιολογικής καλλιέργειας μήλου, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες με άλλες βιοχημικές μεθόδους, όπως η μέθοδος του προφίλ των λιπαρών οξέων, που μπορεί να δώσει απαντήσεις σχετικά με συγγενικά βακτηριακά στελέχη και να βοηθήσει στη ταξινόμηση αυτού του είδους.

Η οικογένεια *Halomonadaceae* περιλαμβάνει αλοανεκτικά (haloterant) ή μερικούς αλόφιλα βακτήρια, που προέρχονται κυρίως από αλκαλικά περιβάλλοντα (Ventosa et.al.,1998). Το γένος *Halotalea*, όπως και είδος *Halotalea alkalilenta* έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί πρόσφατα από απόβλητα των ελαιοτριβείων (Ntoudias et.al.,2007). Έχει βρεθεί πως είναι υποχρεωτικά αερόβιο, αρνητικό κατά Gramm βακτήριο ραβδοειδούς σχήματος. *P.alkalilenta* είναι αλοανεκτικό βακτήριο, δηλαδή ικανό να αναπτύσσεται παρουσία NaCl, χωρίς να το χρειάζεται (ανέχεται έως και 15%w/v NaCl), ανεκτικό σε ζάχαρα ( ανέχεται έως 45% και 60%w/v (+)-D-γλυκόζης και μαλτόζης, αντιστοίχως; οι συγκεντρώσεις αυτές αποτελούν το υψηλότερο όριο ανοχής που έχει βρεθεί για βακτήρια). Επίσης, βρέθηκε να είναι ακλαλεόφιλο (μεγαλώνει στα όρια του pH 5-11, με βέλτιστο pH=7).

Η *Halotalea sp.* είναι σχετικά καινούριο, ως προς την ανακάλυψη του, γένος των *Halomonadaceae* και δεν έχουν χαρακτηριστεί ακόμα οι πιθανές λειτουργίες που μπορεί να εξυπηρετεί στη μικροχλωρίδα των εντόμων. Αλλά η παρουσία του στο άτομο της συμβατικής καλλιέργειας μήλου μπορεί να αποτελέσει ένδειξη αλλαγής του pH στο εντερικό σωλήνα της *Cydia pomonella*, μετά από την έκθεση σε εντομοκτόνα.

Παρόλα αυτά, περισσότερες μελέτες πρέπει να πραγματοποιηθούν προκειμένου να εντοπιστεί αν τα *Pseudomonas sp.* και *Halotalea sp.* όντος αποτελούν τα κυρίαρχα βακτηριακά στελέχη των δυο βακτηριακών κοινοτήτων και να ξεκαθαριστεί ο λειτουργικός ρόλος τους. 16S rDNA βιβλιοθήκες πρέπει να δημιουργηθούν και για τα



υπόλοιπα αναπτυξιακά στάδια (προνύμφες, νύμφες,) για να προσδιοριστεί ποια βακτηριακά στελέχη απαντούν σε όλα τα στάδια του βιολογικού κύκλου. Επίσης, η σάρωση περισσότερων κλώνων από τις 16S rDNA βιβλιοθήκες της καρπόκαψας του μήλου, αλλά και του αχλαδιού θα μπορούσε να δώσει απαντήσεις σχετικά με πιθανές αλλαγές της βακτηριακής κοινότητας ανάλογα με το τύπο διατροφής του ξενιστή. Εν συνέχεια η εφαρμογή της μεθόδου των μικροσυστοιχίων θα επέτρεπε την την ανίχνευση πολύπλοκων μικροβιακών κοινοτήτων της μικροχλωρίδας. Εξ ορισμού, τα PhyloChips είναι μικροσυστοιχίες DNA που αποτελούνται από rRNA στοχευμένους ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της χρήσης των PhyloChips 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 a., 2002, Zhou J. et al., 2002, Chandler et al., 2003,).

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ahmadjian V.**, Paracer S. (2000). *Symbiosis: an introduction to biological associations*. Oxford University Press. Oxford.
- Akman, L.**, Yamashita, A., Watanabe, H., Oshima, K., Shiba, T., Hattori, M. and Aksoy, S. (2002) Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*. *Nature Genetics*, 32, 402-407.
- Amann, R.I.**, Ludwig, W. and Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59, 143-169.
- Bajwa, M., A.** (1985). Wheat research and production in Pakistan. pp. 20-30. In: Problems and progress of wheat pathology in South Asia. (Eds.).
- Bajwa W.I.**, Kogan M. (1996). Compendium of IPM definitions (electronic database). *Integrated Plant Protection Center*. Corvallis, Oregon. USA
- Bangera, M.G.**, and Thomashow, L.S. (1999). Identification and characterization of a gene cluster for synthesis of the polyketide antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *J. Bacteriol.* 181: 3155–3163
- Bandi C.**, Damiani G., Magrassi L., Grigolo A., Fani, R. & Sacchi, L. (1994). Flavobacteria as intracellular symbionts in cockroaches. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 257, 43-48.
- 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. *J. of Econ. Ent.*, Vol. 85, Number 4:1274-1277(4)
- Baumann P.**, Lai C., Baumann L., Rouhbakhsh D., Moran N. A. & Clark M. A. (1995). Mutualistic associations of aphid and prokaryotes: biology of the genus *Buchnera*. *Appl Environ Microbiol* 61, 1-7.
- Bauman A**, Dore J, Eggleton P, Bignell D, Breznak JA, Kane MD (2001). Molecular phylogenetic profiling of prokaryotic communities in guts of termites with different feeding habits. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35:27-36
- Baumann P.** (2005). Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *An. Review of Micr.*, Vol. 59: 155-189
- Berg RD.** (1996). The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* 4:430–35

- Bignell DE.** (2000). Introduction to symbiosis. See Ref. 1a, pp. 189-208
- Bourtzis K.** and T. Miller eds. (2003). *Insect Symbiosis*. CRC Press, Florida, USA, pp. 347.
- Breznak JA** (2000). Ecology of prokaryotic microbes in the guts of wood- and litterfeeding termites. See Ref. 1a, pp. 209-31
- Breznak, J.A.** (2004). Invertebrates-Insects. *Microbial Diversity and Bioprospecting* (ed. A.T. Bull), pp. 191-203. ASM Press, Washington, D.C.
- Brooks MA.** (1963). The microorganisms of healthy insects. In *Insect Pathology: An Advanced Treatise*, ed. EA Steinhaus, pp. 215-50. London: Academic
- Brune A.** (1998). Termite guts: the world's smallest bioreactors. *Trends Biotechnol.* 16:16-21
- Buchner, P.,** (1965). *Endosymbiosis of Animals with Plant Microorganisms*. Interscience Publishers, New York.
- Campbell BC.** (1990). On the role of microbial symbiotes in herbivorous insects. In *Insect-Plant Interactions*, ed. EA Bernays, 1: 1-44.
- Campbell B. C., Bragg T. S. & Turner C. E.** (1992). Phylogeny of symbiotic bacteria of four weevil species (Coleoptera: Curculionidae) based on analysis of 16S ribosomal DNA. *Insect Biochem Mol Biol* 22, 415-421
- Capuzzo C., Firrao G., Mazzon L., Squartini A., Girolami V.** (2005). 'Candidatus *Erwinia dacicola*' a coevolved symbionts bacterium of the olive fly *Bactrocera oleae* (Gmelin). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 1641-1647
- Chao A.** (1984). Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scand J Stat.* 11: 265-270.
- Chao A., Ma M.C, Yang M. K.** (1993). Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates. *Scand J Stat.*43: 783-791.
- Chandler S.M, T.L Wilkinson and A.E Douglas** (2008) *Proc. R. Soc. B* **275**, 565-570
- 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
- Charmillot P.J. and J.F. Brunner.** (1990). La tordeuse de la pelure *Adoxophyes orana* F.v.R. (Capua): biology, avertissement et lutte. *Revue Suisse Vitic. Arboric. Hortic.* 22(4): 243-254
- Clark, M. A., Baumann, L., Munson, M. A., Baumann, P., Campbell B. C., Duffus, J. E., Osborne, L. S. & Moran, N. A.** (1992). The eubacterial endosymbionts of

whiteflies (Homoptera: Aleyrodoidea) constitute a lineage distinct from the endosymbionts of aphids and mealybugs. *Curr Microbiol* 25, 119-123.

**Craft** B.A. and McRae I.V. (1993). Biological control of apple mites: impact of *Zetzellia mali* (Acari: Stigmaeidae) on *Typhlodromus pyri* Scheuten and *Metaseiulus occidentalis* (Nesbitt) (Acari: Phytoseiidae). *Environ. Entomol.* 22, 865–873.

**Craft** B.A. (1992). IPM System that conserve pesticides, pest-resistant plants and biological controls, including genetically altered forms. *Journal of the Entomological Society of South Africa* 55: 107-121

**Cruden** DL, Markovetz AJ. (1987). Microbial ecology of the cockroach gut. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:617-43

**Dale** C., Moran N. (2006). Molecular interactions between bacterial symbionts and their hosts. *Cell* 126: 453-465

**Dasch** G.A, Weiss E, Chang K.P. (1984). Endosymbionts of insects. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, ed. NR Krieg, JG Holt, pp. 811-13

**Dillon** R.J. and Dillon V.M. (2004). The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. *Annual Review of Entomology*, 49, 71-92

**Douglas** A. (2003). *Buchnera* bacteria and other symbionts of aphids. In: *Bourtzis K., Miller T. (eds) Insect Symbiosis* pp.23-38

**Douglas** A.E. (1994). *Symbiotic Interactions*. Oxford University Press. Oxford.

**Douglas**, A.E. (1998) Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: Aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annual Review of Entomology*, 43, 17-37.

**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

**Euzéby**, J.P. (1997). "List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet". *Int J Syst Bacteriol* 47 (2): 590-2.

**Feldhaar** H. (2011). Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. *Ecological Entomology* 36: 533-543

**Garcia-Armisen** T., Papalexandratou Z., Hendryckx H., Camu N., Vrancken G., Luc De Vuyst and Cornelis P. (2010) Diversity of the total bacterial community associated with Ghanaian and Brazilian cocoa bean fermentation samples as revealed by a 16 S rRNA gene clone library. *Applied Microbial and Cell Physiology*.

- 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
- Gennari** M, and Dragotto F (1992). A study of the incidence of different *Pseudomonas fluorescent* species and biovars in the microflora of fresh and spoiled meat and fish, raw milk, cheese, soil and water. *J Appl Bacteriol* **72** (4): 281–8
- Goonewardene**, H. F., W. F. Kwolek, and R. A. Hayden. (1984). Survival of immature stages of the codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) on seeded and seedless apple fruit. *J. Econ. Entomol.* 77: 1427-1431.
- 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.
- Head**, I.M., Saunders, J.R. and Pickup, R.W. (1998) Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology*, 35, 1-21.
- Hogg** JC, Lehane MJ. (2001). Microfloral diversity of cultured and wild strains of *Psoroptes ovis* infesting sheep. *Parasitology* 123:441-46
- Hughes** J.B., Jessica J. Hellmann, Ricketts T.H., Bohannon B. (2001). Counting the Uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity. *Appl. Environ Microbiol.* 67(10):4399-4406.
- Ishikawa** H. (2003). Insect Symbiosis: An introduction. In: *Bourtzis K., Miller T. (eds) Insect Symbiosis pp.1-21*
- Janjua** N.A, Nasir M.M, Chaudhry G.U (1958). The codling moth *Cydia pomonella* L. in Baluchistan. *Biol. Sec. Pak. Monograph No.2. Ist End. Govt. College, IBE:* 1-122
- Kane**, M.D. and Pierce, N.E. (1994) Diversity within diversity: Molecular approaches to studying microbial interactions with insects. *Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications*, pp. 509–524.
- Kenny**, A. J., O’Hare, M. J. and Gusterson, B. A. (1989). Cell-surface peptidases as modulators of growth and differentiation. *Lancet* ii, 785-7.
- Khachane**, A.N., Timmis, K.N. and Martins dos Santos, V.A. (2007) Dynamics of reductive genome evolution in mitochondria and obligate intracellular microbes. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 449-456.
- Knight** A.L, Thomas J. Weissling (1994) Passive trap for monitoring codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) flight activity. *Journal of Economic Entomology* 87 (1), 103-107

- 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
- Levine, M.**, and Anderson, DQ (1932 ). Two New Species of Bacteria Causing Mustiness in Eggs. *J Bacteriol* **23** (4): 337–47.
- Lysenko O.** (1985). Non-spore forming bacteria pathogenic to insects: incidence and mechanisms. *Annu. Rev. Microbiol.* 39:673-95
- Madigan, M.;** Martinko J (editors). (2005). *Brock Biology of Microorganisms* (11th ed.). Prentice Hall
- Mazzon L.**, Piscedda 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 *Candidatus Stammerula tephritidis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, Vol 58:1277-1287
- McKillip, J.L.**, Small, C.L., Brown, J.L., Brunner, J.F. and Spence, K.D. (1997) Sporogenous midgut bacteria of the leafroller, *Pandemis pyrusana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Environmental Entomology*, 26, 1475-1481.
- Miyazaki I.**, Kawashima K., Hamajima F., Otsuru M. (1968). On a new lung-fluke, *Paragonimus sadoensis* sp. nov. found in Japan (Trematoda: Troglotrematidae). *Jap. J. Parasit.* 17: 149-159
- Moran N.A.** (2006). Symbiosis. *Current Biology* 16: 866-871
- Munson, M. A.**, Baumann, P. & Moran, N. A. (1992). Phylogenetic relationships of endosymbionts of mealybugs (Homoptera: Pseudococcidae) based on 16S rDNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 1, 26-30.
- Nam et al.** (2003). A novel catabolic activity of *Pseudomonas veronii* in biotransformation of pentachlorophenol. *Applied Microbiology and Biotechnology* **62** (2–3): 284–290.
- Nel, P.J.** (1983). *Deciduous fruits and vines: Pests and diseases and their control.* David Philip Publisher (Pty) Ltd.
- Ntougias S.**, Zervakis G., Fasseas C. (2007). *Halotalea alkalilenta* gen. nov., sp. nov., a novel asmotolerant and alkalitolerant bacterium from alkaline dye mill wastes, and emended description of the family *Halamonadaceae* Franzmann et.al. 1989, emend. Dobson and Frazmann 1996. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 1975-1983
- Ohkuma, M.** (2003). Termite symbiotic systems: efficient bio-recycling of lignocellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61, 1-9.

- Ohkuma**, M. and Kudo, T. (1996). Phylogenetic diversity of the intestinal bacterial community in the termite *Reticulitermes speratus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 461-468.
- Oliver**, J.D. (2000). Problems in detecting dormant (VBNC) cells, and the role of DNA elements in this response. *Tracking Genetically-Engineered Microorganisms* (eds. J.K. Jansson, J.D. van Elsas & M. Bailey), pp. 1-15.
- Onaca** et al. (2007). Degradation of alkyl methyl ketones by *Pseudomonas veronii*. *Journal of Bacteriology* **189** (10): 3759–3767.
- Pace**, N.R. (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 276, 734-740.
- Paster** B.J, Dewhirst F.E, Cooke S.M, Fussing V, Poulsen L.K, Breznak J.A. (1996). Phylogeny of not-yet-cultured spirochetes from termite guts. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:347-52
- Piel** et.al. (2002). A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles. *PNAS* 99: 14002-14007
- de Reede** R., Blommers, L., P. Alkema (1986). The effects of pesticides and other spraying material on the predacious mite *Typhlodromus pyri*. *Bull. SROP* 9(3): 60-62.
- Rock**, G. C. and P. L. Shaffer. (1983). Developmental rates of codling moth (Lepidoptera: Olethreutidae) reared on apple at four constant temperatures. *Environ. Entomol.* 12: 831- 834.
- 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
- Savage** DC. (1977). Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu. Rev. Microbiol.* 31:107-33
- Schröder** F., Franke S., Francke W., Baumann H., Kaib M., Pasteels J.M., Daloze D. (1996). A new family of tricyclic alkaloids from *Myrmecaria* ants. *Tetrahedron* 52: 13539-13546.
- Setyobudi**, L. (1989). Seasonality of codling moth, *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Olethreutidae) in the Willamette Valley of Oregon: role of photoperiod and temperature. *Ph.D. dissertation, Oregon State University*, 138pp.
- Shi** W., Syrenne R., Jian-Zhong Sun and Joshua S. Yuan (2010). Molecular approaches to study the insect gut symbiotic microbiota at the ‘omics’ age. *Insect Science* 17, 199-219

- Singh G.P.** (1981). Studies on the role of microorganisms in the metabolism of dieldrin in the epicuticular wax layer of blowflies *Calliphora erythrocephala*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 16(3): 256-266
- Sleator, R.D., Shortall, C. and Hill, C.** (2008) Metagenomics. *Letters in Applied Microbiology*, 47, 361-366.
- Smalla, K.** (2004). Culture-independent microbiology. *Microbial Diversity and Bioprospecting* (ed. A.T. Bull), pp. 88-99
- Smith, D. C. & Douglas, A. E.** (1987). *The Biology of Symbiosis*. London: Edward Arnold.
- Stokes, H.W., Holmes, A.J., Nield, B.S., Holley, M.P., Nevalainen, K.M.H., Mabbutt, B.C. and Gillings, M.R.** (2001). Gene cassette PCR: Sequence-independent recovery of entire genes from environmental DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 5240-5246.
- Tamas, I., Klasson, L., Canback, B., Naslund, A.K., Eriksson, A.S., Wernegreen, J.J., Sandstrom, J.P., Moran, N.A. and Andersson, S.G.E.** (2002) 50 million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria. *Science*, 296, 2376-2379.
- Tanada Y, Kaya H.K.** (1993). Associations between insects and nonpathogenic microorganisms. In *Insect Pathology*, pp. 12-51.
- Toth E, Kovacs G, Schumann P, Kovacs AL, Steiner U, et al.** (2001). *Schineria larvae* gen. nov., sp nov., isolated from the 1st and 2nd larval stages of *Wohlfahrtia magnifica* (Diptera: Sarcophagidae). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:401-7
- Tsiamis G., Katsaveli K., Ntougias S., Kyrpides N., Andersen G., Piceno Y., Bourtzis K.** (2008). Prokaryotic community profiles at different operational stages of a Greek solar saltern. *Reserch in Microbiology* 159, 609-627.
- Τζανακάκης Μ.Ε., Κατσόγιαννος Β.Ι.** (2003). (*Cydia pomonella*, *Laspeyresia pomonella*) (Lepidoptera, Tortricidae). Έντομα Καρποφόρων δένδρων & Αμπέλου 2003: 125-132
- Τσαπικούνης Φ.** (1999). *Παθολογία των εντόμων (Μικροβιολογική καταπολέμηση και συμβιωτικοί μικροοργανισμοί)*. pp. 213-221
- Van Eldere J** (2003). "Multicentre surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility patterns in nosocomial infections". *J. Antimicrob. Chemother.* 51 (2): 347–352.
- van Ham, R., Kamerbeek, J., Palacios, C., Rausell, C., Abascal, F., Bastolla, U., Fernandez, J.M., Jimenez, L., Postigo, M., Silva, F.J., Tamames, J., Viguera, E., Latorre, A., Valencia, A., Moran, F. and Moya, A.** (2003) Reductive genome evolution in *Buchnera aphidicola*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 581-586



**Varela L**, Welter SC, Jones VP, Brunner JF & Riedl H (1993) Monitoring and characterization of insecticide resistance in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in four western states. *Journal of Economic Entomology* 86: 1–10

**Ventosa, A.**, Nieto, J. J. & Oren, A. (1998). Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 504–544.

**Vickers, R. A.**, and G.H.L. Rothschild (1991). Use of sex pheromones for control of codling moth, pp. 339 -354. In L.P.S. van der Geest and H. H. Evenhuis [eds.], Tortricid pests: their biology, natural enemies and control. *World Crop Pests, vol. 5. Elsevier, Amsterdam.*

**Vorburger C**, Gehrler L, Rodriguez P. (2010). A strain of the bacterial symbiont *Regiella insecticola* protects aphids against parasitoids. *Biol. Lett.* 6: 109-111

**Vodovar N.** et al. (2006). Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. *Nat. Biotechnol.* 24: 673-679

**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

**Vries EJ**, Breeuwer JAJ, Jacobs G, Mollema C. (2001). The association of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, with a near *Erwinia* species gut bacteria: transient or permanent? *J. Invertebr. Pathol.* 77:120-28

**Weisburg, W. G.**, Barns, S. M., Pelletier, D. E. A. & Lane, D. J. (1991). 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173, 697-703.

**Whalon, M.E.**, Croft, B.A., (1984). Apple IPM implementation in North America. *Ann. Rev. Ent.* 29: 435-470.

**Wilson K. H.**, Wilson W. J., Radosevich J. L., DeSantis T. Z., Viswanathan V. S., Kuczmariski T. A. and Andersen G. L. (2002). High-density microarray of small-subunit ribosomal DNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2535-2541

**Wilkinson D.M.** (2001). At cross purposes. *Nature* 412: 485

**Χατζή I.** (2010). Μελέτη βακτηριακής χλωρίδας στο έντομο *Cydia pomonella* (καρπόκαφα). Master thesis. University of Thessaly, Department of Biochemistry and Biotechnology. Larisa.

**Zhou J.** and Thompson D. K. (2002). Challenges in applying microarrays to environmental studies. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 204-207

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

➤ **BA1.1.A-2** (440 letters)

GTGGATCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTACGGTTACCTTGTACGACT  
TCACCCAGTCATGAATCACACCGTGGTAACCGTCCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTC  
TGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCA  
CCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACT  
GCGATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCT  
GTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTC  
ATCCACCTTCTCCGGTTTTGTCACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATTACGTGCT  
GGTAACTAAGGAAAA

➤ **BA1.1.A-3** (604 letters)

ATCCGCGGTGCGCCGCTCTAAACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTC  
GCCCTTACGGTTACCTTGTACGACTTCACCCAGTCATGAATCACACCGTGGTAACCGTC  
CTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTG  
TGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCG  
ACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCT  
CCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCG  
TAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTTGTCACCGGCAGTCTCC  
TTAGAGTGCCACCATTACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGAC  
TTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGTTTT  
CCGAAGGCACCAATCTATCTCTAGAAAGTTCATTGGATGTCAAGGCCTGGTAAAGTT

➤ **BA1.1.A-5** (531 letters)

CCTTGTACGANCTTCACCCAGTCATGAATCACTCCGTGGTAACCGTCCCCCTTGCGGTT  
AGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCC  
CGGGAACGTATTACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAG  
TCGAGTTGCAGACTCGGACTCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGG  
CTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCAT  
GATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTTGTCACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCC  
CACCATTACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAAC  
ATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGNCTCAATGTTCCCGAAGGCAC  
CAATCTATCTCTAGAAAGTTCATTGGATGTCAAGGGCCTGGTAAAGTT

➤ **BA1.1.A-7** (470 letters)

CTCCCGCGGTGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAA  
TTCGCCCTTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCA  
AGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTA  
ATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCA  
TAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGAT  
GGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAG  
AGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGTAGACACNGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT  
GGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGT

➤ **BA1.1.A-8** (538 letters)

TGCGGTTACCTTGTTACGACTTGGCGCCTAAACAATTCCAAATAATATATAAACTTGTGCT  
TTTTACAGTGTCCTTAACTCCTTACAAACATTATCATAATGATCAATATTGGTAAGACGCT  
CTACATAGCTATAATATTTAGTCCTATGCTTACATAAGTATGAGAGCGGCGTTAAACCATG  
TCGCAAGCGCACATCGTATNGGTTTCGAATAGTCACCTGATTCCGAGAGTTGCCACACGA  
GATAACCGCAATGCCCAAAAATAGTAGCAAGTACATAAATAAGTATGTGTACATGCGGCT  
GTGCTGAGCCAGGATCANACTCTAAGGGCGAATTCCACAGTGGATATCGAGCTTATCGAT  
ACCGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCCAGCTTTTGTTCCTTTTATGTAGGGGTTAAA  
TTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTTATCCGCTCAC  
AATCCACACAACATACGAGCCGGGAGCATAAAGNGTAAAGCCTGGGGGGCC

➤ **BA1.1.A-9** (480 letters)

TGGAACTCCCGCGGTGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGCCCA ATG  
TGGAATTCGCCCTTACGGTTACCTTGTTACGACTTCACCCAGTCATGAATCACACCGTGG  
TAACCGTCCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGAC  
GGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTA  
GCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTATG  
GGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAG  
CCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTATCCCCACCTTCTCCGGTTTTGTCACCG  
CGAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATTACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGA

➤ **BA1.1.A-10** (559 letters)

GTGGAATTCGCCCTTACGGTTACCTTGNTACGACTTCACCCAGTCATGAATCACACCGTG  
GTAACCGTCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGA  
CGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACT  
AGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTAT  
GGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTA  
GCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACC  
GGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATTACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTC  
GTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGT  
CTCAATGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAGGTTCAATTGGATGTCAAGNCTG  
GTAAGGTCTTCGCG

➤ **BA1.1.A-11** (575 letters)

TGGATCCCCGGGCTGCANCCCAATGTGGAATTCGCCCTTACGGTTACCTTGTTACGACTT  
CACCCAGTCATGAATCACACCGTGGTAACCGTCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCT  
GGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCAC  
CGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTG  
CGATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTG  
TACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCA  
TCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCAGGAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATTACGTGCTG  
GTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAG  
CTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGTTCCCGAAGGCACCAATCTATCTTAGAA  
AGTTCATTGGATGTCAAGGCCTGGTAAGG

➤ **BA1.1.A-12** (608 letters)

CCGCGGTGCGCCGCTCTAAACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGC  
CCTTACGGTTACCTTGTTACGACTTCACCCAGTCATGAACCACTCCGTGGTAACCGTCCC  
CCTTGCGGTTAGACTAGCTACTTCTGGAGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTG  
TACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGACATTCTGATTACGATTACTAGCGATTCCGAC  
TTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCC  
ACCTCGCGGCTTGGCAACCCTTTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTA  
AGGGCCATGATGACTTGACGTATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCAGGAGTCTCCTT  
AGAGTGCCCAACCAACCGTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTT  
AACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGTACCTGTGTCTGAGTCCC

GAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCAGCATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCG  
CG

➤ **BA1.1.B-3** (471 letters)

TCCCGCGGTGCGGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAAT  
TCGCCCTTACGGTTACCTTGTACGACTTCACCCCAGTCATGAATCACACCGTGGTAACCG  
TCCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGG  
TGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATT  
CGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAG  
CTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGCGTGTAGCCCAGGC  
CGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTTGTCACCGGCAGTCT  
CCTTAGAGTGCCACCATTACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGT

➤ **BA1.1.B-5** (474 letters)

GGGACTCCGCGGTGCGGGCCGCTCTANAAGTGGATCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTG  
GAATTCGCCCTTACGGTTACCTTGTACGACTTCACCCCAGTCATGAATCACACCGTGGTA  
ACCGTCCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGG  
GCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGC  
GATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGG  
ATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGCGTGTAGCC  
CAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTTGTCACCGGC  
AGTCTCCTTANAGTGCCACCATTACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGG

➤ **BA1.1.B-7** (464 letters)

GCGGCCGCTCTANAAGTGGATCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTT  
ACGGTTACCTTGTACGACTTCACCCCAGTCATGAATCACACCGTGGTAACCGTCCTCCCG  
AAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTAC  
AAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTC  
ACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACC  
TCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGCGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAG  
GGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTTGTCANCGGCAGTCTCCTTAG  
AGTGCCACCATTACGTGCTGGTAACTAAGGACATGGTTG

➤ **BA1.1.B-9** (446 letters)

GGATCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTACGGTTACCTTGTACGACTTC  
ACCCCAGTCATGAATCACACCGTGGTAACCGTCCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTG  
GTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACC  
GCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGC  
GATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGT  
ACCGACCATTGTAGCACGCGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCAT  
CCCCACCTTCCTCCGGTTTTGTCACCGGCAGTTCTCCTTAGAGTGCCACCATTACGTTGCT  
GGTAACTAAGGACAAGGGA

➤ **BA1.1.B-11** (642 letters)

CTCTAAAATANTGGATCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTACGGTTA CCT  
TGTTACGACTTCACCCCAGTCATGAATCACACCGTGGTAACCGTCCTCCCGAAGGTTAGAC  
TAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGG  
AACGTATTCACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGA  
GTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTG  
GCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGCGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATG  
ACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTTGTCACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCNACCA  
TTACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTC  
ACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGTTCCCGAAGGCACCAATC

TATCTCTANAAAGTTCATTGGATGTCANGGNCTGGTAAGGTTCTTCNCGTTGCTNCAATTT  
AAACAAATGCTCNACGGCTTGGGNGGGCCCCNGTCA

➤ **BA1.1.B-12** (545 letters)

TGTGCTTTTTACNGTGCCTTAACTCCTTACAAACATTATCATAATGATCAATATTGGTAAG  
ACGCTCTACATAGCTATAATATTTAGTCCTATGCTTACATAAGTATGAGAGCGGCGTTAAA  
CCATGTCGCAAGCGCACATCGTATTGTTTCGAATAGTCACCTGATTCCGAGAGTTGCCACA  
CGAGATAACCGCAATGCCAAAAATAGTAGCAAGTACATAAATAAGTATGTGTACATGCA  
GCTGTGCTGAGCCAGGATCCAACCTCTAAGGGCGAATTCACAGTGGATATCAAGCTTATC  
GATACCGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCCGGTACCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTA  
ATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATGTATCCGCTCA  
CAATTCCACACAACATAACNAGCCGGGAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAG  
TGAGCTACTCACATTAATTGCGTGGCGCTCATGNCCGCTTTCNGTCGNAACCTGTCTG

➤ **BA1.1.C-1** (629 letters)

AGTCCGCGGTGCGGCCGCTCTAAACTAGTGGATCCCCGGGCTGCCNCCAATGTGGAAT  
TCGCCCTTACNGTTNCCTTGTTACGACTTCACCCCAGTCATGAATCACACCGTGGTAACCG  
TCCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGGCGG  
TGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATT  
CGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGACTCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAG  
CTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCCTGTACCCGACTTGTAGCACGTGTGTAGCCAGCCAGG  
CGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTACATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCT  
CCTTAGAGTGCCACCATACGTGCTGGTAACCTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGG  
ACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGT  
TCCCGAAGGCACCAATCTATCTCTAAAAAGTTCATTGGATGTCAAGGCCTGGTAAGGTNCT  
NCGCGTTGCTTCNAATTAAACT

➤ **BA1.1.C-7** (580 letters)

CGCTGGCGGCNGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGAGAGAAGCTTGCTTCTCTTGA  
GAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTTCGG  
AAACGGACGCTAATACCGCATAACGTCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTTGC  
GCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCCGA  
CGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGTGACACGGTCCAGAC  
TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATG  
CCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGANGAGGGTTGT  
AGATTAATACTCTGCAATTTTACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTANCTCTGTGCCA  
GCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGNAATTACTGGGCGTAAAGCCGCN  
CGTANGTGGTTTGTAAAGTTGGATGTNANTCCCNGGCTC

➤ **BA1.1.C-8** (582 letters)

CCTTGTTACGACTTCACCCAGTCATGAATCAGACCGTGGTAACCGTCCTCCCGAAGGTTA  
GACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCC  
GGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGT  
CGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGG  
TTGGCAACCCCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATG  
ATGACTTGACGTACATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCC  
ACCATTACGTGCCGGTAACCTAANGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACA  
TCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGTTCCCGAAGGCACC  
AATCTATCTCTAGAAAAGTCATTGGATGTCAAGGCCTGGTAAGGTGCTTCGCGTNGCTTCAA  
ATAAACNACATGCTCACCGCTTGNCGGNCCCCGTC

➤ **BA1.1.C-12** (522 letters)

GGACTCCGCGGTGCGGCCGCTCTAAACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGA  
ATTCGCCCTTACGGTTACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTCATGAATCACACCGTGGTAAC

CGTCCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGC  
GGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGA  
TTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGAT  
TAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCA  
GGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAG  
TCTCCTTAGAGTGCCACCATTACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACG  
GGACTTAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGA

➤ **BA1.1.D-2** (587 letters)

GTCCTGGCTCENNATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGAGA  
GAAGCTTGCTTCTTGTAGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTA  
GTGGGGGATAACGTTTCGGAACGGACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCA  
GGGGACCTTCGGGCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGG  
TAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGA  
ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGC  
GAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTT  
AAGTTGGGAGGAAGGGTTGTAGATTAATACTCTGCANTTTTGACGTTACCGACAGAATAA  
GCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTNATCGAAT  
TACTGGGCGTAAGCNCCCCTAGGTGGTTTGTAAATTGGATGTGAATCC

➤ **BA1.1.D-4** (592 letters)

GTGGAATTCGCCCTTACGGTTACCTTGTACGACTTCACCCCAGTCATGAATCACACCGTG  
GTAACCGTCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGA  
CGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACT  
AGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTAT  
GGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTA  
GCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACC  
GGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATTACGTGCTGGTAACTAANGACAAGGGTTGCGCTC  
GTTACGGGACTTAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGT  
CTCAATGTTCCCGAAGGCACCAATCTATCTTAGAAAAGTTCATTGGATGTCAAGGCCTGGT  
AAGGTNCTTCGCGTTGCTTCNAATTAACCCATGCTCCACCGCTTG

➤ **BA1.1.D-5** (522 letters)

CTCCGCGGTGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGCCC AATGTGGAAT  
TCGCCCTTACGGTTACCTTGTACGACTTCACCCCAGTCATGAATCACACCGTGGTAACCG  
TCCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGG  
TGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATT  
CGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAG  
CTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGC  
CGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCT  
CCTTAGAGTGCCACCATTACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGG  
ACTTAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGAAG

➤ **BA1.1.D-6** (584 letters)

CCTTGTTACGACTTCACCCCAGTCATGAATCACACCGTGGTAACCGTCTCCCGAAGGTTA  
GACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCC  
GGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGT  
CGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGG  
TTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATG  
ATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTAGAGTCCC  
ACCATTACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCAACA  
TCTCACGACAGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGTTCCCGAAGGCACC  
AATCTATCTTAGAAAAGTTCATTGGATGTCAAGGGCCTGGTAAAGTTCTTCGCGTTGCTTC  
NAATTAACNACATGCTCCACCGCTNGNGCGGNCCCCGT

➤ **BA1.1.D-7** (624 letters)

GATCCCCCGGGCTGCNGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTACGGTTACCTTGTTACGACTTCA  
CCCCAGTCATGAATCACACCGTGGTAACCGTCCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGG  
TGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG  
CGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCG  
ATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGAACCCCTCTGTA  
CCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATC  
CCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATACGTGCTGGT  
AACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCT  
GACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGTTCCCGAAGGCACCAATCTATCTCTANAAA  
GTTCAATTGGATGTCANGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTNCAAATTAACACATGCTC  
CACCGCTGGGGGGGCCCC

➤ **BA1.1.D-8** (600 letters)

GTGGAATTCGCCCTTACGGTTACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTCATGAATCACACCGTG  
GTAACCGTCCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGA  
CGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTCGCGATTACT  
AGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGGTCCGGACTACGATCGGTTTTAT  
GGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGAACCCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTA  
GCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCC  
GGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTC  
GTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGT  
CTCAATGTTCCCGAAGGCACCAATCTATCTCTAGAAAGTTCATTGGATGTCAAGGCCTGGT  
AAGGTTCTTCGCGTTGCTNCAAATAAACCCATGCTCCCCGCTTGNGNGGGGCCCC

➤ **BA1.1D-9** (630 letters)

GATCCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTACGGTTACCTTGTTACGACTTCA  
CCCCAGTCATGAATCACGCCGTGGTAACCGTCCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGG  
TGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG  
CGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCG  
ATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGAACCCCTCTGTAC  
CGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCC  
CCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATACGTGCTGGTA  
ACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTG  
ACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGTTCCCGAAGGCACCAATCTATCTCTAGAAAG  
TTCATTGGATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCAAATTAACCCACATGCTC  
CACGGCTTGNGCGGGCCCCGTC

➤ **BA1.1.E-3** (627 letters)

ATCCCCCGGGCTGCNNCCCATGTGGAATTCGCCCTTACGGTTACCTTGTTACGACTTCACC  
CCAGTCATGAATCACACCGTGGTAACCGTCCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTG  
CAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCG  
ACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGAT  
CCGGACTACGATCGGTTTTATNGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGAACCCCTCTGTACC  
GACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCC  
CACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATACGTGCTGGTAA  
CTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGA  
CGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGTTCCCGAAGGCACCAATCTATCTCTAGAAAGTT  
TCATTGGATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCAAATAAACCCACATGCTCNA  
CCGCTGGNGNGGGCCCCGTC

➤ **BA1.1.E-5** (623 letters)

GGATCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTACGGTTACCTTGTTACGACTTG  
GCGCCTAAACAATTCCAAATAATATAAACTTGTGCTTTTTACGGTGTCTTAACTCCTT  
ACAAACATTATCATAATGATCAATATTGGTAAGACGCTCTACATAGCTATAATATTTAGTC  
CTATGCTTACATAAGTATGAGAGCGGCGTTAAACCATGTGCGCAAGCGCACATCGTATTGTT  
TCGAATAGTCACCTGATTCGAGAGTTGCCACACGAGATAACCGCAATGCCAAAAATAG  
TAGCAAGTACATAAATAAGTATGTGTACATGCGGCTGTGCTGAGCCAGATCAAACCTCTAA  
GGCGAATTCACAGTGGATATCAAGCTTATCGATACCGTTCGACCTCGAGGGGGGGCCCG  
GTACCCAGCTTTTGTCCCTTTAGTGAGGGTAAATTGCNCGCTTGGCGTAATCATGGTCAT  
AGCTGTTTCTGTGTGAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCNNGGAG  
CATAAAGTGTAAAGCCNNGGGTGCCTAATGNGTGANCTACTCNCNTNATTGNGTGCGCCN  
CNGCCCCTTTCCAGTC

➤ **BA1.1.E-6** (516 letters)

GCGGTGCGGCCGCTCTAAAAGTGGATCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGC  
CCTTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTC  
GAGCGGTAGAGAGAAGCTTGCTTCTTTGAGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGA  
ATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTTCGAAACGACGCTAATACCGCATAACGTCCTAC  
GGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCT  
AGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCA  
GTCACACTGGAAGTGANACACGGTCCANACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTG  
NACANTGGGCGAANGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTNCGGATTGT  
AAGCACTTTAAGTTGGGAAGAAGGGTTGTANATTAT

➤ **BA1.1.E-7** (629 letters)

ATCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTACGGTTACCTTGTTACGACTTCAC  
CCCAGTCATGAATCACAAAGTGGTAAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTT  
GCAGACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG  
TGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCA  
ATCCGGACTACGACGCACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTA  
TGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCC  
CCACCTTCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCTAACCGCTGGCAA  
CAAANGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAACACGAGCTGA  
CGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAATCNAATCTCTGGAAAGT  
TCTCTGGATGTCAANANTANGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCNAATNAACNACATGCTCCA  
CNGCTTGNGNGGGGCCCCCGTCA

➤ **BA1.1.E-8** (648 letters)

GGATCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTACGGTTACCTTGTTACGACTTC  
ACCCAGTCATGAATCACACCGTGGTAACCGTCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTG  
GTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACC  
GCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGC  
GATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGT  
ACCGACCATTTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGCCATAAGGGCCATGATGACTTGACGTCAT  
CCCCACCTTCTCCGTTTTGTCACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATACGTGCTGG  
TAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGC  
TGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGTTCCCGAAGGCACCAATCTATCTCTANAA  
AGTTCATTGGATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCAAATTAAACCACANGC  
TCCACCGCTTGNGCGGGCCCCNGTCAATTCATTTGAGTTTTT

➤ **CA.1.A-2** (604 letters)

ACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTACGGTTACCTTGTTAC  
GACTTCACCCAGTCATGAACCACACCGTGGTACCCTTCTCCCGAAGGTTAAACTAGCC  
ACTTCTGGTGCAATCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGT  
ATTCACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGC  
AGACTCCAATCCGGACTGAGGCGAGCTTTCTGGAGATTGGCTTCACGTCGCCGCTTCGCAA



CCCTCTGTACTCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACCCGTAAGGGCCATGATGACTTG  
ACGTCGTCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTAGAGTTCCCGACCGAAT  
CGCTGGCAAATAAGGATAGGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATTTACAAC  
ACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCANANTTCCGAAGGCACCCCTCCATCTC  
TGGAAGTCTCTGGATGTCAAGGGTANGTAAGGTNCTTCGCGTTGCATCGAATTAATA

➤ **CA.1.A-3** (591 letters)

TGGATCCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGA  
TTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCACGGGGAGCTTGCTC  
CCTGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCATGGGAATCTGCCCGGTAGTGGGGGAT  
AACGTGTGAAACGCACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGGAGGGGATCCG  
TGTTCTTCGGAATGGGGACCTTCCGCTATCGGATGAGCCCATGTCCGATTAGCTAGTTGGT  
AGGGTAAAGGCCTACCAAGGCAACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACAC  
TGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAAT  
GGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAANGCCTTCGGGTTGTAAAGCA  
CTTTCAGCGANGAAGAACGCCTTTGGGTTAATACCCTGGANGGGGGACGTAACGCAAAA  
NAANCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGNTAATACGGAGGGTGCAT

➤ **CA.1.A-7** (601 letters)

ACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTACGGTTACCTTGTTAC  
GACTTACCCAGTCATGAACCACACCGTGGTGACCGTTCTCCGAAGGTTAAACTAGCC  
ACTTCTGGTGCAATCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGT  
ATTCACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGC  
AGACTCCAATCCGGACTGAGGCGAGCTTTCTGGGATTGGCTTACGTCGCCGCTTCGCAAC  
CCTCTGTACTCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACCCGTAAGGGCCATGATGACTTGA  
CGTCGTCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTAGAGTTCCCGACCGAATC  
GCTGGCAAATAAAGGATAGGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATTTACAAC  
ACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCANANTTCCCGAAGGCACCCCTCCATCT  
CTGGAAGNTCTCTGGATGTCAANGGGTAGGTAAGGTTCTTCNCGTTGCATCGAAT

➤ **CA.1.A-9** (627 letters)

TGACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTAGAGTTTGATCCTG  
GCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCACGGGGA  
GCTTGCTCCCTGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCATGGGAATCTGCCCGGTAG  
TGGGGGATAACGTGTGAAACGCACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGGAG  
GGGATCCGTGTTCTTCGGAATGGGGACCTTCCGCTATCGGATGAGCCCATGTCCGATTAGC  
TAGTTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCAACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATC  
AGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT  
TGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTG  
TAAAGCACTTTCAGCGAGGANGAACGCCTTTGAGTTAATACCCTGGAGGGGGGACGTTAC  
TCCCAAAAAAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACNGANGGTGCNA  
CGGTTAATCNGAATTTCTGGGCGTAAGGG

➤ **CA.1.A-12** (580 letters)

TGGATCCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGA  
CACGGTAGTAGAAAGCAACTCTTAGCCATTTTGTAAATCATTGGATATATATTTAAGA  
ATTAATTAAGTTAAGTTCAATTTAATCAACTCCGCAAGGCTCTAGAACTATTTCCATT  
TGTGCAATAGAATTTTCAATGCTTGTCTCTCTCTAATGATGGAGCGGCCACCGAATTC  
ATAACCGAATTGTCAAACGTCAAATGTCCAATTAAGGACGACTCCATCCACTCTTTG  
AGACGATTCTGATATAGCAATTTGTTATGGCTTTCAACTGGTTTTGACACGACTTTGTAG  
ATCGTTTTCGCTGATTGGTACTTGTGAAATCACGACTAGTGCTGGTGTAGACTGAGTCCGA  
TTGGTACCTTTATTCAATTTAATCGTGTTCGCAACACGAATACGGCCCCAGAAACCTGGATG

TCAGGCATTCCCTTTTAAACGTCTCANNGGATATTAATTGCTGAATAATGANAAGGNCCGG  
CATGGTTCATAATTCAANATAATTGACTTGA

➤ **CA.1.B-1** (513 letters)

CGGTGCGGCCGCTCTAAACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCC  
CTTAGAGTTTGTATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGACGGTGTGCTTTAGGCATGCAAGTCG  
AACGAGAAAGCCCTTCGGGGTGAGTAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAAC  
CTGCCCTCGCAGGGGATAACCGGAGGAACTCCGGCTAATACCCGTAAGCTTTCAGG  
GTCGCATGTCCCTGTAAGGAAAGGTAGCTTCGGCCATCCGGCGAGGGATGGGCCCGCGGT  
GCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCCACCAAGGCGACGATGCGTAGCTGGTCTGAGA  
GGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGCC  
AGGAATCTTGGGCAATGGGCGCAAGCTGACCCAGCAACACCGTGTGGGCGATGAAGGC  
CTTCGGGTGTAAGCCCTGTTGATANGGACAAAGG

➤ **CA.1.B-2** (650 letters)

ACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTACGGTTACCTTGTTAC  
GACTTCACCCAGTCATGAACCACACCGTGGTGACCGTTCTCCCGAAGGTTAAACTAGCC  
ACTTCTGGTGCAATCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGT  
ATTCACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGC  
AGACTCCAATCCGGACTGAGGCGAGCTTTCTGGGATTGGCTTACGTCGCCGCTTCGCAAC  
CCTCTGTACTCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACCCGTAAGGGCCATGATGACTTGA  
CGTCGTCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTAGAGTTCCCGACCGAGT  
GCTGGCAAATAANGGATAGGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATTTACAAC  
ACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCANAATTTCCCGAANGCACCCCTCCATC  
TCTGGAAGGTCTCTGGATGTCANGGGTANGTAAGGTNCTNCCCGTNGCATCNAATAAACC  
ACATGCTCACCGCTTGNCGGNCCCGTCAATNCATTGAGTTTAGC

➤ **CA.1.B-5** (637 letters)

TGGATCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTACGGTTACCTTGTTACGACTT  
CACCCAGTCATGAACCACACCGTGGTGACCGTTCTCCCGAAGGTTAAACTAGCCACTTCT  
GGTGCAATCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTAC  
CGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTC  
CAATCCGGACTGAGGCGAGCTTTCTGGGATTGGCTTACGTCGCCGCTTCGCAACCCTCTG  
TACTCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCGT  
CCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTAGAGTTCCCGACCGAATCGCTGGC  
AAATAAGGATAGGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATTTACAACACGAGCT  
GACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCANANTTCCCGAAGGCACCCCTCCATCTCTGGAAG  
GTCCTCTGGATGTCAAGGGTANGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTC  
NACCGCTNGNGCGGGCCCCGTCAATTCATT

➤ **CA.1.B-6** (628 letters)

GTGGATCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTACGGTTACCTTGTTACGACT  
TCACCCAGTCATGAACCACACCGTGGTGACCGTTCTCCCGAAGGTTAAACTAGCCACTTC  
TGGTGCAATCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCA  
CCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACT  
CCAATCCGGACTGAGGCGAGCTTTCTGGGATTGGCTTACGTCGCCGCTTCGCAACCCTCT  
GTACTCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCG  
TCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTAGAGTTCCCGACCGAATCGCTGG  
CAAATAAGGATAGGGGTTGCGCTCGTTACAGGACTTAACCCAACATTTACAACACGAGC  
TGACGACAGCCATGCAGCACCTGCCTCAAANTTCCCGAAGGCACCCCTCNATCTCTGGA  
AGTCTCTGGATGTCAAGGGTANGTAAGTTCNCGTNGCATCNAATAAACCAATGCTC  
CCCGTGGGNGGGCCCCGTCA

➤ **CA.1.B-7** (630 letters)

TGGATCCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTACGGTTACCTTGTTACGACTT  
CACCCCAGTCATGAACCACACCGTGGTGACCGTTCTCCCGAAGGTTAAACTAGCCACTTCT  
GGTGCAATCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTAC  
CGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTC  
CAATCCGGACTGAGGCGAGCTTTCTGGGATTGGCTTCACGTCGCCGCTTCGCAACCCTCTG  
TACTCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCTG  
CCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTAGAGTTCCCGACCGAATCGCTGGC  
AAATAAAGGATAGGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATTTACAACACGAGC  
TGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAAANTTCCCGAAGGCACCCACCATCTCTGGAA  
GGTCTCTGGATGTCAAGGGTANGTAAGGTNCTNCNCGTNGCATCNAATTAACCAATGCT  
CCACCGCTTGNCGGGCCCCGTCA

➤ **CA.1.B-8** (636 letters)

GCTCTAAAAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTACGGTTAC  
CTTGTTACGACTTCACCCCAGTCATGAACCACACCGTGGTGACCGTTCTCCCGAAGGTTAA  
ACTAGCCACTTCTGGTGCAATCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCG  
GGAACGTATTACCCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTC  
GAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTGAGGCGAGCTTTCTGGGATTGGCTTCACGTCCGGCT  
TCGCAACCCTCTGTAAGTTCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACCCGTAAGGGCCATGAT  
GACTTGACGTCTGCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTAGAGTTCCCGA  
CCGAATCGCTGGCAAATAANGGATAGGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATT  
TTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCANAAATTCCCGAAGGCACCC  
CTCCATCTCTGGAAGGTCTCTGGATGTCAAGGGTANGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGA  
ATTAACCACATGCTCNACCGCTTGTGCGGNCCCCGTCAAT

➤ **CA.1.B-9** (630 letters)

TAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTACGGTTACCTTGTTACGA  
CTTCACCCCAGTCATGAACCACACCGTGGTGACCGTTCTCCCGAAGGTTAAACTAGCCACT  
TCTGGTGCAATCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATT  
CACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGA  
CTCCAATCCGGACTGAGGCGAGCTTTCTGGGATTGGCTTCACGTCCGGCTTCGCAACCCT  
CTGTAAGTTCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGT  
CGTCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTAGAGTTCCCGACCGAATCGCT  
GGCAAATAAAGGATAGGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATTTACAACACGA  
GCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGCCTCAAANTTCCCGAAGGCACCCCTCCATCTCTGG  
AAGTCTCTGGATGTCNNGGGNAAGNAAAGGTTTCCCGTTGCATCAAATNAACNACATG  
CTCCCGCTNNGGGGGCCCCGTCA

➤ **CA.1.B-10** (650 letters)

ACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTACGGTTACCTTGTTAC  
GACTTCACCCCAGTCATGAACCACACCGTGGTGACCGTTCTCCCGAAGGTTAAACTAGCC  
ACTTCTGGTGCAATCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGT  
ATTCACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGC  
AGACTCCAATCCGGACTGAGGCGAGCTTTCTGGGATTGGCTTCACGTCCGGCTTCGCAAC  
CCTCTGTAAGTTCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACCCGTAAGGGCCATGATGACTTGA  
CGTCTGCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTAGAGTTCCCGACCGAATC  
GCTGGCAAATAAAGGATAGGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATTTACAACA  
CGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCCGAAGGCACCCCTCCATCTCT  
GGAAGGTCTCTGGATGTCAAGGGTANGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACA  
CATGCTCNACNGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCATTGAGTTTA

➤ **CA.1.B-12** (637 letters)

GATCCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTAGAGTTTGTCTGGCTCANATT  
GAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCACGGGGAGCTTGTCCC  
TGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGANTAATGCATGGGAATCTGCCCGGTAGTGGGGGATA

ACGTGTGGAAACGCACGCTAATACCGCATAACGTCTACGGGAGAAAGGAGGGGATCCGT  
GTTCTCGGAATGGGGACCTTCCGCTATCGGATGANCCCATGTCCGATTAGCTAGTTGGTA  
GGGTAAAGGCCTACCAAGGCAACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACT  
GGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATG  
GGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAANGCCTTCGGGTTGTAAAGCAC  
TTTCAGCGAGGANGAACGCCTTTGGGTTAATACCCTGGANGGGGGACGTTACTCGCAAAA  
AAACACCGGCTAACTCCGTGCCAGCACCCCGGTAATACNGANGGTGCGAGCGTTAATCGN  
AATNCTGGGCTTAANGGCNCGTAAGCGGTCTGTAAACC

➤ **CA.1.C-2** (629 letters)

GTGGATCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTAGAGTTTGATCCTGGCTCAG  
ACACGGTAGTAGAAAGCAACTCTTAGCCCATTTTGTAAATCATTGGATATATATTTTAAG  
AATTAATTCAGTTAAGTTCAATTTAATCAACTTCCGCAAGGCTCTAGAACTATTTCCAT  
TTGTGCAATAGAATTTTCAATGCTTGTCTCTCTAAATGATGGAGCGCGCCACCGAATT  
CATAACCGAATTGTCAAACGTCAAATGTCCAATTAAGGACGACTCTATTCCACTCTTT  
GAGCAGATTCTGATATAGCAATTTGTTATGGCTTTCAACTGGTTTTGACACGACTTTGTA  
GATCGTTTTGCGCTGATCCGTACTTGTGAAATCACGACTAGTGCTGGTGTAGACTGAGTCCG  
ATTGGTACCTTTATTCAATTTAATCGTGTGCAACNANNATACGGCCCCAGAACCTGGATG  
TCAGGCATTCTTTTTAACGTCTCAANGGATATTAATTTGCTGANTAGTGAGAAGGGTCCG  
GCATTGNTTCATAAATNCATATTAATTGACTGGANTGCTGTTATTTGGCGANAGTTGCTCN  
GTTTTACCCACTCAAATCC

➤ **CA.1.C-3** (670 letters)

GCTCTAAANTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTACGGTTACC  
TTGTTACGACTTCACCCAGTCATGAACCACACCGTGGTGACCGTTCTCCCGAAGGTTAAA  
CTAGCCACTTCTGGTGCAATCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGG  
GAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCG  
AGTTGCAGACTCCAATCCGGACTGAGGCGAGCTTTCTGGGATTGGCTTCACGTCGCCGCTT  
CGCAACCCCTGTACTCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACCCGTAAGGGCCATGATG  
ACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTAGAGTTCCCGACC  
GAATCGCTGGCAAATAAGGATAGGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATTTCA  
CAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAAANTTCCCGAAGGCACCCCTCC  
ATCTCTGGAANGNCTCTGGATGTCANGGGTANGTAAGGTNCTTCCCGTTGCATCNAATTA  
ACCACATGCTCCACNGCTNNGGGCGGGCCCCGTCAATNCATTGANTTTAACCTTGCGGCGT  
AC

➤ **CA.1.C-4** (689 letters)

GGGCGCGCTCTAAACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTA  
CGGTTACCTTGTACGACTTCACCCAGTCATGAACCACACCGTGGTGACCGTTCTCCCGA  
AGGTTAAACTAGCCACTTCTGGTGCAATCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACA  
AGGCCCGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCA  
TGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTGAGGCGAGCTTTCTGGGATTGGCTTACGT  
CGCCGCTTCGCAACCCCTCTGTACTCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACCCGTAAGGG  
CCATGATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTAGAG  
TTCCCGACCGAATCGCTGGCAAATAAGGATAGGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCC  
AACATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAAANTTTCCCGAAG  
GCACCCCTCNATCTCTGGAAAGTCTCTGGATGTC AAGGGTANGTAAGGTTCTNCNCGTTG  
CATCGAATTAANCACATGCTCNACCGCTTGNCGGGCCCCGTCAATNCATTGAGTTTAACC  
TTGNGGCGTANTCCCAGGGTT

➤ **CA.1.C-5** (682 letters)

GCTCTAAANTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTACGGTTACC  
TTGTTACGACTTCACCCAGTCATGAACCACACCGTGGTGACCGTTCTCCCGAAGGTTAAA  
CTAGCCACTTCTGGTGCAATCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGG

GAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCG  
AGTTGCAGACTCCAATCCGGACTGAGGCGAGCTTTCTGGGATTGGCTTCACGTCGCCGCTT  
CGCAACCTCTGTACTCGCCATCGTAGCACGTGTGTAGCCCTACCCGTAAGGGCCATGATG  
ACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTAGAGTTCCCGACC  
GAATCGCTGGCAAATAAGGATAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATTTC  
CAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCANANTTCCCGAAGGCACCCCTCC  
ATCTCTGGAAGGTCTCTGGATGTCAAGGGTANGTAAGGTNCTNCNCGTTGCATCNAATT  
AACCACATGCTCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATNCNTTGANTTTAGCNTGNGGCGTAC  
TCCNAGGGGTCAAT

➤ **CA.1.C-6** (609 letters)

TGGATCCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGA  
TTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCACGGGGAGCTTGCTC  
CCTGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCATGGGAATCTGCCCGGTAGTGGGGGAT  
AACGTGTGGAACGCACGCTAATACCGCATAACGTCTACGGGAGAAAGGAGGGGATCCG  
TGTTCTTCGGAATGGGGACCTTCCGCTATCGGATGAGCCCATGTTCGGATTAGCTGGTTGGT  
AGGGTAAAGGCCTACCAAGGCAACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACAC  
TGGGACTGAAACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAAT  
GGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCNGGTTGTAAAGCA  
CTTTCAGCGAGNANGAACGCCTTTGGGTTAATACCCTGGANGGGGGACGTTACTCCCAA  
AAAACACCGGCTAACTCCNTGCCANCACCNCGGTAATACGGANGGTGCGANCGTAATCNG  
AATACTGGC

➤ **CA.1.C-7** (580 letters)

GGATCCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGAT  
TGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCACGGGGAGCTTGCTCC  
CTGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCGTGGGAATCTGCCCGGTAGTGGGGGAT  
AACGTGTGGAACGCACGCTAATACCGCATAACGTCTACGGGAGAAAGGAGGGGATCCG  
TGTTCTTCGGAATGGGGACCTTCCGCTATCGGATGAGCCCATGTTCGGATTAGCTGGTTGGT  
AGGGTAAAGGCCTACCAAGGCAACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACAC  
TGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAAT  
GGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAANGCCTTCGGGTTGTAAAGCA  
CTTTCAGCGANGANGAACGCCTTTGGGTTAATACCCTGGANGGGGGACGTTACTCGCAA  
ANAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCCCGGTAATAC

➤ **CA.1.C-8** (663 letters)

TGGATCCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTAGAGTTTACCTTGTTACGACTT  
CACCCCAGTCATGAACCACACCGTGGTGACCGTTCTCCCGAAGGTTAAACTAGCCACTTCT  
GGTGCAATCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTAC  
CGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTC  
CAATCCGGACTGAGGCGAGCTTTCTGGGATTGGCTTCACGTCGCCGCTTCGCAACCCTCTG  
TACTCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCGT  
CCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTAGAGTTCCCGACCGAATCGCTGGC  
AAATAANGATAGGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATTTACACAACACGAGCT  
GACGACAGCCATGCAGCACCTGCCTCAGANTTCCCGAAGGCACCCCTCATCTCTGGAAAG  
TCCTCTGGATGTCAAGGGTAGGTAAGNTCTNCCCCTGCATCNAATAAACNACATGCTCNA  
CNGCTNNGNNGGGCCCCGTCANTCATTNANTTTAACCTTGNNGCGTATCCCAGGGT

➤ **CA.1.C-9** (666 letters)

ACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTAGAGTTTACCTTGTTACG  
ACTTCACCCCAGTCATGAACCACACCGTGGTGACCGTTCTCCCGAAGGTTAAACTAGCCAC  
TTCTGGTGAATCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTAT  
TCACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAG  
ACTCCAATCCGGACTGAGGCGAGCTTTCTGGGATTGGCTTCACGTCGCCGCTTCGCAACCC  
TCTGTACTCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACG  
TCGTCACCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTAGAGTTCCCGACCGAATCGCT

GGCAAATAANGGATAGGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATTTACAACACG  
AGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCANANTTCCCGAAGGCACCCCTCCATCTCTG  
GAAGGTCTCTGGATGTCAAGGGTANGTAAGGTNCTTCCCGTTGCATCNAATTAACACA  
TGCTCNACNGCTNGNGCGGGCCCCGTCAATNCATTNANTTTAACCTTGNGGCGTACTCC

➤ **CA.1.C-10** (662 letters)

TGGATCCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTACGGTTACCTTGTTACGACTT  
CACCCAGTCATGAACCACACCGTGGTGACCGTTCTCCCGAAGGTTAACTAGCCACTTCT  
GGTGCAATCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTAC  
CGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTC  
CAATCCGGACTGAGGCGAGCTTTCTGGGATTGGCTTCACGTCGCCGTTTCGCAACCCTCTG  
TACTCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCTG  
CCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTAGAGTTCCCGACCGAATCGCTGGC  
AAATAAAGGATAGGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATTTACAACACGAGC  
TGACGACAGCCATGCAGCACCTGCCTCAAANTTCCCGAAGGCACCCCTCCATCTCTGGAA  
GTCCTCTGGATGTCAAGGGTANGTAAGGTNCTTCCCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTC  
ACCGTTGNGCGGGCCCCGTCAATNATTTGATTTNANCTTGNGGCGTACTCCAG

➤ **CA.1.C-11** (670 letters)

ACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTACGGTTACCTTGTTAC  
GACTTCACCCAGTCATGAACCACACCGTGGTGACCGTTCTCCCGAAGGTTAACTAGCC  
ACTTCTGGTGCAATCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGT  
ATTCACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGC  
AGACTCCAATCCGGACTGAGGCGAGCTTTCTGGGATTGGCTTCACGTCGCCGTTTCGCAAC  
CCTCTGTACTCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACCCGTAAGGGCCATGATGACTTGA  
CGTCGTCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTAGAGTTCCCGACCGAATC  
GCTGGCAAATAAGGATAGGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATTTACAACA  
CGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGANTTCCCGAAGGCACCCCTCCATCTCT  
GGAAAGTCTCTGGATGTCAAGGGTAAGTAAGGTTCTTCGCGTNGCATCNAATTAACAC  
ATGCTCACNGCTNGTGCGGGCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTANCTTGNGGCGTACTCC  
AGG

➤ **CA.1.D-1** (634 letters)

GGATCCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTACGGTTACCTTGTTACGACTTC  
ACCCAGTCATGAACCACACCGTGGTGACCGTTCTCCCGAAGGTTAACTAGCCACTTCTG  
GTGCAATCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACC  
GCAACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCC  
AATCCGGACTGAGGCGAGCTTTCTGGGATTGGCTTCACGTCGCCGTTTCGCAACCCTCTGT  
ACTCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCTG  
CCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTAGAGTTCCCGACCGAATCGCTGGCA  
AATAAGGATAGGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATTACACAACACGAGCTG  
ACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCANANTTCCCGAAGGCACCCCTCCATCTCTGGAAAG  
TCTCTGGATGTCAAGGGTANGTAAGTTCTNCGGTTGCATCNAATTAACNACATGCTCCA  
CCGTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCATT

➤ **CA.1.D-2** (668 letters)

GGATCCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTAGAGTTTGTATCCTGGCTCAGAT  
TGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCACGGGGAGCTTGCTCC  
CTGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCATGGGAATCTGCCCGGTAGTGGGGGAT  
AACGTGTGAAACGCACGCTAATACCGCATACTCCTACGGGAGAAAGGAGGGGATCCG  
TGTTCTTCGGAATGGGGACCTTCCGCTATCGGATGAGCCCATGTCCGATTAGCTGGTTGGT  
AGGGTAAAGGCCTACCAAGGCAACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACAC

TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAAT  
GGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAANGCCTTCGGGTTGTAAAGCA  
CTTTCAGCGAGGANGAACGCCTTTGGGTTAATACCCTGGAAGGGGGGACGTTACTCNCAA  
AAAAANCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCANCCGCGGTAATACNGAGGGTGCNAGCGTTA  
ATCCGAANTACTGGGCGTAANGGCCCNTANGCGGTCTGTTAACCNAAATNTGAAACCCCGG  
CTCACCTGGA

➤ **CA.1.D-3** (671 letters)

ACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTACGGTTACCTTGTTAC  
GACTTCACCCAGTCATGAACCACACCGTGGTGACCGTTCTCCCGAAGGTTAAACTAGCC  
ACTTCTGGTGCAATCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGT  
ATTCACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGC  
AGACTCCAATCCGGACTGAGGCGAGCTTTCTGGGATTGGCTTACGTCGCCGCTTCGCAAC  
CCTCTGTACTCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACCCGTAAGGGCCATGATGACTTGA  
CGTCGTCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTAGAGTTCCCGACCGAATC  
GCTGGCAAATAAGGATAGGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATTTACAACA  
CGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCCGAAGGCACCCCTCCATCTCT  
GGAAGGTCCTCTGGATGTCAAGGGTANGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATNAAACAC  
ATGCTCNACNGCTGGNGCGGGCCCCGTCAATTCATTGANTTTTANCCTTGNGGCGTACTCC  
CAGG

➤ **CA.1.D-4** (670 letters)

AACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTACGGTTACCTTGTTA  
CGACTTCACCCAGTCATGAACCACACCGTGGTGACCGTTCTCCCGAAGGTTAAACTAGCC  
ACTTCTGGTGCAATCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACAT  
ATTCACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGC  
AGACTCCAATCCGGACTGAGGCGAGCTTTCTGGGATTGGCTTACGTCGCCGCTTCGCAAC  
CCTCTGTACTCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACCCGTAAGGGCCATGATGACTTGA  
CGTCGTCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTAGAGTTCCCGACCGAATC  
GCTGGCAAATAAGGATAGGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATTTACAACA  
CGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCCGAAGGCACCCCTCCATCTCT  
GGAAGGTCCTCTGGATGTCAAGGGTANGTAAGNTCTTCGCGTNGCATCGAATTAANCACA  
TGCTCNACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATNCATTGAGTTTANCCTTGCGGCGTACTCCCA  
GG

➤ **CA.1.D-6** (418 letters)

TGGATCCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTACGGTTACTTGTTACGACTTC  
ACCCAGTCATGAACCACACCGTGGTGACCGTTCTCCCGAAGGTTAAACTAGCCACTTCTG  
GTGCAATCCACTCCCCTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACC  
GCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCC  
AATCCGGACTGAGGCGAGCTTTCTGGGATTGGCTTACGTCGCCGCTTCGCAACCCTCTGT  
ACTCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCGTC  
CCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTAAAGTTCCCGACCGAAT

➤ **CA.1.D-8** (475 letters)

GCGGCCGCTCTAAACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTAC  
GGTTACCTTGTTACGACTTCACCCAGTCATGAACCACACCGTGGTGACCGTTCTCCCGAA  
GGTTAAACTAGCCACTTCTGGTGAATCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAA  
GGCCCCGGGAACGTATTACCCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCAT  
GGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTGAGGCGAGCTTTCTGGGATTGGCTTACGT  
CGCCGCTTCGCAACCCTCTGTACTCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACCCGTAAGGG  
CCATGATGACTTGACGTCGTCGCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTANAG  
TTCCCGACCGAATCGCTGGCAATAAGGATAGGGGTTGCGCTCGTTACGGGA

➤ **CA.1.D-10** (436 letters)

GGATCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTACGGTTACCTTGTTACGACTTC  
ACCCAGTCATGAACCACACCGTGGTGACCGTTCTCCCGAAGGTTAAACTAGCCACTTCTG  
GTGCAATCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACC  
GCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCC  
AATCCGGACTGAGGCGAGCTTTCTGGGATTGGCTTCACGTCGCCGCTTCGCAACCCTCTGT  
ACTCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCGTC  
CCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTAGAGTTCCCGACCGAATCGCTGGCA  
AATAAGGATA

➤ **CA.1.E-2** (499 letters)

CTACAAGTGGATCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTAGAGTTTGATC  
CGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCACGGG  
GAGCTTGCTCCCTGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCATGGGAATCTGCCCGGT  
AGTGGGGGATAACGTGTGGAACGCACGCTAATACCGCATAACGTCTACGGGAGAAAGG  
AGGGGATCCGTGTTCTTCGGAATGGGGACCTTCCGCTATCGGATGAGCCCATGTCCGATTA  
GCTGGTTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCAACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGA  
TCAGCCACACTGGGACTGAAACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT  
ATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGG  
TTGTAAAGCACTTTCAGCGA

➤ **CA.1.E-4** (515 letters)

GGATCCCCGGGCTGCAGCCCAATGTGGAATTCGCCCTTACGGTTACCTTGTTACGACTTC  
ACCCAGTCATGAACCACACCGTGGTGACCGTTCTCCCGAAGGTTAAACTAGCCACTTCTG  
GTGCAATCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACC  
GCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCC  
AATCCGGACTGAGGCGAGCTTTCTGGGATTGGCTTCACGTCGCCGCTTCGCAACCCTCTGT  
ACTCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCGTC  
CCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTANAGTTCCCGACCGAATCGCTGGCA  
ATAANGATAGGGGNTTGCCTCGTTACGGGAACTTAANCCAACATTTTCAACACGAGCT  
GACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAA