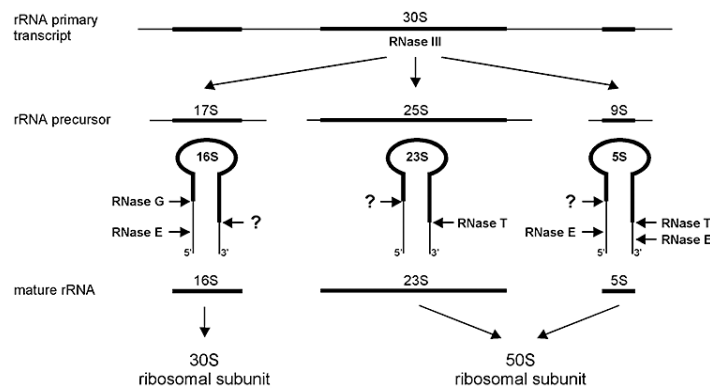


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Π.Μ.Σ. «Βιοτεχνολογία και εφαρμογές στη γεωπονία»
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: «ΜΟΡΙΑΚΗ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΑ
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ»

**Μοριακή Ανάλυση των Εσωτερικών Μεταγραφόμενων Περιοχών των
Οπερονίων των Ριβοσωμικών rRNA (ITS1 και ITS2) από τα
Αζωτοδεσμευτικά Βακτήρια *Pseudomonas stutzeri***

ΠΑΓΩΝΑ-ΑΡΤΕΜΙΣ ΚΑΤΙΝΑΚΗ



ΑΘΗΝΑ 2012

Π.Μ.Σ. «Βιοτεχνολογία και Εφαρμογές στη Γεωπονία»
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: «ΜΟΡΙΑΚΗ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΑ
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΑΓΩΝΑ-ΑΡΤΕΜΙΣ ΚΑΤΙΝΑΚΗ

**Μοριακή ανάλυση των εσωτερικών μεταγραφόμενων περιοχών των οπερονίων
των ριβοσωμικών rRNA (ITS1 και ITS2)
από τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια *Pseudomonas stutzeri***

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:
ΠΟΛΥΔΕΥΚΗΣ ΧΑΤΖΟΠΟΥΛΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Αθήνα 2012

Η ΑΝΑΘΕΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΜΕ ΘΕΜΑ: «Μοριακή ανάλυση των εσωτερικών μεταγραφόμενων περιοχών των οπερονίων των ριβοσωμικών rRNA (ITS1 και ITS2) από τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια *Pseudomonas stutzeri*», ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΜΕ ΑΠΟΦΑΣΗ ΤΗΣ ΓΕΝΙΚΗΣ ΣΥΝΕΛΕΥΣΗΣ ΕΙΔΙΚΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ (12/29.3.2011) ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ. Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ. ΟΡΙΣΤΗΚΕ ΜΕ ΑΠΟΦΑΣΗ ΤΗΣ ΓΣΕΣ (7/27.1.2008) ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Χατζόπουλος Πολυδεύκης, καθηγητής (επιβλέπων)

Χατζηπαυλίδης Ιορδάνης, Επίκουρος Καθηγητής (συνεπιβλέπων)

Ταμπακάκη Αναστασία, Λέκτορας (μέλος)

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών 'Μοριακή Οικολογία & Ανίχνευση Γενετικά τροποποιημένων Οργανισμών'.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή κ. Πολυδεύκη Χατζόπουλο για την αμέριστη συμπαράσταση και τη υπομονή που έδειξε κατά τη διάρκεια υλοποίησης της εργασίας. Όπως επίσης και για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή του στην επίλυση διαφόρων θεμάτων.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Χατζηπαυλίδη Ιορδάνη και τη Λέκτορα κ. Ταμπακάκη Αναστασία για τον χρόνο που μου αφιέρωσαν και τις εύστοχες παρατηρήσεις τους.

Θα ήταν παράληψη να μην ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, τη διδάκτορα κ. Βενιεράκη Αναστασία για την άψογη συνεργασία και την αμέριστη βοήθεια που μου προσέφεραν, τόσο σε επιστημονικό και πειραματικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου που είναι πάντα δίπλα μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες	1
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
Abstract	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 Γενικά για το <i>Pseudomonas</i>	7
1.2 <i>Pseudomonas stutzeri</i>	7
1.2.1 Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του είδους <i>P. stutzeri</i>	8
1.2.2 Οργάνωση και μέγεθος του γονιδιώματος του <i>P. stutzeri</i>	9
1.2.3 Γενετική ποικιλομορφία του <i>P. stutzeri</i>	10
1.2.4 Φυλογενετική ανάλυση του <i>P. stutzeri</i>	12
1.2.5 Φυσικός μετασχηματισμός της <i>P. stutzeri</i>	12
1.2.6 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές της <i>P. stutzeri</i>	13
1.2.7 Απονιτροποιητικά βακτήρια <i>Pseudomonas</i>	13
1.2.7.1 Απονιτροποιητικά βακτήρια <i>P. stutzeri</i>	13
1.2.8 Αζωτοδεσμευτικά βακτήρια <i>Pseudomonas</i>	14
1.2.8.1 Αζωτοδεσμευτικά βακτήρια <i>P. stutzeri</i>	14
1.2.8.2 Γονίδια που εμπλέκονται στην αζωτοδέσμευση του <i>P. stutzeri</i>	15
1.2.9 Γονίδια που επάγονται ή καταστέλλονται κατά την αζωτοδέσμευση του <i>P. stutzeri</i>	17
1.2.10 Γονίδια που επάγονται κατά την αποίκιση της ρίζας του ρυζιού από το <i>P. stutzeri</i>	18
1.3 Ριβοσωμικά RNA	20
1.3.1 Τα <i>rrn</i> του <i>P. stutzeri</i>	22
1.3.2 Εσωτερική μεταγραφόμενη περιοχή 1 του <i>rrn</i>	22
1.3.3 Το μέγεθος της ITS1	22
1.3.4 Οι περιοχές ITS1 φέρουν γονίδια tRNA	25
1.3.5 Ένδο- και Ετερογονιδωματική ποικιλομορφία αλληλουχιών των περιοχών ITS1	25
1.3.6 Εσωτερική μεταγραφόμενη περιοχή 2 του <i>rrn</i>	26
Σκοπός	27
2. ΥΛΙΚΑ και ΜΕΘΟΔΟΙ	28
2.1 Βακτηριακά στελέχη	29

2.2 Μοριακές τεχνικές ταξινόμησης βακτηριακών στελεχών.....	30
2.2.1 Απομόνωση ολικού γονιδιωματικού DNA από Gram - βακτήρια.....	30
2.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	32
2.2.2.1 Αρχή της μεθόδου	32
2.2.2.2 Ενίσχυση τμήματος DNA (PCR)	33
2.2.3 Ανάλυση δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αгарόζης.....	35
2.2.4 Ανάκτηση κλάσματος δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων από πηκτή αгарόζης	36
2.2.5 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων.....	37
2.2.6 Υποκλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακό φορέα	38
2.2.6.1 Χαρακτηριστικά πλασμιδιακού φορέα.....	38
2.2.6.2 Ενσωμάτωση τμημάτων DNA με τυφλά άκρα στον πλασμιδιακό φορέα	40
2.2.7 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>Escherichia coli</i>	40
2.2.7.1 Υγρές και στερεές καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων <i>E.coli</i>	40
2.2.7.2 Δημιουργία βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> δεκτικών για μετασχηματισμό (Competent cells).....	41
2.2.7.3 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> με πλασμίδιο	42
2.2.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα <i>E. coli</i>	43
2.2.9 Πέψη δεοξυριβονουκλεοτιδικών οξέων (DNA) με χρήση ενζύμων (ενδονουκλεασών) περιορισμού.....	44
2.2.10 Αλληλούχηση νουκλεοτιδικών ακολουθιών (sequencing).....	45
2.2.11 Σύγκριση αλληλουχιών και φυλογενετική ανάλυση	45
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	47
3. 1 Φυλογενετική ανάλυση των στελεχών <i>Pseudomonas stutzeri</i> τα οποία απομονώθηκαν από την ριζόσφαιρα δημητριακών	48
3.2. Ανάλυση με βάση το μέγεθος της περιοχής ITS1 των αζωτοδεσμευτικών στελεχών <i>P. stutzeri</i>	50
3. 2. Ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των περιοχών ITS1	51
3. 3 Φυλογενετική ανάλυση των περιοχών ITS1	55
3. 4. Διαφορετικοί τύποι οπερονίων ριβοσωμικού RNA στο γονιδίωμα του <i>P. stutzeri</i> A1501. 57	
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	62
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	65
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α΄	71
ΣΥΝΘΕΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΜΕΣΩΝ	71
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β΄	72
ΣΥΝΘΕΣΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ.....	72

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ενδοριβωσωμική περιοχή ITS1 (εδράζεται μεταξύ του 16S rDNA και του 23S rDNA) των οπερονίων του ριβωσωμικού rDNA (*rrn*), στα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια αναφοράς *Pseudomonas stutzeri* στελέχη A15 και CMT.9A όπως επίσης και άλλων έντεκα (Gr16, Gr17, Gr18, Gr19, Gr20, Gr21, Gr45, Gr46, Gr50, Gr57 και Gr65) αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων *P. stutzeri* τα οποία έχουν απομονωθεί από τη ριζόσφαιρα σιτηρών. Η ενίσχυση του γονιδιωματικού DNA των στελεχών *P. stutzeri* A15 και Gr50 έδωσε δύο ζώνες, ονομαζόμενες ως ITS1S και ITS1L, ενώ στις υπόλοιπες ελληνικές απομονώσεις *P. stutzeri* και στο στέλεχος CMT.9A ενισχύθηκε μόνο μία ζώνη. Όλα τα PCR προϊόντα ITS1 που ενισχύθηκαν ανεξαρτήτου μεγέθους ή προέλευσης περιέχουν τα γονίδια tRNA^{ala} και tRNA^{lle}. Κατασκευάστηκε φυλογενετικό δενδρόγραμμα με βάση τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες ITS1 από το οποίο συμπεραίνουμε ότι οι αλληλουχίες ITS1S ομαδοποιούνται σε διαφορετικό κλάδο από τις ITS1L. Επίσης, πραγματοποιήσαμε *in silico* ανάλυση της περιοχής ITS1 από το γονιδίωμα των αζωτοδεσμευτικών *P. stutzeri* A1501, DMS4166 και ATCC17588 όπως επίσης και των άλλων συστατικών των τεσσάρων ριβωσωμικών οπερονίων (ITS2, 16S rRNA, 23S rRNA, 5'- και 3'-άκρων). Βασιζόμενοι στην ανάλυση αυτή, θεωρούμε ότι ένα εκ των τεσσάρων οπερονίων *rrn* του στελέχους *P. stutzeri* A1501 μπορεί να είναι αποτέλεσμα οριζόντιας μεταφοράς, με πιθανό δότη το στέλεχος *P. stutzeri* Zobell.

Abstract

The internal transcribed spacer regions (ITS1) located between the 16S rDNA and the 23S rDNA of ribosomal rDNA operons (*rrn*) of the reference diazotrophic *P. stutzeri* strains A15 and CMT.9A as well as of eleven nitrogen-fixing *P. stutzeri* isolates (Gr16, Gr17, Gr18, Gr19, Gr20, Gr21, Gr45, Gr46, Gr50, Gr57 και Gr65) was PCR amplified. Genomic DNA from one reference *P. stutzeri* strain A15 and *P. stutzeri* Gr50 generated two amplicons, designated as ITS1S and ITS1L while the other *P. stutzeri* isolates and *P. stutzeri* CMT.9A generated one amplicon. All examined ITS1 amplicons, independent of their size or origin, contained genes for both tRNA^{ala} and tRNA^{leu}. The phylogenetic dendrogram constructed for the inferred nucleotide sequences of ITS1 revealed that the ITS1S sequences were clustered while the ITS1L formed a separate branch. The recently established whole-genome sequence of the nitrogen-fixing *P. stutzeri* A1501, DMS4166 and ATCC17588 allowed an *in silico* analysis of the ITS1 as well as the other components (ITS2, 16S rRNA, 23S rRNA, 5' end region and 3' end region) of the four ribosomal operons. Based on this analysis it can be argued that one out of the four *rrn* operons of *P. stutzeri* strain A1501 may have resulted via horizontal gene transfer with the possible donor being *P. stutzeri* strain Zobell.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά για το *Pseudomonas*

Το γένος *Pseudomonas* περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Migula (1894) και αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης από την αρχή της ανάπτυξης της επιστήμης της Μικροβιολογίας. Στην έκδοση του 1933 το εγχειρίδιο Bergeley αφιέρωσε ένα κεφάλαιο στη ταξινόμηση του γένους *Pseudomonas* με κριτήριο μορφολογικά χαρακτηριστικά. Το 1966, σε μια εκτεταμένη μελέτη, προσπάθησε να ξεκαθαρίσει την ταξινόμηση του γένους *Pseudomonas*, καταγράφοντας την ανάπτυξη 246 στελεχών σε 146 διαφορετικές οργανικές ενώσεις. Η ανάπτυξη της τεχνικής απομόνωσης του DNA από βακτήρια επέτρεψε τις πρώτες μελέτες ομολογίας αλληλουχιών του DNA μεταξύ των στελεχών που ανήκαν στο γένος *Pseudomonas*. Το 1973 ο Pelleroni, αξιοποιώντας τις δυνατότητες απομόνωσης DNA και rRNA, ομαδοποίησε τα στελέχη του *Pseudomonas* με βάση μετρήσεις της ομολογίας μεταξύ DNA-rRNA των διαφόρων στελεχών. Στις αρχές τις δεκαετίας του '80 άρχισε να χρησιμοποιείται ως κριτήριο για την ταξινόμηση των βακτηρίων η αλληλουχία του 16S rDNA, το οποίο παραμένει σε χρήση μέχρι και σήμερα. Το γένος *Pseudomonas* περιλαμβάνει φθορίζοντα είδη (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*) και μη-φθορίζοντα είδη (*P. mendocina*, *P. stutzeri*) (Peix et al., 2009).

Ο αριθμός των ειδών που ανήκουν στο γένος *Pseudomonas* αυξάνεται σχεδόν κάθε χρόνο. Το 2006 είχαν πιστοποιηθεί 106 είδη και το 2009 ο αριθμός έφτασε τα 119 (Mulet et al., 2010). Μεταξύ των 119 ειδών του *Pseudomonas*, το είδος *Pseudomonas stutzeri* καταλαμβάνει εξέχουσα θέση.

1.2 Το είδος *Pseudomonas stutzeri*

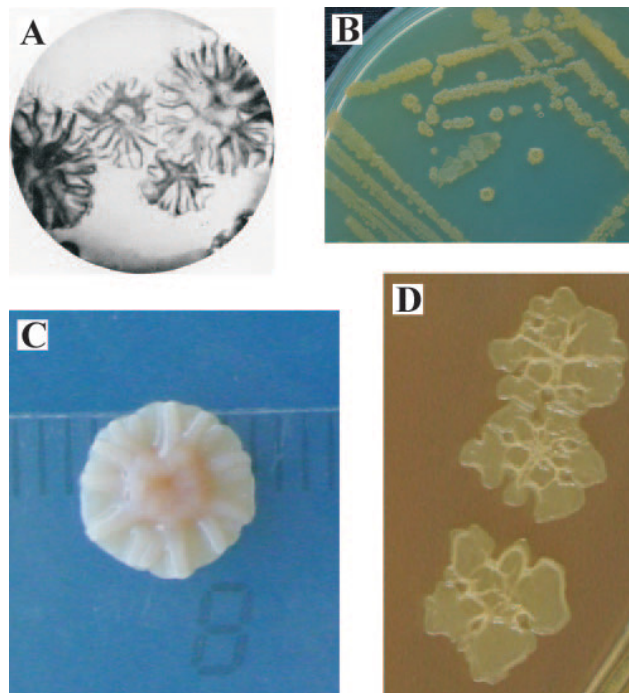
Το είδος *Pseudomonas stutzeri* περιγράφηκε το 1895 από τους Burr και Stutzer. Το *P. stutzeri* ανήκει στην τάξη των γ-πρωτεοβακτηρίων. Φυλογενετική ανάλυση με βάση την αλληλουχία νουκλεοτιδίων 1705 συντηρημένων γονιδίων 14 ειδών *Pseudomonas* των οποίων το γονιδίωμα έχει αλληλουχηθεί έδειξε ότι το *P. stutzeri* διαφέρει σημαντικά από τα γένη *P. putida*, *P. aeruginosa*, *P. syringae* και *P. fluorescence* (Silby et al., 2009). Φυλογενετική ανάλυση με βάση την αλληλουχία νουκλεοτιδίων του γονιδίου 16S rDNA αλλά και άλλων γονιδίων (*gyrB*, *rpoB* και *rpoD*)

107 τυπικών στελεχών του γένους *Pseudomonas* έδειξαν ότι το *P. stutzeri* ανήκει στην ίδια ομάδα με τα είδη *P. mendocina*, *P. balearica*, *P. azotifigens* και *P. xanthomarina* (Mulet et al., 2010).

1.2. 1 Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του είδους *P. stutzeri*

Το *P. stutzeri* είναι αρνητικό κατά *Gram* βακτήριο με ραβδόμορφο σχήμα και κινείται μέσω ενός πολικού μαστιγίου. Σε ορισμένα στελέχη (π.χ. *P. stutzeri* AN11) έχει παρατηρηθεί η παρουσία πλευρικών μαστιγίων (Lalucat et al., 2006).

Η μορφολογία της αποικίας είναι πτυχωτή, ξηρή και ιδιαίτερα συνεκτική, με κόκκινο-ροζ χρώμα. Οι αποικίες έχουν μορφή κρατήρα με υπερυψωμένες παρυφές, οι οποίες είτε διακλαδίζονται είτε ενώνονται (Εικόνα 1.1). Η ανακαλλιέργεια μιας αποικίας επιφέρει σημαντικές αλλαγές στη μορφολογία της. Οι νέες αποικίες, μετά από πολλαπλές ανακαλλιέργειες, παρουσιάζονται ομαλές, λιγότερο συνεκτικές και έχουν ωχρό χρώμα.



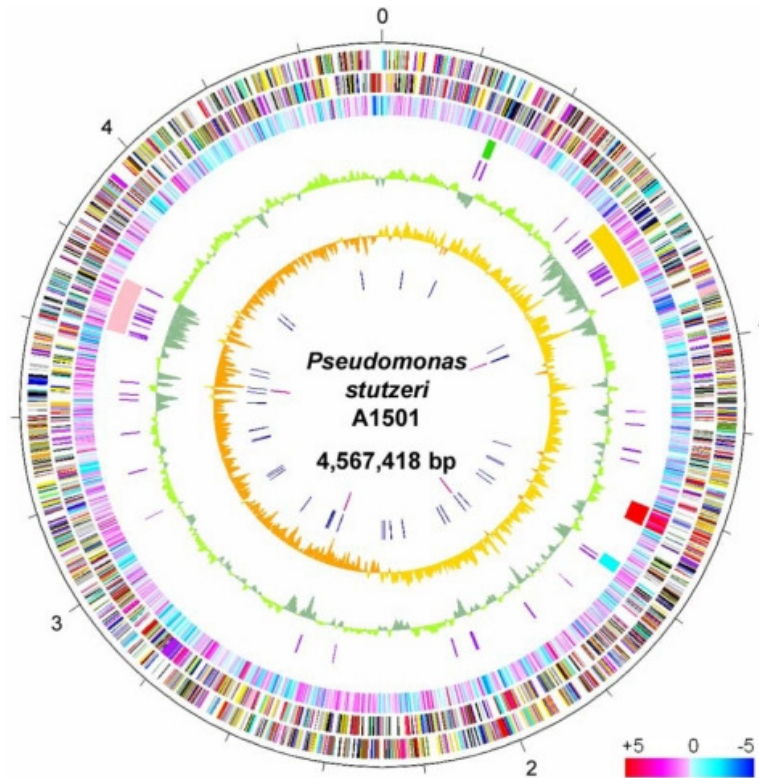
Εικόνα 1.1. Μορφολογία αποικιών στελεχών του *P. stutzeri*.

Το είδος *P. stutzeri*, όπως και τα περισσότερα είδη των *Pseudomonas*, μπορούν να αναπτυχθούν σε ελάχιστα θρεπτικά μέσα και αξιοποιούν ως πηγή αζώτου τα

αμμωνιακά ή/και τα νιτρικά και ως πηγή άνθρακα μια μόνο οργανική ένωση (π.χ. γλυκόζη). Τα στελέχη που ανήκουν στο είδος *P. stutzeri* δεν αναπτύσσονται σε όξινα pH (π.χ. pH 4.5). Το *P. stutzeri* αναπτύσσεται σε αερόβιες συνθήκες, με τελικό δέκτη ηλεκτρονίων το οξυγόνο είτε σε μικροαερόβιες συνθήκες, με τελικό δέκτη ηλεκτρονίων τα νιτρικά. Η θερμοκρασία ανάπτυξης των στελεχών του *P. stutzeri* παρουσιάζει σημαντικό εύρος, 4-45 °C, με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 30-35 °C (Lalucat et al., 2006).

1.2.2 Οργάνωση και μέγεθος του γονιδιώματος του *P. stutzeri*

Προκαταρκτική ανάλυση του γονιδιώματος είκοσι στελεχών του *P. stutzeri* έδειξε ότι αποτελείται από ένα κυκλικό χρωμόσωμα μεγέθους 3,75- 4,64 Mb. Τα στελέχη αυτά φέρουν στο γονιδιώμα τους 4 αντίγραφα του οπερονίου του ριβοσωμικού RNA (*rrn*), τα οποία είναι διάσπαρτα στο γονιδίωμα (Ginard et al., 1997). Ορισμένα στελέχη του *P. stutzeri* φέρουν πλασμίδια το μέγεθος των οποίων ποικίλει από 50-95 kb. Το γονιδίωμα του αζωτοδεσμευτικού στελέχους *P. stutzeri* A1501 έχει πλήρως αλληλουχηθεί (4,567 Mb) και φέρει 4 *rrn* (Εικόνα 1.2). Επίσης, το γονιδίωμα των στελεχών DMS4166 (4,689 Mb) και ATCC17588 (4,547 Mb) έχει πλήρως αλληλουχηθεί και τα δυο πρώτα φέρουν 4 *rrn*. Ένα μεγάλο ποσοστό (66.8%) των γονιδίων του στελέχους DMS4166 απαντώνται και στο γονιδίωμα του στελέχους A1501. Τα τρία στελέχη *P. stutzeri* έχουν κοινά 3.186 γονίδια τα οποία αποτελούν το βασικό πυρήνα του γονιδιώματος (core genome) για το καθένα στέλεχος. Το στέλεχος ATCC17588 έχει 3.255 κοινά γονίδια με το στέλεχος A1501 και 3.472 με το στέλεχος DMS4166. Η οργάνωση των γονιδίων που εμπλέκονται στην απονιτροποίηση, στον καταβολισμό της κατεχόλης, στο χημειοτακτισμό και σε άλλες λειτουργίες παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία σε επίπεδο αλληλουχίας νουκλεοτιδίων και αμινοξέων. Επίσης παρατηρείται μεγάλος βαθμός συνταίνιας (synteny) μεταξύ των τριών στελεχών (Chen et al., 2011; Yu et al., 2010; Yuan et al., 2008).



Εικόνα 1.2. Σχηματική παρουσίαση του γονιδιώματος του *P. stutzeri* A1501 (Yan et al., 2008).

1.2.3 Γενετική ποικιλομορφία του *P. stutzeri*

Η γενετική ποικιλομορφία που παρουσιάζουν τα διάφορα στελέχη του *P. stutzeri* είναι γενικά εξαιρετικά μεγάλη. Η πρώτη ομαδοποίηση των διαφόρων στελεχών στηρίχτηκε σε πειράματα DNA-DNA υβριδισμού και στο ποσοστό ομολογίας τμημάτων DNA δύο στελεχών. Στελέχη που παρουσίαζαν ομολογία DNA-DNA μεγαλύτερη από 70% ομαδοποιήθηκαν σε κατηγορίες, οι οποίες αναφέρονται ως γονιδιωματικές παραλλαγές του είδους (genomonars). Ο όρος genomonars καθιερώθηκε για πρώτη φορά για το *P. stutzeri* και χρησιμοποιείται για στελέχη, τα

οποία αν και παρουσιάζουν φαινοτυπική ομοιότητα έχουν γενετική ποικιλομορφία. Το είδος *P. stutzeri*, μέχρι σήμερα, περιλαμβάνει 19 genomovars (Mulet et al., 2009, Sikorski et al., 2005). Οι αλληλουχίες του γονιδίου 16S rDNA, σε στελέχη που ανήκουν στο ίδιο genomovar, παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία (98,0-99,7%) (Benassar et al., 1996). Η γενετική ποικιλομορφία στελεχών του *P. stutzeri* διερευνήθηκε επίσης μέσω της ανάλυσης Rep-PCR ανάλυσης (Benassar et al., 1998).

1.2.4 Φυλογενετική ανάλυση του *P. stutzeri*

Βασικό εργαλείο στη φυλογενετική ανάλυση των βακτηρίων είναι η αλληλουχία του 16S rDNA (Stackebrandt and Ebers 2006; Stackebrandt et al., 2002). Ωστόσο και η ποικιλότητα της αλληλουχίας περιοχών του *rrn* (π.χ. ITS1) ή άλλων γονιδίων (π.χ. *gyrB*, *rpoD*, *nosZ*) έχει αξιοποιηθεί στην προσπάθεια της φυλογενετικής ανάλυσης του *P. stutzeri*. Η προσέγγιση αυτή (ανάλυση της αλληλουχίας πολλών γονιδίων) επιτρέπει τον εντοπισμό των πολυμορφικών θέσεων στα γονίδια διαφόρων στελεχών, αναφέρεται ως Πολλαπλή Ανάλυση Τμημάτων Αλληλουχιών Γονιδίων (Multilocus sequence analysis, MLSA). Εφαρμογή της μεθόδου MLSA στην ανάλυση στελεχών του *P. stutzeri*, τα οποία ανήκουν σε διαφορετικά genomovars, έδειξε ότι τα περισσότερα ομαδοποιούνται στον ίδιο κλάδο του φυλογενετικού δένδρου (Cladera et al., 2004).

1.2.5 Φυσικός μετασχηματισμός της *P. stutzeri*

Η πρόσληψη χρωμοσωμικού DNA από το *P. stutzeri* είναι εφικτή ανεξάρτητα από την προέλευση του DNA (από το ίδιο είδος ή από άλλα είδη). Ωστόσο, η συχνότητα πρόσληψης διαφέρει σημαντικά, ανάλογα με την προέλευση του DNA. Η παρουσία μικρών ομόλογων περιοχών (311 bp) στο 5' ή στο 3' άκρο του ξένου DNA αυξάνει τη συχνότητα πρόσληψης κατά 200 φορές. Τα διάφορα στελέχη του *P. stutzeri* παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές σε ότι αφορά στην ικανότητά τους να προσλαμβάνουν ξένο DNA. Ο ακριβής μηχανισμός πρόσληψης του DNA δεν είναι γνωστός. Ωστόσο, έχει δειχθεί ότι γονίδια που εμπλέκονται στο σχηματισμό του τύπου IV μαστιγίου (*pilA*, *pilB*, *pilC*), φαίνεται ότι επηρεάζουν την ικανότητα των κυττάρων για μετασχηματισμό. Επίσης, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ορισμένα στελέχη του *P. stutzeri* μετασχηματίζονται από ξένο DNA, με σχετικά μεγάλη συχνότητα, στο φυσικό τους περιβάλλον ή το έδαφος (Sikorski et al., 2002; Meier and Wackernagel, 2003; Lalucat et al., 2006).

1.2.6 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές της *P. stutzeri*

Στελέχη του *P. stutzeri* έχουν χρησιμοποιηθεί για βιοαποικοδόμηση ρυπογόνων χημικών ενώσεων, που απορρίπτονται στο περιβάλλον ως παραπροϊόντα βιομηχανικών διεργασιών. Για παράδειγμα, το στέλεχος *P. stutzeri* NT-1, κάτω από αερόβιες συνθήκες, έχει την ικανότητα απομάκρυνσης του διαλυτού σεληνίου από βιομηχανικά απόβλητα (Kurota et al., 2011). Το στέλεχος *P. stutzeri* CL7 χρησιμοποιεί την πενταχλωροφαινόλη (pentachlorophenol) ως πηγή άνθρακα (Karn et al., 2010). Το στέλεχος *P. stutzeri* SMD έχει την ικανότητα μετατροπής του 2-υδροξυβουτυρικού οξέος σε οξυβουτυρικό οξύ μέσω μιας NADH-εξαρτώμενης αφυδρογονάσης του λακτικού οξέος (Gao et al., 2010). Το οξοβουτυρικό οξύ αποτελεί βασική πρώτη ύλη για την παρασκευή πολλών φαρμάκων. Το στέλεχος *P. stutzeri* KC παράγει και εκκρίνει τη χημική ένωση pyridine-2,6-bis(thiocarboxylate), η οποία έχει την ικανότητα μετασχηματισμού του τετραχλωράνθρακα σε μη τοξικούς μεταβολίτες (Lalucat et al., 2006).

1.2.7 Απονιτροποιητικά βακτήρια *Pseudomonas*

Η διαδικασία της απονιτροποίησης δηλαδή η σταδιακή μετατροπή των νιτρικών σε μοριακό άζωτο είναι φυλογενετικά διαδεδομένη μεταξύ των βακτηρίων, των αρχαιοβακτηρίων και των ευκαρυωτικών. Οι περισσότεροι απονιτροποιητικοί οργανισμοί ανήκουν στο φύλλο των Πρωτεοβακτηρίων. Η αναγωγή των υδατοδιαλυτών NO_3^- ή NO_2^- σε αέριο, NO , N_2O ή N_2 από τα απονιτροποιητικά βακτήρια καταλύεται από τις αναγωγάσες των νιτρικών (*Nar* και *Nap*), τις αναγωγάσες των νιτρωδών (*nirS* και *nirK*), τις αναγωγάσες του οξειδίου του αζώτου (*cNor* και *qNor*) και την αναγωγή του υποοξειδίου του αζώτου (*Nos*) (Kraft et al., 2011; Moreno-Vivian et al., 1999).

1.2.7.1 Απονιτροποιητικά βακτήρια *P. stutzeri*

Όλα τα στελέχη του *P. stutzeri* που έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα φαίνεται να φέρουν τα γονίδια που κωδικοποιούν για τη βιοσύνθεση των ενζύμων που εμπλέκονται στην διαδικασία πλήρους απονιτροποίησης (Lalukat et al., 2006). Στο γονιδίωμα των

στελεχών A1501, DMS 4166 και ATCC 1758 του *P. stutzeri* τα γονίδια που εμπλέκονται στην πλήρη απονιτροποίηση των νιτρικών είναι οργανωμένα σε ομάδες και παρουσιάζουν εξαιρετικά μεγάλη συνταίνεια (synteny) (Chen et al., 2011; Yu et al., 2010; Yuan et al., 2008).

1.2.8 Αζωτοδεσμευτικά βακτήρια *Pseudomonas*

Για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα η επιστημονική κοινότητα θεωρούσε ότι στο γένος *Pseudomonas* δεν υπάρχουν στελέχη ικανά να αζωτοδεσμεύουν. Στις μέρες μας, αυτή η άποψη έχει αναθεωρηθεί και σημαντικός αριθμός δημοσιεύσεων αναφέρεται σε στελέχη του γένους *Pseudomonas*, τα οποία είναι ικανά να δεσμεύουν άζωτο και φέρουν γονίδια, τα οποία εμπλέκονται στην αζωτοδέσμευση (Andrade et al., 1997, Barraquio et al., 1988, Chowdhury et al., 2007, Kulakov et al., 2002, Mirza et al., 2006, Muthukumarasay et al., 2007, Puente and Bashan 1994, Venieraki et al., 2011a).

1.2.8.1 Αζωτοδεσμευτικά βακτήρια *P. stutzeri*

Το 1987 οι Krotzky και Werner δημοσίευσαν μια αναλυτική μελέτη, όπου παρουσίασαν αδιάσειστα στοιχεία για τις αζωτοδεσμευτικές δυνατότητες ενός στελέχους (CMT.9A), το οποίο είχαν απομονώσει από τη ριζόσφαιρα του *Sorghum mutans* cv. CSV5 (Γερμανία). Το στέλεχος CMT.9A με βάση τα βιοχημικά του χαρακτηριστικά ταξινομήθηκε ως *P. stutzeri* και κατατέθηκε στην Γερμανική συλλογή στελεχών DSMZ με τον κωδικό DMS4166.

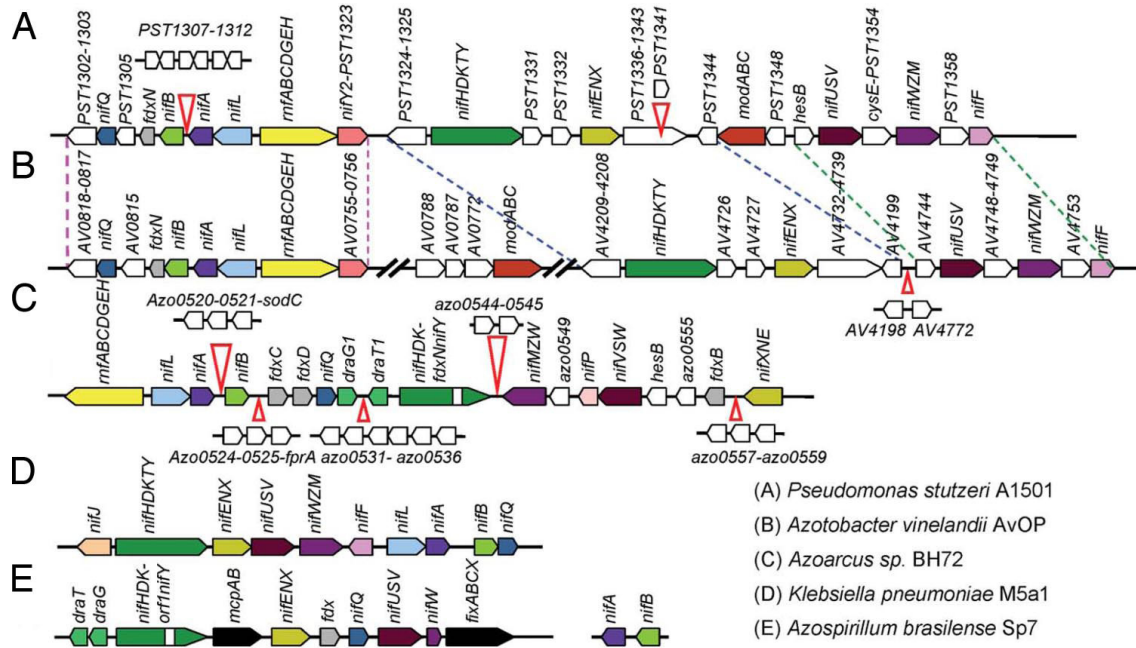
Το 1989 απομονώθηκε από τη ριζόσφαιρα ρυζιού (Κίνα) ένα στέλεχος, το οποίο επέδειξε εξαιρετική αζωτοδεσμευτική ικανότητα και το οποίο ταξινομήθηκε ως *Alcaligenes faecalis* A15 (You και Zhou, 1989). Το 1999 η ερευνητική ομάδα του Καθ. Vanderleyden δημοσίευσε την επαναταξινόμηση του στελέχους *A. faecalis* A15 και την κατάταξή του ως *P. stutzeri* στέλεχος A15 (Vermeiren et al., 1999). Το στέλεχος A15 ή ένα γενετικά τροποποιημένο στέλεχος του A15 (A15A, όπου ένα ακόμη αντίγραφο του γονιδίου *nifA* έχει ενσωματωθεί στο γονιδίωμα) χρησιμοποιήθηκε ως εμβόλιο σε πειραματικούς αγρούς ρυζιού. Η παραγωγικότητα αυξήθηκε κατά 3-7% στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε το αγρίου τύπου στέλεχος και 5-12% στην περίπτωση

που χρησιμοποιήθηκε το γενετικά τροποποιημένο (You και Zhou 1991, You et al., 1995). Αυτό πιθανά οφείλεται στο γεγονός ότι το στέλεχος A15A διαβιεί ενδοφυτικά ή επιφυτικά και εκκρίνει αμμωνιακά (You and Zhou, 1991; Lin et al., 2000; Lalucat et al., 2006). Το στέλεχος A15A επίσης παρουσιάζει ανθεκτικότητα στην αλατότητα και εκκρίνει ινδολο-οξικό οξύ (Lin et al., 1992). Το στέλεχος A15 είναι το ίδιο με το στέλεχος A1501 (Desnoues et al., 2003).

Το 1989 απομονώθηκαν αζωτοδεσμευτικά στελέχη από τη ριζόσφαιρα καλλιεργούμενων δημητριακών στην Ελλάδα (Κεφαλογιάννη, 2008). Φυλογενετική ανάλυση των στελεχών αυτών έδειξε ότι τουλάχιστον οκτώ από αυτά ανήκαν στο είδος *P. stutzeri* (Venieraki et al., 2011a; Venieraki et al., 2011b).

1.2.8.2 Γονίδια που εμπλέκονται στην αζωτοδέσμευση του *P. stutzeri*

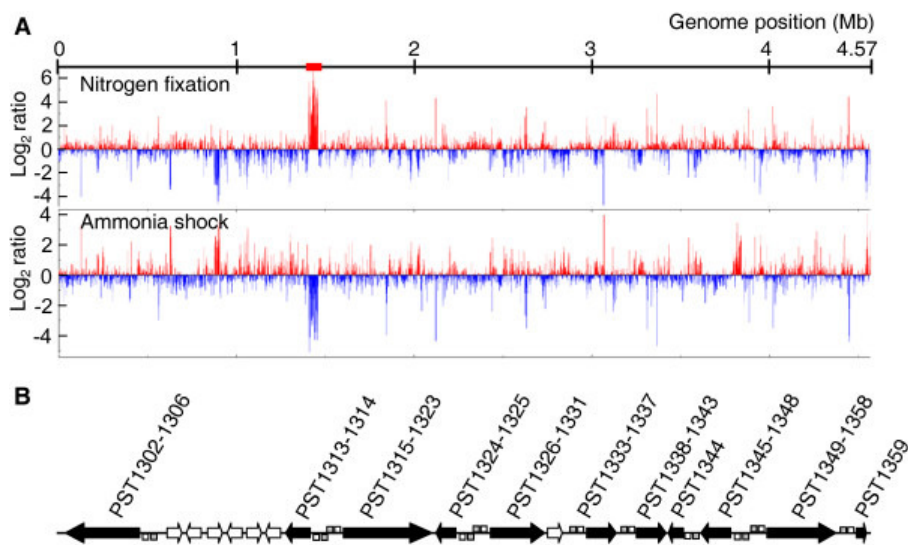
Η οργάνωση των αζωτοδεσμευτικών γονιδίων στα στελέχη A1501 και DMS4166 είναι παρόμοια με αυτήν του *Azotobacter vinelandi* (Εικόνα 1.3). Στο στέλεχος A1501, τα γονίδια που εμπλέκονται στην αζωτοδέσμευση (59 γονίδια) ομαδοποιούνται σε ένα τμήμα μεγέθους 49 kb, το οποίο αναφέρεται ως νησίδα αζωτοδέσμευσης (*nif* island) (Εικόνα 1.3). Η οργάνωση των γονιδίων στη νησίδα αζωτοδέσμευσης του στελέχους DMS4166 είναι σχεδόν πανομοιότυπη με αυτήν που απαντάται στο στέλεχος A1501 (Yu et al., 2011). Η έκφραση των γονιδίων της νησίδας αζωτοδέσμευσης του *P. stutzeri* A1501 είναι συντονισμένη και παρατηρείται κάτω από μικροερόβιες συνθήκες.



Εικόνα 1.3. Σχηματική αναπαράσταση του συμπλέγματος γονιδίων του *P. stutzeri* που εμπλέκονται στην αζωτοδέσμευση και των συμπλεγμάτων γονιδίων που απαντώνται στα *A. vinelandii* AvOP, *K. pneumoniae* M5a1, *Azoarcus* sp. BH72 και *A. brasilense* Sp7. (Yan et al., 2008)

1.2.9 Γονίδια που επάγονται ή καταστέλλονται κατά την αζωτοδέσμευση του *P. stutzeri*

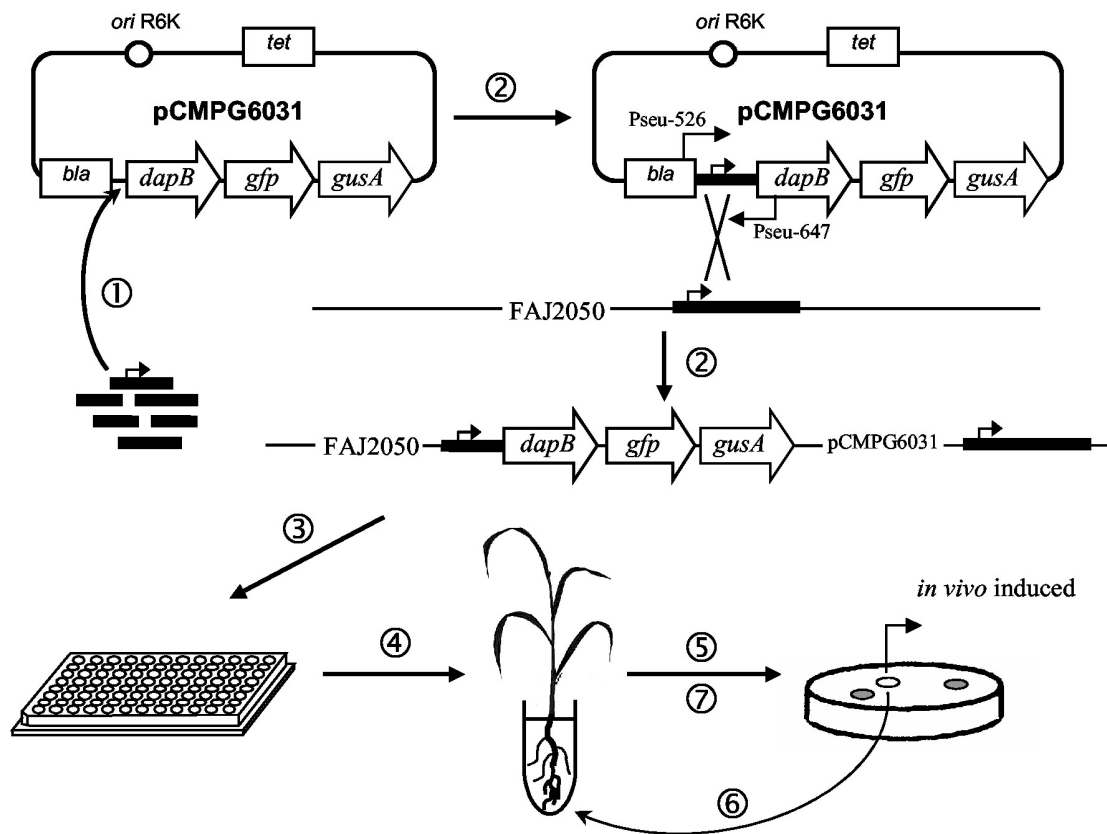
Ανάλυση των επιπέδων των μεταγραφημάτων, με χρήση μικροσυστοιχιών DNA, που επάγονται υπό αζωτοδεσμευτικές συνθήκες (0,5 % O₂ και 0,5mM NH₄Cl) ή καταστέλλονται μετά από ξαφνική έκθεση του αζωτοδεσμεύοντος στελέχους *P. stutzeri* A1501 των σε αμμωνιακά (20 mM) έδειξε ότι επάγεται η μεταγραφή 52 γονιδίων της νησίδας αζωτοδέσμευσης καθώς και 114 γονιδίων που εδράζονται εκτός της νησίδας (Εικόνα 1.4).



Εικόνα 1.4. Σχηματική αναπαράσταση των γονιδιακών περιοχών του *P. stutzeri*, οι οποίες παρουσιάζουν επαγωγή ή καταστολή της έκφρασης. (Α) Γονίδια, η έκφραση των οποίων επάγεται (κόκκινες γραμμές) και καταστέλλεται (μπλε γραμμές) σε συνθήκες αζωτοδέσμευσης και καταπόνησης με αμμωνιακά. Η νησίδα 49-kb των γονιδίων *nif* (κόκκινο ορθογώνιο) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα (από το γονίδιο PST1302 έως το PST1359) (Β). Προβλεπόμενα οπερόνια (μαύρα βέλη) με συντηρημένους *groN* και *nifA* προαγωγείς. Τα λευκά και γκρι κουτιά αναπαριστούν τους πιθανούς σ⁵⁴-εξαρτώμενους προαγωγείς και τις ανωφερικές αλληλουχίες των ενεργοποιητών, αντίστοιχα (Yan et al., 2010).

1.2.10 Γονίδια που επάγονται κατά την αποίκιση της ρίζας του ρυζιού από το *P. stutzeri*

Ο μηχανισμός, ο οποίος καθιστά το στέλεχος *P. stutzeri* A1501 ικανό να αποικίζει και να εγκαθίσταται ενός των κυττάρων της ρίζας του ρυζιού, δεν είναι ακόμη γνωστός. Ωστόσο, μέσω της τεχνολογίας IVET (*in vivo* expression technology), πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός μιας ομάδας βακτηριακών γονιδίων (*carA*, *pta*), η έκφραση των οποίων επάγεται κατά την αποίκιση της ρίζας του ρυζιού από το στέλεχος A1501 (Rediers et al., 2003). Η στρατηγική η οποία ακολουθείται στην τεχνολογία IVET, βασίζεται στην ενσωμάτωση ενός τυχαίου τμήματος DNA, ανωφερικά του γονιδίου *dapB*, το οποίο αποτελεί μέρος του φορέα IVET (pCMPG6031). Το γονίδιο *dapB* δεν φέρει προαγωγή (στάδιο 1). Στη συνέχεια, ο φορέας εισάγεται σε κύτταρα του στελέχους A1501, όπου υπόκεινται σε ανασυνδιασμό και ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του βακτηρίου. Το ανασυνδιασμένο στέλεχος A1501 (FAJ2050) φέρει το γονίδιο *dapB* υπό τον έλεγχο ενός πιθανού προαγωγέα που εδράζεται στο τυχαίο τμήμα DNA (στάδιο 2). Στελέχη ανασυνδιασμένων βακτηρίων (στάδιο 3) χρησιμοποιούνται ως εμβόλιο σε φυτάρια ρυζιού (στάδιο 4). Μετά από 2-3 εβδομάδες, βακτήρια που είναι προσκολλημένα στη ρίζα απομονώνονται και καλλιεργούνται σε ελάχιστα στερεά θρεπτικά μέσα, παρουσία X-Glu. Αποικίες με λευκό χρώμα απομονώνονται και χρησιμοποιούνται ως εμβόλιο για φυτάρια ρυζιού (στάδιο 6 και 7) (Εικόνα 1.5).



Εικόνα 1.5. Σχηματική αναπαράσταση της τεχνολογίας IVET. Επιλογή βακτηριακών γονιδίων, η έκφραση των οποίων επάγεται κατά την αποίκιση της ρίζας του ρυζιού (Rediers et al., 2003).

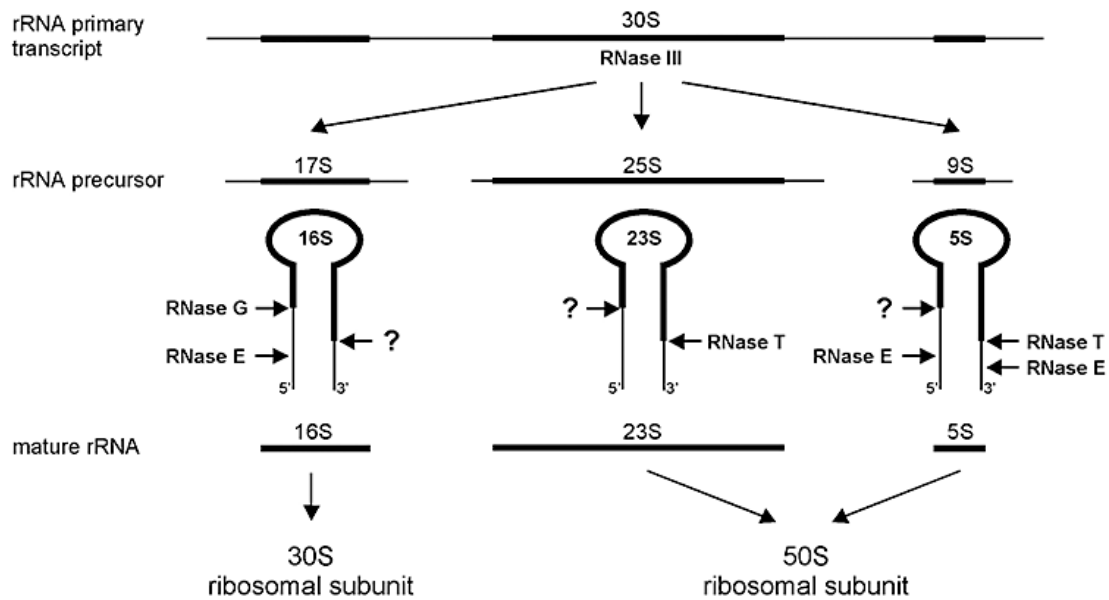
1.3 Ριβοσωμικά RNA

Το κύριο προϊόν της γονιδιακής μεταγραφής στα βακτήρια είναι τα tRNAs και τα rRNAs, τα οποία αποτελούν πάνω από το 98% της μάζας του ολικού RNA. Στα βακτήρια απαντώνται τρία είδη rRNAs, το 16S rRNA, το 23S rRNA και το 5S rRNA. Τα rRNAs είναι βασικά συστατικά των ριβοσωμάτων. Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, τα ριβοσώματα αποτελούνται από δύο υπομονάδες, μια μεγάλη υπομονάδα (50S) και μια μικρή υπομονάδα (30S). Η υπομονάδα 50S αποτελείται από 23S rRNA και 5S rRNA και περίπου 30 διαφορετικές πρωτεΐνες. Η υπομονάδα 30S αποτελείται από 16S rRNA και περισσότερες από 30 πρωτεΐνες.

Τα γονίδια των rRNAs των βακτηρίων οργανώνονται σε οπερόνια (ribosomal rRNA operon, *rrn*). Το γονιδίωμα των βακτηρίων φέρει 1-15 αντίγραφα των *rrn* (Acinas et al., 2004). Το κάθε *rrn* οργανώνεται με την ακόλουθη διάταξη: 5' άκρο (προαγωγέας)-16S rRNA-ITS1(εσωτερική μεταγραφόμενη περιοχή 1)-23S rRNA-ITS2 (εσωτερική μεταγραφόμενη περιοχή 2)-5S rRNA-3' άκρο. Στο γονιδίωμα ενός βακτηρίου οι αλληλουχίες των γονιδίων 16S και 23S rRNA είναι συνήθως παρόμοιες (99-100% ομολογία). Σε βακτήρια τα οποία φέρουν περισσότερα από ένα rRNA γονίδια, η ομοιογένεια των γονιδίων rRNA φαίνεται να διατηρείται μέσω ομόλογων ανασυνδυασμών, πιθανά μέσω ενός μηχανισμού, ο οποίος αναφέρεται ως συντονισμένη εξέλιξη (concerted evolution) (Liao, 2000). Τα γονίδια 16S rRNAs μερικών βακτηρίων (*Haloarcula marimortui*, *Thermoanaerobacter tengcongensis* και *Borrelia afzelii*) φαίνεται να διαφέρουν σημαντικά (95% ομολογία) στη πρωτοταγή δομή τους, ωστόσο η δευτεροταγής δομή τους δε φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά. Τα αντίγραφα των γονιδίων 16S rRNAs που διαφοροποιούνται, έχουν υψηλό περιεχόμενο σε GC σε σύγκριση με τα υπόλοιπα κανονικά αντίγραφα. Για παράδειγμα, στο *H. marimortui* αυτή η διαφορά είναι 58,4% έναντι 56,7%. Επίσης, στο *H. marimortui*, το οπερόνιο το οποίο φέρει το 16S rRNAs γονίδιο με το υψηλό περιεχόμενο GC φαίνεται να έχει διαφορετικό προαγωγέα, ο οποίος εκφράζεται εκλεκτικά σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας (Lopez-Lopez et al., 2007).

Κατά τη διαδικασία μεταγραφής του *rrn*, παράγεται ένα πρόδρομο μετάγραφο (pre-rRNA) μεγέθους περίπου 5,5 kb (30S), το οποίο στη συνέχεια υπόκειται σε ωρίμανση μέσω της δράσης εξειδικευμένων ριβονουκλεασών (RNase III, RNase T,

RNase E, RNase G), οι οποίες απομακρύνουν συγκεκριμένες εσωτερικές και εξωτερικές περιοχές από το pre rRNA, με αποτέλεσμα το σχηματισμό των ώριμων 16S, 23S και 5S rRNAs (Εικόνα 1.6). Η RNase III είναι μια εξειδικευμένη ενδοριβονουκλεάση, η οποία αναγνωρίζει δίκλωνο RNA. Η απενεργοποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την RNase III έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση του μεταγράφου 30S. Τα μετάγραφα 30S δεν απαντώνται στα κύτταρα αγρίου-τύπου. Η RNaseE και η RNase G έχουν δράση ενδοριβονουκλεάσης και παίζουν ρόλο στην ωρίμανση του 5' άκρου του 16S rRNA. Η RNase T είναι μια ενδοριβονουκλεάση και παίζει ρόλο στην ωρίμανση του 23S rRNA και του 5S rRNA (Apirion and Miczak 1993; Deutscher, 2009).



Εικόνα 1.6. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας ωρίμανσης του πρόδρομου rRNA (Deutscher, 2009).

1.3.1 Τα *rrn* του *P. stutzeri*

Το γονιδίωμα των στελεχών του είδους *P. stutzeri* φαίνεται ότι φέρει τέσσερα *rrn*. Η περιοχή ITS1 φαίνεται ότι είναι πανομοιότυπη στα τέσσερα διαφορετικά *rrn*. Ανάλυση των αλληλουχιών της ITS1 περιοχής έδειξε ότι είναι διαφορετική για τα στελέχη που ανήκουν σε διαφορετικό *genomovar* ενώ είναι παρόμοια για στελέχη που ανήκουν στο ίδιο *genomovar* (Sikorski et al., 2005). Ωστόσο, η αλληλούχιση του γονιδιώματος του αζωτοδεσμευτικού στελέχους *P. stutzeri* A1501 έδειξε ότι στο γονιδιώμα του απαντώνται δύο τύποι ITS1 με διαφορετικό μέγεθος και αλληλουχία νουκλεοτιδίων. Ωστόσο και οι δύο τύποι ITS1 φέρουν γονίδια για tRNA για τα αμινοξέα ισολευκίνη και αλανίνη. Η αλληλούχιση του γονιδιώματος του αζωτοδεσμευτικού στελέχους DMS 4166 και του στελέχους ATCC 17588 έδειξε ότι και τα δύο στελέχη φέρουν τέσσερα *rrn*. Οι αλληλουχίες και το μέγεθος των ITS1 είναι σχεδόν πανομοιότυπα με έναν από τους δυο τύπους ITS1 που απαντώνται στο στέλεχος A1501.

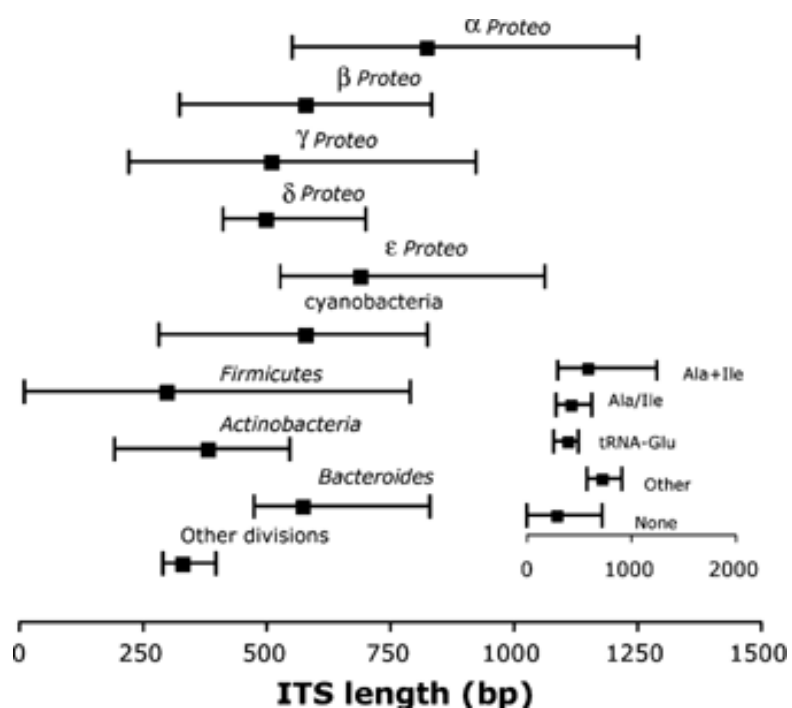
1.3.2 Εσωτερική μεταγραφόμενη περιοχή 1 του *rrn*

Η εσωτερική μεταγραφόμενη περιοχή 1 εδράζεται μεταξύ του 16S rDNA και του 23S rDNA (αναφέρεται ως 16S-23S περιοχή ή ITS1) και αποτελεί εξαιρετικό δείκτη φυλογενετικών σχέσεων διότι εξελίσσεται ταχύτατα σε σύγκριση με τους παραδοσιακούς δείκτες φυλογένειας όπως είναι το 16S rRNA (Stewart and Cavanaugh, 2007).

1.3.3 Το μέγεθος της ITS1

Το μέγεθος της ITS1 περιοχής ποικίλει μεταξύ των βακτηρίων (Εικόνα 1.7). Η μικρότερη περιοχή ITS1 (13 bp) έχει εντοπιστεί στο γονιδίωμα του *Lactobacillus salivaris* και η μεγαλύτερη (2880 bp) στο γονιδίωμα του *Saccharophages degradans*. Το μέγεθος της περιοχής ITS1 μεταξύ των *rrn* του ίδιου γονιδιώματος μπορεί να είναι πανομοιότυπο ή να διαφέρει σημαντικά. Για παράδειγμα, το γονιδίωμα του *Pseudomonas stutzeri* DSM4166 φέρει τέσσερα οπερόνια *rrn* και τέσσερις πανομοιότυπες περιοχές ITS1 ενώ το γονιδίωμα του *Pseudomonas stutzeri* A1501 φέρει τέσσερα οπερόνια *rrn* και δύο διαφορετικές σε μέγεθος περιοχές ITS1. Η διαφορά

μεγέθους μεταξύ των ITS1 περιοχών των οπερονίων ενός βακτηρίου μπορεί να διαφέρει σημαντικά. Για παράδειγμα, στο *Photobacterium profundum* απαντώνται περιοχές μεγέθους 1 bp και 2201 bp (Stewart και Cavanaugh, 2007).



Εικόνα 1.7. Η ποικιλομορφία με βάση το μέγεθος σε ζεύγη βάσεων (bp) των περιοχών ITS1 στις διάφορες ομάδες βακτηρίων (αριστερά). Η ποικιλομορφία των περιοχών ITS1 που φέρουν γονίδια tRNA (δεξιά). (Stewart and Cavanaugh, 2007).

1.3.4 Οι περιοχές ITS1 φέρουν γονίδια tRNA

Οι περιοχές ITS1 συνήθως φέρουν γονίδια tRNA αλλά και αλληλουχίες νουκλεοτιδίων, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στη μεταγραφή του *rnr* όσο και στην ωρίμανση του pre-rRNA (Εικόνα 1.6). Οι περιοχές ITS1, με βάση τον αριθμό και την ποικιλότητα των γονιδίων tRNA διαχωρίζονται σε πέντε κατηγορίες: περιοχές ITS1 οι οποίες φέρουν το tRNA^{Ala} και το tRNA^{Ile}, περιοχές ITS1 που φέρουν είτε το tRNA^{Ala} είτε το tRNA^{Ile}, περιοχές ITS1 που φέρουν το tRNA^{Glu}, περιοχές ITS1 που φέρουν ένα οποιοδήποτε tRNA και περιοχές ITS1 που δε φέρουν γονίδιο tRNA.

Η παρουσία γονιδίων tRNA, εκτός των tRNA^{Ala}, tRNA^{Ile} και tRNA^{Glu}, στις περιοχές ITS1 είναι πολύ σπάνια και περιορίζεται σε βακτήρια του γένους *Vibrio* και στο βακτήριο *Photobacterium profundum*.

1.3.5 Ένδο- και Ετερογονιδιωματική ποικιλομορφία αλληλουχιών των περιοχών ITS1

Η αλληλούχιση του γονιδιώματος στελεχών βακτηρίων που ανήκουν στο ίδιο γένος ή στο ίδιο είδος καθώς και των περιοχών ITS1 βακτηρίων του ίδιου είδους, έδειξε ότι υπάρχει ιδιαίτερη ετερογένεια σε ότι αφορά το μέγεθος και τις αλληλουχίες μεταξύ των περιοχών ITS1 που ανήκουν σε φυλογενετικά διαφορετικά βακτήρια (διαγονιδιωματική ετερογένεια, intergenomic heterogeneity). Επίσης, οι αλληλουχίες των διαφόρων περιοχών ITS1 που εδράζονται στο γονιδίωμα του ίδιου βακτηρίου, παρουσιάζουν, σε αρκετές περιπτώσεις, σημαντική ετερογένεια (intragenomic heterogeneity). Η νουκλεοτιδική ετερογένεια των περιοχών ITS1 δεν οφείλεται μόνο στην παρουσία διαφορετικών tRNAs αλλά και σε ενθέσεις (insertions), ελλείψεις (deletions) μικρών περιοχών και αντικαταστάσεις (substitutions) ορισμένων νουκλεοτιδίων (Stewart and Cavanaugh 2007).

1.3.6 Εσωτερική μεταγραφόμενη περιοχή 2 του *rrn*

Η εσωτερική μεταγραφόμενη περιοχή 2 εδράζεται μεταξύ του 23S και του 5S rRNA (αναφέρεται ως 23S-5S περιοχή ή ITS2), είναι σχετικά μικρότερη σε μέγεθος (80-250 bp) από την ITS1 (120-1260 bp) και δεν έχει μελετηθεί επαρκώς στα βακτήρια (Chen et al., 2000).

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν η ανάλυση των περιοχών ITS1 αζωτοδεσμευτικών στελεχών *P. stutzeri*, τα οποία απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα καλλιεργούμενων δημητριακών. Επίσης, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, πραγματοποιήθηκε μια *in silico* ανάλυση των περιοχών ITS1 καθώς και των αλληλουχιών του 5' και 3' άκρου των τεσσάρων *rrn* οπερονίων του *P. stutzeri* A1501, DMS4166 και ATCC17588 για να διερευνηθεί η ομοιότητα ή/και ετερογένεια των *rrn* του *P. stutzeri* A1501.

2. ΥΛΙΚΑ και ΜΕΘΟΔΟΙ

2. 1 Βακτηριακά στελέχη

Τα υπό μελέτη αζωτοδεσμευτικά βακτηριακά στελέχη απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα καλλιεργούμενου σιταριού, βρώμης και σίκαλης (Πίνακας 2.1). Η συλλογή αυτή των βακτηρίων διατηρείται στο εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών από την κ. Η. Κεφαλογιάννη

Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν δύο στελέχη, ως στελέχη αναφοράς, προκειμένου να πραγματοποιηθεί σύγκριση με τα προαναφερθέντα βακτήρια. Συγκεκριμένα, παρελήφθησαν από την εταιρεία Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms BCCM™/LMG, σε λυοφιλιωμένη μορφή, το *Pseudomonas stutzeri* LMG 10652 = You A15 και το *Pseudomonas stutzeri* CMT.9.A (DSMZ 4166) από τη German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ).

Οι καλλιέργειες των βακτηρίων διατηρούνται για μεγάλα χρονικά διαστήματα στο κατάλληλο θρεπτικό μέσο (NA), παρουσία 20% γλυκερόλης στους -80°C. Οι στερεές καλλιέργειες διατηρούνται στους 4°C για διάστημα μερικών εβδομάδων σε στερεό θρεπτικό μέσο NA.

Με βάση το 16S rRNA τα στελέχη έχουν ταξινομηθεί και ανήκουν είτε στο είδος *P. stutzeri* (Gr16, Gr17, Gr18, Gr19, Gr20, Gr21, Gr45, Gr46 και Gr50) είτε σε ένα νέο είδος *Pseudomonas* sp. (Πίνακας 2.1).

Πίνακας 2.1. Στελέχη τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

A/A	Στέλεχος	Τοποθεσία	Είδος φυτού	Ποικιλία	Παρατηρήσεις
1	Gr16	Σκούρτα, Βοιωτίας	<i>Triticum durum</i>	capeiti	<i>P. stutzeri</i>
2	Gr 17	Σκούρτα, Βοιωτίας	<i>Triticum durum</i>	capeiti	<i>P. stutzeri</i>
3	Gr 18	Σκούρτα, Βοιωτίας	<i>Triticum durum</i>	capeiti	<i>P. stutzeri</i>
4	Gr 19	Σκούρτα, Βοιωτίας	<i>Triticum durum</i>	capeiti	<i>P. stutzeri</i>
5	Gr 20	Σκούρτα, Βοιωτίας	<i>Triticum durum</i>	capeiti	<i>P. stutzeri</i>
6	Gr 21	Σκούρτα, Βοιωτίας	<i>Triticum durum</i>	capeiti	<i>P. stutzeri</i>
7	Gr 45	Θεσσαλονίκη	<i>Triticum aestivum</i>	Generoso	<i>P. stutzeri</i>
8	Gr 46	Θεσσαλονίκη	<i>Triticum aestivum</i>	Generoso	<i>P. stutzeri</i>
9	Gr 50	Θεσσαλονίκη	<i>Hordeum vulgare</i>	Carina	<i>P. stutzeri</i>
10	Gr 57	Κιλελέρ, Θεσσαλία	<i>Hordeum vulgare</i>	local	<i>Pseudomonas sp.</i>
11	Gr 65	Κιλελέρ, Θεσσαλία	<i>Hordeum vulgare</i>	local	<i>Pseudomonas sp.</i>

2.2 Μοριακές τεχνικές ταξινόμησης βακτηριακών στελεχών

2.2.1 Απομόνωση ολικού γονιδιωματικού DNA από Gram - βακτήρια

Η απομόνωση ολικού γονιδιωματικού DNA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το *GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit*.

- 5 ml θρεπτικού διαλύματος LB¹ εμβολιάζονται με μεμονωμένη αποικία του κάθε, υπό μελέτη, στελέχους. Ακολουθεί επώαση, υπό συνεχή ανάδευση, στους 30°C για 24 h.
- 3 ml από την παραπάνω καλλιέργεια μεταφέρονται σε σωλήνα eppendorf, ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6000 rpm για 2 min, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται πλήρως και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 100 µl διαλύματος R1.
- Εν συνεχεία προστίθενται 10 µl λυσοζύμης³ (για Gram⁻ βακτήρια). Ακολουθεί επώαση, υπό συνεχή ανάδευση, στους 37 °C για 20 min.

- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 3 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απομακρύνεται πλήρως.
- Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 180 μl διαλύματος R2 και 20 μl Proteinase K (10mg/100μl TE²). Το διάλυμα ανακινείται και επωάζεται, υπό συνεχή ανάδευση, στους 65 °C για 20 min.
- Εάν το δείγμα του DNA εμπεριέχει και υπολείμματα RNA, προστίθενται επιπλέον 20 μl RNase A⁴. Ακολουθεί ανακίνηση και επώαση, υπό συνεχή ανάδευση, στους 37 °C για 5 min.
- Προστίθενται 2 όγκοι (440 μl) από το διάλυμα BG. Το διάλυμα ανακινείται και επωάζεται, υπό συνεχή ανάδευση, στους 65 °C για 10 min.
- Εν συνεχεία το διάλυμα μεταφέρεται προσεκτικά στην ειδική στήλη, όπου φυγοκεντρείται στις 13000 rpm για 1 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Το DNA προσδένεται στη στήλη και το διάλυμα που διαπερνά αυτή απομακρύνεται.
- Προστίθενται 750 μl διαλύματος έκπλυσης (περιέχει αιθανόλη). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min, σε θερμοκρασία δωματίου και το διάλυμα που διαπερνά τη στήλη απομακρύνεται.
- Η διαδικασία της φυγοκέντρησης επαναλαμβάνεται μέχρι να απομακρυνθεί πλήρως το διάλυμα έκπλυσης, καθώς εμπεριέχει αιθανόλη, η οποία εάν παραμείνει μπορεί να παρεμποδίσει περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις.
- Το πάνω μέρος της στήλης τοποθετείται σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf, όπου πραγματοποιείται η έκλυση του DNA με προσθήκη 50 μl διαλύματος έκλυσης ή TE² ή ddH₂O.
- Αφού η στήλη σταθεροποιηθεί για 2 min, ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το δείγμα φυλάσσεται στους 4 °C ή στους -20 °C.

2.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

2.2.2.1 Αρχή της μεθόδου

Οι συμβατικές μέθοδοι μοριακής κλωνοποίησης θεωρούνται εργαλεία *in vivo* πολλαπλασιασμού του DNA. Ωστόσο, με την ανάπτυξη του συνθετικού DNA δημιουργήθηκε μια νέα μέθοδος γρήγορου πολλαπλασιασμού του DNA *in vitro*, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Η τεχνική αυτή (Mullis *et al.*, 1986) αποτελεί την πλέον εξειδικευμένη και ευαίσθητη μέθοδο ενίσχυσης αλληλουχιών DNA και RNA, *in vitro* ή και *in situ*.

Η βασική αρχή της αντίδρασης PCR βασίζεται σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά της αντιγραφής του DNA. Το εκμαγείο DNA αρχικά αποδιατάσσεται σε θερμοκρασία 94 °C σε δύο μονόκλωνες αλυσίδες. Εν συνέχεια, δύο κατάλληλα σχεδιασμένα, μονόκλιωνα ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές), τα οποία καθορίζουν τα σημεία έναρξης της αντιγραφής, υβριδίζονται με το εκμαγείο, ένα με κάθε αλυσίδα. Κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών, θα πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν τα παρακάτω:

- Το μέγεθος των εκκινητών (15-30 νουκλεοτίδια) θα πρέπει να είναι τέτοιο, ώστε η θερμοκρασία για τον υβριδισμό τους στο DNA να κυμαίνεται σε λογικά πλαίσια
- Η αλληλουχία του κάθε εκκινητή να είναι μοναδική και να υβριδίζεται σε μια μόνο περιοχή του DNA
- Η δομή των εκκινητών δεν θα πρέπει να είναι δευτεροταγής. Στην αντίδραση PCR, όπου χρησιμοποιείται ζεύγος εκκινητών δε θα πρέπει τα 3' άκρα τους να είναι συμπληρωματικά
- Η σύνθεση των βάσεων των εκκινητών θα πρέπει να είναι περίπου 50% σε GC και 50% σε AT
- Ο κάθε εκκινητής θα πρέπει να περιέχει στα άκρα του G ή C
- Στην περίπτωση όπου οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών δεν είναι πλήρως συμπληρωματικές με το DNA, η μετάλλαξη ή οι μεταλλάξεις είναι

συνήθως στο κέντρο του εκκινητή ή τουλάχιστον 12 νουκλεοτίδια από το 3' άκρο.

Ακολούθως, μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί ως μήτρα το μονόκλωνο DNA για τη σύνθεση μιας καινούργιας συμπληρωματικής αλυσίδας κατά την κατεύθυνση 5'-3', ξεκινώντας από το τμήμα του μορίου το οποίο είναι δίκλωνο. Για τη συγκεκριμένη σύνθεση απαραίτητη είναι η παρουσία μίγματος νουκλεοτιδίων και ιόντων Mg⁺².

Αρχικά για την PCR χρησιμοποιήθηκε η DNA πολυμεράση του *E. coli*. Εξαιτίας της θερμοαισθησίας του προαναφερθέντος ενζύμου και της καταστροφής του στις θερμοκρασίες που απαιτούνται για την αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA, συνήθως χρησιμοποιείται η DNA πολυμεράση, η οποία έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus* και παρουσιάζει άριστη θερμοκρασία δραστηριότητας στους 72 °C. Η δραστηριότητα, της αναφερόμενης ως *Taq* πολυμεράσης, παραμένει σε υψηλά επίπεδα κατόπιν επανειλημμένης αύξησης της θερμοκρασίας στους 94 °C. Οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες μπορεί να επεκτείνονται πέρα από την αλληλουχία βάσεων που ορίζεται από τον άλλον εκκινητή και ως εκ τούτου, δημιουργούνται νέες θέσεις υβριδισμού των εκκινητών. Εν συνεχεία, οι αρχικές αλυσίδες καθώς και οι νεοσυντιθέμενες, αφού πρώτα αποδιαταχθούν με θέρμανση στο 94 °C, χρησιμεύουν εκ νέου ως μήτρες αντιγραφής όπου θα υβριδιστούν οι εκκινητές. Εάν αυτός ο κύκλος επαναληφθεί (n) φορές, το τελικό αποτέλεσμα θα είναι η σύνθεση 2ⁿ δίκλωνων μορίων DNA που αποτελούν αντίγραφα της αλληλουχίας μεταξύ των δύο εκκινητών, συμπεριλαμβάνοντας και τις αλληλουχίες των εκκινητών στα άκρα τους. Η εκθετική αυτή συσσώρευση των προϊόντων της αντίδρασης πραγματοποιείται εφόσον δεν υφίστανται περιοριστικοί παράγοντες, όπως η έλλειψη νουκλεοτιδίων και εκκινητών και η παραγωγή παρεμποδιστικών ουσιών που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη λειτουργία της πολυμεράσης. Η εξειδίκευση του προϊόντος εξαρτάται, τόσο από την θερμοκρασία υβριδισμού, όσο και από την εξειδίκευση των θέσεων υβριδισμού των συγκεκριμένων εκκινητών στην μήτρα του DNA.

2.2.2.2 Ενίσχυση τμήματος DNA (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση τμημάτων DNA, απευθείας από το DNA των υπό μελέτη βακτηριακών στελεχών, με τη χρήση κατάλληλα σχεδιασμένων εκκινητών. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των εκκινητών αναφέρεται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων (κεφάλαιο 3).


Οι ακριβείς συνθήκες πραγματοποίησης μιας τυπικής αντίδρασης PCR προσαρμόζονται στις απαιτήσεις του εκάστοτε πειράματος. Η ποσότητα της μήτρας DNA, που προστίθεται κάθε φορά, εξαρτάται από την πηγή προέλευσής του. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση γονιδιωματικού DNA χρησιμοποιείται ποσότητα 40-50 ng. Επίσης, η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξεώς τους (T_m) (συνήθως είναι 5 °C κάτω από αυτήν). Οι ακριβείς συνθήκες, υπό τις οποίες τελούνταν οι αντιδράσεις της PCR για το κάθε γονίδιο που μελετήθηκε στην παρούσα έρευνα, αναφέρονται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων (κεφάλαιο 3).

Μια τυπική αντίδραση PCR λαμβάνει χώρα ως εξής:

Σε ειδικό σωλήνα eppendorf (100μl) προστίθενται:

1. Γονιδιωματικό DNA	50 ng
2. Εκκινητής ευθείας κατεύθυνσης (Forward) (10μM)	1 μl
3. Εκκινητής αντίστροφης κατεύθυνσης (Reverse) (10μM)	1 μl
4. Μίγμα dNTPs (10mM)	1 μl
5. 10x PCR ρυθμιστικό διάλυμα ¹¹	5 μl
6. DMSO	2μl
7. <i>Taq</i> DNA πολυμεράση (1unit/μl) ¹	0.5μl

Οι συνθήκες πραγματοποίησης μιας τυπικής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης είναι:

Αρχική αποδιάταξη	94 °C για 2-4 min		35 κύκλοι
Αποδιάταξη	94 °C για 1 min		
Υβριδισμός εκκινητών	45-65 °C για 1 min		
Επιμήκυνση	72 °C για 1 min / 1,3-15 kb αναμενόμενου προϊόντος		
Τελική επιμήκυνση	72 °C για 5-10 min.		

Το πρόγραμμα το οποίο χρησιμοποιείται για την PCR προγραμματίζεται στη συσκευή του ειδικού θερμικού κυκλοποιητή.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της περιοχής ITS1 είναι οι εξής:

A1F (Rm16S f: 5' GAAGTCGTAACAAGG)
A2R (Rm23S R: CAAGGCATCCACCGT)

2.2.3 Ανάλυση δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης

Ο διαχωρισμός των δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων, βάσει του μεγέθους και της διαμόρφωσής τους, πραγματοποιείται μέσω της διαδικασίας ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης. Στην περίπτωση διαχωρισμού γραμμικών μορίων DNA, ο διαχωρισμός είναι ανάλογος του μεγέθους τους. Το εύρος μεγεθών που μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης και κυμαίνεται από 0,1-100 kb.

Τα τμήματα DNA γίνονται ορατά με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου⁶, το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και να φθορίζει παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας.

Η προετοιμασία της πηκτής και των δειγμάτων γίνεται ως εξής:

- Ποσότητα αγαρόζης αναμιγνύεται, σε κωνική φιάλη Erlenmeyer, με ορισμένο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης 1x TAE⁵. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση πηκτής αγαρόζης 1% και 3% (w/v), με εύρος διαχωρισμού γραμμικών μορίων DNA από 0,3-10kb.
- Ακολουθεί σταδιακή θέρμανση του μίγματος σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι η αγαρόζη να διαλυθεί.
- Η θερμοκρασία του διαλύματος αφήνεται να φτάσει έως τους 60°C και αφού προστεθεί διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου⁶, τελικής συγκέντρωσης 0,5mg/ml, αφήνεται να στερεοποιηθεί σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης, σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συσκευή προσαρμόζεται η κατάλληλη «χτένα» έτσι ώστε να σχηματισθούν, στην πηκτή, τα βοηθία φόρτωσης.
- Εν συνεχεία η χτένα απομακρύνεται από την πηκτή. Η συσκευή συμπληρώνεται με διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x TAE⁵ έτσι ώστε η πηκτή να παραμείνει βυθισμένη 1-2mm από την επιφάνεια του.
- Ακολουθεί ανάμιξη των δειγμάτων νουκλεϊνικών οξέων με ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (1/10 του όγκου loading buffer)⁷ και τα δείγματα τοποθετούνται στα βοηθία φόρτωσης
- Τέλος στα άκρα της πηκτής εφαρμόζεται κατάλληλη τάση, η οποία δεν υπερβαίνει τα 60 Vcm⁻¹.

2.2.4 Ανάκτηση κλάσματος δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων από πηκτή αγαρόζης

Η ανάκτηση κλάσματος DNA από πηκτή αγαρόζης, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το *QIAquick Gel Extraction Kit* της *QIAGEN*TM.

- Το τμήμα της πηκτής αγαρόζης το οποίο φέρει την επιθυμητή ζώνη DNA, απομονώνεται με τη χρήση νυστεριού. Εν συνεχεία τοποθετείται σε σωλήνα τύπου erppendorf, ζυγίζεται και προστίθενται 3 όγκοι ρυθμιστικού διαλύματος QG (3 µl QG/mg πηκτής).

- Ακολουθεί επώαση του δείγματος στους 50 °C για 10 min (ανά 2-3min ανακινείται) μέχρι να διαλυτοποιηθεί η αγαρόζη. Εάν χρειαστεί παρατείνεται ο χρόνος επώασης.
- Στο διάλυμα προστίθεται ένας όγκος ισοπροπανόλης (1 μl ισοπροπανόλης/mg πηκτής).
- Το μίγμα ανακινείται ήπια, μεταφέρεται σε φορτισμένη στήλη *QIAQuick Spin* και φυγοκεντρείται στις 13000 rpm για 1 min
- Το DNA προσδένεται στην στήλη και το διάλυμα που διαπέρασε αυτήν απομακρύνεται.
- Ακολουθεί πλύση της στήλης με προσθήκη 750 μl διαλύματος QG και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min.
- Το διάλυμα που διαπέρασε την στήλη απομακρύνεται και η διαδικασία της φυγοκέντρησης επαναλαμβάνεται για 1 min.
- Η στήλη μεταφέρεται σε νέο σωλήνα τύπου eppendorf και το DNA εκλύεται με την προσθήκη 30 μl ddH₂O ή διαλύματος EB.
- Αφού η στήλη σταθεροποιηθεί για 1 min, ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min
- Το δείγμα φυλάσσεται στους -20°C.

2.2.5 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων

Ο προσδιορισμός τόσο της συγκέντρωσης όσο και της καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων σε υδατικό διάλυμα, πραγματοποιείται φωτομετρικά με τη χρήση φασματοφωτομέτρου μικροποσοτήτων (NanoDrop® ND1000 Spectrophotometer). Πριν από τη μέτρηση, επιλέγεται από τον χειριστή το αντίστοιχο λογισμικό της συσκευής (DNA).

- Για τον μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιείται ποσότητα 1μl του εκάστοτε διαλύτη (H₂O ή TE²).
- Ποσότητα δείγματος 1μl φωτομετρείται και λαμβάνονται οι λόγοι OD₂₆₀/OD₂₈₀ και OD₂₆₀/OD₂₃₀, βάσει των οποίων εκτιμάται η καθαρότητα των δειγμάτων των νουκλεϊνικών οξέων
- Όταν ο λόγος OD₂₆₀/OD₂₈₀ είναι 1,8 (περίπου) το δείγμα θεωρείται ικανοποιητικής καθαρότητας. Μικρότερες τιμές της προαναφερθείσας αποτελούν ένδειξη παρουσίας προσμίξεων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η παρουσία πρωτεϊνών, φαινόλης ή άλλων ουσιών οι οποίες απορροφούν στα 280nm
- Ένα δεύτερο μέτρο καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων αποτελεί ο λόγος OD₂₆₀/OD₂₃₀. Σε δείγματα υψηλής καθαρότητας ο συγκεκριμένος λόγος κυμαίνεται μεταξύ 1,8 και 2,2, έχει δηλαδή τιμές υψηλότερες του OD₂₆₀/OD₂₈₀. Μικρότερες τιμές αποτελούν ένδειξη παρουσίας προσμίξεων.

2.2.6 Υποκλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακό φορέα

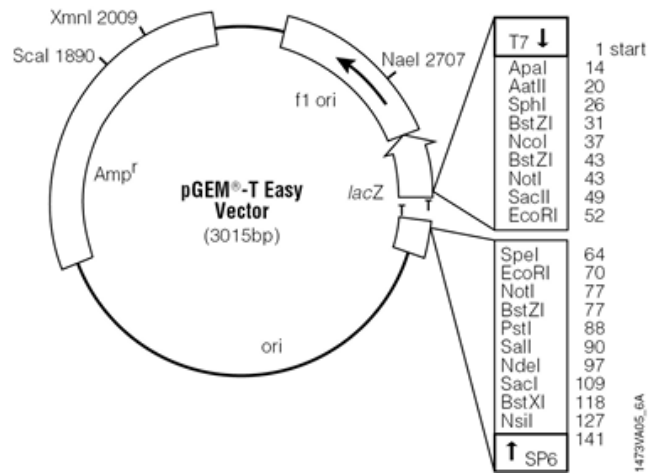
2.3.6.1 Χαρακτηριστικά πλασμιδιακού φορέα

Ο πλασμιδιακός φορέας ο οποίος χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη είναι ο pGEM-T Easy (Promega) (Εικόνα 2.1). Σκοπός της χρήσης του, είναι η υποκλωνοποίηση των τμημάτων DNA, προκειμένου να καταστεί ευκολότερος ο χειρισμός τους και να επιτραπεί ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων τους και γενικότερα ο χαρακτηρισμός τους.

Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά του προαναφερθέντος φορέα, αναφέρεται ότι οι πλασμιδιακοί φορείς pGEM-T διαθέτουν μια αρχή αντιγραφής (ori) και τμήμα του γονιδίου *lacZ* του *E. coli*, που κωδικοποιεί για το α-πεπτίδιο του ενζύμου β-γαλακτοζιδάση. Επιπλέον, φέρουν μια πολλαπλή θέση κλωνοποίησης (πολυσυνδέτης) εντός του γονιδίου *lacZ* καθώς και τους προαγωγείς της RNA πολυμεράσης, T7 και SP6, οι οποίοι βρίσκονται ένθεν και ένθεν του πολυσυνδέσμου. Το γονίδιο της β-γαλακτοζιδάσης βρίσκεται υπό τον μεταγραφικό έλεγχο των παραπάνω προαγωγέων,

ενώ η μεταγραφή μπορεί να επάγεται παρουσία του χημικού αναλόγου της λακτόζης IPTG (ισοπροπυλοθειογαλακτοζίδιο). Η β-γαλακτοζιδάση μεταβολίζει την οργανική ένωση X-gal, παράγοντας μια αδρανή ουσία μπλε χρώματος. Η ένθεση ξένου DNA στην περιοχή του πολυσυνδέτη ωστόσο, διακόπτει τη μεταγραφή του γονιδίου *lacZ*, με αποτέλεσμα την αδυναμία μεταβολισμού της X-gal.

Τέλος, οι συγκεκριμένοι φορείς φέρουν γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, γεγονός το οποίο επιτρέπει την επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων.



Εικόνα 2.1. Χάρτης πλασμιδιακού φορέα PGEM-T easy (Promega)

2.2.6.2 Ενσωμάτωση τμημάτων DNA με τυφλά άκρα στον πλασμιδιακό φορέα (ligation)

Λόγω των κολλωδών άκρων των τμημάτων DNA τα οποία προκύπτουν από την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), χρησιμοποιείται για την κλωνοποίησή τους ο πλασμιδιακός φορέας pGEM-T easy (Promega) (Εικόνα 2.1). Ο φορέας έχει υποστεί πέψη με το ένζυμο περιορισμού *EcoRI* και στα τυφλά άκρα που δημιουργήθηκαν προστέθηκαν βάσεις θυμίνης, αφενός για να αποφευχθεί η επανασυγκόλλησή τους, αφετέρου για να βελτιωθεί η ενσωμάτωση του ένθετου τμήματος στον πλασμιδιακό φορέα.

Στην αντίδραση ενσωμάτωσης (ligation), για τη μεγιστοποίηση της πιθανότητας δημιουργίας ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, η αναλογία των μορίων του πλασμιδιακού φορέα και του προς ένθεση τμήματος DNA ρυθμίζεται στο 1:3. Η αραιώση τόσο του φορέα όσο και του ένθετου DNA γίνεται με τρόπο ώστε να διευκολύνεται η επίτευξη της απαιτούμενης αναλογίας.

Σε αντίδραση ενσωμάτωσης τελικού όγκου 10 μl αναμιγνύονται:

1. DNA πλασμιδιακός φορέας	1 μl
2. DNA ένθεσης	1 μl
3. 10x ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης ⁸	1 μl
4. Ένζυμο λιγάση T4 (1 unit/μl)	1 μl
5. ddH ₂ O	6 μl

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή 4 °C για 3h ή 16h αντίστοιχα.

2.2.7 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli*

2.2.7.1 Υγρές και στερεές καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων *E. coli*

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *E. coli* XL-Blue, το οποίο καλλιεργήθηκε σε υγρό ή στερεό θρεπτικό μέσο LB¹, παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού (παραρτήματα Β'). Η ανάπτυξή του πραγματοποιήθηκε κατόπιν επώασης

στους 37°C για 16h. Στην περίπτωση υγρής καλλιέργειας, η επώαση τελούνται υπό ανάδευση.

2.2.7.2 Δημιουργία βακτηριακών κυττάρων *E. coli* δεκτικών για μετασχηματισμό (Competent cells)

- 10 ml LB¹ θρεπτικού υλικού εμβολιάζονται με μια αποικία *E. coli* (στέλεχος XL-blue) και επώάζονται, υπό συνεχή ανάδευση, για περίπου 18 h στους 37°C.
- 2 ml της παραπάνω καλλιέργειας χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 200 ml αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού LB¹. Ακολουθεί επώαση, υπό συνεχή ανάδευση, στους 37°C για 2 h, εωσότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να κυμαίνεται από 0.3-0,4 (O.D.₆₀₀=0,3-0,4).
- Οι χειρισμοί που ακολουθούν πραγματοποιούνται στους 4°C.
- Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 6000 rpm για 10 min.
- Το ίζημα των κυττάρων αφού επαναδιαλύεται με ήπια ανάδευση σε 50 ml διαλύματος 0,1 M MgCl₂, φυγοκεντρείται στις 6000 rpm για 10 min.
- Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 25 ml διαλύματος 0,1 M CaCl₂ και διατηρείται σε πάγο για 20 min. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 6000 rpm για 10 min.
- Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 10 ml διαλύματος 0,1 M CaCl₂ και προστίθεται γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 20% (v/v).
- Τα κύτταρα αφού διαμοιραστούν σε σωλήνες τύπου erpendorf φυλάσσονται στους -80 °C.

2.2.7.3 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* με πλασμίδιο

- Σε σωλήνα τύπου erppendorf μεταφέρονται, μέσα σε πάγο, 100 μl, δεκτικά για μετασχηματισμό κύτταρα *Escherichia coli*
- Προστίθενται 10-100 ng πλασμδιακού DNA (αφότου τα κύτταρα ξεπαγώσουν), σε όγκο ο οποίος δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1/10 του όγκου των προς μετασχηματισμό κυττάρων.
- Ακολουθεί επώαση του μίγματος κυττάρων-πλασμδιακού DNA, στον πάγο για 30 min.
- Η είσοδος του πλασμιδίου στα κύτταρα, επιτυγχάνεται με την υποβολή τους σε θερμικό σοκ (Heat-Shock) στους 42 °C για 1 min και την απ' ευθείας μεταφορά τους, στη συνέχεια, στον πάγο.
- Προστίθενται 200 μl θρεπτικού διαλύματος LB¹ και τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για 1 h.
- Τα κύτταρα επιστρώνονται σε τριβλία με θρεπτικό υλικό LB¹ και κατάλληλο αντιβιοτικό (αμπικιλίνη για τον φορέα pGEM-T easy), ώστε να επιτευχθεί η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων.
- Στην περίπτωση όπου σκοπός είναι η επιλογή αποικιών που φέρουν ανασυνδυσμένο πλασμίδιο, προστίθενται στα κύτταρα 10μl διαλύματος IPTG 100mM⁹ και 50μl διαλύματος 2%¹⁰ (w/v) X-Gal. Οι αποικίες που φέρουν ανασυνδυσμένο πλασμίδιο, λόγω της διακοπής του γονιδίου που κωδικοποιεί για τη β-γαλακτοζιδάση από το ένθεμα, εμφανίζονται λευκές. Αντίθετα, οι αποικίες με μη ανασυνδυσμένα πλασμίδια, λόγω της δράσης του ενζύμου, εμφανίζουν μπλε χρώμα.
- Τέλος, τα τριβλία με το θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα επωάζονται τους 37°C για 18 h.

2.2.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli*

Στην παρούσα μελέτη η απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli* πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του *QIAprep Spin Miniprep Kit* της *QIAGEN*TM σύμφωνα με την εξής διαδικασία:

- 5 ml θρεπτικού διαλύματος LB^I που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό-αμπικιλίνη, εμβολιάζονται με μεμονωμένη αποικία κυττάρων *E.coli*, τα οποία έχουν μετασχηματισθεί με το προς απομόνωση πλασμίδιο. Ακολουθεί επώαση, υπό συνεχή ανάδευση, στους 37°C για 16 h.
- 3 ml από την παραπάνω καλλιέργεια μεταφέρονται σε σωλήνα τύπου erpendorf και φυγοκεντρώνται στις 6000 rpm για 5min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται πλήρως και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 250 μl διαλύματος P1, το οποίο εμπεριέχει RNase A.
- Προστίθενται 250 μl διαλύματος P2 (περιέχει NaOH), το διάλυμα ανακινείται απαλά και αφήνεται σε ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 5 min. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται η λύση των κυττάρων.
- Προστίθενται 350 μl διαλύματος N3 (περιέχει οξικό οξύ και υδροχλωρική γουανιδίνη), ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά και μεταφέρεται σε στήλη *QIAprep*.
- Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Σε αυτό το στάδιο το πλασμιδιακό DNA έχει προσδεθεί στην στήλη και το διάλυμα που την έχει διαπεράσει απομακρύνεται.
- Προστίθενται 350 μl διαλύματος PE (περιέχει αιθανόλη). Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το

διάλυμα που διαπερνά την στήλη απομακρύνεται και η διαδικασία της φυγοκέντρωσης επαναλαμβάνεται, ώστε να απομακρυνθεί τελείως το διάλυμα PE καθώς περιέχει αιθανόλη, η οποία εάν παραμείνει μπορεί να παρεμποδίσει περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις.

- Το πάνω μέρος της στήλης τοποθετείται σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf και ακολουθεί έκλυση, του προσδεμένου στη στήλη DNA, με την προσθήκη 30 μl διαλύματος EB (10mM Tris-HCl, pH= 8,5) ή ddH₂O και αφήνεται σε ηρεμία για 1 min.
- Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 1 min.
- Το δείγμα φυλάσσεται στους -20°C.

2.2.9 Πέψη DNA με χρήση ενζύμων (ενδονουκλεασών) περιορισμού

Οι πέψεις των δειγμάτων DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού πραγματοποιούνται σε τελικό όγκο ο οποίος εξασφαλίζει την πραγματοποίηση των αντιδράσεων. Τόσο η ποσότητα και η καθαρότητα του DNA, όσο και η ποσότητα του ενζύμου περιορισμού, καθορίζουν το συγκεκριμένο όγκο. Συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 20 μl-100 μl.

Η διαδικασία έχει ως εξής:

- Σε σωλήνα τύπου erpendorf τοποθετούνται: το δείγμα DNA, η ενδονουκλεάση περιορισμού καθώς και το ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο απαιτείται για την δράση του ενζύμου. Συνήθως χρησιμοποιείται μία μονάδα ενζύμου (1 unit) για κάθε μικρογραμμάριο δείγματος DNA. Εάν το δείγμα του DNA εμπεριέχει και υπολείμματα RNA, προστίθεται επιπλέον και RNase A⁴. Τέλος προστίθεται ddH₂O μέχρι τον επιθυμητό όγκο.
- Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η ενδονουκλεάση περιορισμού *EcoRI* με αλληλουχία αναγνώρισης G/AATTC (όπου /: ορισμός σημείου πέψεως στην αλληλουχία) και βέλτιστη θερμοκρασία δράσης στους 37 °C.

Σε μια τυπική αντίδραση πέψης τελικού όγκου 30 μl αναμιγνύονται:

1. Διάλυμα DNA 1 μg (σε H ₂ O ή TE ²)	έως 10μl
2. Ένζυμο περιορισμού (1 unit/μl)	1 μl
3. 10x ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου	3 μl
4. RNAse A ⁴ (1 mg/ml)	0,5 μl
5. ddH ₂ O	έως τελικό όγκο 30 μl

- Το δείγμα αναμιγνύεται καλά και επωάζεται σε κατάλληλη θερμοκρασία για 3-4 h.
- Μετά το πέρας της αντίδρασης τα προϊόντα αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης.

2.2.10 Αλληλούχιση νουκλεοτιδικών ακολουθιών (sequencing)

Πλασμιδικό DNA που απομονώθηκε με τη μέθοδο του *QIAprep Spin Miniprep Kit* της *QIAGEN*TM, εστάλη για αυτόματη αλληλούχιση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στην εταιρεία MWG (Germany). Για κάθε κλώνο παρελήφθησαν 750-900bp και επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα DNASTar ως προς την εύρεση τμημάτων που έχουν υποκλωνοποιηθεί στον φορέα pGEM-Teasy, δηλαδή εντοπισμός των εκκινητών που οριοθετούν το τμήμα του DNA που έχει υποκλωνοποιηθεί.

2.2.11 Σύγκριση αλληλουχιών και φυλογενετική ανάλυση

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη, η αναζήτηση της ταυτότητας των υπό μελέτη αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με σύγκριση αυτών, με τις διαθέσιμες αλληλουχίες της βάσης δεδομένων GenBank, χρησιμοποιώντας τη μηχανή αναζήτησης BLAST (Basic Local Alignment Tool) του NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>).

Η ευθυγράμμιση των υποκλώνων των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, πραγματοποιήθηκε μέσω του αλγόριθμου πολλαπλής ευθυγράμμισης Clustal W (Thompson et al., 1994), του προγράμματος Lasergene 7.0.

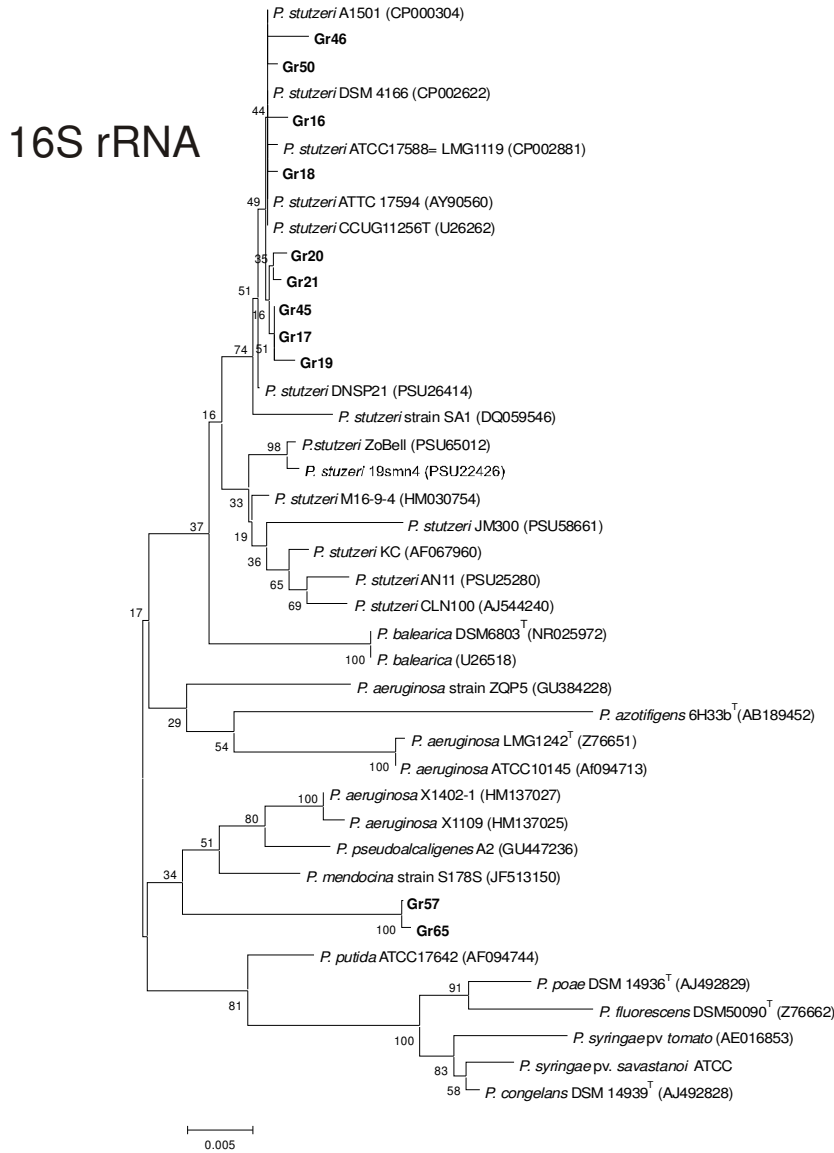
Η εκτίμηση των εξελικτικών αποστάσεων των νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών, πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Maximum Composite Likelihood (Tamura et al., 2011).

Τα φυλογενετικά δέντρα κατασκευάστηκαν με τη μέθοδο Neighbor-Joining (Saitou και Nei, 1987), μέσω του προγράμματος MEGA 5.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura et al., 2011). Η αξιοπιστία και η σταθερότητα των σχέσεων του δενδρογράμματος εκτιμήθηκε μέσω 1000 bootstrap δειγμάτων.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3. 1 Φυλογενετική ανάλυση των στελεχών *Pseudomonas stutzeri* τα οποία απομονώθηκαν από την ριζόσφαιρα δημητριακών

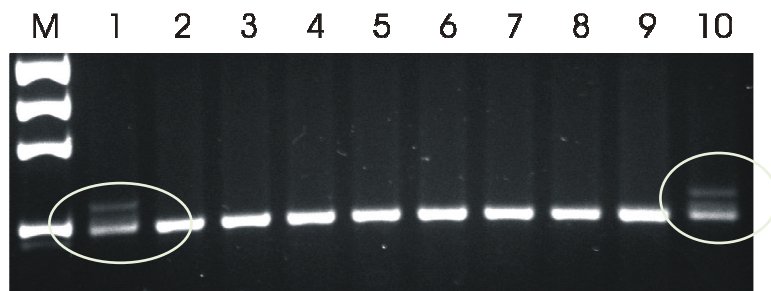
Στοίχιση των διαθέσιμων αλληλουχιών (Pair-wise alignment) του 16S rRNA των *P. stutzeri* τα οποία απομονώθηκαν από την ριζόσφαιρα δημητριακών έδειξε ότι οι αλληλουχίες 16S rRNA των στελεχών Gr16, Gr17, Gr18, Gr19, Gr20, Gr21, Gr45, Gr46 και Gr50 παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία (<99.4 %) με το 16S rRNA των τυπικών στελεχών της *P. stutzeri*. Οι αλληλουχίες όμως του 16S rRNA των στελεχών Gr57 και Gr65 παρόλο που είναι σχεδόν πανομοιότυπες (ομολογία <99.8%) μεταξύ τους, η ομολογία τους με τα τυπικά στελέχη του *P. stutzeri* καθώς και με αζωτοδεσμευτικά στελέχη αναφοράς, *P. stutzeri* A1501 και *P. stutzeri* DMS 4166, αποκλίνει σημαντικά. Η απόκλιση αυτή κυμαίνεται από 2.7% έως 3.3%. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει ότι πιθανά τα στελέχη αυτά ανήκουν σε ένα είδος συγγενές στο *P. stutzeri*. Φυλογενετική ανάλυση με βάση τις αλληλουχίες του 16S rRNA όλων των υπό διερεύνηση στελεχών (Gr16, Gr17 Gr18, Gr19, Gr20, Gr21, Gr545, Gr46, Gr50, Gr57 και Gr65) επιβεβαίωσε ότι τα στελέχη Gr16, Gr17 Gr18, Gr19, Gr20, Gr21, Gr45, Gr46 ομαδοποιούνται με τα τυπικά στελέχη του *P. stutzeri* ενώ τα στελέχη Gr57 και Gr65 φαίνεται να αποτελούν ένα νέο είδος του γένους *Pseudomonas* (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1. Φυλογενετικό δένδρο των υπό μελέτη στελεχών και στελεχών αναφοράς κατασκευασμένο με βάση τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες τμήματος του γονιδίου 16S rRNA. Ως στελέχη αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν τυπικά στελέχη των *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. fulva*, *P. aeruginosa*, *P. syringae* και *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. congelans*, *P. balearica*. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al.*, 2011) και η κλίμακα αντιπροσωπεύει τον αριθμό υποκαταστάσεων ανά θέση.

3.2. Ανάλυση με βάση το μέγεθος της περιοχής ITS1 των αζωτοδεσμευτικών στελεχών *P. stutzeri*

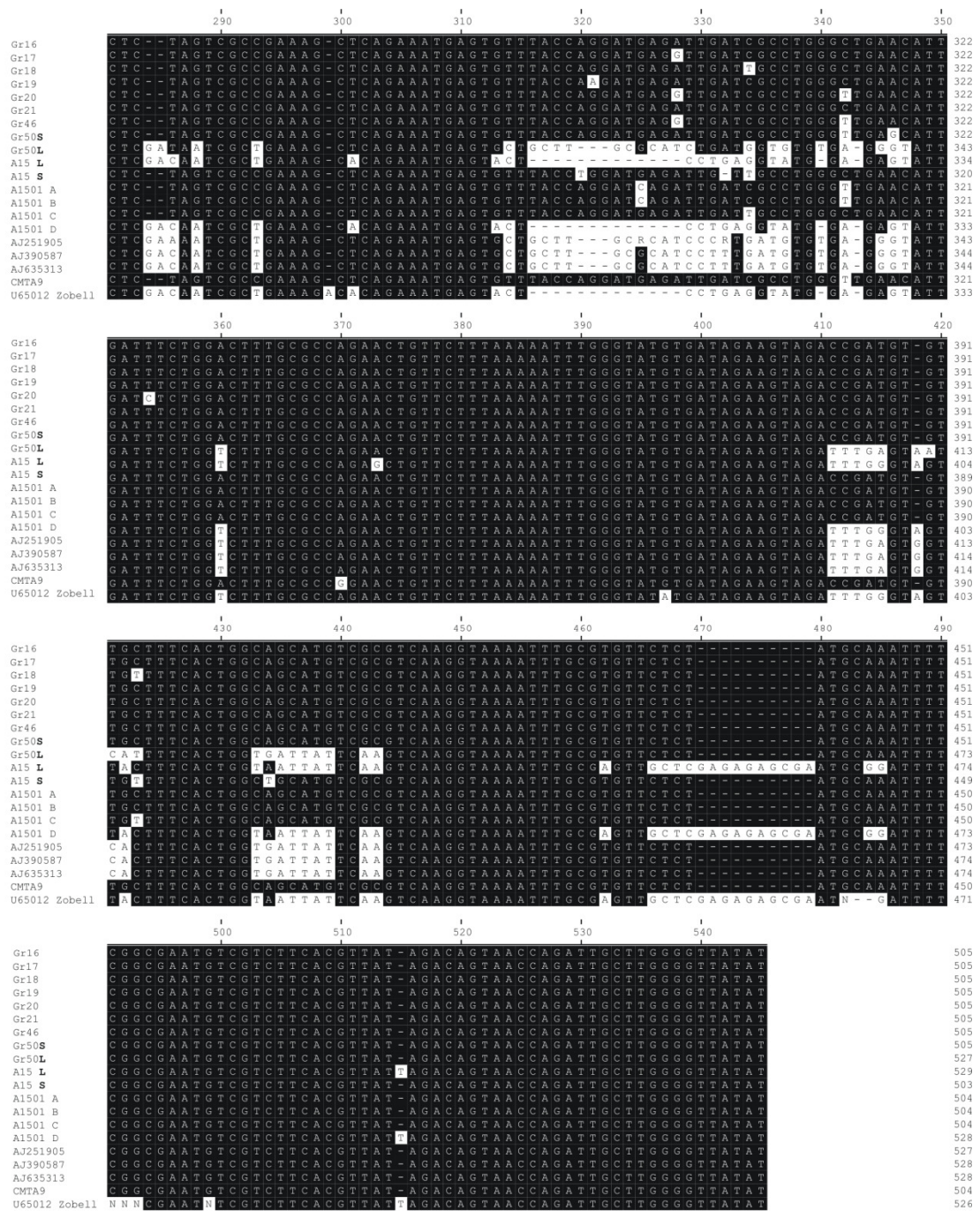
Με σκοπό την ενίσχυση της περιοχής η οποία εδράζεται μεταξύ των 16S και 23S γονιδίων και αναφέρεται ως ενδοριβοσωμική περιοχή (internal transcribed spacer, ITS1) των υπό μελέτη στελεχών σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές βάσει των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του 3'-άκρου του 16S rRNA και του 5'-άκρου του 23S rRNA. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η PCR-αντίδραση με εκμαγείο το γονιδιωματικό DNA όλων των στελεχών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στα περισσότερα στελέχη ενισχύθηκε ένα μόνο προϊόν PCR ενώ στα στελέχη A15 και Gr50, εμφανίστηκαν δύο ζώνες (η μικρότερη, που ονομάστηκε ITS1S και μία μεγαλύτερη που ονομάστηκε ITS1L) διαφορετικής έντασης (η ITS1S εμφανίζεται περισσότερο έντονη από την ITS1L). Στα στελέχη *P. stutzeri* CMT.9.A, Gr16, Gr17, Gr18, Gr19, Gr20, Gr21, Gr45 και Gr46 διαπιστώθηκε η παρουσία μίας μόνο ζώνης ως προϊόν PCR, η οποία είχε μέγεθος ίδιο με αυτό των ζωνών ITS1S των *P. stutzeri* A15 και Gr50 (Εικόνα 3.2). Στα στελέχη Gr57 και Gr65 εντοπίστηκε μόνο μια ζώνη, η οποία έχει μέγεθος λίγο μεγαλύτερο από το ITS1L των στελεχών *P. stutzeri* A15 και Gr50.



Εικόνα 3.2. Ανάλυση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων ενίσχυσης PCR της ITS1 περιοχής με εκμαγείο το ολικό γονιδιωματικό DNA των στελεχών 1: *P. stutzeri* A15(1501), 2: *P. stutzeri* CMT.9.A (DMS4166), 3-10: *P. stutzeri* Gr16, Gr17, Gr18, Gr19, Gr20, Gr21, Gr46 και Gr50. (M= μάρτυρας μοριακών μεγεθών λ DNA *Hind*III και φX174 DNA *Hae*III).

3. 2. Ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των περιοχών ITS1

Μελετώντας τις ομοιότητες και/ή τις διαφορές σε μεγέθη και αριθμό ζωνών των περιοχών ITS1 ανακύπτει το ερώτημα της ομοιότητας μεταξύ των νουκλεοτιδικών τους αλληλουχιών. Το προϊόν της ενίσχυσης με PCR υποκλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pGEM-T Easy και πραγματοποιήθηκε η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του. Οι ακολουθίες αυτές επεξεργάστηκαν έτσι ώστε να απομακρυνθούν οι πλεονάζουσες βάσεις του 3'-άκρου του 16S rDNA γονιδίου και του 5'-άκρου του 23 rDNA γονιδίου, έτσι ώστε να παραμείνει αποκλειστικά μόνο η αλληλουχία της περιοχής ITS1. Με την ολοκλήρωση των αναλύσεων των ITS1S ή/και των ITS1L νουκλεοτιδικών αλληλουχιών όλων των στελεχών διερευνήθηκε κατ' αρχήν η παρουσία γονιδίων tRNAs μέσω του προγράμματος tRNAscan (Lowe και Eddy 1997). Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι η περιοχή ITS1L και η ITS1S φέρουν δύο γονίδια tRNAs, τα tRNA^{Ala} και tRNA^{Ile}. Η ευθυγράμμιση των ITS1 αλληλουχιών έδειξε ότι οι ITS1S αλληλουχίες των στελεχών *P. stutzeri* A15, Gr50 καθώς και οι ITS1 των στελεχών Gr16, Gr17, Gr18, Gr19, Gr20, Gr21, Gr45 και Gr46 είναι σχεδόν πανομοιότυπες μεταξύ τους (Εικόνα 3.3). Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες ITS1L των στελεχών *P. stutzeri* A15 και *P. stutzeri* Gr50 έχουν σημαντική ομολογία με την παραπάνω ομάδα αλλά παρατηρούνται κάποιες σημαντικές αποκλίσεις εξαιτίας ενθέσεων και/ή αντικαταστάσεων βάσεων (Εικόνα 3.3). Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες ITS1L των στελεχών Gr57 και Gr65 είναι σχεδόν πανομοιότυπες μεταξύ τους αλλά διαφέρουν σημαντικά από τις άλλες. (Εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.3. Ευθυγράμμιση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών ITS1 στελεχών *P. stutzeri*. Οι συντομογραφίες A1501A, A1501B, A1501C και A1501A αφορούν τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των περιοχών ITS1 του στελέχους *P. stutzeri* A1501. Οι αλληλουχίες του tRNA^{Ala} και του tRNA^{Ile} είναι υπογραμμισμένες.



Εικόνα 3.4. Ευθυγράμμιση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών ITS1 στελεχών *P. stutzeri* Gr19, Gr57, Gr65 και A1501.

3.3 Φυλογενετική ανάλυση των περιοχών ITS1

Βάσει των παραπάνω αλληλουχιών των περιοχών ITS1 κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο με χρήση του αλγορίθμου Neighbor-joining του προγράμματος MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) (Εικόνα 3.5). Για την καλύτερη ανάλυση του φυλογενετικού δένδρου συμπεριελήφθησαν αλληλουχίες ITS1 από όλα τα genomovars του *P. stutzeri* καθώς και αλληλουχίες ITS1 από στελέχη που ανήκουν στα *P. aeruginosa*, *P. syringae* και *P. fluorescens*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλες οι αλληλουχίες ITS1 των υπό διερεύνηση στελεχών *P. stutzeri* ομαδοποιούνται σε ένα κλάδο διακριτό από τους κλάδους των άλλων ειδών του γένους *Pseudomonas*. Ωστόσο, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι οι αλληλουχίες ITS1 από σχεδόν όλα τα στελέχη *P. stutzeri* ομαδοποιούνται σύμφωνα με το genomovar στο οποίο ανήκουν. Τα στελέχη που φέρουν στο γονιδίωμά τους δύο τύπους ITS1, όπως το A1501 και Gr50, παρουσιάζουν κάποια προβλήματα. Με βάση το ITS1S το στέλεχος A1501 ανήκει στο genomovar 2 ενώ με βάση το ITS1L ανήκει στο genomovar 8. Παρομοίως με βάση το ITS1S το στέλεχος Gr50 ανήκει στο genomovar 2, ενώ ο τύπος ITS1L δεν ανήκει σε κάποιο χαρακτηρισμένο genomovar. Τα στελέχη Gr57 και Gr65 φαίνεται να ομαδοποιούνται σε ένα διακριτό αλλά μη χαρακτηρισμένο genomovar.

3. 4. Διαφορετικοί τύποι οπερονίων ριβοσωμικού RNA στο γονιδίωμα του *P. stutzeri* A1501

Πρόσφατα έχει ολοκληρωθεί η αλληλούχιση του γονιδιώματος των αζωτοδεσμευτικών στελεχών *P. stutzeri* A1501 και DMS4166 καθώς και του μη-αζωτοδεσμευτικού τυπικού στελέχους *P. stutzeri* ATCC17588. Το στέλεχος A1501 θεωρείται ότι είναι το ίδιο με το A15 (Desnoves et al., 2003). *In silico* ανάλυση των οπερονίων του στελέχους A1501 έδειξε ότι στο γονιδίωμα απαντώνται τέσσερα οπερόνια ριβοσωμικού RNA (*rrn*), τα οποία στην παρούσα εργασία θα αναφέρονται ως εξής: *rrnA*, *rrnB*, *rrnC* και *rrnD*. Οι συντεταγμένες των *rrn* παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1.

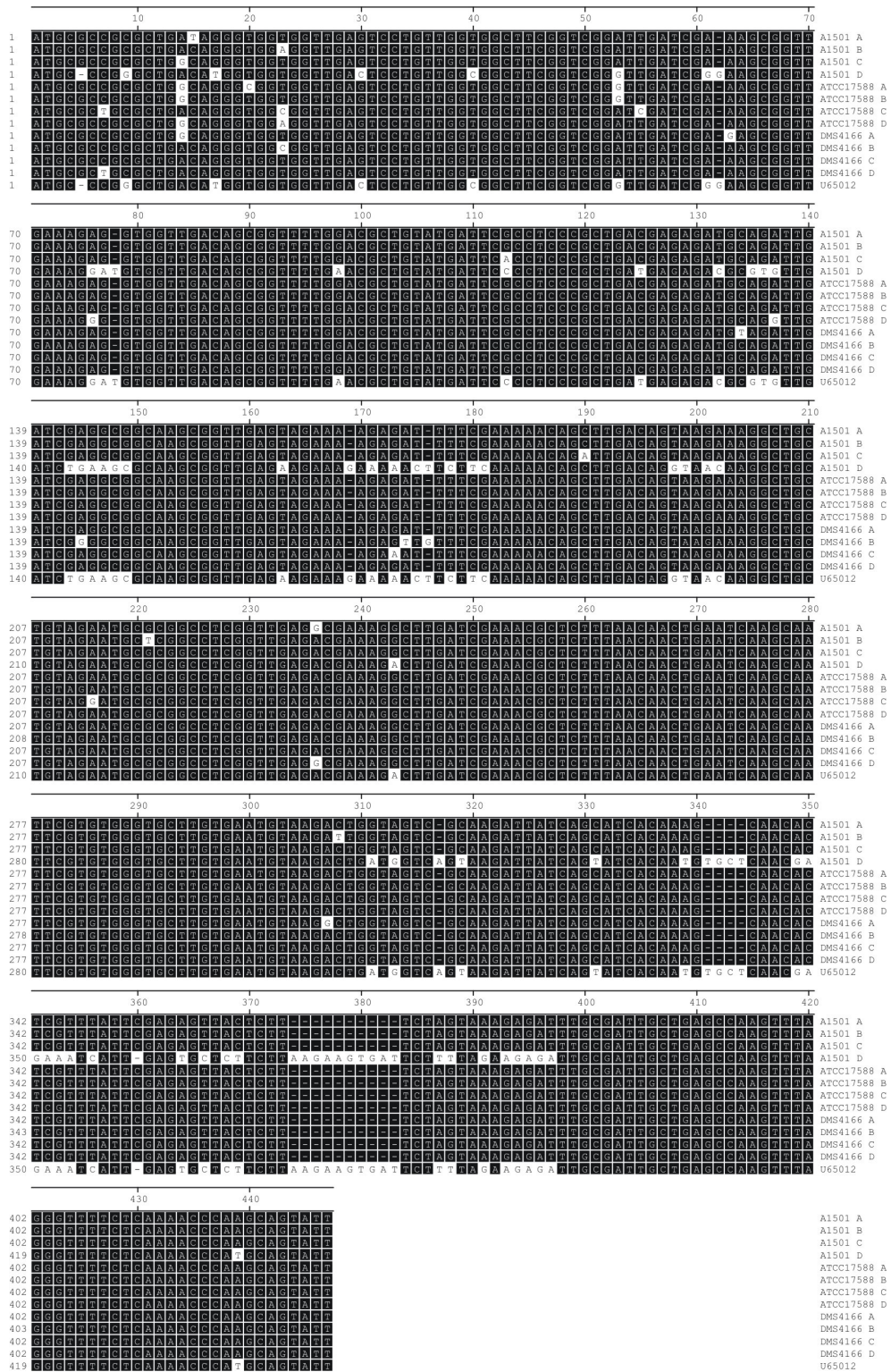
Η ευθυγράμμιση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των τεσσάρων *rrn* του στελέχους *P. stutzeri* A1501 έδειξε ότι τα οπερόνια *rrnA*, *rrnB* και *rrnC* του *P. stutzeri* A1501 είναι σχεδόν ίδια ενώ οι αντίστοιχες ακολουθίες του τέταρτου οπερονίου, *rrnD*, παρουσιάζουν αξιοσημείωτη απόκλιση από τα υπόλοιπα τρία. Οι ενδο-γονιδιωματικές (intragenomic) αποκλίσεις ανάμεσα στα τέσσερα οπερόνια *rrn* ήταν πιο ευδιάκριτες στην ευθυγράμμιση των περιοχών των ITS1 περιοχών καθώς και των 5'-άκρων και 3'-άκρων. Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των 5' άκρων (προαγωγέων) των *rrnA*, *rrnB* και *rrnC* ήταν σχεδόν πανομοιότυπες ενώ ήταν εμφανής η απόκλιση των αλληλουχιών του προαγωγέα του *rrnD* (Εικόνα 3.6). Παρομοίως, οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των 3'-άκρων των οπερονίων *rrnA*, *rrnB* και *rrnC* είναι σχεδόν πανομοιότυπες ενώ διαφέρει σημαντικά αυτή του *rrnD* (Εικόνα 3.7). Οι αλληλουχίες των 16S rRNA, 23S rRNA, 5S rRNA, ITS1, ITS2 περιοχών καθώς και των 5'-άκρων και 3'-άκρων όλων των *rrn* των στελεχών DMS4166 και ATCC17588 είναι σχεδόν πανομοιότυπες (<98% ομολογία) με αυτές των *rrnA*, *rrnB* και *rrnC* του *P. stutzeri* A1501.

Ακολούθησε διερεύνηση της βάσης δεδομένων NCBI, μέσω του αλγόριθμου BLASTN, χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτή την περιοχή του προαγωγέα του *rrnD* του *P. stutzeri* A1501 και διαπιστώθηκε ότι είναι σχεδόν ίδια με την περιοχή του προαγωγέα του οπερονίου *rrn* του στελέχους *P. stutzeri* Zobell. Στη συνέχεια, ευθυγραμμίστηκαν οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των διαφόρων περιοχών ITS1, ITS2, 16S, 23S, 5S rRNA και 5' και 3'-άκρων του στελέχους *P. stutzeri* Zobell με τα αντίστοιχα τμήματα των *P. stutzeri* A1501. Τα αποτελέσματα των ευθυγραμμίσεων έδειξαν ότι υπάρχει μεγάλη ομοιότητα των *P. stutzeri* A1501 *rrnD* και του *rrn* οπερονίου του στελέχους *P. stutzeri*

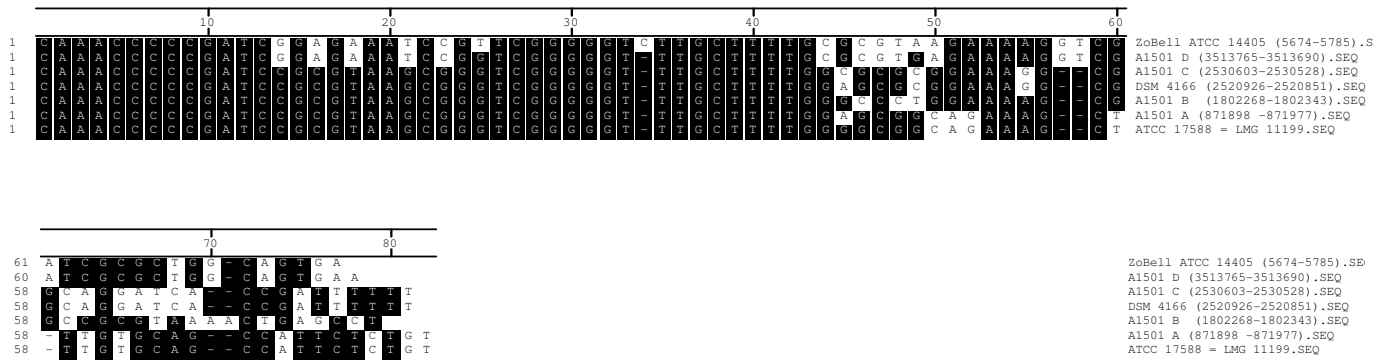
Zobell ιδιαίτερα των αλληλουχιών των 5'-άκρων και 3'-ακρων (Εικόνα 3.6 και Εικόνα 3.7).

Πινάκας 3.1. Συνταγμένες των 16S, 23S, 5S, rDNA γονιδίων, ITS1 και ITS2 περιοχών καθώς και των προαγωγέων των rrn *P. stutzeri*

Οπερόνια rrn	Περιοχή προαγωγή	16S	ITS1	23S	ITS2	5S	3'end
<i>P. stutzeri</i> A1501 A	866280-866708	866709-868244	868245-868748	868749-871639	871638-871765	871766-871897	871898-871973
<i>P. stutzeri</i> A1501 B	1796650-1797078	1797079-1798614	1798615-1799118	1799119-1802009	1802008-1802135	1802136-1802267	1802268-1802343
<i>P. stutzeri</i> A1501 C	2536222-2535793	2535792-2534257	2534256-2533753	2533752-2530862	2530863-2530736	2530735-2530604	2530603-2530528
<i>P. stutzeri</i> A1501 D	3519444-3519000	3518999-3517464	3517463-3516936	3516935-3514045	3514046-3513898	3513897-3513772	3513765-35131690
<i>P. stutzeri</i> ZoBell U65012	1-446	447-1983	1984-2509	2510-5393	5392-5539	5541-5673	5673-5749



Εικόνα 3.6. Ευθυγράμμιση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των 5' άκρων των *rrn* των στελεχών *P. stutzeri* A1501, *P. stutzeri* DMS4166, *P. stutzeri* ATCC17588 και *P. stutzeri* Zobell (U65012).



Εικόνα 3.7. Ευθυγράμμιση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των 3' άκρων των *rrn* των στελεχών *P. stutzeri* A1501, *P. stutzeri* DMS4166, *P. stutzeri* ATCC17588 και *P. stutzeri* Zobell.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η ετερογένεια της ενδοριβωσωμικής περιοχής ITS1 αζωτοδεσμευτικών στελεχών *P. stutzeri* τα οποία απομονώθηκαν από ριζόσφαιρα δημητριακών. Τα αποτελέσματα της ενίσχυσης μέσω PCR της περιοχής ITS1 έδειξαν ότι τα στελέχη CMT.9A (DMS4166), Gr16, Gr17, Gr18, Gr19, Gr20, Gr21, Gr45 και Gr46 δίνουν μια ζώνη με σχεδόν πανομοιότυπο μέγεθος ενώ τα στελέχη Gr50 και A15(A1501) δίνουν δυο ζώνες οι οποίες παρουσιάζουν διαφορές στο μέγεθος και τη νουκλεοτιδική αλληλουχία. Τα στελέχη Gr57 και Gr65 φέρουν ένα ITS1 με πανομοιότυπο μέγεθος και νουκλεοτιδική αλληλουχία σε όλα τα *rrn*. Το δενδρόγραμμα που κατασκευάστηκε με βάση τις περιοχές ITS1 έδειξε ότι όλα τα στελέχη ανήκουν στο είδος *P. stutzeri*. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε αντίθεση με το δενδρόγραμμα που κατασκευάστηκε βάση την αλληλουχία νουκλεοτιδίων του γονιδίου 16S rRNA στο οποίο φαίνεται ότι τα στελέχη Gr57 και Gr65 ανήκουν σε ένα νέο είδος *Pseudomonas*.

Οι περιοχές ITS1 που εξετάστηκαν σε όλα τα γνωστά στελέχη *P. stutzeri*, συμπεριλαμβανομένων των στελεχών που απομονώθηκαν από την Ελλάδα, περιέχουν τα γονίδια tRNA^{Ala} και tRNA^{Ile} (Cladera et al., 2004; Guasp et al., 2000; Sikorski et al., 2005). Η ενδο-γονιδιωμική (intragenomic) ετερογένεια του μεγέθους και της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της περιοχής ITS1 αποτελεί σύνηθες φαινόμενο μεταξύ των ειδών του γένους *Pseudomonas* (Natalini και Scortini, 2007; Mullet et al., 2009; Tamborg et al., 2009).

Η διαφορετική ένταση της ενίσχυσης του προϊόντος PCR των ITS1S και ITS1L των *P. stutzeri* A15 (A1501) και *P. stutzeri* Gr50 στην πηκτή αгарόζης (Εικόνα 3.2) είναι ενδεικτικό ότι υπάρχει ποσοτική διαφορά ανάμεσα στον αριθμό των *rrn* που φέρουν το ITS1S και το ITS1L. Είναι γνωστό ότι το στέλεχος *P. stutzeri* A15(1501) φέρει τρία *rrn* τα οποία φέρουν το ITS1S και ένα *rrn* φέρει το ITS1L (Yan et al., 2008). Το στέλεχος *P. stutzeri* Gr50 ενδεχομένως να φέρει τρία αντίγραφα ITS1S και ένα ITS1L όπως συμβαίνει στο *P. stutzeri* A15 (1501).

Οι αλληλουχίες των ενδοριβωσωμικών περιοχών ITS1 συχνά χρησιμοποιούνται ως γενετικοί μάρτυρες για τον καθορισμό των genomovars διαφόρων στελεχών *P. stutzeri* (Guasp et al., 2000; Sikorski et al., 2005) ή τον προσδιορισμό της

βιοποικιλότητας των *Pseudomonas* spp από περιβαλλοντικά δείγματα (Spasenovski et al., 2009). Με την ανάλυση BLASTN ανάλυση διαπιστώθηκε ότι οι αλληλουχίες που ήταν όμοιες με το ITS1S του *P. stutzeri* A15(1501), είχαν επίσης υψηλή ομολογία με αντίστοιχα τμήματα άλλων στελεχών *P. stutzeri*, όπως τα *P. stutzeri* CCUG 11256, SAND 19, AER2.5, A95/69. Όλα τα παραπάνω στελέχη ανήκουν στο genomovar 2. Αντιθέτως, αλληλουχίες όμοιες με το ITS1L του *P. stutzeri* A15, εντοπίστηκαν σε στελέχη *P. stutzeri* όπως τα ATCC 14405, ATCC 17591, ATCC 17587, A60/72 που ανήκουν στο genomovar 8. Ομοίως, η αλληλουχία ITS1L του *P. stutzeri* Gr50 παρουσιάζει υψηλή ομολογία (98%) με το στέλεχος *P. stutzeri* AN11 που ανήκει στο genomovar 3. Ως εκ τούτου, οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των περιοχών ITS1 θα μπορούσαν ενδεχομένως να χρησιμοποιηθούν, έστω με επιφύλαξη, στο διαχωρισμό σε genomovars των στελεχών *P. stutzeri*.

Πιστεύεται ότι η ενδοριβωσωμική περιοχή ITS1 είναι το πιο ταχέως εξελισσόμενο τμήμα του οπερονίου *rrn* (Chen et al., 2000; Perez Luz et al., 1998). Η παραδοχή ότι το γονίδιο 16S rRNA είναι πολύ συντηρημένο μεταξύ των στελεχών *P. stutzeri* (Venieraki et al., 2011a; Venieraki et al., 2011b; Yu et al., 2011), σε συνδυασμό με την παρουσία ενός τύπου ITS1 (ITS1S) στα τέσσερα οπερόνια *rrn* του *P. stutzeri* DMS4166 και σε επτά από τα οκτώ αζωτοδεσμευτικά στελέχη *P. stutzeri*, όπως επίσης και σε τρία από τα τέσσερα οπερόνια *rrn* του *P. stutzeri* A15(1501) και του στελέχους Gr50, μας επιτρέπουν να υποθέσουμε ότι τα οπερόνια *rrn*, τουλάχιστον όσον αφορά στα αζωτοδεσμευτικά στελέχη *P. stutzeri*, ενδεχομένως εξελίχτηκαν συγχρόνως (concerted evolution). Η παράλληλη εξέλιξη των βακτηριακών οπερονίων *rrn* αποτελεί ένα σύνηθες φαινόμενο ανάμεσα σε βακτήρια αλλά και σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Guthier et al., 1999; Liao et al., 2000; Hashimoto et al., 2003). Βεβαίως, δεν μπορούμε να παραβλέψουμε την πιθανότητα ότι η ετερογένεια των οπερονίων *rrn* αποτελεί ένα παλαιό και σταθερό χαρακτηριστικό, το οποίο παρέχει στα μέλη των διαφόρων ειδών του γένους *Pseudomonas* πλεονεκτήματα για την προσαρμογή τους στις περιβαλλοντικές συνθήκες.

Η σύγκριση (ευθυγράμμιση) των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των ITS1 που εντοπίστηκαν στα οπερόνια *rrn* των *P. stutzeri* A15(1501) με αυτές των ελληνικών αζωτοδεσμευτικών στελεχών *P. stutzeri*, έδειξε ότι η ποικιλομορφία της περιοχής ITS1 στα ίδια γονιδιώματα υπερβαίνει την ποικιλομορφία ανάμεσα στα διαφορετικά γονιδιώματα (Εικόνα 3.3). Φαίνεται ότι στα αζωτοδεσμευτικά στελέχη *P. stutzeri* με

ετερογένεια στην περιοχή ITS1 (π.χ. το στέλεχος A1501) ο υποτιθέμενος μηχανισμός για ταυτόχρονη εξέλιξη χάθηκε ή εναλλακτικά, η ετερογένεια μέσα στο γονιδίωμα ενός στελέχους (π.χ του A1501) μπορεί να είναι το αποτέλεσμα μιας πρόσφατης οριζόντιας μεταφοράς ενός οπερονίου *rrn*, το οποίο δεν έχει ομογενοποιηθεί ακόμα. Σύμφωνα με τα δεδομένα μας, το στέλεχος *P. stutzeri* Zobell θα μπορούσε να παίζει το ρόλο δότη σε ενδεχόμενη οριζόντια μεταφορά του οπερονίου *rrn*, τη στιγμή που οι αλληλουχίες του προαγωγέα, του 16SrRNA, 23SrRNA, ITS1, ITS2, 5S rRNA γονιδίου και 3'-άκρου είναι σχεδόν ίδιες με τα αντίστοιχα τμήματα του *rrnD* του *P. stutzeri* A1501. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται στοιχεία για οριζόντια μεταφορά ολόκληρου οπερονίου *rrn* στην περίπτωση του βακτηρίου *Thermomonospora chromogena* (Yap et al., 1999). Η πιθανότητα για οριζόντια μεταφορά ολόκληρου *rrn* οπερονίου ενισχύεται επίσης από την παρατήρηση ότι πολλά μέλη του είδους *P. stutzeri* μπορούν να μετασχηματιστούν με φυσικό τρόπο είτε κάτω από εργαστηριακές συνθήκες ή στο έδαφος (Sikorski et al., 2002b). Επιπλέον, είναι σύνηθες φαινόμενο, στελέχη τα οποία περιέχουν διαφορετικού τύπου ITS1 να μπορούν να συνυπάρχουν στο ίδιο μικρο-οικοσύστημα (Sikorski et al., 2002b). Υπό αυτήν την έννοια, είναι πιθανό ότι η απόκτηση ενός νέου γενετικού χαρακτηριστικού μπορεί να μη διανεμηθεί ομοιόμορφα σε όλα τα μέλη του είδους.

Η παρουσία διακριτών αλληλουχιών στον προαγωγέα σε διαφορετικά είδη οπερονίων *rrn* του *P. stutzeri* A1501, θέτει το ερώτημα του κατά πόσον οι διαφορετικοί προαγωγείς μεταγράφονται κάτω από διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι έχουν εντοπισθεί διαφορές στη νουκλεοτιδική αλληλουχία των προαγωγέων ανάμεσα σε οπερόνια *rrn* του βακτηρίου *Streptomyces coelicolor*, που ρυθμίζουν τη διαφορική έκφραση των οπερονίων αυτών στα διαφορετικά στάδια μορφολογικής ανάπτυξης, ενώ δεν παρατηρήθηκε επίδραση αυτών κάτω από συνθήκες διαφορετικών συνθηκών ανάπτυξης (Kim et al., 2008). Διακριτοί τύποι οπερονίων *rrn* (με διαφορετικούς προαγωγείς), οι οποίοι έχουν διαφορετική έκφραση κάτω από διαφορετικές θερμοκρασίες, έχουν εντοπισθεί στο αλοφιλικό αρχαιοβακτήριο *Haloarcula marismortui* (Lopez-Lopez et al., 2007). Για το λόγο αυτό, η ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων rRNA, κάτω από διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, αξίζει περαιτέρω μελέτης.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Κεφαλογιάννη Η. 2008. Οικο-φυσιολογική μελέτη βακτηρίων του γένους *Azospirillum*. Διδακτορική διατριβή. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Acinas SG, Marcelino LA, Klepac-Ceraj V, Polz MF. 2004. Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. *J Bacteriol.* 186: 2629–2635.
- Andrade G, Esteban E, Velasco L, Lorite MJ, Bedmar EJ. 1997. Isolation and identification of N₂-fixing microorganisms from rhizosphere of *Capparis spinosa* (L). *Plant Soil.* 197: 19-23.
- Apirion D, Miczak A. 1993. RNA processing in prokaryotic cells. *BioEssays* 15: 113-120.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biology.* 215:403-410.
- Barraquio WL, Daroy MLG, Tirol AC, Ladha JK, Watanabe I. 1988. Laboratory acetylene reduction assay for relative measurement of N₂-fixing activities associated with field-grown wetland rice plants. *Plant Soil.* 90: 359-372.
- Bennasar A, Rosselo-Mora R, Lalucat J, Moore ERB. 1996. 16S gene sequence analysis relative to genomovars of *Pseudomonas stutzeri* and proposal of *Pseudomonas balearica* sp.nov. *Int. J Syst. Bacteriol.* 46: 200-205.
- Benassar A, Guasp C, Lalucat J. 1998. Molecular methods for the detection and identification of *Pseudomonas stutzeri* in pure culture and environmental samples. *Microb. Ecol.* 35:22-33.
- Carlson CA, Pierson LS, Rosen JJ, Ingraham JL. 1983. *Pseudomonas stutzeri* and related species undergo natural transformation. *J Bacteriol.* 153: 93-99.
- Chen H, Lim CK, Lee YK, Chan YN. 2000. Comparative analysis of the genes encoding 23S-5S rRNA intergenic spacer regions of *Lactobacillus casei*-related strains. *Int. J Syst. Evol. Microbiol.* 50: 471-478.
- Chen M, Yan Y, Zhang W, Lu W, Wang J, Ping S, Lin M. 2011. Complete genome sequence of the type strain *Pseudomonas stutzeri* CGMCC 1.1803. *J Bacteriol.* 93: 6095.
- Chowdhury SP, Schmid M, Hartmann A, Tripathi AK. 2007. Identification of diazotrophs in the culturable bacterial community associated with roots of *Lasiurus indicus*, a perennial grass of Thar desert, India. *Microb. Ecol.* 54: 82-90.

Cladera AM, Bennasar A, Barcelo M, Lalucat J, Garcia-Valdez E.(2004. Comparative genetic diversity of *Pseudomonas stutzeri* genomovars, clonal structure and phylogeny of the species. J Bacteriol. 186: 5239-5248.

Desnoues N, Lin M, Guo X, Ma L, Carreño-Lopez R, Elmerich C. 2003. Nitrogen fixation genetics and regulation in a *Pseudomonas stutzeri* strain associated with rice. Microbiology 149: 2251-2262

Deutscher MP. 2009. Maturation and degradation of ribosomal RNA in bacteria Prog Mol. Biol. Transl. Sci. 85:369-91.

Gao X, Chen JC, Wu Q, Chen GQ. 2011. Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels. Cur. Opin. Biotechnol. 22:768-774.

Garcia-Martinez J, Acinas SG, Anton AI, Rodriguez-Valera F. 1999. Use of the 16-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. J Microbiol. Methods 36: 55-64.

Gauthier F, Neufeld JD, Driscoll BT, Archibald FS. 2000. Coliform bacteria and nitrogen fixation in pulp and paper mill affluent treatment systems. Appl. Environ. Microbiol. 66: 5155-5160.

Ginard M, Lalucat J, Tummler B, Romling U. 1997. Genome organization of *Pseudomonas stutzeri* and resulting taxonomic and evolutionary considerations. Int. J Syst. Microbiol. 47: 132-143.

Guasp C, Moore ERB, Lalucat J, Bennasar A. 2000. Utility of internally transcribed 16S-23S- rDNA spacer regions for the definition of *Pseudomonas stutzeri* genomovars and other *Pseudomonas* species. Int. J Syst. Microbiol. 50: 1629-1639

Hashimoto JG, Stevenson BS, Schmidt TM. 2003. Rates and consequences of recombination between rRNA operons. J Bacteriol. 185: 966-972.

Hatayama K, Kawai S, Shoun H, Ueda Y, Nakamura A. 2005. *Pseudomonas azotifigens* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium isolated from a compost pile. Int. J Syst. Evol. Microbiol. 55: 1539-1544

Karn SK, Chakrabarty SK, Reddy MS. (2010) Pentachlorophenol degradation by *Pseudomonas stutzeri* CL7 in the secondary sludge of pulp and paper mill. J Environ. Science 22:1608-1612

Kerkhof L. (1997.) A ribosomal RNA operon from *Pseudomonas stutzeri* Zobell. Gene 192: 241-243.

Kim HL, Song WS, Kim K, Lee K. 2008. Characterization of heterogeneous LSU rRNA profiles in *Streptomyces coelicolor* under different growth stages and conditions Curr. Microbiol 57: 537-541.

- Kraft B, Strous M, Tegetmeyer HE. 2011. Microbial nitrate respiration-Genes, enzymes and environmental distribution. *J Biotechnol.* 20:104-117.
- Krotzky A, Werner D. 1987. Nitrogen fixation in *Pseudomonas stutzeri*. *Arch. Microbiol.* 147: 48-57.
- Kulakov, LA, McAlister MB, Ogden KL, Larkin MJ, O'Hanlon JF. 2002. Analysis of bacteria contaminating ultrapure water in industrial systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1548-1555.
- Kuroda M, Notaguchi E, Sato A, Yoshioka M, Hasegawa A, Kagami T, Narita T, Yamashita M, Sei K, Soda S, Ike M. 2011. Characterization of *Pseudomonas stutzeri* NT-I capable of removing soluble selenium from the aqueous phase under aerobic conditions *J Biosci. Bioeng.* 112:259-264.
- Lalucat J, Bennasar A, Bosch R, Garcia-Valdes E, Palleroni NJ. 2006. Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 510-547.
- Lin M, Smalla K, Heuer H, van Elsas JD. 2000. Effect of an *Alcaligenes faecalis* inoculant strain on bacteria communities in flooded soil microcosms planted with rice seedlings. *Appl. Soil Science.* 15:211-225.
- Lin M, Ping SZ, You SB. 1992. Effect of inoculation with *Alcaligenes faecalis* on excretion of protons by rice root microecology of the rice rhizosphere. *Acta Phytophysiol. Sin.* 18:233-238.
- Liao D. 2000. Gene conversion drives within genomic sequences: concerted evolution of ribosomal genes in bacteria and archaea. *J Mol. Evol.* 51: 305-317.
- Locatelli L, Tarnawski S, Hamelin J, Rossi P, Aragno M, Fromin N. 2002. Specific PCR amplification for the genus *Pseudomonas* targeting the 3' half of 16S rDNA and the whole 16S-23S rDNA spacer. *System. Appl. Microbiol.* 25: 220-227.
- López-López A, Benlloch S, Bonfá M, Rodríguez-Valera F, Mira A. 2007. Intragenomic 16S rDNA divergence in *Haloarcula marismortui* is an adaptation to different temperatures. *J Mol. Evol.* 65: 687-696.
- Lowe TM, Eddy SR. 1997. tRNAScan-SE: a program of improved detection of transfer RNA genes. *Nucleic Acids Res.* 25: 955-964.
- Meier P, Wackernagel W. 2003. Mechanisms of homology-facilitated illegitimate recombination for foreign DNA acquisition in transformable *Pseudomonas stutzeri*. *Mol. Microbiol.* 48:1107-1116.
- Milyutina IA, Bobrova VK, Matveena EV, Schaad NW, Troitsky AV. 2004. Intragenomic heterogeneity of the 16S rRNA-23S rRNA internal transcribed spacer among *Pseudomonas syringae* and *Pseudomonas fluorescens* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 239: 17-23.

- Mirza MS, Mehnaz S, Normand P, Prigent-Combaret C, Moenne-Loccoz Y, Bally R, Malik KA. 2006. Molecular characterization and PCR-detection of a nitrogen-fixing *Pseudomonas* strain promoting rice growth. *Biol. Fertil. Soil.* 43:136-170.
- Mulet M, Bennasar A, Lalucat J, Garcia-Valdes E. 2009. An rpoD-based PCR procedure for the identification of *Pseudomonas* species and for their detection in environmental samples. *Mol. Cell Prob.* 23: 140-147.
- Mulet M, Lalucat J, Garcia-Valdes EM. 2010. DNA base sequence analysis of the *Pseudomonas* species. *Environ. Microbiol.* 12:1513-1530.
- Mullis KB, Faloona FA, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:263-273.
- Muthukumarasay R, Kang UG, Park KD, Jeon WT, Park CY, Cho YS, Kwon SW, Song J, Roh DH, Revathi G. 2007. Enumeration, isolation and identification of diazotrophs from Korean wetland rice varieties grown with long-term application of N and compost and their short-term inoculation effect on rice plants. *J Appl. Microbiol.* 102: 981-991
- Natalini E, Scortichini M. 2007. Variability of the 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer in *Pseudomonas avellanae* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 271: 274-280.
- Moreno-Vivian C, Cabello P, Martinez-Luque M, Blasco R, Castillo F. 1999. Prokaryotic nitrate reduction: Molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *J Bacteriol.* 181: 6573-6584.
- Peix A, Ramirez-Bahena MH, Velazquez E. 2009. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas* *Infect. Genet. Evolut.* 9:1132-1147.
- Perez Luz S, Rodriguez-Valera F, Lan R, Reeves PR. 1998. Variation of the ribosomal operon 16S-23S gene spacer region in representatives of *Salmonella enterica* subspecies. *J Bacteriol.* 180: 2144-2151.
- Puente M-E, Bashan Y. 1994. The desert epiphyte *Tillandsia recurvata* harbours the nitrogen-fixing bacterium *Pseudomonas stutzeri*. *Can. J Bot.* 72: 406-408.
- Rediers H, Bonnacarrere V, Rainey BP, Hamonts K, Vanderleyden J, De-Mot R. 2003. Development and application of a *dapB*-based *in vivo* expression technology system to study colonization of rice by the endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pseudomonas stutzeri* A15 *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6864-6874.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetics trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Sikorski J, Lalucat J, Wackernagel W. 2005. Genomovars 11 and 18 of *Pseudomonas stutzeri*, identified among isolates from soil and marine sediment. *Int. J Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1767-1770.

- Sikorski J, Möhle M, Wackernagel W. 2002. Identification of complex composition, strong strain diversity and directional selection in local *Pseudomonas stutzeri* populations from marine sediment and soils. *Environ. Microbiol.* 4: 465-476
- Sikorski J, Teschner N, Wackernagel W. 2002. Highly different levels of natural transformation are associated with genomic subgroups within a local population of *Pseudomonas stutzeri* from soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 865-873.
- Silby MW, Cerdano-Tarraga AM, Vernikos GS, Giddens SR, Jackons RW, Preston GM et al.,. 2009. Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. *Gen. Biology.* 10: R51.
- Smith LM, Tola E, deBoer P, O’Gara F. 1999. Signaling by the fungus *Pythium ultimum* represses expression of two ribosomal RNA operons with key roles in the rhizosphere ecology of *Pseudomonas fluorescens* F113. *Environ. Microbiol.* 1: 495-502.
- Spasenovski T, Carroll MP, Payne MS, Bruce KD. 2009. Molecular analysis of diversity within the genus *Pseudomonas* in the lungs of cystic fibrosis patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 63: 261-267.
- Stackebrandt E, Ebers J. 2006. Taxonomic parameters revisited tarnished gold standards. *Microbiol. Today* 33:152–155.
- Stackebrandt E, Frederiksen W, Grimont GGM, PAD KP, Maiden MCJ, Nesme X, Rosseló-Mora R, Swings J, Truper HG, Vauterin L, Ward AC, Whitman WB. 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:1043–1047.
- Stewart FJ, Cavanaugh CM. 2007. Intragenomic variation and evolution of the internal transcribed spacer of the rRNA operon in bacteria. *J Mol. Evol.* 65: 44-67.
- Tambong JT, Xu R, Bromfield ESP. 2009. Intercistronic heterogeneity of the 16S-23S rRNA spacer region among *Pseudomonas* strains isolated from subterranean seeds of hog peanut (*Amphicarpa bracteata*). *Microbiology* 155: 2630-2640.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acid Res.* 22:4673-4680.
- Venieraki A, Dimou M, Vezyri E, Kefalogianni I, Argyris N, Liara G, Pergalis P, Chatzipavlidis I, Katinakis P. 2011a. Characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from field-grown barley, oat and wheat. *J Microbiol.* 49:535-534.
- Venieraki A, Dimou M, Pergalis P, Kefalogianni I, Chatzipavlidis I, Katinakis P. 2011b. The genetic diversity of culturable nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of wheat. *Microb. Ecol.* 61: 277-285.

Vermeiren H, Willems A, Schoofs G, de Mot R, Keijers V, Hai W, Vanderleyden J. 1999. The rice inoculant strain *Alcaligenes faecalis* A15 is a nitrogen-fixing *Pseudomonas stutzeri*. Syst. Appl. Microbiol. 22: 215-224.

Yan Y, Yang J, Dou Y, Chen M, Ping S, Peng J, Lu W, Zhang W, Yao Z, Li H, Liu W, He S, Geng L, Zhang X, Yang F, Yu H, Zhan Y, Li D, Lin Z, Wang Y, Elmerich C, Lin M, Jin Q. 2008. Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 7564-7569

Yan Y, Ping S, Peng J, Han Y, Li L, Yang J, Dou Y, Li Y, Fan H, Fan Y, Li D, Zhan Y, Chaen M, Lu W, Zhang W, Cheng Q, Jin Q, Lin M. 2010. Transcription analysis of nitrogen fixation and ammonium repression in root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. BMC Genom. 11:11-22.

Yap WH, Zhang Z, Wang Y. 1999. Distinct types of rRNA operons exist in the genome of the actinomycete *Thermomonospora chromogena* and evidence for horizontal transfer of an entire rRNA operon. J Bacteriol 181: 5201-5209.

You CB, Zhou FY. 1989. Non-nodular endorhizospheric nitrogen fixation in wetland rice. Can J Microbiol 35: 403-408.

You CB and Zhou FY. 1991. Non-nodular endorhizospheric nitrogen fixation in wetland rice. In: You CB (Ed.)The associative nitrogen fixation in the rice rhizosphere, Agriculture Publishing House, Beijing,pp.305-314.

You CB, Lin M, Fang XJ. 1995. Field release of genetically engineered associative diazotrophs and its risk assessment. Plant Soil. 137: 81-85.

Yu H, Yuan M, Lu W, Yang J, Dai S, Li Q, Yang Z, Dong J, Sun L, Deng Z, Zhang W, Chen M, Ping S, Han Y, Zhan Y, Yan Y, Jin Q, Lin M. 2011. Complete genome sequence of the nitrogen-fixing and rhizosphere-associated bacterium *Pseudomonas stutzeri* strain DMS4166. J Bacteriol.193:3422-3423.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α΄

ΣΥΝΘΕΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΜΕΣΩΝ

Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης βακτηρίων *E.coli*

Lysogeny broth (LB)

a) Για την παρασκευή 1 l υγρού θρεπτικού διαλύματος LB, σε τελικό όγκο 1 l dH₂O προστίθενται:

- 10 g NaCl
- 10g Bacto-Trypton (Casein) και
- 5 g εκχύλισμα ζύμης Yeast extract.

b) Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου προστίθεται στο παραπάνω διάλυμα 1,5% Agar.

Συνθήκες ανάπτυξης: 37 °C για 16 h

Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης βακτηρίων *Pseudomonas stutzeri*

a) Για την παρασκευή 1 l υγρού θρεπτικού διαλύματος NA, σε τελικό όγκο 1 l dH₂O προστίθενται:

- 5 g Peptone
- 3 g Nutrient broth

b) Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου προστίθεται στο παραπάνω διάλυμα 1,5% Agar.

Συνθήκες ανάπτυξης: 30 °C για 18 h

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β΄

ΣΥΝΘΕΣΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

A. Διαλύματα απομόνωσης DNA

1. **Tris-HCl 1M pH:7:** Σε τελικό όγκο 1 l H₂O διαλύονται 121,14 g Tris-Base (BDH). Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 7,0 με την προσθήκη πυκνού HCl. Το τελικό διάλυμα αποστειρώνεται και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.
2. **TE:** Tris-HCl 10 mM pH:8, EDTA. 25 mM
3. **Λυσοζύμη:** 50 mg λυσοζύμης διαλύονται σε 1 ml dH₂O (Boehringer-Mannheim). Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.
4. **RNase A:** 10 mg RNase A διαλύονται σε 1 ml Tris-HCl 10 mM pH:7,5 / NaCl 15 mM. Το διάλυμα θερμαίνεται στους 100 °C για 15 min, με σκοπό την αδρανοποίηση τυχόν δράσης DNase, αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου και φυλάσσεται στους -20 °C.

B. Διαλύματα ανάλυσης νουκλεϊκών οξέων

5. **TAE 1x:** Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα TAE 50x, το οποίο αραιώνεται 50 φορές. **TAE 50x:** 242 g Tris base, 57,1 ml οξικού οξέος και 0,5 ml EDTA pH:8,0 σε ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 1l.
6. **Βρωμιούχο αιθίδιο:** Το βρωμιούχο αιθίδιο παρασκευάζεται ως πυκνό διάλυμα 0,5 mg/ml σε dH₂O και φυλάσσεται στους 4 °C. Η τελική συγκέντρωση του βρωμιούχου αιθιδίου στην πηκτή είναι 0,5 μg/ml.
7. **Διάλυμα φόρτωσης (Loading buffer):** 0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανό του ξυλενίου και 30% γλυκερόλη.

C. Διαλύματα υποκλωνοποίησης τμημάτων DNA

8. **Ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης 10x:** Tris-HCl 0,66 M pH:7,6 , MgCl₂ 50 mM DTT 50 mM και ATP 10 mM. Το πυκνό ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης φυλάσσεται σε μικρές ποσότητες στους -20 °C.

D. Διαλύματα μετασχηματισμού κυττάρων E. coli

9. **IPTG 100 mM:** 0,238 g IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, SIGMA) διαλύονται σε 1 ml ddH₂O. Το διάλυμα αποστειρώνεται με φίλτράρισμα (0,22 μm Millipore) και φυλάσσεται στους -20 °C.
10. **X-Gal 2%:** 0,02 g X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosidase, SIGMA) (Boehringer-Mannheim) προστίθενται σε 1 ml διμεθυλ-φορμαμίδιο.

E. Διαλύματα αντίδρασης PCR

11. **Ρυθμιστικό διάλυμα PCR 10x:** Tris-HCl 100 mM pH:8,3 , KCl 500 mM, MgCl₂ 15 mM, 0,1% (w/v) και gelatin (BDH)

ΜΗΤΡΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ANTIBIOTIKΩΝ

Αμπικιλίνη (Ampicillin)

Μητρικό διάλυμα: 100mg/ml σε dH₂O

Τελική συγκέντρωση: 100μg/ml θρεπτικού υλικού