



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ  
ΜΕ ΤΙΤΛΟ:

**ΓΕΝΕΤΙΚΗ**  
**ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΑ**  
**ΑΖΩΤΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΩΝ**  
**ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΤΑ ΟΠΟΙΑ**  
**ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΑΠΟ**  
**ΤΗ ΡΙΖΟΣΦΑΙΡΑ**  
**ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΩΝ**  
**ΔΗΜΗΤΡΙΑΚΩΝ**

**ΑΡΓΥΡΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ**

ΑΘΗΝΑ 2011

$\mu$   $\mu$   $\mu$   $\mu$   $\mu$

$\mu$   $\mu$

1. ( )
2. ( )
3.  $\mu$  ( )





## ABS RACT

The cultivation of cereals is very widespread in Greece. Barley and oat like most of the grasses have an increased demand for nitrogen, a very important element for their growth. Nitrogen in nature is non-assimilable and cannot be absorbed from the plants. The provision of nitrogen to the rhizosphere of grain in nature is accomplished by free-living diazotrophic bacteria. The aim of the present study is the identification by molecular methods of 8 strains of diazotrophic bacteria, collected from the rhizosphere of barley and oat plant samples deriving from regions that constitute the main grain growing regions of Greece. Specifically, a molecular analysis of the *nifH* gene was conducted, which encodes the Fe-protein of nitrogenase ( nitrogenase reductase ) and is responsible for the nitrogen-fixing ability. We also proceed to the analysis of two housekeeping genes, the gene that encodes for the 16S rRNA, which is widely accepted as an indispensable tool for the phylogenetic classification, and *dnaK* which encodes for chaperones responsible for important cellular functions. Finally we analysed the gene which that encodes the indole-pyruvate decarboxylase *ipdC* in certain strains. The phylogenetic analysis carried out showed that among the 8 strains of diazotrophic bacteria, 5 strains belong to the *Azospirillum* genus ( *A. brasilense*, *A. zeae* ) and 3 strains belong to *Pseudomonas stutzeri* species.

## Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	5
ABSTRACT.....	6
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	7
1.1 Το άζωτο και η βιολογική του δέσμευση.....	7
1.2 Η διαδικασία της αζωτοδέσμευσης.....	8
1.3 Αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί.....	9
1.3.1 Συμβιωτικοί αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί.....	9
1.3.2 Μη-συνβιωτικοί αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί.....	10
1.3.3 Αζωτοδεσμευτικά βακτήρια ελεύθερης διαβίωσης.....	11
1.4 Τα χαρακτηριστικά του γένους <i>Azospirillum</i> .....	12
1.5 Μηχανισμός αποικισμού της ριζόσφαιρας.....	14
1.6 Τρόποι προαγωγής της ανάπτυξης.....	15
1.7 Το γονιδίωμα των <i>Azospirillum</i> .....	17
1.8 Το γένος των <i>Azospirillum</i> .....	19
1.8.1 <i>Azospirillum lipoferum</i> sp.....	20
1.8.2 <i>Azospirillum brasilense</i> sp.....	21
1.8.3 <i>Azospirillum largimobile</i> sp.....	23
1.8.4 <i>Azospirillum amazonense</i> sp.....	24
1.8.5 <i>Azospirillum halopraeferens</i> sp.....	25
1.8.6 <i>Azospirillum irakense</i> sp.....	26
1.8.7 <i>Azospirillum doebereineriae</i> sp.....	27
1.8.8 <i>Azospirillum oryzae</i> sp.....	28
1.8.9 <i>Azospirillum melinis</i> sp.....	29
1.8.10 <i>Azospirillum zeae</i> sp.....	29
1.8.11 <i>Azospirillum canadense</i> sp.....	30

1.8.12 <i>Azospirillum rugosum</i> sp. ....	31
1.8.13 <i>Azospirillum massilensis</i> sp. ....	31
1.8.14 <i>Azospirillum palatum</i> sp. ....	31
1.8.15 <i>Azospirillum picis</i> sp. ....	32
1.8.16 <i>Azospirillum thiophilum</i> sp. ....	33
1.9 <i>Pseudomonas stutzeri</i> .....	34
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	36
2.1 Βακτηριακά στελέχη .....	36
2.2 Απομόνωση νουκλεϊνικών οξέων .....	37
2.2.1 Απομόνωση ολικού γονιδιωματικού DNA από Gram (-) βακτήρια .....	37
2.2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα <i>E. coli</i>	38
2.3 Ανάλυση νουκλεϊνικών οξέων .....	40
2.3.1 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων.....	40
2.3.2 Πέψη DNA με χρήση ένζυμων (ενδονουκλεασών) περιορισμού .....	41
2.3.3 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αγαρόζης.....	42
2.4 Υποκλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακό φορέα.....	44
2.4.1 Χαρακτηριστικά πλασμιδιακού φορέα.....	44
2.5 Μετασχηματισμός κυττάρων <i>E. coli</i> .....	47
2.5.1 Υγρές και στερεές καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> .....	47
2.5.2 Δημιουργία βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> ικανών για μετασχηματισμό (Competent cells).....	47
2.5.3 Μετασχηματισμός ικανών κυττάρων <i>E. coli</i> με πλασμίδια .....	47
2.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) .....	48
2.6.1 Αρχή της μεθόδου.....	48
2.6.2 Ενίσχυση τμήματος DNA (PCR).....	50
2.7 Σύγκριση ακολουθιών - φυλογενετική ανάλυση.....	51
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....	53

ΣΥΝΘΕΣΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ .....	53
ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΕΧΝΙΤΩΝ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΜΕΣΩΝ .....	55
ΣΥΝΘΕΣΗ ΜΗΤΡΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ -ANTIBIOTΙΚΩΝ .....	56
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	57
3.1 Μοριακή ανάλυση γονιδίου 16S rRNA .....	57
3.1.1 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου 16S rRNA .....	58
3.1.2 Ευθυγράμμιση των 10 ακολουθιών 16S rRNA <i>Azospirillum</i> .....	60
3.1.3 Πίνακας αποστάσεων των 10 ακολουθιών .....	63
3.1.4 Αποτελέσματα BLAST και συχνότητα νουκλεοτιδίων .....	64
3.1.5 Φυλογενετικό δέντρο των 12 ακολουθιών 16S rRNA <i>Azospirillum</i> .....	65
3.1.6 Ευθυγράμμιση των 7 ακολουθιών 16S rRNA <i>Pseudomonas</i> .....	66
3.1.7 Πίνακας αποστάσεων των 7 ακολουθιών .....	69
3.1.8 Αποτελέσματα BLAST και συχνότητα νουκλεοτιδίων .....	70
3.1.9 Φυλογενετικό δέντρο των 10 ακολουθιών 16S rRNA <i>Pseudomonas</i> .....	71
3.2. Μοριακή ανάλυση γονιδίου <i>nifH</i> .....	72
3.2.1 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου <i>nifH</i> .....	73
3.2.2 Ευθυγράμμιση των 8 ακολουθιών <i>NifH Azospirillum</i> .....	75
3.2.3 Πίνακας αποστάσεων των 8 ακολουθιών .....	76
3.2.4 Αποτελέσματα BLAST και συχνότητα νουκλεοτιδίων .....	77
3.2.5 Το φυλογενετικό δέντρο των 9 ακολουθιών <i>nifH azospirillum</i> .....	78
3.2.6 Ευθυγράμμιση των 6 ακολουθιών <i>NifH Pseudomonas</i> .....	79
3.2.7 Πίνακας αποστάσεων των 6 ακολουθιών .....	80
3.2.8 Αποτελέσματα BLAST και συχνότητα νουκλεοτιδίων .....	81
3.2.9 Το φυλογενετικό δέντρο των 6 ακολουθιών <i>nifH Pseudomonas</i> .....	82
3.3 Μοριακή ανάλυση γονιδίου <i>ipdC</i> .....	83
3.3.1 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου <i>ipdC</i> .....	84
3.3.2 Ευθυγράμμιση των 5 ακολουθιών <i>ipdC Azospirillum</i> .....	86



3.3.3 Πίνακας αποστάσεων των 5 ακολουθιών .....	87
3.3.4 Αποτελέσματα BLAST και συχνότητα νουκλεοτιδίων.....	88
3.3.5 Το φυλογενετικό δέντρο των 5 ακολουθιών <i>ipdC Azospirillum</i> .....	89
3.4 Μοριακή ανάλυση γονιδίου <i>dnaK</i> .....	90
3.4.1 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου <i>dnaK</i> .....	91
3.4.2 Ευθυγράμμιση των 6 ακολουθιών <i>dnaK Azospirillum</i> .....	93
3.4.3 Πίνακας αποστάσεων των 6 ακολουθιών .....	94
3.4.4 Αποτελέσματα BLAST και συχνότητα νουκλεοτιδίων.....	95
3.4.5 Το φυλογενετικό δέντρο των 8 ακολουθιών <i>dnaK Azospirillum</i> .....	96
3.4.6 Ευθυγράμμιση των 6 ακολουθιών <i>dnaK Pseudomonas</i> .....	97
3.4.7 Πίνακας αποστάσεων των 6 ακολουθιών .....	97
3.4.8 Αποτελέσματα BLAST και συχνότητα νουκλεοτιδίων.....	98
3.4.9 Το φυλογενετικό δέντρο των 7 ακολουθιών <i>dnaK Pseudomonas</i> .....	99
4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	100
5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	108

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Από τις πιο διαδεδομένες καλλιέργειες στον Ελλαδικό χώρο αποτελεί η καλλιέργεια των δημητριακών. Η βρώμη και το κριθάρι όπως και όλα σχεδόν τα αγρωστώδη έχουν αυξημένες ανάγκες σε άζωτο, στοιχείο σημαντικό για την ανάπτυξη τους, που όμως η μη-αφομοιώσιμη μορφή του στην φύση, δεν το καθιστά ικανό να απορροφηθεί από τα φυτά. Έτσι η διαδικασία τροφοδότησης της ριζόσφαιράς τους με άζωτο στη φύση επιτελείται από αζωτοδεσμευτικά βακτήρια ελεύθερης διαβίωσης. Ο στόχος της παρούσας διατριβής αποτέλεσε την ταυτοποίηση με μοριακές μεθόδους 8 στελεχών αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων, τα οποία συλλέχθηκαν από τη ριζόσφαιρα φυτικών δειγμάτων βρώμης και κριθαριού προερχόμενα από τα διαμερίσματα της Ελλάδας που αποτελούν τους κύριους σιτοβολώνες της χώρας. Συγκεκριμένα, αναλύθηκε μοριακά το γονίδιο *nifH* που κωδικοποιεί για την Fe-πρωτεΐνη της νιτρογενάσης (αναγωγή νιτρογενάσης) και είναι υπεύθυνο για την διαδικασία της αζωτοδεύσμησης. Εν συνεχεία προχωρήσαμε σε ανάλυση δύο αρκετά συντηρημένων γονιδίων του 16S rRNA, όπου αποτελεί το πιο αποδεκτό και ευρέως χρησιμοποιούμενο γονίδιο στην βακτηριακή ταξινόμηση και φυλογένεια, και του *dnaK* που κωδικοποιεί για μόρια σαπερόνης (chaperone protein) τα οποία εμπλέκονται σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες. Τέλος σε ορισμένα στελέχη αναλύθηκε το γονίδιο το οποίο εκφράζει την αποκαρβοξυλάση του ινδολοπυροβικού οξέος *ipdC*. Η φυλογενετική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε έδειξε ότι από τα 8 αζωτοδεσμευτικά στελέχη πέντε ανήκουν στο γένος *Azospirillum* (*A. brasilense*, *A. zea* ) και τα τρία στο είδος *Pseudomonas stutzeri*.

## ABSTRACT

The cultivation of cereals is very widespread in Greece. Barley and oat like most of the grasses have an increased demand for nitrogen, a very important element for their growth. Nitrogen in nature is non-assimilable and cannot be absorbed from the plants. The provision of nitrogen to the rhizosphere of grain in nature is accomplished by free-living diazotrophic bacteria. The aim of the present study is the identification by molecular methods of 8 strains of diazotrophic bacteria, collected from the rhizosphere of barley and oat plant samples deriving from regions that constitute the main grain growing regions of Greece. Specifically, a molecular analysis of the *nifH* gene was conducted, which encodes the Fe-protein of nitrogenase (nitrogenase reductase) and is responsible for the nitrogen-fixing ability. We also proceed to the analysis of two housekeeping genes, the gene that encodes for the 16S rRNA, which is widely accepted as an indispensable tool for the phylogenetic classification, and *dnaK* which encodes for chaperones responsible for important cellular functions. Finally we analysed the gene which that encodes the indole-pyruvate decarboxylase *ipdC* in certain strains. The phylogenetic analysis carried out showed that among the 8 strains of diazotrophic bacteria, 5 strains belong to the *Azospirillum* genus (*A. brasilense*, *A. zea*) and 3 strains belong to *Pseudomonas stutzeri* species.

# 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Το άζωτο και η βιολογική του δέσμευση

Το άζωτο είναι απαραίτητο για τη ζωή αφού αποτελεί βασικό συστατικό των αμινοξέων και νουκλεϊνικών οξέων. Η πλειονότητα των ζωντανών οργανισμών όπως επίσης και τα φυτά δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν το μοριακό άζωτο που βρίσκεται εν αφθονία στην ατμόσφαιρα, και για τον λόγο αυτόν υπάρχει η ανάγκη μετατροπής του σε κάποια άλλη πιο “εύχρηστη” μορφή. Η μετατροπή αυτή επιτυγχάνεται με δυο τρόπους α) την φυσική δέσμευση του αζώτου, όπου το άζωτο της ατμόσφαιρας ενώνεται με το οξυγόνο ή το υδρογόνο των υδρατμών, σχηματίζοντας νιτρικά ιόντα ή αμμωνία αντίστοιχα όπου με τη βοήθεια της βροχής μεταφέρονται στο έδαφος και β) την βιολογική αζωτοδέσμευση χάρη στην δράση αζωτοδεσμευτικών μικροοργανισμών.

Η βιολογική αζωτοδέσμευση, αποτελεί τον κύριο τρόπο μετατροπής του ελεύθερου αζώτου σε χρήσιμες χημικές ενώσεις και συνεισφέρει 100-290 Tg N ανά έτος στη βιόσφαιρα (Hsu & Buckley, 2009). Η δέσμευση αζώτου μέσω της συμβιωτικής σχέσης ψυχανθών-ριζοβίων παρουσιάζει την μεγαλύτερη συνεισφορά, και ανέρχεται σε μερικές εκατοντάδες Kg/N/εκτάριο/έτος στις εντατικές καλλιέργειες (Lindemann & Glover, 2003). Η βιολογική αζωτοδέσμευση πραγματοποιείται με τη βοήθεια μικροοργανισμών του εδάφους, αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, τα οποία είτε ζουν ελεύθερα είτε συνηθέστερα συμβιώνουν (πχ. *Rhizobium*) στις ρίζες ορισμένων φυτών όπως τα ψυχανθή (σογια, μπιζελια, κουκιά κλπ.). Τα συμβιωτικά αζωτοδεσμευτικά βακτήρια μετατρέπουν το ατμοσφαιρικό άζωτο σε αμμωνιακό μέρος των οποίων αξιοποιούνται από τα φυτά για τη βιοσύνθεση πρωτεϊνών και άλλων αζωτούχων ενώσεων, και σε αντάλλαγμα τα διαθέτουν σάκχαρα τα οποία χρειάζονται τα βακτήρια.

Μόνο ορισμένα βακτήρια έχουν την ικανότητα να αζωτοδεσμεύουν, είτε ως ελεύθερα διαβιούντα, όπως τα μικροαερόβια *Azospirillum*, τα αερόβια *Azotobacter*, και ορισμένα κυανοβακτήρια, είτε διαμορφώνοντας συμβιωτικές σχέσεις με ψυχανθή φυτά, όπως αυτά του γένους *Rhizobium* και *Bradyrhizobium* (Postgate 1982, Bailey & Ollis 1986, Atlas & Bartha 1993). Όλοι οι άλλοι οργανισμοί (ευκαρυωτικοί και προκαρυωτικοί) απαιτούν για την αύξηση τους δεσμευμένες μορφές αζώτου (Bashan & Holguin, 1997)

## 1.2 Η διαδικασία της αζωτοδέσμευσης

Το μοριακό άζωτο ( $N_2$ ) είναι το κύριο συστατικό της ατμόσφαιρας με την συγκέντρωσή του να αγγίζει σχεδόν το 80%. Αποτελείται από δύο άτομα αζώτου ενωμένα με έναν ισχυρό τριπλό δεσμό. Σαν μόριο θεωρείται αδρανές λόγω των μεγάλων ποσών ενέργειας που απαιτούνται για να σπάσει αυτός ο δεσμός. Η γενική χημική αντίδραση αναγωγής του αζώτου είναι ( $N_2 + 3H_2 + \text{energy} \rightarrow 2NH_3$ ) είναι ίδια και για την βιολογική αλλά και για την χημική δέσμευση του αζώτου. (Hubbell & Kidder, 2003)

Η αζωτοδέσμευση γίνεται μέσω της δράσης του ενζυμικού συστήματος της νιτρογενάσης. Η νιτρογενάση είναι ένα ενζυμικό σύμπλοκο ασταθές παρουσία οξυγόνου και τα γονίδια που την κωδικοποιούν είναι πολύ συντηρημένα μεταξύ συμβιωτικών και ελεύθερης διαβίωσης αζωτοδεσμευτικών οργανισμών (Franche *et al.*, 2008). Αποτελείται από δύο πρωτεϊνικά μόρια, όπου η συνεργασία τους είναι απαραίτητη για τη δέσμευση και την αναγωγή του μοριακού αζώτου. Το ένα πρωτεϊνικό μόριο ονομάζεται δινιτρογενάση ή σίδηρο – μολυβδαίνο - πρωτεΐνη (Fe-Mo-πρωτεΐνη) και η λειτουργία του είναι ως κέντρο ενεργοποίησης του υποστρώματος. Ενώ το δεύτερο ονομάζεται Fe-πρωτεΐνη ή αναγωγάση της δινιτρογενάσης και παίζει το ρόλο του κέντρου ενεργοποίησης των ηλεκτρονίων που μεταβιβάζονται, ένα κάθε φορά, στη δινιτρογενάση. Η δέσμευση του  $N_2$  και η παραγωγή του  $H_2$  γίνεται από την δινιτρογενάση, ενώ για κάθε ηλεκτρόνιο που ενεργοποιείται και μεταφέρεται μέσω της νιτρογενάσης απαιτείται υδρόλυση δυο δεσμών ATP. Η δράση της νιτρογενάσης αναστέλλεται παρουσία νιτρικών ιόντων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγές αζώτου καθώς και παρουσία αμμωνιακών ιόντων.

Τα υπεύθυνα γονίδια σύνθεσης της νιτρογενάσης και όλων των απαραίτητων μηχανισμών αζωτοδέσμευσης, τα οποία εντοπίζονται στο ίδιο οπερόνιο, το *nifHDK*, ονομάζονται *nif* γονίδια (nitrogen fixation γονίδια) (Διαμαντίδης, 1994).

## 1.3 Αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί

### 1.3.1 Συμβιωτικοί αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί

Ο Frank το 1885 χρησιμοποιώντας τον όρο συμβίωση (μικροοργανισμών και φυτών) ήθελε απλά να χαρακτηρίσει την συνύπαρξη δύο ανόμοιων οργανισμών. Ο De Bary, όμως χρησιμοποίησε τον όρο για να δηλώσει την κοινή διαβίωση παρασίτου και ξενιστή καθώς επίσης και τις σχέσεις βάση των οποίων οι οργανισμοί προφανώς βοηθούν ο ένας τον άλλο (Smith & Read, 1997, Brundrett, 2004). Η μεγαλύτερη συνεισφορά του αζώτου στο έδαφος προέρχεται από τη συμβιωτική σχέση που έχουν ορισμένοι οργανισμοί και τα φυτά, καθώς από μόνη της η συμβίωση ψυχανθών και αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων, ευθύνεται για το 20% του δεσμευόμενου αζώτου παγκοσμίως. Τα γνωστά σε όλους μας ριζόβια είναι τα βακτήρια τα οποία δημιουργούν αμοιβαίες σχέσεις με τα ψυχανθή. Η είσοδος των ριζοβίων, με τροποποιημένη μορφή (βακτηριοειδή) (Hubbell & Kidder, 2003), στο φυτό ξενιστή είναι μια ελεγχόμενη μόλυνση. Τα ριζόβια παράγουν ενώσεις λιποολιγοσακχαριτιδικής φύσεως, οι οποίες όταν λαμβάνονται από το φυτό οδηγούν στο σχηματισμό φυματίων. Τα ψυχανθή ανήκουν στην οικογένεια Leguminosae (Fabaceae), της τάξης Fabales και διακρίνονται σε τρεις υποοικογένειες: Caesalpinioideae, Mimosoideae και Papilionidae. Στην Papilionidae ανήκουν τα περισσότερα σημαντικά καλλιεργούμενα είδη ενώ η υποοικογένεια Caesalpinioideae έχει πολύ λίγα taxa, στα οποία σχηματίζονται φυμάτια. Η ικανότητα ενός τροπικού ψυχανθούς του *Sesbania rostrata*, να σχηματίζει φυμάτια όχι μόνο στις ρίζες αλλά και στον βλαστό το κάνει να αποτελεί ξεχωριστή συμβίωση. Η ικανότητα του αυτή επιτρέπει στο φυτό να δεσμεύει άζωτο όταν αναπτύσσεται σε υγρές συνθήκες κατά τις οποίες δεν είναι δυνατός ο σχηματισμός φυματίων στις ρίζες. Επίσης στα φυμάτια του βλαστού ακόμη και όταν οι ρίζες απορροφούν νιτρικά από το έδαφος, δεν επηρεάζεται η δυνατότητα δέσμευσης αζώτου. Το βακτήριο το οποίο εμπλέκεται σε αυτή την διαδικασία ανήκει στο γένος *Azorhizobium* (Paul & Clark, 1989). Μία άλλη περίπτωση συμβίωσης ψυχανθών με βακτήρια, τους ακτινομύκητες εντοπίζεται σε εύκρατα κλίματα καθώς και σε αρκτικές περιοχές, ενώ το μεγαλύτερο μέρος των ξυλωδών ψυχανθών απαντάται κυρίως σε τροπικές περιοχές (Vitousek et al., 2002). Πρόκειται για τα βακτήρια του γένους *Frankia* τα οποία είναι ινώδους μορφής και αναπτύσσονται ακτινωτά (γεγονός στο οποίο οφείλεται η επωνομασία

«ακτινομύκητες», που είναι και η ονομασία της οικογένειας στην οποία ανήκουν) (Διαμαντίδης, 1994).

Η τελευταία κατηγορία συμβιωτικών αζωτοδεσμευτικών οργανισμών είναι μέλη των κυανοβακτηρίων. Τα κυανοβακτήρια αποτελούν την μεγαλύτερη και πιο ποικίλη ομάδα Gram αρνητικών προκαρυωτικών οργανισμών (Franche *et al.*, 2008). Τα νηματώδη στελέχη είναι τα πιο σημαντικά αζωτοδεσμευτικά κυανοβακτήρια όπου διαφοροποιούνται ώστε να δημιουργηθούν ετεροκύστες. Οι σημαντικότεροι εκπρόσωποι των κυανοβακτηρίων είναι τα βακτήρια του γενών *Nostoc* και *Anabaena* (Nostocales). Οι ετεροκύστες είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένα κύτταρα που διαφοροποιούνται εντός νηματίου όπου εντοπίζεται η αζωτοδέσμευση όταν υπάρχει έλλειψη αζώτου (Elmerich, 2007, Franche *et al.*, 2008).

### **1.3.2 Μη-συμβιωτικοί αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί**

Ανάλογα , με την επίδρασή τους στα φυτά και τον τρόπο που αλληλεπιδρούν με τις ρίζες οι μικροοργανισμοί που αποικούν στη ριζόσφαιρα κατατάσσονται σε κατηγορίες. Ως προς τη επίδραση τους, χωρίζονται σε παθογόνους και μη παθογόνους. Οι μη παθογόνοι, οι οποίοι είναι ταυτόχρονα και ωφέλιμοι, διακρίνονται σε δύο κατηγορίες. Η μία περιλαμβάνει τόσο βακτήρια ελεύθερης διαβίωσης, τα οποία επιδρούν θετικά αφενός στην ανάπτυξη του φυτού, αφετέρου στον εμπλουτισμό του εδάφους όσο και βακτήρια που προάγουν την ανάπτυξη του φυτού, μέσω έμμεσων ή άμεσων μηχανισμών, και είναι γνωστά ως PGPB (**P**lant **G**rowth **P**romoting **B**acteria). Η άλλη κατηγορία περιλαμβάνει μύκητες και βακτήρια τα οποία δημιουργούν αμοιβαίες συμβιωτικές σχέσεις με το φυτό ξενιστή (*Rhizobium*, *Frankia* και άλλα).

Τα PGPB σχετίζονται αν όχι με όλα, με πολλά από τα είδη φυτών και απαντούν συχνά σε πολλά περιβάλλοντα (Mantelin & Touraine, 2004). Στην ομάδα αυτήν ανήκουν στελέχη ορισμένων γενών όπως τα γένη *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas* και *Serratia* (Somers *et al.*, 2004). Ορισμένα από τα βακτήρια αυτά έχουν την ικανότητα να εισέλθουν στη ρίζα και να πολλαπλασιαστούν ενδοφυτικά. Ορισμένα, μάλιστα, είναι ικανά να ξεπεράσουν το εμπόδιο της ενδοδερμίδας και να εγκατασταθούν μέσω του αγγειοφόρου συστήματος και σε άλλα όργανα, όπως οι βλαστοί, τα φύλλα, οι βολβοί και άλλα.

Τα υπεύθυνα για την προαγωγή της ανάπτυξης των φυτών, ριζοβακτηρία PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), τα οποία αποτελούν την πιο καλά μελετημένη ομάδα των PGPB, προάγουν την ανάπτυξη των φυτών είτε υποβοηθώντας τη θρέψη του φυτού, είτε με άμεση έκκριση φυτοορμονών, για παράδειγμα με διαλυτοποίηση φωσφόρου και βιολογική δέσμευση αζώτου. Επιπλέον τα PGPR διαθέτουν μηχανισμούς προστασίας των φυτών από φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς του εδάφους, οι οποίοι περιλαμβάνουν: α) παραγωγή σιδηροφόρων ουσιών, β) αντιβιοτικών, γ) ενζύμων και άλλων μεταβολιτών εμποδίζοντας έτσι την δράση μικροοργανισμών που βρίσκονται στη ριζόσφαιρα. Κάποια στελέχη φαίνεται να έχουν και προστατευτική δράση έναντι διασυστηματικών και επιφανειακών παθογόνων. Η «ανοσοποίηση», εκδηλώνεται ως καθυστέρηση στην έκφραση των συμπτωμάτων και μείωση στην ένταση και εξέλιξη της ασθένειας με παράλληλη ενεργοποίηση μηχανισμών που συμβάλλουν στη διασυστηματική προστασία των φυτών έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων, βακτηρίων και ιών (Τζάμος, 2004, Compant *et al.*, 2005, Kloepper *et al.*, 1999).

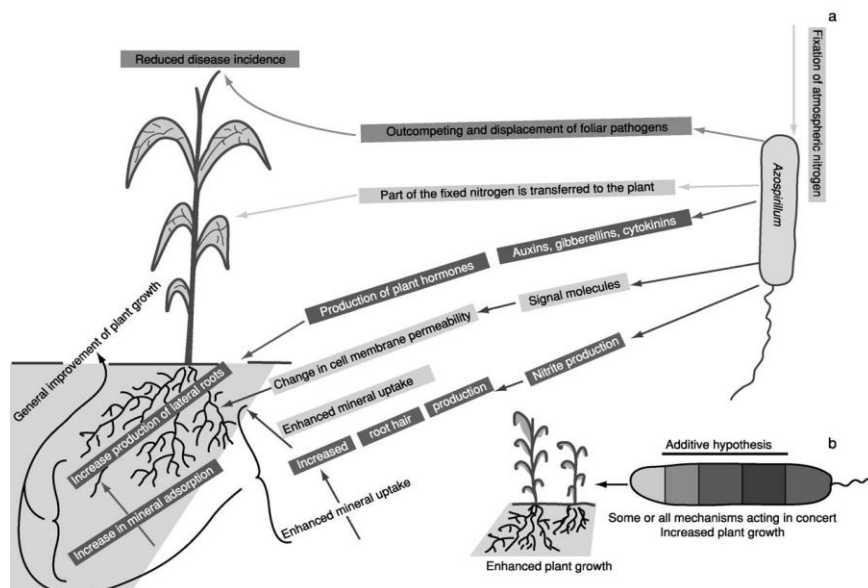
### 1.3.3 Αζωτοδεσμευτικά βακτήρια ελεύθερης διαβίωσης

Βακτήρια ελεύθερης διαβίωσης καλούνται τα βακτήρια των οποίων η επιβίωση δεν εξαρτάται άμεσα από τις εκκρίσεις των ριζών και απαντώνται στο έδαφος. Εν τούτοις, οι βακτηριακοί πληθυσμοί της ριζόσφαιρας έχουν αποδοτικά συστήματα απορρόφησης και καταβολισμού οργανικών ενώσεων που περιέχονται στις εκκρίσεις των ριζών (Tilak *et al.*, 2005). Λόγω όμως της δυσκολίας που παρουσιάζουν στην καλλιέργειά τους στο εργαστήριο η οικολογική τους σημασία έχει υποτιμηθεί.

Οι ελεύθερης διαβίωσης οργανισμοί φέρουν τα απαραίτητα γονίδια *nif* για την παραγωγή νιτρογενάσης. Η παρουσία του γονιδίου *nifH*, το οποίο κωδικοποιεί για μία υπομονάδα της νιτρογενάσης, μας δίνει την δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη και την ταξινόμηση αζωτοδεσμευτικών οργανισμών χωρίς αυτοί να χρειάζεται να καλλιεργηθούν, αποτελώντας έτσι έναν χρήσιμο δείκτη. Έρευνες που έχουν γίνει σε σχέση με την ποικιλότητα του *nifH* στο έδαφος, μας αποκάλυψαν αλληλουχίες οι οποίες αντιστοιχούν σε διάφορους μη αναγνωρισμένους αζωτοδεσμευτικούς οργανισμούς. Το μεγαλύτερο ποσοστό αποτελούν οι μη



καλλιεργήσιμοι αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί - κυρίαρχοι οργανισμοί δέσμευσης εδαφικού αζώτου - έναντι των καλλιεργήσιμων (Poly *et al.*, 2001, Zehr *et al.*, 2003 Sarita *et al.*, 2008).



(Εικόνα 1) Τρόποι δράσης του βακτηρίου *Azospirillum* στην προώθηση της ανάπτυξης των φυτών (Bashan *et al.*, 2005)

## 1.4 Τα χαρακτηριστικά του γένους *Azospirillum*

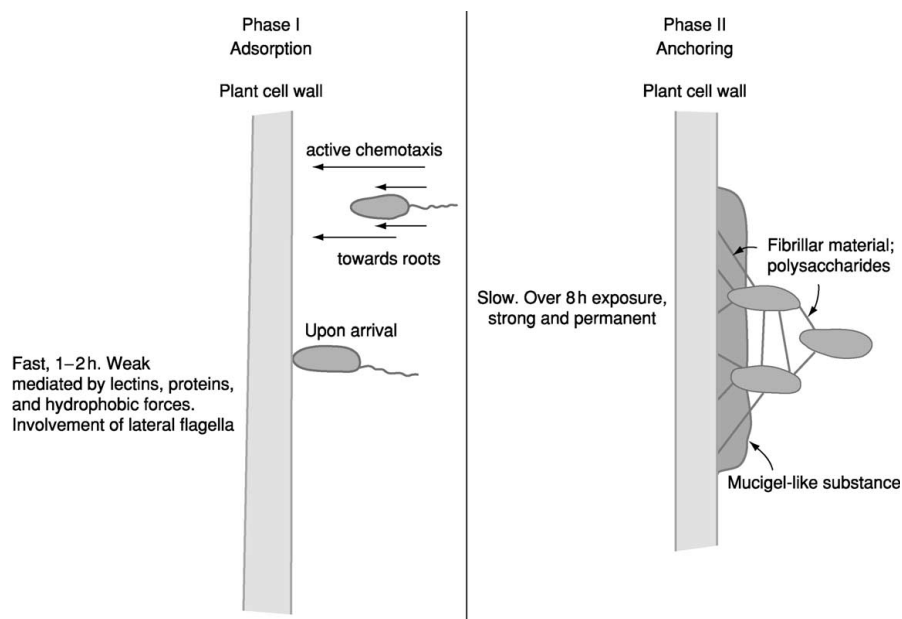
Τα βακτήρια του γένους *Azospirillum* έχουν ταξινομηθεί στην υποκατηγορία των Πρωτεοβακτηρίων σύμφωνα με την ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του 16S rRNA γονιδίου (Claudia *et al.*, 2000) έχουν από τα πιο πολύπλοκα μόρια DNA υψηλού μοριακού βάρους που έχουν περιγραφεί στην κατηγορία αυτή (Moreno, 1998). Τα βακτήρια αυτά έχουν απομονωθεί από την ριζόσφαιρα μεγάλων καλλιεργειών όπως το καλαμπόκι, το ρύζι και το σιτάρι. Τόσο στα θερμοκήπια όσο και στους αγρούς φαίνεται να ασκούν ευεργετικές επιδράσεις στην ανάπτυξη αλλά και στις αποδόσεις των καλλιεργειών, κάτω από διάφορες κλιματικές και εδαφικές συνθήκες (Vial *et al.*, 2006). Απομονώθηκαν και παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά το 1922 από τον Ολλανδό μικροβιολόγο M. Beijerinck (Hartmann *et al.*, 2006) όμως λόγω έλλειψης τεχνογνωσίας και κατάλληλου εξοπλισμού η έρευνα δεν κατέστη δυνατόν να ολοκληρωθεί. Στα μέσα της δεκαετίας του '70 επετεύχθη η λεγόμενη 'επανανακάλυψη' του *Spirillum* από την Johanna Döbereiner κάνοντας το να αποκτήσει την φήμη του βακτηρίου που έχει

μελετηθεί περισσότερο. Λίγο αργότερα και ύστερα από έρευνα και εκτεταμένες ταξινομικές μελέτες των Tarrand *et al.* (1978) προέκυψε και η μετονομασία του σε *Azospirillum* (Schmid & Hartmann, 2007, Hartmann & Baldani, 2006)

Η αλληλεπίδραση των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων με τα ποώδη φυτά είναι ένα πολύ συχνό φαινόμενο στην φύση. Με τον τρόπο αυτό τα βακτήρια αποδίδουν έμμεσα το άζωτο σε αφομοιώσιμη μορφή στα αγρίου τύπου αγρωστώδη, επιτρέποντας τους έτσι την ανάπτυξη σε μη αζωτούχα εδάφη (Peng *et al.*, 2006). Το γένος *Azospirillum* αποτελεί το καλύτερα χαρακτηρισμένο γένος των βακτηρίων που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (Plant Growth Promoting Bacteria) και έχουν απομονωθεί στη ριζόσφαιρα από πολλά αγρωστώδη και σιτηρά σε όλο τον κόσμο, ενώ αναπτύσσονται σε τροπικά αλλά και σε εύκρατα κλίματα (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). Η συγκέντρωσή τους στην ριζόσφαιρα φτάνει μέχρι και το  $10^7/g$  ενώ το *A. brasilense* μπορεί να απομονωθεί από το 30-90% των δειγμάτων εδάφους και ριζόσφαιρας (Hartmann & Baldani, 2006). Υπάρχουν και στελέχη όπως το *A. brasilense* Sp245, που παρουσιάζουν κυρίως ενδοφυτική δράση σε κύτταρα της επιδερμίδας της ρίζας (Elmerich, 2007). Τα περισσότερα είδη επιλέγουν την ριζόσφαιρα ως οικοσύστημα τους, και όχι τον κύριο όγκο του εδάφους όπου και δύσκολα επιβιώνουν (Bashan *et al.*, 2004). Για τον λόγο αυτό τα *Azospirillum* όπως τα περισσότερα ελεύθερης διαβίωσης αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, αναπτύσσουν διάφορους μηχανισμούς επιβίωσης σε αντίξοες για αυτά συνθήκες. Τα κύτταρα παίρνουν μορφή κύστης και συσσωματωμάτων που τα προστατεύουν από την αποξήρανση, παράγουν επίσης μελανίνη μπλοκάροντας την υπεριώδη ακτινοβολία (Bashan *et al.*, 2005). Τα βακτήρια προσαρμόζουν ταχύτατα την τακτική τους έτσι ώστε να πετυχαίνουν κάθε φορά τον βέλτιστο μεταβολισμό, και να καθίστανται ανταγωνιστικά ώστε να επιβιώνουν στις περιβαλλοντικές αλλαγές (Bible *et al.*, 2008). Η ευελιξία τους να μεταβολίζουν τόσο πηγές άνθρακα όσο και αζώτου, είναι η ικανότητα που τα καθιστά κατάλληλα για να μπορέσουν να επιβιώσουν (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000), όπως επίσης και το σύστημα μεταγωγής σημάτων όπου επιτρέπει στα κύτταρα να εντοπίζουν τις αλλαγές αυτές και να καταφέρνουν να προσαρμοστούν, εκτελώντας κατάλληλες κυτταρικές αντιδράσεις, όπως η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων ή διαμόρφωση του προτύπου κίνησης ‘swimming pattern’ (Bible *et al.*, 2008).

## 1.5 Μηχανισμός αποικισμού της ριζόσφαιρας

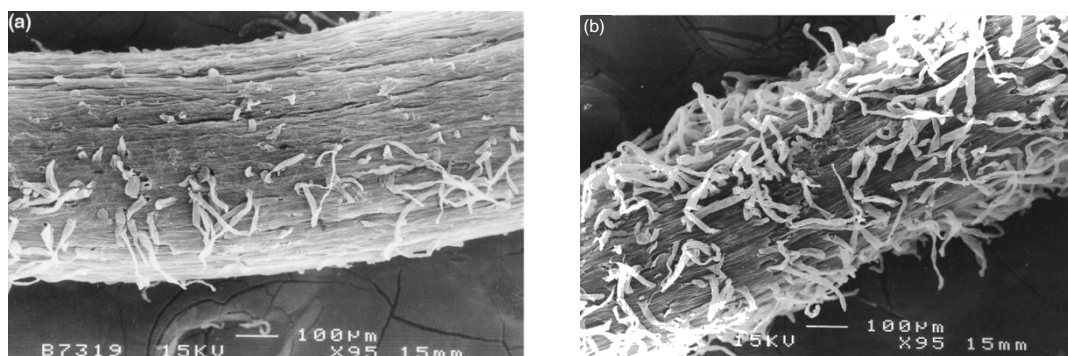
Είναι γενικά αποδεκτό ότι η εγκατάσταση των *Azospirillum* στις ρίζες είναι μια διαδικασία που αποτελείται από δύο στάδια: της προσρόφησης και της σταθεροποίησης (Εικ. 1). Η κύρια φάση της προσρόφησης είναι ταχεία (φθάνει στο μέγιστο μέσα σε 2 ώρες από την έκθεση των βακτηρίων στις ρίζες), ασθενής, αναστρέψιμη, και πιθανώς διέπεται από βακτηριακές πρωτεϊνικές ενώσεις (bacterial proteinaceous compounds). Η φάση της σταθεροποίησης είναι ισχυρότερη, διαρκεί αρκετές ώρες για να διαμορφωθεί, είναι μη αναστρέψιμη, και βασίζεται στην βακτηριακή εξωκυττάρια επιφάνεια (bacterial extracellular surface), που αποτελείται από πολυσακχαρίτες, όπου συμμετέχει σε ένα δίκτυο από ινώδη υλικά που συνδέει μόνιμα τα βακτήρια στην επιφάνεια και εμποδίζει την απομάκρυνσή τους από την περιοχή (Bashan and Holguin, 1997).



(Εικόνα 2) Μηχανισμός αποικισμού του *Azospirillum* στις ρίζες του φυτού. (Bashan *et al.*, 2005)

## 1.6 Τρόποι προαγωγής της ανάπτυξης

Ο τρόπος με τον οποίο προάγεται η ανάπτυξη από το μέλη του γένους *Azospirillum* δεν είχε κατανοηθεί πλήρως, αρχικά ήταν γνωστά μόνο για την αζωτοδεσμευτική τους ικανότητα αλλά πλέον επικρατεί η γνώμη ότι ο κύριος μηχανισμός τους συνδέεται με την παραγωγή αυξητικών ουσιών όπως κυτοκινίνες, γιββερελλίνες και αυξίνες. (Mehnaz & Lazarovits, 2006). Η αυξίνη ινδολοξικό οξύ (indole-3-acetic acid) παράγεται σε μεγαλύτερες ποσότητες, σε σχέση με τις υπόλοιπες, η οποία αυξάνει τον αριθμό των πλάγιων ριζών και των ριζικών τριχιδίων, με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη απορρόφηση του νερού και των μετάλλων του εδάφους αυξάνοντας τελικά τις αποδόσεις, και σε πολλές περιπτώσεις μετατρέποντας τα φυτά σε πιο παραγωγικά. (Εικ. 3) Η πραγματοποίηση της παραγωγής αυτής επιτυγχάνεται μέσω α βιοσυνθετικών μονοπατιών εκ των οποίων μόνο το ένα είναι ανεξάρτητο από την τρυπτοφάνη (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000, Vial *et al.*, 2006, Dobbelaere *et al.*, 2001).



(Εικόνα 3) Μικροφωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης της εξέλιξης των τριχιδίων της ρίζας σε φυτό σόγιας (AGS190) : (a) χωρίς εμβολιασμό, (b) μετά από εμβολιασμό με *Azospirillum* (CCM3863) (Molla *et al.*, 2001)

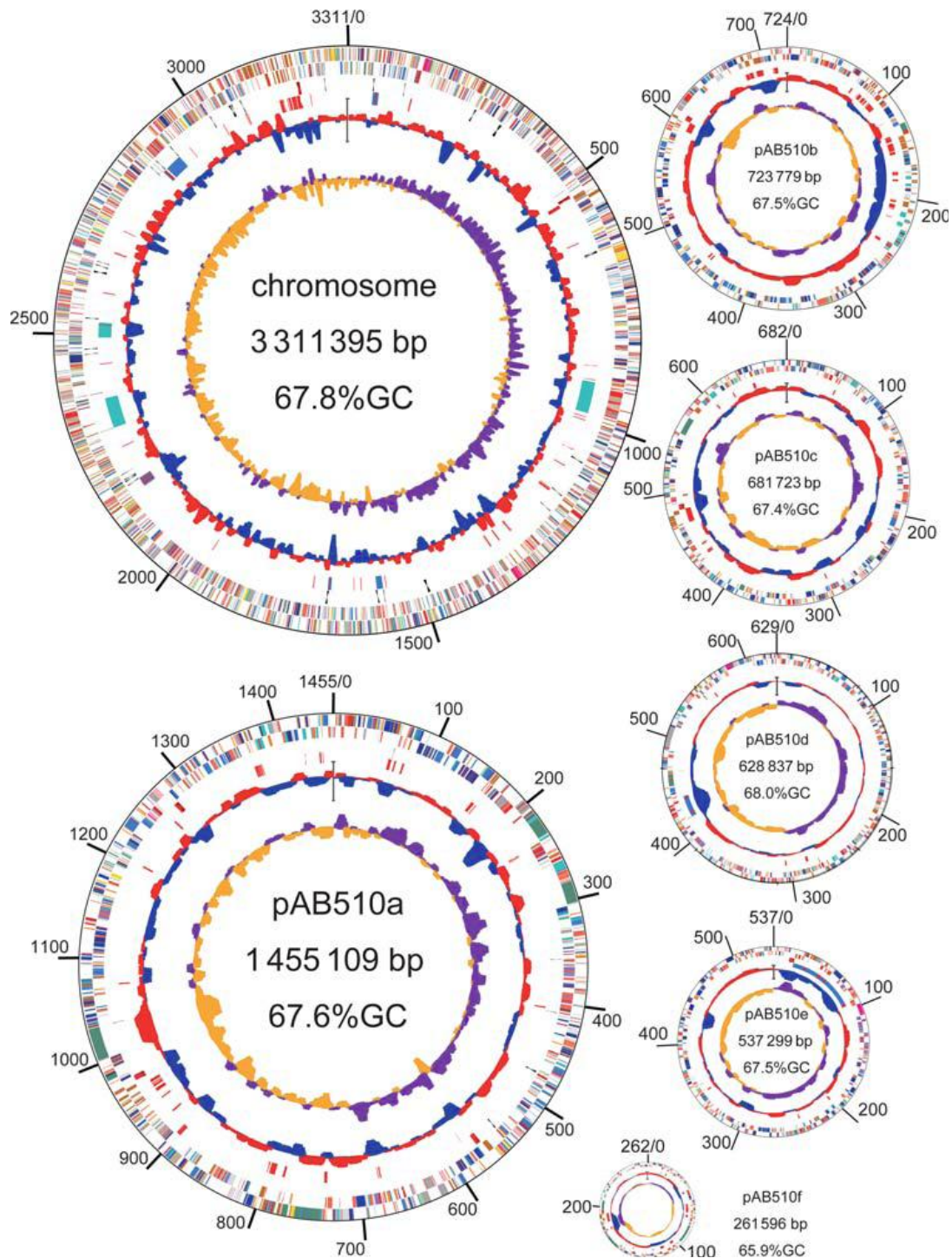
Παρόλο που τα *Azospirillum* απομονώθηκαν αρχικώς από σιτηρά και οι περισσότεροι εμβολιασμοί έγιναν στις κυριότερες καλλιέργειες τους (Bashan &

Levanony, 1990) υπάρχουν πάρα πολλά είδη φυτών τα οποία δεν ανήκουν στην οικογένεια αυτή, όπου οι εμβολιασμοί τους με *Azospirillum* στέφθηκαν με μεγαλύτερη επιτυχία από ότι στα σιτηρά (Bashan & Holguin 1997). Έτσι τα *Azospirillum* θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη σαν βακτήρια που προωθούν την αύξηση γενικώς των φυτών και όχι μόνο των σιτηρών. Σε πολλές περιπτώσεις ο εμβολιασμός με *Azospirillum* μείωσε την χρήση των χημικών λιπασμάτων, ειδικά των νιτρικών στο 20%-50% και παρουσίασε καλύτερα αποτελέσματα από την στιγμή που ενσωματώθηκαν με οργανική λίπανση. Σε πολλές από τις αναπτυγμένες χώρες που έγινε χρήση του εμβολιασμού αυξήθηκε το κέρδος σε συνάρτηση με το κόστος (Bashan *et al.*, 2004). Εκτός από την γεωργία και την δασοκομία, ένα κομμάτι της έρευνας έχει ασχοληθεί με την χρήση του εμβολιασμού σε φυτά σημαντικά για το περιβάλλον (χερσαίο και υδάτινο) έτσι ώστε να βοηθήσουν στην επίλυση των σοβαρών προβλημάτων που αντιμετωπίζει (Bashan *et al.*, 2004). Αν και η προέλευσή τους και τα κύρια αποτελέσματα που έχουν μελετηθεί είναι σε συνδυασμό με γεωργικές καλλιέργειες, έχει παρατηρηθεί σημαντική επίδραση σε πολλές μεταβολικές πορείες κατά την αλληλεπίδρασή τους με τα μικροφύκη. Με αυτόν τον τρόπο ενισχύουν την βιοαποικοδόμηση των υγρών αποβλήτων, αυξάνοντας την ανάπτυξη και τον μεταβολισμό των μικροφυκών, επιτρέποντας τους να καθαρίζουν το νερό καλύτερα από ότι πριν (Bashan *et al.*, 2008, Bashan *et al.*, 2005)

Μια ραγδαία εξελισσόμενη χρήση των στελεχών του γένους *Azospirillum* στην βιολογική γεωργία είναι η χρήση τους ως βιολιπάσματα. Βιολιπάσματα ορίζονται τα υλικά που περιέχουν ζωντανούς οργανισμούς, οι οποίοι όταν εφαρμοστούν στους σπόρους, στο έδαφος ή στην επιφάνεια των φυτών, αποικίζουν τα συγκεκριμένα φυτά και έτσι προωθούν την ανάπτυξη τους με το να αυξάνουν την διαθεσιμότητα των θρεπτικών ουσιών. Έχουν δημοσιευτεί πολλές αναφορές όπου μιλούν για τον εμβολιασμό των σιτηρών με τα βακτήρια του γένους *Azospirillum* όπου βοηθούν στην ανάπτυξη τους. Στην Γαλλία ήδη κυκλοφορεί σαν εμπορικό λίπασμα, το οποίο περιέχει *A. lipoferum*, με την επωνυμία Azogreen-m (Mehnaz & Lazarovits, 2006)

## 1.7 Το γονιδίωμα των *Azospirillum*

Το συνολικό μέγεθος του γονιδιώματος των μελών του γένους *Azospirillum* ποικίλει από ένα ελάχιστο 4,8 Mbp (*A. irakense*) σε 9,7 Mbp (*A. lipoferum* στέλεχος Sp59b). (Martin-Didonet *et al.*, 2000) Ορισμένα στελέχη περιέχουν μέχρι και έξι πλασμίδια που κυμαίνονται σε μέγεθος από 4 MDa έως πάνω από 300 MDa. Όλα τα στελέχη του *A. brasilense* και ορισμένα στελέχη του *A. lipoferum* περιέχουν πλασμίδια 90 - MDa (p90), που μοιράζονται συντηρημένες περιοχές και φέρουν διάφορα γονίδια που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση με τις ρίζες των φυτών. (Holguin *et al.*, 1999). Το ποσοστό σε G + C του DNA στα *Azospirillum* κυμαίνεται μεταξύ 64 -71% (Schmid *et al.*, 2007). Έχει προσδιοριστεί η πλήρη αλληλούχιση των νουκλεοτιδίων ολόκληρου του γονιδιώματος του *Azospirillum* B510. Το γονιδίωμα του B510 αποτελείται από ένα απλό χρωμόσωμα (3 311 395 bp) και έξι πλασμίδια που έχουν οριστεί ως pAB510a (1 455 109 bp), pAB510b (723 779 bp), pAB510c (681 723 bp), pAB510d (628 837 bp), pAB510e (537 299 bp) και pAB510f (261 596 bp). (Kaneko *et al.*, 2010)



(Εικόνα 4) Σχηματική παρουσίαση των 7 μονάδων αντιγραφής του γονιδιώματος του *Azospirillum* sp. B510 (Kaneko *et al.*, 2010)

## 1.8 Το γένος των *Azospirillum*.

Το γένος <i>Azospirillum</i>		
1	<i>Azospirillum lipoferum</i>	(Beijerinck 1925) Tarrand <i>et al.</i> , 1979
2	<i>Azospirillum brasilense</i>	Tarrand <i>et al.</i> , 1979
3	<i>Azospirillum largimobile</i>	(Skerman <i>et al.</i> , 1983) Ben Dekhil <i>et al.</i> , 1997
4	<i>Azospirillum amazonense</i>	Magalhaes <i>et al.</i> , 1984
5	<i>Azospirillum halopraeferens</i>	Reinhold <i>et al.</i> , 1987
6	<i>Azospirillum irakense</i>	Khammas <i>et al.</i> , 1991
7	<i>Azospirillum doebereineriae</i>	Eckert <i>et al.</i> , 2001
8	<i>Azospirillum oryzae</i>	Xie and Yokota <i>et al.</i> , 2005
9	<i>Azospirillum melinis</i>	Peng <i>et al.</i> , 2006
10	<i>Azospirillum zea</i>	Mehnaz <i>et al.</i> , 2007
11	<i>Azospirillum canadense</i>	Mehnaz <i>et al.</i> , 2007
12	<i>Azospirillum rugosum</i>	Young <i>et al.</i> , 2008
13	<i>Azospirillum massilensis</i>	Pagnler <i>et al.</i> , 2008
14	<i>Azospirillum palatum</i>	Zhou <i>et al.</i> , 2009
15	<i>Azospirillum picis</i>	Lin <i>et al.</i> , 2009
16	<i>Azospirillum thiophilum</i>	Lavrinenko <i>et al.</i> , 2010

(Πίνακας 1) Τα είδη *Azospirillum* που έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα



### 1.8.1 *Azospirillum lipoferum* sp.

Το 1976 ο Dobereiner και ο Day περιγράφουν την απομόνωση ενός μικροαερόφιλου αζωτοδεσμευτικού, ραβδοειδούς βακτηρίου από τις ρίζες του αγρωστώδους που χρησιμοποιούσαν για ζωοτροφή στην Βραζιλία. Ο οργανισμός αυτός ταυτοποιήθηκε σαν “*Spirillum lipoferum*” (Falk et al., 1986) αργότερα σε μια λεπτομερή ταξινομική μελέτη Tarrand et al., (1978) το ονόμασε *Azospirillum lipoferum*” (Hartmann et al., 2006)

Τα κύτταρα του *A. lipoferum* είναι κινητά ενώ παρουσιάζουν διαφορετικού τύπου μαστίγια: ένα μονό πολικό μαστίγιο όταν μεγαλώνουν σε υγρό θρεπτικό μέσο, ενώ εμφανίζουν επιπλέον πλευρικά μαστίγια όταν μεγαλώνουν σε στερεό θρεπτικό υλικό (Alexandre et al., 1999, Hartmann et al., 2006). Το γονιδίωμα του *A. lipoferum* περιέχει και γραμμικό και κυκλικό DNA ενώ το μέγεθος του είναι 9.7 Mbp (*A. lipoferum* strain Sp59b) (Martin-Didonet et al., 2000)

Έχει την ικανότητα να χρησιμοποιεί την γλυκόζη σαν πηγή άνθρακα για την αζωτοδέσμευση, δεν μπορεί όμως να χρησιμοποιήσει δισακχαρίτες, όπως η σακχαρόζη, ενώ για την ανάπτυξη του δεν είναι απαραίτητη η βιοτίνη (Falk et al., 1986). Το *A. lipoferum* μπορεί να μεγαλώσει λιθοαυτότροφα με  $H_2$  (Pedrosa et al., 1982) χάρη στην παρουσία υδρογενάσης καθώς επίσης και στην ικανότητά του να σχηματίζει την ριβουλόζη -1,5- διφωσφατάση καρβοξυλάση (Rubisco) (Hartmann et al., 2006). Τα βακτήρια του γένους *azospirillum* έχουν έναν τυπικό αερόβιο μεταβολισμό με το  $O_2$  σαν τελικό δέκτη ηλεκτρονίων. Το *A. lipoferum* μπορεί να αντικαταστήσει το  $O_2$  με  $NO_3^-$  στην αναπνοή, ενώ σχηματίζονται  $N_2O$  και  $N_2$  κάτω από αλκαλικές συνθήκες (Stephan et al., 1984).

Ενδοφυτικά έχει απομονωθεί από *Pennisetum purpureum*, *Miscanthus sinensis*, *Miscanthus sacchariflorus*, και *Spartina pectinata* όπου χρησιμοποιούνται για ενέργεια (Bashan et al., 2004)· μπορεί όμως να δημιουργήσει αποικίες και σε ρίζες σιταριού και ρυζιού (Chebotar et al., 1999; Steenhoudt et al., 2001a). Ορισμένα από τα στελέχη του *A. lipoferum* είναι ικανά να αποικίζουν στο εσωτερικό των ριζών του σιταριού (Bashan et al., 2004). Θεωρείται ότι μπορεί να απομονωθεί από το 30-90% των δειγμάτων σε όλο τον κόσμο που έχουν συλλεχθεί από το έδαφος και την ριζόσφαιρα (Döbereiner et al., 1976).

### 1.8.2 *Azospirillum brasilense* sp.

Το *Azospirillum brasilense* είναι ένα αζωτοδεσμευτικό ελεύθερης διαβίωσης βακτήριο το οποίο ανήκει στα α-πρωτεοβακτήρια και σχετίζεται με την ρίζες και τη ριζόσφαιρα των περισσότερων σημαντικών καλλιεργούμενων φυτών συμπεριλαμβανομένου του καλαμποκιού σιταριού και ρυζιού. Είδη τις οικογένειας *Azospirillum* αποικίζουν την επιφάνεια των ριζών και επάγουν σημαντικά την ανάπτυξη των φυτών γεγονός το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη βιολογικών λιπασμάτων.

Το κύριο μονοπάτι αφομοίωσης του αζώτου στο *Azospirillum brasilense* είναι η βιοσύνθεση του γλουταμινικού (Westby *et al.*, 1987) Το ένζυμο κλειδί στο μεταβολισμό του αζώτου στα προκαρυωτικά αλλά και στα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι η συνθετάση της γλουταμίνης, όπου καταλύει τη συμπύκνωση του αμμωνίου και του γλουταμινικού και καταλήγει σε σύνθεση γλουταμίνης. Αυτή η διαδικασία που απαιτεί ATP ρυθμίζεται τόσο μεταγραφικά όσο και μεταμεταφραστικά με αδενυλίωση της συνθετάσης της γλουταμίνης σε συνθήκες περίσσειας αζώτου (Dommelen *et al.*, 2003). Οι ικανότητες της ανίχνευσης των χημικών ουσιών που απελευθερώνονται από το φυτό ξενιστή, και της μετάβασης προς το ριζικό σύστημα του, είναι σημαντικές για την εγκατάσταση του βακτηρίου στην ριζόσφαιρα. Την υπόθεση αυτή υποστηρίζουν πειραματικές αποδείξεις με μεταλλαγμένα στελέχη *A. brasilense* μη χημειοτακτικά και μη-κινητά, που παρουσιάζουν σοβαρή μείωση στον αποικισμό της επιφάνειας των ριζών του σιταριού. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν την υπόθεση ότι ο χημειοτακτισμός μπορεί να θεωρηθεί εξειδικευμένος ως προς το φυτό ξενιστή και να προσδιοριστεί μέσω του μεταβολισμού του βακτηρίου. (Greer-Phillips *et al.*, 2004)

Το βακτήριο αυτό ανήκει στα ριζοβακτήρια που επάγουν την αύξηση των φυτών με την άμεση προώθηση της ανάπτυξης. Τα αποτελέσματα του εμβολιασμού με *Azospirillum* μας δίνουν αύξηση του αριθμού των τριχών της ρίζας και των πλευρικών ριζών, μέσω των οποίων παρατηρείται βελτίωση στην απορρόφηση του νερού και των θρεπτικών συστατικών. Η επίδραση αυτή προκαλείται από την παραγωγή της φυτομόνης ίνδολο-3-οξικό οξύ (IAA) (Dobbelaere *et al.*, 1999). Μετά από πειραματικές έρευνες σε ένα μεταλλαγμένο στέλεχος του *A. brasilense* όπου το

*ipdC* γονίδιο είχε απενεργοποιηθεί, βρέθηκε να παράγει λιγότερο από το 10% της παραγωγής IAA από αυτήν του αγρίου τύπου, υποδεικνύοντας έτσι ότι το προϊόν του γονιδίου *ipdC* είναι ένα βασικό ένζυμο για την βιοσύνθεση του IAA στο συγκεκριμένο βακτήριο. (Prinsen *et al.*, 1993, Costacurta *et al.*, 1994) Το *phbC* μεταλλαγμένο στέλεχος (στο οποίο έχει μειωθεί η παραγωγή PHB) παράγει περισσότερο IAA από ότι παράγει το αγρίου τύπου σε θρεπτικό μέσο τρυπτοφάνης (Jaeger *et al.*, 1999). Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν παρατηρήθηκε ότι τα εμβόλια βακτηριακής καλλιέργειας που προέρχονται από το *phbC* μεταλλαγμένο στέλεχος και αποθηκεύτηκαν υπό ελαττωματικές συνθήκες, εμφάνισαν μειωμένη βιωσιμότητα σε σχέση με την ικανότητα των αντίστοιχων του αγρίου τύπου στελεχών Sp7. Μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η παραγωγή PHB είναι κρίσιμης σημασίας για τη βελτίωση της διάρκειας ζωής, την αποτελεσματικότητα και την αξιοπιστία των εμβολίων (Kadouri *et al.*, 2003). Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι το προϊόν του γονιδίου *ipdC* συμμετέχει επίσης στη βιοσύνθεση του φαινυλοξικού οξέος (PAA), μια αυξίνη με αντιμικροβιακή δράση. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία αναστολής της έκφρασης του γονιδίου *ipdC*, με το μεταλλαγμένο στέλεχος να παρουσιάζει σημαντικά χαμηλότερη παραγωγή της PAA (Somers *et al.*, 2005). Έχει αποδειχθεί ότι σε αντίθεση με άλλα είδη βακτηρίων το *A. brasilense* δεν παράγει συμπολυμερή hydroxyalkanoates (PHAs), αλλά μόνο τα ομοιοπολυμερή του PHB (πολυ-β-υδροξυβουτυρικού) (Itzigsohn *et al.*, 1995)

Έχει εξεταστεί η συγγένεια του *Roseomonas fauriae* και του *Azospirillum brasilense* με την χρήση φαινοτυπικών μεθόδων και του DNA–DNA υβριδισμού. Οι κλασσικοί βιοχημικοί μέθοδοι δεν έδειξαν διαφοροποιήσεις μεταξύ των δύο ειδών ενώ και η μέθοδος του DNA–DNA υβριδισμού έδειξε υψηλούς δείκτες συγγένειας μεταξύ των δύο τυπικών στελεχών αποτελέσματα που οδήγησαν στο ότι τα δύο αυτά είδη θα πρέπει να συνιστούν τελικά ένα. Τα στελέχη που είχαν ταυτοποιηθεί ως *R. fauriae* θα πρέπει να αναταξινομηθούν σαν *A. brasilense* (Helsel *et al.*, 2006).

### 1.8.3 *Azospirillum largimobile* sp.

Το *Azospirillum largimobile* αρχικά είχε ταυτοποιηθεί ως *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* (Skerman *et al.*, 1983) και μεταφέρθηκε στο γένος *Azospirillum* ως *Azospirillum largimobile* με βάση τα στοιχεία ομολογίας του 16S rDNA και του DNA-DNA υβριδισμού (Dekhil *et al.*, 1997). Το όνομά του διορθώθηκε σε *Azospirillum largimobile* από τους Sly and Stackebrandt (1999).

Τα κύτταρά του έχουν 1-10 χαρακτηριστικά πλευρικά μαστίγια (Ben Dekhil *et al.*, 1997). Μπορεί εύκολα να ταυτοποιηθεί από το χαρακτηριστικό πολυκυτταρικό του σχήμα σε lake water agar, ενώ σε αντίθεση με το *A. lipoferum* η ανάπτυξη του δεν εξαρτάται άμεσα από την παρουσία βιοτίνης (Hartmann *et al.*, 2006). Σε θρεπτικό υλικό που περιέχει ιόντα νατρίου, αναπτύσσονται πολυκυτταρικά συσσωματώματα του βακτηρίου αυτού (Ben Dekhil *et al.*, 1997)

Παράγει οξέα από γλυκόζη υπό αερόβιες αλλά και υπό αναερόβιες συνθήκες. Η ανάπτυξη επιτυγχάνεται με γλυκόζη, με D- γαλακτόζη, με D- φρουκτόζη, D- ριβόζη και L-αραβινόζη ως κύρια πηγή άνθρακα, είναι θετικό στην καταλάση, στην οξειδάση, στην ουρεάση, στην DNAάση, στην μείωση των νιτρικών και στην υδρόλυση της αεσκουλίνης, ενώ δεν παρατηρείται ανάπτυξη με την λακτόζη ή την D- κελλοβιόζη ως πηγή άνθρακα και σε συγκεντρώσεις 3% NaCl. (Xie and Yokota, 2005).

#### 1.8.4 *Azospirillum amazonense* sp.

Τα βακτήρια *A. amazonense* απομονώθηκαν από έδαφος της ριζόσφαιρας και τις ρίζες διαφόρων φυτών Gramineae αλλά και σε άλλα φυτά σε διάφορες τοποθεσίες της περιοχής του Αμαζονίου και του Ρίο ντε Τζανέιρο (Magalhaes *et al.*, 1983) επίσης στελέχη του *A. amazonense* έχουν απομονωθεί από τις ρίζες ζαχαροκάλαμου στην επαρχία της Tucumán στην Αργεντινή ( Pedraza *et al.*, 2000). Η ικανότητα τους να αζωτοδεσμεύουν κάτω από μικροαερόφιλες συνθήκες, το σχήμα τους, το μέγεθος τους, η χαρακτηριστική κινητικότητα τους καθώς και ο σχηματισμός μεμβράνης στην επιφάνεια των κυττάρων του όταν αναπτύσσεται σε ημιστερεό μέσο μας επιτρέπει να τα κατατάξουμε στο γένος *Azospirillum*. Το ποσοστό σε G + C του DNA είναι 67-68% ( Magalhaes *et al.*, 1983).

Το βακτήριο *A. amazonense* διαφέρει από τα υπόλοιπα είδη του *Azospirillum* σε πολλά αλλά και σημαντικά χαρακτηριστικά. Ένα από αυτά είναι η δραστηριότητα της νιτρογενάσης όπου έχει χαμηλότερη ανοχή στο οξυγόνο, διαφέρει ακόμα ως προς την ικανότητα του να χρησιμοποιεί την σακχαρόζη ως πηγή άνθρακα, με τη σημαντικότερη όμως διαφορά την ευαισθησία του σε αλκαλικό pH. Από την φυλογενετική ανάλυση που έγινε σε αλληλουχίες 16S rDNA, επιβεβαιώθηκε ότι το *A. amazonense* και το *A. irakense* σχηματίζουν μια ομάδα, και τα πιο συγγενικά σε αυτά είδη είναι το *A. brasilense* and *A. lipoferum* όπου σχηματίζουν μια δεύτερη ομάδα μαζί με το *A. halopraeferens* (Potrich *et al.*, 2001).

Ο εμβολιασμός με στελέχη του *A. amazonense* σε φυτά ρυζιού είχε σαν αποτελέσματα την αύξηση του ξηρού βάρους των σπόρων και της συγκέντρωσης του αζώτου κατά την ωρίμανση. Η συμβολή του εμβολιασμού του βακτηρίου στο έδαφος που περιβάλλει το φυτό όσον αφορά την δέσμευση του αζώτου έφτασε μέχρι και το 27% της συνολικής απορρόφησης. Η επαγωγή της ανάπτυξης στα εν λόγω φυτά ρυζιού από το *A. amazonense* είναι η πρώτη απάντηση στην λειτουργία της αζωτοδέσμευσης στα βακτήρια ελεύθερης διαβίωσης (Rodrigues *et al.*, 2008).

### 1.8.5 *Azospirillum halopraeferens* sp.

Απομονώθηκε από την επιφάνεια της ρίζας του *Leptochloa fusca* (L.) Kunth όπου ευδοκίμει στα αλλατούχα εδάφη στην περιοχή Shakot, Punjab, του Πακιστάν. Τα κύτταρα του είναι αρνητικά κατά Gram, ραβδοειδούς σχήματος ενώ εμφανίζονται λίγα μόνο ελικοειδή κύτταρα όταν αναπτυχθεί σε αλκαλικό μέσο. Μπορούν να κινηθούν όταν βρίσκονται σε υγρό μέσο με την βοήθεια ενός πολικού μαστιγίου. Δεν υπάρχει ανάπτυξη σε στερεό θρεπτικό μέσο BMS ή ερυθρό του Κογκό, παρατηρήθηκε όμως πολύ καλή ανάπτυξη σε θρεπτικό υπόστρωμα (tryptic soy agar), όπου σχηματίσθηκαν κυκλικές, επίπεδες, γαλακτόχρωμες αποικίες με μεγάλη άλω. Όταν καλλιεργηθούν απουσία αζώτου σε ημιστερεά θρεπτικά μέσα στους 30 ή 35°C, οι νέες καλλιέργειες που θα αναπτυχθούν έχουν μια λεπτή μεμβράνη που θα αποτελείται από κύτταρα μικρού πλάτους, με μέσο όρο 0,7 έως 0,9 μm. Ενώ όταν η ανάπτυξη γίνει σε θρεπτικό υλικό όπου έχει προστεθεί 0.25% NaCl σε pH 7.2, το πλάτος των νέων κυττάρων κυμαίνεται από 1 έως 1,2μm. Το *Azospirillum halopraeferens* αναπτύσσεται σε κιτρικό και D-αραβινόζη. Παράγει οξύ από την D-ριβόζη, D-ξυλόζη, L-ραμνόζη, μαλτόζη, σορβιτόλη, και μυο-ινοσιτόλη. Το ποσοστό σε G + C είναι 70%. Διαφέρει από το *Azospirillum lipoferum* λόγω της αδυναμίας του να οξειδώσει την γλυκόζη και την φρουκτόζη σε αναερόβιες συνθήκες, να αναπτυχθεί με γλυκόζη ως πηγή C σε ημιστερεό θρεπτικό μέσο απουσίας αζώτου, καθώς και από την έλλειψη τυπικού πλειομορφισμού. Διαφοροποιείται από το *Azospirillum brasilense* λόγω των αναγκών του για βιοτίνη και από την ικανότητα του να μεταβολίζει την μανιτόλη και παρουσιάζει ασθενή αύξηση κατά την διάρκεια επώασης 3 ημερών σε ημιστερεό θρεπτικό μέσο απουσίας αζώτου, ενώ παρατηρείται βελτιστοποιημένη ανάπτυξη μετά από παρατεταμένη περίοδο επώασης 5 έως 7 ημερών. Τέλος διαφέρει από το *Azospirillum amazonense* στην ανάγκη του για βιοτίνη, στο μεταβολισμό της μανιτόλης όχι όμως της γλυκόζης και της φρουκτόζης, στην ικανότητα απονιτροποίησης, και στην ανοχή στα αλκάλια. Η βιοτίνη είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη του. Πειραματικά δεδομένα απέδειξαν ότι παρατηρείται καλύτερη ανάπτυξη των κυττάρων του στους 41°C από ότι στους 35°C και καθόλου ανάπτυξη στους 44°C, ενώ είναι ικανά να αναπτυχθούν και στους 20°C (Reinhold *et al.*, 1987).

### 1.8.6 *Azospirillum irakense* sp.

Το αζωτοδεσμευτικό βακτήριο *Azospirillum irakense*, απομονώθηκε από τις ρίζες και την ριζόσφαιρα ρυζιού (*Oryza sativa*) στην περιοχή της Diwaniyah (Qadisiya), στο Ιράκ. (Khammas *et al.*, 1989) επίσης στελέχη του έχουν απομονωθεί και από λιμνάζοντα ύδατα (Winkelmann *et al.*, 1996). Το Ιρακινό αυτο στέλεχος είναι αρνητικό κατά Gram, το ποσοστό σε G + C του DNA είναι 66% , αζωτοδεσμεύει μόνο υπό μικροαερόβιες συνθήκες, τα κύτταρά του παρουσιάζουν μια κυρτότητα, είναι ραβδόμορφα με πλάτος από 0.6 έως 0.9  $\mu\text{m}$  και μήκος από 2 έως 20  $\mu\text{m}$  (ανάλογα με τις συνθήκες της καλλιέργειας). Συνήθως κινούνται σε μια ελικοειδή τροχιά, με ένα μονό πολικό μαστίγιο όταν αναπτύσσονται σε υγρό θρεπτικό υλικό και με επιπρόσθετα περίτριχα μαστίγια όταν αναπτύσσονται σε στερεό θρεπτικό υλικό. Το κοντινότερο είδος φαινοτυπικά είναι το *A. Amazonense*. Διαφέρουν όμως στα εξής: α) στην ικανότητα ανάπτυξης σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 3% NaCl, β) στο μεγαλύτερο εύρος pH (5.5 έως 8.5), γ) στην πορεία της ανάπτυξης, δ) στην αζωτοδέσμευση, ε) στην υδρόλυση της πηκτίνης σε 7 ημέρες και στ) στο ότι δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει την μυο-ινοσιτόλη. Το πολικό μαστίγιο εμφανίζεται παχύτερο από τα πλευρικά και έχει μεγαλύτερο μήκος κίνησης, ενώ έχουν παρατηρηθεί και ενδοκυττάριοι κόκκοι. Σε ημιστερεό θρεπτικό υλικό, παρουσία σακχαρόζης και πλήρη απουσία αζώτου, αναπτύσσεται ως μια λευκή μεμβράνη, 2 mm κάτω από την επιφάνεια μετά από επώαση μιας ημέρας. Η ανάπτυξη επεκτείνεται στην επιφάνεια μετά από 2 ή 3 ημέρες. Δεν παράγεται οξύ από την γλυκόζη και την φρουκτόζη υπό αερόβιες αλλά ούτε και υπό αναερόβιες συνθήκες σε θρεπτικό μέσο πεπτόνης. Η βιοτίνη δεν χρειάζεται για την ανάπτυξη. Θετικά είναι τα τεστ της οξειδάσης και καταλάσης. Η καλύτερη ανάπτυξη επιτυγχάνεται στους 30 με 33 °C ενώ δεν έχουμε καθόλου ανάπτυξη στους 44 °C σε AAM θρεπτικό μέσο. Η ανάπτυξη και η αναγωγή του ακετυλενίου συμβαίνει σε pH από 5.5 μέχρι 8.5, με καταλληλότερη τιμή pH 6.5. και σε παρουσία NaCl μέχρι 3 % w/v. Ωστόσο η αναγωγή ακετυλενίου είναι βέλτιστη όταν το NaCl είναι λιγότερο από 0.01 %. Η εσκουλίνη και η πηκτίνη υδρολύονται, ενώ η υδροξυκινολίνη-β-γλυκουρονίδιο δεν υδρολύεται. Επιπλέον υδρολύει την πηκτίνη σε 7 ημέρες και έχει παρατηρηθεί ότι είναι το μόνο με πυκτινολυτική δραστηριότητα (Vande Broek and Vanderleyden, 1995). Το μέγεθος του γονιδιώματος του *A. irakense* είναι 4.8 Mbp (Bashan *et al.*, 2004) μαζί με το *A. amazonense* είναι τα μόνα *Azospirillum* που μπορούν να

χρησιμοποιήσουν αποτελεσματικά την σουκρόζη (Hartmann *et al.*, 2006) Το *A. irakense* είναι ικανό για την αποικοδόμηση της δεσφερριοξαμίνης υδροφόρου τύπου από την υδρολάση της δεσφερριοξαμίνης. Μόνο το *A. irakense* ανάμεσα από διάφορα *Azospirillum* μπορεί να ταυτοποιηθεί με εξειδικευμένους εκκινητές Airak1423 ή Airak985 χρησιμοποιώντας την μέθοδο FISH (Stoffels *et al.*, 2001)

### **1.8.7 *Azospirillum doebereinae* sp.**

Ένα νέο είδος αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων *Azospirillum* sp απομονώθηκε από τις ρίζες ενός C<sub>4</sub> αγρωστώδους φυτού το *Miscanthus* (Eckert *et al.*, 2001), επίσης το είδος αυτό έχει απομονωθεί και από ριζόσφαιρα φυτών *Pennisetum* που ευδοκιμούν και μεγαλώνουν στην Γερμανία (Baldani *et al.*, 2005). Πήρε το όνομα του προς τιμήν του Johanna Döbereiner που απομόνωσε και χαρακτήρισε πολλά είδη *Azospirillum*. Το *Azospirillum* που απομονώθηκε είναι χημειοοργανοετερότροφος οργανισμός και παρουσιάζει την ικανότητα μετατροπής των νιτρικών σε νιτρώδη. Η δοκιμή οξειδάσης και ουρεάσης ήταν θετική, η εσκουλίνη υδρολύεται ενώ η βιοτίνη δεν αποτελεί βασικό στοιχείο για την ανάπτυξη. Πειραματικά δεδομένα απέδειξαν ότι η άριστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη της βακτηριακής καλλιέργειας παρατηρείται στους 30 °C ενώ στους 37 και στους 42°C δεν σημειώθηκε κάποια αύξηση. Το εύρος των pH που εξετάστηκε ήταν από 3.0 έως 10.5. σε pH 6.0 - 7.0 σημειώθηκε η καλύτερη ανάπτυξη, η οποία και δεν επηρεάστηκε από την παρουσία 3% NaCl Τα κύτταρα είναι αρνητικά κατά Gram, έχουν σχήμα κυρτού ραβδίου, πλάτος από 1.0 έως 1.5 μm και μήκος 2.0-3.0 μm. Είναι κινητά με μια ελικοειδή κίνηση, με ένα μονό πολικό μαστίγιο, το οποίο παρατηρείται όταν τα κύτταρα μεγαλώνουν σε υγρό θρεπτικό μέσο. Τα γηρασμένα κύτταρα περιέχουν ενδοκυττάρια κοκκία. Τα κύτταρα δεν ενθυλακώνονται. Ο μεταβολισμός του έχει τυπικό αναπνευστικό χαρακτήρα. Η αραβινόζη, η D-φρουκτόζη, το γλυκονικό, η γλυκερόλη, το μηλικό, η μανιτόλη και η σορβιτόλη μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγές άνθρακα. Η αζωτοδέσμευση πραγματοποιείται σε μικροαερόβιες συνθήκες περιορισμένου αζώτου και συμβαίνει με μηλικό, σορβιτόλη, μανιτόλη, φρουκτόζη και γλυκερίνη. Η δραστηριότητα της καταλάσης, οξειδάσης και ουρεάσης είναι θετική και η ζελατίνη δεν υδρολύεται.. Το ποσοστό σε G + C του DNA είναι 69.6 ± 3%. Τα πιο κοντινά συγγενή είδη, με βάση



το γονίδιο 16S rRNA, είναι τα *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum largimobile* και *Azospirillum brasilense*. Το τυπικό στέλεχος είναι το GSF71<sup>T</sup> (Eckert *et al.*, 2001).

### 1.8.8 *Azospirillum oryzae* sp.

Το *Azospirillum oryzae* πήρε το όνομα του από το φυτό *Oryzae sativa*, από όπου και απομονώθηκε το τυπικό στέλεχος. Τα κύτταρα του έχουν σχήμα ελικοειδές ή ραβδοειδές, το μέγεθος τους κυμαίνεται από 1.0 x 1.5–5.0 μm και κινούνται με την βοήθεια ενός μονού πολικού μαστιγίου. Κοκκία πολυ-β-υδροξυβουτυρικού (PHB) παρατηρούνται μέσα στο εσωτερικό των κυττάρων. Η αζωτοδέσμευση πραγματοποιείται και τα κύτταρα μπορούν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό υλικό που δεν περιέχει άζωτο ή σε θρεπτικό υπόστρωμα. Το εύρος της θερμοκρασίας κυμαίνεται από τους 4 έως τους 37 °C (με την βέλτιστη να βρίσκεται στους 30 °C). Το κατάλληλο pH για την ανάπτυξη βρίσκεται μεταξύ 6.0 και 7.0, ενώ τα κύτταρα δεν αντέχουν σε συγκέντρωση 3% NaCl. Οξέα παράγονται από L-αραβινόζη, D-ξυλόζη, D-ριβόζη, D-γλυκόζη, η D-φρουκτόζη, D-γαλακτόζη και L-ραμνόζη, όχι όμως και από τη σορβιτόλη, τη λακτόζη, τη μαλτόζη, τη μαννιτόλη, τη ινοσιτόλη, τη κελλοβιόζη και τη σακχαρόζη. Θετικό στη μείωση του νιτρικού άλατος, αλλά αρνητικό στη μείωση του νιτρώδους. Θετικό με την καταλάση, την οξειδάση, την ουρεάση, την φωσφατάση, την Dnάση, την υγροποίηση της ζελατίνης, την υδρόλυση της αεσκουλίνης και στην ανάπτυξη με κιτρικό ως πηγή άνθρακα. Αρνητικό στη δοκιμή Voges-Proskauer και στην παραγωγή ινδόλης. Δεν πραγματοποιείται αφομοίωση του μηλονικού και της φαινυλαλανίνης. Η βιοτίνη απαιτείται για την ανάπτυξη ενώ γίνεται χρησιμοποίηση του υδρογόνου. Τα κυριότερα κυτταρικά λιπαρά οξέα είναι 18:1ω7c, 16:1ω7c και 16:0 ενώ τα υδρόξυ- λιπαρά οξέα είναι 14:0 3-OH και 16:0 3-OH. Το ποσοστό σε G+C του DNA είναι 66.8%. Το κυρίαρχο σύστημα κίνησης είναι η ουβικινόνη (Q-10). Το τυπικό στέλεχος είναι COC8<sup>T</sup> (=IAM 15130T=CCTCC AB204051T), απομονώθηκε το 1982 από τις ρίζες του ρυζιού *Oryzae sativa* (Cheng-Hui Xie & Akira Yokota, 2005).

### 1.8.9 *Azospirillum melinis* sp.

Το *Azospirillum melinis* απομονώθηκε από το φυτό μελάσα (Molasses grass) *Melinis minutiflora* Beauv. από όπου πήρε και το όνομα του. Τα κύτταρα του είναι ευθυτενή ή ελαφρός κυρτά, ραβδόμορφα, και το μέγεθος ποικίλει από 0.7 - 0.8 x 1.0-1.5 mm. Τα κύτταρα του αρνητικά κατά Gram και ακίνητα. Είναι προαιρετικά αναερόβια και χημειο-οργανότροφα. Οι αποικίες σε NFB θρεπτικό μέσο είναι στρογγυλές, κυρτές, ημιδιαφανής, με διάμετρο 3 mm και αναπτύσσονται μέσα σε 3 ημέρες στους 28 °C. Η ανάπτυξη του επιτυγχάνεται στους 5–37 °C με την κατάλληλη θερμοκρασία να βρίσκεται κάπου ανάμεσα στους 20–33 °C ενώ το εύρος του pH από 4 έως 8. Η ανάπτυξη αναστέλλεται σε συγκεντρώσεις NaCl μεγαλύτερες του 5%, ενώ σε συγκεντρώσεις μικρότερες του 3% εμφανίζεται ARA δραστηριότητα. Η αραβινόζη, η D-φρουκτόζη, το γλυκονικό, η γλυκερόλη, το μηλικό, η μανιτόλη, η μαλτόζη και η σορβιτόλη μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν πηγές άνθρακα. Δεν μεγαλώνει με το υπερχλωρικό ως τελικό δέκτης ηλεκτρονίων κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Το ποσοστό σε G + C του DNA του τυπικού στελέχους είναι 68.7%. Το κοντινότερο φυλογενετικά είδος σύμφωνα με το γονίδιο 16S rRNA είναι το *Azospirillum lipoferum*, το *Azospirillum oryzae* και το *Azospirillum largimobile*. Το τυπικό στέλεχος είναι το TMCY 0552T (=CCBAU 5106001T=LMG 23364T=CGMCC 1.5340T), όπου και απομονώθηκε από φυτά *Melinis minutiflora* που μεγαλώνουν στις μεσοτροπικές περιοχές της Κίνας (Peng *et al.*, 2006).

### 1.8.10 *Azospirillum zeae* sp.

Το *Azospirillum zeae* απομονώθηκε από έδαφος ριζόσφαιρας καλαμποκιού (*Zea mays*) στο Οντάριο, του Καναδά. Τα κύτταρα του είναι ραβδόμορφα με μέγεθος 0.9 – 1.5 x 1.9 – 6.8 mm, αρνητικά κατά Gram, κινητά μέσω ενός πολικού μαστιγίου. Μετά από επώαση 48–72 ωρών δημιουργούνται ρόδινες αποικίες, οι οποίες μετατρέπονται σε αφυδατωμένες με τραχεία επιφάνεια σε προχωρημένα στάδια ανάπτυξης. Αναπτύσσεται σε θρεπτικό μέσο μηλικού οξέος στους 20–41 °C, με pH 5–7 και σε 0.5–1.0% NaCl. Η άριστη ανάπτυξη του επιτυγχάνεται στους 30 °C με pH 5–7. Θετικό στην αζωτοδέσμευση και στην παραγωγή IAA. Αρνητικό στη διαλυτοποίηση του φωσφορικών αλάτων. Θετικό στην καταλάση, οξειδάση,

ουρεάση, στην μείωση του νιτρικού, στην υδρόλυση της αεσκουλίνης και της β-γαλακτοζιδάσης. Αρνητικό στη παραγωγή ινδόλης, στην διυδρολάση της αργινίνης και στην υδρόλυση της ζελατίνης. Παρατηρούνται ποικίλες αντιδράσεις στην παραγωγή ασετοΐνης (acetoin). Για την ανάπτυξή του δεν είναι απαραίτητη η βιοτίνη. Τα κύρια κυτταρικά λιπαρά οξέα είναι 18 : 1ω7c, 18 : 1 2-OH και 16 : 0. Το κυρίαρχο σύστημα κίνησης είναι η ουβικινόνη (Q-10), ενώ το ποσοστό του DNA σε G+C είναι 67.6 %. Το τυπικό στέλεχος είναι το N7<sup>T</sup> (5NCCB 100147T5LMG 23989T). (Mehnaz *et al.*, 2007)

### **1.8.11 *Azospirillum canadense* sp.**

Το *Azospirillum canadense* είναι ένα αζωτοδεσμευτικό βακτήριο ελεύθερης διαβίωσης το οποίο απομονώθηκε από την ριζόσφαιρα καλαμποκιού, και πήρε την ονομασία του από τον Canada, περιοχή από την οποία και απομονώθηκε. Τα κύτταρα είναι μικρά ραβδία μεγέθους 0.9 x 1.8–2.5 μm, αρνητικά κατά Gram, κινητά μέσω ενός μονού πολικού μαστιγίου. Οι αποικίες μετά από 48-72 h έχουν χρώμα λευκό έως απαλό ρόδινο, έχουν σχήμα κυκλικό ενώ έχουν υγρή μορφή. Η ανάπτυξη τους γίνεται σε μέσο M στους 20-37°C, το pH 5-7 και η συγκέντρωση NaCl από 0,5 έως 1%. Η άριστη θερμοκρασία είναι 25–30 °C και το ιδανικό pH είναι 5 – 7. Θετικό στην δέσμευση του αζώτου και του ινδολο-οξικού οξέος αρνητικό όμως για την διαλυτοποίηση του φωσφορικού. Θετικό στην καταλάση, στην οξειδάση, για την μείωση του νιτρικού, στην β-γλυκοσιδάση, στην β-γαλακτοζιδάσης και στην παραγωγή ασετοΐνης (acetoin) ενώ αρνητικό στην παραγωγή ινδόλης, στην διυδρολάση της αργινίνης, της ουρεάσης και στην υδρόλυση της ζελατίνης. Η βιοτίνη δεν απαιτείται για την ανάπτυξη της βακτηριακής καλλιέργειας του *Azospirillum canadense*. Τα κυριότερα κυτταρικά λιπαρά οξέα είναι 18 : 1ω7c, 16:1ω7c, 16 : 0. Το ποσοστό του DNA σε G+C είναι 67.9 mol%. Το κυρίαρχο σύστημα κίνησης είναι η ουβικινόνη Q-10. Το τυπικό στέλεχος είναι το DS2T (=NCCB 100108T=LMG 23617T), το οποίο έχει απομονωθεί από την ριζόσφαιρα καλαμποκιού (*Zea mays*) από το Delhi, Ontario, Canada ( Mehnaz *et al.*, 2007).

#### **1.8.12 *Azospirillum rugosum* sp.**

Το *Azospirillum rugosum* απομονώθηκε από έδαφος μολυσμένο με πετρέλαιο κοντά στο διυλιστήριο πετρελαίου που βρίσκεται στο Kaohsiung County, της Ταϊβάν. Σε στερεό θρεπτικό υλικό οι αποικίες του εμφανίζουν πτυχωτή επιφάνεια και αυτός είναι ο λόγος από όπου πήρε και το όνομα του. Τα κύτταρα είναι κινητά, ευθυτενή προς ελάχιστα καμπυλωτά, ραβδόμορφα. Είναι αρνητικά κατά Gram, και θετικά στην οξειδάση και καταλάση. Τα γηρασμένα κύτταρα περιέχουν ενδοκυττάρια σφαιρίδια. Σε στερεό θρεπτικό υλικό με τρυπτόνη και σε BHI άγαρ, σχηματίζονται αποικίες με απαλό πορτοκαλί χρώμα, οι οποίες στην αρχή είναι λείες με ολόκληρη άλω, για να αποκτήσουν σε προχωρημένα στάδια ανάπτυξης παρουσιάζουν πτυχές και ακανόνιστο σχήμα. Αεροβίως αναπτύσσεται στους 22–37 °C και αναπτύσσει ανθεκτικότητα στο NaCl έως συγκέντρωση 2.0% (w/v). Έχει τα σημαντικότερα χημειοταξονομικά χαρακτηριστικά του γένους *Azospirillum*. Το προφίλ λιπαρών οξέων του αποτελείται κυρίως από κορεσμένες και ακόρεστες αλυσίδες λιπαρών οξέων, με το n-C<sub>18:1</sub> ω7c ως κύριο λιπαρό οξύ, καθώς επίσης και 3-OH υδροξυλιωμένα λιπαρά οξέα. Το αναπνευστικό σύστημα κίνησης αποτελείται από την ουβικίνη. Θετικό στην παραγωγή ακετοΐνης αλλά αρνητικό στην παραγωγή ινδόλης και H<sub>2</sub>S. Ο φυσικός τύπος είναι IMMIB AFH-6T (5CCUG 53966T5DSM 19657T) (Young et al., 2008)

#### **1.8.13 *Azospirillum massiliensis* sp.**

Το *Azospirillum massiliensis* (συνώνυμο *Candidatus Azospirillum massiliensis*) απομονώθηκε από λίμνη στην περιοχή της νότιας Γαλλίας. Έχει πραγματοποιηθεί ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του 16S rRNA για το στέλεχος URAM1 (EF394925) (Pagnier et al., 2008).

#### **1.8.14 *Azospirillum palatum* sp.**

Το *Azospirillum palatum* απομονώθηκε από χώμα σε δασική έκταση στην επαρχία Zhejiang της Κίνας. Τα κύτταρα του είναι αρνητικά κατά Gram, κινητά με περίτριχα μαστίγια, ενδοφυλλικά, ραβδόμορφα και το μέγεθος τους κυμαίνεται από

0.6-1.0 x 2.0-2.6 μm. Οι αποικίες του έχουν χρώμα κίτρινο, είναι κυκλικές και επίπεδες μετά από επώαση 2 ημερών σε θρεπτικό μέσο TYB. Η ανάπτυξη επιτυγχάνεται σε θερμοκρασίες από 15° C έως 42°C με την βέλτιστη να βρίσκεται στους 30-37°C, ενώ το εύρος του pH είναι 5.0-9.0 με την καταλληλότερη όμως τιμή να βρίσκεται στο 6.0-8.0. Παρατηρήθηκε ανάπτυξη σε τροποποιημένο θρεπτικό μέσο TYB με συγκεντρώσεις 0-2 % NaCl, ενώ δεν αναπτύχθηκε όταν η συγκέντρωση του NaCl ήταν 3%. Το Tween 80 υδρολύθηκε ενώ δεν συνέβη το ίδιο στην καζεΐνη και στην τυροσίνη. Θετικό στην καταλάση και στην ουρεάση. Υπάρχει παρουσία ουρεάσης και β-γαλακτοζιδάσης. τα νιτρικά και τα νιτρώδη δεν μειώθηκαν ενώ μεταβολίζει το κιτρικό. Η ζελατίνη δεν υδρολύεται ενώ δεν παράγεται H<sub>2</sub>S και ινδόλη. Στο τεστ Voges-Proskauer βρέθηκε θετικό και δεν παράγονται οξέα από γλυκόζη, ινοσιτόλη, σουκρόζη και αραβινόζη. Το προφίλ των λιπαρών οξέων αποτελείται από C<sub>18:1</sub> ω7c (35,9%), cyclo-C<sub>19:0</sub> ω8c (32.1%), C<sub>16:0</sub> (13.0%). Το αναπνευστικό σύστημα κινόνης αποτελείται από μια μεγάλη ποσότητα Q-10 μια μικρότερη ποσότητα Q-9 με μοριακή αναλογία 2:1. Το τυπικό στέλεχος είναι το WW 10<sup>T</sup> και το ποσοστό σε G + C του DNA του είναι 67,3% (Zhou *et al.*, 2009).

#### **1.8.15 *Azospirillum picis* sp.**

Το *Azospirillum picis* είναι ένα βακτήριο αρνητικό κατά Gram και αερόβιο. Το σχήμα των κυττάρων του είναι ραβδόμορφα, ευθυτενή με ελαφρά κλίση, κινητά και αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες μεταξύ 22 και 37 °C. Είναι θετικά στην οξειδάση και στην καταλάση ενώ τα γηρασμένα κύτταρα ύστερα από καλλιέργεια 5 ημερών αναπτύσσουν ενδοκυττάρια κοκκία. Αναπτύσσονται ρόδινες αποικίες σε tryptone soya agar και σε θρεπτικό άγαρ. Περιέχει τα κυριότερα χημειοταξονομικά χαρακτηριστικά του γένους *Azospirillum*. Το προφίλ των λιπαρών οξέων αποτελείται κυρίως από ευθείες αλυσίδες κορεσμένων και ακόρεστων λιπαρών οξέων, με το C<sub>18:1</sub> ω7c ως το κύριο λιπαρό οξύ, όπως επίσης και τα 3-υδροξυλιωμένα λιπαρά οξέα. Το αναπνευστικό σύστημα κινόνης αποτελείται από την ουβικινόνη (Q-10). Θετικό στην αζωτοδέσμευση. Υδρολύει την αεσκουλίνη αλλά είναι αρνητικό στην υγροποίηση της ζελατίνης. Θετικό στην αναγωγή του νιτρικού. Το τυπικό στέλεχος έχει δράση p-νιτροφαινυλ-b-D-γαλακτοπυρανοϊδάσης και ουρεάσης ενώ

είναι αρνητικό στην διυδρολάση της αργινίνης και στην παραγωγή της ινδόλης. Το στέλεχος αυτό ονομάζεται IMMIB TAR-3T (5CCUG 55431T 5DSM 19922T), και απομονώθηκε από υπολείμματα πίσσας σε δρόμο στην πόλη Taichung στην περιοχή της Taiwan (Lin *et al.*, 2009).

#### **1.8.16 *Azospirillum thiophilum* sp.**

Σε αντίθεση με τα γνωστά είδη του *Azospirillum*, το νέο στέλεχος *Azospirillum thiophilum* BV-ST έχει την ικανότητα να χρησιμοποιεί διαφορετικές πηγές ενέργειας και άνθρακα (mixotrophic) υπό μικροαερόβιες συνθήκες, με την ταυτόχρονη χρησιμοποίηση των οργανικών υποστρωμάτων και του θειοθειικού ως δότης ηλεκτρονίων για την εξοικονόμηση ενέργειας. Η οξειδωση του σουλφιδίου ( $S^{2-}$ ) συνοδεύτηκε από εναποθέσεις σφαιριδίων θείου μέσα στα κύτταρα. Εντοπίστηκε δραστηριότητα της οξειδοαναγωγής του θειοθειικού. Το στέλεχος BV-S<sup>T</sup> απομονώθηκε από βακτηριακό επιφανειακό υπόστρωμα στις θειούχες πηγές “Shameless Baths” που βρίσκονται στην Stavropol Krai, Βόρεια του Καύκασου, στην Ρωσία. Τα κύτταρά του είναι αρνητικά κατά Gram, είναι ελικοειδή, καμπυλωτά, ραβδόμορφα με πλάτος 1,1 -2,0 μm και μήκος 3,6 -7,0 μm και είναι κινητά. Όταν τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε στερεό θρεπτικό άγαρ ήταν ελαφρώς κυρτά. Οι αποικίες είναι λευκές, λείες, στρογγυλές, με διάμετρο 0,4 -0,6 mm.

Η θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 15-40 ° C, με την βέλτιστη ανάπτυξη να επιτυγχάνεται στους 37° C. Το εύρος του pH που μπορεί να αναπτυχθεί είναι 6,5 - 8,5, με εξαιρετική ανάπτυξη σε pH 7,5. Μπορεί να αναπτυχθεί σε συγκεντρώσεις NaCl ≤ 3% (w / v). Είναι θετικά στην δέσμευση του αζώτου, και τα κύτταρά του μπορούν να αναπτυχθούν σε υπόστρωμα απουσίας αζώτου ή θρεπτικό μέσο.

Θετικό για την καταλάση, την οξειδάση, την υδρόλυση του αμύλου και μείωση των νιτρικών, και αρνητικό για την ουρεάση, την παραγωγή ινδόλης, της ζελατίνης και τέλος υδρολύει την καζεΐνη. Τα κυριότερα λιπαρά οξέα είναι C<sub>16:0</sub>, C<sub>16:1ω7c</sub>, C<sub>18:1ω7c</sub>. Το ποσοστό σε G + C του DNA είναι 67%. Το κυρίαρχο σύστημα κίνησης είναι η ουβικινόνη (Lavrinenko *et al.*, 2010)

## 1.9 *Pseudomonas stutzeri*

Το γένος *Pseudomonas* αποτελείται από τουλάχιστον 183 είδη, όπου το *P. Aeruginosa* αποτελεί το τυπικό είδος του γένους (Euzéby,1997) Το 1919 έγινε για πρώτη φορά η περιγραφή του γένους *Alcaligenes* από τότε έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές ανακατατάξεις, στις μέρες μας περιλαμβάνει δύο είδη το *Alcaligenes defragrans* και το *Alcaligenes faecalis* (με δύο υποείδη *A. faecalis* subsp. *faecalis* και *A. faecalis* subsp. *Parafaecalis*). (Busse & Stolz, 2006). Μία από τις ανακατατάξεις αυτές έγινε στο στέλεχος *Alcaligenes faecalis* A15 όπου αναγνωρίστηκε ως *Pseudomonas stutzeri* (Vermeiren *et al.*, 1999).

Το *Pseudomonas stutzeri* είναι ένα αρνητικό κατά gram βακτήριο, με σχήμα ραβδοειδές και κινείται μέσω ενός μονού πολικού μαστιγίου. Είναι ένα απονιτροποιητικό βακτήριο που απελευθερώνει άζωτο σε αέρια μορφή από τα νιτρικά. Είναι θετικό στην αμυλάση αλλά αρνητικό στην ζελατινάση ενώ μπορεί να αναπτυχθεί σε μαλτόζη και άμυλο (Rius *et al.*, 2001). Η αποικία έχει ένα ασυνήθιστο σχήμα, είναι πτυχωτή, ξηρή και ιδιαίτερα συνεκτική.

Κατατάσσεται στην κατηγορία των γ- Πρωτεοβακτηρίων, το DNA του *P. stutzeri* A1501 αποτελείται από ένα μονό κυκλικό χρωμόσωμα με 4.567.418 bp χωρίς όμως την παρουσία πλασμιδίου, κωδικοποιεί 4.146 πιθανές πρωτεΐνες, έχει 59 tRNA γονιδια και τέσσερα rRNA οπερόνια. Δεν φθορίζει, και γενικά θεωρείται βακτήριο του εδάφους που όμως απαντάται και σε υδάτινα περιβάλλοντα (Moore *et al.*, 2006, Yan *et al.*, 2010)

Το στέλεχος A1501 είναι ένα πολυδύναμο βακτήριο του εδάφους που διαθέτει το ασυνήθιστο χαρακτηριστικό, για *Pseudomonas*, να αζωτοδεσμεύει, και μπορεί να εντοπίζεται ως ενδοφυτικό. Το στέλεχος αυτό μελετάτε ιδιαίτερα λόγω των ειδικών μεταβολικών ιδιοτήτων του. Απονιτροποίηση υπό μικροαερόβιες συνθήκες, νιτροποίηση υπό αερόβιες συνθήκες, αζωτοδέσμευση υπό μικροαερόφιλες συνθήκες (Yan *et al.*, 2010). Τα νιτρικά απαντώνται σε πολλά περιβάλλοντα και μπορούν μετατραπούν από το *Pseudomonas stutzeri* σε νιτρώδες για τρεις διαφορετικούς σκοπούς: 1) χρησιμοποίηση σαν πηγή αζώτου για την ανάπτυξη (αφομοίωση νιτρικού), 2) παραγωγή πρωτονίων ως κινητήριο δύναμη για την σύνθεση ATP

χρησιμοποιώντας τα νιτρικά σαν τελικό δέκτη ηλεκτρονίων (αναπνοή νιτρικού) και 3) απαγωγή του πλεονάζοντος και μείωση των ισοδύναμων (dissimilatory). (Rediers *et al.*, 2007).



## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία απομονώθηκαν από το Εργαστήριο Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής της κας Κεφαλογιάννη Η. (2008). Σύμφωνα με τη μέθοδο αναγωγής ακετυλενίου σε αιθυλένιο με αέριο χρωματογράφο Perkin-Elmer F-11 (> 10nmoles αιθυλένιο) πραγματοποιήθηκε η εκτίμηση της αζωτοδεσμευτικής ικανότητας των στελεχών αυτών, βάσει της δραστηριότητας της νιτρογενάσης.

Στέλεχος	Είδος φυτού	Ποικιλία	Τοποθεσία	Πηγή απομόνωσης
<b>GR50</b>	<i>H.vulgare</i>	Carina	Θεσσαλονίκη, Μακεδονία	Ριζόσφαιρα
<b>GR52</b>	<i>H. vulgare</i>	Georgy	Θεσσαλονίκη, Μακεδονία	Ριζόσφαιρα
<b>GR54</b>	<i>H. vulgare</i>	Georgy	Θεσσαλονίκη, Μακεδονία	Ριζόσφαιρα
<b>GR57</b>	<i>H. vulgare</i>	Τοπική	Θεσσαλονίκη, Μακεδονία	Ριζόσφαιρα
<b>GR60</b>	<i>A. sativa</i>	Τοπική	Σκούρτα, Βιοτία	Ριζόσφαιρα
<b>GR61</b>	<i>A. sativa</i>	Τοπική	Θεσσαλονίκη, Μακεδονία	Ριζόσφαιρα
<b>GR65</b>	<i>H. vulgare</i>	Τοπική	Κιλελέρ, Θεσσαλία	Ριζόσφαιρα

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν επίσης ορισμένα βακτηριακά στελέχη, τα οποία αποτελούν μοντέλα έρευνας, προκειμένου να πραγματοποιηθεί σύγκριση με τα υπό μελέτη στελέχη της εργασίας. Συγκεκριμένα, παρελήφθησαν από την εταιρεία BCCM™/LMG σε λιοφιλιωμένη μορφή τα εξής στελέχη:

*Azospirillum brasilense* LMG 13127<sup>T</sup> = ATCC29145 = CECT 590 = DSM 1690 = JCM 1224 = NCIB 11860 = Döbereiner Sp7 = Vlassak 002 = LMG 1263.

*Azospirillum lipoferum* LMG 13128<sup>T</sup> = ATCC 29707 = Döbereiner Sp 59b = Krieg VPI Sp59b.

Από την εταιρεία παροχής των στελεχών πήραμε τα προτεινόμενα **θρεπτικά μέσα** CM3 για το *A. brasilense*, CM131 για το *A. lipoferum* και μία παραλλαγή του CM3 για το *Pseudomonas stutzeri* (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ).

Οι καλλιέργειες των βακτηρίων μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλα χρονικά διαστήματα στο κατάλληλο θρεπτικό μέσο, παρουσία 20% γλυκερόλης στους -80°C. Ενώ οι στερεές καλλιέργειες διατηρούνται στους 4°C για διάστημα μερικών εβδομάδων.

## 2.2 Απομόνωση νουκλεϊνικών οξέων

### 2.2.1 Απομόνωση ολικού γονιδιωματικού DNA από Gram (-) βακτήρια

Μία μεμονωμένη αποικία του κάθε στελέχους χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό 20 ml θρεπτικού υλικού Oxoid CM3 και ακολούθησε επώαση υπό ανάδευση στους 30°C για 24 ώρες.

- I. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 6.000 στροφές ανά λεπτό (στρ./λεπτό) για 10 λεπτά και επαναδιαλύθηκαν σε 5 ml διαλύματος TE3. Ακολούθησε καλή ανάμειξη.
- II. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν και πάλι με φυγοκέντρηση, επαναδιαλύθηκαν σε 3 ml διαλύματος TE και προστέθηκαν 0,3 ml διάλυμα λυσοζύμης6.
- III. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 20 λεπτά και στη συνέχεια προστέθηκε 0,5 ml από το διάλυμα LauroSarkosyl/Proteinase K (10% LauroSarkosyl με 5mg/ml Proteinase K σε TE). Το μίγμα αναδεύτηκε καλά και επώαστηκε στους 37°C για μία ώρα λαμβάνοντας ιζώδη μορφή.
- IV. Στη συνέχεια έγινε καθαρισμός με φαινόλη/χλωροφόρμιο1 και το τελικό υπερκείμενο μίγμα διαμοιράστηκε ανά 500 μl σε μικρούς δοκιμαστικούς σωλήνες.

- V. Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 50 μl 3M οξικού νατρίου pH: 4,8 και 1 ml, περίπου, ισοπροπανόλης και τοποθετήθηκαν στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για 18 ώρες.
- VI. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 13.000 στρ./λεπτό για 20 λεπτά στους  $4^{\circ}\text{C}$  και το ίζημα που συλλέχθηκε από όλα τους δοκιμαστικούς σωλήνες επαναδιαλύθηκε σε 500 μl TE. Προστέθηκαν 50 μl 3M οξικού νατρίου pH: 4,8 και 1 ml ισοπροπανόλης και τοποθετήθηκε στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για τουλάχιστον 1 ώρα.
- VII. Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε όπως και πριν και το ίζημα ξεπλύθηκε με 70% αιθανόλη.
- VIII. Μετά από φυγοκέντρωση το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 500 μl TE και προστέθηκαν 3 μl πυκνού διαλύματος RNάσης συγκέντρωσης 20 mg/ml. Ακολούθησε επώαση στους  $37^{\circ}\text{C}$  για 20 λεπτά και στη συνέχεια καθαρισμός με φαινόλη/χλωροφόρμιο.
- IX. Στο τελικό υπερκείμενο που περιείχε το χρωμοσωμικό DNA προστέθηκε και πάλι οξικό νάτριο σε όγκο ίσο με το 1/10 του όγκου του υπερκείμενου και διπλάσιος όγκος αυτού ισοπροπανόλη.
- X. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στους  $4^{\circ}\text{C}$ , ξέπλυμα με 70% αιθανόλη και επαναδιάλυση του τελικού ιζήματος (χρωμοσωμικό DNA) σε διάλυμα TE.

### 2.2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli*

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli* γίνεται με δύο μεθόδους:

#### i) Μέθοδος του βρασμού (Holmes & Quigley, 1981)

- I. 5 ml θρεπτικού υλικού LB, που περιέχουν το αντιβιοτικό αμπικιλίνη (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ), εμβολιάζονται με μεμονωμένη αποικία μετασχηματισμένων, με το προς απομόνωση πλασμίδιο, κυττάρων *E. coli*. Ακολουθεί επώαση με ανακίνηση στους  $37^{\circ}\text{C}$  για περίπου 16 ώρες.
- II. Από την καλλιέργεια αυτήν 1,5 ml μεταφέρεται σε σωλήνα erpendorf και φυγοκεντρείται στις 6.000 στρ./λεπτό για 5 λεπτά.
- III. Το υπερκείμενο απομακρύνεται σχολαστικά αφήνοντας το ίζημα των κυττάρων όσο το δυνατόν πιο στεγνό.

- IV. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 150 µl διαλύματος STET4 παρουσία λυσοζύμης (Sigma) σε τελική συγκέντρωση 0,5 mg/ml.
- V. Ακολουθεί βρασμός του δείγματος για 45 δευτερόλεπτα και μετά φυγοκέντρωσή του στις 13.000 στρ./λεπτό για 20 λεπτά.
- VI. Μετά τη φυγοκέντρωση, το ίζημα που αποτελείται από τα κυτταρικά υπολείμματα απομακρύνεται. Για την κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA προστίθενται στο υπερκείμενο 180 µl ισοπροπανόλης και ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13.000 στρ. /λεπτό για 5 λεπτά.
- VII. Αφού το ίζημα ξεπλυθεί με 70% αιθανόλη και στεγνώσει στον αέρα επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος TE.

## ii) με QIAprep Miniprep (QIAGEN)

- I. 5 ml θρεπτικού διαλύματος LB που περιέχουν αμπικιλίνη εμβολιάζονται με μία μεμονωμένη αποικία κυττάρων E. coli, τα οποία έχουν μετασχηματισθεί με το προς απομόνωση πλασμίδιο. Ακολουθεί επώαση με συνεχή ανακίνηση στους 37°C για περίπου 16 ώρες.
- II. 2-5 ml από την παραπάνω καλλιέργεια μεταφέρονται σε σωλήνα erpendorf και φυγοκεντρώνται στις 13.000 στρ./λεπτό για 4 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- III. Το υπερκείμενο απομακρύνεται σχολαστικά και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 250 µl διαλύματος P1 (περιέχει RNase A).
- IV. Προστίθενται 250 µl διαλύματος P2 (περιέχει NaOH), το δείγμα αναδεύεται απαλά και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για διάστημα λιγότερο από 5 λεπτά.
- V. Προστίθενται 350 µl διαλύματος εξουδετέρωσης N3 (περιέχει οξικό οξύ και γουανιδίνη-HCl), ακολουθεί ανάμιξη και φυγοκέντρωση στις 13.000 στρ./λεπτό για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- VI. Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά και μεταφέρεται στην στήλη QIAprep.
- VII. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13.000 στρ./λεπτό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- VIII. Το διάλυμα που διαπέρασε την στήλη πετάγεται, σε αυτό το στάδιο το πλασμιδιακό DNA έχει προσδεθεί στην στήλη.
- IX. Προστίθενται 350 µl διαλύματος PE (περιέχει αιθανόλη). Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13.000 στρ./λεπτό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου, το διάλυμα που διαπερνά την στήλη απομακρύνεται και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρωση, ώστε να απομακρυνθεί τελείως το διάλυμα PE καθώς

περιέχει αιθανόλη, η οποία αν παραμείνει μπορεί να παρεμποδίσει περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις.

- X. Το πάνω μέρος της στήλης τοποθετείται σε σωλήνα eppendorf. Για την έκλυση του DNA προστίθεται ddH<sub>2</sub>O ή διάλυμα 30 μl EB (10 mM Tris-HCl, pH: 8.5).
- XI. Ακολουθεί φυγοκέντρηση της στήλης για 1 λεπτό στις 13.000 στρ./λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- XII. Το δείγμα φυλάσσεται στους -20°C.

## 2.3 Ανάλυση νουκλεϊνικών οξέων

### 2.3.1 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων

Η συγκέντρωση και η καθαρότητα των νουκλεϊνικών οξέων σε υδατικό διάλυμα προσδιορίζονται φωτομετρικά με τη χρήση σπεκτροφωτόμετρου nanodrop (NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer). Επιλέγουμε πριν προχωρήσουμε στην μέτρηση, από το λογισμικό της συσκευής την ένδειξη DNA.

- Για τον μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιείται ποσότητα 1 μl του εκάστοτε διαλύτη (H<sub>2</sub>O ή TE).
- Φωτομετρείται ποσότητα δείγματος 1 μl και λαμβάνονται οι λόγοι OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> και OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> βάσει των οποίων γίνεται η εκτίμηση της καθαρότητας των δειγμάτων των νουκλεϊνικών οξέων.
- Ικανοποιητικής καθαρότητας θεωρείται ένα δείγμα DNA όταν ο λόγος OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> είναι περίπου 1,8. Μικρότερες τιμές της τιμής αυτής αποτελούν ένδειξη μόλυνσης, π.χ. από την παρουσία πρωτεϊνών, φαινόλης ή άλλων ουσιών που απορροφούν στα 280nm.
- Ο λόγος OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> αποτελεί ένα δεύτερο μέτρο της καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων. Σε δείγματα υψηλής καθαρότητας ο λόγος αυτός είναι συνήθως υψηλότερος από τις αντίστοιχες τιμές του OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> και κυμαίνεται μεταξύ 1,8 και 2,2. Μικρότερες τιμές αποτελούν συνήθως ένδειξη μόλυνσης.

### 2.3.2 Πέψη DNA με χρήση ένζυμων (ενδονουκλεασών) περιορισμού

Οι πέψεις των δειγμάτων DNA γίνονται σε τελικό όγκο ο οποίος εξασφαλίζει την πραγματοποίηση των αντιδράσεων. Ο καθορισμός του όγκου εξαρτάται τόσο από την ποσότητα του εκάστοτε ένζυμου περιορισμού που χρησιμοποιήσαμε όσο και από την ποσότητα και την καθαρότητα του DNA. Η συνήθης ποσότητα κυμαίνεται μεταξύ 20–100  $\mu\text{l}$ .

- I. Σε σωλήνα erpendorf τοποθετείται το δείγμα του DNA, το ρυθμιστικό διάλυμα που απαιτείται για τη δράση του ένζυμου και η ενδονουκλεάση περιορισμού. Συνήθως, χρησιμοποιείται μια μονάδα ένζυμου (1 unit) ανά μικρογραμμάριο δείγματος DNA. Εάν το δείγμα του DNA περιέχει υπολείμματα RNA προστίθεται επιπλέον και RNase A. Τέλος, προστίθεται ddH<sub>2</sub>O μέχρι τον επιθυμητό όγκο.

Σε μία τυπική αντίδραση πέψης τελικού όγκου 30  $\mu\text{l}$  αναμιγνύονται:

<b>Διάλυμα DNA 1<math>\mu\text{g}</math> (σε νερό ή TE)</b>	<b>έως 10 <math>\mu\text{l}</math></b>
<b>10x ρυθμιστικό διάλυμα ένζυμου</b>	3 $\mu\text{l}$
<b>Ένζυμο περιορισμού (1 unit/<math>\mu\text{l}</math>)</b>	1 $\mu\text{l}$
<b>RNase A<sup>7</sup> (1 mg/ml)</b>	0,5 $\mu\text{l}$
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	έως τελικό όγκο 30 $\mu\text{l}$

- II. Το δείγμα αναμιγνύεται καλά και επωάζεται στην κατάλληλη θερμοκρασία για 3-4 ώρες. Στον πίνακα B.1 αναφέρονται, ενδεικτικά, κάποιες ενδονουκλεάσες περιορισμού, οι θέσεις αναγνώρισης της νουκλεοτιδικής ακολουθίας καθώς και η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ένζυμου.
- III. Μετά το πέρας της αντίδρασης τα προϊόντα αναλύονται σε πηκτή αгарόζης.

Ενδονουκλεάση Περιορισμού	Αλληλουχία αναγνώρισης	Βέλτιστη θερμοκρασία δράσης (°C)
BamHI	G/GATCC	37
EcoRI	G/AATTC	37
EcoRV	GAT/ATC	37
HindIII	A/AGCTT	37
SacI	GAGCT/C	37
SalI	G/TCGAC	37
PstI	CTGCA/G	37
XhoI	C/TCGAG	37

/ : ορισμός σημείου πέψεως στην αλληλουχία

**Πίνακας Β.1:** Ενδονουκλεάσες περιορισμού

### 2.3.3 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αгарόζης

Ο διαχωρισμός των δεσοξυριβονουκλεϊνικών οξέων γίνεται με βάση το μέγεθος και τη διαμόρφωσή τους με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. Στην περίπτωση διαχωρισμού γραμμικών μορίων DNA, ο διαχωρισμός είναι ανάλογος του μεγέθους τους. Το εύρος μεγεθών που μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτή αгарόζης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αгарόζης και κυμαίνεται από 0,1 έως 100Kb. Στον πίνακα Β.2 αναφέρονται οι τυπικές συγκεντρώσεις αгарόζης ανάλογα με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού.

Πίν. Β.2. Συγκέντρωση πηκτής αγαρόζης ανάλογα με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού	
Αγαρόζη (%)	Εύρος διαχωρισμού γραμμικών μορίων (kb)
0.3	1.7-70
0.5	0.7-45
0.8	0.4-20
1.0	0.3-10
1.2	0.2-8
1.5	0.2-6
2.0	0.1-5

Για να καταφέρουμε να παρατηρήσουμε τα μόρια του DNA κάνουμε χρήση του **βρωμιούχου αιθιδίου**<sup>9</sup>, το οποίο μπορεί και παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA ενώ έχει και την ικανότητα να φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός. Για την προετοιμασία της πηκτής αγαρόζης εκτελούμε το εξής διαδικασία:

- I. Ποσότητα αγαρόζης αναμειγνύεται, σε κωνική φιάλη Erlenmeyer, με ορισμένο όγκο διαλύματος ηλεκτροφόρησης 1xTAE8. Η συγκέντρωση της πηκτής αγαρόζης που χρησιμοποιήθηκε είναι 1%, η οποία έχει εύρος διαχωρισμού γραμμικών μορίων από 0,3 έως 10 kb.
- II. Η φιάλη με την αγαρόζη και το διάλυμα TAE θερμαίνεται σταδιακά σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου η αγαρόζη διαλυθεί εντελώς.
- III. Η θερμοκρασία του διαλύματος αφήνεται να πέσει έως τους 60°C και αφού προστεθεί διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (10 mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 0,5 µg/ml, αφήνεται να στερεοποιηθεί σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης. Στη συσκευή προσαρμόζεται η κατάλληλη "χτένα" έτσι ώστε να σχηματιστούν, στην πηκτή, τα βοηθία φόρτωσης.
- IV. Η "χτένα" απομακρύνεται από την πηκτή. Η συσκευή συμπληρώνεται με διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE έτσι ώστε η πηκτή να παραμένει βυθισμένη 1-2 mm από την επιφάνειά του.



- V. Τα δείγματα των νουκλεοξέων, αφού αναμιχθούν σε ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης<sup>10</sup>, τοποθετούνται στις εγκοπές της πηκτής. Στη συνέχεια εφαρμόζεται στα άκρα της πηκτής κατάλληλη τάση .

#### 2.3.4 Ανάκτηση κλάσματος DNA από πηκτή αγαρόζης

Η ανάκτηση κλάσματος DNA από πηκτή αγαρόζης γίνεται με τη χρήση του QIA quick Gel Extraction Kit (QIAGEN) σύμφωνα με την εξής διαδικασία:

- I. Από την πηκτή αγαρόζης απομονώνεται, με την χρήση καθαρού νυστεριού, το τμήμα εκείνο το οποίο περιέχει την επιθυμητή ζώνη DNA. Το κομμάτι αυτό τοποθετείται σε σωλήνα erpendorf ζυγίζεται και προστίθενται τρεις όγκοι ρυθμιστικού διαλύματος QG (για παράδειγμα για 100 mg πηκτής αγαρόζης απαιτούνται 300 μl διαλύματος QG).
- II. Ακολουθεί επώαση στους 50°C για 10 λεπτά έως ότου διαλυθεί η αγαρόζη.
- III. Στο διάλυμα προστίθεται ένας όγκος ισοπροπανόλης, το μίγμα ανακινείται ήπια, μεταφέρεται σε φορτισμένη στήλη QIAquick και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 13.000 στρ./λεπτό.
- IV. Το υγρό αδειάζεται και η στήλη ξεπλένεται με 0,75 ml ρυθμιστικού διαλύματος PE και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό.
- V. Πραγματοποιείται μια επιπλέον φυγοκέντρηση για 1 λεπτό.
- VI. Η στήλη μεταφέρεται σε νέο σωλήνα erpendorf και το DNA εκλύεται με την προσθήκη στη στήλη 50 μl διαλύματος EB ή ddH<sub>2</sub>O και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό.

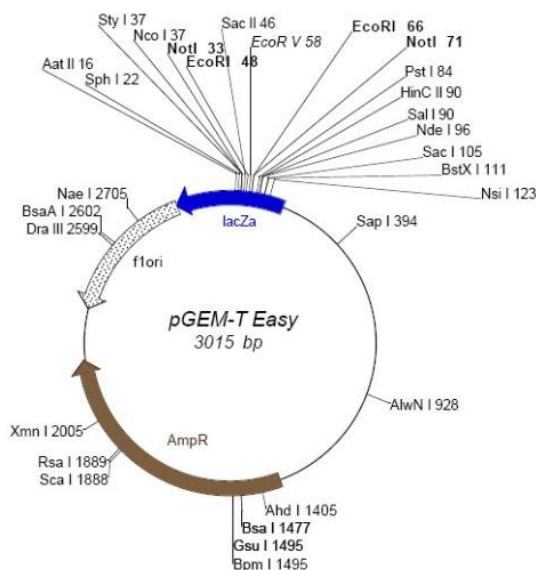
## 2.4 Υποκλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακό φορέα

### 2.4.1 Χαρακτηριστικά πλασμιδιακού φορέα

Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη είναι ο **pGEM-T easy (Promega)** (Εικ. 2.1). Ο συγκεκριμένος φορέας χρησιμοποιήθηκε στην υποκλωνοποίηση των DNA τμημάτων έτσι ώστε να γίνει πιο εύκολος ο χειρισμός τους και να επιτραπεί ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων τους και γενικότερα ο χαρακτηρισμός τους.

Τα κυριότερα χαρακτηριστικά του φορέα είναι τα εξής: οι πλασμιδιακοί φορείς pGEM-T διαθέτουν μια αρχή αντιγραφής (ori), τμήμα του γονιδίου *lacZ* του

*E. coli*, που κωδικοποιεί για το α-πεπτιδίο του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση. Επιπλέον, φέρουν μια πολλαπλή θέση κλωνοποίησης (πολυσύνδεσμος) εντός του γονιδίου αυτού *lacZ*



**Εικ. 2.1** Ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα **pGEM-T easy (Promega)**

καθώς και τους προαγωγείς της RNA πολυμεράσης, T7 και SP6, οι οποίοι βρίσκονται ένθεν και ένθεν του πολυσυνδέσμου. Το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης βρίσκεται υπό τον μεταγραφικό έλεγχο των παραπάνω προαγωγέων ενώ η μεταγραφή μπορεί και επάγεται παρουσία του χημικού ανάλογου της λακτόζης IPTG (ισοπροπυλοθειογαλακτοσίδιο). Η β-γαλακτοσιδάση μεταβολίζει την οργανική ένωση X-gal, παράγοντας μια αδρανή μπλε ουσία. Η ένθεση ξένου DNA στην περιοχή του πολυσυνδέσμου, ωστόσο, διακόπτει τη μεταγραφή του γονιδίου *lacZ* με αποτέλεσμα την αδυναμία μεταβολισμού της X-gal και, κατά συνέπεια, την απουσία ανάπτυξης μπλε χρώματος στις βακτηριακές καλλιέργειες. Το γεγονός αυτό επιτρέπει τον εντοπισμό των ανασυνδυασμένων κλώνων με βάση το χρώμα των αποικιών όταν σε αυτές προστεθεί X-gal και IPTG. Επίσης, οι συγκεκριμένοι φορείς φέρουν γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικιλίνη, γεγονός που επιτρέπει την επιλογή των μετασχηματισμένων με αυτούς βακτηριακών κυττάρων.

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

Τμήματα DNA τα οποία προκύπτουν από την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης φέρουν κολλώδη άκρα, οπότε για την κλωνοποίησή τους χρησιμοποιείται ο πλασμιδιακός φορέας pGEM-T Easy (Promega). Ο φορέας έχει υποστεί πέψη με ένζυμο περιορισμού EcoRV και στα τυφλά άκρα που δημιουργήθηκαν προστέθηκαν βάσεις θυμίνης, ώστε να αποφευχθεί η επανασυγκόλλησή τους και να βελτιωθεί η ενσωμάτωση του ένθετου τμήματος στον πλασμιδιακό φορέα.

Η μέθοδος που αναφέρεται παρακάτω περιγράφεται από τους Sambrook *et al.* (1989). Στην αντίδραση ενσωμάτωσης (ligation), η αναλογία των μορίων του πλασμιδιακού φορέα και του προς ένθεση τμήματος DNA ρυθμίζεται στο 1:3 για τη μεγιστοποίηση της πιθανότητας δημιουργίας ανασυνδυασμένων πλασμιδίων. Η αραίωση τόσο του φορέα όσο και του ενθέτου DNA γίνεται ώστε να διευκολύνεται η επίτευξη της απαιτούμενης αναλογίας.

Η αντίδραση ενσωμάτωσης περιλαμβάνει:

<b>DNA πλασμιδιακός φορέας</b>	<b>1 μl</b>
<b>DNA ένθεσης</b>	1 μl
<b>10x ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης<sup>11</sup></b>	1 μl
<b>Ένζυμο λιγάση T4 (1 unit/μl)</b>	1 μl
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	έως 10 μl

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες ή στους 4°C για 16 ώρες.

## 2.5 Μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli*

### 2.5.1 Υγρές και στερεές καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων *E. coli*

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *E. coli* XL-blue, το οποίο καλλιεργήθηκε σε υγρό ή στερεό θρεπτικό μέσο LB παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ). Η ανάπτυξη του πραγματοποιήθηκε στους 37°C σε επωαστικούς θαλάμους για περίπου 16 ώρες. Για τις υγρές καλλιέργειες η επώαση πραγματοποιήθηκε υπό ανάδευση.

### 2.5.2 Δημιουργία βακτηριακών κυττάρων *E. coli* ικανών για μετασχηματισμό (Competent cells)

- I. 10 ml LB θρεπτικού υλικού εμβολιάζονται με μια αποικία *E. coli* (XL-blue) και επωάζονται, με ανακίνηση, για περίπου 18 ώρες στους 37°C.
- II. 2 ml της παραπάνω καλλιέργειας χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 200 ml αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού LB. Ακολουθεί επώαση με ανακίνηση στους 37°C για 2 περίπου ώρες (O.D.<sub>600</sub>=0,3-0,4).
- III. Οι χειρισμοί οι οποίοι ακολουθούν παρακάτω γίνονται ή στον πάγο ή στους 4°C. Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 6.000 στρ./λεπτό για 10 λεπτά.
- IV. Το ίζημα των κυττάρων αφού επαναδιαλύεται με ήπια ανάδευση σε 25 ml 0,1 M MgCl<sub>2</sub>, φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 6.000 στρ./λεπτό.
- V. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 25 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> και διατηρείται σε πάγο για 20 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 6.000 στρ./λεπτό.
- VI. Τα ίζημα επαναδιαλύεται σε 10 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> και προστίθεται γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 20% (v/v). Τα κύτταρα αφού τοποθετηθούν σε σωλήνες erpendorf φυλάσσονται στους -80°C.

### 2.5.3 Μετασχηματισμός ικανών κυττάρων *E. coli* με πλασμίδια

- I. Σε σωλήνα erpendorf μεταφέρονται, μέσα σε πάγο, 100 μl ικανών προς μετασχηματισμό κυττάρων από το κατάλληλο στέλεχος *E. coli*.
- II. Προστίθενται 10-100 ng πλασμιδιακού DNA σε όγκο που δε πρέπει να υπερβαίνει το 1/10 του όγκου των προς μετασχηματισμό κυττάρων.
- III. Το μίγμα κυττάρων-πλασμιδιακού DNA επωάζεται στον πάγο για περίπου μισή ώρα.

- IV. Η είσοδος του πλασμιδίου στα κύτταρα επιτυγχάνεται με την υποβολή τους σε θερμικό σοκ στους 42°C για 1-2 λεπτά και την απ' ευθείας μεταφορά τους στη συνέχεια στον πάγο για 1 λεπτό.
- V. Προστίθενται 200 μl LB θρεπτικού διαλύματος (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ) και τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για 1 ώρα.
- VI. Τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό LB και το κατάλληλο αντιβιοτικό (αμπικιλίνη για τον φορέα pGEM-T Easy) (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ) για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων.
- VII. Στην περίπτωση όπου σκοπός είναι η επιλογή των αποικιών που φέρουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, προστίθενται στα κύτταρα 10 μl IPTG 100 mM12 και 50 μl X-Gal 2%13 (w/v). Οι αποικίες που φέρουν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, λόγω της διακοπής του γονιδίου που κωδικοποιεί τη β-γαλακτοσιδάση από το ένθεμα, εμφανίζονται λευκές. Αντίθετα, οι αποικίες με τα μη ανασυνδυασμένα πλασμίδια, λόγω της δράσης του ένζυμου, αναπτύσσουν μπλε χρώμα.

## 2.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

### 2.6.1 Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική αυτή (Mullis *et al.*, 1986, Mullis & Faloona, 1987) αποτελεί την πλέον εξειδικευμένη και ευαίσθητη μέθοδο ενίσχυσης ακολουθιών DNA και RNA, *in vitro* ή και *in situ*. Η βασική αρχή της PCR βασίζεται σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά της αντιγραφής του DNA. Το εκμαγείο του DNA αρχικά αποδιατάσσεται σε θερμοκρασία 94°C σε δύο μονόκλωνες αλυσίδες. Δύο μονόκλινα ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές), τα οποία καθορίζουν τα σημεία έναρξης της αντιγραφής, υβριδίζονται με το εκμαγείο, ένα με κάθε αλυσίδα. Κατά το σχεδιασμό των εκκινητών θα πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψη τα εξής:

- I. Το μέγεθος των εκκινητών πρέπει να είναι τέτοιο (15-30 νουκλεοτίδια) ώστε η θερμοκρασία για τον υβριδισμό τους στο DNA να είναι λογική.
- II. Η αλληλουχία του κάθε εκκινητή να είναι μοναδική και να υβριδίζεται σε μια μόνο περιοχή του DNA.

III. Οι εκκινητές δε θα πρέπει να έχουν δευτεροταγή δομή. Στην αντίδραση PCR, όπου χρησιμοποιείται ζεύγος εκκινητών, δε θα πρέπει τα 3'-άκρα τους να είναι συμπληρωματικά.

IV. Η σύνθεση των βάσεων των εκκινητών θα πρέπει να είναι περίπου 50% σε GC και 50% σε AT.

V. Ο κάθε εκκινητής θα πρέπει να περιέχει στα άκρα του G ή C.

VI. Στην περίπτωση που οι νουκλεοτιδικές ακολουθίες των εκκινητών δεν είναι πλήρως συμπληρωματικές με το DNA η μετάλλαξη ή οι μεταλλάξεις είναι συνήθως στο μέσο του εκκινητή ή τουλάχιστον 12 νουκλεοτίδια από το 3'-άκρο.

Ακολούθως, μια 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 που είναι δίκλωνο. Για τη σύνθεση αυτή απαραίτητη είναι η παρουσία μίγματος νουκλεοτιδίων και ιόντων  $Mg^{+2}$ . Αρχικά για την PCR χρησιμοποιήθηκε η DNA πολυμεράση του *E. coli* αλλά το ένζυμο αυτό είναι θερμοευαίσθητο και καταστρέφεται στις θερμοκρασίες εκείνες που απαιτούνται για την αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA. Συνήθως χρησιμοποιείται η DNA πολυμεράση, που έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus*, και έχει άριστη θερμοκρασία δραστηριότητας στους 72°C. Η δραστηριότητα της αναφερόμενης ως *Taq* πολυμεράσης παραμένει σε υψηλά επίπεδα μετά από επανειλημμένη αύξηση της θερμοκρασίας στους 94°C. Οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες μπορεί να επεκτείνονται πέρα από την αλληλουχία βάσεων που ορίζεται από τον άλλο εκκινητή και, ως εκ τούτου, δημιουργούνται καινούριες θέσεις υβριδισμού των εκκινητών. Στη συνέχεια, οι αρχικές αλυσίδες, καθώς και οι νεοσυντιθέμενες, αφού πρώτα αποδιαταχθούν με θέρμανση στους 94°C, μπορούν να χρησιμεύσουν ξανά ως μήτρες αντιγραφής όπου θα υβριδιστούν οι εκκινητές. Εάν αυτός ο κύκλος επαναληφθεί *n* φορές, τότε το τελικό αποτέλεσμα θα είναι η σύνθεση 2<sup>*n*</sup> δίκλωνων μορίων DNA που αποτελούν αντίγραφα της αλληλουχίας ανάμεσα από τους εκκινητές και περιέχουν 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 παρεμποδιστών της πολυμεράσης. Η εξειδίκευση του προϊόντος εξαρτάται κυρίως από τη θερμοκρασία υβριδισμού και από την

εξειδίκευση των θέσεων υβριδισμού των συγκεκριμένων εκκινητών στη μήτρα του DNA.

### 2.6.2 Ενίσχυση τμήματος DNA (PCR)

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

Οι ακριβείς συνθήκες πραγματοποίησης μιας τυπικής αντίδρασης PCR προσαρμόζονται κάθε φορά στις απαιτήσεις του συγκεκριμένου πειράματος. Συγκεκριμένα, η ποσότητα της μήτρας DNA, που προστίθεται κάθε φορά, εξαρτάται από το είδος του και συγκεκριμένα στην περίπτωση γονιδιωματικού DNA χρησιμοποιείται ποσότητα ίση περίπου με 1μg. Επίσης, η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών εξαρτάται κάθε φορά από τη θερμοκρασία τήξεώς τους ( $T_m$ ).

Μία τυπική αντίδραση PCR πραγματοποιείται ως εξής:

Σε ειδικό σωλήνα eppendorf προστίθενται:

<b>Ολικό γενωματικό DNA</b>	<b>1 μg</b>
<b>εκκινητής ευθείας κατεύθυνσης (Forward) (10 μM)</b>	1 μl
<b>εκκινητής αντίστροφης κατεύθυνσης Reverse (10 μM)</b>	1 μl
<b>μίγμα dNTPs (10 mM το καθένα)</b>	1 μl
<b>10x PCR ρυθμιστικό διάλυμα<sup>14v</sup></b>	5 μl
<b>DMSO</b>	2 μl
<b>DyNAzyme II DNA πολυμεράση (FINNZYMES)(2 U/μl)</b>	0,5 μl
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	έως τελικό όγκο 50 μl

Στην περίπτωση ενίσχυσης μεγάλων τμημάτων DNA (>1000bp) στην παραπάνω αντίδραση χρησιμοποιείται 1  $\mu$ L DNA πολυμεράσης DyNAzymes EXT (FINNZYMES) (1 U/ $\mu$ L)

Γενικά, οι συνθήκες πραγματοποίησης της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης είναι:

<b>Αρχική αποδιάταξη</b>	<b>94°C για 2-4 λεπτά</b>	} 35 κύκλοι
<b>Αποδιάταξη</b>	94°C για 1 λεπτό	
<b>Υβριδισμός εκκινητών</b>	45-65°C για 1 λεπτό	
<b>Επιμήκυνση</b>	72°C για 1 λεπτό/1.3-15kb αναμενόμενου προϊόντος	
<b>Τελική επιμήκυνση</b>	72°C για 5-10 λεπτά	

Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ) των εκκινητών και είναι, συνήθως, 5°C κάτω από αυτήν. Οι εξειδικευμένες συνθήκες PCR, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για το κάθε γονίδιο που μελετήθηκε, αναφέρονται στο κεφάλαιο *Αποτελέσματα*.

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

## 2.7 Σύγκριση ακολουθιών - φυλογενετική ανάλυση

Η αναζήτηση της ταυτότητας των υπό μελέτη ακολουθιών πραγματοποιήθηκε με σύγκριση αυτών με τις διαθέσιμες ακολουθίες της βάσης δεδομένων GenBank χρησιμοποιώντας τη μηχανή αναζήτησης BLAST (Basic Local Alignment Tool, Altschul *et al.*, 1990) του NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Η μετάφραση των ακολουθιών σε αμινοξικές και η ανάλυσή τους έγινε με το πρόγραμμα ExPASy (Expert Protein Analysis System) (Gasteiger *et al.*, 2003).



Οι ακολουθίες ευθυγραμμίστηκαν με τον αλγόριθμο CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994) με τη βοήθεια του προγράμματος MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007). Τα φυλογενετικά δέντρα κατασκευάστηκαν με τη μέθοδο Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) έπειτα από υπολογισμό των γενετικών αποστάσεων με τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al.*, 2004) για την περίπτωση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών και μέσω κατανομής Poisson (Zuckerkandl & Pauling, 1965β) για την περίπτωση των αμινοξικών αλληλουχιών. Η αξιοπιστία και η σταθερότητα των σχέσεων του δενδρογράμματος εκτιμήθηκε μέσω 1000 bootstrap δειγμάτων.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

### ΣΥΝΘΕΣΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

#### A. Διαλύματα απομόνωσης DNA

**1. Φαινόλη - χλωροφόρμιο** αναμιγνύονται σε αναλογία 1:1. Το μίγμα εξισορροπείται με 100 mM Tris-HCl pH 8,3. **Φαινόλη:** η φαινόλη θερμαίνεται σε υδατόλουτρο στους 65-68°C έως ότου υγροποιηθεί. Σε 200 ml υγρή φαινόλης προστίθενται 50 ml 500 mM Tris-HCl pH 8,3. Ακολουθεί καλή ανάδευση και οι δύο φάσεις αφήνονται να διαχωριστούν. Η άνω φάση αφαιρείται και προστίθενται 50 ml 100 mM Tris-HCl pH 8,3. Ακολουθεί καλή ανάδευση και διαχωρισμός των δύο φάσεων. Το τελευταίο αυτό βήμα επαναλαμβάνεται έως ότου το pH φθάσει στο 8. Η φαινόλη φυλάσσεται στους 4°C.

#### **2. 3M οξικό νάτριο pH 4,8:**

Σε τελικό όγκο 1 lt H<sub>2</sub>O διαλύονται 246,09 g άνυδρο οξικό νάτριο (BDH). Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 4,8 με την προσθήκη πυκνού οξικού οξέος (BDH). Το τελικό διάλυμα αποστειρώνεται και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

#### B. Διαλύματα απομόνωσης DNA

#### **3. TES:**

Tris 10mM pH:8, EDTA 25mM, NaCl 150mM

#### **4. STET:**

8% σακχαρόζη, 5% Triton x 100 (BDH), 50 mM Tris- HCl pH 8,0, 50 mM EDTA.

#### **5. TE:**

10 mM Tris- HCl pH 8,0, 1 mM EDTA.

#### **6. Λυσοζύμη:**

50 mg λυσοζύμης (Boehringer-Mannheim) διαλύονται σε 1 ml dH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.

## Γ. Διαλύματα ανάλυσης νουκλεϊνικών οξέων

### **7. RNase A:**

10 mg RNase A διαλύονται σε 1 ml 10 mM Tris-HCl pH 7,5/15 mM NaCl. Το διάλυμα θερμαίνεται στους 100°C για 15 λεπτά, με σκοπό την αδρανοποίηση τυχόν δράσης DNase, αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου και φυλάσσεται στους -20°C.

### **8. 1x TAE:**

Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα 50x TAE το οποίο αραιώνεται 50 φορές. **50x TAE:** διαλύονται 242 g Tris base, 57,1 ml οξικού οξέος και 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 σε ddH<sub>2</sub>O, μέχρι τελικό όγκο 1 lt.

### **9. Βρωμιούχο αιθίδιο:**

Το βρωμιούχο αιθίδιο παρασκευάζεται ως πυκνό διάλυμα 0,5 mg/ml σε dH<sub>2</sub>O και φυλλάσσεται στους 4°C. Η τελική συγκέντρωση του βρωμιούχου αιθιδίου στην πηκτή είναι 0,5 μg/ml.

### **10. Διάλυμα φόρτωσης:**

0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανό του ξυλενίου και 30% γλυκερόλη.

## Δ. Διαλύματα υποκλωνοποίησης τμημάτων DNA

### **11. 10x ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης:**

0,66 M Tris-HCl pH 7,6, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT, 10 mM ATP. Το πυκνό ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης φυλάσσεται σε μικρές ποσότητες στους -20°C.

## Ε. Διαλύματα μετασηματισμού κυττάρων *E. coli*

### **12. 100 mM IPTG:**

0,0238g IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, SIGMA) διαλύονται σε 1 ml ddH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα αποστειρώνεται με φιλτράρισμα (0,22 μm Millipore) και φυλάσσεται στους -20°C.

### **13. 2% X-Gal:**

0,02 g X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosidase, SIGMA) προστίθενται σε 1 ml διμεθυλ-φορμαμίδιο (Sigma).

### **ΣΤ. Διαλύματα αντίδρασης PCR**

#### **14. 10x PCR ρυθμιστικό διάλυμα:**

100 mM Tris-HCl pH 8,3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% (w/v) gelatin (BDH).

### **ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΕΧΝΙΤΩΝ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΜΕΣΩΝ**

#### **LB: Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης βακτηρίων *E.coli***

Για την παρασκευή 1 lt θρεπτικού διαλύματος LB, σε τελικό όγκο 1 lt dH<sub>2</sub>O προστίθενται 10 g NaCl, 10 g Bacto-Trypton (Casein) και 5 g Yeast extract. Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου σε τρυβλία, προστίθεται στο διάλυμα 1,5% άγαρ. Ακολουθεί αποστείρωση. Το υγρό θρεπτικό μέσο φυλάσσεται σε φιαλίδια MacCartney σε θερμοκρασία δωματίου ενώ τα τρυβλία με το στερεό μέσο φυλάσσονται στους 4°C.

#### **Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης βακτηρίων του γένους *Azospirillum***

##### **I. CM3**

‘Lab-Lemco’ beef extract	1g
Εκχύλισμα ζύμης	2g
Πεπτόνη	5g
NaCl	5g
Αποσταγμένο νερό	1lt
pH	7,4

##### **II. CM131**

Τρυπτόνη	15g
Πεπτόνη σόγιας	5g
NaCl	5g
Αποσταγμένο νερό	1lt
pH	7,3

### Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης βακτηρίου *Pseudomonas stutzeri*

#### III. CM3

Θρεπτικό μέσο I	1lt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,45g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12H <sub>2</sub> O	2,39g
pH	6,8

Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου σε τρυβλία, προστίθεται στο διάλυμα 1,5% άγαρ. Ακολουθεί αποστείρωση για 20 λεπτά στους 121°C. Το υγρό θρεπτικό μέσο φυλάσσεται σε φιαλίδια MacCartney σε θερμοκρασία δωματίου ενώ τα τρυβλία με το στερεό μέσο φυλάσσονται στους 4°C.

#### ΣΥΝΘΕΣΗ ΜΗΤΡΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ -ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

##### Αμπικιλίνη:

Μητρικό διάλυμα:	100 mg/ml σε ddH <sub>2</sub> O
Τελική συγκέντρωση:	100 µg/ml θρεπτικού διαλύματος

##### Τετρακυκλίνη:

Μητρικό διάλυμα:	15 mg/ml σε αιθανόλη (BDH)
Τελική συγκέντρωση:	15 µg/ml για τρυβλία, 7,5 µg/ml για τις υγρές καλλιέργειες

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Μοριακή ανάλυση γονιδίου 16S rRNA

Για πρώτη φορά το 1965 διατυπώθηκε από τους Zuckerkandl και Pauling η άποψη ότι τα μόρια ενδεχομένως να αποτελούν ‘αποδείξεις της εξελικτικής ιστορίας’ ή ‘μοριακά χρονόμετρα’ (Zuckerkandl & Pauling, 1965α). Μετά από περίπου μία δεκαετία αργότερα, οι Woese και συνεργάτες του αναγνώρισαν το γονίδιο που κωδικοποιεί για το 16S rRNA ως ένα δυναμικό φυλογενετικό εργαλείο δίνοντας το έναυσμα να δημιουργηθούν τα πρώτα φυλογενετικά δέντρα προκαρυωτικών οργανισμών με βάση το γονίδιο που κωδικοποιεί για τη μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος (Fox *et al.*, 1980). Οι πρόοδοι στην νουκλεοτιδική αλληλούχηση, που έχουν επιτευχθεί από τότε έως σήμερα, κυρίως με την ανάπτυξη της τεχνικής ενίσχυσης PCR, έχουν βοηθήσει όχι μόνο στην αναγνώριση νέων ειδών βακτηρίων αλλά και στην ταξινόμηση εκ νέου ορισμένων παλιότερων ενώ παράλληλα έχουν δημιουργηθεί και βάσεις δεδομένων γονιδίων. Το 1980 τα αναγνωρισμένα είδη ήταν 1.792 (Approved Lists of Bacterial Names) ενώ σήμερα ο αριθμός αυτός των προκαρυωτικών ειδών ανέρχεται σε 9.297 (Skerman *et al.*, 1980, Euzéby, 1997).

Τα κυτοχρώματα και οι φερεδοξίνες ήταν τα πρώτα μόρια που εξετάστηκαν για τις δυνατότητές τους ως φυλογενετικοί δείκτες, όμως το γονίδιο 16S rRNA αποτελεί το πιο αποδεκτό και ευρέως χρησιμοποιούμενο συντηρημένο γονίδιο που χρησιμοποιείται στην βακτηριακή ταξινόμηση και φυλογένεια. Οι λόγοι που χρησιμοποιείται είναι: α) το γονίδιο 16S rRNA έχει μέγεθος ~1500bp, το οποίο εξυπηρετεί σε έρευνες βιοπληροφορικής, β) η παρουσία του, σχεδόν, σε όλα τα βακτήρια, συχνά ως πολλαπλά γονίδια ή ως οπερόνια και γ) η λειτουργία του γονιδίου 16S rRNA δεν έχει αλλάξει με το πέρασμα του χρόνου, υποδηλώνοντας ότι οι τυχαίες αλλαγές στην αλληλουχία είναι περισσότερο αντιπροσωπευτικές της εξέλιξης (Janda & Abbott, 2007). Σύμφωνα με την ad-hoc επιτροπή για την επανεκτίμηση του προσδιορισμού ειδών στη βακτηριολογία, κατά την περιγραφή ενός νέου είδους, για να είναι αντιπροσωπευτική η ακολουθία 16S rRNA πρέπει να είναι μεγαλύτερη των 1.300 βάσεων (<0,5% αμφιβολία) (Stackebrandt *et al.*, 2002).

Παρά την ευρεία αποδοχή του 16S rRNA ως φυλογενετικός δείκτης παρουσιάζει και ορισμένα μειονεκτήματα. Το γεγονός ότι οργανισμοί οι οποίοι έχουν ακολουθίες rRNA με υψηλή ομολογία μπορεί να έχουν σημαντικές διαφορές στο επίπεδο του συνολικού γονιδιώματος. Τέλος ανάλογα με τη λειτουργική σημασία, τα δομικά στοιχεία των rRNA δεν μπορούν να διαφοροποιούνται ελεύθερα και οι αλλαγές στην ακολουθία τους δε φαίνεται να αποτελούν μια συνεχή διαδικασία. Έτσι, η απόκλιση των σύγχρονων ακολουθιών rRNA μπορεί να αποδεικνύει την επιτυχία των κοινών προγόνων και των σύγχρονων απογόνων τους αλλά δεν πρέπει να θεωρείται δεδομένο ότι υπάρχει άμεση αλληλεξάρτηση με μία χρονική κλίμακα. (Ludwig & Klenk, 2005).

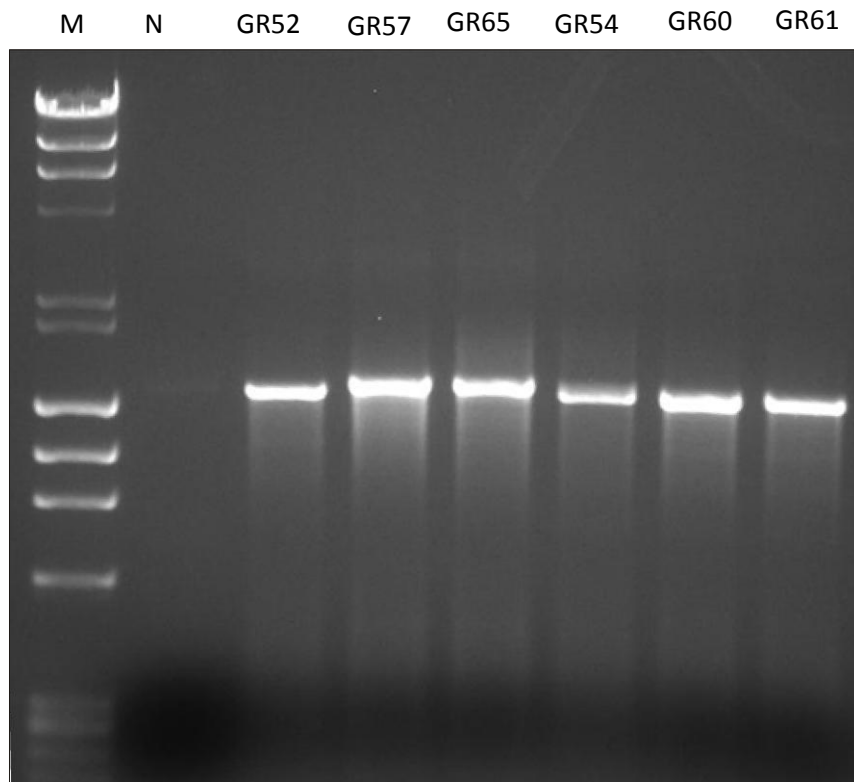
### 3.1.1 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου 16S rRNA

Πραγματοποιήθηκε μοριακή ανάλυση του γονιδίου που κωδικοποιεί για το 16S rRNA. Ενισχύθηκε τμήμα περίπου 1450 βάσεων (97% του συνολικού 16S rRNA γονιδίου) με χρήση της τεχνικής PCR. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν (Weisburg *et al.*, 1991) για την ενίσχυση με PCR του τμήματος 16S rRNA είναι οι εξής:

Forward	<b>fD1</b>	5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3'
Reverse	<b>rD1</b>	5'- CAAGTCGTAAAAGGTAGCCGT -3'

Για την ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA, οι συνθήκες πραγματοποίησης της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης ήταν:

<b>Αρχική αποδιάταξη</b>	94°C για 4 λεπτά	} 35 κύκλοι
<b>Αποδιάταξη</b>	94°C για 1 λεπτό	
<b>Υβριδισμός εκκινητών</b>	48°C για 1 λεπτό	
<b>Επιμήκυνση</b>	72°C για 1 λεπτό	
<b>Τελική επιμήκυνση</b>	72°C για 5-10 λεπτά	



---

**Εικ. 3.1** Ενίσχυση PCR τμήματος του γονιδίου 16S rRNA μεγέθους 1450bp στο ολικό γονιδιωματικό DNA των δειγμάτων GR52, GR56, GR65, GR54, GR60, GR61, (M= μάρτυρας μοριακών μεγεθών λ DNA *Hind* III και φX174 DNA *Hae* III)

---





C G C G G T A A T A C G A A G G G G G C T A G C G T T G T T C G G A A T T A C T G G G C G T A A A G G C G C G T A G G Majority

490 500 510 520 530 540

16S 52  
16S 54  
16S 60  
16S 61  
16S 66  
A. oryzae AB185396  
Abrasilense sp7\_X79739  
AirakenseDSM1158\_6\_GU256443  
Alipiferumb2\_D0787330  
AzeaeN7\_LMG23989\_D0682470

C G G C C T G T T T A G T C A G A A G T G A A A G C C C C G G C T C A A C C T G G G A A T A G C T T T T G T A T A C T G Majority

550 560 570 580 590 600

16S 52  
16S 54  
16S 60  
16S 61  
16S 66  
A. oryzae AB185396  
Abrasilense sp7\_X79739  
AirakenseDSM1158\_6\_GU256443  
Alipiferumb2\_D0787330  
AzeaeN7\_LMG23989\_D0682470

G C A G G C T T G A G T T C C G G A G A G G A T G G T G G A A T T C C C A G T G T A G A G G T G A A A T T C G T A G A T Majority

610 620 630 640 650 660

16S 52  
16S 54  
16S 60  
16S 61  
16S 66  
A. oryzae AB185396  
Abrasilense sp7\_X79739  
AirakenseDSM1158\_6\_GU256443  
Alipiferumb2\_D0787330  
AzeaeN7\_LMG23989\_D0682470

A T T G G G A A G A A C A C C G G - T G G C G A A G G C G G C C A T C T G G A C G G A C A C T G A C G C T G A G G C G C Majority

670 680 690 700 710 720

16S 52  
16S 54  
16S 60  
16S 61  
16S 66  
A. oryzae AB185396  
Abrasilense sp7\_X79739  
AirakenseDSM1158\_6\_GU256443  
Alipiferumb2\_D0787330  
AzeaeN7\_LMG23989\_D0682470

G A A A G C G T G G G G A G C A A A C A G G A T T A G A T A C C C T G G T A G T C C A C G C C G T A A A C G A T G A A T Majority

730 740 750 760 770 780

16S 52  
16S 54  
16S 60  
16S 61  
16S 66  
A. oryzae AB185396  
Abrasilense sp7\_X79739  
AirakenseDSM1158\_6\_GU256443  
Alipiferumb2\_D0787330  
AzeaeN7\_LMG23989\_D0682470

G C T A G A C G T T G G G G T G C A T G C A - C T T C G G T G T C G C C G C T A A C G C A T T A A G C A T T C C G C C T Majority

790 800 810 820 830 840

16S 52  
16S 54  
16S 60  
16S 61  
16S 66  
A. oryzae AB185396  
Abrasilense sp7\_X79739  
AirakenseDSM1158\_6\_GU256443  
Alipiferumb2\_D0787330  
AzeaeN7\_LMG23989\_D0682470

G G G G A G T A C G G C C G C A A G G T T A A A A C T C A A A G G A A T T G A C G G G G G C C C G C A C A A G C G G T G Majority

850 860 870 880 890 900

16S 52  
16S 54  
16S 60  
16S 61  
16S 66  
A. oryzae AB185396  
Abrasilense sp7\_X79739  
AirakenseDSM1158\_6\_GU256443  
Alipiferumb2\_D0787330  
AzeaeN7\_LMG23989\_D0682470

G A G C A T G T G G T T T A A T T C G A A G C A A C G G C G A G A A C C T T A C C A A C C C T T G A C A T G T C C A T T Majority

910 920 930 940 950 960

16S 52  
16S 54  
16S 60  
16S 61  
16S 66  
A. oryzae AB185396  
Abrasilense sp7\_X79739  
AirakenseDSM1158\_6\_GU256443  
Alipiferumb2\_D0787330  
AzeaeN7\_LMG23989\_D0682470



Πραγματοποιήθηκε η ευθυγράμμιση των υποκλώνων και ακολουθιών διαθέσιμων στο διαδίκτυο (βλ. παράρτημα για Accession Number) με το πρόγραμμα πολλαπλής ευθυγράμμισης Clustal W του λογισμικού Lasergene v7.0

### 3.1.3 Πίνακας αποστάσεων των 10 ακολουθιών

Percent Identity												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	■	98.1	96.5	96.8	99.9	96.9	96.9	91.4	96.5	96.0	1	16S 52
2	1.9	■	96.8	97.1	98.1	97.0	97.2	91.4	97.4	96.3	2	16S 54
3	3.6	3.3	■	99.7	96.5	99.0	94.6	91.1	97.6	99.3	3	16S 60
4	3.3	3.0	0.3	■	96.7	99.1	94.9	91.3	97.9	99.2	4	16S 61
5	0.1	2.0	3.6	3.3	■	96.8	96.8	91.3	96.4	95.9	5	16S 66
6	3.2	3.0	1.0	0.9	3.3	■	94.9	91.0	98.2	98.4	6	<i>A. oryzae</i> (AB185396)
7	2.4	2.1	4.9	4.6	2.5	4.5	■	89.8	95.4	94.1	7	<i>A. brasilense</i> sp7 (X79739)
8	9.2	9.1	9.5	9.3	9.3	9.6	10.3	■	90.7	91.0	8	<i>A. irakense</i> DSM11586 (GU256443)
9	3.5	2.5	2.3	2.0	3.6	1.7	3.9	9.8	■	97.2	9	<i>A. lipoferum</i> B2 (DQ787330)
10	4.0	3.7	0.6	0.7	4.1	1.5	5.3	9.4	2.6	■	10	<i>A. zeae</i> N7 LMG23989 (DQ682470)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		

Πίν. 3.1 Ο πίνακας των αποστάσεων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα πολλαπλής ευθυγράμμισης Clustal W του λογισμικού Lasergene v7.0

Από τη μοριακή ανάλυση των 5 *Azospirillum* νουκλεοτιδικών αλληλουχιών 16S rRNA προέκυψαν τα εξής στατιστικά στοιχεία για τη συχνότητα των νουκλεοτιδίων:

Στέλεχος	T(U)	C	A	G	G+C	Σύνολο
<b>Gr52</b>	19.1	24.7	23.4	32.8	57.5	1446
<b>Gr54</b>	19.1	24.7	23.3	32.9	57.6	1448
<b>Gr60</b>	19.3	24.4	23.6	32.7	57.1	1446
<b>Gr61</b>	19.4	24.3	23.5	32.8	57.1	1447
<b>Gr66</b>	19.1	24.7	23.5	32.7	57.4	1446

Πίν. 3.2 Συχνότητα νουκλεοτιδίων και του αθροίσματος G+C στην κάθε μία αλληλουχία 16S rRNA. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, software version 4.0) (Tamura *et al.*, 2007).

### 3.1.4 Αποτελέσματα BLAST και συχρότητα νουκλεοτιδίων

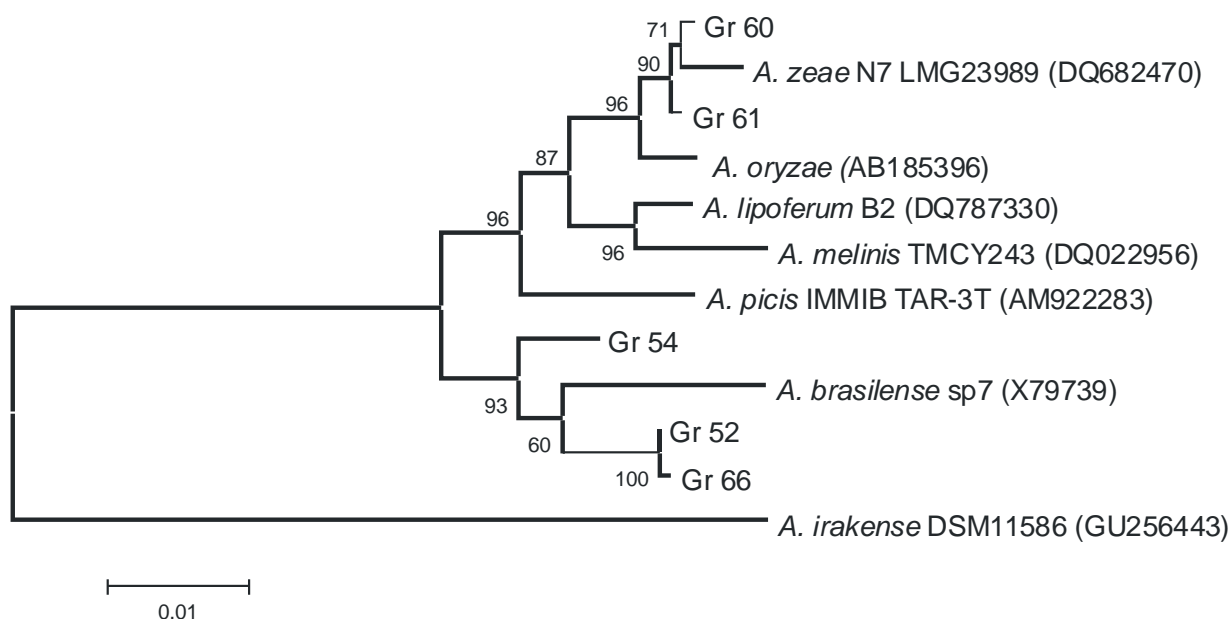
Πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αλληλουχιών με τα στοιχεία των βάσεων δεδομένων από διαδικτυακό πρόγραμμα BLAST του National Center of Biotechnology Information (NCBI).

Από τη σύγκριση με τα στοιχεία των βάσεων δεδομένων από το διαδικτυακό πρόγραμμα BLAST των 5 *Azospirillum* υποκλώνων 16S rRNA προέκυψαν τα εξής:

Στέλεχος	Υποκλώνος	Αποτέλεσμα BLAST	Max identity	Query Coverage
Gr52	pGemT.16S.52	EF634028.1 ; <i>Azospirillum brasilense</i> strain	99%	99%
Gr54	pGemT.16S.54	DQ288687.1 ; <i>Azospirillum brasilense</i> strain	100%	99%
Gr60	pGemT.16S.60	DQ682470.1 ; <i>Azospirillum zeae</i> strain N7 DQ682469.1 ; <i>Azospirillum zeae</i> strain N6	100%	98%
Gr61	pGemT.16S.61	DQ682470.1 ; <i>Azospirillum zeae</i> strain N7 DQ682469.1 ; <i>Azospirillum zeae</i> strain N6	100%	98%
Gr66	pGemT.16S.66	EF634028.1 ; <i>Azospirillum brasilense</i> strain	99%	98%

Πίν. 3.3 Αποτελέσματα σύγκρισης με τη βάση δεδομένων BLAST των 5 *Azospirillum* υποκλώνων 16S rRNA

### 3.1.5 Φυλογενετικό δέντρο των 12 ακολουθιών 16S rRNA *Azospirillum*



**Εικ. 3.2** Εξελικτικές σχέσεις των υπό μελέτη στελεχών και στελεχών αναφοράς βάσει τμήματος του γονιδίου 16S rRNA. Η απεικόνιση της εξελικτικής ιστορίας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Παρουσιάζεται το δέντρο ομολογίας 1000 αντιγράφων bootstrap προκειμένου να απεικονισθεί η εξελικτική ιστορία των υπό ανάλυση taxa. Οι κλάδοι που αντιστοιχούν σε κατανομές οι οποίες αναπαράχθηκαν σε λιγότερα από 50% των αντιγράφων bootstrap έχουν συγχωνευθεί. Δίπλα στους κλάδους παρουσιάζεται το ποσοστό των αντιγράφων των δέντρων στα οποία τα συσχετιζόμενα taxa συγκροτούν μία ομάδα (Felsenstein, 1985). Το δέντρο είναι σχεδιασμένο σε κλίμακα, με τους κλάδους να έχουν τις ίδιες μονάδες με αυτές των αποστάσεων που χρησιμοποιήθηκαν για να προκύψει το φυλογενετικό δέντρο. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al.*, 2004) και οι μονάδες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό υποκαταστάσεων ανά θέση. Ως outgroup χρησιμοποιήθηκε το βακτήριο *A. Irakense* DSM 11586. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν ως ακολουθίες αναφοράς τυπικά στελέχη *A. zeae* N7 LMG23989, *A. oryzae*, *A. lipoferum* B2, *A. melinis* TMCY243, *A. picis* IMMIB TAR-3T, *A. brasilense* sp7. Όλες οι θέσεις που περιείχαν κενά ή απουσίαζαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν (επιλογή πλήρους απάλειψης). Σύνολο 1297 βάσεις. Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007).

### 3.1.6 Ευθυγράμμιση των 7 ακολουθιών 16S rRNA *Pseudomonas*









### 3.1.7 Πίνακας αποστάσεων των 7 ακολουθιών

Percent Identity									
	1	2	3	4	5	6	7		
1	■	97.4	97.3	97.0	99.9	97.1	97.5	1	16S 50
2	2.7	■	99.9	95.1	97.4	95.1	96.2	2	16S 57
3	2.8	0.1	■	95.1	97.3	95.1	96.0	3	16S 65
4	3.0	5.0	5.1	■	97.1	95.4	95.4	4	P.balearicaU26418
5	0.1	2.7	2.7	2.9	■	97.1	97.5	5	P.stutzeriCCUG11256 U26262
6	2.9	5.0	5.1	4.7	2.9	■	95.8	6	PaeruginosaLMG1242T_Z76651
7	2.5	3.9	4.0	4.7	2.5	4.2	■	7	PputidaATCC17642_AF094744
	1	2	3	4	5	6	7		

Πιν. 3.4 Ο πίνακας των αποστάσεων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα πολλαπλής ευθυγράμμισης Clustal W του λογισμικού Lasergene v7.0

Από τη μοριακή ανάλυση των 3 *Pseudomonas* νουκλεοτιδικών αλληλουχιών 16S rRNA προέκυψαν τα εξής στατιστικά στοιχεία για τη συχνότητα των νουκλεοτιδίων:

Στέλεχος	T(U)	C	A	G	G+C	Σύνολο
<b>Gr50</b>	20.9	22.3	25.4	31.4	53.7	1498
<b>Gr57</b>	20.5	22.6	25.1	31.8	54.4	1498
<b>Gr65</b>	20.5	22.6	25.2	31.6	54.2	1498

Πίν. 3.5 Συχνότητα νουκλεοτιδίων και του αθροίσματος G+C στην κάθε μία αλληλουχία 16S rRNA. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, software version 4.0) (Tamura *et al.*, 2007).

### 3.1.8 Αποτελέσματα BLAST και συχρότητα νουκλεοτιδίων

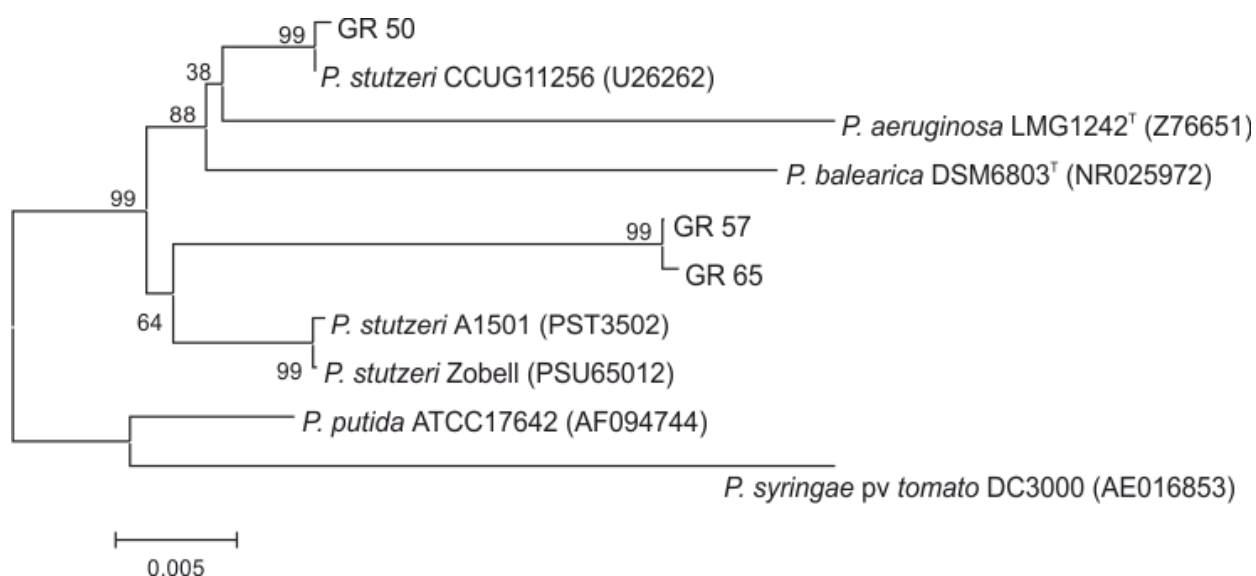
Πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αλληλουχιών με τα στοιχεία των βάσεων δεδομένων από διαδικτυακό πρόγραμμα BLAST του National Center of Biotechnology Information (NCBI).

Από τη σύγκριση με τα στοιχεία των βάσεων δεδομένων από το διαδικτυακό πρόγραμμα BLAST των 3 *Pseudomonas* υποκλώνων 16S rRNA προέκυψαν τα εξής:

Στέλεχος	Υποκλώνος	Αποτέλεσμα BLAST	Max identity	Query Coverage
Gr50	pGemT.16S.50	HM749063.1 ; <i>Pseudomonas sp. sampath10</i>	100 %	99 %
Gr57	pGemT.16S.57	DQ124297.1 ; <i>Pseudomonas sp. JQR2-5</i>	99 %	97 %
Gr65	pGemT.16S.65	DQ124297.1 ; <i>Pseudomonas sp. JQR2-5</i> DQ059546.1 ; <i>Pseudomonas stutzeri</i> strain SA1	99 %	97 %

Πιν. 3.6 Αποτελέσματα σύγκρισης με τη βάση δεδομένων BLAST των 3 *Pseudomonas* υποκλώνων 16S rRNA

### 3.1.9 Φυλογenetικό δέντρο των 10 ακολουθιών 16S rRNA *Pseudomonas*



**Εικ. 3.3** Εξελικτικές σχέσεις των υπό μελέτη στελεχών και στελεχών αναφοράς βάσει τμήματος του γονιδίου 16S rRNA. Η απεικόνιση της εξελικτικής ιστορίας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Παρουσιάζεται το δέντρο ομολογίας 1000 αντιγράφων bootstrap προκειμένου να απεικονισθεί η εξελικτική ιστορία των υπό ανάλυση taxa. Οι κλάδοι που αντιστοιχούν σε κατανομές οι οποίες αναπαράχθηκαν σε λιγότερα από 50% των αντιγράφων bootstrap έχουν συγχωνευθεί. Δίπλα στους κλάδους παρουσιάζεται το ποσοστό των αντιγράφων των δέντρων στα οποία τα συσχετιζόμενα taxa συγκροτούν μία ομάδα (Felsenstein, 1985). Το δέντρο είναι σχεδιασμένο σε κλίμακα, με τους κλάδους να έχουν τις ίδιες μονάδες με αυτές των αποστάσεων που χρησιμοποιήθηκαν για να προκύψει το φυλογenetικό δέντρο. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al.*, 2004) και οι μονάδες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό υποκαταστάσεων ανά θέση. Ως outgroup χρησιμοποιήθηκε το βακτήριο *P. syringae* pv *tomato* DC3000. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν ως ακολουθίες αναφοράς τυπικά στελέχη, *Pseudomonas stutzeri* CCUG11256, *P. aeruginosa* LMG1242<sup>T</sup>, *P. balearica* DSM6803<sup>T</sup>, *P. Pseudomonas stutzeri* A1501, *Pseudomonas stutzeri* Zobell, *P. putida* ATCC17642. Όλες οι θέσεις που περιείχαν κενά ή απουσίαζαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν (επιλογή πλήρους απάλειψης). Σύνολο 1453 βάσεις. Όλες οι φυλογenetικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007).

### 3.2. Μοριακή ανάλυση γονιδίου *nifH*

Στο γονιδίωμα όλων των αζωοδεσμευτικών οργανισμών εμπεριέχεται το ίδιο οπερόνιο (*nifHDK*) στο οποίο το γονίδιο *nifH* είναι υπεύθυνο για την αναγωγή της νιτρογενάσης. Λόγω του ότι το οπερόνιο αυτό είναι ιδιαίτερα συντηρημένο μεταξύ των αζωοδεσμευτικών οργανισμών μπορεί εύκολα να προκύψει το ερώτημα κατά πόσο απεικονίζεται η καταγωγή των βακτηρίων που το κατέχουν, μέσα από την φυλογένεια των γονιδίων *nif* (Young, 1992).

Στο παρελθόν έχουν υλοποιηθεί πάρα πολλές συγκριτικές έρευνες μεταξύ των γονιδίων 16S rRNA και *nifH* για να καταφέρουν να διαπιστώσουν αν υπάρχει συμφωνία ανάμεσα στο φυλογενετικό δέντρο που προκύπτει από το *nifH* με το αντίστοιχο του 16S rRNA. Η χρησιμότητα των ερευνών αυτών έγκυται στην ανάγκη για μοριακή ανάλυση περισσότερων του ενός γονιδίου παρά την καθολική αποδοχή του γονιδίου 16S rRNA.

Τα αποτελέσματα σχεδόν όλων των ερευνών επιβεβαιώνουν ότι πολλά από τα χαρακτηριστικά του φυλογενετικού δέντρου του *nifH* συμφωνούν απόλυτα με τη φυλογένεια του 16S rRNA (Young, 1992). Επιτρέποντας έτσι μια ‘χονδρική’ εκτίμηση της ταξινόμησης των αζωοδεσμευτικών βακτηρίων όπως επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την διερεύνηση της ποικιλότητας των βακτηρίων που δεσμεύουν άζωτο (Poly *et al.*, 2001). Τα αποτελέσματα που προκύπτουν και από τη μοριακή ανάλυση των γονιδίων *nifK* και *nifD* είναι αντίστοιχα και ενδέχεται να αποτελούν αξιόπιστους φυλογενετικούς δείκτες αν και δεν προκύπτει απόλυτη συμφωνία της μεταξύ τους φυλογένειας (Zehr *et al.*, 2003, Schmid & Hartmann, 2007). Η υψηλή ομολογία η οποία έχει παρατηρηθεί μεταξύ των ακολουθιών *nifH* και 16S rRNA, στις αντίστοιχες βάσεις δεδομένων, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η νιτρογενάση παρουσιάστηκε σε έναν από τους αρχικούς προγόνους, νωρίς δηλαδή στην εξέλιξη. Έχουν διατυπωθεί πολλά σενάρια για την εξελικτική ιστορία του *nifH* αλλά τα επικρατέστερα είναι κυρίως δύο (Raymond *et al.*, 2004).

Το πρώτο σενάριο προέλευσης της ιδιότητας της αζωοδέσμευσης στην εμφάνισή της για πρώτη φορά στα μεθανογόνα βακτήρια (αρχαία) το κυρίαρχο φαινόμενο θα ήταν η οριζόντια μεταφορά γονιδίων. Το σενάριο αυτό μπορεί να επιβεβαιωθεί και από τον κυρίαρχο ρόλο στη βιόσφαιρα, των μεθανογόνων βακτηρίων που είχαν κάποια στιγμή της ιστορίας (Raymond *et al.*, 2004). Το δεύτερο

σενάριο αφορά την παρουσία της αζωτοδέσμευσης στον τελευταίο κοινό πρόγονο όλων των μορφών ζωής. Αυτή η υπόθεση έχει σαν βασική προϋπόθεση την απώλεια γονιδίων έτσι ώστε η απουσία των γονιδίων *nif* από τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και από ολόκληρα φύλα προκαρυωτικών να μπορεί να δικαιολογηθεί. Σε αυτήν τη διαδικασία λαμβάνει χώρα και η οριζόντια μεταφορά γονιδίων όπου προήλθαν από τα αρχαία (*methanosarcina*) και κατόπιν με οριζόντια μεταφορά διαδόθηκαν σε άλλα γένη ευβακτηρίων (Raymond *et al.*, 2004, Kechris *et al.*, 2006).

### 3.2.1 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *nifH*

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί μοριακή ανάλυση του γονιδίου *nifH* πραγματοποιήθηκε ενίσχυση τμήματος ~360 βάσεων (41% του συνολικού *nifH* γονιδίου) με χρήση της τεχνικής PCR.

Για την ενίσχυση του τμήματος *nifH* χρησιμοποιήθηκαν εκφυλισμένοι εκκινητές σύμφωνα με τους Poly και συνεργάτες (2001) και είναι οι εξής:

Forward	PolF	5'- TGC GAY CCS AAR GCB GAC TC -3'
Reverse	PolR	5'- ATS GCC ATC ATY TCR CCG GA -3'

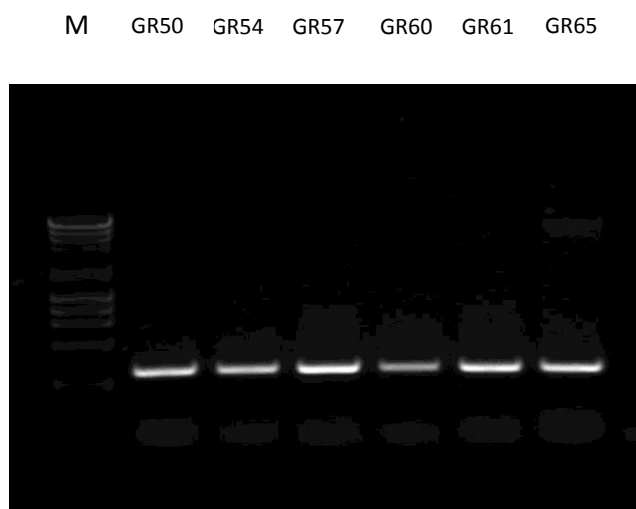
**Y = C/T, S = G/C, R = A/G, B = C/G/T**

(Ονοματολογία από International Union of Pure and Applied Chemistry Conventions)

Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR ήταν:

<b>Αρχική αποδιάταξη</b>	94°C για 4 λεπτά	} 35 κύκλοι
<b>Αποδιάταξη</b>	94°C για 1 λεπτό	
<b>Υβριδισμός εκκινητών</b>	55°C για 1 λεπτό	
<b>Επιμήκυνση</b>	72°C για 2 λεπτά	
<b>Τελική επιμήκυνση</b>	72°C για 5-10 λεπτά	

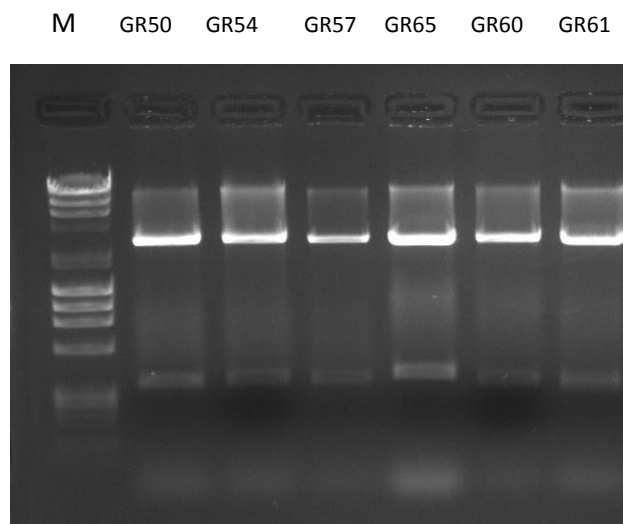
Τα προϊόντα της PCR τα οποία προέκυψαν υποκλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα PGEM-T easy (Promega) και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τους (sequencing).



---

**Εικ. 3.4** Ενίσχυση PCR τμήματος του γονιδίου *nifH* ~360 βάσεων στο ολικό γονιδιωματικό DNA των δειγμάτων GR50, GR54, GR57, GR60, GR61, GR65 (M= μάρτυρας μοριακών μεγεθών λ DNA *Hind* III και φX174 DNA *Hae* III)

---



---

**Εικ. 3.5** Πέψεις με το ενζυμο *Eco*RI των πλασμιδίων από τους PGEM-T κλώνους *nifH* GR50, GR54, GR57, GR60, GR61, GR65 (M= μάρτυρας μοριακών μεγεθών λ DNA *Hind* III και φX174 DNA *Hae* III)

---

### 3.2.2 Ευθυγράμμιση των 8 ακολουθιών *NifH* *Azospirillum*



Πραγματοποιήθηκε η ευθυγράμμιση των υποκλώνων και ακολουθιών διαθέσιμων στο διαδίκτυο (βλ. παράρτημα για Accession Number) με το πρόγραμμα πολλαπλής ευθυγράμμισης Clustal W του λογισμικού Lasergene v7.0



### 3.2.3 Πίνακας αποστάσεων των 8 ακολουθιών

Percent Identity										
	1	2	3	4	5	6	7	8		
1	■	97.8	93.9	94.2	98.3	98.1	95.5	93.0	1	H 52
2	2.3	■	94.4	94.7	98.3	98.3	95.2	93.3	2	H 54
3	6.4	5.8	■	99.7	93.3	93.6	98.0	98.6	3	H 60
4	6.1	5.5	0.3	■	93.6	93.9	98.0	98.3	4	H 61
5	1.7	1.7	7.0	6.7	■	97.8	94.7	92.8	5	H 66
6	2.0	1.7	6.7	6.4	2.3	■	94.8	92.2	6	AbrasilenseX51500
7	4.6	4.9	2.0	2.0	5.6	5.3	■	96.9	7	Alipoferum B2_DQ78733.1
8	6.7	6.4	0.8	1.1	7.1	7.6	2.6	■	8	AzæaeN7_DQ682472
	1	2	3	4	5	6	7	8		

Πίν.3.7 Ο πίνακας των αποστάσεων των 8 ακολουθιών πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα πολλαπλής ευθυγράμμισης Clustal W του λογισμικού Lasergene v7.0

Από τη μοριακή ανάλυση των 5 *Azospirillum* νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *NifH* προέκυψαν τα εξής στατιστικά στοιχεία για τη συχνότητα των νουκλεοτιδίων:

Στέλεχος	T(U)	C	A	G	G+C	Σύνολο
<b>Gr52</b>	16.4	30.6	18.9	34.0	64.6	359
<b>Gr54</b>	16.4	31.8	19.2	32.6	64.4	359
<b>Gr60</b>	16.4	31.5	20.1	32.0	63.5	359
<b>Gr61</b>	16.4	31.2	20.1	32.3	63.5	359
<b>Gr66</b>	16.4	31.2	18.7	33.7	64.9	359

Πίν. 3.8 Συχνότητα νουκλεοτιδίων και του αθροίσματος G+C στην κάθε μία αλληλουχία 16S rRNA. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, software version 4.0) (Tamura *et al.*, 2007).

### 3.2.4 Αποτελέσματα BLAST και συχρότητα νουκλεοτιδίων

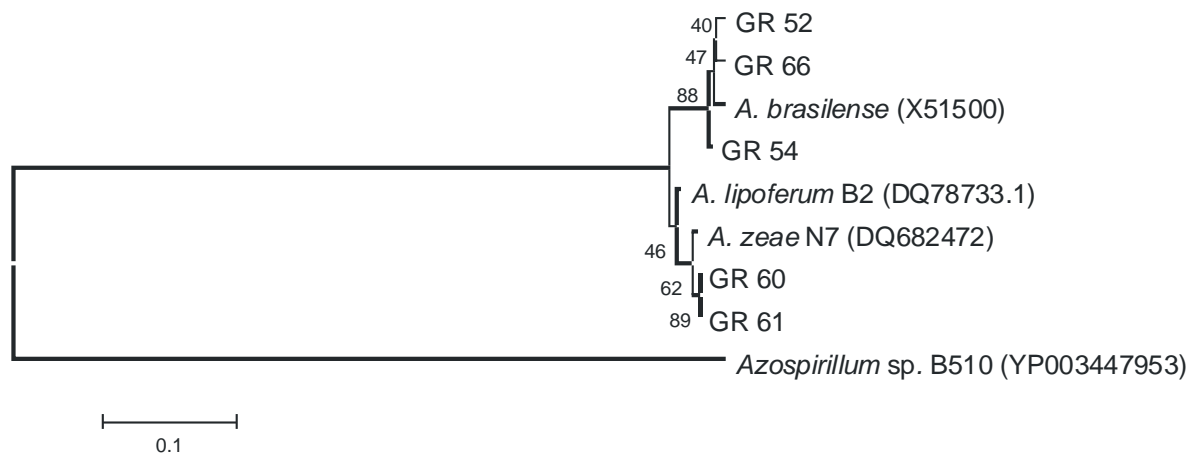
Πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αλληλουχιών με τα στοιχεία των βάσεων δεδομένων από διαδικτυακό πρόγραμμα BLAST του National Center of Biotechnology Information (NCBI).

Από τη σύγκριση με τα στοιχεία των βάσεων δεδομένων από το διαδικτυακό πρόγραμμα BLAST των 5 *Azospirillum* υποκλώνων *NifH* προέκυψαν τα εξής:

Στέλεχος	Υποκλώνος	Αποτέλεσμα BLAST	Max identity	Query Coverage
Gr52	pGemT.nifH.52	X51500.1 ; <i>Azospirillum brasilense</i>	99%	98%
Gr54	pGemT.nifH.54	X51500.1 ; <i>Azospirillum brasilense</i>	99%	98%
Gr60	pGemT.nifH.60	DQ682472.1 ; <i>Azospirillum zea</i> strain N7	100%	98%
Gr61	pGemT.nifH.61	DQ682472.1 ; <i>Azospirillum zea</i> strain N7	99%	98%
Gr66	pGemT.nifH.66	X51500.1 ; <i>Azospirillum brasilense</i>	99%	98%

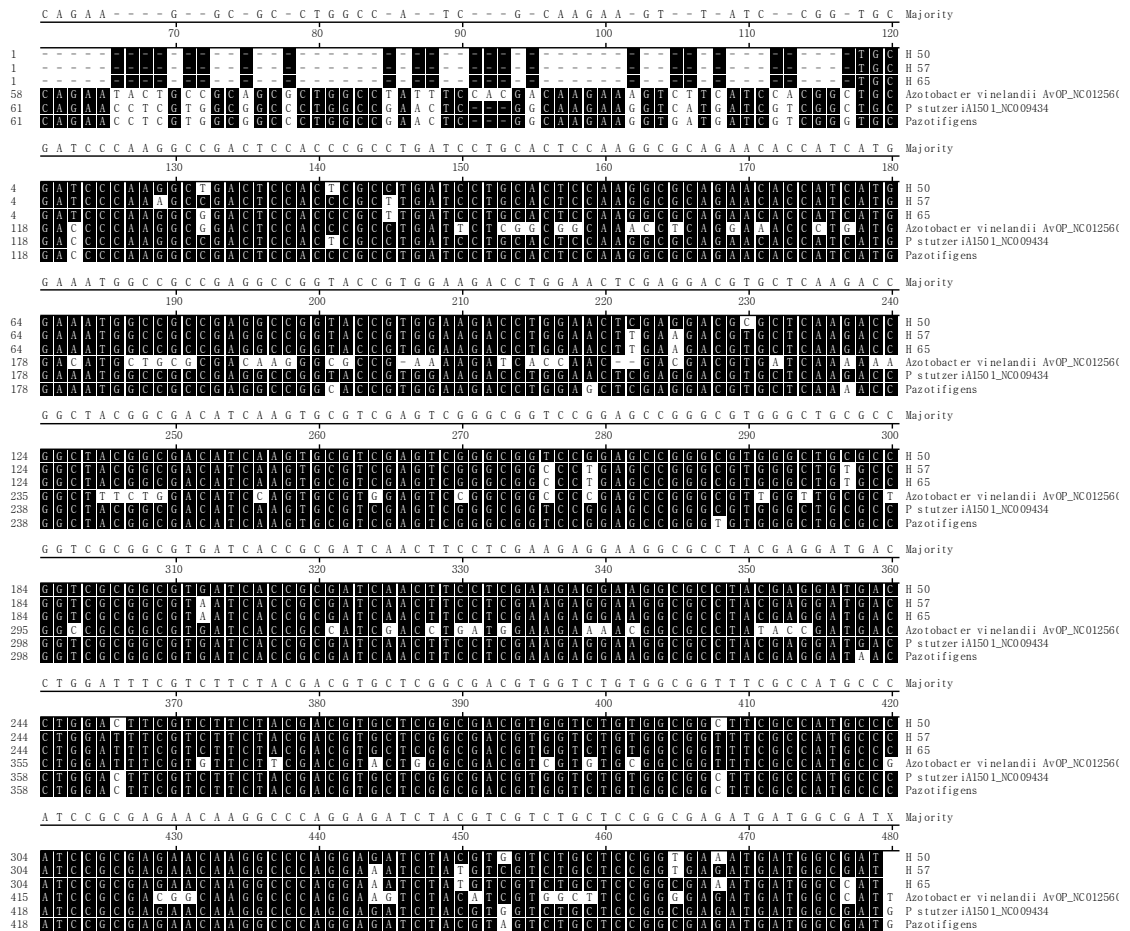
Πίν. 3.9 Αποτελέσματα σύγκρισης με τη βάση δεδομένων BLAST των 5 *Azospirillum* υποκλώνων *NifH*

### 3.2.5 Το φυλογενετικό δέντρο των 9 ακολουθιών *nifH* *azospirillum*



**Εικ. 3.6** Εξελικτικές σχέσεις στελεχών *Azospirillum* και στελεχών αναφοράς βάσει νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου *nifH*. Η απεικόνιση της εξελικτικής ιστορίας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Παρουσιάζεται το δέντρο ομολογίας 1000 αντιγράφων bootstrap προκειμένου να απεικονισθεί η εξελικτική ιστορία των υπό ανάλυση taxa. Οι κλάδοι που αντιστοιχούν σε κατανομές οι οποίες αναπαράχθηκαν σε λιγότερα από 50% των αντιγράφων bootstrap έχουν συγχωνευθεί. Δίπλα στους κλάδους παρουσιάζεται το ποσοστό των αντιγράφων των δέντρων στα οποία τα συσχετιζόμενα taxa συγκροτούν μία ομάδα (Felsenstein, 1985). Το δέντρο είναι σχεδιασμένο σε κλίμακα, με τους κλάδους να έχουν τις ίδιες μονάδες με αυτές των αποστάσεων που χρησιμοποιήθηκαν για να προκύψει το φυλογενετικό δέντρο. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al.*, 2004) και οι μονάδες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό υποκαταστάσεων ανά θέση. Ως outgroup χρησιμοποιήθηκαν το στέλεχος *Azospirillum* sp. B510. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν ως ακολουθίες αναφοράς τυπικά στελέχη *A. brasilense*, *A. lipoferum* B2, *A. zea* N7. Όλες οι θέσεις που περιείχαν κενά ή απουσίαζαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν (επιλογή πλήρους απάλειψης). Σύνολο 350 βάσεις. Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007).

### 3.2 6 Ευθυγράμμιση των 6 ακολουθιών *NifH Pseudomonas*



Πραγματοποιήθηκε η ευθυγράμμιση των υποκλώνων και ακολουθιών διαθέσιμων στο διαδίκτυο (βλ. παράρτημα για Accession Number) με το πρόγραμμα πολλαπλής ευθυγράμμισης Clustal W του λογισμικού Lasergene v7.0

### 3.2.7 Πίνακας αποστάσεων των 6 ακολουθιών

Percent Identity								
	1	2	3	4	5	6		
1	■	95.3	95.3	74.7	98.6	96.7	1	H 50
2	4.9	■	98.6	75.5	95.6	94.5	2	H 57
3	4.9	1.4	■	76.0	95.3	94.2	3	H 65
4	31.0	29.7	28.9	■	71.2	70.9	4	Azotobacter vinelandii AvOP_NC012560
5	1.4	4.6	4.9	36.5	■	97.3	5	P stutzeriA1501_NC009434
6	3.4	5.8	6.1	36.9	2.8	■	6	Pazotifigens
	1	2	3	4	5	6		

Πίν. 3.10 Ο πίνακας των αποστάσεων των 6 ακολουθιών πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα πολλαπλής ευθυγράμμισης Clustal W του λογισμικού Lasergene v7.0

Από τη μοριακή ανάλυση των 3 *Pseudomonas* νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *NifH* προέκυψαν τα εξής στατιστικά στοιχεία για τη συχνότητα των νουκλεοτιδίων:

Στέλεχος	T(U)	C	A	G	G+C	Σύνολο
<b>Gr50</b>	16.9	30.7	19.6	32.9	63.6	362
<b>Gr57</b>	18.2	29.8	20.4	31.5	61.3	362
<b>Gr65</b>	18.0	30.1	20.4	31.5	61.6	362

Πίν. 3.11 Συχνότητα νουκλεοτιδίων και του αθροίσματος G+C στην κάθε μία αλληλουχία *NifH*. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, software version 4.0) (Tamura *et al.*, 2007).

### 3.2.8 Αποτελέσματα BLAST και συχρότητα νουκλεοτιδίων

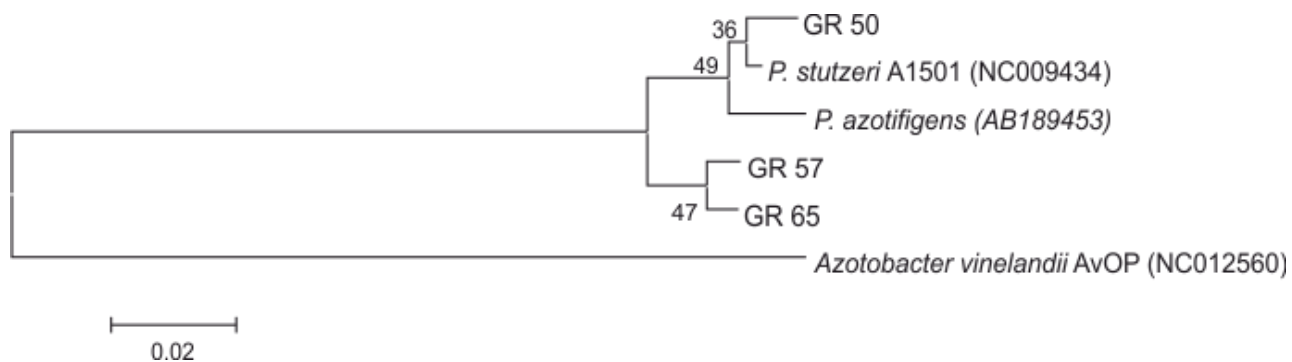
Πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αλληλουχιών με τα στοιχεία των βάσεων δεδομένων από διαδικτυακό πρόγραμμα BLAST του National Center of Biotechnology Information (NCBI).

Από τη σύγκριση με τα στοιχεία των βάσεων δεδομένων από το διαδικτυακό πρόγραμμα BLAST των 3 *Pseudomonas* υποκλώνων *nifH* προέκυψαν τα εξής:

Στέλεχος	Υποκλώνος	Αποτέλεσμα BLAST	Max identity	Query Coverage
Gr50	pGemT.nifH.50	CP000304.1 ; <i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	100%	98%
Gr57	pGemT.nifH.57	CP000304.1 ; <i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501 X96609.1 ; <i>A.faecalis</i>	100%	95%
Gr65	pGemT.nifH.65	CP000304.1 ; <i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501 AB571541.1 ; <i>Pseudomonas sp.</i> T16(2010)	99%	95%

Πίν. 3.12 Αποτελέσματα σύγκρισης με τη βάση δεδομένων BLAST των 3 *Pseudomonas* υποκλώνων *nifH*

### 3.2.9 Το φυλογενετικό δέντρο των 6 ακολουθιών *nifH* *Pseudomonas*



**Εικ. 3.7** Εξελικτικές σχέσεις στελεχών *Pseudomonas* και στελεχών αναφοράς βάσει νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου *nifH*. Η απεικόνιση της εξελικτικής ιστορίας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Παρουσιάζεται το δέντρο ομολογίας 1000 αντιγράφων bootstrap προκειμένου να απεικονισθεί η εξελικτική ιστορία των υπό ανάλυση taxa. Οι κλάδοι που αντιστοιχούν σε κατανομές οι οποίες αναπαράχθηκαν σε λιγότερα από 50% των αντιγράφων bootstrap έχουν συγχωνευθεί. Δίπλα στους κλάδους παρουσιάζεται το ποσοστό των αντιγράφων των δέντρων στα οποία τα συσχετιζόμενα taxa συγκροτούν μία ομάδα (Felsenstein, 1985). Το δέντρο είναι σχεδιασμένο σε κλίμακα, με τους κλάδους να έχουν τις ίδιες μονάδες με αυτές των αποστάσεων που χρησιμοποιήθηκαν για να προκύψει το φυλογενετικό δέντρο. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al.*, 2004) και οι μονάδες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό υποκαταστάσεων ανά θέση. Ως outgroup χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *Azotobacter vinelandii* AvOP. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν ως ακολουθίες αναφοράς τυπικά στελέχη *P. stutzeri* A1501, *P. azotifigens*. Όλες οι θέσεις που περιείχαν κενά ή απουσίαζαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν (επιλογή πλήρους απάλειψης). Σύνολο 359 βάσεις. Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007).

### 3.3 Μοριακή ανάλυση γονιδίου *ipdC*

Τον ρυθμιστικό ρόλο στις βασικές λειτουργίες των φυτών όπως η επιμήκυνση, η κυτταρική διαίρεση, ο τροπισμός, η διαφοροποίηση κ.ά τον έχουν οι αυξίνες. Έχει αποδειχθεί και πειραματικά ότι οι αυξίνες παράγονται και από τα ριζοβακτήρια με την ευεργετική τους επίδραση να αποδεικνύεται πιο σημαντική ακόμα και από αυτήν της αζωτοδέσμευσης (Malhotra & Srivastava, 2008). Πολλές φυτοορμόνες έχουν ανιχνευθεί όπως γιβερελίνες και κυτοκυνίνες την σημαντικότερη όμως ποσοτικά να αποτελεί η αυξίνη ινδολοξικό οξύ (IAA) (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

Έχει παρατηρηθεί μεγάλη ομοιότητα μεταξύ των βιοσυνθετικών μονοπατιών ινδολοξικού οξέος σε φυτά και βακτήρια. Στα βακτήρια η κύρια πρόδρομος ένωση για την παραγωγή IAA είναι η τρυπτοφάνη. Έχουν παρατηρηθεί αρκετοί τρόποι παραγωγής της με τον πιο σημαντικό από αυτούς να είναι το μονοπάτι του ινδολοπυρουβικού οξέος (IPyA) το οποίο έχει εντοπιστεί και σε ορισμένα παθογόνα βακτήρια αλλά του οποίου τα γονίδια/ένζυμα κλειδιά δεν είναι ακόμα όλα γνωστά. Σε αυτό το μονοπάτι το ινδολοπυρουβικό οξύ αποκαρβοξυλιώνεται δίνοντας ινδολοακεταλδεΐδη, η οποία αποτελεί την πρόδρομο ένωση του IAA. Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την αποκαρβοξυλίωση του IPyA είναι το *ipdC*. Το *ipdC* έχει απομονωθεί από πολλά βακτήρια όπως το *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas putida* κ.ά. Έχει αποδειχθεί η σημασία του γονιδίου αυτού στην παραγωγή IAA από το γεγονός ότι σε έρευνες κατά την απενεργοποίηση του γονιδίου *ipdC* σε στελέχη *A. brasilense* η παραγωγή IAA παρατηρήθηκε μείωση ως και 90%. Η συνεισφορά του IAA στην επαγωγή της ανάπτυξης του ριζικού συστήματος των φυτών είναι ευρέως διαπιστωμένη και, πιθανώς, είναι σημαντικότερη από αυτήν της αζωτοδέσμευσης (Spraeren *et al.*, 2007). Έτσι χρήζουν ιδιαίτερης ανάγκης η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός των γονιδίων που εμπλέκονται στα μονοπάτια βιοσύνθεσης του IAA.



### 3.3.1 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *ipdC*

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί μοριακή ανάλυση του γονιδίου *ipdC* πραγματοποιήθηκε ενίσχυση τμήματος ~590 βάσεων (78% του συνολικού *ipdC* γονιδίου) με χρήση της τεχνικής PCR.

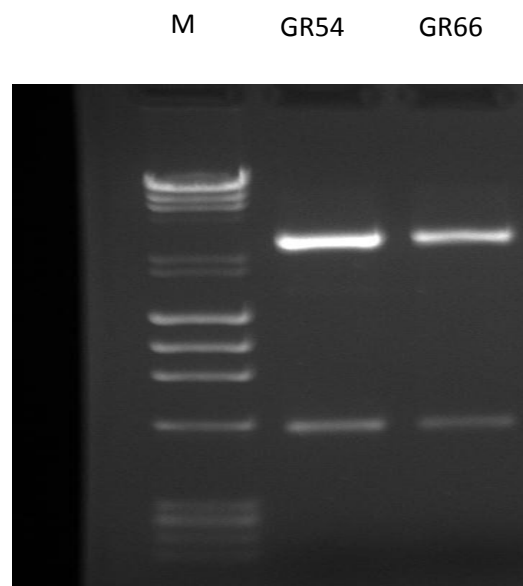
Για την ενίσχυση του τμήματος *ipdC* χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εκκινητές

Forward	<i>ipdC2f</i>	5'- TCCCAGCGCAAGATCGACCTG -3'
Reverse	<i>ipdC2r</i>	5'- CTTAGCCGGAAGTTGCTGGACCTGC -3'

Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR ήταν:

<b>Αρχική αποδιάταξη</b>	94°C για 4 λεπτά	} 35 κύκλοι
<b>Αποδιάταξη</b>	94°C για 1 λεπτό	
<b>Υβριδισμός εκκινητών</b>	66°C για 1 λεπτό	
<b>Επιμήκυνση</b>	72°C για 1,5 λεπτά	
<b>Τελική επιμήκυνση</b>	72°C για 5-10 λεπτά	

Τα προϊόντα της PCR τα οποία προέκυψαν υποκλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα PGEM-T easy (Promega) και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τους (sequencing).



---

**Εικ. 3.8** Πέψεις με το ενζυμο *EcoRI* των πλασμιδίων από τους PGEM-T κλώνους *ipdC*, GR54, GR66 (M= μάρτυρας μοριακών μεγεθών λ DNA *Hind* III και φX174 DNA *Hae* III)

---

### 3.3.2 Ευθυγράμμιση των 5 ακολουθιών *ipdC* *Azospirillum*



Πραγματοποιήθηκε η ευθυγράμμιση των υποκλώνων και ακολουθιών διαθέσιμων στο διαδίκτυο (βλ. παράρτημα για Accession Number) με το πρόγραμμα πολλαπλής ευθυγράμμισης Clustal W του λογισμικού Lasergene v7.0

### 3.3.3 Πίνακας αποστάσεων των 5 ακολουθιών

Percent Identity						
	1	2	3	4	5	
1	█	97.7	96.7	96.8	98.4	1
2	2.3	█	96.8	96.8	97.5	2
3	3.4	3.2	█	95.0	95.5	3
4	3.2	3.2	5.2	█	95.5	4
5	1.6	2.5	4.7	4.6	█	5
	1	2	3	4	5	

C 54  
 C 66  
 A brasilense sp7\_X88853  
 Alipoferum spFS\_AB052841  
 A brasilense sp245

Πίν. 3.13 Ο πίνακας των αποστάσεων των 5 ακολουθιών πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα πολλαπλής ευθυγράμμισης Clustal W του λογισμικού Lasergene v7.0

Από τη μοριακή ανάλυση των 2 *Azospirillum* νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *ipdC* προέκυψαν τα εξής στατιστικά στοιχεία για τη συχνότητα των νουκλεοτιδίων:

Στέλεχος	T(U)	C	A	G	G+C	Σύνολο
<b>Gr54</b>	13.9	35.9	15.7	34.5	70.4	568
<b>Gr66</b>	14.4	35.2	16.0	34.3	69.5	568

Πίν. 3.14 Συχνότητα νουκλεοτιδίων και του αθροίσματος G+C στην κάθε μία αλληλουχία *ipdC*. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, software version 4.0) (Tamura *et al.*, 2007).

### 3.3.4 Αποτελέσματα BLAST και συχρότητα νουκλεοτιδίων

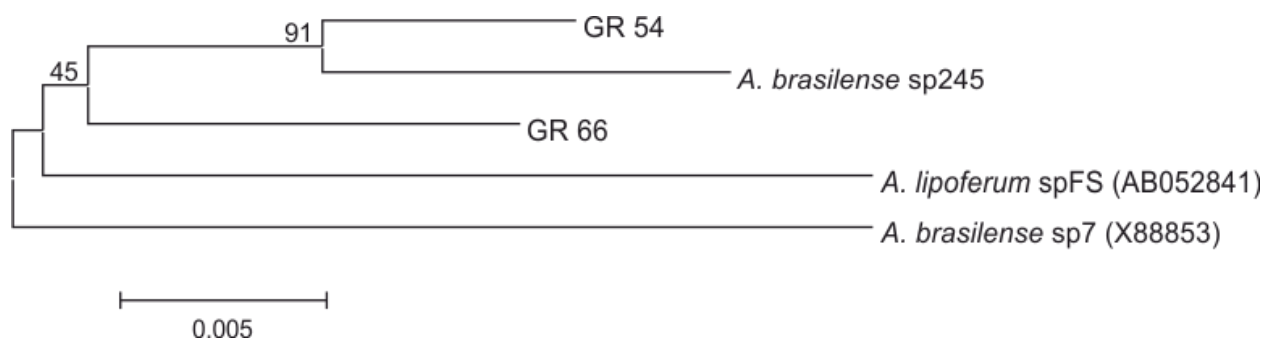
Πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αλληλουχιών με τα στοιχεία των βάσεων δεδομένων από διαδικτυακό πρόγραμμα BLAST του National Center of Biotechnology Information (NCBI).

Από τη σύγκριση με τα στοιχεία των βάσεων δεδομένων από το διαδικτυακό πρόγραμμα BLAST των 2 *Azospirillum* υποκλώνων *ipdC* προέκυψαν τα εξής:

Στέλεχος	Υποκλώνος	Αποτέλεσμα BLAST	Max identity	Query Coverage
Gr54	pGemT.ipdC.54	L26240.1 ; <i>Azospirillum brasilense</i>	100%	98%
Gr66	pGemT.ipdC.66	X88853.1 ; <i>Azospirillum brasilense</i>	100%	96%

Πίν. 3.15 Αποτελέσματα σύγκρισης με τη βάση δεδομένων BLAST των 2 *Azospirillum* υποκλώνων *ipdC*

### 3.3.5 Το φυλογενετικό δέντρο των 5 ακολουθιών *ipdC* *Azospirillum*



**Εικ. 3.9** Εξελικτικές σχέσεις στελεχών *Azospirillum* και στελεχών αναφοράς βάσει νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου *ipdC*. Η απεικόνιση της εξελικτικής ιστορίας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Παρουσιάζεται το δέντρο ομολογίας 1000 αντιγράφων bootstrap προκειμένου να απεικονισθεί η εξελικτική ιστορία των υπό ανάλυση taxa. Οι κλάδοι που αντιστοιχούν σε κατανομές οι οποίες αναπαράχθηκαν σε λιγότερα από 50% των αντιγράφων bootstrap έχουν συγχωνευθεί. Δίπλα στους κλάδους παρουσιάζεται το ποσοστό των αντιγράφων των δέντρων στα οποία τα συσχετιζόμενα taxa συγκροτούν μία ομάδα (Felsenstein, 1985). Το δέντρο είναι σχεδιασμένο σε κλίμακα, με τους κλάδους να έχουν τις ίδιες μονάδες με αυτές των αποστάσεων που χρησιμοποιήθηκαν για να προκύψει το φυλογενετικό δέντρο. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al.*, 2004) και οι μονάδες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό υποκαταστάσεων ανά θέση. Ως outgroup χρησιμοποιήθηκαν το στέλεχος *A. brasilense* sp7. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν ως ακολουθίες αναφοράς τυπικά στελέχη *A. lipoferum* spFS, *A. brasilense* sp245. Όλες οι θέσεις που περιείχαν κενά ή απουσίαζαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν (επιλογή πλήρους απάλειψης). Σύνολο 568 βάσεις. Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007).

### 3.4 Μοριακή ανάλυση γονιδίου *dnaK*

Σε όλα τα βακτηρία που το γονιδιώματά τους έχει πλήρως αλληλουχηθεί εντοπίζεται η οικογένεια των πρωτεϊνών Hsp70/DnaK. Ο βασικός ρόλος των πρωτεϊνών αυτών είναι η λειτουργία τους ως μόρια σαπερόνης (chaperone) σε διαδικασίες δίπλωσης πρωτεϊνών και άλλες κυτταρικές λειτουργίες. Το γονίδιο, που κωδικοποιεί για αυτήν την πρωτεΐνη (*dnaK*), μεταξύ των οργανισμών που το διαθέτουν παρατηρείται ιδιαίτερα συντηρημένο. Μεταξύ Gram αρνητικών και Gram θετικών βακτηρίων παρατηρείται μία εμφανής διαφορά στην αλληλουχία του *dnaK*. Σε όλα τα Gram αρνητικά βακτήρια εντοπίζεται μία ομόλογη περιοχή 21-23 αμινοξέων αλλά είναι απύσα σε όλα τα Gram θετικά. Ύστερα από μελέτες πάνω στο γεγονός αυτό φτάσαμε στο συμπέρασμα να θεωρείτε πιο πιθανό ότι κατά την εξέλιξη η περιοχή αυτή να έχει προστεθεί στα Gram αρνητικά βακτήρια παρά να απαλειφθεί από τα Gram θετικά (Gupta, 2001).

Μεσα στην ίδια αυτή περιοχή έχει εντοπιστεί μία μικρή περιοχή δύο αμινοξέων η οποία παρατηρείται μόνο στα Πρωτεοβακτήρια και η οποία είναι πολύ πιθανό να αναγνωριστεί σαν ένα εργαλείο για την μοριακή ταυτοποίηση βακτηρίων ως Πρωτεοβακτήρια. Τέλος, έχει εξακριβωθεί και μία τρίτη ακολουθία που αποτελείται από τέσσερα αμινοξέα και η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαφοροποιητικό εργαλείο στη μοριακή ταξινόμηση μεταξύ των Πρωτεοβακτηρίων. Πιο Συγκεκριμένα, η περιοχή αυτή εντοπίζεται μόνο σε β- και γ-Πρωτεοβακτήρια. Και οι δύο αυτές περιοχές υποδηλώνουν εξελικτικά φαινόμενα πρόσθεσης των συγκεκριμένων ακολουθιών σε κοινό πρόγονο των Πρωτεοβακτηρίων –για την πρώτη περίπτωση- και κοινό πρόγονο των β- και γ-Πρωτεοβακτηρίων –για τη δεύτερη περίπτωση (Gupta, 2000).

### 3.4.1 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *dnaK*

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί μοριακή ανάλυση του γονιδίου *dnaK* πραγματοποιήθηκε ενίσχυση τμήματος ~327 βάσεων με χρήση της τεχνικής PCR 7 υπό μελέτη υποκλώνων καθώς και των δύο στελεχών αναφοράς: *A. brasilense* LMG 13127<sup>T</sup> και *A. lipoferum* LMG 13128<sup>T</sup> της εταιρείας BCCM<sup>TM</sup>/LMG.

Για την ενίσχυση του τμήματος *dnaK* χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εκκινητές σύμφωνα με τους (Stepkowski *et al*, 2003):

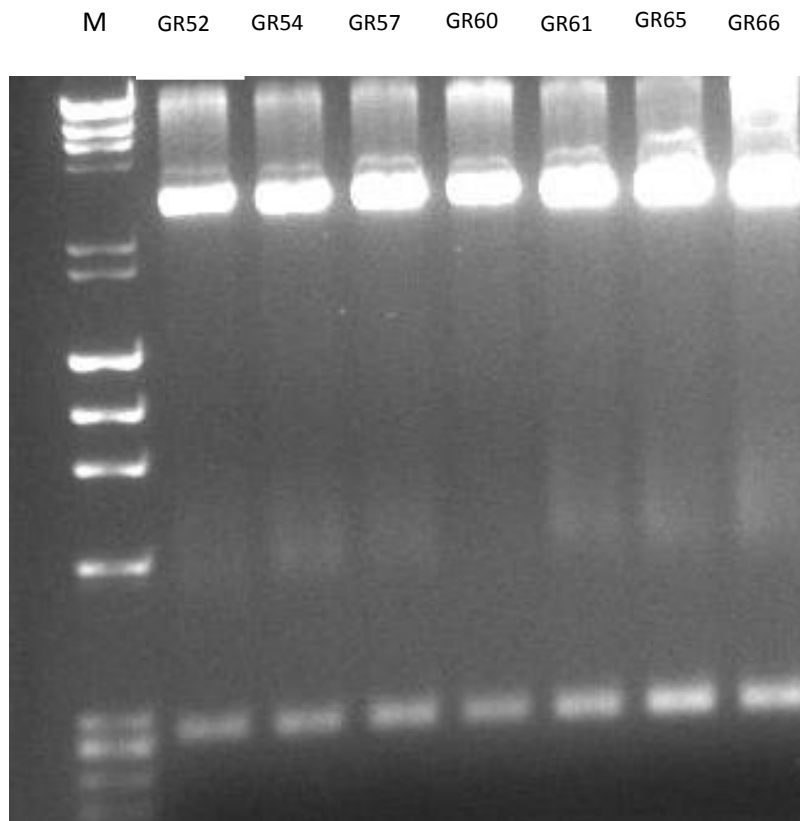
Forward	TSdnaK3	5'-AAGGAGCAGCAGATCCGCATCCA-3'
Reverse	TSdnaK2	5'-GTACATGGCCTCGCCGAGCTTCA-3'

Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR ήταν:

<b>Αρχική αποδιάταξη</b>	94°C για 4 λεπτά	} 35 κύκλοι
<b>Αποδιάταξη</b>	94°C για 1 λεπτό	
<b>Υβριδισμός εκκινητών</b>	54°C για 1 λεπτό	
<b>Επιμήκυνση</b>	72°C για 1 λεπτό	
<b>Τελική επιμήκυνση</b>	72°C για 5-10 λεπτά	



Τα προϊόντα της PCR τα οποία προέκυψαν υποκλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα PGEM-T easy (Promega) και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τους (sequencing).

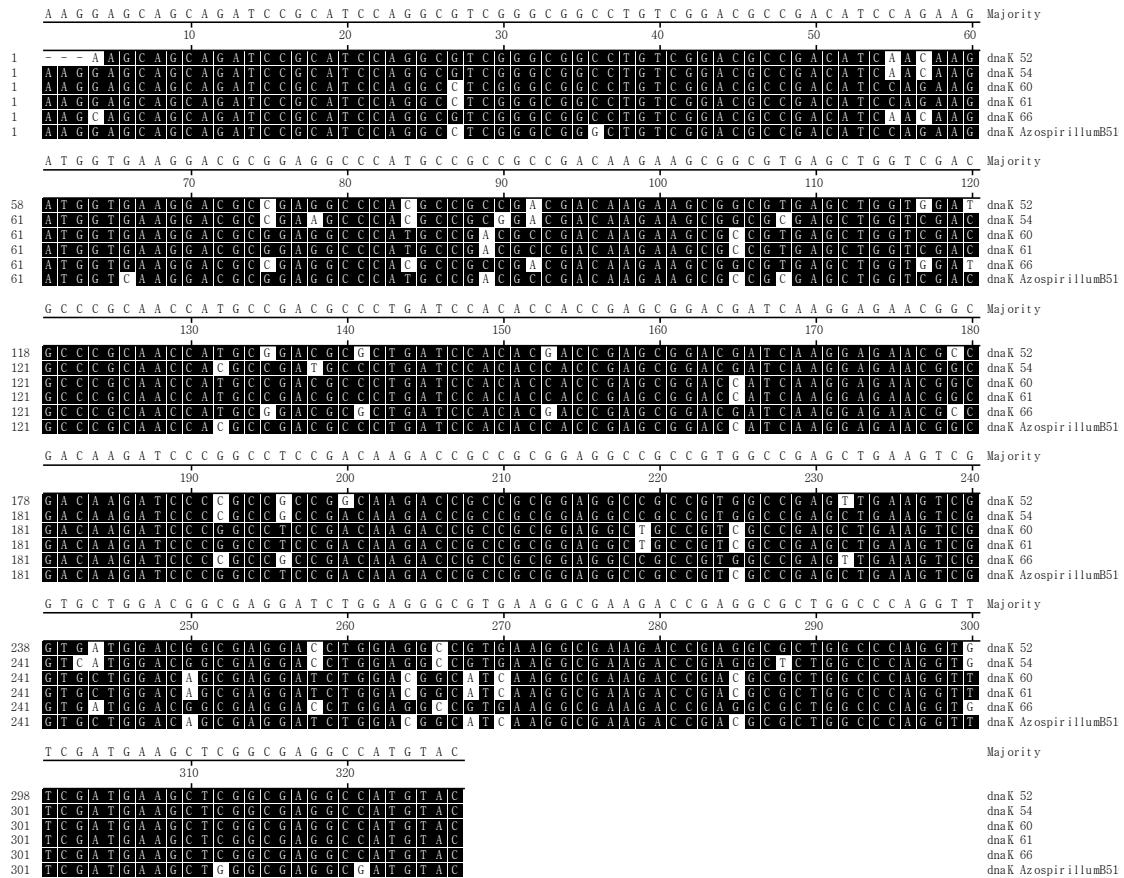


---

**Εικ. 3.10** Πέψεις με το ενζυμο *EcoRI* των πλασμιδίων από τους PGEM-T κλώνους *dnaK*, GR52, GR54, GR57, GR60, GR61, GR65, GR66 (M= μάρτυρας μοριακών μεγεθών λ DNA *Hind* III και φΧ174 DNA *Hae* III)

---

### 3.4.2 Ευθυγράμμιση των 6 ακολουθιών *dnaK* *Azospirillum*



Πραγματοποιήθηκε η ευθυγράμμιση των υποκλώνων και ακολουθιών διαθέσιμων στο διαδίκτυο (βλ. παράρτημα για Accession Number) με το πρόγραμμα πολλαπλής ευθυγράμμισης Clustal W του λογισμικού Lasergene v7.0

### 3.4.3 Πίνακας αποστάσεων των 6 ακολουθιών

Percent Identity								
	1	2	3	4	5	6		
1	■	39.4	37.0	37.0	39.8	37.3	1	dnaK 52
2	132.6	■	91.1	91.1	95.4	90.8	2	dnaK 54
3	150.4	9.4	■	100.0	90.8	97.9	3	dnaK 60
4	150.4	9.4	0.0	■	90.8	97.9	4	dnaK 61
5	133.0	4.7	9.8	9.8	■	89.3	5	dnaK 66
6	149.0	9.8	2.2	2.2	11.6	■	6	dnaK <i>Azospirillum</i> B510
	1	2	3	4	5	6		

Πίν. 3.16 Ο πίνακας των αποστάσεων των 6 ακολουθιών πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα πολλαπλής ευθυγράμμισης Clustal W του λογισμικού Lasergene v7.0

Από τη μοριακή ανάλυση των 5 *Azospirillum* νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *dnaK* προέκυψαν τα εξής στατιστικά στοιχεία για τη συχνότητα των νουκλεοτιδίων:

Στέλεχος	T(U)	C	A	G	G+C	Σύνολο
<b>Gr52</b>	9.9	30.9	22.5	36.7	67.6	324
<b>Gr54</b>	9.2	32.4	23.2	35.2	67.6	327
<b>Gr60</b>	10.7	32.7	22.9	33.6	66.3	327
<b>Gr61</b>	10.7	32.7	22.9	33.6	66.3	327
<b>Gr66</b>	9.8	30.9	22.9	36.4	67.3	327

Πίν. 3.17 Συχνότητα νουκλεοτιδίων και του αθροίσματος G+C στην κάθε μία αλληλουχία *dnaK*. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, software version 4.0) (Tamura *et al.*, 2007).

### 3.4.4 Αποτελέσματα BLAST και συχρότητα νουκλεοτιδίων

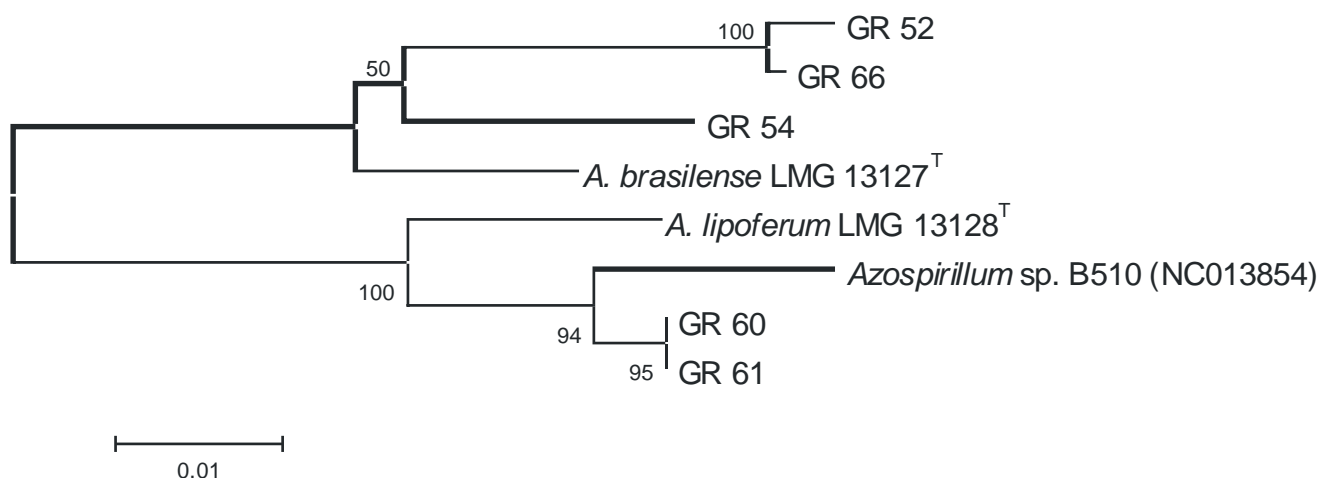
Πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αλληλουχιών με τα στοιχεία των βάσεων δεδομένων από διαδικτυακό πρόγραμμα BLAST του National Center of Biotechnology Information (NCBI).

Από τη σύγκριση με τα στοιχεία των βάσεων δεδομένων από το διαδικτυακό πρόγραμμα BLAST των 5 *Azospirillum* υποκλώνων *dnaK* προέκυψαν τα εξής:

Στέλεχος	Υποκλώνος	Αποτέλεσμα BLAST	Max identity	Query Coverage
Gr52	pGemT.dnaK.52	CP000781.1 ; <i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2	99%	78%
Gr54	pGemT.dnaK.54	AP010946.1 ; <i>Azospirillum</i> sp. B510 DNA	100%	90%
Gr60	pGemT.dnaK.60	AP010946.1 ; <i>Azospirillum</i> sp. B510 DNA	100%	97%
Gr61	pGemT.dnaK.61	AP010946.1 ; <i>Azospirillum</i> sp. B510 DNA	100%	97%
Gr66	pGemT.dnaK.66	AP010946.1 ; <i>Azospirillum</i> sp. B510 DNA	100%	98%

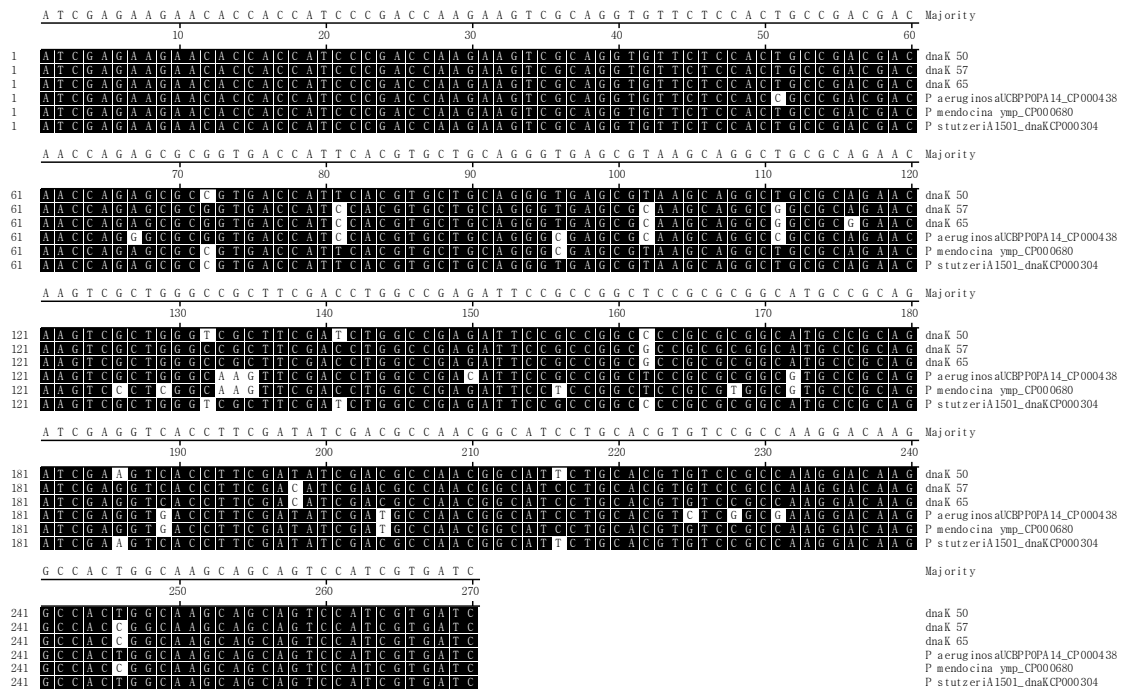
Πίν. 3.18 Αποτελέσματα σύγκρισης με τη βάση δεδομένων BLAST των 5 *Azospirillum* υποκλώνων *dnaK*

### 3.4.5 Το φυλογενετικό δέντρο των 8 ακολουθιών *dnaK* *Azospirillum*



**Εικ. 3.11** Εξελικτικές σχέσεις 8 στελεχών και στελεχών αναφοράς βάσει νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου *dnaK*. Η απεικόνιση της εξελικτικής ιστορίας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Παρουσιάζεται το δέντρο ομολογίας 1000 αντιγράφων bootstrap προκειμένου να απεικονισθεί η εξελικτική ιστορία των υπό ανάλυση taxa. Οι κλάδοι που αντιστοιχούν σε κατανομές οι οποίες αναπαράχθηκαν σε λιγότερα από 50% των αντιγράφων bootstrap έχουν συγχωνευθεί. Δίπλα στους κλάδους παρουσιάζεται το ποσοστό των αντιγράφων των δέντρων στα οποία τα συσχετιζόμενα taxa συγκροτούν μία ομάδα (Felsenstein, 1985). Το δέντρο είναι σχεδιασμένο σε κλίμακα, με τους κλάδους να έχουν τις ίδιες μονάδες με αυτές των αποστάσεων που χρησιμοποιήθηκαν για να προκύψει το φυλογενετικό δέντρο. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al.*, 2004) και οι μονάδες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό υποκαταστάσεων ανά θέση. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν ως ακολουθίες αναφοράς τα *A. brasilense* LMG 13127<sup>T</sup>, *A. lipoferum* LMG 13128<sup>T</sup>, *Azospirillum* sp. B510. Όλες οι θέσεις που περιείχαν κενά ή απουσίαζαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν (επιλογή πλήρους απάλειψης). Σύνολο 324 βάσεις. Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007).

### 3.4.6 Ευθυγράμμιση των 6 ακολουθιών *dnaK Pseudomonas*



Πραγματοποιήθηκε η ευθυγράμμιση των υποκλώνων και ακολουθιών διαθέσιμων στο διαδίκτυο (βλ. παράρτημα για Accession Number) με το πρόγραμμα πολλαπλής ευθυγράμμισης Clustal W του λογισμικού Lasergene v7.0

### 3.4.7 Πίνακας αποστάσεων των 6 ακολουθιών

Percent Identity							
	1	2	3	4	5	6	
1	■	95.9	95.6	91.9	93.7	100.0	1
2	4.2	■	99.6	93.7	93.7	95.9	2
3	4.6	0.4	■	93.3	93.3	95.6	3
4	8.7	6.6	7.0	■	94.4	91.9	4
5	6.6	6.6	7.0	5.8	■	93.7	5
6	0.0	4.2	4.6	8.7	6.6	■	6
	1	2	3	4	5	6	

dnaK 50  
 dnaK 57  
 dnaK 65  
 P aeruginosaUCBPP0PA14\_CP000438  
 P mendocina ymp\_CP000680  
 P stutzeriA1501\_dnaKCP000304

Πίν. 3.19 Ο πίνακας των αποστάσεων των 6 ακολουθιών πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα πολλαπλής ευθυγράμμισης Clustal W του λογισμικού Lasergene v7.0

Από τη μοριακή ανάλυση των 3 *Pseudomonas* νουκλεοτιδικών αλληλουχιών *dnaK* προέκυψαν τα εξής στατιστικά στοιχεία για τη συχνότητα των νουκλεοτιδίων:

Στέλεχος	T(U)	C	A	G	G+C	Σύνολο
Gr50	15.6	33.0	23.3	28.1	61.1	270
Gr57	12.6	34.8	23.0	29.6	64.4	270
Gr65	12.6	34.8	22.6	30.0	64.8	270

Πίν. 3.20 Συχνότητα νουκλεοτιδίων και του αθροίσματος G+C στην κάθε μία αλληλουχία *dnaK*. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, software version 4.0) (Tamura *et al.*, 2007).

#### 3.4.8 Αποτελέσματα BLAST και συχνότητα νουκλεοτιδίων

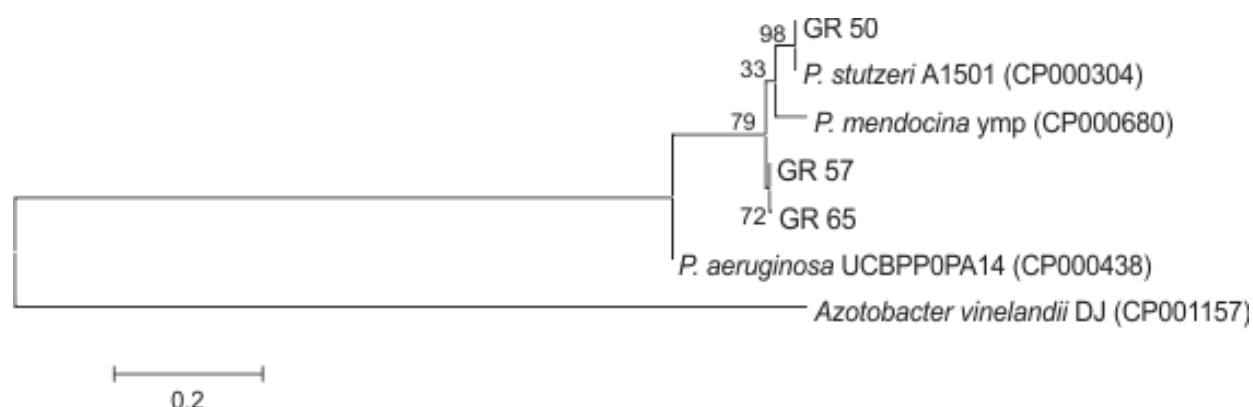
Πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αλληλουχιών με τα στοιχεία των βάσεων δεδομένων από διαδικτυακό πρόγραμμα BLAST του National Center of Biotechnology Information (NCBI).

Από τη σύγκριση με τα στοιχεία των βάσεων δεδομένων από το διαδικτυακό πρόγραμμα BLAST των 3 *Pseudomonas* υποκλώνων *dnaK* προέκυψαν τα εξής:

Στέλεχος	Υποκλώνος	Αποτέλεσμα BLAST	Max identity	Query Coverage
Gr50	pGemT.dnaK.50	CP000304.1 ; <i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	100%	95%
Gr57	pGemT.dnaK.57	CP000304.1 ; <i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501 CP001157.1 ; <i>Azotobacter vinelandii</i> DJ	100%	95%
Gr65	pGemT.dnaK.65	CP000304.1 ; <i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	100%	95%

Πίν. 3.21 Αποτελέσματα σύγκρισης με τη βάση δεδομένων BLAST των 3 *Pseudomonas* υποκλώνων *dnaK*

### 3.4.9 Το φυλογενετικό δέντρο των 7 ακολουθιών *dnaK* *Pseudomonas*



**Εικ. 3.12** Εξελικτικές σχέσεις 7 στελεχών και στελεχών αναφοράς βάσει νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου *dnaK*. Η απεικόνιση της εξελικτικής ιστορίας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Παρουσιάζεται το δέντρο ομολογίας 1000 αντιγράφων bootstrap προκειμένου να απεικονισθεί η εξελικτική ιστορία των υπό ανάλυση taxa. Οι κλάδοι που αντιστοιχούν σε κατανομές οι οποίες αναπαράχθηκαν σε λιγότερα από 50% των αντιγράφων bootstrap έχουν συγχωνευθεί. Δίπλα στους κλάδους παρουσιάζεται το ποσοστό των αντιγράφων των δέντρων στα οποία τα συσχετιζόμενα taxa συγκροτούν μία ομάδα (Felsenstein, 1985). Το δέντρο είναι σχεδιασμένο σε κλίμακα, με τους κλάδους να έχουν τις ίδιες μονάδες με αυτές των αποστάσεων που χρησιμοποιήθηκαν για να προκύψει το φυλογενετικό δέντρο. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al.*, 2004) και οι μονάδες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό υποκαταστάσεων ανά θέση. Ως outgroup χρησιμοποιήθηκε το *Azotobacter vinelandii* DJ. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν ως ακολουθίες αναφοράς τα *P. stutzeri* A1501, *P. mendocina* ymp, *P. aeruginosa* UCBPP0PA14. Όλες οι θέσεις που περιείχαν κενά ή απουσίαζαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν (επιλογή πλήρους απάλειψης). Σύνολο 261 βάσεις. Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007).



## 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η μοριακή ταυτοποίηση στελεχών αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων που έχουν απομονωθεί από τη ριζόσφαιρα σιτηρών, κριθαριού και βρώμης (*Hordeum vulgare*, *Avena sativa*), φυτικό υλικό που έχει συλλεχθεί από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας που καλλιεργούνται τα φυτά αυτά. Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν ελάχιστες αναφορές για αζωτοδεσμευτικά βακτήρια που έχουν απομονωθεί από τα φυτά αυτά (Belimov *et al.*, 1995; Bashan *et al.*, 2004).

Τα στελέχη αυτά έχουν ήδη απομονωθεί από το Εργαστήριο Γεωργικής Μικροβιολογίας του ΓΠΑ και έχουν χαρακτηριστεί βάσει κλασικών μικροβιολογικών μεθόδων (Κεφαλογιάννη, 2008). Οι απομονώσεις πραγματοποιήθηκαν δειγματοληπτικά από τα γεωγραφικά διαμερίσματα - σιτοβολώνες της Ελλάδας.

Οι περιοχές είναι οι εξής: Μακεδονία (Θεσσαλονίκη), Θεσσαλία (Λάρισα), Στερεά Ελλάδα (Σκούρτα Βοιωτίας).

Μελετήθηκαν τα στελέχη Gr50, Gr52, Gr54, Gr57, Gr60, Gr61, Gr65, Gr66 (πιν. 1) στα οποία, πριν χρησιμοποιηθούν, πραγματοποιήθηκε επανεκτίμηση της αζωτοδεσμευτικής τους ικανότητας με τη μέθοδο αναγωγής του ακετυλενίου σε αιθυλένιο, έτσι ώστε να διασφαλιστεί η ενεργή δράση της χαρακτηριστικής ιδιότητας των εν λόγω στελεχών.

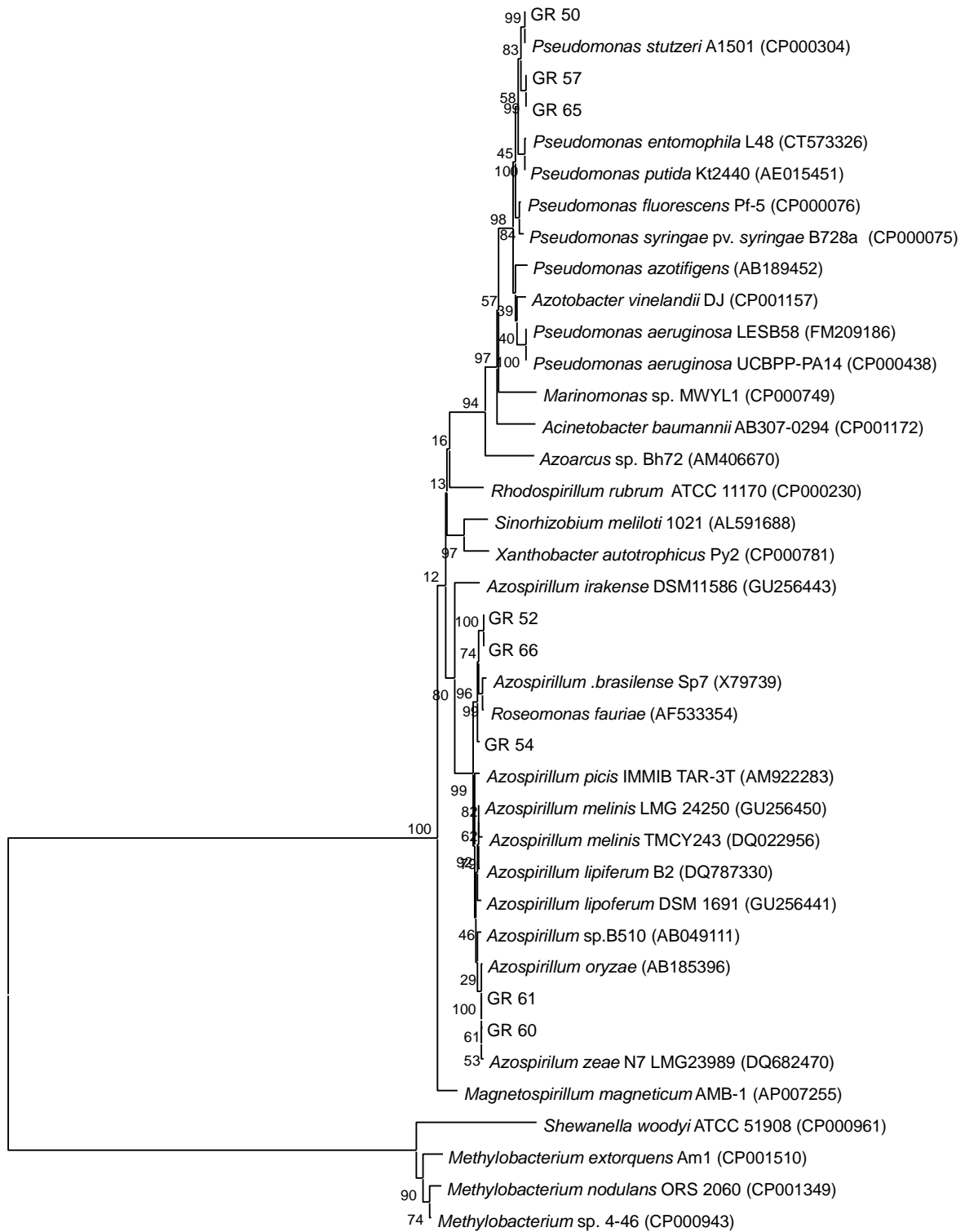
Στέλεχος	Φυτό απομόνωσης	Τυπικό στέλεχος	highest match %
<b>Gr50</b>	<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i> CCUG 11256	99.931
<b>Gr 52</b>	<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Azospirillum brasilense</i> ATCC 49958	98.194
<b>Gr 57</b>	<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i> CCUG 11256	<b>97.390</b>
<b>Gr54</b>	<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Azospirillum brasilense</i> ATCC 49958	98.611
<b>Gr60</b>	<i>Avena sativa</i>	<i>Azospirillum zeae</i> N7	99.445
<b>Gr61</b>	<i>Avena sativa</i>	<i>Azospirillum zeae</i> N7	99.307
<b>Gr65</b>	<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i> CCUG 11256	<b>97.321</b>
<b>Gr66</b>	<i>Avena sativa</i>	<i>Azospirillum brasilense</i> ATCC 49958	98.125

Πιν. 1 Προσδιορισμός του πλησιέστερου τυπικού στελέχους των στελεχών βάσει του 16S rRNA με τη βοήθεια του διαδικτυακού προγράμματος EzTaxon (Chun *et al.*, 2007)

Στόχος της εργασίας ήταν η μοριακή προσέγγιση της ταυτοποίησής τους. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν 4 γονίδια προκειμένου να αναλυθεί τμήμα της νουκλεοτιδικής τους ακολουθίας. Πραγματοποιήθηκε υποκλωνοποίηση και στη συνέχεια αλληλούχηση τμημάτων που κωδικοποιούν για τα συντηρημένα (housekeeping) γονίδια 16S rRNA και *dnaK* (chaperone protein DnaK) καθώς και τμημάτων δύο γονιδίων υπεύθυνων για τις σημαντικότερες ιδιότητες των αυξητικών βακτηρίων PGPR: το *nifH* (αζωτοδέσμευση) και το *ipdC* (παραγωγή φυτοορμόνης).

Η ανάλυση του 16S rRNA γονιδίου (Stackebrandt *et al.*, 2002) αποτελεί ένα δυναμικό φυλογενετικό εργαλείο και βάσει αυτού έχουν δημιουργηθεί τα περισσότερα φυλογενετικά δέντρα προκαρυωτικών οργανισμών. Το γονίδιο 16S rRNA αποτελεί το πιο αποδεκτό και ευρέως χρησιμοποιούμενο συντηρημένο γονίδιο που χρησιμοποιείται στην βακτηριακή ταξινόμηση και φυλογένεια. Έχει μέγεθος ~1500bp, το οποίο εξυπηρετεί σε έρευνες βιοπληροφορικής (Janda & Abbott, 2007). Σύμφωνα με την ad-hoc επιτροπή για την επανεκτίμηση του προσδιορισμού ειδών στη βακτηριολογία, κατά την περιγραφή ενός νέου είδους η ακολουθία 16S rRNA, προκειμένου να είναι αντιπροσωπευτική, πρέπει να είναι μεγαλύτερη των 1300 βάσεων. Για τον λόγο αυτό ενισχύθηκε τμήμα περίπου 1450 βάσεων του 16S rRNA, επί συνόλου περίπου 1500bp (96,6-100%). Παρά την αναμφισβήτητη αποδοχή του γονιδίου 16S rRNA ως μοριακό εργαλείο, προτείνεται η μοριακή ανάλυση περισσότερων του ενός γονιδίων προκειμένου να υποστηρίζονται τα αποτελέσματα των φυλογενετικών αναλύσεων.

Στο συνολικό φυλογενετικό δέντρο 16S rRNA (Εικ. 1) φαίνεται σαφώς ότι τα διαφορά στελέχη που ταυτοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή δημιουργούν ομάδες (Cluster) με τα αντίστοιχα κατά περίπτωση τυπικά στελέχη. Η μελέτη τμήματος του συντηρημένου γονιδίου *dnaK* παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον μια και πρόκειται για συντηρημένο γονίδιο. Το γονίδιο 16S rRNA εμφανίζεται στα βακτήρια σε πολλά αντίγραφα στο γένωμα τους ενώ το γονίδιο *dnaK* σε ένα μόνο αντίγραφο. Αυτό ενδεχομένως σημαίνει ότι θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στο μέλλον εντατικότερα για ταυτοποίηση στελεχών κυρίως μεταξύ Πρωτεοβακτηρίων.



---

**Εικ. 1 Εξελικτικές σχέσεις των υπό μελέτη στελεχών και στελεχών αναφοράς βάσει τμήματος του γονιδίου 16S rRNA (1453 βάσεις).** Η απεικόνιση της εξελικτικής ιστορίας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). Παρουσιάζεται το δέντρο ομολογίας 1000 αντιγράφων bootstrap προκειμένου να απεικονισθεί η εξελικτική ιστορία των υπό ανάλυση taxa. Οι κλάδοι που αντιστοιχούν σε κατανομές οι οποίες αναπαράχθηκαν σε λιγότερα από 50% των αντιγράφων bootstrap έχουν συγχωνευθεί. Δίπλα στους κλάδους παρουσιάζεται το ποσοστό των αντιγράφων των δέντρων στα οποία τα συσχετιζόμενα taxa συγκροτούν μία ομάδα (Felsenstein, 1985). Το δέντρο είναι σχεδιασμένο σε κλίμακα, με τους κλάδους να έχουν τις ίδιες μονάδες με αυτές των αποστάσεων που χρησιμοποιήθηκαν για να προκύψει το φυλογενετικό δέντρο. Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Maximum Composite Likelihood (Tamura et al., 2004) και οι μονάδες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό υποκαταστάσεων ανά θέση. Όλες οι θέσεις που περιείχαν κενά ή απουσίαζαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν (επιλογή πλήρους απάλειψης).. Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA4 (Tamura et al., 2007).

---

Επιπροσθέτως, το *dnaK* (Hsp70) κωδικοποιεί για μόρια σαπερόνης (chaperone protein) τα οποία εμπλέκονται σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες όπως το δίπλωμα των πρωτεϊνών και η προστασία έναντι υψηλών θερμοκρασιών. Αποτελεί συντηρημένο γονίδιο μεταξύ προκαρυωτικών οργανισμών και χρησιμοποιείται ως φυλογενετικό εργαλείο κυρίως μεταξύ Gram αρνητικών - Gram θετικών βακτηρίων αλλά και α-, β-, γ- Πρωτεοβακτηρίων. Σε κάποιες περιπτώσεις η ανάλυσή του παρέχει υψηλότερη ανάλυση απ' ό,τι του 16S rRNA (Strepkowski et al., 2003; Huang et al., 2010). Στη μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε ανάλυση τμήματος νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του *dnaK* γονιδίου μεγέθους 327 bp.

Η παρουσία του *nifH* γονιδίου στα υπό μελέτη στελέχη ενισχύει την άποψη ότι πρόκειται περί αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων. Το *nifH* κωδικοποιεί για την Fe-πρωτεΐνη της νιτρογενάσης (αναγωγή νιτρογενάσης). Πραγματοποιήθηκε ανάλυση τμήματος νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μεγέθους 359bp, αποτελώντας το 41% του συνολικού μεγέθους του γονιδίου. Η φυλογένεια του γονιδίου *nifH* συμφωνεί σε μεγάλο βαθμό με τη φυλογένεια του 16S rRNA. Βάσει αυτού, οι εξελικτικές σχέσεις στελεχών όπως προκύπτουν από μοριακές αναλύσεις του γονιδίου *nifH* είναι δυνατόν να χρησιμοποιούνται για να υποστηρίξουν φυλογενετικές αναλύσεις άλλων γονιδίων σε αζωτοδεσμευτικούς οργανισμούς.

Η αυξίνη ινδολοξικό οξύ παράγεται από τα PGPR βακτήρια μέσω του μονοπατιού της τρυπτοφάνης, του μονοπατιού του ινδολοπυρουβικού οξέος (IPyA) (υπάρχει και εναλλακτικό μονοπάτι παραγωγής IAA). Η αποκαρβοξυλάση του ινδολοπυρουβικού οξέος συμμετέχει στο μονοπάτι αυτό και κωδικοποιείται από το γονίδιο *ipdC*. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση τμήματος νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μεγέθους 590bp. Κάποια από τα χαρακτηριστικά των αυξητικών ριζοβακτηρίων όπως η παραγωγή του IAA προωθούν την αύξηση των ριζικών διακλαδώσεων και την επιμήκυνσή τους, συμβάλλοντας στην ανοδική πορεία του εδαφικού νερού και των στοιχείων θρέψης του φυτού. Υπάρχουν εργασίες που δείχνουν θεαματικά αποτελέσματα από εμβολιασμό του βακτηρίου ελεύθερης διαβίωσης *Azospirillum* σε καλλιέργεια σιταριού, κριθαριού και βρώμης, επιτυγχάνοντας αύξηση της παραγωγής συγκριτικά με το μάρτυρα.

Διαπιστώθηκε ότι τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια που μελετηθήκαν ανήκουν στα είδη *Azospirillum brasilense*, *A. zae* and *Pseudomonas stutzeri*. Μετά την ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας εκάστου γονιδίου έγινε σύγκριση με τη βάση δεδομένων του προγράμματος BLAST του διαδικτυακού τόπου NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Τα αποτελέσματα της αναζήτησης στο διαδικτυακό πρόγραμμα EzTaxon (Chun *et al.*, 2007) για τις αλληλουχίες 16S rRNA χρησιμοποιήθηκαν ως αναφορά για την ταξινόμηση και ταυτοποίηση των στελεχών. Οι συγκρίσεις που ακολούθησαν για τα άλλα υπό μελέτη γονίδια συμφωνούν με τα δεδομένα που προέκυψαν για το 16S rRNA.

Η σύγκριση των τμημάτων 16S rRNA των στελεχών Gr50, Gr57 και Gr65 με το πρόγραμμα EzTaxon αλλά και BLAST με του NCBI διαπίστωσε ότι πρόκειται για είδη του γένους *Pseudomonas*. Τα στελέχη αυτά παρουσιάζουν υψηλή ομολογία με το τυπικό στέλεχος *Pseudomonas stutzeri* CCUG 11256 (EzTaxon) και με το *Pseudomonas stutzeri* A1501 (BLAST / NCBI) του οποίου έχει ολοκληρωθεί η αλληλούχιση του γενώματός του.

Παρατηρούμε ότι ενώ το στέλεχος Gr50 έχει ποσοστό ομολογίας με το τυπικό στέλεχος της τάξεως του 99%, τα στελέχη Gr57 και Gr65 κατεβάζουν το ποσοστό αυτό στο 97%. Επίσης σύμφωνα με τα φυλογενετικά δέντρα που παραθέτονται στην εργασία τα στελέχη Gr57 και Gr65 διαχωρίζονται από το Gr50 (Εικ 3.3), σε όλα τα

φυλογενετικά δέντρα των διαφόρων γονιδίων που μελετήθηκαν. Για τον λόγο αυτό αξίζει μια περαιτέρω διερεύνηση των στελεχών αυτών.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης όσον αφορούν τα *Pseudomonas stutzeri* ενισχύουν την παραδοχή (Venieraki et al., 2011) ότι υπάρχει διασπορά του είδους σε διάφορες περιοχές όπου καλλιεργούνται σιτηρά.

Το *Pseudomonas stutzeri* είναι το μοναδικό είδος του γένους *Pseudomonas* το οποίο δεσμεύει ατμοσφαιρικό άζωτο ενώ τα περισσότερα έχουν κλινική σημασία ως παθογόνα φυτών και ζώων και ανθρώπων. Το *P. stutzeri* προάγει την ανάπτυξη σε ορισμένα φυτά, αγρωστώδη και μη, ενώ έχει διαπιστωθεί ότι έχει και ενδοφυτική δράση σε φυτά ρυζιού (Yan et al., 2008). Το είδος αυτό είναι ιδιαίτερα ποικιλόμορφο από γενετική άποψη και χωρίζεται σε 18 genomovar (Cladera et al., 2004 ; Sikorski et al., 2005).

Τα στελέχη Gr52 και Gr54 που έχουν απομονωθεί αμφότερα από ριζόσφαιρα κριθαριού και το στέλεχος Gr66 που έχει απομονωθεί από ριζόσφαιρα φυτού βρώμης ανήκουν στο είδος *Azospirillum brasilense*. Το είδος *A. brasilense* είναι ευρέως διαδεδομένο και απαντά σε ποικίλες εδαφοκλιματικές συνθήκες και διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Θεωρείται το πιο μελετημένο αζωτοδεσμευτικό βακτήριο ελεύθερης διαβίωσης. Όπως σε όλα τα είδη του γένους *Azospirillum* ο μηχανισμός της αζωτοδέσμευσης ίσως πρέπει να θεωρείται ότι έχει περισσότερο καταλυτικό ρόλο στην ανάπτυξη του φυτού παρά ότι αποτελεί την κύρια πηγή αζώτου.

Τα στελέχη Gr60 και Gr61 που έχουν απομονωθεί από ριζόσφαιρα φυτών βρώμης από δύο διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας, τα Σκούρτα Βοιωτίας (Gr60) και τη Θεσσαλονίκη (Gr61) ανήκουν στο είδος *Azospirillum zeae*. Αξίζει να σημειωθεί ότι για πρώτη φορά έχει απομονωθεί *Azospirillum zeae* από φυτά βρώμης. Μέχρι στιγμής έχει απομονωθεί μόνο από ριζόσφαιρα φυτών αραβόσιτου (Mehnaz et al., 2007) και από ριζόσφαιρα μαλακού σιταριού (Venieraki et al., 2011)

Συνοπτικά τα κύρια συμπεράσματα από τη παρούσα μελέτη είναι τα εξής:

- ✓ Υποκλωνοποιήθηκε σχεδόν ολόκληρο το 16S rRNA και αλληλουχήθηκε για την ταυτοποίηση των στελεχών
- ✓ Ταυτοποιήθηκαν αζωτοδεσμευτικά βακτήρια τα οποία έχουν απομονωθεί από ριζόσφαιρα σιτηρών κριθαριού και βρώμης ως *Azospirillum brasilense*, *A. zeae* και *Pseudomonas stutzeri*
- ✓ Διαπιστώθηκε η παρουσία των γονιδίων *nifH*, *dnaK*, *ipdC*, υποκλωνοποιήθηκαν τα αντίστοιχα τμήματα DNA και πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τους
- ✓ Τα φυλογενετικά δέντρα των γονιδίων *nifH*, *dnaK*, *ipdC* ακολουθούν την ομαδοποίηση της φυλογένειας του 16S rRNA
- ✓ Τα στελέχη *Pseudomonas stutzeri* Gr57 και Gr65 μπορούν από μόνα τους μετά από περεταίρω διερεύνηση να αποτελέσουν τυπικά στελέχη.
- ✓ Απομονώθηκε για πρώτη φορά *Azospirillum zeae* από ριζόσφαιρα φυτών βρώμης (Gr60, Gr61)
- ✓ Το γονίδιο *ipdC* δεν ενισχύθηκε στα *Azospirillum zeae* (Gr60, Gr61) με τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν.

Η έρευνα έχει στηριχθεί στην απομόνωση και την μελέτη της φυσιολογίας και της οικολογίας των νέων στελεχών *Azospirillum* προωθώντας την χρήση αυτών ως σκευάσματα εμβολιασμού των εδαφών των καλλιεργειών. Πάνω σε αυτό το κομμάτι έχει στηριχθεί η οργανική γεωργία για να μπορέσει να καλύψει τις διαρκώς αυξανόμενες απαιτήσεις τα τελευταία χρόνια της αγοράς για βιολογικά προϊόντα. Τα σκευάσματα αυτά είναι εύκολα στην χρήση αλλά και οικονομικά, πρόσφατα μάλιστα έχει δοθεί ένα τέτοιου είδους εμβόλιο (Thamizh Vendan & Thangaraju, 2007α, 2007β) που έχει ως βάση την καλλιέργεια *Azospirillum* σε θρεπτικό μέσο που περιέχει άλατα, επάγοντας με αυτόν τον τρόπο την ανάπτυξη κυστών οι οποίες έχουν χρόνο βιωσιμότητας περισσότερο από 14 μήνες. Με την εγκύστωση των βακτηριακών κυττάρων αυξάνεται η ανθεκτικότητά τους στην ξηρασία και την υψηλή θερμοκρασία που μπορεί να φτάσει μέχρι και τους 40°C, κάνοντας επίσης πιο εύκολη την μετατροπή τους σε βλαστικά κύτταρα με την χρήση απλών θρεπτικών μέσων (όπως νερό βρύσης κ.α.) επιτρέποντας την αποτελεσματικότερη προσκόλληση σε ρίζες και σπόρους. Τα σκευάσματα αυτά προωθούν τους μηχανισμούς ανάπτυξης του φυτού, μεγιστοποιώντας τα οφέλη της αζωτοδέσμευσης. Τα στελέχη του γένους *Azospirillum* σε συνδυασμό ή όχι με άλλους μικροοργανισμούς όπως μυκόρριζες είναι ιδιαίτερα ωφέλιμα για τα φυτά, ευνοώντας τα τόσο στην εγκατάσταση όσο και στην ανάπτυξη των φυταρίων ενώ παράλληλα μειώνουν τις πιθανότητες διάβρωσης του εδάφους.

Για την επίλυση σοβαρών περιβαλλοντικών προβλημάτων όπως στην αποτοξίνωση υγρών αποβλήτων εφαρμόζεται η χρήση *Azospirillum*. Έχουν την ικανότητα να διασπών κάτω από μικροαερόφιλες συνθήκες υδρογονάνθρακες όπως τολουόλιο, αιθανόλη, βενζόλιο κ.α. χημικά τα οποία ρυπαίνουν τους υπόγειους υδάτινους ορίζοντες (Cápiro *et al.*, 2008). Στελέχη *Azospirillum* και *Pseudomonas* μπορούν και βιοαποικοδομούν το ισχυρό οργανοφωσφορικό παρασιτοκτόνο Ethion (Foster *et al.*, 2004). Η βιοεξυγίανση των υπογείων υδάτων με βακτήρια του γένους *Azospirillum* έχει εφαρμοστεί εκτενώς στις Ηνωμένες Πολιτείες, μάλιστα ύστερα από εκτίμηση των παραμέτρων κινητικότητας, έδειξε ότι τα *Azospirillum* είναι ιδιαίτερα δραστικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις υπερχλωριωδών αλάτων συγκριτικά με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς (Waller *et al.* 2004).



## 5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Διαμαντίδης Γ.** 1994. Εισαγωγή στην βιοχημεία (2<sup>η</sup> έκδοση). University Studio Press. Θεσσαλονίκη.
- Κεφαλογιάννη Η.** 2008. Οικο-φυσιολογική μελέτη βακτηρίων του γένους *Azospirillum*. Διδακτορική διατριβή. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Τζάμος Ε.** 2004. Φυτοπαθολογία. Εκδόσεις Α. Σταμούλης. Αθήνα.
- Alexandre, G., R. Rohr, and R. Bally.** 1999. A phase variant of *Azospirillum lipoferum* lacks a polar flagellum and constitutively expresses mechanosensing lateral flagella. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4701–4704.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. & Lipman D.J.** 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**:403–410.
- Baca B.E. & Elmerich C.** 2007. Microbial Production of Plant Hormones. In: Elmerich C. & Newton W.E. (eds.), *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*. 113-143.
- Baldani J.I. & Baldani V.L.D.** 2005. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *An. Acad. Bras. Cienc.* **77**(3): 549-579.
- Baldani J.I., Krieg N.R., Baldani V.L.D., Hartmann A. & Döbereiner J.** 2005. Genus II *Azospirillum* Tarrand, Krieg and Döbereiner 1979, 978. In: Garrity G., Brenner D.J., Krieg N.R. & Staley J.T. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2<sup>nd</sup> ed., Vol. 2, part C, Springer-Verlag, New York. 7-26.
- Bashan Y. & Holguin G.** 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Can. J. Microbiol.* **43**: 103-121.
- Bashan, Y., and Levanony, H.** 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.* **36**, 591–608.

- Bashan, Y., G. Holguin, and L. E. de-Bashan.** 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can. J. Microbiol.* **50**:521–577
- Bashan, Y., and L. E. de-Bashan.** 2005. Bacteria/plant growth-promotion, p.103–115. *In* D. Hillel (ed.), *Encyclopedia of soils in the environment*, vol. 1. Elsevier, Oxford, United Kingdom
- Belimov, A.A., Kojemiakov, A.P., and Chuvarliyeva, C.V.** 1995. Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate-solubilizing bacteria. *Plant Soil*, **173**: 29-37.
- Bible A N., Stephens B. B., Ortega D. R., Xie Z. , and Gladys Alexandre.** 2008. Function of a Chemotaxis-Like Signal Transduction Pathway in Modulating Motility, Cell Clumping, and Cell Length in the Alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense*. *Int. J. Syst. Bacteriol* **190**: 6365–6375.
- Ben Dekhil S., Cahill M., Stackebrandt E. & Sly L.I.** 1997. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largimobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* **20**: 72-77.
- Betancourt D.A., Loveless T.M., Brown J.W. & Bishop P.E.** 2008. Characterization of diazotrophs containing Mo-independent nitrogenases, isolated from diverse natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**(11): 3471-3480.
- Busse H. & Stolz A.** 2006. *Achromobacter*, *Alcaligenes* and Related Genera. *In*: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H. & Stackebrandt E. (eds.), *The Prokaryotes*, 3<sup>rd</sup> ed., Vol. 5, Springer-Verlag, New York. 675-700.
- Cápiro N.L, Da Silva M.L., Stafford B.P., Rixey W.G. & Alvarez P.J.J** 2008. Microbial community response to a release of neat ethanol onto residual hydrocarbons in a pilot-scale aquifer tank. *Environ. Microbiol.* **10**: 2236-2244.

- Chun J, Lee H-K, Jung Y, Kim M, Kim S, Kim BK, Lim Y-M.** 2007 EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:2259–2261
- Aina Maria Cladera, Antonio Bennasar, Maria Barcelo', Jorge Lalucat, and Elena García-Valde's.** 2004. Comparative Genetic Diversity of *Pseudomonas stutzeri* Genomovars, Clonal Structure, and Phylogeny of the Species. *J. Bacteriol.* 186: 5239–5248
- Compant S., Duffy B., Nowak J., Clément C. & Barka E.A.** 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4951–4959.
- Costacurta, A., V. Keijers, and J. Vanderleyden.** 1994. Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. *Mol. Gen. Genet.* 243:463–472
- Criminger J.D., Hazen T.H., Sobecky P.A. & Lovell C.R.** 2007. Nitrogen fixation by *Vibrio parahaemolyticus* and its implications for a new ecological niche. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(18): 5959–5961.
- de-Bashan, L. E., and Bashan, Y.** (2008). Joint immobilization of plant growth-promoting bacteria and green microalgae in alginate beads as an experimental model for studying plant–bacterium interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6797–6802.
- Dobbelaere, S., A. Croonenborghs, A. Thys, A. Vande Broek, and J. Vanderleyden.** 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil* 212:155–164
- Dobbelaere S., Croonenborghs A., Thys A., Ptacek D., Vanderleyden J., Dutto P., Labandera-Gonzalez C., Caballero-Mellado J., Aguirre J.F., Kapulnik Y., Brener S., Burdman S., Kadouri D., Sarig S. & Okon Y.** 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust. J. Plant Physiol.* 28: 871-879.

- Döbereiner, J., and Day, L.** 1976. Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In “Proceedings First International Symposium on Nitrogen Fixation” (W. E. Newton and C. J. Nyman, Eds.), pp. 518–538. Washington State University Press, Pullman.
- Eckert B., Weber O.B., Kirchof G., Halbritter A., Stoffels M. & Hartmann A.** 2001. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. Int. J. Syst. Evol. Bacteriol. 51: 17–26.
- Elmerich C.** 2007. Historical Perspective: from Bacterization to Endophytes. In: Elmerich C. & Newton W.E. (eds.), Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations. 1–20.
- Euzéby J.P.** 1997. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet. Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 590-592. (List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Last full update: February 26, 2009. URL: <http://www.bacterio.net>).
- Falk E. C., Johnson J. L., Baldani V. L. D., Dobereiner J., And Krieg N. R.** 1986. Deoxyribonucleic and Ribonucleic Acid Homology Studies of the Genera *Azospirillum* and *Conglomeromonas*. Int. J. Syst. Evol. Bacteriol, 36: 80-85
- Felsenstein J.** 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.
- Foster L.J.R., Kwan B.H. & Vancov T.** 2004. Microbial degradation of the organophosphorous pesticide, Ethion. FEMS Microbiol. Lett. 240(1): 49-53.
- Franche C., Lindström K. & Elmerich C.** 2008. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. Plant Soil, published on line 03 December 2008, doi 10.1007/s11104-008-9833-8.
- Fox G.E., Stackebrandt E., Hespell R.B., Gibson J., Maniloff J., Dyer T.A., Wolfe R.S., Balch W.E., Tanner R.S., Magrum L.J., Zablen L.B., Blakemore R., Gupta R., Bonen L., Lewis B.J., Stahl D.A., Luehrsen**

- K.R., Chen K.N. & Woese C.R.** 1980. The phylogeny of prokaryotes. *Science* 209: 457–463.
- Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D. & Bairoch A.** 2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 31: 3784-3788.
- Greer-Phillips Suzanne E., Stephens Bonnie B., and Gladys Alexandre.** 2004. An Energy Taxis Transducer Promotes Root Colonization by *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* 186: 6595–6604
- Gupta R.S.** 2000. The phylogeny of Proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 367-402.
- Gupta R.S.** 2001. The branching order and phylogenetic placement of species from completed bacterial genomes, based on conserved indels found in various proteins. *Int. Microbiol.* 4: 187-202
- Hartmann A. & Baldani J.I.** 2006. The Genus *Azospirillum*. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H. & Stackebrandt E. (eds.), *The Prokaryotes*, 3<sup>rd</sup> ed., Vol. 5, Springer-Verlag, New York. 115-140.
- Holguin G., Patten C.L. & Glick B.R.** 1999. Genetics and molecular biology of *Azospirillum*. *Biol. Fertil. Soils* 29:10-23.
- Holmes D.S. & Quigley M.** 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114: 193-197.
- Hsu S.F. & Buckley D.H.** 2009. Evidence for the functional significance of diazotroph community structure in soil. *ISME J.* 3: 124-136.
- Hubbell D.H. & Kidder G.** 2003. Biological nitrogen fixation. University of Florida IFAS Extension SL16. U.S.A.
- Itzigsohn, R., O. Yarden, and Y. Okon.** 1995. Polyhydroxyalkanoate analysis in *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* **41**:73–76.
- Jaeger, C. H., III, S. E. Lindow., W. Miller., E. Clark., and M. K. Firestone.** 1999. Mapping of sugar and amino acid availability in soil around roots with

- bacterial sensors of sucrose and tryptophan. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2685–2690.
- Janda J.M. & Abbott S.L.** 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* 45(9): 2761-2764.
- Kadouri, D., Jurkevitch, E. and Okon, Y.** 2003. Involvement of reserve material poly- $\beta$ -hydroxy butyrate (PHB) in *Azospirillum brasilense* in stress endurance and colonization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 3244–3250.
- Kaneko T., Minam isawa K., Isawa T., Nakatsukasa H., Mitsui H., Kawaharada Y., Nakamura Y., Watanabe A., Kawashima K., Ono A., Shimizu Y., Takahashi C., Minami C., Fujishiro T., Kohara M., Katoh M., Nakazaki N., Nakayama S., Yamada M., Tabata S., and Sato S.** 2010. Complete genomic structure of the cultivated rice endophyte *Azospirillum* sp.B510. *DNA RESEARCH* 17, 37-50.
- Kechris K.J, Lin J.C., Bickel P.J. & Glazer A.N.** 2006. Quantitative exploration of the occurrence of lateral gene transfer by using nitrogen fixation genes as a case study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 123(25): 9584–9589.
- Kennedy C. & Bishop P.** 2004. Genetics of Nitrogen Fixation and Related Aspects of Metabolism in Species of *Azotobacter*: History and Current Status. In: Klipp W., Masepohl B., Gallon J.R. & Newton W.E. (eds.), *Genetics and Regulation of Nitrogen Fixation in Free-Living Bacteria.* 27-52.
- Kennedy I.R., Choudhury A.T.M.A. & Kecskés M.L.** 2004. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biol. Biochem.* 36: 1229–1244.
- Khammas K.M., Ageron E., Grimont P.A. & Kaiser P.** 1989. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Res. Microbiol.* 140: 679.
- Kloepper J.W., Rodriguez-Ubana R., Zehnder G.W., Murphy J.F., Sikora E. & Fernández C.** 1999. Plant root-bacteria interactions in biological control of

soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. Austral. Plant Pathol. 28: 21-26.

**Lalucat J., Bennasar A., Bosch R., García-Valdés E. & J. Palleroni N.J.** 2006. Biology of *Pseudomonas stutzeri*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70(2): 510–547.

**Lavrinenko K, Chernousova E, Gridneva E, Dubinina G, Akimov V, Kuever J, Lysenko A, Grabovich M.** 2010. *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a novel diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. Int. J. Evol. Microbiol. 60: 2832-2837.

**Lin S.Y., Young C.C., Hupfer H., Siering C., Arun A.B., Chen W.M., Lai W.A., Shen F.T., Rekha P.D. & Yassin A.F.** 2009. *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59(4): 761-765.

**Lindemann W.C. & Glover C.R.** 2003. Nitrogen fixation by legumes. New Mexico state University Guide-129.U.S.A.

**Ludwig W. & Klenk H.P.** 2005. Overview: A Phylogenetic Backbone and Taxonomic Framework for Prokaryotic Systematics. In: Garrity G., Brenner D.J., Krieg N.R. & Staley J.T. (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2<sup>nd</sup> ed., Vol. 2, part A, Springer-Verlag, New York. 49-66.

**Magalhães F.M.M., Baldani J.I. Souto S.M., Kuykendall J.R. & Döbereiner J.** 1983. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. An. Acad. Bras. Cien. 55: 417-430.

**Malhotra M. & Srivastava S.** 2008. Organization of the *ipdC* region regulates IAA levels in different *Azospirillum brasilense* strains: molecular and functional analysis of *ipdC* in strain SM. Environ. Microbiol. 10(5): 1365-1373.

**Mantelin S. & Touraine B.** 2004. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. J. Exp. Bot. 55(394): 27-34.

**Martin-Didonet C.C., Chubatsu L.S., Souza E.M., Kleina M., Rego F.G., Rigo L.U., Yates M.G. & Pedrosa F.O.** 2000. Genome structure of the genus *Azospirillum*. J. Bacteriol. 182: 4113-4116.

- Mehnaz S. & Lazarovits G.** 2006. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microb. Ecol.* 51: 326-335.
- Mehnaz S., Weselowski B. & Lazarovits G.** 2007a. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 620-624.
- Mehnaz S., Weselowski B. & Lazarovits G.** 2007b. *Azospirillum zae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 620-624.
- Molla, A. H., Shamsuddin, Z. H., and Saud, H. M.** 2001. Mechanism of root growth and promotion of nodulation in vegetable soybean by *Azospirillum brasilense*. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 32, 2177–2187.
- Moore E.R.B., Tindall B.J., Martins Dos Santos V.A.P., Pieper D.H., Ramos J.L. & Palleroni N.J.** 2006. Nonmedical: *Pseudomonas*. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H. & Stackebrandt E. (eds.), *The Prokaryotes*, 3<sup>rd</sup> ed., Vol. 6, Springer-Verlag, New York. 646-703.
- Moreno E.** 1998. Genome evolution within the alpha Proteobacteria: why do some bacteria not possess plasmids and others exhibit more than one different chromosome? *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 255-275.
- Pagnier Isabelle, Didier Raoult and Bernard La Scola** 2008. Isolation and identification of amoeba-resisting bacteria from water in human environment by using an *Acanthamoeba polyphaga* co-culture procedure. *Environ. Microbiol.* 10(5), 1135–1144
- Pedraza R.O.** 2007. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* doi10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.079.
- Pedrosa, F. O., M. P. Stephan, J. Döbereiner, and M. G. Yates.** 1982. Hydrogen-uptake hydrogenase activity in nitrogen-fixing *Azospirillum brasilense*. *J. Gen. Microbiol.* 128:161–166.



- Peng G., Wang H., Zhang G., Hou W., Liu Y. Wang E.T. & Tan Z.** 2006. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.* 56: 1263-1271.
- Poly F., Lucile L.J. & Bally R.** 2001. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Res. Microbiol.* 152: 95-103.
- Prinsen, E., A. Costacurta, K. Michiels, J. Vanderleyden, and H. Van Onckelen.** 1993. *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6:609–615.
- Raymond J., Siefert J.L., Staples C.R. & Blankenship R.E.** 2004. The natural history of nitrogen fixation. *Mol. Biol. Evol.* 21(3): 541–554.
- Rediers H., Vanderleyden J. & De Mot R.** 2007. Nitrate respiration in *Pseudomonas stutzeri* A15 and its involvement in rice and wheat root colonization. *Microbiol. Res.* doi:10.1016/j.micres.2007.03.003
- Reinhold B., Hurek T., Fendrik I., Pot B., Gillis M., Kertsers K., Thielemans D. & De Ley J.** 1987. *Azospirillum halopraeferans* sp. nov., a nitrogen fixing organism associated with roots of kallar grass [*Leptochloa fusca* (L.) Kunth.]. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 43-51.
- Rius N., Fusté M.C., Guasp C., Lalucat J. & Lorén J.G.** 2001. Clonal population structure of *Pseudomonas stutzeri*, a species with exceptional genetic diversity. *J. Bacteriol.* 183(2): 736-744.
- Rodrigues, E. P., Rodrigues, L. S., de Oliveira, A. L. M., Baldani, V. L. D., Teixeira, K. R. D., Urquiaga, S., and Reis, V. M.** 2008. *Azospirillum amazonense* inoculation: Effects on growth, yield and N<sub>2</sub>-fixation of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Soil* 302, 249–261
- Potrich DP, Passaglia LMP and Schrank IS.** 2001. Partial characterization of *nif* genes from the bacterium *Azospirillum amazonense*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34: 1105–1113.

- Saitou N. & Nei M.** 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sarita S., Priefer U.B., Prell J. & Sharma P.K.** 2008. Diversity of *nifH* gene amplified from rhizosphere soil DNA. *Curr. Sci.* 94(1): 109-115.
- Schmid M. & Hartmann A.** 2007. Molecular Phylogeny and Ecology of Root Associated Diazotrophic  $\alpha$ - and  $\beta$ -Proteobacteria. In: Elmerich C. & Newton W.E. (eds.), *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*. 21-40.
- Sikorski J., Lalucat J. & Wackernage W.** 2005. Genomovars 11 to 18 of *Pseudomonas stutzeri*, identified among isolates from soil and marine sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1767-1770.
- Skerman V.B.D., McGowan V. & Sneath P.H.A.** 1980. Approved Lists of Bacterial Names. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30: 225-420.
- Skerman, V. B. D., L. I. Sly, and M. L. Williamson.** 1983. *Conglomeromonas largomobilis* gen. nov., sp. nov., a sodium-sensitive, mixed-flagellated organism from fresh waters. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33:300–308.
- Sly L.I. & Stackebrandt E.** 1999. Description of *Sermanella parooensis* gen. nov., to accommodate *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* following the transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 541.
- Smith D.R., Doucette-Stamm L.A., Deloughery C.** 1997. Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics. *J. Bacteriol.* 179: 7135-55.
- Somers E., Vanderleyden J. & Srinivasan M.** 2004. Rhizosphere signalling: A love parade beneath our feet. *Crit. Rev. Microbiol.* 30: 205-240.
- Somers, E., Ptacek, D., Gysegom, P., Srinivasan, M., and Vanderleyden, J.** 2005. *Azospirillum* brasilense produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1803–1810

- Spaepen S., Vanderleyden J. & Remans R.** 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signalling. *FEMS Microbiol. Rev.* 31: 425–448.
- Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M., Grimont P.A.D., Kämpfer P., Maiden M.C.J., Nesme X., Rosselló-Mora R., Swings J., Trüper H.G., Vauterin L., Ward A.C. & Whitman W.B.** 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.
- Steenhoudt O. & Vanderleyden J.** 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 487-506.
- Steenhoudt, O., Ping, Z., Vande Broek, A., and Vanderleyden, J.** (2001). A spontaneous chlorate-resistant mutant of *Azospirillum brasilense* Sp245 displays defects in nitrate reduction and plant root colonization. *Biol. Fertil. Soils* 33, 317–322.
- Stephan, M. P., W. Zimmer, and H. Bothe.** 1984. Denitrification by *Azospirillum brasilense* Sp7. II: Growth with nitrous oxide as respiratory electron acceptor. *Arch. Microbiol.* 138:212–216
- Stoffels, M., T. Castellanos, and A. Hartmann.** 2001. Design and application of new 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for the *Azospirillum-Skermanella-Rhodocista-Cluster*. *Syst. Appl. Microbiol.* 24:83–97.
- Tamura K., Nei M. & Kumar S.** 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbour-joining method. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 11030-11035.
- Tamura K., Dudley J., Nei M. & Kumar S.** 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- Tarrand J.J., Krieg N.R. & Döbereiner J.** 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description a new genus, *Azospirillum* gen. nov., and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 24: 967-980.

- Thamizh Vendan R. & Thangaraju M.** 2007a. Development and standardization of cyst based liquid formulation of *Azospirillum* bioinoculant. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 54: 167-177.
- Thamizh Vendan R. & Thangaraju M.** 2007b. Standardization of dosage of liquid and cyst formulations of *Azospirillum* for different application methods. *Acta Agron. Hung.* 55: 475–484.
- Thompson J.D., Higgins D.G. & Gibson T.J.** 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Tilak K.V.B.R., Ranganayaki N., Pal K.K., De R., Saxena A.K., Shekhar Nautiyal C., Mittal S., Tripathi A.K. & Johri B.N.** 2005. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Curr. Sci.* 89(1): 136-150.
- Van Dommelen, A., V. Keijers, E. Somers, and J. Vanderleyden.** 2002. Cloning and characterisation of the *Azospirillum brasilense glnD* gene and analysis of a *glnD* mutant. *Mol. Genet. Genomics* 266:813–820
- Vande Broek A and Vanderleyden J.** 1995. The genetics of the *Azospirillum*-plant root association. *Crit Rev Plant Sci* 14: 445–466
- 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.
- Vial, L., C. Lavire, P. Mavingui, D. Blaha, J. Haurat, Y. Moe`nne-Loccoz, R. Bally, and F. Wisniewski-Dye´.** 2006. Phase variation and genomic architecture changes in *Azospirillum*. *J. Bacteriol.* 188:5364–5373.
- Vitousek P.M., Cassman K., Cleveland C., Crews T., Field C.B., Grimm N.B., Howarth R.W., Marino R., Martinelli L., Rastetter E.B. & Sprent J.I.** 2002. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry* 57/58: 1–45.

- Waller A.S., Cox E.E., & Edwards E.A.** 2004. Perchlorate reducing microorganisms isolated from contaminated sites. *Environ. Microbiol.* 6(5): 517-527.
- Westby, C.A., Enderlin, C.S., Steinberg, N.A., Joseph, C.M. and Meeks, J.C.** 1987. Assimilation of  $^{13}\text{NH}_4$  by *Azospirillum brasilense* grown under nitrogen limitation and excess. *J. Bacteriol.* 169: 4211-4214.
- Winkelman, G., K. Schmidtkunz, and F. Rainey.** 1996. Characterization of a novel *Spirillum*-like bacterium that degrades ferrioxamine-type siderophores. *BioMetals* 9:78–83.
- Xie C.H. & Yokota A.** 2005. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.* 55: 1435-1438.
- 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. U.S.A.* 105(21): 7564–7569.
- Young J.P.W.** 1992. Phylogenetic Classification of Nitrogen-Fixing Organisms. In: Stacey G., Burris R.H. & Evans H.J. (eds.), *Biological Nitrogen Fixation*. Chapman and Hall, New York. 43-86.
- Young C.C., Hupfer H., Siering C., Ho M.J., Arun A.B., Lai W.A., Rekha P.D., Shen F.T., Hung M.H., Chen W.M. & Yassin A.F.** 2008. *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.* 58: 959-963.
- Zehr J.P., Jenkins B.D., Short S.M. & Steward G.F.** 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ. Microbiol.* 5(7): 539-554.

**Zhou Yu, Wei Wei, Xu Wang, Lihong Xu and Ren Lai.** 2009. *Azospirillum palatum* sp. nov., isolated from forest soil in Zhejiang province, China. J. Gen. Appl. Microbiol., 55, 1-7

**Zuckerkindl E. & Pauling L.** 1965a. Molecules as documents of evolutionary history. J. Theor. Biol. 8: 357-366.

**Zuckerkindl E. & Pauling L.** 1965b. Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: Bryson V. & Vogel H.J. (eds.), *Evolving Genes and Proteins*. Academic Press, New York. 97-166.