

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας

ΣΚΑΓΙΑ Δ. ΑΓΓΕΛΙΚΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Χαρακτηρισμός και Φυλογενετική ανάλυση συμβιωτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα φυμάτια της

Medicago marina



ΑΘΗΝΑ 2012

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας

Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας

Βιοτεχνολογία & Εφαρμογές στη Γεωπονία

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Χαρακτηρισμός και Φυλογενετική ανάλυση συμβιωτικών
βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα φυμάτια της
Medicago marina

ΑΓΓΕΛΙΚΗ Δ. ΣΚΑΓΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2012

Επιβλέπων Καθηγητής: Παναγιώτης Κατινάκης

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Χαρακτηρισμός και Φυλογενετική ανάλυση συμβιωτικών
βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα φυμάτια της
Medicago marina

ΑΓΓΕΛΙΚΗ Δ. ΣΚΑΓΙΑ

Τριμελής συμβουλευτική και εξεταστική επιτροπή

1. Καθηγητής Παναγιώτης Κατινάκης (Επιβλέπων)
2. Επίκουρος Καθηγητής Ιορδάνης Χατζηπαυλίδης (Μέλος)
3. Λέκτορας Αναστασία Ταμπακάκη (Μέλος)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Μοριακή Οικολογία & Ανίχνευση Γενετικά Τροποποιημένων Οργανισμών» του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου κ. Κατινάκη Παναγιώτη κυρίως για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την υπομονή που έκανε κατά τη διάρκεια υλοποίησης της εργασίας. Όπως επίσης και για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση του, για την επίλυση διάφορων θεμάτων που προέκυψαν καθόλη τη διάρκεια των πειραμάτων.

Τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, Επίκουρο Καθηγητή κ. Χατζηπαυλίδη Ιορδάνη και Λέκτορα κ. Ταμπακάκη Αναστασία για τον χρόνο που μου αφιέρωσαν και τις πολύτιμες συμβουλές.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Διδάκτορα κ. Βεζύρη Έλενα για την καθοδήγηση, τις γνώσεις και τις συμβουλές της στην πραγματοποίηση του πειραματικού μέρους και την Διδάκτορα κ. Βενιεράκη Αναστασία για την πολύτιμη βοήθεια της.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω το υπόλοιπο επιστημονικό προσωπικό του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία και την βοήθεια τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τους γονείς μου και τον αδερφό μου για την βοήθεια, την αγάπη και τη συνεχή συμπαράσταση που πάντα δείχνουν σε ότι επιλέξω να κάνω.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	9
SUMMARY	10
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	2
1.1. Το γένος <i>Medicago</i> και αναλυτική αναφορά σε σημαντικά είδη	11
1.1.1. <i>Medicago spp</i>	11
1.1.2. Το γένος <i>Medicago</i> στην Ελλάδα	13
1.1.3. <i>Medicago marina</i>	15
1.1.5. <i>Medicago truncatula</i>	19
1.2. Μοριακό άζωτο και Αζωτοδέσμευση	22
1.2.1. Το μοριακό άζωτο και η βιολογική δέσμευση αζώτου	22
1.2.2. Η δέσμευση του μοριακού αζώτου και το ενζυμικό σύμπλοκο της νιτρογενάσης	23
1.2.3. Μη συμβιωτική αζωτοδέσμευση	26
1.2.4. Συμβιωτική αζωτοδέσμευση	28
1.2.5. Μοντέλο συμβίωσης ριζοβίου - ψυχανθούς	30
1.2.6. Ανταλλαγή μεταβολικών προϊόντων μεταξύ ριζοβίου - ψυχανθούς	32
1.3. Το γένος <i>Sinorhizobium</i>	33
1.3.1. Τα χαρακτηριστικά του γένους <i>Sinorhizobium/Ensifer</i>	33
1.3.2. Το μοντέλο συμβίωσης <i>Sinorhizobium- Medicago</i>	34
1.4. Το είδος <i>Sinorhizobium meliloti</i> και αναφορά σε στελέχη του είδους	35
1.4.1. Χαρακτηριστικά του είδους <i>Sinorhizobium meliloti</i>	35
1.4.2. Τυπικό στέλεχος, <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	36
1.4.3. Τα στελέχη <i>S. meliloti</i> AK83 και BL225C, σύγκριση με το τυπικό στέλεχος 1021	38
1.4.4. Το στέλεχος <i>Sinorhizobium meliloti</i> SM11	40
1.5. Το είδος <i>Sinorhizobium medicae</i>	42
1.6. Αβιοτικό στρες στο είδος <i>Sinorhizobium meliloti</i>	44
1.6.1. Αλατότητα	44
1.7. Ταξινόμηση και φυλογενετικοί δείκτες: μοριακή ανάλυση γονιδίων	46
1.7.1. Ταξινόμηση και φυλογένεση	46
1.7.2. Μοριακή ανάλυση γονιδίου 16S rRNA	48
1.7.3. Μοριακή ανάλυση γονιδίου <i>nifH</i>	2
1.7.4. Μοριακή ανάλυση γονιδίου <i>nodC</i>	3

1.7.5. Μοριακή ανάλυση IGS ή ITS περιοχής	4
2. Σκοπός της εργασίας	7
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	8
3.1. Βακτηριακά στελέχη	8
3.2. Απομόνωση νουκλεϊνικών οξέων.....	9
3.2.1. Απομόνωση ολικού γονιδιωματικού DNA από Gram (-) βακτήρια.....	9
3.2.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα <i>E.coli</i>	10
3.3. Ανάλυση νουκλεϊνικών οξέων	13
3.3.1. Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων.....	13
3.3.2. Πέψη DNA με χρήση ενζύμων (ενδονουκλεασών) περιορισμού.....	13
3.3.3. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αγαρόζης.....	14
3.3.4. Ανάκτηση κλάσματος DNA από πηκτή αγαρόζης.....	16
3.4. Υποκλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακό φορέα	17
3.4.1. Χαρακτηριστικά πλασμιδιακού φορέα.....	17
3.4.2. Ενσωμάτωση τμημάτων DNA με τυφλά άκρα στον πλασμιδιακό φορέα (ligation)	18
3.5. Μετασχηματισμός κυττάρων <i>E. coli</i>	19
3.5.1. Υγρές και στερεές καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i>	19
3.5.2. Δημιουργία βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> ικανών για μετασχηματισμό (Competent cells).....	19
3.5.3. Μετασχηματισμός ικανών κυττάρων <i>E. coli</i> με πλασμίδια.....	20
3.6. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	21
3.6.1. Αρχή της μεθόδου	21
3.6.2. Ενίσχυση τμήματος DNA (PCR).....	23
3.7. Σύγκριση ακολουθιών – φυλογενετική ανάλυση	24
3.8. Μελέτη της ανάπτυξης του <i>S. meliloti</i> σε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl	25
3.8.1. Καλλιέργεια βακτηριακών στελεχών <i>S. meliloti</i>	25
3.8.2. Οπτική πυκνότητα	25
3.8.3. Τελικές καλλιέργειες μέτρησης της αλατότητας.....	26
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	30
4.1. Μοριακή ανάλυση γονιδίου 16S rRNA.....	30
4.1.1. Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου 16S rRNA	30
4.1.4. Φυλογενετικό δέντρο των 9 ακολουθιών 16S rRNA	31
4.2. Μοριακή ανάλυση γονιδίου <i>nifH</i>	33
4.2.1. Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου <i>nifH</i>	33

4.2.2. Φυλογενετικό δέντρο των 9 ακολουθιών <i>nifH</i>	34
4.3. Μοριακή ανάλυση γονιδίου <i>nodC</i>	36
4.3.1. Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου <i>nodC</i>	36
4.3.2. Φυλογενετικό δέντρο των 9 ακολουθιών <i>nodC</i>	37
4.4. Μοριακή ανάλυση ITS1 περιοχής	39
4.4.1. Ενίσχυση τμήματος της διαγονιδιακής περιοχής ITS1	39
4.4.2. Φυλογενετικό δέντρο των 9 ακολουθιών ITS1	40
4.5. Μοριακή ανάλυση των ακολουθιών REP και ERIC	42
4.5.1. Ενίσχυση των ακολουθιών REP	42
4.5.2. Ενίσχυση των ακολουθιών ERIC	43
4.6. Μελέτη της ανάπτυξης του <i>S. meliloti</i> σε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl	45
4.6.1 Καμπύλες ανάπτυξης όλων των στελεχών σε 0%, 3% και 5% NaCl	45
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	49
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	2

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γένος *Medicago* L. ανήκει στην οικογένεια *Fabaceae* (*Leguminosae*) και περιλαμβάνει περίπου 83 είδη συμπεριλαμβανομένου το κτηνοτροφικής αξίας ψυχανθές *Medicago sativa* και το μοντέλο ψυχανθές *Medicago truncatula*. Στην Ελλάδα συγκεκριμένα έχουν καταγραφεί μέχρι τώρα 34 είδη από τα οποία, τα 7 είναι πολυετή και τα 27 ετήσια. Το είδος *Medicago marina* αυτοφυές απαντάται σε παράκτιους οικότοπους (αμμοθινικά συστήματα) στην Ελλάδα και σε άλλες Μεσογειακές χώρες. Αν και το είδος είναι πολύ διαδεδομένο στη λεκάνη της Μεσογείου, λίγες μελέτες έχουν ασχοληθεί με τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια που δημιουργούν συμβιωτική σχέση με αυτό. Ο στόχος της παρούσας διατριβής αποτέλεσε την ταυτοποίηση με μοριακές μεθόδους 9 στελεχών αζωτοδεσμευτικών συμβιωτικών βακτηρίων, τα οποία συλλέχθηκαν από τα φυμάτια του φυτού *Medicago marina* προερχόμενα από διάφορα παράκτια συστήματα αμμοθινών στην Ελλάδα. Η μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας των στελεχών πραγματοποιήθηκε με βάση την μοριακή ανάλυση των γονιδίων 16S rRNA, *nifH*, *nodC* και της διαγονιδιακής περιοχής ITS1. Επίσης πραγματοποιήθηκε και η μοριακή ανάλυση των REP και ERIC ακολουθιών. Η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι όλα τα στελέχη ανήκουν στο είδος *Sinorhizobium meliloti*. Επιπλέον, μελετήθηκε η ανάπτυξη των απομονωθέντων βακτηρίων σε συνθήκες υψηλής αλατότητας όπου τέσσερα από τα στελέχη εμφάνισαν ανοχή σε αυτές τις συνθήκες.

Λέξεις-κλειδιά: *Medicago marina*, *Sinorhizobium meliloti*, αζωτοδεσμευτικά συμβιωτικά βακτηρία

Characterization and Phylogenetic analysis of symbiotic bacteria isolated from the nodules of *Medicago marina*

SUMMARY

Medicago marina is widespread in many coastal habitat in Greece and other Mediterranean countries. However, few studies are dealing with *M. marina*-nodulating rhizobia. In the present study, the genetic diversity of rhizobia species nodulating natural populations of *M.marina* grown in different coastal sand dune systems in Greece was assessed using 16S rRNA, ITS1, *nifH* and *nodC* analysis as well as rep-PCR and ERIC-PCR fingerprinting. The sequencing and phylogenetic reconstruction data clearly indicated that all tested strains are affiliated to *Sinorhizobium meliloti*. Furthermore, the salt tolerance of the isolated strains was assessed. Analysis of the data revealed that, although all tested strain were able to grow in 3% NaCl, only four out of nine *S. meliloti* strains were able to grow in 5% NaCl.

Keywords: *Medicago marina*, *Sinorhizobium meliloti*, rhizobia species

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Το γένος *Medicago* και αναλυτική αναφορά σε σημαντικά είδη

1.1.1. *Medicago* spp.

Το γένος μηδική (*Medicago* spp.) ανήκει στην οικογένεια *Fabaceae* (*Leguminosae*), την υποοικογένεια *Trigonellinae*, στην οποία συμπεριλαμβάνονται και τα γένη *Trigonella* και *Melilotus*. Η μεγάλη αυτή οικογένεια φαίνεται ότι έχει εμφανιστεί κατά την πρώιμη Κρητιδική ή Κρητιδική περίοδο (Brockwell, 1981).

Οι Lesins και Lesins (1979) προτείνουν ότι η περιοχή προέλευσης του γένους *Medicago* ήταν η βόρεια ακτή της Μεσογείου, αν και προηγούμενες μελέτες το τοποθετούν στον Καύκασο. Σήμερα τα περισσότερα είδη βρίσκονται σε χώρες που συνορεύουν ή είναι κοντά με την Μεσόγειο Θάλασσα, την Αραβική Χερσόνησο, το Ιράκ και τα ανατολικά Βαλκάνια (πολλά είδη είναι ενδημικά των περιοχών αυτών). Μόνο μερικοί αντιπρόσωποι του είδους *M. sativa* και τρεις αντιπρόσωποι του είδους *M. edgeworthii* εκτείνονται πολύ πέρα από αυτές τις περιοχές στην κεντρική, βόρεια και ανατολική Ασία (Maureira-Butler *et al.*, 2008). Γενικά τα είδη του γένους μπορούν σύμφωνα με την γεωγραφική τους εξάπλωση να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες: παγκόσμια (για είδη που βρίσκονται σε περισσότερες από μία ηπείρους ή γύρω από την λεκάνη της Μεσογείου), περιφερειακά (για είδη που βρίσκονται σε μια μεγάλη περιφερειακή ζώνη όπως είναι νότια ή δυτικά της λεκάνης της Μεσογείου) και ενδημικά (για είδη που φύονται σε μια περιορισμένη περιοχή, από μια μοναδική τοποθεσία έως μία ή δύο χώρες)(Bena *et al.*, 2005).

Σύμφωνα με την τελευταία ταξινομική μελέτη του γένους, αυτό περιλαμβάνει 83 είδη (Thanopoulos, 2007, Bena *et al.*, 2005), εκ των οποίων πολλά είναι ποώδη και μερικά θαμνώδη (Κοντσιώτου, 2005). Ο βιολογικός τους κύκλος μπορεί να είναι ετήσιος, διετής ή πολυετής. Το γένος περιλαμβάνει 34 είδη που είναι ετήσια και 22 που είναι πολυετή (Zribi *et al.*, 2004). Υπάρχει ένα πλήθος χαρακτήρων που χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση και την συστηματική ταξινόμηση των ειδών του γένους όπως είναι η παρουσία ξυλώδους ιστού, η δομή των κοτυληδόνων και ο αριθμός των χρωμοσωμάτων.

Το γένος *Medicago* περιλαμβάνει πολυπλοειδή και ανευπλοειδή είδη. Ο βασικός αριθμός του γένους εκτιμάται ότι είναι $x=8$, αν και μερικά ετήσια είδη έχουν $x=7$, όπου αυτός είναι και ο βασικός αριθμός του αδελφού γένους *Trigonella* (Steele *et al.*, 2010). Αυτά τα είδη είναι τα *M.*

constricta Dur., *M. praecox* DC., *M. polymorpha* L., *M. rigidula* (L.) All. και το *M. murex* Willd (Hanson *et al.*, 1988). Τρία είδη πολυπλοειδίας έχουν βρεθεί μεταξύ των ειδών του γένους, διπλοειδή $2n=2x=14$ $2n=2x=16$, τετραπλοειδή ($2n=4x=32$) και εξαπλοειδή $2n=6x=48$. Τα είδη *M. scutellata* (L.) και *M. rugosa* Desr. έχουν $2n=30$ (Hanson *et al.*, 1988).

Τα φυτά που ανήκουν στο γένος έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν συμβιωτική σχέση με βακτήρια του εδάφους που κοινώς αναφέρονται ως ριζόβια. Αυτή η συμβίωση είναι επωφελής για τα φυτά αφού αυτά τα βακτήρια όταν εποικούν τα φυμάτια στις ρίζες τους, δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό άζωτο και σχηματίζουν ενώσεις (αμμώνιο) που μπορούν να χρησιμοποιηθούν από αυτά για την ανάπτυξη τους (Berkum *et al.*, 2006).

Το γένος *Medicago* είναι από τα πιο εκτενώς μελετημένα γένη ψυχανθών λόγω της μεγάλης γεωργικής σημασίας που παρουσιάζει. Τα είδη μηδικής λόγω αυτής της συμβίωσης με τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια που ανήκουν στις α και β κλάσεις των Πρωτεοβακτηρίων, χρησιμοποιούνται στη βιολογική δέσμευση αζώτου στο έδαφος στο οποίο καλλιεργούνται. Έτσι αυξάνουν την οργανική του ουσία, προλαμβάνοντας την διάβρωση του (Zakhia *et al.*, 2004) και μειώνοντας τις ασθένειες, τα έντομα κ.ά. Μέσα από συστήματα αμειψισποράς των καλλιεργειών αναπτύσσουν γόνιμο εδαφικό υπόστρωμα για ωφέλιμους οργανισμούς που συμβάλλουν στην αύξηση της εδαφικής παραγωγικότητας (Κοντσιώτου, 2005). Άρα ουσιαστικά είναι καλοί άποικοι των φτωχών εδαφών κάτω από ακραίες κλιματολογικές συνθήκες. Το είδος *Medicago sativa* (alfalfa) είναι το πιο ευρέως καλλιεργούμενο ψυχανθές και η πιο σημαντική καλλιέργεια ζωοτροφών στον κόσμο, εκτιμάται ότι η παγκόσμια έκταση καλλιεργούμενης μηδικής είναι 32 εκατομμύρια εκτάρια. Επίσης άλλα είδη του γένους χρησιμοποιούνται ως μοντέλα για την μελέτη δέσμευσης του αζώτου (Steele *et al.*, 2010).

1.1.2. Το γένος *Medicago* στην Ελλάδα

Σε πρόσφατη έρευνα (Thanopoulos, 2007) για την ποικιλότητα του γένους *Medicago* βρέθηκε ότι η Ελλάδα είναι η δεύτερη χώρα παγκοσμίως μετά την Τουρκία σε αριθμό ειδών. Συγκεκριμένα έχουν καταγραφεί μέχρι τώρα 34 είδη από τα οποία, τα 7 είναι πολυετή και τα 27 ετήσια. Σ' αυτά θα πρέπει να προστεθεί ένα νέο ετήσιο είδος για την Ελλάδα, το *M. polyceratia* (L.) Trautv (Gustavsson). Ενώ η πλειονότητα των ειδών έχουν ποώδη μορφή, στην Ελλάδα εμφανίζονται επίσης δύο θάμνοι. Ανάμεσα στα είδη το *M. strasseri* (Greuter, Matthäs & Risse) είναι ενδημικό της Κρήτης και το *M. heyniana* (Greuter) ενδημικό του νοτιοανατολικού Αιγαίου. Η γεωγραφική εξάπλωση των ειδών του γένους *Medicago* παρουσιάζει δύο κύριες τάσεις: υπάρχουν είδη που βρίσκονται σχεδόν παντού ενώ άλλα έχουν καταγραφεί σε λίγες ή μόνο μια τοποθεσία. Τα είδη και οι περιοχές που αυτά έχουν καταγραφεί παρουσιάζονται στον πίνακα 1.1 που ακολουθεί.

Τα περισσότερα είδη φύονται σε ασβεστούχα, ασβεστολιθικά και σχιστολιθικά μητρικά πετρώματα, σε μηχανικές συστάσεις αμμώδεις, αμμοπηλώδεις και πηλώδεις και σε pH κυρίως αλκαλικό μέχρι μέτρια όξινο. Πολλά είδη, όπως το *M. lupulina* L., αναπτύσσονται σε ευρύτατο φάσμα συνθηκών ενώ ορισμένα, όπως το *M. marina* L. είναι πολύ εντοπισμένα.

Η σχέση του γένους *Medicago* με τη γεωργία στην Ελλάδα εντοπίζεται στη καλλιέργεια του *M. sativa* ssp. *Sativa* για ζωοτροφή. Όμως τα είδη του γένους *Medicago* απαντώνται και σε πολλά φυσικά οικοσυστήματα των οποίων τα φυτά χρησιμοποιούνται για βοσκή από τα φυτοφάγα ζώα (Thanopoulos, 2007).

Πίνακας 1.1: Τα είδη του γένους *Medicago* που έχουν καταγραφεί στην Ελλάδα και πληροφορίες για το βιολογικό τους κύκλο και τη γεωγραφική τους εξάπλωση (Thanopoulos, 2007)

Είδος	Βιολογικός κύκλος	Γεωγραφική εξάπλωση
<i>M. arborea</i> L.	πολυετής	Νησιά, νησίδες, παραθαλάσσια
<i>M. strasseri</i> Greuter, Matthäs & Risse	πολυετής	Κρήτη
<i>M. sativa</i> L. ssp. <i>sativa</i>	πολυετής	Σχεδόν σε όλες τις περιοχές
<i>M. sativa</i> L. ssp. <i>falcata</i> (L.) Arcang.	πολυετής	Σχεδόν σε όλες τις περιοχές
<i>M. prostrata</i> Jacq.	πολυετής	Χάσια, Β.Δ. Πίνδος, Βούρινος, Βέρμιο, Φαλακρό
<i>M. marina</i> L.	πολυετής	Σχεδόν σε όλες τις παραλιακές περιοχές
<i>M. carstiensis</i> Wulf.	πολυετής	Παγγαίο
<i>M. littoralis</i> Loisel.	ετήσιος	Σχεδόν σε όλες τις περιοχές σε χαμηλά υψόμετρα
<i>M. truncatula</i> Gaertn.	ετήσιος	Σχεδόν σε όλες τις περιοχές μέχρι 800 m, όχι στην Πίνδο και ορεινά Μακεδονίας
<i>M. doliata</i> Carmign.	ετήσιος	Δυτική και ανατολική κεντρική Ελλάδα, ανατολικό Αιγαίο, Κρήτη
<i>M. tuberculata</i> Retz. (Willd.)	ετήσιος	Σχεδόν σε όλες τις περιοχές μέχρι 800 m, όχι στην Πίνδο και ορεινά Μακεδονίας
<i>M. rigidula</i> (L.) All.	ετήσιος	Σχεδόν σε όλες τις περιοχές
<i>M. constricta</i> Durieu	ετήσιος	Ανατολική κατανομή μέχρι Φθιώτιδα και στη Μεσσηνία, Κεφαλονιά
<i>M. murex</i> Willd.	ετήσιος	Νότια Ελλάδα
<i>M. rugosa</i> Desr.	ετήσιος	Σχεδόν σε όλες τις περιοχές όχι στην Πίνδο, Θεσσαλία και ορεινά Μακεδονίας
<i>M. scutellata</i> (L.) Miller	ετήσιος	Σχεδόν σε όλες τις περιοχές όχι στην Πίνδο, Θεσσαλία και ορεινά Μακεδονίας
<i>M. blancheana</i> Boiss.	ετήσιος	Α. Αιγαίο, Θράκη
<i>M. intertexta</i> (L.) Miller	ετήσιος	Κέρκυρα, Κεφαλονιά, Μεσσηνία
<i>M. ciliaris</i> (L.) All.	ετήσιος	Δυτική και νότια Ελλάδα και ανατ. Αιγαίο
<i>M. muricoleptis</i> Tineo	ετήσιος	Δυτική Ελλάδα και Καβάλα
<i>M. minima</i> (L.) Bart.	ετήσιος	Σχεδόν σε όλες τις περιοχές
<i>M. praecox</i> DC.	ετήσιος	Σχεδόν σε όλες τις περιοχές
<i>M. coronata</i> (L.) Bartal	ετήσιος	Σχεδόν σε όλες τις περιοχές
<i>M. polymorpha</i> L.	ετήσιος	Σχεδόν σε όλες τις περιοχές
<i>M. arabica</i> (L.) Huds.	ετήσιος	Σχεδόν σε όλες τις περιοχές
<i>M. disciformis</i> DC	ετήσιος	Σχεδόν σε όλες τις περιοχές
<i>M. lupulina</i> L.	ετήσιος διετής, πολυετής	Σχεδόν σε όλες τις περιοχές
<i>M. heyriana</i> Greuter	ετήσιος	Νοτιανατολικό Αιγαίο
<i>M. orbicularis</i> (L.) Bartal	ετήσιος	Σχεδόν σε όλες τις περιοχές
<i>M. phrygia</i> (Boiss. & Bal.) E. Small	ετήσιος	Σάμος, Ικαρία
<i>M. fischeriana</i> (Ser.) Trautv.	ετήσιος	Σάμος
<i>M. medicaginoidea</i> (Retz.) E. Small	ετήσιος	Τυμφρηστός, Κλώκος Αχαΐας
<i>M. carica</i> (Huber-Mor.) E. Small	ετήσιος	Καστελόριζο
<i>M. orthoceras</i> (Kar. & Kit.) Trautv.	ετήσιος	Αλεξανδρούπολη
<i>M. polyceratia</i> (L.) Trautv	ετήσιος	Οίτη
<i>M. monspeliaca</i> (L.) Trautv.	ετήσιος	Σχεδόν σε όλες τις περιοχές

1.1.3. *Medicago marina*

Το είδος *Medicago marina* (παράλια ή θαλασσινή μηδική) είναι φυτό πολυετές. Έχει εύρωστη βαθιά ρίζα, μήκους 10-30 εκατοστών, βλαστούς πυκνούς, πολυάριθμους, που βγαίνουν από τη ρίζα, πλαγιαστούς με τάση ανόρθωσης, πλούσια διακλαδισμένους, μήκους 20-60 εκατοστών που καλύπτονται από άφθονες, λευκές, βαμβακόμορφες τρίχες. Τα φυλλάρια είναι ωοειδή-κωνοειδή πλατιά στο επάνω μισό μέρος, οδοντωτά και φέρουν τρίχες. Τα άνθη έχουν χρώμα κίτρινο, στεφάνη μήκους 5-8 χιλιοστών, κάλυκα καμπανοειδή με τρεις αιχμηρούς οδόντας, ταξιανθία βοτρυώδη με 5-16 άνθη. Οι λοβοί είναι βαμβακοειδώς τριχωτοί, δισκοειδείς, διάτρητοι στο κέντρο, διαμέτρου 5 χιλιοστών, με περίπου 2-4 σπείρες και απομακρυσμένα αγκάθια (Κοντσιώτου, 2005, Δαλιάνης, 1983). Φυτό του είδους παρουσιάζεται στην εικόνα 1.1.



Εικόνα 1.1: Φυτό του είδους *Medicago marina*.

Η θαλασσινή μηδική αυτοφυής απαντάται σε αμμώδεις περιοχές των Βαλκανίων, της Ασίας, της Μεσογειακής Ευρώπης, της Αφρικής και της Ωκεανίας (Δαλιάνης, 1983). Στην Ελλάδα είναι διαδεδομένη σε πολλούς παράκτιους οικότοπους και είναι γνωστή ως αρμυρίθρα του πελάγους. Συναντάται σε αμμώδεις παραλίες και σε αμμοθινικά συστήματα, υφάλμυρες λιμνοθάλασσες, υδροβιότοπους με φρέσκο και υπεραλατούχο νερό, προσχώσεις και παρόχθιες περιοχές (Thanopoulos, 2007).

Η αξία της παράλιας μηδικής συνίσταται στη διαμόρφωση αντιδιαβρωτικού τάπητα σε αμμώδη εδάφη και στο ότι είναι πολύτιμο φυτό για βοσκή ζώων (Κοντσιώτου, 2005, Δαλιάνης, 1983). Επίσης το αιθέριο έλαιο του φυτού χρησιμοποιείται ως διουρητικό αφέψημα για την αντιμετώπιση του ουρικού οξέος (Flamini *et al.*, 2003)

1.1.4. *Medicago sativa* L.

Η μηδική (*Medicago sativa* L.), γνωστή και με τα ονόματα καλλιεργούμενη, ήμερη, κοινό τριφύλλι, συχνά τριφύλλι ήμερο ή τριφύλλι γαλάζιο, είναι πολυετές φυτό, με μέσο ύψος 55-60 εκατοστά.

Είναι το μόνο χορτοδοτικό φυτό που καλλιεργείται από τους προϊστορικούς χρόνους ως σήμερα, με συνέπεια να περιορίζεται η δυνατότητα να καθοριστεί επακριβώς το κέντρο προέλευσής της. Από μελέτες συμπεραίνεται ότι είχε δύο διακριτά κέντρα προέλευσης. Το πρώτο κέντρο ήταν η ορεινή περιοχή της Υπερκαυκασίας και της Μικράς Ασίας και οι παρακείμενες ζώνες του βορειοδυτικού Ιράν. Σε αυτές τις περιοχές η μηδική ήταν αποδοτική καλλιέργεια αφού είχε αντοχή στον χειμώνα. Το δεύτερο κέντρο ήταν η κεντρική Ασία. Σε αυτές τις περιοχές η μηδική ήταν ευπαθής σε προσβολή από μύκητες. Στο Τουρκεστάν και σε άλλες περιοχές της κεντρικής Ασίας το κλίμα χαρακτηρίζεται από χαμηλή υγρασία, ζεστά, ξηρά καλοκαίρια και μέτρια κρύους χειμώνες. Ως εκ τούτου, η εξέλιξη της κεντρικής ασιατικής μηδικής σε μια περιοχή χαμηλής υγρασίας, παρουσιάζει έλλειψη ανθεκτικότητας των φύλλων στις ασθένειες και συγκριτικά χαμηλή ανθεκτικότητα στην ξηρασία. Ωστόσο μια πολύτιμη σειρά από χαρακτηριστικά εξελίχθηκαν υπό αυτές τις συνθήκες και συγκεκριμένα ανθεκτικότητα σε ασθένειες και έντομα, όπως βακτήρια μάρανσης (*Corynebacterium insidiosum*), νηματώδεις βλαστών (*Ditylenchus dipsaci*), άλλα παθογόνα και αφίδες (Hanson *et al.*, 1988).

Η μηδική διαδόθηκε από την νοτιοδυτική Ασία στην Ευρώπη με τους περσικούς πολέμους κατά της Ελλάδας τον 5^ο π.Χ. αιώνα, όπως αναφέρεται από τον Θεόφραστο (4^ο π.Χ. αιώνα) , καθώς αποτελούσε βασικό χόρτο εκτροφής του ιππικού των Περσών. Από την Ελλάδα πέρασε στην Ιταλία το 2^ο π.Χ. αιώνα και από εκεί με την εξάπλωση της Ρωμαϊκής Αυτοκρατορίας διαδόθηκε σε ολόκληρη την Ευρώπη. Στη συνέχεια μέσω της Ισπανίας πέρασε στην Αφρική, στο Μεξικό και από εκεί στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής το 18^ο αιώνα από όπου διαδόθηκε στη Ν.Ζηλανδία και στην Αυστραλία (Κοντσιώτου, 2005).

Στην Ελλάδα, αυτοφυές απαντάται στην ηπειρωτική χώρα και σε πολλά νησιά, συμπεριλαμβανομένων και ορισμένων από τις Κυκλάδες. Φτάνει σε υψόμετρο έως και 1500 μέτρων (Ιωάννινα). Είναι προσαρμοσμένη σε διαφορετικά περιβάλλοντα, συμπεριλαμβανομένων των υδροβιότοπων, λιβαδιών, εγκαταλελειμμένων χωραφιών και σε θέσεις αποβλήτων (Thanopoulos, 2007).

Είναι σταυρογονιμοποιούμενο είδος σε πολύ υψηλό ποσοστό (84,5-95%), αυτοτετραπλοειδές (2n=32 χρωμοσώματα) και χαρακτηρίζεται από μεγάλη παραλλακτικότητα χαρακτηριστικών.

Έχει εύρωστη βαθιά ρίζα, βλαστούς διακλαδισμένους με ή χωρίς τρίχες, φυλλάρια με μεγάλη παραλλακτικότητα σχήματος, μήκους 10-25 χιλιοστών, πλάτους 3-20 χιλιοστών, είναι στενά και ωοειδή, στενότερα στη βάση και κορυφή, οδοντωτά στο πάνω μέρος της περιμέτρου με μικρή εσοχή στην κορυφή. Στεφάνη μήκους 6-15 χιλιοστών, χρώμα ανοικτό κίτρινο ως ανοικτό ή σκούρο ιώδες, κάλυκας σωληνοειδής με επιμήκεις στενούς οδόντας μεγαλύτερους του κάλυκα. Ταξιανθία βότρυς, μήκους 1-2,5 εκατοστών, με 5 έως πάνω από 25 ανθίδια με λεπτό ισχυρό ποδίσκο άτριχο ή με χνούδι. Λοβοί σπειροειδείς με 2-4 σπείρες, σπόροι ωοειδείς, καρδιόσχημοι, χρώματος κεκριμαριού (Κοντσιώτου, 2005). Φυτά του είδους παρουσιάζονται στην εικόνα 1.2.



Εικόνα 1.2: Φυτά του είδους *Medicago sativa* L. Με χρώμα στεφάνης ανοικτό κίτρινο (αριστερά) και σκούρο ιώδες (δεξιά). (<http://sophy.u-3mrs.fr/photohtm/VI3903.HTM>)

Η μηδική είναι το πιο σημαντικό χορτοδοτικό ψυχανθές, χάρη στη μεγάλη παραγωγή χόρτου υψηλής ποιότητας, την εύκολη καλλιέργεια, το μικρό κόστος. Φυτό πολυετές με πολλές κοπές χόρτου το χρόνο (3 έως πάνω από 8) ανάλογα με τις εδαφοκλιματολογικές συνθήκες, την ποικιλία κ.ά., με υψηλή προσαρμοστικότητα σε διάφορα εδαφοκλιματικά περιβάλλοντα, με δυνατότητα να καλλιεργηθεί με ξηρικές και ποτιστικές συνθήκες (Κοντσιώτου, 2005). Η μηδική είναι μια από τις κύριες πηγές πρωτεϊνών για τα ζώα, με περισσότερα από 6.000 στρέμματα γης, μόνο στο Ιράν, καλλυμένων από την καλλιέργεια της (Lakzian *et al.*, 2008). Ως μέλος του γένους *Medicago* αναπτύσσει συμβιωτική σχέση με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, συγκεκριμένα του γένους *Sinorhizobium*.

Επίσης η μηδική είναι ένα από τα πιο φημισμένα φαρμακευτικά φυτά που παραδοσιακά χρησιμοποιείται για να βελτιώσει τη μνήμη, ως θεραπεία για τον πόνο των νεφρών, τον βήχα, τον μυϊκό πόνο. Χρησιμοποιείται ακόμα, ως αντιβιοτικό, αντιοξειδωτικό, αντιφλεγμονώδες, ομοιοπαθητικό. Φυτοχημικές μελέτες έχουν δείξει ότι το φυτό περιέχει φλαβονοειδή, αλκαλοειδή,

φυτοοιστρογόνα, κουμαρίνες, πεπτικά ένζυμα, τριτερπένια, σαπωνίνες και φυτοστερόλες. Έχει δειχθεί ότι το φυτό έχει αντικαρκινική δραστηριότητα εναντίον συγκεκριμένων τύπων λευχαιμικών κυττάρων σε ποντίκια και επιλεκτική τοξικότητα σε καρκινικά κύτταρα σκύλου *in vitro* (Doss *et al.*, 2011).

Η μηδική έχει δυνατότητα να καλλιεργηθεί σε όλο το Βόρειο και Νότιο πλάτος της εύκρατης ζώνης με μεγαλύτερη όμως προσαρμογή στα νοτιοδυτικά μέρη της Ασίας από όπου κατάγεται. Η καλλιέργεια της, στην Ελλάδα επανέρχεται τον 19^ο αιώνα, σε έκταση 92 στρέμματα, το έτος 1860 (Κοντσιώτου, 2005). Η καλλιεργούμενη έκταση με μηδική στην Ελλάδα κυμαίνεται από 1,5 έως 2,5 εκατομμύρια στρέμματα ετησίως. Καλλιεργείται σε ολόκληρη τη χώρα, ιδίως σε περιοχές πεδινές και ημιορεινές με ευνοϊκό κλίμα (ξηροθερμικό με υψηλές θερμοκρασίες το θέρος, μεγάλη φωτοπερίοδο, μέτριο ψύχος το χειμώνα) και σε γόνιμα εδάφη. Η μέση απόδοση του ξηρού χόρτου (σανός) ποτιστικής μηδικής μετά το πρώτο έτος κυμαίνεται από 1200-3000 Kg/στρ. και ξηρικής από 400-1500 Kg/στρ (Κοντσιώτου, 2005).

Η έρευνα στην καλλιεργούμενη μηδική είναι μεγάλη και συνεχίζεται σχεδόν σε όλες τις χώρες, λόγω των πολλών πλεονεκτημάτων της.

1.1.5. *Medicago truncatula*

Το είδος *Medicago truncatula* είναι φυτό ετήσιο. Τα φυτά είναι απλωτά. Οι βλαστοί είναι κατακείμενοι έως ανορθούμενοι, χνουδωτοί, τα φυλλάρια είναι αντρωειδή-σφηνοειδή ή ελαφρώς ρομβοειδή, οδοντωτά επάνω, με χνούδι στις δύο επιφάνειες. Τα παράφυλλα είναι πλατιά και βαθιά σχισμένα, τα άνθη κίτρινα, μήκος στεφάνης 5,5-7 χιλιοστά, μονήρη ή σε βότρυ μέχρι και 5, ο ποδίσκος του οποίου είναι μικρότερος από το μίσχο του φύλλου. Οι χέδρωπες έχουν μεγάλη παραλλακτικότητα με 4-6 σπείρες, μήκος 4-6 χιλιοστά, είναι κυλινδρικοί, επίπεδοι στα δύο τους άκρα, με αγκάθια παραλλάσσοντα έντονα (Κοντσιώτου, 2005). Παρακάτω παρουσιάζεται εικόνα του άνθους του είδους *Medicago truncatula* (εικόνα 1.3).

Το είδος *Medicago truncatula* αυτοφυές συναντάται σε όλες τις περιοχές γύρω από την λεκάνη της Μεσογείου. Οι αυτόχθονες αυτοί πληθυσμοί, παρουσιάζουν μια ανθεκτικότητα στην ξηρασία και την αλατότητα και αναπτύσσονται σε ένα ευρύ φάσμα εδαφών και περιβαλλοντικών συνθηκών.

Η κατανομή του είδους στην Ελλάδα είναι περιφερική. Ως επί το πλείστον συναντάται σε παράκτιες περιοχές της ηπειρωτικής χώρας έως και 800 μέτρα υψόμετρο, και στα νησιά του Ιονίου και του Αιγαίου Πελάγους. Το είδος είναι προσαρμοσμένο σε αμμώδεις περιοχές και υγρά λιβάδια, σε υγρά λιβάδια με είδη του γένους *Juncus*, σε περιοχές με έντονη υπερβόσκηση και υποβαθμισμένα φρύγανα, σε φρύγανα με πέτρες και βράχια, σε φρύγανα που κυριαρχεί το είδος *Coridothymus capitatus*, σε θάμνους από τα είδη *Quercus* sp. και *Pyrus spinosa*, σε περιοχές με το είδος *Q. pubescens*, σε δάσος με τα είδη *Q. coccifera*- *Phillyrea latifolia*, σε κωνοφόρα δάση, σε λιβάδια, σε αγρούς και χέρσα χωράφια, σε ελαιώνες, καθώς και ως ζιζάνιο στην καλλιέργεια δημητριακών και σε χώρους ρήψης απορριμμάτων (Thanopoulos, 2007).



Εικόνα 1.3: Άνθος του είδους *Medicago truncatula*. (<http://www.freenatureimages.eu/plants>)

Το είδος *Medicago truncatula* είναι στενά συγγενικό με το υψηλού αγρονομικά ενδιαφέροντος είδος *Medicago sativa*, έτσι η αξία του είδους αναγνωρίστηκε ήδη από το 1939 (Rose, 2008). Επίσης ως μέλος του γένους *Medicago* αναπτύσσει συμβιωτική σχέση με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια του γένους *Sinorhizobium* και συγκεκριμένα με το είδος *Sinorhizobium meliloti*, το πιο εκτενώς μελετημένο ριζόβιο.

Το 1990, Barker και συνεργάτες, πρότειναν το είδος *Medicago truncatula* ως φυτό- μοντέλο για την μοριακή γενετική μελέτη της συμβιωτικής σχέσης που αναπτύσσει το γένος *Medicago* με τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια. Το είδος *M. truncatula* είναι διπλοειδές ($2n = 2x = 16$) και αυτογονιμοποιείται, έχει σχετικά μικρό γονιδίωμα (~ 500 mbp) και χρόνο γενιάς ~3 μήνες υπό συνθήκες μεγάλης ημέρας (Barker *et al.*, 1990). Αυτά τα χαρακτηριστικά το κατέστησαν πιο κατάλληλο μοντέλο για έρευνα από το σταυρογονιμοποιούμενο και αυτοτετραπλοειδές είδος *M. sativa*, με το οποίο δεν είναι δυνατή η απόκτηση ομόζυγων διαγονιδιακών σειρών (Chabaud *et al.*, 1995). Επίσης η δυνατότητα του να μετασχηματίζεται από το *Agrobacterium tumefaciens* και να αναγεννάται μέσω σωματικής εμβρυογένεσης το καθιστά κατάλληλο για συνδιασμό μοριακών και γενετικών μελετών. Το 1989, Nolan και συνεργάτες, δημοσίευσαν ένα πρωτόκολλο για την επιλογή ενός εξαιρετικά αναγεννητικού γονότυπου του είδους, μετά από αρκετούς κύκλους *in vitro* αναγέννησης, την ποικιλία Jemalong. Αυτός ο ιδιαίτερα αναγεννητικός γονότυπος μπορούσε να μετασχηματίζεται τόσο με το βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens* όσο και με το *A. rhizogenes* (Chabaud *et al.*, 1995).

Το είδος *Medicago truncatula* ήταν το επίκεντρο συζήτησης και έρευνας, για αρκετές συνεδριάσεις και εργαστήρια στις Ηνωμένες Πολιτείες και την Ευρώπη τη δεκαετία του 1990. Οι "Ετικέττες Μεταγραφόμενων Ακολουθιών" (Expressed Sequence Tags, ESTs) αναπτύχθηκαν ραγδαία, ξεκινώντας με τρίχες της ρίζας του *Medicago truncatula* και σήμερα υπάρχουν 268.712 *M. truncatula* ESTs στη βάση δεδομένων The Gene Index Project. Ο πρώτος δημοσιευμένος γενετικός χάρτης δημιουργήθηκε από τους Thoquet και συνεργάτες (2002) με τη χρήση δύο ομόζυγων σειρών (Jemalong 6 και του Αλγερινού φυσικού πληθυσμού DZA3150) (Rose, 2008). Η αλληλούχηση του γονιδιώματος άρχισε το 2002 (Young *et al.* 2005) και συνεχίζεται μέχρι σήμερα (<http://www.medicago.org/genome/>).

Επίσης το φυτό εκτός από μοντέλο της συμβιωτικής σχέσης που αναπτύσσει με το *Sinorhizobium meliloti* έχει αποδειχθεί χρήσιμο μοντέλο και για μελέτες μυκκοριζικών αλληλεπιδράσεων, επιτρέποντας έτσι την άμεση σύγκριση των δύο αυτών τύπων συμβιωτικής σχέσης (Oldroyd και Geurts, 2001). Ακόμα έχει χρησιμοποιηθεί για την έρευνα της αλληλεπίδρασής του με νηματώδεις και αφίδες και την μελέτη μηχανισμών αντοχής σε παθογόνα (Rose, 2008).

Το *Medicago truncatula* είναι ένα πολύτιμο είδος για την μελέτη της αλληλεπίδρασης του φυτού με το περιβάλλον του, έχουν βρεθεί πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες και γονίδια που σχετίζονται με αποκρίσεις στο αβιοτικό στρες όπως είναι η ξηρασία και η αλατότητα. Τέλος έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει τα σήματα από τους ωφέλιμους οργανισμούς και να έχει τις κατάλληλες αναπτυξιακές αποκρίσεις.

1.2. Μοριακό άζωτο και Αζωτοδέσμευση

1.2.1. Το μοριακό άζωτο και η βιολογική δέσμευση αζώτου

Το μοριακό άζωτο (N₂) είναι το κύριο συστατικό (περίπου 80%) της ατμόσφαιρας της γης. Το άζωτο ανακαλύφθηκε από τον Daniel Rutherford το 1772. Βρέθηκε να είναι τόσο αδρανές που ο Αντουάν Λαβουαζιέ το ονόμασε "άζωτο", που σημαίνει "χωρίς ζωή". Το μοριακό άζωτο, διάζωτο (N₂), έχει έναν ισχυρά τριπλό δεσμό και έτσι δύσκολα δέχεται ή δωρίζει ηλεκτρόνια. Σαν αέριο ή υγρό, το άζωτο είναι άχρωμο και άοσμο. Υπάρχουν δύο αλλοτροπικές μορφές στερεού αζώτου, με τη μετάβαση από την α στη β μορφή να λαμβάνει χώρα στους -237⁰C (Cheng, 2008).

Το άζωτο είναι ένα στοιχείο που αποτελεί ουσιαστικό συστατικό πολλών χημικών ενώσεων βασικών για την ζωή, όπως οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα. Ωστόσο, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα από τα βιολογικά συστήματα για την κατασκευή των χημικών ουσιών που απαιτούνται για την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή. Πριν από την ενσωμάτωσή του σε ένα ζωντανό σύστημα, το μοριακό άζωτο πρέπει πρώτα να συνδυαστεί με το στοιχείο του υδρογόνου. Αυτή η διαδικασία αναγωγής του N₂, που συνήθως αναφέρεται ως «δέσμευση του αζώτου» (N-σταθεροποίηση) μπορεί να επιτευχθεί με χημική ή βιολογική μέθοδο (Hubbell και Kidder, 2003).

Το άζωτο (N) είναι το πιο συχνά απαντόμενο, περιοριστικό, θρεπτικό συστατικό στοιχείο για την ανάπτυξη των φυτών. Αυτό προκύπτει από τη συνεχή απώλεια του αποθεματικού αζώτου, σε μορφή ενώσεων ή ανηγμένο, το οποίο είναι παρόν στο έδαφος και είναι διαθέσιμο για χρήση από τα φυτά. Διαδικασίες που μειώνουν συνεχώς το αποθεματικό άζωτο είναι η μικροβιακή απονιτροποίηση, η διάβρωση του εδάφους, η έκπλυση, η χημική πτητικότητα και η απόπλυση. Επομένως, πρέπει να αναπληρώνονται περιοδικά τα αποθέματα αζώτου, προκειμένου να διατηρείται ένα επαρκές (μη περιοριστικό για την ανάπτυξη) επίπεδο για τη φυτική παραγωγή. Αυτή η αντικατάσταση του αζώτου στο έδαφος συνήθως επιτυγχάνεται με την προσθήκη χημικών ενώσεων αζώτου, με τη μορφή των εμπορικών ανόργανων λιπασμάτων, ή από τη δραστηριότητα των βιολογικών συστημάτων δέσμευσης αζώτου.

Η γενική χημική αντίδραση αναγωγής του αζώτου είναι η ίδια τόσο για χημικές όσο και για βιολογικές διαδικασίες.



Η αναγωγή του αζώτου, είτε επιτυγχάνεται χημικά είτε βιολογικά, απαιτεί ένα μεγάλο ποσό ενέργειας. Η χημική διεργασία που χρησιμοποιείται για την παραγωγή λιπασμάτων χρησιμοποιεί τεράστιες ποσότητες ορυκτών καυσίμων ως πηγή ηλεκτρονίων, ατόμων υδρογόνου και ενέργειας. Τα υλικά αυτά είναι μη ανανεώσιμα και, τελικά, εξαντλήσιμα. Στην βιολογική αζωτοδέσμευση οι μικροοργανισμοί αποκτούν την απαιτούμενη ενέργεια από την οξείδωση των υδατανθράκων που έχουν συσταθεί από τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα των φυτών. Φυσικά η ενέργεια για τη φωτοσύνθεση προέρχεται από το φως του ήλιου. Συνεπώς η ενέργεια για την βιολογική αζωτοδέσμευση, εμμέσως, προέρχεται από μια καθολικά διαθέσιμη και ανεξάντλητη πηγή.

Η βιολογική δέσμευση αζώτου είναι η βασικότερη διαδικασία μέσω της οποίας το ατμοσφαιρικό άζωτο μετατρέπεται σε αφομοιώσιμες μορφές για τα φυτά και τα ζώα και συνεισφέρει 100-290 Kg αζώτου/εκτάριο/έτος στη βιόσφαιρα (Hsu και Buckley, 2009). Προσφέρει τα μεγαλύτερα ποσά αφομοιώσιμων μορφών αζώτου και εκτιμάται ότι έχει διπλάσια συνεισφορά, παγκοσμίως, από το ποσό που δεσμεύεται μη βιολογικά.

Η ικανότητα ενός βιολογικού συστήματος να δεσμεύει το άζωτο εξαρτάται από την παρουσία ενός συγκεκριμένου ενζυμικού συμπλόκου που είναι γνωστό ως νιτρογενάση.

Τουλάχιστον, 90 γένη εξειδικευμένων μικροοργανισμών (αζωτοδεσμευτικοί) είναι γνωστό ότι έχουν το ενζυμικό σύμπλοκο της νιτρογενάσης (Unkonovich και Baldock, 2008). Αυτοί οι μικροοργανισμοί δημιουργούν δύο τύπους αζωτοδέσμευσης, ανάλογα με τη σχέση που αναπτύσσουν με το φυτό, μη συμβιωτική αζωτοδέσμευση ή συμβιωτική αζωτοδέσμευση (Tilak *et al.*, 2005).

1.2.2. Η δέσμευση του μοριακού αζώτου και το ενζυμικό σύμπλοκο της νιτρογενάσης

Η γενική χημική αντίδραση αναγωγής του αζώτου ($N_2 + 3H_2 + \text{energy} \rightarrow 2NH_3$), όπως αναφέρθηκε, είναι ίδια και για την βιολογική και για την χημική δέσμευση του αζώτου (Hubbell και Kidder, 2003). Ουσιαστικά πρέπει να σπάσει ο τριπλός δεσμός και τρία άτομα υδρογόνου να ενωθούν με καθένα από τα τρία άτομα αζώτου. Ο κύκλος του αζώτου (το ελάχιστο) περιλαμβάνει πέντε αναγωγικές και τρεις οξειδωτικές αντιδράσεις (Ferguson, 1998). Η βιολογική αζωτοδέσμευση γίνεται μέσω της δράσης του ενζυμικού συμπλόκου της νιτρογενάσης. Η νιτρογενάση είναι ένα ενζυμικό σύμπλοκο ασταθές παρουσία οξυγόνου και τα γονίδια που την κωδικοποιούν είναι πολύ συντηρημένα μεταξύ των αζωτοδεσμευτικών οργανισμών (Franché *et al.*, 2009).

Η νιτρογενάση καταλύει την μετατροπή του N₂ σε NH₄⁺, όπως παρουσιάζεται από την εξίσωση (Halbleib και Ludden, 2000):

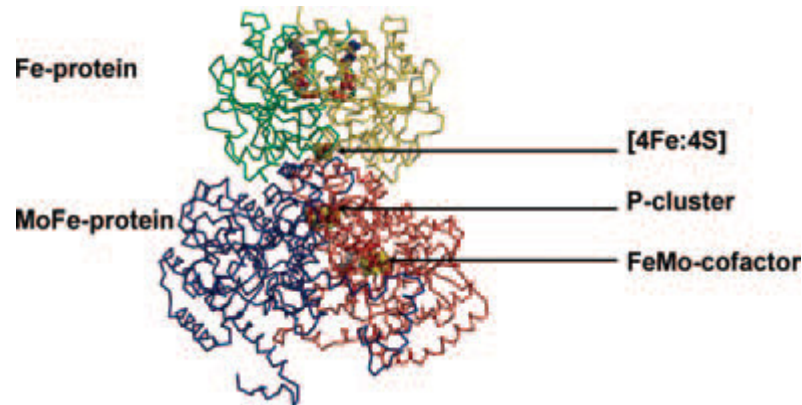


Το ενζυμικό σύμπλεγμα της νιτρογενάσης αποτελείται από δύο πρωτεϊνικά μόρια, όπου η συνεργασία τους είναι απαραίτητη για τη δέσμευση και την αναγωγή του μοριακού αζώτου. Αποτελείται από δύο μεταλλοπρωτεΐνες, οι οποίες παρουσιάζουν υψηλά συντηρημένη ακολουθία και δομή ανάμεσα στους αζωτοδεσμευτικούς μικροοργανισμούς (Dean και Jacobsen, 1992). Το ένα πρωτεϊνικό μόριο ονομάζεται δινιτρογενάση ή σίδηρο- μολυβδαίνο- πρωτεΐνη (Fe-Mo-πρωτεΐνη). Έχει μοριακό βάρος περίπου 250 kDa και αποτελείται από δύο ετεροδιμερή (είναι δηλαδή ένα ετεροτετραμερές της μορφής α₂β₂), που κωδικοποιούνται από τα *nifD* και *nifK* γονίδια (Zehr *et al.*, 2003) και περιλαμβάνει δύο άτομα μολυβδαινίου ανά μόριο, σε αντίστοιχα Fe-MoS σύμπλοκα. Η λειτουργία της είναι να δρα ως ενεργό κέντρο για την αναγωγή του αζώτου. Το δεύτερο πρωτεϊνικό μόριο ονομάζεται Fe-πρωτεΐνη ή αναγωγάση της δινιτρογενάσης και έχει μοριακό βάρος περίπου 70 kDa. Αποτελείται από δύο πανομοιότυπες υπομονάδες (είναι δηλαδή ένα διμερές της μορφής α₂) και κωδικοποιείται από το *nifH* γονίδιο. Περιέχει ένα σύμπλοκο [4 Fe 4S]₂⁻ ανά διμερές. Παίξει το ρόλο του κέντρου ενεργοποίησης των ηλεκτρονίων που μεταβιβάζονται, ένα κάθε φορά, στη δινιτρογενάση. Η δομή του ενζυμικού συμπλόκου της νιτρογενάσης παρουσιάζεται στην εικόνα 1.4.

Η νιτρογενάση έχει την ικανότητα, εκτός από το μοριακό άζωτο να ανάγει και μια σειρά από άλλα υποστρώματα όπως για παράδειγμα τα πρωτόνια που ανάγονται προς μοριακό υδρογόνο: (2H⁺ + 2e⁻ → H₂). Παρουσία επαρκών συγκεντρώσεων ακετυλενίου, η νιτρογενάση το ανάγει μετατρέποντάς το σε αιθυλένιο: (CH≡CH + 2e⁻ + 2H⁺ → H₂C=CH₂). Η αντίδραση αυτή χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της δραστηριότητας της νιτρογενάσης (Heldt, 1999).

Η δέσμευση του μοριακού αζώτου και η παραγωγή του υδρογόνου γίνεται από την δινιτρογενάση, ενώ για κάθε ηλεκτρόνιο που ενεργοποιείται και μεταφέρεται μέσω της νιτρογενάσης απαιτείται υδρόλυση δύο δεσμών ATP. Αναλυτικά τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το δότη ηλεκτρονίων (φερρεδοξίνη ή φλαβοδοξίνη) στην Fe-πρωτεΐνη, ένα κάθε φορά, και στη συνέχεια στην Fe-Mo-πρωτεΐνη. Η μεταφορά των ηλεκτρονίων μεταξύ των δύο συστατικών της νιτρογενάσης προϋποθέτει το σχηματισμό συμπλόκου μεταξύ τους, για τον οποίο απαιτείται η ενεργοποίηση της Fe-πρωτεΐνης, με τη δέσμευση δύο μορίων MgATP. Η μεταφορά ηλεκτρονίων στο άζωτο συνδέεται με την υδρόλυση των δύο μορίων MgATP σε MgADP. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο διαχωρίζεται και η Fe-πρωτεΐνη ανάγεται με το πέρασμα ενός ηλεκτρονίου από την

φερρεδοξίνη, αντικαθιστά τα δύο μόρια MgADP με δύο MgATP και ο κύκλος αρχίζει εκ' νέου. Γίνεται φανερό, ότι η αντίδραση που καταλύει η νιτρογενάση είναι ενεργειακά δαπανηρή, αφού καταναλώνονται 16 ATP και 8 ηλεκτρόνια ανά αναγόμενο μόριο αζώτου (Zehr *et al.*, 2003).



Εικόνα 1.4: Παρουσιάζεται το ενζυμικό σύμπλοκο της νιτρογενάσης (Fe-πρωτεΐνη και MoFe-πρωτεΐνη). Οι επιμέρους υπομονάδες της Fe-πρωτεΐνης φαίνονται με πράσινο και κίτρινο χρώμα. Ενώ της MoFe-πρωτεΐνης, οι α- και β-υπομονάδες είναι χρώματος κόκκινου και μπλε, αντίστοιχα. Οι μη-πρωτεϊνικές ομάδες εμφανίζονται σε μια παράσταση που γεμίζει το χώρο, με το φθόριο και το μαγνήσιο να έχουν χρώμα πορτοκαλί και πράσινο, αντίστοιχα (Cheng Qi, 2008).

Η δράση της νιτρογενάσης αναστέλλεται παρουσία νιτρικών ιόντων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγές αζώτου καθώς και παρουσία αμμωνιακών ιόντων.

Τα υπεύθυνα γονίδια σύνθεσης και λειτουργίας της νιτρογενάσης, τα οποία εντοπίζονται στο ίδιο οπερόνιο, ονομάζονται *nif* γονίδια (nitrogen fixation γονίδια). Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα *nif* γονίδια εντοπίζονται σε ένα ή περισσότερα μεγάλα σε μέγεθος και συν-μεταγραφόμενα οπερόνια που εκφράζουν όχι μόνο τις υπομονάδες της νιτρογενάσης αλλά και ένα σύνολο πρωτεϊνών σχετικών με τη ρύθμιση της βιοσύνθεσης, τη μεταφορά μετάλλων κ.α (Raymond *et al*, 2004).

Δεν παρουσιάζουν όλοι οι αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί τον ίδιο αριθμό *nif* γονιδίων. Για παράδειγμα το ελεύθερης διαβίωσης αζωτοδεσμευτικό είδος *Klebsiella pneumoniae*, έχει ένα σύμπλεγμα 20 γονιδίων, εκ' των οποίων τα 12 γονίδια συμβάλλουν στην σύνθεση, επεξεργασία και στο σχηματισμό του ενζυμικού συμπλόκου της νιτρογενάσης. Σε αντίθεση το γονιδίωμα των ριζοβίων παρουσιάζει λιγότερα *nif* γονίδια. Τα βακτήρια του γένους *Bradyrhizobium* και το είδος *A. caulinodans* έχουν ένα σύμπλεγμα 12 *nif* γονιδίων, ενώ τα είδη *S. meliloti* and *R. leguminosarum* bv. *viciae* έχουν ένα σύμπλεγμα 9 και 8 *nif* γονιδίων αντίστοιχα, που τους ορίζει ως εκείνους τους αζωτοδεσμευτικούς μικροοργανισμούς με τον μικρότερο αριθμό *nif* γονιδίων.

Τα γονίδια που αποτελούν τον πυρήνα των *nif* γονιδίων είναι τα : i) δομικά γονίδια που κωδικοποιούν την αναγωγή της δινιτρογενάσης (*nifH*) και τις α και β υπομονάδες της δινιτρογενάσης (*nifDK*), ii) τα *nifEN* που κωδικοποιούν το μοριακό ικρίωμα για τη συναρμολόγηση του σίδηρο-μολυβδαίνο-συμπαράγοντα iii) το *nifB*, του οποίου το γονιδιακό προϊόν συνθέτει ένα Fe-S, που αποτελεί πρόδρομη ένωση του FeMo-co και iv) το ρυθμιστικό γονίδιο *nifA* (Masson-Boivin *et al.*, 2009).

1.2.3. Μη συμβιωτική αζωτοδέσμευση

Η μη συμβιωτική αζωτοδέσμευση παρουσιάζει μεγάλη γεωπονική σημασία. Ο κύριος περιορισμός στη μη συμβιωτική δέσμευση του αζώτου είναι η διαθεσιμότητα των πηγών άνθρακα και ενέργειας, ώστε να βρεθεί η απαιτούμενη ενέργεια για την εντατική διαδικασία της δέσμευσης. Αυτός ο περιορισμός μπορεί να αντισταθμιστεί από τους μικροοργανισμούς με τη μετακίνηση πιο κοντά ή μέσα στα φυτά.

Οι εκκρίσεις της ρίζας των φυτών παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιλογή και στον εμπλουτισμό της από τους διάφορους τύπους βακτηρίων. Ανάλογα με τη φύση και τις συγκεντρώσεις των οργανικών συστατικών των εκκρίσεων, υπάρχει και η αντίστοιχη ικανότητα από τα βακτήρια να κάνουν χρήση αυτών ως πηγές ενέργειας, έτσι η βακτηριακή κοινότητα αναπτύσσεται στη ριζόσφαιρα. Υπάρχει μια συνέχεια της βακτηριακής παρουσίας από το χώμα → στη ριζόσφαιρα → στην επιφάνεια της ρίζας → εσωτερικά στους φυτικούς ιστούς. Σύμφωνα με αυτήν οι μικροοργανισμοί χωρίζονται σε αζωτοδεσμευτικούς που είναι παρόντες στη ριζόσφαιρα, σε αυτούς που είναι σε επαφή με την ριζική επιφάνεια και σε αυτούς που αναπτύσσονται ενδοφυτικά (Tilak *et al.*, 2005).

Τα βακτήρια που ζουν στο έδαφος ονομάζονται βακτήρια ελεύθερης διαβίωσης, καθώς η επιβίωσή τους δεν εξαρτάται άμεσα από τις ριζικές εκκρίσεις. Ωστόσο έχουν αποδοτικά συστήματα απορρόφησης και καταβολισμού των οργανικών ενώσεων που περιέχονται σε αυτές (Tilak *et al.*, 2005). Πολλά βακτήρια έχουν την ικανότητα να διαβιούν στην επιφάνεια της ρίζας (rhizoplane) που τους επιτρέπει να αποκομίζουν το μέγιστο όφελος από τις ριζικές εκκρίσεις. Επίσης μερικά από αυτά είναι πιο εξειδικευμένα, δεδομένου ότι έχουν την ικανότητα να διεισδύουν στο εσωτερικό των ιστών της ρίζας (endophytes) και να έχουν άμεση πρόσβαση στις οργανικές ενώσεις που υπάρχουν στον αποπλάστη. Καταλαμβάνοντας αυτή την προνομιακή

ενδοφυτική τοποθεσία, τα βακτήρια δεν έχουν να αντιμετωπίσουν τον ανταγωνισμό των ομολόγων τους, που υπάρχουν στην ριζόσφαιρα και στο έδαφος.

Τα βακτήρια που συνδέονται με τα φυτά μπορεί να είναι επιβλαβή αλλά και ευεργετικά. Τα PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria) είναι βακτήρια που προάγουν την ανάπτυξη του φυτού και επιδρούν θετικά στον εμπλουτισμό του εδάφους. Προάγουν την ανάπτυξη του φυτού μέσω άμεσων και έμμεσων μηχανισμών. Άμεσοι μηχανισμοί είναι για παράδειγμα, η δέσμευση του ατμοσφαιρικού αζώτου, η διαλυτοποίηση μετάλλων όπως ο φώσφορος, η παραγωγή σιδηροφόρων που διαλυτοποιούν και δεσμεύουν τον σίδηρο ή η έκκριση φυτοορμονών. Οι έμμεσοι μηχανισμοί είναι η βελτιστοποίηση των συνθηκών ανάπτυξης, είτε με την παραγωγή ανταγωνιστικών ουσιών ή προκαλώντας ανοχή σε παθογόνα. Κάποια στελέχη φαίνεται να έχουν 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 των φυτοπαθογόνων μυκήτων, βακτηρίων και ιών (Compant *et al.*, 2005, Kloepper *et al.*, 1999).

Ένας αριθμός βακτηριακών ειδών που σχετίζονται με την εγκαταστασή τους στην ριζόσφαιρα και είναι σε θέση να ασκήσουν ευεργετική επίδραση στην ανάπτυξη των φυτών ανήκουν στα γένη *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* και *Serratia* (Somers *et al.*, 2004).

Γενικά στους μη συμβιωτικούς οργανισμούς περιλαμβάνονται 20 γένη μη φωτοσυνθετικών αερόβιων (όπως τα γένη *Azotobacter*, *Beijerinckia*) και αναερόβιων βακτηρίων (όπως το γένος *Clostridium*). Μερικά από τα σημαντικότερα γένη είναι τα: *Achromobacter*, *Acetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Azomonas*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Derxia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas* και *Xanthobacter*.

Ένας σημαντικός αντιπρόσωπος των αζωτοδεσμευτικών μικροοργανισμών που είναι παρόντες στην ριζόσφαιρα είναι το γένος *Azospirillum*. Τα μέλη του γένους είναι μικροαερόφιλα βακτήρια που βρίσκονται στη ριζόσφαιρα και σχετίζονται με τη ρίζα φυτών μεγάλης γεωργικής σημασίας όπως είναι τα δημητριακά και τα σιτηρά (Tilak *et al.* 2005). Τόσο στους αγρούς όσο και στα θερμοκήπια φαίνεται να ασκούν ευεργετικές επιδράσεις στην ανάπτυξη και στις αποδόσεις των καλλιεργειών, κάτω από διάφορες κλιματικές και εδαφικές συνθήκες (Vial *et al.*, 2006).

Ένας αντιπρόσωπος μη φωτοσυνθετικών αερόβιων βακτηρίων είναι το γένος *Azotobacter* ενώ ενδοφυτικών μικροοργανισμών είναι το γένος *Acetobacter*. Τα ενδόφυτα, που χρησιμοποιούνται ως εμβόλια για τα φυτά (μη-ψυχανθή), απέδειξαν ότι είναι μια αποτελεσματική

πηγή αζώτου και ότι μπορεί να υποκαταστήσουν εν μέρει την αζωτοουρία στην καλλιέργεια του ρυζιού και άλλων δημητριακών (Bhattacharjee *et al.*, 2008).

1.2.4. Συμβιωτική αζωτοδέσμευση

Το 1885 ο Frank χρησιμοποίησε τον όρο συμβίωση απλά για να χαρακτηρίσει την συνύρπαξη δύο ανόμοιων οργανισμών. Όμως ο De Bary, χρησιμοποίησε τον όρο για να δηλώσει την κοινή διαβίωση παρασίτου-ξενιστή καθώς και τις σχέσεις βάση των οποίων οι οργανισμοί βοηθούν ο ένας τον άλλο (Smith *et al.*, 1997, Brundrett, 2004).

Η σημαντικότερη συνεισφορά στη βιολογική αζωτοδέσμευση προκύπτει από τη συμβιωτική σχέση ορισμένων μικροοργανισμών με τις ρίζες των ανώτερων φυτών. Τα συστήματα μη-συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης δεσμεύουν πολύ λιγότερο άζωτο απ'ότι τα συμβιωτικά συστήματα όπου οι ξενιστές παρέχουν απ'ευθείας στους συμβιόντες μικροοργανισμούς την απαιτούμενη ενέργεια και προστατεύουν το ενζυμικό σύστημα νιτρογενάσης από απενεργοποίηση λόγω του οξυγόνου (Unkovich και Baldock, 2008).

Η ιδιότητα της συμβίωσης δημιουργώντας φυμάτια στις ρίζες των φυτών για την δέσμευση του αζώτου βρίσκεται σε δύο μεγάλες ομάδες βακτηρίων που δεν σχετίζονται φυλογενετικά: τα ριζόβια (α - β *Proteobacteria*) που συνδέονται κυρίως με ψυχανθή φυτά που ανήκουν σε μία υπερκογένεια των αγγειόσπερμων (*Fabaceae*) και το γένος *Frankia* (ανήκει στα *Actinobacteria*) που συνδέεται με ένα ευρύτερο φάσμα φυτών από οκτώ οικογένειες (Franche *et al.*, 2009), σε αυτές περιλαμβάνονται περισσότερα από 280 είδη ξυλωδών φυτών.

Τα βακτήρια του γένους *Frankia*, δημιουργούν συμβιωτικές σχέσεις με το μεγαλύτερο μέρος των ξυλωδών ψυχανθών που απαντάται κυρίως σε τροπικές περιοχές καθώς και με μερικά που εντοπίζονται σε εύκρατες και αρκτικές περιοχές (Vitousek *et al.*, 2002). Είναι βακτήρια ινώδους μορφής και αναπτύσσονται ακτινωτά, γεγονός στο οποίο οφείλεται και η επωνομασία «ακτινομήκητες», που είναι και η ονομασία της οικογένειας στην οποία ανήκουν (Διαμαντίδης, 1994).

Στα ριζόβια συγκαταλλέγονται επτά γένη: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Rhizobium* και *Sinorhizobium*.

Μια ομάδα πολύ καλά μελετημένων ριζοβίων, είναι αυτή των ριζοβίων που μολύνουν τη σόγια. Όλα τα είδη που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα έχουν εντοπιστεί στην Κίνα. Χωρίζονται σε γρήγορους και αργούς καλλιεργητές. Στους αργούς ανήκουν τρία είδη του γένους

Bradyrhizobium, το *Bradyrhizobium japonicum*, το *Bradyrhizobium liaoningense* και το *Bradyrhizobium elkanii*, ενώ στους γρήγορους ανήκουν τα είδη *Sinorhizobium fredii* και *S. xinjiangense* (Appunu *et al.*, 2008).

Τα μόνα μη-ψυχανθή που δημιουργούν μια αποτελεσματική συμβίωση με τα *Rhizobium* ή *Bradyrhizobium* είναι τα είδη *Parasponia* και *Tremma*.

Επίσης σε μερικά ψυχανθή δημιουργούνται φυμάτια όχι μόνο στην ρίζα αλλά και στον βλαστό και αυτό τα κάνει να αποτελούν ξεχωριστό τύπο συμβίωσης. Αυτή η ιδιαιτερότητα περιορίζεται σε 15 από τα 250 είδη του γένους *Aeschynomene*, σε 1 από τα 15 είδη του γένους *Neptunia* (*N. oleracea*), και σε 1 από τα 70 είδη του γένους *Sesbania* (*S. rostrata*). Ο σχηματισμός βλαστικών φυματίων είναι πιο διαδεδομένος σε συνθήκες κατάκλισης όπου δεν είναι δυνατός ο σχηματισμός φυματίων στις ρίζες (Tilak *et al.*, 2005). Επίσης στα φυμάτια του βλαστού δεν επηρεάζεται η δυνατότητα δέσμευσης αζώτου ακόμα και όταν οι ρίζες απορροφούν νιτρικά από το έδαφος. Το βακτήριο το οποίο εμπλέκεται σε αυτό τον τύπο συμβίωσης ανήκει στο γένος *Azorhizobium*.

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.*, 2009). Τα νηματώδη στελέχη είναι τα πιο σημαντικά αζωτοδεσμευτικά κυανοβακτήρια όπου διαφοροποιούνται ώστε να δημιουργηθούν ετεροκύστες. Οι ετεροκύστες είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένα κύτταρα που διαφοροποιούνται εντός νηματίου όπου εντοπίζεται η αζωτοδέσμευση όταν υπάρχει έλλειψη αζώτου (Elmerich, 2007). Οι σημαντικότεροι εκπρόσωποι των κυανοβακτηρίων είναι τα βακτήρια των γενών *Nostoc* και *Anabaena* (*Nostocales*).

1.2.5. Μοντέλο συμβίωσης ριζοβίου - ψυχανθούς

Μια από τις καλύτερα μελετημένες μορφές συμβίωσης είναι αυτή μεταξύ των ριζοβίων και των ψυχανθών φυτών. Πρόκειται για μια μορφή συμβίωσης μεγάλης οικολογικής σημασίας που εμφανίζεται σε όλες τις ηπείρους και αποτελεί το ένα τέταρτο της ετήσιας ποσότητας αζώτου που δεσμεύεται στον πλανήτη (Masson-Boivin *et al.*, 2009). Η μοναδική ικανότητα των ψυχανθών να δεσμεύουν ατμοσφαιρικό άζωτο σε συνεργασία με τα ριζόβια αναγνωρίστηκε ήδη από την «Νέα ώθηση» και τις συνέπειες της για τα εδάφη της Αρχαίας Ελλάδας που καταγράφηκε από τον Θεόφραστο (370 - 285 π.Χ.), καθώς και η χρήση των ψυχανθών στην αμειψισπορά ήταν ευρέως διαδεδομένη πρακτική στη ρωμαϊκή αυτοκρατορία (Brockwell, 1981). Το αποτέλεσμα της συμβιωτικής αυτής σχέσης είναι ο σχηματισμός ενός νέου φυτικού οργάνου, με ιδιαίτερα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά, το οποίο όπως έχει αναφερθεί, ονομάζεται φυμάτιο.

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ούτε τα ψυχανθή φυτά ούτε τα ριζόβια μπορούν να δεσμεύσουν άζωτο. Σε καθαρή καλλιέργεια, τα ριζόβια είναι ικανά να δεσμεύουν άζωτο μόνα τους, όταν αυτά αναπτύσσονται κάτω από μικροαερόφιλες συνθήκες, όμως χρειάζονται οξυγόνο για να παράγουν ενέργεια για την δέσμευση του αζώτου. Αλλά το ενζυμικό σύστημα της νιτρογενάσης απενεργοποιείται παρουσία οξυγόνου. Το φυτό όμως περιορίζει την ελεύθερη διάχυση οξυγόνου με δύο, κυρίως, τρόπους. Τα κύτταρα του παρεγχύματος με τους πολύ μικρούς μεσοκυττάριους χώρους, αποτελούν ένα φυσικό εμπόδιο στη ελεύθερη διάχυση του οξυγόνου, με αποτέλεσμα η συγκέντρωσή του εντός του κεντρικού ιστού να διατηρείται πολύ χαμηλότερη. Επιπλέον, η συγκέντρωση του ελεύθερου οξυγόνου εντός του κεντρικού ιστού ελέγχεται από την παρουσία της ψυχανθαιμοσφαιρίνης, μιας φυτικής πρωτεΐνης ανάλογης των ζωικών αιμοσφαιρινών, που έχει την ικανότητα να δεσμεύει το μοριακό οξυγόνο. Η ψυχανθαιμοσφαιρίνη βρίσκεται εξωτερικά της περιβακτηριακής μεμβράνης μέσα στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου-ξενιστή και μάλιστα μπορεί να αποτελεί το 40% της ολικής πρωτεΐνης των φυματίων και είναι αυτή που τους δίνει το χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα. Η ψυχανθαιμοσφαιρίνη είναι υπεύθυνη για την μεταφορά του οξυγόνου προς τα βακτηριοειδή, σε μορφή που δεν επηρεάζει την νιτρογενάση, με σκοπό την ικανοποίηση των αναγκών της αναπνευστικής τους δραστηριότητας (Heldt, 1999).

Υπάρχει μια αντιστοιχία μεταξύ των ριζοβίων και των ψυχανθών. Συγκεκριμένο είδος ριζοβίου μπορεί να μολύνει συγκεκριμένο είδος φυτού και όχι άλλο. Επίσης, αν και μπορεί κάποιο στέλεχος βακτηρίου να μολύνει συγκεκριμένο ψυχανθή, δεν είναι πάντα ικανό να επάγει λειτουργικά φυμάτια. Αν ένα στέλεχος είναι γενετικά αναποτελεσματικό, τότε τα φυμάτια θα

είναι μικρά, λευκοπράσινα και ανίκανα να δεσμεύουν άζωτο. Αντίθετα, εάν ένα είδος είναι αποτελεσματικό, τα φυμάτια θα είναι μεγάλα, κοκκινωπά και ικανά να δεσμεύουν άζωτο. Η αποτελεσματικότητα αυτή καθορίζεται από γονίδια του βακτηρίου, που ονομάζονται, *nod* γονίδια.

Τα στάδια της μόλυνσης και της ανάπτυξης των φυματίων στη ρίζα είναι πια αρκετά καλά κατανοητά. Τα στάδια είναι: 1) η αναγνώριση του σωστού μέλους τόσο από την πλευρά του φυτού όσο και του βακτηρίου και η προσκόλληση του βακτηρίου στα ριζικά τριχίδια, 2) η έκκριση των *nod* παραγόντων από το βακτήριο, 3) η βακτηριακή εισβολή στα τριχίδια της ρίζας, 4) η μετακίνηση στην κύρια ρίζα μέσω του μολυσματικού νηματίου, 5) η διαμόρφωση των τροποποιημένων βακτηριακών κυττάρων, βακτηριοειδή, μέσα στα κύτταρα των φυτών και η ανάπτυξη του συστήματος για την δέσμευση του αζώτου και τέλος 6) η συνεχής διαίρεση των φυτών και των βακτηρίων και ο σχηματισμός των ώριμων φυματίων στην ρίζα (Brock).

Αναλυτικά, η προσκόλληση του βακτηρίου στο φυτό είναι το πρώτο βήμα για τον σχηματισμό φυματίων. Μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη προσκόλλησης που ονομάζεται ρικασυκολλιτίνη είναι παρούσα στην επιφάνεια των ειδών του γένους *Rhizobium* και *Bradyrhizobium*. Η ρικασυκολλιτίνη είναι μια ασβέστο-δεσμευόμενη πρωτεΐνη που η λειτουργία της έγκειται στο να δεσμεύει σύμπλοκα ασβεστίου στην επιφάνεια των ριζικών τριχιδίων. Άλλες ουσίες, όπως είναι οι λεκτίνες, πρωτεΐνες που περιέχουν υδατάνθρακες, και συγκεκριμένοι υποδοχείς στην κυτταρική μεμβράνη των φυτικών κυττάρων επίσης παίζουν ρόλο στην προσκόλληση του βακτηρίου στο φυτό.

Η αρχική διείσδυση των κυττάρων του ριζοβίου στα ριζικά τριχίδια γίνεται μέσω της άκρης των τριχιδίων. Μετά την δέσμευση, τα ριζικά τριχίδια αναδιαμορφώνονται ως αποτέλεσμα της δράσης ουσιών που εκκρίνονται από τα βακτήρια και ονομάζονται *nod* παράγοντες. Μετά την ελίκωση των ριζικών τριχιδίων, τα βακτήρια εισέρχονται σε αυτά και επάγουν τον σχηματισμό ενός κυτταρινικού σωλήνα από τα φυτά που ονομάζεται μολυσματικό νηματίο, το οποίο εκτείνεται ως το φλοιώδες παρέγχυμα της ρίζας. Στη συνέχεια μολύνονται από τα ριζόβια τα κύτταρα της ρίζας και μέσω των *nod* παραγόντων επάγεται η κυτταρική τους διαίρεση. Η συνεχόμενη κυτταρική διαίρεση των φυτικών κυττάρων οδηγεί στον σχηματισμό των φυματίων.

Οι *nod* παράγοντες είναι λιποολιγосακχαριτιδικής φύσεως και κωδικοποιούνται από τα *nodABC* γονίδια. Η έκκριση αυτών των παραγόντων προάγεται από δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών, τα ισοφλαβονοειδή. Τα φλαβονοειδή δεσμεύουν τις βακτηριακές NodD πρωτεΐνες, οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων LysR, και τις ενεργοποιούν ώστε να προάγουν την μεταγραφή των *nod* γονιδίων που οδηγεί στη μορφογένεση των φυματίων (Jones *et al.*, 2007). Τα ριζόβια παράγουν πολλές μορφές τέτοιων παραγόντων και οι δομές τους μπορούν να επηρεαστούν από το pH του περιβάλλοντος (Cooper, 2007). Τα γονίδια του

οπερονίου *nodABC*, κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την δημιουργία του δομικού πυρήνα των παραγόντων, ενώ τα γονίδια *noe* και *nol* καθιστούν τροποποιήσεις στους *nod* παράγοντες που τους μεταδίδουν την εξειδίκευση σε ξενιστή (Jones *et al.*, 2007).

Κατά το σχηματισμό του φυματίου το φυτό ξενιστής συνθέτει κάποιες πρωτεΐνες που ονομάζονται νοντουλίνες. Οι νοντουλίνες περιλαμβάνουν ένζυμα αποικοδόμησης των υδατανθράκων, του κύκλου του κιτρικού οξέος, της σύνθεσης της γλουταμίνης και της ασπαραγίνης καθώς και της σύνθεσης της ουρεΐδης. Οι πρώιμες νοντουλίνες εμπλέκονται στη διαδικασία της μόλυνσης και στο σχηματισμό των φυματίων. Οι όψιμες νοντουλίνες συντίθεται μόνο μετά το σχηματισμό των φυματίων (Heldt, 1999).

Τα ριζόβια πολλαπλασιάζονται γρήγορα μέσα στα φυτικά κύτταρα και μετατρέπονται σε φουσκωτές, παραμορφωμένες, διακλαδισμένες μορφές που ονομάζονται βακτηριοειδή. Τα βακτηριοειδή έχουν απαλλαχθεί από το κυτταρικό τους τοίχωμα και ο όγκος τους μπορεί να είναι ακόμα και δέκα φορές μεγαλύτερος από τον όγκο των ριζοβίων. Τα βακτηριοειδή περιβάλλονται από μία φυτικής προελεύσης μεμβράνη, την περιβακτηριακή μεμβράνη και έτσι χωρίζονται από το κυτταρόπλασμα των κυττάρων του ξενιστή μέσα σε μια δομή το συμβιώσωμα (Heldt, 1999). Μόνο μετά τον σχηματισμό του συμβιωσώματος ξεκινά η διαδικασία της αζωτοδέσμευσης.

1.2.6. Ανταλλαγή μεταβολικών προϊόντων μεταξύ ριζοβίου - ψυχανθούς

Όπως αναφέρθηκε η διαδικασία της αζωτοδέσμευσης απαιτεί την δράση του ενζυμικού συστήματος της νιτρογενάσης το οποίο εντοπίζεται μέσα στα βακτηριοειδή. Τα βακτηριοειδή είναι πλήρως εξαρτώμενα για τις ενεργειακές πηγές που χρειάζονται από τα φυτικά κύτταρα. Η κύρια ουσία που παρέχεται από το φυτό στα βακτηριοειδή είναι το μηλικό οξύ που παράγεται από τη σακχαρόζη. Η σακχαρόζη μεταβολίζεται από τη συνθάση της σακχαρόζης, αποδομείται μέσω της γλυκόλυσης σε φωσφοενολπυροσταφιλικό, το οποίο καρβοξυλιώνεται προς οξαλοξικό και το τελευταίο ανάγεται σε μηλικό οξύ.

Το μηλικό που εισέρχεται στα βακτηριοειδή οξειδώνεται από τον κύκλο του κιτρικού οξέος. Έτσι τα αναγωγικά ισοδύναμα που παράγονται αποτελούν την πηγή ενέργειας που χρειάζονται για την αζωτοδέσμευση (Heldt, 1999). Εκτός από το μηλικό στα βακτηριοειδή μεταφέρονται αμινοξέα και μια σειρά από ανόργανα θρεπτικά συστατικά απαραίτητα για την λειτουργία τους. Σε αυτά περιλαμβάνονται ο σίδηρος (Fe), το ασβέστιο (Ca), το βανάδιο (Va), το μολυβδαίνιο (Mo), το νικέλιο (Ni) και το κοβάλτιο (Co). Επιπλέον η διακίνηση ιόντων (Na) και καλίου (K)

έχει μεγάλη σημασία για την ιοντική και ωσμωτική ισορροπία κατά μήκος της βακτηριακής και περιβακτηριακής μεμβράνης.

Το μεγαλύτερο μέρος της αμμωνίας που παράγεται από τη δράση της νιτρογενάσης δε χρησιμοποιείται από τα βακτηριοειδή, λόγω της καταστολής των μηχανισμών αφομοίωσης. Αντίθετα, η αμμωνία διαχέεται ελεύθερα διαμέσου της βακτηριακής μεμβράνης στον περιβακτηριακό χώρο όπου πρωτονιώνεται αμέσως, λόγω της υψηλής οξύτητας, και μετατρέπεται σε αμμωνιακά ιόντα. Αυτά μεταφέρονται μέσω ενός ειδικού καναλιού της περιβακτηριακής μεμβράνης στο κυτταρόπλασμα του φυτικού κυττάρου. Εκεί μετατρέπονται κυρίως σε γλουταμίνη και ασπαραγίνη, τα οποία μεταφέρονται στη συνέχεια μέσω των αγγείων του ξυλώματος στα υπόλοιπα μέρη του φυτού.

1.3. Το γένος *Sinorhizobium*

1.3.1. Τα χαρακτηριστικά του γένους *Sinorhizobium/Ensifer*

Το γένος *Sinorhizobium* ανήκει στην κλάση των α-Πρωτεοβακτηρίων, στην τάξη *Rhizobiales* και στην οικογένεια *Rhizobiaceae*. Σύμφωνα με το εγχειρίδιο Συστηματικής Βακτηριολογίας του Bergey (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) η οικογένεια *Rhizobiaceae* περιλαμβάνει ριζόβια και αγροβακτήρια που ταξινομούνται σε τέσσερα γένη: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium* και *Phyllobacterium*. Από τότε ομάδες ριζοβίων και αγροβακτηρίων έχουν προστεθεί και αναθεωρηθεί σε επίπεδο γένους και είδους.

Το γένος *Sinorhizobium* συμπεριλαμβάνει μια ομάδα γρήγορα αναπτυσσόμενων βακτηρίων καθώς και το ριζόβιο *Rhizobium fredii* (Chen *et al.*, 1988, Kwon *et al.*, 2005).

Η παλαιότερη ονομασία του γένους ήταν *Ensifer*, δημοσιεύτηκε το 1982, και σημαίνει στα Λατινικά «κομιστής που φέρει σπαθί». Ενώ το όνομα *Sinorhizobium* δημοσιεύτηκε το 1988 και σημαίνει «ένα βακτήριο που ζει σε μια ρίζα στην Κίνα» (ετυμολογικά το συνδεδετικό sino- σημαίνει στα Μεσαιωνικά Λατινικά Κίνα, το συνδεδετικό rhizo- προέρχεται από την Ελληνική λέξη ρίζα και το συνδεδετικό bios- που σημαίνει ζωή). Σήμερα η επιστημονική κοινότητα αναφέρεται στο γένος χρησιμοποιώντας και τα δύο ονόματα, με πιο κοινό το *Sinorhizobium*, το οποίο χρησιμοποιείται και στην παρούσα εργασία.

Το γένος περιλαμβάνει 11 είδη, εκ των οποίων στα δύο έχει ολοκληρωθεί η αλληλούχηση του γονιδιώματος τους, το είδος *Sinorhizobium meliloti* και το είδος *Sinorhizobium medicae*.

Το γένος χαρακτηρίζεται από αερόβια, αρνητικά κατά Gram βακτήρια που διαβιούν στο έδαφος, ελεύθερα ή δημιουργώντας συμβιωτικές σχέσεις με ψυχανθή. Όλα τα είδη διαθέτουν ένα ή περισσότερα μαστίγια από πολύ-β-υδροξυβουτιρικό. Η δομή του κυτταρικού τους τοιχώματος είναι όμοια με αυτή των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Οι πεπτιδογλυκάνες αποτελούνται από γλουταμινικό οξύ, αλανίνη και αμινοσακχαρίτες. Η σύνθεση των πολυσακχαριτών στο κυτταρικό τοίχωμα ποικίλλει από είδος σε είδος, αλλά σίγουρα περιέχει 2-κετο-3-δεοξυοκτανεϊκό οξύ, ουρονικό οξύ, γλυκοζαμίνες, γλυκόζη και γαλακτόζη. Τα είδη του γένους συνήθως αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο YEM (Bergey).

1.3.2. Το μοντέλο συμβίωσης *Sinorhizobium-Medicago*

Η ολοκλήρωση της αλληλουχίας του γονιδιώματος του είδους *Sinorhizobium meliloti*, καθώς και η πρόοδος προς την ολοκλήρωση της ακολουθίας του γονιδιώματος του φυτού μοντέλου *Medicago truncatula*, έχουν οδηγήσει σε αύξηση του μοριακού χαρακτηρισμού των καθοριστικών παραγόντων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της συμβίωσης μεταξύ των ριζόβιων βακτηρίων και των ψυχανθών.

Το πρώτο βήμα για την δημιουργία της συμβίωσης, όπως έχει αναφερθεί, είναι η αμοιβαία ανταλλαγή των σημάτων που επιτρέπει στα βακτήρια να χρησιμοποιούν τα κύτταρα των ριζικών τριχιδίων ως ένα μέσο εισόδου. Οι φλαβονοειδείς ενώσεις που παράγονται από τα ψυχανθή είναι τα πρώτα μηνύματα που ανταλλάσσονται μεταξύ των συμβιωτών.

Το είδος *M. sativa* παράγει το φλαβονοειδές λουτεολίνη που δεσμεύεται με την ενεργό μορφή της NodD1 πρωτεΐνης του *S. meliloti* που ενεργοποιεί την μεταγραφή των *nod* γονιδίων. Το είδος *S. meliloti* έχει άλλες δύο NodD πρωτεΐνες, την NodD2 που προάγεται από φυτικά συστατικά και την NodD3, η οποία δεν απαιτεί φυτικής προέλευσης ενώσεις για την ενεργοποίηση των *nod* γονιδίων. Η έκφραση της NodD3 ελέγχεται από ένα πολύπλοκο ρυθμιστικό μονοπάτι. Οποιαδήποτε από αυτές τις NodD πρωτεΐνες μπορούν να παρέχουν στο βακτήριο τη δυνατότητα να δημιουργεί φυμάτια στο *M. sativa* (Perrett *et al.*, 2000). Τα φλαβονοειδή από φυτά μη-ξενιστές μπορούν να εμποδίσουν τη μεταγραφή των *nod* γονιδίων στο *S. meliloti*. Τα γονίδια που ενεργοποιούνται κωδικοποιούν τους *nod* παράγοντες που εκκρίνονται από το βακτήριο και είναι απαραίτητοι για την μορφογένεση των φυματίων.

Στη συνέχεια μετά την ελίκωση των ριζικών τριχιδίων τα βακτήρια εισέρχονται σε αυτά επάγοντας την δημιουργία του μολυσματικού νηματίου. Το είδος *S. meliloti* παράγει τον εξωπολυσακχαρίτη ηλεκτρογλυκάνη (EPSI) και την γαλακτογλυκάνη (EPSII), οι οποίες διευκολύνουν τον σχηματισμό του μολυσματικού νηματίου. Η ηλεκτρογλυκάνη είναι πιο αποτελεσματική στον σχηματισμό μολυσματικού νηματίου στο *M. sativa* απ'ότι η γαλακτογλυκάνη και είναι ο μοναδικός εξωπολυσακχαρίτης που παράγει και που μπορεί να σχηματίσει μολυσματικό νημάτιο στο *M. truncatula* (Pellock *et al.*, 2000).

Μέσω των ριζικών τριχιδίων τα βακτήρια μολύνουν και εισέρχονται στα κύτταρα της ρίζας, τα οποία αρχίζουν να διαιρούνται για να δημιουργηθεί το φυμάτιο. Τα βακτήρια αφού μετατραπούν σε βακτηριοειδή μαζί με τα φυτικά κύτταρα δημιουργείται το συμβιώσωμα για να ξεκινήσει η διαδικασία της αζωτοδέσμευσης. Το *NIP* γονίδιο είναι πιθανό ότι εμπλέκεται στην ανάπτυξη του συμβιωσώματος. Επίσης το μεταλλαγμένο στέλεχος του *S. meliloti* στο γονίδιο *hemA*, που έχει πρωταρχικό πρόβλημα στην βιοσύνθεση της αίμης, δεν απελευθερώνεται από το μολυσματικό νημάτιο και δεν κλείνεται σε συμβιώσωμα (Dickstein *et al.*, 1991). Αρκετά βακτηριακά συστατικά που είναι απαραίτητα για την συμβίωση απαιτούν την αίμη, όπως ο αισθητήρας οξυγόνου FixL και το κυτόχρωμα αιμικών πρωτεϊνών, αυτό εξηγεί και τον παραπάνω φαινότυπο. Τέλος το γονίδιο *bacA* του βακτηρίου, απαιτείται για την τροποποίηση του λιποσακχαρίτη (των λιπιδίων A συγκεκριμένα) της κυτταρικής του μεμβράνης ώστε να μπορεί να μετατραπεί σε βακτηριοειδές (Capela *et al.*, 2006).

1.4. Το είδος *Sinorhizobium meliloti* και αναφορά σε στελέχη του είδους

1.4.1. Χαρακτηριστικά του είδους *Sinorhizobium meliloti*

Το είδος *Sinorhizobium meliloti* είναι ένα αερόβιο, ετερότροφο βακτήριο του εδάφους που ανήκει στην τάξη *Rhizobiales*, στη κλάση των α-Πρωτεοβακτηρίων, η οποία περιλαμβάνει παθογόνα του ανθρώπου, όπως τα γένη *Bartonella* και *Brucella*, και πολλά βακτήρια που συνδέονται με τα φυτά και έχουν γεωργική σημασία, όπως τα γένη *Agrobacterium*, *Ochrobactrum*, *Bradyrhizobium* και *Mesorhizobium* (Galardini *et al.*, 2011).

Τα χαρακτηριστικά του είδους για την δομή του κυτταρικού του τοιχώματος είναι αυτά που έχουν περιγραφεί για το γένος. Τα κύτταρα του είδους έχουν 2-6 περίτριχα μαστίγια (Bergey).

Είναι μεσόφυλλο βακτήριο με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 25-30⁰C. Το είδος σχηματίζει λειτουργικά φυμάτια με πολλά ψυχανθή φυτά που ανήκουν στα γένη *Medicago*, *Melilotus* και *Trigonella*, και είναι πιθανόν το πιο καλά μελετημένο μοντέλο αζωτοδεσμευτικής συμβίωσης ριζοβίου-ψυχανθούς.

Το *Sinorhizobium meliloti* κατανέμεται σε όλο τον κόσμο και είναι παρόν σε πολλούς τύπους εδαφών. Αυτό συμβαίνει γιατί ο μεταβολισμός του παρουσιάζει μια δυνατότητα ευρέου φάσματος που του επιτρέπει να προσαρμόζεται σε πολύ διαφορετικές περιβαλλοντικές και διατροφικές συνθήκες. Συναντάται τόσο σε σχέση με τα ψυχανθή, όσο και ως βακτήριο που διαβιεί ελεύθερα. Τα στελέχη του είδους παρουσιάζουν μια ποικιλία φαινοτύπων για χαρακτηριστικά όπως η αντοχή στα αβιοτικά στρες και στην αλατότητα, η χρήση διαφορετικών πηγών άνθρακα, φωσφόρου, θείου και αζώτου, το pH και την παραγωγή εξωπολυσακχαριτών (Biondi *et al.*, 2009).

Το είδος λόγω της αζωτοδεσμευτικής σχέσης που αναπτύσσει με το αγρονομικό ενδιαφέροντος είδος *Medicago sativa* αλλά και γιατί ως α-Πρωτεοβακτήριο είναι συγγενικό με παθογόνα βακτήρια ζωικών και φυτικών οργανισμών, αποτελεί επίκεντρο έρευνας, μοριακών και γενετικών μελετών (Galibert *et al.*, 2001).

Το τυπικό στέλεχος του είδους είναι το *S.meliloti* 1021 του οποίου η αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματός του ολοκληρώθηκε το 2001. Στη συνέχεια ολοκληρώθηκε και η αλληλούχηση γονιδιωμάτων άλλων στελεχών, του στελέχους AK83 και του BL225C, όπως και του στελέχους SM11 που εκτείνουν την έρευνα στο παν-γονιδίωμα του είδους.

1.4.2. Τυπικό στέλεχος, *Sinorhizobium meliloti* 1021

Το τυπικό στέλεχος του είδους *Sinorhizobium meliloti* 1021, είναι το πρώτο στέλεχος του οποίου ολοκληρώθηκε η αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματός του και αντιπροσωπεύει το είδος.

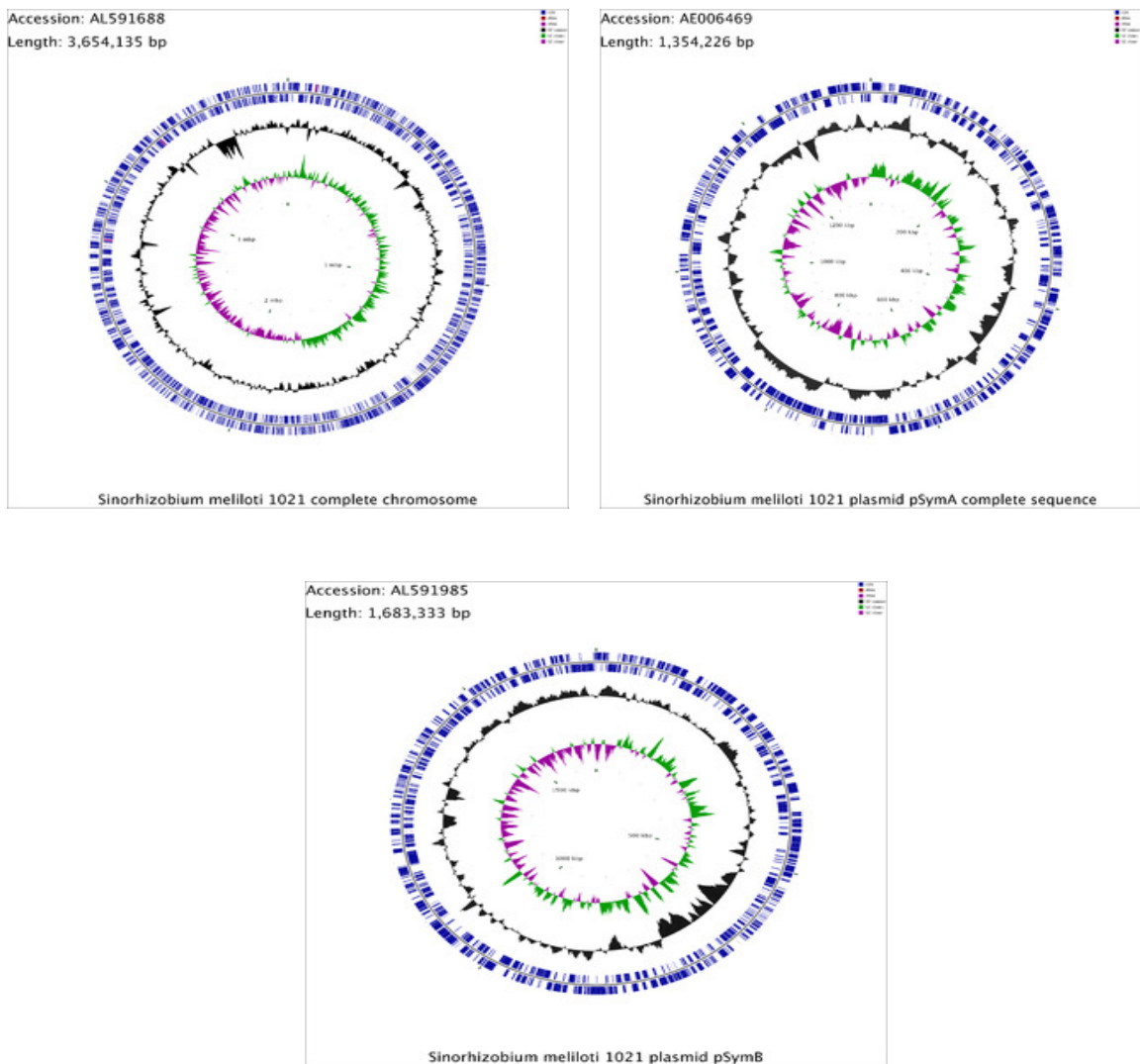
Το γονιδίωμα του *Sinorhizobium meliloti* αποτελείται από ένα χρωμόσωμα μεγέθους 3.65 Mb, και από δύο μεγαπλασμίδια, το pSymA μεγέθους 1.35 Mb και το pSymB μεγέθους 1.68 Mb. Το γονιδίωμα του δεν είναι ιδιαίτερα επαναλαμβανόμενο, όμως περιέχει πολλές αρχαίες επαναλήψεις επειδή το 42% (2589) των γονιδίων του ανήκουν σε 548 παράλογες οικογένειες (2 έως 134 γονίδια ανά οικογένεια). Αυτό το υψηλό επίπεδο των παράλογων γονιδίων υποδεικνύει ότι το μέγεθος του γονιδιώματος έχει περιοριστεί κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του είδους,

διευκολύνοντας την απόκτηση νέων προσαρμοστικών λειτουργιών για την ζωή στο έδαφος και για την συμβίωση. Αυτό επιβεβαιώνεται και από το πλούσιο σύνολο συστημάτων μεταφοράς και λειτουργικών παραγόντων. Τα γονίδια που κωδικοποιούν συστήματα μεταφοράς αποτελούν τη μεγαλύτερη τάξη (12%) γονιδίων στο γονιδίωμα του είδους. Τα περισσότερα από αυτά είναι ABC μεταφορείς, οι οποίοι εμφανίζουν υψηλή σχετική αφθονία (17.4%) στο pSymB. Τα ρυθμιστικά γονίδια αποτελούν ένα σημαντικό ποσοστό του γονιδιώματος (8.7%), κυρίως στα μεγαπλασμίδια (Galibert *et al.*, 2001).

Το κυκλικό χρωμόσωμα είναι πλούσιο σε περιεχόμενο GC (62,7%) και περιέχει σχεδόν όλα τα διαχειριστικά γονίδια (housekeeping genes), συμπεριλαμβανομένων των μεταφορέων των αμινοξέων/πεπτιδίων και των γονιδίων εκφυλισμού και μεταβολισμού των σακχάρων. Το μεγαπλασμίδιο pSymB έχει ένα παρόμοιο περιεχόμενο GC σε σχέση με του χρωμοσώματος και κωδικοποιεί ένα βασικό tRNA-αργινίνης και τα γονίδια της κυτταρικής διαίρεσης *minCDE*. Φαίνεται ότι αυτό το ρεπλικόνιο παίζει σημαντικό ρόλο στη σαπροφυτική ικανότητα του βακτηρίου στο χώμα και στη ριζόσφαιρα (Finan *et al.*, 2001).

Σε αντίθεση με το χρωμόσωμα και το pSymB, το pSymA έχει χαμηλότερη περιεκτικότητα σε GC (60,4%) και κυρίως περιέχει γονίδια που απαιτούνται για την συμβιωτική αλληλεπίδραση, συμπεριλαμβανομένων των *nod* γονιδίων που αποτελούν σήματα για τη διαδικασία σχηματισμού φυματίων καθώς επίσης και τα *nif* και *fix* γονίδια που καθορίζουν την ενσωμάτωση του αζώτου (Barnett *et al.*, 2001). Συγκεκριμένα περιέχει 9 *nif* γονίδια (*nifA*, *nifB*, *nifD*, *nifE*, *nifH*, *nifK*, *nifN*, *nifS* και *nifU*). Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι κυκλικές απεικονίσεις του χρωμοσώματος και των δύο μεγαπλασμιδίων (εικόνα 1.5).

Εξελικτικά το χρωμόσωμα του *S. meliloti* είναι αυτό ενός τυπικού αερόβιου, ετερότροφου βακτηρίου. Όμως η απόκτηση του pSymB επέκτεινε σημαντικά τις μεταβολικές δυνατότητες του μικροβίου, επιτρέποντάς του να μεταβολίζει μια μεγάλη ποικιλία από μικρές ενώσεις που ανακύπτουν στο έδαφος ή στη ριζόσφαιρα. Η αυξημένη ικανότητα να συνθέτει πολυσακχαρίτες μπορεί επίσης να έχει βελτιώσει σημαντικά τη δυνατότητα εποίκισμού του στη ριζόσφαιρα. Τέλος, η απόκτηση του pSymA οδήγησε στην εμφάνιση των φυματίων, καθώς και στην ικανότητα του βακτηρίου να αποικεί το χαμηλής περιεκτικότητας σε οξυγόνο περιβάλλον του φυματίου. Το pSymA επέκτεινε επίσης την ικανότητα να μεταβολίζει ποικιλία ενώσεων αζώτου, συμπεριλαμβανομένου του μοριακού αζώτου (Galibert *et al.*, 2001).



Εικόνα 1.5: Κυκλικές απεικονήσεις του χρωμοσώματος (πάνω αριστερά) και των μεγαπλασμιδίων pSymA (πάνω δεξιά), pSymB (κάτω αριστερά) του στελέχους *S. meliloti* 1021. Από έξω προς τα μέσα παρουσιάζονται: CDS μπλε, t RNA κόκκινο, r RNA ιώδες, περιεχόμενο GC μαύρο.

1.4.3. Τα στελέχη *S. meliloti* AK83 και BL225C, σύγκριση με το τυπικό στέλεχος 1021

Στα στελέχη AK83 και BL225C του είδους *Sinorhizobium meliloti* πραγματοποιήθηκε η ολοκλήρωση αλληλούχησης ολόκληρου του γονιδιώματος τους το 2011. Το στέλεχος BL225C απομονώθηκε στην Ιταλία από το είδος *Medicago sativa* και το στέλεχος AK83 απομονώθηκε στην θαλάσσια περιοχή Αράλ και κατατέθηκε στη Γερμανική Συλλογή Μικροοργανισμών και Καλλιέργειας κυττάρων (DSMZ).

Το στέλεχος BL225C βρέθηκε ότι είναι πιο αποτελεσματικό στην προαγωγή αύξησης των φυτών του είδους *M. truncatula* και *M. sativa*, σε σχέση με το στέλεχος AK83.

Τα γονιδιώματα και των δύο στελεχών είναι μεγαλύτερα από αυτό του στελέχους 1021. Το γονιδίωμα του AK83 είναι μεγαλύτερο κατά 450kbp, ενώ του στελέχους BL225C κατά 290kbp. Το στέλεχος AK83 έχει το υψηλότερο ποσοστό των ORFs (ORFs)(5,63%), που ορίζονται ως εκείνα τα γονίδια που δεν υπάρχει ανιχνεύσιμη ομοιότητα με άλλα γονίδια σε οποιοδήποτε άλλο οργανισμό. Ενώ όσον αφορά τον αριθμό των τρυσποζασών και των παρένθετων ακολουθιών το στέλεχος 1021 παρουσιάζει τον μεγαλύτερο (152) σε σχέση με τα στελέχη AK83 και BL225C (135 και 76 αντίστοιχα).

Τα στελέχη AK83 και BL225C διαθέτουν περισσότερα συστήματα που σχετίζονται με την έκκριση πρωτεϊνών τύπου IV από το Rm1021 τυπικό στέλεχος, ενώ διαθέτουν παρόμοιο αριθμό ABC μεταφορέων και συστημάτων έκκρισης τύπου III.

Το στέλεχος με τα περισσότερα μοναδικά γονίδια είναι το AK83, με 843 αποκλειστικές ομάδες, ενώ τα στελέχη BL225C και Rm1021 έχουν 469 και 602 αποκλειστικές ομάδες, αντίστοιχα.

Ενώ το στέλεχος BL225C περιέχει τρία ρεπλικόνια όπως το τυπικό στέλεχος 1021, το στέλεχος AK83 αποτελείται από πέντε κυκλικά ρεπλικόνια, που αντιστοιχούν στο χρωμόσωμα, στο pSymA και στο pSymB, τα οποία επίσης υπάρχουν στο γονιδίωμα του Rm1021 και BL225C, και δύο νέα μικρά ρεπλικόνια 1 και 2, 0,26 Mbp και 0,07 Mbp σε μέγεθος αντίστοιχα. Το χρωμόσωμα και το pSymB χαρακτηρίζονται από μεγάλη ανοχή στις γονιδιωματικές ανακατατάξεις και έτσι είναι σχεδόν ίδια στα στελέχη εκτός από μερικές προσθήκες στο χρωμόσωμα του στελέχους AK83. Όμως τα άλλα ρεπλικόνια του στελέχους AK83 παρουσιάζουν χαμηλό βαθμό αντιστοιχίας και ιδίως το πλασμίδιο 2 που δεν έχει καμία περιοχή ομολογίας με τα άλλα ρεπλικόνια των στελεχών 1021 και BL225C (και με άλλα πλασμίδια διαθέσιμα στη βάση δεδομένων NCBI).

Όσον αφορά τη συμβίωση, που απαιτείται το μεγαπλασμίδιο pSymA, το στέλεχος AK83 έχει τρεις περιοχές στο πλασμίδιο 1 που παρουσιάζουν υψηλό βαθμό ομολογίας με το pSymA του στελέχους Rm1021 (περίπου 47kbp), ενώ μόνο μία περιοχή είναι παρόμοια με το pSymA του στελέχους BL225C (περίπου 27 kbp). Αντίθετα το pSymA του στελέχους BL225C παρουσιάζει μεγαλύτερο αριθμό περιοχών ομολογών με το μεγαπλασμίδιο του στελέχους 1021 (Galardini, 2011).

1.4.4. Το στέλεχος *Sinorhizobium meliloti* SM11

Το αυτόχθονο στέλεχος *S. meliloti* SM11 απομονώθηκε κατά τη διάρκεια ενός πειράματος αγρού με απελευθέρωση γενετικώς τροποποιημένων στελεχών *S. meliloti* και η αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος του ολοκληρώθηκε το 2010.

Το στέλεχος *S. meliloti* SM11 αποτελείται από ένα χρωμόσωμα και δύο μεγαπλασμίδια το pSmeSM11c (ανάλογο του pSymA) και το pSmeSM11d (ανάλογο του pSymB). Επίσης περιέχει και δύο μικρότερα πλασμίδια το pSmeSM11a και το pSmeSM11b.

Το χρωμόσωμα, που αποτελεί το μεγαλύτερο ρεπλικόνιο του στελέχους *S. meliloti* SM11, έχει μέγεθος 3.908.022 bp, είναι πλούσιο σε περιεχόμενο GC (62,7%) και περιλαμβάνει 3785 ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια που κωδικοποιούν πρωτεϊνικές ακολουθίες. Παρουσιάζει ομολογία με το χρωμόσωμα του τυπικού στελέχους 1021, αφού τα δύο χρωμοσώματα έχουν 3183 κοινά γονίδια. Η βασική διαφορά των δύο χρωμοσωμάτων είναι μια μεγάλη ένθεση, 1677kb, στο χρωμόσωμα του στελέχους SM11.

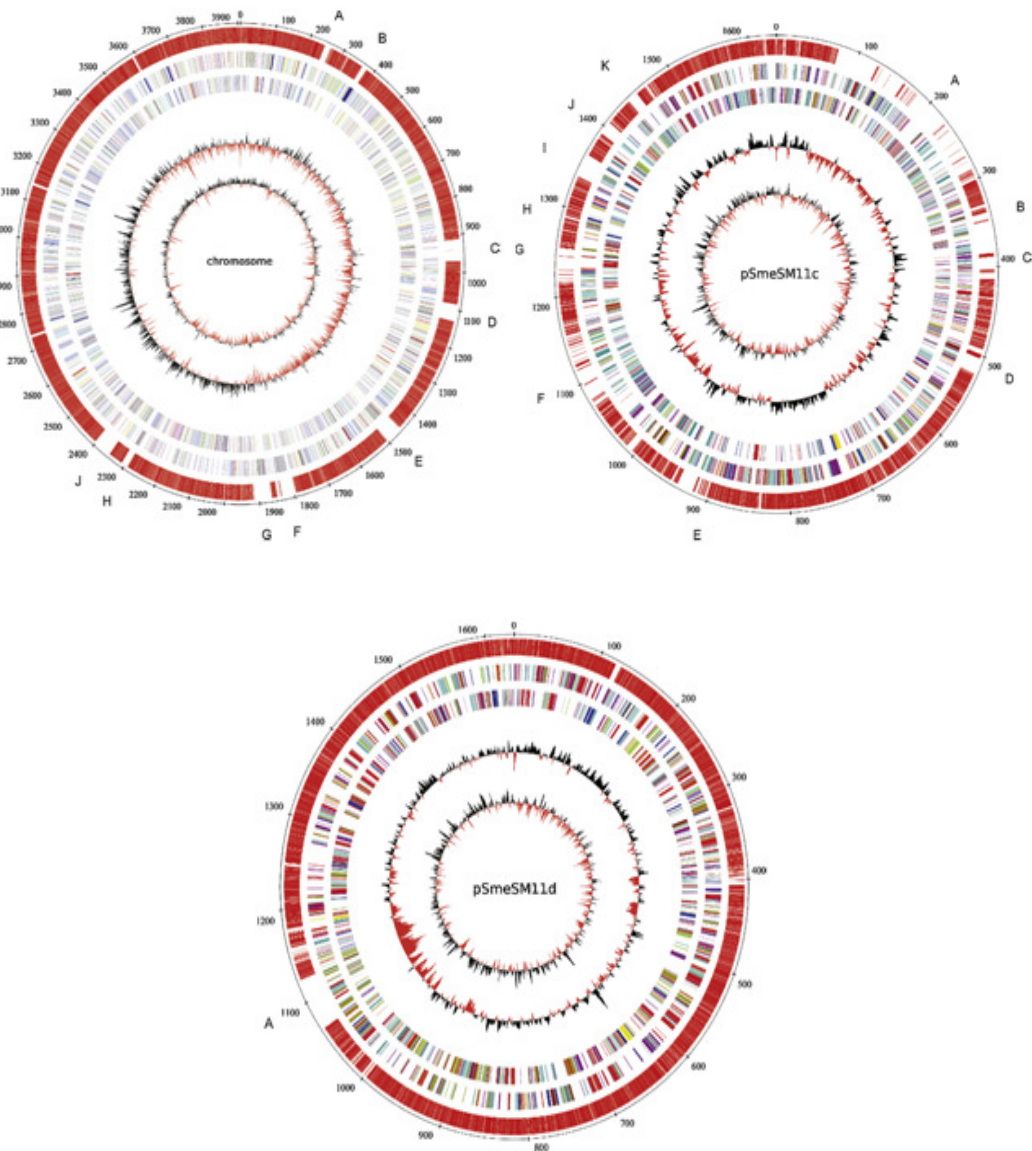
Το μεγαπλασμίδιο pSmeSM11d (ανάλογο του pSymB), διαθέτει σχεδόν όμοιο περιεχόμενο πλούσιο σε GC με το χρωμόσωμα (62,43%). Το μέγεθος του είναι 1,632,395 bp και περιλαμβάνει 1548 ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια που κωδικοποιούν πρωτεϊνικές ακολουθίες, εκ των οποίων τα 1386 βρίσκονται και στο pSymB του τυπικού στελέχους 1021.

Το μεγαπλασμίδιο pSmeSM11c (ανάλογο του pSymA), έχει μέγεθος 1,633,319 bp και περιεχόμενο πλούσιο σε GC μικρότερο από αυτό του χρωμοσώματος και του pSmeSM11d (60.16%), υψηλότερο όμως από το περιεχόμενο σε GC των μικρότερων πλασμιδίων pSmeSM11a (59.54%) και pSmeSM11b (58.67%). Περιλαμβάνει 1760 ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια που κωδικοποιούν πρωτεϊνικές ακολουθίες, εκ των οποίων το 55% βρίσκεται και στο pSymA του τυπικού στελέχους 1021, ενώ τα 740 είναι μοναδικά για αυτό. Επομένως το pSmeSM11c και το pSymA φαίνεται να αντιπροσωπεύουν περιοχές επιδεκτικές σε γεγονότα γενετικού ανασυνδιασμού. Επιπλέον, το pSmeSM11c κωδικοποιεί περιοχές γονιδίων υπεύθυνων για επιβίωση (διαμερισματοποίηση, κινητοποίηση και μεταφορά γονιδίων μέσω σύζευξης). Ακόμα περιέχει γονίδια υπεύθυνα για πολλές λειτουργίες όπως, αποκρίσεις στο στρες, μεταβολισμό των οξέων και αμινοξέων και παρόμοιων βιοχημικών μονοπατιών.

Τα στοιχεία αυτά για το χρωμόσωμα και τα δύο μεγαπλασμίδια παρατηρούνται και στις κυκλικές απεικονήσεις τους στην εικόνα 1.6.

Τέλος, τα δύο μικρότερα πλασμίδια, pSmeSM11a και pSmeSM11b, περιέχουν γονίδια που δεν είναι ομόλογα με αυτά που περιέχει το τριμερές γονιδίωμα του τυπικού στελέχους. Τέτοια είναι τα *acdS* γονίδια που περιέχει το πλασμίδιο pSmeSM11a και κωδικοποιούν την απαμινάση

του 1-αμινοκυκλοπροπάνιου-1-καρβοξυλικού, που εμπλέκεται στην διαμόρφωση των επιπέδων αιθυλενίου στο φυτό-ξενιστή. Επίσης το πλασμιδίο pSmeSM11b περιέχει ένα νέο σύμπλεγμα γονιδίων που προβλέπεται ότι συμμετέχει στην βιοσύνθεση πολυσακχαριτών (Schneiker-Bekela *et al.*, 2011).



Εικόνα 1.6: Κυκλικές απεικονήσεις του χρωμοσώματος (πάνω αριστερά) και των μεγαπλασμιδίων pSmeSM11c (πάνω δεξιά), pSmeSM11d (κάτω αριστερά) του στελέχους *S. meliloti* SM11. Από έξω προς τα μέσα οι κύκλοι παρουσιάζουν: κύκλος 1, γονιδιοματική θέση σε kb. κύκλος 2, γονίδια που έχουν ορθόλογα αντίστοιχα γονίδια στα πεπλικόνια του στελέχους *S. meliloti* Rm1021. κύκλος 3 και 4, CDS (εξωτερικά) και οι αντίθετοι κλώνοι. κύκλος 5, περιεχόμενο GC, φαίνονται οι παρεκκλίσεις από τον μέσο όρο (Schneiker-Bekela *et al.*, 2011).

1.5. Το είδος *Sinorhizobium medicae*

Το είδος *Sinorhizobium medicae* πήρε το όνομα του (*medicae*) από τη λέξη *medica*, την λατινική ονομασία για τα φυτά που ανήκουν στο γένος *Medicago*. Το είδος είναι σε θέση να αναπτύσσει συμβιωτική σχέση και να σχηματίζει φυμάτια με τα είδη του γένους *Medicago*. Στελέχη του βακτηριακού είδους έχουν απομονωθεί από διάφορα είδη όπως τα *M. truncatula*, *M. orbicularis*, *M. polymorpha* και *M. rugosa* και σε διαφορετικούς γεωγραφικούς τόπους όπου εξαπλώνονται τα φυτά του γένους αυτού (Rome *et al.*, 1996).

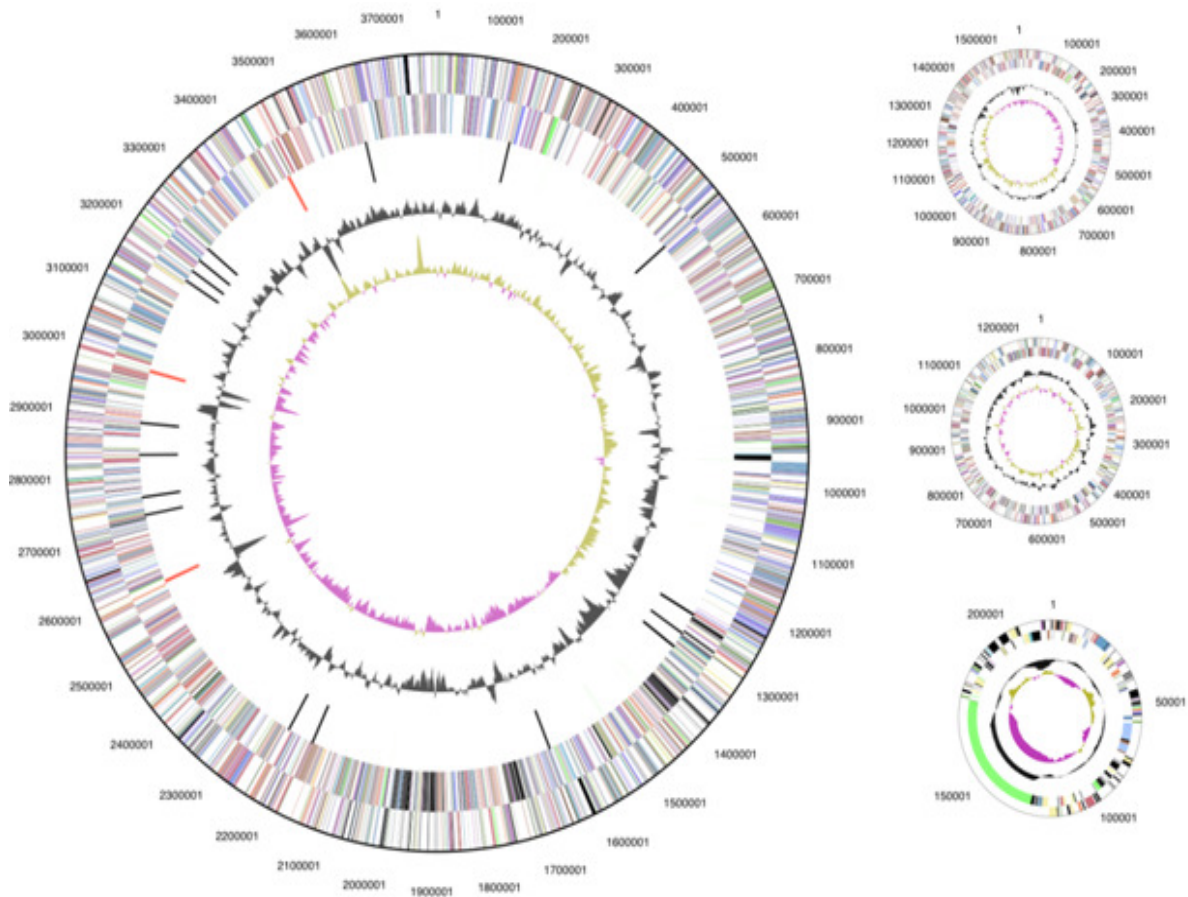
Με βάση τον ξενιστή, το είδος *S. medicae* μπορεί να διακριθεί από το είδος *S. meliloti*, αφού το πρώτο μπορεί και δημιουργεί λειτουργικά φυμάτια με το φυτό *M. polymorpha* ενώ τα στελέχη του είδους *S. meliloti* δημιουργούν αναποτελεσματικά φυμάτια. Το *S. medicae* μπορεί να διαφοροποιηθεί από τα άλλα μέλη του γένους *Sinorhizobium* λόγω φαινοτυπικών χαρακτηριστικών και χαρακτηριστικών του γονιδιωμάτος του, όπως είναι η ακολουθία του γονιδίου, 16S rRNA.

Είναι αρνητικό κατά Gram βακτήριο, αερόβιο και σχηματίζει ράβδους χωρίς σπόρια. Οι αποικίες που σχηματίζει σε YEM άγαρ είναι κυκλικές, ημιδιάφανες και βλεννώδεις και αναπτύσσεται πλήρως μέσα σε διάστημα τριών έως πέντε ημερών στους 28⁰C. Ο χρόνος γενιάς του κυμαίνεται από 3 έως 5 ώρες σε θρεπτικό μέσο YEM. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του είδους είναι 28⁰C ενώ για τα περισσότερα στελέχη η μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 40⁰C. Τα στελέχη του είδους είναι ανθεκτικά στην πενικιλίνη G, στο ναλιδιξικό οξύ, στη χλωραμφενικόλη και στη στρεπτομυκίνη (Rome *et al.*, 1996).

Το τυπικό στέλεχος του είδους *S. medicae* είναι το στέλεχος A 321 που παρουσιάζει όλα τα χαρακτηριστικά του είδους, που αναφέρθηκαν παραπάνω. Το στέλεχος A 321 έχει δύο μεγαπλασμίδια, 1600 και 1300kb, και ένα πλασμίδιο, 400kb (Silva *et al.*, 2007).

Ένα στέλεχος του είδους που έχει ολοκληρωθεί η αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος του είναι το WSM419. Οι κυκλικές απεικονίσεις του χρωμοσώματος και των πλασμιδίων του στελέχους παρουσιάζονται στην εικόνα 1.7. Απομονώθηκε το 1981 από ένα ετήσιο είδος του γένους *Medicago*, το *M. murex*, που φύεται νότια της επαρχίας Τέμπιο, στην Σαρδηνία. Παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, διότι είναι ανθεκτικό στα όξινα εδάφη και αυτό το καθιστά κατάλληλο για τα όξινα και άγονα εδάφη της νότιας Αυστραλίας. Επίσης είναι εξαιρετικά αποτελεσματικό στη δημιουργία αζωτοδεσμευτικών συμβιωτικών σχέσεων με ένα ευρύ φάσμα ετήσιων μηδικών μεσογειακής προέλευσης όπως *M. polymorpha*, *M. arabica*, *M. murex* και *M. shaerocarpos*. Αυτά τα χαρακτηριστικά συντέλεσαν και στην εμπορευματοποίηση του στελέχους στην Αυστραλία την περίοδο μεταξύ του 1985 και 1993, ως υλικό εμβολιασμού για είδη του

γένους *Medicago* που αναπτύσσονται σε όξινα εδάφη. Το στέλεχος επιλέχθηκε για αλληλούχηση ως μέρος του κοινοτικού προγράμματος αλληλούχησης του Ινστιτούτου Joint Genome (JGI) το 2005 (Reeve *et al.*, 2010). Στον πίνακα (πίνακας 1.2) που ακολουθεί αναφέρονται στοιχεία για το γονιδίωμα του στελέχους.



Εικόνα 1.7: Κυκλικές απεικονίσεις του χρωμοσώματος και των πλασμιδίων του στελέχους *S. medicae* WSM419. Από έξω προς το κέντρο παρουσιάζονται: γονίδια ορθού κλώνου, γονίδια αντίθετου κλώνου, RNA γονίδια (tRNAs πράσινο, sRNAs κόκκινο, άλλα RNAs μαύρο), περιεχόμενο σε GC (Silva *et al.*, 2007).

Πίνακας 1.2: Πληροφορίες για το γονιδίωμα του στελεχούς *S. medicae* WSM419

<u>Ρεπλικόνιο</u>	<u>Όλικά γονίδια</u>	<u>Γονίδια πρωτεϊνών</u>	<u>RNA γονίδια</u>	<u>Ψευδογονίδια</u>	<u>Μέγεθος (bp)</u>
Χρωμόσωμα 1	3572	3572	0	43	3,781,904
Πλασμίδιο pSMED01	1477	1477	0	36	1,570,951
Πλασμίδιο pSMED02	1278	1278	0	184	1,245,408
Πλασμίδιο pSMED03	196	196	0	47	219,313
Σύνολο:	6523	6523	0	310	6,817,576

1.6. Αβιοτικό στρες στο είδος *Sinorhizobium meliloti*

1.6.1. Αλατότητα

Η αλατότητα είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που περιορίζουν τις γεωργικές καλλιέργειες. Σχεδόν το 40% της παγκόσμιας επιφάνειας έχει πιθανά προβλήματα αλατότητας (Zahran, 1999). Η ριζόσφαιρα γύρω από την ρίζα επηρεάζεται από τις εκκρίσεις που προέρχονται από τα φυτά. Για να τεθεί σε μια ενδοσυμβιωτική σχέση, ένα βακτήριο πρέπει πρώτα να είναι σε θέση να επιβιώσει στην ριζόσφαιρα και να αποικίσει τις ρίζες του ξενιστή. Εκτός από την έκκριση των ενώσεων, το φυτό επηρεάζει επίσης την ριζόσφαιρα του περιβάλλοντος με την ενεργητική άρση των θρεπτικών συστατικών, όπως το νερό και άλλα ιχνοστοιχεία που είναι απαραίτητα για την επιβίωση του και εξαιρεί άλλα όπως το νάτριο που είναι επιβλαβή. Αυτή η εξαίρεση μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της ωσμωτικότητας στην ριζόσφαιρα και να είναι υψηλότερη από αυτήν που υπάρχει στο μεγαλύτερο μέρος του εδάφους (Williams *et al.*, 1996).

Τα ριζόβια που συμβιώνουν με τα ψυχανθή είναι πιο ευπαθή στην αλατότητα και στο ωσμωτικό στρες απ'ότι τα ελεύθερα διαβιούντα ριζόβια. Το στρες αλατότητας μπορεί να αναστείλλει τα αρχικά στάδια της συμβίωσης (εποικισμό της ρίζας, μόλυνση και ανάπτυξη φυματίων), αλλά επίσης έχει και αρνητική επίδραση στη δέσμευση του αζώτου (Zahran, 1999). Έτσι, η ανεκτικότητα των ριζοβίων στην αλατότητα είναι σημαντική για την συμβίωση.

Αύξηση της εξωτερικής αλατότητας και ώσμωσης προκαλεί μια εκροή νερού από το κύτταρο, με αποτέλεσμα την μείωση της σπαργής και την αφυδάτωση του κυτταροπλάσματος, η οποία προκαλεί μείωση του κυτταροπλασματικού όγκου και κατά συνέπεια αύξηση της κυτταροπλασματικής συγκέντρωσης των ιόντων. Τα ριζόβια χρησιμοποιούν διάφορους μηχανισμούς ωσμωτικής προσαρμογής όταν αυτά εκτίθενται σε στρες αλατότητας, όπως είναι η ενδοκυτταρική συσσώρευση οργανικών διαλυτών χαμηλού μοριακού βάρους (ωσμολύτες), συμπεριλαμβανομένου αμινοξέων σακχάρων και πολυαμινών, ή συσσώρευση ιόντων (π.χ. K^+) (Domínguez-Ferreras *et al.*, 2006).

Το *Sinorhizobium meliloti* είναι πιο ανεκτικό στην αλατότητα από πολλά βακτήρια. Το είδος ως απόκριση στο ωσμωτικό στρες βιοσυνθέτει γλουταμινικό, το διπεπτίδιο N-ακέτυλο-γλουταμίνιλο αμίδιο γλουταμίνης (NAGGN) και συσσωρεύει κάλλιο. Εάν οι συνθήκες του στρες είναι ακραίες τότε αρχίζει και συσσωρεύει ωσμολύτες όπως και αλλάζει την παραγωγή των εξωπολυσακχαριτών του (EPSI και EPSII) (Williams *et al.*, 2006).

Η τρεχαλόζη είναι ένας από τους ενδογενείς ωσμολύτες που συνθέτει το *S. meliloti* μετά από ένα ωσμωτικό στρες. Η σύνθεση της τρεχαλόζης στο τυπικό στέλεχος 1021 πραγματοποιείται μέσω τριών βιοσυνθετικών οδών. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις τρεις οδούς σύνθεσης της τρεχαλόζης στο γονιδίωμα του είναι τα: *OtsA*, *TreYZ*, και *Tres*. Και τα τρία γονίδια μεταγράφονται ως απόκριση στο αβιοτικό στρες. Μεταξύ αυτών, το γονίδιο *OtsA* παίζει σημαντικό ρόλο στην συσσώρευση της τρεχαλόζης και είναι το κύριο σύστημα που εμπλέκεται στην προσαρμογή στο ωσμωτικό στρες (Domínguez-Ferreras *et al.*, 2009).

Εκτός από ενδογενείς ωσμολύτες, συσσωρεύει και ωσμολύτες που είναι υποκατάστατα αυτών όπως είναι η γλυκίνη μεταΐνη, η προλίνη μεταΐνη, η ομομεταΐνη και το διμεθυλοσουλφονιοπροπιονικό (Flechar *et al.*, 2010). Το *S. meliloti* διαθέτει αρκετά συστήματα μεταφοράς μεταΐνης ώστε να αντιμετωπίζει το στρες αλατότητας. Το BetS, είναι ένα σύστημα που εμπλέκεται στην αφομοίωση μεταΐνων και ενεργοποιείται σε συνθήκες υψηλής αλατότητας, τόσο σε απομονωμένα βακτηριοειδή όσο και σε συμβίωση (Boscari *et al.*, 2006).

Τέλος το μεγαπλασμίδιο pSymB έχει αποδειχθεί ότι απαιτείται για την αντοχή του *S. meliloti* σε συνθήκες υψηλής αλατότητας (Domínguez-Ferreras *et al.*, 2006). Συγκεκριμένα το γονίδιο SMb21071, κωδικοποιεί μια γλυκοσιλτρανσφεράση που η μεταγραφή της προάγεται κάτω από υπεροσμωτικές συνθήκες (Reguera *et al.*, 2009).

1.7. Ταξινόμηση και φυλογενετικοί δείκτες: μοριακή ανάλυση γονιδίων

1.7.1. Ταξινόμηση και φυλογένεση

Η εξελικτική απόσταση μεταξύ δύο οργανισμών μπορεί να υπολογιστεί από τις διαφορές στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων ή των αμινοξέων σε ομόλογα μακρομόρια που απομονώνουμε από αυτούς. Αυτό συμβαίνει διότι ο αριθμός των διαφορών στην αλληλουχία ενός μακρομορίου, είναι ανάλογος με τον αριθμό των σταθερών μεταλλάξεων οι οποίες παγιώνονται στο DNA που κωδικοποιεί το μακρομόριο από τους δύο υπό σύγκριση οργανισμούς. Με την δημιουργία και διατήρηση των μεταλλάξεων σε διάφορους πληθυσμούς έχουμε την εξέλιξη, και το τελικό αποτέλεσμα είναι η βιοποικιλότητα.

Προκειμένου να διευκρινιστούν οι πραγματικοί εξελικτικοί συσχετισμοί μεταξύ των οργανισμών, είναι απαραίτητο να επιλεγούν τα κατάλληλα μόρια για τις μελέτες των αλληλουχιών. Τα μόρια πρέπει να έχουν μία οικουμενική κατανομή στην ομάδα που έχουμε αποφασίσει να μελετήσουμε. Πρέπει να είναι λειτουργικώς ομόλογα σε κάθε έναν από τους οργανισμούς (οι φυλογενετικές συγκρίσεις πρέπει να έχουν ως αφετηρία μόρια με πανομοιότυπη λειτουργία). Επίσης είναι σημαντικό να μπορούμε να αντιστοιχίσουμε επακριβώς τα δύο μόρια ώστε να αναγνωρίσουμε περιοχές των αλληλουχιών που είναι όμοιες και άλλες που διαφέρουν. Η αλληλουχία του επιλεγμένου μορίου πρέπει να μεταβάλλεται με ρυθμό κατάλληλο για την μετρούμενη εξελικτική απόσταση. Και μάλιστα, όσο μεγαλύτερη είναι η απόσταση που μετριέται, τόσο βραδύτερος πρέπει να είναι ο ρυθμός μεταβολής της αλληλουχίας (οι πολλές αλλαγές καθιστούν δυσανάγνωστο το εξελικτικό αρχείο) (Βιολογία των μικροοργανισμών Brock, 10^η έκδοση).

Ουσιαστικά, οι αλληλουχίες γονιδίων που χρησιμοποιούνται για ταξινομικούς σκοπούς, προϋποθέτουν ότι η εξέλιξη του γονιδιώματος γίνεται με ομαλό τρόπο και ότι αυτά τα γονίδια κληρονομούνται με μια αυστηρή ιεραρχική διαδικασία. Με άλλα λόγια, τα γονίδια αυτά περνούν από μια γενιά στην επόμενη και δεν διαμοιράζονται μεταξύ υπαρχόντων κυττάρων μέσω οριζόντιας μεταφοράς.

Για να σχηματιστούν εξελικτικά δέντρα, πολλά μόρια έχουν δοκιμαστεί ως μοριακά χρονόμετρα και πολλές συγκριτικές μελέτες έχουν γίνει με την βοήθειά τους. Στα μόρια αυτά περιλαμβάνονται διάφορα κυτοχρώματα, σιδηροθειούχες πρωτεΐνες όπως φερρεδοξίνες, γονίδια για αρκετές άλλες πρωτεΐνες και για ριβοσωμικά RNA (δομικά RNA που αποτελούν μέρος του

σκελετού του ριβοσώματος, τα οποία δεν μεταφράζονται), έδωσαν τις πιο διαφωτιστικές πληροφορίες για τους μικροοργανισμούς.

Τα μόρια αυτά ήταν απαραίτητα ακόμη και για μάλλον πρωτόγονα κύτταρα, συνεπώς ο προσδιορισμός των μεταβολών της αλληλουχίας των γονιδίων μας επιτρέπει να διερευνήσουμε σε βάθος το εξελικτικό παρελθόν (Βιολογία των μικροοργανισμών Brock, 10^η έκδοση).

Τα πλέον διαδεδομένα εξελικτικά χρονόμετρα είναι τα ριβοσωματικά RNA τα οποία αποτελούν εξαιρετικά μόρια για την εξακρίβωση εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των οργανισμών. Τα ριβοσωματικά RNA έχουν σταθερή λειτουργικότητα, είναι οικουμενικώς καταναμημένα και έχουν μια μετρίως διατηρημένη αλληλουχία σε ευρύ φάσμα φυλογενετικών αποστάσεων. Επίσης επειδή ο αριθμός των διαφορετικών δυνατών αλληλουχιών σε μεγάλα μόρια όπως τα ριβοσωματικά RNA είναι τόσο μεγάλος, η ομοιότητα μεταξύ δύο αλληλουχιών αποτελεί πάντοτε ένδειξη κάποιας φυλογενετικής σχέσης. Ωστόσο, εκείνο που συνιστά ένδειξη για την σχετική εξελικτική απόσταση, είναι ο βαθμός ομοιότητας των αλληλουχιών των ριβοσωματικών RNA μεταξύ δύο οργανισμών. Από συγκριτικές αναλύσεις μπορούν να κατασκευαστούν οι μοριακές γενεαλογίες οι οποίες οδηγούν στα φυλογενετικά δέντρα που δείχνουν τις πιθανότερες εξελικτικές θέσεις των οργανισμών όταν τοποθετούνται ο ένας σε σχέση με τον άλλο.

Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι του rRNA σε κάθε οργανισμό. Οι προκαρυωτικοί οργανισμοί περιέχουν τρεις τύπους: το rRNA 16S (ή 16S rRNA), το rRNA 23S (ή το 23S rRNA) και το rRNA 5S (ή 5S rRNA). Υπάρχουν συστοιχίες που περιέχουν ένα γονίδιο για κάθε έναν από αυτούς τους τύπους rRNA, και τα γονίδια μιας τέτοιας συστοιχίας συμμεταγράφονται. Επομένως, σε όλους τους οργανισμούς η μεταγραφική μονάδα για τα περισσότερα rRNA είναι μεγαλύτερη του ενός γονιδίου. Τα ριβοσώματα είναι η θέση σύνθεσης των πρωτεϊνών. Κάθε ριβόσωμα συνίσταται από δύο υπομονάδες. Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, οι ριβοσωματικές υπομονάδες έχουν μέγεθος 30S (μονάδες Svedberg) και 50S, και σχηματίζουν ολοκληρωμένα ριβοσώματα των 70S⁺. Κάθε υπομονάδα συνιστά η ίδια ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο αποτελούμενο από ειδικά ριβοσωματικά μόρια και ριβοσωματικές πρωτεΐνες. Η υπομονάδα 30S περιέχει rRNA 16S και περίπου 21 πρωτεΐνες, ενώ η υπομονάδα 50S περιέχει rRNA 5S και 23S και περίπου 34 πρωτεΐνες.

Οι νεοπροσδιοριζόμενες αλληλουχίες, συγκρίνονται με τις υπάρχουσες στις βάσεις γενετικών δεδομένων και στην συνέχεια, με την χρήση ενός προγράμματος αναγνώρισης διακλαδώσεων σχηματίζονται αρκετά πιθανά δενδρογράμματα τα οποία συνοψίζουν με τον καλύτερο τρόπο τις εξελικτικές πληροφορίες που εμπεριέχονται στις αλληλουχίες (Βιολογία των μικροοργανισμών Brock, 10^η έκδοση).

1.7.2. Μοριακή ανάλυση γονιδίου 16S rRNA

Το 1965 οι Zuckerkandl και Pauling διατύπωσαν για πρώτη φορά την άποψη ότι τα μόρια ενδεχομένως να αποτελούν «αποδείξεις της εξελικτικής ιστορίας» ή «μοριακά χρονόμετρα» (Zuckerkandl και Pauling, 1965). Σχεδόν μια δεκαετία αργότερα, οι Woese και συνεργάτες αναγνώρισαν το γονίδιο που κωδικοποιεί για το 16S rRNA ως ένα δυναμικό φυλογενετικό εργαλείο και σύντομα δημιουργήθηκαν τα πρώτα φυλογενετικά δέντρα προκαρυωτικών οργανισμών βάσει του γονιδίου που κωδικοποιεί για τη μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος (Fox *et al.*, 1980). Από εκείνη την εποχή ως σήμερα, οι πρόοδοι στην νουκλεοτιδική αλληλούχηση και κυρίως, η ανάπτυξη της τεχνικής ενίσχυσης PCR έχουν βοηθήσει στην αναγνώριση νέων ειδών βακτηρίων και στην ταξινόμηση εκ νέου ορισμένων παλαιότερων ενώ έχουν δημιουργηθεί και βάσεις δεδομένων γονιδίων.

Γρήγορα έγινε αντιληπτό ότι το γονίδιο 16S rRNA διαθέτει ορισμένα πλεονεκτήματα έναντι άλλων συντηρημένων γονιδίων (Ludwig και Klenk, 2005). Τα γονίδια του ριβοσωμικού RNA, τα οποία κωδικοποιούν για τις υπομονάδες 16S, 23S και 5S RNA, ενώνονται μεταξύ τους μέσω tRNA και είναι οργανωμένα σε οπερόνια. Τα οπερόνια αυτά μεταγράφονται συντονισμένα ώστε να παράγουν ισομοριακές ποσότητες κάθε γονιδιακού προϊόντος. Τόσο η αφθονία των οπερονίων rRNA όσο και η ετερογένειά τους εντός ενός γονιδιώματος έχουν σημαντικές επιπτώσεις στην έρευνα αναγνώρισης και ταξινόμησης βακτηρίων βάσει δεδομένων αλληλουχιών rRNA (Klabbenbach *et al.*, 2001).

Πλέον, το γονίδιο 16S rRNA αποτελεί το πιο αποδεκτό και ευρέως χρησιμοποιούμενο συντηρημένο γονίδιο που χρησιμοποιείται στην βακτηριακή ταξινόμηση και φυλογένεια. Οι πιο σημαντικοί λόγοι είναι: α) η παρουσία του, σχεδόν, σε όλα τα βακτήρια, συχνά ως πολλαπλά γονίδια ή ως οπερόνια, β) η λειτουργία του δεν έχει αλλάξει με το πέρασμα του χρόνου, υποδηλώνοντας ότι τυχαίες αλλαγές στην αλληλουχία είναι περισσότερο αντιπροσωπευτικές της εξέλιξης και γ) το γονίδιο 16S rRNA έχει μέγεθος ~1500 bp, το οποίο εξυπηρετεί σε έρευνες βιοπληροφορικής (Janda και 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 1.300 βάσεων (< 0,5% αμφιβολία) (Stackebrandt *et al.*, 2002). Εκτός από τα παραπάνω χαρακτηριστικά, το γονίδιο που κωδικοποιεί για το 16S rRNA περιέχει τόσο εξελικτικά συντηρημένες περιοχές όσο και εξαιρετικά διαφοροποιημένες δομικές περιοχές. Αυτό οφείλεται σε διαφορετικές λειτουργικές πιέσεις επιλογής οι οποίες δρουν επί ανεξάρτητων δομικών στοιχείων. Αυτές οι διακυμάνσεις στη συντήρηση των ακολουθιών επιτρέπουν την

αναπαράσταση της φυλογένειας για ένα ευρύ φάσμα συγγενειών από το επίπεδο της επικράτειας ως το επίπεδο του είδους. Πλέον, η βάση δεδομένων που περιλαμβάνει ακολουθίες του γονιδίου 16S rRNA διαθέτει πάνω από 16.000 ακολουθίες και ο αριθμός αυτός συνέχεια ανεβαίνει. Ένα μεγάλο ποσοστό προκαρυωτικών ειδών αντιπροσωπεύεται από ακολουθίες 16S rRNA που προέρχονται από τυπικά στελέχη ή από στενά συγγενικά στελέχη (Ludwig και Klenk, 2005).

Παρά την ευρεία αποδοχή που απολαμβάνει το γονίδιο που κωδικοποιεί για το 16S rRNA ως φυλογενετικός δείκτης παρουσιάζει και ορισμένα μειονεκτήματα. 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. Ένα άλλο πρόβλημα αποτελεί η ύπαρξη πολλαπλών γονιδίων σε έναν οργανισμό. Μέχρι πρότινος, υπήρχε η άποψη ότι δεν υπάρχουν αξιοσημείωτες διαφορές μεταξύ πολλαπλών ακολουθιών rRNA για έναν οργανισμό (Ludwig και Klenk, 2005). Αν και για τα περισσότερα είδη η ομολογία μεταξύ ακολουθιών rRNA είναι 99%, για ορισμένα είδη αυτό δεν ισχύει. Υπάρχουν ορισμένες εξαιρέσεις, όπως τα *Thermomonospora chromogena*, *Thermobispora bispora* και *Haloarcula marismortui* των οποίων τα γονίδια 16S και 23S παρουσιάζουν διαφορές ως και 10% (Hashimoto *et al.*, 2003). Τέλος, ένα άλλο πρόβλημα που προκύπτει είναι το γεγονός ότι οργανισμοί οι οποίοι έχουν ακολουθίες rRNA με υψηλή ομολογία μπορεί να έχουν σημαντικές διαφορές στο επίπεδο του συνολικού γονιδιώματος. Γι' αυτόν τον λόγο, πρέπει κατά την ερμηνεία των φυλογενετικών δέντρων να δίδεται προσοχή στα πρότυπα διακλάδωσης στην περιφέρεια του δέντρου διότι, πιθανώς, να μην αντιπροσωπεύουν την πραγματική φυλογένεια (Ludwig και Klenk, 2005).

1.7.3. Μοριακή ανάλυση γονιδίου *nifH*

Όλοι οι αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί είναι προκαρυωτικοί και περιέχουν το ίδιο οπερόνιο (*nifHDK*) στο οποίο το γονίδιο *nifH* κωδικοποιεί για την αναγωγή της νιτρογενάσης. Το οπερόνιο αυτό είναι ιδιαίτερα συντηρημένο μεταξύ των αζωτοδεσμευτικών οργανισμών και προκύπτει το ερώτημα κατά πόσο η φυλογένεια των γονιδίων *nif* απεικονίζει την καταγωγή των βακτηρίων που το κατέχουν (Young, 1992).

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές έρευνες σύγκρισης των γονιδίων 16S rRNA και *nifH* προκειμένου να διαπιστωθεί αν το φυλογενετικό δέντρο που προκύπτει από το 16S rRNA συμφωνεί με το αντίστοιχο του *nifH*. Αυτό είναι χρήσιμο διότι παρά την αναμφισβήτητη αποδοχή του γονιδίου 16S rRNA προτείνεται η μοριακή ανάλυση περισσότερων του ενός γονιδίων. Οι περισσότερες έρευνες επιβεβαιώνουν ότι πολλά χαρακτηριστικά του φυλογενετικού δέντρου του *nifH* συμφωνούν απόλυτα με την φυλογένεια του 16S rRNA. Γι' αυτόν τον λόγο, η ποικιλότητα των γονιδίων *nifH* επιτρέπει την «χονδρική» εκτίμηση της ταξινόμησης των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διερεύνηση της ποικιλότητας των βακτηρίων που δεσμεύουν άζωτο (Poly *et al.*, 2001). Αντίστοιχα αποτελέσματα προκύπτουν και από τη μοριακή ανάλυση των γονιδίων *nifD* και *nifK* και πιθανώς να αποτελούν αξιόπιστους φυλογενετικούς δείκτες παρόλο που δεν προκύπτει απόλυτη συμφωνία μεταξύ της φυλογένειας των γονιδίων *nifH*, *nifD*, *nifK* (Zehr *et al.*, 2003, Schmid και Hartmann, 2007).

Η υψηλή ομολογία μεταξύ των ακολουθιών *nifH* και 16S rRNA, που υπάρχουν στις αντίστοιχες βάσεις δεδομένων, υποδηλώνει ότι η νιτρογενάση παρουσιάστηκε νωρίς κατά την εξέλιξη σε έναν αρχικό πρόγονο. Γενικά, υπάρχουν πολλά σενάρια για την εξελικτική ιστορία του *nifH* αλλά έχουν επικρατήσει κυρίως δύο (Raymond *et al.*, 2004).

Το πρώτο σενάριο αφορά την παρουσία της αζωτοδέσμευσης στον τελευταίο κοινό πρόγονο όλων των μορφών ζωής. Αυτή η υπόθεση προϋποθέτει ως κυρίαρχο γεγονός την απώλεια γονιδίων ώστε να δικαιολογείται η απουσία των γονιδίων *nif* από τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και από ολόκληρα φύλα προκαρυωτικών. Συμμετοχή σε αυτήν τη διαδικασία έχει και η οριζόντια μεταφορά γονιδίων η οποία έχει πραγματοποιηθεί για να μεταφερθεί νιτρογενάση ακόμα και σε οργανισμούς που ήδη είχαν ένα αντίγραφο νιτρογενάσης. Σε αυτήν την περίπτωση, οι εναλλακτικές νιτρογενάσες προήλθαν από τα αρχαία (*methanosarcina*) και κατόπιν με οριζόντια μεταφορά διαδόθηκαν σε άλλα γένη ευβακτηρίων (Raymond *et al.*, 2004, Kechris *et al.*, 2006).

Το δεύτερο σενάριο προέλευσης της ιδιότητας της αζωτοδέσμευσης αφορά στην εμφάνισή της για πρώτη φορά στα μεθανογόνα βακτήρια (αρχαία). Μετά από αυτό, μεταφέρθηκε σε άλλες

βακτηριακές συγγενικές σειρές μέσω τριών ξεχωριστών εξελικτικών γεγονότων. Σε αυτήν την περίπτωση, το κυρίαρχο φαινόμενο θα ήταν η οριζόντια μεταφορά γονιδίων και όχι η απώλεια γονιδίων όπως στο πρώτο σενάριο. Η υπόθεση αυτή δικαιολογεί την απουσία αζωτοδέσμευσης από τους ευκαρυώτες, τα crenarchaea και από πρώιμα διακλαδιζόμενες βακτηριακές συγγενικές σειρές. Ταυτόχρονα, το σενάριο εναρμονίζεται με την επικρατούσα άποψη ότι κάποια στιγμή της ιστορίας τα μεθανογόνα βακτήρια είχαν κυρίαρχο ρόλο στη βιόσφαιρα (Raymond *et al.*, 2004). Τα παραπάνω σενάρια αποτελούν τα κυρίαρχα μεταξύ πολλών που έχουν διατυπωθεί και τα οποία απεικονίζουν με τον καλύτερο τρόπο τις διαθέσιμες φυλογενετικές και βιοχημικές πληροφορίες (Kechris *et al.*, 2006).

1.7.4. Μοριακή ανάλυση γονιδίου *nodC*

Η φυλογενετική ταξινόμηση των συμβιωτικών αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων δεν αντικατοπτρίζει τα συμβιωτικά χαρακτηριστικά των βακτηρίων αυτών και ιδιαίτερα το φάσμα των φυτών-ξενιστών τους. Η είσοδος των ριζοβίων στο φυτό-ξενιστή είναι μια διαδικασία ελεγχόμενης μόλυνσης. Τα ριζόβια παράγουν κάποιες ενώσεις λιπο-ολιγοσακχαριδικής φύσης οι οποίες όταν λαμβάνονται από το φυτό προκαλούν μια σειρά από διαδικασίες που οδηγούν στο σχηματισμό του φυματίου. Οι ενώσεις αυτές ονομάζονται Nod παράγοντες. Κάθε είδος ριζοβίου παράγει διαφορετικούς Nod παράγοντες που είναι χαρακτηριστικό του δεδομένου ριζοβίου. Τα *nod* γονίδια επάγονται από τα φλαβονοειδή των φυτών και καθορίζουν την σύνθεση των Nod παραγόντων. Τόσο το είδος όσο και το ποσό των Nod παραγόντων είναι σημαντικά για τον προσδιορισμό εξειδίκευσης στον ξενιστή (Laguerre *et al.*, 2001).

Το γονίδιο *nodC* κωδικοποιεί για την N-ακετυλογλουκοζαμινιλτρανσφεράση, η οποία εμπλέκεται στο πρώτο βήμα σύνθεσης των Nod παραγόντων και επίσης είναι ένας καθοριστικός παράγοντας για τον προσδιορισμό του φάσματος των ξενιστών. Ακόμα είναι απαραίτητο στη δημιουργία φυματίων για τα περισσότερα είδη ριζοβίων και έτσι αποτελεί ένα κοινό *nod* γονίδιο μεταξύ των ριζοβίων (Ruiz-Dvez *et al.*, 2011).

Τα φυλογενετικά δέντρα που προκύπτουν από αλληλουχίες *nod* γονιδίων, γενικά, δεν συμφωνούν απόλυτα με αυτά που προκύπτουν από 16S rRNA ακολουθίες, αλλά τα *nod* φυλογενετικά δέντρα δείχνουν κάποια συσχέτιση με το φάσμα των ξενιστών. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι τα *nod* φυλογενετικά δέντρα είναι παρόμοια με αυτά που προκύπτουν από αλληλουχίες *nifH* γονιδίων. Αυτό το αποτέλεσμα συμφωνεί με το γεγονός ότι τα *nif* και *nod*

γονίδια είναι συχνά στενά συνδεδεμένα στα ριζόβια αφού βρίσκονται σε στοιχεία που διαβιβάζονται, όπως σε πλασμίδια στα περισσότερα ριζόβια ή σε στοιχεία που μοιάζουν με μεταθέσιμα όπως στο *Mesorhizobium loti* (Laguerre *et al.*, 2001).

Τόσο η ύπαρξη του στα περισσότερα συμβιωτικά αζωτοδεσμευτικά βακτήρια όσο και το μέγεθος της ακολουθίας του που είναι σχετικά μεγάλο και επιτρέπει την εφαρμογή πολλών μοριακών τεχνικών, το καθιστούν έναν αξιόπιστο φυλογενετικό δείκτη που δείχνει την συμβιωτική και πλασμιδιακή ποικιλομορφία.

1.7.5. Μοριακή ανάλυση IGS ή ITS περιοχής

Οι ακολουθίες 16S rDNA είναι γνωστό ότι είναι ιδιαίτερα συντηρημένες μεταξύ των βακτηρίων και η ανάλυση των γενετικών παραλλαγών σε αυτή την περιοχή δεν είναι κατάλληλη για τη διαφοροποίηση στελεχών εντός των ειδών (Frothingham και Wilson, 1993, Laguerre *et al.*, 1994).

Το 1991 οι Barry και συνεργάτες, σε μια προσπάθεια να εντοπίσουν αλληλουχίες-στόχους με μεγαλύτερη μεταβλητότητα μελέτησαν τις διαγονιδιακές περιοχές μεταξύ των 16S rDNA και 23S rDNA των ευβακτηρίων. Υποστήριξαν ότι οι διαγονιδιακές περιφέρειες θα πρέπει να υφίστανται ελάχιστες επιλεκτικές πιέσεις κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, ως εκ τούτου θα πρέπει να διαφέρουν περισσότερο από ακολουθίες που βρίσκονται μέσα σε γονίδια που έχουν λειτουργικούς ρόλους. Σύμφωνα με αυτό το σκεπτικό κατασκεύασαν εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση των διαγονιδιακών περιοχών στα βακτήρια (Barry *et al.*, 1991).

Έτσι η 16S-23S διαγονιδιακή περιοχή (IGS) ή ITS (internal transcribed spacer) λόγω του ότι είναι λιγότερο ευάλωτη σε επιλεκτικές πιέσεις, επειδή δεν κωδικοποιείται, έχει συσσωρεύσει υψηλότερο ποσοστό μεταλλάξεων από τα γονίδια rRNA (Guasp *et al.*, 2000). Αυτό προσδίδει στην περιοχή μεταβλητότητα και χρησιμοποιείται επιτυχώς για τη διαφοροποίηση ριζοβιακών στελεχών σε ενδοειδικό επίπεδο.

Η ανάλυση και η σύγκριση των ITS1s αλληλουχιών από διαφορετικά βακτήρια δείχνουν ότι εμφανίζεται σημαντική διακύμανση του μήκους και της πρωτογενούς ακολουθίας και για αυτό χρησιμοποιούνται ως δείκτες για τη διάκριση μεταξύ στενά συνδεδεμένων ειδών (Gurtler και Stanisich, 1996).

1.7.6. Μοριακή ανάλυση των ακολουθιών REP και ERIC

Η ποικιλομορφία των βακτηρίων σε ενδοειδικό επίπεδο οφείλεται κυρίως σε τρία γενετικά γεγονότα: οριζόντια μεταφορά γονιδίων, απώλεια ή απόκτηση γονιδίων και ανασυνδυασμός. Η συχνότητα αυτών των τριών γεγονότων κάνει τη διερεύνηση της διαφορετικότητας σε ενδοειδικό επίπεδο αρκετά περίπλοκη (Li, 2009).

Οικογένειες από μικρές επαναλαμβανόμενες ακολουθίες έχουν βρεθεί και χρησιμοποιούνται ως εργαλεία που βοηθούν την ταξινόμηση των ειδών. Αυτές οι ακολουθίες περιέχουν εξαιρετικά συντηρημένες, κεντρικές, ανεστραμμένες επαναλήψεις και χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τα στοιχεία REPs (repetitive extragenic palindromic elements) που είναι γνωστά και ως παλινδρομικές μονάδες (palindromic units). Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τις ακολουθίες ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) αλλιώς γνωστές και ως διαγονιδιακές μονάδες επανάληψης (de Bruijn, 1992).

Τα στοιχεία REP περιγράφηκαν για πρώτη φορά ως πιθανές ρυθμιστικές αλληλουχίες μέσα σε αμετάφραστες περιοχές των οπερονίων, λόγω της παλινδρομικής φύσης τους και της ικανότητας τους να σχηματίζουν σταθερές δομές, stem-loop, κατά τη μεταγραφή του RNA (Versalovic *et al.*, 1991). Όλες οι REP ακολουθίες είναι εξωγονιδιακές (extragenic) περιοχές και οι περισσότερες από αυτές βρίσκονται στο 3' άκρο ενός διαρθρωτικού γονιδίου (Merino *et al.*, 1987). Αποτελούν τις πιο καλά μελετημένες επαναλαμβανόμενες ακολουθίες των προκαρυωτικών οργανισμών. Αποτελούνται από μια αλληλουχία 35-40 bp η οποία έχει μια ιδιαίτερα συντηρημένη συμμετρική δυάδα. Αυτή η δυάδα επιτρέπει την δημιουργία μιας δομής στελέχους-βρόχου (stem-loop) μέσα στα αντίστοιχα μετάγραφα του RNA, και μπορεί να βρεθεί μεμονωμένη ή σε διάσπαρτα αντίγραφα που απέχουν μεταξύ τους λιγότερο από 25 bp (Merino *et al.*, 1987). Στα βακτήρια *Escherichia coli* και *Salmonella typhimurium* η ακολουθία REP βρίσκεται σε περίπου 500 αντίτυπα, διάσπαρτα γύρω από τα χρωμοσώματα (Hulton *et al.*, 1991). Έχουν προταθεί πολλοί ρόλοι για τις REP ακολουθίες αν και δεν είναι σαφές εάν οποιοσδήποτε από αυτούς μπορεί να εξηγήσει την εκτεταμένη διατήρηση της ακολουθία τους και τη διανομή τους εντός και μεταξύ των ειδών (Hulton *et al.*, 1991). Οι ακολουθίες REP μπορεί να συμμετέχουν στη δομή και στην οργάνωση των χρωμοσωμάτων, μπορεί να παίζουν ρόλο στις χρωμοσωμικές ανακατατάξεις, μπορεί επίσης να εμπλέκονται στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Τέλος, οι REP ακολουθίες μπορεί να είναι ένα προκαρυωτικό ισοδύναμο του «εγωιστικού» επαναλαμβανόμενου DNA (Merino *et al.*, 1987).

Οι εκκινητές για τις ακολουθίες σχεδιάστηκαν από τους Versalovic και συνεργάτες το 1991. Τα ολιγονουκλεοτίδια από τα οποία αποτελούνται οι REP εκκινητές σχεδιάστηκαν με βάση το

μισό του συντηρημένου στελέχους του παλινδρόμου (stem-loop) σε αντίθετες κατευθύνσεις, έτσι ώστε το 3' τελικό άκρο να είναι στραμμένο προς το εξωτερικό κάθε REP ακολουθίας. Αφού η μία πλευρά της ακολουθίας του στελέχους του παλινδρόμου είναι μικρότερη, προστέθηκαν τρεις ινوسίνες στο 5' τελικό άκρο του REPIR εκκινήτη ώστε το μέγεθός του να ταιριάζει με το μέγεθος του REP2 εκκινήτη. Συνολικά οι εκκινήτες αποτελούνταν από τις κοινές βάσεις [A, T, G, C] σε συγκεκριμένες θέσεις και από ινوسίνες τοποθετημένες σε συγκεκριμένες θέσεις. Η ινοσίνη περιέχει την πουρινική βάση της υποξανθίνης και έχει την ικανότητα να σχηματίζει ζεύγη βάσεων με τις A, T, G, ή C (Versalovic *et al.*, 1991).

Μια δεύτερη οικογένεια συντηρημένων αλληλουχιών που βρίσκονται σε πολλαπλά αντίγραφα στο γονιδιώμα των εντεροβακτηρίων περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Hulton και συνεργάτες το 1991. Οι ακολουθίες αυτές ονομάστηκαν ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) και είναι μικρές επαναλαμβανόμενες μονάδες από 126 bp που περιέχουν μια συντηρημένη, κεντρική, ανεστραμμένη επανάληψη των 40 bp. Στην συνέχεια πιστοποιήθηκε η υπαρξή τους σε διάφορα είδη που ανήκουν στο βασίλειο των Ευβακτηρίων με την χρήση ειδικών εκκινήτων (Versalovic *et al.*, 1991) και αργότερα σε αρνητικά και θετικά κατά gram βακτήρια και στα ριζόβια (de Bruijn, 1992).

Παρά το γεγονός ότι όλες οι ακολουθίες περιλαμβάνουν έναν κεντρικό επαναλαμβανόμενο ανεστραμμένο πυρήνα, η πιθανή δευτερογενή δομή που σχηματίζεται από το υπόλοιπο του στοιχείου μπορεί διαφέρει από ERIC σε ERIC. Επιπλέον, η ακολουθία μπορεί να βρεθεί και στους δύο προσανατολισμούς σε σχέση με την κατεύθυνση της μεταγραφής, γεγονός που συνεπάγεται ότι οποιαδήποτε λειτουργία συμβαίνει σε δευτεροβάθμιο επίπεδο δομής αντί να καθορίζεται από την πρωτογενή ακολουθία (Hulton *et al.*, 1991). Οι εκκινήτες για τις ακολουθίες σχεδιάστηκαν από τους Versalovic J. και συνεργάτες το 1991. Μη εκφυλισμένες ακολουθίες νουκλεοτιδίων ERIC1 και ERIC2 σχεδιάστηκαν από το κάθε μισό του επαναλαμβανόμενου, ανεστραμμένου πυρήνα σε αντίθετες κατευθύνσεις, έτσι ώστε το 3' τελικό άκρο να είναι στραμμένο προς το εξωτερικό κάθε ERIC ακολουθίας (Versalovic *et al.*, 1991).

Οι ακολουθίες ERIC φαίνεται ότι δεν παρουσιάζουν καμία ομοιότητα με τις REP ακολουθίες. Παρ' όλα αυτά, ορισμένα χαρακτηριστικά των ERIC και REP ακολουθιών είναι παρόμοια, και μπορεί να διατηρήθηκαν στο βακτηριακό γονιδιώμα με παρόμοιους μηχανισμούς. Η πραγματική λειτουργία αυτών των εξαιρετικά επαναλαμβανόμενων και διατηρημένων στοιχείων παραμένει ένα αίνιγμα. Αν και έχει προταθεί η συμμετοχή τους στη σταθεροποίηση του mRNA, στη μεταγραφική σύζευξη μεταξύ των γονιδίων, στον ομόλογο ανασυνδυασμό, στην οργάνωση των χρωμοσωμάτων και στη δέσμευση των HU πρωτεϊνών, της DNA γυράσης και της DNA πολυμεράσης I, καμία μεμονωμένη λειτουργία δεν εξηγεί ικανοποιητικά τη διατήρηση και

την πανταχού παρουσία των αλληλουχιών του DNA τους. Επίσης, έχει θεωρηθεί ότι αυτά τα επαναλαμβανόμενα στοιχεία αντιπροσωπεύουν «εγωιστικές» αλληλουχίες DNA που συντηρούνται και μεταδόθηκαν μέσω γονιδιακής μετατροπής (Hulton *et al.*, 1991).

Οι REP- και ERIC -PCR μέθοδοι είναι πολύ χρήσιμοι για τη ανάλυση της γενετικής ποικιλομορφίας των βακτηριακών πληθυσμών και την ταυτοποίηση και ταξινόμηση των βακτηριακών στελεχών.

2. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μοριακή ταυτοποίηση στελεχών αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων που έχουν απομονωθεί από τα φυμάτια του είδους *Medicago marina*, φυτικό υλικό που έχει συλλεχθεί από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας που φύονται τα φυτά του είδους αυτού.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Βακτηριακά στελέχη

Τα στελέχη απομονώθηκαν από φυμάτια φυτών *Medicago marina* που αναπτύσσονταν σε αμμοθίνες σε διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας (Πίνακας 1) αποτελούν μέρος της συλλογής του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γ.Π.Α.. Τα φυτά συλλέχτηκαν και ταυτοποιήθηκαν ταξινομικά από τον κ. Ρ. Θανόπουλο και η απομόνωση των ριζοβίων πραγματοποιήθηκε από την κ. Η. Κεφαλογιάνη.

Στέλεχος	Είδος φυτού	Τοποθεσία	Πηγή απομόνωσης
GR67	<i>M. marina</i>	Ραφήνα, Αττική	Φυμάτια
GR68	<i>M. marina</i>	Σύρος, Κυκλάδες	Φυμάτια
GR70	<i>M. marina</i>	Αγκίστρι, Αττική	Φυμάτια
GR71	<i>M. marina</i>	Λέσβος, Βόρειο Αιγαίο	Φυμάτια
GR72	<i>M. marina</i>	Πάτμος, Δωδεκάνησα	Φυμάτια
GR73	<i>M. marina</i>	Σάμος, Βόρειο Αιγαίο	Φυμάτια
GR75	<i>M. marina</i>	Άνδρος, Κυκλάδες	Φυμάτια
GR78	<i>M. marina</i>	Πρέβεζα (Κανάλι), Πρέβεζα	Φυμάτια
GR79	<i>M. marina</i>	Καλύβια, Αττική	Φυμάτια

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, δόθηκαν στο εργαστήριο τα εξής στελέχη:

Sinorhizobium meliloti = ATCC10312=DSM 6048

Sinorhizobium meliloti 1021

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.

3.2. Απομόνωση νουκλεϊνικών οξέων

3.2.1. Απομόνωση ολικού γονιδιωματικού DNA από Gram (-) βακτήρια

Μία μεμονωμένη αποικία του κάθε στελέχους χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό 6 ml θρεπτικού υλικού YMB και ακολούθησε επώαση υπό ανάδευση στους 30⁰C για 24 ώρες. Για την απομόνωση του ολικού γονιδιωματικού DNA χρησιμοποιήθηκε το κατάλληλο πρωτόκολλο της NucleoSpin® Tissue και έγινε σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία:

- I. Από την καλλιέργεια που αναπτύχθηκε υπό ανάδευση στους 30⁰C για 24 ώρες μεταφέρονται 1,5 ml σε σωλήνα erpendorf και φυγοκεντρώνται στις 13.000 στροφές/λεπτό για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απορρίπτεται σχολαστικά και στο σωλήνα erpendorf παραμένει μόνο το ίζημα των κυττάρων.
- II. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 180 μl διαλύματος λύσης T (περιέχει RNAse A).
- III. Προστίθενται 20 μl διαλύματος Proteinase K, το δείγμα αναδεύεται και επωάζεται για 30 λεπτά στους 55⁰C.
- IV. Στη συνέχεια προστίθενται 200 μl διαλύματος λύσης C, ακολουθεί καλή ανάδευση του δείγματος για περίπου 15 δευτερόλεπτα και επωάζεται 10 λεπτά στους 55⁰C.
- V. Προστίθενται 500 μl από το διάλυμα Column Preparation στη στήλη. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και απορρίπτεται το έκλουσμα.
- VI. Προστίθενται στο δείγμα 200 μl αιθανόλης (95-100%) και αναδεύεται καλά για 5-10 δευτερόλεπτα μέχρι να ομογενοποιηθεί.
- VII. Όλο το δείγμα που είναι στο σωλήνα erpendorf μεταφέρεται στη στήλη, φυγοκεντρείται στις 8.500 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Το έκλουσμα απορρίπτεται και η στήλη μεταφέρεται σε καινούριο σωλήνα erpendorf.
- VIII. Προστίθενται 500 μl διαλύματος Wash Solution 1 (W0263) στη στήλη, ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 8.500 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό σε

θερμοκρασία δωματίου. Το έκλουσμα απορρίπτεται και η στήλη μεταφέρεται σε καινούριο σωλήνα erpendorf.

- IX. Ακολουθεί δεύτερο πλύσιμο, προσθέτοντας στη στήλη 500 μl διαλύματος Wash Solution (περιέχει αιθανόλη) και φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να στεγνώσει η στήλη. Ξανά φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να απομακρυνθεί τελείως το διάλυμα Wash Solution καθώς περιέχει αιθανόλη, η οποία αν παραμείνει μπορεί να παρεμποδίσει περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις.
- X. Η στήλη τοποθετείται σε καινούριο σωλήνα erpendorf και ακολουθεί έκλουση του DNA από αυτήν. Προστίθενται 200 μl του διαλύματος Elution Solution (B6803) (5 mM Tris/HCl, pH 8.5) κατευθείαν στο κέντρο της στήλης, και επώάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά ώστε να αυξηθεί η έκλουση. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 8.500 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- XI. Το δείγμα φυλάσσεται στους -20°C .

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

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

i. Μέθοδος του βρασμού (Holmes και Quilgey, 1981)

- I. 5 ml θρεπτικού υλικού LB, που περιέχουν το αντιβιοτικό αμικικίνη, 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. Από την παραπάνω καλλιέργεια μεταφέρονται 1,5 ml σε σωλήνα erpendorf και φυγοκεντρούνται στις 13.000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

- 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 STET¹ παρουσία λυσοζύμης³ (Sigma) σε τελική συγκέντρωση 0,5 mg/ml.
- V. Ακολουθεί βρασμός του δείγματος για 45 δευτερόλεπτα και μετά φυγοκέντρωσή του στις 13.000 στροφές/λεπτό για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 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 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- VII. Αφού το ίζημα ξεπλυθεί με 70% αιθανόλη και στεγνώσει στον αέρα ώστε να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη, η οποία αν παραμείνει μπορεί να παρεμποδίσει περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις, επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος TE².

ii. Απομόνωση με στήλη

Για την απομόνωση με στήλη χρησιμοποιήθηκε το κατάλληλο πρωτόκολλο της NucleoSpin® Plasmid και έγινε σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία:

- I. 5 ml θρεπτικού υλικού LB, που περιέχουν το αντιβιοτικό αμικιλίνη, εμβολιάζονται με μία μεμονωμένη αποικία κυττάρων *E.coli*, τα οποία έχουν μετασχηματισθεί με το προς απομόνωση πλασμίδιο. Ακολουθεί επώαση με συνεχή ανακίνηση στους 37⁰C για περίπου 16 ώρες.
- II. 1-5 ml από την παραπάνω καλλιέργεια μεταφέρονται σε σωλήνα eppendorf και φυγοκεντρώνονται στις 13.000 στροφές/λεπτό για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- III. Το υπερκείμενο απομακρύνεται σχολαστικά και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 250 μl διαλύματος A1 (περιέχει RNase A).

- IV. Προστίθενται 250 μl διαλύματος A2 (περιέχει SDS), το δείγμα αναδεύεται απαλά και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για διάστημα λιγότερο από 5 λεπτά.
- V. Προστίθενται 350 μl διαλύματος A3, ακολουθεί ανάμιξη (6-8 φορές) και φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- VI. Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά και μεταφέρεται στην στήλη.
- VII. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- VIII. Το διάλυμα που διαπέρασε τη στήλη απορρίπτεται, σε αυτό το στάδιο το πλασμιδιακό DNA είναι προσδεδεμένο στην στήλη.
- IX. Προστίθενται 600 μl διαλύματος A4 (περιέχει αιθανόλη). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα που διαπερνά την στήλη απορρίπτεται και επαναλαμβάνεται φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να απομακρυνθεί τελείως το διάλυμα A4 καθώς περιέχει αιθανόλη, η οποία αν παραμείνει μπορεί να παρεμποδίσει περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις.
- X. Η στήλη τοποθετείται σε σωλήνα eppendorf. Για την έκλουση του DNA προστίθεται ddH₂O ή 50 μl διαλύματος έκλουσης AE (5 mM Tris/HCl, pH 8.5). Το δείγμα επωάζεται για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- XI. Ακολουθεί φυγοκέντρηση της στήλης στις 13.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- XII. Το δείγμα φυλάσσεται στους -20°C.

3.3. Ανάλυση νουκλεϊνικών οξέων

3.3.1. Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων

Η συγκέντρωση και η καθαρότητα των νουκλεϊνικών οξέων σε υδατικό διάλυμα προσδιορίζονται φωτομετρικά με τη χρήση σπεκτροφωτόμετρου nanodrop (Nano Drop® ND-1000 Spectrophotometer). Πριν από τη μέτρηση επιλέγεται στο λογισμικό της συσκευής από τον χειριστή η ένδειξη DNA.

Για το μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιείται ποσότητα 1μl από τον εκάστοτε διαλύτη (H₂O ή άλλο διαλύτη). Φωτομετρείται ποσότητα δείγματος 1 μl και λαμβάνονται οι λόγοι OD₂₆₀/OD₂₈₀ και OD₂₆₀/OD₂₃₀ βάσει των οποίων γίνεται η εκτίμηση της καθαρότητας των δειγμάτων των νουκλεϊνικών οξέων. Ένα δείγμα DNA θεωρείται ικανοποιητικά καθαρό όταν ο λόγος OD₂₆₀/OD₂₈₀ 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 OD₂₆₀/OD₂₃₀ αποτελεί ένα δεύτερο μέτρο της καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων. Σε δείγματα υψηλής καθαρότητας ο λόγος αυτός είναι συνήθως υψηλότερος από τις αντίστοιχες τιμές του λόγου OD₂₆₀/OD₂₈₀ και κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 1,8 και 2,2. Μικρότερες τιμές αποτελούν συνήθως ένδειξη μόλυνσης.

3.3.2. Πέψη DNA με χρήση ενζύμων (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 ενζύμου περιορισμού που χρησιμοποιείται όσο και από την ποσότητα και την καθαρότητα του DNA. Η συνήθης ποσότητα κυμαίνεται μεταξύ 20-100 μl. Περιγραφή διαδικασίας:

- I. Σε σωλήνα erpendorf τοποθετείται το δείγμα του DNA, το ρυθμιστικό διάλυμα που απαιτείται για τη δράση του ενζύμου και η ενδονουκλεάση περιορισμού. Συνήθως, χρησιμοποιείται μια μονάδα ενζύμου (1 unit) ανά

μικρογραμμάριο δείγματος DNA. Εάν το δείγμα του DNA περιέχει υπολείμματα RNA προστίθεται επιπλέον και RNase A⁴. Τέλος, προστίθεται ddH₂O μέχρι τον επιθυμητό όγκο.

Σε μία τυπική αντίδραση πέψης τελικού όγκου 30 μl αναμειγνύονται:

διάλυμα DNA 1 μg (σε νερό ή TE)	έως 10 μl
10x ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου	3 μl
ένζυμο περιορισμού (1 unit/μl)	1 μl
RNase A (1 mg/ml)	0,5 μl
ddH₂O	έως τελικό όγκο 30 μl

- II. Το δείγμα αναμειγνύεται καλά και επωάζεται στην κατάλληλη θερμοκρασία για 3-4 ώρες. Ως ενδονουκλεάση περιορισμού χρησιμοποιήθηκε η EcoRI, με αλληλουχία αναγνώρισης G/AATTC και βέλτιστη θερμοκρασία δράσης τους 37⁰C.
- III. Μετά το πέρας της αντίδρασης τα προϊόντα αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης.

3.3.3. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή αγαρόζης

Ο διαχωρισμός των δεσοξυριβονουκλεϊνικών οξέων γίνεται με βάση το μέγεθος και τη διαμόρφωσή τους με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Στην περίπτωση διαχωρισμού γραμμικών μορίων DNA, ο διαχωρισμός είναι ανάλογος του μεγέθους τους. Το εύρος μεγεθών που μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από την συγκέντρωση της αγαρόζης και κυμαίνεται από 0,1 έως 100Kb. Στον πίνακα 3.1 αναφέρονται οι τυπικές συγκεντρώσεις αγαρόζης ανάλογα με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού.

Αγαρόζη (%)	Εύρος διαχωρισμού γραμμικών μορίων (bp)
0.75	10.000 - 15.000
1.0	500 – 10.000
1.25	300 – 5.000
1.5	200 – 4.000
2.0	100 – 2.500
2.5	50 - 1000

Πίνακας 3.1.: Συγκέντρωση πηκτικής αγαρόζης ανάλογα με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού

Τα μόρια του DNA γίνονται ορατά με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και φθορίζει παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας. Η προετοιμασία της πηκτικής αγαρόζης πραγματοποιείται με την ακόλουθη διαδικασία:

- I. Ποσότητα αγαρόζης αναμειγνύεται σε κωνική φιάλη Erlenmeyer, με ορισμένο όγκο διαλύματος ηλεκτροφόρησης 1xTAE⁵. Η συγκέντρωση της πηκτικής αγαρόζης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ανάλογη του μεγέθους των γραμμικών μορίων που ηλεκτροφορούνταν κάθε φορά.
- II. Η φιάλη με την αγαρόζη και το διάλυμα TAE θερμαίνεται σταδιακά σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου η αγαρόζη διαλυθεί εντελώς.
- III. Το διάλυμα κρυώνει έως ότου η θερμοκρασία του φτάσει τους 60⁰C και προστίθεται διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου⁶ (10 mg/ml) τελικής συγκέντρωσης 0,5 μg/ml, αφήνεται να στερεοποιηθεί σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης. Στην συσκευή προσαρμόζεται η κατάλληλη «χτένα» έτσι ώστε να σχηματιστούν, στην πηκτή, τα βοηθία φόρτωσης.
- IV. Αφού η πηκτή έχει σταθεροποιηθεί απομακρύνεται από αυτήν η «χτένα». Η συσκευή ηλεκτροφόρησης συμπληρώνεται με διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE έτσι ώστε η πηκτή να παραμένει βυθισμένη 1-2mm από την επιφάνειά του.
- V. Τα δείγματα των νουκλεοξέων, αφού αναμιχθούν σε ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης⁷, τοποθετούνται στα βοηθία φόρτωσης. Στη συνέχεια εφαρμόζεται στα άκρα της συσκευής ηλεκτροφόρησης κατάλληλη τάση.

3.3.4. Ανάκτηση κλάσματος DNA από πηκτή αγαρόζης

Για την ανάκτηση κλάσματος DNA από πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε το κατάλληλο πρωτόκολλο της NucleoSpin® Extract II και έγινε σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία:

- I. Από την πηκτή αγαρόζης απομονώνεται, με την χρήση καθαρού νυστεριού, το τμήμα εκείνο το οποίο περιέχει την επιθυμητή ζώνη DNA. Η απομονωμένη ζώνη τοποθετείται σε σωλήνα erppendorf, ζυγίζεται και προστίθενται διπλάσιος όγκος ρυθμιστικού διαλύματος NT (περιέχει άλατα) (για παράδειγμα για 70mg πηκτής αγαρόζης απαιτούνται 140 μl διαλύματος NT).
- II. Ακολουθεί επώαση του δείγματος στους 50⁰C για 5-10 λεπτά έως ότου διαλυθεί η αγαρόζη. Για να διαλυθεί πλήρως, αναδεύουμε ήπια το δείγμα κάθε 2-3 λεπτά, καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης.
- III. Το διάλυμα τοποθετείται στη στήλη και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Απορρίπτεται το διάλυμα που διαπέρασε τη στήλη, σε αυτό το στάδιο το πλασμιδιακό DNA είναι προσδεδεμένο στην στήλη.
- IV. Προστίθενται 700 μl διαλύματος NT3 (περιέχει αιθανόλη). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα που διαπερνά τη στήλη απορρίπτεται. Αυτό το στάδιο ήταν το ξέπλυμα της στήλης.
- V. Επαναλαμβάνεται φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να απομακρυνθεί τελείως το διάλυμα NT3 καθώς περιέχει αιθανόλη, η οποία αν παραμείνει μπορεί να παρεμποδίσει περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις.
- VI. Η στήλη τοποθετείται σε σωλήνα erppendorf . Για την έκλυση του DNA προστίθεται ddH₂O ή 15-50 μl διαλύματος έκλυσης NE (5 mM Tris/HCl, pH 8.5). Το δείγμα επωάζεται για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- VII. Ακολουθεί φυγοκέντρηση της στήλης στις 13.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- VIII. Το δείγμα φυλάσσεται στους -20⁰C.

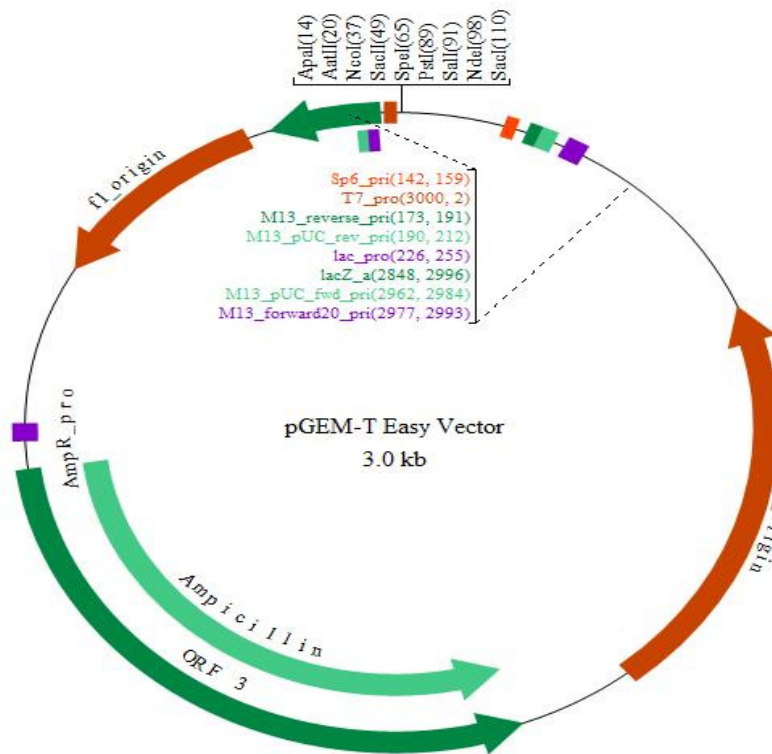
3.4. Υποκλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακό φορέα

3.4.1. Χαρακτηριστικά πλασμιδιακού φορέα

Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη είναι ο pGEM-T easy (Promega) (εικόνα 3.1). Ο λόγος για τον οποίο χρησιμοποιήθηκε ο συγκεκριμένος φορέας είναι η υποκλωνοποίηση DNA τμημάτων προκειμένου να γίνει ευκολότερος 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 easy διαθέτουν μια αρχή αντιγραφής (*ori*), τμήμα του γονιδίου *lacZ* του *E.coli*, που κωδικοποιεί για το α-πεπτίδιο του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση. Επιπλέον, φέρουν μια πολλαπλή θέση κλωνοποίησης (πολυσύνδεσμος) εντός του γονιδίου *lacZ* καθώς και τους προαγωγείς της RNA πολυμεράσης, T7 και SP6, οι οποίοι βρίσκονται ένθεν και ένθεν του πολυσυνδέσμου (εικόνα 3.1).

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 ανασυνδιασμένων κλώνων με βάση το χρώμα των αποικιών όταν σε αυτές προστεθεί X-gal και IPTG. Επίσης, οι συγκεκριμένοι φορείς φέρουν γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, γεγονός που επιτρέπει την επιλογή των μετασχηματισμένων με αυτούς βακτηριακών κυττάρων.



Εικόνα 3.1: Περιοριστικός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pGEM-T easy (Promega).

3.4.2. 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 το ένζυμο περιορισμού EcoRI 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 και συνεργάτες (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 ανασυνδιασμένων πλασμιδίων. Η αραίωση τόσο του φορέα όσο και του ενθέτου DNA γίνεται ώστε να διευκολύνεται η επίτευξη της απαιτούμενης αναλογίας. Η αντίδραση ενσωμάτωσης περιλαμβάνει:

DNA πλασμιδιακός φορέας	1μl
DNA ένθεσης	1μl
10 x ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης ⁸	1μl
ένζυμο λιγάση T4 (1 unit/μl)	1μl
ddH ₂ O	έως 10μl

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 4⁰C για 16 ώρες.

3.5. Μετασηματισμός κυττάρων *E. coli*

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

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *E. coli* DH5a, το οποίο καλλιεργήθηκε σε υγρό ή στερεό θρεπτικό μέσο LB παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού (Παράρτημα). Η ανάπτυξη του πραγματοποιήθηκε στους 37⁰C σε επωαστικούς θαλάμους για περίπου 16 ώρες. Για τις υγρές καλλιέργειες η επώαση πραγματοποιήθηκε υπό ανάδευση.

3.5.2. Δημιουργία βακτηριακών κυττάρων *E. coli* ικανών για μετασηματισμό (Competent cells)

Περιγραφή διαδικασίας δημιουργίας βακτηριακών κυττάρων *E. coli* ικανών για μετασηματισμό (Competent cells):

- I. 10 ml θρεπτικού υλικού εμβολιάζονται με μια αποικία *E. coli* (XL-blue) και επωάζονται υπό ανάδευση, για περίπου 18 ώρες στους 37⁰C.
- II. 2 ml της παραπάνω καλλιέργειας χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 200 ml αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού LB. Ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση στους 37⁰C για 2 περίπου ώρες (O.D.₆₀₀= 0,3-0,4).
- III. Οι χειρισμοί που ακολουθούν γίνονται στον πάγο ή στους 4⁰C. Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 6.000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά.

- IV. Το ίζημα των κυττάρων αφού επαναδιαλύεται με ήπια ανάδευση σε 25 ml 0,1M MgCl₂, φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 6.000 στροφές/λεπτό.
- V. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 25 ml 0,1M CaCl₂, και διατηρείται σε πάγο για 20 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 6.000 στροφές/λεπτό.
- VI. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 10 ml 0,1M CaCl₂ και προστίθεται γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 20% (v/v). Τα κύτταρα αφού τοποθετηθούν σε σωλήνες erpendorf φυλάσσονται στους -80⁰C.

3.5.3. Μετασηματισμός ικανών κυττάρων *E. coli* με πλασμίδια

Περιγραφή διαδικασίας μετασηματισμού ικανών κυττάρων *E. coli* με πλασμίδια:

- I. Σε σωλήνα erpendorf μεταφέρονται, μέσα σε πάγο, 100 μl ικανών προς μετασηματισμό 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 μετασηματισμό 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 42⁰C για ένα 1-2 λεπτά και την απ'ευθείας μεταφορά τους στη συνέχεια στον πάγο για 1 λεπτό.
- V. Προστίθενται 200 μl LB θρεπτικού διαλύματος και τα δείγματα επωάζονται στους 37⁰C για 1 ώρα.
- VI. Τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό LB και το κατάλληλο αντιβιοτικό (αμπικιλίνη για τον φορέα pGEM-T Easy) για την επιλογή των μετασηματισμένων κυττάρων.
- VII. Στην περίπτωση όπου σκοπός είναι η επιλογή των αποικιών που φέρουν ανασυνδιασμένο πλασμίδιο, προστίθενται στα κύτταρα 10 μl IPTG 100 mM⁹ και 50 μl X-Gal¹⁰ 2% (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 ενζύμου, αναπτύσσουν κυανό χρώμα.

3.6. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

3.6.1. Αρχή της μεθόδου

Η Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια *in vitro* μέθοδος που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA σε πολλά αντίγραφα σε σύντομο χρόνο. Η μέθοδος εφευρέθηκε από τον Kerry Mullis, ο οποίος ανακοίνωσε την εφευρεσή του το 1984 και τιμήθηκε γι' αυτήν με βραβείο Νόμπελ το 1993.

Πιο συγκεκριμένα η μέθοδος της PCR στηρίζεται στην συνεχή επανάληψη ενός κύκλου που αποτελείται από τρία διαδοχικά στάδια. Σε κάθε στάδιο γίνεται επώαση του δείγματος σε διαφορετική κάθε φορά θερμοκρασία, με την βοήθεια ενός ειδικού μηχανήματος, του θερμικού κυκλοποιητή (thermal cycler). Ο κυκλοποιητής έχει την δυνατότητα να θερμάνει και να ψύχει τα δείγματα σε σύντομο χρόνο. Τα στάδια που αποτελούν τον επαναλαμβανόμενο κύκλο είναι τα εξής: 1) Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (denaturation), 2) Υβριδοποίηση εκκινητών (primer annealing) στις αλληλουχίες του DNA-στόχου, 3) Επιμήκυνση εκκινητών (μονόκλιωνα ολιγονουκλεοτίδια) (extension).

Κατά την διάρκεια του **πρώτου σταδίου** το τμήμα DNA που μας ενδιαφέρει υποβάλλεται σε θερμοκρασία 94°C προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των αλυσίδων του δίκλωνου αυτού DNA (αποδιάταξη/denaturation). Στο **δεύτερο στάδιο** η θερμοκρασία μειώνεται στους 50-60°C και έτσι επιτυγχάνεται η ένωση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA σε κάθε αλυσίδα (υβριδοποίηση εκκινητών/primer annealing). Στο **τρίτο και τελευταίο στάδιο** η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C και με την βοήθεια της DNA πολυμεράσης, που προσθέτει τα νουκλεοτίδια (dNTP's) στο 3' άκρο των εκκινητών, επιτυγχάνεται η σύνθεση των νέων συμπληρωματικών αλυσίδων DNA. Η σύνθεση των αντιγράφων γίνεται από την DNA πολυμεράση πάντα με κατεύθυνση 5' προς 3'.

Η διαδικασία της PCR χωρίζεται σε τρεις φάσεις:

- **Εκθετική (exponential) φάση:** Είναι η φάση κατά την οποία έχει αρχίσει ο πολλαπλασιασμός της προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA. Σ' αυτή την φάση η αντίδραση είναι πολύ αποτελεσματική και σε κάθε κύκλο διπλασιάζεται η προεπιλεγμένη αλληλουχία DNA.

- **Γραμμική (linear) φάση:** Η φάση στην οποία παρατηρείται μειωμένη παραγωγή αντιγράφων της αλληλουχίας DNA εξαιτίας της μείωσης της ενεργότητας των αντιδραστηρίων.
- **Φάση Plateau:** Στη φάση αυτή έχει σταματήσει η αντίδραση PCR καθώς και η παραγωγή νέων αντιγράφων εξαιτίας της εξάντλησης των αντιδραστηρίων.

Μεγάλη σημασία στην επιτυχία της PCR έχουν οι εκκινητές και η DNA πολυμεράση. Οι εκκινητές (primers) είναι ολιγονουκλεοτίδια και έχουν συνήθως μήκος 15-30 νουκλεοτιδίων ο καθένας. Η αλληλουχία του κάθε εκκινητή πρέπει να είναι μοναδική και να υβριδίζεται σε μια μόνο περιοχή του DNA. Οι εκκινητές δε θα πρέπει να έχουν δευτεροταγή δομή. Επίσης στην αντίδραση PCR, όπου χρησιμοποιείται ζεύγος εκκινητών, δε θα πρέπει τα 3'- άκρα τους να είναι συμπληρωματικά. Η σύνθεση των βάσεων των εκκινητών θα πρέπει να είναι περίπου 50% σε GC και 50% σε AT και ο καθένας θα πρέπει να περιέχει στα άκρα του G ή C. Στην περίπτωση που οι συμπληρωματικές ακολουθίες των εκκινητών δεν είναι πλήρως συμπληρωματικές με το DNA η μεταλλάξη ή οι μεταλλάξεις είναι συνήθως στο μέσο του εκκινητή ή τουλάχιστον 12 νουκλεοτίδια από το 3'- άκρο. Τέλος θα πρέπει να έχουν την ίδια θερμοκρασία αποδιάταξης (melting temperature, T_m).

Η DNA πολυμεράση είναι ένζυμο που χρησιμοποιεί ως μήτρα το μονόκλωνο DNA για τη σύνθεση μιας καινούργιας συμπληρωματικής αλυσίδας με 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.

Στην αρχή, ως ένζυμο της PCR χρησιμοποιήθηκε ένα τμήμα του μορίου της DNA πολυμεράσης της *E. coli*, το "τμήμα Klenow" (Klenow fragment). Η αδρανοποίηση του ενζύμου αυτού σε υψηλές θερμοκρασίες απαιτούσε την προσθήκη ενζύμου μετά το στάδιο αποδιάταξης σε κάθε κύκλο. Το πρόβλημα αυτό λύθηκε με την ανακάλυψη και χρήση της θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης, Taq πολυμεράσης, που απομονώθηκε από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus*. Η Taq πολυμεράση έχει μοριακό βάρος 94 kDa και ειδική ενεργότητα 200.000 μονάδες/mg ενζύμου. Το ένζυμο αυτό διαθέτει μόνο 5'→3' και όχι 3'→5' εξωνουκλεοτιδική δράση. Η καλύτερη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου (temperature optimum) είναι 72-80°C. Σήμερα με την βοήθεια μεθοδολογιών της Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας έχουν αναπτυχθεί διάφορα παράγωγα της Taq πολυμεράσης με βελτιωμένα χαρακτηριστικά και μεγαλύτερη εξειδίκευση. Αυτές οι πολυμεράσες δεν επιτρέπουν την λάθος τοποθέτηση βάσεων κατά την σύνθεση του DNA, εξαιτίας της 3' προς 5' επιδιορθωτικής ικανότητας (proofreading activity) που έχουν. Η Taq πολυμεράση δεν παρουσιάζει τέτοια ικανότητα και γι'αυτό υπάρχει πιθανότητα να έχουμε παραγωγή προϊόντων με τυχαίες τοποθετήσεις νουκλεοτιδίων στις νέες αλυσίδες DNA (με μικρή συχνότητα) (Berg *et al*, 2002).

3.6.2. 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 1 μg. Επίσης, η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών εξαρτάται κάθε φορά από τη θερμοκρασία τήξεώς τους (T_m).

Μια τυπική αντίδραση PCR πραγματοποιείται ως εξής:

Σε ειδικό σωλήνα erpendorf προστίθενται:

✓ Γονιδιωματικό DNA	1 μg
✓ Εκκινητής ευθείας κατεύθυνσης (Forward) (10 μM)	1 μl
✓ Εκκινητής αντίστροφης κατεύθυνσης (Reverse) (10 μM)	1 μl
✓ Μίγμα dNTPs (10 mM το καθένα)	1 μl
✓ 10 x PCR ρυθμιστικό διάλυμα ¹¹	5 μl
✓ DMSO	2 μl
✓ DyNAzyme II DNA πολυμεράση (FINNZYMES)(2 U/μl) ²	0,5 μl
✓ ddH ₂ O	έως τελικό όγκο 50 μl

Γενικά, οι συνθήκες πραγματοποίησης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης είναι:

Αρχική αποδιάταξη	94 ⁰ C για 2-4 λεπτά	} 35 κύκλοι
Αποδιάταξη	94 ⁰ C για 1 λεπτό	
Υβριδισμός εκκινητών	45-65 ⁰ C για 1 λεπτό	
Επιμήκυνση	72 ⁰ C για 1 λεπτό/1.3-15 kb αναμενόμενου προϊόντος	
Τελική επιμήκυνση	72 ⁰ C για 5-10 λεπτά	

Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης (T_m) των εκκινητών. 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.

3.7. 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 και 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 (Zuckermandl και Pauling, 1965β) για την περίπτωση των αμινοξικών αλληλουχιών. Η αξιοπιστία και η σταθερότητα των σχέσεων του δενδρογράμματος εκτιμήθηκε μέσω 1000 bootstrap δειγμάτων.

3.8. Μελέτη της ανάπτυξης του *S. meliloti* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl

3.8.1. Καλλιέργεια βακτηριακών στελεχών *S. meliloti*

Τα βακτηριακά στελέχη καλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο YMB. Το θρεπτικό μέσο αφού παρασκευαστεί μοιραζόταν σε φιαλίδια MacCartney, ώστε το καθένα να περιέχει τελικό όγκο 6ml. Τα φιαλίδια με το θρεπτικό μέσο αποστειρώνονταν στους 121⁰C για 20 min και αφού ψύχονταν ακολουθούσε ο εμβολιασμός. Ο εμβολιασμός έγινε χρησιμοποιώντας ένα μεταλλικό κλειστό βρόχο εμβολιασμού (ο οποίος προηγουμένως είχε περαστεί από τη φλόγα στο Bunsen και ψυχθεί πριν ακουμπήσει την επιφάνεια της καλλιέργειας των κυττάρων). Από τις καλλιέργειες που χρησιμοποιούνται ως απόθεμα (stock) των απομονωμένων βακτηριακών στελεχών που φυλλάσσονταν στους -80⁰C, με τη χρήση του βρόχου αποσπάζονταν ένα δείγμα, και γινόταν ο εμβολιασμός στα φιαλίδια που περιείχαν 6 ml YMB. Στην συνέχεια τα φιαλίδια με την καλλιέργεια επωάζονταν υπό ανάδευση στους 30⁰C για περίπου 18 ώρες, έως ότου φτάσουν σε εκθετική φάση ανάπτυξης και είναι έτοιμες για να χρησιμοποιηθούν για εμβολιασμό (OD~0.500-0.600).

3.8.2. Οπτική πυκνότητα

Η οπτική πυκνότητα των καλλιεργειών μετριόταν σε φασματοφωτόμετρο. Το φασματοφωτόμετρο είναι ένα φωτόμετρο (μια συσκευή για την μέτρηση της έντασης του φωτός) που μπορεί να μετρήσει την ένταση ως συνάρτηση του χρώματος, ή πιο συγκεκριμένα, το μήκος κύματος του φωτός. Σε αυτήν την εργασία χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο με εμπορικό σήμα HITACHI U-1100 Spectrophotometer.

Η μέτρηση των καλλιεργειών γινόταν σε μήκος κύματος 600nm (μεταξύ 500-650nm είθισται να μετράται η απορρόφηση μικροβιακών καλλιεργειών). Όλα τα δείγματα για τις μετρήσεις λαμβάνονταν υπό ασηπτικές συνθήκες με πιπέτα και είχαν όγκο 1ml. Σε όλες τις περιπτώσεις για τυφλό χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης.

3.8.3. Τελικές καλλιέργειες μέτρησης της αλατότητας

Για την μέτρηση αντοχής των βακτηριακών στελεχών στην αλατότητα χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης YMB με προσθήκη σε αυτό διαφορετικών συγκεντρώσεων NaCl. Για το κάθε στέλεχος χρησιμοποιούνταν τρεις κωνικές φιάλες Erlenmayer με υγρό θρεπτικό μέσο διαφορετικής συγκέντρωσης NaCl. Αποστειρώνονταν όπως περιγράφηκε παραπάνω και αφού ψύχονταν εμβολιάζονταν η καθεμία με εμβόλιο από την αντίστοιχη αρχική καλλιέργεια των 6ml που είχε αναπτυχθεί και είχε φτάσει σε εκθετική φάση την ίδια ημέρα.

Στην συνέχεια οι κωνικές φιάλες με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις αλατότητας επωάζονταν υπό ανάδευση στους 30⁰C.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Σύνθεση Διαλυμάτων

A. Διαλύματα απομόνωσης DNA

1. STET:

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

2. TE:

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

3. Λυσοζύμη:

50 mg λυσοζύμης (Boehringer-Mannheim) διαλύονται σε 1 ml dH₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20⁰C.

B. Διαλύματα ανάλυσης νουκλεϊνικών οξέων

4. RNase A:

10 mg RNase A διαλύονται σε 1 ml 10 mM Tris-HCl pH 7,5/15 mM NaCl. Το διάλυμα θερμαίνεται στους 100⁰C για 15 λεπτά, με σκοπό την αδρανοποίηση τυχόν δράσης DNase, αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου και φυλάσσεται στους -20⁰C.

5. 1 x TAE:

Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα 50 x TAE το οποίο αραιώνεται 50 φορές. **50 x TAE:** διαλύονται 242g Tris base, 57,1 ml οξικού οξέος και 100ml 0,5 M EDTA pH 8,0 σε ddH₂O, μέχρι τελικό όγκο 1lt.

6. Βρωμιούχο αιθίδιο:

Το βρωμιούχο αιθίδιο παρασκευάζεται ως πυκνό διάλυμα 0,5 mg/ml σε dH₂O και φυλλάσσεται στους 4⁰C. Η τελική συγκέντρωση του βρωμιούχου αιθιδίου στην πηκτή είναι 0,5μg/ml.

7. Διάλυμα φόρτωσης:

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

Γ. Διαλύματα υποκλωνοποίησης τμημάτων DNA

8. 10 x ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης:

0,66 M Tris-HCl pH 7,6, 50 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 10 mM ATP. Το πυκνό ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης φυλλάσσεται σε μικρές ποσότητες στους -20⁰C.

Δ. Διαλύματα μετασηματισμού κυττάρων E.coli

9. 100 mM IPTG:

0,0238 g IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, SIGMA) διαλύονται σε 1 ml ddH₂O. το διάλυμα αποστειρώνεται με φιλτράρισμα (0,22 μm Millipore) και φυλλάσσεται στους -20⁰C.

10. 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).

Ε. Διαλύματα αντίδρασης PCR

11. 10 x PCR ρυθμιστικό διάλυμα:

100 mM Tris-HCl pH 8,3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0,1% (w/v) gelatin (BDH).

Σύνθεση Τεχνητών Θρεπτικών Μέσων

LB: Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης βακτηρίων *E. coli*

Για την παρασκευή 1 lt θρεπτικού διαλύματος LB, σε τελικό όγκο 1 lt dH₂O 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 για 20 λεπτά στους 121⁰C. Το υγρό θρεπτικό μέσο φυλλάσσεται σε φιαλίδια MacCartney σε θερμοκρασία δωματίου ενώ τα τρυβλία με το στερεό μέσο φυλάσσονται στους 4⁰C.

YMB: Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης βακτηρίων του είδους *S.meliloti*

Για την παρασκευή 1 lt θρεπτικού διαλύματος YMB, σε τελικό όγκο 1 lt dH₂O προστίθενται 10 g Μανιτόλη, 0,5 g K₂HPO₄, 0,2 g MgSO₄-7H₂O, 0,1 g NaCl και 0,5 g Yeast extract. Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου σε τρυβλία, προστίθεται στο διάλυμα 1,5% άγαρ. Ακολουθεί αποστείρωση για 20 λεπτά στους 121⁰C. Το υγρό θρεπτικό μέσο φυλλάσσεται σε φιαλίδια MacCartney σε θερμοκρασία δωματίου ενώ τα τρυβλία με το στερεό μέσο φυλάσσονται στους 4⁰C.

Σύνθεση Μητρικών Διαλυμάτων – Αντιβιοτικών

Αμπικιλίνη:

Μητρικό Διάλυμα:	100 mg/ml σε ddH ₂ O
Τελική Συγκέντρωση:	100 μg/ml θρεπτικού διαλύματος

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Μοριακή ανάλυση γονιδίου 16S rRNA

4.1.1. 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 ακόλουθοι:

Forward:

16S-F: 5' - AGAGTTTGATCCTGGTCAG -3'

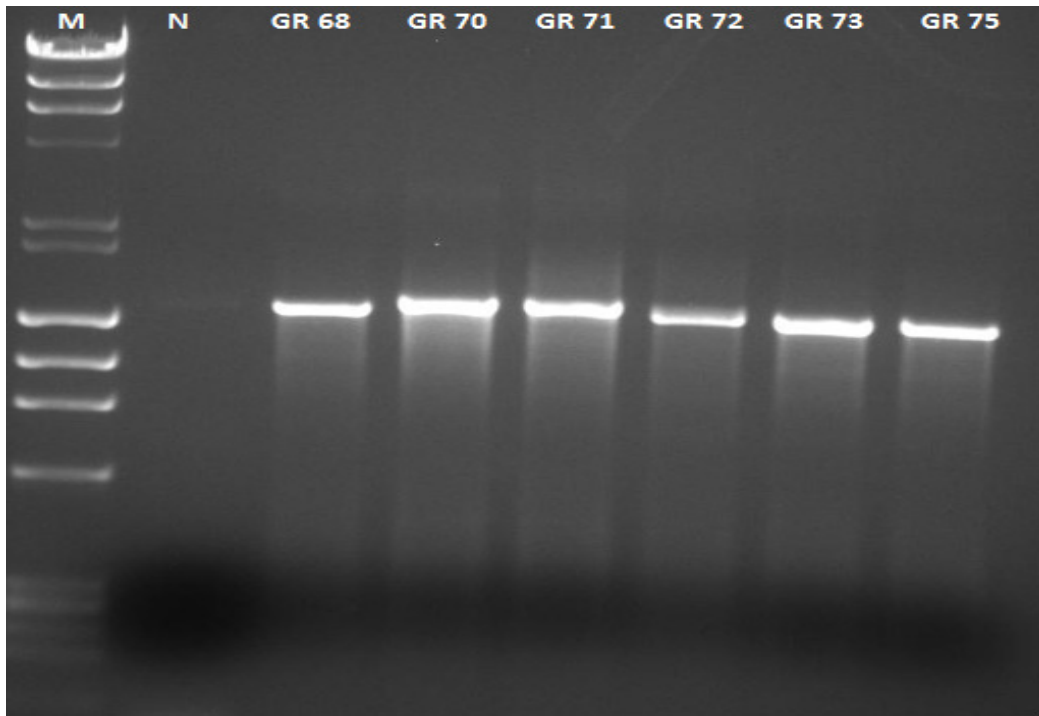
Reverse:

16S-R: 5' - CAAGTCGTA AAAAGGTAGCCGT -3'

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

Αρχική αποδιάταξη	94 ⁰ C για 4 λεπτά	} 35 κύκλοι
Αποδιάταξη	94 ⁰ C για 1 λεπτό	
Υβριδισμός εκκινητών	48 ⁰ C για 1 λεπτό	
Επιμήκυνση	72 ⁰ C για 1 λεπτό	
Τελική επιμήκυνση	72 ⁰ C για 5-10 λεπτά	

Τα προϊόντα που προέκυψαν από την PCR, υποκλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα pGEM-T Easy (Promega) και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τους (sequencing). Στη συνέχεια παρουσιάζεται ενδεικτική εικόνα ενίσχυσης PCR τμήματος του γονιδίου 16S rRNA (εικόνα 4.1).



Εικόνα 4.1: Ενίσχυση PCR τμήματος του γονιδίου 16S rRNA μεγέθους 1450bp στο ολικό γονιδιωματικό DNA των δειγμάτων GR68, GR70, GR71, GR72, GR73, GR75 (M= μάρτυρας μοριακών μεγεθών λ DNA *Hind* III και φX174 DNA *Hae* III).

4.1.4. Φυλογενετικό δέντρο των 9 ακολουθιών 16S rRNA

Στο φυλογενετικό δέντρο 16S rRNA φαίνεται ότι τα 9 στελέχη που ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ανήκουν όλα στο είδος *Sinorhizobium meliloti*. Επίσης διαπιστώνεται ότι δημιουργούν ομάδες (cluster) με τα αντίστοιχα κατά περίπτωση τυπικά στελέχη. Συγκεκριμένα δημιουργούν όλα ομάδα με το τυπικό στέλεχος *S. meliloti* 1021.

4.2. Μοριακή ανάλυση γονιδίου *nifH*

4.2.1. Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *nifH*

Πραγματοποιήθηκε μοριακή ανάλυση του γονιδίου που κωδικοποιεί για το *nifH*. Ενισχύθηκε τμήμα ~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 ακόλουθοι:

Forward:

Pol-F: 5'- TGC GAY CCS AAR GCB GAC TC -3'

Reverse:

Pol-R: 5'-ATS GCC ATC ATY TCR CCG GA -3'

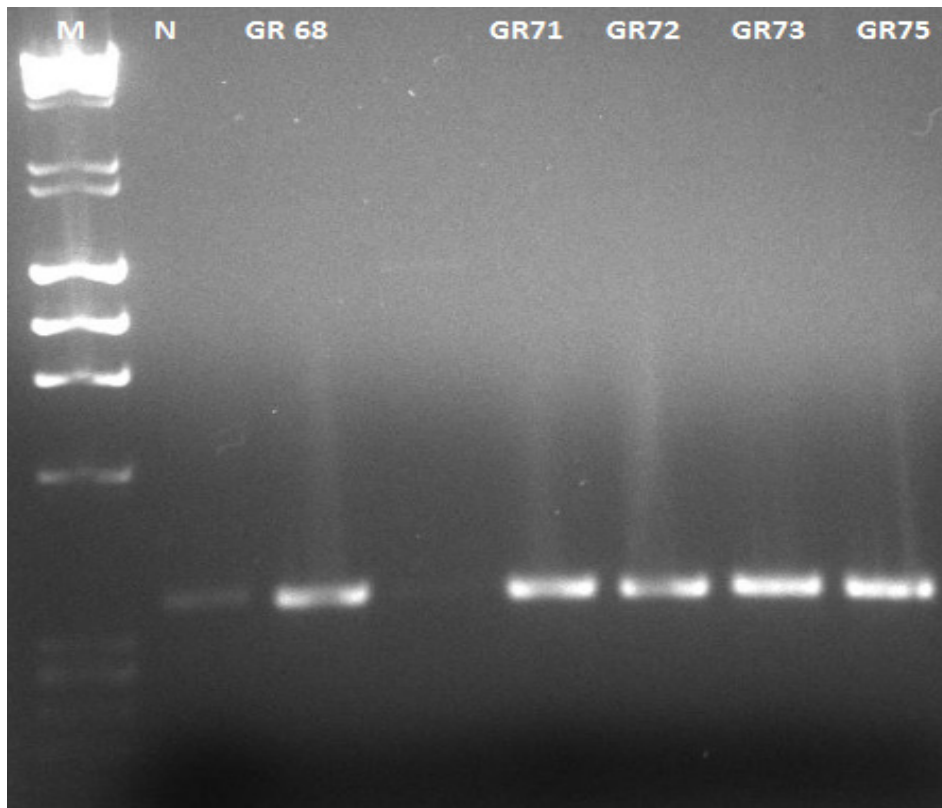
Y= C/T, S= G/C, R= A/G, B= C/G/T

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

Για την ενίσχυση του γονιδίου *nifH*, οι συνθήκες πραγματοποίησης της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης ήταν οι παρακάτω:

Αρχική αποδιάταξη	94 ⁰ C για 4 λεπτά	} 35 κύκλοι
Αποδιάταξη	94 ⁰ C για 1 λεπτό	
Υβριδισμός εκκινητών	55 ⁰ C για 1 λεπτό	
Επιμήκυνση	72 ⁰ C για 1 λεπτό	
Τελική επιμήκυνση	72 ⁰ C για 5-10 λεπτά	

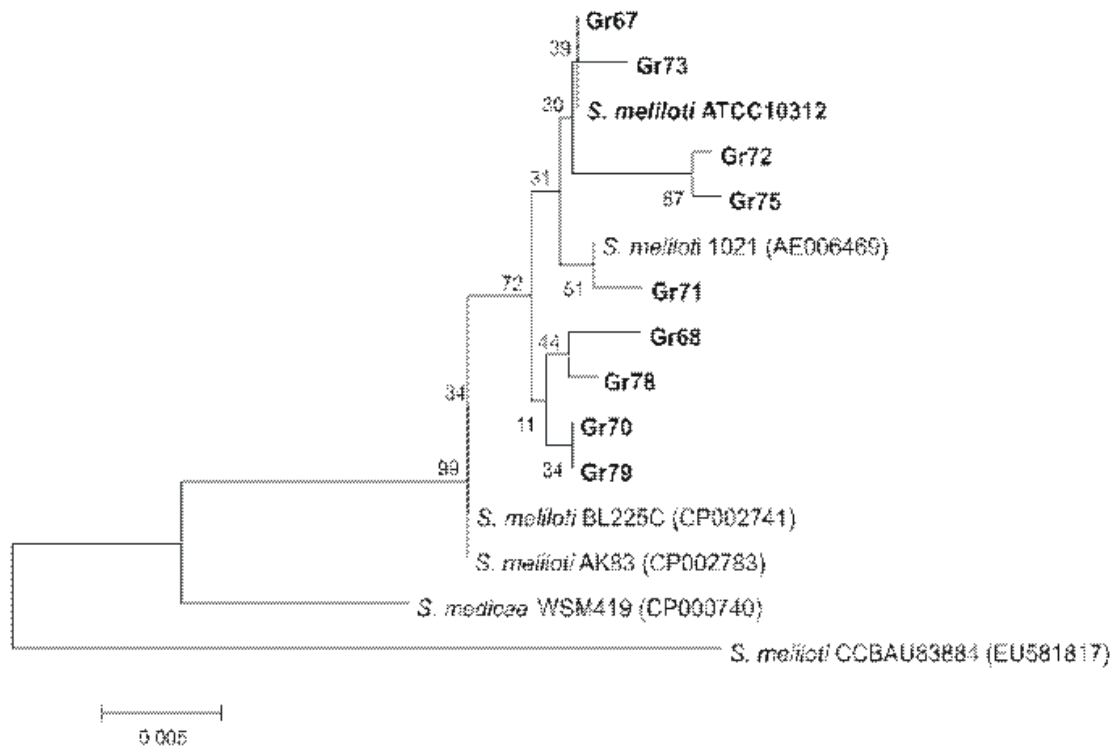
Τα προϊόντα που προέκυψαν από την PCR, υποκλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα pGEM-T Easy (Promega) και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τους (sequencing). Στη συνέχεια παρουσιάζεται ενδεικτική εικόνα ενίσχυσης PCR τμήματος του γονιδίου *nifH* (εικόνα 4.3).



Εικόνα 4.3: Ενίσχυση PCR τμήματος του γονιδίου *nifH* μεγέθους ~360 bp στο ολικό γονιδιωματικό DNA των δειγμάτων GR68, GR71, GR72, GR73, GR75 (M= μάρτυρας μοριακών μεγεθών λ DNA *Hind* III και φX174 DNA *Hae* III).

4.2.2. Φυλογενετικό δέντρο των 9 ακολουθιών *nifH*

Στο φυλογενετικό δέντρο *nifH* φαίνεται ότι τα 9 στελέχη που ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ανήκουν όλα στο είδος *Sinorhizobium meliloti*. Επίσης διαπιστώνεται ότι δημιουργούν ομάδες (cluster) με τα αντίστοιχα κατά περίπτωση τυπικά στελέχη. Συγκεκριμένα δημιουργούν όλα ομάδα με τα τυπικά στελέχη *S. meliloti* 1021 και *S. meliloti* 10312.



Εικόνα 4.4: Εξελικτικές σχέσεις των υπό μελέτη στελεχών και στελεχών αναφοράς βάσει νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου *nifH*. Η απεικόνιση της εξελικτικής ιστορίας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining (Saitou και 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 συγροτούν μια 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 *S. meliloti* CCBAU83884. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν ως ακολουθίες αναφοράς τα τυπικά στελέχη *S. meliloti* ATCC10312, *S. meliloti* 1021, *S. meliloti* BL225C, *S. meliloti* AK83, *S. medicae* WSM419. Όλες οι θέσεις που περιείχαν κενά ή απουσίαζαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν (επιλογή πλήρους απάλειψης). Σύνολο 357 βάσεις. Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007).

4.3. Μοριακή ανάλυση γονιδίου *nodC*

4.3.1. Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *nodC*

Πραγματοποιήθηκε μοριακή ανάλυση του γονιδίου που κωδικοποιεί για το *nodC*. Ενισχύθηκε τμήμα ~400 βάσεων (46% του συνολικού *nodC* γονιδίου) με χρήση της τεχνικής PCR.

Για την ενίσχυση του τμήματος *nodC* χρησιμοποιήθηκαν εκφυλισμένοι εκκινητές και είναι οι ακόλουθοι:

Forward:

NODC-F: 5' - GCACAHGGGCCGAGCAACACA -3'

Reverse:

NODC-R: 5' - GGAAAGCGSAARGCGCARATYGC -3'

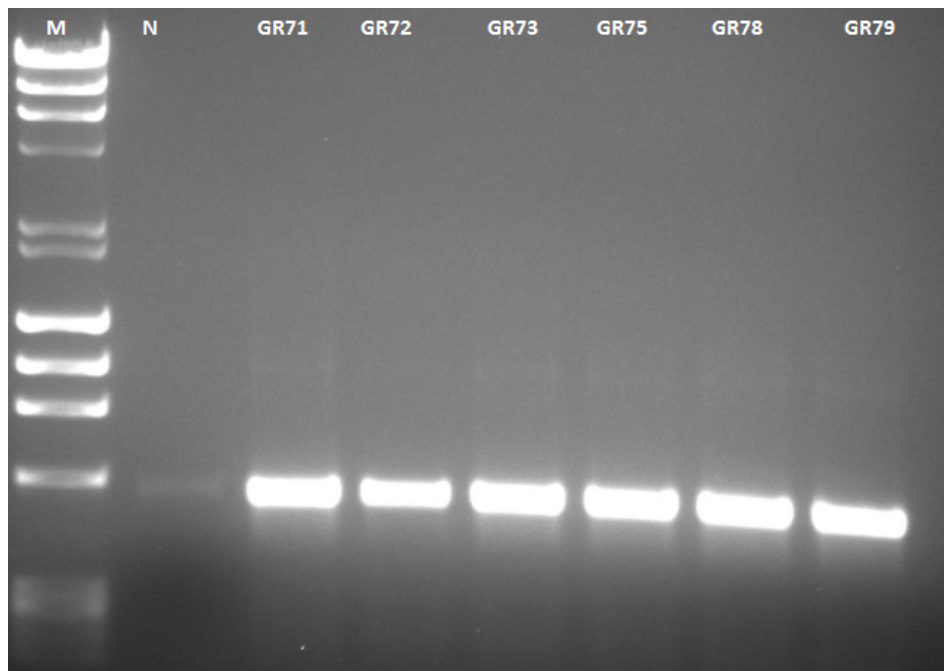
Y= C/T, S= G/C, R= A/G, H= C/A/T

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

Για την ενίσχυση του γονιδίου *nodC*, οι συνθήκες πραγματοποίησης της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης ήταν οι παρακάτω:

Αρχική αποδιάταξη	94 ⁰ C για 4 λεπτά	} 35 κύκλοι
Αποδιάταξη	94 ⁰ C για 1 λεπτό	
Υβριδισμός εκκινητών	60 ⁰ C για 1 λεπτό	
Επιμήκυνση	72 ⁰ C για 1 λεπτό	
Τελική επιμήκυνση	72 ⁰ C για 5-10 λεπτά	

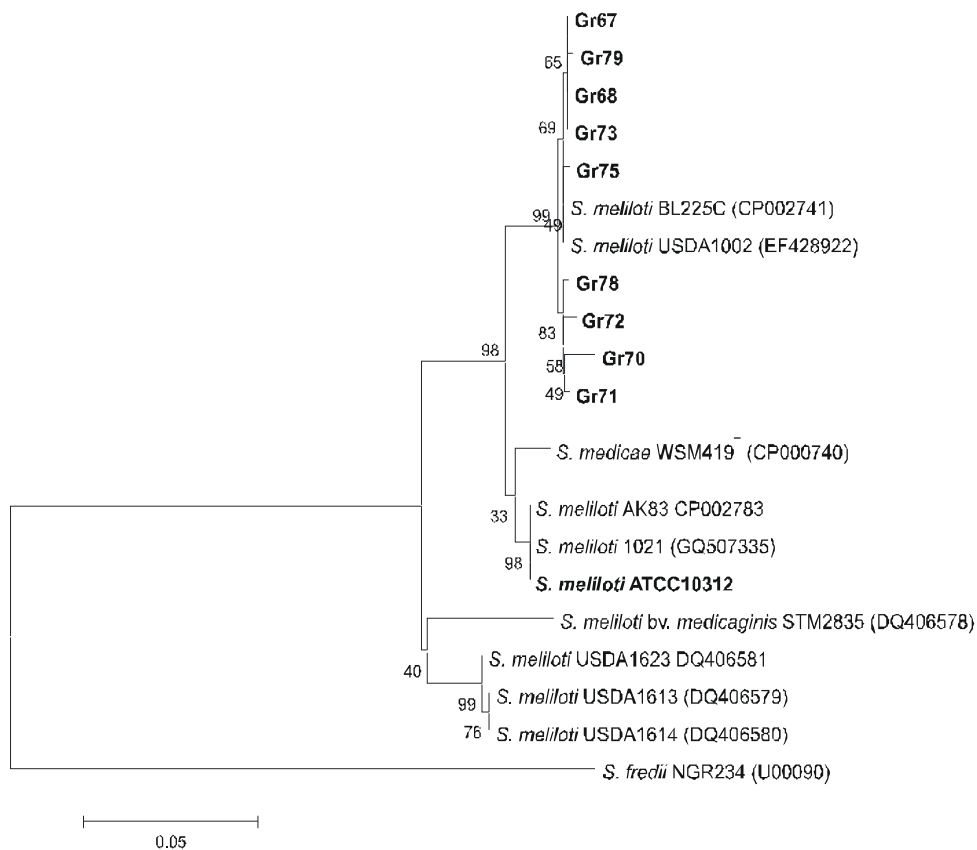
Τα προϊόντα που προέκυψαν από την PCR, υποκλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα pGEM-T Easy (Promega) και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τους (sequencing). Στη συνέχεια παρουσιάζεται ενδεικτική εικόνα ενίσχυσης PCR τμήματος του γονιδίου *nodC* (εικόνα 4.5).



Εικόνα 4.5: Ενίσχυση PCR τμήματος του γονιδίου *nodC* μεγέθους ~600 βάσεων στο ολικό γονιδιωματικό DNA των δειγμάτων GR71, GR72, GR73, GR75, GR78, GR79 (M= μάρτυρας μοριακών μεγεθών λ DNA *Hind* III και φX174 DNA *Hae* III).

4.3.2. Φυλογενετικό δέντρο των 9 ακολουθιών *nodC*

Στο φυλογενετικό δέντρο *nodC* φαίνεται ότι τα 9 στελέχη που ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ανήκουν όλα στο είδος *Sinorhizobium meliloti*. Επίσης διαπιστώνεται ότι δημιουργούν ομάδες (cluster) με τα αντίστοιχα κατά περίπτωση τυπικά στελέχη. Συγκεκριμένα δημιουργούν όλα ομάδα με τα τυπικά στελέχη *S. meliloti* 1021 και *S. meliloti* 10312.



Εικόνα 4.6: Εξελικτικές σχέσεις των υπό μελέτη στελεχών και στελεχών αναφοράς βάσει νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου *nodC*. Η απεικόνιση της εξελικτικής ιστορίας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining (Saitou και 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 συγροτούν μια 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 *S. fredii* NGR 234. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν ως ακολουθίες αναφοράς τα τυπικά στελέχη *S. meliloti* BL225C, *S. meliloti* USDA1002, *S. medicae* WSM419, *S. meliloti* AK83, *S. meliloti* 1021, *S. meliloti* ATCC10312, *S. meliloti* USDA1623, *S. meliloti* USDA1613, *S. meliloti* USDA1614. Όλες οι θέσεις που περιείχαν κενά ή απουσίαζαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν (επιλογή πλήρους απάλειψης). Σύνολο 391 βάσεις. Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007).

4.4. Μοριακή ανάλυση ITS1 περιοχής

4.4.1. Ενίσχυση τμήματος της διαγονιδιακής περιοχής ITS1

Πραγματοποιήθηκε μοριακή ανάλυση της διαγονιδιακής περιοχής ITS1. Ενισχύθηκε τμήμα περίπου 1200 βάσεων με χρήση της τεχνικής PCR. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση με PCR του τμήματος ITS1 είναι οι ακόλουθοι:

Forward:

ITS1-F: 5'- GCAGTTCGAGTCTGCCCGGGC -3'

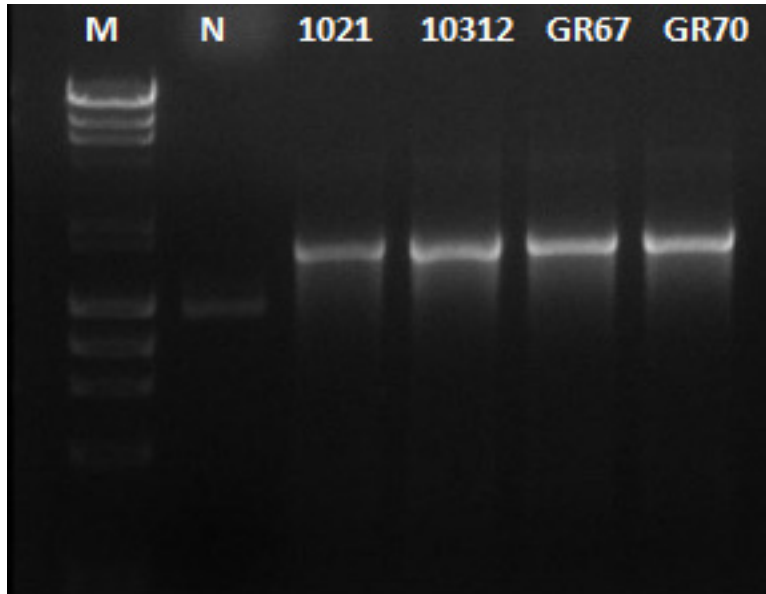
Reverse:

ITS1-R: 5'- CTTGCGGAGTCTCGGTTGATGTCC -3'

Για την ενίσχυση της διαγονιδιακής περιοχής ITS1, οι συνθήκες πραγματοποίησης της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης ήταν οι παρακάτω:

Αρχική αποδιάταξη	94 ⁰ C για 4 λεπτά	} 35 κύκλοι
Αποδιάταξη	94 ⁰ C για 1 λεπτό	
Υβριδισμός εκκινητών	60 ⁰ C για 1 λεπτό	
Επιμήκυνση	72 ⁰ C για 1 λεπτό	
Τελική επιμήκυνση	72 ⁰ C για 5-10 λεπτά	

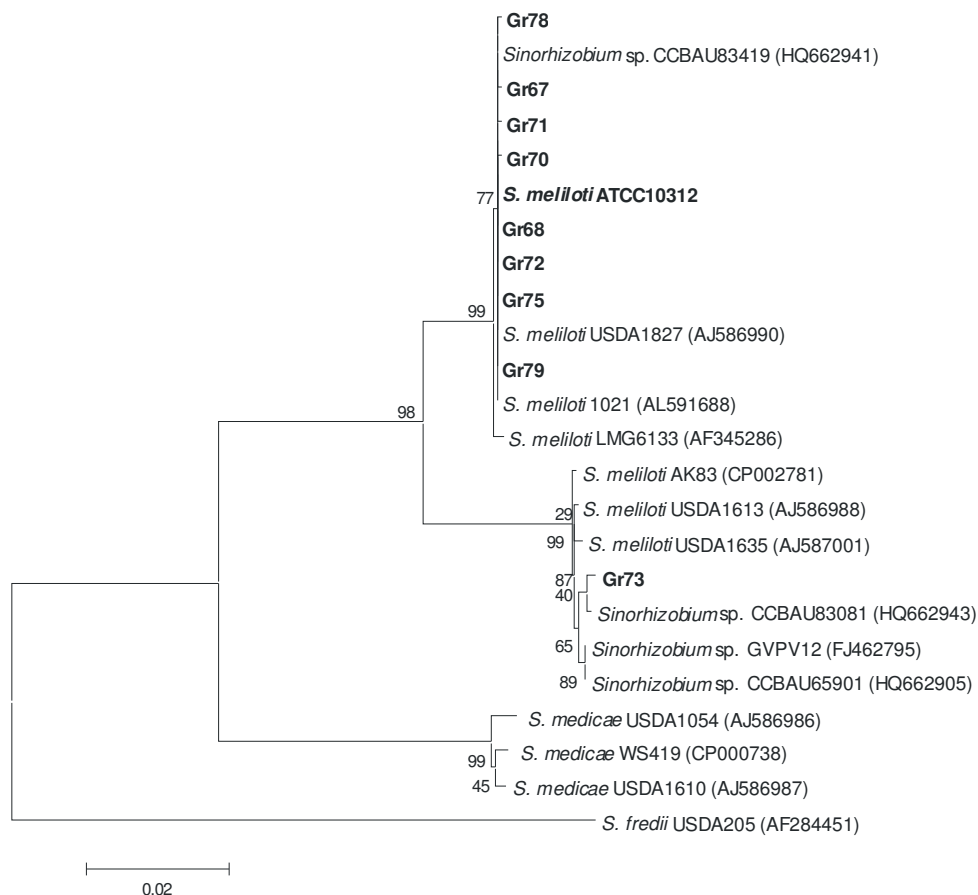
Τα προϊόντα που προέκυψαν από την PCR, υποκλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα pGEM-T Easy (Promega) και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τους (sequencing). Στη συνέχεια παρουσιάζεται ενδεικτική εικόνα ενίσχυσης PCR τμήματος της διαγονιδιακής περιοχής ITS1 (εικόνα 4.7).



Εικόνα 4.7: Ενίσχυση PCR τμήματος της διαγονιδιακής περιοχής ITS1 μεγέθους ~1900 βάσεων στο ολικό γονιδιωματικό DNA των δειγμάτων 1021, 10312, GR67, GR70 (M= μάρτυρας μοριακών μεγεθών λ DNA *Hind* III και φX174 DNA *Hae* III).

4.4.2. Φυλογενετικό δέντρο των 9 ακολουθιών ITS1

Στο φυλογενετικό δέντρο ITS1 φαίνεται ότι τα 9 στελέχη που ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ανήκουν όλα στο είδος *Sinorhizobium meliloti*. Επίσης διαπιστώνεται ότι δημιουργούν ομάδες (cluster) με τα αντίστοιχα κατά περίπτωση τυπικά στελέχη. Συγκεκριμένα δημιουργούν όλα ομάδα με τα τυπικά στελέχη *S. meliloti* 1021 και *S. meliloti* 10312. Το μόνο στέλεχος που δημιουργεί διαφορετική ομάδα είναι το στέλεχος GR 73 το οποίο ομαδοποιείται με το τυπικό στέλεχος *S. meliloti* AK83.



Εικόνα 4.8: Εξελικτικές σχέσεις των υπό μελέτη στελεχών και στελεχών αναφοράς βάσει νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της διαγονιδιακής περιοχής ITS1 . Η απεικόνιση της εξελικτικής ιστορίας πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Neighbor-Joining (Saitou και 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 μια 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 *S. fredii* USDA205. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν ως ακολουθίες αναφοράς τα τυπικά στελέχη *Sinorhizobium sp.* CCBAU83419, *S. meliloti* ATCC10312, *S. meliloti* USDA1827, *S. meliloti* 1021, *S. meliloti* LMG6133, *S. meliloti* AK83, *S. meliloti* USDA1613, *S. meliloti* USDA1635, *Sinorhizobium sp.* CCBAU83081, *Sinorhizobium sp.* GVPV12, *Sinorhizobium sp.* CCBAU65901, *S. medicae* USDA1054, *S. medicae* WSM419, *S. medicae* USDA1610. Όλες οι θέσεις που περιείχαν κενά ή απουσίαζαν πληροφορίες δεν υπολογίστηκαν (επιλογή πλήρους απάλειψης). Σύνολο 1157 βάσεις. Όλες οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007).

4.5. Μοριακή ανάλυση των ακολουθιών REP και ERIC

4.5.1. Ενίσχυση των ακολουθιών REP

Πραγματοποιήθηκε μοριακή ανάλυση των ακολουθιών REP. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν (Versalovic *et al.*, 1991) για την ενίσχυση με PCR των REP ακολουθιών είναι οι ακόλουθοι:

REP1-R: 5' - IIIICGICGICATCIGGC-3'

REP2-R: 5' - ICGICTTATCIGGCCTAC -3'

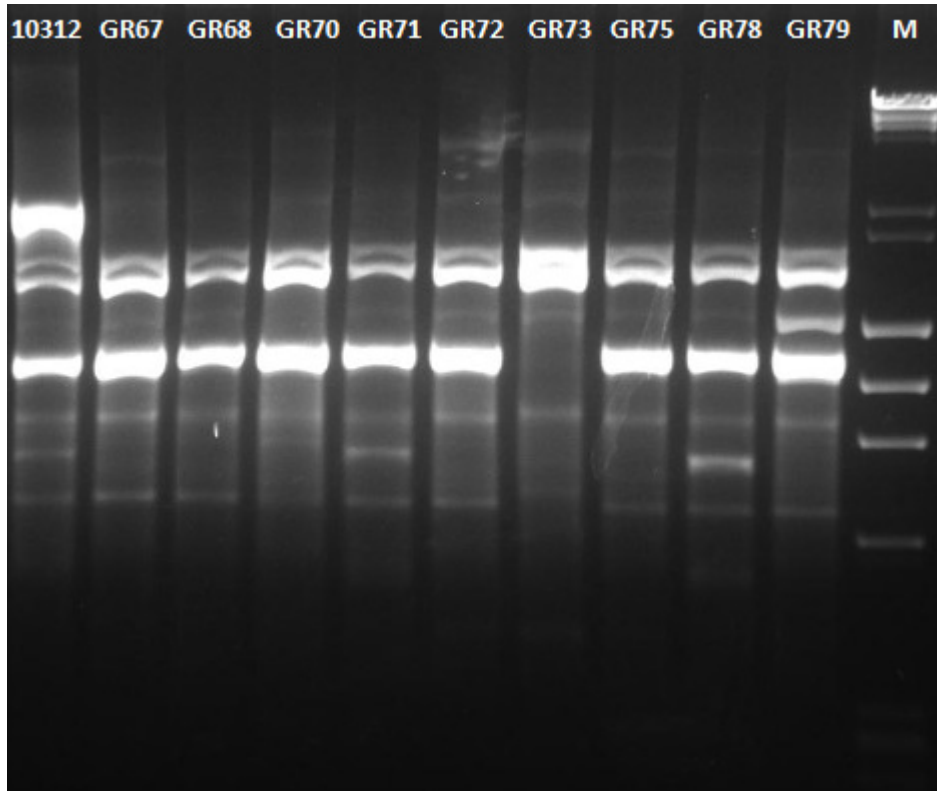
I = ινοσίνη

Για την ενίσχυση των ακολουθιών REP (repetitive extragenic palindromic elements), οι συνθήκες πραγματοποίησης της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης ήταν οι παρακάτω:

Αρχική αποδιάταξη	94,5 ⁰ C για 7 λεπτά	} 35 κύκλοι
Αποδιάταξη	94 ⁰ C για 1 λεπτό	
Υβριδισμός εκκινητών	40 ⁰ C για 1 λεπτό	
Επιμήκυνση	65 ⁰ C για 8 λεπτά	
Τελική επιμήκυνση	65 ⁰ C για 8 λεπτά	

Τα προϊόντα που προέκυψαν από την PCR, ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης.

Από το πήκτωμα αγαρόζης φαίνονται τα διαφορετικά γενετικά προφίλ των 9 στελεχών που έχουν ταυτοποιηθεί στην παρούσα εργασία. Τα 9 στελέχη ομαδοποιούνται μεταξύ τους σύμφωνα με την ομολογία των προτύπων ζώνωσης. Συγκεκριμένα οι ομάδες που δημιουργούνται είναι οι εξής: 1^η ομάδα δημιουργούν τα στελέχη GR72, GR75 και GR67, 2^η ομάδα το στέλεχος GR73, 3^η ομάδα το στέλεχος GR70, 4^η ομάδα τα στελέχη GR79, 5^η ομάδα το στέλεχος GR68, 6^η ομάδα τα στελέχη GR78 και GR71 και μόνο του ομαδοποιείται το τυπικό στέλεχος *S. meliloti* 10312.



Εικόνα 4.9: Τα πρότυπα από το ολικό γονιδιωματικό DNA όλων των δειγμάτων που προέκυψαν μετά από ενίσχυση PCR των ακολουθιών REP. Τα δείγματα είναι τα: 10312, GR67, GR68, GR70, GR71, GR72, GR73, GR75, GR78, GR79 (M= μάρτυρας μοριακών μεγεθών λ DNA *Hind* III και φX174 DNA *Hae* III).

4.5.2. Ενίσχυση των ακολουθιών ERIC

Πραγματοποιήθηκε μοριακή ανάλυση των ακολουθιών ERIC. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν (Versalovic *et al.*, 1991) για την ενίσχυση με PCR των ERIC ακολουθιών είναι οι ακόλουθοι:

ERIC1 R: 5' - ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC -3'

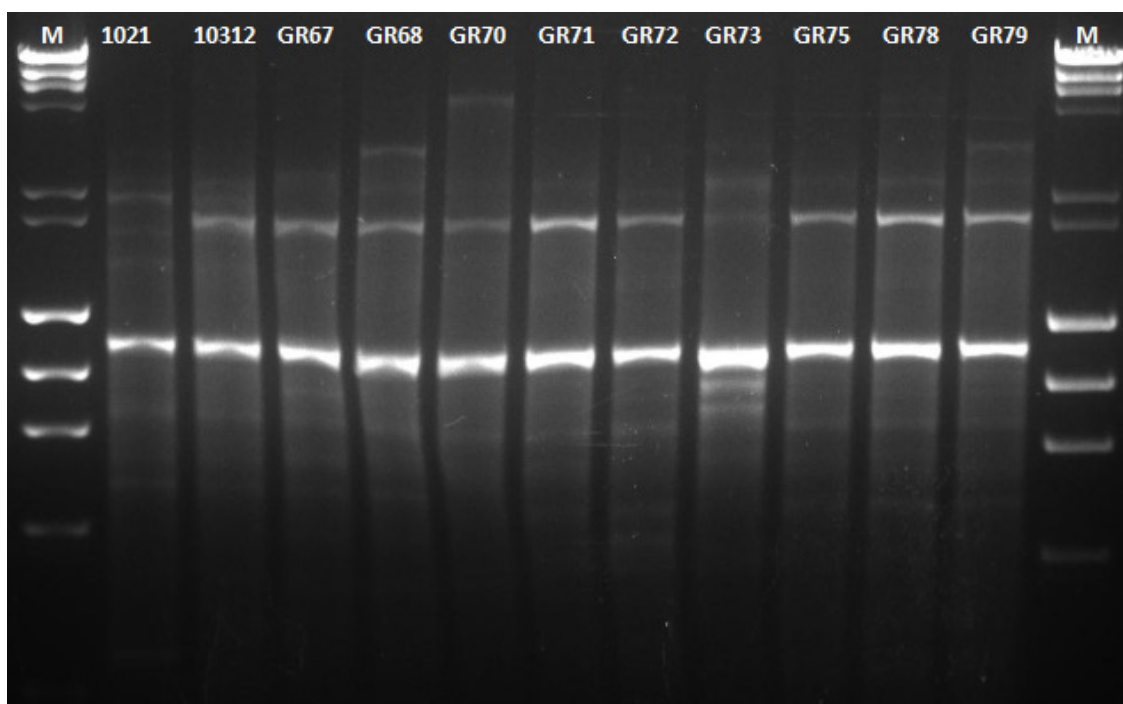
ERIC2: 5' - AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'

Για την ενίσχυση των ακολουθιών ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus), οι συνθήκες πραγματοποίησης της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης ήταν οι παρακάτω:

Αρχική αποδιάταξη	94,5 °C για 7 λεπτά	} 35 κύκλοι
Αποδιάταξη	94°C για 1 λεπτό	
Υβριδισμός εκκινητών	45°C για 1 λεπτό	
Επιμήκυνση	65°C για 8 λεπτά	
Τελική επιμήκυνση	65°C για 8 λεπτά	

Τα προϊόντα που προέκυψαν από την PCR, ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης.

Από το πήκτωμα αγαρόζης φαίνονται τα διαφορετικά γενετικά προφίλ των 9 στελεχών που έχουν ταυτοποιηθεί στην παρούσα εργασία. Επειδή όμως οι ζώνες που προέκυψαν από την μοριακή ανάλυση των ακολουθιών ERIC είναι αχνές δεν μπορεί να προκύψει ομαδοποίηση των στελεχών σύμφωνα με την ομολογία των προτύπων ζώνωσης. Σίγουρα όμως μπορούν να δημιουργηθούν δύο ομάδες: 1^η ομάδα δημιουργεί το στέλεχος GR73, 2^η ομάδα το στέλεχος GR70 και μόνο τους ομαδοποιούνται τα τυπικά στελέχη *S. meliloti* 1021 και *S. meliloti* 10312.



Εικόνα 4.10: Τα πρότυπα από το ολικό γονιδιωματικό DNA όλων των δειγμάτων που προέκυψαν μετά από ενίσχυση PCR των ακολουθιών ERIC. Τα δείγματα είναι τα: 1021, 10312, GR67, GR68, GR70, GR71, GR72, GR73, GR75, GR78, GR79 (M= μάρτυρας μοριακών μεγεθών λ DNA *Hind* III και φX174 DNA *Hae* III).

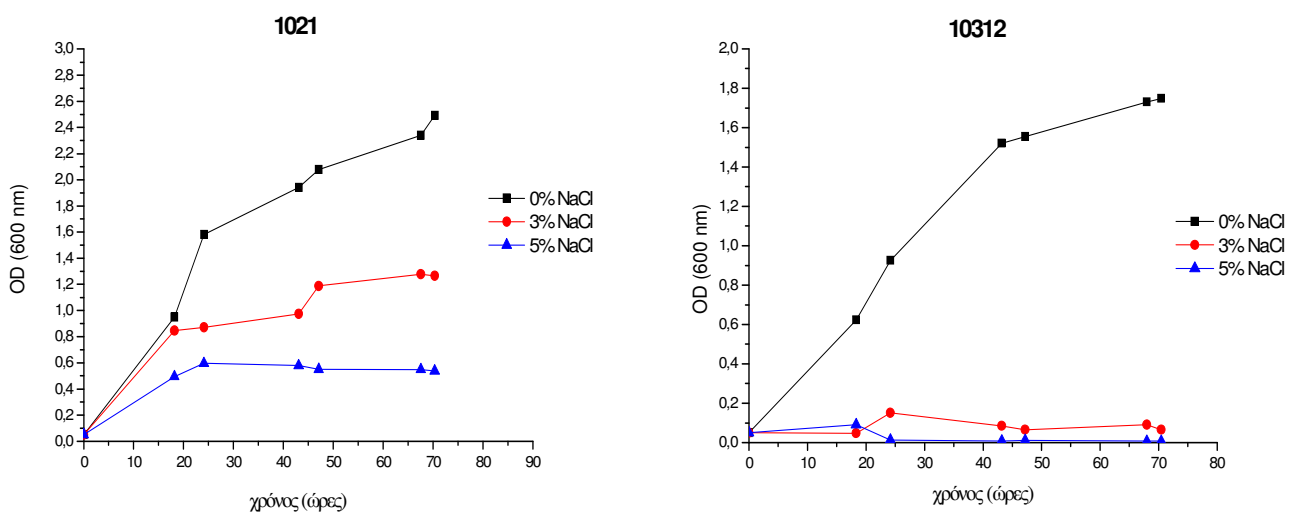
4.6. Μελέτη της ανάπτυξης του *S. meliloti* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl

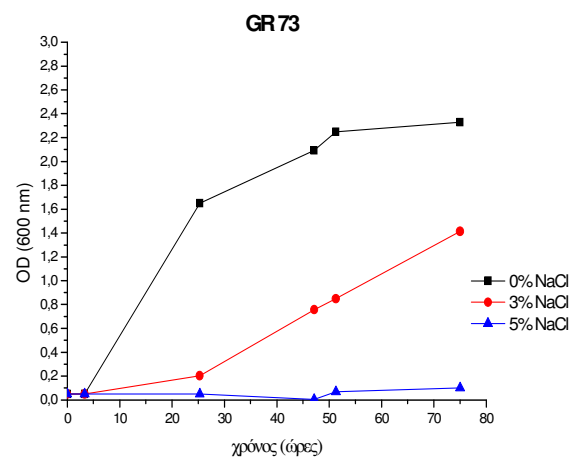
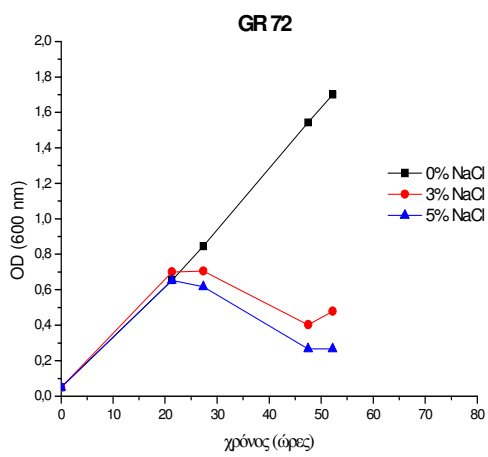
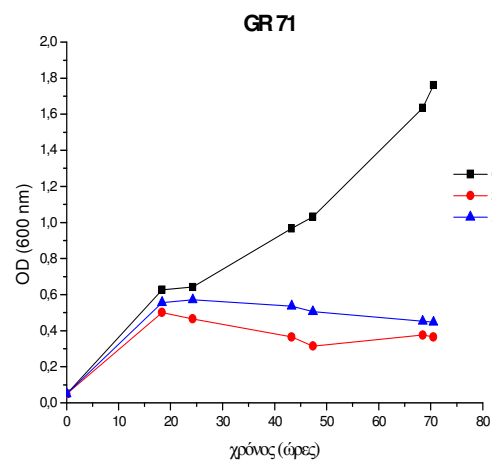
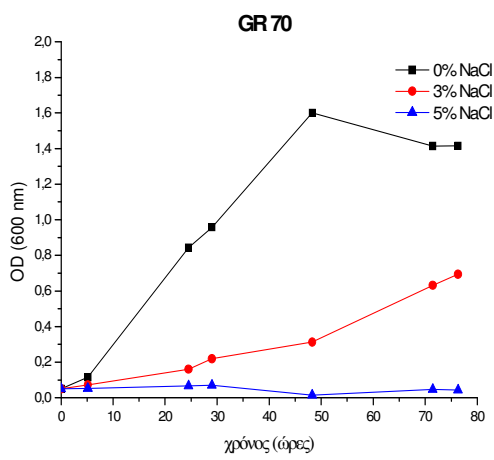
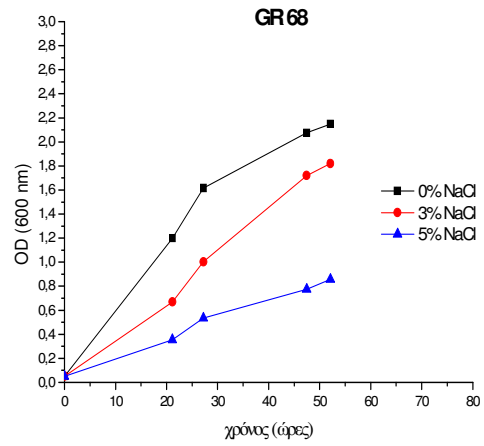
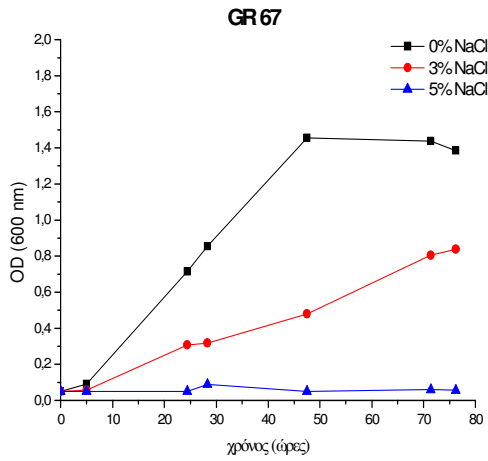
Για την μελέτη ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών σε συνθήκες αλατότητας χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης (YMB) με προσθήκη σε αυτό διαφορετικών συγκεντρώσεων NaCl. Οι τελικές συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν ήταν 0%, 3% και 5% NaCl. Για το κάθε στέλεχος χρησιμοποιούνταν τρεις κωνικές φιάλες με υγρό θρεπτικό μέσο διαφορετικής συγκέντρωσης NaCl (0%, 3%, 5%) σε τελικό όγκο 10ml. Το εμβόλιο ήταν 100μl (αναλογία 1:100) από την αντίστοιχη αρχική καλλιέργεια των 6ml που είχε αναπτυχθεί και είχε φτάσει σε εκθετική φάση την ίδια ημέρα.

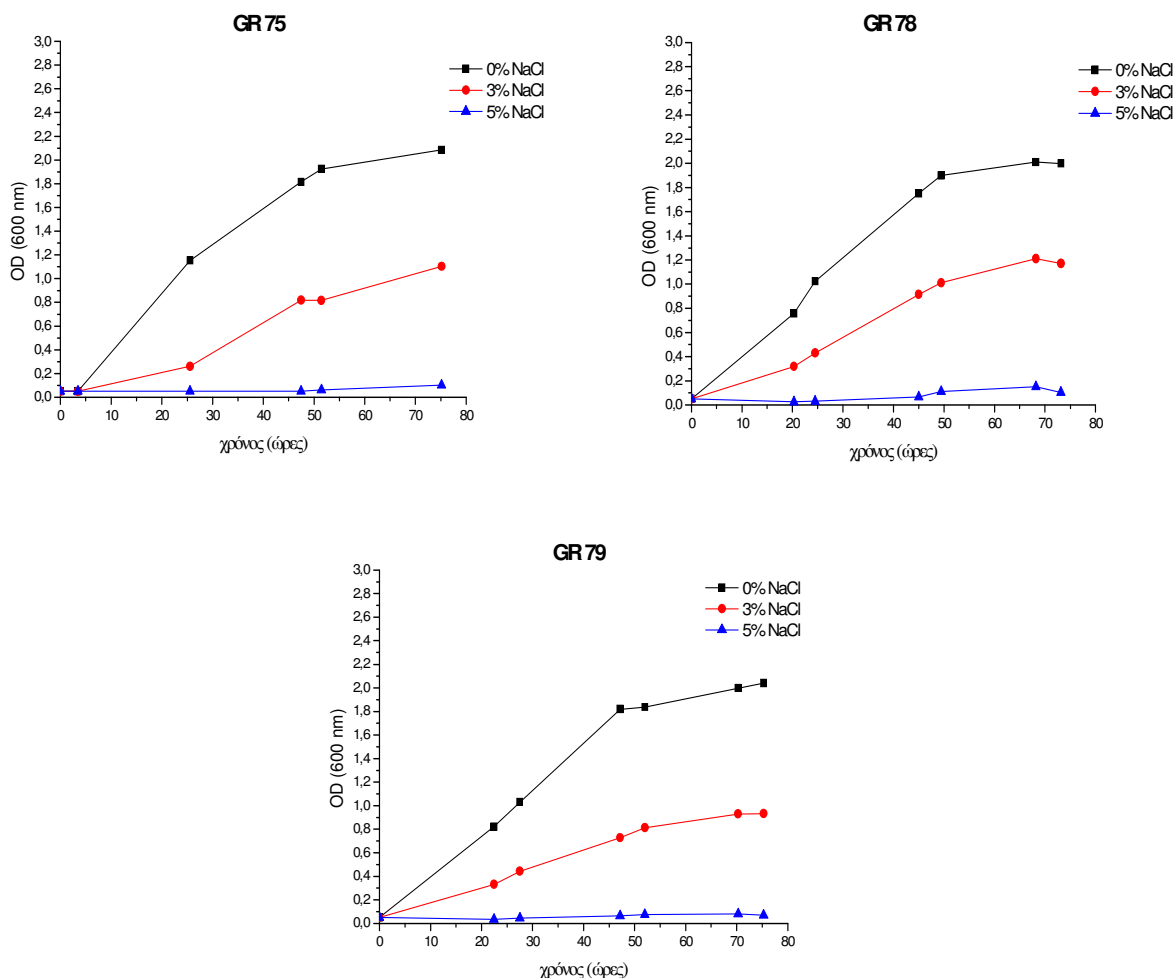
Προκειμένου να κατασκευαστούν οι καμπύλες ανάπτυξης των στελεχών, μετριόταν η οπτική απορρόφηση των τριών καλλιεργειών (διαφορετικής συγκέντρωσης αλατότητας) για το κάθε στέλεχος στα 600nm και παίρνονταν τουλάχιστον τρεις μετρήσεις την ημέρα. Κάθε καμπύλη διηρκήσε περίπου 70 ώρες από αρχική πυκνότητα 0,05 έως ότου οι καλλιέργειες φτάσουν σε στατική φάση ανάπτυξης.

Όλα τα δείγματα για τις μετρήσεις λαμβάνονταν υπό ασηπτικές συνθήκες με πιπέτα και είχαν όγκο 1ml. Σε όλες τις περιπτώσεις για τυφλό χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης.

4.6.1 Καμπύλες ανάπτυξης όλων των στελεχών σε 0%, 3% και 5% NaCl



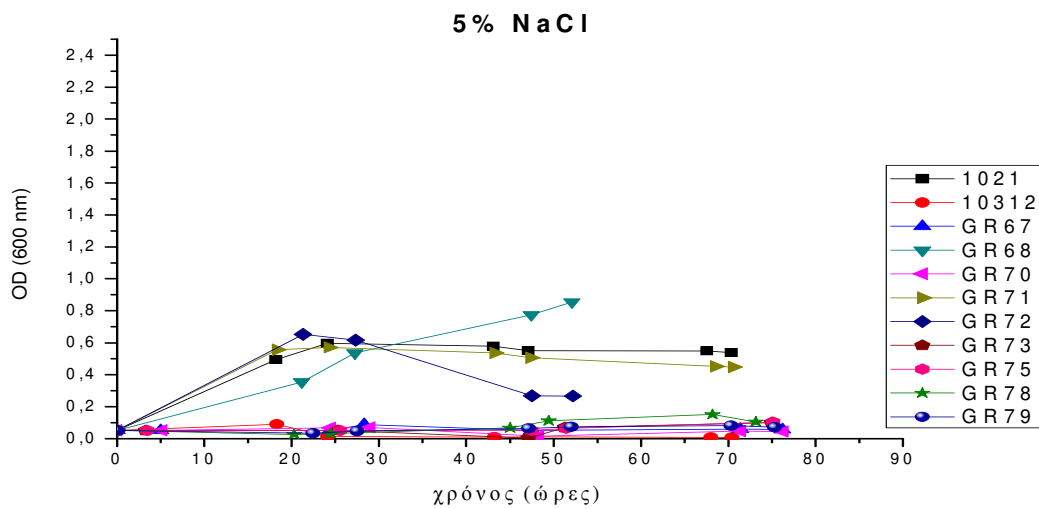
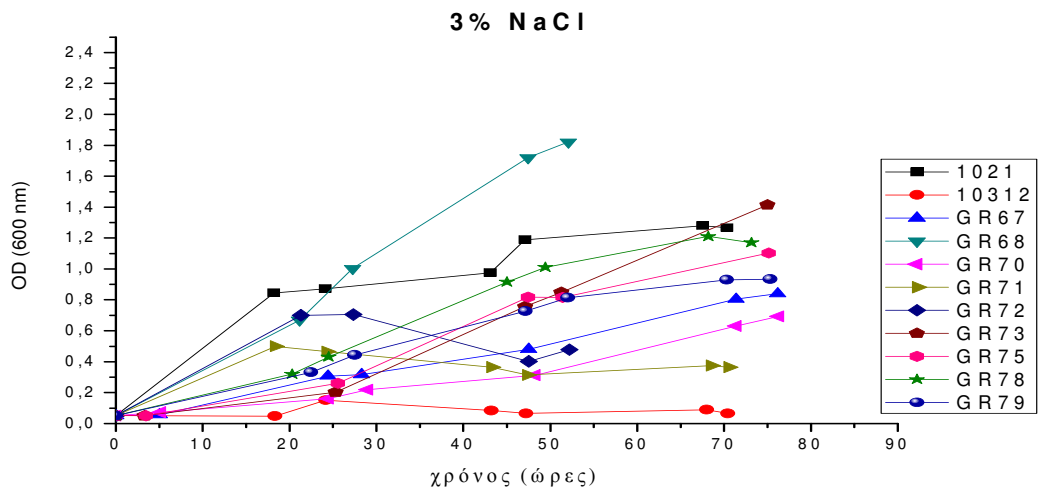
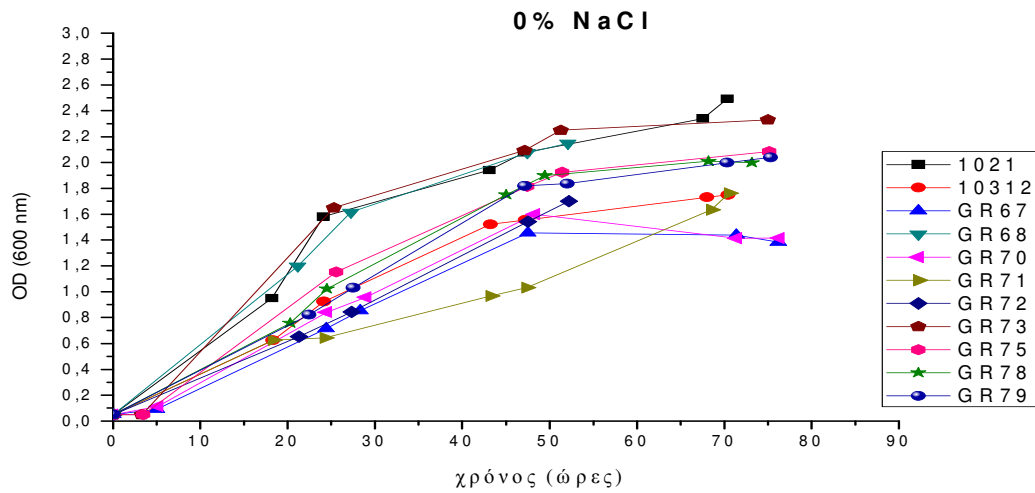




Διαγράμματα 4.1: Καμπύλες ανάπτυξης όλων των στελεχών (1021, 10312, GR67, GR68, GR70, GR71, GR72, GR73, GR75, GR78, GR79). Για το κάθε στέλεχος φαίνεται η καμπύλη ανάπτυξης του σε 0% (control)(μαύρη καμπύλη), σε 3% (κόκκινη καμπύλη) και σε 5% (μπλε καμπύλη) NaCl.

Από τις καμπύλες ανάπτυξης των απομονοθέντων στελεχών φαίνεται η συμπεριφορά τους σε συνθήκες αλατότητας, 0%, 3% και 5% NaCl. Γίνεται εμφανές από τα διαγράμματα ότι σε συνθήκες υψηλής αλατότητας, μόνο τέσσερα από τα στελέχη μπορούν να αναπτυχθούν. Αυτά τα στελέχη είναι: το τυπικό στέλεχος 1021, το GR 68, το GR 71 και το GR 72. Επίσης φαίνεται, ότι για συνθήκες ανάπτυξης αλατότητας 3%, όλα τα στελέχη μπορούν να αναπτυχθούν εκτός από το τυπικό στέλεχος 10312.

Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνονται και από τα τρία συγκεντρωτικά διαγράμματα που παραθέτονται παρακάτω. Στα διαγράμματα αυτά φαίνονται οι καμπύλες ανάπτυξης όλων των στελεχών για κάθε μία από τις συγκεντρώσεις αλατότητας που μελετήθηκαν. Το διάγραμμα 0% NaCl χρησιμοποιήθηκε ως control αφού φαίνεται η ανάπτυξη των στελεχών στις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης (πείραμα ελέγχου).



Διαγράμματα 4.2: Καμπύλες ανάπτυξης όλων των στελεχών (1021, 10312, GR67, GR68, GR70, GR71, GR72, GR73, GR75, GR78, GR79). Για την κάθε συγκέντρωση NaCl φαίνονται συγκεντρωτικά οι καμπύλες ανάπτυξης όλων των στελεχών. Το διάγραμμα 0% NaCl χρησιμοποιήθηκε ως control.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα στελέχη που χαρακτηρίστηκαν στην παρούσα εργασία έχουν απομονωθεί από το Εργαστήριο Γεωργικής Μικροβιολογίας του ΓΠΑ. Οι απομονώσεις πραγματοποιήθηκαν δειγματοληπτικά από τα διάφορα παράκτια συστήματα αμμοθινών της Ελλάδας.

Οι περιοχές είναι οι εξής: Αττική (Ραφήνα, Αγκίστρι, Καλύβια), Κυκλάδες (Σύρος, Άνδρος), Βόρειο Αιγαίο (Λέσβος, Σάμος), Δωδεκάνησα (Πάτμος), Πρέβεζα (Κανάλι).

Μελετήθηκαν τα στελέχη GR67, GR68, GR70, GR71, GR72, GR73, GR75, GR78, GR79 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.

Στόχος της εργασίας ήταν πρώτα 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 το συντηρημένο (housekeeping) γονίδιο 16S rRNA καθώς και τμημάτων δύο γονιδίων υπεύθυνων για τις σημαντικότερες ιδιότητες των συμβιωτικών αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων *nifH* (αζωτοδέσμευση) και *nodC* (παραγωγή Nod παράγοντα). Επίσης υποκλωνοποιήθηκε και αλληλουχήθηκε τμήμα της διαγονιδιακής περιοχής ITS1.

Το γονίδιο 16S rRNA είναι καθολικό στα βακτήρια, και έτσι αποτελεί ένα δυναμικό φυλογενετικό εργαλείο. Η σύγκριση των ακολουθιών του 16S rRNA γονιδίου επιτρέπει τη διαφοροποίηση μεταξύ των οργανισμών σε επίπεδο γένους σε όλα τα μεγάλα φύλα των βακτηρίων (Jill, 2004). Το γονίδιο αποτελεί το πιο αποδεκτό και ευρέως χρησιμοποιούμενο συντηρημένο γονίδιο που χρησιμοποιείται στην βακτηριακή ταξινόμηση και φυλογένεια. Έχει μέγεθος ~1500 bp, το οποίο εξυπηρετεί σε έρευνες βιοπληροφορικής (Janda και 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 1.300 βάσεων (< 0,5% αμφιβολία) (Stackebrandt *et al.*, 2002). Για τον λόγο αυτό ενισχύθηκε τμήμα περίπου 1450 βάσεων του 16S rRNA, επί συνόλου περίπου 1500 bp (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. Η σύγκριση των ακολουθιών του 16S rRNA γονιδίου δεν είναι αξιόπιστη για την ταξινόμηση των στελεχών σε επίπεδο είδους και υποείδους,

επειδή οι αλολουθίες είναι ιδιαίτερα συντηρημένες μεταξύ των βακτηρίων (Frothingham και Wilson, 1993, Laguerre *et al.*, 1994).

Έτσι υποκλωνοποιήθηκε και αλληλουχήθηκε τμήμα της διαγονιδιακής περιοχής ITS1. Η 16S-23S διαγονιδιακή περιοχή (IGS) ή ITS (internal transcribed spacer) λόγω του ότι είναι λιγότερο ευάλωτη σε επιλεκτικές πιέσεις, επειδή δεν κωδικοποιείται, έχει συσσωρεύσει υψηλότερο ποσοστό μεταλλάξεων από τα γονίδια rRNA (Guasp *et al.*, 2000). Αυτό προσδίδει στην περιοχή μεταβλητότητα και χρησιμοποιείται επιτυχώς για τη διαφοροποίηση ριζοβιακών στελεχών σε ενδοειδικό επίπεδο, ως δείκτης δηλαδή για τη διάκριση μεταξύ στενά συνδεδεμένων ειδών. Στη μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε ανάλυση τμήματος νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της διαγονιδιακής περιοχής ITS1 μεγέθους 1157bp.

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 357bp, αποτελώντας το 41% του συνολικού μεγέθους του γονιδίου. Οι περισσότερες έρευνες επιβεβαιώνουν ότι πολλά χαρακτηριστικά του φυλογενετικού δέντρου του *nifH* συμφωνούν απόλυτα με την φυλογένεια του 16S rRNA. Γι' αυτόν τον λόγο, η ποικιλότητα των γονιδίων *nifH* επιτρέπει την «χονδρική» εκτίμηση της ταξινόμησης των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διερεύνηση της ποικιλότητας των βακτηρίων που δεσμεύουν άζωτο (Poly *et al.*, 2001).

Για να αντικατοπτριστούν στη φυλογενετική ταξινόμηση των βακτηρίων τα συμβιωτικά χαρακτηριστικά αυτών και ιδιαίτερα το φάσμα των φυτών-ξενιστών τους πραγματοποιήθηκε υποκλωνοποίηση και αλληλούχηση του γονιδίου *nodC*. Το γονίδιο *nodC* κωδικοποιεί για την N-ακετυλογλουκοζαμινιλτρανσφεράση, η οποία εμπλέκεται στο πρώτο βήμα σύνθεσης των Nod παραγόντων και επίσης είναι ένας καθοριστικός παράγοντας για τον προσδιορισμό του φάσματος των ξενιστών. Ακόμα είναι απαραίτητο στη δημιουργία φυματίων για τα περισσότερα είδη ριζοβίων και έτσι αποτελεί ένα κοινό *nod* γονίδιο μεταξύ των ριζοβίων (Ruiz-Dvez *et al.*, 2011). Πραγματοποιήθηκε ανάλυση τμήματος νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μεγέθους 391bp. Τα φυλογενετικά δέντρα που προκύπτουν από αλληλουχίες *nod* γονιδίων, γενικά, δεν συμφωνούν απόλυτα με αυτά που προκύπτουν από 16S rRNA ακολουθίες, αλλά τα *nod* φυλογενετικά δέντρα δείχνουν κάποια συσχέτιση με το φάσμα των ξενιστών, όμως είναι παρόμοια με αυτά που προκύπτουν από αλληλουχίες *nifH* γονιδίων (Laguerre *et al.*, 2001).

Διαπιστώθηκε ότι τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια που μελετήθηκαν ανήκουν όλα στο είδος *Sinorhizobium meliloti*. Μετά την ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας εκάστου γονιδίου έγινε σύγκριση με τη βάση δεδομένων του προγράμματος BLAST του διαδικτυακού τόπου NCBI.

Στο φυλογενετικό δέντρο 16S rRNA φαίνεται ότι τα 9 στελέχη που ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία δημιουργούν ομάδες (cluster) με τα αντίστοιχα κατά περίπτωση τυπικά στελέχη. Συγκεκριμένα δημιουργούν όλα ομάδα με το τυπικό στέλεχος *S. meliloti* 1021. Αυτό επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα του φυλογενετικού δέντρου του *nifH* που συμφωνούν σε πολύ μεγάλο βαθμό με αυτά του 16S rRNA δέντρου. Την ίδια συμφωνία δείχνουν και τα δεδομένα που προκύπτουν από το φυλογενετικό δέντρο *nodC*. Η μοναδική ασυμφωνία με το φυλογενετικό δέντρο 16S rRNA εμφανίζεται στη μελέτη του φυλογενετικού δέντρου ITS1. Σε αυτό φαίνεται μεν ότι τα 9 στελέχη που ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία δημιουργούν ομάδες (cluster) με τα αντίστοιχα τυπικά στελέχη, συγκεκριμένα με τα τυπικά στελέχη *S. meliloti* 1021 και *S. meliloti* 10312, όμως το στέλεχος GR73 ομαδοποιείται με το τυπικό στέλεχος *S. meliloti* AK83.

Οικογένειες από μικρές επαναλαμβανόμενες ακολουθίες έχουν βρεθεί και χρησιμοποιούνται ως εργαλεία που βοηθούν την ταξινόμηση των ειδών. Αυτές οι ακολουθίες περιέχουν εξαιρετικά συντηρημένες, κεντρικές, ανεστραμμένες επαναλήψεις και χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τα στοιχεία REPs (repetitive extragenic palindromic elements) που είναι γνωστά και ως παλινδρομικές μονάδες (palindromic units). Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τις ακολουθίες ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) αλλιώς γνωστές και ως διαγονιδιακές μονάδες επανάληψης (de Bruijn, 1992). Έτσι για την εκτίμηση της γενετικής ποικιλομορφίας των απομονοθέντων στελεχών χρησιμοποιήθηκε επίσης και η μοριακή ανάλυση των ακολουθιών REP και ERIC.

Από τα διαφορετικά γενετικά προφίλ που προκύπτουν μέσω της ανάλυσης των ακολουθιών REP τα 9 στελέχη μπορούν να ομαδοποιηθούν. Οι ομάδες που προκύπτουν είναι οι εξής: 1^η ομάδα δημιουργούν τα στελέχη GR72, GR75 και GR67, 2^η ομάδα το στέλεχος GR73, 3^η ομάδα το στέλεχος GR70, 4^η ομάδα τα στελέχη GR79, 5^η ομάδα το στέλεχος GR68, 6^η ομάδα τα στελέχη GR78 και GR71 και μόνα τους ομαδοποιούνται τα τυπικά στελέχη *S. meliloti* 1021 και *S. meliloti* 10312.

Έπειτα από αυτές τις μοριακές αναλύσεις και μετά από περαιτέρω διερεύνηση τα 9 αυτά στελέχη μπορούν από μόνα τους να αποτελέσουν τυπικά στελέχη (strains).

Τα Ψυχανθή φυτά είναι πιο ευαίσθητα στην αλατότητα από ότι τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια που δημιουργούν συμβιωτικές σχέσεις με αυτά (Shamseldin και Werner, 2005). Σε γενικές γραμμές, τα αζωτοδεσμευτικά συμβιωτικά βακτήρια είναι πιο ανεκτικά σε στρες αλατότητας από ό,τι οι ξενιστές τους, αν και μερικά είδη δέντρων, όπως το γένος *Acadia* και *Prosopis*, και γένη που χρησιμοποιούνται στις γεωργικές καλλιέργειες, όπως το γένος *Sesbania* και *Medicago* είναι γνωστό ότι είναι ανεκτικά στην αλατότητα (Abolhasani *et al.*, 2010). Κατά

συνέπεια, σε συνθήκες συμβίωσης τα αζωτοδεσμευτικά συμβιωτικά βακτήρια είναι πιο ευαίσθητα στην αλατότητα από ότι τα ελεύθερα διαβιούντα (Shamseldin και Werner, 2005).

Το είδος *M. marina* θεωρείται ότι είναι ανεκτικό στην αλατότητα λόγω του συγκεκριμένου βιότοπου που συναντάται αυτοφυές, αφού είναι διαδεδομένο σε πολλούς παράκτιους οικοτόπους (αμμοθίνες) κατά μήκος των ακτών της Μεσογείου. Από συγκριτικές μελέτες που αφορούν την ανεκτικότητα στην αλατότητα πολλών ειδών του γένους *Medicago* έχει βρεθεί ότι το είδος *M. marina* μπορεί να εμφανίσει ανεκτικότητα σε αλατότητα έως και σε συγκέντρωση 0,6% NaCl (McCoy, 1987).

Σύμφωνα με αυτά τα στοιχεία θεωρήθηκε αναγκαίο να πραγματοποιηθεί και μία σειρά πειραμάτων ώστε να χαρακτηριστούν τα 9 στελέχη *Sinorhizobium meliloti*, που έχουν απομονωθεί από τα φυμάτια του είδους *M. marina*, σε σχέση με την ανεκτικότητά τους σε συνθήκες αλατότητας. Τα στελέχη μελετήθηκαν σε συνθήκες ελεύθερης διαβίωσης και οι τελικές συγκεντρώσεις NaCl που ελέγχθηκαν ήταν 0% (πείραμα ελέγχου), 3% και 5%.

Από τα συγκεντρωτικά διαγράμματα των καμπυλών ανάπτυξης των στελεχών φαίνεται ότι όλα τα στελέχη μπορούν να αναπτυχθούν για συνθήκες ανάπτυξης αλατότητας 3%, εκτός από το τυπικό στέλεχος 10312. Ενώ σε συνθήκες υψηλής αλατότητας, μόνο τέσσερα στελέχη μπορούν να αναπτυχθούν. Αυτά τα στελέχη είναι: το τυπικό στέλεχος 1021, το GR 68, το GR 71 και το GR 72.

Η έρευνα έχει στηριχθεί στην απομόνωση και την μελέτη της φυσιολογίας και της οικολογίας νέων στελεχών *Sinorhizobium meliloti* προωθώντας την χρήση αυτών ως σκευάσματα εμβολιασμού των εδαφών των καλλιεργειών. Ο εμβολιασμός με αζωτοδεσμευτικούς βακτηριακούς πληθυσμούς όχι μόνο ενισχύει την εγκαθίδρυση των φυτικών ειδών αλλά συμβάλλει και στην αύξηση της γονιμότητας και της ποιότητας του εδάφους (Zahran, 2001).

Σχεδόν το 10% της χερσαίας επιφάνειας του κόσμου μπορεί να χαρακτηριστεί ως απειλούμενο από την αλατότητα. Οι περισσότερες τέτοιες περιοχές είναι τροπικές και περιοχές της Μεσογείου (Shamseldin και Werner, 2005). Η αζωτοδεσμευτική ικανότητα περιορίζεται σε συνθήκες υψηλής αλατότητας. Ως εκ τούτου η απομόνωση στελεχών ανεκτικών στην υψηλή αλατότητα είναι απαραίτητη ώστε να υπάρξει βελτιστοποίηση του εμβολιασμού τέτοιων εδαφών.

Επίσης η συμβίωση είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στην οξύτητα του εδάφους, η οποία μειώνει την επιβίωση των ριζοβίων και τη δημιουργία φυματίων στο φυτό (Cheng *et al.* 2005). Έτσι αυτά τα στελέχη της παρούσας εργασίας σε ένα μελλοντικό πείραμα θα μπορούσαν να εξεταστούν ως προς την αναπτυξή τους για διαφορετικές τιμές pH. Τέλος θα μπορούσε να ελεγχθεί και η αναπτυξή τους σε διάφορες άλλες συνθήκες περιβαλλοντικού στρες που υφίστανται οι ξενιστές αλλά και τα αζωτοδεσμευτικά συμβιωτικά βακτήρια. Τέτοιες είναι το ωσμωτικό στρες (υψηλό

δυναμικό νερού) που επηρεάζει την σύνδεση των βακτηρίων με τους ξενιστές αλλά και η έλλειψη θρεπτικών συστατικών όπως είναι το Ca^{2+} και ο P (Sadowsky, 2005).

Έτσι η απομόνωση και η επιλογή στελεχών του είδους *Sinorhizobium meliloti* που παρουσιάζουν ανοχή σε συνθήκες υψηλής αλατότητας, υψηλών επιπέδων pH αλλά και σε διάφορες άλλες συνθήκες αβιοτικού στρες αποτελεί έναν στόχο και μια επιστημονική πρόκληση.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Διαλιάνης Κ., 1983.

Διαμαντίδης Γ., 1994, Εισαγωγή στην Βιοχημεία (2^η έκδοση), University Studio Press, Θεσσαλονίκη.

Κεφαλογιάννη Η., 2008, Οικο-φυσιολογική μελέτη βακτηρίων του γένους *Azospirillum*, Διδακτορική διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Κοντσιώτου Ε., 2005, Η Μηδική καλλιέργεια και χρήση, Εκδόσεις Αγρότυπος.

Abolhasani M., Lakzian A., Tajabadipour A., Haghnia G., 2010, The study salt and drought tolerance of *Sinorhizobium* bacteria to the adaptation to alkaline condition, Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 4: 882-886.

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J., 1990, Basic local alignment search tool, Journal of Molecular Biology, 215: 403-410.

Appunu C., N Zoue A. and Laguerre G., 2008, Genetic diversity of native Bradyrhizobia isolated from soybeans (*Glycine max* L.) in different agricultural-ecological-climatic regions of India, Applied and Environmental Microbiology, 74: 5991–5996.

Barker D., Bianchi S., Blondon F., Datteé Y., Duc G. *et al.* , 1990, *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the *Rhizobium*-legume symbiosis. Plant Molecular Biology, 8: 40-49.

Barnett M.J., Fisher R.F., Jones T., Komp C., Abola P.A., Barloy-Hubler F., Bowser L., Capela D., Galibert F., Gouzy J. *et al.*, 2001, Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 98: 9883–9888.

Barry T., Colleran G., Glennon M., Dunican L.K., Gannonl F., 1991, The 16s/23s ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify Eubacteria, University College Galway, Ireland.

Bena G., Lyet A., Huguet T., Olivieri I., 2005, *Medicago – Sinorhizobium* symbiotic specificity evolution and the geographic expansion of *Medicago*, Journal of Evolutionary Biology, 18: 1547–1558.

Berg J., Tymoczko J. and Stryer L., 2002, Biochemistry, 5th edition, W.H. Freeman and Company, New York.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 1.

- Berkum P., Elia P. and Eardly B.**, 2006, Multilocus sequence typing as an approach for population analysis of *Medicago*-nodulating rhizobia, *Journal of Bacteriology*, 188: 5570-5577.
- Bhattacharjee R., Singh A. and Mukhopadhyay S.**, 2008, Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80: 199–209.
- Biondi E. G., Tatti E., Comparini D., Giuntini E., Mocali S., Giovannetti L., Bazzicalupo M., Mengoni A. and Viti C.**, 2009, Metabolic capacity of *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti* strains as determined by phenotype MicroArray Analysis, *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 5396-5404.
- Boscari A., Van de Sype G., Le Rudulier D., Mandon K.**, 2006, Overexpression of BetS, a *Sinorhizobium meliloti* high-affinity betaine transporter, in bacteroids from *Medicago sativa* nodules sustains nitrogen fixation during early salt stress adaptation, *Molecular Plant Microbe Interactions*, 19: 896- 903.
- Brock**, *Biology of Microorganisms*, Eleventh Edition.
- Brockwell J.**, 1981, A strategy for legume nodulation research in developing regions of the Old World, *Plant and Soil*, 58: 367-382.
- Brundrett M.**, 2004, Diversity and classification of mycorrhizal associations, *Biological Reviews*, 79: 473–495.
- Capela D., Filipe C., Bobik C., Batut J., Bruand C.**, 2006, *Sinorhizobium meliloti* differentiation during symbiosis with alfalfa: a transcriptomic dissection, *Molecular Plant Microbe Interactions*, 19: 363-372.
- Chabaud M., Larsonneau C., Marmouget C., Huguet T.**, 1995, Transformation of barrel medic (*Medicago truncatula* Gaertn.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration via somatic embryogenesis of transgenic plants with the *MtENOD12* nodulin promoter fused to the *gus* reporter gene, *Plant Cell Reports*, 15:305-310.
- Chen W.X., Yan G.H., Li J.L.**, 1988, Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 38: 392–397.
- Cheng Q.**, 2008, Perspectives in biological nitrogen fixation research, *Journal of Integrative Plant Biology* 2008, 50: 786–798.

- Cheng Y., Watkin E.L.J., Howieson J.G., O'Hara G.W.,** 2005, Root and root hair mechanisms that confer symbiotic competence for nodulation in acidic soils within *Medicago* species: a holistic model, *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 45:231–240.
- Compant S., Duffy B., Nowak J., Clément C. and Barka E.,** 2005, Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action and future prospects, *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 4951-4959.
- Cooper J.E.,** 2007, Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 1355–1365.
- de Bruijn F.,** 1992, Use of Repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergeneric Consensus) Sequences and the Polymerase Chain Reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 2180-2187.
- Dean D. R. and Jacobsen M. R. ,** 1992, Biochemical genetics of nitrogenase In: *Biological Nitrogen Fixation*, Chapman and Hall, New York, 763–834.
- Dickstein R., Scheirer D.C., Fowle W.H., Ausubel F.M.,** 1991, Nodules elicited by *Rhizobium meliloti* heem mutants are arrested at an early stage of development, *Molecular and General Genetics*, 230: 423–432.
- Domínguez-Ferreras A., Pérez-Arnedo R., Becker A., Olivares J., Soto M., Sanjuán J.,** 2006, Transcriptome profiling reveals the importance of plasmid pSymB for osmoadaptation of *Sinorhizobium meliloti*, *Journal of Bacteriology*, 188: 7617-7625.
- Domínguez-Ferreras A., Soto M.J., Pérez-Arnedo R., Olivares J. and Sanjuán J.,** 2009, Importance of trehalose biosynthesis for *Sinorhizobium meliloti* osmotolerance and nodulation of Alfalfa roots, *Journal of Bacteriology*, 191: 7490-7499.
- Doss A., Parivuguna V., Vijayasanthi M. and Surendran S.,** 2011, Antibacterial evaluation and phytochemical analysis of *Medicago sativa L.* against some microbial pathogens, *Indian Journal of Science and Technology*, 4: 550-552.
- Elmerich C.,** 2007, Historical Perspective: From Bacterization to Endophytes, Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations, 5: 1-20.
- Ferguson S.,** 1998, Nitrogen cycle enzymology, *Current opinion in Chemical Biology*, 2: 182-193.
- Finan T.M., Weidner S., Wong K., Buhrmester J., Chain P., Vorhölter F.J., Hernandez-Lucas I., Becker A., Cowie A., Gouzy J., Golding B., Pühler A.,** 2001, The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont

Sinorhizobium meliloti, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 98: 9889–9894.

- Flamini G., Cioni P., Morelli I., Ceccarini L., Andolfi L. and Macchia M.**, 2003, Composition of the essential oil of *Medicago marina* L. from the coastal dunes of Tuscany, Italy, Flavour and Fragrance Journal, 18: 460–462.
- Flechard M., Fontenelle C., Blanco C., Goude R., Ermel G. and Trautwetter A.**, 2010, RpoE2 of *Sinorhizobium meliloti* is necessary for trehalose synthesis and growth in hyperosmotic media, Microbiology, 156: 1708-1718.
- Franche C., Lindström K. and Elmerich C.**, 2009, Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants, Plant Soil, 321: 35–59.
- Frothingham R. and Wilson K.**, 1993, Sequence-based differentiation of strains in the *Mycobacterium avium* complex, Journal of Bacteriology, 175: 2818-2825.
- Fox G.E., Stackebrandt E., Hespell R.B., Gibson J., Maniloff J., Dyer T.A., Wolfe R.S., Balch W. E. et al.**, 1980, The phylogeny of prokaryotes, Science, 209: 457-463.
- Galardini M., Mengoni A., Brilli M., Pini F., Fioravanti A., Lucas S., Lapidus A., Cheng J., Goodwin L. et al.**, 2011, Exploring the symbiotic pangenome of the nitrogen-fixing bacterium *Sinorhizobium meliloti*, BMC Genomics, 12: 235.
- Galibert F., Finan T., Long S., Pühler A., Abola P., Ampe F., Barloy-Hubler F., Barnett M., Becker A., Boistard P. et al.**, 2001, The composite genome of the Legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*, Science, New Series, 293: 668-672.
- Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D. and Bairoch A.**, 2003, ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis, Nucleic Acids Research, 31: 3784-3788.
- Guasp C., Moore E., Lalucat J. and Bennisar A.**, 2000, Utility of internally transcribed 16S–23S rDNA spacer regions for the definition of *Pseudomonas stutzeri* genomovars and other *Pseudomonas* species, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50: 1629–1639.
- Gurtler V. and Stanisich V. A.**, 1996, New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S±23S rDNA spacer region, Microbiology, 142:3-16.
- Hanson A., Barnes D., Hill R.**, 1988, Alfalfa and alfalfa improvement, Series Agronomy, 29: 25-26.
- Halbleib C.M., Ludden P.W.**, 2000, Regulation of biological nitrogen fixation, Recent advances in Nutritional sciences, American Society for Nutritional Sciences.

- Hashimoto J.G., Stevenson B.S., Schmidt T.M.**, 2003, Rates and consequences of recombination between rRNA operons, *Journal of Bacteriology*, 185:966-72.
- Heldt H.-W.**, 1999, *Plant biochemistry and molecular biology* (ed.), Oxford University Press, 278-288.
- Hubbell D. and Kidder G.**, 2003, *Biological Nitrogen Fixation*, University of Florida IFAS Extension, SL 16. U.S.A.
- Hulton C.S.J., Higgins C.F. and Sharp P.M.**, 1991, ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria, *Molecular Microbiology*, 5: 825-834.
- Hsu S.F. and Buckley D.H.**, 2009, Evidence for the functional significance of diazotroph community structure in soil, *ISME Journal*, 3: 124-136.
- Janda J.M. and Abbott S.L.**, 2007, 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils and pitfalls, *Journal of Clinical Microbiology*, 45: 2761-2764.
- Jill E.**, 2004, Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases, *Clinical Microbiology Reviews*, 17: 840–862.
- Jones K.M., Kobayashi H., Davies B.W., Taga M.E. and Walker G.C.**, 2007, How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium–Medicago* model, *Nature Reviews Microbiology*, 5: 619–633.
- Kechris K.J., Lin J.C., Bickel P.J. and Glazer A.N.**, 2006, Quantitative exploration of the occurrence of lateral gene transfer by using nitrogen fixation genes as a case study, *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 123: 9584-9589.
- Klappenbach J., Saxman P.R., Cole J.R. and Schmidt T.M.**, 2001, rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database, *Nucleic Acids Research*, 29: 181-184.
- Kloepper J., Rodriguez-Ubana R., Zehnder G., Murphy J., Sikora E. and Fernández C.**, 1999, Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases, *Australasian Plant Pathology*, 28: 21-26.
- Kwon S., Park J., Kim J., Kang J., Cho Y., Lim C., Parker M., Lee G.**, 2005, Phylogenetic analysis of the genera *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* on the basis of 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequences, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55: 263-270.

- Lakzian A., Karimi E., Khavazi K. and Haghnia G.,** 2008, Genetic diversity of *Sinorhizobium meliloti* isolated from root nodules of Alfalfa (*Medicago sativa*) growing in Hamadan soils(Iran) using Plasmid Profile and PCR/RFLP, International Journal of Agriculture and Biology, 10: 669-72.
- Laguerre G., Allard M., Revou F. and Amarger N.,** 1994, Rapid Identification of rhizobia by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes, Applied and Environmental Microbiology, 60: 56-63.
- Laguerre G., Nour S., Macheret V., Sanjuan J., Drouin P. and Amarger N.,** 2001, Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts, Microbiology, 147:981–993.
- Li W., Raoult D. and Fournier P.E.,** 2009, Bacterial strain typing in the genomic era, FEMS Microbiology Ecology, 33: 892–916.
- Ludwig W. and Klenk H.P.,** 2005, Overview: A phylogenetic backbone and taxonomic framework for Procaryotic systematics, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Edition, Vol. 2, part A, Springer-Verlag, New York, 49-66.
- Masson-Boivin C., Giraud E., Perret X. and Batut J.,** 2009, Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes?, Trends in Microbiology, 17: 458-466.
- Maureira-Butler I., Pfeil B., Muangprom A., Thomas C., Doyle J.,** 2008, The reticulate history of *Medicago* (*Fabaceae*), Systematic Biology, 57: 466-482.
- Mc Coy T. J.,** 1987, Tissue culture evaluation of NaCl tolerance in *Medicago* species: Cellular versus whole plant response, Plant Cell Reports, 6: 31-34.
- Merino E., Becerril B., Valle F. and Bolivar F.,** 1987, Deletion of a repetitive extragenic palindromic (REP) sequence downstream from the structural gene of *Escherichia coli* glutamate dehydrogenase affects the stability of its mRNA, Gene, 58:305-309.
- Miller-Williams M., Loewen P. and Oresnik I.,** 2006, Isolation of salt-sensitive mutants of *Sinorhizobium meliloti* strain Rm1021, Microbiology, 152: 2049–2059.
- Mullis K.B., Faloona F.A., Scharf S., Saiki R., Horn G. and Erlich H.,** 1986, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 51: 263-273.
- Pellock B.J., Cheng H.P., Walker G.C.,** 2000, Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides, Journal of Bacteriology, 182: 4310–4318.

- Perret X., Staehelin C., Broughton W.J.**, 2000, Molecular basis of symbiotic promiscuity, *Microbiology and Molecular Biology*, 64: 180–201.
- Poly F., Lucile L.J. and Bally R.**, 2001, Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil, *Research of Microbiology*, 95-103.
- Raymond J., Siefert J.L., Staples C.R. and Blankenship R.E.**, 2004, The natural history of nitrogen fixation, *Molecular Biology and Evolution*, 21: 541-554.
- Reeve W. et al.**, 2010, Complete genome sequence of the *Medicago* microsymbiont *Ensifer* (*Sinorhizobium*) *medicae* strain WSM419, *Standards in Genomic Sciences*, 28: 77–86.
- Reguera M., Lloret J., Margaret I., Vinardell J.M., Martín M., Buendía A., Rivilla R., Ruiz-Sainz J.E., Bonilla I., Bolaños L.**, 2009, Gene SMb21071 of plasmid pSymB is required for osmoadaptation of *Sinorhizobium meliloti* 1021 and is implicated in modifications of cell surface polysaccharides structure in response to hyperosmotic stress, *Canadian Journal of microbiology*, 55: 1145- 1152.
- Rome S., Fernandez M.P., Brunel B., Normand P. and Cleyet-Marel J.C.**, 1996, *Sinorhizobium medicae* sp. nov., Isolated from annual *Medicago* spp., *Journal of Bacteriology*, 972-980.
- Rose R.J.**, 2008, *Medicago truncatula* as a model for understanding plant interactions with other organisms, plant development and stress biology: past, present and future, *Functional Plant Biology*, 35: 253-264.
- Ruiz-Dvez B., Fajardo S., del Rosario de Felipe M. and Fernández-Pascual M.**, 2011, Characterization of rhizobia from legumes of agronomic interest grown in semi-arid areas of Central Spain relates genetic differences to soil properties, *Journal of Basic Microbiology*, 51:1–13.
- Sadowsky M. J.**, 2005, Soil stress factors influencing symbiotic nitrogen fixation, D. Werner and W. E. Newton (eds.), *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology and the Environment*, 89-112.
- Saitou N. and Nei M.**, 1987, The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees, *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.
- Schmid M. and Hartmann A.**, 2007, Molecular phylogeny and ecology of root associated diazotrophic α - and β -Proteobacteria. In: Elmerich C. and Newton W.E. (eds) *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacter Associations*, 21-40.

- Schneiker-Bekela S., Wibberga D., Bekelb T., Blomb J., Linkeb B., Neuwegerb H., Stienza M., Vorhöltera J., Weidnera S., Goesmannb A., Pühlera A., Schlüter A., 2011,** The complete genome sequence of the dominant *Sinorhizobium meliloti* field isolate SM11 extends the *S. meliloti* pan-genome, *Journal of Biotechnology*, 155: 20-33.
- Shamseldin A. and Werner D., Silva C., Kan F.L. and Martinez-Romero E., 2007,** Population genetic structure of *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* isolated from nodules of *Medicago* spp. in Mexico, *FEMS Microbiology Ecology*, 60: 477–489.
- Smith D.R., Doucette-Stamm L.A., Deloughery C. et al., 1997,** Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics, *Journal of Bacteriology*, 179: 7135-55.
- Somers E., Vanderleyden J., Srinivasan M., 2004,** Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet., *Critical Reviews in Microbiology*, 30: 205-40.
- Steele K., Ickert-Bond S., Zarre S., Wojciechowski M., 2010,** Phylogeny and character evolution in *Medicago* (*Leguminosae*): Evidence from analyses of plastid trnK/matK and nuclear GA3ox1 sequences, *American Journal of Botany*, 97: 1142-1155.
- Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M., Grimont P.A.D., Kämpfer P., Maiden M., Nesme X., Rossello-Mora R., Swings J.,9 Hans G. Truper H.G., Vauterin L., Ward A.C. and Whitman W.B., 2002,** Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52:1043–1047.
- Tamura K., Nei M. and Kumar S., 2004,** Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method, *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 101: 11030-11035.
- Tamura K., Dudley J., Nei M. and Kumar S., 2007,** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0., *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599.
- Thanopoulos R., 2007,** The genus *Medicago* in Greece: 1. A review of species diversity, geographical distribution and ecological adaptation, *Flora Mediterranea.*, 17: 217-276.
- Thompson J.D., Higgins D.G. and 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 Research*, 22: 4673-4680.
- Tilak K., Ranganayaki1 N., Pal2 K., De R., Saxena A., Shekhar Nautiyal S., Mittal S., Tripathi A. and Johri B., 2005,** Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria, *Current Science*, 89: 10.

- Unkovich M., Baldock J.**, 2008, Measurement of asymbiotic N₂ fixation in Australian agriculture, *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 2915–2921.
- Versalovic J., Koeuth T. and Lupski J.R.**, 1991, Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes, *Nucleic Acids Research*, 19: 6823–6831.
- Vial L., Lavire C., Mavingui P., Blaha D., Haurat J., Moënne-Loccoz Y., Bally Y., Wisniewski-Dyé F.**, 2006, Phase variation and genomic architecture changes in *Azospirillum*, *Journal of Bacteriology*, 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. and Rastetter E.B., et al.**, 2002, Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation, *Biochemistry*, 57/58: 1-45.
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A. and Lane D. J.**, 1991, 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study, *Journal of Bacteriology*, 173: 697-703.
- Young N.D., Cannon S.B., Sato S., Kim D., Cook D.R., Town C.D., Roe B.A., Tabata S.**, 2005, Sequencing the genespaces of *Medicago truncatula* and *Lotus japonicas*, *Plant Physiology*, 137: 1174-1181.
- Young J.P.W.**, 1992, Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms, In: Stacey G., Burris R.H. and Evans H.J. (eds), *Biological Nitrogen Fixation*, Chapman and Hall, New York, 43-86.
- Zahran H.H.**, 1999, Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate, *Microbiology and Molecular Biology*, 63: 968-989.
- Zahran H.H.**, 2001, Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology, *Journal of Biotechnology*, 91:143–153.
- Zakhia F., Jeder H., Domergue O., Willems A., Cleyet-Marel J., Gillis M., Dreyfus B. and Lajudie P.**, 2004, Characterisation of wild Legume Nodulating Bacteria (LNB) in the infra-arid zone of Tunisia, *Systematic and Applied Microbiology*, 27: 380-395.
- Zehr J., Jenkins B., Short S. and Steward G.**, 2003, Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison, *Environmental Microbiology*, 5: 539–554.
- Zribi K., Mhamdi R., Huguet T. and Aouani M.**, 2004, Distribution and genetic diversity of rhizobia nodulating natural populations of *Medicago truncatula* in Tunisian soils, *Soil Biology and Biochemistry*, 36: 903-908.
- Zuckerkindl E. and Pauling L.**, 1965a, Molecules as documents of evolutionary, *Journal of Theoretical Biology*, 8: 357-366.

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