بررسی گوناگونی ژنتیکی جدایه‌های *ازتوباکتر* به روش PCR-RFLP

میترا ابراهیمی*[۱]، علی‌اکبر صفری سنجانی[۲]، محمدرضا ساریخانی[۳]، سید ابوالقاسم محمدی[۴]، ناصر علی‌اصغرزاد[۵]
به ترتیب دانشجوی دکترا و استاد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشگاه بوعلی سینا همدان، دانشیار بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک دانشگاه تبریز، استاد اصلاح نباتات مولکولی و استاد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک دانشگاه تبریز

چکیده

برای جداسازی و بررسی گوناگونی ژنتیکی ازتوباکترها به شیوه PCR-RFLP، در آغاز از خاک‌های شهرهای تبریز، اردبیل و گیلان که دارای کاربری گوناگون بودند، نمونه‌برداری شد. در این پژوهش پس از جداسازی باکتری‌های وابسته به جنس *ازتوباکتر*، نزدیک به ۳۰ باکتری برای بررسی بیشتر از دیدگاه الگوی برش قطعات فراوان شده ژن رمز کننده 16S rRNA انتخاب شد. با بهره‌گیری از آغازگرهای عمومی 1525R/24F ژن رمزکننده 16S rRNA فراوان شد. سپس چندریختی (پلی‌مورفیسم) در ازای تکه‌های برش یافته این ژن با آنزیم‌های برشی *Hind*III و *Msp*I بررسی شد. یافته‌های شناسایی مولکولی باکتری‌ها نشان داد که افزون بر باکتری‌های *ازتوباکتر*، باکتری‌هایی از جنس‌های دیگر مانند *کلبسیلا*، *بیجرینکیا*، *سودوموناس*، *ریزوبیوم* و *اگروباکتریوم* نیز در جدایه‌ها هستند. گرچه همه ازتوباکترهای شناسایی شده از گونه *ازتوباکتر کروکوکوم* بودند، ولی از دیدگاه الگوی برش، گوناگونی ژنتیکی در میان آن‌ها دیده شد، به گونه‌ای که همگی در یک گروه نبودند و در سه گروه دیده شدند. گذشته از آن این بررسی نشان داد که از دید مارکر PCR-RFLP ازتوباکترها با باکتری‌هایی از جنس‌های دیگر مانند *سودوموناس*، *بیجرینکیا* و *کلبسیلا* نیز نزدیکی فیلوژنتیکی دارند.

واژه های کلیدی: *ازتوباکتر*، گوناگونی ژنتیکی، ژن 16S rRNA، Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

مقدمه

غنای میکروبی خاک به اندازه‌ای است که تنها در چند گرم خاک می‌توان میلیون‌ها یا میلیاردها از این ریزجانداران یافت. در بخش کوچکی از خاک بیش از ۲۰۰۰ گونه ژنوم را می‌توان دید که تنها با روش‌های نوین شناسایی می‌شوند (Varma and Oelmüller, 2007). با شناخت و کاربرد شیوه‌های بررسی مولکولی در شاخه علوم زیستی دگرگونی بزرگی در گروه‌بندی سیستماتیک جانداران رخ داده است. کاربرد روش‌های وابسته به PCR مانند RAPD، RISA، RFLP به گونه‌ی ویژه‌ای فهم ما را از گروه‌بندی‌های تاکسونومیک، خویشاوند شناسی و تبارشناسی جانداران افزایش داده است. شیوه‌هایی مانند RAPD، RFLP، DGGE/TGG که وابسته به جداسازی اسیدهای نوکلئیک و فراوان‌سازی آن است و یا شیوه‌های بررسی PLFA و FAME که وابسته به بررسی ساختار اسیدهای چرب ریزجانداران است، برای شناسایی و آنالیز ریزجانداران خاک بکار رفته است. بررسی‌های مولکولی وابسته به اسیدهای نوکلئیک شامل ۱) کاربرد پروب‌های هیبریداسیون (همانند FISH) ۲) انگشت‌نگاری DNA به کمک PCR از ژن‌های rDNA یا دیگر ژن‌ها است (ساریخانی و ابراهیمی، ۱۳۹۳). با نگاهی بر روش-های وابسته به PCR که در بررسی گوناگونی میکروبی و کارکردی[۱] آن‌ها بکار رفته است، نقش ژن‌هایی مانند rDNA و جایگاه‌های میان ژنی زیریگان‌های کوچک و بزرگ ریبوزومال (IGS[۲]) و ژن‌های کارکردی مانند *nif*، *amo* به خوبی نمایان می‌شود (Paul, 2007). در آنالیز RFLP، پس از جداسازی DNA از نمونه (خاک یا ریزجاندار)، DNA با آنزیم‌های برشی برش داده می‌شود. این آنزیم‌های برشی می‌تواند به گونه‌ای گزینش شود که دارای جایگاه‌های برش فراوان یا کم باشد، آنزیم‌های برشی همانند *Sau3*AI که یک آنزیم 4-cutter می‌باشد، دارای جایگاه برش بیشتری خواهد بود، در برابر آن آنزیم‌هایی مانند *Eco*RI و *Hind*III که از گونه 6-cutter می‌باشند، دارای جایگاه برش کمتری هستند. چندریختی[۳] یا گوناگونی در درازی

[1] Functional diversity
[2] Intergeneric spacer region
[3] Polymorphisms

رشته‌های برش‌یافته DNA از راه بردن DNAهای برش یافته بر روی ژل الکتروفورز آشکار خواهد شد. این گوناگونی[۴] در درازی رشته‌های همانند اثر انگشت[۵] برای شناسایی ریزجانداران بهره‌گیری می‌شود (Varma and Oelmüller, 2007; Paul, 2007). کارایی روش‌های وابسته به RFLP بستگی به شناخت بدست آمده از بررسی انگشت‌نگاره‌های DNA به دست آمده از ژن‌های جانداران گوناگون دارد (Paul, 2007).

آکویلانتی و همکاران (۲۰۰۴) پس از فراوان‌سازی ژن 16S rDNA به کمک آغازگرهای عمومی 27F/1492R، فرآورده PCR را با آنزیم‌های برشی مانند *Rsa*I یا *Hha*I برش داده و الگوهای برش رشته‌های این ژن ازتوباکترها را بررسی نمودند. آن-ها به این شیوه گوناگونی ژنتیکی ازتوباکترهای خاک‌های اسپانیا را ارزیابی نمودند(Aquilantia et al., 2004). پلی و همکاران (۲۰۰۱) گوناگونی ژن *nifH* در تثبیت‌کنندگان نیتروژن را با بکارگیری برخی از آغازگرها با روش PCR-RFLP بررسی کردند و جفت آغازگرهای PolF/PolR را برای فراوان‌سازی این ژن شایسته گزارش کردند. در برش ژن فراوان شده نیز از آنزیم‌های برشی مانند *Hae*III، *Nde*II و *Mnl*I بهره‌گیری کردند(Poly et al., 2001).

در ایران پژوهش‌های بسیار اندکی پیرامون گوناگونی ژنتیکی باکتری‌های تثبیت‌کننده آزادزی بومی انجام شده است. در این پژوهش پس از نمونه‌برداری از ۵۰ نمونه خاک با کاربری‌های گوناگون از سه استان کشور (آذربایجان شرقی، اردبیل و گیلان) جنس مهم تثبیت‌کننده نیتروژن در کشتگاه‌های ویژه آن جداسازی شد و برای بررسی گوناگونی ژنتیکی جدایه‌های برگزیده از تکنیک RCR-RFLP با فراوان‌سازی ژن رمزکننده 16S rRNA بهره‌گیری شد تا شناختی از گوناگونی آن‌ها و توان روش بکار رفته در بررسی این گروه از باکتری‌های سودمند خاک، بدست آید.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری‌ها از خاک

برای جداسازی باکتری‌های ازتوباکتر از روش جداسازی آن‌ها از خمیره خاک و کشتگاه‌های بدون نیتروژن (NF-media) بهره‌گیری شد. از شناسه‌هایی چون توان ساخت کیست، رنگدانه و تراوش پلی‌ساکاریدی در کشتگاه NF برای جداسازی نخستین این باکتریها بهره گیری شد.

بررسی گوناگونی ژنتیکی ژن rRNA (PCR- RFLP)

گوناگونی ژنتیکی جدایه‌های به دست آمده و نزدیک به جنس *ازتوباکتر* به روش زیر آزمون شد. برای این کار نزدیک ۳۰ جدایه باکتریایی گزینش و کشت تازه‌ای از آن‌ها آماده شد. برای انجام PCR-RFLP، ژن رمزکننده 16S rRNA به روش Colony-PCR با بهره‌گیری از آغازگرهای 1525R/24F فراوان شد. واکنش PCR در ۴۰ میکرولیتر حجم واکنش بر پایه روش (Tejera et al., 2005) انجام شد (جدول ۱). برنامه PCR برای فراوان‌سازی این ژن دارای ۳۰ چرخه بود که در دستگاه ترموسایکلر Flexigene این چرخه‌ها به گونه، یک چرخه نخستین با دمای ۹۴ درجه سلسیوس برای ۴ دقیقه، در پی آن دمای ۹۴ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه، دمای ۵۳ درجه سلسیوس (دمای پیوند آغازگر) برای ۱ دقیقه و دمای فراوان شدن ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه بود که در پایان یک چرخه پایانی با دمای ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱۰ دقیقه نیز انجام شد (Tejera et al., 2005). پس از پایان PCR در آغاز فرآورده PCR بر روی ژل آگاروز برده شد و سپس با شناخت درستی آن، در واکنش هضم آنزیمی (مطابق جدول ۱)، از آنزیم‌های برشی برای به دست آوردن الگوی برش تکه های فراوان شده بهره-گیری شد. آنزیم‌های برشی *Hpa*II (*Msp*I) و *Hind*III) دارای جایگاه شناختی و برش ۴ و ۶ نوکلئوتیدی به ترتیب با جایگاههای C˅CGG و A˅AGCTT می‌باشند. گوارش آنزیمی فرآورده PCR برای ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در گرمابه انجام شد و فرآورده برش یافته آنزیمی بر روی ژل آگاروز دیده و بررسی گردید (Varma and Oelmüller, 2007). پس از دیدن الگوی برش بر روی ژل آگاروز، بودن یا نبودن باندهای گوناگون بررسی شد. سپس بر پایه اندازه باندهای به دست آمده و رتبه‌دهی به گونه صفر و یک (A و T) در نرم افزار MegAlign آنالیز شد و درخت فیلوژنتیکی آن رسم گردید. برای

[4] Variation
[5] Fingerprint

رسم این درخت از الگوریتم‌های گوناگون Hein، Clustal V و Clustal W بهره‌گیری شد (Varma and Oelmüller, 2007; Paul, 2007).

جدول۱- بخش‌های واکنش PCR و واکنش گوارش آنزیمی

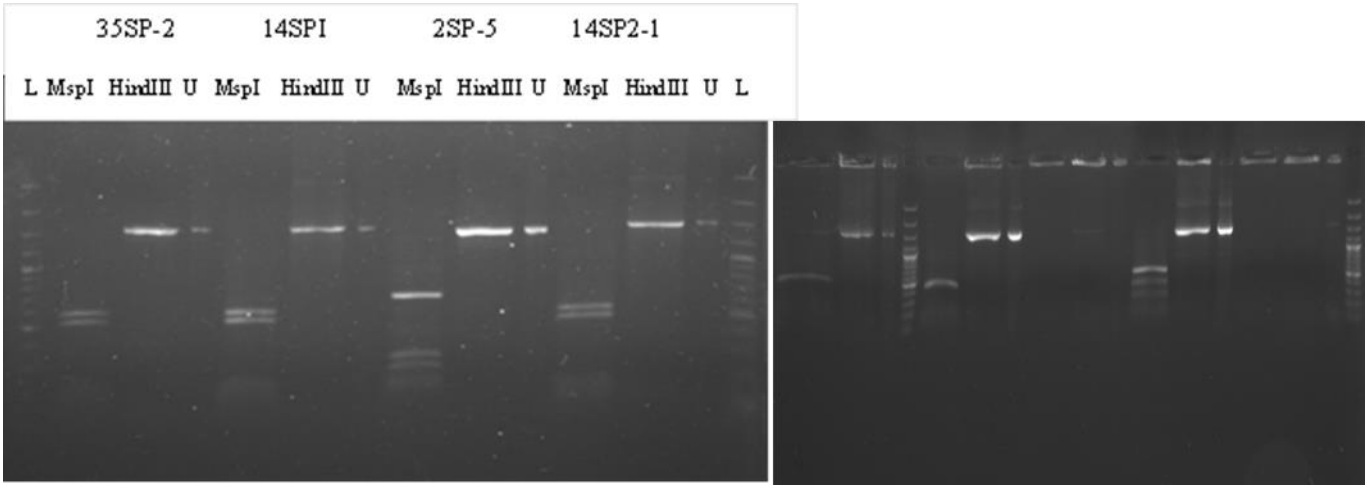
داده نامه	اندازه بکاررفته	بخشهای واکنش PCR
بخشی از کلنی در ۳۰ µl آب جوشانده و ۲۰ µl بهره‌گیری شد	۲۰	dH_2O (DNAg)
	۱۲/۴	dH_2O
بایستی 1X در واکنش بهره گیری شود	۴	Buffer (10X)
غلظت بکاررفته آن ۵ mM-۱می باشد	۱/۶	$MgCl_2$ (50mM)
معمولترین غلظت آن در واکنش۲۰۰ µM می باشد	۰/۸	dNTP (10mM)
24F primer	۰/۴	Forward primer (10 pmol)
1525R primer	۰/۴	Reverse primer (10 pmol)
۰/۲ تا ۱ واحد آنزیمی در واکنش۴۰ µl معمول است	۰/۴	Taq DNA polymerase (10U/µl)
	۴۰µl	حجم کل

بخش‌های واکنش گوارش آنزیمی ژن فراوان شده	اندازه
PCR Product (4 µg)	13µL
Buffer (10X)	2 µL
dH_2O	4µL
*Msp*I or *Hind*III 10U/ µL	1µL
	20 µL

نتایج و بحث

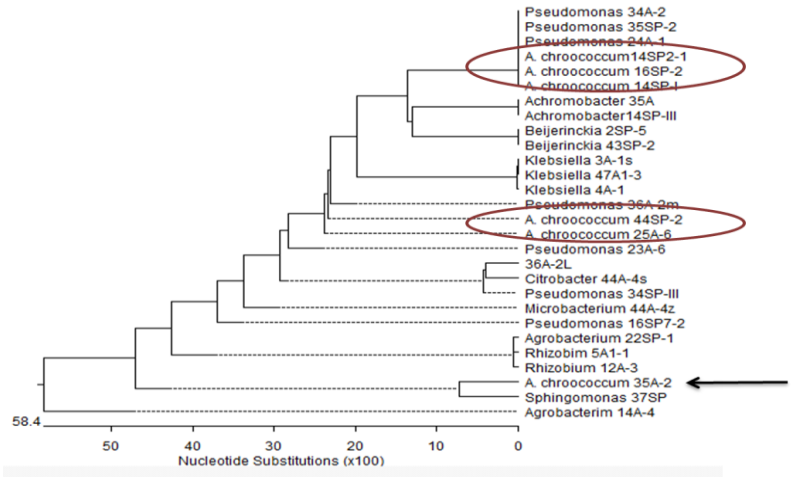
الگوی برش (طولی) تکه‌های ژن فراوان یافته 16S rDNA پس از انجام گوارش آنزیمی در ژل‌های آگاروز به دست آمد. برای بدست آوردن این الگو نمونه‌های برش نیافته (uncut) و برش یافته به گونه جداگانه با هر آنزیم (*Msp*I و *Hind*III) برای هر جدایه در سه راهه (lane) الکتروفورز شد (شکل ۱). در شکل ۱ نمونه‌ای از این الگوها آورده شده است. در همه ژل‌های برش یافته فرآورده PCR ژن 16S rDNA با گوارش آنزیمی هیچ جایگاه برشی برای آنزیم *Hind*III به دست نیامد و این یافته از برابری راهه نمونه بدون برش، با راهه برش آنزیم *Hind*III به دست آمد. باند یا نوار این دو راهه در راستای هم بودند. جایگاه شناخت و برش این آنزیم ۶ نوکلئوتیدی، یگانه بوده و فراوانی تکه برش این آنزیم ۱/۵ kb بوده است. از دید آماری برای هر تکه‌ای به اندازه ۴ kb یک جایگاه برش برای این نمونه از آنزیم‌ها است. به هر گونه الگوی برش آنزیمی برای فرآورده PCR در گوارش با آنزیم *Msp*I به گونه‌ای دیگری بود. چندین باند با اندازه‌های گوناگونی به دست آمد. به این گونه این آنزیم با جایگاه شناخت و برش ۴ تایی، آنزیم شایسته‌تری در بررسی گوناگونی ژنتیکی این جدایه‌ها بوده است.

شکل ۱- نمونه‌ای از الگوی برش ژن rDNA فراوان شده برخی از جدایه‌های باکتری ها با آنزیم‌های برشی (PCR-RFLP)



کلاسترینگ جدایه‌ها بر پایه الگوی برش به دست آمده با آنزیم *Msp*I انجام شد. الگوهای برش یکسانی در برخی از جدایه‌ها مانند ۱) 14SPI، 14SP2-1، 35SP-2، 16SP-2، 34A-2، 24A-1؛ ۲) 3A-1S، 4A-1 و 47A1-3 ؛ ۳) 2SP-5، 43SP-2 و دیگر گروه‌ها دیده شد، به گونه‌ای که در گروه‌های چند گانه‌ای گروه‌بندی شدند. با رسم درخت فیلوژنی الگوی کاملی از باکتری‌های بررسی شده به دست آمد. از میان درخت فیلوژنتیک‌های رسم شده به روش‌های گوناگون (Clustal V، Clustal W و Hein)، درخت به دست آمده به روش الگوریتم Clustal V در شکل ۲ آورده شده است. چگونگی جاگیری جدایه‌های باکتری‌ها در این درخت، نزدیکی و دوری آن‌ها با آنچه پیش‌بینی می‌شد، هماهنگی بیشتری داشت. بر پایه شکل ۲ همه جدایه‌های *ازتوباکتر* در یک خوشه نبودند. بویژه الگوی برش ژن جدایه *A. chroococcum* 35A-2 ناهمانندی چشم‌گیری با دیگر ازتوباکترها داشت و در شاخه‌ای جدا و بسیار دور از آن‌ها بود. جدایه‌های 14SP-I، 14SP2-1 و 16SP-2 *ازتوباکتر کروکوکوم* الگوی برش یکسانی داشتند و در یک گروه جای گرفتند. جدایه‌های 44SP-2 و 25A-6 نیز از دیدگاه الگوی برش با ازتوباکترهای یاد شده ناهمانند بودند ولی در برابر الگوی برش ژن جدایه 35A-2 در گروه‌های نزدیک‌تری بودند.

از سوی دیگر الگوی برش یکسان و بسیار همانندی از ژن 16S rDNA برخی جدایه‌های *سودوموناس* (مانند 34A-2، 35SP-2 و 24A-1) با الگوی برش دسته نخست *ازتوباکتر کروکوکوم* بدست آمد. همچنین در بهره‌گیری روش بکاررفته (PCR-RFLP) میان جدایه های جنس‌های *کلبسیلا* و *بیجرینکیا* نیز نزدیکی بالایی با ازتوباکترهای جداشده دیده شد.



شکل ۲- درخت فیلوژنی به دست آمده از بررسی الگوی برش ژن rDNA فراوان شده جدایه ها با الگوریتم Clustal V.

بررسی گوناگونی ژنتیکی ۱۵۰ جدایه از باکتری‌های *سینوریزوبیوم* جدا شده از خاک‌های استان همدان با بهره‌گیری از روش PCR / RFLP 16S-23S rDNA نشان داد که روش بکاررفته کارایی خوبی در گروه‌بندی ژنتیک آن‌ها دارد (کریمی و همکاران، ۱۳۸۶). آن‌ها در کار خود از آغازگرهای 926F و 115R برای فراوان‌سازی جایگاه میان ژنی 16S-23S بهره‌گیری نمودند و با آنزیم‌های برشی *Hin*fI و *Hea*III فرآورده PCR را برش دادند. روی‌هم‌رفته جدایه‌های بررسی شده در سه گروه بودند، گروه یکم ۱۲۲ جدایه از ۱۵۰ جدایه را دارد و این گروه ویژگی‌های ژنتیکی *Sinorhizobium meliloti* را نشان دادند. گروه دوم (II) ۲۵ جدایه داشت که این گروه ویژگی‌های ژنتیکی *Sinorhizobium medicae* را داشتند. گروه سوم (III) دو جدایه داشت که ویژگی‌های ژنتیکی بسیار دور و ناهمانند با دو گروه پیش داشتند.

در بررسی که لنارت در خاک‌های جنوب کشور لهستان در سال ۲۰۱۲ انجام داد، فراوانی، ویژگی‌ها و گوناگونی ژنتیکی باکتری *A. chroococcum* بررسی شد. در این بررسی از دو روش وابسته به PCR یعنی RAPD[۶] و MP-PCR[۷] بهره‌گیری شد. یادآور می‌شود که این دو روش دارای توان شناخت بالایی برای بررسی گوناگونی ژنتیکی باکتری‌های نزدیک بهم است

6 Random Analysis of Polymorphic DNA
7 Melting Profile

(Lenart, 2012). پس از جداسازی DNA باکتریایی از آغازگرهای G1 و L1 برای فراوان‌سازی جایگاه میان ژنی 16S-23S بهره‌گیری شد. برای آنالیز پروفایل RFLP بر روی ژل ۱٪، در آغاز تکه‌های فراوان شده با آنزیم *Hind*III برش داده شدند. آنالیز RAPD با بهره‌گیری از دو جفت آغازگر با توالی‌های (3 AGTCAGCCAC 5 و 3 AAGAGCCCGT 5) انجام شد. وی در پایان بهره‌گیری از دو روش RAPD و MP-PCR را برای شناخت ناهمانندی‌های درون گونه‌ای و RFLP را در سطح گونه پیشنهاد نمود (Lenart, 2012).

جیمنز و همکاران (۲۰۱۱) گوناگونی ژنتیک باکتری‌های *ازتوباکتر* جدا شده از نمونه‌های خاک Boyacá-Colombia زیر کشت ارگانیک سبزی‌های (اسپناج، گل کلم، کلم بروکلی، هویج و کدو) را بررسی نمودند. آن‌ها برای جداسازی باکتری‌ها از کشتگاه Ashby-Sucrose agar بهره‌گیری و ۲۴ جدایه به دست آمده را به روش ARDRA بررسی کردند. آن‌ها با بهره‌گیری از آغازگرهای Y1 و Y3 ژن 16S rDNA را فراوان نموده و با کمک آنزیم‌های *Alu*I، *Hpa*II یا *Rsa*I فرآورده PCR برش دادند. همانند آنچه در این پژوهش دیده شد، نتایج آنالیز کلاستر (Cluster analysis) ازتوباکترها منجر به قرارگیری آن‌ها در سه گروه اصلی شد (Jimenz et al., 2011). در این پژوهش دیده شد که از دید مارکر PCR-RFLP ازتوباکترها با باکتری‌هایی از جنس‌های دیگر مانند *سودوموناس*، *بیجرینکیا* و *کلبسیلا* نیز نزدیکی فیلوژنتیکی دارند.

منابع

ساریخانی، م.ر. و ابراهیمی، م. ۱۳۹۳. مروری بر روش‌های بررسی گوناگونی ژنتیکی باکتریها. کنگره ملی خاک و محیط زیست. دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

کریمی، ا.، لکزیان، ا.، خاوازی، ک.، اصغرزاده، ا. و حق‌نیا، غ. ۱۳۸۶. مطالعه تنوع ژنتیک باکتری‌های *سینوریزوبیوم* با استفاده از تکنیک PCR / RFLP 16S-23S rDNA . علوم وفنون کشاورزی و منابع طبیعی، جلد ۱۱، شماره ۴۲، صفحه‌های ۴۴۱ تا ۴۴۹.

Paul E.A. 2007. Soil microbiology, ecology, and biochemistry. 3ed edition. 365- 386.

Jiménez D.J., Montaña J.S. and Martínez M.M. 2011. Characterization of free nitrogen fixing bacteria genus *Azotobacter* in organicvegetable-growing Colombian soils. Brazilian Journal of Microbiology, 42: 846-858.

Lenart A. 2012. Occurrence, characteristic and genetic diversity of *Azotobacter chroococcum* in various soils of southern Poland. Polish Journal of Environmental Studies, 21: 415-424.

Varma A. and Oelmüller R. 2007. Advanced Techniques in Soil Microbiology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.

Aquilantia L., Favillib F. and Clementia F. 2004. Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of *Azotobacter* from soil samples. Soil Biology and Biochemistry, 36: 1475-1483.

Tejera N., Lluch C., Martinez-Toledo M. V. and Gonzalez-Lopez J. 2005. Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. Plant and soil, 270: 223-232.

Poly F., Monrozier 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 in Microbiology, 152: 95–103.

Study on genetic diversity of Azotobacter isolates by PCR-RFLP

M. Ebrahimi[1], A.A. Safari sinegani[2], M.R. Sarikhani[*2], S.A. Mohammadi[4], N. Aliasgharzad[5]

[1]PhD Student of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu-AliSina University of Hamedan, Iran
[2]Professor of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu-AliSina University of Hamedan, Iran
[3,5]Associate Prof. and Professor of Soil Biology and Biotechnology, Dept. of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran
[4] Professor of Plant Breeding, Dep. of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran
*Corresponding Author Email:mtrr_ebrahimi@yahoo.com

Abstract
In order to isolate and study on genetic diversity of Azotobacteria by PCR-RFLP, first of all soil samples from different land usages were collected. In this research after isolation of Azotobacteria, nearly 30 isolates were selected to study restriction fragment length polymorphism (RFLP) pattern of amplified 16S rRNA gene. The gene encoding 16S rRNA was amplified using universal primers (1525R/24F), then RFLP of this gene was investigated by restriction enzyme such as *Msp*I and *Hind*III. Our results revealed that, besides *Azotobacter* there are other genera including *Klebsiella*, *Beijerinckia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* and *Agrobacterium* in the isolated bacteria. Although molecular identification showed that all Azotobacters belonged to the same species namely *A. chroococcum*, but from the point of PCR-RFLP view they separated in three different groups. Furthermore, results displayed that Azotobacters had similar RFLP pattern with other genera such as *Klebsiella*, *Beijerinckia* and *Pseudomonas.*
Key words: Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), 16S rDNA, Genetic diversity, Azotobacteria