مجله دنیای میکروب ها
سال دوم، شماره یک، ۱۳۸۸
صفحات ۱۸-۱۲

Original Article

ارزیابی ژن *nifH* در باکتری مزوریزوبیوم سیسری سویه بومی ایران

الهام معظمیان*[۱]، دکترمحمد کارگر[۲]، دکتراحمد اصغرزاده[۳]، دکترسید مهدی حسینی مزینانی[۴]

[۱]گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات فارس، [۲] گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم،

[۳] موسسه تحقیقات آب خاک، [۴]پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

چکیده

سابقه و هدف: نخود سومین لگوم دانه ای جهان و اولین لگوم دانه ای ایران است. بررسی اثر متقابل مزوریزوبیوم سیسری همزیست با این گیاه در تثبیت ازت مولکولی اهمیت زیادی دارد. تثبیت نیتروژن اتمسفری مستلزم وجود سیستم آنزیمی نیتروژناز است که توسط سه ژن *nifH*، *nifD* و *nifK* کد می شود. هدف از این پژوهش تعیین توالی ژن *nifH*، کد کننده زیر واحد گامای آنزیم نیتروژناز مقایسه آن با ژن های مشابه در سایر ریزوبیوم ها می باشد.

مواد و روش ها: پس از جداسازی سویه های بومی مزوریزوبیوم و کشت آنها، استخراج DNA برای تهیه DNA الگو انجام شد. سپس پرایمرهای مناسب و اختصاصی برای ژن *nifH* طراحی و پس از بهینه سازی شرایط آزمایش PCR به منظور تکثیر قطعه ژن *nifH*، توالی ژنی آن مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: باکتری‌های مزوریزوبیوم سیسری در محیط کشت YMA کلنی‌های صورتی تا سفید با حاشیه صاف ایجاد نمودند. با استفاده از دو جفت پرایمر nifH1/nifH2 توالی حدود ۷۷۰ و nifH4/nifD1 توالی ۱۸۰۰ جفت بازی از این ژن تکثیر و تعیین توالی انجام گردید.

نتیجه گیری: مقایسه توالی ژن *nifH* باکتری مزوزیزوبیوم سیسری با ژن مشابه در باکتری مزوزیزوبیوم لوتی با استفاده از پایگاه اطلاعاتی NCBI، شباهت ۹۰٪ را نشان داد . این ژن در باکتری مزوزیزوبیوم سیسری تشابه زیادی با سایر ژن های *nifH* گزارش شده مربوط به سایر گونه های ریزوبیوم دارد.

واژگان کلیدی: باکتری مزوریزوبیوم سیسری، اپرون *nifHDK*، تثبیت ازت، گیاه نخود .

دریافت مقاله: پاییز ۸۷ پذیرش برای چاپ: زمستان ۸۷

مقدمه

زیان های اقتصادی و زیست محیطی ناشی از استفاده بی رویه از کودهای ازته در کشاورزی در سطح جهان مطرح می باشد و منطق حکم می کند که جایگزین مناسب تری برای این کودها در نظر گرفته شود. تثبیت ازت مولکولی که یک واکنش زیستی برای تبدیل ازت اتمسفری به فرم قابل استفاده گیاه است، می تواند این وظیفه مهم را به عهده گیرد. سیستم های تثبیت ازت دارای مزایای دو جانبه اقتصادی و سلامت زیست محیطی هستند و در کشاورزی پایدار سبب کاهش مصرف مواد افزودنی و توسعه منابع داخلی می شوند (۱). تثبیت نیتروژن اتمسفری مستلزم وجود سیستم آنزیمی نیتروژناز است. ژن های *nifH*، *nifD* و *nifK* کد کننده سه پلی پپتید از سیستم آنزیمی نیتروژناز هستند. ژن *nifH* کد کننده جزء II، (نیتروژناز ردوکتاز)، و ژن های *nifD/nifK* کد کننده جزء I، (دنیتروژناز)، می باشند. پروتئین نیتروژناز ردوکتاز از دو پلی پتپید یکسان γ^2 با وزن مولکولی پنج هزار دالتون تشکیل شده است که توسط ژن *nifH* کد می‌شود. هر پلی پپتید دارای دو اتم آهن است. جایگاه های فعال این دو پروتئین نزدیک به یکدیگر است (۲، ۳، ۴ و ۵).

در سال ۱۹۸۰ برای اولین بار تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن *nifH* در باکتری سیانو باکتر توسط مواریچ و همکاران انجام شد و در سال ۱۹۹۱ تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن های *nifH* و *frxC*

*) آدرس برای مکاتبه: گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات فارس تلفن:۰۹۱۷۷۱۱۰۹۹۴
email: elhammoazamian@gmail.com

(مشابه -*nifH*) در سیانوباکتر رشته ای تثبیت کننده ازت به نام پلکتونما بوریانوم توسط سیبولد و همکاران به انجام رسید (۶، ۷ و ۸).

در سال ۲۰۰۰، ژنوم باکتری مزوریزوبیوم لوتی توسط کانکو و همکارانش از مؤسسهٔ تحقیقاتی DNA در ژاپن به طور کامل تعیین توالی گردید. در این باکتری، قطعه ۵۰۰ کیلو بازی به نام جزیره همزیستی، که دسته ژن های همزیست در آن قرار دارند، بیشتر مورد بررسی قرار گرفت (۹). در سال ۲۰۰۱ ژن *nifH* در باکتری سینوریزوبیوم ملی لوتی توسط بارنت و همکارانش در انستیتو تحقیقاتی استانفرد کالیفرنیا تعیین توالی و در سال ۲۰۰۴ در باکتری متانوباکتر توسط ددیش و همکارانش در روسیه تعیین توالی شد (۱۰ و ۱۱).

گیاه نخود یکی از مهمترین گیاهان حبوبات بومی کشور است که همزیست با این گروه از باکتری ها می باشد. همزیستی بین ریزوبیوم - لگومینوز می تواند منبع عمده ازت در بیشتر سیستم های زراعی باشد. سطح زیر کشت گیاه نخود تقریباً نصف سطح زیر کشت کل حبوبات کشور است. با این وجود، مطالعه کافی در زمینه همزیستی این گیاه با ریزوبیوم اختصاصی آن در ایران صورت نگرفته است (۱، ۱۲ و ۱۳).

باکتری مزوریزوبیوم سیسری میله ای، گرم منفی، تاژک دار، هوازی و کموارگانوتروف می باشد و در حضور اکسیژن و در محیط حاوی کربوهیدرات های نسبتاً ساده و ترکیبات آمینی به خوبی رشد می کند. این باکتری از عمده ترین همزیست های تثبیت کننده ازت گیاه نخود محسوب می شود. اثر متقابل ریزوبیوم همزیست با این گیاه در تثبیت ازت آن بسیار مؤثر است. به همین دلیل مطالعه این همزیستی از اهمیت زیادی بر خوردار است. (۱۴ و ۱۵).

هدف از این پژوهش شناسایی و تعیین توالی ژن *nifH* در باکتری مزوریزوبیوم سیسری سویه C-15 و ثبت این ژن در بانک ژن جهانی می باشد.

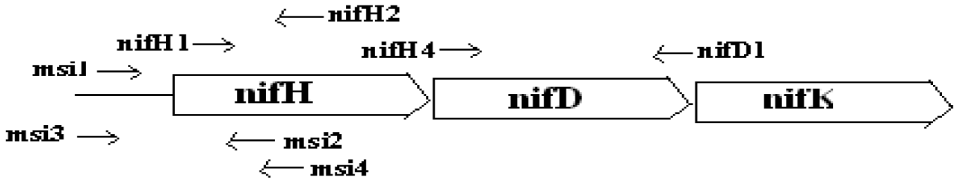
مواد و روش ها

الف) سویه میکروبی: باکتری مزوریزوبیوم سیسری سویه C-15 از بخش تحقیقات بیولوژی خاک از مؤسسه تحقیقات خاک و آب تهیه گردید.

ب) استخراج *DNA*: استخراج DNA باکتری با استفاده از روش ذوب و انجماد (ریچاردستون و همکاران ۱۹۹۵) انجام شد (۱۶). برای این منظور باکتری در محیط YMA (Yeast extract Mannitol Agar) کشت داده شد. پس از ظهور کلنی ها، از هر نمونه یک لوپ به داخل لوله‌های حاوی ۱ میلی لیتر محیط TY (Tripton Yeast Extract Broth) تلقیح و ۴۸ ساعت گرما گذاری شد. مجدداً از هر نمونه یک میلی لیتر به لوله‌های جدید حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط TY تلقیح شد و یک شب در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری گردید. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از آن در داخل لوله های اپندروف منتقل و ۲ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰rpm سانتریفوژ گردید. در مرحله بعد محلول رویی خارج و سلول ها در ۱/۵ میلی لیتر محلول یک مولار Nacl سوسپانسیون به آرامی مخلوط و ۴ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. سپس با خارج کردن محلول رویی، ۷۵۰ میکرولیتر بافر TE (Tris EDTA) به رسوب اضافه و در ابتدا ۴۵ دقیقه در دمای ۲۰°c ـ و سپس ۱۰دقیقه در دمای ۷۰°c- ۶۵ نگهداری شد.

جدول شماره ۱-: توالی پرایمرهای طراحی شده در پژوهش.

اسم پرایمر	پرایمر	قطعه تکثیر شده
nifH1	5'CGTTTTACGGCAAGGGCGGTATCGGCA-3'	۷۷۳bp
nifH2	5'TCCTCCAGCTCCTCCATGGTGATCGG-3'	
nifH4	5'-CAATTCGGCCAGGGCAC-3'	۱۸۰۰bp
nifD1	5'-CTCCATTGTTCCGCGAGCC-3'	
msi1	5'-ACTTGGTTATATTGGTCGCACG-3'	۱۲۶۰bP
msi2	5'-GCTGCGACCCCAAAGCC-3'	
msi3	5'-GTGGGATTGGTAGTCTTTG-3'	۱۳۶۰bp
msi4	5'-CCACCCGGCTGATCCTGAAC-3'	



شکل ۱- ترتیب قرارگیری ژن ها و موقعیت پرایمرهای طراحی شده در این پژوهش.

عمل ذوب و انجماد سه بار تکرار و در نهایت در دمای ۲۰°c- نگهداری گردید. به منظور تعیین غلظت و کیفیت DNA استخراج شده از دو روش الکتروفورز و اسپکتروفتومتری استفاده شد.

ج) واکنش *PCR*: برای انجام این روش با استفاده از برنامه نرم افزاری Oligo (USA) طراحی پرایمرهای مناسب مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به در دسترس نداشتن توالی ژنوم باکتری مزوریزوبیوم سیسری، به منظور طراحی پرایمر از توالی ژنوم باکتری مزوزیزوبیوم لوتی استفاده گردید. سپس مطابق جدول شماره ۱، چهار جفت پرایمر طراحی و تهیه گردید.

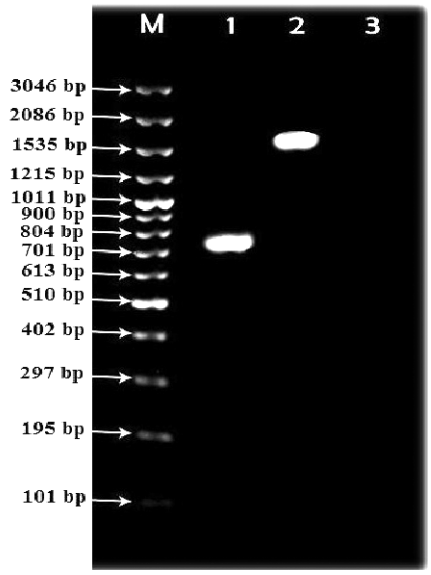
سپس مخلوط ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱x، ۰/۷۵ µl کلرید منیزیم (۱/۵ میلی مولار)، ۰/۵ µl dNTPs (۰/۲ میلی مولار)، ۲ µl آغازگر، ۱ µl DNA و یک واحد آنزیم DNA پلی مراز Taq تهیه و حجم با آب مقطر دیونیزه به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. سپس با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Biometra) با شرایط: واکنش ۹۴°C، ۴ دقیقه (واسرشت ابتدایی)، ۳۵ چرخه شامل یک دقیقه در ۹۴°C، یک دقیقه در ۶۲°C برای دو پرایمر *nif H1/nif H2* و ۵۸°C برای دو پرایمر *nif D1/nif H4* (اتصال پرایمر) و یک دقیقه (واسرشت شدن) در ۷۲°C و ۱۰ دقیقه در حرارت ۷۲°C (گسترش نهایی) واکنش PCR انجام شد. سپس محصول PCR روی ژن آگارز یک درصد الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، عکسبرداری گردید.

د) تعیین توالی: با استفاده از کیت مخصوص بازیابی (Agarose Gel DNA Extration kit cat.No.1696 505 Roshe) استخراج DNA از ژل انجام و سپس تعیین توالی گردید.

نتایج

باکتری های مزوریزوبیوم سیسری در محیط کشت YMA کلنی های صورتی تا سفید با حاشیه صاف ایجاد می کنند. پس از استخراج DNA باکتری، به منظور تکثیر ژن *nif H*، پرایمرهای مناسب طراحی شد. با توجه به این که تاکنون ژن *nif H* در باکتری مزوریزوبیوم سیسری تعیین توالی نشده بود، اکثر پرایمرهای مورد نیاز در این پژوهش، براساس توالی نوکلئوتیدی گزارش شده از باکتری مزوریزوبیوم لوتی طراحی شد (شکل ۱). سپس با استفاده از جفت پرایمرهای *nif H1/nif H2*، توالی حدود ۷۷۰ و *nif H4/nif D1* توالی ۱۸۰۰ جفت بازی از این ژن تکثیرشد (شکل۲).

با استفاده از دو پرایمر *nif H4* و *nif D1*، از قسمت انتهایی ژن *nif H* تا رسیدن به کدون ختم تکثیر شد. به منظور دست یابی به قسمت ابتدایی ژن *nif H* و کدون شروع آن، دو پرایمر *msi1* و *msi2* طراحی شد. با استفاده از این دو پرایمر موفق به بدست آوردن باند مورد نظر نشدیم. در نتیجه برای این منطقه مجدداً پرایمرهای جدید با توالی متفاوت با دو پرایمر *msi3* و *msi4* طراحی گردید. اما با استفاده از این دو پرایمر موفق به بدست آوردن قطعه مورد نظر به صورت باند خالص جداگانه نشدیم.



شکل۲- محصول PCR با استفاده از دو جفت پرایمر nifH1/nifH2 و nifH4/nifD1. (M) مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز، (۱) محصول PCR با استفاده از دو پرایمر nifH1 و nifH2، (۲) محصول PCR با استفاده از دو پرایمر nifH4و nifD1، (۳) کنترل منفی.

بحث

هدف اصلی ما از این پژوهش شناسایی و تعیین هویت باکتری بود که توانایی تثبیت ازت را در حد بالایی داشته باشد و موجب افزایش رشد گیاه به منظور جایگزینی مناسب کودهای بیولوژیکی به جای کودهای شیمیایی ازته شود. دلیل انتخاب سویه C-15 جدا شده از منطقه کوهدشت لرستان این بود که با توجه به آزمایشات انجام شده و اندازه گیری درصد نیتروژن در اندام هوایی بیشترین اثر را نسبت به بقیه سویه ها داشت. داده های ارائه شده در جدول۲ نشان دهنده تثبیت ازت بالا در تیمار ۱۱ می باشد که با کد آزمایشگاهی C-15 شناخته می شود. این جدول مقایسه میانگین بین تیمارها از لحاظ درصد نیتروژن در اندام هوایی را در سویه های مختلف مزوریزوبیوم سیسری نشان می دهد.

در باکتری مزوریزوبیوم سیسری با استفاده از دو پرایمر *nifH1* و *nifH2* نتایج تعیین توالی نشان داد که فاصله بین دو پرایمر با احتساب نوکلئوتید های پرایمر ۷۷۳ جفت باز می باشد. اما پرت و همکارانش در سال ۱۹۹۸ با استفاده از پرایمرهای یاد شده در باکتری ریزوبیوم ملی لوتی نشان دادند که تعداد نوکلئوتیدهای این ناحیه ۷۸۱ جفت باز است(۱۷) . به دلیل یکسان نبودن نتایج، با وجود سه بار تکرار تعیین توالی و اطمینان از دقت آن، می‌توان به این نتیجه رسید که طول قطعه بین دو پرایمر در باکتری مزوریزوبیوم سیسری کوتاه تر از طول قطعه بین دو پرایمر در باکتری ریزوبیوم ملی لوتی می باشد. احتمالاً تفاوت نوکلئوتیدی در قطعه ژن *nifH* واقع در بین دو پرایمر می تواند توجیهی برای تثبیت بیولوژیک نیتروژن متفاوت در باکتری ها باشد. زیرا با تفاوت در نوکلئوتیدها، اسید آمینه و در نتیجه پروتئین و عملکرد آن تغییر می یابد. البته برای بحث بیشتر لازم است مجموعه کامل ژن *nifH* همراه با اپرون آن تعیین توالی و مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرد (۱). همچنین با استفاده از پرایمرهای *nifH4* و *nifD1*، قسمت انتهایی ژن *nifH* و کدون ختم آن نیز شناسایی شد. به منظور مشخص نمودن توالی قسمت ابتدایی ژن *nifH* و ناحیه پروموتور اپرون *nifHDK*، پرایمرهای *msi1* و *msi2* طراحی شدند . با استفاده از این دو پرایمر در هیچ شرایطی موفق به بدست آوردن باند اختصاصی و مشخص نشدیم. به همین دلیل این احتمال وجود دارد که ناحیه انتخاب شده برای طراحی پرایمر از باکتری مزوریزوبیوم لوتی شباهتی با باکتری مزوریزوبیوم سیسری ندارد. در نتیجه به منظور بررسی این ناحیه پرایمرهای *msi3* و *msi4* طراحی شدند. نتایج بدست آمده با استفاده از پرایمرهای یاد شده با پرایمرهای *msi1* و *msi2* مشابه بود. بررسی ژنوم باکتری مزوریزوبیوم لوتی که توسط سالیوان در دانشگاه اوگاتوی نیوزلند و برایجان در مرکز تحقیقات INRA در فرانسه در سال ۲۰۰۲ نشان

جدول۲- مقایسه میانگین بین تیمارها از لحاظ درصد نیتروژن در اندام هوایی

Mean	11	2.480	A	Mean	80	2.090	ABCDEFGHI
Mean	58	2.457	AB	Mean	64	2.090	ABCDEFGHI
Mean	73	2.433	ABC	Mean	2	2.087	ABCDEFGHI
Mean	60	2.427	ABC	Mean	59	2.063	ABCDEFGHI
Mean	7	2.407	ABCD	Mean	50	2.060	ABCDEFGHI
Mean	36	2.400	ABCD	Mean	32	2.060	ABCDEFGHI
Mean	38	2.397	ABCD	Mean	21	2.057	ABCDEFGHI
Mean	68	2.373	ABCD	Mean	20	2.047	ABCDEFGHI
Mean	17	2.370	ABCDE	Mean	29	2.007	ABCDEFGHI
Mean	63	2.370	ABCDE	Mean	40	2.000	ABCDEFGHI
Mean	15	2.333	ABCDE	Mean	43	1.987	ABCDEFGHI
Mean	33	2.323	ABCDE	Mean	51	1.970	ABCDEFGHI
Mean	49	2.310	ABCDEF	Mean	24	1.967	ABCDEFGHI
Mean	18	2.307	ABCDEF	Mean	35	1.960	ABCDEFGHI
Mean	5	2.300	ABCDEF	Mean	31	1.947	ABCDEFGHI
Mean	6	2.297	ABCDEFG	Mean	76	1.930	ABCDEFGHI
Mean	34	2.287	ABCDEFG	Mean	1	1.920	ABCDEFGHI
Mean	9	2.270	ABCDEFG	Mean	26	1.917	ABCDEFGHI
Mean	8	2.260	ABCDEFG	Mean	55	1.907	ABCDEFGHI

داد که ناحیه فرادست و فرودست اپرون *nifHDK* در باکتری مزوریزوبیوم لوتی حفاظت شده نیست و توالی نوکلئوتیدی آن نیز متغیر است (۱۸). محققین یاد شده و همچنین جیراد و همکارانش در سال ۱۹۹۱ در باکتری ریزوبیوم لگومینوساروم نشان دادند که چندین نسخه از ژن *nifH* دراین باکتری ها وجود دارد. این حالت به دلیل نوترکیبی های پی در پی در درون ژنوم تکرار می شود (۱۹). همچنین گونزالز از مکزیک در سال ۲۰۰۳ این مسأله را در باکتری ریزوبیوم اتلی نیز تأیید نمود (۲۰). در بین ژن های موثر در تثبیت ازت، ژن های *nifHDK* بیشتر از بقیه ژن ها حفاظت شده است. ژن هایی که در فرادست و فرودست اپرون *nifHDK* قرار دارند از نظر توالی و جایگاه قرار گیری ثبات ندارند و در بین باکتری‌های ریزوبیوم شباهت چندانی نشان نمی دهند (۲۱). این مسأله در پژوهش ما نیز در تکثیر قسمت ابتدایی ژن *nifH*، به دلیل انتخاب پرایمرهای *msi1* و *msi3* طراحی شده مربوط به ناحیه بالا دست اپرون ژنی *nifHDK* تأیید گردید. همچنین با مقایسه همولوژی توالی قطعه حاصل از PCR با پرایمرهای، *nifH1/nifH2* و *nifH4/nifD1* در بانک ژنی با سایر توالی های مرتبط، مشخص شد که توالی ژن *nifH* دراین باکتری بیشترین شباهت را با گونه های مزوریزوبیوم لوتی و ریزوبیوم ملی لوتی دارد (۵ و ۱۰).

در این تحقیق حدود ۹۵٪ از توالی ژن *nifH* باکتری مزوریزوبیوم سیسری سویه C-15 برای اولین بار تعیین توالی گردیده و در بانک جهانی ژن به شماره AY 318755 به ثبت رسید. همولوژی ژن *nifH* با استفاده از BLASTn ۸۹٪ تشابه با ژن *nifH* باکتری مزوریزوبیوم لوتی و ۸۷٪ با این ژن در باکتری ریزوبیوم اتلی نشان می دهد. همچنین ۸۴٪ در باکتری سینوریزوبیوم و ۸۳٪ با باکتری متیلوباکتریوم همولوژی دارد. با استفاده از BLASTp پروتئین حاصل از این ژن ۹۴٪ تشابه با باکتری های مزوریزوبیوم لوتی و سینوریزوبیوم مدیسی نشان می‌دهد (شکل ۵). از این‌رو به منظور استفاده از این توالی به عنوان مارکر جنس و گونه بررسی های بیشتر پیشنهاد می گردد. تحقیق حاضر یکی از قدم های اساسی در راه تعیین توالی ژنی باکتری‌های مزوریزوبیوم در ایران است .

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری و مؤسسهٔ تحقیقات خاک و آب به دلیل حمایت های مالی و اجرائی ابراز می‌دارند.

```
M.ciceri      3    STTSQNTLAALVDLGQRILIVGCDPKADSTRLILNSKAQDTVLDLAAQEGSVEDLELQDV  182
                   STTSQNTLAALVDLGQ+ILIVGCDPKADSTRLILN+KAQDTVL LAAQEGSVEDLELQDV
M.loti       18    STTSQNTLAALVDLGQKILIVGCDPKADSTRLILNAKAQDTVLHLAAQEGSVEDLELQDV   77
S.medicae    18    STTSQNTLAALVDLGQKILIVGCDPKADSTRLILNAKAQDTVLHLAATEGSVEDLELEDV   77

M.ciceri    183    LKVGYRGIKCVESGGPEPGVGCAGRGVITSINFLEENGAyddvdyvsydvlgdvvCGGFA  362
                   LK+GY+ IKCVESGGPEPGVGCAGRGVITSINFLEENGAYD+VDYVSYDVLGDVVCGGFA
M.loti       78    LKIGYKDIKCVESGGPEPGVGCAGRGVITSINFLEENGAYDNVDYVSYDVLGDVVCGGFA  137
S.medicae    78    LKVGYRGIKCVESGGPEPGVGCAGRGVITSINFLEENGAYNDVDYVSYDVLGDVVCGGFA  137

M.ciceri    363    MPIREGKAQEIYIVMSGEMMALYAANNIAKGILKYAHSGGVRLGGLICNERQTDRELDLA  542
                   MPIRE KAQEIYIVMSGEMMALYAANNIAKGILKYAHSGGVRLGGLICNERQTDRELDL+
M.loti      138    MPIRENKAQEIYIVMSGEMMALYAANNIAKGILKYAHSGGVRLGGLICNERQTDRELDLS  197
S.medicae   138    MPIRENKAQEIYIVMSGEMMALYAANNIAKGILKYAHAGGVRLGGLICNERQTDRELDLA  197

M.ciceri    543    EALAGRLNSKLIHFVPRDNIVQHAELRKMSVIQYAPDSKQAGEYRALAEKIHANSGQGTI  722
                   EALA RLNSKLIHFVPRDNIVQHAELRKM+VIQYAPDSKQAGEYRALAEKIH NSGQGTI
M.loti      198    EALAARLNSKLIHFVPRDNIVQHAELRKMTVIQYAPDSKQAGEYRALAEKIHVNSGQGTI  257
S.medicae   198    EALAARLNSKLIHFVPRDNIVQHAELRKMTVIQYAPDSKQAGEYRALAEKIHANSGRGTV  257

M.ciceri    723    PTPITMEELEEMLLDFGIMKTDEQMLAELHSKEAR  827
                   PTPITMEELE+MLLDFGIMKTDEQMLAEL +KEA+
M.loti      258    PTPITMEELEDMLLDFGIMKTDEQMLAELQAKEAK  292
S.medicae   258    PTPITMEELEDMLLDFGIMKTDEQMLAELQAKEAK  292
```

شکل ۵: مقایسه همولوژی توالی پروتئین حاصل از ژن *nifH* در باکتری مزوریزوبیوم سیسری با باکتری مزوریزوبیوم لوتی و سینوریزوبیوم مدیسی. (ردیف اول) باکتری مزوریزوبیوم سیسری، (ردیف دوم) همولوژی بین دو باکتری، (ردیف سوم) باکتری مزوریزوبیوم لوتی و(ردیف چهارم) باکتری سینوریزوبیوم مدیسی می باشد.

منابع

۱ـ اصغرزاده، ا. حسینی مزینانی، س.م. ملکوتی، م. فیض آبادی، م.م.(۱۳۸۰). شناسایی سویه های باکتریهای همزیست نخود ایرانی (strains) *Mesorhizobium ciceri* باکارایی تثبیت ازت متفاوت با روشهای بیوشیمیائی و مولکولی، پایان نامه دکترا، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس.

2. Anolles GC, and Gresshoff PM Advances in the positional cloning of nodulation genes in soybean. Plant and Soil, 1996;186:1-7.
3. Auman A.J, Speake C.C, and Lidstrom ME *nifH* Sequences and Nitrogen Fixation in Type I and Type II Methanotrophs. Applied and Enviromental Microbiology, 2001;67(9):4009-4016.
4. Barnett MJ, Fisher RF, and et.al. Nucleotide sequence and predicted functions of the entire Sinorhizobium meliloti pSymA megaplasmid. Proc Natl Acad Sci USA, 2001;98 (17):9883-9888.
5. Barney BM, Igarashi RY, Dos Santos, PC, Dean DR, Seefeldt LC Substrate interaction at an Iron-sulfur face of the FeMo-cofactor during nitrogenase catalysis. Jour. Biol Chem 2004;279(51):53621-53624.
6. Cantera JJ, Kawasaki H, Seki T The nitrogen-fixing gene (*nifH*) of Rhodopseudomonas palustris: a case of lateral gene transfer?. Microbiology, 2004;150(7):2237-2246.
7. Dedysh SN, Rice P, Liesack W NifH and NifD phylogenies: an evolutionary basis for understanding nitrogen fixation capabilities of methanotrophic bacteria. Microbiology, 2004;150(5):1301-13.
8. Girard ML, Flores M, Brom S, Romero D, Palacios R, and Dávila G Structural complexity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum* by Phaseoli. Jour. Bacteriol, 1991;173(8): 2411-2419.
9. Gonzalez JE, and Marketon MM. Quorum sensing in nitrogen-fixation Rhizobia Micobiol Mol Biol Rev, 2003;67(4):574-592.
10. Hirsch AM, Mckhann HI, Reddy A, Liao J, Fang Y, Marshall CR Assessing horizontal transfer of *nifHDK* genes in eubacteria: nucleotide sequence of *nifK* from *Frankia* strain HFP CcI3. Mol Biol Evol, 1995;12(1):16-27.
11. Igarashi RY, Dos Santos PC, Niehaus WG, Dance IG, Dean DR, Seefeldt LC Localization of a catalytic intermediate bound to the FeMo-cofactor of nitrogenase. Jour of Biol Chem, 2004;279(33):34770-5.
12. Kaneko T, Nakamura Y, and et.al. Complete genome structure of the nitrogen-fixation symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. DNA Reseach, 2000;7:331-338.
13. Mevarech M, Rice D, and Haselkorn R, Nucleotide sequence of a Cyanobacterial *nifH* gene coding for nitrogenase reductase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1980;77: 6476-6480.
14. Nour SM, Fernandez MP, and Cleyet-Marel JC *Rhizobium ciceri sp.* Nov. consistinf of strain that nodulate chickpeas (*cicer arietinum*). International Journal of Systematic Bacteriology, 1994;44(3):511-522.
15. Palacios R, Mora J, and Newton WE New Horizons in Nitrogen Fixation. Kluwer Academic Publisher, 1992;55-65.
16. Perret X, Broughton WJ Rapid identification of *Rhizobium* strains by targeted PCR fingerprinting. Plant and Soil, 1998;204:21-34.

17. Pujita T, Takashi Y, Shonai F, Ogura Y, and Mastubara H Cloning, nucleotide sequences and differential expression of the *nifH* and *nifH-like (frxC)* genes from the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Plectonema boryanum*. Plant Cell Physiol, 1991;32:1093-1106.
18. Richardson AE, Viccars LA, Watson JM, and Gibson AH Differentiation of *Rhizobium* strains using the polymerase chain reaction with random and directed primers,. Soil Biology and Biochemestry, 1995;27:515-524.
19. Sibold L, Henriquet M, Possot O, and Aubert JP Nucleotie sequence of *nifH* regions from *Methanobacterium ivanovii Methanosarcina barkeri* 277 and characterization of *glnB-like* genes. Res Microbiol, 1991;142:5-12.
20. Sullivan JT, and et.al Comparative Sequence Analysis of the Symbiosis Island of *Mesorhizobium loti* Strain R7A. Journal of Bacteriology, 2002;184(11):3086-3095.
21. Velazquez E, Sanchez JMC, Mateos PF, and Molina EM. Analysis of Stable Low-weight RNA Profiles of Members of the Family Rhizobiaceae. Applied and environmental Microbiology, 1998;64(4):1555-1559.

Journal of Microbial World
Volume 2, No. 1, 2009

nifH gene Study of *Mesorhizobium ciceri* isolated From Iran

Elham Moazemian[1], Mohammad Kargar[2], Ahmad Asgharzadeh[3], Sayed Mehdi Hoseini Mazinani[4]

[1]Department of microbiology, Islamic Azad University, Science & Research, Fars Branch, Fars, Iran
[2]Department of Microbiology, Islamic Azad University, Jahrom Branch, Jahrom, Iran
[3]Water & Soil Research Institute, Iran
[4]National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Iran

Abstract

Background and objectives: Cicer arietinum is the world`s third ranking and Iran`s first ranking legume in terms of amount of production. *Mesorhizobium ciceri* is the most important bacteria that has symbiosis with this plant and fixes nitrogen for this legume. The symbiotic *Rhizobium* of this plant is quite effective in fixing nitrogen molecules. Therefore the study of this phenomenon is very important. Atmospheric nitrogen fixation requires nitrogenase enzyme. *nifH*, *nifD* and *nifK* genes encode three polypeptides of the nitrogenase complex.

Material and methods: After isolation of bacteria and culture it, total DNA was isolated by using a standard protocol and it was used as a template. The *nifH* gene was amplified from genomic DNA by PCR method with appropriate primers.

Results: Using two sets of primers nifH1/nifH2 and nifH4/nifD1, amplified products of the expected size were obtained on DNA extracted from M. ciceri. The amplified products obtained with the *nifH* gene was purified and sequenced. The nucleotide sequences of *nifH* gene of *M.ciceri* was performed.

Conclusion: 90% homology was shown with the *nifH* gene in M.loti. This gene has also shown high homology with nifH gene in other *Rhizobium* species.

Keywords: Mesorhizobium ciceri, *nifHDK* operon, Nitrogen fixation, *Cicer arietinum.*

Correspondence to: Elham Moazemian
Tel: (+98)9177110994
Email: elhammoazamian@gmail.com
Journal of Microbial World 2009, 2(1), 12-18