

تنوع پلاسمیدهای باکتریهای سینوریزوبیوم (انسیفر)

اسماعیل کریمی - امیر لکزیان* - کاظم خاوازی - اصغر اصغر زاده^۱

تاریخ دریافت: ۸۴/۸/۲۱

تاریخ پذیرش: ۸۷/۲/۱۴

چکیده

شواهد ژنتیکی نشان داده است که باکتری‌های ریزوبیوم بدلیل داشتن ژنهای *nod* گیاهان لگوم را گره دار می‌کنند. تقریباً تمام خانواده باکتری‌های ریزوبیاسه دارای پلاسمیدهای بزرگ هستند که از لحاظ اندازه و تعداد بسیار متغیر می‌باشند. معمولاً ژن‌های *nif* و *nod* بر روی پلاسمیدهای هم‌زیست (Psym) قرار دارند. مطالعه تعداد و اندازه پلاسمیدها از طریق تکنیک پروفیل‌های پلاسمیدی می‌تواند به‌عنوان شاخصی از تنوع باکتری‌های ریزوبیوم در مطالعات اکولوژی استفاده شود. در این مطالعه تنوع پلاسمیدی ۱۹۶ جدایه سینوریزوبیوم (انسیفر) جدا شده از خاک‌های استان همدان با استفاده از تکنیک پروفیل پلاسمیدی مورد ارزیابی و مطالعه قرار گرفت. نتایج آزمایش نشان داد که تعداد پلاسمیدها در بین جدایه‌ها بین ۱ تا ۴ پلاسمید تغییر می‌کند. به‌طور کلی ۱۳ نوع پلاسمید مختلف در بین جدایه‌ها شناسایی شدند که اندازه آن‌ها از ۵۰ تا ۲۰۰ کیلو جفت باز آلی متغیر بود. جدایه‌هایی با ۱، ۲، ۳ و ۴ پلاسمید به ترتیب ۶۳، ۲۱، ۱۳ و ۲ درصد کل جدایه‌ها را تشکیل می‌دادند. جدایه‌های حاوی ۲ و ۳ پلاسمید به ترتیب ۸ و ۱۵ گروه مختلف پلاسمیدی گروه بندی شدند. چهار جدایه سینوریزوبیوم که دارای ۴ پلاسمید بودند و در ۴ گروه پلاسمیدی متفاوت قرار گرفتند. کل جدایه‌ها جمعا ۲۸ گروه پلاسمیدی گروه بندی شدند.

واژه‌های کلیدی: سینوریزوبیوم (انسیفر)، پروفیل پلاسمیدی

مقدمه

فرآیند همزیستی دخیل نیستند ولی دارای نقش‌های زیادی در رقابت برای گره زایی، بهره برداری از منابع مختلف کربن، تولید ملانین، رشد و زنده ماندن ریزوبیوم تحت شرایط تنش‌های محیطی، بهره‌گیری از ترشح‌های گیاه، و ترکیب‌های آروماتیک، سنتز پلی ساکاریدهای سطحی و کمک به رشد ساپروفیتی ریزوبیوم در خاک از نقش‌های آن‌ها به‌شمار می‌رود (۱، ۵، ۸، ۱۲ و ۱۶). اندازه و تعداد پلاسمیدها در باکتری‌های ریزوبیوم‌ها خیلی متغیر هستند. معمولاً باکتری‌های ریزوبیومی بین ۱ تا ۱۰ پلاسمید را در خودشان جای می‌دهند که از لحاظ وزنی بین ۱۵۰۰ kb - ۱۵۰ متغیر می‌باشند (۸، ۹، ۱۰ و ۱۳). ترومن و برومفیلد

پلاسمیدها در باکتری‌های ریزوبیومی در دو گروه پلاسمیدهای هم‌زیست (Psym) و غیر هم‌زیست (nonPsym) قرار می‌گیرند (۸ و ۱۷). پلاسمیدهای هم‌زیست پلاسمیدهایی هستند که همه ژن‌های ضروری برای فرآیند همزیستی را دارا هستند که از جمله آنها می‌توان به ژن‌های *nif* و *nod* اشاره کرد. پلاسمیدهای غیر هم‌زیست که پلاسمیدهای کریپتیک هم نامیده می‌شوند در

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی

مشهد و استادیار ان مؤسسه تحقیقات خاک و آب تهران

Email: alakzian@yahoo.com

* - نویسنده مسئول:

سینوریزوبیوم (انسیفر) مطرح می‌باشد و بنابر این به‌نظر می‌رسد که پلاسمیدهای جدایه‌های سینوریزوبیوم در این منطقه از تنوع بسیار زیادی برخوردار باشند.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری خاک

ابتدا مزارع یونجه مورد نظر در استان همدان انتخاب و سپس نمونه‌های خاک از عمق ۳۰-۰ سانتیمتر و به منظور جلوگیری از آلودگی، هر یک از نمونه‌ها برای تهیه گره‌ها به گلدان‌های ۲ کیلو گرمی منتقل و سپس با کاشت ۸ عدد بذور یونجه همدانی و نگهداری آن‌ها ب‌مدت ۴ ماه، گرهک‌های ریشه‌ای هر خاک جدا شدند. گرهک‌ها در داخل سیلیکاژل تا زمان جداسازی جدایه‌های سینوریزوبیوم نگهداری شدند (۳).

جداسازی باکتری‌های سینوریزوبیوم (انسیفر) از گرهک

قبل از جداسازی باکتری‌ها از گرهک‌های خشک شده، آن‌ها به مدت یک ساعت در آب مقطر استریل قرار داده شدند و سپس سطوح گرهک‌ها با الکل ۹۶ درصد، کلروژیه ۰/۱ درصد و شستشوی مکرر استریل شدند (۱۵). با له کردن گرهک‌ها و پخش سوسپانسیون باکتری بر روی محیط کشت YEM حاوی کنگورد و نگهداری آن‌ها در گرمخانه به مدت ۳-۴ روز و با باز کشت مجدد جدایه‌ها آن‌ها خالص شدند (۲). بر روی جدایه‌های خالص شده آزمون آلوده سازی گیاه انجام شد. جمعا تعداد ۱۹۶ جدایه باکتری سینوریزوبیوم (انسیفر) خالص سازی و آزمون تشکیل گره بر روی گیاه میزبان انجام و تأیید شدند.

(۱۴) با بررسی نیمرخ پلاسمیدی جدایه‌های *R. leguminosarum* bv. *trifoli* که از ۲۱ منطقه جغرافیایی مختلف در ولز انگلستان جمع آوری شده بودند، تعداد پلاسمیدهای این جدایه‌ها را بین ۲ تا ۱۰ پلاسمید گزارش کردند. در تحقیقی مشابه جیبرا و همکاران (۶) با بررسی نیمرخ پلاسمیدی جدایه‌های *Sinorhizobium meliloti* که از ۴ نوع کولتیوار متفاوت یونجه جدا شده بودند نشان دادند که محتوای پلاسمیدی جدایه‌ها بین ۱ تا ۶ پلاسمید متغیر می‌باشد. گزارش‌های منتشر شده از سوی محققین مختلف حاکی از آن است که پلاسمید در ریزوبیوم‌ها ممکن است ۵۰-۲۵ درصد ژنوم باکتری را شامل شود. وجود پلاسمیدهای بزرگ بالغ بزرگ ۹۰۰ kb را در جدایه *R. leguminosarum* جدا شده از نخود نیز گزارش شده است. کرول و همکاران (۷) تغییرهای نسبتا زیادی را در وزن مولکولی پلاسمیدها ((MD ۶۰۰-۱۳۰)) در ۶ جدایه *R. leguminosarum* گزارش کردند.

روش‌های مختلفی برای مطالعه تنوع و گوناگونی باکتری‌ها وجود دارد که بعضی از این روش‌ها بر مبنای ویژگی‌های متابولیکی باکتری‌ها می‌باشد که از آن جمله می‌توان به سیستم بیولگ (Biolog) اشاره کرد. اما امروزه از روش‌های زنتیکی برای مطالعات تنوع استفاده می‌شود. شاید بتوان گفت که با توجه به پایداری نسبی پلاسمیدها در باکتری‌های ریزوبیوم استفاده از پروفیل‌های پلاسمیدی روش بهتری برای مطالعه تنوع باکتری‌های یک جنس مشخص باشد که محققین زیادی از این روش استفاده کرده‌اند. هدف از این تحقیق مطالعه تنوع پلاسمیدهای جدایه‌های سینوریزوبیوم (انسیفر) جدا شده از مزارع مختلف یونجه در کل استان همدان بوده است که اولاً اطلاعاتی راجع به این موضوع وجود ندارد و ثانياً منطقه همدان از مناطقی است که به‌عنوان خواستگاه گیاه میزبان باکتری

تهیه پلاسמיד پروفیل

به منظور مطالعه پلاسמידهای جدایه‌ای باکتری‌های سینوریزویوم (انسیفر) از روش اکهارت (۴) با اعمال بعضی تغییرها بر روی آن انجام شد. جدایه‌ها خالص شده مجدداً در شرایط کاملاً استریل بر روی محیط کشت YEM (عصاره مخمر و مانیتول) باز کشت شدند تا از خلوص جدایه‌ها اطمینان حاصل گردد. سپس برای کاهش تولید پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی جدایه‌ها مجدداً بر روی محیط کشت TY (تریپتون و عصاره مخمر) دوباره کشت داده شدند. تک کلنی هر یک از جدایه‌ها در ۵ میلی لیتر از محیط کشت HP (عصاره مخمر، تریپتون و پیتون) مایع به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد رشد داده شدند. یک میلی لیتر از محیط کشت HP ۱۸ ساعته را در داخل اپندورف ۱/۵ میلی لیتری استریل قرار داده و بلافاصله یک میلی لیتر از محلول سارکوسین ۰/۳ درصد به نمونه‌ها اضافه کرده و بر روی یخ قرار داده شد. نمونه‌ها به آرامی به هم زده شد. سپس سوسپانسیون باکتری در دور ۶۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و پس از خارج کردن مایع رویی، نمونه‌ها مجدداً بر روی یخ قرار داده شدند. ۳۲ میکرولیتر از بافر لیزکننده (۱۰۰۰ میکروگرم لیزوزیم، ۱۰ میکروگرم RNAase و ۰/۰۵ درصد زایلن سیانول در ۱ میلی لیتر بافر TBE 1X حاوی ۱۰ درصد ساکارز) به نمونه‌ها اضافه و پس از چند بار پیست کردن نمونه‌ها در داخل چاهک ژل قرار داده شد. با توجه به این که افزودن مستقیم SDS به نمونه‌ها باعث توقف فعالیت آنزیم لیزوزیم می‌شود و از طرفی وجود SDS در نمونه‌ها مانع استقرار نمونه‌های لیز شده در چاهک‌ها می‌شود لذا شده و باعث کف کردن و در نتیجه پخش نمونه هنگام پر کردن چاهک‌ها می‌شود. بنابر این در بخش جلویی چاهک‌ها شیاری را با آگاروز ۰/۴ درصد حاوی یک درصد SDS پر

کرده و سپس نمونه‌ها که دقیقاً بعد از شیار قرار گرفته بود در داخل چاهک‌های ژل قرار داده شدند. الکتروفورز در ابتدا با ۱۰ ولت به مدت ۲۰ دقیقه و سپس با ۱۱۰ ولت به مدت ۶ ساعت انجام شد. پس از اتمام زمان الکتروفورز ژل در اتیدیوم بروماید به مدت ۳۰ دقیقه رنگ آمیزی شده و پس از شستشوی کامل در آب مقطر در حضور اشعه ماوراء بنفش عکس برداری شدند.

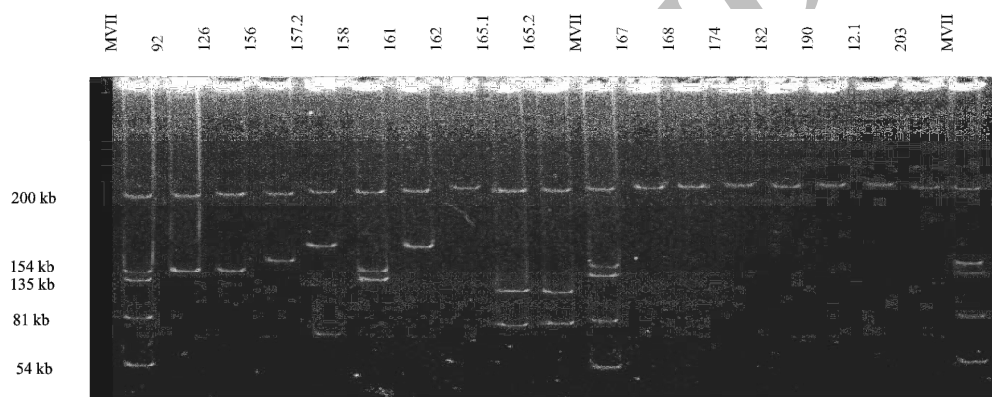
نتایج و بحث

نتایج حاصله از تجزیه پلاسמידهای باکتری‌های سینوریزویوم میلیوتی (انسیفر) جدا شده از مزارع یونجه استان همدان نشان داد که کلیه جدایه‌های مطالعه شده (۱۹۶ جدایه) حداقل دارای یک پلاسמיד بودند (شکل ۱). پلاسמיד مشترک بین پلاسמידی جدایه‌های سینوریزویوم (انسیفر) بسیار بزرگ و اندازه‌ای حدود ۲۰۰ کیلو باز داشت. بنابر این بر خلاف گزارش‌های برخی از محققین دیگر که تعداد پلاسמידهای باکتری‌های ریزویوم را تا هشت (۸) و در مواردی تا ده پلاسמיד (۱۴) گزارش کردند، جدایه‌های مورد مطالعه حداکثر ۴ پلاسמיד داشتند و تعداد پلاسמידها در بین جدایه‌های سینوریزویوم در کل منطقه مورد مطالعه با توجه به اندازه جمعیت انتخاب شده برای این مطالعه بین ۱ تا ۴ پلاسמיד متغیر بود. (شکل ۱) نمونه‌ای از پروفیل پلاسמידی جدایه‌های سینوریزویوم (انسیفر) را نشان می‌دهد. البته جدایه‌هایی با چهار پلاسמיד در این پروفیل پلاسמידی نشان داده نشده است.

در تحقیقی که بر روی ۴۵ جدایه باکتری ریزویوم هم‌زیست گیاه میزبان *Hedysarum coronarium* انجام شد نتایج نشان داد که تنوع بسیار زیادی هم در تعداد و اندازه پلاسמידهای این جدایه‌ها وجود داشت و کل این جدایه‌ها در ۱۹ گروه متفاوت قرار گرفتند و اندازه پلاسמידها بین ۱۸۷ تا ۳۴۹ مگا دالتون متغیر بود (۱۱).

سینوزیویوم ملیوتی (انسیفر) بر روی پلاسمیدها قرار دارند (۸ و ۱۷) و از طرف دیگر تمامی جدایه‌های مورد مطالعه در این آزمایش از گره‌های یونجه جدا شده بودند، بنابراین به احتمال قوی به نظر می‌رسد که این پلاسمید حاوی ژن‌های درگیر در فرآیند تشکیل گره و تثبیت بیولوژیکی نیتروژن باشد. قطعاً اطمینان از صحت این ادعا به مطالعات هیبریداسیون نیاز دارد. موزو و همکاران (۱۱) نیز پلاسمید مشترک بین ۴۵ جدایه ریزویومی مورد مطالعه رابه‌عنوان پلاسمید هم‌زیست Psym گزارش کردند.

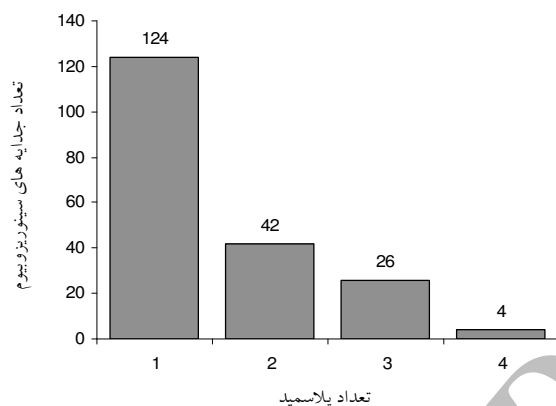
نتایج تجزیه پلاسمیدهای باکتری‌های سینوزیویوم ملیوتی (انسیفر) همچنین نشان داد که در بین ۱۹۶ جدایه مطالعه شده ۱۳ نوع پلاسمید متفاوت وجود دارد. این پلاسمیدها به ترتیب دارای ۲۰۰، ۱۹۵، ۱۸۱، ۱۷۲، ۱۶۵، ۱۵۴، ۱۴۳، ۱۳۰، ۱۱۰، ۱۰۰، ۸۴، ۷۰ و ۵۰ کیلو باز آلی بودند. سنگین‌ترین پلاسمید در بین ۱۳ پلاسمید شناسایی شده با وزن مولکولی ۲۰۰ کیلو باز آلی در بین جدایه‌های سینوزیویوم (انسیفر) مشترک بود. با توجه به این که ژن‌های تشکیل گره و تثبیت نیتروژن معمولاً در باکتری‌های



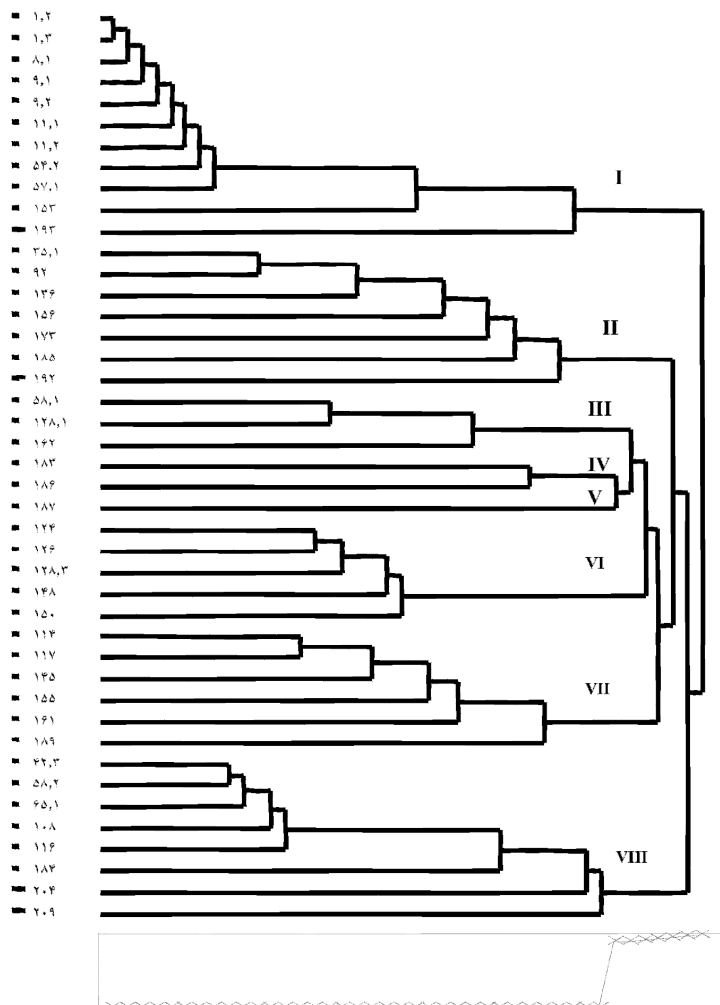
(شکل ۱) - پروفیل پلاسمیدی ۱۶ جدایه‌های سینوزیویوم (انسیفر) جدا شده از خاکهای مناطق مختلف در استان همدان جدایه MVII بعنوان شاخص برای برآورد اندازه تقریبی پلاسمیدها در ابتدا، انتها و وسط ژل قرار داده شده است

از بین ۴۲ جدایه سینوزیویوم ملیوتی (انسیفر) که حاوی ۲ پلاسمید بودند ۲۶ درصد آن‌ها پلاسمید ۱۵۴ کیلو بازی را دارا بودند و ۱۹، ۱۷، ۱۲، ۱۲، ۷، ۵، ۲ درصد آن‌ها به ترتیب پلاسمیدهای ۱۷۲، ۱۴۳، ۱۳۰، ۱۶۵، ۱۰۰، ۱۸۱، ۱۱۰ کیلو بازی را دارا داشتند. بنابراین فراوان‌ترین پلاسمید در بین جدایه‌های باکتریهای سینوزیویوم ملیوتی (حاوی ۲ پلاسمید) به جز پلاسمید ۲۰۰ کیلو بازی، پلاسمید ۱۵۴ کیلو بازی بود و کمترین فراوانی پلاسمید در بین این جدایه‌ها متعلق به پلاسمید ۱۱۰ بود. (شکل ۴) تغییرات اندازه پلاسمیدها را در بین جدایه‌های سینوزیویوم ملیوتی حاوی ۲ پلاسمید را نشان می‌دهد.

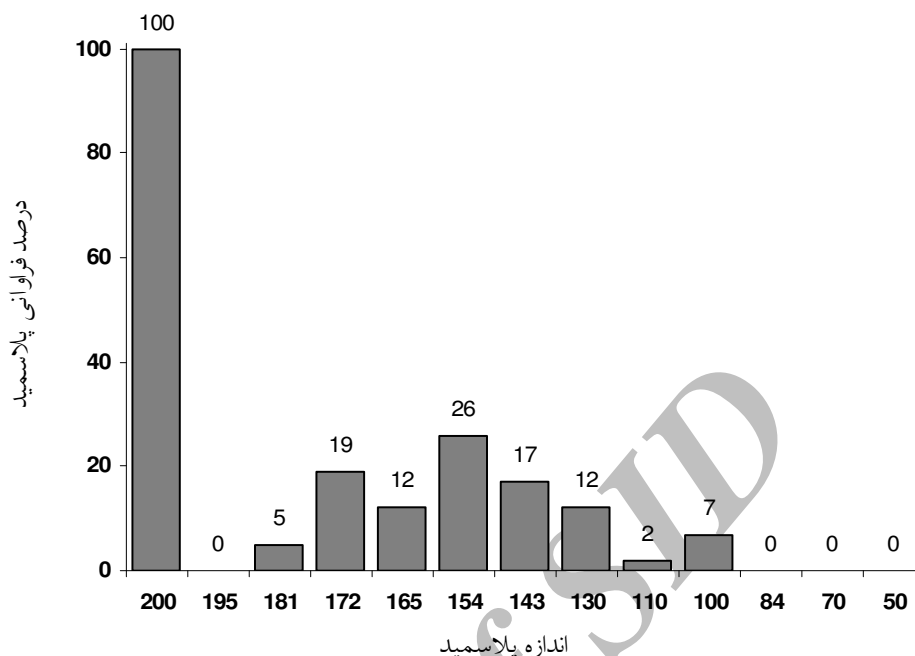
نکته جالب توجه در مطالعه تنوع پلاسمیدی در بین ۱۹۶ جدایه مطالعه شده این بود که ۱۲۴ جدایه سینوزیویوم (انسیفر) (۶۳ درصد کل جدایه‌ها) فقط پلاسمید ۲۰۰ کیلو باز آلی را دارا بودند و ۲۱، ۱۳ و ۲ درصد دیگر جدایه‌ها به ترتیب ۲، ۳ و ۴ پلاسمید داشتند (شکل ۲). ۲۱ درصد از جدایه‌های سینوزیویوم ملیوتی (انسیفر) مطالعه شده در خاک‌های استان همدان دارای دو پلاسمید بودند که بدون استثناء تمامی این جدایه‌ها علاوه بر دارا بودن پلاسمید ۲۰۰ کیلو بازی دارای پلاسمید دیگری نیز بودند که اندازه آن از ۱۸۱ تا ۱۰۰ کیلو باز متغیر بود. گروه بندی ۴۲ جدایه سینوزیویوم ملیوتی (انسیفر) (با دو پلاسمید) بر مبنای پروفیل‌های پلاسمیدی نشان داد که آن‌ها در ۸ گروه متفاوت قرار می‌گیرند (شکل ۳).



(شکل ۲) - گروه بندی ۱۹۶ جدایه سینوریزوبیوم ملیوتی (انسیفر) (جدا شده از استان همدان) بر مبنای تعداد پلاسمید



(شکل ۳) - گروه بندی جدایه های سینوریزوبیوم ملیوتی (دارای ۲ پلاسمید) جدا شده از خاک های مناطق مختلف استان بر مبنای الگوی پروفیل پلاسمیدی



(شکل ۴) توزیع فراوانی اندازه پلاسمیدها در بین جدایه‌های سینوریزوبیوم میلیوتی (جدا شده از استان همدان) که دارای دو پلاسمید بودند

این پلاسمید ۱۳۰ کیلو بازی فراوان ترین پلاسمید در بین جدایه‌های حاوی سه پلاسمید بود. کمترین فراوانی پلاسمید در بین این جدایه‌ها متعلق به پلاسمید ۵۰ کیلوبازی بود. (شکل ۶) تغییرهای اندازه پلاسمیدها را در بین جدایه‌های سینوریزوبیوم میلیوتی حاوی ۳ پلاسمید را نشان می‌دهد.

نتایج تجزیه پروفیل‌های پلاسمیدی جدایه‌های سینوریزوبیوم میلیوتی حاوی ۴ پلاسمید نشان داد که فقط ۲ درصد جدایه‌ها دارای ۴ پلاسمید بودند. این جدایه‌ها علاوه بر دارا بودن پلاسمید ۲۰۰ کیلو بازی دارای ۳ پلاسمید دیگر نیز بودند. این جدایه‌ها از نقطه نظر پروفیل پلاسمید هر کدام گروه جداگانه‌ای را تشکیل دادند.

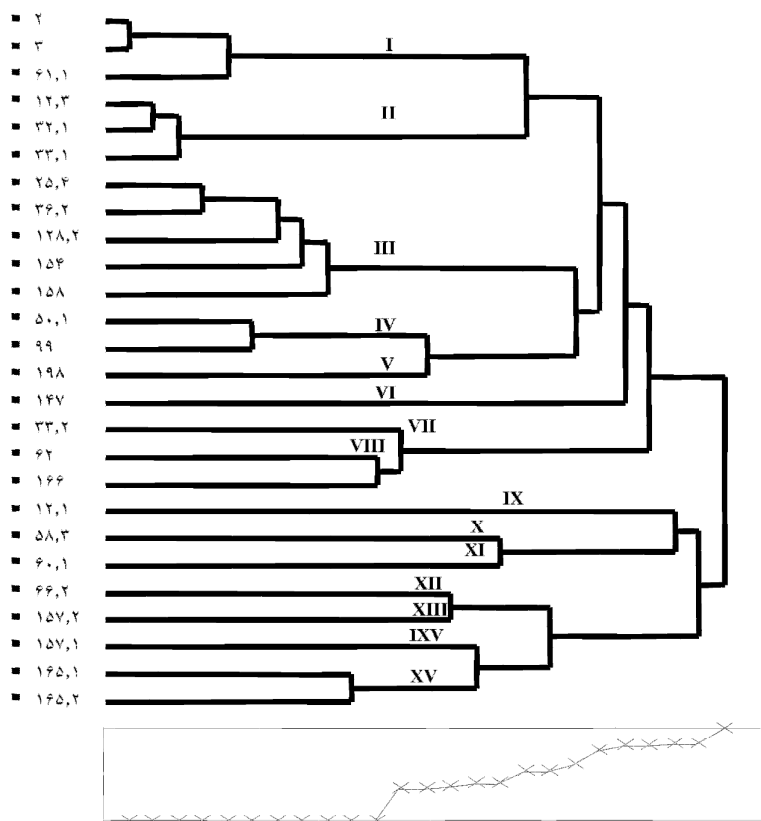
بنابراین باکتری‌های سینوریزوبیوم میلیوتی حاوی ۴ پلاسمید در ۴ گروه مختلف قرار گرفتند. (شکل ۷) تغییرات

نتایج تجزیه پلاسمیدهای باکتری‌های سینوریزوبیوم میلیوتی جدا شده از خاک‌های استان همدان نشان داد که ۱۳ درصد جدایه‌ها حاوی ۳ پلاسمید بودند. این جدایه‌ها علاوه بر داشتن پلاسمید ۲۰۰ کیلوبازی دارای دو پلاسمید دیگر نیز بودند. اندازه این دو پلاسمید بین ۵۰ تا ۱۸۱ کیلو باز متغیر بود. گروه بندی این جدایه‌ها بر مبنای پروفیل‌های پلاسمیدی نشان داد که این ۲۶ جدایه (۱۳ درصد درصد کل جدایه‌ها) در ۱۵ گروه متفاوت قرار می‌گیرند (شکل ۵).

از بین ۲۶ جدایه سینوریزوبیوم میلیوتی که دارای ۳ پلاسمید بودند، ۲۷ درصد آن‌ها پلاسمید ۱۳۰ کیلوبازی را دارا بودند. ۲۳، ۱۲، ۸، ۸، ۸، ۸، ۴، ۲ و ۲ درصد جدایه‌های دیگر به ترتیب دارای پلاسمیدهایی با اندازه ۱۴۳، ۱۵۴، ۱۶۵، ۱۷۲، ۱۸۱، ۸۴، ۱۱۰، ۱۰۰ و ۵۰ کیلو باز بودند. بنابر

جدایه‌ها و پلاسمیدی وجود ندارد. این نتایج با یافته‌های موزو و همکاران (۱۱) نیز مطابقت داشت.

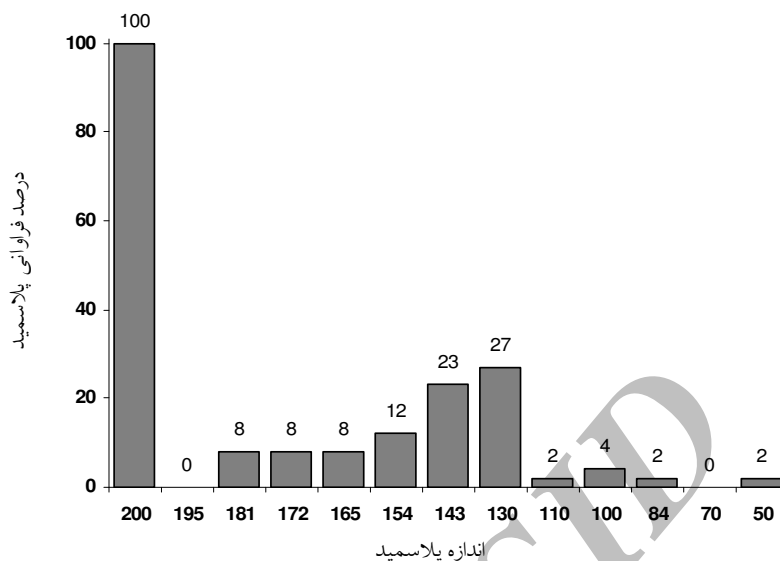
اندازه پلاسمیدها را در بین جدایه‌های سینوریزوبیوم ملیوتی حاوی ۴ پلاسمید را نشان می‌دهد. نتایج حاصله از این آزمایش نشان داد که ارتباطی بین منشاء جغرافیایی این



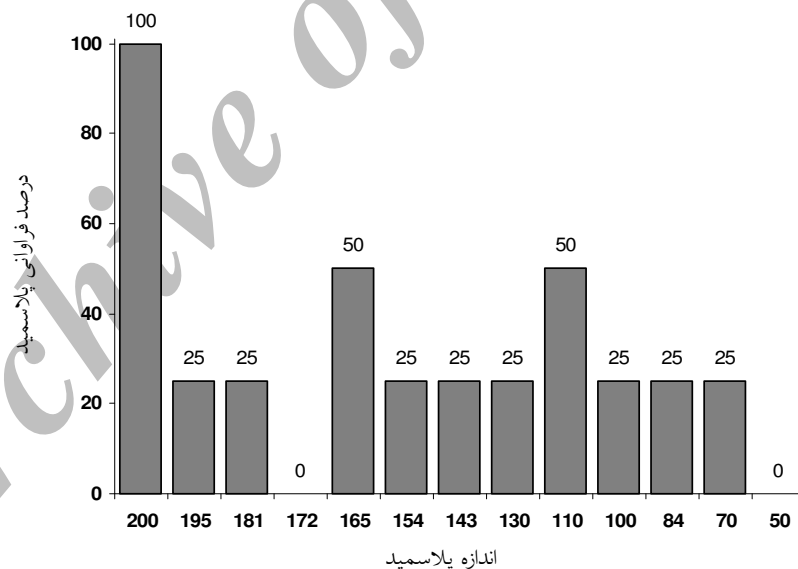
(شکل ۵) گروه بندی جدایه‌های سینوریزوبیوم ملیوتی (دارای ۲ عدد پلاسمید) جدا شده از خاک‌های مناطق مختلف استان بر مبنای الگوی پروفیل پلاسمیدی

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد و مرکز تحقیقات خاک و آب تهران که امکان این تحقیق را فراهم کردند تشکر می‌کنیم.



(شکل ۶) - نمودار توزیع تعداد پلاسمیدها در بین جدایه‌های سینوریزوبیوم ملیوتی (جدا شده از استان همدان) که دارای سه پلاسمید بودند



(شکل ۷) - نمودار توزیع تعداد پلاسمیدها در بین جدایه‌های سینوریزوبیوم ملیوتی (جدا شده از استان همدان) که دارای چهار پلاسمید بودند

منابع

- 1- Baldani, J. I., Weaver, R. W., Hynes, M. F., Eardly, B. D. 1992. Utilization of carbon substrates, electrophoretic enzyme patterns, and symbiotic performance of plasmid-cured clover rhizobia. *Applied Environment Microbiology*, 58: 2308-2314.
- 2- Beck, D. p., Marteron, L. A., and Afandi, F. 1993. Practical *Rhizobium* legume technology. Technical manual No. 19, ICARDA, Syria.

- 3- Date, R. A., Halliday, J. 1987. Collection, isolation and maintenance of Rhizobia. In Elkan, G. H. (ed). Symbiotic Nitrogen Fixation Technology. Matcel Dekker, New York.
- 4- Eckhardt, T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria, *Plasmid*, 1: 584–588.
- 5- Finan, T.M., Kunkel, B., Vos, G.F.D., and Signer, E.R. 1986. Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. *Journal of Bacteriology*, 167 : 66-72
- 6- Jebara, M., Mhamdi, R., Aouani, M.E., Ghrir, R., and Mars, M. 2001. Genetic diversity of *Sinorhizobium* populations recovered from different *Medicago* varieties cultivated in Tunisian soils. *Canadian Journal of Microbiology*, 47: 139-147.
- 7- Krol, A. J. M., Hontelez, J. G. J., and Kammen, A. V. 1982. Only one of the large plasmids in *Rhizobium leguminosarum* strain PRE is strongly expressed in the endosymbiotic state. *Journal of General Microbiology*, 128: 179 – 190.
- 8- Lakzian, A., Murphy, P., Turner, A., Beynon, J., and Ken Giller, E. 1998. *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* populations in soils with increasing heavy metal contamination: abundance, plasmid profiles, diversity and metal tolerance. *Soil Biology and Biochemistry*. 34: 519-529.
- 9- Lederberg, J. 1998. Personal perspective plasmid (1952-1957), *Plasmid*, 39:1-9
- 10-Martinez, E., D. Romero, and Palacios, R. 1990. The *Rhizobium* genome. *Plant Science*, 9: 59-93
- 11-Mozo, T., Cabrera, E., and Ruiz-Argüeso, T. 1988. Diversity of Plasmid Profiles and Conservation of Symbiotic Nitrogen Fixation Genes in Newly Isolated *Rhizobium* Strains Nodulating Sulla (*Hedysarum coronarium* L.). *Applied Environmental Microbiology*. 54(5): 1262–1267.
- 12-Santos, A, G. Brom, S., and Romero, D. 1996. *Rhizobium* plasmid in bacteria-legume interactions. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 12: 119-125.
- 13-Somasegaran, P. and Hoben, H. J. 1994. Handbook for Rhizobia. Springer- Berlin.
- 14-Thurman, N. P. and E. S. P. Bromfield 1988. Effect of variation within and between *Medicago spp.* and *Melilotus spp.* on the composition and dynamics of indigenous populations of *Rhizobium meliloti*. *Soil Biology and Biochemistry*, 20: 31-38.
- 15-Vincent, J. M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP. Handbook No.15, Blackwell, Oxford.
- 16-Yost, C. K., Clark, K. T., Bel, K. L. and Hynes, M. F. 2003. Characterization of the nodulation plasmid encoded chemoreceptor gene *mcpG* from *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology*.
- 17-Zou, X., Feng. X.L., Chen, W. X., Li, F.D. 1998 . Biological behavior of plasmid in *Rhizobium sp.* strain S25 from *Tephrosia candida*. *Plasmid*, 40: 158- 163.

Plasmid diversity of *Sinorhizobium* (Ensifer) bacteria

E.Karimi – A. Lakzian* – K. Khavazi – A. Asgharzadeh¹

Abstract

Genetic evidences have shown that the rhizobium bacteria nodulate the legume plants because of *nod*, *sym* and *fix* genes. Almost all members of rhizobaceae family harbor large plasmids, which are highly variable in number and size. Representative of *nif*, *fix* and *nod* genes have been located on the symbiotic plasmids of different *rhizobium* species. Therefore, the size and numbers of plasmids of bacterial isolates (by the plasmid profile technique) could be used as a diversity index in ecological studies. In this investigation, the diversity of 196 isolates of *sinorhizobium sp* isolated from Hamada soils was evaluated by using Plasmid profile technique. The results showed that the number of plasmids among all isolates varied from 1 to 4 and totally 13 different plasmids were identified. The size of plasmids varied from 50 to 200 kb. Isolates with 1, 2, 3 and 4 plasmids formed 63, 21, 13 and 2 percentage of the population. Isolates of *sinorhizobium* with 2 and 3 plasmids were clustered into 8 and 15 groups, respectively, based on plasmid patterns. Four isolates which contained 4 plasmids were grouped in four different clusters and finally all isolates of *Sinorhizobium* (196) were grouped in 28 different groups.

Key words: Plasmid profiles, *Sinorhizobium*

*- Corresponding author Email: alakzian@yahoo.com

1- Contribution from College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad- Water and Soil Research Institute of Teheran .