تنوع پلاسمیدهای باکتریهای سینوریزوبیوم (انسیفر)

اسماعیل کریمی- امیر لکزیان* - کاظم خاوازی - اصغر اصغر زاده[1]

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. تقریبا تمام خانواده باکتری‌های ریزوبیاسه دارای پلاسمیدهای بزرگ هستند که از لحاظ اندازه و تعداد بسیار متغیر می‌باشند. معمولا 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 قرارگرفت. 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 بازآلی 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 سینورزیوبیوم که دارای ۴ پلاسمید بودند و در ۴ گروه پلاسمیدی متفاوت قرار گرفتند. کل جدایه‌ها جمعادر ۲۸ گروه پلاسمیدی گروه بندی شدند.

واژه‌های کلیدی: سینوریزوبیوم (انسیفر) ، پروفیل پلاسمیدی

مقدمه

پلاسمیدها در باکتری‌های ریزوبیومی‌در دو گروه پلاسمیدهای همزیست (Psym) و غیر همزیست (nonPsym) قرار می‌گیرند (۸ و۱۷). 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. پلاسمیدها ی غیر همزیست که پلاسمیدهای کریپتیک هم نامیده می‌شوند در 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، بهره گیری از ترشح‌های گیاه، و ترکیب‌های آروماتیک، سنتز پلی ساکاریدهای سطحی و کمک به رشد ساپروفیتی ریزوبیوم در خاک از نقش‌های آن‌ها به شمار می‌رود (۱، ۵، ۸، ۱۲و ۱۶). اندازه و تعداد پلاسمیدها در باکتری‌های ریزوبیوم‌ها خیلی متغیر هستند. معمولا باکتری‌های ریزوبیومی بین۱ تا ۱۰ پلاسمید را در خودشان جای می‌دهند که از لحاظ وزنی بین kb ۱۵۰۰- ۱۵۰ متغیر می‌باشند (۸، ۹، ۱۰ و ۱۳). ترومن و برومفیلد

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد ، دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد و استادیاران مؤسسه تحقیقات خاک و آب تهران

* - نویسنده مسئول: Email: alakzian@yahoo.com

(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 بین۲ 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 ۱تا 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 بر kb ۹۰۰ 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 ((MD۶۰۰-۱۳۰) 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 پلامیدها در باکتری‌های ریزوبیوم استفاده از پروفیل‌های پلاسمیدی روش بهتری برای مطالعه تنوع باکتری‌های یک جنس مشخص باشدکه 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 اولا اطلا عاتی راجع به این موضوع وجود ندارد و ثانیا منطقه همدان از مناطقی است که به‌عنوان خواستگاه گیاه میزبان باکتری 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 انتخاب 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 بذر یونجه همدانی و نگهداری آن‌ها بnامدت ۴ ماه، گرهک‌های ریشه‌ای هر خاک جدا شدند. گرهک‌ها در داخل سیلیکاژل تا زمان جداسازی جدایه‌های سینورزوبیوم نگهداری شدند (۳).

جدا سازی 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 ، کلروجیوه 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 به‌مدت 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.

تهیه پلاسمید پروفیل

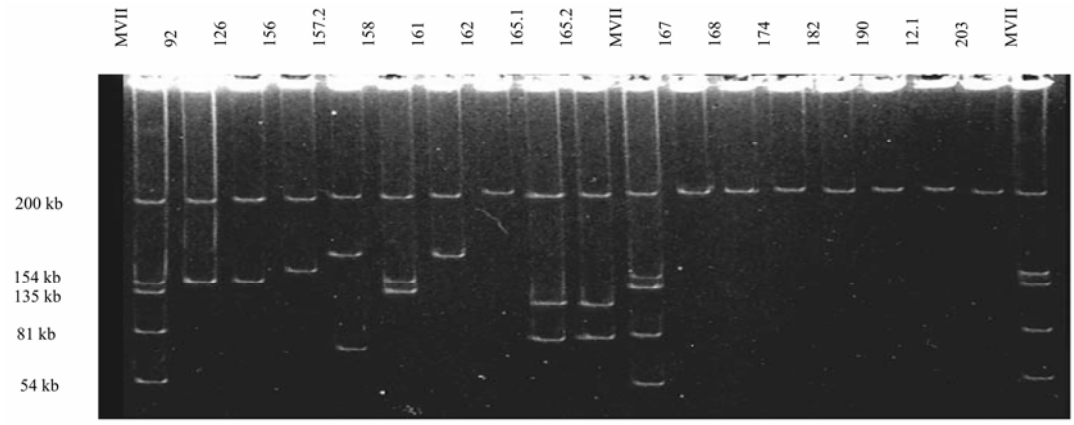
به منظور مطالعه پلاسمیدهای جدایه‌ای باکتری‌های سینوریزوبیوم (انسیفر) از روش اکهارت (۴) با اعمال بعضی تغییرها بر روی آن انجام شد. جدایه‌ها خالص شده مجددا در شرایط کاملا استریل بر روی محیط کشت YEM (عصاره مخمر و مانیتول) باز کشت شدند تا از خلوص جدایه‌ها اطمینان حاصل گردد. سپس برای کاهش تولید پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی جدایه‌ها مجددا 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 پپتون) مایع به‌مدت 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 مجددا بر روی یخ قرار داده شدند. ۳۲ میکرولیتر از بافر لیزکننده (۱۰۰۰میکروگرم 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 پیپت کردن نمونه‌ها در داخل چاهک ژل قرار داده شد. با توجه به این‌که افزودن مستقیم SDS به نمونه‌ها باعث توقف فعالیت آنزیم لیزوزم 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 پرکردن 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 دقیقا 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 عکس‌برداری شدند.

نتایج و بحث

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

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

نتایج تجزیه پلاسمیدهای باکتری‌های سینوریزوبیوم ملیلوتی (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 بازآلی بودند. سنگین ترین پلاسمید در بین ۱۳ پلاسمید شناسایی شده با وزن مولکولی ۲۰۰ کیلوباز آلی در بین جدایه‌های سینوریزوبیوم (انسیفر) مشترک بود. با توجه به این‌که ژن‌های تشکیل گره و تثبیت نیتروژن معمولا در باکتری‌های سینوریزوبیوم ملیلوتی(انسیفر) بر روی پلاسمیدها قرار دارند (۸ و۱۷) و از طرف دیگر تمامی جدایه‌های مورد مطالعه در این آزمایش از گره‌های یونجه جدا شده بودند، بنابر این به احتمال قوی به‌نظر می‌رسد که این پلاسمید حاوی ژن‌های درگیر در فرآیند تشکیل گره و تثبیت بیولوژیکی نیتروژن باشد. قطعا اطمینان از صحت این ادعا به مطالعات هیبریداسیون نیاز دارد. موزو و همکاران (۱۱) نیز پلاسمید مشترک بین ۴۵ جدایه ریزوبیومی مورد مطالعه رابه‌عنوان پلاسیمید هم‌زیست Psym گزارش کردند. .

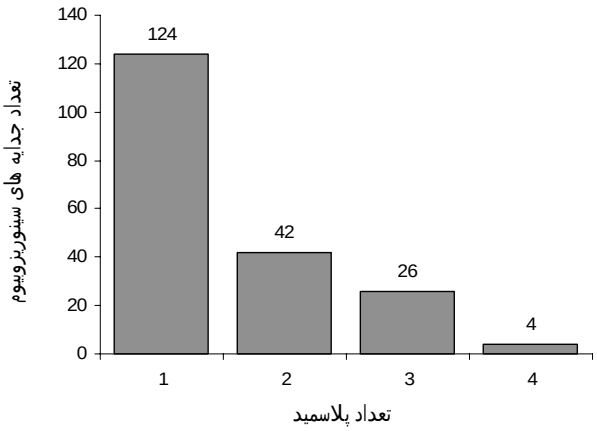


(شکل۱) - پروفیل پلاسمیدی ۱۶ جدایه‌های سینوریزوبیوم (انسیفر) جدا شده از خاکهای مناطق مختلف در استان همدان **جدایه MVII بعنوان شاخص برای برآورد اندازه تقریبی پلاسمیدها در ابتدا، انتها و وسط ژل قرار داده شده است.**

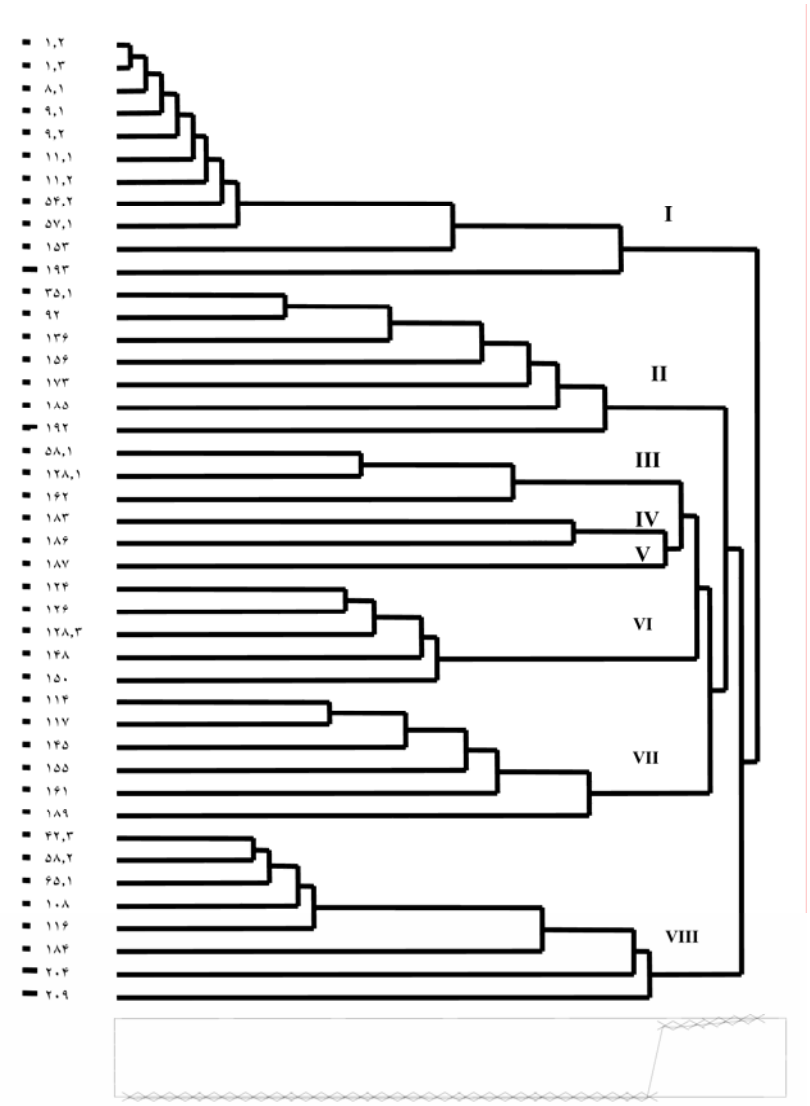
نکته جالب توجه در مطالعه تنوع پلاسمیدی در بین ۱۹۶ جدایه مطالعه شده این بود که ۱۲۴ جدایه سینوریزوبیوم (انسیفر) (۶۳درصد کل جدایه‌ها) فقط پلاسمید ۲۰۰ کیلو باز آلی را دارا بودند و ۲۱، ۱۳ و ۲ درصد دیگر جدایه‌ها به ترتیب ۲، ۳ و ۴ پلاسمید داشتند (شکل ۲).

۲۱ درصد از جدایه‌های سینوریزوبیوم ملیلوتی(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 سینوریزوبیوم ملیلوتی(انسیفر) (با دو پلاسمید) بر مبنای پروفیل‌های پلاسمیدی نشان داد که آن‌ها در ۸ گروه متفاوت قرار می‌گیرند (شکل۳).

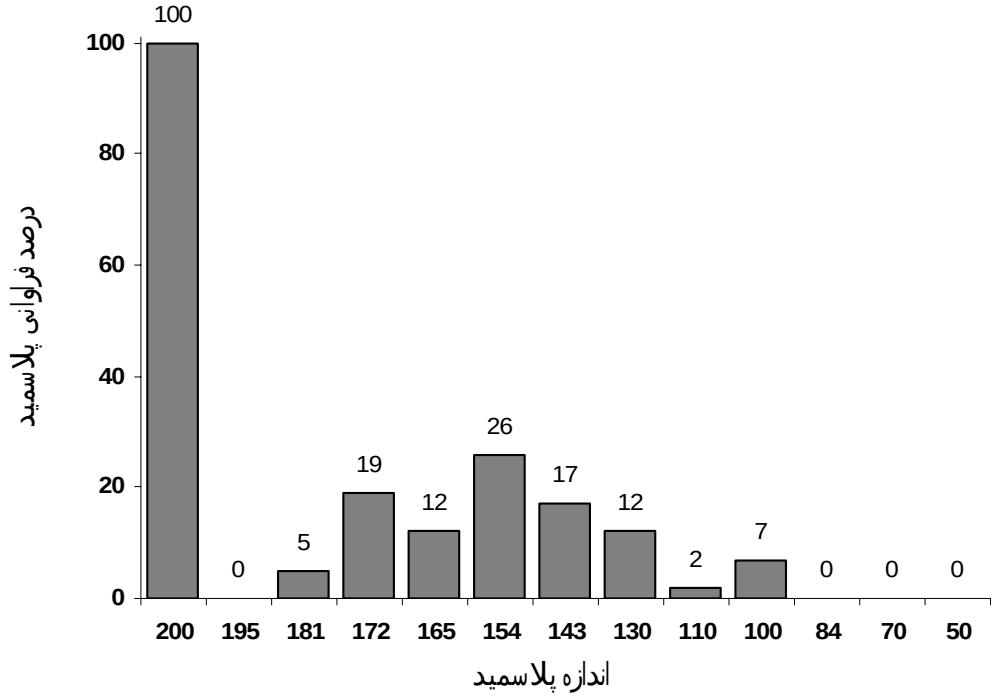
از بین ۴۲ جدایه سینوریزوبیوم ملیلوتی(انسیفر) که حاوی ۲ پلاسمید بودند ۲۶درصد آن‌ها پلاسمید ۱۵۴ کیلو بازی را دارا بودند و ۱۹, ۱۷, ۱۲, ۱۲, ۷, ۵, ۲ درصد آن‌ها به ترتیب پلاسمیدهای ۱۷۲, ۱۴۳, ۱۳۰, ۱۶۵, ۱۰۰, ۱۸۱, ۱۱۰ کیلو بازی را دارا داشتند. بنابر این فراوان ترین پلاسمید در بین جدایه‌های باکتریهای سینوریزوبیوم ملیلوتی (حاوی ۲ پلاسمید) به‌جز پلاسمید ۲۰۰ کیلو بازی، پلاسمید ۱۵۴ کیلو بازی بود و کمترین فراوانی پلاسمید در بین این جدایه‌ها متعلق به پلاسمید ۱۱۰ بود. (شکل۴) تغییرات اندازه پلاسمیدها را در بین جدایه‌های سینوریزوبیوم ملیلوتی حاوی ۲ پلاسمید را نشان می‌دهد.



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



(شکل۳) – گروه بندی جدایه‌های سینورزوبیوم ملیلوتی (دارای ۲ پلاسمید) جدا شده از خاک‌های مناطق مختلف استان بر مبنای الگوی پروفیل پلاسمیدی.



(شکل۴) توزیع فراوانی اندازه پلاسمیدها در بین جدایه‌های سینوریزوبیوم ملیلوتی (جدا شده از استان همدان) که دارای دو پلاسمید بودند

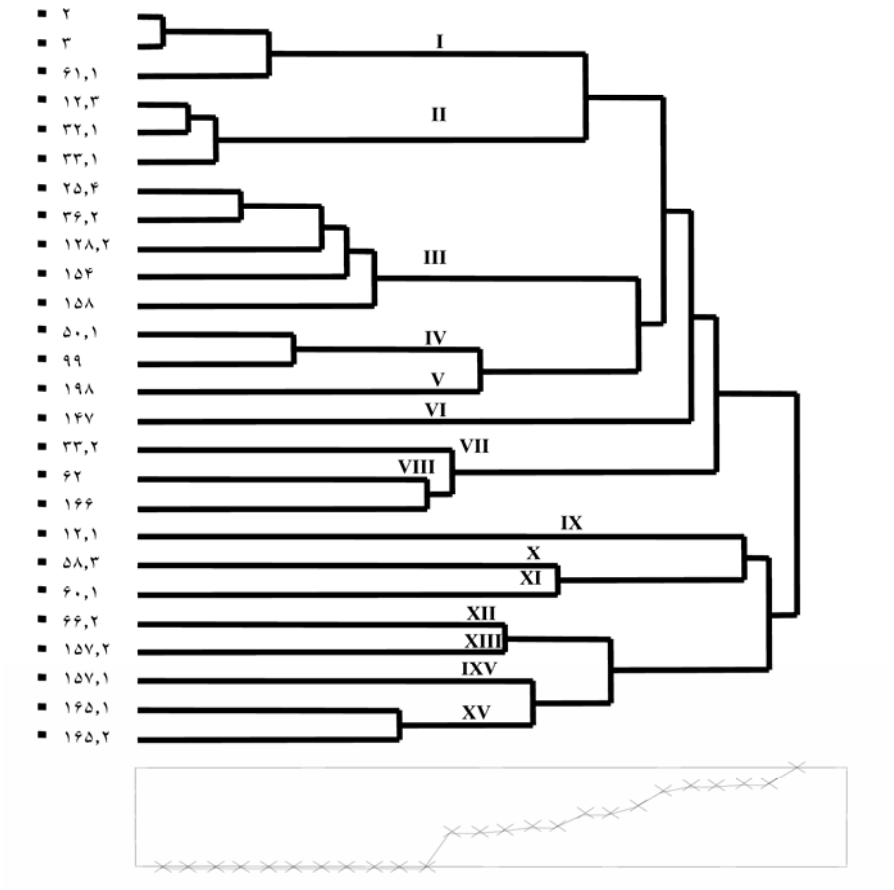
نتایج تجزیه پلاسمیدهای باکتری‌های سینوریزوبیوم ملیلوتی جدا شده از خاک‌های استان همدان نشان داد که ۱۳ درصد جدایه‌ها حاوی ۳ پلاسمید بودند. این جدایه‌ها علاوه بر داشتن پلاسمید ۲۰۰ کیلوبازی دارای دو پلاسمید دیگر نیز بودند. اندازه این دو پلاسمید بین ۵۰ تا ۱۸۱ کیلو باز متغیر بود. گروه بندی این جدایه‌ها بر مبنای پروفیل‌های پلاسمیدی نشان داد که این ۲۶ جدایه (۱۳درصد درصد کل جدایه‌ها) در۱۵گروه متفاوت قرار می‌گیرند (شکل ۵).

از بین ۲۶ جدایه سینوریزوبیوم ملیلوتی 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 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 ملیلوتی حاوی ۳ پلاسمید را نشان می‌دهد.

نتایج تجزیه پروفیل‌های پلاسمیدی جدایه‌های سینوریزوبیوم ملیلوتی 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 ملیلوتی حاوی ۴ پلاسمید در ۴ گروه مختلف قرار گرفتند. (شکل ۷) تغییرات

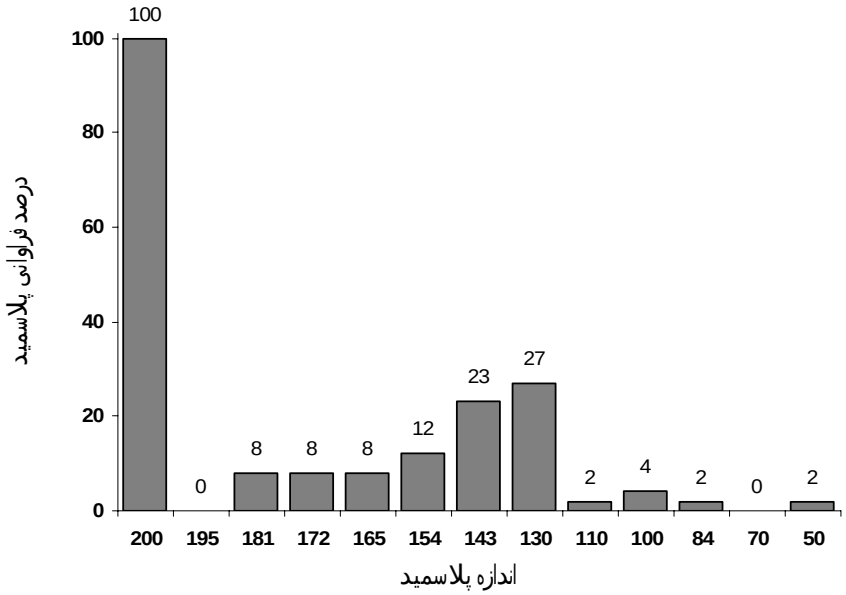
اندازه پلاسمیدها را در بین جدایه‌های سینوریزوبیوم ملیلوتی حاوی ۴ پلاسمید را نشان می‌دهد. نتایج حاصله از این آزمایش نشان داد که ارتباطی بین منشاء جغرافیایی این جدایه‌ها و پلاسیمدی وجود ندارد. این نتایج با یافته‌های موزو و همکاران(۱۱) نیز مطابقت داشت.



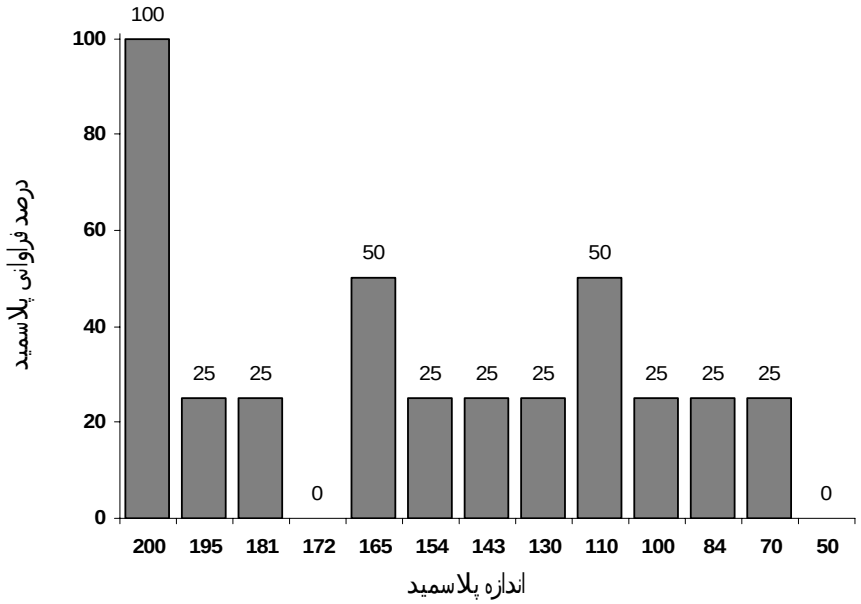
(شکل ۵) گروه بندی جدایه‌های سینورزوبیوم ملیلوتی (دارای ۲ عدد پلاسمید) جدا شده از خاک‌های مناطق مختلف استان بر مبنای الگوی پروفیل پلاسمیدی.

سپاسگزاری

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



(شکل۶) – نمودار توزیع تعداد پلاسمیدها در بین جدایه‌های سینوریزوبیوم ملیلوتی (جدا شده از استان همدان) که دارای سه پلاسمید بودند .



(شکل۷) – نمودار توزیع تعداد پلاسمیدها در بین جدایه‌های سینوریزوبیوم ملیلوتی (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 exopolysacharide 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. Asgharzadeh[1]

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 auther Email: alakzian @yahoo.com
1- Contribution from College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad- Water and Soil Research Institute of Teheran .