جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۶، شماره ۱، سال ۱۳۸۴ (۲۴۵-۲۳۹)

شناسایی پلاسمیدهای مشترک در بین باکتریهای ریزوبیوم با استفاده از تهیه خزانه ژن

امیر لکزیان
عضو هیئت علمی گروه خاکشناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
تاریخ پذیرش مقاله ۸۲/۱۰/۳

خلاصه

جداکردن ژنوم پلاسمیدی از ژنوم کروموزومی در باکتریهای ریزوبیوم حاوی مگاپلاسیمد با روشهای معمول آزمایشگاهی بسیار مشکل است. اما با تهیه خزانه ژن و انجام تکنیک هیبریداسیون امکان جدا سازی ژنوم پلاسمیدی و مطالعه پلاسمیدهای مشترک در بین سویه‌های مختلف باکتریهای ریزوبیوم امکان پذیر می‌گردد. در این مطالعه پروفیلهای پلاسمیدی ۲۰۰ سویه ریزوبیوم لگومینوزارم بیوار ویسیه تهیه و سپس پروفیلهای پلاسمیدی متفاوت آنها با کاوشگرهای پلاسمیدی حاصله از خزانه ژن سویه ۷۱۳۱ مطالعه شدند. نتایج بدست آمده نشان داد که ۷ سویه ریزوبیوم لگومینوزارم بیوار ویسیه جدا شده از مناطق آلوده با فاضلاب شهری با سویه ۷۱۳۱ دارای پلاسمید مشترک بودند. بقیه سویه‌های جدا شده از مناطق بدون آلودگی یا با آلودگی، فاقد پلاسمید مشترک بودند. بنابراین با ساخت خزانه ژن می‌توان پلاسمیدهای مشترک بین سویه‌های ریزوبیوم و نقش آنها را در سلول مطالعه کرد.

واژه‌های کلیدی: ژن خزانه ژن، پروفیل پلاسمید، ریزوبیوم

مقدمه

مواد ژنتیکی در باکتریهای ریزوبیوم همانند سایر باکتریها بصورت کروموزوم و پلاسمیدها است. بسیاری از باکتریها دارای یک یا چند پلاسمید می‌باشند. پلاسمیدها در حقیقت قطعات حلقوی DNA هستند که معمولا بسیار کوچکتر از کروموزومها بوده و می‌توانند بطور مستقل تکثیر شوند. پلاسمیدها در باکتریها نقش‌های بسیار زیادی ایفا می‌کنند (۱۰). گستره اندازه پلاسمیدها بین ۱۵۰-۱۵۰۰ هزار جفت باز می‌باشد (۱۱). در بعضی موارد پلاسمیدهای بزرگ می‌توانند تکرار پلاسمیدهای کوچک باشند که این حالت برای افزایش تاثیر ژن در سلول می‌باشد. در بسیاری از سویه‌های باکتریهای ریزوبیوم ژن‌های تشکیل گره، انتخاب گیاه میزبان و تثبیت ازت بر روی پلاسمیدها (pSym) قرار گرفته‌اند. از طرفی نقش بسیاری از پلاسمیدهای کریپتیک (Cryptic plamsid) در سلولها شناخته نشده است ولی مطالعات نشان داده است که حضور آنها در جمعیتهای بومی در زنده ماندن باکتریها تأثیر دارد (۷). محققین معمولا با خارج کردن پلاسمیدها از سلول (Curing) و انتقال آن به سلولهای دیگر نقش پلاسمیدها را مطالعه می‌کنند. بیشتر پلاسمیدها در باکتریهای ریزوبیوم فوق‌العاده پایدار هستند و امکان خارج ساختن و انتقال آنها به سویه‌های دیگر بسیار مشکل است. پایداری و ماندگاری پلاسمیدهای کریپتیک و پلاسمیدهای درگیر در فرآیند تثبیت ازت در باکتریهای ریزوبیوم فازئولی بعد از ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ نسل مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۲). نتایج این تحقیق نشان داده است که این پلاسمیدها ماندگاری بسیار زیادی در سلول داشته‌اند. شاید به همین دلیل است که محققین تغییر در مواد ژنتیکی باکتریهای حاوی پلاسمیدهای بزرگ را بسیار ناچیز دانسته‌اند (۶). بنابراین انجام مطالعات ژنتیکی بر روی ژنوم پلاسمیدی بدلیل بزرگی آنها بسیار مشکل است. از طرف دیگر امکان جدا کردن مگاپلاسمیدها با استفاده از گرادیان کلرید سزیم عملی

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

نمی‌باشد. زیرا مگاپلاسمیدهایی با ۱۵۰۰ هزار جفت باز (۸) را نمی‌توان از ژنوم کروموزومی بسهولت جدا کرد. استفاده از آگاروز ۰/۴ تا ۰/۶ درصد و استفاده از ولتاژهای بالا در تکنیک الکتروفورز برای تهیه پروفیل پلاسمیدهای باکتریهای ریزوبیوم نیز خود گواه دیگری بر بزرگی اندازه مگاپلاسمیدها می‌باشد (۴). از سوی دیگر تعداد کپی کم مگاپلاسمیدها در داخل سلول و غلظت کم DNA در ژلهای پروفیلهای پلاسمیدی، امکان استخراج DNA پلاسمیدی از ژل را نیز با استفاده از روشهای معمول با مشکل روبرو می‌سازد. با ساخت خزانه ژن از سویه‌های ریزوبیوم می‌توان به قطعات نسبتا بزرگ پلاسمید بسته به نوع حامل استفاده شده دست یافت. به این ترتیب امکان مطالعه پلاسمیدها و نقش آنها در سلول و همچنین مطالعه پلاسمیدهای مشترک در بین سویه‌های باکتریهای ریزوبیوم فراهم می‌شود.

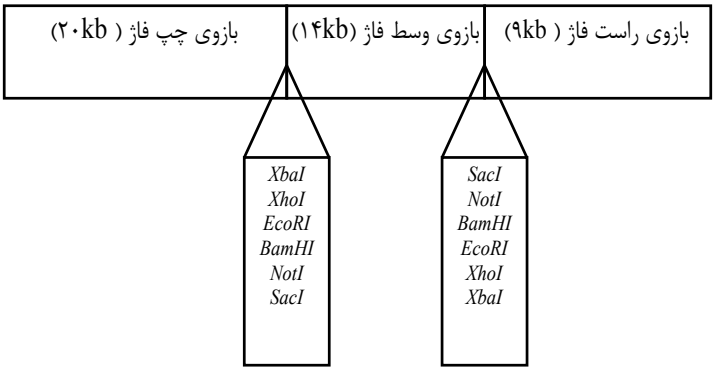
هدف از این مطالعه، جدا کردن کاوشگرهای پلاسمیدی از ژنوم باکتریهای ریزوبیوم بود: که با داشتن این کاوشگر امکان شناسایی پلاسمیدهای مشترک در بین جمعیت‌های بومی سویه‌های باکتری ریزوبیوم فراهم می‌گردد که این امر خود گامی بسوی درک ویژگی اعطاء شده از پلاسمید به سویه حامل آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

دویست سویه باکتری ریزوبیوم لگومینوزاروم بیوار ویسیه جدا شده از گره‌های گیاه ماشک مناطق آلوده و غیر آلوده به فاضلاب برای این مطالعه انتخاب شدند. برای تهیه پروفیل پلاسمیدی این سویه‌ها از روش اکارت استفاده شد (۵). با مقایسه پروفیلهای پلاسمیدی، ۲۵ سویه ریزوبیوم لگومینوزارم بیوار ویسیه با پروفیلهای پلاسمیدی متفاوت انتخاب شدند (۲). سپس غالبترین سویه باکتری ریزوبیوم لگومینوزاروم بیوار ویسیه (۷۱۳۱) با ۸ پلاسمید که از محلهای آلوده با فاضلاب جدا شده بود، برای ساختن خزانه ژن انتخاب شد.

خزانه ژن

حامل Lambda GM-12 برای ساختن خزانه ژن استفاده شد. بازوی چپ و راست حامل (vector) بترتیب دارای ۲۰ و ۹ هزار جفت باز و قطعه وسط فاژ دارای ۱۴هزار جفت باز بود. معمولا همین قطعه توسط قطعات DNA مورد نظر جایگزین می‌شود. بزرگی قطعه وسط این حامل دلیل برتری و انتخاب این حامل نسبت به سایر فاژها و حاملهای پلاسمیدی دیگر می‌باشد. آنزیمهای *SacI, NotI, BamHI, EcoRI, XhoI, XbaI* قادر به برش قطعه وسط این حامل می‌باشند.



در این مطالعه بازوهای راست و چپ این حامل با آنزیم *XhoI* برش داده شده و سپس برای جلوگیری از الحاق مجدد، واکنش فیلینگ با آنزیمKelnow و بافر حاوی بازهای dTTP, dCTP بر روی آن انجام شد (۹).

استخراج و هضم DNA

روش کلرید سزیم برای استخراج DNA سویه (۷۱۳۱) ریزوبیوم لگومینوزاروم بیوار ویسیه استفاده شد تا کیفیت بسیار خوبی از DNA حاصل گردد. غلظت DNA حاصله که مجموع DNA کروموزومی و پلاسمیدی را تشکیل می‌داد با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. سه میکرولیتر از DNA (۱ میکروگرم) برای هضم جزئی DNA با رقتهای مختلف آنزیم *Sau3AI* در ۳۷ درجه سانتیگراد بمدت ۳۰ دقیقه مورد استفاده قرار گرفت. نهایتا پس از انجام الکتروفورز بهترین غلظت آنزیم *Sau3AI* برای تولید قطعاتی تقریبا مساوی قطعه وسط فاژ حامل تعیین گردید. بمنظور جلوگیری از اتصال مجدد قطعات DNA هضم شده، واکنش فیلینگ (۳۳ میکرو لیتر DNA، ۵ میکرولیتر بافر حاوی dATP, dGTP، ۱۰ واحد آنزیم Kelnow و ۱۰ میکرولیتر آب در ۳۷ درجه سانتیگراد بمدت ۳۰ دقیقه) انجام شد. پس از انجام واکنش، نمکهای اضافی DNA با روش معمول فنل - کلروفورم، استات آمونیوم و اتانول

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

خارج و با تهیه سوسپانسیون مجدد، DNA آماده واکنش اتصال شد.

اتصال قطعات DNA به بازوهای حامل Lambda GM-12

فرآیند اتصال در دو حالت متفاوت با نسبت اجزاء برابر جدول ۱ انجام شد.

جدول ۱- اتصال قطعات DNA به فاژ Lambda با دو غلظت متفاوت از DNA

اجزاء واکنش	واکنش ۱(µL)	واکنش ۲(µL)
حامل Lambda GM-12 (۰/۵µg/µL)	۲	۲
DNA هضم شده	۳	۱
بافر	۱	۱
آب	۳	۱
لیگاز T4DNA	۱	۵
حجم کل	۱۰	۱۰

پوشش دادن به فاژ

برای ایجاد پوشش در فاژ ۵۰ میکرولیتر عصاره مخصوص و ۱۰ میکرولیتر از DNA متصل شده به فاژ برای مدت سه ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. و سپس ۴۱۵ میکرولیتر از بافر فاژ و ۲۵ میکرولیتر کلروفرم به واکنش اضافه و به آرامی مخلوط شدند.

تیتر کردن فاژ

سری رقت از فاژ و بافر فاژ تهیه شد. صد میکرولیتر از هر سری رقت با ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون *E. coli* به آرامی مخلوط و بمدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شد. ۳ میلی‌لیتر آگاروز ذوب شده (۴۵ درجه سانتیگراد) حاوی تریپتون، کلرید سدیم و عصاره مخمر به هر یک از رقتهای فاژ اضافه و بر روی محیط کشت LB پخش و بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شد. تعداد پلاکهای حاصله شمارش گردید.

جداسازی DNA از فاژ کلن شده

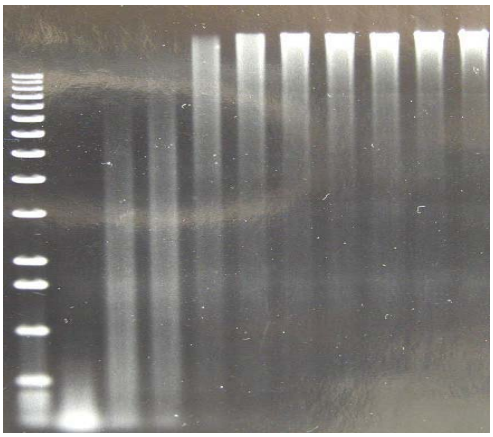
فاژهای کلن شده بطور جداگانه در محیط کشت LB (کلریدسدیم، تریپتون و عصاره مخمر) که حاوی باکتری *E. coli* (LE392) بودند، تکثیر و سپس DNA فاژ با روشهای استاندارد جدا شد.

سوترن بلات

انجام مطالعات هیبریداسیون و مراحل مختلف تکنیک سوترن بلات قبلا توسط لکزیان (۱۳۷۸) شرح داده شده است.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از هضم DNA سویه ۷۱۳۱ نشان داد که غلظت ۱، ۰/۱، و ۰/۰۵ واحد آنزیم *Sau3AI* کاملا ژنوم مورد نظر را هضم کرد که وجود قطعات کوچک DNA هضم شده در شکل ۱ گواه این موضوع می‌باشد. واحدهای کمتر آنزیم *Sau3AI* بخاطر رقت زیاد آنزیم نتوانستند DNA سویه مورد نظر را هضم کنند که وجود DNA در چاهک‌های سمت راست ژل این موضوع را نشان می‌دهد (شکل ۱). غلظت ۰/۰۱۲۵ واحد از آنزیم *Sau3AI* برای هضم ۱میکروگرم DNA کافی بود. اما برای داشتن قطعاتی به اندازه ۲۳-۱۵ هزار جفت باز ۱۰ میکروگرم DNA با ۰/۰۶۲۵ واحد از آنزیم هضم شد. کاهش مقدار آنزیم به نصف مقدار حاصله از آزمایش در دستورالعمل تهیه خزانه ژن توصیه شده بود. پس از هضم DNA و ساخت خزانه ژن، تیتراسیون خزانه ژن تهیه شده از کل ژنوم سویه ۷۱۳۱ انجام شد.

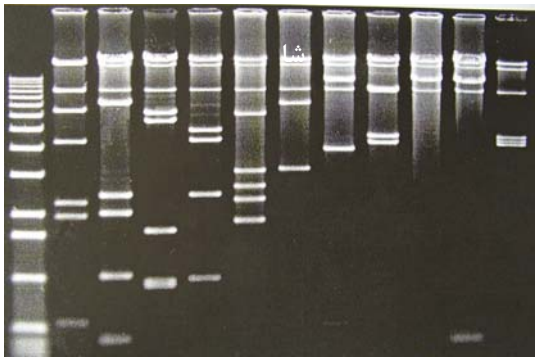


شکل ۱ - بهینه کردن شرایط هضم ژنوم سویه ۷۱۳۱ بمنظور حصول اندازه مناسب قطعات DNA برای کلن شدن به فاژ حامل (از چپ به راست غلظت آنزیم *Sau3AI* عبارت است از ۱، ۰/۱، ۰/۰۵، ۰/۰۲۵، ۰/۰۱۵، ۰/۰۱۲۵، ۰/۰۱، ۰/۰۰۸، ۰/۰۰۵ و ۰/۰۰۳۵ واحد آنزیم برمیکروگرم DNA)

نتایج حاصل از تیتراسیون خزانه ژن نشان داد که در دو تکرار جداگانه بترتیب تعداد ۹۰۰۰ و ۱۲۰۰۰ پلاک (Plaque) تشکیل شده است. از آنجائیکه خزانه ژن باید حاوی تمام ژنوم موجود مورد مطالعه باشد بنابراین اطمینان از حضور تمام ژنوم موجود زنده در خزانه ژن اولین شرط اعتبار خزانه ژن است. بهمین

دلیل محققین با ارائه فرمولی نشان داده‌اند که چه تعداد کلن برای ساختن یک خزانه ژن ضروری است. در این مطالعه فرمول $N = Ln (1-P) / Ln(1-a / b)$ برای این منظور استفاده شد. N تعداد کلن مورد نیاز، P سطح احتمال ۹۵٪ ، a متوسط اندازه قطعه کلن شده و b اندازه کل ژنوم موجود است (۳). با توجه به فرمول فوق و با مراجعه به اندازه ژنوم متوسط باکتریها (۵۷۰۰ هزار جفت باز) می‌توان محاسبه کرد که حدود ۱۰۰۰۰ کلن با قطعات ۹ هزار جفت باز قادر است که کل ژنوم باکتری را مطمئنا پوشش دهد. بنابراین با توجه به تیتراسیون انجام شده، می‌توان به درجه اعتبار خزانه ژن ساخته شده اطمینان داشت.

بمنظور مطالعه خصوصیات خزانه ژن و اطمینان از مناسب بودن خزانه ژن، ۱۰ فاژکلن شده بطور تصادفی انتخاب، تکثیر و DNA آنها استخراج و خالص سازی شدند. از آنجائیکه پس از کلن کردن قطعات DNA بر روی فاژ محل برشی با آنزیم *BamHI* باقیمانده بود، فاژهای کلن شده با آن آنزیم هضم شدند. نتایج نشان داد که ۱۰ قطعه کلن شده بر روی فاژ از نظر اندازه و ردیف بازهای آلی کاملا متفاوت بودند (شکل۲). اندازه قطعات کلن شده بین ۱۷-۹ هزار جفت باز بود. همچنین پلی‌مورفیسم حاصله از هضم DNA با آنزیم *BamHI* نشان داد که قطعات کلن شده نیز با یکدیگر تفاوت داشتند. دو باند مشترک در همه فاژهای کلن شده نیز نمایانگر بازوهای چپ و راست فاژ هستند که به ترتیب حاوی ۲۰ و ۹ هزار جفت باز بودند. ضمنا بزرگترین باند مشترک در تمام ستونهای شکل ۲ بدلیل الحاق مجدد دو بازوی چپ و راست فاژ lambdaGM-12 می‌باشد. بنابراین نتایج نشان داد که قطعات کلن شده از تنوع خوبی برخودار بوده و خزانه ژن تهیه شده از مقبولیت خوبی برخودار است و می‌تواند برای مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گیرد.



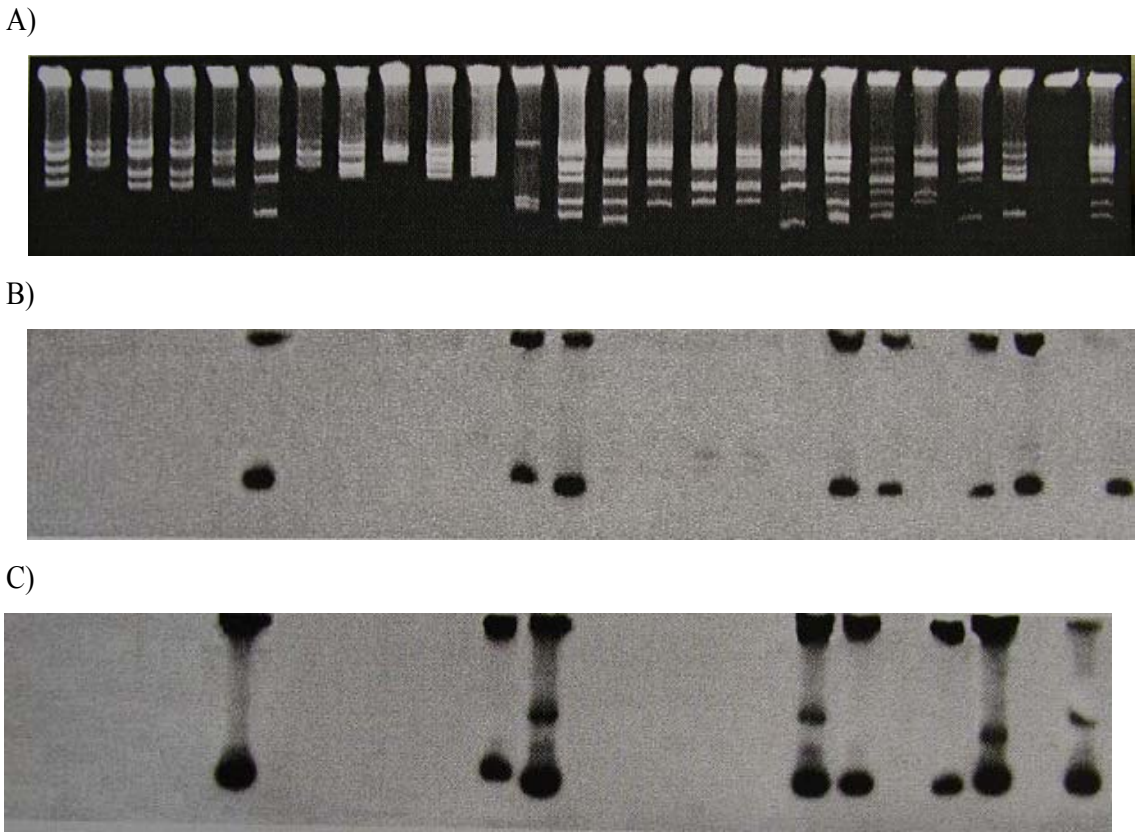
شکل ۲- پلی مورفیسم ۱۰ قطعه DNA کلن شده از سویه ۷۱۳۱ به فاژ Lambda GM-12. اولین و دومین ستون از سمت چپ شاخص می‌باشند. ده ستون بعدی ۱۰ قطعه DNA کلن شده به فاژ را نشان می‌دهد. قطعات DNA با آنزیم *BamHI* بریده شده است. باند های ۲۳و ۹ هزار جفت باز نمایانگر بازوهای راست و چپ فاژ هستند.

بمنظور پیداکردن کاوشگرهای پلاسمیدی لازم بود تا ابتدا قطعات DNA کلن شده از فاژ جدا شوند و سپس با انجام هیبریداسیون این قطعات شناسایی شوند. انجام این کار بسیار وقت گیر بود. اما خوشبختانه با انجام هیبریداسیون DNA خالص فاژ با ژنوم باکتری معلوم شد که تشابهی بین ردیف بازهای آلی فاژ و ژنوم باکتری وجود ندارد. عدم هیبرید شدن DNA فاژ با ژنوم باکتری خود گواه این موضوع بود. همچنین بمنظور اطمینان از انتقال ژنوم پلاسمیدی به غشای نیتروسلولزی، پروفیل پلاسمیدهای دو سویه با استفاده از تکنیک سوترن بلات به غشاء نیتروسلولزی منتقل و سپس عمل هیبریداسیون با یکی از ژنهای تثبیت ازت (*nifH*) انجام شد. نتایج نشان داد که اولا سویه‌های انتخاب شده همه دارای ژن مورد نظر بودند و ثانیا انتقال قطعات بزرگ پلاسمیدی به غشاء نیتروسلولزی نیز صورت گرفته است.

بدنبال این نتایج تعداد ۵۰ هیبریداسیون بین DNAهای کلن شده در فاژ و پروفیل پلاسمیدی سویه ۷۱۳۱ که خزانه ژن از ژنوم سویه تهیه شده بود، انجام شد. در بیشتر موارد DNA کلن شده با DNA کروموزومی که معمولا در چاهک ژلهای پروفیلهای پلاسمیدی باقی می‌ماند هیبرید می‌شدند. این موضوع خارج از انتظار نبود زیرا DNA کروموزومی حجم بیشتری از ژنوم باکتری را تشکیل می‌دهد. نهایتا با تکرار

هیبریداسیون دو کلن شناسایی شدند که با کوچکترین پلاسمید سویه ۷۱۳۱ هیبرید شدند. این قطعات پلاسمیدی کلن شده ۱۱ و ۱۲ هزار جفت باز داشتند و تحت عنوان کاوشگرهای پلاسمیدی ۳ و ۳۸ نامگذاری شدند. این کاوشگرهای پلاسمیدی برای مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

پس از حصول این نتایج، ۲۳ سویه ریزوبیوم لگومینوزارم بیوار ویسیه با پروفیل پلاسمیدهای متفاوت در ژل جداگانه‌ای تهیه شدند. پروفیل پلاسمیدها با تکنیک سوترن بلات به غشاء نیتروسلولز منتقل و سپس با کاوشگر پلاسمیدی ۳ و ۳۸ که قبلا با غربال کردن خزانه ژن شناسایی شده بودند هیبرید شدند. نتایج حاصله در شکل۳ نشان داده شده است.



شکل ۳- پروفیلهای پلاسمیدی۲۳ سویه ریزوبیوم لگومینوزرام بیوار ویسیه(A) (اولین ستون سمت راست پروفیل پلاسمید سویه ۷۱۳۱را نشان می‌دهد). هیبریداسیون پروفیلهای پلاسمیدی سویه‌های مختلف را به ترتیب با کاوشگرهای پلاسمیدی۳ (B) و ۳۸ (C) را نشان می دهد.

اولین پروفیل پلاسمیدی از سمت راست شکل ۳ (A) سویه ۷۱۳۱ را نشان می‌دهد که خزانه ژن از ژنوم آن تهیه شده است. بیست و سه پروفیل پلاسمیدی بعدی، گروههای متفاوت پلاسمیدی را نشان می‌دهند که در بین ۲۰۰ سویه ریزوبیوم لگومینوزارم بیوار ویسیه وجود داشتند. نتایج نشان می‌دهد که ۷ سویه از بین ۲۳ سویه با کاوشگرهای پلاسمیدی ۳ و ۳۸ هیبرید شده‌اند. بنابراین از نتایج حاصله چنین نتیجه‌گیری می‌شود که اولا دو کاوشگر شناسایی شده از خزانه ژن متعلق به کوچکترین پلاسمید سویه ۷۱۳۱ می‌باشند و ثانیا کوچکترین پلاسمید سویه ۷۱۳۱ حداقل در بین ۶ سویه دیگر نیز وجود دارد. نکته قابل توجه این است که پلاسمیدهای شش سویه که با کاوشگر پلاسمیدی هیبرید شده‌اند با کوچکترین پلاسمید سویه ۷۱۳۱ از لحاظ اندازه برابر بودند. اما پلاسمید یکی از

سویه‌ها (سویه شماره ۱۴ از سمت راست) از لحاظ اندازه متفاوت بود. بنابراین می‌تـــوان
گفت که این پلاسمید از لحاظ ردیف بازهای آلی با کوچکترین پلاسمید سویه ۷۱۳۱ داری تشابه می‌باشد. نکته قابل توجه دیگر این است که تمام سویه‌هایی که دارای پلاسمید مشترک بودند از مناطق آلوده با فاضلاب شهری جدا شده بودند و سویه‌های مناطق غیر آلوده یا مناطق با آلودگی کم فاقد این پلاسمید بودند. بنابراین بنظر می‌رسد که احتمالا این پلاسمید ویژگی خاصی را به سویه‌های حامل منتقل کرده است که احتمالا امکان بقاء و پایداری سویه‌ها را در داخل خاکهای آلوده به فلزات سنگین که از افزودن فاضلابهای شهری به خاکهای مورد آزمایش حاصل شده افزایش می‌دهد. البته اثبات این موضوع با انجام آزمایشات دیگر باید مورد مطالعه و بررسی بیشتری قرار گیرد.

سپاسگزاری

از همکاری پرسنل محترم بخش ژنتیک مولکولی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تشکر می‌کنم.

مراجع مورد استفاده REFERENCES

۱. لکزیان. الف. ۱۳۷۸ .انتقال پلاسمید بین سویه‌های ریزوبیوم لگومینوزارم بیوار ویسیه در خاکهای آلوده به فاضلاب. مجله پژوهش کشاورزی. شماره۱. جلد۱.

۲. لکزیان. الف. ۱۳۷۸. تاثیر دراز مدت کاربرد فاضلاب شهری بر تنوع پلاسمیدها در سویه‌های ریزوبیوم لگومینوزارم بیوارویسیه. مجله علمی ـ پژوهشی. علوم و صنایع کشاورزی. جلد۱۳ . شماره۱.

3. Brown, T. A. 1991. Gene Cloning, Chapman & Hall, London.

4 .Casse, F., C. Boucher, J. S. Julliot, M. Michel, & J. Dnari. 1979. Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. *Journal of General Microbiology* 113, 229-242.

5. Eckhardt, T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 1, 584-588

6. Martínez-Romero, E. & J. Caballero-Mellado. 1996. *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Critical Reviews in Plant Sciences* 15, 113-140.

7.Mercado-Blanco, J. & N. Toro. 1996. Plasmids in rhizobia: The role of nonsymbiotic plasmids. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9, 535-545.

8. Mozo, T., E. Cabrera, & T. Ruiz-Argueso. 1988. Diversity of plasmid profile and conservation of symbiotic nitrogen fixation genes in newly isolated *Rhizobium* strains nodulating Sulla (*Hedysarum coronarium* L.). *Applied and Environmental Microbiology* 54, 1262-1267.

9 .Promega Corporation. 1995. Genomic cloning manual. Printed in USA. Singelton, P. (1995). Bacteria in biology ,biothechnology and mediciene.Jhon Wiley &Son.New York.

10.Singelton, P. 1995. Bacteria in biology, biotechnology and medicine. Jhon Wiley & Son, Chichester, New York.

11.Tichy, H. V. & W. Lotz. 1981. Identification and characterization of large plasmids in newly isolated strains of *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology Letters* 10, 203-207.

12. Weaver, R. W., G. R. Wei, & D. L. Berryhill. Satbility of plasmids in Rhizobiu phaseoli during culture. Soil biology and Biochemistry. 22. 4: 456-469.

Iranian, J. Agric. Sci. Vol. 36, No. 1, 2005

An Identification of Common Plasmid Among Rhizobial Bacteria through Making a Gene Library

A. LEKZIAN
Scientific Member, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
Accepted. Dec. 24, 2003

SUMMARY

Separation of plasmid genom from chromosomal genom among rhizobial bacteria containing megaplasmids is very difficult. It is possible to separate plasmid genom and study common plasmids among bacteria through making a gene library, and using hybridization technique. In this study 200 isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* were isolated from different areas and characterized by their plasmid profile patterns. Different plasmid profiles were studied by plasmid probes which had been detected from gene library. The results of hybridization technique showed that strain 7131 and 7 isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolated form sewage sludge contaminated area had common plasmid. Isolates from noncontaminated aera didn't have any common plasmid. This indicates that making gene library is a good technique in these kinds of studies.

Key words: Gene library, Plasmid profiles, *Rhizobium*