مجله علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۴، شماره ۱، ۱۳۹۲ (۹۳-۸۵)

پراکنش جدایه‌های سینوریزوبیومی تولید کننده ملانین همزیست با یونجه در مناطق غرب و شمال غربی ایران

مجید طالبی[1*]، مسعود بهار[2] و قدرت الله سعیدی[2]
۱، ۲، ۳، استادیار، دانشیار و استاد دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
(تاریخ دریافت : ۹۰/۸/۱۰- تاریخ تصویب : ۹۱/۹/۲۹)

چکیده

به منظور تعیین پراکنش سینوریزوبیوم‌های تولید کننده ملانین همزیست با یونجه در نواحی غرب و شمال غربی ایران، تعداد ۹۸۲ جدایه از سینوریزوبیومهای همزیست با دو جمعیت یونجه داخلی (همدانی و نیک شهری) و یک جمعیت خارجی (کودی)، در هشت خاک جمع آوری شده از استانهای کردستان، کرمانشاه، آذربایجان شرقی و کردستان، انتخاب شدند که از بین آنها تعداد ۲۳۷ جدایه (۲۴/۱٪) توانایی تولید ملانین را داشتند. نتایج نشان داد که تفاوت خاک‌های مناطق مختلف در تعداد سوش‌های تولید کننده ملانین بیشتر از تفاوت ارقام مختلف یونجه است. بنابراین، چنین استنباط می‌شود که تأثیر نوع خاک مزرعه در غالبیت جدایه‌های تولید کننده ملانین بیشتر از نوع رقم میزبان است. تکثیر نوار ۴۵۶ جفت بازی به وسیله آغازگرهای طراحی شده از ژن *mepA* در ۳۰ جدایه ریزوبیومی و عدم تکثیر در ۲۰ جدایه دیگر و تطابق آن با نتایج حاصل از تولید ملانین در محیط کشت، نشان داد که همه جدایه‌های تولید کننده ملانین حاوی ژن تولید کننده آنزیم تیروزیناز هستند. بررسی توالی‌های نوکلئوتیدی نشان داد که توالی ژن *mepA* در *S. meliloti* حفاظت شده است اما در گونه *S. medicae*، این توالی با تغییرات محدودی روبروست.

واژه های کلیدی : **یونجه، سینوریزوبیوم، ملانین، تیروزیناز، ایران**

مقدمه

یکی از ویژگی های مهم گیاهان خانواده لگوم مانند یونجه، توانایی آنها در همزیستی با باکتری های تثبیت کننده نیتروژن می باشد. همزیستی اختصاصی بین یک گونه خاص باکتری ریزوبیوم و گونه مشخصی از لگوم با مبادله سیگنالهای پیچیده ملکولی آغاز می شود و باکتری پس از ورود به داخل ریشه، گره هـایـی ایجاد می کند که در داخل این گره ها عملیات تثبیت بیولوژیکی نیتروژن انجام می گیرد (Denarie et al., 1996). خصوصیات ویژه نژاد ریزوبیومی از نظر قدرت تحرک، سرعت رشد، سرعت کلونیزه شدن در ریزوسفر و ماندگاری بیشتر در خاک برای گره سازی در ریشه گیاهان از اهمیت زیادی برخوردار است. نژادهایی که پایداری بیشتر در خاک داشته باشند و با سرعت بیشتری گره سازی نمایند در رقابت با سایر ریزوبیوم های ریزوسفر موفق تر عمل خواهند کرد (de Oliveira & Graham, 1990). ویژگی های رقابتی و پایداری ریزوبیوم ها توسط بعضی ژنها کنترل می شودکه بیان این ژنها در بهبود توان ماندگاری آنها و پیشی گرفتن از سایر نژادهای ریزوبیومی برای گره سازی نقش اساسی دارد. در بین این ژن ها می توان به ژنهای تولید کننده ملانین اشاره کرد که یک مزیت رقابتی در گره سازی

* نویسنده مسئول: مجید طالبی تلفن: ۰۳۱۱۳۹۱۳۳۴۵ E-mail: mtalebi@cc.iut.ac.ir

برای نژادهای تولید کننده آن فراهم می نماید (Castro et al., 2000).

ملانین رنگدانه ای قرمز تا قهوه ای رنگ است که بوسیله حیوانات،گیاهان، قارچها و باکتری‌ها تولید می‌شود (Henson et al., 1999). این ماده با پلیمریزاسیون اکسیداتیو ترکیبات پلی‌فنولی و با استفاده از آنزیم‌های تیروزیناز (Tyrosinase) یا لکاز (Laccase) سنتز می‌شود. تیروزینازها به دو صورت Monophenol monooxygenase و *o*-diphenol:oxygen-oxidoreductase عمل می‌نمایند، در حالی که لکاز فقط فعالیت *p*-diphenol:oxygen oxidoreductase دارد (Sanchez-Navarro et al., 2000; Thurston, 1994).

مشخص شده است که توانایی تولید ملانین برای موجودات زنده سودمندی‌هایی دارد که مقاومت در برابر تابش اشعه ماوراء بنفش و نور مرئی (Hill, 1992)، حفاظت سلول‌ها در برابر شرایط اکسید اسیون - احیا و فعالیت ضد میکروبی (Montefiori & Zhou, 1991)، مقاومت در برابر حمله آنزیم های تخریب کننده دیواره سلولی (Kuo & Alexander, 1967) و افزایش ماندگاری و توانایی رقابت در شرایط تنش (Nosanchuk & Casadevall, 2003) از جمله آنهاست. همچنین، تولید ملانین در قارچ های بیمارگر گیاهی و جانوری ، به دلیل افزایش مقاومت آنها به مکانیزم‌های دفاعی میزبان (Nosanchuk & Casadevall, 2003; Salas et al., 1996) و نقش آن در هضم لیگنین (Hatakka, 1998) اهمیت زیادی دارد. تاکنون تولید ملانین در جنس‌های مختلف باکتریایی *Aeromonas*، *Azospirillum*، *Azotobacter*، *Bacillus*، *Legionella*، *Micrococcus*، *Mycobacterium*، *Proteus*، *Pseudomonas*، *Rhizobium*، *Sinorhizobium*، *Shewanella*، *Streptomyces* و *Vibiro* گزارش شده است (Wang et al., 2000; Claus & Decker, 2006).

تولید ملانین در *R. leguminosarum* bv. phaseoli باعث سم زدایی ترکیبات فنلی در گره ها و ریشه های مسن گیاه لوبیا می شود (Borthakur et al., 1987; Cubo et al., 1988) و همچنین به عنوان یک مکانیزم جایگزین در حفاظت از آنزیم نیتروژناز در برابر اکسیژن در باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن جنس *Azotobacter* معرفی شده است (Shivprasad & Page, 1987).

تولید ملانین در باکتری *S. meliloti* GR4 به بیان ژن تیروزیناز نسبت داده می‌شود (Nosanchuk & Casadevall, 2003). حدس بر این است که علاوه بر تیروزیناز، آنزیم دیگری به نام لکاز نیز در تولید ملانین در *S. meliloti* نقش داشته باشد (Castro-Sowinski et al., 2002). آنزیم تیروزیناز، که در اکسیداسیون تیروزین نقش دارد، به وسیله ژن ساختمانی *mepA* کد می‌شود که به نظر می‌رسد این ژن در سوش‌های *S. meliloti* بصورت حفاظت شده باشد. ژن *mepA* شباهتی با ژن‌های *mel* در *R. leguminosarum* bv. phaseoli یا *R. leguminosarum* bv. viceae ندارد. ژن *melA* در *R. leguminosarum* در پلاسمید p*Sym* واقع شده و نسخه برداری از آن تحت شرایط بی‌هوازی به وسیله ژن تنظیمی *nifA* کنترل می شود (Borthakur et al., 1987) ، در حالیکه تولید ملانین در *S. meloloti* GR4 را با پلاسمید غیر همزیست pRme GR4b (MDa ۱۴۰) مرتبط دانسته اند وحتی انتقال این پلاسمید به *Agrobacterium tumefaciens* منجر به تولید ملانین از این باکتری شده است (Mercado-Blanco et al., 1993). برخلاف *R. leguminosarum* bv. phaseoli تولید ملانین در سویه GR4 تحت کنترل ژن تنظیم کننده *nifA* نیست (Mercado-Blanco et al., 1993). به منظور اجتناب از اشتباه با ژن های *mel* (تولید کننده melibiose) ، ژن تولید کننده ملانین را *mep* نامگذاری کرده اند (Mercado-Blanco et al., 1993). آنزیم دیگر دخیل در تولید ملانین ، لکاز ،از این جهت که نیازی به پراکسید هیدروژن برای اکسید کردن پیش ماده‌ها ندارد با پرواکسیداز متفاوت است. این آنزیم با انتقال الکترون‌ها به مولکول اکسیژن ، آب تولید می‌کند. موادی مانند Syringaldazine (4-hydroxy-3,5-dimethyloxybenaldehyd azine) و ABTS (2,2'-azino-bis-ethylbenzthiazoline-6-sufonic acid) به عنوان پیش ماده برای این آنزیم به کار می‌روند. هر دو آنزیم تیروزیناز و لکاز دنباله‌ای جهت اتصال مولکول مس دارند که برای فعالیت خود نیازمند این مولکول می باشند (Castro-Sowinski et al., 2002).

بررسی جدایه‌های ریزوبیومی گونه‌های *R. etli*، *R. gallicum*، *R. giardinii*، *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* و *S. fredii* جداسازی شده از گیاه لوبیا و در منطقه جنوب غرب اسپانیا، نشان داده است که حدود ۳۷ درصد جدایه‌ها توانایی تولید ملانین را دارند (Rodriguez-Navarro et al., 2000). مطالعه ۲۴ سوش مختلف *Sinorhizobium* از مناطق مختلف نشان داده است که حدود ۶۲٪ از سوش‌ها تولید ملانین می کنند و این نشانگر توانسته است در طی چهار سال متوالی پایداری خود را در سوش‌های تولید کننده ملانین حفظ نماید (Castro et al., 2000). بنابراین ، شناسایی ریزوبیوم‌های تولید کننده ملانین در بین جدایه های سینوریزوبیومی یونجه های ایرانی برای تعیین استرین های واجد قدرت ماندگاری و توانایی رقابت با سایر باکتری ها ریزوسفر حائز اهمیت است.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه ها و استخراج DNA

به منظور جداسازی ریزوبیومهای همزیست با یونجه، ابتدا سه جمعیت یونجه چندساله شامل دو جمعیت داخلی (همدانی و نیک شهری) و یک جمعیت اصلاح شده خارجی (کودی) به طور جداگانه در دو نمونه خاک متفاوت از یک مزرعه یونجه و یک زمین بایر جمع آوری شده از مناطق چغاکبودکرمانشاه، سنندج کردستان ، عجب شیرآذربایجان شرقی و نور- آباد لرستان در سه تکرار کشت گردید و با شرایط دمایی C ° ۳۵- ۲۲ در گلخانه نگهداری شدند. پس از ده هفته، به طور تصادفی چهار گیاه از هرگلدان و چهار گره از هر گیاه (درمجموع ۱۶ گره از هر نمونه خاک) انتخاب شدند. هرگره پس ازسترون کردن سطحی در الکل ٪۹۶ به مدت دو دقیقه، هیپوکلریت سدیم ٪۵/. (مایع تجارتی سفید کننده ٪۱۰) به مدت یک دقیقه و سه بار شستشو در آب مقطر استریل، به کمک پنس استریل در یک قطره آب استریل داخل یک ظرف پتری سترون له گردید. یک لوپ باکتریایی از سوسپانسیون بدست آمده روی محیط جامدTY (Tryptone 5g, Yeast extract 3g, $CaCl_2$ 0.9g, Agar 15g, ddH2O 1liter) کشت گردید و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸°C نگهداری شد. یک پرگنه مشخص سینوریزوبیومی از هر کشت انتخاب شد وپس از تکثیر در محیط مایعTY ،۶۰۰ میلی لیتر از سوسپانسیون جدایه مزبور با ۳۰۰ میلی لیتر گلسیرول سترون در داخل لوله های کرایو مخلوط گردید و پس از انجماد کامل در نیتروژن مایع برای نگهداری طولانی مدت به فریزر ۸۰°C- انتقال یافت.

برای استخراج DNA از جدایه ها، یک لوپ از پرگنه های ۲۴ ساعت رشد کرده هر جدایه درTY در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به صورت سوسپانسیون درآمد و به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد و بلافاصله روی یخ قرار گرفت. پس از سرد شدن نمونه ها و سانتریفوژ در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، از مایع رویی محتوی DNA هر نمونه مقدار دو میکرولیتر در واکنش های PCR استفاده گردید.

تولید ملانین در محیط کشت TY

به منظور بررسی تولید ملانین جدایه‌های ریزوبیومی به دست آمده از خاک‌های مختلف غرب و شمال غرب ایران، از محیط کشت TY حاوی ۶۰ میلی‌گرم تیروزین و ۴۰ میلی‌گرم سولفات مس در لیتر استفاده گردید (Castro et al., 2000). بدین منظور، مقدار اندکی از هر جدایه رشد کرده روی TY، با استفاده از لوپ سترون، به محیط کشت مذکور انتقال یافت و باکتری‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس انکوبه شدند. پس از این مدت مقدار دو میلی‌لیتر از محلول TBE (89mM Tris, 89mM Boric acid, 2mM EDTA) محتوی ۱۰ درصد SDS به محیط کشت حاوی جدایه اضافه شد، به ترتیبی که سطح محیط کشت را پوشانید. تغییر رنگ کلنی به قهوه‌ای تیره پس از حدود ۳۰ دقیقه ، به عنوان شاخص جدایه‌های واجد تولید ملانین در نظر گرفته شد.

طراحی نشانگر اختصاصی ژن *mepA*

مشخص شده است که دو آنزیم تیروزیناز و لکاز در تولید ملانین سوش‌های ریزوبیومی نقش دارند (Mercado-Blanco et al., 1993). آنزیم تیروزیناز به وسیله ژن ساختمانی *mepA* کد می شود و به نظر می‌رسد که در تمامی سوش‌های *S. meliloti* حفاظت شده باشد. این ژن در سویه GR4 باکتری *S. meliloti* شناسایی و توالی‌یابی گردیده است و در بانک اطلاعات ژنی (NCBI) با شماره Accession no. X69526 ثبت

می‌باشد (Nosanchuk & Casadevall, 2003). ازتوالی این ژن با استفاده از نرم‌افزار Primer3 v. 0.4.0 (http://frodo.wi.mit.edu/) آغازگر رفت (MepA 5' GTACCGCAATGGCTTCATCC 3') و برگشت (MepAr 5' GCCTTGATGGTGTCGATGTC 3') طراحی شد.

در بررسی امکان وجود ژن *mep*A در جدایه‌های ریزوبیومی، از حدود ۵۰ جدایه ریزوبیومی که اغلب آنها در محیط کشت حاوی تیروزین و سولفات مس رنگدانه ملانین تولید نموده بودند، استفاده شد. سویه‌های GR4 و Rm1021 باکتری *S. meliloti* به ترتیب به عنوان نمونه‌های استاندارد شاهد مثبت و شاهد منفی، در این آزمایش شرکت داده شدند. واکنش PCR با مواد تهیه شده از شرکت سیگما (Sigma Co.) در حجم ۲۵ میکرولیتری شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X حاوی کلریدمنیزیوم ۱۵ میلی‌مولار، یک واحد آنزیم *Taq* DNA Polymerase (Red *Taq* حاوی بافر بارگذاری)، ۰/۳۳ میکرومولار از هر آغازگر، ۰/۲ میلی مولار dNTPs و دو میکرولیتر از DNA استخراج شده (حدود ۵۰ نانوگرم) انجام گرفت. برنامه انجام واکنش PCR شامل یک چرخه در ۹۵°C به مدت دو دقیقه، ۳۵ چرخه در ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۲°C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت یک دقیقه و یک چرخه بسط نهایی در ۷۲° C به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر Primus 96 (MWG) انجام شد. محصولات PCR روی ژل آگارز یک درصد با بافر TAE الکتروفورز شد. ژل پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم‌بروماید µg/ml ۱۰، بوسیله دستگاه Gel document عکسبرداری گردید.

توالی یابی قطعات تکثیر یافته ژن *mep*A

پس از ردیابی قطعه ژن *mep*A در جدایه‌های ریزوبیومی به وسیله جفت آغازگر MepAf/MepAr، چهار جدایه واجد ژن انتخاب شدند تا چندشکلی بین توالی‌های نوکلئوتیدی آنها مقایسه شود. ابتدا محصول PCR این نمونه‌ها به کمک کیت مخصوص شرکت Invitogene (Cat. No. K3100-02) خالص سازی گردید. به منظور توالی یابی مستقیم قطعه تکثیر یافته ، مقدار ۱۰ نانوگرم از محصول PCR به ازای هر ۱۰۰ جفت باز به همراه شش پیکومول از هر آغازگر، ۱/۵ میکرولیتر بافر توالی‌یابی ۱۰ برابر و چهار میکرولیتر مخلوط واکنش توالی‌یابی (Sigma Co. H-1282) در واکنش PCR به کار رفت. واکنش در ترموسایکلر Primus 96 (MWG) با شرایط دمایی یک دقیقه در ۹۶°C و سپس ۲۵ چرخه دمایی شامل ۱۰ ثانیه در ۹۶°C، پنج ثانیه در ۵۰°C و چهار دقیقه در ۶۰°C صورت گرفت.

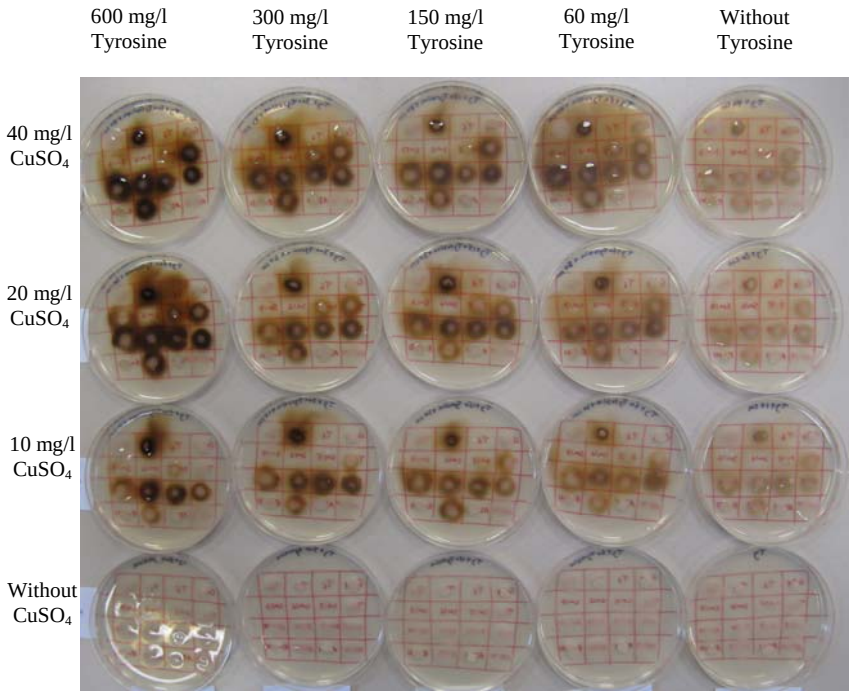
پس از انجام واکنش، خالص‌سازی محصول PCR به کمک اتانول انجام گرفت. توالی نمونه‌های مورد نظر در آزمایشگاه توالی‌یابی دانشگاه فلورانس ایتالیا تعیین شد و توالی‌های نوکلئوتیدی به کمک نرم‌افزار Bioedit مورد بررسی قرار گرفتند. توالی‌های به دست آمده با توالی‌های نوکلئوتیدی موجود در بانک ژن مقایسه گردیدند. از نرم‌افزار MEGA4 به منظور مقایسه توالی‌ها و بررسی رابطه فیلوژنتیکی آنها استفاده شد.

نتایج و بحث

در آزمون بررسی تولید ملانین جدایه ها ، از محلول TBE حاوی ۱۰ درصد SDS برای تیمار سلول‌های ریزوبیومی رشد یافته در محیط TY حاوی تیروزین و سولفات مس استفاده شد تا با تخریب دیواره سلولی و وزیکول‌ها، ملانین داخل باکتری به بیرون نشت کند. نتیجه این تیمار تغییر رنگ کلنی باکتری‌های تولیدکننده ملانین به قهوه‌ای تیره بود.

استفاده از غلظت‌های مختلف تیروزین (۶۰۰، ۳۰۰، ۱۵۰ و ۶۰ میلی‌گرم در لیتر) و سولفات مس (۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر) در محیط کشت TY نشان داد که گرچه با افزایش غلظت تیروزین و سولفات مس میزان تراکم رنگدانه ملانین نشت یافته از کلنی افزایش می‌یابد، اما غلظت ۶۰ میلی‌گرم در لیتر تیروزین و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر سولفات مس مناسب‌ترین غلظت برای تعیین توانایی تولید ملانین در جدایه‌های ریزوبیومی است. نتیجه آزمون تولید ملانین ۳۰ جدایه ریزوبیومی نشان داد که در غیاب تیروزین و در حضور سولفات مس در محیط کشت، تولید ملانین انجام می‌گیرد، در صورتی‌که بدون استفاده از سولفات مس و حتی در حضور تیروزین، تولید ملانین صورت ممکن نیست (شکل ۱). پیشتر نیز گزارش شده بود که ۲۴ سوش

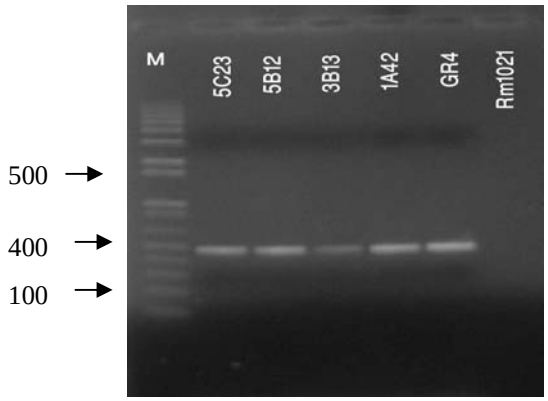
سینوریزوبیومی تولید کننده ملانین در محیط کشت TY و TY حاوی تیروزین رنگدانه‌ای تولید نکردند (Castro-Sowinski et al., 2002) ، در حالیکه با استفاده از محیط کشت حاوی سولفات مس فاقد تیروزین ، همه آن جدایه‌ها به جز سوش ریزوبیومی U143 تولید ملانین نمودند. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که دو آنزیم تیروزیناز و لکاز جایگاهی برای اتصال فلز مس دارند و در صورت عدم وجود سولفات مس در محیط کشت، قادر به تولید ملانین نخواهند بود. از سوی دیگر، تیروزین به عنوان سوبسترای آنزیم تیروزیناز برای فعالیت این آنزیم مورد نیاز است (Castro-Sowinski et al., 2002). محققین در مطالعه خود عدم تولید ملانین در جدایه U143 در محیط کشت حاوی سولفات مس و فاقد تیروزین را وجود ژن تولید کننده آنزیم تیروزیناز و عدم وجود ژن تولید کننده آنزیم لکاز عنوان نموده‌اند (Castro-Sowinski et al., 2002). بنابراین، در صورت تولید ملانین توسط جدایه ای در محیط کشت حاوی سولفات مس، احتمال فعالیت ژن‌های تولید کننده آنزیم‌های تیروزیناز، لکاز یا هر دو در جدایه مزبور وجود دارد، اما عدم تولید ملانین در محیط کشت حاوی سولفات مس و فاقد تیروزین نشان دهنده فعالیت ژن تولید کننده آنزیم تیروزیناز و عدم فعالیت ژن تولید کننده آنزیم لکاز در جدایه مزبور است (Castro-Sowinski et al., 2002). تولید ملانین در ۳۰ جدایه سینوریزوبیومی جداسازی شده از خاک‌های مناطق غرب و شمال غرب ایران و ارقام مختلف یونجه در محیط کشت حاوی سولفات مس و فاقد تیروزین نشان داد که احتمال وجود ژن تولید کننده لکاز به همراه ژن تولید کننده تیروزیناز در جدایه‌های مزبور وجود دارد. در صورت یافتن جدایه‌ای که فاقد ژن تولید کننده آنزیم لکاز باشد، می‌توان نسبت به خاموشی ژن تولید کننده تیروزیناز و بررسی نقش ملانین در جدایه مزبور استفاده نمود.



شکل ۱- جدایه‌های سینوریزوبیومی تولید کننده ملانین در محیط کشت TY حاوی غلظت‌های مختلف تیروزین و سولفات مس که پس از تیمار با محلول TBE و SDS به رنگ قهوه ای دیده می شوند.

به منظور ردیابی ژن تولید کننده آنزیم تیروزیناز در جدایه‌های مورد مطالعه، تعداد ۵۰ جدایه ریزوبیومی و دو سویه GR4 و Rm1021 باکتری *S. meliloti* به ترتیب به عنوان استانداردهای مثبت و منفی، با استفاده

از آغازگرهای طراحی شده MepAf/MepAr بررسی شدند (شکل ۲). تکثیر نوار ۴۵۶ جفت بازی به وسیله این آغازگرها در ۳۰ جدایه ریزوبیومی و عدم تکثیر در ۲۰ جدایه دیگر و تطابق آن با نتایج حاصل از تولید ملانین در محیط کشت، نشان داد که همه جدایه‌های تولید کننده ملانین حاوی ژن تولید کننده آنزیم تیروزیناز هستند. اما همان‌طور که ذکر شد تولید ملانین در محیط کشت حاوی سولفات مس و فاقد تیروزین در جدایه‌های مزبور نشان داد که احتمالاً این جدایه‌ها علاوه بر ژن تولید کننده آنزیم تیروزیناز، حاوی ژن تولید کننده آنزیم لکاز نیز هستند. ژن تولید کننده لکاز در باکتری‌های ریزوبیوم هنوز شناسایی و توالی‌یابی نشده است که بتوان آغازگر اختصاصی به منظور ردیابی ژن مزبور در جدایه‌های ریزوبیومی طراحی نمود.



شکل ۲- قطعه تکثیر یافته ۴۵۶ جفت بازی ژن *mepA* در جدایه‌های سینوریزوبیومی مورد بررسی با استفاده از آغازگرهای MepAf/MepAr

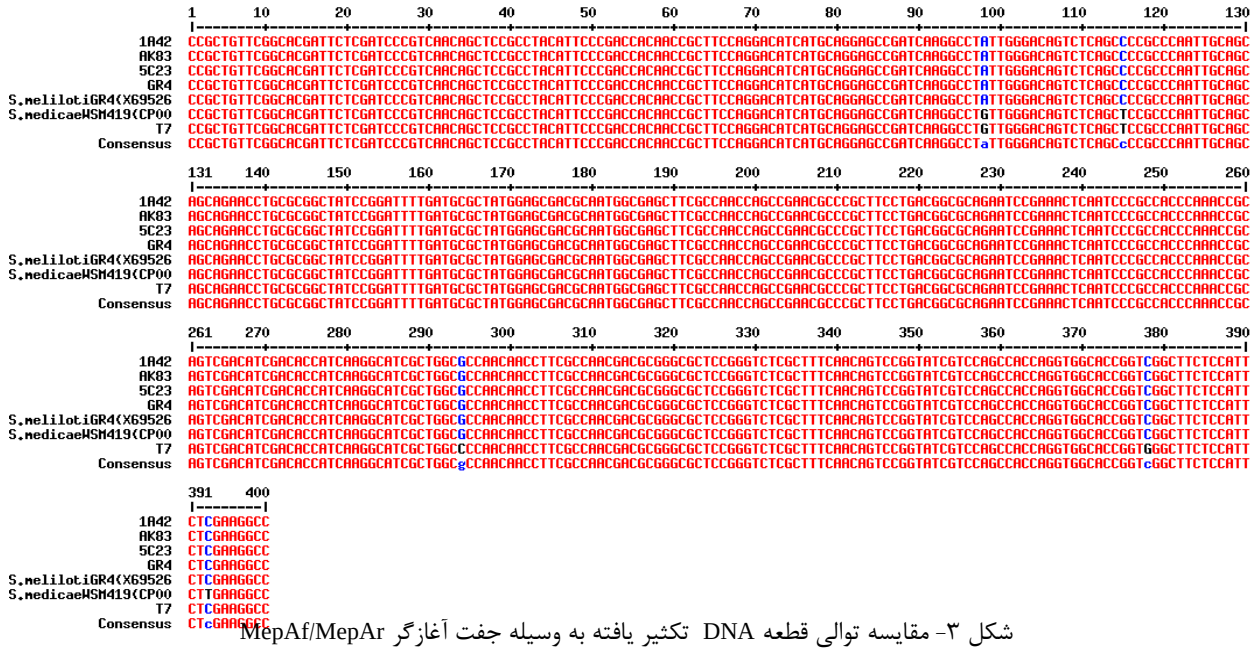
قطعه ۴۵۶ جفت بازی تکثیر شده در دو جدایه ریزوبیومی از ارقام مختلف یونجه در خاک‌های ایران(1A42 و 5C23)، یک جدایه از گونه *S. meliloti* خاک‌های تونس (AK83)، یک جدایه از گونه *S. medicae* جداسازی شده از شنبلیله ایران (T7) به همراه سویه GR4 باکتری *S. meliloti* توالی‌یابی گردیدند. بررسی توالی‌های نوکلئوتیدی جدایه‌های فوق و همردیف کردن آنها با توالی‌های موجود در NCBI نشان داد که توالی قطعه تکثیری در سویه GR4 و همچنین جدایه‌های 1A42 و 5C23 ایران و AK83 تونس با توالی ژن *mepA* موجود در بانک ژن که از همین سویه توالی یابی شده است، شباهت کامل دارد. علاوه بر این، قطعه تکثیر یافته در سویه GR4 با بخشی از ژن تولید کننده Monophenol monooxygenase در گونه *S. medicae* WSM419 با شماره CP000741 در بانک اطلاعات ژن، ۹۹ درصد شبیه است. همردیف کردن توالی جدایه‌ها با استفاده از نرم‌افزار MEGA4 نشان داد که توالی‌های مزبور در جدایه‌های 1A42، 5C23، AK83 و GR4 شباهت کامل دارند. هیبریداسیون ژن ساختمانی *mepA* در جدایه‌های مختلف *S. meliloti* نیز نشان داده است که توالی ژن مزبور در گونه *S. meliloti* حفاظت شده است (Mercado-Blanco et al., 1993). در این بررسی مشخص شد که توالی مربوط به جدایه T7 شنبلیله ایرانی (*S. medicae*) به اندازه چهار نوکلئوتید با ترادف ژن *mepA* در *S. meliloti* متفاوت است (شکل ۳). بنابراین، به نظر می‌رسد که توالی ژن *mepA* در *S. meliloti* حفاظت شده باشد اما در گونه *S. medicae*، این توالی با تغییرات محدودی روبروست. در صورتی‌که توالی ژن *mepA* در تعداد بیشتری از باکتری‌های *S. medicae* مقایسه شود می‌توان در مورد صحت این نظریه با دقت بیشتری اظهار نظر نمود.

از تعداد ۹۸۲ جدایه سینوریزوبیومی جداسازی شده از گره‌های ریشه جمعیت‌های مختلف یونجه در خاک‌های مناطق غرب و شمال غرب ایران، تعداد ۲۳۷ جدایه (حدود ۲۴ درصد) توانایی تولید ملانین را داشتند (جدول ۱).

جدول ۱- تاثیر نمونه خاک‌ها، ارقام مختلف یونجه و اثر متقابل آنها بر صفت تولید ملانین در جدایه‌های سینوریزوبیوم

تیمار مورد استفاده	تعداد کل جدایه‌ها	جدایه‌های تولیدکننده ملانین	
		تعداد	درصد
جمعیت A (همدانی)	۳۰۲	۶۴	۲۰/۴
جمعیت B (نیک‌شهری)	۳۴۸	۸۴	۲۴/۲
جمعیت C (کودی)	۳۳۲	۸۹	۲۶/۶
خاک شماره	۱۳۱	۳۷	۲۸/۴
خاک شماره ۲	۱۱۶	۵	۴/۳
خاک شماره ۳	۱۱۲	۶۳	۵۵/۲
خاک شماره ۴	۱۱۳	۱۴	۱۳/۱
خاک شماره ۵	۱۲۴	۲۰	۱۵/۸
خاک شماره ۶	۱۳۰	۳۱	۲۴/۱
خاک شماره ۷	۱۴۱	۱۵	۱۰/۵
خاک شماره ۸	۱۱۵	۵۲	۴۳/۶
A1	۴۳	۱۱	۲۵/۳
A2	۳۰	۸	۱۸/۶
A3	۲۷	۶	۱۵/۵
A4	۳۰	۳	۱۳/۹
A5	۴۲	۴	۱۰/۷
A6	۴۱	۱۱	۲۶/۴
A7	۴۸	۴	۸/۳
A8	۴۱	۱۷	۴۱
B1	۴۵	۱۲	۲۸/۱
B2	۳۹	۱	۳/۳
B3	۴۲	۲۶	۶۴/۲
B4	۳۸	۳	۶/۵
B5	۴۷	۶	۱۲/۶
B6	۴۸	۱۵	۳۱/۲
B7	۴۶	۵	۱۰/۴
B8	۴۳	۱۶	۳۶/۵
C1	۴۳	۱۴	۳۲/۱
C2	۴۷	۱	۲/۱
C3	۴۳	۲۶	۶۰/۷
C4	۴۵	۸	۱۸/۱
C5	۳۵	۱۰	۲۸/۶
C6	۴۱	۵	۱۲/۹
C7	۴۷	۶	۱۲/۵
C8	۳۱	۱۹	۶۰/۲
کل جمعیت ریزوبیومی	۹۸۲	۲۳۷	۲۴/۱

در مطالعه ۲۴ سوش مختلف *Sinorhizobium* همزیست یونجه از مناطق مختلف کشور اروگوئه نشان داده شد که حدود ۶۲٪ از سوش‌ها تولید ملانین می‌کنند (Castro et al., 2000). بنابراین، به نظر می‌رسد که پراکنش جدایه‌های ریزوبیومی تولید کننده ملانین در خاک‌های مناطق مختلف متفاوت است.



شکل ۳- مقایسه توالی قطعه DNA تکثیر یافته به وسیله جفت آغازگر MepAf/MepAr درجدایه‌های سینوریزوبیومی با جدایه‌های موجود در بانک ژن.

به منظور مقایسه فراوانی سوش‌های سینوریزوبیومی واجد توانایی تولید ملانین در خاک‌های مناطق مختلف غرب و شمال غرب ایران، جدایه‌های ریزوبیومی همزیست با یونجه از هر نمونه خاک گروه‌بندی گردید و درصد جدایه‌های تولید کننده ملانین در آنها محاسبه شد. نتایج حاصل نشان داد که بین جدایه‌های خاک‌های مناطق مختلف تفاوت معنی‌داری از نظر تولید ملانین وجود دارد. خاک‌های شماره ۳ و ۸ جمع‌آوری شده از سنندج به ترتیب با ۵۵/۲ و ۴۳/۶ درصد بالاترین تعداد جدایه تولید کننده ملانین را به خود اختصاص دادند. این درصد بالای جدایه‌های تولید کننده ملانین برای ارقام مختلف یونجه کشت شده در خاک‌های ۳ و ۸ صدق می‌کرد، هر چند که جدایه‌های ملانین دار به دست آمده از یونجه همدانی (3A) در خاک شماره ۳، کمتر از دو رقم دیگر بود. خاک شماره ۲، متعلق به منطقه چغاکبود کرمانشاه، کمترین میزان جدایه‌های تولید کننده ملانین را داشت، اما درصد جدایه‌های ریزوبیومی جداسازی شده از رقم یونجه همدانی در خاک شماره ۲ به مراتب بالاتر از ارقام نیک‌شهری و کودی ارزیابی شد. مجموع نتایج خلاصه شده در جدول ۱ نشان می‌دهد که تفاوت خاک‌های مناطق مختلف در تعداد سوش‌های تولید کننده ملانین بیشتر از تفاوت ارقام مختلف یونجه است. بنابراین، چنین استنباط می‌شود که شاید رقم یونجه تأثیر مهمی در جذب سوش‌های تولید کننده ملانین نداشته باشد، اما اختلاف معنی‌دار حضور آنها در خاک‌های مختلف، فارغ از نوع میزبان، تأثیر نوع خاک مزرعه را در غالبیت جدایه‌های تولید کننده ملانین نشان می‌دهد. بررسی جدایه‌های ریزوبیومی گونه‌های *R. etli*، *R. gallicum*، *R. giardinii* و *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* و *S. fredii* جداسازی شده از گیاه لوبیا و در منطقه جنوب غرب اسپانیا، نشان داده است که حدود ۳۷ درصد جدایه‌ها توانایی تولید ملانین را دارند که توانایی تولید ملانین گونه‌های ریزوبیومی از خاک‌های مختلف به‌طور معنی‌داری متفاوت بود (Rodriguez-Navarro et al., 2000). بنابراین، شاید بتوان نتیجه‌گیری کرد که پراکنش جدایه های سینوریزوبیومی تولید کننده ملانین با منطقه جغرافیایی وشرایط خاک آن ارتباط دارد.

REFERENCES

1. Borthakur, D., Lamb, J. W. & Johnston, A. W. B. (1987). Identification of two classes of *Rhizobium phaseoli* genes required for melanin synthesis, one of which is required for nitrogen fixation and activates the transcription of the other. *Molecular Genetics and Genomics*, 207, 155–160.

2. Castro, S., Carrera, I. & Martinez-Drets, G. (2000). Methods to evaluate nodulation competitiveness between *Sinorhizobium meliloti* strains using melanin production as a marker. *Journal of Microbiological Methods.* 41, 173–177.
3. Castro-Sowinski, S., Martinez-Drets, G. & Okon, Y. (2002). Laccase activity in melanin-producing strains of *Sinorhizobium meliloti*, *FEMS Microbiology Letters*. 209, 119–125.
4. Claus, H. & Decker, H. (2006). Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*, 29, 3 –1 4.
5. Cubo, M. T., Buendia-Claveria, A. M., Beringer, J. E. and Ruiz-Sainz, J. E. (1988). Melanin production by *Rhizobium* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 1812-1817.
6. 6. Denarie, J., Debelle, F. & Prome, J.C. (1996). *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry*, 65, 503-535.
7. de Oliveira, L. A., & Graham, P. H. (1990). Speed of nodulation and competitive ability among strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli., *Archives of Microbiology*, 153, 311-315.
8. Hatakka, A. (1998). Lignin-modifying enzymes from select while-rot fungi: Production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiology Review*, 13, 125–135.
9. Henson, J. M., Butler, M. J. & Day, A. W. (1999). The dark side of the mycelium: Melanins of phytopathogenic fungi. *Annual Review of Phytopatholgy*, 37, 447–471.
10. Hill, H. Z. (1992). The function of melanin or six blind people examine an elephant. *BioEssays*. 14, 49–56.
11. Kuo, M. J. & Alexander M. (1967). Inhibition of the lysis of fungi by melanins. *Journal of Bacteriology*, 94, 624–629.
12. Mercado-Blanco, J., Garcia, F. Fernández-Lopez, M. & Olivares, J. (1993). Melanin production by *Rhizobium meliloti* GR4 is linked to nonsymbiotic plasmid p*RmeGR4b*: Cloning, sequencing and expression of the tyrosinase gene *mepA*. *Journal of Bacteriology*, 175, 5403–5410.
13. Montefiori, D. C. & Zhou J. (1991). Selective antiviral activity of synthetic soluble L-tyrosine and L-dopa melanins against human immunodeficiency virus in vitro. *Antiviral Research*, 15, 11–25.
14. Nosanchuk, J. D. & Casadevall, A. (2003). The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiology*, 5, 203–223.
15. 15. Rodriguez-Navarro, D. N., Buendia, A. M. Camacho, M.. Lucas, M. M & Santamaria, C. (2000). Characterization of *Rhizobium* spp. Bean isolates from South- West Spain. *Soil Biology and Biochemistry*, 32, 1601–1613.
16. Salas, S. D., Bennet, J. E. Kwon-Chung, K. J. Perfect, J. R. & Williamson, P. R. (1996). Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Experimental Medicine*, 184, 377–386.
17. Sanchez-Ferrer, A., Rodriguez-Lopez, J. N. Garcia-Canovas, F. & Garcia-Carmona, F. (1995). Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism. *Biochemistry and Biophysics Acta*, 1247, 1–11.
18. Shivprasad, S. & Page, W. J. (1989). Catechol formation and melanization by Na^+-dependent *Azotobacter chroococcum*: A protective mechanism for aeroadaptation?. *Applied Environmental Microbiology*, 55, 1811–1817.
19. Thurston, C. F. (1994). The structure and function of fungal laccase. *Microbiology*, 140, 19–26.
20. Wang, G., Aazaz, A., Peng, Z. & Shen, P. (2000). Cloning and overexpression of a tyrosinase gene *mel* from *Pseudomonas maltophila*. *FEMS Microbiology Letters*, 185, 23–27.