کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دوره۹، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۹ (۱۸۳-۱۷۳) مقاله پژوهشی
DOI: 10.22059/jbioc.2021.315643.301

مطالعه کنترل بیولوژیک سرمازدگی درختان پسته با استفاده از باکتری های ضد هسته یخ

خدیجه شاهرخی کهنوج[۱]، مهدیه رستمی*[۲]
۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه بیماری شناسی گیاهی، واحد رفسنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، رفسنجان، ایران.
۲. استادیار گروه بیماری شناسی گیاهی، واحد رفسنجان، دانشگاه آزاداسلامی، رفسنجان، ایران.
(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۹/۲۹ - تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۰۱/۰۸)

چکیده

تنش سرمازدگی یکی از مهمترین عوامل محدود کننده تولید محصولات کشاورزی بویژه محصولات باغی و درمنطقه کرمان، گیاه پسته است. با توجه به ارزش اقتصادی پسته، مطالعه مدیریت سرمازدگی این محصول بسیار ضروری است. یکی از روش‌های جدید مدیریت سرمازدگی، کنترل باکتری های عامل هسته یخ، از طریق به‌کارگیری باکتری‌های ضدهسته یخ ساکن سطح گیاهان، ازجمله پسته است. برخی از این باکتری‌های اپیفیت می‌توانند تولید پروتئین‌های ضدهسته‌یخ نموده که با مولکول‌های آب در کریستال یخ ترکیب شده و از ایجاد کریستال‌های یخ بزرگتر جلوگیری کند. در این مطالعه توان ضدیخی ۱۰۰جدایه باکتری اپیفیت درختان پسته، بررسی شد که از این تعداد، چهار جدایه مانع از یخ‌زدگی، درون لوله آزمایش در آزمون هسته یخ شدند. همچنین این جدایه‌ها مانع از سرمازدگی گیاهچه‌های گندم تیمار شده با جدایه هسته‌یخ در شرایط سرما شدند. این جدایه‌ها براساس نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شدند. با استفاده از جفت آغازگرهای 63f و 1387r در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، بخشی از ناحیه 16SrDNA، تکثیر و توالی‌یابی شد. توالی‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم افزار بلاست در بانک ژن، با توالی‌های موجود در این پایگاه مقایسه و میزان شباهت تعیین گردید. نتایج نشان داد جدایه‌های ضد هسته یخ متعلق به چهار جنس بودند. بر اساس مقایسه بخشی از توالی 16S rDNA، این جدایه‌ها شباهت بالای ۹۹ درصد به گونه‌های *Pseudomonas* sp., *Escherichia*, *Erwinia iniecta fergusonii* و *Serratia* sp. نشان دادند. توالی‌های مزبور در بانک ژن به ترتیب با کدهای شاخص MH704448، MH704263،MH703583،MH703535 ثبت شد. بدیهی است این مطالعه می‌تواند افق جدیدی را در امر مدیریت خسارت سرمازدگی روی محصولات کشاورزی پدید آورد.

واژه های کلیدی: باکتری ضد هسته یخ، پسته ، رفسنجان، **16SrDNA**.

Study of the possibility of biological control of frostbite of pistachio plants using epiphytic antifreeze bacteria

Khadijeh Shahrokhi Kahnooj[1], Mahdieh Rostami[2]
[1]Former Ms.c. Student, Department of Plant Protection, Rafsanjan Branch, Islamic Azad University, Rafsanjan, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Plant Protection, Rafsanjan Branch, Islamic Azad University, Rafsanjan, Iran
(Received: December 19, 2020 - Accepted: March 28, 2021)

Abstract

Frost stress is one of the most important factors limiting the crop production, especially horticultural products and pistachio plant in Kerman region. Because of the economic value of pistachios, the frost management of this product is very necessary. One of the novel methods is the use of anti-ice nucleating bacteria on the surface of plants, including pistachios. Some of these epiphytic bacteria can produce antifreeze proteins that bind to water molecules in order to suppress crystal formation in the target sites. In this study, 100 epiphytic pistachio bacteria were assessed in anti-freeze activity, out of which, four isolates were effective both *in vitro* and wheat seedling bioassays. These were identified by biochemical and molecular tests. PCR primers 63f and 1387r were used for amplification of 16SrDNA genes sequencing. Sequences were then compared with other isolates in NCBI GenBank using blast methods. With 99% sequence similarity, the bacteria were identified as *Serratia* sp, *Pseudomonas* sp., *Erwinia iniecta* and *Escherichia fergusonii*. Sequences recorded at GenBank under the accession numbers MH704448, MH704263, MH703583 and MH703535 respectively. Obviously this study could open up a new horizon in the management of frost damage of agricultural products.

Key Words: Anti Ice Bacteria, Pistachio, Rafsanjan, 16SrDNA.

E-mail: r.saberi@vru.ac.ir

مقدمه

سرمازدگی در ایران یکی از مشکلات اساسی بخش کشاورزی است و هرساله خسارت چشمگیری ناشی از تنش سرما به محصولات کشاورزی وارد می‌شود. معمولا دو نوع سرمازدگی توده ای (جبهه ای) و تشعشعی گیاهان را تهدید می‌کند. یخبندان های جبهه ای به علت جابه جایی توده های هوای سرد از روی یک منطقه بروز می کند. مثل توده های هوایی که از سیبری منشاء می گیرند. ضخامت لایه هوای سرد در این نوع یخبندان ممکن است چندین کیلومتر باشد. مقابله با آن بسیار مشکل و تقریبا غیرممکن است. یخبندان تشعشعی در شرایط آسمان صاف و بدون ابر واقع می گردد در هنگامیکه تشعشع خالص منفی باشد سطح خاک و گیاه، سرد تر از هوای اطراف می شود در نتیجه هوا در اثر برخورد با این سطوح سردتر و متراکم تر می‌گردد. هوای متراکم در سطح زمین باقی می‌مانند و مرحله انتقال حرارت ادامه می‌یابد حاصل این امر پدیده ای بنام وارونگی حرارت می‌باشد. به عبارت دیگر هنگامی که در طول شب تا قبل از طلوع آفتاب، حرارت زمین سریع از دست می رود و گرما با توجه به سبکتر بودن به سطوح بالایی رفته و هوای سرد جای آن را روی زمین و اطراف گیاه می‌گیرد که در چنین شرایطی با توجه به آغاز رشد اولیه گیاه و حساس بودن آن باعث وارد آمدن خسارت می‌شود. این نوع سرمازدگی اصطلاحا سرمازدگی تشعشعی نامیده می شود. بیشترین خسارت هایی که در شرایط کشور رخ می دهد، ناشی از این نوع سرمازدگی است. درجه دماهای بحرانی، حداقل دمایی است که گیاه می‌تواند با تداوم ۳۰ دقیقه تحمل کند و در بیشتر از این مدت و کمتر از این درجه حرارت خسارت می بیند. این درجه حرارت برای گیاهان مختلف و مراحل مختلف فنولوژی متفاوت است. در انواع سرمازدگی وجود عوامل زیستی به ویژه باکتری های هسته یخ در سطح گیاهان (اعم از باغی یا زراعی)، عواملی هستند که که در منابع متعدد نقش موثر آنها در تشدید سرمازدگی به اثبات رسیده است (Lindow 1982a; Ramstedt *et al*. 1994; Cambours 2004). بدون حضور باکتری‌های مولد هسته یخ، خسارت سرمازدگی (در دماهای نزدیک به صفر) محدود بوده و گیاه می تواند بهبودی خود را بازیابد (Hirano., 1985). باکتری‌های هسته یخ، ساکن سطح گیاه بوده و در واقع می‌توانند به عنوان تشکیل دهنده‌های اصلی هسته یخ فعال در روی برگ، عمل نمایند. پروتئین تولید شده توسط این باکتری‌ها با آسان کردن شکل‌گیری کریستال‌های یخ سبب پارگی دیواره و غشاء سلولی و آسیب به سلول گیاه می شود (*et al*., Fahy 1984). در غیاب این باکتری ها گیاه می‌تواند دماهای ۵- تا۱۰- درجه سانتی‌گراد را تحمل کند. لذا این باکتری‌ها، مکانیسم مقاومتی گیاهان در برابر کاهش دما را شکسته و باعث یخ‌زدن آب و موجب یخ‌زدگی بافت‌های گیاهی در دماهای بالاتر (۱ درجه سانتی‌گراد) می‌شوند (Lindow, 1983). تاکنون مطالعات زیادی در خصوص باکتری‌های هسته یخ در سطح گیاهان مختلف در سراسر دنیا و همچنین در ایران صورت گرفته است. حضور این باکتری ها در سطح درختان پسته استان کرمان و نقش آنها در خسارت سرمازدگی باغات پسته، توسط رستمی و همکاران به اثبات رسیده است (Rostami *et al*.,2018). لذا با توجه به نقش مهم باکتری‌های هسته یخ در ایجاد خسارت‌های سرمازدگی، اهمیت مدیریت باکتری‌های هسته یخ ضروری به نظر می رسد. روش‌های متعددی همچون استفاده از باکتری‌کش‌ها، دستکاری ژن‌های مولد هسته‌یخ، استفاده از آنتاگونیست‌های ساکن سطح گیاه، مطالعه باکتری‌های رقیب و همچنین مطالعه بر روی میکروارگانیسم هایی که تولید پروتئین‌های ضد هسته‌یخ می کنند، از این موارد است (Mir-Mohammadi Meybodi, 2004). یکی از این سازگاری‌ها پروتئین‌های ضدانجماد نامیده می‌شوند که از رشد کریستال‌های یخ جلوگیری می‌کنند (Ustun and Turhan, 2015). پروتئین‌های ضدیخ از مسیرهای گوناگون مانند کاهش دمای انجماد، تعدیل یا ممانعت از رشد بلورهای یخ، جلوگیری از تبلور مجدد و محافظت غشای سلولی در برابر آسیب ناشی از سرما، موجودات زنده را در مقابل سرما محافظت می نمایند. این پروتئین‌ها در گستره وسیعی از گونه‌های مناطق سرد مانند ماهی ها، موش صحرایی (Wlostowski *et al*., 2000) وگیاهان (Zykova *et al*., 2000) یافت شده اند.

برخی باکتری‌ها که اغلب اپی‌فیت هستند، نیز قادر به تولید پروتئین‌های ضد هسته یخ هستند. در برخی گونه‌های جنس سودوموناس (*P. putida*) تولید این پروتئین‌ها گزارش شده است (Muryoi *et al.*, 2004; Kawahara *et al.*, 2008). پروتئین‌های ضدهسته یخ در بقاء باکتری در شرایط یخ‌زدگی نقش دارند (Wilson *et al.*, 2006). همچنین برخی جدایه‌های باکتریایی (*P. fluorescens* KUAF-68) قادرند علاوه بر پروتئین‌های هسته یخ، پروتئین‌های ضد هسته یخ را هم تولید کنند (Kawahara *et al.*, 2004). در این مطالعه سعی شد از مجموعه باکتری‌های جداسازی شده از سطح درختان پسته، جدایه هایی که مانع یخ زدن سوسپاسیون حاوی باکتری مولد هسته یخ (*P. syringae*) می‌شوند، غربالگری و شناسایی شوند. در مطالعات تکمیلی می‌توان با بررسی جنبه های مختلف از این استرین‌ها یا مطالعه شرایط مناسب برای بیان ژن‌های ضد هسته یخ، به‌عنوان باکتری‌های ضد هسته یخ سازگار با فیلوسفر گیاه و به‌عنوان کنترل بیولوژیک در مقابل باکتری‌های هسته استفاده نمود و گامی در زمینه مدیریت سرمازدگی درختان پسته برداشت.

مواد و روش ها

جدایه‌های مورد مطالعه

تعداد ۱۰۰ جدایه‌ی باکتری مورد مطالعه در این تحقیق از مجموعه باکتری های اپی‌فیت پسته موجود در کلکسیون گروه گیاهپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رفسنجان که در اواخر زمستان و بهار، سال‌های ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۴، به‌طور تصادفی از باغ‌های پسته در شهرستان‌های مختلف استان کرمان جداسازی شده‌اند، استفاده گردید.

غربالگری فعالیت ضدهسته‌یخ در باکتری‌های اپی‌فیت پسته

توان ضدیخی هر جدایه اپی فیت در ممانعت از یخ زدن باکتری *P. syringea* (عامل هسته یخ) به روش انجماد درون لوله بررسی شد. بدین منظور حجم یکسان از سوسپانسیون‌هایی با رقت مساوی از کشت تازه جدایه‌ها تهیه گردید. غلظت *P. syringae*، (OD_{660}=0. 1) و غلظت جدایه‌های اپی‌فیت غیرهسته‌یخ (OD_{660}=0.2) در نظر گرفته شد. در میکروتیوب‌های حاوی یک میلی‌لیتر سوسپانسیون استرین *P. syringae*، ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون‌های تهیه شده از باکتری اپی‌فیت غیر-هسته یخ اضافه شد. به‌عنوان شاهد مثبت به یک میکروتیوب حاوی سوسپاسیون *P. syringae*، ۵۰ میکرولیتر ضدیخ خودرو با ضریب جذب مشخص[1] اضافه گردید. یک میکروتیوب حاوی سوسپاسیون *P. syringae* هم شاهد منفی در نظر گرفته شد. میکروتیوب‌ها درون حمام فوق سرد شده توسط مخلوط یخ و اتانول با دمای ثابت ۷- °C به مدت ۵ دقیقه به صورت شناور قرارداده شد. زمان یخ‌زدن سوسپانسیون درون میکروتیوب‌ها در مقایسه با شاهد مثبت، ثبت گردید. سوسپانسیون میکروتیوب‌هایی که در این مدت یخ نزدند یا دیرتر یخ زد (در مقابل یخ زدن میکروتیوب شاهد منفی)، به عنوان جدایه های دارای فعالیت ضد هسته یخ نگهداری شدند. در ادامه این جدایه‌ها با روش های مرسوم بیوشیمیایی و مولکولی مورد شناسایی قرار گرفتند.

آزمون اثبات ضد یخ زدگی روی گیاهچه گندم

فعالیت ضد یخی جدایه های غربال شده در مرحله قبل، با تیمار گیاهچه های گندم بوسیله جدایه های ضد یخ در شرایط دمای ۵- درجه سلسیوس و جلوگیری از سرمازدگی گیاهچه‌های گندم ارزیابی شد. جهت تیمار گیاهچه‌ها سوسپانسیونی از کشت تازه جدایه‌های هسته یخ که روی محیط کشت آگار مغذی حاوی ۲/۵درصد گلیسرول در دمای ۲۲ درجه سلسیوس رشد کرده بود، با غلظت (1×10^9CFU/ml) تهیه شد. سوسپانسیون باکتری هسته یخ (*P. syringae*) با مه‌پاش دستی تا حالت روان آب روی گیاهچه‌های گندم پاشیده شد (Buttner and Amy, 1989). گیاهان شاهد منفی با آب مقطر استریل مه پاشی شدند. به منظور تامین رطوبت جهت کلونیزاسیون بهتر باکتری، گیاهچه‌های تیمار شده به مدت دو روز، زیر پوشش پلاستیکی و دمای ۲۲ نگهداری شد. سپس گلدان‌ها (به جز گلدان شاهد مثبت) با سوسپانسیون باکتری ضدهسته یخ تا حالت روان آب مه‌پاشی شدند. مجددا به منظور کلونیزاسیون

1 (OD660=2)

باکتری، گیاهچه‌های تیمارشده به مدت دو روز، زیر پوشش پلاستیکی و دمای ۲۲ نگهداری شد. گلدان‌ها به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۵- درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس ۲۴ساعت پس از نگهداری گلدان‌ها در دمای اتاق، نشانه‌های سرمازدگی (تغییر رنگ برگ‌ها به سبز تیره و شل شدن برگ) روی گیاهچه‌ها ارزیابی شد. جهت انجام این آزمون برای هر تیمار سه تکرار در نظرگرفته شد.

شناسایی جدایه‌های دارای توان ضدیخی

در مراحل اولیه شناسایی، با انجام رنگ آمیزی گرم، باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، از هم تفکیک شدند. در ادامه آزمون‌های کاتالاز، اکسیداز Kovacs, (1956.)، لوان، هیدرولیز آسکولین[1] ، ذوب ژلاتین[2] ، هیدرولیز توئین[3]، هیدرولیز آربوتین، آزمون تولید مواد احیاکننده از سوکروز[4] (Schaad *et al.*, 2001)، آرژنین دی هیدرولاز[5] (Thornely, 1960)، رشد در شرایط هوازی و بی هوازی [6] (Hugh and Leifson, 1953) انجام شد. علاوه‌بر آزمون‌های به‌کاررفته در گروه‌بندی اولیه، برای شناسایی بیشتر جدایه‌های ضد هسته یخ، برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی تکمیلی بررسی شد. تشکیل یا عدم تشکیل پرگنه زرد روی محیط YDC[7] تولید یا عدم تولید پیگمان فلورسنت روی محیط کشت King's B، مشخصات کلنی جدایه‌ها روی محیط کشت آگار غذایی۸ و همچنین محیط ائوزین متیلن بلو[9] بررسی شد (Schaad *et al.*, 2001).

شناسایی مولکولی بر اساس بخشی از توالی 16srDNA

پس از استخراج DNA جدایه‌های ضد هسته یخ جهت شناسایی مولکولی، از آغازگرهای عمومی 63f و 1387r (Marchesi *et al.*, 1998) در واکنش زنجیره ای پلی مراز[1] استفاده شد. استخراج DNA ژنومی اسیدنوکلئیک جدایه‌ها به روش معمول فنل-کلروفرم (Ausubel *et al.*, 1988) استخراج گردید. پس از اطمینان از کیفیت مطلوب DNA توسط دستگاه نانودراپ اسپکتوفتومتر (Sambrook *et al.*, 1989)، نمونه DNA مناسب جهت تکثیر بخشی از ژن 16SrDNA مورد استفاده قرار گرفت (جدول). الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز یک درصد در اختلاف پتانسیل ثابت ۹۰ ولت انجام و با رسیدن نوار به یک سانتی‌متری انتهای ژل پایان پذیرفت. جدایه‌های نماینده مورد توالی یابی قرار گرفتند (http://www.denazist.com). نتایج توالی با استفاده از نرم‌افزار BioEdit اصلاح و بررسی مشابهت توالی ژن‌ها با اطلاعات موجود در بانک ژن مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی[10](NCBI) پس از هم ردیف سازی با نرم-افزار Clastal W، و با استفاده از برنامه‌ی BLAST صورت گرفت. توالی‌ها توسط نرم‌افزار bankIt در بانک ژن پایگاه NCBI، ثبت شد. درخت فیلوژنتیکی بر اساس تشابه بخشی از توالی‌های ژن 16SrRDNA برای نشان دادن شباهت و ارتباط ژنتیکی جدایه‌های به‌دست‌آمده در مقایسه با تعدادی از استرین‌های موجود در بانک ژن توسط نرم‌افزار (MEGA7) ترسیم شد (شکل ۶).

نتایج

غربال جدایه های ضد هسته یخ

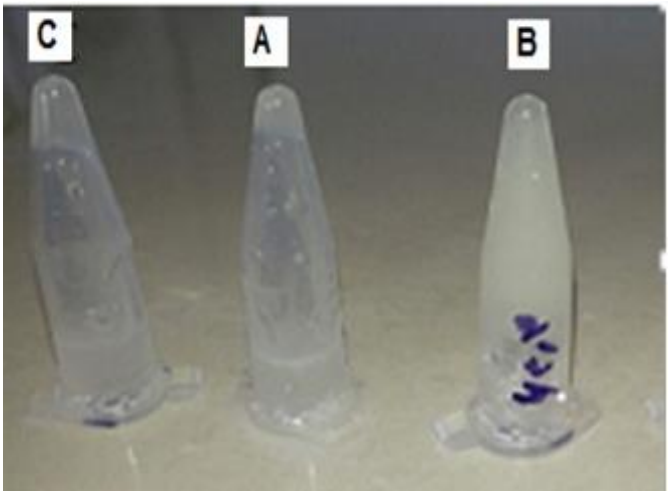
در مجموع از ۱۰۰ جدایه‌ی باکتری اپی‌فیت پسته ، چهار جدایه به آزمون ضد هسته یخ پاسخ مثبت دادند. عدم یخ‌زدن تیمار مخلوط باکتری اپی فیت به‌همراه *P. syringea*، در مقایسه با یخ زدن شاهد منفی(*P. syringea*)، در چهار تیمار مشاهده شد. این چهار جدایه مانند مخلوط آب و ضدیخ، مانع از یخ‌زدن سوسپانسیون جدایه هسته یخ شدند. نتیجه این آزمون در سه تکرار مورد تایید قرار گرفت (شکل ۱). همچنین با انجام آزمون هسته یخ از فعالیت هسته یخ جدایه *P. syringae* (باکتری عامل هسته یخ) اطمینان حاصل شد (شکل ۲).

1 Scholin hydrolysis
1 Gelatin hydrolysis
1 Tween 80 hydrolysis
1 Sucrose
1 Arginine dihydrolase
1 *Oxidation Fermentation* (OF) test
8Yeast Extract Dextros CaCO3
9 Nutrient Agar (3.3 g Bacto peptone, 2.7 g Difco nutrient broth, 2.0 g yeast extract, and 15.0 g Bacto agar/L distilled H2O)
10 EMB-Eosin methylene blue
11 National Center for Biotechnology Information

جدول۱ : برنامهٔ PCR استفاده شده جهت تکثیر ژن 16S rDNA

Table 1. PCR program used to amplify 16S rDNA gene

Step	Temperature(ºC)	Time(Min)	Cycle
Initial Denaturation	94	5	1
Denaturation	94	1	30
Annealing	56	1	
Extension	72	2	
Final extension	72	10	1
Hold	4		



شکل۱ بررسی فعالیت ضدهسته یخ و عدم یخ زدگی در لوله حاوی جدایه ضد هسته یخ.A: سوسپانسیون حاوی باکتری فعال هسته یخ به همراه جدایه ضد هسته یخ، B: جدایه فعال هسته یخ، C: شاهد حاوی سوسپانسیون باکتری فعال هسته یخ به همراه ضد یخ خودرو.

Figure 1. Evaluation of antifreeze activity and not-freezing in the tube containing antifreeze isolate.A: Suspension containing ice nucleation active bacteria with antifreeze isolate. B: Ice nucleation bacteria. C: Control Suspension containing ice nucleation active bacteria with automobile antifreeze.

شکل ۲. آزمون هسته یخ: یخ زدن سوسپانسیون فعال هسته یخ درون لوله پس از ۵ دقیقه، در دمای -۰۷ درجه سانتی گراد

Figure 2. Ice nucleation test in micro centrifuge tubesin -7°C

آزمون اثبات ضدیخ‌زدگی جدایه های منتخب در گیاهچه گندم

جدایه هسته یخ *P. syringae* به‌عنوان شاهد مثبت، روی گیاهچه‌های گندم پس از ۴۰ دقیقه قرار گرفتن در دمای ۵- درجه سانتی‌گراد، آسیب سرمازدگی ایجاد نموده و حدود یک ساعت پس از قرار گرفتن در دمای اتاق نشانه‌هایی به‌صورت شل‌شدگی و تغییررنگ به سبز تیره (آب سوختگی) نشان دادند (شکل ۳). در حالی‌که

جدایه‌هایی که فعالیت ضدهسته‌یخ آنها در آزمون درون لوله اثبات شد، مانع از یخ‌زدگی گیاهچه‌های تیمار شده با باکتری فعال هسته یخ شدند (شکل ۴).

۴-۳ شناسایی اولیه جدایه‌ها

در نتیجه انجام برخی آزمون های بیوشیمیایی، جدایه‌های دارای فعالیت ضدهسته یخ، باکتری‌های گرم منفی، کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی بوده و به غیر از جدایه 1-10 همگی بر روی محیط EMB تولید رنگیزه سبز متالیک کردند. همچنین به جز جدایه 1-10 سه جدایه دیگر قادر بودند علاوه بر رشد در حضور اکسیژن، در شرایط بی‌هوازی متابولیسم داشته باشند. نتایج شناسایی اولیه جدایه‌ها با برخی آزمون‌های بیوشیمیایی در جدول (۲) قابل مشاهده است.

شکل ۳. ایجاد نشانه‌های سرمازدگی (شل شدگی و آبسوختگی) در گیاهچه‌های تیمار شده با سوسپانسیون باکتری فعال هسته یخ(*P. syringae*) پس از قرارگرفتن در دمای ۵ °C - به مدت ۴۰ دقیقه.

Figure 3. Symptoms of frostbite (loosening and water-soaking) in seedlings treated with suspension of ice nucleation bacteria (*P. syringae*) after exposure to -5 ° C for 40 minutes.

شکل ۴. مه‌پاشی با جدایه‌های ضدهسته‌یخ در گلدان‌های شماره۱، ۳، ۴ و ۶، مانع از یخ‌زدگی گیاهچه‌های گندم پس ازتیمار با جدایه هسته یخ شد. گلدان شماره ۲ و۵ فقط تیمار شده با جدایه هسته یخ. گلدان شماره ۱۰: گیاه شاهد تیمار شده با آب مقطر استریل.

Figure 4. Spraying with antifreez isolates in pots 1, 3, 4 and 6 prevented wheat seedlings from freezing after treatment with ice nucleation isolate. Pots 2 and 5 are only treated with ice nucleation isolate. Pot No. 10: Control plant treated with sterile distilled water.

شناسایی مولکولی براساس تعیین توالی 16SrDNA

الکتروفورز ژل آگارز حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز توسط آغازگرهای عمومی 63f و 1387r، از ۴ جدایه منتخب، باند واضح به اندازه حدود ۱۳۰۰جفت باز نشان داد (شکل ۵).

شناسایی و تعیین توالی جدایه‌های ضدهسته‌یخ

نتیجه تعیین توالی جدایه‌های ضدهسته یخ در این مطالعه و مقایسه با توالی‌های موجود در بانک ژن حاکی از شباهت بالای ۹۹ درصدی به گونه‌های *Serattia sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Erwinia iniecta* و *Escherichia fergusonii* است که به همراه کد دسترسی[1] در جدول (۳) نشان‌داده‌شده‌است.

جدول ۲. خصوصیات بیوشیمیایی جدایه‌های ضدهسته‌یخ جداسازی شده از سطح درختان پسته رفسنجان.

Table 2. Biochemical properties of antifreeze isolating from Rafsanjan pistachio trees.

Serratia sp. strain 17-3	*Pseudomonas*sp. strain 10-1	*Erwinia iniecta* strain 4-63	*Escherichia fergusonii* strain 69-3	Biochemical Tests
–	–	–	–	Gram Stain
–	–	–	–	Oxidase
+	+	+	+	*Catalase*
+	–	+	+	Oxidase/Fermentation
–	–	–	–	Arbutin hydrolysis
–	–	–	–	Arginine dihydrolase
+	+	+	+	Esculin hydrolysis
+	+	+	+	Tween hydrolysis
+	+	–	–	Gelatin hydrolysis
–	–	–	–	Sucrose reduction
+	+	+	+	Anti-Freeze
+	–	+	+	Metallic green sheen on EMB agar

جدول ۳. شماره دسترسی توالی 16 S rDNA در بانک ژن، طول قطعه تکثیرشده، درصد شباهت استرین‌های ضدهسته‌یخ جداسازی شده از سطح درختان پسته رفسنجان.

Table 3. GenBank 16 S rDNA sequence accession numbers, The length of the amplified piece, and similarity percentage of antifreeze strains obtained from pistachio trees in Rafsanjan city.

Antifreeze bacteria	Accession numbers	Amplified piece length(bp)
Serratia sp. strain 17-3	MH704448	1300
Pseudomonas sp. strain 10-1	MH704263	1300
Erwinia iniecta strain 4-63	MH703583	1300
Escherichia fergusonii strain 69-3	MH703535	1300

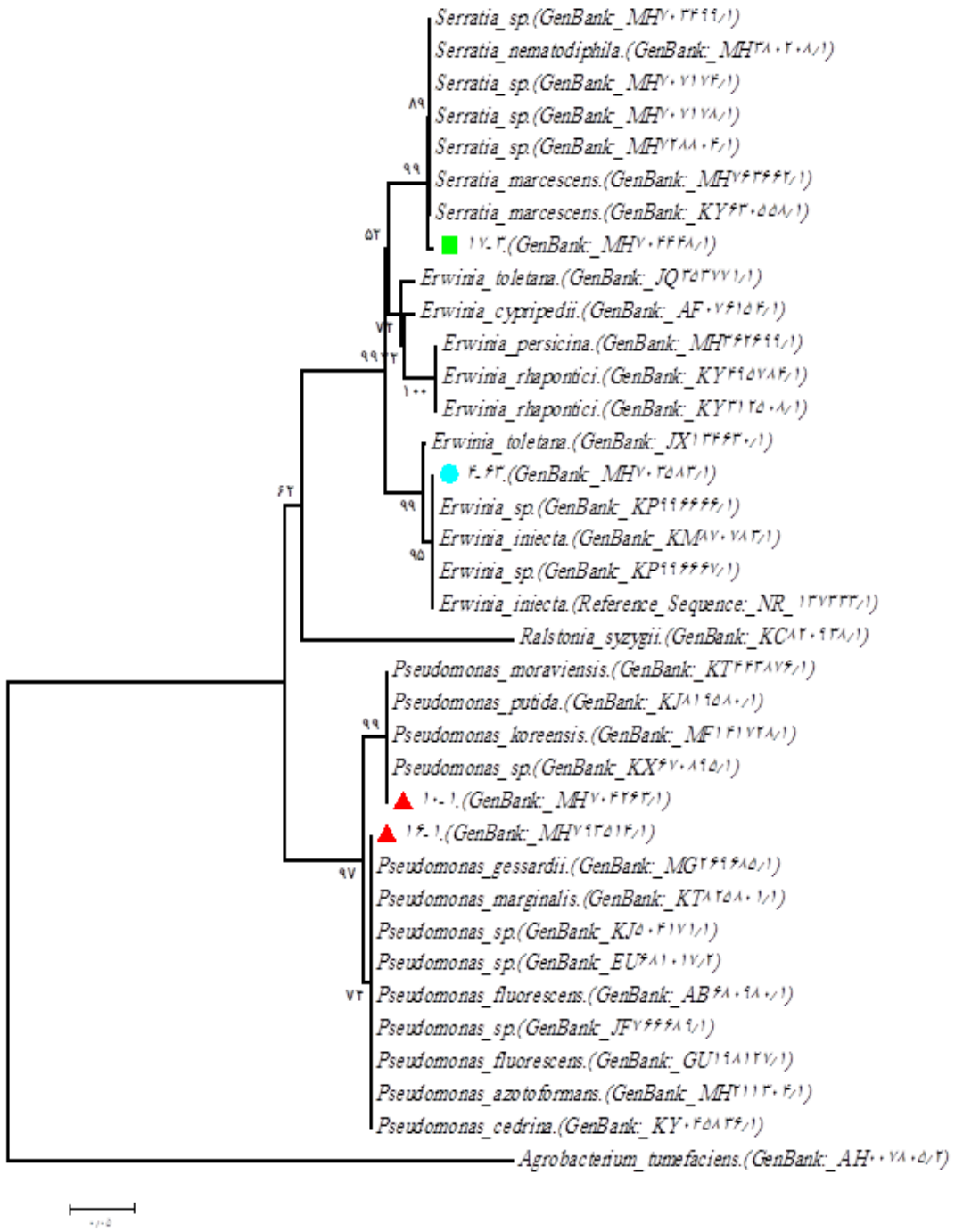
شکل ۵ .تکثیر قطعه ۱۳۰۰جفت بازی ناحیه 16SrDNA جدایه‌های ضدهسته یخ توسط جفت آغازگر 63f و 1387r.

M: Lader, A*: serattia sp*., B: *Pseudomonas sp*.C*: Erwinia iniecta*, D: *Escherichia fergusoni*

Figure 5. Amplification of 1300 bp fragment of 16SrDNA region of anti-ice isolates by primer pairs 63f and 1387r.

M: Lader, A: serattia sp., B: Pseudomonas sp.C: Erwinia iniecta, D: Escherichia fergusoni

بررسی ارتباط فیلوژنتیکی جدایه‌ها بر اساس توالی 16srDNA



شکل ۶. درخت فیلوژنی نشان دهنده ارتباط بین توالی ناحیه 16SrDNA جدایه‌های *Serratia sp* ، *Pseudomonas sp* ، *Erwinia iniecta*، *Escherichia fergusonii* و سایر جدایه‌های ثبت شده در ژن بانک با روش اتصال همسایه‌ها (Neighbor Joining) و با برنامه MEGA7. اعداد ثبت شده در محل انشعاب‌ها نشانگر درصد تأیید خوشه بندی با ۱۰۰۰ تکرار نمونه برداری (bootstrap) است.

Figure 6. Phylogenetic tree showing the relationship between the 16S rDNA gene sequences of antifreeze bacteria (*Serratia sp* ،*Pseudomonas sp*. *Erwinia iniecta* ،*Escherichia fergusonii*) and closest strains for each isolate in GenBank. Bootstrap analyses were made with 1000 cycles.

بحث و نتیجه گیری اهمیت اقتصادی پسته در بخش تولید داخلی و صادرات کشور بسیار واضح است. هرساله کاهـش ناگهانی دما در اواخر زمستان و اوایل بهار باعث آسیب قابل‌توجه محصول سال جاری و حتی از بین رفتن جوانه‌های بارده سال بعد می‌گردد. وجود منابع و مستندات فراوان در نقش باکتری‌های هسته یخ در بروز آسیب سرمازدگی، ضرورت بررسی و مطالعه درخصوص این باکتری‌ها را در جهت ارائه راهکارهای مفید برای مدیریت سرمازدگی این محصول باارزش بیان می‌کند (Hirano and Upper, 2000). یکی از زمینه های بیولوژیک کنترل سرمازدگی، مطالعه پروتئین‌های ضدیخ[1]می باشد که به‌طور طبیعی در شرایط آب و هوای سرد روی برگ‌ها وجود دارند. پروتئین‌های ضدانجماد موجود درگیاهان حتی در غلظت‌های پایین مانع یخ‌زدگی کریستال یخ در بافت گیاهی می‌شود. طی دو دهه گذشته، پروتئین‌های ضد یخ مختلفی در حیوانات، حشرات، قارچ‌ها، باکتری‌ها و گیاهان و همیشه در گونه‌هایی که در معرض دمای کم قرار گرفته اند بیشتر گزارش شده است (Cai *et al*., 2011). تولید این پروتئین‌ها در بسیاری از گیاهان نیز گزارش شده‌است (Wu *et al*., 2015). برخی گیاهان در زمستان، پروتئین‌های ضد انجماد را تولید می‌کنند (Hassas-Roudsari and Goff, 2012). وجود این نوع پروتئین‌ها در باکتری‌ها نیز به اثبات رسیده است که مطالعه روی آنها می‌تواند گامی به سوی مدیریت سرمازدگی باشد. در این مطالعه سعی شد، از بین باکتری‌های اپی فیت پسته، باکتری هایی شناسایی شوند که مانع از فعالیت هسته یخ جدایه شاهد (*Pseudomonas syringae*)گردند. از بین ۱۰۰ جدایه اپیفیت ارزیابی شده در آزمون هسته یخ، تعداد چهار جدایه همانندتیمار ضدیخ اتومبیل، مانع از یخ زدن سوسپانسیون حاوی (*Pseudomonas syringae*)شدند. عملکرد ممانعت از یخ زدگی در این جدایه ها در گیاهچه‌های گندم که به مدت ۴۰ دقیقه در شرایط دمایی فوق سرد قرار گرفته بودند تایید شد. بررسی مکانسیم عملکرد این چهار جدایه در مطالعات تکمیلی لازم وضروری است. هدف از این مطالعه شناسایی جدایه های اپی فیت ضد هسته یخ عنوان شده که به روش بیوشیمیایی و توالی یابی بخشی از ژن16sr DNA انجام شد. در نتیجه شناسایی بر اساس آزمون های بیوشیمیایی جدایه 3-17 بیشترین شباهت را به گونه *Serratia* sp. نشان می‌داد. با توجه به اینکه این باکتری دارای پرگنه‌های قرمزرنگ روی محیط کشت آگار مغذی بود، که قادر به هیدرولیز اسکولین، ژلاتین، کازئین و توئین ۸۰ بودند اما قادر به هیدرولیز آربوتین نبودند. این جدایه در آزمون‌های آرژنین دی هیدرولاز، احیا سوکروز منفی بود و روی محیط کشت ائوزین متیلن بلو[2] تولید رنگ مسی می‌کند که با نتایج بررسی‌های (Schaad *et al*., 2001) مطابقت داشت. این جدایه با کد شاخص MH704448 در پایگاه NCBI ثبت توالی شد. تا کنون گزارشی در خصوص تولید پروتئین‌های ضد یخ از این گونه در منابع وجود ندارد اما به‌عنوان باکتری اپی فیت از سطح گیاهان و همراه ذرات گرد وغبار جو جداسازی شده است (Grimont *et al*, 1981). یکی دیگر از باکتری‌های شناسایی شده در این مطالعه *Pseudomonas* sp. است. تولید پروتئین‌های ضد هسته یخ از جمله *P. putida* در برخی منابع گزارش شده است (Sun *et al*., 1995). ازآنجا که این گونه باکتریایی از یخچال‌های طبیعی قطب شمال جداسازی شده است (Muryoi *et al*., 2004)، قادر است دماهای بین °C ۲۰- تا۵۰- را بدون انجماد به کمک پروتئین‌های آنتی فریز (ضد یخ) تحمل کند (Sun *et al*., 1995). این باکتری مهم می‌تواند پس‌از قرار گرفتن در محیط به مدت ۲۰۰ روز در سطح گیاهان به بقای خود ادامه بدهد (Molina *et al*., 2000). لذا با مطالعه بر روی شرایط مناسب برای بیان ژن‌های هسته یخ و همچنین ژن‌های ضد هسته یخ می‌توان از این استرین و استرین‌های مشابه، به‌عنوان باکتری‌های ضد هسته یخ سازگار با فیلوسفر گیاه و به‌عنوان کنترل بیولوژیک در مقابل باکتری‌های هسته استفاده نمود. مشروط بر اینکه توان بیماری‌زایی آن‌ها و همچنین توانایی عملکرد ضدیخی در شرایط باغ بررسی شود. جدایه *Escherichia fergusonii* یکی دیگر از جدایه های شناسایی شده در

1 AFP: Antifreeze protein

2 EMB

این مطالعه است. در منابع این جدایه بصورت اندوفیت از بافت‌های گیاه قهوه جداسازی شده است که به عنوان یک باکتری محرک رشد سبزینه گیاه و عامل کنترل بیولوژیک زنگ قهوه معرفی شده است (Harllen *et al* 2012 ., جدایه *Eerwinia iniecta* باکتری دیگری است که در این مطالعه فعالیت ضدهسته یخی نشان داد. این باکتری گرم منفی میله ای شکل متعلق به خانواده Entrobactericeae است که تا کنون گزارشی از بیماریزایی آن روی گیاهان اعلام نشده است (Campillo *et al*., 2015). ازآنجاکه استفاده از توالی‌های 16srDNA به‌عنوان یکی از استانداردهای تشخیص در باکتری‌شناسی است (Janda and Abbot, 2007)، در قدم اول، توالی‌یابی این ناحیه از اپران ریبوزومی برای شناسایی جدایه‌های منتخب استفاده شد. در این پژوهش در هم‌ترازی ترادف توالی‌های 16s rDNA با توالی‌های موجود در بانک ژن، تمام جدایه‌ها تشابه بالای ۹۹ درصدی به گونه‌های معرفی شده در جدول (۳) نشان دادند.

هرساله تنش سرمای دیررس بهاره خسارات زیادی را به درختان پسته در استان کرمان وارد می‌سازد. مطالعه برای یافتن باکتری‌های مشابه که تولیدکننده پروتئین‌های ضدیخ باشند یکی از این راهبردهاست. تلاش برای یافتن این‌گونه موارد می‌تواند افقی روشن را در زمینه مدیریت خسارت سرمازدگی پیش رو داشته باشد.

پیشنهادات

ردیابی ژن‌های مولد پروتئین‌های ضد یخ با استفاده از پرایمرهای اختصاصی درباکتری‌های اپی فیت. استفاده از پرایمرهای اختصاصی در تکثیر قطعات اختصاصی در هر جنس وگونه در تکمیل شناسایی مولکولی جدایه‌ها.

REFRENSES

Ausuble F, Brent FM , Kingestone RE, Moor DD, Smith JA , Seideman JG Struhl K(1988) Current Protocol in Molecular Biology. Greene, Publishing Associates, Wiley Interscience, New York, USA. 4757 p.

Buttner MP , Amy PS(1989) Survival of ice nucleation-active and genetically engineerednon ice nucleating *Pseudomonas syringae* strains after freezing. Applied and Environmental Microbiology, 55: 1690-1694.

Cai Y , Liu S, Liao X, Ding Y, Sun J , Dabing Z (2011) Purification and partial characterization of antifreeze proteins from leaves of *Ligustrum lucidum* Ait. Food and Bioproducts Processing, 89: 98-102.

Cambours MA (2004) Ice nucleation-active and pathogenic bacteria in Swedish and Estonian Salix short-rotation forestry plantations suffering from frost-related dieback. B.Sc. Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala

Campillo T, Luna E, Portier P, Fischer-Le Saux M, Lapitan N, Tisserat NA, & Leach J E (2015). *Erwinia iniecta* sp. nov., isolated from Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia*). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 65:3625-3633.

Dickson RE , Isebrand JG (1991) Leaves as regulators of stress responses, p. 3–34. In: H.A. Mooney, W.E. Winner, and E.J. Pell (eds.). Response of plants to multiple stresses.Academic Press, San Diego, pp.1-2, 6-15.

Fahy PC, Persley GJ (1983) Plant Bacterial Diseases.A Diagnostic Guide.Academic Press, Sydney Australia. pp. 337-375.

Fahy GM , MacFarlane DR, Angell CR , Meryman HT (1984) Vitrificationas an approach to cryopreservation, Cryobiology, 21:407-426.

Grimont PA, Grimont F , Starr MP (1981) *Serratia* species isolated from plants. Current Microbiology, 5:317-322.

Harllen SA, Silva João PL, Tozzi, César R F (2012) Endophytic microorganisms from coffee tissues as plant growth promoters and biocontrol agents of coffee leaf rust. Biological Control, 63:62-67.

Hassas-Roudsari M , Goff HD (2012) Ice structuring proteins from plants: Mechanism of action and food application. Food research international, 46: 425-436.

Hirano SS , Upper CD (1985) Ecology and physiology of *Pseudomonas syringae*, Biotechnology, 3:1074-1078.

Hirano SS , Upper CD (2000) Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*a pathogen, ice nucleus, and epiphyte, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 64:624-653.

Hugh R , Leifson E (1953) The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria, Journal of Bacteriology, 66:24-66.

Janda JM , Abbott SL (2007) 16SrRNA gene sequencing for bacterial identification inThe diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. Journal of Clinical Microbiology, 45:2761-2764.

Kawahara H , Nakano Y , Omiya K , Muryoi N , Nishikawa J , Obata H(2004) Production of two types of ice crystal-controlling proteins in Antarctic bacterium,Journal of Bioscience and Bioengineering, 3:220-223.

Kawahara H (2008) Cryoprotectants and ice-binding proteins. In Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology. Springer, Berlin, pp. 229- 314.

Kovacs N (1956) Identification of *Pseudomonas pyocyana* by the oxidase reaction. Nature, 178: 703-704.

Lindow SE (1982) Population dynamics of epiphytic ice nucleation active bacteria on frost sensitive plants and frost control by means of antagonistic bacteria.Plant Cold Hardines and Freezing Stress 2:395–416

Lindow SE (1983) The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants. Annual Review of Phytopathology, 21:363-384

Marchesi JR , Sato T, Weightman AJ , Martin TA , Fry JC , Hiom SJ (1998) Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16SrRNA. Applied and Environmental Microbiology, 64: 795-799.

MirMohammadiMeybodi A , Torkesh Esfahani S (2004) Management of cold stresses and freezing of crops and orchards. Jihad Daneshgahi Publications, Isfahan, page 330 (In Persian with English summary).

Molina L , Ramos C , Duque E , Ronchel MC , Garcia JM , Wyke L (2000) Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plant sunder greenhouse and environmental conditions. Soil Biology and Biochemistry, 32:315-321.

Muryoi N, Sato M , Kaneko S. Kawahara H, Obata H ,Yaish MW (2004) Cloning and expression of afpA, a gene encoding an antifreeze protein from the arctic plant growth-promoting Rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. Journal of Bacteriology, 186: 5661- 5671.

Ramstedt M, Astrom B, Von Fircks HA (1994) Dieback of poplar and willow caused by Pseudomonas syringae in combination with freezing stress. Eur J For Pathol 24:305–315

Rostami M , Hasanzadeh N , Khodaygan P , Riahi-Madva A (2018) Ice nucleation active bacteria from pistachio in Kerman Province, Iran. *Journal of Plant Pathology*, *100*(1), 51-58.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning: A LaboratoryManual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 1626.

Schaad NW , Jones JB , Chun W (2001) Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic (3th ed.), American Phytopathological Society (APS Press), New -York, pp. 373.

Sun X , Griffith M , Pasternak JJ , Glick BR (1995) Low temperature growth, freezing survival, and production of antifreeze protein by the plant growth promoting *rhizobacterium Pseudomonas putida* GR12-2. Canadian Journal of Microbiology**,** 41:776-784.

Thornley MJ (1960) The differentiation of *Pseudomonas* from other Gram- negative bacteria on the basis of arginine metabolism. Journal of Applied Bacteriology , 23:37-52

Wilson SL , Kelley DL , Walker VK (2006) Ice-active characteristics of soil bacteria selected by ice-affinity. Environmental Microbiology, 8:816-1824.

Ustun NS, Turhan S. (2015). Antifreeze proteins: Characteristics, function, mechanism of action, sources and application to foods. Journal of food processing and preservation, *39*(6): 3189-3197.

Włostowski T , Bonda E , Krasowska A (2008) Effect of cold on lipid peroxidatioin the brown adipose tissue and liver of rats. Journal of Thermal Biology33:180-184.

Wu J, Rong Y, Wang Z, Zhou Y, Wang S, Zhao B (2015) Isolation and characterisation of sericin antifreeze peptides and molecular dynamics modeling of their Ice-binding interaction. Food chemistry, 174:621-629.

Zykova VV, Grabelnych OI , Antipina AI, Koroleva NA , Vladimirova SV, Kolesnichenko AV, Pobezhimova TP, Voinikov VK (2000) Plant stress-related uncoupling protein CSP310 caused lipid peroxidation in winter wheat mitochondria under chilling stress. Journal of Thermal Biology, 25:323-327.