ژنتیک نوین
دوره چهاردهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۸
صفحه ٥٤ - ٤٩

مطالعات ژنتیکی روی ژن هسته یخ باکتری *Bacillus cereus* عامل سرمازدگی گیاه پیاز (*Allium cepa*)

Genetic studies on *Bacillus cereus*, the cause of cold damage on onion plant (*Allium cepa*)

سارا کرکزی[۱]، پریسا عبداللهی*[۱]، نادر حسن‌زاده راستگاری[۲]

۱- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار، گروه بیوتکنولوژی و به نژادی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه گیاهپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

Karkazi S[1], Abdollahi P[*1], Hasanzadeh rastegari N[2]

1- MSc Student, Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Science and Research branch, Islamic Azad university, Tehran, Iran
2- Associate Professor, Department of Plant Protection, Science and Research branch, Islamic Azad university, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: abdollahi@srbiau.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰٤/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۱۵)

چکیده

باکتری‌های فعال هسته یخ به‌دلیل تسریع فرآیند یخ‌زدگی در دمای ۵- °C و دماهای بالاتر، یکی از عوامل مهم سرمازدگی در سطح مزارع و باغ‌های کشور هستند. به‌منظور شناسایی باکتری‌های دارای ژن هسته یخ، چندین نمونه باکتریائی با قدرت هسته یخ جداسازی شد که نهایتاً باکتری عامل سرمازدگی گیاه پیاز انتخاب شد. جهت ارزیابی فعالیت هسته یخ از آزمون انجماد درون لوله‌ای و انجماد قطره‌ای استفاده شد. شناسایی به روش معمول صفات فنوتیپی انجام گرفت و جدایه باکتریائی در سطح جنس *Bacillus* شناسائی شد. با تکثیر ژن *16SrRNA* و بلاست توالی در سایت NCBI تعلق آن به گونه *Bacillus cereus* محرز شد. به‌دلیل عدم وجود ژن مولد هسته یخ برای جدایه مذکور در سایت NCBI آغازگری مشابه با آغازگرهای تعریف شده برای ژن هسته یخ در *Pseudomonas syringae* با این فرض که ژن *ina* در *B. cereus* مشابه با ژن هسته یخ (*inaZ*) در *Pseudomonas syringae* است طراحی شد و برای ردیابی ژن هسته یخ (*ina*) آنالیز واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام گرفت. در ادامه تحقیق با استفاده از آغازگر *16SrRNA*، فرآیند همسانه‌سازی و استخراج پلاسمید به‌منظور انجام توالی‌یابی دقیق‌تر انجام گرفت. این اولین گزارش از وجود ژن هسته یخ در گونه *Bacillus cereus* است.

واژه‌های کلیدی

همسانه‌سازی

هسته یخ

INA

Bacillus cereus

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-06-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.1.5.9]

مقدمه

تنش‌های محیطی مهم‌ترین عوامل محدود کننده در عملکرد محصولات هستند. یخ‌زدگی یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی است که منجر به خسارت اقتصادی و نابودی گیاهان می‌شود. تنش یخ‌زدگی در شرایطی پیش می‌آید که دما به پایین‌تر از نقطه انجماد آب برسد. آب به‌طور بالقوه در دماهای زیر صفر درجه سلسیوس منجمد نمی‌شود. آب کاملاً خالص در دمای ۴۰°C- یخ می‌زند. ناخالصی‌های موجود در آب شامل ذرات گردوغبار، باکتری‌های مولد هسته یخ و غیره هستندکه موجب می‌شوند آب در دماهای بالاتر از ۲°C- منجمد شود (Warren et al. 1987). باکتری‌های دارای ژن فعال هسته یخ INA^+[1]به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل بیولوژیکی تشکیل هسته یخ در گیاهان، نقش عمده‌ای در تسریع سرمازدگی در دماهای زیر صفردرجه دارند. در واقع زمانی‌که جمعیتی از این باکتری وجود داشته باشد، دمای یخ‌زدگی تا ۲°C- افزایش می‌یابد (Warren et al. 1986). محل حضور هسته‌های یخ، تعیین کننده ادامه زندگی یا مرگ سلول‌های گیاهان است. بدون حضور باکتری‌های مولد هسته یخ خسارت سرمازدگی محدود به سرشاخه‌ها بوده و گیاه می‌تواند بهبودی خود را باز یابد. اگر هسته‌های یخ منحصراً در خارج سلول‌ها حضور داشته باشند، گیاه پژمرده شده ولی زنده می‌ماند. چنانچه کریستال‌های یخ در داخل سلول تشکیل شود به ساختار داخلی آن‌ها آسیب زده و منجر به مرگ سلولی می‌شود اگر هسته‌های یخ نتوانند به داخل یا خارج سلول‌ها نفوذ کنند، هر چند سلول و فضای اطراف آن حالت شیشه‌ای پیدا کرده ولی زنده می‌ماند (Fahy et al. 1984).

پدیده‌ی هسته یخ‌زایی باکتریایی اولین بار در سال ۱۹۷٤ در سویه‌های *Pseudomonas syringae* مشاهده شد. بعداً مشخص شد که جدایه‌های *Pseudomonas viridifiava*، *P. Xantomunas* و *Erwinia herbicola* و *translucens* pv. *translucens* و *fluorescens* توانایی ایجاد یخ‌زدگی را دارند. فعالیت هسته یخ در گونه‌های دیگر نظیر *Sphingomonas* sp. و *Bacillus* sp. نیز مورد تأیید قرار گرفته است (Maki et al. 1974). باکتری‌های مولد هسته یخ، اکثراً گرم منفی، اپی‌فیت و بیمارگر هستند. این باکتری‌ها در سه گروه طبقه‌بندی شده‌اند؛ گروه A شامل باکتری‌هایی است که در دمای ۵ °C- یا در دماهای بالاتر فعال هستند، گروه B که در دماهای ۵°C- تا ۸- تولید هسته یخ می‌نمایند و گروه C که در دمای ۱۰ °C - و یا کمتر فعالیت تشکیل هسته یخ را دارند (Hasanzadeh 1995). بیان و فراوانی هسته‌های یخ در باکتری‌های مولد هسته یخ تحت تأثیر عوامل مختلفی است. به‌عنوان مثال در محیط کشت حاوی گلیسرول در دمای ۱٦ °C بیش‌ترین فراوانی هسته یخ مشاهده شده‌است (Lindow et al. 1982).

همه ساله بخش عمده محصولات اقتصادی مهم کشور، در معرض تنش سرما قرار می‌گیرد و میکروارگانیزم‌های تولیدکننده هسته‌های یخی به‌ویژه باکتری‌ها از عوامل تشدید کننده‌ی سرمازدگی هستند. این پدیده و خسارت‌های ناشی از آن نه فقط در ایران بلکه در اکثر کشورهای جهان وجود دارد و از آن جایی که سالانه خسارات زیادی به کشاورزان و باغداران از طریق وقوع یخبندان و در نتیجه سرمازدگی محصولات وارد می‌شود ارایه راهکارهای مناسب جهت کاهش خسارات ناشی از آن ضروری به‌نظر می‌رسد. به‌کارگیری روش‌های متفاوت زیست فناوری می‌تواند با تغییر فلور میکروبی و کاهش میکروارگانیزم‌های تولیدکننده هسته یخ به کنترل خسارت سرمازدگی و پیشگیری از آن کمک کند. غیرفعال شدن ژن عامل هسته یخ می‌تواند باعث تولید جدایه‌هایی شود که در همه‌ی خواص مورفولوژیکی، اکولوژیکی و اپی‌فیتی به جز قابلیت تشکیل هسته یخ، مشابه جدایه‌ی والد دارای هسته یخ هستند. تکثیر و انتقال این جدایه‌های دستکاری شده ژنتیکی روی گیاهان باعث می‌شود که به رقابت با والد وحشی خود پرداخته و از استقرار آن جلوگیری می‌کنند. جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولیدکننده هسته یخ اولین گام برای مطالعات ژنتیکی و بررسی امکان دستکاری ژنتیکی این باکتری‌ها به‌منظور کاهش و کنترل خسارت سرمازدگی است. در پژوهش حاضر جداسازی و شناسایی باکتری‌های مولد هسته یخ در گیاه پیاز با استفاده از روش‌های ریخت‌شناسی، بیوشیمیایی و ژنتیکی به‌منظور مطالعه کارکرد ژن باکتری مولد هسته یخ انجام گرفته است.

[1] Ice Nucleation Activity

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-06-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.1.5.9]

مواد و روش‌ها

جدایه باکتری از گیاه پیاز (*Allium cepa*) با علائم سرمازدگی و لهیدگی جداسازی شد. پس از کشت، خالص‌سازی و اثبات بیماری‌زایی روی محیط کشت نوترینت آگار حاوی ۱ درصد ساکاروز در دمای ٤ °C نگهداری شد.

شناسایی اولیه باکتری به کمک آزمون لوپات (تولید لوان، اکسیداز، لهانیدن سیب‌زمینی، تولید آرژنین‌دی‌هیدروژلاز و ایجاد فوق حساسیت در توتون) انجام گرفت (Klement et al. 1964).

آزمون انجماد قطره‌ای برای تعیین فعالیت هسته یخ، طبق روش مارکو و لیندو انجام شد (Lindow et al. 1987). بدین منظور سوسپانسیونی با غلظت 10^8cfu/ml از باکتری کشت شده روی محیط کشت آگارمغذی حاوی ساکارز، با ۱/۵ درصد گلیسیرین تهیه شد. سوسپانسیون باکتری در سه رقت مختلف تهیه شد. در ابتدا چند کلنی از باکتری در یک میلی‌لیتر آب‌مقطر استریل حل شد و طی سه مرحله اینوکلوم اولیه هر بار با یک میلی‌لیتر آب مقطر استریل رقیق‌سازی و سری رقت‌های ۱:۱، ۱:۲ و ۱:۳ به‌عنوان کنترل منفی تهیه شد. قطراتی به حجم ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون‌های به‌دست آمده روی فویل آلومینیومی که سطح آن با پارافین محلول در زایلن پوشیده شده بود و در دمای ۵ °C- تا ۱۰ °C- قرار داده و تشکیل هسته یخ با چشم غیر مسلح بررسی شد. در صورتی که قطره‌ها در مدت زمان کم‌تر از ۵ دقیقه یخ می‌زدند، فعالیت هسته یخ برای باکتری مثبت تلقی می‌شد. آب‌مقطر به‌عنوان شاهد این آزمایش بود.

از سوسپانسیون باکتری جهت آزمون انجماد درون لوله‌ای در کنار لوله حاوی آب‌مقطر استریل به‌عنوان شاهد نیز استفاده شد. برای اطمینان از صحت آزمون مخلوط باکتری مورد نظر و باکتری *P. syringae* استفاده شد. لوله‌های حاوی سوسپانسیون باکتری و آب‌مقطر شاهد در بشر حاوی مخلوط آب و نمک و در فریزر ۲۰°C- قرار داده شده و پس از گذشت یک تا دو دقیقه نتایج ثبت شدند.

استخراج DNA به روش CTAB صورت گرفت (Nishiguchi et al. 2002). به‌منظور تکثیر ژن *16SrRNA* آغازگرهای 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3' و 5'- CGGGTTACCTTGTTACGACTT -3' به‌کار گرفته شدند (Lane 1991). به‌منظور بهینه‌سازی واکنش PCR غلظت‌های مختلف DNA مخلوط با 1µM از هر کدام از آغازگرها و 1X بافر Mastermix PCR به‌همراه یک واحد آنزیم *Taq* DNA polymerase و حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر استفاده شد. واکنش PCR با شرایط دمایی ۳ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹٤ °C (یک چرخه) و ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹٤ °C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ٥٦ °C به مدت ۳۰ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ °C به مدت ۲ دقیقه، نهایتاً یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه انجام شد و محصول تکثیر شده به کمک ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد.

پیش از انجام همسانه‌سازی به‌منظور شستشو و خالص‌سازی محصول PCR، ۲ میکرولیتر سدیم استات و ۸ میکرولیتر ایزوپروپانول به ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR اضافه و مخلوط شدند. مخلوط حاصل پس از آنکه به مدت ۲۵ دقیقه در فریزر ۸۰°C- قرار داده شد، به مدت ۲۰ دقیقه در ۱٦۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. فاز رویی میکروتیوپ خالی شده و مقدار ۱۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد به آن اضافه شد. پس از سانتریفیوژ به مدت ۲۰ دقیقه در ۱٦۰۰۰ rpm بار دیگر فاز رویی خالی شده و بعد از تبخیر کل اتانول موجود در میکروتیوپ در نهایت ۱۰ میکرولیتر آب‌مقطر استریل به آن اضافه نموده و در ۲۰°C- برای مرحله بعدی نگهداری شد.

درج محصول PCR در وکتور pTG19-T با استفاده از کیت TA Cloning شرکت سینا کلون (CL5841) مطابق با دستورالعمل موجود در کیت انجام شد. ژن مورد نظر به روش شوک حرارتی در باکتری *E. coli* همسانه‌سازی شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌های انتقال یافته، روی سطح پلیت LB-Ampicillin X-Gal/IPTG agar اسپری شده و بعد ازگذشت ۲٤ تا ٤۸ ساعت کلونی‌ها شامل کلونی‌های نوترکیب به رنگ سفید و کلونی‌های آبی فاقد پلاسمید نوترکیب رشد کردند. به‌منظور اطمینان از گزینش کلونی‌های سفید، کلونی PCR با استفاده از آغازگرهای رفت و برگشت عمومی M13 موجود در کیت انجام شد. استخراج پلاسمید کلونی‌های نوترکیب طبق دستورالعمل کیت Plasmid extractin Kit (Ex611) شرکت سیناژن، انجام گرفت. محصولات PCR برای امر توالی‌یابی با آغازگرهای رفت و

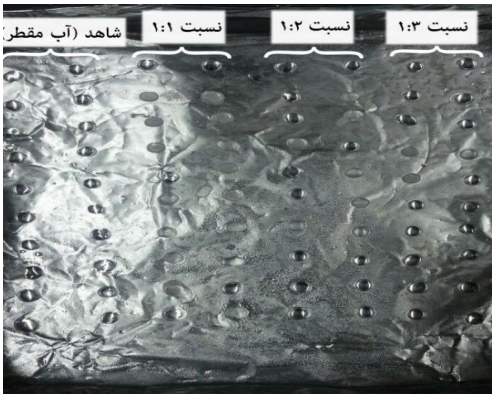
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-06-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.1.5.9]

برگشت *16SrRNA* به شرکت تکاپوزیست (Bioneer کره جنوبی) فرستاده شد.

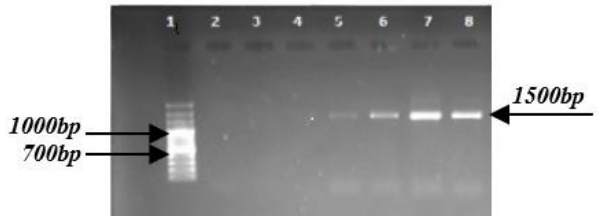
نتایج

پس از جداسازی و خالص‌سازی جدایه منتخب (*Bacillus* sp. A) به کمک آزمون‌های لوپات (LOPAT) شامل تولید لوان، اکسیداز، پوسیدگی نرم غده سیب‌زمینی، آرژنین دی هیدرولیزه و فوق حساسیت روی برگ توتون مشخص شد که سویه جداسازی شده یک باکتری گرم مثبت، متحرک، اکسیداز مثبت، حلالیت در پتاس مثبت، لوان منفی، آرژنین دی هیدرولیزه مثبت است که شکل سلول‌ها در زیر میکروسکوپ نوری به شکل میله‌ای و خود کلنی‌هایی سفید و دیواره نامنظم داشت.

نتایج آزمون انجماد درون لوله‌ای برای اثبات توانایی تشکیل هسته یخ جدایه منتخب مشاهده و یادداشت برداری شد. باکتری *P. syringae* در فریزر ۲۰- °C در ۵ تا ۷ دقیقه و باکتری جدایه منتخب (*Bacillus* sp. A) در مدت بین ۷ تا ۱۳ دقیقه یخ زد. مخلوط باکتری *P. syringae* و جدایه باکتری منتخب در مدت ۷ دقیقه یخ زد که نشان داد باکتری مورد نظر ازتوان بالای هسته یخ برخوردار نمی‌باشد. نتایج مشابهی از آزمون انجماد قطره‌ای به‌دست آمد که نشان می‌دهد جدایه منتخب دارای فعالیت هسته یخ در دمای بین ٦ °C- تا ۱۷ °C- می‌باشد (شکل ۱).



شکل ۱- آزمون انجماد قطرات سوسپانسیون باکتری منتخب strain A *Bacillus cereus* روی ورق آلومینیومی آغشته به زایلن. قطرات حاوی سوسپانسیون باکتری در سه رقت مختلف محاسبه شد. قطرات یخ‌زده ظاهری کدر نسبت به قطرات یخ نزده داشت.



شکل ۲- الکتروفورز محصول واکنش PCR ژن *16SrRNA* جدایه منتخب strain A *Bacillus cereus* اعداد به‌ترتیب ۱) نشانگر مولکولی 1kb، شرکت Thermo ، ۲)کنترل منفی، ۳، ٤، ٥، ٦) DNA باکتری منتخب با غلظت‌های ۳٤/٥ng/ul، ٥۲/۹، ٤٥/٥، ٦۹/۸، ۷ و ۸) DNA باکتری منتخب در غلظت ۱۰۸ ng/ul.

در آنالیز PCR ژن *16SrRNA* سویه منتخب قطعه‌ای در اندازه حدود 1500 kb تکثیر شد (شکل ۲). نتیجه تطابق توالی ژن *16S rRNA* همسانه‌سازی شده با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعات ژنومی NCBI نشان داد که جدایه منتخب ۹۷ درصد شباهت به گونه باکتری *Bacillus cereus* strain A دارد.

بحث

پیاز (*Allium cepa*) از قدیمی‌ترین سبزی‌ها و صیفی‌جات خوراکی در دنیا و ایران به‌شمار می‌رود. سطح زیر کشت این محصول ٦۲۲۹۷ هکتار و میزان تولید آن در کل کشور ٤۹۹٥۳۲۷ هکتار می‌باشد (Ahmadi et al. 2016). از بعد گیاه‌شناسی این گیاه به خانواده آلیاسه (Alliaceae) تعلق دارد و کشت آن تماماً بستگی به شرایط محیطی دارد. زیرا درجه حرارت و طول روز در تشکیل غده پیاز حائز اهمیت است. از این رو ارقام پیاز که در سه گروه روز بلند، روز متوسط و روز کوتاه تقسیم‌بندی می‌شوند به تناسب شرایط محیطی استان‌های مختلف کشور انتخاب و کشت می‌شوند. به‌طور مثال رقم روز بلند پیاز قرمز در ابتدای فروردین ماه کشت می‌شود که تقریبا مقاوم به سرما است.

این گیاه برغم داشتن ده‌ها مواد ضدمیکروبی به تعدادی از عوامل قارچی و باکتریائی حساسیت دارد. از مهم‌ترین عوامل باکتریائی می‌توان به باکتری‌های عامل پوسیدگی نرم چون *Burkholderia cepacia*، *Burkholderia gladioli* subsp. *alliicola* و *Burkholderia cepacia* اشاره نمود.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-06-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.1.5.9]

هیچ‌یک از عوامل فوق روی گیاهان ایجاد سرمازدگی نمی‌کنند. بالعکس، تعدادی از گونه‌های جنس *Bacillus* در خانواده باسیلاسه (Bacillaceae) دارای ژن‌های مولد هسته یخ می‌باشند. این باکتری‌ها به‌دلیل ترشح آنزیم‌های مختلف و تشکیل اسپور در خاک و مواد غذایی، از اهمیت بالایی برخوردارند (Holt 2009). در مطالعه حاضر، اقدام به جداسازی سویه باسیلوس از پیاز شد که بر اساس آزمون‌های بیوشیمیائی و مولکولی خصوصیات آن با باکتری *Basillus cereus* مطابقت داشت.

از ویژگی‌های این باکتری‌ها تولید اسپور در شرایط نامناسب محیطی است. علاوه بر آن باکتری‌های فوق، به مواد ضد باکتریایی، حرارت، خشکی، یخ‌زدگی، سموم شیمیایی و دیگر فاکتورهای مضر محیطی مقاومت نشان می‌دهند (Jensen et al. 2003). به طوری‌که در آزمون تحمل دما که در دمای ۸۰°C به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد سلول‌های تیمار شده جدایه strain A *Bacillus cereus* قادر به رشد مجدد در محیط کشت NA بودند. بر پایه مقایسه توالی‌های دو ژن *16srRNA* و*23srRNA* جنس *Bacillus* به گروه‌های متعددی طبقه می‌شوند. در گروه *Bacillus cereus* شش گونه *B. cereus*، *B. thuringiensis*، *B. mycoides*، *B. anthracis*، *B. pseudomycoides* و *B. weihenstephanesis* قرار دارند (Sleytr 1988).

نقش‌های متنوعی برای باکتری‌های با قابلیت تولید هسته یخ از جمله *Bacillus*ها که از مکانیسم کنترلی INA تبعیت می‌کنند گزارش شده‌است. اخیرا دو جدایه با فعالیت هسته یخ در جنس جدید *Lysinibacillus* مورد شناسایی قرارگرفتند که نقش آن‌ها در آغاز بارش نزولات آسمانی بسیار حائز اهمیت بوده است. جنس مذکور گرم مثبت و پروتئین INA جدایه‌های آن بر خلاف سایر پروتئین‌های شناخته شده هسته یخ در باکتری‌ها که غالبا در اندازه‌های چند کیلو دالتون هستند، پروتئینی در حد نانومتر است که در برابر حرارت، لیزوزایم و پروتئیناز بسیار مقاوم می‌باشد. بنابراین مکانیسم عمل تولید هسته یخ و نقش پروتئین INA متنوع‌تر از حد انتظار است (Failor et al. 2017).

در تحقیق حاضر نتایج آزمون انجماد قطره‌ای و انجماد درون لوله‌ای برای اثبات فعالیت هسته یخی و ضدیخی نشان داد که جدایه *Bacillus cereus* strain A دارای فعالیت هسته یخ بوده و دارای ژن هسته یخ است. این باکتری، با باسیل‌های دارای توانایی تولید هسته یخ که از مناطق یخبندان جداسازی شده بودند دارای ۹۶ درصد شباهت توالی بودند (Mortazavi et al. 2015). امروزه ژن‌های هسته یخ که به نام‌های مختلف در گونه‌های مختلف شناسائی و تعیین توالی شده‌اند از پنج گونه باکتریایی کلون، توالی‌یابی و با نام‌های مختلف گزارش شده‌است. این ژن‌ها عبارتند از: *inaZ* از *Pseudomonas syringae* (Green and Warren 1985)، *inaW* از *Pseudomonas fluorescens* (Warren et al. 1986)، *ice E* از (*Erwinia herbicola*) *agglomerans* (Warren and Corotto, 1989)، *inaA* از (*Erwinia uredoura*) *Pantoea ananas* (Abe et al. 1989) و *inaX* از *Xanthomonas translucens* (Zhao et al. 1990). توالی این ژن در بین پنج گونه‌ی ذکر شده بسیار حفاظت شده بوده و شامل نواحی تکراری و متناوب در مجاورت نواحی پایانه‌های C و N است. با توجه به حفاظت شدید این توالی بین گونه‌ها احتمال اینکه ژن منشاء غیر باکتریایی داشته باشد، بعید است (Edwards et al. 1994).

در این پژوهش به‌منظور تکثیر ژن *ina* سویه منتخب، آغازگرهایی بر اساس توالی ژن هسته یخ *inaZ* در باکتری *Pseudomonas syringae* طراحی شد که با توجه به عدم تکرار پذیری در تکثیر قطعه مورد انتظار به‌کمک آغازگرها و حضور قطعات تکثیرشده با اندازه‌های تصادفی نتیجه‌گیری شد که سویه منتخب علی‌رغم وجود فعالیت هسته یخ فاقد ژن *inaZ* می‌باشد. اثبات اینکه فعالیت تشکیل هسته یخ سویه منتخب *Bacillus cereus* strain A به ژن‌های دیگر *ina* مرتبط است نیازمند آزمایشات تکمیلی بیشتر است.

نتایج به‌دست‌آمده از تحقیق حاضر نشان داد که باکتری‌های مولد هسته یخ بسیاری می‌توانند روی سطح گیاهان زراعی و باغی به صورت اپیفیت وجود داشته باشند که در شرایط محیطی خاص موجب خسارت‌های سنگین به محصولات زراعی و باغی بشوند. گزارش وجود چنین باکتری روی پیاز اولین بار است که حداقل از ایران گزارش می‌شود. با توجه به اهمیت محصول پیاز و کشت آن در مناطق مختلف کشور وجود این باکتری و باکتری‌های مشابه در مزارع و سردخانه‌ها و تکثیر آن‌ها می‌تواند در روند

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-06-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.1.5.9]

طبیعی تولید محصول به‌طور بالقوه خطرناک باشد. لذا مطالعات تکمیلی در همه ابعاد آن از جمله شناسائی و مدیریت آن‌ها می‌تواند حائز اهمیت باشد.

منابع

Abe K, Watabe S, Emori Y, Watanabe M, and Arai S (1989) An ice nucleation active gene of *Erwinia ananas*. Sequence similarity to those of *Pseudomonas species* and regions required for ice nucleation activity. FEBS Letters 58: 297-300.

Ahmadi K, Gholizadeh H and Ebadzadeh H (2016) Agriculture statistics. Ministry of agriculture jahad Press, Tehran, Iran. (In Farsi).

Edwards A R, Van Den Bussche R A, Wichman H A, and Orser C S (1994) Unusual pattern of bacterial ice nucleation gene evolution. Molecular Biology and Evolution 11:911-920.

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

Failor KC, Schmale DG 3rd, Vinatzer BA, Monteil CL (2017) Ice nucleation active bacteria in precipitation are genetically drive and nucleate ice by employing different mechanism. The IJSME 11: 2740-2753.

Green RL, Warren GJ (1985) Physical and functional repletion in a bacterial ice nucleation gene. Nature 317: 645-648.

Hasanzadeh N (1995) Principles and Methods of Plant Bacteriology. Islamic Azad University Press, Tehran, Iran. (In Farsi).

Holt JG, Krieg NR, Sneath PH, Staley JT, Williams ST (2009) In Williams BW and Aidan. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. USA. Baltimore. Springer Dordrecht Heidelberg London New York, 21-68.

Jensen GB, Hansen BM, Eilenberg J, Mahillon J (2003) The hidden life styles of *Bacillus cereus* and relatives. Environmental Microbiology 5: 8 631-640.

Klement Z, Farkas GL, Lovrelovich L (1964) Hypersensitive reaction induced by phytopathologenic bacteria in the tobacco leaf. Journal of Phytopathological 54: 474-477.

Lane DJ (1991) 16S/23S RNA sequencing. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic.E. Stackebrandt and M. Goodfellow, eds. New York, NY, John Wiley and Sons 115-175.

Lindow SE, Arny DC and Upper CD (1978a) Distribution of ice nucleation-active bacteria on plants in nature. Applied and Environmental Microbiology 36: 831-838.

Lindow SE, Hirano WR, Barchet DC, Amy and CD Upper (1982b) Relationship between ice nucleation frequency of bacteria and frost injury. The American Phytopathological Society 70: 1090-3.

Maki LR, Galyan EL, Chang-Chien MM and Caldwell DR (1974) Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae*. Applied Microbiology 28: 456-460.

Mortazavi R, Attiya S, Ariya PA (2015) Arctic microbial and next-generation sequencing approach for bacteria in snow and frost flowers, selected identification, abundance and freezing nucleation. Journal of Atmospheric Chemistry and Physics 15: 6183-6204.

Nishiguchi MK, Doukakis P, Egan M, Kizirian D, Phillips A, PrendiniL, Rosenbaum HC, Torres E, Wyner Y, DeSalle R and Giribet G. DNA Isolation Procedures. Methods and Tools in Biosciences and Medicine. Techniques in molecular systematics and evolution, ed. by Rob DeSalle et al. (2002) Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland. DOI: 10.1007/978-3-0348-8125-8_12.

Sleytr UB, Messner P (1988) Crystalline surface layers in prokaryotes. Journal of Bacteriology 70: 2891-2897.

Warren GJ, Lindemann J, Suslow TV, Green RL (1987) Ice nucleation deficient bacteria as frost protection agents. In: Applications of Biotechnology to Agricultural Chemistry (LeBaron L, Mumma R, Honeyeutt, and Duesing J. Eds) American Chemical Society. Washington DC.

Warren G, Corotto L (1989) The consensus sequence of ice nucleation proteins from *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas flurescens* and *Pseudomonas syringae*. Gene 85: 241-244.

Warren G, Corotto L, Wolber P (1986) Conserved repeats in diverged ice nucleation structural genes from two species of *Pseudomonas*. Nucleic Acids Research 14: 8047-8060.

Zhao J, Orser C (1990) Conserved repetition in the ice nucleation gene inaX from *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*. Molecular and General Genetics 223: 163-166.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-06-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.1.5.9]