نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد 29، شماره 3، پاییز 1394، ص. 458-449

Journal of Plant Protection
Vol. 29, No. 3, Fall 2015, P. 449-458

شناسایی و تخمین جمعیت باکتری‌های مولد هسته یخ جداسازی شده از درختان میوه هسته‌دار در استان خراسان رضوی

الهه طاهری[1]- سعید طریقی[2*]- پریسا طاهری[3]

تاریخ دریافت: 1393/11/22
تاریخ پذیرش: 1394/02/20

چکیده

باکتری‌های اپی‌فیت مولد هسته یخ، یکی از عوامل تشدید کننده سرمازدگی و شانکر در درختان میوه هسته‌دار می‌باشند. به منظور شناسایی این باکتری‌ها، در بهار سال 1392، تعداد 248 نمونه از سرشاخه‌های آلبالو، گیلاس، زردآلو، آلو، هلو، شلیل، بادام و گوجه سبز در استان خراسان رضوی (مشهد، شاندیز، کنگ، نقندر، زشک، اخلمد، چناران و نیشابور)، جمع‌آوری گردید. از هر منطقه دو باغ و از هر باغ چهار درخت بصورت تصادفی انتخاب شدند. با شمارش تعداد کلنی باکتری‌ها در هر گرم بافت گیاهی، جمعیت کل باکتری‌ها در مناطق و میزبان‌های مختلف تخمین زده شد. از هر نوع تیپ کلنی مشاهده شده بر روی محیط کشت، 10 کلنی به طور تصادفی انتخاب شدند. از میان 820 جدایه بررسی شده، 110 جدایه مولد هسته یخ بودند. این باکتری‌ها با استفاده از آزمون‌های مورفولوژیکیو بیوشیمیایی تفکیک گردیدند. بر اساس داده‌های به‌دست آمده، 56، 27، 8، 6 و 3 درصد از جدایه‌ها به ترتیب به عنوان *Pseudomonas syringae*، *P. fluorescens*، *P. viridiflava*، *Pantoeaagglomerans* و *Xanthomonas*sp. شناسایی شدند. نتایج مطالعه حاضر، تأیید کرد که بین علایم شانکر، خسارت سرمازدگی و جمعیت باکتری‌های مولد هسته یخ، رابطه مستقیمی وجود دارد. بنابراین شناسایی و تخمین جمعیت باکتری‌های مولد هسته یخ از اهمیت ویژه‌ای در پیش‌بینی وقوع سرمازدگی برخوردار است. در این تحقیق انواع گونه‌های باکتری مولد هسته یخ در باغات هسته دار استان خراسان رضوی مشخص و نوسانات جمعیت آن‌ها برای اولین بار ارزیابی شده است.

واژه‌های کلیدی: استان خراسان رضوی، باکتری‌های مولد هسته یخ، جمعیت، درختان میوه هسته‌دار

مقدمه

با توجه به اهمیت روز افزون محصولات مختلف درختان میوه هسته‌دار مانند هلو، شلیل، گوجه سبز، آلو، زردآلو و گیلاس در الگوی غذایی خانواده‌های ایرانی، این تولیدات به عنوان زیر مجموعه محصولات باغی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشند (3). مسئله سرمازدگی در ایران یکی از مشکلات اساسی بخش کشاورزی است و طبق آمار وزارت جهاد کشاورزی سالانه حدود 2000 میلیارد تومان خسارت سرمازدگی به محصولات کشاورزی وارد می‌شود (31).

با سرد شدن آب، حرکت مولکول‌های آن بیش از پیش کند می‌شود و سرانجام در دمای معینی انرژی جنبشی تعدادی از مولکول‌ها به قدری کم می‌شود که نیروهای بین مولکولی می‌توانند آن‌ها را در یک شبکه بلوری نگه دارند. در این حال انجماد آغاز می‌شود و مولکول‌های کم‌انرژی به‌تدریج در نقاطی از شبکه بلوری قرار می‌گیرند. آب به طور بالقوه در دماهای زیر صفر درجه سانتی‌گراد منجمد نمی‌شود. آب کاملاً خالص و بدون هیچ‌گونه ناخالصی در دمای 40- درجه سانتی‌گراد یخ می‌زند. ناخالصی‌های موجود در آب شامل ذرات گردوغبار، باکتری‌های مولد هسته یخ و غیره موجب می‌شوند که آب در دماهای بالاتر از 2- درجه سانتی‌گراد، منجمد گردد (42). در واقع این باکتری‌ها می‌توانند به عنوان تشکیل دهنده‌های اصلی هسته یخ فعال در روی برگ عمل نموده، و با تشکیل کریستال‌های یخ، آن‌ها را وارد دیواره سلولی یا پروتوپلاسم کنند (2).

به طور کلی یخ زدگی طی سه مرحله در سلول‌های گیاهان اتفاق می‌افتد. در اولین مرحله از یخ زدگی، آب بین سلولی منجمد شده و سپس، فشار بخار آب این ناحیه، کاهش یافته و آب آزاد از درون سلول به فضای بین سلولی منتقل می‌شود. در مرحله دوم، فرآیند انجماد تا حدی ادامه می‌یابد که تقریباً تمام آب آزاد درون سلولی، وارد فضای بین سلولی شده و منجمد می‌شود. این پدیده منجر به پلاسمولیز ناشی از یخ‌زدگی و در نتیجه گرانوله شدن (دانه دانه شدن) سیتوپلاسم می‌شود. در سومین مرحله آب درون اندامک‌ها نیز یخ‌زده و گیاه قطعاً می‌میرد (13). بدون حضور باکتری‌های مولد هسته یخ خسارت سرمازدگی محدود به سرشاخه‌ها بوده و گیاه می‌تواند بهبودی خود را باز یابد (9).

1، 2 و 3- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(* نویسنده مسئول: Email: starighi@um.ac.ir)

محل حضور هسته‌های یخ، تعیین کننده ادامه زندگی یا مرگ سلول‌های گیاهان می‌باشد. در اولین حالت، اگر هسته‌های یخ منحصراً در خارج سلول‌ها حضور داشته باشند، گیاه پژمرده شده ولی زنده می‌ماند. در حالت دوم، کریستال‌های یخ در داخل سلول تشکیل شده و به ساختار داخلی آن‌ها آسیب می‌زند که معمولاً منجر به مرگ سلول می‌گردد. در سومین حالت، اگر چنان‌چه هسته‌های یخ نتوانند به داخل یا خارج سلول‌ها نفوذ کنند، سلول و فضای اطراف آن حالت شیشه‌ای (Vitrification) پیدا کرده ولی زنده می‌ماند (2).

باکتری‌های مولد هسته یخ، اکثراً گرم منفی، اپی‌فیت، و بیمارگر هستند، به علاوه ممکن است سرما دوست بوده و یا دمای معتدل را ترجیح دهند. باکتری‌های مولد هسته یخ در سه گروه قرار گرفته‌اند که عبارتند از: کلاس A (شامل باکتری‌هایی که در دمای 5- درجه سانتی‌گراد یا در دماهای بالاتر فعال هستند)، کلاس B (در دماهای 5- تا 8- درجه سانتی‌گراد تولید هسته یخ می‌نماید) و کلاس C(در دمای 10- درجه سانتی‌گراد و یا کمتر فعالیت تشکیل یخ دارند). بر اساس نظریه محققان، پروتئین تولید شده توسط باکتری‌های موجود در کلاس Aو B، از پروتئین موجود در باکتری‌های کلاس Cمشتق شده‌اند. بنابراین اولین پروتئین بوجود آمده، قدرت هسته یخ پایینی داشته است(8).

ثابت شده است که بین پروتئین‌های مولد هسته یخ و لیپیدها، مخصوصاً فسفولیپیدها، و افزایش فعالیت هسته یخ، ارتباط مستقیمی وجود دارد (17). این ارتباطات به پروتئین اجازه می‌دهد تا به سطح غشای سلول متصل شده و امکان تجمع آن‌ها را برای افزایش فعالیت یخ زدگی فراهم آورد (6).

دانشمندان در طی مطالعات اخیر نشان دادند که اندازه مجموعه پروتئینی برعملکرد یخ زدگی آن‌ها تأثیر می‌گذارد (4 و7). توده‌های بزرگ پروتئینی 600 کیلو دالتون در جدایه *Pseudomonas fluorescens* KUAF-68، معمولاً هسته یخ، و پروتئین‌های با وزن مولکولی پایین‌تر از50 کیلودالتون، ضد یخ هستند (4 و 12). پروتئین‌های مولد هسته یخ که از نظر زیست محیطی ایمن بوده و به مقدار کافی موجود هستند، می‌توانند جایگزین مناسبی برای معادل غیر ارگانیک خود مثل یدیدنقره (Silver iodide) باشند. این پروتئینها کاربردهای زیادی دارند. از آن جمله می‌توان به تولید برف مصنوعی (5 و 43)، صرفه‌جویی در مصرف انرژی و زمان، جهت ایجاد یخ زدگی‌های مصنوعی در دماهای بالاتر از معمول (20)، کنترل بیولوژیک حشرات (41)، و استفاده از آن‌ها به عنوان ژن‌ها یا پروتئین‌های گزارشگر (Reporter) در زیست فناوری اشاره نمود (28، 37 و 39).

جمعیت باکتری‌های اپی‌فیت از جمله باکتری‌های مولد هسته یخ، در طی فصل رشد متغیر می‌باشد. تحقیقات نشان می‌دهد که با ظهور شکوفه و برگ‌های جوان، مواد مترشحه سطح گیاه افزایش پیدا کرده و بین مقدار این مواد و افزایش جمعیت باکتری‌های اپی‌فیت مولد هسته یخ رابطه مستقیمی وجود دارد. در دمای مناسب محیط نیز، مواد غذایی و میزان کربن روی سطح گیاه می‌تواند در افزایش یا کاهش جمعیت باکتری‌های اپی‌فیت مولد هسته یخ تأثیرگذار باشد (19، 27 و 30).غالباً این تغییرات جمعیت به گونه گیاه و دوره‌های مختلف رشدی آن بستگی دارد به طوری که در قسمت‌های جوان گیاه، جمعیت این باکتری‌ها زیاد تر از سایر قسمت‌ها می‌باشد (10، 29 و35).

به منظور بررسی نقش باکتری‌های اپی فیت در پدیده‌های بیولوژیکی مهم، تخمین دقیق جمعیت باکتری‌های اپی‌فیت ضروری است. به عنوان مثال، پیش‌بینی بیماری (34) و پیش‌بینی خسارت سرمازدگی (21 و25) بستگی به تخمین دقیق جمعیت باکتری‌ها، در زیستگاه خودشان دارد. با توجه به این‌که خسارت سرمازدگی یکی از مشکلات اساسی در استان خراسان رضوی است و حضور باکتری‌های مولد هسته یخ می‌تواند یکی از عوامل تشدید کننده این عارضه فیزیولوژیک باشد، این پژوهش با هدف شناسایی و تخمین جمعیت آن‌ها انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

به منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های مولد هسته یخ، در بهار سال 1392 از درختان میوه هسته‌دار (زردآلو، آلبالو، گیلاس، آلو، هلو، شلیل، بادام و گوجه سبز) در مناطق عمده زیر کشت این درختان در استان خراسان رضوی (مشهد، شاندیز، کنگ، نقندر، زشک، اخلمد، چناران و نیشابور) نمونه‌برداری انجام شد. برای این منظور از هر منطقه دو باغ (دارای مدیریت و بدون مدیریت باغی) و در هر باغ بطور کاملاً تصادفی سرشاخه‌های چهار درخت از هر گونه (دارای علایم شانکر و فاقد علایم) انتخاب گردید. نمونه‌ها به طور کاملاً جداگانه داخل پاکت کاغذی قرار داده شده و جهت بررسی به آزمایشگاه منتقل شدند.

جداسازی باکتری‌ها و تخمین جمعیت

برای جداسازی باکتری‌ها، سرشاخه‌های هر درخت وزن شده و از هر کدام به‌صورت تصادفی 20 گرم انتخاب گردید. سپس با استفاده از قیچی استریل، نمونه‌ها به قطعات کوچک‌تر خرد و در 200 میلی‌لیتر آب مقطر استریل به همراه دو قطره توئین20 (Tween 20) به مدت یک ساعت بر روی همزن تکان داده شدند. از سوسپانسیون حاصله، سری‌های رقت تهیه شد و از هر سری رقت، 25 میکرولیتر، بر روی محیط کینگ ب (King's medium B) کشت گردید. پتری‌ها به مدت 48 ساعت در داخل انکوباتور با دمای 28 درجه سانتی‌گراد

نگهداری شدند. تعداد تک کلنی‌های رشد کرده بر روی پتری، شمارش گردید (14) و جمعیت کل باکتری‌ها در یک گرم بافت گیاهی، تخمین زده شد (22). جدایه‌ها بر اساس رنگ، شکل و اندازه تک کلنی‌ها، گروه‌بندی شدند.

از هر نوع تیپ کلنی مشاهده شده در سطح پتری‌ها، به‌طور کاملاً تصادفی، 10 عدد (در مجموع 820 جدایه) انتخاب گردید. برای اطمینان از خلوص باکتری‌های جدا شده، هر تک کلنی مجدداً بر روی محیط کشت آگار غذایی (Nutrient agar) مخطط گردید. از باکتری‌های خالص شده، سوسپانسیون تهیه و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

آزمون هسته یخ

بعد از اتمام نمونه‌برداری و جداسازی، به منظور شناسایی عوامل مولد هسته یخ، از سوسپانسیون باکتری تازه رشد کرده، غلظت‌های مساوی تهیه (10^8 سلول در هر میلی‌لیتر) و در دمای 5- تا 7- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. از آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده شد. سوسپانسیون باکتری‌هایی که پس از 30 دقیقه زودتر از آب مقطر استریل یخ زدند به عنوان هسته یخ مثبت شناسایی شدند (26). جمعیت باکتری‌های مولد هسته یخ نیز با توجه به جمعیت کل و با استفاده از فرمول $\frac{\text{Total Cells}}{\text{INA+1 g (fresh weight)}}$ - بر روی هر میزبان و در هر منطقه بطور جداگانه تخمین زده شد (22).

بررسی خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های مولد هسته یخ

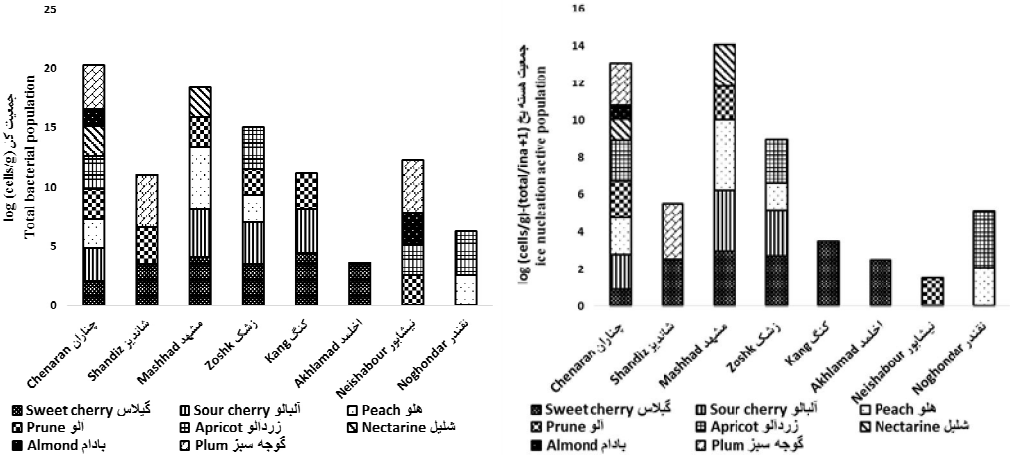
برای گروه‌بندی جدایه‌های جمع‌آوری شده، آزمون‌های زیر بر روی آن‌ها انجام شد. بر اساس نتایج حاصل و نیز محل جمع‌آوری، اندازه، شکل و رنگ کلنی، جدایه‌ها دسته‌بندی گردیدند.

واکنش گرم باکتری‌ها به روش حلالیت در هیدروکسید پتاسیم سه درصد انجام شد (40). آزمون تولید رنگ فلورسنت، با استفاده از محیط کشت KBصورت گرفت. آزمون تحمل نمک طعام 5 درصد و 7 درصد با استفاده از محیط کشت پایه آگار غذایی بررسی گردید. آزمون لهانیدن سیب زمینی (پکتیناز)، آرژنین دی هیدرولاز (38)، اکسیداز (16)، کاتالاز (18) و تولید لوان با استفاده از محیط کشت آگار غذایی حاوی 5 درصد سوکروز بررسی شد (1). آزمون رشد هوازی و بی هوازی (11)، واکنش فوق حساسیت (15) روی برگ‌های شمعدانی،رشد موکوئیدی بر روی محیط Yeast extract dextrose-$CaCo_3$و تشخیص رنگدانه زانتوموندین نیز انجام شد (38).

نتایج و بحث

تخمین جمعیت باکتری‌های اپی فیت و باکتری‌های مولد هسته یخ

جمعیت کل باکتری‌های جداسازی شده از نمونه‌های مربوط به گونه‌های گیاهی یکسان و نواحی مشابه، در بیشتر موارد یکسان بود (با حداکثر اختلاف 150 سلول در هر میلی‌لیتر). با این حال جمعیت کل و جمعیت هسته یخ‌های باکتریایی در میان گونه‌های گیاهی و نواحی جغرافیایی مختلف، متفاوت بودند (شکل 1). لیندو و همکاران (22) نشان دادند برخی از باکتری‌های موجود در طبیعت بسته به نوع میزبان، ممکن است در چند ناحیه پراکنده شده و تراکم جمعیت در سایر نواحی کمتر باشد.



شکل1- جمعیت کل باکتری‌ها (الف) و جمعیت باکتری‌های مولد هسته یخ (ب) بر روی گونه‌های مختلف درختان میوه هسته‌دار و در مناطق مختلف استان خراسان رضوی

Figure 1- Total bacterial population (a) and ice nucleation active bacterial population (b) on various stone fruit trees and locations in Khorasan-Razavi province

با توجه به نتایج بدست آمده، توانایی تخمین درست از این جمعیت‌های پایین نیازمند افزایش اندازه نمونه‌ها می‌باشد. اثر تأخیر در انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه و کشت نمونه‌ها، بر روی جمعیت باکتری‌ها، محاسبه نشد ولی مقایسه جمعیت‌ها اختلاف قابل توجهی را نشان نداد.

در شهرستان‌های چناران، مشهد، نقندر و اخلمد باکتری‌های مولد هسته یخ بر روی تمام گیاهان بررسی شده یافت شدند. در حالی‌که در برخی از مناطق مثل زشک، کنگ، شاندیز و نیشابور باکتری مولد هسته یخ از روی برخی میزبان‌ها یافت نشد. بیشترین جمعیت باکتری‌های اپی فیت در چناران بر روی گوجه سبز و کمترین جمعیت بر روی بادام بود. در حالی‌که بیشترین درصد باکتری‌های مولد هسته یخ از روی آلو و کمترین آن از روی هلو یافت شد. این نتایج در مناطق دیگر شبیه شهرستان چناران نبود (جدول 1). برخی گونه‌های گیاهی مختلف با ژنوتیپ یکسان که در شرایط محیطی تقریباً مشابه در یک ناحیه رشد کرده بودند، اختلاف معنی‌داری در اندازه جمعیت نشان دادند. این نتایج ممکن است مرتبط با محتوای آب موجود در خاک، مواد غذایی در دسترس، تراوش مواد غذایی از گیاهان و وجود زخمی که قابل دیدن نیست (در محلی که تراوش صورت می‌گیرد)، باشد که منجر به اختلافات قابل توجهی در اندازه جمعیت باکتریایی در سطح گیاهان شدند.ابرین و لیندو (33) بطور مشابهی، اثر شرایط محیطی را بر جمعیت اثبات نمودند. میزان بالای تنوع در جمعیت باکتری‌های جدا شده از نمونه‌های جمع‌آوری شده، صرف نظر از نوع جدایه‌های باکتریایی یا گونه‌های گیاهی، نشان داد که در یک گیاه مقیاس بهینه و مطلوبی برای نمونه‌برداری وجود ندارد تا واریانس را به میزان قابل توجهی کاهش دهد و تخمین دقیقی از جمعیت فراهم آورد. با مقایسه جمعیت باکتری‌ها در نمونه‌های آلوده به شانکر و نمونه‌های سالم، مشخص گردید در باغ‌هایی که شانکر باکتریایی دیده شد، جمعیت باکتری‌های مولد هسته یخ بالا و معمولاً خسارت سرمازدگی نیز بیشتر بود. بنابراین وجود علایم شانکر باکتریایی، به عنوان یکی از راه‌های تشخیص وجود باکتری‌های مولد هسته یخ در روی درختان میوه هسته‌دار، شناسایی گردید. در اکثر موارد یخ زدگی به گیاه تنش وارد کرده و امکان حضور و ایجاد آلودگی توسط باکتری‌های مولد شانکر را فراهم می‌آورد. این نتایج با نتایج صحراگرد (36) مطابقت داشت. از میان 820 جدایه بررسی شده، 110 جدایه مولد هسته یخ بودند. خسارت سرمازدگی با جدایه‌های باکتریایی مولد هسته یخ که در سطح برگ حضور دارند، مشخص می‌شود. بررسی لیندو (25) به طور مشابه نشان داد، خسارت سرمازدگی ارتباط مستقیمی با لگاریتم جمعیت باکتری‌ها و لگاریتم هسته‌های یخ باکتریایی در زمان یخزدگی دارد و هم‌چنین فراوانی باکتری‌های مولد هسته یخ بر روی گیاهان بیشتر از محیط کشت است. ابرین و لیندو (32)ثابت کردند حضور باکتری‌های مولد هسته یخ دلیل بر وجود یخ در گیاهان نیست. طبق نتایج ما جمعیت آن‌ها بستگی به گونه گیاهی، مکان، آب و هوا، اقلیم و فصل داشته و تنها درصد کمی از سلول‌ها در یک جمعیت باکتریایی مولد هسته یخ می‌باشند (جدول 1). این تخمین‌ها هنگامی که جمعیت به سرعت در حال تغییر و دگرگونی نباشند، مفید هستند. به هر حال، ممکن است شناسایی دقیق‌تر میکروارگانیسم‌های مشخص بر روی سطح گیاهی، مثل باکتری‌های مولد هسته یخ و غیره با آزمون نمونه‌های بزرگ‌تر یا گیاه کامل امکان پذیر شود. فراوانی بیان فنوتیپ هسته یخ در کشت‌های خالص در شرایط آزمایشگاهی به میزان قابل توجهی متغیر، و سطح بیان تحت تأثیر شرایط رشدی بود. این نتایج با نتایج لیندو (24) مطابقت داشت.

شناسایی و پراکنش باکتری‌های مولد هسته یخ در درختان هسته‌دار

تمامی جدایه‌ها بر روی محیط کینگ ب کشت گردیدند. باکتری‌های فلورسنت مربوط به جنس *Pseudomonas* بوده و در ابتدا با توجه به این خصوصیت از سایر باکتری‌ها، تفکیک شدند. سه گونه از جنس سودوموناس به کرات به عنوان هسته یخ از روی درختان میوه هسته دار گزارش شده اند که آزمون‌های لازم برای شناسایی این سه گونه انجام شد. تمامی جدایه‌ها گرم منفی و کاتالاز مثبت بودند. در 27 درصد از جدایه‌ها اکسیداز و آرژنین دی هیدرولاز مثبت بود که تعلق آن‌ها را به گونه *P. fluorescens*نشان داد. در آزمون پکتیناز، 8 درصد جدایه‌ها پکتیناز مثبت بوده و به عنوان *P. viridiflava* در نظر گرفته شدند. از میان جدایه‌های فلورسنت، 56 درصد جدایه‌ها متعلق به گونه *P. syringae* بودند که نسبت به آزمون‌های اکسیداز، پکتیناز و آرژنین دی هیدرولاز واکنش منفی نشان دادند.

جهت تفکیک باکتری‌های کرم و زرد رنگ جداسازی شده، از آزمون رشد در شرایط بی‌هوازی استفاده شد. 6 درصد از جدایه‌ها رشد لعابی داشته و در شرایط بی هوازی قادر به ادامه زندگی بودند و در جنس *Pantoea* قرار گرفتند. باکتری‌های باقی مانده بر روی محیط YDC، کلنی‌های زرد مایل به نارنجی تشکیل دادند. رنگدانه منحصر به فرد زانتومونادین نیز از آن‌ها استخراج گردید و این جدایه‌ها در جنس .*Xanthomonas* sp جای گرفتند. آزمون‌های تکمیلی برای تأیید جنس‌ها و در مواردی مشخص شدن گونه، انجام شد (جدول2). فراوانی جدایه‌ها در مناطق نمونه‌برداری شده در شکل 3 نشان داده شده است.

پراکندگی باکتری‌ها در مناطق نمونه‌برداری شده بررسی شد (شکل 2). باکتری .*Xanthomonas*spدر دو منطقه شاندیز و نغندر و

بـر روی گـیلاس و هلـو مشـاهده شـد. بـاکتری *Pantoeaag glomerans* فقط از چناران جداسازی گردید و روی پنج میزبان آلبالو، هلـو، زردآلـو، آلـو و گوجـه سـبز حضـور داشـت. گونـه‌هـای جـنس *Pseudomonas*. بر روی همـه میزبـان‌هـا و همـه منـاطق حضـور داشتند.

جدول 1- لگاریتم جمعیت کل (تعداد سلول‌ها در هر میلی‌لیتر) و درصد باکتری های مولد هسته یخ بر روی درختان میوه هسته‌دار در استان خراسان رضوی

Table 1- Logarithm of total bacteria population (CFU/ml) and the percent of ice nucleation active bacteria on stone fruit trees in KhorasanRazavi province.

مناطق Location	میزبان Host	لگاریتم جمعیت کل باکتری ها Logarithm of total bacterial population	درصد هسته یخ INA percent
چناران Chenaran	هلو	2.48	2.95%
	زردآلو	2.87	25.87%
	آلو	2.51	26.67%
	آلبالو	2.81	12.9%
	گیلاس	2.04	11.31%
	شلیل	2.4	4.55%
	بادام	1.48	14.3%
	گوجه سبز	3.7	4.08%
مشهد Mashhad	هلو	5.24	3.92%
	آلو	2.52	16.67%
	آلبالو	4.04	16.07%
	گیلاس	4.13	6.67%
	شلیل	2.48	30%
زشک Zoshk	هلو	2.3	12.5%
	زردالو	3.48	15%
	آلبالو	3.6	13.64%
	گیلاس	3.4	17.86%
	آلو	2.18	0
نغندر Noghondar	هلو	2.56	28%
	زردآلو	3.72	20%
اخلمد Akhlamad	گیلاس	3.6	8.33%
کنگ Kang	آلو	3.05	0
	آلبالو	3.76	0
	گیلاس	4.43	11/54%
شاندیز Shandiz	گیلاس	3.52	10.71%
	گوجه سبز	4.48	3.03%
	آلو	3.07	0
نیشابور Neyshaboor	آلو	2/54	10%
	گوجه سبز	4.48	0
	زردآلو	2.6	0
	بادام	2.7	0

جدول 2- آزمون‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی انجام شده جهت تفکیک جنس‌ها و گونه‌های مختلف باکتری‌های مولد هسته یخ

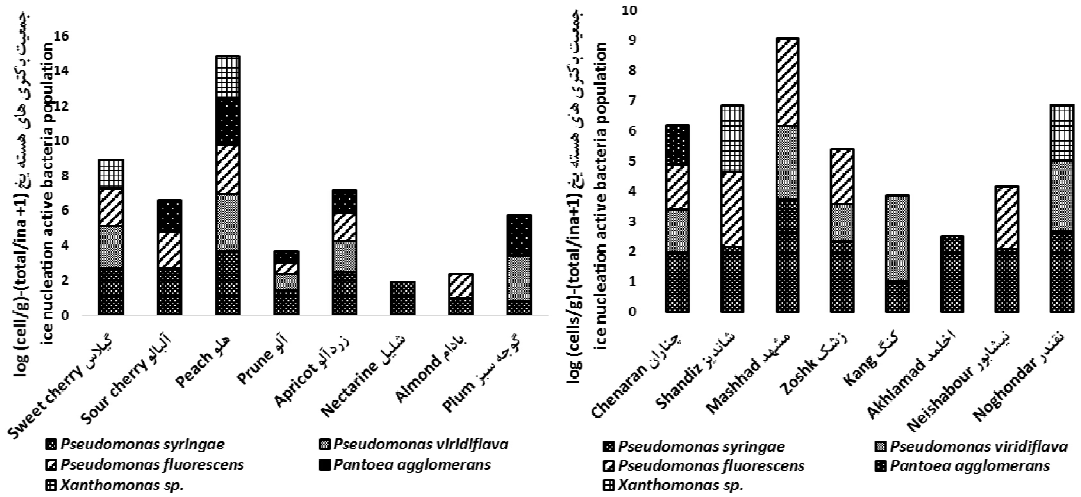
Table 2- Morphological and biochemical tests carried out to separate different genera and species of ice nucleation active bacteria

خصوصیات (Characteristics)	*Xanthomonas sp.*	*Pantoeaagglomeran*	*P. fluorescens*	*P. viridiflava*	*Pseudomonas syringaepv. syringae*
واکنش گرم (Gram reaction)	-	-	-	-	-
کاتالاز (Catalase)	+	+	+	+	+
تولید پیگمان فلورسنت در محیط KB (Fluorescent pigment production)	-	-	+	+	+
لوان (Levan)	+	+	V	V	V
اکسیداز (Oxidase)	-	-	+	-	-
آرژنین دی هیدرولاز (Arginine dihydrolase)			+	-	-
پوسیدگی سیب زمینی (پکتینیاز) Potato rot (Pectolytic) (activity)	-	-	-	+	-
واکنش فوق حساسیت روی شمعدانی (Hypersensitive Reaction on Geranium)	+	+	-	+	+
فعالیت هسته یخ (Ice nucleation activity)	+	+	+	+	+
تحمل نمک 5% (5% Nacl tolerance)	-	+	V	-	+
تحمل نمک 7% (7% Nacl tolerance)	-	-	V	-	-
رشد بی هوازی (Anaerobic growth)	-	+	-	-	-
رشد لعابی (Mucoid growth)	-	+	-	-	-
رشد در 37 درجه سانتی گراد Growth at 37 degree) (centigrade	+	+	-	-	-
کلنی زرد مایل به نارنجی روی YDC Colonies yellowing orange) (on YDC	+	-	-	-	-
تولید رنگدانه زانتومونادین (Xanthomonadine production)	+	-	-	-	-

V: واکنش متغیر. + : واکنش مثبت. - : واکنش منفی.

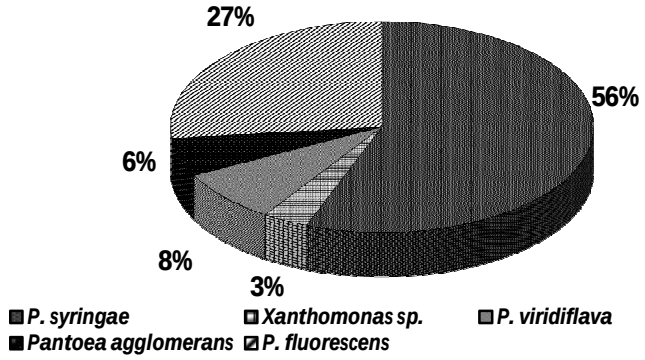
V: Variable reaction. + : positive reaction. - : negative reaction.

گونه *P. viridiflava*، در چناران، مشهد، زشک، کنگ و نقندر به ترتیب از روی میزبان‌های گیلاس، هلو، آلو، زردآلو و گوجه سبز جداسازی شد. *P. fluorescens* در مناطق چناران، شاندیز، مشهد، زشک و نیشابور و بر روی میزبان‌های گیلاس، آلبالو، هلو، آلو، زردآلو و بادام مشاهده گردیدند. باکتری *P. syringae* به عنوان فراوان‌ترین گونه باکتریایی مولد هسته یخ، از همه نواحی و همه میزبان‌ها جداسازی شد. این نتایج با نتایج لیندو و همکاران (23) مطابقت داشت و نشان داد باکتری *P. syringae* فراوان‌ترین باکتری مولد هسته یخ در سطح گیاهان بود.



شکل 2-جمعیت گونه‌های مولد هسته یخ در مناطق مختلف (الف) و بر روی درختان میوه هسته‌دار (ب)

Figure 2- Ice nucleation active bacterial population in different locations (a) and on stone fruit trees (b)



شکل 3-فراوانی گونه‌های مختلف باکتری‌های مولد هسته یخ در استان خراسان رضوی

Figure 3- Frequency of different ice nucleation active bacterial species in KhorasanRazavi province

نتیجه‌گیری کلی

سرمازدگی در سال‌های اخیر خسارات قابل توجهی به میزان تولید محصولات کشاورزان منطقه خراسان رضوی وارد کرده است. خسارت وارده از سرما در درختان مختلف و در شرایط گوناگون متفاوت است و ارتباط مستقیم بین درصد آلودگی و خسارت در همه حالات وجود ندارد. در مورد درختان میوه، میوه‌های بالایی خسارت کمتری را نسبت به میوه‌های پایینی، می‌بینند. در درختان با میوه‌های بزرگ (مانند هلو، آلو و غیره) از بین رفتن 50 درصد از گل‌ها هم نمی‌تواند خسارت اقتصادی بر محصول وارد نماید ولی در مورد گل‌ها در میوه‌های دانه ریز (مانند گیلاس، آلبالو و غیره) این مقدار قابل تحمل نمی‌باشد.

در این مطالعه جمع‌آوری نمونه از هشت منطقه و هشت میزبان انجام شد. از میان 820 جدایه مورد بررسی، 110 جدایه فعالیت هسته یخ داشتند که با توجه به خصوصیات فنوتیپی مختلف، شناسایی شدند. تخمین جمعیت کل باکتری‌ها و باکتری‌های مولد هسته یخ در مناطق مختلف بدون در نظر گرفتن میزبان صورت گرفت و بر اساس نتایج بدست آمده وقوع علائم شانکر، ارتباط مستقیمی با حضور باکتری‌های مولد هسته یخ نشان داد. مشاهده باکتری‌های مولد هسته یخ لزوماً دلیل بر یخ زدگی گیاهان نبوده و خسارت سرمازدگی ارتباط مستقیمی با لگاریتم جمعیت باکتری‌ها و لگاریتم هسته‌های یخ باکتریایی در هنگام یخ زدگی دارد. تا زمانی که جمعیت باکتری‌ها به CFU/ml 10^6نرسد، یخ زدگی آغاز نمی‌شود (22). گونه *P. syringae* به عنوان فراوان‌ترین و قوی ترین باکتری مولد هسته یخ بر روی درختان مورد

بررسی، مشخص شد. به نظر می رسد شناخت فاکتورهای مؤثر در کلونیزه نمودن سطح گیاه توسط باکتری‌های مولد هسته یخ، می‌تواند راهکار های مؤثری برای کنترل بیماری‌های گیاهی و خسارت سرمازدگی ارائه دهد.

در منطقه زشک، جمعیت باکتری‌های مولد هسته یخ و خسارت سرمازدگی بر روی آلبالو و گیلاس، و در نقندر بر روی زردآلو، حداکثر بود زیرا در این نواحی بیشتر باغ‌ها به حال خود رها شده و بازرسی کافی نداشتند. در اکثر موارد جمعیت کل و هسته یخ بر روی آلو بسیار پایین بود که نیاز به مطالعات بیشتر در زمینه مواد یا متابولیت‌های مترشحه از این گیاه و تاثیر آن‌ها بر روی رشد باکتری‌ها دارد. طبق نتایج این تحقیق، در مناطقی که مدیریت باغی (انتخاب زمین مناسب، خودداری از عملیات خاک ورزی و کود دادن‌های بیش از اندازه، هرس به موقع درختان، برس زنی و غیره) صورت گرفته بود، خسارت سرمازدگی کمتر بود. هم‌چنین در برخی مناطق مثل نیشابور برخی باکتری‌های دارای خاصیت آنتاگونیستی بر علیه باکتری‌های مولد هسته یخ یافت شدند که میتوانست یکی از دلایل کاهش جمعیت باکتری‌های هسته یخ در این منطقه باشد.

منابع

1- Fahy P.C., and Persley C.J. 1983. Plant Bacterial Disease A Diagnostic Guide, Academic Press Sidney, Australia.

2- Fahy G.M., MacFarlane D.R., Angell C.R., and Meryman H.T. 1984. Vitrification is an approach to cryopreservation, Cryobiology, 21:407-426.

3- Gangimoghaddam A. 2011. Fruit planting in temperate regions, Agricultural Extension and Education Publications, Tehran. (In Persian).

4- Garnham C.P., Campbell R.L., Walker V.K., and Davies P.L. 2011. Novel dimeric β-helical model of an ice nucleation protein with bridged active sites, BMC Structural Biology, 11-36.

5- Goodnow R.A., Harrison M.D., Morris J.D., Sweeting K.B., and LaDuca R.J. 1990. Fate of ice nucleation-active *Pseudomonas syringae* in alpine soils and waters and in synthetic Snow samples, Applied and Environmental Microbiology, 56:2223-2227.

6- Govindarajan A.G., and Lindow S.E. 1988. Phospholipid requirement for expression of ice nuclei in *Pseudomonas syringae* and in vitro, Journal of Biology and Chemistry, 19:9333-9338.

7- Graether S.P., and Jia Z. 2001. Modeling *Pseudomonas syringae* ice nucleation protein as a β-helical protein, Biophysical Journal, 3:1169-1173.

8- HasanZadeh N. 1995. Principles and methods of plant bacteriology,Islamic Azad University Press. (In Persian).

9- Hirano S.S., and Upper C.D. 1985. Ecology and physiology of *Pseudomonas syringae*, Bio/Technology, 3:1074-1078.

10- Hirano S.S., and Upper C.D. 2000. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* a pathogen, ice nucleus, and epiphyte, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 3:624-653.

11- Hugh R., and Leifson, E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrate by versus gram negative bacteria. Journal of Bacteriology, 66:24-26.

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

13-Khadivi E. 2010. Fruit planting (public and private),Agricultural Extension andEducation Publications, Tehran. (In Persian).

14- Kinkel L.L., Wilson M., and Lindow S.E. 2000. Plant Species and Plant Incubation Conditions Influence Variability in Epiphytic Bacterial Population Size, Microbial Ecology, 39:1-11.

15- Klement Z., Farkas G.L., and Lovrekovich H. 1964. Hypersensitive reaction induce by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf, Phytopathology, 54:474-477.

16- Kovacs N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyana* by the oxidase reaction, Nature, 178:703-708.

17- Kozolff L.M., Turner M.A., Arellano F., and Lute M. 1991. Phosphatidylinositol, a phospholipid of ice-nucleating bacteria, Journal of Bacteriology, 6:2053-2060.

18- Lelliott R.A., and Stead D.E. 1987. Methods for the Diagnosis of Bacterial disease of plants. Blackwell Scientific Publication, Oxford, Boston.

19- Leveau J.H.J., and Lindow S.E. 2001. Appetite of an epiphyte quantitative monitoring of bacteria sugar

consumption in the phyllosphere, Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98:3446-3453.
20- Li J., Izquierdo M.P., and Lee T.C. 1997. Effects of ice-nucleation active bacteria on the freezing of some model food systems, International Journal of Food Science and Technology, 1:41-49.
21- Lindemann J., and Suslow T.V. 1987. Competition between ice nucleation-active wild-type and ice nucleation deficient deletion mutant strains of *Pseudomonas syringae*and *Pseudomonas fluorescens*Biovar I and biological control of frost injury on strawberry blossoms, Phytopathology, 77:882-886.
22- Lindow S.E., Arny D.C., and Upper C.D. 1978. Distribution of ice nucleation-active bacteria on plants, Applied Environmental Microbiology, 6:831-838.
23- Lindow S.E., Arny D.C., and Upper C.D. 1982. Bacterial ice nucleation: A factor in frost injury to plants, Plant Physiology, 70:1084–1089.
24- Lindow S.E. 1983. The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants. Annual Review of Phytopathology, 21:363-384.
25- Lindow S.E. 1987. Competitive exclusion of epiphytic bacteria by Ice⁻ mutants of *Pseudomonas syringae,*Applied and Environmental Microbiology, 53:2520-2527.
26- Lindow S.E. and Gurian-Sherman D. 1993. Bacterial ice nucleation: significance and molecular basis,*FASEB, Journal,* 7:1338-1343 .
27- Lindow S.E, and Andersen G.L. 1996. Influence of immigration epiphyic bacteria populations on navel orange leaves, Applied and Environmental Microbiology, 62:2978-2987.
28- Manulis S., Haviv-Chesner A., Brandl M.T., Lindow S.E., and Barash I. 1998. Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwiniaherbicola*pv. *Gypsophilae*,Molecular Plant-Microbe Interactions, 7:634–642.
29- Mazaree M. and Ghasemi A. 1993. Identification and seasonal variation of populations of ice nucleation active bacteria on stone fruit trees in Shahrood, Journal of Plant Pathology,60:57-29.(In Persian with English abstract)
30- Mercier J., and Lindow S.E. 2000. Role of leaf surface sugar in colonization of plants by bacterial epiphytes, Applied and Environmental Microbiology, 66:369-374.
31- Mosivand M., Akbarievala S., and Hejazi M.A. 2005. Relationship between dispersion of ice nucleation active bacteria and frost damage in some of the crops in Iran,Applied science conference on ways to deal with frostbite, Yazd. (In Persian).
32- O'Brien R.D., and Lindow S.E. 1988. Effect of plant species and environmental conditions on ice nucleation activity of *Pseudomonas syringae* on leaves, Applied andEnvironmental Microbiology, 9:2281–2286.
33- O'Brien R.D., and Lindow S.E. 1989. Effect of plant species and environmental conditions on epiphytic population sizes of *Pseudomonas syringae* and other bacteria, Phytopathology, 79:619–627.
34- Rouse D.I., Nordheim E.V., Hirano S.S., and Upper C.D. 1985. A model relating the probability of foliar disease incidence to the population frequencies of bacterial plant pathogens, Phytopathology, 75:505-509.
35- Sahragard N., Banihashemi Z., and Taghavi M. 1997. Identification of ice nucleation active bacteria on stone fruit trees in Fars province, Journal of Plant Pathology, 330:209-215. (In Persian with English abstract)
36- Sahragard N. 2005. Decrease of frost damage (freezing) of flowers in stone fruit trees by controlling of ice nucleation active bacteria,Applied Science Conference on ways to deal with frostbite, Yazd. (In Persian).
37- Sarhan M.A.A. 2011. Ice nucleation protein as a bacterial surface displayprotein. Archives of Biological Sciences, 4:943–948.
38- Schaad N.W., Joneas J.B., and Chun C. 2001. Laboratory guid for identification of plant pathogenic bacteria,st Paul, Minnestota, Aps press.
39- Shimazu M., Mulchandani A., and Chen W. 2001. Cell surface display of organophosphorus hydrolase using ice nucleation protein, Biotechnology Progress, 17:76-80.
40- Suslow T.V., Schroth M.N., and Isaka M. 1982. Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining, Phytopathology, 72:917-918.
41- Tang C., Sun F., and Zhao T. 2003. Construction of ice nucleation active *Entrobacter cloacae* for control of insect pests, Chinese Science Bulletin, 2:175-180.

42- Warren G.J., Lindemann J., Suslow T.V., and Green R.L. 1987. Ice nucleation deficient bacteria as frost protection agents. In Applications of Biotechnology to Agricultral Chemistry (LeBaron, L., Mumma, R., Honeyeutt, and Duesing, J. Eds), American Chemical Society. Washington.

43- Zhang C., Zhang H., Wang L., Gao H., Xiao N.G., and Hui Y.Y. 2007. Improvement oftexture properties and flavor of frozen dough by carrot (Daucuscarota) antifreeze protein supplementation, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 23:9620–9626.