

جهش القایی در ژن کنترل کننده فعالیت هسته یخ با جهش‌زای EMS در دو جدایه از باکتری شبه *Pseudomonas viridiflava*

Induced mutation in gene controlling ice nucleation activity by EMS, in two strains of *Pseudomonas viridiflava* like bacteria

سیده فاطمه رشیدایی^{۱*}، حشمت‌اله رحیمیان^۱، غلامعلی رنجبار^۱

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد و دانشیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

Rashidaei F^{1*}, Rahimian H¹, Ranjbar GH¹

1. MSc Student, Professor, Associate Professor, Mazandaran University, Sari, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Rashidaei.f@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۱۸)

چکیده

باکتری‌های مولد هسته یخی با افزایش جمعیت و فعالیت خود باعث سرمازدگی گیاهان در دماهای بالاتر از معمول می‌شوند. اساس ژنتیکی هسته‌های یخی باکتریایی به صورت تک ژن کروموزومی *ina* (Ice nucleation active) می‌باشد. برای ایجاد جهش در ژن *ina*، باکتری شبه *Pseudomonas viridiflava* از ماده EMS در دو غلظت ۲۰ و ۲۵ میکرولیتر در میلی‌لیتر استفاده شد. جهت ردیابی ژن *ina* در جدایه‌های شبه *P. viridiflava* از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با یک جفت آغازگر اختصاصی ژن *ina* که از روی نواحی حفظ شده ژن هسته یخ در چندین گونه باکتری مولد هسته یخی، طراحی شد، استفاده شد. فعالیت هسته یخ با آزمون انجماد قطره‌ای ارزیابی شد. برای بررسی از دست رفتن فعالیت هسته یخی، سوسپانسیون حاوی ۱۰^۷ سلول در میلی‌لیتر هر جهش‌یافته بر روی گیاهچه-های پرتقال پاشیده شده و از گیاهچه تیمار شده با آب مقطر استریل به عنوان شاهد منفی استفاده شد. گیاهان به مدت ۷ تا ۱۰ ساعت در دمای ۱۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و سپس به گلخانه برگردانده شدند. تعدادی از جهش‌یافته‌های به دست آمده در گیاهچه‌ها ایجاد یخ‌زدگی نکردند.

واژه‌های کلیدی

جهش
هسته یخ
EMS
Pseudomonas viridiflav

پدیده هسته یخ‌زایی اولین بار در سال ۱۹۷۴ در جدایه‌های *Pseudomonas syringae* مشاهده شد. کمی بعد از آن مشخص شد که جدایه‌هایی از *Pseudomonas viridiflava*, *Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia herbicola* (*Pantoea agglomerans*), *Xantomonas translucens* pv. *translucens* توانایی ایجاد یخ در آب سرد شده را دارند (Maki et al. 1974). بیشتر گونه‌های گیاهی می‌توانند تا حدود ۵- درجه سانتی‌گراد بدون یخ زدن، سرد شوند و گونه‌های گیاهی حساس به یخ‌زدگی در غیاب باکتری‌های Ice^+ دچار خسارت ناشی از تشکیل یخ در دمای بالاتر از ۵- درجه سانتی‌گراد نمی‌شوند. (Obata et al. 1990). جدایه‌های *Pseudomonas viridiflav* جدا شده از برگ هویج را بر اساس رنگ کلنی‌ها به گروه‌های خاکستری، سفید و یا زرد تقسیم کردند. کلنی‌های سفید و زرد فعالیت هسته یخ از خودشان نشان دادند. آن‌ها یک جدایه از این باکتری‌های مولد هسته یخ را مورد مطالعه قرار دادند و اظهار داشتند که ژن هسته یخ در این باکتری‌ها در دمای ۲/۸- درجه سانتی‌گراد فعال خواهد بود و با استفاده از اوره یا ان- اتیل مالیمید^۱ تولید هسته یخ را در باکتری متوقف کردند. (Lindow et al. 1995) ثابت کردند که با کاهش اندازه جمعیت باکتری‌های اپی‌فیت به کمک موتان‌های Ice^- طبیعی و یا حاصل از موتان‌زایی شیمیایی نژادهای *Pseudomonas syringae*، *fluorescens* و *Erwinia herbicola* صدمات حاصل از سرمازدگی به نحو چشمگیری کاهش می‌یابد. جدایه‌های شبه *Pseudomonas viridiflava* از مجموعه جدایه‌های نگهداری شده در آزمایشگاه باکتری‌شناسی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری دریافت شد. برای اطمینان از شناسایی انجام شده، از آزمون لوپات^۲ (Klement et al. 1964)؛ Lelliott et al. (1966) استفاده شد.

برای تعیین فعالیت هسته یخ جدایه‌ها از آزمون انجماد قطره‌ای^۳ طبق روش (Marco and Lindow 1990) استفاده شد. باکتری‌ها روی محیط کشت آگار مغذی حاوی سوکروز^۴، با ۱/۵ درصد گلیسرین کشت و به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه

سانتی‌گراد نگهداری شدند. در آزمون انجماد قطره‌ای از سوسپانسیون قطرات ۱۰ میکرولیتری جدایه‌ها استفاده شد و بر روی ورق آلومینیومی قایق شکل پوشانده شده با لایه نازکی از پارافین و زایلن که قبلاً در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد (به مدت ۱۵ دقیقه) در آون استریل شده بود، قرار داده شد. قایق‌ها در سطح حمام اتانل سرد با دمای ۵- تا ۱۰- درجه سانتی‌گراد شناور شدند. از آب مقطر استریل به عنوان شاهد منفی استفاده شد. آغازگر از روی نواحی حفظ شده ژن هسته یخ در چندین گونه باکتری مولد هسته یخ، از جمله، *Pseudomonas borealis*، *Pseudomonas syringae* (*inaV gene*) و *syringae* S203 و چند جدایه دیگر که برخی از ویژگی آن‌ها در جدول ۱ خلاصه شده، طراحی شد. هم‌ترازی توالی‌های نوکلئوتیدی و پروتئینی توسط برنامه Clustal W موجود در نرم‌افزار BioEdit Ver. 7.0.9.0 انجام شد. از روی این هم‌ترازی و به صورت دستی آغازگری با عنوان *inaC* و توالی (Forward 5'-GGCAGGACAGYTCVYTGAT-3' و توالی 3'-TTGCTKCGGTCDCCCGCKGTYTG Reverse) طراحی شد. سپس جفت آغازگر *inaC* با نرم‌افزار PrimerPremier Ver. 5.0 برای تطابق داشتن با توالی ژن هسته یخ باکتری‌های مذکور ارزیابی شد. از آغازگر *inaC* برای ردیابی ژن *ina* در دو جدایه *Pseudomonas viridiflava* استفاده شد. در دو جدایه ۱۰۱ و ۵۱۰ با آغازگر *inaC* قطعه‌ای به اندازه ۳۷۰ bp تکثیر شد. جدایه‌های ۱۰۱ و ۵۱۰ باکتری *P. viridiflava* در محیط مایع معادل K.B (۲-۳ گرم پروتئوز پپتون، ۲ گرم تریپتون، ۱ تا ۲ گرم K_2HPO_4 ، ۵ تا ۲ میلی‌لیتر گلیسرین، ۱-۰/۵ گرم سولفات منیزیم) کشت داده و در ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا باکتری‌ها به مرحله رشد لگاریتمی برسند. پس از ۱۲ تا ۲۴ ساعت، با شروع کدر شدن محلول (مرحله رشد لگاریتمی)، از این سوسپانسیون ۱۰ تا ۲۰ میکرولیتر به یک میلی‌لیتر محیط مایع پایه یا محیط LB (تریپتون = ۱۰ گرم، عصاره مخمر = ۵ گرم، NaCl = ۵ گرم، NaOH = ۱ میلی‌لیتر با pH ۷) منتقل شد. پس از ۴ الی ۶ ساعت که کدری محیط نسبتاً مشخص شد، EMS در دو تیمار ۲۰ و ۲۵ میکرولیتر در میلی‌لیتر به هر کدام اضافه شد. بعد از آن نمونه‌های تیمار شده به مدت ۳۵ دقیقه در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد درون

¹ N-ethylmaleimide

² LOPAT

³ Droplet freezing method

⁴ Nutrient agar + sucrose, NAS

شیکر با تکان ملایم قرار گرفت. باقی مانده EMS سلول شستشو داده شد. رسوب نهایی در یک میلی لیتر محیط پایه مجدداً سوسپانسیون و به مدت ۴ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد رشد داده شد. به منظور کاهش جمعیت در هر پتری، برای جداسازی راحت تر موتان ها، سوسپانسیون با آب مقطر استریل رقیق شد و روی محیط معرف جامد فلورسنس KB کشت داده شد تا پس از ۴۸ ساعت رشد در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد، کلنی های موتان یافته به دست آمد (Lindow (1983). دو جدایه ۱۰۱ و ۵۱۰ از باکتری شبه *P. viridiflava* به ترتیب در دمای ۶- و ۵- درجه سانتی گراد دارای فعالیت هسته یخ بودند. این آزمون در سه تکرار با نتایج مشابه انجام شد. جدایه های ۱۰۱ و ۵۱۰ باکتری شبه *Pseudomonas viridiflava* که دارای فعالیت هسته یخ در مرحله رشد لگاریتمی تحت تیمار EMS در دو دوز ۲۰ و ۲۵ میکرو لیتر در میلی لیتر قرار داده شدند. برای حذف EMS، سلول ها شستشو و سلول ها در رقت های بسیار پایین، رشد داده شدند. کلنی های رشد یافته در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد، به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت، برای انتخاب جهش یافته های فاقد هسته یخ با آزمون PCR با آغازگر *inaC* مورد ارزیابی قرار گرفتند. بعضی از کلنی ها با آغازگر تولید باند کردند که برخی از این باندها مانند باند والدینی و بعضی دیگر متفاوت از باند والدینی بودند. تعدادی از این کلنی ها نیز با آغازگر *inaC* نتوانستند باندی تولید کنند که به احتمال قوی نشانگر ایجاد جهش در ژن *ice* این کلنی ها بود (شکل ۱). سوسپانسیون کداری از کلنی های جهش یافته بر روی گیاهچه های چند برگه پرتقال رشد یافته در محیط پایه MS، اسپورپاشی شد و سپس گیاهچه ها به مدت ۱۰-۷ ساعت در دمای حدود ۱۰- درجه سانتی گراد قرار گرفتند. بعد از این گیاهچه ها برای سازگار شدن به محیط گرم ابتدا به یخچال انتقال داده شده و پس از دو روز به محیط گلخانه منتقل شدند. در این آزمون از گیاهچه ای که با جدایه وحشی ۵۱۰ آلوده شده بود، به عنوان شاهد مثبت و از گیاهچه تیمار شده با آب مقطر استریل به عنوان شاهد منفی استفاده شد. بعد از یک هفته علائم ناشی از سرمازدگی بر روی بعضی از برگ های گیاهچه ها ظاهر شد. این علائم شامل آب سوختگی برگ ها بود. رنگ برخی از برگ ها قهوه ای تیره شد که می تواند حاکی از بیماری زایی باکتری

و ایجاد بلایت باشد، اما بعضی دیگر رنگی با تیرگی کمتر قهوه ای روشن تا مایل به زرد داشتند که می تواند ناشی از سرمازدگی برگ ها باشد. در ادامه سرمازدگی تمامی سطح برگ به رنگ قهوه ای روشن یا زرد مایل به قهوه ای در آمد، گیاهچه هایی که تا دو هفته پس از تیمار با باکتری ها به صورت روزانه مورد بررسی قرار گرفتند. بعد از دو هفته علائم سرمازدگی روی گیاهچه های صدمه دیده، شدیدتر شد. گیاهچه هایی که با جدایه وحشی تیمار شده بودند بعد از یک هفته علائم سرمازدگی مشهودی را نشان دادند. گیاهچه های تیمار شده با آب مقطر استریل، هیچ علائمی را نشان ندادند. (Edwards et al. (1990 و Wolber (1992 نشان دادند که توزیع ژن هسته یخ با انتقال افقی بین جنس و گونه های باکتریایی صورت می پذیرد. بنابراین می توان این احتمال را داد که به مرور زمان این ژن میان جنس و گونه های باکتریایی دچار تغییرات جزئی شده است. بنابراین با طراحی جفت آغازگر (*inaC*) از نواحی محافظت شده این ژن در چند باکتری INA^+ می توان ژن هسته یخ را تکثیر کرد. (Warren et al. (1986 نواحی محافظت شده ژن *ina* را در دو گونه *P. syringae* و *P. fluorescens* مورد بررسی قرار دادند. بررسی ها نشان داد که ژن *inaW* مربوط به *P. fluorescens* با ژن *inaZ* مربوط به *P. syringae* شباهت قابل توجهی داشتند. اگرچه ژن های هسته یخ در گونه های مختلف، کمی با هم متفاوت هستند اما ساختار کلی آن ها به هم شبیه است (Wolber (1992. در بررسی ژن هسته یخ باکتری های موتانت در مقایسه با تیمار شاهد والدینی وحشی تعداد زیادی از موتان های فنوتیپی باندهای مشابه با تیپ والدینی را تولید کردند. بنابراین در این جدایه ها احتمالاً جهش در خارج از محدوده تکثیر شده توسط آغازگرها رخ داده و این بخش از ژنوم دست نخورده و قابل تکثیر باقی مانده است، اما بیان کل ژن و تشکیل پروتئین های هسته یخ دچار اختلال شده است و یا احتمالاً می تواند هیچ موتاسیونی در کل ژنوم رخ نداده باشد و نشان ندادن فنوتیپ هسته یخ در آزمون قطره ای هسته یخ ناشی از عوامل خطا ساز محیطی بوده باشد (Pourmoayyed (2005. بعضی از این موتانت های فنوتیپی باندهایی متفاوت با تیپ والدینی را تولید کردند که احتمالاً جهش باعث شکسته شدن ژن هسته یخ شده که این شکستگی قطعاً با اندازه متفاوت را تکثیر

هسته یخ تکثیر یافته باشد ولی به خاطر این که با این آغازگر امکان تکثیر نداشت ما پی به وجود آن نبردیم. به همین دلیل وجود ژن هسته یخ در این جدایه‌ها باعث بروز علائم سرمازدگی شد. Gibson et al. (2001) نشان دادند که علائم ناشی از سرمازدگی شامل پیدایش رنگ قهوه‌ای و یا خاکستری می‌باشد. در ابتدا بافت برگی تحت تاثیر قرار می‌گیرد اما وقتی گیاه آسیب شدیدی ببیند، ممکن است ساقه و تنه‌اش نیز آسیب ببینند. در گیاه تیمار شده با باکتری نوع وحشی ۵۱۰ علاوه بر آسیب دیدن برگ‌ها، ساقه نیز مورد صدمه قرار گرفت.

کرده است. در بررسی اثر موتانت‌های ژنوتیپی و فنوتیپی بر روی گیاهچه‌های پرتقال حاصل از کشت بافت دیده شد که بعضی از جهش‌یافته‌ها نتوانستند سرمازدگی در گیاه را تشدید کنند. در صورتی که برخی دیگر با گذشت یک هفته علائم سرمازدگی را نشان دادند و در هفته دوم این علائم در بعضی‌ها شدت گرفته و در سایرین این علائم تغییر چندانی نداشت. بنابراین به نظر می‌رسد که در این موتانت‌ها احتمالاً جهش فقط در نواحی تکثیر شده توسط آغازگرها رخ داده ولی بیان قسمت‌های دیگر ژن هسته یخ و بیان پروتئین‌های هسته یخ دچار اختلال نشده است. یعنی قطعات تکثیر شده توسط جفت آغازگر *inaC*، کل ژن هسته یخ این جدایه‌ها را نمی‌توانست پوشش دهد، شاید قسمتی از ژن

منابع

Edwards AR, Van Den Bussche RA, Wichman HA, Orser CS (1994) Unusual pattern of bacterial ice nucleation gene evolution. *Molecular Biology and Evolution* 11:911-920.
Gibson R, Kelly J, Wright G (2001) Dealing with freeze damaged landscape plants. *Journal of Agricultural Life Scientist of Arizona University*.
Keykhasaber M, Rahimian H, Babaeian Jelodar N, Bolouri Moghaddam M (2007) Production of ice nucleation deficient (Ice⁻) mutants of the epiphytic strains of *Erwinia herbicola*. *Iranian Journal of Biotechnology* 5:153-157 (in Farsi).
Klement Z, Farkas GL, Lovrekovich L (1964) Hypersensitivity reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology* 54:474-477.
Lelliott RA, Billing E, Hayward AC (1966) A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *pseudomonads*. *Journal of Applied Bacteriology* 29:470-89.
Lindow SE (1983) Methods of preventing frost injury caused by epiphytic ice nucleation active bacteria. *Plant Disease* 67:327-333.
Maki LR, Galyan EL, Chang-Chien MM, Caldwell DR (1974) Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae*. *Applied Microbiology* 28: 456-460.

Marco M, Lindow SE, Quantification of biological ice nuclei from the *inaZ* reporter gene, the droplet freezing method in: Loper JE, Lindow SE (1997) Reporter gene systems useful in evaluating in situ gene expression by soil- and plant-associated bacteria. pp.482-492. In: Christon Journal Hurst (ed), *Manual of Enviromental Microbiology* ASM Press. Washington, DC.
Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologiae Plantarum* 15:473-497.
Obata H, Ttakeuchi S, Tokuyama T (1990) Release of cell-free ice nuclei from *Pseudomonas viridiflava* with a triton X-100/EDTA system and their ice nucleation properties. *Journal of Ferment Bioengineering* 70:308-312.
Pourmoayyed P (2005) Inactivation of ice nucleation activity in strains epiphytic *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas syringae*. M.S. Thesis. Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (in Farsi).
Rouhraz K, Rahimian H (2011) Bacterial leaf spot disease of sleepy marshmallow caused positive Levan strains of *Pseudomonas viridiflava*. *Journal of Plant Diseases* 47:39-55 (in Farsi).
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.
Wolber PK (1992) Bacterial ice nucleation. *Advances Microbial Physiology* 34:205-237.