

بررسی نقش ژن *inaZ* در تولید هسته یخ در باکتری‌های *Escherichia*

coli فوترکیب و *Pseudomonas syringae* جهش‌یافته

Investigating the role of *inaZ* gene in production of ice nuclei in recombinant *Escherichia coli* and mutant *Pseudomonas syringae* bacteria

نصیبه یاری^۱، نادر حسن‌زاده راستگاری^۲، پرینسا عبداللهی^{*}

۱- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد

علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲- دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

Yari N¹, Hassanzadeh Rstegari N², Abdollahi P^{*1}

1- MSc Student and Assistant professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, SR.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Associate Professor, Department of plant protection, SR.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۰۶ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۲/۲۹)

چکیده

باکتری‌های فعال هسته یخ (Ice nucleation bacteria) از عواملی هستند که در ایجاد خسارت ناشی از سرمازدگی و یخ‌زدگی در گیاهان حساس به سرما نقش مهمی دارند. ژن‌های هسته یخ در باکتری‌ها به‌صورت یک ژن کروموزومی منفرد است که غالباً در زیرمجموعه ژن‌های *ina* طبقه‌بندی می‌شوند و در بیان فنوتیپ تولید هسته یخ (INA^+) نقش کلیدی دارند. یکی از راه‌های مقابله با سرمازدگی ایجاد تغییر در ساختار ژنتیکی ژن کدکننده پروتئین *INA* است. تکثیر ژن *inaZ* در باکتری *Pseudomonas syringae* با یک جفت آغازگر اختصاصی و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) انجام شد. محصول PCR در وکتور pTG19-T کلون و به باکتری *Escherichia coli* منتقل شد. جهت ارزیابی و مقایسه فرکانس هسته یخ *E. coli* فوترکیب از روش انجماد قطره‌ای *K12* استفاده شد. برای ایجاد جهش در ژن *ina* در باکتری *Pseudomonas syringae* از ماده EMS (Ethyl methanesulfonate) استفاده شد. برای تأیید جهش ایجاد شده، علاوه بر آنالیز PCR، باکتری جهش‌یافته فاقد ژن هسته یخ و واجد آن در باکتری وحشی، با آزمون انجماد قطره‌ای مقایسه شدند. نتایج بر اساس فرمول پایه تشکیل ۵۰ درصد قطره انجماد در هر تیمار (T_{50}) نسبت به شاهد آب مقطر استریل و باکتری وحشی *E. coli* فاقد هسته یخ زدگی تعیین شد. در کلیه تیمارهای مثبت، بسامد هسته یخ زدگی بین ۴- تا ۷- بسته به رقت سوسپانسیون‌ها متغیر بود. مشاهدات نشان داد علاوه بر انتقال موفق ژن *inaZ* مولد هسته یخ از باکتری *P. syringae* به *E. coli*، کلنیهای جهش‌یافته *P. syringae* به‌دلیل فقدان ژن هسته یخ، کاندیدهای مناسبی برای ایجاد اثر رقابتی با باکتری‌های INA^+ محسوب شده که می‌توانند با قدرت تکثیر مشابه باکتری‌های وحشی روی گیاهان مستقر و مانع هسته یخ بیولوژیکی شوند و جایگزین مناسبی برای محدود باکتری کش‌های گیاهی باشند.

واژه‌های کلیدی

باکتری فوترکیب
تنش سرمازدگی
جهش‌زایی
ژن هسته یخ

مقدمه

مهم‌ترین عامل محدود کننده در تولید محصولات گیاهی در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری، تنش سرما است. البته سرمازدگی همیشه متأثر از جغرافیای محل نیست. گاهی اوقات جریان توده بزرگ هوای سرد در سطح افق می‌تواند کاهش ناگهانی و شدید دما در بهار و پاییز شده و خسارت شدید سرمازدگی را در گیاهان به وجود آورد (Luoranen et al. 2022). هر ساله پهنه وسیعی از حاصل‌خیزترین مناطق تولیدی کشور و قسمت عمده محصولات اقتصادی مهم کشور، در معرض تنش سرما قرار می‌گیرند. باکتری‌های دارای ژن فعال هسته یخ به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل بیولوژیکی تشکیل هسته یخ در گیاهان، نقش عمده‌ای در تسریع سرمازدگی در دماهای بالاتر زیر صفر درجه دارند. این خسارات عمدتاً به دلیل تشکیل کریستال‌های یخ در بافت‌های گیاه در دمای زیر صفر پدید می‌آید. اگر چه نقطه انجماد آب، صفر درجه سانتی‌گراد می‌باشد اما در آب‌مقطر خالص به دلیل فقدان هسته‌های تشکیل کریستال‌های یخ، آن آب می‌تواند تا -40°C هم برای مدتی یخ نزنند (Rostami et al. 2018).

سال‌ها قبل پژوهشگران دریافته‌اند باکتری‌ها دارای هسته یخ توانایی انجماد آب در بالای صفر درجه سانتی‌گراد را دارند و به تدریج کشف کردند ژن‌های فعال هسته یخ بنام *ina* یکی از مهم‌ترین عوامل بیولوژیکی تشکیل هسته یخ در گیاهان هستند که نقش عمده‌ای در تسریع سرمازدگی در دماهای زیر صفر درجه دارند. در واقع زمانی که جمعیتی از این باکتری وجود داشته باشد، دمای یخ‌زدگی تا 2°C افزایش می‌یابد (Maki et al. 1974; Renzer et al. 2024).

طبیعی است با حذف ژن‌های مولد هسته یخ در باکتری‌های یاد شده، مقاومت این گیاهان به عارضه یخ‌زدگی افزایش می‌یابد. حذف فیزیکی این باکتری‌ها با استفاده از باکتری‌کش‌های رایج امکان‌پذیر است. اما این امر با محدودیت‌هایی مواجه می‌باشد. دانشمندان اخیراً توانسته‌اند از طریق مهندسی ژنتیک ژن‌های مولد هسته یخ را در این باکتری‌ها حذف و از این طریق مقاومت آن‌ها را به سرمازدگی افزایش دهند (Lindow 2023). باکتری‌های فعال هسته یخ تقریباً روی همه سطح گیاهان یافت می‌شوند. ایجاد خسارت یخ‌زدگی در گیاهان به‌طور مستقیم به لگاریتم جمعیت باکتری‌های فعال هسته یخ و لگاریتم تعداد هسته‌های یخ باکتریایی در زمان انجماد بستگی

دارد. هر تیماری که تعداد باکتری‌های فعال هسته یخ و به تبع آن فعالیت هسته‌زایی باکتری‌ها را روی گیاهان کاهش دهد، میزان خسارت یخ‌زدگی را در گیاهان کاهش می‌دهد. یکی از این راهکارها، دستکاری در ساختار ژنتیکی ژن کد کننده پروتئین INA است به‌طوری که دیگر قادر به کد کردن پروتئین هسته یخ نباشد. در نتیجه این عمل، *inaZ* باکتری *Pseudomonas syringae* قادر به تولید هسته‌های یخی و در نتیجه یخ‌زدگی در گیاه نمی‌شود و هزینه‌های لازم برای حفاظت از یخ‌زدگی به‌طور قابل توجهی کاهش می‌یابد و از کاهش عملکرد و کیفیت محصول نیز جلوگیری می‌شود (Kassmannhuber et al. 2017).

ژن هسته یخ در اغلب باکتری‌ها به‌عنوان یک ژن کروموزومی منفرد، با نام اختصاری *ina* شناخته می‌شود. از ژن‌های شناخته شده هسته یخ که توالی‌یابی شده‌اند می‌توان به *inaZ* از *Pseudomonas syringae*، *inaW* از *Pseudomonas fluorescens*، *iceE* از *Erwinia herbicola*، *inaA* از *Erwinia ananas* و *inaX* از *Xanthomonas campestris* اشاره کرد (Edwards et al. 1994). امروزه به کمک زیست فناوری می‌توان با تغییر در فلور میکروبی منطقه‌ای که شامل کاهش میکروارگانیسم‌های مهم توزیع کننده ی هسته‌های یخ به‌ویژه باکتری‌های اپی‌فیت است در جهت پیشگیری از سرمازدگی اقدام نمود. باکتری‌های اپی‌فیت در سطح اندام‌های گیاهی مانند برگ و ساقه زندگی می‌کنند و بر خلاف انگل‌ها به گیاه میزبان آسیب نمی‌رسانند و مواد غذایی مورد نیاز را از محیط اطراف دریافت می‌کنند. در این روش با تخریب مستقیم یا غیر مستقیم ژن عامل هسته یخ، جدایه‌های فاقد پروتئین هسته یخ به‌دست می‌آیند که در همه‌ی خواص مورفولوژیکی، اکولوژیکی و اپی‌فیتی به جز قابلیت تشکیل هسته یخ مشابه (ایزوژن) جدایه‌ی والد خود هستند و با تکثیر و انتقال روی گیاه با اشغال محل‌های مناسب، با والد وحشی خود به رقابت پرداخته یا از استقرار آن جلوگیری می‌کنند (Lindow 2023).

در پژوهش حاضر به‌منظور اثبات عملکرد ژن *inaZ* و اطمینان از اینکه باکتری فاقد فعالیت هسته یخ با دریافت یک نسخه از ژن مذکور فعالیت هسته یخ را به‌دست خواهد آورد، ابتدا ژن مورد نظر تکثیر و شبیه‌سازی شده و سپس به *E. coli* انتقال داده شد. همچنین

استخراج DNA ژنومی باکتری و آنالیز PCR به منظور استخراج DNA ژنومی باکتری از روش لیز قلیائی استفاده شد (Shwani et al. 2024). تعیین کیفیت نمونه های DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ سنجیده شد. به منظور تکثیر ژن هسته یخ *inaZ* در باکتری مولد هسته یخ *P. syringae* از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده به کمک نرم افزار Primer3 استفاده شد. توالی جفت آغازگرها برای تکثیر ژن عامل هسته یخ عبارت بودند از 5'GCA GAC TGC GGG TTA TGA GAG (3' و 5'CGC CGG TCA GTT TGC TTC TAT C 3' (R). تکثیر ژن *inaZ* با استفاده از آغازگر اختصاصی ژن از طریق واکنش زنجیره ای پلیمرز انجام شد. به منظور بهینه سازی PCR، (100 ng) DNA، با 1 μM از هر کدام از آغازگرها و 1X بافر PCR Master mix به همراه یک واحد آنزیم Taq DNA polymerase و حجم نهایی واکنش 25 میکرولیتر استفاده شد. واکنش PCR با شرایط دمایی 3 دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای 94°C، واسرشت شدن در دمای 94°C به مدت 30 ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای 56°C به مدت 30 ثانیه، بسط در دمای 72°C به مدت 2 دقیقه، بسط نهایی در دمای 72°C به مدت 5 دقیقه و طی 35 چرخه انجام و محصول تکثیر شده به کمک ژل آگارز 1٪ الکتروفورز شد.

به منظور شستشو و خالص سازی محصول PCR، 2 میکرولیتر سدیم استات 3M و 8 میکرولیتر ایزوپروپانول به 10 میکرولیتر از محصول PCR اضافه و مخلوط شد. مخلوط حاصل پس از آن که به مدت 25 دقیقه در فریزر 80°C قرار داده شد، به مدت 20 دقیقه در 16000 rpm سانتریفیوژ شد. فاز رویی میکروتیوب خالی شده و مقدار 10 میکرولیتر اتانول 70٪ به آن اضافه شد. پس از سانتریفیوژ به مدت 20 دقیقه در 16000 rpm بار دیگر فاز رویی خالی شده و بعد از تبخیر کل اتانول موجود در میکروتیوب در نهایت 10 میکرولیتر آب مقطر استریل به آن اضافه نموده و در 20°C برای مرحله بعدی نگهداری شد.

کلونینگ محصول PCR

درج محصول PCR در وکتور pTG19-T با استفاده از کیت PCR TA Cloning شرکت سينا کلون ایران (CL5841) مطابق با دستورالعمل موجود در کیت انجام شد. ژن مورد نظر به روش شوک حرارتی در باکتری *E. coli* همسانه سازی شد. 100 میکرولیتر از

با ایجاد جهش زایی در باکتری *P. syringae* امکان ایجاد جهش در ژن *inaZ* و از دست رفتن فعالیت هسته یخ بررسی شد.

مواد و روش ها

تشخیص اولیه باکتری

باکتری *Pseudomonas syringae* که از روی درخت پسته کرمان جداسازی و شناسائی شده بود (Rostami et al. 2018 a, Rostami at al. 2018 b) تهیه و پس از خالص سازی مجدد و انجام چند آزمون کلیدی چون آزمون های لوپات شامل لوآن، اکسیداز، لمانیدن سیب زمینی، تولید آرژنین دی هیدروژلاز و ایجاد فوق حساسیت روی برگ توتون (Klement et al. 1964) در لوله حاوی محیط کشت نوترینت آگار زیر پارافین مایع دوبار استریل در شرایط اتاق نگهداری شد.

تعیین فعالیت هسته یخ

جهت تعیین فعالیت هسته یخ و میزان بسامد هسته یخ ایزوله، از روش انجماد قطره ای استفاده شد (Vali 1971). باکتری *P. syringae* روی محیط کشت KB (King's B) کشت داده شد. تک کلونی ها به آب مقطر استریل منتقل و غلظت سوسپانسیون های باکتریایی با دستگاه اسپکتروفتومتر در OD₆₀₀=0.1 تنظیم شد. در شرایط مذکور واحد تشکیل کلنی (CFU) (Colony forming unit) حدود 10⁸ سلول در یک میلی لیتر محلول بود. از هر سوسپانسیون سری رقت های لگاریتمی (10⁻¹، 10⁻²، 10⁻³) تهیه شد و 25 μl از هر سوسپانسیون روی ورقه آلومینیم آغشته به پارافین گذاشته شد. پوشش پارافین موجب می شود قطرات، حالت برجسته روی ورقه آلومینیم به خود بگیرند. قطرات آب مقطر استریل به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. ورقه آلومینیم روی حمام فوق سرد داخل یک سینی حاوی نسبت 1:1 اتانول و آب مقطر که پس از ترکیب شدن در فریزر نگهداری می شود، قرار داده شده و در دمای ثابت 4°C- تعداد قطرات یخ زده شمارش شد. تعداد قطرات یخ زده پس از 3 دقیقه یادداشت و بسامد هسته یخ با استفاده از فرمول $N(T) = -\ln(1-F) / C \times V$ محاسبه شد، که در آن $N(T)$ بسامد هسته یخ در دمای T، F حاصل تقسیم تعداد قطرات یخ زده به تعداد کل قطرات در آزمون، C غلظت سلول ها در سوسپانسیون و V حجم هر قطره در واحد میلی لیتر است (Schaad et al. 2001).

از گذشت ۱۲ ساعت از رشد و کدر شدن محیط کشت، از سوسپانسیون حاصل ۱۰ میکرولیتر به یک میلی لیتر محیط کشت مایع پایه LB منتقل شد. پس از ۶ ساعت، EMS در دو غلظت ۱۵ و ۲۰ میکرولیتر در میلی لیتر به هر کدام اضافه و ورتکس شد. بعد از آن نمونه های تیمار شده به مدت ۳۵ دقیقه در دمای ۲۷°C روی شیکر با تکان ملایم قرار داده شد. برای حذف EMS سلول ها سه بار در محیط کشت مایع پایه استریل به کمک سانتریفیوژ یخچال دار در دور ۳۰۰۰rpm شستشو داده شد. رسوب نهایی در یک میلی لیتر محیط پایه مجدداً سوسپانسیون شد و به مدت ۴ ساعت در دمای ۲۷°C رشد داده شد تا پس از ۷۲ ساعت رشد، کلونی های جهش یافته به دست آید (Lindow 1983). به منظور اطمینان از ایجاد جهش در ژن *inaZ* باکتری *P. syringae* کلونی ها با روش PCR و آغازگرهای اختصاصی ژن *inaZ* بررسی و فعالیت هسته یخ آن ها مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

تشخیص اولیه باکتری:

واکنش منفی ایزوله باکتری به دو آزمون کلیدی اکسیداز و آرژنین دی هیدروژناز، واکنش گرم منفی، رشد هوازی و عدم لهانیدن سبب زمینی و نیز ایجاد واکنش فوق حساسیت در برگ توتون، و از همه مهم تر فعالیت هسته یخ، تولید لوان از ساکاروز و تولید پیگمان فلورسنت، موید صفات فنوتیپی مشابه به *P. syringae* بود (جدول ۱).

جدول ۱- آزمون های کلیدی جهت تشخیص اولیه باکتری *P. syringae*

نوع آزمون	واکنش گرم	کاتالاز	اکسیداز	تولید پیگمانت فلورسنت در محیط KB	لوان	آرژنین دی هیدروژناز	پوسیدگی سبب زمینی	رشد هوازی	واکنش فوق حساسیت وی توتون	فعالیت
نتیجه	منفی	مثبت	منفی	مثبت	مثبت	منفی	منفی	مثبت	مثبت	مثبت

کردند. مبنای قدرت هسته یخ، تشکیل ۵۰ درصد قطره انجماد در هر تیمار بود (T₅₀). شاهد آب مقطر استریل و باکتری وحشی *E. coli* فاقد هسته یخ زدگی بود (شکل ۱).

سلول های انتقال یافته، روی سطح پلیت LB-Ampicillin X-Gal/IPTG agar اسپری شده و بعد از گذشت ۲۴ تا ۴۸ ساعت کلونی ها شامل کلونی های نوترکیب به رنگ سفید و کلونی های آبی فاقد پلاسمید نوترکیب رشد کردند. به منظور اطمینان از نوترکیبی کلونی های سفید، کلونی PCR با استفاده از آغازگرهای رفت و برگشت عمومی M13 موجود در کیت انجام شد. پس از انتقال ژن *inaZ* به باکتری *E. coli* سوسپانسیون سلولی از کلون های نوترکیب دارای ژن *inaZ* تهیه شده و استخراج پلاسمید کلونی های نوترکیب طبق دستورالعمل کیت Plasmid extraction Kit (Ex611) شرکت سیناژن، انجام گرفت. جهت تأیید حضور ژن *inaZ* در پلاسمید نوترکیب تکثیر ژن *inaZ* با استفاده از آغازگر اختصاصی ژن از طریق واکنش زنجیره ای پلیمرز انجام شد. محصولات PCR برای توالی یابی با آغازگرهای رفت و برگشت به شرکت تکاپوزیست (Bioneer کره جنوبی) فرستاده شد. توالی نوکلئوتیدی حاصل در سایت بانک اطلاعاتی جهانی NCBI بلاست و با سویه های موجود در بانک ژن مقایسه شد. ارزیابی و مقایسه فرکانس هسته یخ *E. coli* نوترکیب به روش انجماد قطره ای انجام شد (et al. 2001, Schaad).

تولید موتانت های فاقد ژن فعالیت هسته یخ در جدایه *P. syringae* با استفاده از اتیل متان سولفونات به منظور ایجاد جهش در ژن *inaZ* ایزوله *P. syringae* که واجد فعالیت هسته یخ بودند از ماده اتیل متان سولفونات (EMS) استفاده شد. ایزوله باکتری *P. syringae* در محیط کشت Luria-Bertani (LB) مایع کشت داده شد و در ۳۰°C روی شیکر نگهداری شد. بعد

تعیین فعالیت هسته یخ

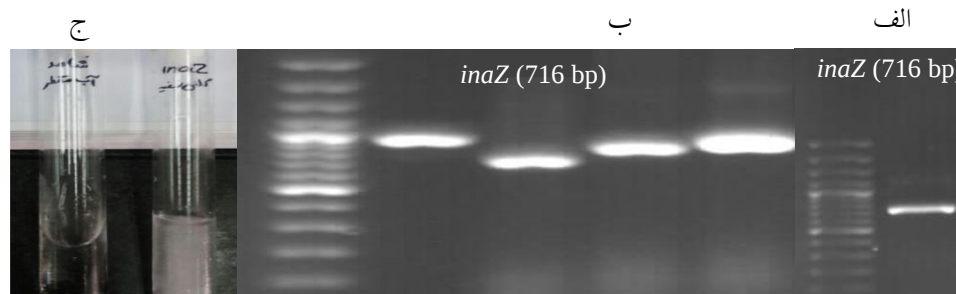
برای ارزیابی و مقایسه بسامد هسته یخ ایزوله ها، از روش انجماد قطره ای استفاده شد. سوسپانسیون سلولی در سه رقت مختلف تهیه و هر سری رقت سه بار تکرار شد. آزمون ها در دماهای بین ۴-°C تا ۷-°C تکرار شد. از دمای ۴-°C سری رقت ها شروع به یخ زدن

جدول ۲- بسامد هسته یخ در باکتری‌های *Pseudomonas syringae* و *Escherichia coli*

نمونه	دما T50 (°C)	میزان یخ زدگی	لگاریتم فرکانس (Log F)	تعداد سلولهای هسته یخ
آب مقطر	-۴	$0/00 \pm 0/00^d$	۰	۰
<i>E. coli</i> تیپ وحشی	-۴	$0/00 \pm 0/00^d$	۰	۰
<i>P. syringae</i> تیپ وحشی	-۴	$9/67 \pm 0/33^a$	-۶	۱ در 10^6 سلول
<i>E. coli</i> نو ترکیب	-۴	$9/00 \pm 0/00^b$	-۶	۱ در 10^6 سلول
<i>P. syringae</i> جهش یافته	-۴	$0/67 \pm 0/33^c$	-۸	۱ در 10^8 سلول



شکل ۱- توانایی تشکیل هسته یخ در سری رقت‌های تهیه شده از ایزوله *P. syringae* به ترتیب از سمت چپ ردیف اول شاهد (آب مقطر استریل فاقد کریستال‌های یخ) و ردیف‌های ۲، ۳ و ۴ سری رقت اول (۱-۱۰)، ردیف‌های ۵، ۶ و ۷ سری رقت دوم (۲-۱۰) و ردیف‌های ۸، ۹ و ۱۰ سری رقت سوم (۳-۱۰) که ۹۰٪ آن‌ها ایجاد کریستال‌های یخ نمودند. قطره‌ها از دمای 4°C - شروع به یخ زدن کردند و تصویر پس از ۳ دقیقه در دمای 7°C - ثبت شده است.



شکل ۲- الف- الکتروفورز محصول PCR مربوط به تکثیر ژن *inaZ* با پرایمرهای اختصاصی، چاهک اول از چپ لدر ۱۰۰۰ bp و چاهک ۲ قطعه تکثیر شده مربوط به *inaZ* با اندازه ۷۱۶ bp، ب- الکتروفورز محصول PCR تکثیر ژن *inaZ* در پلاسمید استخراج شده از کلونی‌های نو ترکیب سفید رنگ ج- آزمون فعالیت هسته یخ باکتری نو ترکیب *E. coli* واجد ژن *inaZ* و توانایی فعالیت هسته یخ آن در داخل لوله آب مقطر استریل در دمای ثابت 4°C -.

به باکتری منتقل شده است، از سوسپانسیون کلونی‌های نو ترکیب سفید رنگ استخراج پلاسمید و سپس PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی *inaZ* و همچنین پرایمرهای عمومی M13 انجام شد. الکتروفورز همه محصولات PCR حضور ژن *inaZ* در باکتری *E. coli* را اثبات کرد (شکل ۲-ب). آزمون فعالیت هسته یخ باکتری نو ترکیب *E. coli* واجد ژن *inaZ* نشان داد که با انتقال ژن *inaZ* به این باکتری، فنوتیپ توانایی فعالیت هسته یخ در آن بروز پیدا کرده

بسامد هسته یخ برای باکتری‌های *E. coli* تیپ وحشی و نو ترکیب *P. syringae* تیپ وحشی و جهش یافته محاسبه شده که در جدول ۲ گزارش شده است. با کمک PCR و با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی ژن *inaZ* باند اختصاصی ۷۱۶bp تولید شد (شکل ۲-الف). محصول PCR پس از شستشو در وکتور pTG19-T کلون شد و به باکتری *E. coli* انتقال داده شد. برای اطمینان از اینکه ژن مورد نظر

و در دمای ثابت 4°C - شروع به یخ زدن می کند (شکل ۲-ج). نتایج مقایسه میانگین نشان داد بین درصد یخ زدگی باکتری *E. coli* نو ترکیب و *E. coli* تیپ وحشی اختلاف معنی داری وجود دارد (شکل ۵)

بلاست توالی قطعه ۱۷۶ bp نشان داد قطعه جدا شده از ایزوله *P. syringae* با همپوشانی ۱۰۰ درصد و میزان تشابه بالای ۹۶ درصد مربوط به ژن *inaZ* است (نتایج گزارش نشده است).

تولید موتانت های فاقد ژن فعالیت هسته یخ در جدایه *P. syringae* با استفاده از اتیل متان سولفونات و بررسی قدرت هسته یخ زدگی آن ها

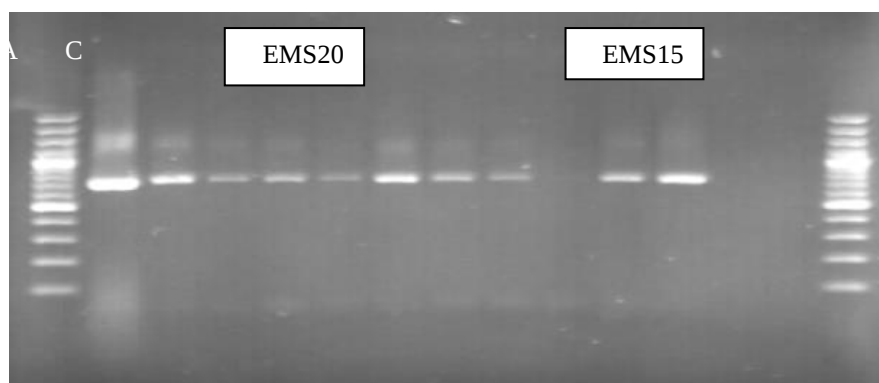
به منظور ایجاد جهش یافته های *P. syringae* که فاقد فعالیت هسته یخ باشند از اتیل متان سولفونات (EMS) استفاده شد. باکتری *P. syringae* که فعالیت هسته یخ آن به اثبات رسیده بود تحت تاثیر تیمار شیمیایی EMS قرار گرفت. این باکتری در مرحله رشد لگاریتمی با دو دز ۱۵ و ۲۰ میکرولیتر در میلی لیتر EMS تیمار شد و پس از حذف کامل موتاژن سلول های احتمالاً جهش یافته در رقت های بسیار پایین در پتری کشت داده شدند. از بین کلونی های ایجاد شده، کلونی های حاصل از تیمار با EMS با دز ۱۵ میکرولیتر جهش در ژن *inaZ* را نشان دادند. ایجاد فنوتیپ هسته یخ به وجود ژن *ina* نیاز دارد و از طرفی بیان هسته های یخی در باکتری نیاز به غشای سالم و بی عیب دارد تا پروتئین های محرک یخ بتوانند در ساختارهای گسترده و کافی آرایش یابند و سبب تسریع تشکیل یخ در دماهای نزدیک صفر درجه گردند. بنابراین در موتانت ها با کوچک ترین تغییر در سطح ژن هسته یخ، تغییراتی در ساختارهای غشایی به وجود می آید و آرایه های پروتئین را ناپایدار می کند و یا از تشکیل شدن آن ممانعت می نماید (Lindow 1993). بعد از گذر ۴۸ ساعت از رشد باکتری ها، تعدادی کلونی انتخاب شده و با آغازگر *inaZ* در واکنش زنجیره ای پلیمرز مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این ارزیابی مشاهده شد که بعضی از کلونی ها با آغازگر *inaZ*، بانندی مشابه باند والدینی تولید کردند. اما تعدادی از این کلونی ها نیز با آغازگر *inaZ* نتوانستند باند تولید کنند که به عنوان کلونی جهش یافته شناسایی شدند. (شکل ۳) کلنی های موتانت فاقد قطعه تکثیر شده *inaZ* با آزمون انجماد قطره ای در سه تکرار با باکتری *P. syringae* تیپ وحشی در سه سری رقت و هر کدام در

سه تکرار در دمای 4°C - تا 7°C - با یکدیگر مقایسه شدند (جدول ۲). باکتری تیپ وحشی در دمای 4°C - شروع به یخ زدن کرد و تا دمای 7°C -، ۹۰٪ سری رقت ها یخ زدند. تیپ جهش یافته از ۱۰ قطره فقط یک قطره یخ زد که نشان دهنده حذف یا جهش موفق ژن یخ *inaZ* از باکتری تیپ وحشی می باشد. نتایج مقایسه میانگین نشان داد بین درصد یخ زدگی باکتری *P. syringae* جهش یافته و *P. syringae* تیپ وحشی اختلاف معنی داری وجود دارد (شکل ۵). لازم به ذکر است تعیین دقیق محل ایجاد جهش نیازمند توالیابی ژن *ina* باکتری جهش یافته است اما با توجه به عدم تشکیل باند در PCR و هماهنگی آن با فنوتیپ عدم تشکیل هسته یخ می توان پیش بینی کرد که به احتمال قوی جهش در ژن *ina* این کلونی ها در محدوده اتصال آغازگر طراحی شده رخ داده است و این جهش یافته ها را می توان به عنوان جدایه *ina* در نظر گرفت (شکل ۴).

بحث

فعالیت هسته زایی یخ در باکتری های گیاهی برای اولین بار در سودوموناس در دهه ۱۹۷۰ کشف شد. متعاقباً، چندین باکتری یخ ساز دیگر متعلق به گونه هایی در خانواده های *Pseudomonadaceae*، *Enterobacteriaceae* و *Xanthomonadaceae* و *Lysinibacillus* شناسایی شدند. *P. syringae* هسته یخ را در دمای 2°C - درجه سانتی گراد فعال می کند. توانایی باکتری ها در تسهیل تشکیل یخ به پروتئین های تخصصی متصل به غشای سلول باکتری نسبت داده می شود. *P. syringae* به عنوان یک بیمارگر گیاهی با افزایش دمای هسته زایی آب باعث آسیب یخ زدگی در بافت گیاهی می شود که دسترسی به مواد مغذی را ممکن می سازد (Failor et al. 2017).

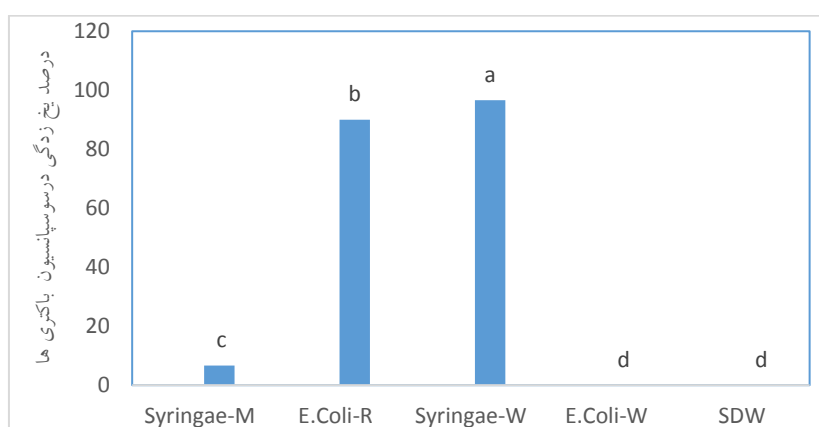
در ایران سالانه بسیاری از محصولات مهم کشاورزی تحت تاثیر تنش سرمایی قرار می گیرند و به همین دلیل شناسایی باکتری های دارای فعالیت هسته یخ مورد توجه قرار گرفته است. حضور باکتری های اپی فیت هسته یخ روی درختان میوه هسته دار از جمله آلبالو، گیلاس، زردآلو، آلو، هلو، شلیل، بادام و گوجه سبز در استان خراسان رضوی گزارش شده است (Taher et al. 2015).



شکل ۳- الکتروفورز ژل آگارز مربوط به PCR جهش یافته‌های *P. syringae*. به ترتیب از سمت چپ A: DNA لدر، C: شاهد مثبت، EMS20 کلنی‌های تیمار شده با غلظت ۲۰ میکرولیتر EMS و EMS15 کلنی‌های تیمار شده با غلظت ۱۵ میکرولیتر EMS عدم حضور باند نشانه وجود جهش در ژن *inaZ* در جایگاه اتصال پرایمر است.



شکل ۴- آزمون انجماد قطره ای سوسپانسیون باکتری نوع وحشی و جهش یافته *P. syringae* در حمام فوق سرد شده توسط اتانول و یخ در دمای 7°C -، قطرات یخ زده ظاهری کدر نسبت به قطرات یخ زده دارند. شاهد آب مقطر است. سری رقت اول، سری رقت دوم و سری رقت سوم مربوط باکتری تیپ وحشی دارای فعالیت هسته یخ است. باکتری جهش یافته (سمت راست) فاقد ژن هسته یخ و فاقد توانایی در ایجاد کریستال‌های یخ.



شکل ۵- درصد یخ زدگی در آزمون انجماد قطره ای سوسپانسیون باکتری برای رقت 10^{-3} و در دمای 4°C $\pm$ SDW: آب مقطر استریل (شاهد)، E.Coli-W: باکتری *E.Coli* تیپ وحشی، Syringae-W: باکتری *P. syringae* تیپ وحشی، E.Coli-R: باکتری *E.Coli* نوترکیب دارای ژن *inaZ* Syringae-M: باکتری *P. syringae* جهش یافته فاقد فعالیت هسته یخ

که در ژن‌های *ina* مشاهده می‌شود، مطالعات تکاملی را پیچیده کرده است، با این حال شباهت بالای توالی بین ژن‌های *ina* در گونه‌های مختلف فیلوژنتیکی نشان می‌دهد که در آن‌ها قطعات به صورت افقی منتقل شده‌اند. مدل‌های ساختاری متفاوت *INA* می‌تواند توانایی آن‌ها را برای عمل به‌عنوان یک هسته یخی توضیح دهد (Roeters et al. 2021).

حضور باکتری‌های جهش‌یافته در بازدارندگی رقابتی باکتری‌های نوع وحشی روی گیاهان در معرض تنش سرما بسیار حائز اهمیت می‌باشند. نتایج پژوهش‌ها نشان می‌دهد زمانی که روی گیاه باکتری نوع وحشی همراه با نوع جهش‌یافته که جمعیت آن‌ها ۱۰۰ برابر نوع وحشی بود، وجود داشته باشد، باکتری نوع وحشی دارای فعالیت هسته یخ قادر به انتشار خود روی گیاه قبل از انتشار نوع جهش یافته فاقد فعالیت هسته یخ نبود و از نظر مقابله با تنش سرما نتیجه مشابه زمانی است که گیاه فقط با نوع جهش یافته تیمار شده است (Lindow 2023).

در پژوهش حاضر عملکرد ژن *inaZ* به دو صورت مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا ژن مورد منظر پس از شبیه‌سازی به باکتری اشرشیاکولی انتقال داده شد که نتایج نشان داد باکتری نوترکیب به‌واسطه دریافت تک ژن *inaZ* توانایی تشکیل هسته یخ را به‌دست آورد. این نتیجه ضمن اثبات نقش تک ژن *inaZ* در ایجاد هسته یخ، نشان داد روش استفاده شده در این پژوهش برای جداسازی ژن مورد نظر و ایجاد سویه نوترکیب اشرشیاکولی روش مناسبی بود (شکل ۲).

نتایج گزارش شده دیگر پژوهشگران نشان داده است که شبیه‌سازی ژن‌های منفرد *ina* که هسته یخ را به چندین گونه باکتری گرم منفی اعطا می‌کنند، گام مهمی در درک فرآیندی بود که توسط آن باکتری‌ها تشکیل یخ را کاتالیز می‌کنند. از سوی دیگر، یافته‌های مبنی بر اینکه تک ژن‌های *ina* یک فنوتیپ Ice^+ را ایجاد می‌کنند که تا حد زیادی فنوتیپ سویه منشأ را هنگام شبیه‌سازی و بیان در اشرشیاکولای کپی می‌کند، نگرانی‌های قبلی مبنی بر اینکه این فنوتیپ یک صفت پیچیده و چند ژنی باشد را برطرف می‌کند (Orser et al. 1985; Warren and Wolber 1978). به‌طور طبیعی، پروتئین هسته یخ مربوط به *P. syringe* روی سطح غشای بیرونی باکتری مستقر می‌شود (Kassmannhuber et al. 2017). اثبات این

فعالیت هسته یخ روی پیاز نیز در ایران گزارش شده اگرچه ژن شناسایی شده *inaZ* نبوده و به گروه‌های دیگری از خانواده *ina* تعلق داشت (Karkazi et al. 2019). سرمای شدید زمستان و تنش سرمایی عاملی محدود کننده برای نیشکر به‌عنوان یکی از محصولات استراتژیک ایران است. استان خوزستان تنها استان نیشکر خیز ایران بوده که تنش سرمایی به مدت سه هفته کاهش عملکرد در نیشکر را به دنبال دارد. اثر استرین‌های باکتری‌های مختلف که عمل تشکیل هسته یخ در آن‌ها به اثبات رسیده بود روی برگ‌های ارقام تجاری نیشکر در آب و هوای گرم نشان داد که در بین این ارقام برخی حساسیت زیادی به سرما نشان دادند و خسارت قابل توجهی را متحمل شدند و برخی دیگر مقاومت نشان دادند. بررسی اثر باکتری‌های هسته یخ در شرایط گلخانه می‌تواند اطلاعات مفیدی را در اختیار تولیدکنندگان محصولات کشاورزی قرار دهد (Moazzen Rezamahalleh et al. 2020).

همه ژن‌های *ina* نسبتاً بزرگ و بیشتر از ۳ کیلوبایت هستند و پروتئین‌های *INA* را رمزگذاری می‌کنند. این پروتئین‌ها دارای بخش پایانی آمینو غیر تکراری نسبتاً کوچکی معادل ۱۶۱ تا ۲۰۳ اسید آمینه و همچنین یک ناحیه هسته تکراری بسیار بزرگ متشکل از ۹۶۰ تا ۱۲۹۶ اسید آمینه و یک قسمت انتهایی کربوکسیل غیر تکراری نسبتاً کوتاه با طول ۴۱ تا ۶۸ اسید آمینه هستند (Wolber and Warren, 1987). با بررسی ساختاری تعاملات بین آب و پروتئین هسته یخ *InaZ* از باکتری *P. syringae*، نشان داده شده است که پروتئین *InaZ* یک ساختار بتا مارپیچ در محلول و در سطوح آب ایجاد می‌کند. در این پیکربندی، تعامل بین *INA*‌ها و مولکول‌های آب، نظم ساختاری را بر شبکه آب مجاور تحمیل می‌کند. بخش داخلی وسیعی از پروتئین *INA*، توالی‌های تکرارشونده پشت سر هم متشکل از ۸ و ۱۶ اسید آمینه غنی از سرین و ترئونین را کد می‌کند. یک توالی تکراری بزرگ‌تر که یک موتیف ۴۸ اسید آمینه‌ای را کد می‌کند نیز تقریباً در تمام ژن‌های *ina* مشترک است. شواهدی از نوترکیبی مکرر در ژن‌های *ina* وجود دارد که احتمالاً به دلیل درجه بالای شباهت توالی در مناطق تکرار شده است. بنابراین، ژن‌های *ina* احتمالاً در معرض حذف و اضافه شدن مداوم این توالی‌های مکرر هستند، که این می‌تواند دلیل تنوع نسبتاً زیاد در اندازه ژن بین سویه‌ها باشد. نرخ نسبتاً بالای نوترکیبی

توجه به نتایج پژوهش حاضر و شروع یخ زدگی از 4°C - پروتئین InaZ تولید شده جز کلاس A بوده و متفاوت از پژوهش Kassmannhuber et al. (2020) است.

در بخش دوم پژوهش با ایجاد جهش زایی در *P. syringae* سویه های جهش یافته ای به دست آمد که فاقد فعالیت هسته یخ شدند. از آنجا که PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *inaZ* انجام شد و باند مربوطه در این جهش یافته ها مشاهده نشد (شکل ۳) نتایج گویای ایجاد جهش در محل اتصال پرایمر در ژن *inaZ* است که بار دیگر بر تک ژنی بودن فنوتیپ هسته یخ صحت می گذارد. در پژوهش حاضر از بروز فنوتیپ توانایی تشکیل هسته یخ به عنوان صفتی برای تایید بیان ژن *inaZ* استفاده شد و از آزمایش های رایج بررسی پروتئین مانند SDS-PAGE برای شناسایی پروتئین استفاده نشد. پروتئین های غشایی مانند INA در *Pseudomonas syringae* به دلیل وزن بالا که از ۱۱۰ تا ۱۸۰ کیلو دالتون متغیر است و اینکه بخش بزرگی از ساختار آن ها آب گریز است، در محیط آبی ژل یا با SDS نامحلول می شوند و معمولاً به جای باند واضح، توده ای پخش شده یا اسمیر دیده شود. جدا سازی آن ها نیازمند بهینه سازی پروتکل استخراج است که در پژوهش حاضر انجام نشد و تنها بروز فنوتیپ هسته یخ در *E. coli* نو ترکیب و عدم بروز فنوتیپ هسته یخ *Pseudomonas syringae* جهش یافته دلیلی بر وجود یا عدم وجود فعالیت پروتئین مذکور در نظر گرفته شد.

شواهد قابل توجهی نشان می دهد که استراتژی های کاهش جمعیت باکتری های INA^{+} روی گیاهان مانند باکتری کش ها می تواند به طور قابل توجهی بروز خسارت سرما زدگی را کاهش دهد. با این حال، هر رویکردی برای تعدیل باکتری INA^{+} مرتبط با گیاه باید الگوهای زمانی را در نظر بگیرد که به واسطه آن گیاهان با این باکتری ها مواجه می شوند. به طور معمول، اندازه جمعیت انواع باکتری ها، از جمله باکتری INA^{+} ، در بافت های تازه در حال ظهور مانند گل ها و نهال ها بسیار کم است. پس از آن، بسته به شرایط محیطی و میزان تلقیح باکتری، اندازه جمعیت اغلب نسبتاً سریع افزایش می یابد. استراتژی های کنترل یخبندان مبتنی بر کنترل باکتری های INA^{+} معمولاً شامل استفاده از باکتری کش های حاوی ترکیبات مس، یا باکتری های رقابتی غیر INA ، می توانند سرعت تکثیر باکتری های INA^{+} روی گیاهان را کاهش دهند، در نتیجه اندازه جمعیت آن ها

موضوع به کمک فرم مهندسی شده ژن *inaZ* که از ناحیه پایانه N کوتاه شده بود و فاقد توالی انتقال برای استقرار InaZ روی غشای خارجی بود، انجام شد. این مدل مشتق شده از *Escherichia coli* مدل اشباح باکتریایی (BGs) نام گرفت که به عنوان مدلی برای مطالعه نحوه عملکرد InaZ و نقش محلی سازی InaZ در سمت لومینال غشای داخلی باکتری استفاده شد. به طور طبیعی، INP های *P. syringae* روی سطح غشای خارجی نمایش داده می شوند. این پژوهشگران یک فرم کوتاه شده N-ترمینال از *inaZ* را مهندسی کردند که فاقد توالی انتقال برای اتصال InaZ به غشای خارجی بود. این ساختار به *E. coli* منتقل و در آن بیان شد. فعالیت IN مربوط به *E. coli* نو ترکیب زنده مربوطه که تشکیل یخ سطحی آب فوق سرد را در دماهای زیر صفر درجه سانتی گراد کاتالیز می کند، نشان داد میانگین دمای انجماد سلول های زنده والدینی بدون INP در دمای $20/1^{\circ}\text{C}$ - و باکتری های نو ترکیب با INP های متصل به غشای داخلی این مقدار بین 7°C - و 9°C - درجه سانتی گراد تشخیص داده شد، که نشان می دهد القای IN از داخل باکتری توسط INP های متصل به غشای داخلی که رو به سمت غشای داخلی لومینال هستند، بسیار شبیه به IN القا شده توسط INP های باکتریایی واقع در غشای خارجی است. اشباح باکتریایی مشتق شده از این ساختارهای مختلف، مقادیر انجماد اولین قطره را بین 6°C - و 8°C - نشان دادند (Kassmannhuber et al. 2020).

در پژوهش حاضر که انتقال توالی کامل *inaZ* به باکتری *E. coli* باعث بروز فنوتیپ هسته یخ شد، شروع یخ زدگی از دمای 4°C - بود. در پژوهش Kassmannhuber et al. (2020) با مهندسی فرم کوتاه شده N-ترمینال از *inaZ* نشان دادند با حذف ناحیه N-ترمینال نیز امکان بروز فنوتیپ هسته یخ وجود دارد هر چند به دلیل حذف سیگنال های انتقالی پروتئین، InaZ به جای غشای خارجی به غشای داخلی باکتری متصل شد و از طرفی شروع هسته یخ را دمای 6°C - و 8°C - گزارش کردند. باکتری های هسته یخ در سه گروه طبقه بندی شده اند؛ گروه A شامل باکتری هایی است که در دمای 0°C - یا در دماهای بالاتر فعال هستند، گروه B که در دماهای 5°C - تا 8°C - تولید هسته یخ می نمایند و گروه C که در دمای 10°C - و یا کمتر فعالیت تشکیل هسته یخ را دارند (Karkazi et al. 2019).

ترکیبات ضد میکروبی برای مدیریت جمعیت باکتری‌ها در گیاهان، نمونه‌های زیادی از کنترل موفقیت آمیز آسیب سرمازدگی ناشی از تعدیل جمعیت باکتری *INA* وجود دارد (Lindow 2023). سویه‌های جهش‌یافته به‌دست آمده در پژوهش حاضر به دلیل فقدان عملکرد ژن *inaZ* کاندیدهای مناسبی برای ایجاد اثر رقابتی با باکتری‌های دارای ژن یخ زدگی خواهند بود که می‌توانند سرعت تکثیر باکتری‌های INA^+ روی گیاهان را کاهش دهند و جایگزین مناسبی برای باکتری‌کش‌ها باشند. چنین سویه‌هایی به‌صورت تجاری در افشانه‌های برگ، برای گیاهان زراعی ارزشمند حساس به سرما یا یخ زدگی، به‌منظور کاهش تعداد نقاط بالقوه تشکیل هسته اولیه یخ، می‌توانند به کار روند (Karkazi et al. 2019).

را کاهش داده و نقطه‌ی فوق‌خنک‌کننده آستانه بافتی که آن‌ها را در خود جای داده‌اند، کاهش می‌دهند. در مورد استفاده از باکتری‌کش‌های پیشگیرانه برای کنترل بیمارگرهای باکتریایی، هزینه کاربرد مکرر آن‌ها باید با اثربخشی آن‌ها در تعادل باشد. علاوه بر این، کشتن باکتری *INA* با باکتری‌کش‌ها کمی قبل از انجماد، بعید است دمای انجماد گیاهان را تا حد زیادی کاهش دهد. زیرا سلول‌های مرده، فعالیت هسته زایی یخ را برای چندین روز حفظ می‌کنند. متأسفانه، باکتری‌کش‌های نسبتاً کمی برای کنترل باکتری‌های *INA* و سایر باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی نیز وجود دارد. ترکیبات حاوی مس رایج ترین باکتری‌کش‌های در مدیریت باکتری‌های مرتبط با گیاه هستند. علی‌رغم محدودیت‌های این

منابع

- Edwards AR, Ronald A, Wichman HA, Orser CS (1994) Unusual pattern of bacterial ice nucleation gene. *Molecular biology evolution* 11: 911-920.
- Failor KC, Schmale DG, Vinatzer BA, Monteil CL (2017) Ice nucleation active bacteria in precipitation Are genetically diverse and nucleate ice by employing different mechanisms. *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology* 11:2740- 2753.
- Karkazi S, Abdollahi P, Hassanzadeh H (2019) Genetic studies on *Bacillus cereus*, the cause of cold damage on onion plant (*Allium cepa*). *Modern genetic* 14:1 (In farsi).
- Kassmannhuber J, Rauscher M, Schöner L, Witte A, Lubitz W(2017) Functional display of ice nucleation protein InaZ on the surface of bacterial ghosts. *Bioengineered* 3;8:488-500.
- Kassmannhuber J, Mauri S, Rauscher M, Brait N, Schöner L, Witte A, Weidner T, Lubitz W(2020) Freezing from the inside: Ice nucleation in *Escherichia coli* and *Escherichia coli* ghosts by inner membrane bound ice nucleation protein InaZ. *Biointerphases* 19:15(3).
- Klement Z, Farkas G, Lovrekovich L (1964) Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf, *Phytopathology*. 54: 474-477.
- Lindow SE, Amy, DC, Upper, CD (1982) Bacterial Ice Nucleation: A Factor in Frost. Injury to Plants. *Plant Physiology*. 70: 1084-9.
- Lindow S. E (1993) Methods of preventing frost injury caused by epiphytic ice nucleation active bacteria. *Plant Disease* 67: 327-333.
- Luoranen J, Riikonen J, Saksa T (2022) Factors affecting winter damage and recovery of newly planted Norway spruce seedlings in boreal forests. *Forest Ecology and Management* 503.
- Maki LR, Galyan, EL, Chang-Chien M, Caldwell DR (1974) Ice Nucleation Induced by *Pseudomonas Syringae*. *Applied. Microbiology* 28 (3).
- Maki L R, Galyan E L, Chang-Chien M, Caldwell D R (1978) *Applied Microbiology* 28 (3), 456-9.
- Lindow S (2023) History of Discovery and Environmental Role of Ice Nucleating Bacteria. *Phytopathology* 113:605-616.
- Moazzen Rezamahalleh H, Khodakaramian GH, Hassanzadeh N, Rajabi Memari H (2020) Evaluation of ice nucleation ability of bacteria isolated from commercial sugarcane genotypes. *Plant protection* 42:4 (In farsi).
- Orser, C. S, Staskawicz, B. J, Panopoulos N. J, Dahlbeck D, and Lindow S. E(1985) Cloning and expression of bacterial ice nucleation genes in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 164:359-366.
- Renzer G, de Almeida Ribeiro I, Guo H-B, Frohlich-Nowoisky J, Berry R, Bonn M (2024). Hierarchical Assembly and Environmental Enhancement of Bacterial Ice Nucleators. *ChemRxiv* 1.
- Roeters SJ, Golbek TW, Bregnhøj M (2021) Ice-nucleating proteins are activated by low temperatures to control the structure of interfacial water. *Nature communication* 12: 1183.
- Rostami M, Hasanzadeh N, Khodaygan P, Riahi- Madvar A(2018 a) Ice nucleation active bacteria from pistachio in Kerman Province, Iran. *Journal of Plant Pathology* 100: 51-58
- Rostami M, Hasanzadeh N, Khodaygan P. Riahi- Madvar A (2018 b) Evaluation of ice nucleation activity (INA) and INA gene detection in the bacteria isolated from pistachio trees in Kerman Province, Iran. *Journal of Nuts* 9 : 147-157.
- Schaad NW, Jones JB, Chun C (2001) *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, St Paul, Minnestota, Press. API Press, Third ed., 373 pages.

Schnell RC, Vali G (1972) Atmospheric Ice Nuclei from Decomposing Vegetation, Nature 236:163-165
Shwani A, Zuo B, Alrubaye A, Zhao J, Rhoads DD (2024) A Simple, Inexpensive Alkaline Method for Bacterial DNA Extraction from Environmental Samples for PCR Surveillance and Microbiome Analyses. Applied science 14: 141.