ژنتیک نوین
دوره بیستم، شماره۳، پاییز ۱٤۰٤
صفحه ۲٤٥ – ۲۳٥

بررسی نقش ژن *inaZ* در تولید هسته یخ در باکتری‌های *Escherichia coli* نوترکیب 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]، پریسا عبداللهی[*۱]

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

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

Yari N[1], Hassanzadeh Rstegari N[2], 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: ۱٤۰۳/۱۱/۰٦ – تاریخ پذیرش: ۱٤۰٥/۰۲/۲۹)

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 پلیمراز (PCR) انجام شد. محصول PCR در وکتور pTG19-T کلون و به باکتری *Escherichia coli K12* منتقل شد. جهت ارزیابی و مقایسه فرکانس هسته یخ *E. coli* نوترکیب از روش انجماد قطره‌ای استفاده شد. برای ایجاد جهش در ژن *ina* در باکتری *Pseudomonas syringae* از ماده Ethyl methanesulfonate (EMS) استفاده شد. برای تأیید جهش ایجاد شده، علاوه بر آنالیز PCR، باکتری جهش یافته 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 ٤- 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 معدود باکتری کش‌های گیاهی باشند.

واژه‌های کلیدی

باکتری نوترکیب
تنش سرمازدگی
جهش‌زایی
ژن هسته یخ

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

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 عمدتا به‌دلیل 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 به‌دلیل فقدان هسته‌های تشکیل کریستال‌های یخ، آن آب می‌تواند تا ۴۰°C- هم برای مدتی یخ نزند (Rostami et al. 2018).

سال‌ها قبل پژوهشگران دریافتند باکتری‌ها دارای هسته یخ توانایی انجماد آب در بالای صفر درجه سانتی‌گراد را دارند و به‌تدریج کشف کردند ژن‌های فعال هسته‌یخ بنام *ina* یکی از مهم‌ترین عوامل بیولوژیکی تشکیل هسته‌یخ در گیاهان هستند که نقش عمده‌ای در تسریع سرمازدگی در دماهای زیر صفردرجه دارند. در واقع زمانی که جمعیتی از این باکتری وجود داشته باشد، دمای یخ‌زدگی تا °C ۲ 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 تقریبا روی همه سطح گیاهان یافت می‌شوند. ایجاد خسارت یخ زدگی 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 یخ زدگی 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 یخ زدگی در گیاه نمی‌شود و هزینه‌های لازم برای حفاظت از یخ زدگی 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*، *ina*A 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 میکروارگانیزم‌های مهم توزیع کننده‌ی هسته‌های یخ به‌ویژه باکتری‌های اپی‌فیت است در جهت پیشگیری از سرمازدگی اقدام نمود. باکتری‌های اپی‌فیت در سطح اندام‌های گیاهی مانند برگ و ساقه زندگی می کنند 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 پروتیئن 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. هچنین

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

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

مواد و روش‌ها

تشخیص اولیه باکتری

باکتری *Pseudomonas syringae* که از روی درخت پسته کرمان جداسازی و شناسائی شده بود (Rostami et al. 2018 a, Rostami et al. 2018 b) تهیه و پس از خالص‌سازی مجدد و انجام چند آزمون کلیدی چون آزمون‌های لوپات شامل لوان، اکسیداز، لهانیدن سیب‌زمینی، 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 قطره‌ای استفاده شد (Vali 1971). باکتری *P. syringae* روی محیط کشت KB (King's B) کشت داده شد. تک‌کلونی‌ها به آب مقطر استریل منتقل و غلظت سوسپانسیون‌های باکتریایی با دستگاه اسپکتروفتومتر در OD_{600}=0.1 تنظیم شد. در شرایط مذکور واحد تشکیل کلنی (CFU (Colony forming unit حدود 10^8 سلول در یک میلی‌لیتر محلول بود. از هر سوسپانسیون سری رقت‌های لگاریتمی (10^{-1}، 10^{-2}، 10^{-3}) تهیه شد و ۲۵ µl از هرسوسپانسیون روی ورقه آلومینیم آغشته به پارافین گذاشته شد. پوشش پارافین موجب می‌شود قطرات، حالت برجسته روی ورقه آلومینیوم به خود بگیرند. قطرات آب مقطر استریل به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. ورقه آلومینیوم روی حمام فوق سرد داخل یک سینی حاوی نسبت ۱:۱ اتانول و آب مقطر که پس از ترکیب شدن در فریزر نگهداری می‌شود، قرار داده شده و در دمای ثابت ٤°C- تعداد قطرات یخ زده شمارش شد. تعداد قطرات یخ زده پس از ۳ 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 نزده به تعداد کل قطرات در آزمون، C غلظت سلول‌ها در سوسپانسیون و V حجم هر قطره در واحد میلی‌لیتر است (Schaad et al. 2001).

استخراج DNA ژنومی باکتری و آنالیز PCR

به‌منظور استخراج DNA ژنومی باکتری از روش لیز قلیائی استفاده شد (Shwani et al. 2024). تعیین کیفیت نمونه‌های DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ سنجیده شد. به‌منظور تکثیر ژن هسته یخ *inaZ* در باکتری مولد هسته یخ *P. syringae* از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده به کمک نرم‌افزار Primer3 استفاده شد. توالی جفت آغازگرها برای تکثیر ژن عامل هسته یخ عبارت بودند از F (5´GCA GAC TGC GGG TTA TGA GAG C 3´) و R (5´CGC CGG TCA GTT TGC TTC TAT C 3´). تکثیر ژن *inaZ* با استفاده از آغازگر اختصاصی ژن از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد. به‌منظور بهینه‌سازی PCR، (۱۰۰ ng) DNA، با ۱ µM از هر کدام از آغازگرها و ۱X بافر PCR Master mix به همراه 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 دمای٩٤°C، واسرشت شدن در دمای ٩٤°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ٥٦°C به مدت ۳۰ ثانیه، بسط در دمای ٧٢°C به مدت ۲ دقیقه، بسط نهایی در دمای ٧٢°C به مدت ۵ دقیقه و طی ۳۵ چرخه انجام و محصول تکثیر شده به کمک ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد.

به‌منظور شستشو و خالص‌سازی محصول PCR، ۲ میکرولیتر سدیم استات ۰/۳M و ۸ میکرولیتر ایزوپروپانول به ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR اضافه و مخلوط شد. مخلوط حاصل پس از آن‌که به مدت ۲۵ دقیقه در فریزر٨٠°C- قرارداده شد، به مدت ۲۰ دقیقه در۱۶۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. فاز رویی میکروتیوپ خالی شده و مقدار ۱۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ به آن اضافه شد. پس از سانتریفیوژ به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۶۰۰۰ rpm بار دیگر فاز رویی خالی شده و بعد از تبخیر کل اتانول موجود در میکروتیوب در نهایت ۱۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به آن اضافه نموده و در٢٠°C- برای مرحله بعدی نگهداری شد.

کلونینگ محصول PCR

درج محصول PCR در وکتور pTG19-T با استفاده از کیت PCR TA Cloning شرکت سینا کلون ایران (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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

سلول‌های انتقال یافته، روی سطح پلیت LB-Ampicillin X-Gal/IPTG agar اسپری شده و بعد از گذشت ۲٤ تا ٤۸ ساعت کلونی‌ها شامل کلونی‌های نوترکیب به رنگ سفید و کلونی‌های آبی فاقد پلاسمید نوترکیب رشد کردند. به‌منظور اطمینان از نوترکیبی کلونی‌های 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 کلونی‌های 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 زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد. محصولات PCR برای توالی‌یابی 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 قطره‌ای انجام شد (Schaad et al. 2001).

تولید موتانت های فاقد ژن فعالیت هسته یخ در جدایه *P. syringae* با استفاده از اتیل متان سولفونات

به‌منظور 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 در۳۰°C روی شیکر نگهداری شد. بعد 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 ٦ ساعت، EMS در دو غلظت ۱۵ و ۲۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر به هر کدام اضافه و ورتکس شد. بعد از آن نمونه‌های تیمار شده به مدت ۳۵ دقیقه در دمای ۲۷°C روی شیکر با تکان ملایم قرار داده شد. برای حذف EMS سلول‌ها سه بار در محیط کشت مایع پایه استریل به کمک سانتریفیوژ یخچال‌دار در دور ۳۰۰۰rpm شستشو داده شد. رسوب نهایی در یک میلی‌لیتر محیط پایه مجددا سوسپانسیون شد و به مدت ٤ ساعت در دمای ۲۷°C رشد داده شد تا پس از ۷۲ ساعت رشد، کلونی‌های جهش‌یافته به‌دست آید (Lindow 1983). به‌منظور اطمینان از ایجاد جهش در ژن *inaZ* باکتری *P. syringae* کلونی‌ها با روش PCR و آغازگرهای اختصاصی ژن *inaZ* بررسی و فعالیت هسته یخ آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

تشخیص اولیه باکتری:

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

جدول۱- آزمون‌های کلیدی جهت تشخیص اولیه باکتری P. syringae

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

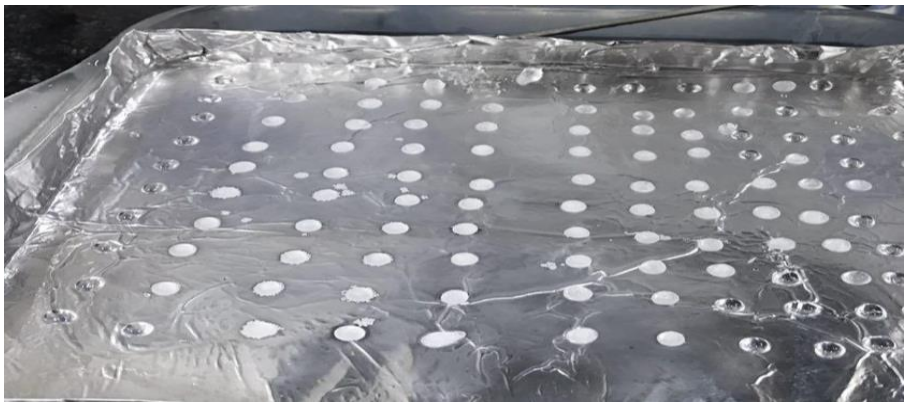
تعیین فعالیت هسته یخ

برای ارزیابی و مقایسه بسامد هسته یخ ایزوله‌ها، از روش انجماد قطره‌ای استفاده شد. سوسپانسیون سلولی در سه رقت مختلف تهیه و هر سری رقت سه بار تکرار شد. آزمون‌ها در دماهای بین ٤- °C تا ۷- تکرار شد. از دمای ٤- °C سری رقت ها شروع به یخ زدن کردند. مبنای قدرت هسته یخ، تشکیل ۵۰ درصد قطره انجماد در هر تیمار بود (T_{50}). شاهد آب مقطر استریل و باکتری وحشی *E.coli* فاقد هسته یخ زدگی بود (شکل ۱).

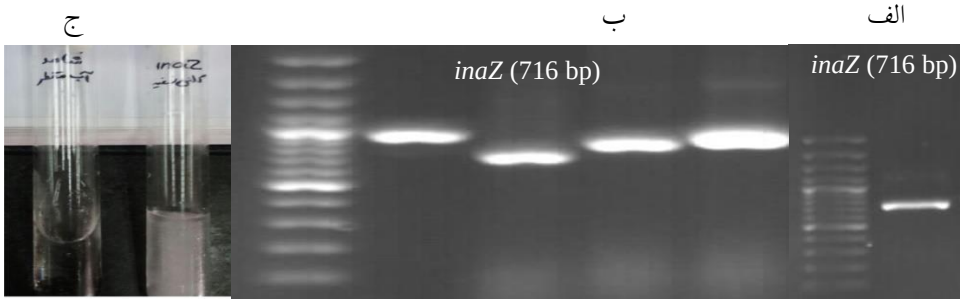
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

جدول۲- بسامد هسته یخ در باکتری‌های Escherichia coli و Pseudomonas syringae

نمونه	دما T50 (°C)	میزان یخ زدگی	لگاریتم فرکانس (Log F)	تعداد سلوهای هسته یخ
آب مقطر	-٤	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{d}	۰	۰
E.Coli تیپ وحشی	-٤	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{d}	۰	۰
P. syringae تیپ وحشی	-٤	۹/٦٧± ۰/۳۳ ^{a}	-٦	۱ در $۱۰^{٦}$ سلول
E.Coli نوترکیب	-٤	۹/۰۰± ۰/۰۰ ^{b}	-٦	۱ در $۱۰^{٦}$ سلول
P. syringae جهش یافته	-٤	۰/٦٧± ۰/۳۳ ^{c}	-۸	۱ در $۱۰^{۸}$ سلول



شکل۱- توانایی تشکیل هسته یخ در سری رقت‌های تهیه شده از ایزوله P. syringae به‌ترتیب از سمت چپ ردیف اول شاهد (آب مقطر استریل فاقد کریستال‌های یخ) و ردیف‌های ۲، ۳و ٤ سری رقت اول (۱-۱۰)، ردیف‌های ٥، ٦و 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 C ° ٤ -. شروع به یخ زدن کردند و تصویرپس از ۳ دقیقه در دمای C ° ۷ - ثبت شده است.



شکل۲- الف- الکتروفورز محصول PCR مربوط به تکثیر ژن *inaZ* با پرایمرهای اختصاصی، چاهک اول از چپ لدرbp ۱۰۰۰ و چاهک ۲ قطعه تکثیر شده مربوط به *inaZ* با اندازه bp ۷۱٦ ، ب- الکتروفورز محصول PCR تکثیر ژن *inaZ* در پلاسمید استخراج شده از کلونی‌های نوترکیب سفید رنگ ج- آزمون فعالیت هسته یخ باکتری نوترکیب *E. coli* واجد ژن *inaZ* و توانایی فعالیت هسته یخ آن در داخل لوله آب مقطر استریل در دمای ثابت C ° ٤ -.

بسامد هسته یخ برای باکتری‌های *E.coli* تیپ وحشی و نوترکیب و *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 ۷۱٦bp 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 به باکتری منتقل شده است، از سوسپانسیون کلونی‌های نوترکیب 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 نوترکیب *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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

و در دمای ثابت C ° ٤ – شروع به یخ زدن می کند (شکل ۲–ج). نتایج مقایسه میانگین نشان داد بین درصد یخ زدگی باکتری E. coli نوترکیب و E. coli تیپ وحشی اختلاف معنی‌داری وجود دارد (شکل ۵)

بلاست توالی قطعه bp ۱۷٦ نشان داد قطعه جدا شده از ایزوله *P. syringae* با همپوشانی ۱۰۰درصد و میزان تشابه بالای ۹٦ درصد مربوط به ژن *inaZ* است (نتایج گزارش نشده است).

تولید موتانت‌های فاقد ژن فعالیت هسته یخ در جدایه *P. syringae* با استفاده از اتیل متان سولفونات و بررسی قدرت هسته یخ زدگی آن‌ها

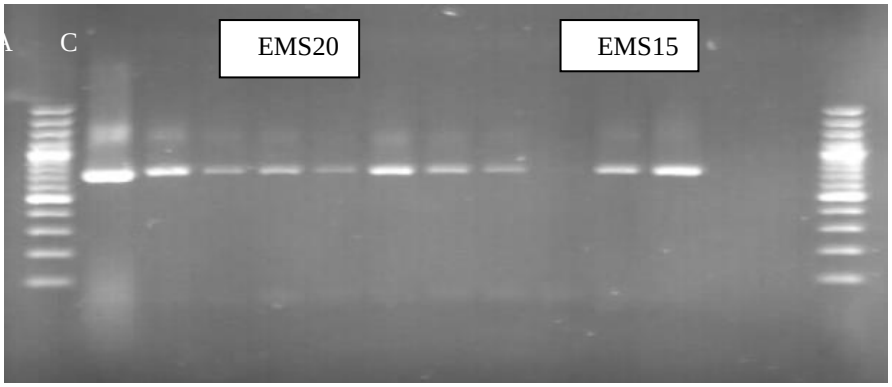
به‌منظور ایجاد جهش یافته‌های *P. syringae* که فاقد فعالیت هسته یخ باشند از اتیل متان سولفونات (EMS) استفاده شد. باکتری *P. syringae* که فعالیت هسته یخ آن به اثبات رسیده بود تحت تاثیر تیمار شیمیایی EMS قرار گرفت. این باکتری در مرحله رشد لگاریتمی با دو دز ۱۵ و ۲۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر EMS تیمار شد و پس از حذف کامل موتاژن سلول‌های احتمالاً جهش‌یافته در رقت‌های بسیار پایین در پتری کشت داده شدند. از بین کلونی‌های ایجاد شده، کلونی‌های 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 هسته‌های یخی در باکتری نیاز به غشای سالم و بی‌عیب 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 موتانت‌ها با کوچک‌ترین تغییر در سطح ژن هسته یخ، تغییراتی در ساختارهای غشایی به وجود می‌آید و آرایه‌های پروتئین را ناپایدار می‌کند و یا از تشکیل شدن آن ممانعت می‌نماید (Lindow1993). بعد از گذر ٤٨ ساعت از رشد باکتری‌ها، تعدادی کلونی انتخاب شده و با آغازگر *inaZ* در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این ارزیابی مشاهده شد که بعضی از کلونی‌ها با آغازگر *inaZ*، باندی مشابه باند والدینی تولید کردند. اما تعدادی از این کلونی‌ها نیز با آغازگر *inaZ* نتوانستند باند تولید کنند که به‌عنوان کلونی جهش یافته شناسایی شدند. (شکل ۳) کلنی‌های موتانت فاقد قطعه تکثیر شده *inaZ* با آزمون انجماد قطره‌ای در سه تکرار با باکتری *P. syringae* تیپ وحشی در سه سری رقت و هر کدام در سه تکرار در دمای C°٤– تا C°۷– با یکدیگر مقایسه شدند (جدول ۲). باکتری تیپ وحشی در دمای C°٤– شروع به یخ زدن کرد و تا دمایC°۷–، ٪۹۰ سری رقت‌ها یخ زدند. تیپ جهش‌یافته از ۱۰ قطره فقط یک قطره یخ زد که نشان‌دهنده حذف یا جهش موفق ژن یخ *inaZ* از باکتری تیپ وحشی می‌باشد. نتایج مقایسه میانگین نشان داد بین درصد یخ زدگی باکتری *P. syringae* جهش‌یافته و *P. syringae* تیپ وحشی اختلاف معنی‌داری وجود دارد (شکل ۵). لازم به ذکر است تعیین دقیق محل ایجاد جهش نیازمند توالی‌یابی ژن *ina* باکتری جهش یافته است اما با توجه به عدم تشکیل باند در PCR و هماهنگی آن با فنوتیپ عدم تشکیل هسته یخ می‌توان پیش‌بینی کرد که به احتمال قوی جهش در ژن *ina* این کلونی‌ها در محدوده اتصال آغازگر طراحی شده رخ داده است و این جهش‌یافته‌ها را می‌توان به‌عنوان جدایه *ina*$^-$ در نظر گرفت (شکل ٤).

بحث

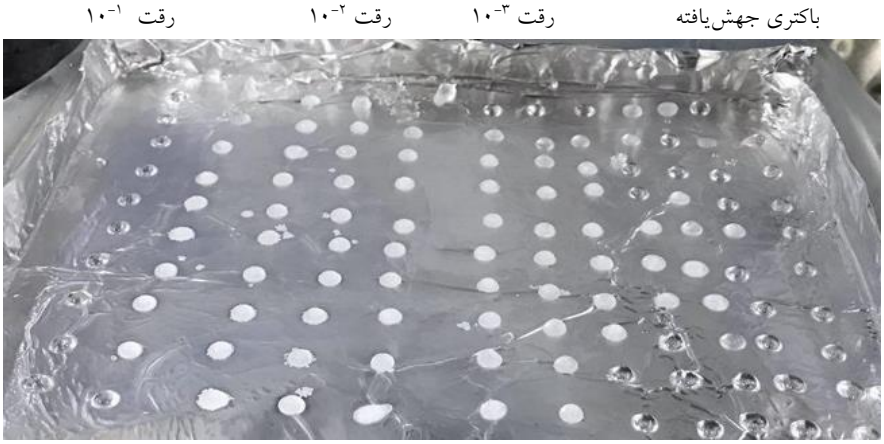
فعالیت هسته‌زایی یخ در باکتری‌های گیاهی برای اولین بار در سودوموناس در دهه ۱۹۷۰ کشف شد. متعاقباً، چندین باکتری یخ‌ساز دیگر متعلق به گونه‌هایی در خانواده‌های *Pseudomonadaceae*، *Enterobacteriaceae*، *Xanthomonadaceae* و *Lysinibacillus* شناسایی شدند. *P. syringae* هسته یخ را در دمای ۲– درجه سانتی‌گراد فعال می‌کند. توانایی باکتری‌ها در تسهیل تشکیل یخ به پروتئین‌های تخصصی متصل به غشای سلول باکتری نسبت داده می‌شود. *P. syringae* به‌عنوان یک بیمارگر گیاهی با افزایش دمای هسته‌زایی آب باعث آسیب یخ‌زدگی در بافت گیاهی می‌شود که دسترسی به مواد مغذی را ممکن می‌سازد (Failor et al. 2017).

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

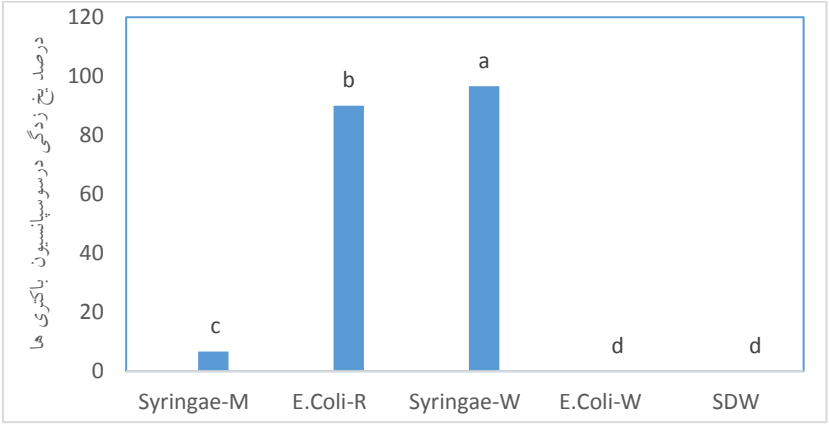
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]



شکل۳- الکتروفورز ژل آگارز مربوط به PCR جهش‌یافته‌های P. syringae. به‌ترتیب 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 ٤- آزمون انجماد قطره ای سوسپانسیون باکتری نوع وحشی و جهش یافته *P. syringae* در حمام فوق سرد شده توسط اتانول و یخ در دمای ۷° C -، قطرات یخ زده ظاهری کدر نسبت به قطرات یخ نزده دارند. شاهد آب مقطراست. 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 توانائی در ایجاد کریستال‌های یخ.



شکل ٥- درصد یخ‌زدگی در آزمون انجماد قطره‌ای سوسپانسیون باکتری برای رقت ۱۰^-۳ ودر دمای ٤- °C: 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* جهش‌یافته فاقد فعالیت هسته یخ

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

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 مقاوت 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 از۹۶۰ 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 INAها 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 اسیدآمینه‌ای 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 می تواند دلیل تنوع نسبتاً زیاد در اندازه ژن بین سویه‌ها باشد. نرخ نسبتاً بالای نوترکیبی 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 می باشند. نتایج پژوهش‌ها نشان می دهد 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 ژن های 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 اشریشیاکولای 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 مستقرمی‌شود (Kassmannhuber et al. 2017). اثبات این

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

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 Bacterial ghosts (BGs) نام گرفت که به‌عنوان مدلی برای مطالعه نحوه عملکرد InaZ و نقش محلی‌سازی InaZ در سمت لومینال غشای داخلی باکتری استفاده شد. به‌طور طبیعی، INPهای *P. syringae* روی سطح غشای خارجی نمایش داده می‌شوند. 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* نوترکیب زنده مربوطه که تشکیل یخ سطحی آب فوق سرد را در دماهای زیر صفر درجه سانتی‌گراد کاتالیز می‌کند، نشان داد میانگین دمای انجماد سلول‌های زنده والدینی بدون INP در دمای C ۲۰/۱– و باکتری‌های نوترکیب با INPهای متصل به غشای داخلی این مقدار بین C ۷° – و C ۹° – درجه سانتی‌گراد تشخیص داده شد، که نشان می‌دهد القای IN از داخل باکتری توسط INPهای متصل به غشای داخلی که رو به سمت غشای داخلی لومینال هستند، بسیار شبیه به IN القا شده توسط INPهای باکتریایی واقع در غشای خارجی است. اشباح باکتریایی مشتق شده از این ساختارهای مختلف، مقادیر انجماد اولین قطره را بین C ٦° – و C ٨° – 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 C ٤° – 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 هرچند به‌دلیل حذف سیگنال‌های انتقالی پروتئین، InaZ به جای غشای خارجی به غشای داخلی باکتری متصل شد و از طرفی شروع هسته یخ را دمای C ٦° – و C ٨° – گزارش کردند. باکتری‌های هسته یخ در سه گروه طبقه‌بندی شده‌اند؛ گروه A شامل باکتری‌هایی است که در دمای °C ٥– یا در دماهای بالاتر فعال هستند، گروه B که در دماهای °C٥– تا ٨– تولید هسته یخ می‌نمایند و گروهC که دردمای °C ١٠ – و یا کمتر فعالیت تشکیل هسته‌یخ را دارند (Karkazi et al. 2019). با توجه به نتایج پژوهش حاضر و شروع یخ‌زدگی از C ٤° – پروتئین InaZ تولید شده جز کلاس A بوده و متفاوت از پژوهش Kassmannhuber et al.(2020) است.

در بخش دوم پژوهش با ایجاد جهش‌زایی در *P. syringae* سویه‌های جهش یافته‌ای به‌دست آمد که فاقد فعالیت هسته یخ شدند. از آنجا که PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *inaZ* انجام شد و باند مربوطه در این جهش یافته‌ها مشاهده نشد (شکل ٣) نتایج گویای ایجاد جهش در محل اتصال پرایمر در ژن *inaZ* است که بار دیگر بر تک ژنی بودن فنوتیپ هسته یخ صحه می گذارد. در پژوهش حاضر از بروز فنوتیپ توانایی تشکیل هسته یخ به‌عنوان صفتی برای تایید بیان ژن *inaZ* استفاده شد و از آزمایش‌های رایج بررسی پروتئین مانند SDS-PAGE برای شناسایی پروتئین استفاده نشد. پروتئین‌های غشایی مانند INA در *Pseudomonas syringae* به‌دلیل وزن بالا که از ١١٠ تا ١٨٠ کیلو دالتون متغیر است و اینکه بخش بزرگی از ساختار آن‌ها آب‌گریز است، در محیط آبی ژل یا با SDS نامحلول می‌شوند و معمولاً به‌جای باند واضح، توده‌ای پخش‌شده یا اسمیر دیده شود. جدا سازی آن‌ها نیازمند بهینه‌سازی پروتوکل استخراج است که در پژوهش حاضر انجام نشد و تنها بروز فنوتیپ هسته یخ در *E.Coli* نوترکیب و عدم بروز فنوتیپ هسته یخ *Pseudomonas syringae* چهش‌یافته دلیلی بر وجود یا عدم وجود فعالیت پروتئین مذگور در نظر گرفته شد.

شواهد قابل‌توجهی نشان می‌دهد که استراتژی‌های کاهش جمعیت باکتری‌های INA^+ روی گیاهان مانند باکتری‌کش‌ها می‌تواند به‌طور قابل‌توجهی بروز خسارت سرمازدگی را کاهش دهد. با این حال، هر رویکردی برای تعدیل باکتری INA^+ مرتبط با گیاه باید الگوهای زمانی را در نظر بگیرد که به‌واسطه آن گیاهان با این باکتری ها مواجه می‌شوند. به‌طور معمول، اندازه جمعیت انواع باکتری‌ها، از جمله باکتری INA^+، در بافت‌های تازه در حال ظهور مانند گل‌ها و نهال‌ها بسیار کم است. پس از آن، بسته به شرایط محیطی و میزان تلقیح باکتری، اندازه جمعیت اغلب نسبتاً سریع افزایش می‌یابد. استراتژی‌های کنترل یخبندان مبتنی بر کنترل باکتری‌های INA^+ معمولاً شامل استفاده از باکتری‌کش‌های حاوی ترکیبات مس، یا باکتری‌های رقابتی غیر INA، می‌توانند سرعت تکثیر باکتری‌های INA^+ روی گیاهان را کاهش دهند، در نتیجه اندازه جمعیت آن‌ها

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

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 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 برگی، 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).

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, Loverkovich L (1964) Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf, Phytopathology. 54: 474-477.

Lindow SE, Arny, 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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]