ویژه‌نامه علمی-پژوهشی

علوم کشاورزی

سال دوازدهم، شماره (۱) ۱۳۸۵

شناسائی و بررسی نوسان جمعیت باکتری‌های مولد هسته یخ، بر روی ژنوتیپ‌های مختلف بادام در منطقه زرقان استان فارس

ساغر کتابچی

دانشجوی دکتری رشته بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران

نادر حسن زاده

استادیار گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران

مجتبی محمدی

استادیار گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه تهران

علی علیزاده علی‌آبادی

استادیار بیماری شناسی گیاهی، حفظ نباتات تهران

یوسف علی سعادت

استادیار باغبانی، مرکز تحقیقات کشاورزی بعثت شیراز

چکیده

برخی از باکتری‌ها از عوامل بیولوژیک تشکیل هسته یخ بوده که با فعالیت و افزایش جمعیت خود به وقوع سرمازدگی گیاهان در دماهای بالاتر از معمول کمک می‌نمایند. در این تحقیق چهار شامل: ژنوتیپ۳۶ (متوسط زود گل)، ۵ (خیلی زود گل)، ۲۶ (متوسط دیر گل)، ۸ (خیلی دیر گل) بادام از ژنوتیپ‌های کلکسیون بادام مرکز تحقیقات کشاورزی زرقان انتخاب شد در طول دوره فنولوژی درختان بادام باکتری‌های مولد هسته یخ با روشهای استاندارد ز روی جوانه، شکوفه، چغاله، چغاله کاملا رسیده و برگ‌ها جداسازی و شناسایی شدند و میزان نوسانات جمعیت باکتری‌های جدا شده در ماه‌های بهمن، اسفند، فروردین و اردیبهشت سال‌های ۱۳۸۰ تا ۱۳۸۱ بررسی شد. در این بررسی گونه‌های *Pseudomonase syringae*، *Pseudomonas fluorescens*، *Pantoea agglomerans* و *Xanthaomonas spp* به عنوان باکتریهای مولد هسته یخ شناسایی شدند. P. syringae بیشترین فعالیت هسته یخ و *P. agglomerans* ، *P. fluorescens'* و*Xanthomonas spp* به ترتیب در مرتبه دوم تا چهارم قرار گرفتند. نوسان جمعیت باکتریها کاملا وابسته به دوره فنولوژی گیاه و دمای محیط بود. در هوای معتدل در زرقان فارس طی ماههای بهمن و اسفند باعث شکوفه دهی ژنوتیپهای زود گل بادام می‌شود. دما و مواد غذائی مناسب باعث افزایش جمعیت باکتریهای مولد هسته یخ روی سطح درختان بادام شد بنابراین با کمترین کاهش دما سرمازدگی درختان بادام تشدید خواهد شد ولی زمان شکوفه دهی ژنوتیپ‌ها دیرگل با گرم شدن هوا همزمان بوده و افزایش جمعیت این باکتری‌ها در تشدید سرمازدگی اثر نداشت. از این رو ژنوتیپ‌های انتخابی و دوره فنولوژی آنها، شرایط آب و هوایی و میزان جمعیت باکتریهای مولد هسته یخ از عوامل موثر وقوع عارضه سرمازدگی تلقی شدند.

واژه‌های کلیدی: بادام، باکتری‌های مولد هسته یخ، سرمازدگی، *P. syringae*، *P. fluorescens*، *P. agglomerans*، *Xanthomonas spp*

تاریخ دریافت مقاله ۸۳/۶/۱۴ تاریخ دریافت نسخه نهایی ۸۴/۵/۴

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

تمام گونه‌های گیاهی در طبیعت معمولاً دارای باکتری‌های بومی خود می‌باشند. اغلب اندام‌های هوایی یک گیاه سالم، جایگاه مناسبی برای فعالیت باکتری‌های بومی و بیماری زای گیاهی است (۱۲) . باکتری های مولد هسته یخ [1] در روی سطح گیاهان مختلف به صورت اپی فیت [2] زندگی می‌کنند (۱۸). گونه‌های *Pseudomonas syringae* ، *Pantoea agglomerans* و *Pseudomonas fluorescens* از باکتری‌های اپی فیت معمول روی سطوح گیاهی هستند (۶،۱۲،۱۹،۱۶،۲۷،۲۸). این باکتری‌ها از عوامل بیولوژیک ایجاد هسته یخ بوده و با ایجاد هسته یخ باعث یخ زدن آب در دماهای بالاتر از معمول می شوند. لذا این باکتریها، مکانیسم مقاومتی گیاهان در برابر کاهش دما به نام فزون سردی [3]، را شکسته و باعث یخ زدن آب در دماهای گرم تر از دمای معمول می‌شوند (۱۰). این دسته از باکتریهای اپیفیت، با پائین آمدن دمای محیط باعث یخ زدن آب بین بافتی شده و در نتیجه اندامهای حساس مانند ، جوانه، شکوفه و غیره که در تولید محصول نهایی نقش دارند دچار سرمازدگی شده و از بین می‌روند (۲۳، ۲۲). برخی از این باکتری‌ها مانند *Pseudomonas syringae* جزو بیمارگرهای [4] گیاهی بوده و جراحات ناشی از سرمازدگی زمینه را برای نفوذ این باکتری به گیاه و ایجاد بیماری فراهم می‌آورد (۲۵، ۲۴، ۲۳). جمعیت باکتری‌های اپیفیت از جمله باکتری‌های مولد هسته یخ، در طی فصل رشد متغیر و در نوسان می‌باشد. غالباً این تغییرات جمعیت به گونه گیاه و دورهای مختلف رشدی آن بستگی دارد به طوری که در قسمت‌های جوان گیاه، جمعیت این باکتری‌ها کم و با افزایش سن گیاه افزایش می‌یابد (۱۳، ۴، ۳). حتی گزارش شده است که جمعیت سویه‌هایی [5] از *P.syringae* در طول روز هم متفاوت بوده است (۱۸). بادام در استان فارس با سطح زیر کشت حدود ۲۱۰۰۰ هکتار یکی از محصولات اصلی استان بوده و مقام دوم در تولید کشور را دارا می‌باشد (۱). درخت بادام برای نیاز حرارتی به زمستان ملایم و تابستان گرم نیاز دارد در استان فارس همه ساله از نیمه دوم بهمن ماه این نیاز دمایی تأمین شده و درختان بسته به نوع ژنوتیپ در مرحله جوانه و یا شکوفه می‌باشند. به همین علت کاهش ناگهانی دما باعث از بین رفتن جوانه‌ها، شکوفه‌ها و حتی چغاله‌ها می‌شود. صحراگرد و همکاران در تحقیقی باکتری‌های مولد هسته یخ درختان بادام منطقه مهارلو استان فارس را شناسایی کردند (۳). تحقیق مشابه بر روی درختان هسته‌دار شاهرود نیز انجام شده است (۴). این تحقیق برای نخستین بار جهت شناسایی باکتریهای مولد هسته یخ درختان بادام مرکز کلکسیون بادام استان فارس واقع در زرقان انجام شده، در این بررسی ۴ ژنوتیپ با زمان گلدهی متفاوت انتخاب گردید و نوسانات جمعیتی باکتری‌های اپیفیت و مولد هسته یخ آنها مطالعه شد. پس از مقایسه اثر زمان‌های متفاوت نمونه‌برداری، نقش ژنوتیپ‌ها در میزان جمعیت باکتری‌های مولد هسته یخ و انتخاب بهترین ژنوتیپ از نظر مقاومت به سرمازدگی بررسی شد.

مواد و روش‌ها:

نمونه‌برداری:

از ۴ ژنوتیپ۳۶ (متوسط زودگل)، ۵ (خیلی زود گل)، ۲۶ (متوسط دیر گل) و ۸ (دیر گل) از بین ژنوتیپ‌های کلکسیون بادام مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس واقع در زرقان انتخاب گردید، و در مراحل مختلف رشدی درختان شامل مراحل جوانه، شکوفه، چغاله، چغاله کاملاً رسیده و برگ‌ها از آنها با چهار تکرار نمونه‌برداری شد. با توجه به شرایط آب و هوایی استان فارس که باعث گلدهی زود هنگام درختان بادام می‌شود، نمونه‌برداری در زمان‌های ۲۰ بهمن، ۱۶ اسفند، ۲۰ فروردین و ۱۵ اردیبهشت انجام شد. در هر نوبت نمونه‌برداری از هر درخت ۱۰ تا ۲۰ گرم نمونه بافت تازه در کیسه‌های یک بار مصرف جمع‌آوری و سریعاً به آزمایشگاه منتقل گردیدند.

1 Ice nucleation activity bacteria
2 Epiphyte
3 Super cooling
4 Pathogen
5 Strains

Archive of SID

www.SID.ir

شناسایی و تعیین جمعیت باکتری‌ها

در هر نوبت از نمونه‌برداری۱۰ گرم بافت از هر نمونه در فلاسک حاوی ۵۰ میلی لیتر با فرفسفات پتاسیم سترون (۰/۱ مولار pH =۷) منتقل گردیده و به مدت یک ساعت روی همزن [1] با ۱۲۵ حرکت در دقیقه شستشو داده شد. سپس محتویات فلاسک از پارچه ململ عبور داده شد و مایع صاف شده به مدت ۱۵ دقیقه (با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه) سانتریفوژ[2]، رسوب[3] حاصل در ۵ میلی لیتر بافرفسفات پتاسیم سترون (۰/۱ مولار pH =۷) حل گردید و از آن رقت‌های سریال در بافر یاد شده تهیه گردید. به منظور شمارش کلی باکتریها، از هر رقت دوبار در محیط کشت آگار شمارش باکتری (PCA)[4] کشت آمیختگی[5] و ظروف به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۲۹ درجه سانتیگراد نگهداری شدند . ظروف‌هایی که حاوی ۳۰ تا۳۰۰ کلنی باکتری در هر پتری، برای شمارش انتخاب شدند. پرگنه‌های[6] مشابه بطور جداگانه شمارش گردیدند وبرای شناسایی باکتری‌های معتدل دوست[7] پرگنه‌های متفاوت جداسازی و پس از خالص‌سازی بر روی محیط آگار مغذی[8] و براساس روش‌های استاندارد، شناسایی شدند در مراحل اولیه تشخیص ابتدا با انجام آزمایش رنگ آمیزی گرم پس از دیدن آرایش باکتری‌ها، باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی از هم جدا شدند، باکتری‌های کروی[9] گرم مثبت با آزمونهای اولیه مانند آزمون کاتالاز، تحمل نمک، رشد در گلوکز در شرایط هوازی و بی هوازی و استفاده از قندهای مختلف شناسائی شدند و باکتری‌های میله‌ای بلند[10] گرم مثبت با توانائی تولید اسپور، رشد در شرایط هوازی و بی هوازی مطلق (به روش هوگ و لیفسون) [11]، آزمون کاتالاز و استفاده از قندهای مختلف تعیین جنس شدند.

برای شناسائی باکتریهای میله ای کوتاه[12] گرم منفی با آزمونهای اولیه مانند رشد در شرایط بی‌هوازی، تشکیل یا عدم تشکیل پرگنه زرد روی محیط کشت YDC[13]، تولید یا عدم تولید پیگمان فلورسانت روی محیط کشت King's B تعیین جنس و با آزمونهای مشخص شده در جداول ۱ الی ۴ تعیین گونه شدند (۱۴ و ۲۵). به منظور شمارش باکتریهای مولد هسته یخ، از هر رقت روی محیط king's B کشت سطحی[14] داده شد .پرگنه‌ها روی محیط King's B و آگار مغذی با ۱/۵ درصد گلیسرین خالص شدند و مجددا مورد شناسایی قرار گرفتند (جداول ۴-۱). به منظور بررسی سریع فعالیت هسته یخ ازروش بررسی درون لوله استفاده گردید و باکتری‌های مولد هسته یخ مشخص شد. (۵، ۱۱، ۲۵)

تعیین فعالیت هسته یخ سویه های شناسایی شده

برای تعیین فعالیت هسته یخ سویه ها از روش یخ زدن قطرات[15] استفاده شد(۵،۲۵). باکتری‌های مورد نظر روی محیط کشت آگار مغذی با ۱/۵ درصد گلیسرین کشت داده شد و به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۲۶ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. سپس از کلنی‌های انفرادی در آب مقطر استریل سوسپانسیون گردید و غلظت آن با دستگاه اسپکتروفوتومتر در جذب نوری OD_{600} = ۰/۱ تنظیم شد در شرایط مذکور جمعیت باکتریها حدوداً به 10^8 سلول در هر میلی لیتر (CFU/ml) می‌رسد. بعد از آن از روش انجماد قطرات استفاده شد به این صورت که هر سوسپانسیون، ۱۰ قطره ۱۰ میکرولیتری بر روی ورقه‌های نازک آلومینیم قایق شکل

1 Rotatory shaker
2 Centrifuge
3 Pellet
4 Plate count agar
5 Pour plate
6 Colony
7 Mesophilic
8 Nutrient agar
9 Cocci
10 Long rod
11 Hugh & Leifson
12 Short rod
13 Yeast extract dextrose-Caco3
14 Surface plate
15 Droplet freezing method

Archive of SID

www.SID.ir

آغشته به پارافین انتقال داده شد. سپس این قایق‌های آلومینیومی روی حمام اتانل ـ یخ [1] با دمای ۲- تا ۷- درجه سانتیگراد شناور شدند. سرانجام تعداد قطرات یخ زده ظرف مدت ۳۰ ثانیه شمارش شدند (۲۵-۵).

تجزیه و تحلیل آماری

مقایسه بین متغییرها با آزمون آنالیز واریانس [2] و مقایسه بین گروهها با آزمون تحلیل پردازش یک سویه یا آزمون مقایسه چندگانه دانکن [3] بر اساس نرم افزار آماری SPSS انجام شد.

نتیجه

شناسایی باکتریهای مولد هسته یخ

باکتری‌های اپیفیت [4] غالب در چهار مرحله نمونه‌برداری در چهار ژنوتیپ انتخابی بادام شامل: جنس *Bacillus spp*، ایجاد پرگنه‌های سفید با حاشیه ناصاف روی محیط کشت آگار مغذی [5]، آرایش میله‌ای بلند با واکنش رنگ آمیزی گرم مثبت، توانائی تولید اسپور، رشد در شرایط هوازی و بی‌هوازی، واکنش کاتالاز مثبت، بررسی قندهای مختلف و *Micrococcus spp* با پرگنه کوچک سفید روی محیط کشت آگار مغذی، آرایش کروی و تک تک، واکنش کاتالاز مثبت، توانائی رشد هوازی و بی هوازی در محیط حاوی گلوکز، عدم تحمل نمک ۱۰٪ و بررسی استفاده از قندهای مختلف تشخیص داده شدند. دیگر گونه های شناسائی شده عبارتند از: *Pseudomonas syringae* (جدول ۱) *Pseudomonas fluorescens*، (جدول ۲) *Pantoea agglomerans (Erwinia herbicola)* (جدول ۳) و *Xanthomonas spp* (جدول ۴). در مراحل اولیه تشخیص گونه‌ها ابتدا واکنش منفی در رنگ آمیزی گرم با آرایش میله‌ای کوتاه جنس‌ها را از بقیه جنس‌های شناسائی شده مجزا کرد. سپس با انجام آزمون رشد بی هوازی *Pantoea spp* با توانائی رشد در شرایط بی‌هوازی و با ایجاد کلنی زرد روی محیط YDC از بقیه جنس‌ها جدا گردید. Pseudomonas spp با کلنی فلورسانت خود روی محیط کشت King's B و *Xanthomonas spp* نیز به علت عدم ایجاد کلنی فلورسانت روی محیط کشت King's B و ایجاد کلنی زرد روی YDC در مراحل بعدی شناسائی قرار گرفتند و بدنبال آن بر اساس جداول ذکر شده شناسائی گونه ها انجام گرفت. با نتایج بدست آمده از آزمون انجماد قطرات [6] و انجماد درون لوله‌ای (رجوع به مواد و روش‌ها) *P. syringae*، *P fluorescens*، *P. agglomerans* و *Xanthomonas spp* به عنوان باکتری‌های مولد هسته یخ شناسایی شدند.

جمعیت کل باکتریها و باکتریهای مولد هسته یخ

جمعیت کل باکتریهای [7] اپیفیت روی چهار ژنوتیپ بادام در طی سال‌های ۱۳۸۰ تا ۱۳۸۱ در چهار نوبت نمونه‌برداری تفاوت معنی‌داری را نشان دادند، در مقایسه در بین ژنوتیپ‌ها، تفاوت ژنوتیپ ۲۶ نسبت به ژنوتیپ‌های ۳۶، ۵ و ۸ معنی‌دار بود (جدول ۵). در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری جمعیت کل باکتری‌های مولد هسته یخ تفاوت معنی‌دار داشتند (جدول ۵). مقایسه این باکتری‌ها روی ژنوتیپ‌های انتخابی نشان داد که جمعیت ژنوتیپ ۵ با رقم‌های ۳۶، ۲۶ و ۸ تفاوت معنی‌داری داشت.

1 Ethanol-ice bath
2 Analaysis of variance (ANOVA)
3 Duncan's multiple range test
4 Epiphyte
5 Nutrient agar
6 Droplet freezing method
7 Total count

Archive of SID

www.SID.ir

مقایسه نوسانات جمعیت باکتریهای مولد هسته یخ در ژنوتیپ ها و زمان های نمونه برداری مختلف

در زمان‌های مختلف نمونه برداری نوسان جمعیت *Xanthomonas spp* با دیگر باکتری‌های مولد هسته یخ تفاوت معنی‌دار داشت. نوسانات این باکتری در ژنوتیپ۳۶، ۵ با ۲۶ و ۸ تفاوت معنی‌داری را نشان داد (جدول ۶). در دیگر باکتری‌ها تنها در زمان‌های مختلف نمونه بردای تفاوت معنی دار دیده شد و تفاوت در بین ژنوتیپ ها معنی دار نبود (جداول ۶).

در مقایسه نوسان جمعیت باکتریهای مولد هسته یخ و کل باکتریها با دما، ژنوتیپ۳۶ (متوسط زود گل) در بهمن ماه که درخت در مرحله جوانه بوده است جمعیت باکتریها کم و با افزایش دما و رسیدن گیاه به مرحله شکوفه دهی، بتدریج افزایش یافته است ولی با گرم شدن هوا و رسیدن گیاه به مرحله چغاله این جمعیت به تدریج کاهش یافت (نمودار A-۱). با توجه به اینکه ژنوتیپ ۵ (خیلی زود گل) در نیمه دوم بهمن ماه شکوفه می دهد، جمعیت باکتریها در این ماه از دیگر ژنوتیپ ها بیشتر بود با افزایش دما این جمعیت نیز افزایش یافت. با رسیدن گیاه به مرحله چغاله و گرم شدن هوا جمعیت باکتریها سریعا کاهش می یابد بطوریکه این جمعیت در اردیبهشت ماه کمتر از بهمن ماه بود (نمودار B-۱) ژنوتیپ۲۶ (متوسط دیر گل) از جمعیت باکتریایی کمتری برخوردار بوده است. در بهمن ماه درخت در مرحله جوانه بوده و دمای محیط پائین بوده است و در نتیجه شرایط برای افزایش جمعیت باکتریها مساعد نمی باشد. با نزدیک شدن به مرحله شکوفه دهی و بالا رفتن تدریجی دما، این جمعیت افزایش یافته و با گرم شدن هوا و رسیدن گیاه به مرحله چغاله بتدریج کاهش یافت (نمودار C-۱). ژنوتیپ۸ (خیلی دیر گل) در بهمن ماه در مرحله جوانه بوده در مقایسه با دیگر ژنوتیپ ها جمعیت باکتریایی کمی را داشت. با افزایش دما و نزدیک شدن درخت به مرحله شکوفه دهی جمعیت باکتری افزایش یافته و در فروردین ماه که زمان شکوفه این ژنوتیپ است به بیشترین میزان خود رسید که در مقایسه با دیگر ژنوتیپ ها کمتر می باشد. با افزایش دمای محیط و نزدیک شدن به مرحله چغاله جمعیت باکتریها نیز بتدریج کاهش یافت (نمودار D-۱).

بررسی درصد باکتریهای مولد هسته یخ در ژنوتیپ ها و زمانهای نمونه برداری مختلف

بیشترین درصد جمعیت در ژنوتیپ‌ها را دو گونه *P. fluorescens* و سپس *P. syringae* به خود اختصاص داده بودند. و *P. agglomerans* و *Xanthomonas spp* به ترتیب در مرتبه سوم و چهارم قرار داشتند. با مقایسه درصدهای این باکتری‌ها، گونه‌های *P. agglomerans* و *Xanthomonas spp* با خود و دیگر باکتری‌ها تفاوت معنی‌دار داشتند. دو گونه *P. fluorescens* و *P. syringae* با هم تفاوت معنی‌دار نداشتند (نمودار ۲).

تعیین فعالیت هسته یخ

با انجام آزمون هسته یخ درون لوله و یخ زدن قطرات روی جدایه‌های خالص شده، بیشترین فعالیت هسته یخ را *P. syringae* داشت. *P. fluorescens*، *P. agglomerans* و *Xanthomonas spp* به ترتیب در مرتبه های دوم تا چهارم قرار داشتند.

بحث

نقش باکتری‌های *Pseudomonas syringae, Pseudomonas fluorescens, ,Xanthomonas spp Pantoea agglomerans* و *Pseudomonas viridiflava* به عنوان عوامل مؤثر در هسته یخ به اثبات رسیده است و نوع و جمعیت آنها به گونه گیاه میزبان بستگی دارد (۶، ۷، ۸) در این تحقیق در مقایسه با تحقیقات قبلی، گونه *P. viridiflava* از درختان بادام جداسازی نشد (۳). تحقیقات نشان داده‌اند که ترکیبات سطح برگ، سن گیاه، دمای محیط، رطوبت محیط و فلور منطقه از جمله فاکتورهای مهمی می‌باشند که می‌توانند کمیت و کیفیت باکتری‌های بومی سطح برگ و دیگر اندامهای گیاه را تحت تاثیر قرار دهند (۱۷، ۱۵، ۱۳، ۹). جمعیت و نوع باکتری‌ها به انتقال باکتری‌ها از دیگر درختان بستگی دارد (۱۸). به خصوص گونه *P. fluorescens* توانایی انتقال از یک گیاه به گیاه دیگر را داشته و شرایط آب و هوایی و محیطی منطقه نیز می تواند به این امر کمک کند (۲۰، ۱۵).

Archive of SID

www.SID.ir

در این تحقیق نیز با توجه به اینکه ۴ ژنوتیپ انتخابی در یک باغ و مجاور هم بوده اند، گونه های شناسایی شده آنها یکسان بوده است. این انتقال باکتریها از درختی به درخت دیگر می تواند به وسیله حشرات ، ذرات ریز معلق در هوا ، تماس شاخه های درخت با هم و بارندگی و آبیاری باشد(۱۸) .

این تحقیق برای اولین بار نقش ژنوتیپ‌های مختلف بادام را روی جمعیت کل باکتری‌ها و باکتری‌های مولد هسته یخ بررسی نمود. ژنوتیپ‌های انتخابی، بر اساس تفاوت در زمان گلدهی انتخاب شدند. در گزارشات مرکز تحقیقات کشاورزی زرقان ژنوتیپ۲۶ در مقایسه با دیگر ژنوتیپ‌ها متوسط دیر گل، مقاومت خوبی در برابر سرمازدگی نشان داده است (۲).

در تحقیق حاضر نیز درصد جمعیت گونه *P. syringae* در این ژنوتیپ در مقایسه با دیگر ژنوتیپ‌ها کمتر بوده است. با توجه به اینکه *P. syringae* فعالیت هسته یخ قوی تری را نسبت به دیگر باکتری ها نشان داد، یکی از دلایل مقاومت این ژنوتیپ را می توان به کم بودن جمعیت این باکتری نسبت داد. تحقیقات انجام شده نیز این ارتباط را تائید می‌کند (۲۲).

ژنوتیپ۵ (زودگل) با شروع نمونه‌برداری، درخت در مرحله آغاز شکوفه‌دهی بوده است، لذا با افزایش مواد مترشحه غذایی بر روی سطح گیاه، جمعیت بالایی از باکتری‌های اپیفیت بر روی آن فعالیت نمود، و با رسیدن میوه، افزایش دما و خشکی محیط جمعیت باکتری‌ها سیر نزولی پیدا می‌کند(۲). این موضوع در ژنوتیپ ۳۶ (متوسط زود گل) نیز صادق است ولی دو ژنوتیپ ۲۶ (متوسط دیر گل) و ۸ (خیلی دیر گل)، در آغاز نمونه‌برداری در مرحله جوانه و یا خواب بوده و با شروع زمان شکوفه‌دهی جمعیت باکتری‌ها افزایش یافت و با گرم شدن هوا و خشکی محیط، این افزایش جمعیت در مقایسه با ژنوتیپ‌های زودگل کمتر بود. بنابراین ژنوتیپ‌های بادام بسته به دوره فنولوژی گیاه و وضعیت شرایط اقلیمی، جمعیت باکتری‌های مولد هسته یخ نوساناتی خواهد داشت(۸).

تحقیقات نیز نشان داده است با ظهور شکوفه و برگ‌های جوان مواد مترشحه سطح گیاه افزایش پیدا کرده و بین مقدار این مواد و افزایش جمعیت باکتری‌های اپیفیت یک رابطه مستقیم وجود دارد حتی اگر شرایط دمایی محیط مناسب باشد، مواد غذایی و میزان منابع کربن روی سطح گیاه می‌تواند در افزایش یا کاهش جمعیت باکتری‌های اپیفیت موثر باشد (۲۱، ۱۷). یکی از راهکارهای مبارزه با سرمازدگی استفاده از ارقام دیر گل می‌باشد. این گونه ارقام به علت عدم شکوفه دهی در دوران خطر سرمازدگی، این تنش محیطی را با موفقیت سپری می‌کنند.

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که دیر گلدهی باعث تأخیر در افزایش جمعیت باکتری‌های مولد هسته یخ در این دوران شده و این امر خود می‌تواند یکی از دلایلی باشد که ژنوتیپ‌های دیر گل کمتر در معرض خطر سرمازدگی قرار می‌گیرند. گزارش شده است که دمای محیط و میزان بارندگی از عوامل اصلی افزایش یا کاهش جمیت باکتریهای مولد هسته یخ می‌باشند (۱۷، ۲۱). در این تحقیق مشخص شد که دما و رطوبت محیط در درجه اول نیاز دمایی و رطوبتی گیاه را تأمین کرده و گیاه در طی دوره فنولوژی خود ترشحاتی داشته که نیاز غذایی باکتری‌های اپیفیت را تأمین می‌کند و بدین صورت باعث افزایش جمعیت باکتری‌ها می‌گردد.

براساس نتایج بدست آمده می‌توان نتیجه گرفت که ارقام دیرگل به دلیل جمعیت پائین باکتری‌های مولد هسته یخ در دوران سرمازدگی از مناسبترین ارقام می‌باشند. از طرفی در مواقع ضروری به تاخیر انداختن دوره فنولوژی گیاه با استفاده از مواد شیمیایی نظیر اتفن و مواد تنظیم کننده رشد گیاه، می‌توان افزایش جمعیت این باکتری‌ها را به تاخیر انداخت، به طوری که در زمان‌های وقوع تنش سرمازدگی این خطر را به حداقل رساند.

پیشنهاد می‌شود:

۱- باغدارانی که قصد احداث باغ بادام در استان فارس را دارند نسبت به کاشت ارقام و ژنوتیپ‌های دیر گل اقدام نمایند.

۲- در صورتی که دارای ارقام زود گل می‌باشند برای کاهش سرمازدگی، دوره فنولوژی گیاه را به تاخیر اندازند و یا با استفاده از قارچ کش‌های مسی مانند مخلوط بردو جمعیت باکتری‌های مولد هسته یخ را کاهش دهند.

Archive of SID

www.SID.ir

۳- مواد ضد سرما[1] که یکی از اثرات آن جلوگیری از تشکیل هسته یخ است در کاهش سرمازدگی نقش بسزائی دارند. لذا استفاده از این مواد در ماه‌های خطر توصیه می‌گردد.

منابع و مآخذ:

۱- بی‌نام ۱۳۸۰. میزان خسارات سرمازدگی درختان بادام در سال ۱۳۸۰، معاونت باغبانی وزارت جهاد کشاورزی استان فارس- شیراز

۲- درستکار-م ۱۳۷۹. شناسائی، جمع آوری و ارزیابی گونه‌ها و ژنوتیپ‌های بادام به منظور استفاده و حفاظت. طرح تحقیقاتی ۷۹۴۲ مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان فارس. زرقان.

۳- صحراگرد جونقانی ن.، بنی‌هاشمی، ض. و تقوی، م. ۱۳۷۶. شناسایی باکتری‌های مولد هسته یخ روی درختان میوه هسته‌دار در استان فارس. مجله بیماری شناسی گیاهی. جلد ۳۳۰:ص ۲۱۵-۲۰۹.

۴- مزارعی، م.، قاسمی، الف. ۱۳۷۲، شناسایی و تغییرات فصلی جمعیت باکتریهای مولد هسته یخ روی درختان میوه هسته دار در شاهرود، مجله بیماری‌های گیاهی، جلد۶۰: ص ۵۷-۲۹.

۵- حسن زاده، ن. ۱۳۷۴. اصول روش‌های باکتری شناسی گیاهی. ناشر مرکز انتشارات علمی دانشگاه آزاد اسلامی چاپ اول. ۶۴۱ صفحه.

6- Andersen, G. L., Menkissoglu, O. Lindow, S .E. 1991. Occurrence and properties of copper tolerant strains of Pseudomonas syringae isolated from fruit in California. Phytopathology . 81: 648-656.

7- Ashworth , E . N . 1991 . The formation and distribution of ice within forsythia flower buds . Plant. Physiol . 92: 718-725.

8- Bakhanova , R. A., Kiprianova , E. A., Maxsimov, V. S., Smirnov, V.L, Kuku, E. I., Boixe, O. I., and Tovstenko, L.M. 1996. Ice nucleation activity of Pseudomonas fluorescens IMV 19. Appl. Bioch. Microbiol. 32: 240-243.

9- Constantinidou, H. A., Hirano, S. S., Baker, L. S., and Upper, C. D. 1990. Atmospheric dispersal of ice nucleation – active bacteria: the role of rain. Phytopathology 80: 934-937.

10- Constantinidou, H. A., Menkissoglu. O., and Stergiadou, H. C 1991. The role of ice nucleation active bacteria in supercooling of citrus tissue. Plant Physiol. 81: 548-554.

11- Fahy, P. C., and Persley, C. J. 1983. Plant bacterial diseases a diagoistic guide. ed. Academic press. Sidney Australia . 393 p.

12- Hirano, S. S., Upper, C.D., 1990. Population biology and epidemioloy of Pseudomonas syringae. Annu. Rev. Phytopathol 28: 155-177.

13- Hirano, S. S., Upper, C. D., 2000 Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on Pseudomonas syringae Pathogen , ice Nucleus and epiphyte . Microbiol . Mol . Bio . Rev . 64: 624-653.

14- Holt, J.G., Krieg, R.N., Sneath, P. H., A., Staley, J.T., and Williams, S.T. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology vol II (18th ed). Williams and Wilkerp 787 P.

15- Knudsen , G . R . 1989. Model to predict aerial dispersal of bacteria during enviromental release. Apple. Environ. Microbiol. 55: 2941-2647.

16- Kozloff, L. M., Schofield. M. A., and Lute, M. 1983. Ice nucleating site of Pseudomonas syringae and Erwinia herbicola. J. Bacteriol. 153: 222-223.

17- Leveau, J. H. J. and Lindow , S . E . 2001. Appetite of an epiphyte quantitative monitoring of bacteria sugar consumption in the phyllosphere. Proc. Nati. Acad. Sci. USA. 98: 3446-3453.

1 Anti frost

Archive of SID

www.SID.ir

18- Lindow, S. E, and Andersen, G. L. 1996. Influence of immigration epiphyic bacteria populations on navel orange leaves . Apple. Environ. Microbiol. 62: 2978-2987.
19- Lindow, S. E., McGourty, G., and Elkins, R. 1996. Interactions of antibiotics with Pseudomonas fluorescens strain A 506 in the Control of fire blight and frost injury to pear . Phytopathology 86: 841-848.
20- Malvick, D. K., and Moore, L. W. 1988. Survival and dispersal of a marked strain of Pseudomonas syringae in a maple nursery . Plant Pathol. 37: 573-580.
21- Mercier, J., and Lindow, S.E. 2000. Role of leaf surface sugar in colonization of plants by bacterial epiphytes. Appl. Environ Microbiol. 66: 369-374.
22- Montesionos, E., and Vitardell, P. 1991. Relationship among population levels of Pseudomonas syringae amount of ice nuclei and incidece of blast of dorment flower buds in commercial pear orchard in Catalunia Spain . Phtophathology 81: 113-119.
23- Prunier, J. P, Bordjiba, O. 1991 . Efflect of frost on bacterial necrosis of apricot buds . Acta. Horticul . 293: 493-502.
24- Rahimian. H. 1994. Angular Leaf spot of iron wood incited by Pathovar of Pseudomonas syringae. J. Phytopathology. 142: 235-240.
25- Schaad, N. W. Jones. J. B., and Chun, W. 2001. Laboratory guide for identification of Plant Pathogenic bacteria. 3 rd ed Amer. Phytopathol. Soc. Paul, MN, USA. 373 p.
26- Wilson, M., Hirano, S. S. and Lindow, S. E. 1999. Location and survival of leaf associated bacteria in relation to pathogenicity and potential for growth within the leaf Appl. Environ. Microbiol 64: 1435-1443.
27- Wisniewski, M., Lindow, S. E., and Ashworth, N. E. 1997. Observation of ice nucleation and oropagation in plant using inferared video thermography. Plant. Physiol. 113: 327-334.
28- Workmaster, B. A., Palta, J. p., and. wisniewski, M. 1999. Ice nucleation and propagation in cranberry uprights and fruit using inferared video thermography. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 124: 619-623.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱ - آزمونهای بکار رفته برای شناسایی باکتری Pseudomonas syringae
(Schaad et al. 2001 and Bergey's Manuals 1994)

P.syringae pv. syringae	Characteristic	خصوصیت
-	Gram reaction	واکنش گرم
+	Diffusible fluorescent pigment	پیگمان فلورسانت منتشر در محیط کشت KB
-	Non – diffusible pigment	پیگمان غیر منتشر در محیط کشت KB
V	Levan	لوان
-	Oxidas	اکسیداز
-	Arginine dihydrolase	آرژنین دهیدرولاز
-	Pectolytic activity (Potato rot)	پوسیدگی سیب زمینی (پکتیناز)
+	Tobacco HR	واکنش فوق حساسیت روی توتون
-	Nitrate reduction	احیاء نیترات
+	Gelatin hydrolysis	هیدرولیز ژلاتین
+	Ice nucleation	فعالیت هسته یخ
-	Starch hydrolysis	هیدرولیز نشاسته
-	Indole formation	تولید ایندول
	Utilization of :	**استفاده از :**
+	D(+) Glucose	دی گلوکز
+	L-Arabinose	ال آرابینوز
+	D-Mannose	دی – مانوز
+	D(+) Galactose	دی-گالاکتوز
-	Lactose	لاکتوز
-	Maltose	مالتوز
+	Sucrose	سوکروز
-	D(+)Cellobiose	دی سلوبیوز
b(7)	Syringomycin production	تولید سیرینگومایسین
-	Gas from glucose	تولید گاز از گلوکز
+	5%Nacl tolerance	تحمل نمک طعام ۵٪
-	7%Nacl tolerance	تحمل نمک طعام ۷٪
-	Methyl red	متیل رد
+	Catalase	کاتالاز
	Voges proskauer	استوئین

V : ۷۹-۲۱٪ از جدایه‌ها به این آزمون واکنش مثبت داشتند.

b : از ۸ جدایته آزمایش شده، ۷ جدایه واکنش مثبت نشان دادند.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- آزمونهای بکار رفته در شناسایی باکتری *Pseudomonas fluorescens* (Schaad *et al.* 2001 and Bergey's Manuals 1994)

P.fluorescens	Characteristic	خصوصیت
–	Yellow – orange cellular pigment	پیگمان زرد-نارنجی سلولی
v	Levan	لوان
+	Oxidase	اکسیداز
+	Arginin dihydrolase	آرژنین دی هیدرولاز
–	Tobacco HR	فوق حساسیت روی توتون
–	Growth at 4° C	رشد در ۴۱ درجه سانتی گراد
+	Growth at 4° C	رشد در ۴ درجه سانتی گراد
+	Nitrate reduction	احیاء نیترات
+	Gelatin hydrolysis	هیدرولیز ژلاتین
	Utilization of :	**استفاده از :**
+	L-Arabinose	ال – آرابیتوز
+	Glucose	گلوکز
+	D-Mannose	دی- مانوز
+	D(+) Galactose	دی - گالاکتوز
–	Lactose	لاکتوز
–	Maltose	مالتوز
+	Sucrose	سوکروز
–	D(+) Cellobiose	سلوبیوز
+	Ice nucleation	تولیدهسته یخ

V : ۷۹-۲۱٪ از جدایه ها دارای واکنش مثبت بودند .

جدول ۳- آزمونهای بکار رفته در شناسایی باکتری *Pantoea agglomerans* (Schaad *et al*, 2001)

P.agglomerans	Characteristic	**خصوصیت**
+	Yellow pigment	پیگمان زرد
+	Anaerobic growth	رشد بی هوازی
+	Motility	حرکت
+	Mucoid growth	رشد لعابی
+	Growth at 37°C	رشد در ۳۷ درجه سانتی گراد
+	Indole production	تولید اندول
+	Nitrate reduction	احیاء نیترات
+	5% NaCl tolerance	تحمل نمک ۵٪
+	Starch hydrolysis	هیدرولیز نشاسته
	Utilization of :	**استفاده از :**
+	Citrate	سیترات
+	Mannose	مانوز
+	Mannitol	مانیتول
–	Cellobiose	سلوبیوز
+	lactose	لاکتوز
+	Xylose	گزیلوز
+	Sucrose	سوکروز
+	Ice nucleation	تشکیل هسته یخ

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴- آزمون‌های بکار رفته برای شناسایی باکتری.*Xanthomonas* spp (Schaad *et al.* 2001)

Xanthomonas spp.	Characteristic	خصوصیت
-	Flourescence pigment on KB	تولید پیگمان فلورسانت روی KB
+	Growth at 40°C	رشد در ۴۰ درجه سانتیگراد
+	Growth at 35°C	رشد در۳۵ درجه سانتیگراد
+	Levan	لوان
-	Oxidase	اکسیداز
+	Colonies yellow or orange on YDC	کلنی زرد یا نارنجی روی YDC
+	Mucoid growth on YDC at 30°C	رشد لعابی روی YDC در ۳۰ °C
+	Gram negative	گرم منفی
-	Grows anaerobically	رشد بی هوازی
+	Grows aerobically	رشد هوازی
-	Urease	اوره آز
+	H2S from cystene	تولید H2S از سیستئین
Alk (بازی)	Litmus milk	شیر لیتموس

جدول۵- مقایسه جمعیت باکتری‌های مولد هسته یخ و کل باکتری‌های اپیفیت سطح چهار ژنوتیپ* بادام در زمان‌های مختلف نمونه برداری (سال ۸۱-۸۰)

زمان نمونه برداری	ژنوتیپ ۳۶		۵		۲۶		۸	
	کل باکتریها	مولد هسته یخ	کل باکتریها	مولد هسته یخ	کل باکتریها	مولد هسته یخ	کل باکتریها	مولد هسته یخ
۲۰ بهمن ۸۰	۶/۱ a**	۳/۱۶ a	۶/۳ a	۴/۱۵ e	۴/۵۴ e	۲/۸۳ a	۴/۱۴ e	۲/۲۵ a
۱۶ اسفند ۸۰	۶/۹۸ b	۵/۸۸ b	۷/۴۷ b	۷/۱ f	۶/۴ f	۵/۱۷ b	۵/۵۲ f	۳/۷۳ b
۲۰ فروردین ۸۱	۵/۶۱ c	۴/۲۳ c	۵/۱۵ c	۴/۴۳ g	۵/۸ g	۴/۳۵ c	۶/۴۱ g	۵/۶۴ c
۱۵ اردیبهشت ۸۱	۵/۱ d	۳/۳۵ d	۴/۲۳ d	۳/۱ h	۴/۶۶ h	۳/۸۵ d	۵/۹۸ h	۵/۱۳ d

* میانگین چهارتکرار از هر رقم

** بر حسب ۱۰ Log واحد تشکیل دهنده کلنی(CFU) در هر گرم از بافت تازه (Log۱۰CFU / gr fresh wt)

جدول۶-مقایسه نوسان جمعیت گونه‌های باکتری مولد هسته یخ جدا شده از سطح چهار ژنوتیپ انتخابی درختان بادام در چهار نوبت نمونه برداری (سال ۸۱-۸۰)*

زمان نمونه برداری	ژنوتیپ ۳۶				۵				۲۶				۸			
	Xa**	Pa	Ps	Pf	Xa	Pa	Ps	Pf	Xa	Pa	Ps	Pf	Xa	Pa	Ps	Pf
۲۰ بهمن ۸۰	۲/۲۱a***	۲/۲۸	۲/۵۹	۲/۷۶ a	۲/۹۶a	۳/۵۰ a	۳/۸۱ a	۳/۵۴ a	۱/۷۳ e	۲/۱۲a	۲/۴۳ a	۲/۳۳ a	۱/۴۳ e	۱/۴۳ a	۱/۷۲ a	۱/۸۵ a
۱۶ اسفند ۸۰	۳/۶۵b	۵/۱۶ b	۵/۵۳ b	۵/۴۲ b	۶/۲۱b	۵/۷۲ b	۶/۷۶ b	۶/۶۳ b	۴/۲۹ f	۴/۳۴ b	۴/۵۴ b	۴/۸۵ b	۲/۴۵ f	۲/۹۹ b	۳/۲۰ b	۳/۳۹ b
۲۰ فروردین ۸۱	۳/۱۷c	۳/۲۱ c	۳/۸۷ c	۳/۸۲ c	۳/۷۹c	۳/۸۱ c	۴/۰۲ c	۳/۸۲ c	۳/۴۴g	۳/۶۸ c	۳/۵۴ c	۴/۰۴۹ c	۴/۱۳ g	۴/۶۱ c	۵/۴۴ c	۵/۰۲ c
۱۵ اردیبهشت ۸۱	۲/۲۶d	۲/۸۰ d	۲/۷۴ d	۲/۹۳ d	۲/۱d	۲/۴۲ d	۲/۶۵ d	۲/۵۹ d	۳/۰۳ h	۳/۱۵ d	۳ d	۳/۵۵ d	۴/۰۴ h	۴/۳۹ d	۴/۷۶ d	۴/۶۱ d

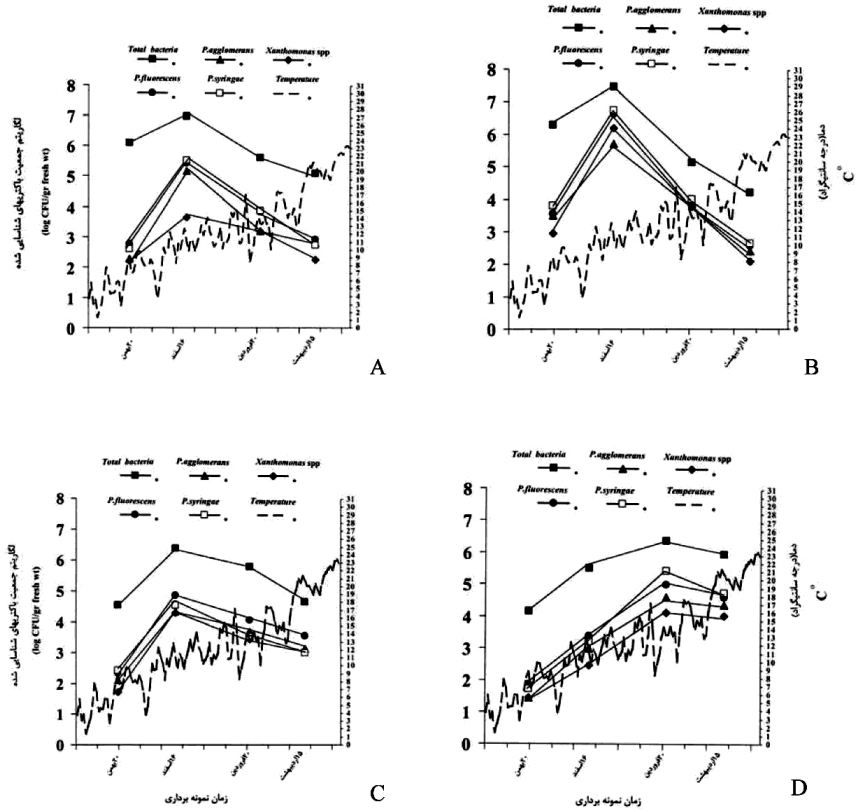
* : میانگین چهارتکرار از هر رقم

**: Xa :*Xanthomonas* spp Pa :*Pantoea agglomerans* Ps :*Pseudomonas syringae* Pf :*Pseudomonas fluorescens*

***: بر حسب ۱۰ Log واحد تشکیل دهنده کلنی (CFU) گرم بافت تازه (Log ۱۰ CFU / gr fresh wt)

Archive of SID

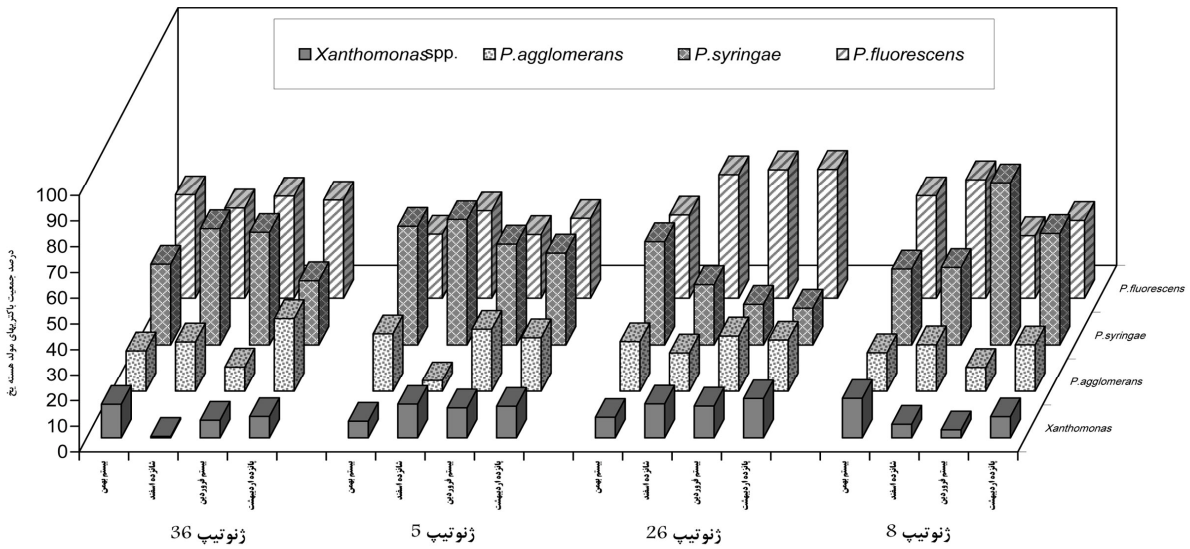
www.SID.ir



نمودار ۱- مقایسه نوسانات جمعیت باکتریهای مولد هسته یخ و کل باکتریهای اپیفیت سطح ژنوتیپ های انتخابی درختان بادام در طی چهار نوبت نمونه برداری (سال ۸۱-۸۰).

A: تغییرات مربوط به ژنوتیپ ۳۶ B: تغییرات مربوط به ژنوتیپ ۵

C: تغییرات مربوط به ژنوتیپ ۲۶ D: تغییرات مربوط به ژنوتیپ ۸



نمودار ۲- مقایسه درصد باکتری‌های مولد هسته یخ جدا شده از روی ژنوتیپ‌های انتخابی بادام در طی چهار نوبت نمونه‌برداری (سال ۸۱-۸۰)

www.SID.ir

JOURNAL OF
AGRICULTURAL
SCIENCES
Islamic Azad University

Investigation of Ice Nucleation Activity of Bacteria on Different Genotypes of Almond Trees in Zarghan area of Fars Province

S. Ketabchi
Ph.D Students- Department of Plant Pathology Science and Research Branch-Islamic Azad University.
N. Hasanzadeh
Assistant Professor- Department of Plant Pathology Science and Research Branch-Islamic Azad University.
M. Mohammadi
Assistant Professor- Department of Plant Pathology Tehran University.
A. Alizadeh Aliabadi
Assistant Professor- Agricultural Research Center Tehran.
Y.A. Seadat
Assistant Professor- Agricultural Research Center.

Keywords: Ice nucleation activity bacteria, Almond, *Pseudomonas syringae, Pseudomonas fluorescens, Pantoea agglomerans, Xanthomonas* spp.

Abstract
One of the factors which increases cold tension in the plants is ice nucleation activity (INA) of bacteria that produce biological ice nuclei which leads to frosting at higher temperature. In this study four genotypes of almond trees were selected and examined in Zarghan agricultural research center, in Fars province. The four genotypes were 36 (early-flowering), 5 (too early flowering), 26 (mid-late flowering) and 8 (too late-flowering). First, the INA^+ bacteria isolated from buds, blossoms, immature fruits & leaves were characterized according to standard bacteriological methods. There after their population densities were determined separately during the months of February, March, April and May, 2002-2003. The strains from *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pantoea agglomerans* and *Xanthomonas* spp. were identified as INA^+ bacteria. To *P.syringae* was the most prevalent bacterium and *P.agglomerans, P.fluorescens* and *Xanthomonas* spp. were ranked second to the fourth, respectively. Bacterial population changed completely depending on the phenology of the plants and the temperature. Moderate temperatures of February and March, induced early flowering almond genotypes to blossom in Zarghan area of Fars province. Since population of epiphytic INA^+ bacteria on almond trees will be increased by moderate temperature and adequate nutrition, any decrease in temperature will intensify on frost injury of almond trees. It was concluded selected almond genotypes, weather condition and population of INA bacteria are the most effective factors in frost damage of Zarghan area.

Archive of SID

www.SID.ir