

مطالعات ژنتیکی روی ژن هسته یخ باکتری *Bacillus cereus* عامل سرمازدگی گیاه پیاز (*Allium cepa*)

Genetic studies on *Bacillus cereus*, the cause of cold damage on onion plant (*Allium cepa*)

سارا کرکزی^۱، پریسا عبداللهی^{۱*}، نادر حسنزاده راستگاری^۲

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار، گروه بیوتکنولوژی و به نژادی، واحد علوم و تحقیقات،

دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

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

Karkazi S¹, Abdollahi P^{*1}, Hasanzadeh rastegari N²

1- MSc Student, Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Science and research branch, Islamic Azad university, Tehran, Iran

2- Associate Professor, Department of Plant Protection, Science and research branch, Islamic Azad university, Tehran, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۴/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۱۵)

چکیده

باکتری‌های فعال هسته یخ به دلیل تسریع فرآیند یخ‌زدگی در دمای ۰°C-۵ و دماهای بالاتر، یکی از عوامل مهم سرمازدگی در سطح مزارع و باغ‌های کشور هستند. به منظور شناسایی باکتری‌های دارای ژن هسته یخ، چندین نمونه باکتریایی با قدرت هسته یخ جداسازی شد که نهایتاً باکتری عامل سرمازدگی گیاه پیاز انتخاب شد. جهت ارزیابی فعالیت هسته یخ از آزمون انجماد درون لوله‌ای و انجماد قطره‌ای استفاده شد. شناسایی به روش معمول صفات فنوتیپی انجام گرفت و جدایه باکتریایی در سطح جنس *Bacillus* شناسایی شد. با تکثیر ژن *I6SrRNA* و بلاست توالی در سایت NCBI تعلق آن به گونه *Bacillus cereus* محرز شد. به دلیل عدم وجود ژن مولد هسته یخ برای جدایه مذکور در سایت NCBI آغازگری مشابه با آغازگرهای تعریف شده برای ژن هسته یخ در *Pseudomonas syringae* با این فرض که ژن *ina* در *B. cereus* مشابه با ژن هسته یخ (*inaZ*) در *Pseudomonas syringae* است طراحی شد و برای ردیابی ژن هسته یخ (*ina*) آنالیز واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام گرفت. در ادامه تحقیق با استفاده از آغازگر *I6SrRNA*، فرآیند همسانه‌سازی و استخراج پلاسمید به منظور انجام توالی‌یابی دقیق‌تر انجام گرفت. این اولین گزارش از وجود ژن هسته یخ در گونه *Bacillus cereus* است.

واژه‌های کلیدی

همسانه‌سازی

هسته یخ

INA

Bacillus cereus

مقدمه

تنش‌های محیطی مهم‌ترین عوامل محدود کننده در عملکرد محصولات هستند. یخ‌زدگی یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی است که منجر به خسارت اقتصادی و نابودی گیاهان می‌شود. تنش یخ‌زدگی در شرایطی پیش می‌آید که دما به پایین‌تر از نقطه انجماد آب برسد. آب به‌طور بالقوه در دماهای زیر صفر درجه سلسیوس منجمد نمی‌شود. آب کاملاً خالص در دمای 0°C - یخ می‌زند. ناخالصی‌های موجود در آب شامل ذرات گردوغبار، باکتری‌های مولد هسته یخ و غیره هستند که موجب می‌شوند آب در دماهای بالاتر از 2°C - منجمد شود (Warren et al. 1987). باکتری‌های دارای ژن فعال هسته یخ INA^+ به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل بیولوژیکی تشکیل هسته یخ در گیاهان، 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 (Warren et al. 1986). محل حضور هسته‌های یخ، تعیین کننده ادامه زندگی یا مرگ سلول‌های گیاهان است. بدون حضور باکتری‌های مولد هسته یخ خسارت سرمازدگی محدود به سرشاخه‌ها بوده و گیاه می‌تواند بهبودی خود را باز یابد. اگر هسته‌های یخ منحصراً در خارج سلول‌ها حضور داشته باشند، گیاه پژمرده شده ولی زنده می‌ماند. چنانچه کریستال‌های یخ در داخل سلول تشکیل شود به ساختار داخلی آن‌ها آسیب زده و منجر به مرگ سلولی می‌شود اگر هسته‌های یخ نتوانند به داخل یا خارج سلول‌ها نفوذ کنند، هر چند سلول و فضای اطراف آن حالت شیشه‌ای پیدا کرده ولی زنده می‌ماند (Fahy et al. 1984).

پدیده‌ی هسته یخ‌زایی باکتریایی اولین بار در سال ۱۹۷۴ در سویه‌های *Pseudomonas syringae* مشاهده شد. بعداً مشخص شد که جدایه‌های *P. viridiflava*، *Pseudomonas translucens* pv. *translucens* و *Erwinia herbicola* و *fluorescens* توانایی ایجاد یخ‌زدگی را دارند. فعالیت هسته یخ در گونه‌های دیگر نظیر *Sphingomonas* sp. و *Bacillus* sp. نیز مورد تأیید قرار گرفته است (Maki et al. 1974). باکتری‌های مولد هسته یخ، اکثراً گرم منفی، اپی فیت و بیمارگر هستند. این

باکتری‌ها در سه گروه طبقه‌بندی شده‌اند؛ گروه A شامل باکتری‌هایی است که در دمای 5°C - یا در دماهای بالاتر فعال هستند، گروه B که در دماهای 5°C - تا 8°C - تولید هسته یخ می‌نمایند و گروه C که در دمای 10°C - و یا کمتر فعالیت تشکیل هسته یخ را دارند (Hasanzadeh 1995). بیان و فراوانی هسته‌های یخ در باکتری‌های مولد هسته یخ تحت تأثیر عوامل مختلفی است. به‌عنوان مثال در محیط کشت حاوی گلیسرول در دمای 16°C بیش‌ترین فراوانی هسته یخ مشاهده شده است (Lindow et al. 1982).

همه ساله بخش عمده محصولات اقتصادی مهم کشور، در معرض تنش سرما قرار می‌گیرد و میکروارگانیزم‌های تولیدکننده هسته‌های یخی به‌ویژه باکتری‌ها از عوامل تشدید کننده‌ی سرمازدگی هستند. این پدیده و خسارت‌های ناشی از آن نه فقط در ایران بلکه در اکثر کشورهای جهان وجود دارد و از آن جایی که سالانه خسارت زیادی به کشاورزان و باغداران از طریق وقوع یخبندان و در نتیجه سرمازدگی محصولات وارد می‌شود ارایه راهکارهای مناسب جهت کاهش خسارت ناشی از آن ضروری به‌نظر می‌رسد. به‌کارگیری روش‌های متفاوت زیست فناوری می‌تواند با تغییر فلور میکروبی و کاهش میکروارگانیزم‌های تولیدکننده هسته یخ به کنترل خسارت سرمازدگی و پیشگیری از آن کمک کند. غیرفعال شدن ژن عامل هسته یخ می‌تواند باعث تولید جدایه‌هایی شود که در همه‌ی خواص مورفولوژیکی، اکولوژیکی و اپی فیتی به جز قابلیت تشکیل هسته یخ، مشابه جدایه‌ی والد دارای هسته یخ هستند. تکثیر و انتقال این جدایه‌های دستکاری شده ژنتیکی روی گیاهان باعث می‌شود که به رقابت با والد وحشی خود پرداخته و از استقرار آن جلوگیری می‌کنند. جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولیدکننده هسته یخ اولین گام برای مطالعات ژنتیکی و بررسی امکان دستکاری ژنتیکی این باکتری‌ها به‌منظور کاهش و کنترل خسارت سرمازدگی است. در پژوهش حاضر جداسازی و شناسایی باکتری‌های مولد هسته یخ در گیاه پیاز با استفاده از روش‌های ریخت‌شناسی، بیوشیمیایی و ژنتیکی به‌منظور مطالعه کارکرد ژن باکتری مولد هسته یخ انجام گرفته است.

¹ Ice Nucleation Activity

مواد و روش‌ها

جدایه باکتری از گیاه پیاز (*Allium cepa*) با علائم سرمازدگی و لهیدگی جداسازی شد. پس از کشت، خالص‌سازی و اثبات بیماری‌زایی روی محیط کشت نوترینت آگار حاوی ۱ درصد ساکاروز در دمای 4°C نگهداری شد.

شناسایی اولیه باکتری به کمک آزمون لوپات (تولید لوان، اکسیداز، لهانیدن سیب‌زمینی، تولید آرژنین‌دی‌هیدروژلاز و ایجاد فوق حساسیت در توتون) انجام گرفت (Klement et al. 1964).

آزمون انجماد قطره‌ای برای تعیین فعالیت هسته یخ، طبق روش مارکو و لیندو انجام شد (Lindow et al. 1987). بدین منظور سوسپانسیونی با غلظت 10^8 cfu/ml از باکتری کشت شده روی محیط کشت آگار مغذی حاوی ساکارز، با ۱/۵ درصد گلیسرین تهیه شد. سوسپانسیون باکتری در سه رقت مختلف تهیه شد. در ابتدا چند کلنی از باکتری در یک میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل شد و طی سه مرحله اینوکولوم اولیه هر بار با یک میلی‌لیتر آب مقطر استریل رقیق‌سازی و سری رقت‌های ۱:۱، ۱:۲ و ۱:۳ به‌عنوان کنترل منفی تهیه شد. قطراتی به حجم ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون‌های به‌دست آمده روی فویل آلومینیومی که سطح آن با پارافین محلول در زایلن پوشیده شده بود و در دمای 5°C تا 10°C قرار داده و تشکیل هسته یخ با چشم غیر مسلح بررسی شد. در صورتی که قطره‌ها در مدت زمان کم‌تر از ۵ دقیقه یخ می‌زدند، فعالیت هسته یخ برای باکتری مثبت تلقی می‌شد. آب‌مقطر به‌عنوان شاهد این آزمایش بود.

از سوسپانسیون باکتری جهت آزمون انجماد درون لوله‌ای در کنار لوله حاوی آب‌مقطر استریل به‌عنوان شاهد نیز استفاده شد. برای اطمینان از صحت آزمون مخلوط باکتری مورد نظر و باکتری *P. syringae* استفاده شد. لوله‌های حاوی سوسپانسیون باکتری و آب‌مقطر شاهد در بشر حاوی مخلوط آب و نمک و در فریزر 20°C قرار داده شده و پس از گذشت یک تا دو دقیقه نتایج ثبت شدند.

استخراج DNA به روش CTAB صورت گرفت (Nishiguchi et al. 2002). به‌منظور تکثیر ژن *16SrRNA* آغازگرهای 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' و 5'-CGGGTTACCTTGTTACGACTT-3' به‌کار گرفته شدند.

(Lane 1991). به‌منظور بهینه‌سازی واکنش PCR غلظت‌های مختلف DNA مخلوط با $1\mu\text{M}$ از هر کدام از آغازگرها و ۱X بافر PCR Mastermix به‌همراه 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 دمای 94°C (یک چرخه) و ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای 94°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای 56°C به مدت ۳۰ ثانیه، بسط در دمای 72°C به مدت ۲ دقیقه، نهایتاً یک چرخه بسط نهایی در دمای 72°C به مدت ۵ دقیقه انجام شد و محصول تکثیر شده به کمک ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد.

پیش از انجام همسانه‌سازی به‌منظور شستشو و خالص‌سازی محصول PCR، ۲ میکرولیتر سدیم استات و ۸ میکرولیتر ایزوپروپانول به ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR اضافه و مخلوط شدند. مخلوط حاصل پس از آنکه به مدت ۲۵ دقیقه در فریزر 80°C قرار داده شد، به مدت ۲۰ دقیقه در 16000 rpm سانتریفیوژ شد. فاز رویی میکروتیوپ خالی شده و مقدار ۱۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد به آن اضافه شد. پس از سانتریفیوژ به مدت ۲۰ دقیقه در 16000 rpm بار دیگر فاز رویی خالی شده و بعد از تبخیر کل اتانول موجود در میکروتیوپ در نهایت ۱۰ میکرولیتر آب‌مقطر استریل به آن اضافه نموده و در 20°C برای مرحله بعدی نگهداری شد.

درج محصول PCR در وکتور pTG19-T با استفاده از کیت PCR TA Cloning شرکت سینا کلون (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 سلول‌های انتقال یافته، روی سطح پلیت LB-Ampicillin X-Gal/IPTG agar اسپری شده و بعد از گذشت ۲۴ تا ۴۸ ساعت کلونی‌ها شامل کلونی‌های نوترکیب به رنگ سفید و کلونی‌های آبی فاقد پلاسمید نوترکیب رشد کردند. به‌منظور اطمینان از گزینش کلونی‌های سفید، کلونی PCR با استفاده از آغازگرهای رفت و برگشت عمومی M13 موجود در کیت انجام شد. استخراج پلاسمید کلونی‌های نوترکیب طبق دستورالعمل کیت Plasmid extractin Kit (Ex611) شرکت سیناژن، انجام گرفت. محصولات PCR



شکل ۲- الکتروفورز محصول واکنش PCR ژن *16S rRNA* جدایه منتخب *Bacillus cereus* strain A (اعداد به ترتیب ۱) نشانگر مولکولی 1kb، شرکت Thermo، ۲) کنترل منفی، ۳، ۴، ۵، ۶) DNA باکتری منتخب با غلظت‌های ۳۴/۵ng/ul، ۵۲/۹، ۴۵/۵، ۶۹/۸، ۷ و ۸) DNA باکتری منتخب در غلظت ۱۰۸ ng/ul.

در آنالیز PCR ژن *16S rRNA* سویه منتخب قطعه‌ای در اندازه حدود 1500 kb تکثیر شد (شکل ۲). نتیجه تطابق توالی ژن *16S rRNA* همسانه‌سازی شده با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعات ژنومی NCBI نشان داد که جدایه منتخب ۹۷ درصد شباهت به گونه باکتری *Bacillus cereus* strain A دارد.

بحث

پیاز (*Allium cepa*) از قدیمی‌ترین سبزی‌ها و صیفی‌جات خوراکی در دنیا و ایران به‌شمار می‌رود. سطح زیر کشت این محصول ۶۲۲۹۷ هکتار و میزان تولید آن در کل کشور ۴۹۹۵۳۲۷ هکتار می‌باشد (Ahmadi et al. 2016). از بعد گیاه‌شناسی این گیاه به خانواده آلیاسه (*Alliaceae*) تعلق دارد و کشت آن تماماً بستگی به شرایط محیطی دارد. زیرا درجه حرارت و طول روز در تشکیل غده پیاز حائز اهمیت است. از این رو ارقام پیاز که در سه گروه روز بلند، روز متوسط و روز کوتاه تقسیم‌بندی می‌شوند به تناسب شرایط محیطی استان‌های مختلف کشور انتخاب و کشت می‌شوند. به‌طور مثال رقم روز بلند پیاز قرمز در ابتدای فروردین ماه کشت می‌شود که تقریباً مقاوم به سرما است.

این گیاه برغم داشتن ده‌ها ماده ضد میکروبی به تعدادی از عوامل قارچی و باکتریایی حساسیت دارد. از مهم‌ترین عوامل باکتریایی می‌توان به باکتری‌های عامل پوسیدگی نرم چون *Burkholderia cepacia*، *Burkholderia gladioli* subsp. *alliiicola* و *Burkholderia cepacia* اشاره نمود.

برای امر توالی‌یابی با آغازگرهای رفت و برگشت *16S rRNA* به شرکت تکاپوزیست (Bioneer کره جنوبی) فرستاده شد.

نتایج

پس از جداسازی و خالص‌سازی جدایه منتخب (*Bacillus* sp. A) به کمک آزمون‌های لوپات (LOPAT) شامل تولید لوان، اکسیداز، پوسیدگی نرم غده سیب‌زمینی، آرزنین دی هیدرولیزه و فوق حساسیت روی برگ توتون مشخص شد که سویه جداسازی شده یک باکتری گرم مثبت، متحرک، اکسیداز مثبت، حلالیت در پتاس مثبت، لوان منفی، آرزنین دی هیدرولیزه مثبت است که شکل سلول‌ها در زیر میکروسکوپ نوری به شکل میله‌ای و خود کلنی‌هایی سفید و دیواره نامنظم داشت.

نتایج آزمون انجماد درون لوله‌ای برای اثبات توانایی تشکیل هسته یخ جدایه منتخب مشاهده و یادداشت برداری شد. باکتری *P. syringae* در فریزر 20°C - در ۵ تا ۷ دقیقه و باکتری جدایه منتخب (*Bacillus* sp. A) در مدت بین ۷ تا ۱۳ دقیقه یخ زد. مخلوط باکتری *P. syringae* و جدایه باکتری منتخب در مدت ۷ دقیقه یخ زد که نشان داد باکتری مورد نظر از توان بالای هسته یخ برخوردار نمی‌باشد. نتایج مشابهی از آزمون انجماد قطره‌ای به دست آمد که نشان می‌دهد جدایه منتخب دارای فعالیت هسته یخ در دمای بین 6°C - تا 17°C - می‌باشد (شکل ۱).



شکل ۱- آزمون انجماد قطرات سوسپانسیون باکتری منتخب strain A *Bacillus cereus* روی ورق آلومینیومی آغشته به زایلن. قطرات حاوی سوسپانسیون باکتری در سه رقت مختلف محاسبه شد. قطرات یخ‌زده ظاهری کدر نسبت به قطرات یخ نزده داشت.

دارای ژن هسته یخ است. این باکتری، با باسیل های دارای توانایی تولید هسته یخ که از مناطق یخبندان جداسازی شده بودند دارای ۹۶ درصد شباهت توالی بودند (Mortazavi et al. 2015). امروزه ژن های هسته یخ که به نام های مختلف در گونه های مختلف شناسائی و تعیین توالی شده اند از پنج گونه باکتریایی کلون، توالی یابی و با نام های مختلف گزارش شده است. این ژن ها عبارتند از: *inaZ* از

Pseudomonas syringae (Green and Warren 1985)، *inaW* از *Pseudomonas fluorescens* (Warren et al. 1986)، *ice E*، (Warren and) *Pantoea agglomerans* (*Erwinia herbicola*) (Corotto, 1989)، *inaA* از *Erwinia uredoura* (Abe et al. 1989) و *Pantoea ananas* و *inaX* از *Xanthomonas translucens* (Zhao et al. 1990). توالی این ژن در بین پنج گونه ی ذکر شده بسیار حفاظت شده بوده و شامل نواحی تکراری و متناوب در مجاورت نواحی پایانه های C و N است. با توجه به حفاظت شدید این توالی بین گونه ها احتمال اینکه ژن منشاء غیر باکتریایی داشته باشد، بعید است (Edwards et al. 1994).

در این پژوهش به منظور تکثیر ژن *ina* سویه منتخب، آغازگرهایی بر اساس توالی ژن هسته یخ *inaZ* در باکتری *Pseudomonas syringae* طراحی شد که با توجه به عدم تکرار پذیری در تکثیر قطعه مورد انتظار به کمک آغازگرها و حضور قطعات تکثیر شده با اندازه های تصادفی نتیجه گیری شد که سویه منتخب علی رغم وجود فعالیت هسته یخ فاقد ژن *inaZ* می باشد. اثبات اینکه فعالیت تشکیل هسته یخ سویه منتخب *Bacillus cereus* strain A به ژن های دیگر *ina* مرتبط است نیازمند آزمایشات تکمیلی بیشتر است.

نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر نشان داد که باکتری های مولد هسته یخ بسیاری می توانند روی سطح گیاهان زراعی و باغی به صورت اپیفیت وجود داشته باشند که در شرایط محیطی خاص موجب خسارت های سنگین به محصولات زراعی و باغی بشوند. گزارش وجود چنین باکتری روی پیاز اولین بار است که حداقل از ایران گزارش می شود. با توجه به اهمیت محصول پیاز و کشت آن در مناطق مختلف کشور وجود این باکتری و باکتری های

هیچ یک از عوامل فوق روی گیاهان ایجاد سرمازدگی نمی کنند. بالعکس، تعدادی از گونه های جنس *Bacillus* در خانواده باسیلاسه (*Bacillaceae*) دارای ژن های مولد هسته یخ می باشند. این باکتری ها به دلیل ترشح آنزیم های مختلف و تشکیل اسپور در خاک و مواد غذایی، از اهمیت بالایی برخوردارند (Holt 2009). در مطالعه حاضر، اقدام به جداسازی سویه باسیلوس از پیاز شد که بر اساس آزمون های بیوشیمیائی و مولکولی خصوصیات آن با باکتری *Bacillus cereus* مطابقت داشت.

از ویژگی های این باکتری ها تولید اسپور در شرایط نامناسب محیطی است. علاوه بر آن باکتری های فوق، به مواد ضد باکتریایی، حرارت، خشکی، یخ زدگی، سموم شیمیایی و دیگر فاکتورهای مضر محیطی مقاومت نشان می دهند (Jensen et al. 2003). به طوری که در آزمون تحمل دما که در دمای ۸۰°C به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد سلول های تیمار شده جدایه strain A *Bacillus cereus* قادر به رشد مجدد در محیط کشت NA بودند. بر پایه مقایسه توالی های دو ژن *16srRNA* و *23srRNA* جنس *Bacillus* به گروه های متعددی طبقه می شوند. در گروه *B. cereus* شش گونه *B. mycoides*، *B. thuringiensis*، *B. cereus*، *B. anthracis*، *B. pseudomycoides* و *B. weihenstephanensis* قرار دارند (Sleytr 1988).

نقش های متنوعی برای باکتری های با قابلیت تولید هسته یخ از جمله *Bacillus* ها که از مکانیسم کترلی INA تبعیت می کنند گزارش شده است. اخیراً دو جدایه با فعالیت هسته یخ در جنس جدید *Lysinibacillus* مورد شناسایی قرار گرفتند که نقش آن ها در آغاز بارش نزولات آسمانی بسیار حائز اهمیت بوده است. جنس مذکور گرم مثبت و پروتئین INA جدایه های آن بر خلاف سایر پروتئین های شناخته شده هسته یخ در باکتری ها که غالباً در اندازه های چند کیلو دالتون هستند، پروتئینی در حد نانومتر است که در برابر حرارت، لیزوزایم و پروتیناز بسیار مقاوم می باشد. بنابراین مکانیسم عمل تولید هسته یخ و نقش پروتئین INA متنوع تر از حد انتظار است (Failor et al. 2017).

در تحقیق حاضر نتایج آزمون انجماد قطره ای و انجماد درون لوله ای برای اثبات فعالیت هسته یخی و ضدیخی نشان داد که جدایه *Bacillus cereus* strain A دارای فعالیت هسته یخ بوده و

تکمیلی در همه ابعاد آن از جمله شناسائی و مدیریت آنها می‌تواند حائز اهمیت باشد.

مشابه در مزارع و سردخانه‌ها و تکثیر آنها می‌تواند در روند طبیعی تولید محصول به‌طور بالقوه خطرناک باشد. لذا مطالعات

منابع

- Abe K, Watabe S, Emori Y, Watanabe M, and Arai S (1989) An ice nucleation active gene of *Erwinia ananas*. Sequence similarity to those of *Pseudomonas species* and regions required for ice nucleation activity. FEBS Letters 58: 297-300.
- Ahmadi K, Gholizadeh H and Ebadzadeh H (2016) Agriculture statistics. Ministry of agriculture jahad Press, Tehran, Iran. (In Farsi).
- Edwards A R, Van Den Bussche R A, Wichman H A, and Orser C S (1994) Unusual pattern of bacterial ice nucleation gene evolution. Molecular Biology and Evolution 11:911-920.
- Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CR and Meryman HT (1984) Vitrification is an approach to cryopreservation. Cryobiology 21:407-426.
- Failor KC, Schmale DG 3rd, Vinatzer BA, Monteil CL (2017) Ice nucleation active bacteria in precipitation are genetically drive and nucleate ice by employing different mechanism. The IJSME 11: 2740-2753.
- Green RL, Warren GJ (1985) Physical and functional repletion in a bacterial ice nucleation gene. Nature 317: 645-648.
- Hasanzadeh N (1995) Principles and Methods of Plant Bacteriology. Islamic Azad University Press, Tehran, Iran. (In Farsi).
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PH, Staley JT, Williams ST (2009) In Williams BW and Aidan. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. USA. Baltimore. Springer Dordrecht Heidelberg London New York, 21-68.
- Jensen GB, Hansen BM, Eilenberg J, Mahillon J (2003) The hidden life styles of *Bacillus cereus* and relatives. Environmental Microbiology 5: 8 631-640.
- Klement Z, Farkas GL, Lovrelovich L (1964) Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. Journal of Phytopathological 54: 474-477.
- Lane DJ (1991) 16S/23S RNA sequencing. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic. E. Stackebrandt and M. Goodfellow, eds. New York, NY, John Wiley and Sons 115-175.
- Lindow SE, Arny DC and Upper CD (1978a) Distribution of ice nucleation-active bacteria on plants in nature. Applied and Environmental Microbiology 36: 831-838.
- Lindow SE, Hirano WR, Barchet DC, Amy & CD Upper (1982b) Relationship between ice nucleation frequency of bacteria and frost injury. The American Phytopathological Society 70: 1090-3.
- Maki LR, Galyan EL, Chang-Chien MM & Caldwell DR (1974) Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae*. Applied Microbiology 28: 456-460.
- Mortazavi R, Attiya S, Ariya PA (2015) Arctic microbial and next-generation sequencing approach for bacteria in snow and frost flowers, selected identification, abundance and freezing nucleation. Journal of Atmospheric Chemistry and Physics 15: 6183-6204.
- Nishiguchi M K, Doukakis P, Egan M, Kizirian D, Phillips A, Prendini L, Rosenbaum HC, Torres E, Wyner Y, DeSalle R and Giribet G. DNA Isolation Procedures. Methods and Tools in Biosciences and Medicine. Techniques in molecular systematics and evolution, ed. by Rob DeSalle et al. (2002) Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland DOI: 10.1007/978-3-0348-8125-8_12.
- Sleytr UB, Messner P (1988) Crystalline surface layers in prokaryotes. Journal of Bacteriology 70: 2891-2897.
- Warren GJ, Lindemann J, Suslow TV, Green RL (1987) Ice nucleation deficient bacteria as frost protection agents. In: Applications of Biotechnology to Agricultural Chemistry (LeBaron L, Mumma, R, Honeyeutt, and Duesing J. Eds) American Chemical Society. Washington DC.
- Warren G, Corotto L (1989) The consensus sequence of ice nucleation proteins from *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas syringae*. Gene 85: 241 – 244.
- Warren G, Corotto L, Wolber P (1986) Conserved repeats in diverged ice nucleation structural genes from two species of *Pseudomonas*. Nucleic Acids Research 14: 8047-8060.
- Zhao J, Orser C (1990) Conserved repetition in the ice nucleation gene inaX from *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*. Molecular and General Genetics 223: 163-166.