ارزیابی توان تشکیل هسته یخ باکتری‌های جداسازی شده از ژنوتیپ‌های تجاری نیشکر

حسین مؤذن رضامحله[۱]، غلام خداکرمیان[۲]، نادر حسن‌زاده[۳]*و حمید رجبی معماری[۴]

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

۲- استاد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

۳- ***نویسنده مسوول:** گروه گیاه‌پزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (hasanzadehr@yahoo.com)

۴- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۷/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۱/۰۵

چکیده

استان خوزستان تنها استان نیشکر خیز ایران محسوب می‌شود و سرمازدگی در بعضی از سال‌ها خسارت زیادی به این محصول ارزشمند وارد می‌کند. از آن‌جایی‌که تاکنون پژوهش جامعی در زمینه‌ی شناسایی باکتری‌هایی با پتانسیل تشکیل هسته‌ی یخ در سرمازدگی انجام نشده است این پژوهش با این هدف انجام شد. در این بررسی، از استرین‌های اندوفیت و اپی‌فیت جداشده از گیاه نیشکر واقع در مؤسسه تحقیقات و آموزش نیشکر و صنایع جانبی استفاده شد. ژن مولد هسته‌ی یخ توسط جفت آغازگرهای 3076f/3463r و 3308f/3463r ردیابی شد. برای بررسی پتانسیل یخ‌زدگی استرین‌های نماینده، چهار آزمون "تعیین فعالیت هسته‌ی یخ به روش انجماد درون لوله"، "آزمون انجماد قطره در دمای منفی بیست درجه سانتی‌گراد"، "آزمون هسته‌ی یخ روی برگ‌های بریده شده در شرایط آزمایشگاه" و "آزمون هسته‌ی یخ روی گیاه نیشکر در شرایط گلخانه" انجام شد. در پایان گونه‌های *Burkholderia gladioli*، *Burkholderia fungorum*، *Burkholderia cantaminans*، *Mesorhizobium huakuii*، *Ochrabacterium ciceri*، *Microbacterium proteolyticum*، *Microbacterium foliorum*، *Ralstonia solanacearum*، *Ralstonia picketii* و *Xanthomonas compestris* با شدت‌های مختلف علائم سرمازدگی را در آزمون‌های مذکور نشان دادند. برای هیچ‌کدام از استرین‌های گونه‌های مذکور، به‌غیر از استرین‌های گونه *X. campestris* در منابع و پژوهش‌های پیشین، فعالیت هسته‌ی یخ گزارش نشده است. آزمون‌های بررسی فعالیت هسته‌ی یخ استرین‌های انجام‌شده در آزمایشگاه و گلخانه نیز تأییدکننده نتایج حاصل از آزمون مولکولی بودند. علاوه بر آن، براساس این آزمون‌ها مشخص شد که رقم CP69-1062 حساس‌ترین و رقم CP73-21 مقاوم‌ترین رقم نسبت به مشکل سرمازدگی است. این نتایج اطلاعات خوبی برای تولیدکنندگان و تشویق آن‌ها به استفاده از ارقام مقاوم فراهم می‌آورد.

کلیدواژه‌ها: باکتری‌های اندوفیت، فعالیت هسته‌ی یخ، Burkholderia sp.، انجماد قطره

مقدمه

سرمازدگی محصولات زراعی و باغی در سطح جهان، به عنوان یکی از تنش‌های محیطی، همواره مورد توجه بوده است. با توجه به اینکه بیشتر وسعت کشور را اقلیم خشک و فراخشک تشکیل می‌دهد، پدیده‌ی سرمازدگی محصولات کشاورزی، در کشور غالب است. به همین دلیل این پدیده در رده‌ی حوادث غیرمترقبه دسته بندی شده و سالیانه میلیاردها تومان خسارت به اقتصاد کشور وارد می‌کند (Dashtakian, 2007).

اهمیت اقتصادی نیشکر معروف به گیاه جادویی، بر هیچ کس پوشیده نیست و به عنوان یک محصول استراتژیک، جایگاه خاصی در بین تولیدات کشاورزی ایران دارد. استان خوزستان تنها استان نیشکرخیز ایران محسوب می شود که سرمازدگی در بعضی از سال‌ها خسارت زیادی به این محصول ارزشمند وارد می‌کند. تنها عامل محدودکننده‌ی رشد و توسعه نیشکر در ایران سرمای شدید فصل زمستان در برخی سال‌ها و خشکی زیاد در فصل تابستان است. تنش سرمازدگی (نه یخ زدگی) بر قلمه‌ها به مدت سه هفته منجر به کاهش تعداد، ارتفاع، وزن ساقه و عملکرد شکر می‌شود و نتایج این تنش به راتون‌ها نیز منتقل می‌شود (Ghotb, 1963). مطالعات نشان می‌دهند که نیشکرهای جوان می‌توانند دمای حداقل حدود منفی یک درجه سانتی‌گراد را به مدت ۴۲ ساعت بدون کاهش در تعداد ساقه یا قابلیت زیست آن‌ها تحمل‌کنند. هرچند دوام دما در منفی چهار درجه سانتی‌گراد تعداد و قابلیت زیست ساقه را کاهش‌می دهد (Rahdar, 2004). تعداد وقوع سرمازدگی اثرات مضر را از طریق کاهش عملکرد نی و شکر نشان می‌دهد (Mirshekari, 2004). از آن‌جا که ثابت شده است، آب کاملاً خالص در دمای منفی چهل درجه سانتی‌گراد یخ می‌زند، لذا یخ زدن آب در دماهای بالاتر به دلیل وجود ترکیباتی است که می‌توانند به عنوان هسته یخ قرار بگیرند. بنابراین، یک محلول آبی می‌تواند در دماهای بالاتر حتی نزدیک به صفر (منفی دو درجه سانتی‌گراد) نیز یخ بزند (Kawahara, 2017).

وجود پروتئین‌های خاص در غشاء بیرونی باکتری‌ها می‌توانند به عنوان عامل هسته یخ عمل کنند و باعث تشکیل کریستال یخ شوند. تصور می‌شود که این پروتئین‌ها به خاطر ساختمان بیوشیمیایی خاصی که دارند می‌توانند در شرایط محیطی مطلوب، به شکلی قرار بگیرند که محل هسته‌ای[1] نامیده می‌شود (Jukes and Cantor, 1969). وقتی مولکول آب در این محل هسته‌ایی وارد شود، کریستاله می‌شود. این کریستال اولیه هسته مرکزی باعث تجمع مولکول‌های دیگر آب و تشکیل کریستال‌های یخ بعدی می‌شود (Lagriffoul et al., 2010).

هسته‌های یخ می‌توانند منشاء زیستی (باکتری‌ها) و یا غیر زیستی (گرد و غبار، ترکیبات معدنی و آلی) داشته باشند. البته عوامل غیر زیستی در دمای پایین‌تر (منفی هشت درجه سانتی‌گراد) و باکتری‌های مولد هسته یخ در دمای نزدیک به صفر (منفی دو تا منفی پنج درجه سانتی‌گراد) تشکیل کریستال‌های یخ را آسان می‌کنند (Kawahara, 2017). خسارت سرمازدگی در گیاهان زراعی بویژه نیشکر یک مشکل جدی در کشاورزی است. بسیاری از این خسارت‌ها در دمای نزدیک به صفر در حضور باکتری‌های مولد هسته یخ صورت می‌گیرد (Kaneda, 1986).

اغلب ارقام تجاری در مرحله گیاهچه‌ای و نی قابل برداشت در دمای بین صفر تا منفی پنج درجه سانتی‌گراد به سرما حساس هستند. حضور باکتری‌های عامل هسته یخ می‌تواند میزان آسیب‌پذیری بافت‌ها در دماهای بالاتر از این را افزایش دهد. در حالی که بافت‌ها بدون حضور این باکتری‌ها می‌توانند سرمای پایین‌تر را بدون آسیب یخ‌زدگی تحمل کنند (Gross, 1983). تنها وجود یک

1- Nucleation site

هسته یخ کافی است تا ایجاد کریستال‌های یخ آغاز گردد و به دنبال آن آسیب سرمازدگی در تمام بافت‌ها اتفاق بیفتد (Single and Olien,1967).

با توجه به مطالب فوق یک بررسی جامع برای مشخص نمودن تأثیر باکتری‌های عامل هسته یخ در ایجاد خسارت‌های چشمگیر سرمازدگی در محصول استراتژیک نیشکر در استان خوزستان لازم به نظر می‌رسد. در ضمن شناسایی عوامل زیستی هسته یخ در ارقام مختلف نیشکر در مناطق مختلف نیشکرکاری خوزستان، و همچنین حساسیت یا مقاومت ارقام مختلف نیشکر نسبت به باکتری‌های مولد هسته یخ لازم است که مشخص گردد.

نظر به اهمیت باکتری های هسته یخ در کاهش مقاومت ارقام نیشکر نسبت به سرما، مطالعه حاضر با اهداف: ۱- انجام آزمون‌های تعیین هسته‌ی یخ روی باکتری‌های جدا شده از گیاه نیشکر؛ ۲- سنجش عملکرد ارقام تجاری نیشکر نسبت به باکتری‌های مولد هسته یخ و ۳- تعیین ارقام مقاوم و حساس نیشکر نسبت به مشکل سرمازدگی انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری، جداسازی و شناسایی جدایه‌های جدا شده از نیشکر

جهت انجام آزمون‌های سرمازدگی، از ۶۷ استرین اندوفیت و اپی‌فیت جداشده از گیاه نیشکر واقع در مؤسسه تحقیقات و آموزش نیشکر و صنایع جانبی استفاده شد. جزئیات مربوط به نمونه‌برداری، نحوه‌ی جداسازی و شناسایی مرفولوژیکی و مولکولی جدایه‌ها قبلاً توضیح داده شده است (Moazzen et al., 2019).

آزمون ردیابی ژن مولد هسته‌ی یخ

به منظور ردیابی ژن هسته یخ در ۶۷ جدایه توالی یابی شده، از آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با دو جفت آغازگر 3076f/3463r و 3308f/3463r استفاده گردید (Hill et al., 2014) (جدول ۱). غلظت و میزان مواد به کار رفته در واکنش ۲۵ میکرولیتری بدین شرح بود: یک تا دو میکرولیتر DNA Template، یک میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها، هشت میکرولیتر Master mix و ۱۴-۱۳ میکرولیتر آب دیونیزه. چرخه دمایی لازم برای انجام واکنش PCR شامل واسرشتگی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه، واسرشتگی[1] در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، هم‌جوشی[2] در ۵۳ درجه سانتی‌گراد ۴۵ ثانیه، ساخت DNA[3] در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و تکمیل ساخت DNA در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه بود. مراحل دو تا چهار در ۳۵ چرخه تکرار شد.

بررسی‌های فعالیت هسته یخ جدایه‌ها

به منظور بررسی توان فعالیت هسته یخ جدایه‌های جداشده از گیاه نیشکر، روش‌های زیر انجام گرفت:

تعیین فعالیت هسته یخ به روش انجماد درون لوله

به منظور شناسایی اولیه‌ی باکتری‌های فعال هسته‌ی یخ از روش انجماد درون لوله استفاده شد (Fahy and Persley, 1983). جدایه‌ها پس از ۲۴ ساعت رشد روی محیط YPGA[4] در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد، در یک میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه به صورت سوسپانسیون درآمدند. جذب نوری سوسپانسیون باکتری‌ها در ۶۰۰ نانومتر برابر با ۰/۱ تنظیم شد. میکروتیوب‌ها درون حمام فوق سرد شده توسط مخلوط یخ و اتانول با دمای ثابت منفی هفت درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه به صورت شناور قرار داده شدند. میکروتیوب حاوی آب مقطر استریل و سوسپانسیون باکتری *Pseudomonas fluorescens*

1- Denaturation
2- Annealing
3- Extension
4- Yeast extract Peptone Glucose Agar

جدول ۱ – جفت آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش

Table 1- Primer pairs used in this study

Prime name	5´- 3´ sequence	Annealing Temperature	Size of amplicon	Target species/region	Reference
3076f 3463r	AGYTCGCTGATTGCGGGNC STGTAVCKTTTNCCGTCCCA	53 °C	421bp	Ina	Hill et al., 2014
3308f 3463r	GGCGATMGVAGCAAACTSAC STGTAVCKTTTNCCGTCCCA	53 °C	192bp	Ina	Hill et al., 2014

تهیه شده از بخش گیاه‌پزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز به ترتیب به عنوان شاهد منفی و مثبت در نظر گرفته شد.

آزمون هسته یخ در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد

این روش برای نماینده‌های جدایه‌هایی که ژن مولد هسته یخ در آن‌ها ردیابی شد، انجام گردید. در این روش توانایی تولید هسته یخ در فریزر با دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. برای ایجاد کم‌ترین تماس قطرات مورد آزمایش وگلوله ماندن آن‌ها روی سطح کار آزمایش از لایه داخلی پارافیلم در فضای زیر هود استریل آزمایشگاه که فاقد هر گونه آلودگی بود، استفاده شد. روی لایه پارافیلم به وسیله سمپلر استریل از سوسپانسیون هر جدایه‌ی باکتریایی ۱۰ قطره، ۱۰ میکرولیتری قرار گرفت. سینی حاوی قطرات با احتیاط و با در نظر گرفتن زمان توسط زمان‌سنج در یخچال فریزر با دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. هر ۳۰ ثانیه یک‌بار نمونه‌ها مشاهده و بررسی شدند، این کار تا پانزده دقیقه ادامه یافت و مشاهدات ثبت گردید. آزمون مذکور دوبار تکرار شد.

آزمون هسته یخ روی برگ‌های بریده نیشکر

در این روش، میزان توانایی ایجاد یخ زدگی در برگ‌های بریده‌ی نیشکر درون یک انکوباتور دارای کنترل دمایی مشخص ارزیابی گردید. برای انجام این آزمون از جدایه‌هایی استفاده شد که در دو آزمون قبلی نتایج مثبت داشتند. برای این منظور از پنج رقم تجاری CP69 -1062، CP57-614، CP48-103، CP73-21 و SP70-1143 موجود در گلخانه‌های حفاظت شده مؤسسه تحقیقات و آموزش نیشکر استفاده گردید و برگ‌های جوان و شاداب نیشکر مورد انتخاب و نمونه برداری قرار گرفتند. در این روش نیز به مانند روش قبل، از آب مقطر دیونیزه و همچنین باکتری *P. fluorescens* تهیه شده از بخش گیاه‌پزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز به ترتیب به عنوان شاهد منفی و مثبت، استفاده گردید. پس از انتقال سریع نمونه‌ها به آزمایشگاه، از استرین‌های باکتریایی که از ۴۸ ساعت قبل روی محیط کشت YPGA در دمای۲۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شده بودند، سوسپانسیون در آب مقطر دیونیزه تهیه شد. جذب نوری سوسپانسیون باکتری‌ها در ۶۰۰ نانومتر برابر با غلظت ۰/۱ تنظیم شد. قطعات ۳۰ تا۴۰ سانتی‌متری از سالم‌ترین قسمت گیاه انتخاب و هر دو انتهای برگ‌ها توسط پارافین جامد (حرارت داده شده برای ایجاد حالت مایع) مسدود و عایق گردیدند. برای هر استرین شش برگ از هر رقم در نظر گرفته شد. سوسپانسیون باکتری‌ها در سه تکرار (هر یک ساعت یک‌بار) روی برگ‌ها اسپری گردید و برای مدت ۲۴ ساعت برگ‌ها درون پلاستیک قرار گرفتند؛ جهت حفظ رطوبت، درون هر پلاستیک یک پنبه مرطوب تعبیه شد (پنبه طوری گذاشته شد که برای جلوگیری از ایجاد آلودگی، کم‌ترین تماس

را با برگ‌ها داشته باشد). پس از گذشت ۲۴ ساعت، نمونه‌ها به انکوباتور منفی سه درجه سانتی‌گراد برای مدت دو ساعت منتقل شدند (Ketabchi et al., 2004). نمونه‌ها ۲۴ ساعت پس از خارج شدن از انکوباتور، جهت ثبت نتایج بررسی شدند و نتایج حاصل ثبت گردید. آزمون مذکور سه بار تکرار شد.

آزمون هسته یخ روی گیاه نیشکر در شرایط گلخانه

این آزمایش با هدف انجام آزمون هسته یخ در شرایط گلخانه انجام شد. برای این منظور از پنج رقم مورد استفاده در روش فوق‌الذکر موجود در گلخانه‌های حفاظت شده مؤسسه تحقیقات و آموزش نیشکر، بوته های جوان و شاداب نیشکر انتخاب گردید. از استرین‌های *B. fungorum* (به عنوان قوی‌ترین استرین مولد هسته یخ جدا شده)، *M. proteolyticom* (به عنوان ضعیف‌ترین استرین مولد هسته یخ جدا شده)، باکتری *P. fluorescens* (به عنوان شاهد مثبت) و آب دیونیزه (به عنوان شاهد منفی) استفاده شد. برای هر رقم ۱۲ گیاه (سه گلدان و در هر گلدان چهار گیاه) مورد استفاده قرار گرفت؛ گیاهان مذکور با سوسپانسیون استرین‌های مذکور به روش اسپری مایه‌زنی شدند. گلدان‌ها در شرایط گلخانه، در دمای ۲۵–۲۲ درجه سانتی‌گراد و نور طبیعی ۱۴ ساعته نگهداری شدند. بعد از گذشت ۲۴ساعت، گیاهچه‌ها به سردخانه منتقل شدند، در سردخانه دما به تدریج پایین آمد و به منفی سه درجه سانتی‌گراد رسید، به مدت دو ساعت گیاهچه‌ها در دمای مذکور قرار گرفتند، بعد از این مدت دما دوباره بالا آمد و روی دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ثابت ماند. بعد از گذشت چند روز علائم کلروز نواری، سوختگی حاشیه برگ، سبزخشک شدن و در نهایت قهوه‌ای شدن پدیدار و ثبت گردیدند. آزمون مذکور دو بار تکرار شد.

تجزیه و تحلیل آماری

مقایسه بین متغییرها با آزمون آنالیز واریانس و مقایسه بین گروه‌ها با آزمون تحلیل پردازش یک سویه یا آزمون مقایسه چندگانه دانکن با سطح احتمال یک درصد براساس نرم‌افزار آماری SPSS انجام شد (SPSS Inc., 2008).

نتایج

ردیابی ژن‌های هسته یخ

این آزمون روی ۶۷ استرین انجام شد. جفت آغازگر اختصاصی 3076f/3463r، یک قطعه ۴۲۱ جفت بازی در ۲۵ استرین (شکل ۱) و جفت آغازگر 3308f/3463r، یک قطعه ۱۹۲ جفت بازی در ۳۳ استرین (شکل ۲) به صورت اختصاصی تکثیر نمودند. در ۱۹ استرین هر دو آغازگر توانستند قطعات مورد نظر را تکثیر کنند (جدول ۲)، اما در ۲۸ استرین، هیچ کدام از آغازگرها موفق به ردیابی ژن مورد نظر نشدند.

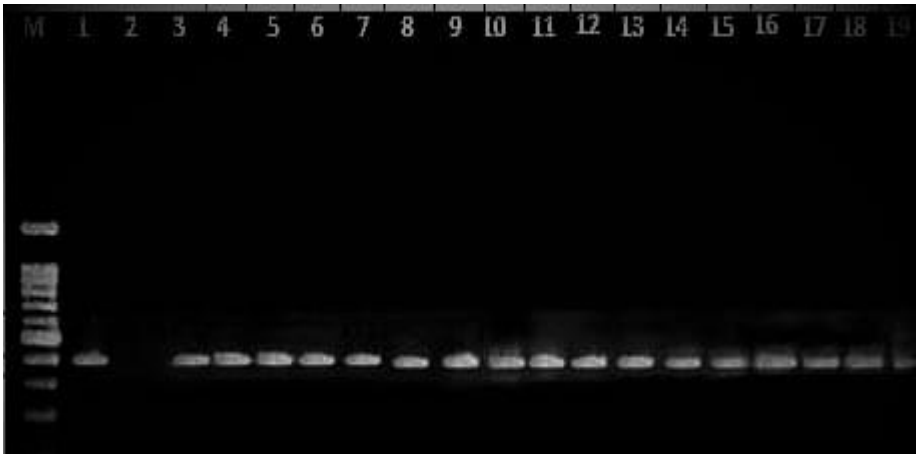
بررسی‌های فعالیت هسته یخ جدایه‌ها

تعیین فعالیت هسته یخ به روش انجماد درون لوله

برای انجام این آزمون، از بین ۶۷ جدایه که توسط آزمون مولکولی، توالی‌یابی شدند، ۱۲ جدایه با روش انجماد در لوله نتیجه مثبت دادند و نسبت به آب مقطر دیونیزه زودتر یخ زدند (جدول ۲).

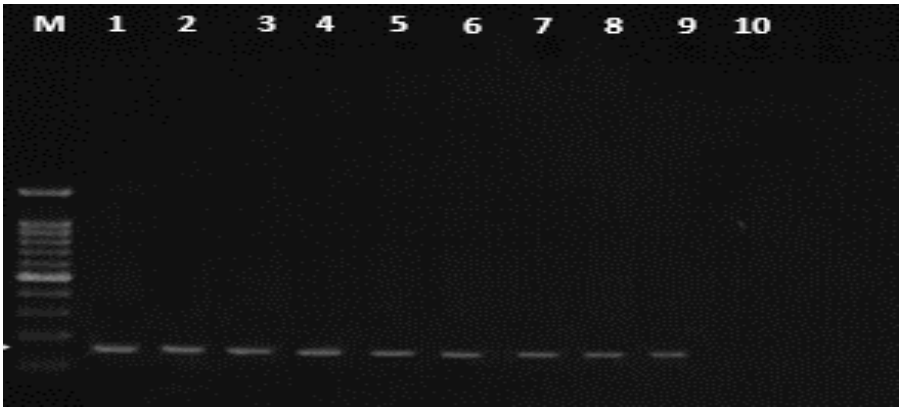
آزمون هسته یخ در دمای منفی بیست درجه سانتی‌گراد (انجماد قطره)

در بررسی توان و سرعت تشکیل هسته یخ روی ورقه‌های پارافیلم در دمای منفی بیست درجه سانتی‌گراد در طول مدت زمان ۶۰ ثانیه درجدایه‌های *B. fungorum*، *O. ciceri*، *M. foliorum*، *B. contaminans*، *M. proteolyticom*، تغییری مشاهده نشد. در بازه‌ی زمانی ۶۰ تا ۹۰ ثانیه باز هم هیچ کدام از قطره‌های مربوط به جدایه‌های *O. ciceri*،



شکل ۱- نقوش الکتروفورزی محصول PCR با استفاده از جفت آغازگر3076f/3463r، جهت ردیابی ژن مولد هسته یخ در استرین‌های جدا شده از گیاه نیشکر. M: نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، ۱: شاهد مثبت (*Pseudomonas fluorescens*)، ۲: شاهد منفی (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* UTMC00162)، ۳-۸: *Burkholderia fungorum*، ۹: *Burkholderia contaminant*، ۱۰: *Ralstonia solanacearum*، ۱۱-۱۲: *Mesorhizobium huakuii*، ۱۳: *Ochrobactrum ciceri*، ۱۴-۱۶: *Ralstonia solanacearum*، ۱۷-۱۸: *Microbacterium foliorum* و ۱۹: *Xanthomonas campestris*.

Fig 1. Agarose gel of PCR products obtained with the primers 3076f/3463r, to detect the ice nucleating gene in strains isolated from sugarcane. Well No. M: Thermo Scientific GeneRuler (Schwerte, Germany) 1-k DNA ladder (#SM0311), 1: positive control (*Pseudomonas syringae*), 2: negative control (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* UTMC00162), 3-8: *Burkholderia fungorum*, 9: *Burkholderia contaminant*, 10: *Ralstonia solanacearum*, 11-12: *Mesorhizobium huakuii*, 13: *Ochrobactrum ciceri*, 14-16: *Ralstonia solanacearum*, 17-18: *Microbacterium foliorum* and 19: *Xanthomonas campestris*.



شکل ۲- نقوش الکتروفورزی محصول PCR با استفاده از جفت آغازگر3308f/3463r ، جهت ردیابی ژن مولد هسته یخ در استرین‌های جدا شده از گیاه نیشکر. M: نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، ۱: شاهد مثبت (*Pseudomonas fluorescens*)، ۲: *Burkholderia gladioli*، ۳-٤: *Burkholderia fungorum*، ٥: *Mesorhizobium huakuii*، ٦: *Ochrobactrum ciceri*، ۷-۸: *Ralstonia solanacearum*، ۹: *Xanthomonas campestris* و ۱۰:شاهد منفی (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* UTMC00162).

Fig 2. Agarose gel of PCR products obtained with the primers 3076f/3463r, to detect the ice nucleating gene in strains isolated from sugarcane. Well No. M: Thermo Scientific GeneRuler (Schwerte, Germany) 1-kb DNA ladder (#SM0311), 1: positive control (*Pseudomonas syringae*), 2: *Burkholderia gladioli*, 3– 4: *Burkholderia fungorum*, 5: *Mesorhizobium huakuii*, 6: *Ochrobactrum ciceri*, 7- 8: *Ralstonia solanacearum*, 9: *Xanthomonas campestris*, 10: negative control (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* UTMC00162).

جدول ۲- مشخصات استرین های باکتریایی که هر دو ژن مولد هسته یخ در آن ها ردیابی شد، همچنین نتیجه آزمون انجماد درون لوله روی این استرین‌ها

Table 2. Characteristics of the bacterial strains in which both Ice-nocleation genes were detected, as well as the result of freezing test in the tubes on these strains

Characteristics of isolates		Accession no.	Type of bacteria	Separated source	Freezing test in the tube
Hit in NCBI database	Strain				
Burkholderia gladioli	SC107	MH256555	Epi[1]	Leaf	+
Burkholderia fungorum	SC111	MH256497	Endo[2]	Leaf	-
B. fungorum	SC112	MH256498	Endo	Leaf	+
B. fungorum	SC113	MH256499	Endo	Leaf	-
B. fungorum	SC115	MH256501	Endo	Leaf	+
B. fungorum	SC117	MH256503	Endo	Leaf	-
B. fungorum	SC123	MH256509	Endo	Sheath	-
B. fungorum	SC128	MH256514	Endo	Leaf	-
Burkholderia contaminans	SC138	MH256524	Endo	Sheath	+
Mesorhizobium huakuii	SC139	MH256525	Epi	Leaf	+
M. huakuii	SC140	MH256526	Endo	Leaf	-
Microbacterium proteolyticum	SC151	MH256537	Endo	Leaf	+
M. foliorum	SC153	MH256539	Endo	Leaf	+
Ochrobactrum ciceri	SC144	MH256530	Endo	Sheath	+
Ralstonia solanacearum	SC136	MH256522	Endo	Leaf	+
R. solanacearum	SC157	MH256542	Endo	Leaf	+
R. solanacearum	SC158	MH256543	Endo	Leaf	-
R. solanacearum	SC162	MH256547	Endo	Leaf	-
R. pickettii	SC160	MH256545	Endo	sheath	+
Xanthomonas campestris	SC166	MH256552	Epi	Leaf	+

[1]Epiphytic bacteria
[2]Endophytic bacteria

M. foliorum و *M. proteolyticom* یخ نزدند. در زمان پنج دقیقه جدایه‌های *B. fungorum*، *R. solanacearum* و *R. pickettii* نسبت به شاهد مثبت تغییر زیادی نداشتند و نه قطره از ۱۰ قطره مربوط به آنها یخ زدند. در دقیقه پانزدهم تمام ۱۰ قطره‌ی مربوط به جدایه‌های *B. fungorum*، *B. gladioli*، *R. solanacearum* و *M. huakuii* یخ زدند، اما جدایه‌ی *M. proteolyticum* نسبت به آب دیونیزه اختلافی نداشت و حدود ۷۰ درصد قطره‌ها یخ نزدند (جدول ۳).

آزمون هسته یخ روی برگ های بریده‌شده

نتایج تجزیه آماری داده‌ها با آزمون دانکن در آزمایش هسته یخ روی ده استرین روی برگ‌های بریده شده نیشکر نشان داد که تمام استرین‌ها بر روی برگ‌های نیشکر با درصدهای مختلف، ایجاد سرمازدگی کردند و بین استرین‌ها در ایجاد سرمازدگی در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی داری وجود داشت (جداول ۴، ۵- الف و ۵- ب)، و جدایه‌ها از نظر ایجاد سرمازدگی در هفت گروه قرار گرفتند و بر اساس شکل شماره سه جدایه *B. fungorum* بعد از استرین شاهد مثبت *P. fluorescens* بیشترین درصد سرمازدگی را در ارقام تجاری نیشکر ایجاد نمود و استرین‌های *B. contaminans* و *M. proteolyticom* کمترین درصد سرمازدگی را در ارقام تجاری نیشکر موجب شدند. همچنین درصد سرمازدگی استرین‌ها در بین ارقام تجاری نیشکر نیز در سطح احتمال یک درصد معنی دار بوده بطوری‌که بیشترین درصد سرمازدگی در رقم CP69-1062 و کمترین آن در رقم CP73-21 اتفاق افتاده است (شکل ۳).

جدول ۳- رابطه زمان با میزان فعالیت هسته‌ی یخ استرین‌های باکتریایی جدا شده از گیاه نیشکر به روش انجماد قطره در منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد

Table 3- Relationship between time and ice nucleation activity of bacterial strains isolated from sugarcane by droplet freezing test at -20°C

Time (min.)	Strain name													
	P.f	*B.f*	*B.f*	*B.g*	*R.s*	*R.s*	*X.c*	*O.c*	*M.f*	*B.c*	*M.h*	*R.p*	*M.p*	DW
1	4	0	1	1	3	0	2	0	0	0	2	3	0	0
1.5	8	5	4	2	6	3	2	0	0	2	2	4	0	0
2	10	5	6	2	6	5	2	2	3	6	2	5	0	0
3	10	8	9	3	9	6	3	3	3	6	4	7	1	0
5	10	9	10	4	9	6	5	5	4	7	7	8	2	0
10	10	10	10	8	10	7	6	6	4	9	8	8	3	2
15	10	10	10	10	10	9	8	6	5	9	10	9	3	3

Numbers 0-10: Indicates the number of frozen droplets in 15 minutes
P.f=Pseudomonas fluorescens, B.f=Bulkholderia fungorum, B.g=Bulkholderia gladioli, R.s=Ralstonia solanacearum, X.c=Xanthomonas campestris, O.c=Ochrobactrum ciceri, M.f=Microbacterium foliorum, B.c=Bulkholderia contaminans, M.h=Mesorhizobium huakuii, R.pi=Ralstonia pickettii, M.p=Microbacterium proteolyticom, DW=Distilled Water

جدول ٤- تجزیه واریانس برهمکنش استرین‌های باکتریایی و ارقام تجاری نیشکر بر درصد سرمازدگی برگ

Table 4. Analysis of variance of interaction of bacterial strains and sugarcane commercial cultivars on leaf frost percentage

Source of variation	df	Squares of means-Percentage of frost
Strain	11	6072.16**
Cultivar of sugarcane	4	21058.6*
Strain* Cultivar of sugarcane	44	235.39**
Error	120	37.04
Coefficient of variations	-	14.01

* and ** have a significant at P<0.05 and P<0.01, respectively.

جدول ٥- الف- مقایسه میانگین‌های برهمکنش استرین‌های باکتریایی بر درصد سرمازدگی برگ با استفاده از آزمون دانکن

Table 5- A. Comparison of means in interaction of bacterial strains on leaf frost percentage by Duncan's test

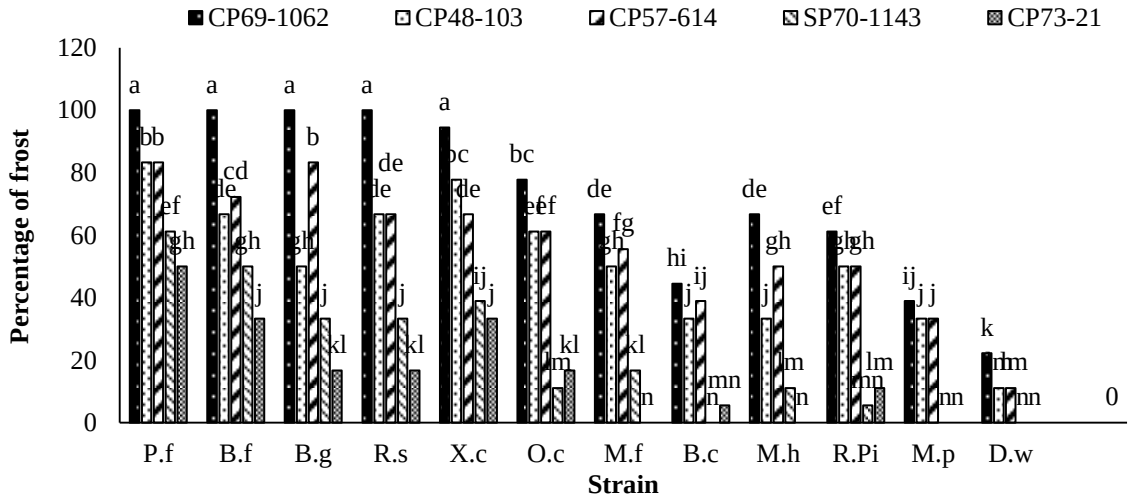
Bacterial strains	Percentage of frost
P.f	75.56a
B.f	64.45b
B.g	56.67c
R.s	56.67c
X.c	62.22bc
O.c	45.56d
M.f	37.78e
B.c	24.44f
M.h	32.22e
R.pi	35.56e
M.p	21.11f
D.w	8.89g

جدول ۵- ب- مقایسه میانگین‌های برهمکنش ارقام تجاری نیشکر بر درصد سرمازدگی برگ با استفاده از آزمون دانکن

Table 5- B. Comparison of means in interaction of sugarcane commercial cultivars on leaf frost percentage by Duncan's test

Cultivar of sugarcane	Percentage of frost
CP57-614	56.019b
CP69-1062	72.686a
CP48-103	51.389c
CP73-21	15.278e
SP70-1143	21.759d

Treatments having at least one similar letter do not show a significant difference at P<0.01



*Means followed by same letters are not statistically different

شکل ۳- برهمکنش استرین های باکتریایی و ارقام تجاری نیشکر بر درصد سرمازدگی برگ

Fig 3. Interaction of bacterial strains and sugarcane commercial cultivars on leaf frost percentage. **P.f**=*Pseudomonas fluorescens*, **B.f**=*Bulkholderia fungorum*, **B.g**=*Bulkholderia gladioli*, **R.s**=*Ralstonia solanacearum*, **X.c**=*Xanthomonas campestris*, **O.c**= *Ochrobactrum ciceri*, **M.f**=*Microbacterium foliorum*, **B.c**=*Bulkholderia contaminans*, **M.h**=*Mesorhizobium huakuii*, **R.pi**=*Ralstonia pickettii*, **M.p**=*Microbacterium proteolyticom*, **DW**= Distilled Water.

آزمون هسته یخ روی گیاه نیشکر در شرایط گلخانه

بر اساس نتایج تجزیه آماری داده‌ها با آزمون دانکن در آزمون هسته یخ دو استرین قوی (*B. fungorum*) و ضعیف (*M. proteolyticom*) روی گیاه نیشکر در کنار شاهد مثبت (*P. fluorescens*) و شاهد منفی (Distillesd Water) نشان داد که بین دو استرین ضعیف و قوی در ایجاد سرمازدگی اختلاف معنی دار وجود داشت (جداول ۶، ۷- الف و ۷- ب). همچنین درصد سرمازدگی استرین‌های قوی و ضعیف در بین ارقام تجاری نیشکر نیز در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود بطوری‌که بیشترین درصد سرمازدگی در ارقام CP69-1062، CP57-614، CP48-103 و کم‌ترین آن در ارقامCP73-21, SP70-1143 صورت گرفت. نتایج حاصل از این آزمون نشان داد که استرین *B. fungorum* همانند باکتری *P. fluorescens* (به عنوان شاهد مثبت) موجب سرمازدگی صد در صد بوته‌ها در ارقام تجاری CP69-1062 و CP57-614، ۷۵ درصد در رقم تجاری CP48-103، ۵۰ درصد در رقم تجاری SP70-1143 و ۴۰ درصد بوته‌ها در رقم تجاری CP73-21 گردید. درحالی که استرین *M. proteolyticom* در رقم تجاری CP69-1062 باعث سرمازدگی ۲۸ درصد بوته‌ها، در رقم CP57-614

۱۹درصد، در رقم تجاری CP48-103 ۱۶/۷ درصد و در رقم تجاری SP70-1143 ۱۶درصد بوته‌ها گردید و در رقم تجاری CP73-21 قادر به ایجاد سرما در هیچ بوته‌ای نبود. نتایج حاصل از این تحقیقات نشان داد که باکتری‌های مولد هسته یخ، تأثیر بسیار شگرفی در ایجاد و تشدید هسته‌ی یخ و سرمازدگی دارند. در بین پنج رقم مورد مطالعه، رقم CP69-1062 از همه ارقام حساس‌تر و بعد از آن ارقام CP57-614 و CP48-103 به ترتیب درجه حساسیت، بعد از CP69-1062 قرار گرفت. رقم CP73-21 مقاوم‌ترین رقم بوده و CP57-614 آثار سرمازدگی را به ندرت از خود نشان داد. رقم SP70-1143 نیز عملکردی مشابه رقم CP73-21 داشته ولی درجه مقاومت آن کم‌تر از رقم مذکور بود. در بین استرین‌ها، واکنش استرین *B. fungorum* (که در آزمون‌های مولکولی، ژن مولد هسته یخ در آن ردیابی شده بود)، نتیجه‌ی حاصل از آزمون‌های مولکولی را تأیید کرد، یعنی این‌که این استرین توانست روی همه ارقام با درجه حساسیت متفاوت، علائم سرمازدگی را ایجاد نماید. در آزمون‌های مولکولی مربوط به استرین *M. proteolyticom*، آغازگرهای تکثیرکننده ژن هسته یخ نتوانستند قطعات مربوطه را تکثیر کنند. نتایج حاصل از این آزمون نیز نتیجه آزمون مولکولی را تأیید کرد، به نحوی که استرین مربوطه کم‌ترین میزان علائم را روی ارقام مختلف ایجاد کرد و روی رقم CP73-21 هیچ علائمی نشان نداد (شکل ۴).

جدول ٦- تجزیه واریانس میزان سرمازدگی دو استرین ضعیف (*Microbacterium proteolyticom*) و قوی (*Bulkholderia fungorum*) بر روی ٥ رقم تجاری نیشکر در شرایط گلخانه

Table 6. Analysis of variance in frost rate of weak (*Microbacterium proteolyticom*) and strong (*Bulkholderia fungorum*) strains on five commercial sugarcane cultivars under greenhouse conditions

Source of variation	df	Squares of means-Percentage of frost
Strain	3	12108.04**
Cultivar of sugarcane	4	5759.22**
Strain* Cultivar of sugarcane	12	533.96**
Error	40	137.71
Coefficient of variations	-	30.6

* and ** have a significant at P<0.05 and P<0.01, respectively.

جدول ۷- الف- مقایسه میانگین‌های برهمکنش استرین‌های باکتریایی بر درصد سرمازدگی ارقام نیشکر با استفاده از آزمون دانکن

Table 7. Comparison of means of interaction of bacterial strains on sugarcane cultivars frost percentage by Duncan's test

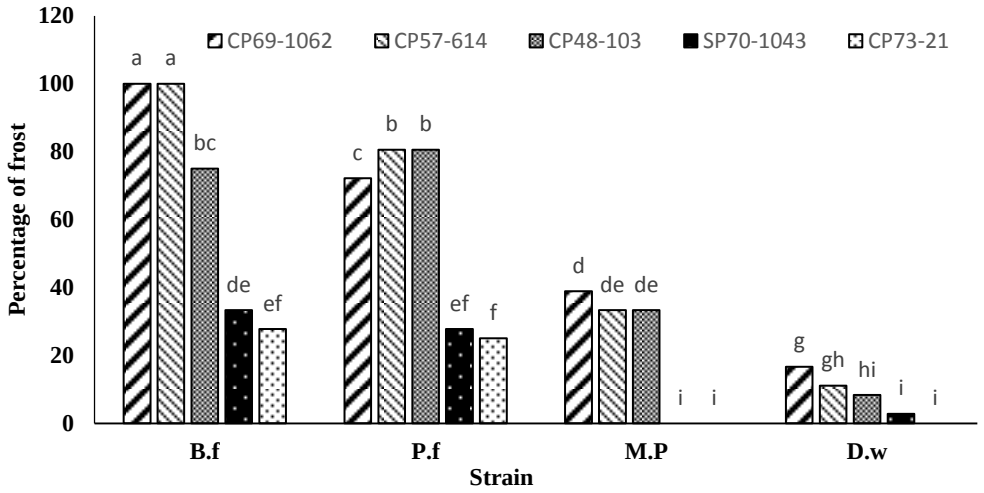
Bacterial strains	Percentage of frost
P.f	75.56a
B.f	64.45b
B.g	56.67c
R.s	56.67c
X.c	62.22bc
O.c	45.56d
M.f	37.78e
B.c	24.44f
M.h	32.22e
R.pi	35.56e
M.p	21.11f
D.w	8.89g

جدول ۷- ب- مقایسه میانگین‌های برهمکنش ارقام تجاری نیشکر بر درصد سرمازدگی ارقام نیشکر با استفاده از آزمون دانکن

Table 7- B. Comparison of means of interaction of sugarcane commercial cultivars on sugarcane cultivars frost percentage by Duncan's test

Cultivar of sugarcane	Percentage of frost
CP57-614	56.019b
CP69-1062	72.686a
CP48-103	51.389c
CP73-21	15.278e
SP70-1143	21.759d

Treatments having at least one similar letter do not show a significant difference at P<0.01.



*Means followed by same letters are not statistically different

شکل ٤- میزان سرمازدگی دو استرین ضعیف (*Microbacterium proteolyticom*) و قوی (*Bulkholderia fungorum*) بر روی ٥ رقم تجاری نیشکر در شرایط گلخانه

Fig 4. Frost rate of two weak (*Microbacterium proteolyticom*) and strong (*Bulkholderia fungorum*) strains on five commercial sugarcane cultivars under greenhouse condition. P.f=*Pseudomonas fluorescens*, **B.f**=*Bulkholderia fungorum*, **M.f**=*Microbacterium foliorum*, , **DW**=Distilled Water.

بحث

بررسی وجود یا عدم وجود ژن‌های مولد هسته یخ در استرین‌های باکتریایی با هر دو جفت آغازگرهای (3308f/3463r و 3076f/3463r) انجام پذیرفت. در سال ۲۰۱۴ با استفاده از همین آغازگرها باکتری *X. campestris* و ۱۹ گونه باکتریایی دیگر که دارای ژن های مولد هسته یخ و توانایی تولید هسته یخ بودند از نمونه‌های گیاهی جداسازی، شناسایی و معرفی شدند (Hill et al., 2014). از جنس *Xanthomonas* گونه‌ی *X. campestris* به عنوان یک گونه دارای توانایی تولید هسته یخ گزارش شد (Maki et al., 1974). همچنین در بررسی جمعیت باکتری‌های اپی‌فیت بادام در استان فارس، *Xanthomonas* spp. را در کنار باکتری‌هایی چون *P. fluorescens* و *P. syringae* به عنوان باکتری دارای فعالیت هسته یخ معرفی کردند (Ketabchi et al., 2004).

تحقیق حاضر، فعالیت هسته یخ در استرین‌های *X. campestris* را تأیید می‌کند. استرین‌های *P. syringae* نسبت به سایر باکتری‌ها، قارچ‌ها و دانه‌های گرده، بهتر می‌توانند به عنوان مولد هسته‌ی یخ عمل کنند (Murray et al., 2012). همه‌ی استرین‌های *P. syringae* ژن مولد هسته‌ی یخ را درخود ندارند (Lindow, 1983). و علاوه بر آن شرایط محیطی طبیعی نیز در بیان این ژن‌ها مؤثر هستند (Nemecek-Marshall et al., 1993). دمای پایین و همچنین کمبود مواد غذایی می‌تواند باعث القای بیان ژن‌های مذکور شود (Nemecek-Marshall et al., 1993). به همین دلیل، در مناطق با شرایط آب‌وهوایی گرم استرین‌های این باکتری نمی‌توانند به عنوان باکتری‌های مولد هسته یخ عمل کنند (Pietsch et al., 2017). از آنجایی که این گونه از باکتری از میزبان نیشکر در استان خوزستان، بدلیل شرایط آب و هوایی، جداسازی نشد، نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج سایر پژوهشگران مطابقت دارد.

در این پژوهش، استرین‌های *B. gladioli*، *B. fungorum*، *B. cantaminans*، *M. huakuii*، *O. ciceri*، *M. proteolyticum*، *M. foliorum*، *R. solanacearum*، *R. picketii* شدت‌های مختلفی از علائم سرمازدگی را از خود نشان دادند و ژن‌های مولد هسته‌ی یخ توسط آغازگرهای مورد استفاده دراین استرین‌ها ردیابی گردید. نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج سایر محققین در این زمینه در تضاد است (Waturangi and Tjhen, 2009). از علل احتمالی این تفاوت، تفاوت در گونه‌های گیاهی رایج منطقه، شرایط آب و هوایی (دما و رطوبت) است (Ketabchi et al., 2004).

آزمون‌های بررسی فعالیت هسته یخ جدایه‌ها در آزمایشگاه در بیشتر مواقع نتایج حاصل از آزمون مولکولی ردیابی ژن هسته یخ را تائید کردند؛ بدین معنی که در استرین‌هایی که جفت آغازگرهای مذکور ژن مولد هسته یخ را ردیابی کردند فعالیت هسته یخ شدیدی را در آزمایشگاه از خود نشان دادند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که این آغازگرها از حساسیت بالایی برخوردار بوده و قادر به ردیابی جدایه‌های مولد هسته یخ هستند. این نتایج با نتایج حاصل از تحقیق Hill et al. (2014) مشابه است.

همچنین نتایج تحقیق حاضر نشان داد که از پنج رقم تجاری CP69-1062، SP70-1143، CP48-103، CP73-21 و CP57-614 که در حال حاضر در تمام کشت و صنعت‌ها، کشت می‌شوند، رقم CP69-1062 در دو آزمون "بررسی فعالیت هسته یخ روی برگ‌ها بریده" و "آزمون هسته یخ روی گیاه نیشکر در شرایط گلخانه" بیش‌ترین حساسیت را داشت و بیش‌ترین خسارت حاصل از سرمازدگی را این رقم متحمل شد. بعد از آن ارقام CP57-614 و CP48-103 با اختلاف کمتری از رقم فوق الذکر، علائم سرمازدگی را از خود نشان دادند. در مقابل دو رقم CP73-21 و SP70-1143 درجه بالایی از مقاومت را در برابر سرمازدگی از خود نشان دادند و علائم بسیار کمی از سرمازدگی را داشتند و این موضوع تأییدی بر مقاومت این ارقام نسبت به مشکل سرمازدگی است. با توجه به تنوع بالای باکتری‌های مولدهسته‌ی یخ و همچنین وجود ارقام حساس نسبت به این باکتری‌ها، این نتایج می‌توانند اطلاعات خوبی برای تولیدکنندگان و تشویق آن‌ها به استفاده از ارقام مقاوم فراهم کنند.

سپاس‌گزاری

بدین وسیله از مساعدت و همکاری مؤسسه تحقیقات و آموزش نیشکر و صنایع جانبی سپاس‌گزاری می‌گردد.

REFERENCES

Dashtakian, K. 2007. Investigation of the degree and severity of frost in important climatic and horticultural crops in different climatic regions of Yazd province. Agricultural Jihad Organization of Yazd Province. pp: 2-8.

Fahy, P.C., and Persley, G.J. 1983. Plant bacterial diseases: A diagnostic guide. Academic Press, Australia. P. 393.

Ghotb, A. 1963. Factors affecting sugarcane development and its problems in Khuzestan. University of Tehran Press. P. 107.

Gross, D.C., Probesting, E.L. Jr., and Andrews, P.K. 1984. The effects of ice nucleation active bacteria on the temperatures of ice nucleation and low temperature susceptibilities of prunus flower buds at various stages of development. Journal of the American Society for Horticultural Science. 109: 375-380.

Hill, T.C.J., Moffett, B.F., DeMott. P.J., Georgakopoulos, D.G., Stump W.L., and Franc G.D. 2014. Measurement of ice nucleation active bacteria on plants and in precipitation by quantative PCR. Applied and Environmental Microbiology, 80: 1256-1267.

Jukes, T.H., and Cantor, C.R. 1969. Evolution of protein molecules. In: Munro, H.N. (Ed.). Mammalian protein metabolism. Academic Press, New York, pp: 21-132.

Kaneda, T. 1986. Seasonal population changes and characterization of ice-nucleating bacteria in farm fields of central Alberta. Applied and Environmental Microbiology, 52: 173-178.

Kawahara, H. 2017. Cryoprotectants and ice-binding proteins. In: Margesin, R. (Ed.). Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology. Springer, Berlin, Heidelberg, pp: 237-257.

Ketabchi, S., Hassanzadeh, N., Mohammadi, M., Alizadeh Aliabadi, A., and Saadat, Y.A. 2004. Identification and investigation of bacteria producing ice nucleation in almond trees in Zarghan Fars province. Ph.D. Thesis, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran. P. 219.

Lagriffoul, A., Boudenne, J.L., Absi, R., Ballet, J.J., Berjeaud, J.M., Chevalier, S., Creppy, E.E., Gilli, E., Gadonna, J.P., Gadonna-Widehem, P., and Morris, C.E. 2010. Bacterial-based additives for the production of artificial snow: What are the risks to human health? Science of the Total Environment, 408(7): 1659-1666.

Lindow, S. 1983. The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants. Annual Review of Phytopathology, 21: 363–384.

Maki, L.R., Galyon, E.L., Chang, C.M., and Galdwell, D.R. 1974. Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae*. Applied Microbioly, 3: 456-459.

Mirshekari, B. 2001. Sugarcane farming. Tabriz Islamic Azad University Press. P. 486.

Moazzen Rezamahalleh, H., Khodakaramian, G., and Hassanzadeh, N. 2019. Diversity of endophytic and epiphytic bacteria from sugarcane in Khuzestan, Iran. Brazilian Archives of Biology and Technology, 62. e19180407.

Murray, B.J., O'sullivan, D., Atkinson, J.D., and Webb, M.E. 2012. Ice nucleation by particles immersed in supercooled cloud droplets. Chemical Society Reviews, 41(19): 6519-6554.

Nemecek-Marshall, M., Laduca, R., and Fall, R. 1993. High-level expression of ice nuclei in a *Pseudomonas syringae* strain is induced by nutrient limitation and low temperature. Journal of Bacteriology, 175(13): 4062-4070.

Pietsch, R.B., Vinatzer, B.A., and Schmale III, D.G. 2017. Diversity and abundance of ice nucleating strains of *Pseudomonas syringae* in a freshwater lake in Virginia, USA. Frontiers in Microbiology, 8: 318.

Rahdar, M.R. 2004. Sugarcane. Shahid Chamran University Press. P. 626.

Single, W.V., and Olien, C.R. 1967. Freezing processes in wheat stems. International Journal of Biological Sciences, 20: 1025-1028.

SPSS Inc., 2008. SPSS statistics for Windows, version 17.0. Chicago. USA.

Waturangi, D.E., and Tjhen, A. 2009. Isolation, characterization, and genetic diversity of ice nucleation active bacteria on various plants. HAYATI Journal of Biosciences, 16(2): 54-58.

© 2019 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 42(4), Winter, 2020

Evaluation of ice nucleation ability of bacteria isolated from commercial sugarcane genotypes

H. Moazzen Rezamahalleh[1], GH. Khodakaramian[2], N. Hassanzadeh[3*] and H. Rajabi Memari[4]

1. Department of Plant Protection, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Professor, Department of Plant Protection, Bu–Ali Sina University, Hamedan, Iran
3. ***Corresponding Author:** Department of Plant Protection, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (hasanzadehr@yahoo.com)
4. Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

(DOI): 10.22055/ppr.2019.15317

Received: 12 October 2019 Accepted: 25 January 2020

Abstract

Background and Objectives

Khuzestan is the only province with sugarcane cultivation. One of the limiting factors in the production of this crop is the occurrence of frost damages in some years. Since no comprehensive research has yet been conducted on detection and evaluation of bacteria with the potential to form nuclear ice in frostbite, this study was carried out to evaluate this subject.

Materials and Methods

This study was carried out in the laboratory of Institute for Research and Training of Sugar and Auxiliary Industries. Endophytic and epiphytic strains of bacteria were isolated from sugarcane. To test the freezing potential of representative strains, four tests including, "determination of Ice nucleation activity by freezing in the tube", "freezing droplet test at -20 °C", "Ice nucleation test on sugarcane cut leaves in vitro" and "Ice nucleation test on sugarcane plant in greenhouse conditions" were performed. Also the genes of the nucleus were detected by 3076f / 3463r and 3308f / 3463r specific primers.

Results

Results show that bacteria species *B. gladioli, B. fungorum, B. cantaminans, M. huakuii, O. ciceri, M. proteolyticum, M. Foliorum, R. solanacearum , R. picketii* and *X. campestris* had different degrees of symptoms. In addition, the genes of the nucleus were detected by 3076f / 3463r and 3308f / 3463r specific primers. For all of above mentioned bacterial strains, specifically strain *X. campestris*, no references have been reported of ice nucleation activity. To assess susceptibility or resistance of sugarcane, cultivar CP69-1062 were the most susceptible and highly damaged in the tests including "Ice nucleation test on sugarcane cut leaves in vitro" and "Ice nucleation test on sugarcane plant in greenhouse conditions". In addition, CP57-614 and CP48-103 cultivars showed minimum variation in frosting in

compression to CP69-1062 cultivar. Two cultivars including CP73-21 and SP70-1143 exhibited a high degree of resistance to frostbite.

Discussion

Due to the high variation among Ice-Nucleating bacteria and the sensitivity of commercial cultivars, our finding can be a suitable option for producers and encourage them to use resistant cultivars in the field.

Keywords: Endophytic bacteria, Ice Nucleation-Activity, Burkholderia sp., freezing droplet