نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۰، شماره ۱، بهار ۱۳۹۵، ص. ۴۱-۳۱

Journal of Plant Protection
Vol. 30, No. 1, Spring 2016, P. 31-41

بررسی تنوع فنوتیپی استرین‌های عامل جرب معمولی سیب‌زمینی (*Streptomyces* sp.) در استان چهارمحال و بختیاری

علی اکبر فدایی تهرانی[1*]- عبداله جعفری[2]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۹/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۸/۰۹

چکیده

جرب معمولی یکی از بیماری های مهم در اکثر مزارع سیب زمینی محسوب می شود که توسط چندین گونه باکتری از جنس *Streptomyces* ایجاد می شود. از حدود ۵۰۰ نمونه غده و ریشه با علائم جرب معمولی سیب‌زمینی که طی سال‌های ۱۳۸۸ و ۱۳۸۹ از مناطق مختلف استان چهار محال و بختیاری جمع اوری شده بود ۵۵ جدایه باکتری بدست آمد که با آزمون‌های فنوتیپی اعضای جنس *Streptomyces* تشخیص داده شدند. نتایج آزمون‌های فنوتیپی و آنالیز عددی داده های حاصل از آنها، جدایه‌های مذکور را در شش گروه فنوتیپی متمایز کرد. جدایه‌های گروه اول به گونه‌های *S. stelliscabies* و *S. europaeiscabies* شبیه بود. جدایه‌های گروه دوم با کمترین تنوع، گونه *S. scabies* تشخیص داده شدند. جدایه‌های گروه سوم علیرغم واکنش متفاوت در تعدادی از آزمون‌ها، با گونه *S. acidiscabies* تشابه داشتند. جدایه‌های گروه چهارم نیز با وجود مشابهت به گونه‌های *S. turgidiscabies* و *S. aurofaciens* در تعدادی از آزمون‌ها متفاوت عمل کردند. جدایه‌های گروه پنجم کاملاً متنوع بوده و به هیچکدام از گونه‌های معمول و شناخته شده باکتری عامل جرب شباهت نداشتند. جدایه‌های گروه ششم به گونه *S. griseus* شباهت داشتند ولی در تعدادی از خصوصیات متفاوت عمل کردند. از ۵۵ جدایه بدست آمده، ۴۶ جدایه بر روی گیاهچه تربچه بیماری‌زا بودند. آزمون بیماری‌زایی ۲۶ جدایه انتخابی، ۲۲ جدایه قادر به ایجاد بیماری روی سیب‌زمینی در گلخانه بودند. بررسی نقوش الکتروفورز پروتئین‌های سلولی، از ۱۴ جدایه انتخابی ازگروه‌های مختلف فنوتیپی، آنها را در پنج گروه تفکیک کرد. جدایه‌های گروه‌های فنوتیپی اول، دوم و سوم، در بررسی نقوش الکتروفورزی نیز مشابه گروه‌بندی فنوتیپی عمل نموده و در سه گروه مجزا قرار گرفتند. اما جدایه‌های سایر گروه‌های فنوتیپی، در مواردی مشابه و در مواردی هم متفاوت عمل کردند.

واژه های کلیدی: الکتروفورز پروتئین، جرب معمولی سیب‌زمینی، خصوصیات فنوتیپی، *Streptomyces*

مقدمه

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) یکی از محصولات غذایی مهم جهان است که با تولید جهانی ۳۳۰ میلیون تن بعد از ذرت، گندم و برنج در مقام چهارم از نظر میزان تولید قرار دارد (۵). سطح زیر کشت این محصول در ایران حدود ۱۶۴ هزار هکتار و میزان تولید کل حدود ۴/۲ میلیون تن و مصرف سرانه آن در سال حدود ۵۲ کیلوگرم می‌باشد. استان‌های اردبیل، اصفهان، همدان، فارس، آذربایجان شرقی، خراسان و چهارمحال و بختیاری از مهمترین مناطق کشت این محصول می‌باشند. ارقام اگریا، مارفونا، بیشترین سطوح کشت سیب‌زمینی را در این استان دارا می‌باشند. سطح زیر کشت سیب‌زمینی در چهارمحال و بختیاری ۳۸۹۴ هکتار و تولید کل آن حدود ۱۳۰ هزار تن است. متوسط عملکرد محصول در استان حدود ۳۳ تن در هکتار است که پس از استان همدان (۳۶ تن در هکتار) در رتبه دوم کشور قرار دارد.

عوامل بیماری‌زای گیاهی از مهمترین عوامل کاهش کمی و کیفی تولید سیب‌زمینی به شمار می‌روند که خسارت باکتری‌ها با توجه به نوع خسارت وارده از اهمیت بیشتری برخوردار است. پژمردگی باکتریایی، پوسیدگی نرم، ساق سیاه و جرب معمولی از مهمترین بیماری‌های باکتریایی سیب‌زمینی محسوب می‌شوند (۱۲ و ۳۴).

اسکب یا جرب معمولی سیب زمینی با تأثیر بر خصوصیات کیفی محصول باعث کاهش ارزش اقتصادی و بازارپسندی آن می‌شود. علائم ناشی از گونه‌های *Streptomyces*، عمدتاً به اندام‌های زیرزمینی گیاه محدود می‌شود و در شرایط مناسب ممکن است در

۱ و ۲- دانشیار و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد
(*- نویسنده مسئول: (Email: ma_fadaei@yahoo.com

انبارها نیز تشدید شود. آلودگی سیستمیک در این بیماری تاکنون گزارش نشده است. این بیماری که توسط گونه‌های مختلف جنس *Streptomyces* ایجاد می‌گردد، تاکنون از آمریکا، آسیا و افریقا گزارش شده و علاوه بر سیب زمینی با اثر بر محصولاتی مانند تربچه، شلغم و سیب‌زمینی شیرین باعث کاهش قابل توجه ارزش اقتصادی آنها می‌گردد (۴۰).

یکی ازمسائل مهم در مدیریت بیماری اسکب معمولی متنوع بودن عامل ایجاد بیماری است که توسط گونه‌ها و سویه‌های مختلف جنس *Streptomyces* ایجاد می‌شود. مطالعات مختلف نشان داده است که شرایط محیطی همچون رطوبت، دما و اسیدیته خاک روی تنوع مذکور اثر می‌گذارد (۷) بعنوان مثال اکثر سویه‌های عامل ایجاد بیماری در خاک‌های با اسیدیته بیشتر از ۵/۲ توسعه می‌یابند ولی گونه *S. acidiscabies* در اسیدیته کمتر از ۴ نیز گسترش می‌یابد. به هم دلیل به نظر می‌رسد اولین گام در مدیریت این بیماری شناسایی و تعیین خصوصیات عامل بیماری باشد (۳۷)

برای طبقه‌بندی و تشخیص جدایه‌های مختلف *Streptomyces*، از روش‌های متعددی استفاده شده است که مبنای بیشتر آنها را خصوصیات مرفولوژیکی و بیوشیمیایی تشکیل می‌دهند (۱۹، ۲۳، ۳۲، ۳۶،۳۸ و ۴۰).

در ایران، اولین بار کریمی در سال ۱۳۴۸ جدایه‌هایی از *Streptomyces* را از اقلید فارس جدا کرد ولی کار بیشتری روی آنها انجام نداد. عینی و همکاران، ضمن بررسی خصوصیات فنوتیپی و دامنه میزبانی جدایه‌های *Streptomyces* عامل جرب معمولی در چند استان و تفکیک آنها به پنج گروه متمایز، گونه‌های *S. scabies* و *S. acidiscabies* را برای اولین بار از ایران گزارش کردند (۴). خداکرمیان و همکاران نیز براساس الگوی پروتئینی و اسیدهای چرب، جدایه‌های *Streptomyces* عامل جرب معمولی سیب‌زمینی را در سه گروه قرار دادند (۱۷). بررسی خصوصیات مرفولوژیکی، بیوشیمیایی، تغذیه‌ای و الگوی پروتئینی جدایه‌های *Streptomyces* عامل جرب سیب‌زمینی در استان فارس آنها را در ۶ گروه تفکیک کرد (۳۶). امتی و همکاران گونه‌های جنس *Streptomyces* عامل جرب در استان‌های سمنان، آذربایجان شرقی، اردبیل و کرمان را بر اساس خصوصیات مرفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیولوژیکی در نه گروه قرار دادند (۲۸). حسنی و تقوی نیز ضمن بررسی خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی و بیماری‌زایی جدایه‌های *Streptomyces* عامل بیماری جرب در استان‌های فارس و همدان، آنها را به پنج گروه تفکیک کردند (۱۰). ملکی و همکاران نیز تنها کنترل بیولوژیکی *Streptomyces scabies* را مورد بررسی قرار داده‌اند (۲۶).

با توجه به متنوع بودن عامل بیماری در نقاط مختلف ایران، و گسترش بیماری جرب معمولی، در اکثر نقاط سیب‌زمینی‌کاری استان چهارمحال و بختیاری که باعث کاهش کمی و کیفیت محصول شده است، شناسایی عوامل ایجاد بیماری مذکور در استان ضروری به نظر می‌رسید.

روش بررسی

الف: نمونه‌برداری و جداسازی

طی سال‌های ۱۳۸۷ و ۱۳۸۸، بر اساس اطلاعات دریافتی از سازمان جهاد کشاورزی استان درباره سطوح کشت و تاریخ‌های احتمالی برداشت، از مناطق مختلف سیب‌زمینی کاری شهرکرد، بروجن ، اردل، لردگان ، فارسان و کوهرنگ، در زمان برداشت مزارع از غده‌های سیب‌زمینی با علائم مختلف جرب و خاک مزارع با غده‌های بدون علائم و یا با علائم مشکوک و ضعیف به طور تصادفی نمونه‌برداری به عمل آمد و به آزمایشگاه منتقل شد (جدول ۱).

برای جداسازی عامل بیماری ابتدا غده‌های سیب‌زمینی با علائم جرب (برجسته، فرورفته و سطحی) پس از شستشو با آب، با وایتکس ۱۰٪ به مدت یک دقیقه ضدعفونی سطحی شدند. سپس قطعاتی از بافت آلوده (مرز قسمت سالم و بیمار) جدا و در هاون حاوی ۱۰ میلی لیتر آب مقطر سترون له گردید. سوسپانسیون حاصل روی محیط کشت حاوی مالت، عصاره مخمر و آنتی‌بیوتیک[1](۴ گرم عصاره ۱۰ گرم عصاره مالت، ۴ گرم دکستروز، ۲۰ گرم آگار، ۵۰ میلی‌گرم نیستاتین، ۵ میلی‌گرم پلی‌میکسین سولفات، ۱۰ میلی‌گرم سدیم پنی‌سیلین‌جی و ۵۰ میلی‌گرم سیکلوهگزامید، در لیتر) کشت گردید. تشتک‌ها در دمای ۲۵-۲۸°C نگهداری و پس از ۷ تا ۱۰ روز پرگنه‌های با ظاهر پودری یا منشعب انتخاب و برای تهیه کشت خالص، مجدداً بر روی محیط مالت و عصاره مخمر[2] کشت شدند (۳۱).

برای جداسازی از خاک، ابتدا ۱۰ گرم از نمونه‌های خاک خشک شده در مجاورت هوا، به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه گردید و برای ایجاد سوسپانسون یکنواخت ۱۰ دقیقه روی دستگاه لرزانک بهم‌زده شد. از سوسپانسیون حاصل رقت‌های مختلف تهیه و روی محیط کشت PPC-WA و NPPC–YMEA کشت و در دمای ۲۵–۲۸ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۷ تا ۱۰ روز نگهداری شدند. سپس پرگنه‌های با ظاهر پودری یا منشعب، انتخاب و برای تهیه کشت خالص، مجدداً روی محیط YMEA کشت گردیدند (۳۰).

برای نگهداری طولانی مدت جدایه‌های خالص شده جهت مطالعات بعدی، از کشت ۱۴ روزه آنها روی محیط کشت مورب مالت و عصاره مخمر، در دمای ۲۰°C- فریزر استفاده شد.

1- YMEA-NPPC
2- YMEA

آزمون بیماری‌زایی

ارزیابی توان ایجاد بیماری جدایه‌های بدست آمده روی تربچه و سیب‌زمینی به روش شاد و همکاران (۲۰۰۱) انجام شد:

تربچه-ابتدا بذرهای تربچه با وایتکس ۱۰٪ تجاری به مدت یک دقیقه ضدعفونی و به منظور جوانه‌زنی بر روی محیط آب آگار یک درصد سترون در دمای ۲۵°C قرار داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت، بذرهای جوانه‌زده با سوسپانسیونی از اسپور باکتری با غلظت 10^9 سلول در میلی‌لیتر [1] آغشته و به لوله‌های حاوی آب‌آگار یک درصد سترون منتقل گردیدند. بررسی علائم بیماری روی گیاهچه طی دو هفته بعد از مایه‌زنی صورت گرفت (۳۰).

سیب‌زمینی-برای تهیه مایه تلقیح، جدایه‌های مورد نظر در ارلن‌های حاوی ۱۰۰ گرم ورمیکولیت اشباع شده با محلول غذایی (۲۰ گرم سوکروز، ۱/۲ گرم ال-آسپاراژین، ۰/۶ گرم فسفات دی پتاسیم و ۱۰ گرم عصاره مخمر در لیتر آب) کشت داده و در دمای ۳۰°C به مدت دو هفته نگهداری شدند. غده‌های سیب‌زمینی (رقم آگریا) پس از شستشو با آب و ضدعفونی در محلول وایتکس ۱۵٪ تجاری به مدت ۱۰ دقیقه، با سوزن سترون زخمی گردیدند. ۵۰ گرم از زادمایه تهیه شده به هر گلدان پنج کیلویی اضافه و دو غده در عمق پنج سانتی متری آنها کشت گردید. کشت در گلدان‌های بدون زادمایه به عنوان شاهد در آزمون منظور شد. علائم بیماری بعد از حدود شش ماه مورد بررسی قرار گرفت (۱۴).

بررسی فنوتیپی جدایه‌ها

برای بررسی فنوتیپی جدایه‌ها، از آزمون‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و تغذیه‌ای استاندارد استفاده شد. بدین ترتیب که رنگ پرگنه و رنگ توده اسپور روی محیط YMEA پس از ۱۰ تا ۱۴ روز مورد بررسی قرار گرفت (۳۲). واکنش گرم به روش ساسلو و همکاران (۳۴) انجام شد. آزمون رشد هوازی و بی هوازی (O/F) در حضور گلوکز به روش هیو و لایفسن انجام گردید (۱۴). توانایی رشد جدایه‌ها در استفاده

از قندهای ISP (قندهای ال- آرابینوز، دی- فروکتوز، دی- گلوکز، دی-مانیتول، رافینوز، سوکروز، سلولز، دی-زایلوز، رامنوز و مزواینوسیتول) و همچنین قندهای سالیسین و ریبوز به روش لامبرت و لوریا (۲۳) و توانایی رشد جدایه‌ها در استفاده از اسیدهای آمینه به روش فائوکر و همکاران (۶) انجام شد. بررسی سمیت ناشی از مواد بازدارنده رشد باکتری از محیط کشت مالت و عصاره مخمر حاوی مواد بازدارنده تلورایت پتاسیم (۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، استات تالیوم (۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، کریستال ویولت (۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و فنل (۰/۱ درصد) به روش لامبرت و لوریا (۲۳) صورت گرفت. جهت بررسی توانایی جدایه‌ها در تجزیه پلیمرهای زایلان [2] و زانتین [3] از محیط کشت بنت آگار تغییر داده شده [4] استفاده شد. آزمون هیدرولیز آسکولین و آربوتین جدایه‌ها به روش کوتزنر انجام شد (۲۱).

برای بررسی حساسیت یا مقاومت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط کشت، همچنین بررسی اثر دیسک‌های آنتی‌بیوتیک بر روی رشد جدایه‌ها از محیط YMEA به روش فائوکر و همکاران (۶) استفاده شد. برای آزمون تحمل به نمک طعام، رشد جدایه‌ها در اسیدیته‌های مختلف و رشد در ۳۷°C از محیط کشت YMEA استفاده شد (۲۳). تولید رنگیزه ملانین، با استفاده از محیط کشت‌های مالت و عصاره مخمر، پپتون عصاره مخمر و آهن [5] و به روش شاد و همکاران (۳۰) مورد بررسی قرار گرفت.پس از انجام آزمون‌های مختلف، نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار Ntsys-pc version 2.02 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و درخت فیلوژنتیکی برای گروه‌بندی جدایه‌ها ترسیم گردید.

بررسی الگوی پروتئین‌های سلولی

به منظور بررسی تنوع پروتئین‌های سلولی در جدایه‌های *Streptomyces*، تعداد ۱۴ جدایه به عنوان نماینده از گروه‌های مختلف فنوتیپی انتخاب و به همراه دو استرین مرجع (اهدایی بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز) از گونه‌های *S. acidiscabies* و *S. scabies*، الکتروفورز عمودی در ژل آکریل‌آمید حاوی دودسیل سولفات (SDS) طبق روش لاملی (۲۲) انجام شد. استخراج پروتئین‌های سلولی به روش پارادیس و همکاران و با استفاده از لیزوزوم صورت گرفت (۲۹).

رنگ‌آمیزی ژل با محلول ۰/۱ ٪ کوماسی‌بلو در مخلوط متانول، آب و اسیداستیک انجام و با دستگاه ژل داک از آن عکس گرفته شد.

نتایج و بحث

گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس خصوصیات فنوتیپی

در مجموع تعداد ۵۱ جدایه از غده‌های آلوده سیب‌زمینی و چهار جدایه از خاک مزارع آلوده جداسازی شد. جدایه‌های مذکور با واکنش مثبت به رنگ‌آمیزی گرم، هوازی اجباری بودن، پرگنه‌های مجزای گرد یا خطی باظاهر منشعب یا پودری، و زنجیره اسپور مارپیچی [6] یا پیچشی [7] به رنگ‌های مختلف سفید تا صورتی یا قهوه‌ای متعلق جنس *Streptomyces* تشخیص داده شدند (۳۲، ۱ و ۲۵).

1- cfu/ml

2- Xylan
3- Xanthine
4- Modified Bennett Agar
5- Pepton-Yeast Extract Iron Agar(PYI)
6- spiral
7- Flexuous

جدول ۱- مشخصات نمونه‌های با علائم جرب سیب‌زمینی از مناطق مختلف استان چهارمحال و بختیاری

Table 1- Samples characteristics with symptoms of potato scab of Chaharmahal Va Bakhtiari Province

محل نمونه‌برداری Location		رقم Variety	کدCode	گروه فنوتیپی Phenotypic Group	محل نمونه‌برداری Location		رقم Variety	کدCode	گروه فنوتیپی Phenotypic Group
شهرستان City	محل Place				شهرستان City	محل Place			
		Agria	2-D-1	1			Marfona	17-CS	3
		Agria	2-N	1	بروجن	فرادنبه	Agria	18-E	3
	شهرکیان Shahrekian	Agria	2-D-2	4	Brojen	Fardonbeh	Agria	18-E-1	3
		Agria	2-D	6			Agria	18-E-2	3
		Agria	2-E	6	فارسان	میزدج	Marfona	26-E	2
		Agria	20-R	1	Farsan	Mizdaj	Marfona	26-E-2	2
	Taghanakطاقانک	Agria	20-R-1	1			Marfona	26-E-1	4
		Agria	3-D	2			Agria	13-E-3	4
شهرکرد		Agria	11-CS	2	اردل		Soil	13-3	4
Shahrekord	Nafch نافچ	Agria	11-R	4	Ardal	اردل Ardal	Agria	13-E	5
		Marfona	36-E	5			Agria	13-E-1	5
	Tishniz تیشنیز	Agria	5-R	2			Agria	13-E-2	5
	Shahrekordشهرکرد	Agria	37-E	6		کوگانک Kogang	Agria	27-R	3
		Marfona	4-E	4	کوهرنگ		Agria	27-N	2
	بهرام‌آباد Bahramabad	Marfona	4-D-1	6	Kohrang		Arinda	29-D	3
		Marfona	4-D-2	6		حاجی‌آباد Hajiabad	Ramos	29-E	5
		Agria	24-D	1			Ramos	29-E-1	5
	معموره	Agria	24-D-1	1			Ramos	29-E-2	5
	Maamoreh	Agria	24-D-2	1			Agria	23-E	2
		Marfona	24-R	2			Soil	16-0	2
		Marfona	24-R-1	3		ده صحرا	Agria	16-E	3
		Marfona	15-E	2	لردگان	Dehsahra	Soil	16-4-1	6
	Dehno دهنو	Marfona	15-E-1	2	Lordegan		Soil	16-4-2-	6
		Marfona	15-E-2	6		خانمیرزا	Pikaso	33-D	2
بروجن		Agria	22-R	2		Khanmirza	Marfona	33-E	5
Brojen	Ncirabad نصیرآباد	Agria	22-R-1	2					
		Agria	22-D	4					
	بلداجی	Agria	28-R	3					
	Boldaj	Agria	28-R-2	3					
	Sefid-dasht سفیددشت	Santae	12-R	3					

تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از خصوصیات مرفولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای مربوط به ۵۵ جدایه و مقایسه با شرح گونه‌های مهم بیماری‌زا، منجر به تفکیک جدایه‌ها در شش گروه فنوتیپی گردید (شکل ۱، جدول ۲).

بر اساس آزمون‌های فنوتیپی هفت جدایه در گروه اول قرار گرفتند که از اکثر قندها و مواد آلی مورد آزمایش استفاده کردند و تنها قادر به تجزیه آربوتین نبودند. تمامی جدایه‌ها در اسیدیته‌های بین ۵ تا ۶ رشد کردند ولی قادر به رشد در اسیدیته پایین‌تر از ۵ نبودند. هر چند درصد بالایی از جدایه‌ها در نمک طعام ۵٪ رشد کردند ولی هیچ‌یک از آنها غلظت‌های بالاتر این ماده را تحمل نکردند (جدول ۲). در مجموع جدایه‌های این گروه به گونه‌های *S. stelliscabies* و *S. europaeiscabies* شباهت داشتند.

با آنکه ۱۳ جدایه گروه دوم شباهت زیادی به گروه اول داشتند ولی از نظر بعضی از خصوصیات همچون عدم توانایی در تجزیه زانتین، با گروه اول متفاوت بودند. بنابراین بیشتر به گونه *S. Scabies* شباهت داشتند.

مهم‌ترین تفاوت‌های ۱۰ جدایه تشکیل دهنده گروه سوم با دو گروه قبلی توانایی تجزیه آربوتین و رشد در اسیدیته‌های ۴ و ۴/۵ و عدم استفاده از رافینوز و سالیسین بود. بسیاری از خصوصیات جدایه‌های این گروه با مشخصات گونه *S. acidiscabies* مشابهت داشتند.

هشت جدایه گروه چهارم با وجود توانایی استفاده از قندهای مختلف و هیدرولیز آربوتین، قادر به استفاده از ریبوز و تجزیه زانتین نبودند. جدایه‌های این گروه علیرغم توانایی رشد در اسیدیته‌های

بالای ۴/۵ و تحمل غلظت‌های ۵ و ۷٪ نمک طعام، توانایی رشد در اسیدیته ۴ و تحمل نمک طعام ۱۰٪ را، نداشتند. خصوصیات جدایه‌های این گروه، با مشخصات دو گونه *S. turgidiscabies* و *S. aurofaciens* تطابق زیادی داشت.

هشت جدایه گروه پنجم علاوه بر ناتوانی در استفاده از رامنوز، سوکروز و ریبوز، عدم رشد در اسیدیته‌های زیر ۵ و عدم تحمل غلظت‌های ۷ و ۱۰٪ نمک طعام، قادر به هیدرولیز آسکولین نیز نبودند. علیرغم توانایی ایجاد بیماری شدید توسط تعدادی از جدایه‌ها این گروه، با توجه به واکنش متنوع اعضای این گروه به آزمون‌های فنوتیپی، نسبت دادن اعضای این گروه به یک گونه خاص، امکان‌پذیر نشد.

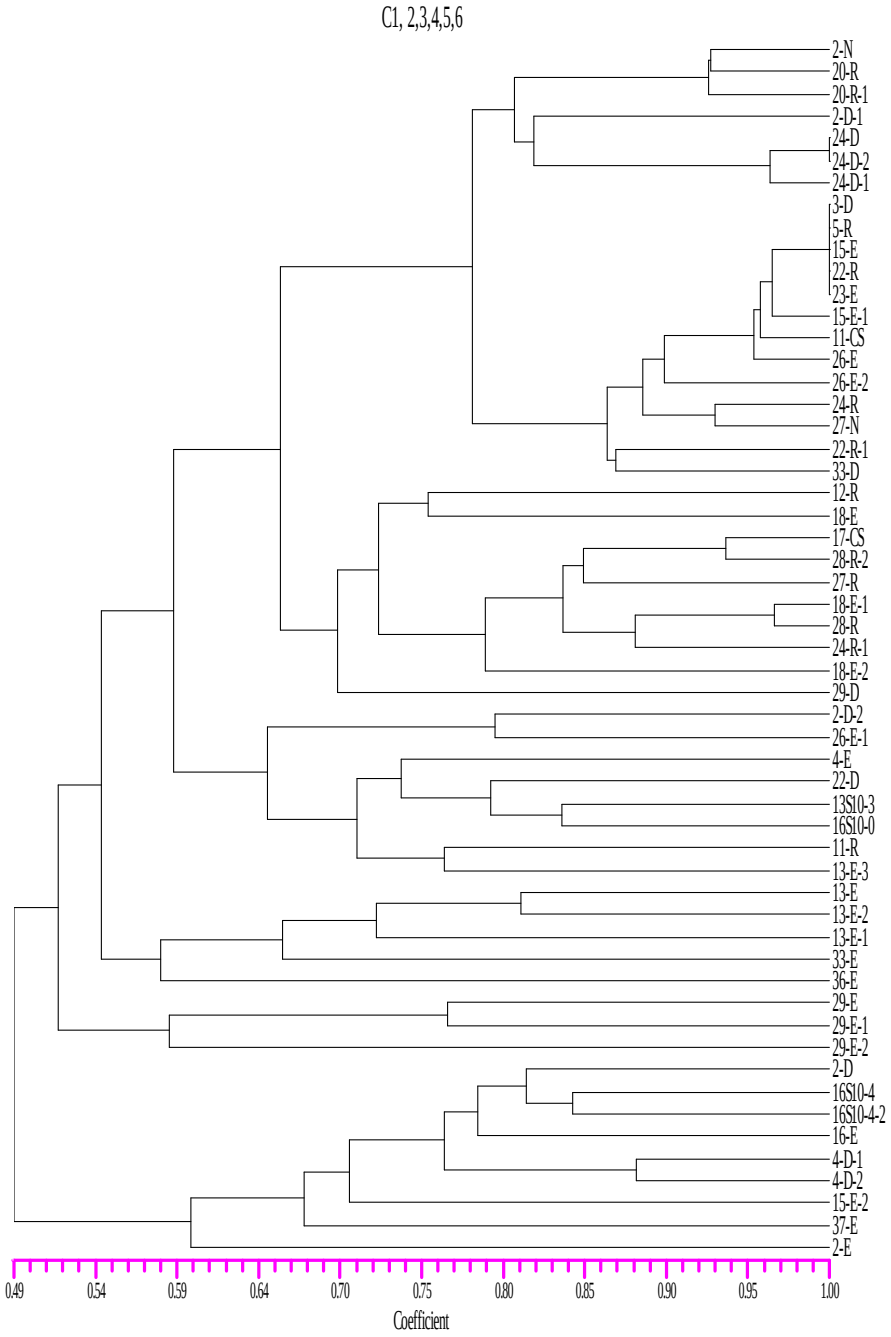
یکی از خصوصیات متمایز کننده نه جدایه گروه ششم، عدم رشد آنها در اسیدیته‌های پایین‌تر از ۵/۵ و عدم استفاده از قند مزواینوسیتول بود. اعضای این گروه همچنین قادر به استفاده از رافینوز، دی زایلوز، ریبوز ومنابع ال- هیدروکسی پرولین و ال-متیونین نبودند. اعضای این گروه به گونه *S. griseus* شباهت داشتند. بررسی‌های فنوتیپی نشان‌دهنده تعلق تمام استرین‌های انتخابی به جنس *Streptomyces* بود. بیشترین تعداد جدایه‌های مورد بررسی به *S. scabies* شباهت تداشتند. وانر نیز در بررسی استرین‌های عامل اسکب معمولی از ایالات مختلف امریکا ۵۰٪ آنها را متعلق به دو گونه *S. scabies* و *S. europaeiscabies* تشخیص داده بود (۳۷) فلورس گونزالس و همکاران با مطالعه استرین‌های عامل اسکب معمولی در اروپای غربی توانستند بوسیله PCR در ۸۴ نمونه آلوده ۷۰ جدایه بیماریزا را ردیابی و جداسازی نمایند که تمام آنها بر اساس خصوصیات فنوتیپی در گروه *S. scabies* قرار گرفتند. با این حال محققین مذکور با بررسی توالی 16sRNA و مصرف منبع کربن تمام آنها را متعلق به گونه *S. europaeiscabies* دانستند (۷). تحقیقات انجام شده در ایران در سال‌های اخیر نیز نشان داده است که تنوع زیادی در عوامل ایجاد بیماری در مناطق مختلف وجود دارد (۱۷ و ۱۶). ورود پیوسته بذر سیب زمینی به کشور در سال های اخیر باعث ورود استرین ها و گونه های مختلف عامل بیماری شده است. مناسب بودن شرایط آب و هوایی و شرایط فیزیکی، شیمیایی (اسیدیته) و رطوبتی مطلوب خاک‌های ایران نیز موجب گسترش بیماری و افزایش شدت بیماری زایی استرین‌های وارداتی شده است.

آزمون بیماری‌زایی

چهل و شش جدایه از ۵۵ جدایه بر روی گیاهچه تربچه بیماری‌زا بوده و علائم کوتولگی، عدم خروج برگ اولیه از بذر، بافت‌مردگی و مرگ گیاهچه را ایجاد کردند. بقیه جدایه‌ها علائم قابل مشاهده‌ای بر روی گیاهچه تربچه ایجاد نکردند. از ۲۶ جدایه‌ای که از گروه‌های مختلف فنوتیپی برای آزمون بیماری‌زایی روی غده سیب‌زمینی انتخاب شدند، ۲۲ جدایه بیماری‌زا بوده و علائم مختلف جرب فرو رفته، برجسته و سطحی را بر روی غده سیب‌زمینی ایجاد کردند (شکل ۲) و ۴ جدایه هیچ گونه علائمی ایجاد نکردند. جدایه‌های مختلف از نظر زخم‌های ایجاد شده بر روی غده‌ها متفاوت عمل کردند. جداسازی مجدد جدایه‌ها از غده‌های آلوده گیاهان، خصوصیات فنوتیپی مشابهی با جدایه‌های اولیه را نشان دادند. تنوع علائم اسکب ایجاد شده نشان دهنده متفاوت بودن میزان و نوع فاکتورهای دخیل در بیماری‌زایی باکتری می‌باشد.

الگوی نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی

تجزیه و تحلیل وجود یا عدم وجود باندها در ۱۴ جدایه انتخابی به عنوان نماینده گروه‌های فنوتیپی به همراه دو استرین مرجع، جدایه های مذکور را به پنج گروه تفکیک کرد که در بیشتر موارد با گروه‌های فنوتیپی همخوانی و شباهت داشتند (شکل ۳).



شکل ۱- درخت فیلوژنی مربوط به آنالیز نتایج آزمون‌های فنوتیپی بر روی ۵۵ جدایه

Figure 1- A phylogenetic tree based on the analysis of phenotypic tests, 55 isolates

جدول ۲- خصوصیات گروه‌های فنوتیپی مختلف، بر اساس درصد جدایه‌های نشان‌دهنده واکنش مثبت به آزمون‌های استاندارد

Table 2- Phenotypic characteristics of different groups, based on the percentage of isolates showed positive reaction to standardized tests

نام آزمون Test name / گروه فنوتیپی Phenotypic group	1 (7)*	2(13) *	3(10) *	4 (8)*	5(8) *	6(9) *
رنگ اسپوردر YMESpore color on YME	سفید White	خاکستری تا سفید خردلی Gray to white mustard	سفید تا صورتی White to pinkish	خاکستری تا سفید Gray to white	سفید مایل به سبز White to greenish	سفید مایل به زرد تا کرم Yellowish-white to cream
تولید رنگدانه درYME Pigment production in YME	100	100	90	0	63	89
تولید رنگدانه درPYI Pigment production in PYI	100	100	0	13	0	0
زنجیره اسپور پیچشی Spore chain torsion	0	0	100	100	100	100
زنجیره اسپور مارپیچ Spore chains spiral	100	100	0	0	0	0
استفاده از : Use of:						
ال – آرابینوز L- arabinose	100	100	100	100	63	100
دی – فروکتوزD-fructose	100	100	100	100	100	89
دی – گلوگز D-glucose	100	100	100	100	100	100
دی – مانیتول(D-mannitol)	86	100	100	63	50	100
رافینوزRafinose	100	100	20	100	88	11
رامنوزRamnose	57	100	100	88	۳۸	100
سوکروزSucrose	71	100	90	75	13	67
دی – زایلوزD-xylose	100	100	70	100	100	11
مزواینوسیتولMesoinositol	100	100	100	100	63	0
دی – گالاکتوزD-glactose	86	100	100	75	50	67
سالیسینSalicilin	57	100	0	88	75	89
ریبوزRibose	100	100	100	13	25	44
ال – هیدروکسی پرولینL-hydroxyproline	100	100	100	63	63	11
ال – متیونینL-methionine	43	92	100	75	50	22
هیدرولیز آربوتین Arbotin hydrolyze	0	15	40	50	63	67
هیدرولیز آسکولین Ascoline hydrolyze	100	85	80	75	25	56
تجزیه زانتینXanthine catalysis	43	15	80	25	75	67
تجزیه زایلانXylan catalysis	100	92	70	63	50	44
رشد در اسیدیته: (Growth in PH:						
4	0	0	60	13	0	0
4.5	0	0	80	75	0	11
5	86	85	100	100	50	22
5.5	100	100	100	100	100	89
6	100	100	100	100	100	100
Salt tolerance of 5%	71	85	100	100	88	100
Salt tolerance of 7%	0	0	40	75	38	89
Salt tolerance of 10%	0	0	20	0	25	11
رشد در حضور :(Growth in)						

k tellurite (10µg/ml)	100	100	90	100	100	56
k tellurite (100µg/ml)	0	8	40	0	13	22
Thallium acetate (10µg/ml)	0	0	20	25	38	100
Thallium acetate (100µg/ml)	0	0	0	0	13	100
Crystal violet (0.5µg/ml)	0	0	60	0	38	0
Phenol 0.1%	0	8	10	0	13	89
Penicillin G.(10µg/ml)	100	100	100	50	100	100
Penicillin G.(100µg/ml)	100	100	100	0	75	89

شکل ۲- ایجاد علائم جرب معمولی روی غده‌های دختری سیب‌زمینی در آزمون بیماری‌زایی در گلخانه
Figure 2- Common scab symptoms on potato tubers in greenhouse pathogenicity test

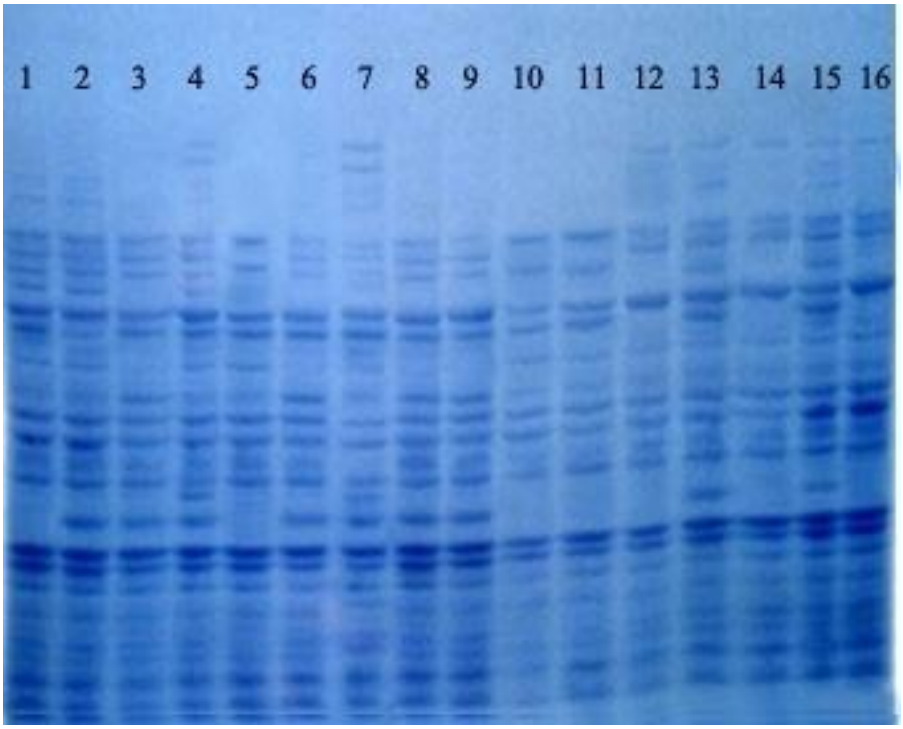
جدایه‌های 2-E-18، 28-R و 12-R که مشابه با گونه *S. acidiscabies* بوده و درگروه سوم فنوتیپی قرار گرفته بودند، به همراه استرین مرجع *S. acidiscabies*، از نظر نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی، در گروه اول قرار گرفتند. تمام جدایه‌های انتخابی گروه دوم فنوتیپی (15-E، 26-E و 22-R) به همراه استرین مرجع *S. scabies* در گروه دوم پروتئینی قرار گرفتند که بر اساس آزمون‌های فنوتیپی گونه *S. scabies* تشخیص داده شده بودند. گروه سوم شامل جدایه‌های 20-R، 24-D و 2-D-1 بودند که در گروه اول فنوتیپی و تحت عنوان *S. stelliscabies* و *S. europaeiscabies* قرار گرفته بودند.

دو جدایه 2-D و 4–16(انتخابی گروه فنوتیپی ششم) و جدایه 26-E-1 (انتخابی گروه فنوتیپی چهارم)، در گروه چهارم پروتئینی قرار گرفتند که با نتایج آزمون‌های فنوتیپی متفاوت بودند.

در گروه پنجم پروتئینی جدایه‌های 15-E-2 (انتخابی گروه ششم فنوتیپی و مشابه گونه *S. griseus*) و 13-E (انتخابی گروه پنجم فنوتیپی) قرار گرفتند.

به طور کلی جدایه‌های گروه‌های فنوتیپی اول، دوم و سوم، در بررسی نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی نیز مشابه عمل کردند و در سه گروه مجزا و همانند گروه‌بندی فنوتیپی قرار گرفتند. اما جدایه‌های سایر گروه‌های فنوتیپی به دست آمده از آزمون‌های فنوتیپی استاندارد، در مواردی مشابه و در مواردی هم متفاوت عمل کردند.

تنوع نقوش الکتروفورزی پروتئین در استرین های مورد بررسی نشان‌دهنده وجود گونه‌های مختلف عامل بیماری در منطقه است که نتایج بررسی‌های فنوتیپی را تأیید کرد. به عبارت دیگر امکان استفاده از الگوی پروتئینسلولیبرای ردیابی و تشخیص استرین‌ها و گونه‌های عامل بیماری وجود دارد. بدیهی است که روش های مولکولی مبتنی بر DNA خصوصا استفاده از rDNA برای تشخیص دقیق‌تر و سریع‌تر می‌باشند. ولی به دلیل محدویت‌های موجود در این بررسی امکان استفاده از چنین روش‌هایی وجود نداشت. و این تحقیق صرفاً برای کسب اطلاعات اولیه از وجود بیماری و پراکنش آن در منطقه انجام شد.



شکل ۳- نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی ۱۶ جدایه نمایندای فنوتیپی حاصل از آزمون‌های فنوتیپی استاندارد

: ۱ 18-E-2 ؛ ۲ : *S. acidiscabies* مرجع؛ ۳ : 15-E ؛ ٤ : 28-R ؛ ٥ : 20-R ؛ ٦ : 26-E ؛ ۷ : 12-R ؛ ۸ : *S. scabies* ؛ ۹ : 22-R مرجع؛ ۱۰ : 2-D-1 ؛ ۱۱ : 26-E-1[1] ؛ ۱٦ : 13-E ؛ ۱٥ : 16-4 ؛ ۱٤ :15-E-2؛ ۱۳ : 2-D ؛ ۱۲ : 24-D

Figure 3- Cell protein electrophoresis pattern of 16 isolates of phenotypic groups of standard tests :1: 8-E-2؛ *2: S. acidiscabies* control; 3: 15-E; 4:28-R; 5:20-R; 6:26-E; 7:12-R; 8:*S. scabies* control; 9:22-R; 10:2-D-1; 11:24-D; 12:2-D; 13: 15-E-2; 14: 16-4; 15: 13-E; 16: 26-E-1

منابع

1- Archuleta J.G., and Easton G.D. 1981. The cause of deep-pitted scab of potatoes, American Potato Journal, 58:385-392.
2- Cummings T. F., and Johnson D. A. 2014.Epidemiology and management of powdery and common scab in the Columbia Basin,Proceedings of the Washington - Oregon Potato Conference.
3- Doering-Saad C., Kampfer P., Manulis S., Kritzrnan G., Schneider J., Zakrzewska-Czerwinska J., Schrempfand H., and Barash I. 1992.Diversity among *Streptomyces*strains causing potato scab, Applied and Environmental Microbiology, 58:3932-3940.
4- Eini O., Khodakaramian Gh.R., and Rahimian H. 2003. Phenotypic characteristics and host range of *Streptomyces* strains causing potato scab disease, Iranian Journal of Plant Pathology, 39:85-101.
5- FAO. 2009. Production yearbook. Home page on internet. Available on the: http://www.FAO.org
6- Faucher E., Otrysko B., Paradis E., Hodge N.C., Stall R.E., and Beaulieu C. 1993. Characterization of *Streptomyces*causing russet scab in Quebec, Plant Disease, 77:1217-1220.
7- Flores- Gonzales R., Velasco I., and Montes F. 2008. Detection and characterization of *Streptomyces* causing potato common scab in Western Europe, Plant pathology, 57:162-167.
8- Goto M. 1992.Fundamentals of bacterial plant pathology, Academic press Inc. Shizuoka, Japan. 342p.
9- Goyer C., and Beaulieu C. 1997. Host range of *Streptomyces* strains causing common scab, Plant Disease, 81:901-904

10- Hasani S., and Taghavi M. 2010. Phenotypic and genotypic characteristics of *Streptomyces* strains the causal agent of common scab in Fars and Hamedan provinces, Proceeding of 19th Iranian Plant Protection Congress, Tehran, Iran. (Abst.). 478.
11- Hiltunen L.H., Weckman A., Ylhainen A., Rita H., Richter E., and Valkonen J.P.T. 2005. Responses of potato cultivars to the common scab pathogens, *Streptomyces scabies* and *S. turgidiscabies*, Annals of Applied Biology, 146:395-403.
12- Hao J. J., and Mengo Q. X. 2009. Characterzation of a new *Streptomyces* strain, DS3024, that causes potato common scab, Plant disease, 93 (12): 1329-1334.
13- Hasani S., and Taghavi S. M. 2014. Phenotype and genotype diversity of Iranian *streptomyces* isolates that cause potato common scab, Journal of plant pathology, 86(3): 459-469.
14- Hugh R., and Leifson E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria, Journal of Bacteriology, 66:24-26.
15- Kampfer P., Kroppenstedt R. M., and Dott W. 1991. A numerical classification of the genera *Streptomyces* and *Streptoverticillium* using miniaturized physiological tests Journal General Microbiology, 137:1831-1891.
16- Khodakaramian GH., Eini O., and Rahimian H. 2003. Protein electerophoretic and fatty acid patterns of the strains of *Streptomyces* causing potato scab in Iran. Iran, J. Agric. Sci. 34:837-844
17- Khodakaramian Gh.R., Zafari D., and Solaimani J. 2011. Diversity of *Streptomyces* strains causing potato scab disease in Hamedan province and their thaxtomin production potential, Pests and plant diseases, 79 (1): 53-70
18- King R.R., and Lawrence C.H. 1996. Characterization of new thaxtomin A analogues generated in vitro by *Streptomyces scabies*, Journal of Agricultural Food Chemistry, 44:1108-1110.
19- Kreuze J.F., Suomalainen S., Paulin L., and Valkonen J.P.T. 1999. Phylogenetic analysis of 16S rRNA genes and PCR analysis of the *necl* gene from *Streptomyces* spp. causing common scab; pitted scab in Finland, Phytopathology, 89:462-469.
20- Kuster E. 1972. Simple working key for the classification and identification of named taxa included in the International Streptomyces project, International Journal of Systematic Bacteriology, 22:139-148.
21- Kutzner H.J. 1981. The family of *Streptomycetaceae*. In: The Prokaryotes: A Handbook of Habitats, Isolation and Identification of bacteria. Vol. II, Starr S. Balows T. & Legal S. (eds). Springer- Verlag. Berlin, PP.2028-2090.
22- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage, Nature 227:680-685.
23- Lambert D.H., and Loria R. 1989. *Streptomycesacidi scabies*. Sp. nov. nom, International Journal of Systematic Bacteriology, 39:393-396.
24- Lehtonen M.J., Rantala H., Kreuze J.F., Bang H., Kuisma L., Koski P., Virtanen E., Vihlman K., and Valkonen J.P.T. 2004. Occurrence and survival of potato scab pathogens (*Streptomyces scabies*) on tuber lesions: quick diagnosis based on a PCR-based assay, Plant pathology, 53:280-287.
25- Loria R., Bukhalid R.A., Fry B.A., and King R.R. 1997.Plant Pathogenicity in the Genus *Streptomyces*. Pant Disease, 81(8):836-846.
26- Maleki1 K., Khodakaramian Gh.R., Zafari D., and Bagheri A. 2010. Biological control of Streptomyces scabies the causal agent of potato scab disease in Hamedan province. Proceeding of 19th Iranian Plant Protection Congress, Tehran, Iran. (Abst.). 464.
27- Miyajima K., Tanaka F., Takeuchi T., and Kuninaga S. 1998. *Streptomyces turgidiscabies* sp. Nov, International Journal of Systematic Bacteriology, 48:495-502.
28- Ommati F., Ghasemi A., Mohammdi-pour M., Baradaran Gh., and Soheili B. 2006. Identification of *Streptomyces* species the cause of potato common scab, Proceeding of 17th Iranian Plant Protection Congress, Karaj, Iran. (Abst.). 173
29- Paradis E., Goyer, C., Hodge N.C., Houge R., Robert E.S., and Beaulieu C. 1994. Fatty acid and protein profiles of *Streptomyces scabies* strains isolated in eastern Canada, International Journal of Systematic Bacteriology, 44:561-564.
30- Schaad N.W., Jones J.B., and Chun W.(eds). 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3nd ed. APS Press. 373p.
31- Shirling E.B., and Gottlieb D. 1966. Method for characterization of *Streptomyces* species, International Journal of Systematic Bacteriology, 16:313-340.
32- Stackebrandt E., Rainey F.A. and Ward-Rainey N.L. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system; *Actinobacteria* class is Nov, International Journal of Systematic Bacteriology, 47:479-491.
33- Stevenson W.R., Loria R., Franc G. and Weingartner D.P. 2001. Compendium of potato diseases, American Phytopathological Society, St. Paul. MN.
34- Suslow T.V., Schorth M.N., and Saka M. 1982. Application of rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining., Phytopathology, 72:917-918.
35- Szabo I.M., Marton M., Buti I., and Fernandez C. 1975. A diagnostic key for the identification of species of *Streptomyces* and *Streptoverticillium* included in the International *Streptomyces* project. Acta Botanica Academiae

Scientiarum Hungaricae 21:387-418.
36- Taghavi M., and Faghihi M. 2006. Distribution and identification of Streptomyces species the cause of potato common scab in Fars province, Iranian Journal of Plant Pathology, 42: 85-115.
37- Wanner L.A. 2006. A survey of genetic variation in *Streptomyces* isolates causing potato common scab in the United States, Phytopathology, 96:1363-1371.
38- Wanner L.A. 2007. A new strain of *Streptomyces* causing potato common scab in Potato plant disease, 91:352(Abstr.).
39- Weber K., and Osborn M. 1969. The realiability of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Journal of Biology and Chemistry, 244:4406-4412.
40- Williams S.T., Goodfellow M., Alderson G., Wellington E.M.H., Sneath P.H.A., and Sackin M.J. 1983. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera, Journal of General Microbiology, 129:1743-1813.