Archive of SID

بیماریهای گیاهی، جلد ٤٢، ١٣٨٥

پراکنش و شناسایی گونه‌های *Streptomyces* عامل جرب معمولی سیب‌زمینی در استان فارس*

Distribution and identification of *Streptomyces* species, the causal agent of potato common scab in Fars province

سید محسن تقوی و محمد مهدی فقیهی**

بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

دریافت ١٣٨٤/٧/٦ پذیرش ١٣٨٤/١٢/١٧

طی سال‌های ١٣٨١تا ١٣٨٣ تعداد ٧٠ جدایه از غده‌های سیب‌زمینی آلوده به جرب و از خاک مزارع جداسازی شد. جدایه‌ها بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و بیماریزایی روی غده‌های سیب‌زمینی و گیاهچه تربچه در ٦ گروه جداگانه قرار گرفتند. جدایه‌های گروه اول که از غده‌های دارای علائم فرو رفته و در مواردی برجسته و زنگاری جدا شدند شباهت زیادی به استرین مرجع *S. scabies* داشتند. جدایه‌های گروه دوم در برخی از خصوصیات مورفولوژیکی شبیه به گونه *S. scabies* بوده ولی، در برخی از خصوصیات بیوشیمیایی متفاوت بودند. اکثر جدایه‌های گروه سوم خصوصیات شبیه به گونه *S. acidiscabies* داشته و تعداد معدودی

*قسمتی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد مولف دوم ارائه شده به بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

** مسئول مکاتبه

www.SID.ir

Archive of SID

نیز در خصوصیات مورفولوژیکی و برخی خصوصیات بیوشیمیایی شباهت‌هایی را با گونه *S. griseus* نشان دادند. جدایه‌های گروه چهارم اغلب ویژگی‌هایی شبیه به گونه *S. turgidiscabies* را داشتند. جدایه‌های گروه پنجم که از علائم جرب سطحی (جرب زنگاری و جرب توری) جداسازی شدند، خصوصیاتی مشابه گونه‌های *S. aureofaciens* و *S.reticuliscabies* را داشتند. جدایه‌های گروه ششم در خصوصیات مورفولوژیکی و برخی خصوصیات بیوشیمیایی شبیه به گونه *S. acidiscabies* بوده ولی، در تعدادی آزمون بیوشیمیایی نیز تفاوت‌هایی را نشان دادند. در آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای شناسایی ژن *nec1*، که در اکثر جدایه‌های بیماری‌زای *Streptomyces scabies*، *S. acidiscabies* و *S. turgidiscabies* وجود دارد، قطعه‌ای به اندازه ۷۰۰ جفت‌باز از استرین مرجع *S. scabies* و تعدادی از جدایه‌های گروه‌های ۱، ۳ و ٤ که علائم جرب معمولی را بر روی غده‌های سیب‌زمینی در شرایط گلخانه ایجاد کرده بودند به دست آمد. چنین قطعه‌ای در جدایه‌های غیربیماری‌زا و جدایه‌های بیماری‌زای گروه‌های ۲، ٥ و ٦ تکثیر نشد. بنابراین، در تعدادی از جدایه‌های مورد مطالعه و بیماری‌زا و در تمام جدایه‌های غیربیماری‌زا ژن *nec1* پیدا نشد ولی، هرکدام از جدایه‌ها که ژن *nec1* را داشتند بیماری‌زایی را بر روی غده‌های سیب‌زمینی و گیاهچه تربچه نشان دادند. نقوش الکتروفورز پروتئین‌های سلولی نماینده جدایه‌های گروه‌های مختلف کم و بیش تفاوت نشان داده و در پاره‌ای موارد با رده‌بندی فنوتیپی همخوانی نداشت.

واژه‌های کلیدی: سیب زمینی، جرب معمولی، *Sterptomyces*

مقدمه

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) از نظر ارزش غذایی همردیف گندم و برنج است . میزان تولید جهانی آن در سال ۲۰۰۰ میلادی ٦۲٥۳۹٤۳۲۱ تن بوده است و ازنظر تولید سالیانه بعد از گندم، برنج، ذرت و جو در مقام پنجم قرار دارد. سطح زیر کشت این محصول در ایران حدود ١٦٥ هزارهکتار با میزان تولید تقریبی ۳۷٤۹۰۰۰ تن بوده و مصرف سرانه آن در سال حدود ٥۲

www.SID.ir

Archive of SID

کیلوگرم می‌باشد (Ministry of Agriculture 2002).

استان فارس یکی از مناطق عمده تولید سیب‌زمینی در ایران می‌باشد و سطح زیر کشت این محصول رو به افزایش است. سطح زیر کشت سیب‌زمینی در این استان بین ۱۵۰۰۰-۱۲۰۰۰ هکتار (آبی) در نوسان بوده و میزان تولید حدود ۲۲۱۰۰۰ تن می‌باشد (Ministry of Agriculture 2002). کشت سیب‌زمینی در این استان طی سه اقلیم (کشت پائیزه-زمستانه-بهاره) انجام می‌گیرد

عوامل بیماری‌زای گیاهی از مهمترین عواملی هستندکه راندمان تولید سیب‌زمینی را پایین آورده وکیفیت آن را کاهش می‌دهند. دست کم شش بیماری باکتریایی سیب‌زمینی را آلوده کرده و موجب کاهش محصول آن می‌گردد که از مهم‌ترین آنها می‌توان به پژمردگی باکتریایی، پوسیدگی نرم، ساق سیاه و جرب معمولی اشاره نمود (Stevenson *et al.* 2001, Goto 1992) . عامل بیماری جرب سیب‌زمینی گونه های مختلف جنس *Streptomyces* می‌باشند (Loria, *et al*. 1997).

علائم بیماری جرب سیب‌زمینی به صورت‌های جرب برجسته (Erumpent scab)، جرب فرو رفته (Deep-pitted scab)، جرب سطحی (Cork scab or superficial scab) و جرب زنگاری (Russet scab) مشاهده می‌شود (Goyer *et al.* 1996) . علائم ناشی از گونه‌های *Streptomyces* به اندام‌های زیرزمینی گیاه محدود می‌شود و اولین علائم بیماری اغلب به صورت بافت‌مردگی محل آلودگی نمایان می‌شود. آلودگی سیستمیک تاکنون گزارش نشده است. اگرچه قسمت‌های هوایی گیاه نیز در آلودگی شدید ریشه، کاهش رشد پیداکرده یا پژمرده می‌گردند ولی، علائم بیماری جرب سیب‌زمینی به صورت زخم‌های کوچک برجسته بر روی اندام‌های زیرزمینی در اطراف عدسک‌ها و یا حفره‌های بافت‌مرده عمیق تا عمق هفت میلیمتر در بافت میزبان می‌باشد که شدت این علائم بستگی به حساسیت میزبان، جدایه بیمارگر و شرایط محیطی دارد (King & Lawrence 1996, Faucher, *et al*. 1993).

عامل جرب سیب‌زمینی دارای دامنه میزبانی نسبتا وسیعی است. شلغم، چغندر، کلم، هویج، بادمجان، پیاز، اسفناج، تربچه و پونه ازمیزبان‌های دیگر آن به حساب می‌آیند (Leiner, *et al*. 1996).

در ایران اولین بار کریمی در سال ۱۳۴۸ جدایه‌هایی از *Streptomyces* را از اقلید فارس

www.SID.ir

Archive of SID

جداسازی کرد ولی، تحقیقی بر روی آن صورت نگرفت (بنی‌هاشمی- مذاکرات شخصی). عینی و همکاران (Eini, *et al.* 2003) براساس آنالیز عددی خصوصیات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی، بیماریزایی و دامنه میزبانی گونه‌های *Streptomyces* عامل جرب سیب‌زمینی در استان‌های همدان، چهارمحال و بختیاری، اصفهان و خراسان را در پنج گروه قرار داده و گونه‌های *S. scabies* و *S. acidiscabies* را برای اولین بار از ایران گزارش گرده اند.

همچنین *خداکرمیان* و همکاران (Khodakaramian *et al.* 2003) استرین‌های *Sterptomyces* عامل جرب سیب‌زمینی در نواحی مختلف ایران را براساس الگوی الکتروفورز پروتئین در سه گروه عمده قرار دادند که جدایه‌های گروه اول به *S. scabies* و جدایه‌های گروه دوم به *S. acidiscabies* شباهت داشته ولی جدایه‌های گروه سوم شباهت کمتری با دو گروه قبل داشته و دارای الگوی پروتئینی متنوعی بود. علاوه بر این اساس آنالیز اسیدهای جرب نیز تنوع نسبتا زیادی بین جدایه‌های مورد بررسی وجود داشت.

بیماری جرب معمولی در سال‌های اخیر در بعضی مناطق سیب‌زمینی کاری استان فارس مشاهده شده است. از آنجایی که در بعضی مزارع استان شدت بیماری بالا بوده و به صورت یکی از مسائل عمده در کشت سیب‌زمینی در آمده است و به علت عدم گزارش رسمی از وجود این بیماری در استان فارس، تعیین پراکنش این بیماری، تعیین تنوع سویه‌های عامل بیماری و خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی و بیماری‌زایی آنها از اهداف این تحقیق بوده است.

روش بررسی

الف: نمونه‌برداری و جداسازی

طی سال‌های ۱۳۸۱، ۱۳۸۲و ۱۳۸۳ از مناطق مختلف سیب‌زمینی‌کاری استان فارس در زمان برداشت بازدید بعمل آمد و غده‌های دارای علائم بیماری از نقاط مختلف مزارع جمع‌آوری گردید و به آزمایشگاه منتقل شد. از خاک مزارع آلوده و سالم هم نمونه‌برداری تصادفی صورت گرفت.

غده‌های سیب‌زمینی آلوده به بیماری جرب پس از شستشو با آب به قطعات کوچک تقسیم

www.SID.ir

Archive of SID

گردیدند و در مخلوط فنل و آب مقطر سترون (به نسبت ۱:۱٤۰) به مدت ده دقیقه غوطـه ور و دو بار با آب مقطر سترون به مدت ۱۵ دقیقه شستشو شدند. یک گرم از قطعات غده‌ها به ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون منتقل شدند و در بن‌ماری به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۵°C نگهداری شدند. پس از آن نمونه‌ها به محیط NPPC-WA (آب‌آگار ۱/۲درصد حاوی ۵۰ میلی‌گرم نیستاتین، ۵ میلـی‌گـرم پلی‌میکسین‌سولفات، ۱۰میلی‌گرم سدیم‌پنی سیلین G و ۵۰ میلی‌گرم سیکلو هگزامید در لیتر) منتقـل و به مدت ۱۰ روز در دمای ۳۰°C نگهداری شد. اسپورهای ایجاد شده روی قطعات یـا اطـراف آن برداشته شد و روی محیط ẎMEA (Yeast Extrac Malt Agar) حاوی آنتی‌بیوتیک‌های فـوق ۳ مرتبـه تا تهیه پرگنه خالص مخطط گردیدند(Goyer & Beaulieu, 1997).

جهت جداسازی از خاک، ده گرم خاک خشک شده در هوا به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر سـترون اضافه گردیـده و بـه مـدت ۱۰ دقیقـه روی شـیکر قـرار داده شـد. سـپس رقـت 10^{-1} تـا 10^{-7} از سوسپانسیون خاک در آب مقطـر سـترون تهیـه شـد. صـد میکرومتـر از رقـت‌هـای مختلـف روی محیط‌های NPPC-YMEA، NPPC-WA و WA پخش گردید و در دمای ۳۰°C–۲۸ برای ۷ تا۱۰ روز نگهداری شد. سپس پرگنه‌های با ظاهر شاخه شاخه و یا پـودری برداشـته شـد و روی محـیط YMEA خالص گردیدند (Schaad *et al.*, 2001).

هفتاد جدایه شامل ۵۰ جدایه از غده‌های سیب‌زمینی آلوده به جرب و ۲۰ جدایه از خاک مزارع آلوده و سالم جداسازی و همراه بـا جدایـه مرجـع *S. scabies* (اهـدائی دکتـر غـلام خـداکرمیان – دانشگاه مامازرند ورامین) مورد مطالعه قرار گرفتند. مشخصات جدایه‌ها، ارقام سیب‌زمینـی و محـل جمع‌آوری در جدول ۱ خلاصه گردیده است.

ب: آزمون بیماریزایی

آزمون بیماری‌زایی بر روی غده‌های سیب‌زمینی

بـــراســـاس روش *گـــویر و بیولیـــو* (Goyer & Beauleiu, 1997) و *شـــاد* و همکـــاران (Schaad *et al*. 2001) جهت تهیه اینوکولوم، جدایه‌ها بـه مـدت دو هفتـه در دمـای ۳۰ °C در ارلـن حاوی ۵۰ میلی‌لیتر ورمیکولایت یا پرلایت سترون اشباع شده با محلول غذایی (۲۰ گـرم سـوکروز،

www.SID.ir

Archive of SID

۱/۲ گرم ال- آسپاراژین، ٦/ گرم فسفات دی پتاسیم و ۱۰ گرم عصاره مخمر در لیتر) رشد داده شدند. سپس غده‌های سیب‌زمینی رقم آگریا که به بیماری جرب معمولی حساس بودند، با آب شسته و در محلول هیپوکلریت‌سدیم ۵/ در صد به مدت ۱۰ دقیقه ضد عفونی و با آب‌مقطر سترون شستشو شدند. سپس با سوزن سترون زخم‌های کوچکی روی غده‌ها ایجاد گردید و به تعداد ۱ تا ۲ عدد در گلدان‌هایی به قطر ۱۵ سانتیمتر حاوی مخلوط ماسه سترون و اینوکولوم به نسبت ۱۰ به ۱ (وزن به حجم) تهیه شده در عمق حدود ۵ سانتی‌متری کاشته شدند . گلدان‌های شاهد نیز یکی فاقد عامل بیماری و دیگری شامل جدایه بیماری‌زا بود. نتایج ۳ تا ٤ ماه بعد در گلخانه بررسی شدند.

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های *Streptomyces* جدا شده از غده‌های سیب‌زمینی آلوده به جرب و خاک

Table 1: Characteristics of *Streptomyces* isolates from infected potato tuber and soil

گروه فنوتیپی Phenotypic group	کد جدایه Isolate code	محل جمع‌آوری Location	رقم /خاک Cultival/Soil	نوع علائم جرب روی غده Symptom
	SA1	آبادهA	آگریاAG	فرو رفته[1]DPS
	SA2	اقلیدE	آگریاAG	برجسته(برآمده)[2]ES
	SA3	شیرازSh	آگریاAG	فرورفتهDPS
	SA4	شیرازSh	آگریاAG	فرورفتهDPS
	SA5	شیرازSh	آگریاAG	فرورفتهDPS
گروه ۱ (group 1)	SA6	شیرازSh	دیامنتDM	زنگاری[3]RS
	SA7	صفاشهرS	آگریاAG	فرورفتهDPS
	SA8	صفاشهرS	آگریاAG	فرورفتهDPS
	SA9	صفاشهرS	مارادونMD	برجستهES
	SA10	صفاشهرS	مارادونMD	برجستهES

www.SID.ir

Archive of SID

Table 1. (continued)

جدول ۱- (ادامه)

SA11	کازرونK	آگریاAG	فرورفتهDPS	
SA12	کازرونK	آگریاAG	زنگاریRS	
SB1	شیرازSh	آگریاAG	زنگاریRS	
SB2	شیرازSh	مارفونMF	زنگاریRS	
SB3	صفاشهرS	آگریاAG	فرورفتهDPS	
SB4	صفاشهرS	آگریاAG	زنگاریRS	گروه ۲(group2)
SB5	خاکSl	مزرعه آلودهIF		
SB6	خاکSl	مزرعه آلوده IF		
SB7	خاکSl	مزرعه سالم NIF		
SB8	خاکSl	مزرعه سالمNIF		
SC1	بوانتB	آگریاAG	فرورفتهDPS	
SC2	شیرازSh	آگریاAG	فرورفتهDPS	
SC3	شیرازSh	آگریاAG	زنگاریRS	
SC4	شیرازSh	مارفونMF	برجستهES	
SC5	صفاشهرS	آگریاAG	فرورفتهDPS	گروه ۳(group3)
SC6	صفاشهرS	آگریاAG	فرورفتهDPS	
SC7	صفاشهرS	مارادونMD	برجستهES	
SC8	کازرونK	آگریاAG	برجستهES	
SC9	خاکSl	مزرعه آلودهIF		
SC10	خاکSl	مزرعه آلودهIF		
SD1	اقلیدE	آگریاAG	فرورفتهDPS	
SD2	شیرازSh	آگریاAG	فرورفتهDPS	
SD3	شیرازSh	آگریاAG	برجستهES	گروه٤ (group 4)
SD4	شیرازSh	دیامنتDM	زنگاریRS	

www.SID.ir

Archive of SID

Table 1. (continued)

جدول ۱- (ادامه)

	SD6	صفاشهرS	آگریاAG	فرورفتهDPS
	SD7	صفاشهر S	مارفوناMF	فرورفته DPS
	SD8	صفاشهرS	مارادوناMD	برجسته ES
	SD9	کازرونK	آگریا AG	زنگاریRS
	SD10	خاکSl	مزرعه آلودهIF	
	SD11	خاکSl	مزرعه آلودهIF	
	SD12	خاکSl	مزرعه آلوده IF	
	SD13	خاکSl	مزرعه سالم NIF	
	SE1	آباده A	آگریاAG	زنگاریRS
	SE2	اقلیدE	آگریاAG	زنگاریRS
	SE3	بوانات B	آگریاAG	توری[4]
	SE4	داراب D	آگریاAG	توری
	SE5	شیرازSh	آگریاAG	زنگاریRS
	SE6	شیرازSh	آگریاAG	زنگاریRS
	SE7	شیرازSh	آگریاAG	توری
	SE8	شیرازSh	آگریاAG	توری
	SE9	شیرازSh	دیامنتDM	زنگاریRS
	SE10	شیرازSh	دیامنت DM	توری
گروه۵(group 5)	SE11	شیرازSh	مارفوناMF	توری
	SE12	صفاشهرS	آگریاAG	زنگاریRS
	SE13	صفاشهرS	دیامنتDM	زنگاریRS
	SE14	کازرونK	آگریا AG	زنگاریRS
	SE15	کازرونK	پیکاسو PS	زنگاریRS
	SE16	خاکSl	مزرعه آلوده IF	

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- (ادامه) Table 1. (continued)

	SE17	خاکSl	مزرعه آلوده IF	
	SE18	خاکSl	مزرعه آلودهIF	
	SE19	خاکSl	مزرعه آلودهIF	
	SE20	خاکSl	مزرعه آلودهIF	
	SE21	خاکSl	مزرعه سالم NIF	
	SE22	خاکSl	مزرعه سالم NIF	
	SF1	شیرازSh	آگریاAG	فرورفته DPS
	SF2	شیرازSh	آگریاAG	زنگاری RS
گروه٦(group 6)	SF3	خاکSl	مزرعه آلودهIF	
	SF4	خاکSl	مزرعه سالمNIF	
	SF5	خاکSl	مزرعه سالمNIF	

DPS = Deep pitted scab -۱ ES= Erumpent scab-۲
RS = Russet scab-۳ NS= Netted scab-۴

A= Abadeh E=Eghlid Sh= Shiraz S= Safashahr K=Kazeroun B= Bavanat D= Darab
SL = Soil AG= Agria DM=Diamont MD=Maradona MF= Marfona PS= Pikasoo IF= Infected field
NIF= Non-infected field

آزمون بیماری‌زایی روی گیاهچه تربچه:

بذور تربچه به طور سطحی با وایتکس ۵ تا ۱۰ درصد به مدت یک دقیقه ضدعفونی گردیدند و به منظور جوانه‌زنی برروی محیط آب آگار یک درصد به مدت ٢٤ ساعت در دمای ٢٥°C نگهداری شدند. بذرهای جوانه زده با سوسپانسیونی از اسپور باکتری (نماینده‌ای ازجدایه‌ها) با غلظت 10^{7} CFU (با جذب نوری ۱ واحد در ٦٠٠ نانومتر) مایه‌زنی گردیدند و در لوله‌های حاوی محیط کشت آب آگار (یک درصد) سترون قرار داده شدند. علائم بیماری روی گیاهچه تربچه یک تا دو هفته بعد بررسی گردید (Schaad *et al*. 2001).

ج- بررسی خصوصیات فنوتیپی

رنگ‌آمیزی گرم براساس روش *ساسلو* و همکاران (Suslow *et al*. 1982) انجام شد. جهت تعیین

www.SID.ir

Archive of SID

نوع زنجیره اسپور، جدایه‌هایی کـه بـر روی محـیط YMEA خـالص شـده بودنـد، بـر روی محـیط آب‌آگار کشت داده گردیدند و سپس از حاشیه پرگنه به وسیله چسب اسپورها برداشته شـدند و بـا استفاده از میکروسـکوپ نـوری بـا بزرگنمـایی 40 X و 100X در حـداقل ده زمینـه میکروسـکوپی مشاهده شدند. برای مشاهده خصوصیات سطح اسپور از میکروسکوپ الکترونی به روش *شیرلینگ و گوتلیب* استفاده شد (Shirling & Gottlieb 1966). جهت بررسی رنگ پرگنه، جدایه‌ها روی محیط YMEA به صورت مخطط کشت داده و رنگ پرگنه ۱۰ تا ۱٤ روز بعد یادداشت شد .

آزمـون رشـد هـوازی و بـی‌هـوازی (O/F) در حضـور گلـوکز بـه روش **هیـو و لایفسـن** (Hugh & Leifson 1953)، توانایی جدایه‌ها در استفاده از قندهای ISP (شامل قنـدهای: ال-آرابینـوز، دی- فروکتـوز، دی-گلـوکز، دی-مـانیتول، رافینـوز، سـوکروز، سـلولز، دی- زایلـوز، رامنـوز، مزواینوسـیتول) و قنـدهای سالیسـین و ریبـوز، بـه روش *لامبـرت و لوریـا* (Lambert & Loria 1989) و اسـتفاده از اسـیدهای آمینـه بـه روش *فـائوکر* و همکـاران (Faucher *et al.* 1993)، بررسی سمیت ناشی از مواد بازدارنده رشد باکتری از محـیط کشـت YMEA حـاوی مـواد بازدارنـده تلورایـت پتاسـیم (µg/ml ۱۰۰ ، ۱۰) اسـتات تـالیوم (µg/ml ۱۰۰ ، ۱۰)، کریستال ویولت (µg/ml ۰/۵)، فنل (µg/ml ۱) و سدیم آزاید (۰/۰۱٪) بـه روش *لامبـرت و لوریـا* (Lambert & Loria 1989) انجام شد. تجزیهٔ پلیمرهای زایلان (Xylan) و زانتین (Xanthine) در محیط Modefied Bennett Agar و تجزیه اسکولین و آربوتین، ارزیابی حساسیت یا مقاومـت جدایـه‌هـا بـه آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط‌کشت همچنین اثر آنتی‌بیوتیک در جلوگیری از رشد جدایه‌ها با دیسک‌هـای آنتـی‌بیوتیـک بـه روش *فـائوکر* و همکـاران (Faucher *et al.* 1993) انجـام شـد. بررسـی فعالیـت آنتـی‌بیوزسـیس جدایـه‌هـا علیـه بـاکتری‌هـایی نظیـر *E. coli*، *Bacillus cereus* ، *Bacillus liquefaciens*، *Klebsiella.* sp ، *Erwinia* spp. و *Pseudomonas* spp. به روش *شاد* و همکاران (Schaad *et al.* 2001) انجام شد. آزمون‌های تحمـل بـه نمـک‌طعـام، رشـد جدایه‌ها در pHهای مختلف و رشد جدایه‌ها در دمای ۳۷°C و بررسی تولید ملانین از تیروزین و سـایر رنگیـزه‌هـا، بـا اسـتفاده از محـیط‌کشـت‌هـای Tyrosine Agar

www.SID.ir

Archive of SID

و PYIA (Pepton-yeast extract iron agar) به روش *شاد* و همکاران (Schaad *et al.* 2001) انجام شد.

د- آزمون PCR جهت تشخیص ژن *nec1*

جهت ردیابی ژن *nec1* که در بیماری‌زایی برخی گونه‌ها نقش دارد از روش PCR استفاده شد. به این منظور اسپور نماینده‌ای از جدایه‌ها به ۵ میلی‌لیتر از محیط سترون CRM (گلوکز ۱۰ گرم، سوکروز ۱۰۳ گرم، کلرید منیزیوم ۱۰/۱۲ گرم، تریپتون ۱۵ گرم، عصاره مخمر ۵ گرم، در لیتر) در لوله‌های آزمایش مایه‌زنی گردید و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۰°C نگهداری شدند. جهت استخراج DNA، ۰/۵ میلی لیتر از سوسپانسیون هر جدایه در لوله‌های اپندورف یک‌ونیم میلی‌لیتری ریخته شد و در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. به رسوب حاصل ۵۰۰ میکرولیتر بافر CTAB (2%(w/v) cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), 1.4 M NaCl, 0.2% 2-mercaptoethanol, 20 mM EDTA, 100 mM tris-HCl (pH 8.0). TE: 10 mM tris-HCl (pH 8.0), 0.2 mM EDTA) (Sambrook *et al.* 1989) اضافه و در دمای ۹۵°C به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه قرار گرفت. سپس ۵۰۰ میکرولیتر کلروفرم به مخلوط اضافه و در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. رونشین به لوله‌های اپندروف منتقل شد و پس از افزودن ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد، مجدداً در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. رسوب حاصل با الکل نیز شستشو داد شده و پس از خشک کردن در معرض هوا ۵۰ میکرولیتر آب مقطر سترون به آن اضافه گردید و به عنوان DNAtemplate در PCR استفاده شد. آغازگرهای اختصاصی Nf و Nr که به ترتیب دارای ترادف‌های ’5-GCAGGTCGTCACGAAGGATCG-3’ و ’ATGAGCGCGAACGGAACGGAAGCCCCGGA-3’ بودند استفاده شد (Kreuze *et al.* 1999). واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر PCR Buffer ×۱۰، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۱۰ pmol از هر یک از آغازگرها، ۰/۵ میکرولیتر از dNTPmix و ۰/۱۵ میکرولیتر از Tag-DNA Polymerase (تهیه شده از شرکت سیناژن) و ۱/۵ میکرولیتر از DNA و آب مقطر سترون انجام گرفت. برای انجام آزمون از دستگاه ترموسا یکلر Biorad استفاده شد که در آن سیکل گرمایی اولیه شامل ۳ دقیقه در ۹۴°C و ۳۰ سیکل شامل ۱

www.SID.ir

Archive of SID

دقیقه در $95^{o}C$، ۱ دقیقه در $60^{o}C$ و ۲ دقیقه در $72^{o}C$ و در نهایت ۱۰ دقیقه در $72^{o}C$ برنامه‌ریزی شده بود (Kreuze *et al.* 1999, Schaad *et al.* 2001).

ژل آگارز یک درصد در بافر TBE براساس روش *شاد* و همکاران (Schaad *et al.* 2001) تهیه و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید صورت گرفت. ژل بر روی صفحه UV transilluminator مورد بررسی و با استفاده از دستگاه Gel documentation مدل (UVP-m-20, Apland, CA-USA) از آن عکسبرداری و با کمک مارکرهای مخصوص وزن مولکولی قطعه تکثیر شده اندازه‌گیری شد.

ه- الکتروفورزپروتئین‌های سلولی:

جهت بررسی تنوع پروتئین‌های سلولی از الکتروفورز عمودی در ژل آکریل‌آمید حاوی سدیم دودسیل سولفات (SDS) و روش *لاملی* (Laemmli 1970) استفاده شد.

جهت استخراج پروتئین‌های سلولی، یک لوپ از اسپور جدایه‌ها به ۵ تا ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت YME مایه‌زنی گردید و به مدت ٢٤ تا ٤٨ ساعت در دستگاه شیکر، در دمای ۳۰°C با سرعت تکان خوردن ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از محیط‌کشت حاوی باکتری در لوله‌های اپندورف ریخته شد و در ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. به رسوب حاصل آب مقطر سترون اضافه گردید و پس از تکان دادن، به کمک سانتریفوژ میسلیوم باکتری رسوب داده شد و عمل شستشو با آب دو تا سه بار تکرار گردید. بر روی رسوب میسلیومی باکتری یک میلی لیتر از بافر A (Tris-HCl, 0.03M, pH7.5; EDTA, 0.002M) اضافه شد. چگالی نوری (OD) به کمک اسپکتروفوتومتر در طول موج ٦٠٠ نانومتر در ۱ تنظیم گردید. آنزیم لیزوزیم به غلظت نهایی ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به هر سوسپانسیون افزوده شد و نمونه‌ها در ۲۷–۳۰°C به مدت ۳۰ دقیقه قرارگرفتند. سدیم دودسیل سولفات (SDS) و ۲–مرکاپتواتانول به غلظت‌های نهایی ۲ درصد به نمونه‌ها اضافه گردید و پس از یک‌بار یخ زدن و ذوب شدن (freezing/thawing)، به مدت۲ تا ۳ دقیقه در ۹۵°C قرار داده شد. سپس نمونه‌ها در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند، رونشین به لوله‌های اپندورف منتقل گردید و در ۲۰°C–تا

www.SID.ir

Archive of SID

زمان استفاده نگهداری شد.

رنگ‌آمیزی ژل در محلول ۰/۱ درصد کومازی بلو در محلول متانول، اسید استیک و آب به نسبت (۵ : ۵ : ۱) به مدت سه ساعت انجام گرفت. عمل رنگبری بوسیله محلول رنگبر (حاوی مخلوط متانول- آب-اسید استیک به نسبت ۱:۵:۵) به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت و سپس از ژل عکس‌برداری شد. جهت نگهداری ژل از اسید استیک ۵٪ استفاده شد (Laemmli 1970 Ausubel *et al.* 1987).

نتیجه

پراکنش بیماری در استان فارس:

علائم بیماری جرب سیب‌زمینی شامل جرب برجسته، جرب فرو رفته و جرب سطحی (زنگاری و توری) با درجات مختلف در مناطق مختلف سیب‌زمینی کاری استان اعم از خرم بید (صفاشهر)، آباده، اقلید، بوانات، شیراز (داریون، سیخ دارنگون و مهارلو)، کازرون (جره و بالاده) و داراب (فسارود) مشاهده شد (شکل ۱). از غده‌های سیب‌زمینی دارای علائم مذکور بر روی محیط YMEA و WA یک باکتری گرم مثبت جداسازی شد که دارای پرگنه‌هایی مجزا و گرد با ظاهر شاخه شاخه، پودری گلسنگی و چرمی به قطر ۱ تا ۱۰ میلی‌متر با رنگ توده اسپور خاکستری روشن، خاکستری، خاکستری تیره، قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای، سفید مایل به کرم و صورتی روشن بودند.

خصوصیات فنوتیپی:

تمامی جدایه‌ها، گرم مثبت و هوازی اجباری بوده که میسلیوم‌های رویشی و میسلیوم‌های هوایی تولید کردند. میسیلیوم‌های هوایی تولید اسپورهایی کرده بودند که به صورت زنجیره‌ای پشت سر هم قرار داشتند و زنجیره‌های اسپور به دو صورت پیچشی (flexuous) و مارپیچی (spiral) دیده شدند. با بررسی الکترون میکروسکوپی، اسپور جدایه صاف مشاهده گردیدند که اندازه آنها در حدود ۱-۰/۸ × ۲-۱/۲ میکرومتر بود. در بررسی فعالیت آنتی‌بیوزیس جدایه‌ها علیه باکتری‌ها ، ۲۷

www.SID.ir

Archive of SID

درصد جدایه‌ها روی *E. coli* و ۸۰ درصد جدایه‌ها بر .*Bacillus* spp موثر بودند ولی بر باکتری‌های دیگر مورد آزمایش تاثیری نداشته با تجزیه و تحلیل خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌ها و مقایسه با خصوصیات گونه‌های مهم بیماری‌زا جدایه‌ها در شش گروه قرار گرفتند (جدول ۲).

جدایه‌های گروه اول دارای رنگ توده اسپور خاکستری، پرگنه قهوه‌ای روشن تا تیره روی محیط YMEA، زنجیره اسپور مارپیچ و سطح اسپور صاف بوده که بر روی محیط‌های تیروزین‌آگار و PYIA تولید ملانین کردند. این جدایه‌ها، همگی از قندهای ال-آرابینوز، دی-فروکتوز، دی-گلوکز، دی-مانیتول، رافینوز، رامنوز، دی-زایلوز، مزواینوسیتول، دی-گالاکتوز و اسیدهای آمینه ال-هیدروکسی پرولین و ال-متیونین استفاده و زایلان را تجزیه کردند. جدایه‌های گروه یک همگی در pHهای ۵/۵ و ٦ و درحضور تلورایت پتاسیم ۱۰µg/mlرشد کرده، ولی هیچکدام از جدایه‌ها در pHهای ٤ و ٤/۵، در حضور نمک‌طعام ۷ و ۱۰ درصد، تالیوم استات ۱۰µg/ml و ۱۰۰µg/ml، کریستال ویولت ۰/۵ µg/ml، فنل ۱/ درصد، سدیم آزاید ۰/۰۱ درصد و استرپتومایسین ۱۰µg/ml قادر به رشد نبوده و زانتین را تجزیه نکردند. با توجه به این ویژگی‌ها، خصوصیات جدایه‌های گروه اول بسیار شبیه به گونه *S. scabies* بود (Faucher *et al.* 1992; Goyer & Beaulieu 1997).

جدایه‌های گروه دوم دارای رنگ توده اسپور خاکستری، پرگنه قهوه‌ای تیره روی محیط YMEA، زنجیره اسپور مارپیچی و سطح اسپور صاف بوده که بر روی محیط‌های تیروزین‌آگار و PYIAتولید ملانین نکردند. جدایه‌های گروه دوم همگی از قندهای ال-آرابینوز، دی-فروکتوز، دی-گلوکز، دی-مانیتول، دی-زایلوز، مزواینوسیتول و دی-گالاکتوز استفاده کرده و در pHهای۵، ۵/۵ و ٦ و در حضور تلورایت پتاسیم ۱۰µg/ml، کریستال ویولت ۰/۵ µg/ml و سدیم پنی‌سیلین جی ۱۰µg/ml همگی قادر به رشد بودند. اکثر جدایه‌های این گروه از سوکروز و ال-متیونین استفاده نکرده و قادر به تجزیه آربوتین و زانتین نبودند. جدایه‌های گروه دوم در بعضی خصوصیات مانند تولید زنجیره اسپور مارپیچ، سطح صاف اسپورها، رنگ توده اسپور خاکستری و رنگ پرگنه قهوه‌ای، با گونه *S. scabies* مشابه بوده ولی قادر به تولید ملانین بر روی محیط تیروزین آگار و PYI

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌های *Streptomyces* جدا شده از غده‌های سیب‌زمینی آلوده به جرب و خاک

Table 2. Morphological and Biochemical characteristics of *streptomyces* isolates from infected tubers and soil

آزمون Test	گروه۱ (۱۲)* Group 1 (12)*	گروه۲ (۸) Group 2 (8)	گروه۳ (۱۰) Group 3 (10)	گروه۴ (۱۳) Group 4 (13)	گروه۵ (۲۲) Group 5 (22)	گروه۶ (۵) Group 6 (5)
رنگ توده اسپور بر روی محیط YMEA Color of spore on YMEA	خاکستری (Gray)	خاکستری (Gray)	سفید مایل به کرم White to Cream	خاکستری روشن تا قهوه‌ای روشن Gray to brown	کرم تا خاکستری روشن Cream to Gray	صورتی روشن Pink
رنگ پرگنه بر روی محیط YMEA Colony color on YMEA	قهوه‌ای روشن تا تیره White Brown to Dark	قهوه‌ای تیره Dark Brown	قهوه‌ای Brown	قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای Brown	زرد تا قهوه‌ای روشن Yellow to Brown	نارنجی Orange
مورفولوژی زنجیر اسپور chain spore Morphology	مارپیچی Spiral	مارپیچی Spiral	پیچشی Flexuous	پیچشی Flexuous	پیچشی Flexuous	پیچشی Flexuous
خصوصیت سطح اسپور Spore Surface Character	صاف Smooth	صاف Smooth	صاف Smooth	صاف Smooth	صاف Smooth	صاف Smooth
تولید ملانین بر روی محیط تیروزین آگار Melanin from tyrosine	+	-	-	-	+	-
تولید پیگمنت بر روی محیط PYA Pigment on PYA	+	-	-	-	-	-
استفاده از منابع کربن: Growth on						
ال-آرابینوز L- Arabinonose	+	+	+	+	+	+
دی-فروکتوز D- Fructose	+	+	+	+	+	+
دی- گلوکز D- Glucose	+	+	+	+	+	+
دی – مانیتول D- Mannitol	+	+	+	+	+	+
رافینوز Raffinose	+	v	+	+	+	v
رامنوز Rammonse	+	v	-	v	+	v
سوکروز Sucrose	+	-	+	v	+	+
دی – زایلوز D- Xyloye	+	+	v	v	v	v
مزو-اینوسیتول Meso-Inositol	+	+	+	v	v	+
دی- گالاکتوز D-Galactose	+	+	+	+	v	+
سالیسین Salicin	+	+	+	+	v	+
ریبوز Ribose	+	+	+	+	+	+
استفاده از منابع نیتروژن: Utilization of nitrogen sources						

www.SID.ir

Archive of SID

Table 2. (countiniue)

جدول ۲– (ادامه)

+	+	v	+	v	+	ال– هیدروکسی پرولین L- Hydroxyprolin
+	v	+	+	–	+	ال– متیونین L-methionin
						تجزیه پلیمرها: **Decompositim of polymeres**
+	+	v	V	–	+	آربوتین Arbutin
+	+	v	+	+	v	اسکولین Escalin
V	+	v	+	–	–	زانتین Xanthin
–	v	v	V	v	+	زایلان Xylan
–	–	–	V	–	–	٤ 4
–	v	v	+	V	–	٤/٥ 4.5
+	+	+	+	+	V	٥ 5
+	+	+	+	+	+	٥/٥ 5.5
+	+	+	+	+	+	٦ 6
						رشد در حضور NaCl : **Growth on Nacl**
+	+	+	+	+	+	٥ در صد 5%
–	v	–	+	V	–	۷ درصد 7%
–	–	–	–	–	–	۱۰ درصد 10%
+	V	+	+	+	+	تلورایت پتاسیم ۱۰ µg/ml Potassium tellorit 10µg/ml
+	V	v	v	+	V	تلورایت پتاسیم ۱۰۰ µg/ml Potassium tellorit 100µg/ml
–	v	v	v	V	–	تالیوم استات ۱۰µg/ml Tallium acetate 10µg/ml
–	–	v	–	–	–	تالیوم استات ۱۰۰ µg/ml Tallium acetate 100µg/ml
V	v	v	+	+	–	کریستال ویولت ۰/٥ µg/ml Crystal violes 0.%5 µg/ml
–	+	v	V	V	–	فنل ۰/۱ درصد

www.SID.ir

Archive of SID

Table 2. (countinue)

+	V	V	V	+	-	Phenol 0.1%
+	+	V			V	Sodium Azid 0.1%
+	V	V				Penicillin 10 µg/ml
-	-	-	V			Penicillin 100 µg/ml
+	V	V		+		Streptomycin 20µg/ml

a) The Numbers of each groups b) 80% or more Positive Reaction
c) 20% or less Negative Reaction d) Variable

جدول ۲- (ادامه)

+	V	V	V	+	-	سدیم آزید ۰/۰۱ درصد
+	+	V		+	V	سدیم آزید ۰/۱ درصد
+	V	V				پنی سیلین ۱۰µg/ml
-	-	-	V			پنی سیلین ۱۰۰ µg/ml
+	V	V		+		استرپتومایسین ۲۰µg/ml

a) تعداد جایگاههای هر گروه b) + به معنی واکنش مثبت ۸۰ درصد یا بیشتر است.
c) - به معنی واکنش منفی ۲۰ درصد یا کمتر است. d) V به معنی واکنش بین ۲۰ تا ۸۰ درصد است.

www.SID.ir

Archive of SID

نبوده و همچنین در بعضی خصوصیات بیوشیمیایی مانند استفاده از قندهای رافنیوز، سوکروز، استفاده از اسید آمینه متیونین، تجزیه پلیمرهای آربوتین و زانتین متفاوت بودند.

جدایه‌های گروه سوم دارای رنگ توده اسپور سفید تا سفید مایل به کرم، رنگ پرگنه قهوه‌ای روی محیط YMEA، زنجیره اسپور پیچشی و سطح اسپور صاف بوده که بر روی محیط‌های تیروزین آگار و PYIA تولید ملانین نکردند. جدایه‌های گروه سوم همگی از قندهای ال-آرابینوز، دی-فروکتوز، دی-گلوکز، دی-مانیتول، مزواینوسیتول، دی-گالاکتوز و ریبوز استفاده کرده و در pHهای ۵، ۵/۵ و ٦ و در حضور تلورایت پتاسیم ۱۰µg/ml و سدیم پنی‌سیلین‌جی ۱۰µg/ml قادر به رشد بودند. این جدایه‌ها در تجزیه پلمیرهای آربوتین، اسکولین، زانتین، زایلان متفاوت عمل کرده ولی، اکثراً قادر به تجزیهٔ این پلیمرها بودند. اکثر جدایه‌های گروه سوم قادر به استفاده از رافینوز به عنوان منبع کربنی نبوده ولی، اکثرا از رامنوز، سوکروز، دی-زایلوز، سالیسین، ال-هیدروکسی‌پرولین و ال-متیونین استفاده کرده و در pH برابر با ٤/٥ و تعدادی نیز در pH ٤ و درحضور استرپتومایسین ۲۰µg/ml قادر به رشد بودند. این جدایه‌ها از نظر تحمل به نمک‌طعام ۵ و ۷ درصد اکثراً متحمل بوده ولی درحضور نمک طعام ۱۰ درصد اکثراً قادر به رشد نبودند. همچنین اکثر آنها درحضور تلورایت پتاسیم µg/ml ۱۰، کریستال ویولت ۰/۵µg/ml، سدیم پنی‌سیلین‌جی ۱۰µg/ml و ۱۰۰µg/ml و در دمای ۳۷° C رشد کرده ولی، در حضور تالیوم استات ۱۰۰µg/ml قادر به رشد نبودند. با توجه به این خصوصیات اکثر جدایه‌های گروه سوم تا حدود زیادی خصوصیات شبیه به گونه *S. acidiscabies* را داشته و تعداد معدودی از جدایه‌ها نیز از نظر خصوصیات مورفولوژی نظیر رنگ توده اسپور، زنجیره اسپور پیچشی، عدم تولید ملانین و بعضی خصوصیات بیوشیمیایی نظیر عدم استفاده از قندهای رافینوز، دی-زایلوز و سوکروز و رشد در حضور فنل ۰/۱ درصد، تالیوم استات ۱۰µg/ml و عدم رشد در حضور کریستال ویولت µg/ml ۰/۵ شباهت‌هایی را با گونهٔ *S. griseus* نشان دادند.

جدایه‌های گروه چهارم دارای رنگ توده اسپور خاکستری روشن تا قهوه‌ای روشن، رنگ پرگنه قهوه‌ای تا قهوه‌ای روشن روی محیط YMEA، زنجیره اسپور پیچشی و سطح اسپور صاف بوده که

www.SID.ir

Archive of SID

بر روی محیط‌های تیروزین آگار و PYIA تولید ملانین نکردند. جدایه‌های گروه چهارم همگی از قندهای ال-آرابینوز، دی-فروکتوز، دی-گلوکز، مزواینوسیتول، دی-گالاکتوز و سالیسین و اکثرا از قندهای رافینوز، رامنوز، سوکروز و اسیدهای آمینه ال-هیدروکسی پرولین و ال-متیونین استفاده کرده ولی، هیچکدام در pH ٤، در حضور نمک‌طعام ۱۰ درصد و استرپتومایسین ۲۰µg/ml قادر به رشد نبودند. اکثر این جدایه‌ها در حضور تلورایت پتاسیم ۱۰µg/ml و سدیم پنی‌سیلین G ۱۰µg/ml رشد کردند. جدایه‌های این گروه از نظر رشد در حضور تلورایت پتاسیم µg/ml ۱۰۰، تالیوم استات ۱۰µg/ml و µg/ml ۱۰۰، کریستال ویولت µg/ml ۰/۵ و فنل ۰/۱ درصد متفاوت عمل کردند. با توجه به این خصوصیات مورفولوژی و بیوشیمیایی، اکثر جدایه‌های گروه چهارم ویژگی‌هایی شبیه به گونه *S. turgidiscabies* را داشتند.

جدایه‌های گروه پنجم که از علائم جرب سطحی شامل جرب زنگاری و جرب توری جداسازی شدند، دارای رنگ تودهٔ اسپور کرم تا خاکستری، رنگ پرگنه کرم، زرد تا قهوه‌ای روشن روی محیط YMEA، زنجیره اسپور پیچشی و سطح اسپور صاف بوده که هیچ کدام قادر به تولید ملانین بر روی محیط تیروزین-آگار و PYIA نبودند. جدایه‌های گروه پنجم همگی از دی-فروکتوز، دی-گلوکز و دی-مانیتول و اکثر جدایه‌ها از ال-آرابینوز، رامنوز، دی-زایلوز، دی-گالاکتوز، سالیسین، ریبوز و اسید آمینه ال-هیدروکسی پرولین استفاده کردند. تقریباً نیمی از جدایه‌ها قادر به استفاده از قندهای رافینوز، سوکروز و رامنوز نبوده و از این نظر متفاوت عمل کردند. اکثر جدایه‌های این گروه قادر به تجزیه پلیمرهای آربوتین، اسکولین و زانتین بودند. هیچکدام از جدایه‌ها در pH ٤ و نمک طعام ۱۰ درصد، تالیوم استات µg/ml ۱۰۰ و استرپتوماسین ۲۰µg/ml رشد نکرده و اکثر جدایه‌ها در pH ۵، در حضور نمک طعام ۵ درصد، تلورایت پتاسیم ۱۰µg/ml و فنل ۰/۱درصد رشد کرده و تعداد کمی در pH ٤/۵، درحضور نمک طعام ۷ درصد و کریستال‌ویولت µg/ml ۰/۵ قادر به رشد بودند. با توجه به این خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، خصوصیات جدایه‌های گروه پنجم اغلب شبیه به خصوصیات گونه‌های عامل جرب سطحی (جرب زنگاری و جرب توری) بوده و از بین گونه‌های ایجادکننده جرب سطحی بیشتر

www.SID.ir

Archive of SID

خصوصیات گونه‌های *S. aureofaciens* و *S. reticuliscabies* را داشتند (Faucher *et al.* 1992, 1993, Loria *et al.* 1997).

جدایه‌های گروه ششم دارای رنگ توده اسپور صورتی روشن، رنگ پرگنه نارنجی تا قهوه‌ای روشن روی محیط YMEA، زنجیره اسپور پیچشی و سطح اسپور صاف بوده که بر روی محیط‌های تیروزین‌آگار و PYIA تولید ملانین نکردند. این جدایه‌ها همگی از قندهای ال-آرابینوز، دی-فروکتوز، دی-گلوکز، رامنوز، دی-زایلوز، دی-گالاکتوز، سالیسین و اسید آمینه‌های ال-هیدروکسی پرولین و ال-متیونین و اکثر جدایه‌ها از قندهای دی-مانیتول و مزواینوسیتول و تعداد کمی از ریبوز استفاده کردند. جدایه‌های این گروه در استفاده از قندهای رافینوز و سوکروز متفاوت عمل کردند. همه این جدایه‌ها در حضور نمک طعام ۵ درصد، تلورایت پتاسیم ۱۰µg/ml، پنی سیلین جی ۱۰µg/ml و ۱۰۰µg/ml و در دمای ۳۷°C رشد کرده، ولی هیچکدام از جدایه‌ها در pHهای ٤ و ٤/٥ و در حضور نمک‌طعام ۱۰ درصد و تالیوم استات ۱۰۰µg/ml و اکثر آنها در حضور نمک‌طعام ۷ درصد، تالیوم استات ۱۰µg/ml و فنل ۰/۱ درصد قادر به رشد نبودند. اکثر جدایه‌های این گروه آربوتین و اسکولین و زانتین را تجزیه کرده و درصد پایینی زایلان را تجزیه کردند. بنابراین، جدایه‌های گروه ششم درخصوصیات مورفولوژی نظیر رنگ توده اسپور بر روی محیط YMEA، داشتن زنجیره اسپور پیچشی، عدم تولید ملانین و بعضی خصوصیات بیوشیمیایی شبیه به گونهٔ *S. acidiscabies* بوده ولی، از نظر رشد در pHهای ٤ و ٤/٥ در حضور فنل ۰/۱ درصد و استرپتومایسین ۲۰µg/ml و استفاده از قندهای رافینوز و ریبوز متفاوت از گونهٔ فوق بودند.

بیماری‌زایی:

از ۳۵ جدایه نماینده، ۲۳ جدایه در شرایط گلخانه بر روی غده‌های سیب‌زمینی علائم بیماری جرب را در درجات مختلف نشان دادند (شکل ۲) و۱۶ جدایه بر روی گیاهچه تربچه نیز بیماریزا بودند. از نه جدایه خاک که در بیماری‌زایی استفاده شد، تنها دو جدایه در شرایط گلخانه بیماری‌زایی را نشان دادند (جدول ۳). از غده‌های سیب‌زمینی دارای علائم جرب مجددا عامل بیماری جداسازی شد که خصوصیاتی شبیه به جدایه‌های اولیه داشتند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- نتایج آزمون بیماری‌زایی ۳۵ جدایه نماینده برروی غده سیب‌زمینی و گیاهچه تربچه و ارتباط آن با ژن *necl*

Table 3. Pathogenicity test of 35 *Streptomyces* isolates on potato tubers and Radish seedling , and its relation with *necl* gene

گروه فنوتیپی Phenotypic group	کد جدایه Isolate code	بیماری‌زایی بر روی غده سیب‌زمینی Pathogenicity on potato tubers	بیماری‌زایی بر روی گیاهچه تربچه Pathogenicity on Radish seedling	وجود ژن *necl* Presence of *necl* gene
S. scabies (استرین مرجع)		+	+	+
		+	+	+
گروه۱(Group 1)	SA1			
	SA2	+	+	
	SA3	+	+	+
	SA7	+	+	
	SA9	+	+	
	SA11	+	+	
	SB1	–	–	
گروه۲(Group 2)	SB3	+	+	-
	SB5	–	–	
	SB7	–	–	
	SC1	+	+	-
	SC2	+	+	+
گروه۳(Group 3)	SC7	+	+	
	SC8	+	+	
	SC9	–	–	
	SD2	+	+	+
	SD3	+	+	
	SD7	+	+	-
گروه٤(Group 4)	SD8	+	+	+
	SD9	+	–	
	SD10	+	–	
	SD11	–	–	
	SE1	+	+	-
	SE3	+	–	-

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- (ادامه) Table 3. (continued)

	–	–	SE4	
گروه۵(Group 5)	–	+	SE5	-
	–	–	SE7	
	–	–	SE11	
	+	+	SE13	–
	–	+	SE15	
	–	+	SE16	-
	–	–	SE17	
	–	–	SE22	
گروه٦Group 6	–	–	SF1	–
	–	–	SF3	

PCR

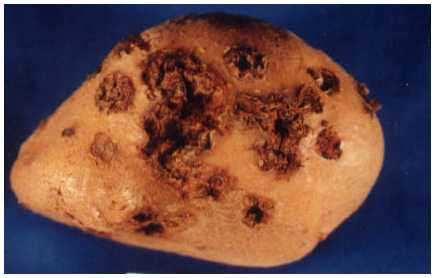
از چهارده جدایه نماینده (۱۳ جدایه بیماری‌زا و ۱ جدایه غیربیماری‌زا) قطعه قابل انتظار ۷۰۰ جفت باز در PCR برای توالی ژن *nec1* تنها در استرین مرجع *S. scabies* (کنترل مثبت)، جدایه‌های SA1 و SA3 ازگروه اول (گروه‌های فنوتیپی) و برخی جدایه‌های نماینده گروه سوم و چهارم (SC2، SD2 وSD8) مشاهده شده، ولی در جدایه‌های نماینده گروه‌های ۲، ۵ و ٦ چنین قطعه‌ای بـه دسـت نیامد (جدول ۳ و شکل ۳).

خصوصیات نقوش الکترو فورز پروتئین‌های سلولی

نقوش الکتروفورزی جدایه‌های نماینده، در تعدادی از جدایه‌ها با هم متفاوت و در بعضی کـم و بیش شباهت داشتند. جدایه‌هـای SA1 و SA3 از گـروه اول بـا جدایـه SD7 از گـروه چهـارم در آرایش باندها مشابه بوده و با استرین مرجع *S. scabies* شباهت بالایی را نشـان دادنـد. جدایـه‌هـای SB1 وSB3 از گروه دوم در نقوش باندهای الکتروفورز با یکدیگر شبیه بوده و در داشتن یـک پروتئین سبکتر با استرین مرجع *S. scabies* تفاوت داشتند. جدایه‌هـای SC1 و SC2 بـا داشـتن یـک پروتئین سبکتر، از بقیه جدایه‌ها متمایز بوده و در محل قرار گیری یک باند مشخص با جدایـه‌هـای SB1، SB3 و استرین تیپ *S. scabies* مشابه بودند. جدایـه‌هـای SC5، SC7 و SC9 از گـروه سـوم و جدایه SD10 از گروه چهارم در آرایش باندها مشابه بوده و با جدایه‌های SA1 و SA3 از گروه اول،

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- علائم ایجادشده توسط جدایه‌های *Streptomyces*. sp.

بر روی غده سیب‌زمینی؛ جرب فرورفته (۱)، جرب برجسته (۲)، جرب سطحی (۳).

Fig. 1. Symptoms of potato Scab caused by *Sterptomyces* spp.

1: Deep-pitted scab, 2: Erumpent scab, 3: Cork or superficial scap

www.SID.ir

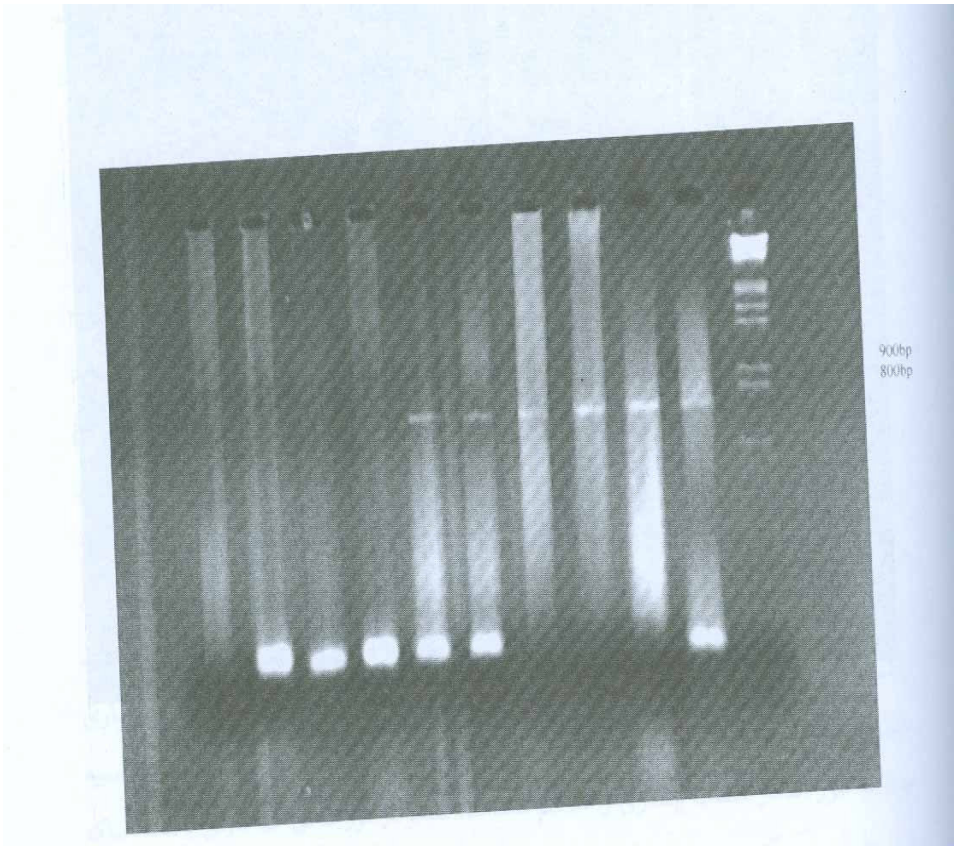
Archive of SID

شکل ۲- علائم حاصل از آزمون بیماری‌زایی بر روی غده سیب‌زمینی رقم آگریا.

Fig. 2. Symptoms of scab from pathogenicity test on potato buers var. Agria.

www.SID.ir

Archive of SID



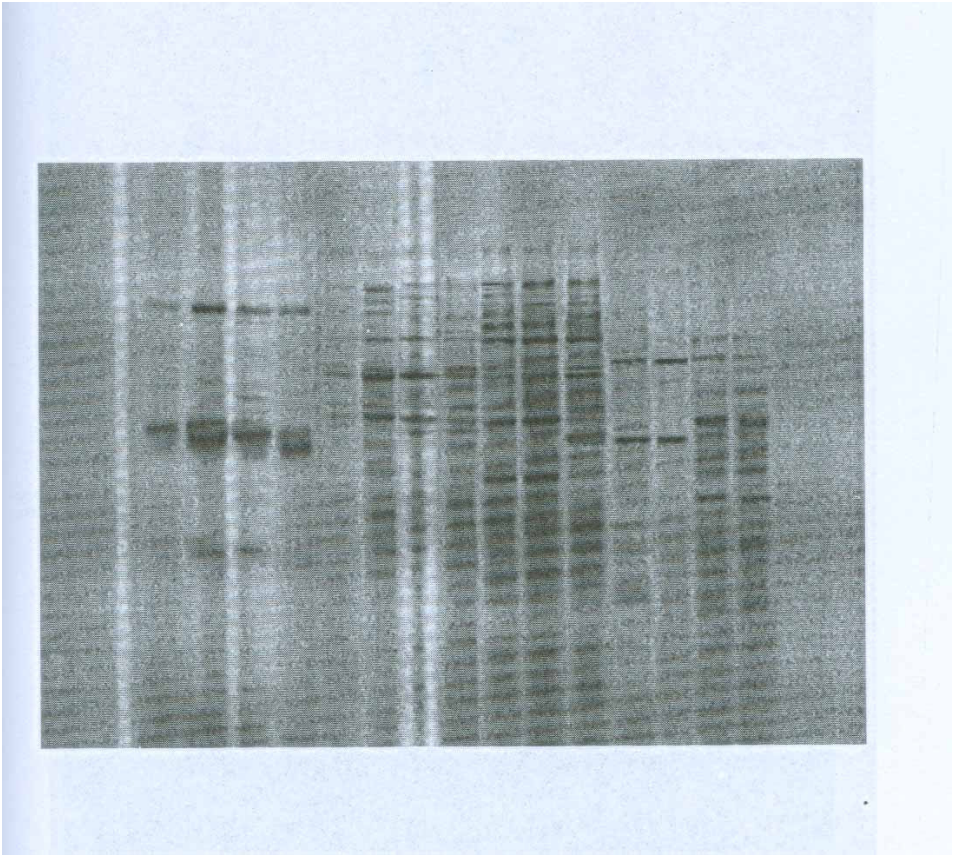
شکل ۳- الکتروفورز محصول PCR ژن *nec1* در جدایه‌های *Streptomyces*.

(از راست به چپ:۱) مارکر؛۲) *S. scabies* (استری‌ن مرجع)؛ ۷-۳) جدایه‌های SA1، SA3، SC2، SD2، SD8، SB3، SE16، SF1 ؛۱۱- شاهد

Fig. 3. Electrophoretic Analysis of PCR products with *nec1* gene primers, from right to left : Lane 1: molecular marker , Lane 2 : *S. scabies* (reference strain) , Lane 3 – 7 : SA1, SA3, SC2, SD2, SD8 isolates , Lane 8-10 : SB3, SE16, SF1 isolates , Lane 11, water control.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۴- نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی جدایه‌های *Streptomyces* جدا شده از غده آلوده به جرب و خاک. از راست به چپ: SC2، SC1، SE5، SF3، SF1، SB3، SB1، استری‌ن مرجع (*S. scabies*)، SA3، SA1، SD8، SE16، SE13، SE1، SD10.

Fig. 4. Electrophoresis of whole cell proteins of *Streptomyces* isolates from infected potato tubers and soil. From right to left : SC2, SC1, SE5, SF3, SF1, SB3, SB1, *S. scabies* (reference strain), SA3, SA1, SD8, SE16, SE13, SE1, SD10.

www.SID.ir

Archive of SID

جدایه SD7 از گروه چهارم، جدایه‌های SB1 و SB3 از گروه دوم و استرین مرجع *S. scabies* تفاوت کلی نشان دادند. جدایه‌های SE3 و SE5 از گروه پنجم در نقوش الکتروفورزی کم و بیش مشابه بوده و در محل قرار گیری یک باند مشخص با جدایه SF1 از گروه ششم و جدایه‌های SC5، SC7، SC9 و SD10 مشابه بودند. جدایه SF1 از گروه ششم با استرین مرجع *S. scabies* به‌طور مشخص در داشتن یک پروتئین سبکتر متفاوت بود (شکل ۴).

بحث

در نمونه‌برداری در فصول مختلف سال در استان فارس علائم بیماری جرب در درجات مختلف بر روی سیب زمینی مشاهده گردید. در مناطق مختلف صفاشهر علائم جرب فرو رفته و برجسته بخصوص در روی ارقام مارادونا و آگریا به وفور مشاهده شد. در شیراز (داریون، سیخ دارنگون، مهارلو) و کازرون علائم جرب زنگاری و توری روی ارقام آگریا، مارفونا و دیامنت بسیار زیادتر از جرب فرو رفته و برجسته مشاهده گردید.

احتمالاً علائم و شدت مختلف بیماری در مناطق مذکور به حساسیت ارقام سیب‌زمینی، پرآزاری عامل بیماری‌زا، بافت و pH خاک، نوع آبیاری مربوط می‌شود. در دو مزرعه با شرایط یکسان که تنها در نوع رقم و یا بافت خاک و یا نوع آبیاری با هم متفاوت بودند، شدت بیماری متفاوت مشاهده شد. برای مثال در دو مزرعه که شرایط کشت و مدیریت زراعی کاملاً به هم شبیه بوده به طور آشکار شدت بیماری و علائم مشاهده شده در مزرعه‌ای که دارای بافت خاک شنی–لومی و سبکتر بود بیشتر بود.

جدایه‌های نماینده گروه اول شامل SA1، SA2، SA3، SA7، SA9 و SA11، جدایه SB3 از گروه دوم، جدایه‌های SC1، SC2، SC7، SC8 از گروه سوم، جدایه‌های SD2، SD3، SD7 و SD8 از گروه چهارم و جدایه‌های SE1 و SE13 از گروه پنجم علائم بیماری جرب معمولی را بر روی غده‌های سیب زمینی ایجاد کرده و بر روی گیاهچه تربچه هم بیماری‌زا بودند. علائم ایجاد شده روی سیب‌زمینی توسط جدایه های مدکور شبیه به بیماری جرب معمولی سیب زمینی و یکسان بود.

www.SID.ir

Archive of SID

برخی از جدایه‌های گروه‌های دوم، سوم، چهارم، پنجم و ششم شامل SB1، SB5، SB7، SC9، SD11، SE4، SE7، SE11، SE17، SE22، SF1 و SF3، بر روی غده سیب‌زمینی و گیاهچه تربچه بیماری‌زا نبودند. تعدادی از جدایه‌های گروه‌های چهارم و پنجم از قبیل SD9، SD10، SE3، SE5، SE15 و SE16 تنها بر روی غده‌های سیب‌زمینی بیماری‌زایی را نشان داده و بر گیاهچه تربچه بی‌تاثیر بودند. وجود ژن *nec1* به عنوان ژن عامل بیماری‌زایی در برخی گونه‌های *Streptomyces* شناخته‌شده است (Kreuze *et al.* 1999). با استفاده از روش PCR وجود ژن مذکور در جدایه‌های SA1 و SA3 از گروه اول، SC2 از گروه سوم، SD2 و SD8 از گروه چهارم و جدایه مرجع *S. scabies* نشان داده شد. در جدایه‌های بیماری‌زای SB3 از گروه دوم، SC1 از گروه سوم، SD7 از گروه چهارم، SE1، SE3، SE5، SE13 و SE16 از گروه پنجم و جدایه غیر بیماری‌زای SF1 از گروه ششم قطعه مورد انتظار حدود ۷۰۰ جفت‌باز در PCR تکثیر نشد. تمام جدایه‌هایی که واجد ژن *nec1* بودند، علائم جرب را بر روی غده‌های سیب‌زمینی و بیماری‌زایی را روی گیاهچه تربچه نشان دادند. ژن پرآزاری *nec1* به همراه ORFها، به‌طور افقی بین جدایه‌های *S. scabies*، *S. acidiscabies* و *S. turgidiscabies* انتقال یافته و به نظر می‌رسد انتقال افقی ژن *nec1* نقش مهمی در تکامل بیماری‌زایی در این سه گونه داشته باشد، ولی ژن *nec1* در بعضی از گونه‌های بیماریزا نظیر *S. reticuliscabies* و *S. ipomoea* وجود ندارد (Kreuze *et al.* 1999).

علائم کاهش رشد، هیپرتروفی و یا بافت مردگی بر روی گیاهچه تربچه که توسط برخی از جدایه‌های بیماری‌زا ایجاد شده، به ترشح تاکستومین توسط آنها نسبتا داده می‌شود (Loria *et al.* 1995). تیمار گیاهچه‌های تربچه با تاکستومین A سبب کاهش رشد گیاهچه‌ها شده و رشد آنها با افزایش غلظت تاکستومین A به مقدار بیشتری کاهش یافته که تاثیر آن روی ریشه تربچه به صورت ایجاد تورم‌هایی روی ریشه بوده است (Leiner *et al.* 1996). تنوع علائم حاصله از *S. scabies* روی غده سیب‌زمینی ناشی از تاکستومین می‌باشد، زیرا این توکسین روی گیاهچه‌ها سبب بروز علائم بیماری شده است. تاکنون تمام جدایه‌های *Streptomyces* که روی سیب‌زمینی بیماری‌زا بوده‌اند، در شرایط آزمایشگاهی تولید تاکستومین کرده‌اند و جدایه‌هایی که تولید

www.SID.ir

Archive of SID

تاکستومین نکرده‌اند قادر به ایجاد بیماری نبوده‌اند (King *et al*. 1991, Loria, *et al.* 1995).

تمام جدایه‌های غیر بیماری‌زای *Streptomyces* که تاکنون بررسی شده‌اند، قادر به تولید تاکستومین نبوده‌اند. DNA استخراج شده از این جدایه‌ها با ژن *nec 1* که در جدایه‌های بیماری‌زا وجود دارد هیبرید نشده است. ژن *necl* به طور فیزیکی به ژن‌های بیوسنتز کننده تاکستومین A متصل است (Bukhalid & Loria 1997).

از جدایه‌های بیماری‌زای گروه پنجم که از غده‌های دارای علائم جرب سطحی (جرب زنگاری و توری) جداسازی شدند، تنها جدایه‌های SE1 و SE13 بر روی گیاهچه تربچه بیماری‌زا بوده و جدایه‌های SE3 ، SE5 ، SE6 و هیچ گونه علائمی روی گیاهچه تربچه نشان ندادند. جدایه‌های SE1 و SE13 از غده‌های دارای علائم جرب زنگاری و جدایه‌های SE3 ، SE5 ، SE6 و SE17 از غده‌های دارای علائم جرب توری جداسازی شدند. در جرب توری علائم روی غده به صورت هیپرتروفی (علائم حاصل از تاکستومین) نبوده و اطلاعاتی در مورد تاکستومین و سایر توکسین‌های تولیدی توسط عامل جرب توری وجود نداشته و احتمالا دارای فاکتورهای بیماری‌زایی متفاوت می‌باشند (Bukhalid *et al.* 1998, King *et al.* 1991) .

جرب توری در شرایط اسیدی و مرطوب و دمای پایین توسط برخی گونه‌های *Streptomyces* مثل *S. aureofaciens* و *S. griseus* ایجاد می‌شود. برخی از جدایه‌های *S. scabies* با قدرت بیماری‌زایی کم نیز این نوع علائم را روی غده ایجاد کرده‌اند (Ndowora 1996, Loria *et al.* 1997).

جدایه‌های گروه اول، سوم و چهارم بیشتر از علائم جرب فرورفته و برجسته و جدایه‌های گروه پنجم از غده‌های دارای علائم جرب سطحی جداسازی شدند. جدایه‌های خاک در گروه‌های دوم، سوم، چهارم، پنجم و ششم قرار گرفتند و جدایه‌های گروه اول فقط از غده‌های آلوده جداسازی شدند. گونه‌های مختلف جنس *Streptomyces* بسته به شرایط محیطی، شدت پرآزاری جدایه باکتری و رقم میزبان علائم متفاوتی را ایجاد کرده و حتی در یک گروه فنوتیپی علائم متنوع دیده می‌شود. نوع و شدت علائم جرب به میزان زیادی تحت تاثیر دما می‌باشد، به طوری که در

www.SID.ir

Archive of SID

دمای ۱۰ تا ۱۵ درجه سانتی‌گراد جدایه‌هایی از *S. scabies* ، *S. stelliscabies* و *S. europaeiscabies* هیچ گونه علائمی ایجاد نکرده، در صورتی که در جدایه‌هایی از *S. reticuliscabies* بیشترین علائم در دمای ۱۵°C–۱۰ مشاهده شده است. بهترین دما (خاک) برای توسعه جرب معمولی و توری به ترتیب ۲۴°C–۱۹ و ۱۷°C–۱۳ می‌باشد (Faucher *et al.* 1992).

نقوش الکتروفورز پروتئین‌های سلولی جدایه‌های نماینده، شش گروه متفاوت را نشان دادند در جدایه‌هایی از گروه پنجم (SE3 با SE5) و در جدایه‌هایی از گروه چهارم (SD8 با SD10) تفاوت‌های آشکاری در نقوش الکتروفورزی مشاهده شد، در صورتی که جدایه‌های گروه دوم با یکدیگر شبیه و جدایه‌های گروه اول نیز در نقوش الکتروفورز پروتئین‌های سلولی مشابه بودند. جدایه‌های *Streptomyces* عامل بیماری جرب سیب‌زمینی از مناطق مختلف ایران را براساس الگوی الکتروفورز پروتئین در سه گروه عمده قرار گرفته‌اند (Khodakaramian *et al.* 2003). جدایه‌های گروه اول به استرین استاندارد *S. scabies* و جدایه‌های گروه دوم به استرین استاندارد *S. acidisabies* شباهت داشتند. جدایه‌های گروه سوم شباهت کمتری با دو گروه قبل داشته و دارای الگوی پروتئینی متنوعی بودند که بیانگر تنوع بالا و ناهمگن بودن جدایه‌های عامل بیماری جرب سیب‌زمینی می‌باشد.

عینی و همکاران (Eini *et al.* 2003) گونه‌های *S. scabies* ، *S. acidiscabies* ، *S. auropaescabies* ، *S. griseus* ، *S. stelliscabies* ، *S. tesda* و *S. turgidiscabies* را به‌عنوان عامل جرب سیب‌زمینی معرفی کرده‌اند. نتایج به دست آمده با نتایج ارائه شده توسط عینی و همکاران (Eini *et al.* 2003) در مواردی مشابه بوده، ولی در تعدادی از گونه‌های تشخیص داده شده تفاوت داشتند. خصوصیات جدایه‌های گروه یک و دو که به *S. scabies* شبیه بودند در بیشتر موارد به گروه یک عینی و همکاران (Eini *et al.* 2003) شباهت دارد. جدایه‌های گروه سوم که بیشترین شباهت به *S. acidisabies* داشته و در برخی از خصوصیات شبیه به گونه *S. griseus* بودند بیشترین شباهت با گروه پنجم عینی و همکاران (Eini *et al.* 2003) دارد. اغلب جدایه‌های گروه چهارم خصوصیات شبیه به *S. turgidiscabies* را داشتند که با جدایه‌های گروه دوم عینی و همکاران (Eini *et al.* 2003)

www.SID.ir

Archive of SID

شباهت داشت. خصوصیات جدایه‌های گروه پنجم که از علائم جرب سطحی (جرب زنگاری و جرب توری) جدا شده و به گونه‌های *S. reticaliscabies, S. aureofaciens* شبیه بودند، با هیچ یک از گروه‌های گزارش شده توسط عینی و همکاران (Eini *et al.* 2003) مطابقت نداشت. جدایه‌های گروه ششم که از سیب‌زمینی دارای علائم فرورفته و برجسته و همچنین از خاک جدا شده بودند، در خصوصیات مرفولوژیکی و برخی خصوصیات بیوشیمیایی به گونه *S. acidiscabies* شباهت داشت که در بعضی از خصوصیات با جدایه‌های گروه پنجم عینی و همکاران (Eini *et al.* 2003) شباهت دارد.

بنابراین، گونه‌های *Streptomyces* عامل جرب سیب‌زمینی در ایران متنوع بوده و خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی و بیماریزائی جدایه‌های ایران با جدایه‌هایی که از سایر نقاط دنیا گزارش شده‌اند کم و بیش تفاوت دارند. با توجه به خصوصیات متنوع این جدایه‌ها و ناهمگن بودن، برای تشخیص قطعی نیاز به مطالعات دقیق‌تری براساس همولوژی DNA، بررسی الگوهای اسیدهای چرب و پروتئین‌های سلولی و بیماری‌زایی آنها می‌باشد.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (26-23) متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نویسندگان: سید محسن تقوی و محمد مهدی فقیهی بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

www.SID.ir