DOI: http://dx.doi.org/10.22092/jaep.2011.107233

آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۷۹، شماره ۱، شهریور ۱۳۹۰

تنوع استرین‌های استرپتومایسس عامل بیماری اسکب سیب‌زمینی در استان همدان و توانایی آن‌ها در تولید تاکستومین

Diversity of Streptomyces strains causing potato scab disease in Hamedan province and their thaxtomin production potential

غلام خداکرمیان*، دوستمراد ظفری و محمدجواد سلیمانی‌پری
گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان
(تاریخ دریافت: آبان ۱۳۸۹، تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۸۹)

چکیده

استان همدان یکی از مناطق مهم کشت سیب‌زمینی ایران است. در مناطق سیب‌زمینی کاری این استان بیماری اسکب روی این محصول فراگیر بوده و یکی از بیماری‌های مهم به شمار می‌رود. غده‌های سیب‌زمینی دارای علایم بیماری اسکب شامل لکه‌های برجسته و حفره‌ای از مناطق کشت سیب‌زمینی گردآوری شد. از زخم‌های برجسته تعداد ۲۵ استرین و از زخم‌های حفره‌ای تعداد ۲۰ استرین *Streptomyces* با روش استاندارد جدا شد. بیماری‌زایی استرین‌ها روی غده‌های نارس و بوته‌های سیب‌زمینی به اثبات رسید. علایم بیماری روی غده‌های سیب‌زمینی در اثر استرین‌های مختلف متفاوت بود. این تنوع در پروفیل پروتئین‌های الکتروفورز شده استرین‌های مورد بررسی، مشهود بود. استرین‌های *Streptomyces* جدا شده دارای رنگ کلنی خاکستری و سفید مایل به خاکستری روی محیط کشت YMEA بودند و اسپورها ۵ تا ۱۰ روز پس از کشت به صورت زنجیری مارپیچ یا خمیده (Flexuous) و مستقیم در انتهای میسلیوم‌های هوایی ظاهر شدند. تمامی‌استرین‌های انتخاب شده وابسته به جنس *Streptomyces* بوده و بیشتر آن‌ها از دی فروکتوز، مانیتول، دی گلوکز، رافینوز، رامنوز، سوکروز،

* **Corresponding author:** Khodakaramian@yahoo.com

دی زایلوز، مزواینوزیتول و آرابینوز به عنوان تنها منبع کربن استفاده کردند. استرین‌های جدا شده در سه گروه جداگانه قرار گرفتند. استرین‌های گروه یک از تیروزین رنگدانه ملانین تولید کرده و به عنوان *S. scabies* تشخیص داده شدند. استرین‌های گروه دوم و سوم به ترتیب به عنوان *S. acidiscabies* و *Sterptomyces* sp. مشخص شدند. تاکنون سه فیتوتوکسین thaxtomin، concanamycin و ترکیبی به نام FD-891 به عنوان فاکتورهای بیماری‌زایی در استرین‌های مختلف *Streptomyces* بیماری‌زای سیب‌زمینی در سراسر دنیا گزارش شده‌اند. تمام این توکسین‌ها علائم برجسته، توری و یا زنگاری روی غده‌های سیب‌زمینی ایجاد می‌نمایند. توکسین‌های تولید شده در محیط کشت oatmeal broth پس از فیلتر شدن به وسیله استون استخراج شدند. توکسین‌های استخراج شده توسط دستگاه rotary evaporator تغلیظ شده و با کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) آنالیز شدند. نتایج نشان داد که تنها استرین‌های عامل ایجاد لکه‌های برجسته از جمله استرین استاندارد EF-35 تاکستومین تولید نمودند. استرین‌های عامل اسکب حفره‌ای سیب‌زمینی تاکستومین و کونکانامایسین را به عنوان فاکتور بیماری‌زایی تولید نکردند، لیکن ترکیب ناشناخته دیگری تولید نمودند که ممکن است فاکتور بیماری زایی باشد. شناسایی و تعیین ویژگی‌های این فاکتور جدید بیماری‌زایی در مدیریت آتی بیماری بسیار مهم است.

واژه‌های کلیدی: بیماری اسکب حفره‌ای سیب‌زمینی، Thaxtomin، Concanamycin، *Streptomyces scabies*، *Streptomyces acidiscabiess*،

Abstract

Hamedan province is one of the main potato growing areas in Iran. Potaoto scab disease caused by *Streptomyces* spp. is one of the prevalent and important diseases of potato in this provice. Potato tubers with symptoms of scab diseases including raised and deep or shallow pitted lesion were collected from potato growing area in this region. A total of 20 and 25 strains of *Streptomyces* were isolated from raised and pitted lesions on potato tubers respectively. The pathogenicity of these strains was confirmed on potato mini tubers and mature plants under greenhouse condition. Different isolated scab inducing *Streptomyces* strains showed diverse of symptoms on potato tubers. Protein electrophoretic profiles of the

Streptomyces indicated diversity among the isolated strains. Colony color of the isolated *Streptomyces* strains on YMEA medium was grey and white-grey and they formed spiral or flexous spore chain on their aerial mycelium five to 10 days after cultivation. All selected strains were belonged to the *Streptomyces* genus and most of them used D-fructose, manitol, D-glucose, raffinose, rhamnose, sucrose, D-xylose, meso-inusitol and arabinose as a sole source of carbon. Phenotypic characteristics of the tested strains showed that they were belong to *Streptomyces* and includs three groups. First group of the strains produced melanin pigment from tyrosine and they were identified as *S. scabies*. Strains of the second and third groups were identified as *S. acidiscabies*, and *Streptomyces* sp. respectively.

Untill now three phytotoxins including thaxtomine (the main pathogenicity factor), concanamycine and FD-891 compound were reported as pathogenicity factor of the *Streptomyces* strains inducing potato scab disease all over the world. All of these phytotoxins induce raised, russeted or neted lesion on potato tubers. Phytotoxins were extracted from culture filterate of the tested *Streptomyces* strains grown in oatmeal broth using aseton. The extracted phytotoxins were concentrated by rotary evaporator and were subjected to thin layer chromatography (TLC). Results showed that only raised, russeted or neted lesion inducing strains including *S. scabies* EF-35 produced thaxtomin. Potato pitted inducing *Streptomyces* strains did not produced thaxtomin or concanamycin as pathogenicity factors however they produced an unknown compound which maybe a new pathogenicity factor. Characterization of this new pathogenicity factor is very important for management of the disease in the future.

Key words: Potato pitted scab disease, Thaxtomin, Concanamycine, *Streptomyces scabies, Streptomyces acidi scabies*

مقدمه

در ایران حدود ۱۷۰ هزار هکتار زیر کشت سیب‌زمینی بوده و تولید سالیانه آن حدود ۱۰ میلیون تن است که پانزده درصد آن در استان همدان تولید می‌شود (Anonymous, 2007).

یکی از بیماری‌های مهم سیب‌زمینی که میزان محصول و بازارپسندی آن را کاهش می‌دهد بیماری اسکب یا جرب است. بیماری اسکب سیب‌زمینی در بیشتر مناطق کشت این محصول در شمال آمریکا، شرق کانادا، اروپای شرقی و غربی، آفریقای جنوبی، استرالیا، نیوزلند و کشورهای آسیایی مشاهده و باعث زیان اقتصادی فراوانی شده است (Lambert and Loria,

1989; Healy and Lambert, 1991; Loria *et al.*, 1997; Paradis *et al.*, 1994). بیماری اسکب معمولی سیب‌زمینی نخستین بار در سال ۱۸۲۵ در آمریکا دیده شد و تا سال ۱۸۹۱ وضعیت عامل بیماری مشخص نبود (Goto, 1992). در سال ۱۸۹۰ Thaxter عامل بیماری را *Oospora scabies* معرفی کرد که در سال ۱۹۱٤ توسط گوسو (Gussow) به *Actinomyces scabies* و در سال ۱۹٤۸ توسط Waksman and Henrici (1948) به *S. scabies* تغییر نام داد (Lambert and Loria, 1989).

هم اکنون عامل این بیماری در تمام مناطق زیر کشت سیب‌زمینی در ایران وجود دارد و به همین خاطر بررسی عوامل ایجاد بیماری به منظور کنترل آن اهمیت زیادی دارد (Khodakaramian *et al*., 2003).

علایم بیماری شامل لکه‌های برجسته، توری مانند، فرورفته عمیق یا سطحی است. این بیماری علاوه بر کاهش میزان محصول در مزرعه، بازارپسندی و ویژگی انباری سیب‌زمینی را نیز کاهش می‌دهد. طبق بررسی‌های به عمل آمده در استان همدان تمامی مزارع کشت سیب‌زمینی، به بیماری اسکب آلوده بوده و در برخی مناطق شدت آلودگی زیاد است (Khodakaramian *et al*., 2003). اهمیت این بیماری به خاطر کاهش بازارپسندی، تخریب غده‌های بذری و انتقال آن توسط غده‌های آلوده است. از آنجا که استرین‌های عامل بیماری اسکب سیب‌زمینی علایم متنوعی شامل لکه‌های برجسته، توری و حفره‌ای روی غده‌های سیب‌زمینی ایجاد می‌کنند، به نظر می‌رسد که علایم بیماری تحت تأثیر نوع استرین و شرایط محیطی است. اولین مورد بررسی ژنتیک استرین‌های بیماری‌زا منجر به شناسایی ژن *nec1* به عنوان ژن بیماری‌زایی در *Streptomyces* گردید (Bukhalid *et al.*, 1998). پس از آن ژن‌های مسئول بیوسنتز تاکستومین که مهم‌ترین توکسین باکتری عامل بیماری است شناسایی شدند (Healy *et al.*, 2000; 2002).

عامل بیماری اسکب سیب‌زمینی گونه‌های مختلف جنس *Streptomyces* می‌باشد. تا کنون بیش از ۱۰ گونه *Streptomyces* به عنوان عامل این بیماری معرفی شده‌اند. از جمله این گونه‌ها می‌توان به *S. scabies*، *S. acidiecabies*، *S. caviscabies*، *S. turgidiscabies*، *S. euro-paeiscabiei*، *S. stelliscabiei*، *S. reticuliscabiei*، *S. puniciscabiei*، *S. luridiscabiei* و *S. niveiscabiei* اشاره

کرد. در سال ۱۹٦۸از مزارع با خاک‌های اسیدی گونـه‌ای استرپتومایـسس جداسـازی شـد کـه توسط Lambert and Loria (1989) به عنوان *S. acidiscabies* معرفی گردید.

Archuleta and Easton (1981) ۳۵۱ اسـترین *Streptomyces* عامـل جـرب حفـره‌ای را در واشـنگتن از غـده‌هـای سـیب زمینـی جداسـازی کردنـد و چهـار گونـه *S. atrooliveaceus*، *S. resistomyeificu*، *S. lidicus* و *S. diastatochromogenes* را بـه عنـوان عوامـل بیمـاری معرفـی کردند. در بررسی دیگر Miyajima *et al.*, (1998) گونه *S. turgidiscabies* را از جزیـره هوکایـدو ژاپن گزارش کردند. بررسی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی عامل اسکب معمولی و توری نشان داده که سه گونه جدید به نام‌هـای *S .europaeiscabies*، *S. stelliscabies* و *S. reticuliscabies* نیـز عامـل بیمـاری هـستند (BouCheek-Mechiche *et al.*, 2000). Park *et al.* (2001) سـه گونـه جدیـد *S. niveiscabiei*، *S. uniciscabi* و *S. lurdiscabiei* را از زخـم‌هـای برجـسته سـیب‌زمینـی‌هـای گردآوری شده از کشور کره جدا و شناسایی کردند.

از شش ایالت آمریکا استرین‌های *Streptomyces* عامل اسکب سیب‌زمینی گردآوری شده و بررسی تنوع آن‌ها بر مبنای توالی 16s rDNA نشان داده کـه حـدود ۵۰٪ اسـترین‌هـا متعلـق بـه *S. scabies* یا *S. europaeiscabiei* هستند. از این مناطق *S. turgidiscabies* نیـز جداسـازی شـد و بقیه ناشناخته ماندند ولی همه آن‌ها در تولید توکسین بیمـاری‌زای تاکـستومین مـشترک بودنـد (Wanner, 2006). در شـرق کانـادا تنـوع ژنتیکـی اسـترین‌هـای *Streptomyces* عامـل اسـکب سیب‌زمینی بر اساس توالی نسبی 16sRNA بررسی شده و مشخص شده که بیشتر استرین‌هـای بررسی شده به *S. scabies* شباهت داشته و تعداد کمی از آن‌هـا نیـز بـه عنـوان *S. acidiscabies* تشخیص داده شدند (St-Onge *et al.*, 2008). تحقیقات انجام شده روی فاکتورهای بیوشـیمیایی بیماری‌زایی تولید شده توسط گونه‌های *Streptomyces* منجر به کشف سه توکسین گیاه سوز بـه نام‌های thaxtomin (King *et al.*, 1989; 1991)، concanamycin (Natsume *et al.*, 2001) و ترکیبـی به نام FD-891 (Natsume *et al.*, 2005) شده است. تاکستومین مهم‌ترین و مخرب‌ترین توکـسین ترشح شده توسط گونه‌های *Streptomyces* عامل بیماری اسکب معمولی سیب زمینی است. این توکسین دارای فرم‌های گوناگونی است که فرم A مخرب‌ترین آن‌ها اسـت (King *et al.,* 1989; 1991; Goyer *et al.*, 2000).

هدف این پژوهش علاوه بر بررسی تنوع گونه‌های *Streptomyces* بیماری‌زای سیب‌زمینی در استان همدان، ردیابی تاکستومین تولید شده توسط گونه‌های *Streptomyces* عامل ایجاد بیماری اسکب حفره‌ای است تا در بررسی‌های دراز مدت مدیریت کنترل بیماری اسکب سیب‌زمینی در آینده مورد استفاده قرار گیرد.

روش بررسی

نمونه‌برداری غده‌های آلوده سیب‌زمینی و جداسازی باکتری بیماری‌زا از آن‌ها: از مزارع مختلف سیب‌زمینی استان همدان که در آن‌ها ارقام مختلف از جمله مارفونا و آگریا کشت می‌شود هنگام برداشت بازدید شد. به طور تصادفی از غده‌های دارای علائم بیماری اسکب تعداد ۱۰۰ غده شامل ۵۰ نمونه دارای علائم اسکب حفره‌ای و ۵۰ نمونه دارای اسکب برجسته و توری و زنگاری گردآوری شد. پس از ثبت مشخصات، نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند. برای جداسازی باکتری عامل بیماری، ابتدا غده‌ها زیر جریان ملایم شیر آب شسته شدند. سپس به ترتیب غده‌های دارای علایم سطحی با وایتکس پنج درصد و غده‌های دارای علایم عمیق با وایتکس ۱۰ درصد (از ماده تجاری) ضدعفونی و پس از آن با آب مقطر استریل تا زدودن وایتکس شستشو شدند. از لایه نازک زیر ناحیه آلوده (مرز بین بافت سالم و آلوده) تکه‌هایی از بافت غده جدا و در آب مقطر استریل خرد شد. از سوسپانسیون ایجاد شده دو تا سه لوپ روی محیط کشت YMA (چهار گرم عصاره مخمر، ۱۰ گرم عصاره مالت، چهار گرم دکستروز، ۲۰ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر با pH برابر ۷/۳) به صورت مخطط کشت شد. پتری‌های کشت شده به صورت وارونه در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و پس از گذشت پنج تا هفت روز از تک کلنی‌های رشد کرده انتخاب و تا خالص سازی کامل، روی محیط کشت بالا مخطط شدند (Schaad *et al.*, 2001).

اثبات بیماریزایی روی غده‌های نارس سیب‌زمینی و درون گلدان: بیماریزایی نمونه‌های *Streptomyces* روی غده‌های نارس، با تلقیح باکتری در زخم سطحی ایجاد شده روی غده سیب‌زمینی در شرایط آزمایشگاه و بوته‌های سیب‌زمینی با روش آغشته سازی غده و کاشت در خاک استریل در گلخانه به روش Goyer and Beaulieu (1997) اثبات شد. از آب مقطر استریل

به عنوان شاهد منفی و از *S. scabies* استرین EF – 35 اهدایی دکتر C. Goyer از کشور کانادا به عنوان شاهد مثبت در آزمایش‌های اثبات بیماری‌زایی استفاده شد.

الکتروفورز پروتئین‌های محلول سلولی استرین‌های *Streptomyces* بیماری‌زای سیب‌زمینی: برای مقایسه الگوی پروتئین‌های محلول سلولی استرین‌های *Streptomyces* عامل اسکب سیب‌زمینی، اسپورهای باکتری از کشت باکتری روی محیط PDA به محیط YGM افزوده شد. سپس به مدت ٤٨ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد روی شیکر با ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد. سپس محیط کشت حاوی باکتری در ۵۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. رسوب میسیلیومی باکتری سه بار با بافر فسفات شسته شد و یک لوپ از میسیلیوم باکتری با یک میلی‌لیتر از بافر A (تریس- اسید کلریدریک با pH ۷/۵، ۲۰ میلی لیتر، ای دی تی آ، دو میلی مولار و ۲-مرکاپتواتانول یک درصد) سوسپانسیون شد. برای شکستن دیواره باکتری از لیزوزایم استفاده شد و نمونه‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار داده شدند. سپس به هر نمونه سدیم دو دسیل سولفات (SDS) اضافه شد تا غلظت نهایی به یک درصد برسد. نمونه‌ها به مدت سه دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و پس از آن ۱۰ دقیقه در ١٤٠٠٠ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول رویی به لوله‌های اپندورف منتقل شد و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Paradis *et al.*, 1994). الکتروفورز پروتئین استخراج شده در ژل پلی‌اکریل‌آمید (SDS-PAGE) تخت عمودی به روش اصلاح شده لاملی ۱۹۷۰انجام شد (Lammli, 1970).

تعیین ویژگی‌های مرفولوژیکی و فنوتیپی استرین‌های *Streptomyces* بیماریزای سیب‌زمینی: برای تعیین رنگ کلنی استرین‌ها و تعیین نوع زنجیره اسپور آن‌ها، روی محیط کشت YMEA کشت شدند. یک لامل استریل در کنار خطوط کشت شده در محیط کشت قرار داده شد تا باکتری رشد و روی لامل گسترش پیدا کند. لامل حاوی زنجیره‌های اسپور باکتری با میکروسکوپ نوری و فازکنتراست مشاهده شد.

برای بررسی توانایی استفاده استرین‌ها از قندهای ال-آرابینوز، دی-فروکتوز، دی-گلوکز، مانیتول، رافینوز، سوکرز، دی-زایلوز، رامنوز و مزواینوزیتول، دی-گالاکتوز، سالیسین، اینولین و اسیدآمینه ال-هیدروکسی پرولین پس از تندال کردن (جوشاندن به مدت نیم ساعت در سه

روز متوالی) به میزان یک درصد به محیط پایه حـاوی $(NH4)_2SO_4$ ۲/٦٤ گـرم، KH_2PO_4 ۲/۸۳ گرم، K_2HPO_4 ۵/٦۵ گرم، $MgSO_4$ یک گرم، $CuSO_4$ ٦/٤ میلی‌گرم، $FeSO_4$ ۱/۱ میلی‌گـرم، $MnCl_2$ ۷/۹ میلی‌گرم $ZnSO_4$ ۱/۵ گرم و آگار خالص ۱۵ گرم در یک لیتر آب مقطـر بـا pH٦/۹ اضـافه شد. ویژگی‌های تحمل نمک طعام ٤٪، تحمل تلوریت پتاسیم ۱۰Mg/ml، رشـد در pHهـای ٤، ٤/۵، ۵، ۵/۵، ٦، تحمل تلوریت پتاسیم ۱۰Mg/ml و رشد در دمای ۳۷ درجـه سـانتی‌گـراد نیـز بررسی شد.

از محیط کشت پایه فاقد قند و نیز از استرین‌های استاندارد *Streptomyces scabies* 87.22 و EF–35 به عنوان شاهد استفاده شد. بر اساس رشد یا عدم رشد نتایج تا سه هفته پس از کـشت یادداشت شد (Lambert and Loria, 1989). برای بررسی تولیـد ملانـین از تیـروزین اسـترین‌هـا روی محیط کشت tyrosine agar کشت شدند و نتایج تا ۱۰ روز پس از کشت یادداشت شد.

بررسی تولید تاکستومین توسط استرین‌های *Streptomyces* بیماریزای سیب‌زمینی: بـرای بررسی تولید یا عدم تولید تاکستومین استرین‌های مورد بررسی در محیط کشت oatmeal broth کشت و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ روز روی شیکر قرار داده شدند. مایع حاصل فیلتر شد و تاکستومین تولیدی با استفاده از استون بـه روش King *et al.*, 1989 جـدا و بررسـی شد. استرین‌های عامل اسکب حفره‌ای و معمولی به همـراه *S. scabies* اسـترین EF–35 اهـدایی دکتر C. Goyer از کشور کانادا به عنوان کنترل مثبـت در تولیـد تاکـستومین اسـتفاده شـدند. از تاکستومین A اهدایی دکتر R. King از کشور کانادا و از کونکانامایسین اهدایی دکتر H. Kinashi از کشور ژاپن در آزمایشات کروماتوگرافی استفاده شد. به عـلاوه مقـدار کـافی تاکـستومین از *S. scabies* استرین EF-35 جدا و خالص شد که در کارهای کروماتوگرافی استفاده شد.

نتیجه و بحث

جداسازی و اثبات بیماری‌زایـی اسـترین‌هـای *Streptomyces* عامـل بیمـاری اسـکب سیب‌زمینی: از غده‌های دارای علائم بیماری اسـکب حفـره‌ای، برجـسته و تـوری و زنگـاری باکتری *Streptomyces* جدا شد. بیماری‌زایی نماینده‌هایی از استرین‌های جدا شده روی غده‌های نارس (شکل یک)و بوته‌های سیب‌زمینی (شکل دو) به اثبات رسید.

کنترل　　استرین EF – 35　　سه استرین نماینده جدا شده از استان همدان

شکل ۱– اثبات بیماری‌زایی استرین‌های *Streptomyces* روی غده‌های نارس سیب‌زمینی

Fig1. Pathogenicity of the strains of *Streptomyces* on potato mini tubers

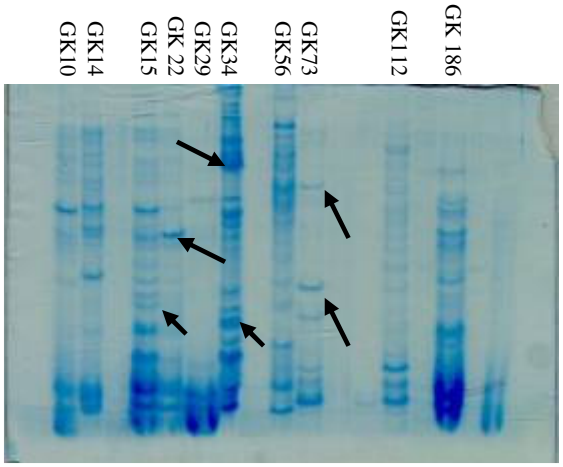
(from left to right: control, *S.scabises* Ef-35 and the isolated strains from Hamedan province)

استرین‌های استرپتومایسس جدا شده از مزارع مختلف سیب‌زمینی استان همدان که بیماری‌زایی آن‌ها روی غده‌های سیب‌زمینی به اثبات رسیده بود در شرایط گلخانه علائم مشابه علائم مزرعه‌ای را روی غده‌های سیب‌زمینی ایجاد کردند. این استرین‌ها سبب کاهش رشد بوته‌های سیب‌زمینی در شرایط گلخانه شدند (شکل ۲).

شکل ۲– اثبات بیماری‌زایی استرین‌های *Streptomyces* روی بوته‌های سیب‌زمینی (به ترتیب ازسمت چپ: کنترل، استرین 87.22، استرین EF – 35 و استرین جدا شده از استان همدان)

Fig.2. Pathogenicity of the strains of *Streptomyces* on potato plants (from left to right: control, *S. scabises*87.22, *S.scabises* Ef-35 and *Streptomyces* sp. isolated strains from Hamedan province)

الکتروفورز پروتئین‌های محلول سلولی استرین‌های *Streptomyces* بیماری‌زای سیب‌زمینی: نقوش پروتئن الکتروفورز شده تعدادی از استرین‌های *Streptomyces* در ژل پلی آکریل آمید در شکل ۳ نشان داده شده است.



شکل ۳- پروفیل پروتئن برخی استرین‌های*Streptomyces* در ژل پلی آکریل آمید؛ باندهای پروتئینی ویژه استرین‌ها با فلش نشان داده شده است

Fig. 3. Protein electrophoretic pattern of some strains of *Streptomyces* on polyacryamide gel; The specific protein bounds shown with arraws

ویژگی‌های مرفولوژیکی و فنوتیپی استرین‌های *Streptomyces* بیماریزای سیب‌زمینی: برخی ویژگی‌های مرفولوژیکی و فنوتیپی استرین‌های *Streptomyces* بیماریزای سیب‌زمینی جدا شده از استان همدان در جدول ۱ درج گردیده است.

تولید تاکستومین توسط استرین‌های *Streptomyces* بیماریزای سیب‌زمینی: الگوی کروماتوگرافی لایه نازک (Thin Layer Chromathography) توکسین‌های استخراج شده از استرین‌های *Streptomyces* عامل بیماری اسکب معمولی سیب‌زمینی و یک استرین عامل اسکب حفره‌ای به همراه تاکستومین خالص بررسی شد.

جدول ۱- برخی ویژگی‌های مورفولوژیکی و فنوتیپی گونه‌های *Streptomyces* عامل جرب سیب‌زمینی

Table 1. Some phenotypical and morphological characteristics of *Streptomyces* species causing potato scab disease

Propertiy or test	**Group 1:** ***S. scabies***	**Group 2:** ***S. acidiscabies***	**Group 3:** ***Streptomyces* sp.**
Spore chain	spiral	Flexous	Flexous
Colony color on YMEA	Grey	Grey-white	Grey
Spore surface	Smooth	Smooth	Smooth
Melanin from tyrosine	+	–	–
D-Glucose	+	+	+
Raffinose	+	–	–
Rhamnose	+	+	+
Sucrose	+	+	+
D-Xyloze	+	+	+
Meso-inusitol	+	+	+
D-Galactose	+	+	+
Salicine	+	–	+
Manitol	+	+	-
Inulin	+	-	+
L-hydroxy proline	+	+	+
Growth on 4% NaCl	+	+	+
Growth on potassium tellurite (10 Mg/m)l	+	+	+
Growth on Ug/ml penicillin 10	+	+	-
pH 4 Growth at	-	+	-
pH 4.5 Growth at	-	+	+
pH 5 Growth at	+	+	+
37°C Growth at	+	+	–

+= استفاده یا تحمل ماده مورد نظر، – = عدم استفاده یا عدم تحمل ماده مورد نظر

+ = positive characteristics, - = negative characteristics

مشاهده صفحات کروماتوگرافی نازک زیر نور معمولی و فرابنفش نشان داد که استرین‌های عامل اسکب حفره‌ای توانایی تولید تاکستومین را ندارند و در روی صفحات نازک کروماتوگرافی باند مربوط به تاکستومین در این استرین‌ها مشاهده نشد. مقیاس Rf برای تاکستومین برابر ۰/۴ و برای کونکانامایسین ۰/۵ بود ولی بخش گیاه‌سوز عصاره‌های باکتریایی دارای Rf بربر ۰/۷ بود. صفحات کروماتوگرافی در Rf باند مربوط به عصاره‌های باکتریایی برابر تاکستومین و کونکانامایسین تراشیده شدند و محتویات سیلیکاژل به وسیله استون استخراج گردید. تلقیح مواد استخراج شده به سیب زمینی نارس نشان داد که این بخش از مواد خاصیت گیاه‌سوزی ندارد که بیانگر عدم تولید تاکستومین و کونکانامایسین در استرین‌های استرپتومایسس عامل اسکب حفره‌ای سیب‌زمینی به عنوان فاکتور بیماریزایی است.

ویژگی‌های مرفولوژیکی و فنوتیپی استرین‌های *Streptomyces* گردآوری شده از مزارع سیب‌زمینی استان همدان مورد بررسی قرار گرفت. رنگ کلنی استرین‌ها روی محیط کشت YMEA خاکستری و سفید مایل به خاکستری بود. اسپورها به صورت زنجیری به فرم مارپیچ یا خمیده (Flexuous) و مستقیم در انتهای میسلیوم‌های هوایی پنج تا ۱۰ روز پس از کشت ظاهر شدند. بیشتر استرین‌های مورد بررسی از دی-فروکتوز، مانیتول، دی-گلوکز، رافینوز، رامنوز، سوکروز، دی-زایلوز، مزواینوزیتول و آرابینوز استفاده کردند. بررسی ویژگی‌های فنوتیپی استرین‌های به کار رفته نشان داد که تمامی‌استرین‌های انتخاب شده وابسته به جنس *Streptomyces* هستند. بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی و الگوی پروتئین الکتروفورز شده، استرین‌ها تنوع زیادی نشان دادند و در سه گروه عمده قرار گرفتند. استرین‌های گروه یک از تیروزین رنگدانه ملانین تولید کردند و به عنوان *S. scabies* مشخص شدند. استرین‌های گروه دوم و سوم به ترتیب به عنوان *S. acidiscabies* و *Sterptomyces* sp. مشخص شدند (Loria *et al.*, 1997; Schaad *et al.*, 2001; Bouchek-Mechiche *et al.*, 2000). تنوع استرین‌های *Streptomyces* عامل اسکب سیب‌زمینی گردآوری شده از شش ایالت آمریکا بر مبنای توالی 16s rDNA نشان داده که حدود ۵۰٪ استرین‌ها *S. scabies* یا *S. europaeiscabiei* تشخیص داده شدند. از این مناطق *S. turgidiscabies* نیز جداسازی شد بقیه ناشناخته بوده ولی در تولید فاکتور بیماری‌زای تاکستومین مشترک بودند (Wanner, 2006). بررسی تنوع ژنتیکی نشان داده

که بیشتر استرین‌های بررسی شده به *S. scabies* شباهت داشته و تعداد کمی از آن‌ها نیز به عنوان *S. acidiscabies* تشخیص داده شدند (St-Onge *et al.*, 2008).

بررسی تنوع ژنتیکی استرین‌های *Streptomyces* عامل اسکب سیب زمینی بر اساس توالی نسبی 16sRNA در شرق کانادا نشان داده که بیشتر استرین‌های بررسی شده به *S. scabies* شباهت داشته و تعداد کمی از آن‌ها نیز به عنوان *S. acidiscabies* تشخیص داده شدند (St-Onge *et al.*, 2008).

بیماری اسکب سیب‌زمینی به علت تنوع در علائم و گونه‌های باکتری عامل بیماری، اختلاف در حساسیت میزبان و شرایط مناسب خاک جهت توسعه بیماری به عنوان یک بیماری باکتریایی کمپلکس مورد توجه قرار گرفته است (St-Onge *et al.*, 2008). تحقیقات پیشین نشان داده که گونه‌های بیماریزا از نظر مرفولوژیکی، فیزیولوژیکی و ژنتیکی اختلاف دارند. در سالیان اخیر به طور پیوسته بذر سیب‌زمینی وارد کشور شده، لذا استرین‌های *Streptomyces* همراه غده‌های آلوده وارد کشور شده وجود تنوع در میان آن‌ها را می‌توان به واردات غده‌های سیب‌زمینی از کشورهای اروپایی نسبت داد چرا که ژن‌های بیماری‌زایی در این باکتری متصل به المان‌های ژنتیکی متحرک بوده که قادرند از استرینی به استرین دیگر انتقال یابند. به دلیل تغییر شرایط آب و هوایی، وضعیت خاک‌های ایران و کمبود آب که شرایط ایجاد بیماری را بهتر فراهم می‌آورد، استرین‌های وارداتی طغیان کرده و شدت بیماری در ایران نسبت به کشور مبداء واردات سیب‌زمینی (هلند) افزایش یافته است. هم‌چنین از تنوع نقوش الکتروفورزی پروتئین می‌توان نتیجه گرفت که گونه‌های متعددی در ایجاد بیماری اسکب سیب‌زمینی در ایران نقش دارند. این استرین‌ها از نظر سیستماتیک متفاوت و تنها وجه اشتراک آن‌ها بیماری‌زایی روی غده‌های سیب‌زمینی است. این پدیده گویای انتقال صفات بیماری‌زایی بین استرین‌هاست که همراه المان‌های متحرک ژنتیکی صورت می‌گیرد.

به دلیل وجود تنوع علائم بیماری اسکب سیب‌زمینی احتمال دارد فاکتورهای بیماری‌زایی تولید شده توسط استرین‌های مختلف که در ایجاد بیماری به طور مستقیم و غیر مستقیم دخالت دارند از نظر نوع و میزان متفاوت باشند. از طرف دیگر تحقیقات نشان داده که مهم‌ترین فاکتور بیماری‌زایی در بین گونه‌های مهم بیماری‌زای *Streptomyces* تاکستومین

است (King *et al.*, 1989, 1991; Goyer *et al.*, 2000). این توکسین از بیوسنتز سلولز جلوگیری کرده و روی غده‌های سیب‌زمینی علائم برجسته و توری و یا زنگاری ایجاد می‌کند (Fry and Loria, 2002; Tegg *et al.*, 2005). تا کنون سه فیتوتوکسین thaxtomins، concanamycin و ترکیبی به نام FD-891 به عنوان فاکتورهای بیماری‌زایی در استرین‌های مختلف *Streptomyces* بیماری‌زای سیب‌زمینی گزارش شده‌اند. از آنجا که هر سه این توکسین‌ها علائم برجسته، توری و یا زنگاری روی غده‌های سیب‌زمینی ایجاد می‌نمایند، به نظر می‌رسد که گونه‌های عامل بیماری اسکب حفره‌ای روی غده‌های سیب‌زمینی فاکتور بیماری‌زایی دیگری غیر از فیتوتوکسین‌های گزارش شده ترشح می‌کنند. در این بررسی نشان داده شد که هیچ کدام از استرین‌های عامل اسکب حفره‌ای سیب‌زمینی تاکستومین یا کونکانامایسین تولید نمی‌کنند. تنها استرین‌های عامل اسکب برجسته، توری و زنگاری از جمله استرین استاندارد EF-35 تاکستومین تولید نمود. بررسی بیشتر این فاکتور جدید بیماری‌زایی در بین استرین‌های عامل اسکب حفره‌ای سیب‌زمینی در مدیریت کنترل بیماری بسیار مؤثر خواهد بود.

سپاسگزاری

نگارنده اول، از دفتر حمایت از پژوهشگران ریاست محترم جمهوری اسلامی ایران به خاطر تأمین بخشی از هزینه‌های این پروژه و نیز از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه بوعلی سینا همدان که بخش دیگر هزینه‌های انجام پروژه مزبور را تأمین نمودند نهایت سپاسگزاری را دارد*.

منابع

ANONYMOUS, 2007. Statistical DATA report of the Ministry of Jihad de agriculture, office of statistical and information technology.

***نشانی نگارندگان:** دکتر غلام خداکرمیان، دکتر دوستمراد ظفری و دکتر محمدجواد سلیمانی‌پری، انتهای بلوار آزادگان، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا، گروه گیاه پزشکی، همدان، ایران.

ARCHULETA, J. G. and G. D. EASTON, 1981. The cause of deep-pitted scab of potatoe. American Journal of Potato 5, 385-392.

BOUCHEK-MECHICHE, K., L. GARDAN, P. NORMAND and B. JOUAN 2000. DNA relatedness among strains of *Streptomyces* pathogenic to potato in France: description of three new species,*S. europaeiscabiei* sp. nov. and *S. stelliscabiei* sp. nov. associated with common scab, and *S. reticuliscabiei* sp. nov. associated with netted scab. International Journal of Systematic Bacteriology, 50, 91–99.

BUKHALID, R. A., S. Y. CHUNG and R. LORIA, 1998. *Nec1*, a gene conferring a necrogenic phenotype, is conserved in plant-pathogenic *Streptomyces* spp. and linked to a transposase pseudogene. Molecular Plant-Microbe Interaction, 11, 660-967.

DANESHVAR, M. H. 2000. Growing vegetables, University of Chamran, Ahvaz press, 400 pp.

FRY, B. A. and R. LORIA, 2002. Thaxtomin A: Evidence for a plant cell wall target. Physiol. Mol. Plant Pathol., 60, 1-8.

GOTO, M. 1992. Fundamentals of bacterial plant pathology. Academic press Inc. Shizuoka japan. 342pp.

GOYER, C. and C. BEAULIEU, 1997. Host range of streptomycete strains causing common scab. Plant Disease 81:901–904.

GOYER, C., P. CHAREST, V. TOUSSAINT and C. BEAULIEU, 2000. Ultrastructural effects of thaxtomin A produced by *Streptomyces scabies* on mature potato tuber tissues. Candian Journal of Botany, 78: 374-380.

HEALY, F. G. and D. H. LAMBERT, 1991. Relationships among *Streptomyces* spp. causing potato scab. International Journal of Systematic Bacteriology, 4: 479-482.

HEALY, F., M. WACH, S. B. KRASNOFF, D. M. GIBSON and R. LORIA, 2000. The txtAB genes of the plant pathogen *Streptomyces acidiscabies* encode a peptide synthetase required for phytotoxin thaxtomin A production and pathogenicity. Molecular Microbiology, 38, 794-804.

HEALY, F., S. B. KRASNOFF, M. WACH, D. M. GIBSON and R. LORIA, 2002. Involvement of a cytochrome P450 monooxygenase in thaxtomin a biosynthesis by *Streptomyces acidiscabies*. Journal of Bacteriology, 184, 2019-2029.

KHODAKARAMIAN, G., O. EINI and H. RAHIMIAN, 2003. Protein and fatty acids profiles of the strains of *Streptomyces scabies* causing potato scab in Iran. Journal of

Agricultural Science, Vol. 34, No. 4: 837-845

KING, R. R., C. H. LAWRENCE and M. C. KELERK, 1991. Correlation of phytotoxin production with pathogenicity of *Streptomyces scabies* isolated from scab infected potato tubers. American Journal of Potato,68: 675-680.

KING, R. R., C. H. LAWRENCE, M. C. CLARK and L. A. CALHOUN, 1989. Isolation and characterization of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies*. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 13, 849-850.

LAEMMLI, V. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriology T4. Nature, 227: 680 - 685.

LAMBERT, D. H. 1991. First Report of additional hosts for the acid scab pathogen *Streptomyces acidiscabies*. Plant Dis. 75: 750.

LAMBERT, D. H. and R. LORIA, 1989. *Streptomyces scabies* sp. nov. nom. rev. International Journal of Systematic Bacteriology, 39:387–392.

LORIA, R., R. BUKHALID and A. BARBARA, 1997. Plant pathogenicity in the genus of *Streptomyces*. Plant Dis., 81: 836-846.

MIYAJIMA, K., F. TANAKA, T. TAKEUCHI and S. KUNINGA, 1998. *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 48: 495-502.

NATSUME, M., M. KOMIYA, F. KOYANAGI, N. TASHIRO, H. KAWAIDE and H. ABE, 2005. Phytotoxin produced by *Streptomyces* sp. Causing potato russet scab in Japan. Journal of General Plant Patholology, 71: 364-369.

NATSUME, M., M. TAKI, N. TASHIRO and H. ABE, 2001. Phytotoxin production and aerial mycelium formation by *Streptomyces scabies* and *S. acidiscabies* in vitro. Journal of General Plant Patholology, 299-302.

PARADIS, E., C. GOYER, N. C. HODGE, R. HOGUE, R. E. STALL and C. BEAULIEU, 1994. Fatty acid and protein profiles of *Streptomycese scabies* strains isolated in Estern Canada. International Journal of Systematic Bacteriology, 44: 561-564

PARK, D. H., J. S. KIM, S. W. KWON, C. WILSON, Y. M. Yu, J. H. HUR and C. K. LIM, 2003. *Streptomyces luridiscabiei* sp. nov., *Streptomyces puniciscabiei* sp. nov. and *Streptomyces niveiscabiei* sp. nov., which cause potato common scab disease in Korea. International Journal of Systematic and Evoloutionary Microbiology 53: 2049-2054.

PAYVAST, Gh. 2002. Olericulture, Agricultural sciences press, 384 pp.

SCHAAD, N. W., J. B. JOENS and W. CHUN, 2001. Laboratory Guide for Identification of

Plant Pathogenic Bacteria. 3rd edit. Amer. Phytopathol. Soc. St. Paul. Minnesota. USA. 398 pp.

ST-ONGE, R., C. GOYER, R. COFFIN and M. FILION, 2008. Genetic diversity of *Streptomyces* spp. causing common scab of potato in eastern Canada. Syst. Appl. Microbiol. 31: 474-84.

TEGG, R. S., L. MELIAN, C. R. WILSON and S. SHABALA, 2005. Plant cell growth and ion flux responses to the *Streptomyces* phytotoxin thaxtomin A: Calcium and hydrogen flux patterns revealed by the non-invasive MIFE technique. Plant Cell Physiology 46, 638-648.

WANNER, L. A. 2006. A survey of genetic variation in *Streptomyces* isolates causing potato common scab in the United States. Phytopathology, 96: 1363-71.

Address of the authors: Dr. GH. KHODAKARAMIAN, Dr. D. ZAFARI and Dr. M. J. SOLAIMANI-e-PARI, Dept. of Plant Protection, College of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.